

氏名(本籍)	高橋一広(兵庫県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第6618号			
学位授与年月日	平成25年3月25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	Human platelets promote liver regeneration with Kupffer cells in severe combined immunodeficiency mice. (ヒト血小板は重症免疫不全マウスにおいて Kupffer 細胞とともに肝再生を促進する)			
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(薬学)	長谷川潤	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	加野准子	
副査	筑波大学講師	博士(医学)	矢藤繁	

論文の内容の要旨

(目的)

血小板は血管内皮成長因子(VEGF)、肝細胞成長因子(HGF)、インシュリン様成長因子-1(IGF-1)をはじめとする様々な成長因子を含有し、止血、炎症、免疫、創傷治癒作用など多彩な機能を有することが知られている。2004年に初めて血小板の肝再生促進効果について発表されて以来、その機序の解明が進められている。第一に血小板がDisse腔に移動することで肝細胞と直接接触し、血小板内部よりHGFやIGF-1をはじめとする成長因子が放出される。これら成長因子が肝細胞に作用して細胞分裂を促進するという血小板の直接的な作用がある。第二に、血小板が肝類洞内皮細胞と接触することで血小板内部よりスフィンゴシン1リン酸が放出され、これが肝類洞内皮細胞に作用してIL-6を放出させる。IL-6が肝細胞に作用して細胞分裂を促進させるという血小板の肝類洞内皮細胞を介した作用がある。一方で、ヒト血小板が肝再生を促進するという*in vivo*での直接的な証拠はなく、またKupffer細胞に着目した研究は過去になかった。本研究ではKupffer細胞に焦点を置き、ヒト血小板の肝再生促進効果について検討した。

(対象と方法)

重症免疫不全(SCID)マウスを下記の通りに群分けした。第1群:70%肝切除を行い、phosphate-buffered saline(PBS)投与をしたPBS群、第2群:70%肝切除を行い、ヒト血小板を輸血したhPLT群、第3群:Kupffer細胞を除去後に70%肝切除を行い、PBSを輸血したKD+PBS群、第4群:Kupffer細胞を除去後に70%肝切除を行い、ヒト血小板を輸血したKD+hPLT群、第5群:sham手術を行い、ヒト血小板を輸血したsham群。Kupffer細胞の除去はリポソーム封入クロドロネートを注入することで行った。実験1:ヒト血小板輸血の肝再生促進効果についてKupffer細胞に焦点を置き、PBS群、hPLT群、KD+PBS群、およびKD+hPLT群で比較した。実験2:ヒト血小板の切除肝での集積および活性化についてsham群、hPLT群、およびKD+hPLT群で比較した。

(結果)

実験1：末梢血における全血小板数は輸血後48時間までKD+hPLT群においてPBS群、hPLT群、およびKD+PBS群よりも有意に高値であった。また、全血小板数はhPLT群およびPBS群において術後12時間まで減少したのに対し、KD+hPLT群ではその減少は緩徐であった。KD+PBS群では有意な変化は認められなかった。肝切除後24時間におけるKi-67標識指数、48時間における肝体重比、Ki-67標識指数、および細胞分裂指数はhPLT群において他3群よりも有意に高値であった。また、肝組織におけるヒト由来VEGF濃度はhPLT群において上昇していた。一方で、他3群では測定感度以下であった。Kupffer細胞から主に分泌されると考えられているTNF- α とIL-6の濃度はhPLT群においてPBS群よりも有意に高値であった。これらサイトカインシグナルの下流にあるI κ BとSTAT3のリン酸化は、hPLT群においてPBS群よりも早く開始し、かつ強かった。一方で、KD-PBS群およびKD+hPLT群の肝組織におけるTNF- α およびIL-6の濃度はhPLT群とPBS群より有意に低値であり、I κ Bのリン酸化も弱かった。実験2：hPLT群において、切除残肝に著名な輸血ヒト血小板の集積と活性化を認めた。一方で、sham群とKD-hPLT群における輸血ヒト血小板の集積数は少なく、その活性化も低かった。マウスの末梢血中における輸血ヒト血小板の活性化をフローサイトメトリーで測定したところ、3群ともいずれも10%以下の低値であり、3群間で有意差を認めなかった。さらに、電子顕微鏡検査によりhPLT群において、大部分の輸血ヒト血小板がKupffer細胞の表面に膠着していることが明らかとなった。

(考察)

ヒト血小板がKupffer細胞のTNF- α とIL-6分泌を早期に開始させ、かつ分泌能を増強することが示唆された。これらサイトカイン刺激を介して肝細胞の細胞周期を早めることで、肝再生が促進したことが考えられた。またKupffer細胞は輸血ヒト血小板と膠着することで、血小板を肝臓に集積させ、活性化を促進し、VEGFをはじめとする成長因子を効率よく切除肝局所で放出させることが推測された。一方で、Kupffer細胞のサイトカイン分泌機能の亢進が血小板との膠着によるものなのか、血小板から放出された成長因子によるものなのかは不明であった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

ヒト血小板はSCIDマウスにおいてKupffer細胞の機能を亢進させることで、肝再生を促進することを示した。今後、さらにKupffer細胞と血小板のinteractionに関する詳細な研究が進むことが期待される。

平成25年1月16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。