

氏名	佐野 直樹		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第 7857 号		
学位授与年月	平成 28 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	New drug delivery system for liver sinusoidal endothelial cells for ischemia-reperfusion injury (虚血再灌流障害に対する肝類洞内皮細胞の新規ドラッグデリバリーシステム)		
主査	筑波大学教授	博士 (薬学)	本間 真人
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	宮崎 淳
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	三好 浩稔
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)

肝虚血再灌流障害は、肝移植におけるグラフト保護や肝切除術に用いる Pringle 法において重要な問題である。肝虚血再灌流障害には肝類洞内皮細胞 (LSEC) のアポトーシスの関与が大きく、このため LSEC のアポトーシスを防ぐことが障害の治療標的と考えられる。スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は様々な生理活性作用を有することが報告されている脂質メディエーターであり、LSEC に対する抗アポトーシス作用も知られている。したがって S1P を投与することにより、肝虚血再灌流障害を抑制できる可能性がある。しかしながら、S1P 受容体は多臓器に存在しており、肝臓には受容体の分布が少ないため、S1P を単独投与して LSEC に特異的に作用させることは困難であると考えられる。そこで、S1P を LSEC へ集積させるため、LSEC に特異的に発現するヒアルロン酸 (HA) 受容体に着目した新規 drug delivery system (DDS) 製剤を開発した。本実験では、S1P と HA を直接共有結合させた新規 DDS 製剤である HA-S1P の肝虚血再灌流障害に対する軽減効果を明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

Sprague-Dawley ラットをコントロール群、HA 単独群、S1P 単独群、HA-S1P 製剤群の 4 群に分け

た。各製剤をラットの尾静脈より静注投与した後、ラットに全身麻酔をかけて開腹して静注から 10 分後に肝動脈・門脈・総胆管の一括結紮によって 20 分間の全肝虚血をかけた。再還流 30、60、120 分後に血液を採取し、再灌流 120 分後にはラットを犠牲死させて肝臓を摘出した。肝機能を評価するために血清 ALT 値を、肝類洞構造を評価するために HE 染色による肝組織像と電子顕微鏡像を、アポトーシスを評価するために TUNEL 染色と Western blot analysis による cleaved caspase-3 の発現量を、肝保護作用を評価するために Western blot analysis による heme oxygenase-1 (HO-1) の発現量を、DDS を確認するために Western blot analysis による S1P の発現量をそれぞれ比較検討した。

(結果)

血清 ALT 値は再灌流 30、60、120 分後に HA-S1P 群において有意に低値を示した。再灌流 120 分後の肝組織において、HE 染色で観察した肝類洞構造は HA-S1P 群でのみ保たれ、電子顕微鏡像で観察した LSEC の裏打ち構造も HA-S1P 群でのみ保持されていた。肝組織の TUNEL 染色では、HA-S1P 群において総肝細胞数に対する TUNEL 陽性肝細胞数の比率が有意に低値を示し、cleaved caspase-3 の発現量が最も少なく、アポトーシスの抑制が観察された。また、肝保護作用の指標である HO-1 の発現量が HA-S1P 群で最も多かった。HA-S1P 群において S1P が最も多く集積していた。

(考察)

肝虚血再灌流障害において、LSEC は再灌流直後にアポトーシスが誘導され、障害の起点となる重要な細胞である。S1P は LSEC に対して抗アポトーシ作用を有することが報告されているが、S1P 受容体が多臓器に分布していることと肝臓での受容体分布が少ないことから、S1P を単独投与しても LSEC へ集積させることは困難である。そこで、LSEC に特異的に発現している HA 受容体である Stabilin-2 受容体に着目した。外因性の HA は静注後速やかに LSEC の HA 受容体へ集積することが報告されている。我々は、S1P と HA を直接共有結合させた新規 DDS 製剤 (HA-S1P) を開発し、HA 受容体を介した S1P の LSEC への集積を試みた。その結果、LSEC に集積した S1P が肝虚血再灌流時に障害される LSEC をアポトーシスから保護することを見出した。また、障害の起点となる LSEC を保護して肝類洞構造を保持することにより肝細胞も保護され、肝障害が軽減することを明らかにした。この過程において肝虚血再灌流障害の保護物質として報告されている HO-1 が増加することも確認された。

新規 DDS 製剤である HA-S1P は、肝臓の LSEC 特異的に S1P を集積させるため LSEC に対して抗アポトーシス作用を有効に発揮し、肝虚血再灌流による肝障害を抑制した。HA-S1P は肝虚血再灌流障害に対して有用な新規製剤となり得る可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、有効な予防法がない虚血再灌流障害に対して、LSEC のアポトーシスを抑制してその障害を軽減する DDS 製剤 (HA-S1P) の有効性をモデル動物で検証した点で評価される。S1P が LSEC のアポトーシスを抑制する可能性については従来から指摘されていたが、S1P を全身投与しても LSEC に集積しないため薬剤として開発することが困難であった。しかしながら著者は、S1P に HA を結合させた新規の DDS 製剤を調製し、その全身投与において HA 受容体を介して S1P を LSEC に集積させることに成功し、さらに虚血再灌流障害に対する有効性も検証している。これらの知見は、虚血再灌流障害に対して HA-S1P が全く新しい薬剤として開発される可能性を示しており、今後、臨床試験への

審査様式 2 - 1

発展も期待されるものである。

平成 28 年 1 月 6 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学位論文の説明を求め、関連事項（肝移植、虚血再灌流障害、DDS 製剤に関する基本事項および学位論文に関する実験手技、結果の解釈、将来の応用性）について質疑応答による最終試験を行った。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。