

氏名	いその まさと 磯野 正人
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	甲第35号
学位授与年月日	平成16年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Reverse transformation of hepatic myofibroblast-like cells by TGF β 1/LAP (TGF β 1/LAP による筋線維芽細胞の逆形質転換)
学位論文審査委員	(主査) 汐田 剛史 (副査) 箸本 英吉 佐藤 建三

学位論文の内容の要旨

はじめに

肝臓は自己再生能力の強い臓器であるにもかかわらず、連続した損傷・治癒反応の繰り返しによって慢性的な肝障害が継続され、線維化が引き起こされている。この肝線維化において極めて重要な役割を担っているのは肝星細胞 (HSC) であり、このHSCは活性化されると筋線維芽細胞 (MF B) に形質転換され、コラーゲン等の細胞外マトリックスの産生を促進することにより線維化が引き起こされる。また、HSCの活性化及び細胞外マトリックスの産生には腫瘍増殖因子 β 1 (TGF β 1) が重要な役割を果たしている。そこで本研究において、肝線維化に関わるTGF β 1の発現抑制が、MF Bの形質転換や増殖能に及ぼす効果を解析する目的で、四塩化炭素投与により肝線維化を起こしたラットよりMF B様細胞株 (MF B Y 2) を樹立した。さらに活性型TGF β 1を潜在型にする働きをもつ latency-associated peptide (LAP) 遺伝子をアデノウイルスベクターを介してMF B Y 2細胞に導入することによりTGF β 1/LAPの役割を検討した。

方法

四塩化炭素投与により線維化を起こしたラットの肝臓よりMF B Y 2細胞株を樹立した。アデノウイルスベクターにTGF β /LAP遺伝子cDNAを挿入した組換えアデノウイルスを作製した。この組換えアデノウイルスをMF B Y 2細胞に感染後、3日間経時的に細胞数を数えた。また、アデノウイルス感染3日後の細胞よりRNAを回収して逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を行うと同時に、 α -smooth muscle actin (α SMA)・glial fibrillary acidic protein (GFAP)・コラーゲンそれぞれに特異的な抗体で免疫染色を行った。さらに、アデノウイルス感染2日後にビタミンAの1つであるレチノイン酸を添加し、24時間後に細胞にレチノイン酸が取り込まれているかを、Oil red-O染色により確かめた。

結 果

四塩化炭素投与により線維化を起こしたラットの肝臓より得られた線維芽細胞は、神経細胞接着分子 (N-CAM)・ α SMA・細胞外マトリックスの発現パターンより、HSCより形質転換したMF Bと同定された。

非感染及びLacZアデノウイルス感染のMF BY 2細胞は正常に増殖したが、LAP遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを感染したMF BY 2細胞は、ウイルス量依存的にその増殖は抑えられた。また、この増殖抑制は肝癌細胞には影響が無かった。

LAPを強制発現したMF BY 2細胞では、コントロール群と比べて、TGF β 1や細胞外マトリックスのmRNA発現が抑制されているのと同時に、コラーゲンタンパクの発現も抑えられていた。

コントロール群のMF BY 2細胞では α SMAが発現しており、GFAPの発現とレチノイン酸の蓄積は見られていなかった。しかし、LAPを強制発現したMF BY 2では逆のパターンを示した。

考 察

TGF β 1の影響を受けない肝癌細胞ではLAPの強制発現は効果を示さないが、MF BY 2では細胞増殖抑制、コラーゲン等の細胞外マトリックスの発現抑制、さらにはTGF β 1自身の発現が抑制された。この事は、LAPの強制発現がTGF β 1の自己分泌による活性化を抑制したものである事が示唆される。また、それだけではなく、 α SMA発現の消失・GFAPの発現・レチノイン酸の蓄積より、MF Bの表現型を示していた細胞がLAPの強制発現によりHSCの表現型へと逆形質転換したものと考えられる。

結 論

アデノウイルスベクターを介したLAP遺伝子導入により、線維化反応を抑えただけでなく、MF BからHSCへの逆形質転換が認められた。これらの事より、LAPがTGF β 1の過剰発現による線維症の治療法の一つとして期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は肝線維化に関わるTGF β 1の発現抑制が、MF Bの形質転換や増殖能に及ぼす効果を解析する目的で、四塩化炭素投与により肝線維化を起こしたラットよりMF B様細胞株 (MF BY 2)を樹立し、さらに活性型TGF β 1を潜在型にする働きをもつLAP遺伝子をアデノウイルスベクターを介してMF BY 2細胞に導入することによりTGF β 1/LAPの役割を検討したものである。その結果、コントロール群と比べてLAPを発現させたMF BY 2細胞は、ウイルス量依存的に増殖は抑えられ、TGF β 1や細胞外マトリックスの発現が抑制されていたことから、LAPによる線維化反応の抑制が証明された。さらには、LAPを強制発現したMF BY 2細胞では、コントロール群と比べて、TGF β 1や細胞外マトリックスのmRNA発現が抑制されているのと同時に、コラーゲンタンパクの発現も抑えられていたことから、LAPによりMF BからHSCへと逆形質転換したことが証明された。本論文の内容は、MF BからHSCへの逆形質転換においてTGF β 1抑制因子の関与を示唆するものであり、未だ有効な治療法が確立されていない線維症の治療法の一つとして期待される事を示唆しており、明らかに学術水準を高めたものと認める。