

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	杉山 晶子
学位授与の条件	学位規則第4条第1項2項該当		
論文題目 Periostin promotes hepatic fibrosis in mice by modulating hepatic stellate cell activation via α_v integrin interaction (ペリオスチンはインテグリン α_v との相互作用を介し肝星細胞を活性化することで肝線維化を促進する)			
論文審査担当者			
主査	教授	茶山 一彰	印
審査委員	教授	大段 秀樹	
審査委員	講師	相方 浩	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>ペリオスチンは細胞外マトリックス蛋白である。細胞外マトリックスは組織の構造維持のほか、細胞の増殖や遊走、分化など様々な生理機能に寄与している。その中でペリオスチンは肺や心臓の線維化や皮膚の創傷治癒に重要な役割を果たしていることが知られており、肝臓においては硬化性変化を伴うことの多い肝内胆管癌での発現亢進が報告されている。しかし、肝臓におけるペリオスチンの役割は未だ明らかになっていない。本研究では肝線維化におけるペリオスチンの機能を明らかにした。</p> <p>結果は以下のように要約される。</p> <p>1) 肝線維化モデルマウスにおけるペリオスチンの発現性についての調査では、肝細胞障害性肝線維化モデル（四塩化炭素 腹腔内投与；CCl₄）と、胆汁うっ滞性肝線維化モデル（総胆管結紮；BDL）の両群において、転写及び翻訳レベルでペリオスチンの発現誘導が観察された。</p> <p>2) ペリオスチンが肝臓においても線維化を進展させる因子であると考え、肝星細胞活性化におけるペリオスチンの生理機能とそのメカニズムを解明することを目的とし、<i>in vitro</i> の検討を行った結果、SD ラットより単離した初代培養肝星細胞、および、ヒト不死化肝星細胞株（LX2）の両者において、ペリオスチンの発現は肝星細胞の活性化に伴い、経時的に上昇した。また逆に、LX2 に対し siRNA による内因性ペリオスチンの発現抑制を行うと、活性化・線維化マーカーである α SMA、Collagen1α1 (Coll1α1) の有意な発現低下が認められた。以上の結果は、肝星細胞の活性化に対するペリオスチンの関与を強く示唆した。</p> <p>3) ペリオスチンが肝星細胞の遊走能・接着能へ与える影響について検討するため、LX2 に対し外因性にペリオスチンを作用させ検討を行った結果、Scratch assay、Migration assay の2種の遊走能試験を実施したところ、ペリオスチンによる肝星細胞の遊走能亢進作用が確認された。また、細胞接着試験を行うとペリオスチンは濃度依存性に LX2 の細胞接着能を亢進し、この変化に伴い、α SMA、Coll1α1 および、内因性ペリオスチンの著明な発現誘導が認められた。以上より、ペリオスチンはオートクライン機構により肝星細胞の活性化維持・増幅と遊走能の亢進に寄与している可能性が示</p>			

唆された。

4) ペリオスチンはインテグリンのリガンドとして報告されているが、インテグリンのどのサブユニットが肝星細胞において線維化を制御しているかは必ずしも一致した見解は得られていないため、ペリオスチン受容体として報告されているインテグリンのうち $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha v \beta 5$ の中和抗体および siRNA による αv インテグリン阻害や発現抑制を行い、細胞接着能、活性化・線維化マーカーへの影響を解析した。その結果、 $\alpha v \beta 5$ の中和抗体の使用により有意な接着能の低下を認め、さらに $\alpha v \beta 3$ 中和抗体の併用により相加的な接着阻害効果を認めた。また LX2 におけるインテグリン αv の発現抑制は、ペリオスチンへの細胞接着を抑制し、 α SMA、Colla1、TIMP1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 1) の有意な発現低下を認めた。このことより、ペリオスチン-インテグリン αv 相互作用が肝星細胞の活性化・線維産生機能の制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

5) 肝線維化におけるペリオスチン発現の必要性を確認するため、ペリオスチン欠損マウスに対し CCl_4 、TAA (thioacetamide)、DDC (3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine) を投与し、肝線維化の減弱が認められるか野生型マウス群と比較することで検討を行った。病態の異なるマウス肝線維化モデルである、慢性肝細胞障害性モデル (CCl_4 ・TAA) および胆汁うっ滞性肝障害性モデル (DDC) の全ての群において、野生型マウスではペリオスチンの発現誘導とコラーゲンの蓄積を伴う高度な肝線維化進展が認められた。一方、ペリオスチン欠損マウスでは肝線維化は軽度にとどまり Colla1、TIMP1、 α SMA の発現が抑制された。また、DDC 投与群においては、野生型と比較し胆管上皮細胞のマーカーである CK19 の有意な発現抑制が認められ、組織上でも明らかな胆管増生の減少が観察された。

以上の結果から、本論文は細胞外マトリックス蛋白ペリオスチンが肝線維化病態時に発現誘導され、 αv インテグリンを介し肝星細胞を活性化することで肝線維化を促進することを明らかにするとともに、肝線維化治療における可能性を示した点で高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。