

氏名(本籍)	川崎卓也(茨城県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第5573号			
学位授与年月日	平成22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	Activation of human liver sinusoidal endothelial cells by human platelets induces hepatocyte proliferation (血小板によって活性化されたヒト肝類洞内皮細胞は肝細胞の増殖を促進する)			
主査	筑波大学教授	医学博士	千葉 滋	
副査	筑波大学教授	医学博士	兵頭 一之介	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	長谷川 雄一	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	三好 浩稔	

論文の内容の要旨

(目的)

過大肝切除において、肝臓の再生は生命予後に関わる重要事項である。また、劇症肝炎、非代償性肝硬変などの疾患や肝移植時においても、肝の再生が非常に重要である。しかし、肝再生の詳細な機序は未だ解明されていない。肝細胞は様々な液性因子によって増殖が促進される。一方、肝臓の非実質細胞であるKupffer細胞、肝類洞内皮細胞(LSEC)、肝星細胞が肝再生の機序に関わるとされている。これらのうちLSECは肝細胞増殖因子(HGF)、インターロイキン-6(IL-6)、一酸化窒素(NO)を産生し、肝切除後の肝細胞の増殖を促進すると報告されている。

血小板は α 顆粒の中に、血小板由来増殖因子(PDGF)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、上皮増殖因子(EGF)、インスリン様増殖因子1(IGF-1)など多数の増殖因子を有している。過去に論文提出者の属する研究グループからは、これらの増殖因子が肝再生において重要な役割を持つ可能性が示されてきた。しかし、肝再生における血症板の役割に関して、血小板から産生されるこのような液性因子が直接肝細胞に作用する他に、LSECなど肝非実質細胞への作用を介する経路が存在するかについては不明であった。今回の研究では、血小板がLSECに作用し、これを介して肝細胞再生を促進するという仮説を設定し、これを証明することを目的とした。

(対象と方法)

健常者から調整した血小板、LSECとして不死化ヒト肝類洞内皮細胞株TMNK-1、ヒト初代培養肝細胞の3者を用いて、in vitroで血小板のLSECに対する作用、血小板を作用させたLSECの肝細胞に対する作用を次の方法により調べた。(1) TMNK-1を血小板と共培養し、血小板がTMNK-1の増殖にどのような影響を与えるかを調べた。また、この際のSTAT3、Akt、ERK、GSK3 β のリン酸化をウェスタンブロット法で調べた。(2) 血小板と共培養したTMNK-1から分泌されるHGF、IL-6、VEGF、IGF-1をELISA法により測定した。さらに、血小板との共培養によりTMNK-1からIL-6が分泌される機序を探索するため、共培養中にVEGF

や PDGF に対する中和抗体や、PDGF 受容体アンタゴニスト、S1P 受容体アンタゴニストを加え、TMNK-1 からの IL-6 分泌に与える影響を調べた。(3) TMNK-1 に S1P を加えて IL-6 を ELISA 法で測定した。(4) 血小板による TMNK-1 からの IL-6 分泌には、血小板と TMNK-1 の接触が必要かを、cell culture inset を用いた共培養により検証した。(5) 血小板と共培養した TMNK-1 の培養上清による肝細胞の増殖効果を、BrdU 取り込み、および STAT3、Akt、ERK、GSK3 β のリン酸化解析により調べた。

(結果)

(1) TMNK-1 は血小板と共培養することにより有意に増殖が促進され、この際 Akt、GSK3 β 、ERK1/2 のリン酸化が誘導されることが確認された。(2) 血小板と共培養することにより、TMNK-1 からの VEGF と IL-6 の分泌が促進された。このうち肝細胞の増殖と関連が指摘されている IL-6 について、血小板との共培養による TMNK-1 からの分泌促進機序を血小板由来分子の抗体や阻害剤を用いて検討したところ、S1P に対する阻害剤により、有意に血小板との共培養による TMNK-1 からの IL-6 分泌が減少した。(3) 逆に TMNK-1 に S1P を作用させることにより、TMNK-1 からの IL-6 分泌は増加した。(4) 血小板との共培養による TMNK-1 からの IL-6 分泌誘導効果は、血小板と TMNK-1 との接触が必要であることが明らかになった。(5) 血小板と共培養した TMNK-1 の培養上清は、初代培養肝細胞に対し増殖促進効果を示した。またこの際、5-10 分以内に Akt、ERK1/2、STAT3 のリン酸化が観察された。さらに、IL-6 中和抗体を用いると肝細胞の BrdU 取り込みが有意に減少したため、IL-6 がこの効果の要因の少なくとも一部であることが明らかになった。

(考察)

血小板は肝臓の様々な障害に対して重要な役割をもつ。論文提出者らは過去に、血小板が肝細胞の増殖を促進すると報告している。本研究では、血小板による肝細胞再生に、LSEC が介在する可能性に注目した。

LSEC 由来細胞株 TMNK-1 を用いた実験で、血小板添加後に TMNK-1 において Akt、ERK1/2、GSK3 β が活性化され、増殖が促進されることが示された。一方、血小板添加後に TMNK-1 から IL-6 の分泌が促進されることも示された。ただし、TMNK-1 に血小板添加 24 時間後の培養上清による肝細胞増殖を、上清中に増加した IL-6 だけでは説明できない現象も観察された。したがって、血小板によって TMNK-1 から分泌された未同定物質が、肝細胞の増殖に寄与している可能性は十分に残されている。

一方、血小板との共培養による TMNK-1 からの IL-6 分泌促進作用は、血小板由来の S1P を介する可能性が示唆された。S1P は脂質メディエーターに属し、様々な生理活性に関わることが明らかになっている。また、S1P は活性化された血小板から多量に分泌されることが知られている。さらに、S1P はラットの LSEC の DNA 合成を促進し、NO 合成酵素を介してアルコールによるアポトーシスから LSEC を保護すると報告されている。そして、S1P はヒト気道平滑筋細胞や未成熟ヒト樹状細胞などからの IL-6 分泌を促進すると報告されている。これらの知見や、今回示された血小板による LSEC からの IL-6 分泌には両者の接触が必要であるという結果から、LSEC との接触により血小板が活性化され、これによって血小板から S1P が分泌され、分泌された S1P が LSEC からの IL-6 分泌を誘導する、という経路が考えられる。ただし、血小板が何らかの細胞に接触することで S1P の分泌が促進されるという報告はなく、本研究でも、この仮説は証明されていない。

病態を考える上では、血小板と LSEC との接触時間も考慮する必要がある。本研究では血小板と LSEC を 6 時間接触させて培養したが、血流のある肝類洞において、血小板がこれほど長時間 LSEC に接触して留まるとは考えにくい。血小板からの S1P 分泌は、より短時間の LSEC との接触でも可能であるのか、さらなる機序の解明が必要である。

本研究により、血小板からの S1P により LSEC が活性化され、IL-6 を分泌して肝細胞の増殖に貢献することが示された。血小板そのもののみならず、S1P の門脈注入によっても、LSEC の活性化を介して肝再生を

促進できる可能性があり、新たな治療法開発が期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、過去に論文提出者らの研究グループが行ってきた、切除あるいは障害肝を標的とした、血小板による肝細胞再生の研究を発展させたものである。具体的には、血小板による直接的な肝細胞再生の他に、血小板と接触した肝類洞内皮が分泌する何らかの液性因子によって肝細胞が再生するという経路の存在を想定し、このような経路の詳細を示し、肝類洞内皮細胞由来の液性因子を同定しようとした研究である。その結果、血小板が肝類洞内皮細胞に接触した後、何らかに機序により血小板由来のS1Pが肝類洞内皮細胞に作用し、肝類洞内皮細胞からインターロイキン-6 (IL-6) が分泌されて肝細胞の増殖につながるという経路を示すことに成功した。ただし、血小板と接触した肝類洞内皮細胞からは、IL-6 以外の未同定因子が分泌されている可能性も考察している。過大肝切除や重度肝障害後に対する新たな治療応用を考える上で、本研究成果は高く評価される。

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。