

## B16 細胞外マトリックスからのシグナル伝達を介した肝臓星細胞の形態変化

小嶋直介<sup>1</sup>, 佐藤充<sup>1</sup>, 三浦光隆<sup>1</sup>, 今井克幸<sup>1</sup>, 福井泰久<sup>2</sup>, 妹尾春樹<sup>1</sup> (<sup>1</sup>秋田大・医・解剖第二, <sup>2</sup>東京大・院・農学生命科学)

〔目的〕肝臓星細胞(HSC)は, 培養基質の種類に応じて著しい形態変化を示す。本研究では, その分子機構を明らかにするため, 細胞外マトリックス成分とインテグリンとの結合を介する細胞内シグナル伝達機構と細胞骨格構築との関係について調べた。

〔対象ならびに方法〕ヒト肝生検組織からコラーゲナーゼ振盪法/Percoll 密度勾配遠心法により分離し, 継代培養した HSC を I 型コラーゲン, フィブロネクチン, マトリゲル, ポリスチレンなどを培養基質として培養し, HSC の形態変化および細胞骨格 (F-アクチンおよび微小管) 構築の変化を調べた。また, 各種シグナル伝達阻害剤を用いて, 細胞外マトリックス成分による HSC の形態変化および細胞骨格構築変化に関与するシグナル伝達機構について検討し, さらに, PI 3-キナーゼの関与を明らかにするため, HSC に dominant negative および constitutively active PI 3-キナーゼ プラスミドベクターを導入し, その影響を調べた。

〔結果〕HSC は, ポリスチレン上ではストレスファイバーを発達させ, よく伸展した形態を示すが, 間質型コラーゲンゲル上またはゲル内で培養すると多数の細胞突起を伸ばすように変化した。細胞突起は, 蛋白質キナーゼ, 低分子量 G 蛋白質, PI3-キナーゼ, 蛋白質ホスファターゼなどによるシグナル伝達機構を介し, 微小管構築に依存して伸長することが明らかになった。

〔考察〕ポリスチレン上および単量体コラーゲン上でよく伸展し, ストレスファイバーが発達した HSC では, 形態の形成・維持に F-アクチン構築が重要であるが, 一方, コラーゲンゲル上またはゲル内で多数の突起を伸ばした HSC では, 微小管構築が重要であり, シグナル伝達機構も異なることが示唆された。

### Morphological Change in Cultured Hepatic Stellate Cells through Signaling from Extracellular Matrix

Naosuke Kojima<sup>1</sup>, Mitsuru Sato<sup>1</sup>, Mitsutaka Miura<sup>1</sup>, Katsuyuki Imai<sup>1</sup>, Yasuhisa Fukui<sup>2</sup>, Haruki Senoo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. Anatomy, Akita Univ. Sch. Med.,

<sup>2</sup>Lab. Biol. Chem., Faculty Agr. Life Sci., Univ. Tokyo

## B17 蹄葉炎罹患馬の葉状層表皮-真皮結合領域における VII 型コラーゲン及び XVII 型コラーゲンの解析

○桑野睦敏<sup>1</sup>・新井克彦<sup>2</sup>・吉原豊彦<sup>1</sup>

(JRA 競走馬総合研究所・臨床医学研<sup>1</sup>、東京農工大学・硬蛋白研<sup>2</sup>)

〔目的〕近年, 馬で発症する蹄葉炎と呼ばれる難治性蹄疾患は, 蹄表皮組織における後天的な基底膜異常が初発病態ではないかと疑われている。そこで, アンカリングフィブリルの主成分として VII 型コラーゲン (COL7)、ヘミズモグロブリンの構成成分として XVII 型コラーゲン (COL17) に着目して, 形態学的解析を行った。

〔材料と方法〕材料として, 正常馬 1 例および蹄葉炎を発症した競走馬 2 例の前肢蹄部の葉状層を用いた。採材後直ちに液体窒素で急速凍結し, また, 組織の一部をメタノール液にて固定した。凍結材料からポリ(A+)RNA を調製した後, ホルムアルデヒド変性ガロースゲルにより RNA を分離し, ジゴキシン (DIG) 標識マウス COL7・cDNA およびマウス COL17・cDNA をプローブとしたノザンプロット・ハイブリダイゼーションを行なった。一方, メタノール液固定材料からパラフィン切片を作製し, 抗ヒト COL7モノクローナル抗体による免疫組織化学的検索ならびに DIG 標識 COL7 および COL17RNA プローブを用いた In Situ Hybridization (ISH) を行った。

〔結果〕ノザンプロットの結果, COL17 mRNA は約 5.6kb のシグナルとして観察され, 正常蹄組織に比べ, 発症 2 週間後の馬蹄では発現の低下が見られた。一方, 抗 COL7 抗体による免疫染色の結果, 正常葉状層では陽性領域が全基底膜に一致して観察されたが, 発症葉状層では複数の表皮葉の決まった側面の基底膜で COL7 陰性を示した。ISH の結果, COL7 および COL17 mRNA は同様の発現動態を示した。すなわち, COL7 陽性基底膜に接する基底細胞と比べると, COL7 陰性基底膜に接する基底細胞のシグナルは, 発症後 2 週間で弱く, 発症後 4 週間で強く観察された。

〔考察〕蹄葉炎に罹患した葉状層において COL7 および COL17 の発現異常が観察されたことから, 蹄葉炎の発症と葉状層基底細胞の機能障害との関連性が示唆された。

### Unusual expression of type VII and type XVII collagen in Equine Laminitis

Atsutoshi Kuwano<sup>1</sup>, Katsuhiko Arai<sup>2</sup>, Toyohiko Yoshihara<sup>1</sup> (Clinical Science & Pathobiology Division., JRA Equine Research Institute<sup>1</sup>, Department of Tissue Physiology., Tokyo University of Agriculture and Technology<sup>2</sup>)