

# 論文内容要旨

論文題目

肝星細胞活性化における  $\alpha$  型ジアシルグリセロールキナーゼの機能的役割の解析

責任講座： 解剖学第二講座

氏名： 清野 慶子

【内容要旨】(1,200字以内)

肝障害は、ウイルスや細菌による感染、アセトアミノフェンやアルコールの過剰摂取など様々な原因により引き起こされ、障害が長期に及ぶと、組織修復反応として線維化が生じる。このプロセスにおいて、正常時ではビタミンA貯蔵細胞として知られる肝星細胞 (hepatic stellate cells) が、transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) の刺激により protein kinase C  $\delta$  (PKC  $\delta$ ) を介して活性化を受け、筋線維芽細胞 (myofibroblast) 様細胞に分化する。この活性化した肝星細胞によるコラーゲンなどの細胞外基質の過剰産生が線維化の基本的なメカニズムと考えられているが、未だ不明な点も多い。PKC  $\delta$  は脂質二重膜構成成分である diacylglycerol (DG) により活性化を受けることから、DG の代謝が肝線維化過程で重要な役割を果たすことが考えられる。DG kinase (DGK) は、DG をリン酸化してホスファチジン酸に変換する酵素である。これまでに、肝臓では DGK アイソザイムのうち  $\alpha$  型 DGK (DGK  $\alpha$ ) のタンパク発現が報告されているが、同分子の肝障害への関与は未知のままである。

本研究では、DGK  $\alpha$  遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) による肝障害モデルを作製し、DGK  $\alpha$  の機能的役割を精査した。CCl<sub>4</sub> 単回投与 48 時間の急性肝障害モデルの組織学的解析の結果、DGK  $\alpha$ -KO マウスと野生型 (WT) マウスの間の組織損傷の程度に明確な差は認められなかったが、ウェスタンブロット解析の結果、DGK  $\alpha$ -KO マウスにおいて活性化型肝星細胞マーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) のタンパク発現が著しく亢進することが明らかとなった。6 週間の連続 CCl<sub>4</sub> 投与による慢性線維化モデルにおいて、DGK  $\alpha$ -KO マウスでは多くの肝細胞が腫大しており、WT マウスよりも組織損傷が重度であったが、線維化の程度に明らかな差は認められなかった。 $\alpha$ -SMA による免疫組織化学やウェスタンブロット解析の結果、DGK  $\alpha$ -KO マウスでは  $\alpha$ -SMA 陽性細胞が増加し、タンパク発現が著しく亢進していることが明らかとなった。さらに、DGK  $\alpha$ -KO マウスでは PKC  $\delta$  のリン酸化レベルが亢進しており、PKC  $\delta$  による肝星細胞の活性化が亢進している可能性が示唆された。以上の結果より、DGK  $\alpha$  欠損状態では肝星細胞活性化が生じやすいことが示唆された。

次に、動物実験において見出された肝星細胞活性化機構を精査するため、マウス胎児線維芽細胞株である NIH3T3 細胞を用いて、TGF- $\beta$  刺激における DGK の関与を検討した。その結果、DGK 阻害剤 (R59949) 存在下では、TGF- $\beta$  刺激に応答した  $\alpha$ -SMA の発現がコントロールに比べて亢進することが明らかとなった。したがって、TGF- $\beta$  による NIH3T3 細胞の活性化は、DGK  $\alpha$  酵素活性が減弱することにより促進されることが示唆された。また、DGK 阻害剤投与群では、TGF- $\beta$  シグナルの主要経路である Smad2 のリン酸化が亢進しており、TGF- $\beta$  が Smad 経路の亢進を介して  $\alpha$ -SMA の発現を惹起すると考えられた。さらに、DGK 阻害剤投与群では、TGF- $\beta$  刺激非依存的に PKC  $\delta$  のリン酸化の増加も認められた。

以上の結果より、肝星細胞の活性化機構において、DGK の酵素活性低下は、TGF- $\beta$  の主要分子である Smad 経路と PKC  $\delta$  を介する非 Smad 経路の両者を亢進させると考えられた。慢性肝疾患は遷延すると肝線維化へと至るが、その根本的な治療法は未だ確立されておらず、不可逆的に肝硬変の段階へと進行する場合が少なくない。本研究の結果は、DGK  $\alpha$  が肝星細胞の活性化を抑制的に制御する可能性を示唆するものであり、DG-PKC 経路を標的とした治療的介入により肝障害が軽減される可能性がある。


平成 29年 1月 6日


山形大学大学院医学系研究科長 殿


## 学位論文審査結果報告書


申請者氏名：清野 慶子

論文題目：肝星細胞活性化における $\alpha$ 型ジアシルグリセロールキナーゼの機能的役割の解析

審査委員：主審査委員 上野義之  □

副審査委員 本郷誠治  □

副審査委員 浅尾裕信  □

審査終了日：平成 29年 1月 6日 

### 【論文審査結果要旨】

申請者は肝障害/肝線維化モデルとして確立された四塩化炭素投与モデルを用いてPKCを中心とした細胞内伝達系に作用するジアシルグリセロールキナーゼ、とりわけ肝臓に発現する $\alpha$ 型DGKの作用を肝星細胞の活性化という観点から検討した。そのためにin vivoの検討として、急性肝障害モデル、慢性肝障害モデルを用いて、それぞれで四塩化炭素投与後の肝臓での $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)の増加を確認し、それをもって肝星細胞(HSC)の活性化がなされたとして評価した。さらにDGK $\alpha$ のノックアウト(KO)マウスではその活性化が強くなることを見出した。それを実際のPKCのリン酸化が肝臓内で起こっていることを免疫ブロッティングで確認した。これらの知見をin vitroの系で確認するために線維芽細胞株3T3を用いて実際にDGK阻害薬の処理により $\alpha$ -SMAの発現が増強することを確認した。以上により、肝線維化の課程でDGK $\alpha$ が肝臓での線維化進展の機序にDGKを介して関与することが示された。さらに、その細胞内伝達系として、これまで想定されたSmad経路と非Smadの経路の双方が関与する可能性を示した。これは新規の視点であり、今後臨床的に重要となる肝線維化の治療まで視野に入れることが可能な貴重な研究であると考え、十分に博士論文に値すると判断した。

審査会では下記のコメントについて、考察し、必要があれば記載することを提案した。

- 1) 研究全体として、肝臓全体のこと、肝細胞のこと、星細胞のこと、を意味しているか不明朗であるので、きちんと何(どの細胞を)評価、判断しているかを明らかに記載すること。
- 2)  $\alpha$ SMAを肝星細胞の活性化として用いているので、その根拠について文中に明確に記載すること。
- 3) NIH3T3細胞を用いた理論的根拠について、文献を用いて明確に考察すること。
- 4) イミュノブロッティングなど定量化して、統計検定が可能なものについては、できるだけ定量的な検討を加えること。
- 5) 肝組織の図については、適切な弱拡大のものも提示して全体像が俯瞰できるようにすること、さらに中心静脈とされているものが門脈域でないことを再度確認すること。
- 6) in vitroの実験の解釈、とりわけ経時的な結果については記載を慎重に吟味すること。
- 7) TGF $\beta$ がそもそも四塩化炭素投与後にWTとKOで異なっていると実験系の前提が崩壊するので、今後可能であれば検討することなどを考察に記載すること。
- 8) 急性/慢性肝障害モデルなどで可能であれば生化学的に肝障害に差がないか確認すること

(1, 200字以内)