

氏名（本籍） 野渡 剛之
 学位の種類 博士（医学）
 学位記番号 博甲第 7448 号
 学位授与年月 平成 27 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 Sphingosine 1-phosphate has anti-apoptotic effect on liver sinusoidal endothelial cells and proliferative effect on hepatocytes in a paracrine manner in human.

（スフィンゴシン 1 リン酸は、ヒト肝類洞内皮細胞に対し抗アポトーシス効果を有し、傍分泌作用によりヒト肝細胞の再生を促進する）

主査	筑波大学教授	医学博士	兵頭 一之介
副査	筑波大学教授	医学博士	谷中 昭典
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）

著者らは過去に、血小板が肝細胞の増殖を促進することを報告してきた。その機序の一つとして血小板に豊富に含まれるスフィンゴシン 1 リン酸（S1P）が肝類洞内皮細胞（LSEC）からの IL-6 分泌を促進し、IL-6 が肝細胞増殖を促進することが考えられている。S1P は赤血球や血小板に含まれる lipid mediator の一種で、血管内皮細胞の再生・アポトーシス抑制の生理活性をもつとされている。しかし、肝における S1P の役割は不明な点が多く、特に LSEC に対する作用に関してはほとんど報告がない。そこで、著者らは S1P の LSEC への作用を検討し、LSEC を介した新規肝再生治療への応用を検討した。

（対象と方法）

I. S1P の LSEC に対する作用の検討

不死化ヒト LSEC 株である TMNK-1 を用いて研究が進められた。i) 細胞増殖とシグナル：S1P を TMNK-1 に添加し、細胞生存を WST-8 で、シグナル伝達の変化を Western Blotting (WB) 法で検討した。ii) アポトーシスとその関連蛋白に与える影響：S1P を TMNK-1 に添加した後、スタウロ

スポリンを用いてアポトーシスを誘導し、S1Pの抗アポトーシス効果とその関連蛋白の発現をWST-8、TUNEL染色、WB法、RT-PCR法で検討した。iii) 抗アポトーシス効果におけるAkt、ERK経路の関与：LY294002 (PI3K inhibitor) とPD98059 (MAPK inhibitor) をTMNK-1に添加し、S1PによるAkt、ERK経路のTMNK-1細胞生存への関与をWST-8で検討した。iv) サイトカインと血管増殖因子分泌への影響：S1PをTMNK-1に添加し、培養上清中のIL-6、VEGFをELISA法で検討した。

II. S1PとLSECの相互作用が肝細胞DNA合成に与える影響

i) S1P添加TMNK-1上清が肝細胞DNA合成に与える影響：ヒト凍結肝細胞を用いて検討した。S1Pを添加していないTMNK-1上清、S1Pを添加したTMNK-1上清、S1P単体をそれぞれ肝細胞に添加し、肝細胞DNA合成促進効果とシグナル伝達の変化をBrdU法、WB法で検討した。ii) IL-6受容体阻害による肝細胞DNA合成への影響：MAB227 (anti human IL-6 receptor monoclonal antibody)を肝細胞に添加し、S1Pを添加したTMNK-1上清による肝細胞DNA合成促進効果へのIL-6の影響をBrdU法で検討した。

(結果)

I. S1PのLSECに対する作用

i) S1PはTMNK-1の細胞増殖を促進し、AktやERK1/2の活性化を促進した。ii) S1PはTMNK-1細胞のアポトーシスを抑制し、TUNEL染色ではS1Pにより陽性細胞数は減少した。また、S1Pは抗アポトーシス方向にBcl-2、Baxの発現を変化させ、caspase-3の切断を有意に抑制した。iii) PI3KまたはMAPKを阻害することにより、スタウロスポリンによるTMNK-1のアポトーシスは促進した。PI3K阻害でS1Pの抗アポトーシス効果は消失したが、MAPK阻害によりS1Pの効果は消失しなかった。iv) S1PによりTMNK-1培養上清中のIL-6、VEGF濃度の上昇を認めた。

II. S1PとLSECの相互作用が肝細胞DNA合成に与える影響

i) S1P添加、非添加TMNK-1上清は、ともに肝細胞DNA合成を促進した。上清添加48時間後においてS1P添加上清は非添加上清に比べて有意に肝細胞DNA合成を促進した。また、S1P添加TMNK-1上清により肝細胞のSTAT3はより活性化され、S1P単体では活性化しなかった。いずれの群でもERKの活性化が認められた。ii) S1P添加上清による肝細胞DNA合成促進効果はIL-6受容体を阻害することで消失した。これらの結果はS1P刺激によって誘導された内皮細胞由来のIL-6が、STAT3の活性化と肝細胞のDNA合成促進に関与していることを示唆している。

(考察)

S1PはAkt経路を介してLSECの増殖を促進し、アポトーシスを抑制した。また、S1PはLSECのIL-6分泌を促進し、分泌されたIL-6がSTAT3経路を介して肝細胞のDNA合成を促進した。S1PによるLSECのアポトーシス抑制効果、IL-6分泌促進効果は新規肝疾患治療へ応用できる可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

(批評)

著者らは、赤血球や血小板に豊富に含まれるlipid mediatorの一種であるスフィンゴシン1リン酸(S1P)が、肝類洞内皮細胞(LSEC)からのIL-6分泌を増加させ、このIL-6を介して肝細胞増殖を促進することを明らかにした。またS1PはPI3K-Akt、ERK-MAPK経路を活性化し、特にAkt経路がLSECの

生存、増殖に重要であることを示した。今後は、この生存や増殖のシグナルと IL-6 産生の機序を解明し、血小板、星細胞、肝類洞内皮細胞と肝細胞再生の研究をさらに進め、臨床応用へと展開されることが期待される。

平成 26 年 12 月 24 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）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。