

氏名(本籍)	わた なべ もと のぶ 渡 辺 基 信 (茨城県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 4860 号		
学位授与年月日	平成 20 年 11 月 30 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Platelets contribute to the reduction of liver fibrosis in mice (血小板はマウスにおける肝線維症の軽減に寄与する)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	野 口 雅 之
副 査	筑波大学准教授	医学博士	正 田 純 一
副 査	筑波大学講師	医学博士	安部井 誠 人
副 査	筑波大学講師	博士(医学)	長谷川 雄 一

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

肝硬変の原因にはC型肝炎, アルコール性肝障害, 非アルコール性脂肪性肝炎などがある。肝硬変に対する根治的治療は現在肝移植のみであるが, 術後再感染などの合併症があり, その効果は完全ではない。近年, 従来不可逆性であると考えられてきた肝硬変が適切な治療により改善するとの報告がなされ, 一部の研究成果が臨床応用されつつある。肝硬変は病態として血小板減少症および脾臓腫大を示すが, 肝線維化における血小板の作用は未だ不明である。血小板はPDGFやHGFなどの様々な増殖因子を含有しており, これまでに *in vivo* および *in vitro* モデルにおいて血小板が著明な肝再生促進効果を有する事が報告されている。本研究は, 肝線維化状態における血小板の肝再生促進効果, および肝線維化抑制効果をマウス肝線維症モデルを用いて検討した。

(対象と方法)

6週齢のC57BL/6雌性マウスを用いて四塩化炭素(CCl₄) 1ml/kgを週2回, 8週間腹腔内投与し肝線維化モデルを作成した。血小板増加状態における肝線維化抑制効果の検討のためにマウスを以下のように群設定した。i) コントロール群: 生理食塩水を8週間投与した。ii) トロンボポエチン(TPO)群: 生理食塩水投与に加えて第5週目より8週目までトロンボポエチンTPO(PEG-rHuMGDF, 0.5 μg/body)を週一回, 腹腔内投与した。iii) 線維化群: CCl₄を8週間投与した。iv) 線維化+血小板増加群: CCl₄投与に加えて第5週目より8週目までTPO(PEG-rHuMGDF, 0.5 μg/body)を週一回, 腹腔内投与した。v) 線維化+脾摘群: CCl₄投与に加えて第5週目に全身麻酔下に脾臓摘出術を施行した。各群ともに5週目・8週目に眼窩採血し末梢血血小板数を測定した。8週目にマウスを犠牲死させ, 肝再生評価として肝体重比, 肝組織免疫染色による肝実質細胞のMitotic index, PCNA labeling index, 肝障害及び肝線維化評価として血清アルブミン・GPT濃度, 肝組織シリウスレッド染色による肝線維化面積比, 肝組織中におけるヒドロキシプロリン量, 肝線維化マーカーの指標としてリアルタイムRT-PCRによる肝組織中TGF-β・MMP-9発現量, また線維化群, 線維化+血小板増加群, 線維化+脾摘群の肝組織中遺伝子発現をマイクロアレイにて測定評価した。

(結果)

血小板数は、線維化+血小板増加群および線維化+脾摘群が線維化群に比べ有意に増加していた。肝体重比、mitotic index、PCNA labeling index は線維化+血小板増加群および線維化+脾摘群において、線維化群に比べて有意な増加が認められた。血清アルブミン濃度、GPT 濃度については各群間に有意差は認められなかった。肝線維化面積比およびヒドロキシプロリン量は線維化+血小板増加群および線維化+脾摘群で線維化群に比べて有意な減少が認められた。肝組織中の TGF- β 発現量は線維化+血小板増加群および線維化+脾摘群が線維化群より有意に減少した。一方で MMP-9 発現量は線維化+血小板増加群のみに線維化群より有意な増加が認められた。肝組織のマイクロアレイ解析では線維化+血小板増加群および線維化+脾摘群で線維化群より細胞増殖関連遺伝子の発現増加が認められた。

(考察)

本研究の成果は、血小板が肝線維化状態において肝再生促進効果および肝線維化抑制効果を有することを示している。血小板は肝実質細胞における mitotic index および PCNA labeling index の増加をもたらしたが、その効果は細胞増殖関連遺伝子の発現増強によることが肝組織マイクロアレイ解析から確認された。肝線維化において血小板増加は肝線維化面積比およびヒドロキシプロリン量の増加を抑制したが、この抗線維化機序は、血小板が TGF- β の発現を抑制することにより肝星細胞の活性化を抑制し、細胞外マトリックスの増生を減少させたことが考えられる。また、TPO 投与による血小板増加群では脾摘群で認められなかった MMP-9 の発現増強が認められたことから、血小板もしくは TPO が肝星細胞のプロテアーゼ活性の増加をもたらした事が考えられる。血小板は星細胞を活性化させる作用を持つ PDGF も含有しているが、本研究の結果は、血小板が肝線維化形成において線維化促進作用よりも肝再生促進効果および線維化抑制効果を強く持つことを示すものである。

審 査 の 結 果 の 要 旨

マウス肝線維症モデルにおいて血小板は肝再生促進効果および肝線維化抑制効果を持つことが示された。その肝線維化抑制作用は肝線維化関連因子の抑制また肝線維プロテアーゼ活性の増加によるものと考えられる。本研究は肝線維症の治療において新たな概念を提示する新規性の高い研究と言え、ますますの展開が期待される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。