OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Secreted frizzled-related protein 5(Sfrp5) decreases hepatic stellate cell activation and liver fibrosis
Author(s)	茶谷, 徳啓
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51905
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	茶谷　徳啓
論文題名 Title	Secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) decreases hepatic stellate cell activation and liver fibrosis （Sfrp5は肝星細胞の活性化と、肝線維化進展を抑制した）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

1990年台後半より肥満と肝線維化について多くの報告がなされ、肥満が肝線維化を促進することが疫学的にも明らかになってきている。近年Wntシグナルを阻害するタンパクとして既知のSfrp5が新規アディポサイトカインであることが示された。Wnt5aおよびその受容体Frizzled2（Fz2）は肝線維化過程において促進的な役割を果たすことがこれまでに示されており、Sfrp5はWnt5aの作用を阻害することが知られている。そこで我々はアディポサイトカインであるSfrp5の肝線維化過程における役割を検討した。

〔方法 (Methods)〕

1）肝線維化において中心的な役割を果たす肝星細胞（HSC）をC57BL6Jマウス（WT）の肝臓よりコラゲナーゼ灌流法にて分離培養の上、Wnt5a、Sfrp5を添加した際の増殖能（WST assay）、遊走能（wound healing assay）を*in vitro*で検討した。HSCにおけるシグナル伝達について、Fz2のノックダウン（siRNA法）およびJNK阻害剤（SP600125）を用いて増殖能（WST assay）、遊走能（wound healing assay）について検討した。またシグナル伝達経路についてJNK、GSK-3βのリン酸化、β-catenin（ウェスタンブロット法）で評価した。2）Sfrp5-KOマウス（KO）の8週齢雄を用いて*in vivo*でのSfrp5の作用について検討した。対照として野生型（WT）マウスを用いた。四塩化炭素（CCl_4）（0.5ml／kg bw）単回腹腔内投与モデルにおける肝障害を血漿ALT値（ELISA法）、肝組織染色（H/E染色）、血漿Wnt5a値（ELISA法）および肝Wnt5a遺伝子発現（real-time RT-PCR法）で評価した。CCl_4（0.5ml／kg bw）を週2回の6週投与する線維化モデルマウスを8から12週齢雄のKOマウスとWTマウスで、また対照としてolive oil投与マウスも同様に8から12週齢雄のKOマウス、WTマウスで作成し、線維化（sirius red染色、α-SMA免疫染色）を評価した。

〔成績（Results)〕

1）HSCにWnt5aを作用させることで増殖能、遊走能の亢進を認め（$p<0.05$）、それらはSfrp5を作用させることで完全に抑制された（$p<0.05$）。またHSCに対するWnt5aの効果は、受容体であるFz2のsiRNA用いた検討、および、Wnt5aのnon-canonical pathwayシグナル伝達の下流にあるJNKの阻害剤（SP600125）を用いた検討でも、増殖能および遊走能は同様に抑制された（$p<0.05$）。Wnt5aのHSCにおける経路はcanonical pathwayであるβ-catenin経路とは独立し、JNKのリン酸化のみが有意に上昇し（$p<0.005$）、その効果はSfrp5により抑制された（$p<0.05$）。2）肝障害の検討ではH.E染色および血漿ALT値ではWT、KOマウス両群間に差を認めなかったが、各群ともに血漿Wnt5a値および肝臓Wnt5a遺伝子発現は投与後有意に著明な上昇を認めた（$p<0.05$）。肝線維化モデルでの検討では、CCl_4投与群において、KOマウスの肝組織中のsirius red陽性領域およびαSMA陽性領域がWTマウスと比較し有意に増加していた（$p<0.05$）。CCl_4投与によるWnt5aの上昇が繰り返されることで肝臓線維化が進展し、KOマウスではSfrp5が欠損しているため肝線維化進展抑制効果が弱まったためこの差が生じたものと考えられる。

〔総　括(Conclusion)〕

Sfrp5はWnt5aによるHSCの増殖、遊走、JNKリン酸化を抑制した。Sfrp5の欠損は四塩化炭素誘発マウス肝線維化を増悪した。Sfrp5によるWnt5a作用阻害は新たな肝線維化の治療標的となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　茶谷　徳啓

論文審査担当者	（職）	氏　名
主　査	大阪大学教授	竹原徹郎
副　査	大阪大学教授	下村伊一郎
副　査	大阪大学教授	森井英一

論文審査の結果の要旨

1990年代後半より、肥満が肝線維化を促進することが疫学的に明らかになってきている。近年、Secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5)が、脂肪組織より分泌されるアディポサイトカインであることが報告された。このSfrp5はWnt経路のうちnon-canonical pathwayで主要な役割を果たすリガンドWnt5aの働きを阻害することが知られている。肥満により脂肪組織のSfrp5発現が低下することが報告されており、Sfrp5の肝線維化進展に及ぼす作用を解明することは肥満の肝線維化進展に及ぼす影響を解明する上で重要な課題である。本論文はSfrp5の肝線維化過程における役割を、Sfrp5欠損マウスと肝線維化において中心的役割を果たす肝星細胞を用いて詳細に解析したものである。Wnt5aは*in vitro*の検討で肝星細胞の増殖能、および遊走能を亢進させ、Sfrp5はこの作用を完全に抑制した。またマウスを用いた*in vivo*の検討では、四塩化炭素投与による急性肝障害時に肝臓におけるWnt5a遺伝子発現およびその血中濃度が著明に上昇することがわかった。四塩化炭素を反復投与し線維化を誘発した慢性肝障害モデルにおいて、Sfrp5欠損マウスは野生型マウスと比較し肝線維化が増悪していることを明らかにした。

これらの研究の結果はSfrp5によるWnt5a阻害作用が、肝線維化に対して保護的に働くことを明確に示したものである。さらに本研究はSfrp5によるWnt5a阻害が新たな肝線維化の治療標的となる可能性を示した優れた論文であり、学位に値すると考える。