

氏名(本籍)	池田直哉(茨城県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第6221号			
学位授与年月日	平成24年3月23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	血小板は肝星細胞の活性化を抑制する			
主査	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)	加野准子	
副査	筑波大学助教	博士(医学)	上妻行則	

## 論文の内容の要旨

### (目的)

肝臓の線維化は、ウイルス性、アルコール性慢性肝炎や非アルコール性脂肪性肝炎など慢性肝疾患でよく見られる現象であるが、肝線維化が進行すると肝機能低下や、門脈圧亢進に続発する血小板減少症、食道静脈瘤、大量腹水などの肝外合併症、そして肝細胞癌発生の危険性が高まることから、これらを予防するため肝線維化のメカニズムおよび治療法は古くから研究されてきた。特に、肝臓の細胞外マトリックスを作る肝星細胞について研究が盛んである。しかし、現在の医療現場で安全性と有効性の確立した肝線維化および肝硬変の治療法は肝移植のみである。肝移植手術は人的物的医療資源を大量に必要とし、尊い意志と適合した提供臓器がなければ成り立たない治療であり、誰でも普遍的に受けられる肝線維化治療が強く求められている。近年、著者の研究室では血小板を増加させた肝線維化モデル動物では肝線維化が抑制されることを見出したが、詳細なメカニズムは不明であった。本研究では、ヒト血小板がヒト肝星細胞機能を抑制し、細胞外マトリックス産生を低下させ、抗線維化効果を示すとの仮説を立て、*in vitro* で検討を行った。

### (対象と方法)

ヒト材料を用いる実験は、筑波大学附属病院の倫理委員会の審査を経た。ヒト血小板は健康成人男性から採血しクエン酸緩衝液で調整した。実験によっては血小板を凍結融解して作成した血小板抽出物を用いた。ヒト肝星細胞は、株化された TWNT-1 と、筑波大学消化器外科で施行した肝臓手術検体からコラゲナーゼ還流法と密度勾配遠心法とで分離採取したヒト初代肝星細胞とを用いた。ヒト血小板または血小板抽出物を肝星細胞に添加培養して以下の検討を行った。i) 肝星細胞の活性化の指標として Western blot で alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の発現を検討し、光学顕微鏡で細胞形態を観察した。ii) DNA 合成の指標である BrdU 取り込み試験を検討した。iii) 肝星細胞遺伝子発現変化をリアルタイム PCR 法で検討した。iv) 培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法で検討した。v) 肝星細胞の分泌する I 型コラーゲン量を ELISA 法で検討した。vi) 血小板抽出物中の肝星細胞活性化抑制物質を各種阻害剤や分解酵素を用いてリアルタイム PCR 法で検討した。vii) 肝星細胞活性化抑制効果のある物質の濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定し、肝星細胞に添加し Western blot で  $\alpha$ -SMA の発現を検討した。また、そのシグナル伝達を

解析した。

#### (結果)

i) 血小板および血小板抽出物は、 $\alpha$ -SMA の発現を抑制し、活性化状態の低い類円形細胞割合を増加させた。ii) 血小板は、肝星細胞の BrdU 取り込みに影響を与えなかった。iii) 血小板は、ACTA2、COL1A1、HGF の遺伝子発現を低下させた。一方、MMP-1、TIMP-1、TGF- $\beta$ 、VEGF の遺伝子発現を増加させた。iv) 血小板は肝星細胞の VEGF 分泌を促進した。血小板中には HGF はほとんど含まれていなかった。v) 血小板は、肝星細胞の I 型コラーゲン分泌量を低下させた。vi) 血小板抽出物も血小板と同様に ACTA2 発現を低下させた。ATP 分解酵素の apyrase は血小板抽出物単独よりも血小板抽出物との共培養時に ACTA2 発現をより低下させたことから、アデニンヌクレオチドが活性化抑制に関与していると考えた。vii) HPLC の結果では、血小板中に高濃度のアデニンヌクレオチドが存在していた。ATP- $\gamma$ -HPLC 反応を用いた検討では、血小板近傍に高濃度 ATP が存在していた。ATP、アデノシン、血小板はヒト初代肝星細胞の  $\alpha$ -SMA の発現を抑制した。また、肝星細胞は ATP を分解しアデノシンを生じた。アデノシンおよび血小板は肝星細胞内 cAMP 濃度を上昇させた。

#### (考察)

肝星細胞活性化を抑制することは、肝臓への抗線維化作用を検討する際に欠かすことのできない重要な論点である。実験結果からは、血小板は ATP などのアデニンヌクレオチドを放出し、それが肝星細胞によってアデノシンに分解されることで、肝星細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、肝星細胞の活性化を抑制し、I 型コラーゲン産生を低下させていると考えられた。静止型肝星細胞は cAMP 濃度が高く、また cAMP 濃度を高めることが肝星細胞の増殖を抑制するとの報告や、心臓や肺の線維芽細胞においても細胞内 cAMP 濃度を高めることが抗線維化効果につながると報告されていることから、実験結果で得られた血小板による肝星細胞活性化抑制メカニズムは支持されたと考えられた。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

血小板から放出されるアデニンヌクレオチドが、肝星細胞の I 型コラーゲン産生を低下させることを明らかにした基礎研究で、血小板の肝線維化抑制作用を応用した臨床研究への展望が期待される。

平成 24 年 1 月 12 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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。