

	なかつか ひでき
氏 名	中塚 英樹
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博(医)第139号
学位授与の日付	平成18年 9月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	Shear stress induces hepatocyte PAI-1 gene expression through cooperative Sp1/Ets-1 activation of transcription (ずり応力による肝細胞 PAI-1遺伝子発現は、Sp1/Ets-1 の転写活性を介して誘導される)
論文審査委員	主査 教授 青 柳 豊 副査 教授 畠 山 勝 義 副査 教授 木 南 凌

#### 博士論文の要旨

肝切除や肝移植には残存肝や移植肝の良好な肝再生が重要な意味を持つが、そのメカニズムは十分に解明されていない。肝切除後、遺伝子レベルではごく早期から肝再生へ向けた変化が起きている。これまでサイトカインや増殖因子といった液性因子の観点から数多くの研究がなされてきたが、なにが肝再生のトリガーとなっているのかの決定的因子は不明である。一方で肝切除後残存肝や部分肝移植グラフトには流入門脈血の増加が起こる。肝細胞表面は、Disse 腔に面しており、類洞内皮細胞に存在する篩板を通じて門脈血が Disse 腔に供給されている。肝切除直後から類洞内皮細胞に存在する篩板の径が拡大することと、類洞を流れる門脈血流量が増加することで、肝細胞表面はより大きな血流によるストレスに晒されると考えられる。この血流に起因する流れずり応力の変化が肝細胞へ直接作用して何らかの遺伝子変化を起こしている可能性がある。これまで門脈血流によるメカニカルストレスの肝再生への関与についての研究はほとんどなされていない。

切除後ごく早期から残存肝には immediate-early gene といわれる遺伝子 (plasminogen activator inhibitor 1, early growth response-1, phosphatase of regenerating liver-1 など)の発現変化が起きている。なかでも plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)は肝切除後 2-3 時間から発現増加が認められ、肝細胞に強く発現していることが確かめられている。*in vitro* では IL-1, glucocorticoid, TGF- $\beta$ などで肝細胞の PAI-1 発現が起こると報告されている。我々は残存肝への流入血流の増加が immediate-early gene の発現を誘導しているのではないかと考えた。そこで本研究では血流により生ずる物理的なずり応力が、肝細胞での PAI-1 遺伝子発現を誘導しているかどうかを調べた。

培養液の流れ負荷装置を用いてラット培養肝細胞に流れずり応力を作用させると、3時間で PAI-1 mRNA は増加し始め、ピークをむかえた後徐々に減少した。ヒト肝癌細胞およびマウス培養肝細胞でも同様の変化が確認された。培養液の粘性を変化させて流れ負荷をかけると、PAI-1 遺伝子発現はずり速度 (shear-rate)ではなくずり応力 (shear-stress) 依存性であった。ELISA では蛋白レベルでの発現増加も確認された。また Nuclear run-on assay では PAI-1 転写活性は亢進していた。Actinomycin D を用いて転写を止め、competitive PCR で定量してみると mRNA の安定性は影響されなかった。これらからずり応力による PAI-1 遺伝子発現は mRNA の安定性亢進ではなく、転写活性の亢進によるものであることが示された。

さらにルシフェラーゼアッセイにより 1kb の PAI-1 プロモーター領域の機能解析を行った結果、転写開始点から 278bp 上流までの領域に含まれる転写因子 Sp1 と Ets-1 の結合部位が、流れずり応力依存的な PAI-1 の転写活性に必須であることが示された。Sp1 と Ets-1 結合モチーフの両方に変位を導入したところ、basal レベルの PAI1 転写活性を抑制し、さらに流れずり応力応答が消失した。片方の変異を導入しても、そのような結果は得られなかった。ゲルシフトアッセイおよびクロマチン免疫沈降法により、Sp1 および Ets-1 が静的条件下でそれぞれのコンセンサスモチ

ープに結合しており、流れずり応力に応答してその結合量が増加することが明らかとなった。これらから肝細胞は流れずり応力応答性を有し、流れずり応力によって Sp1 と Ets-1 の協調的な作用を介した転写活性調節を受けることが明らかとなった。

以上より、肝細胞は各種サイトカインや増殖因子、ホルモンに反応するだけでなく、血流により生ずる物理的な力であるずり応力によって遺伝子発現調節を受けている可能性がある。生体においても門脈血流の急激な増加が肝細胞に直接作用し、PAI-1 遺伝子発現を誘導している可能性が示唆された。今後は肝再生における PAI-1 の生理的意義を明らかにするためにさらなる研究が必要である。

(論文審査の要旨)

切除肝における門脈血流メカニカルストレスの関与解明を目的に、PAI (plasminogen activator inhibitor)-1 遺伝子を始めとする immediate-early gene 発現の検討を行った。

流れ負荷装置を用いてラット培養肝細胞に流れずり応力を作用させると、3 時間で PAI-1 mRNA は増加し始め、ピークをむかえた後徐々に減少した。ヒト肝癌細胞およびマウス培養肝細胞でも同様の変化が確認された。また、培養液の粘性を変化させて流れ負荷をかけると、PAI-1 遺伝子発現は“ずり速度”ではなく“ずり応力”依存性であった。さらに、PAI-1 プロモーター領域の機能解析を行った結果、転写開始点から 278bp 上流までの領域に含まれる転写因子 Sp1 と Ets-1 の結合部位が、流れずり応力依存的な PAI-1 の転写活性に必須であることが示された。すなわち、流れずり応力によって Sp1 と Ets-1 の協調的な作用を介した転写活性調節を受けていることが明らかとなった。

以上本論文は、切除肝における門脈血流による“ずり応力”の肝再生への関与のメカニズムを遺伝子レベルで明らかにしたものであり、この点に学位論文としての価値を認めた。