

平成 21 年 1 月

杉原誉明 学位論文審査要旨

主 査 山 田 一 夫
副主査 林 一 彦
同 村 脇 義 和

主論文

Extracellular matrix metabolism-related gene expression in bile duct ligation rats

(胆管結紮ラットでの細胞外マトリックス代謝関連遺伝子の発現)

(著者：杉原誉明、孝田雅彦、的野智光、前田和範、山本了、植木賢、村脇義和)

平成21年 Molecular Medicine Reports 掲載予定

学位論文要旨

Extracellular matrix metabolism-related gene expression in bile duct ligation rats (胆管結紮ラットでの細胞外マトリックス代謝関連遺伝子の発現)

胆管結紮ラットが胆汁うっ滞性肝線維化モデルとして広く使用されているが、この線維化過程でのサイトカイン、細胞外マトリックス合成系及び分解系の変動を詳細に長期間観察した報告は少ない。本論文では胆管結紮後42日間の長期にわたり生存できる胆管結紮モデル動物実験系を確立し、肝臓における細胞外マトリックス代謝関連の遺伝子発現を経時的に検討した。

方法

Wistar系雄性ラット (200 g) を用いて総胆管を2ヵ所で結紮後、その間を切断した。結紮後10日、21日、42日で屠殺し、血清および肝臓を採取した。細胞外マトリックス代謝関連遺伝子transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1)、connective tissue growth factor (CTGF)、procollagen- α 1 (Collagen-I)、matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)、MMP-13、tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) の発現は、TaqMan法を用い real time RT-PCRで定量した。さらに、胆管結紮10日後のラット肝より totalRNA を抽出後、逆転写により cDNA を作製し、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の検討を行った。肝組織中の TGF- β 1 の蛋白量は、酸エタノールで抽出後、ELISA法で測定をした。また、肝ハイドロキシプロリン量は、Stegemann & Stalderの方法に従って比色定量した。

結果

胆管結紮後、生化学的 (血漿総ビリルビン値、AST、ALT、ALP活性、および肝ハイドロキシプロリン量)、また形態学的 (Azan-Mallory 染色光顕) に肝線維化は経時的に進行し、42日の時点では肝硬変へ進展した。Collagen-I mRNA、線維化促進系サイトカイン TGF- β 1 の mRNA は、胆管結紮後10日より増加し、肝 TGF- β 1 蛋白量は経時的に増加し、42日時点では著明に上昇した。また、CTGF の mRNA の発現も肝 TGF- β 1 蛋白量とほぼ同様な変動を認めた。一方、細胞外マトリックス分解酵素である MMP-13 と MMP-2 の mRNA の発現は、結紮後10日から21日にかけて最大となり、42日には減少する傾向を認めた。MMPの阻害因子である

TIMP-1のmRNA の発現は21日に有意に増加し、その発現は42日まで維持された。DNAマイクロアレイの結果では10日時点でcalgranulin B、 solute carrier family 34、 thymosin、 tubulinの順で11遺伝子が対照群と比べて30倍以上の発現増加を認めたと、線維化に関連したサイトカインは含まれていなかった。

考 察

従来の胆管結紮ラットでの肝線維化過程の検討は結紮後比較的短期での変化を検討したものであったが、本論文では42日間という長期間にわたって検討した。これまでの報告では、collagen-I mRNAの発現上昇は胆管結紮3日後より認められているが、今回の検討により結紮後42日までその発現は増加していることが明らかとなった。さらに、線維化促進系サイトカインであるTGF- β 1 mRNAの発現増加は、これまでの報告と同様に結紮後初期から認められ、10日から42日まで長期にわたって維持され、TGF- β 1蛋白発現も経時的に著大な増加を認めた。TGF- β 1により誘導されるCTGFのmRNA発現も21日から42日にかけて増加しており、両サイトカインが胆汁うっ滞性の肝線維化過程で重要な働きをしていることが示された。一方、細胞外マトリックス分解酵素のMMP-13およびMMP-2のmRNAの発現は、胆管結紮後早期では増加するが、肝硬変期では低下した。逆に、MMPの阻害因子TIMP-1 mRNAは経時的に発現が増加していた。従って、胆管結紮ラット肝では線維化促進系サイトカインの上昇とともにコラーゲン合成系が増加し、これと相反して分解系が抑制され、肝線維化が効率よく進行することが示唆された。

結 論

胆管管結紮後42日では肝硬変に進展しており、TGF- β 1、CTGFとともにCollagen-Iの発現が増加した。一方MMP-13、MMP-2の発現減少、TIMP-1の発現増加が認められた。