

氏名	田野井 智倫			
学位の種類	博士（医学）			
学位記番号	博甲第 7863 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	Protecting liver sinusoidal endothelial cells suppresses apoptosis in acute liver damage (肝類洞内皮細胞の保護が急性肝障害におけるアポトーシスを抑制する)			
主査	筑波大学教授	医学博士	正田 純一	
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）	松井 裕史	
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) 肝炎や肝虚血再灌流など各種肝障害にはアポトーシスが関連することが知られており、アポトーシス促進因子である Bax などの siRNA を投与しアポトーシスを抑制することで、急性肝障害が軽減されたとの報告がある。申請者らはこれまで、急性肝障害において、肝細胞のアポトーシスの前に肝類洞内皮細胞 (LSEC) が障害されることを報告し、急性肝障害において LSEC が重要な役割を果たしていることが示唆してきた。しかし、siRNA を肝臓における肝細胞や LSEC などの細胞それぞれを標的として作用させる Drug Delivery System (DDS) がなかったため、急性肝障害のメカニズムや肝細胞および LSEC の役割は明らかではなかった。申請者らは高い肝臓特異性を有する DDS である a multifunctional envelope-type nano device (MEND) を研究し、最近、LSEC に効率的に作用する MEND (LSEC-transfer efficient MEND) を開発し、この新規 MEND を用いて LSEC に特異的な遺伝子発現を有意に抑制させることを確認した。そこで今回は、新規 MEND を用いた LSEC のアポトーシスの効率的抑制が急性肝障害に及ぼす効果について検討した。

(対象と方法) アポトーシスを抑制するために、アポトーシス促進因子である Bax の siRNA を使用した。In vitro; M1 細胞 (マウス肝類洞内皮細胞) に Bax siRNA を導入し、(i) Bax siRNA (-) 群、(ii) Bax siRNA (+) 群の 2 群に分別した。導入後に抗 Fas 抗体ないしは staurosporine の投与によりアポトーシ

## 審査様式 2 - 1

スを誘導した。 *In vivo*; 各々の MEND に封入した Bax siRNA をマウス (C57BL/6J, 雌性, 8~9 週) に尾静脈投与し, (i) Control 群 (生理食塩水のみを投与した群), (ii) Nonselective 群 (Nonselective MEND を用いた群), (iii) LSEC-transfer efficient 群 (LSEC-transfer efficient MEND を用いた群) の 3 群に分別した (各群 n = 7)。 siRNA 投与 24 時間後に抗 Fas 抗体を腹腔内投与して急性肝障害を誘導し, サンプルングとして血清, 肝臓を採取した。 検討項目として, Real time RT-PCR (Bax), Western blot, 生化学検査 (ALT, AST), 病理学的検査 (HE 染色, TUNEL 染色, 鍍銀染色), 電子顕微鏡検査を施行した。

(結果) *In vitro*: Bax siRNA (+) 群において, RT-PCR で Bax 遺伝子の発現抑制を認め, Western blot で Bax と Cleaved caspase-3 のタンパク発現低下を認めた。 *In vivo*: ALT 値は LSEC-transfer efficient 群で他の 2 群と比較して, 抗 Fas 抗体投与 6 時間および 24 時間後において有意な低下を認めた。 HE 染色では, Control 群および Nonselective 群において, 炎症細胞の集積を認め, 類洞が変形しているのに対して, LSEC-selective 群では炎症細胞の集積が弱かった。 siRNA を投与した Nonselective 群と LSEC-transfer efficient 群では, Bax 遺伝子とタンパク発現の抑制を認め, LSEC-transfer efficient 群においては Cleaved caspase-3 のタンパク発現低下も認めた。 TUNEL 染色では, LSEC-transfer efficient 群で他の 2 群と比較して, TUNEL 陽性の肝細胞率が有意に低かった。 鍍銀染色では, LSEC-transfer efficient 群で他の 2 群と比較して, 染色される類洞面積が有意に大であった。 さらに, 電顕では, LSEC-transfer efficient 群において LSEC の障害が弱く, 類洞構造が保たれていた。

(考察) LSEC における Bax の役割は明らかではなかったが, 本研究は, *in vitro* 実験にて, LSEC における Bax 遺伝子の発現抑制が抗アポトーシス効果を有することを示した。 *In vivo* 実験においては, LSEC-transfer efficient MEND を用いた LSEC の効率的なアポトーシス抑制が, LSEC と類洞構造を保持し, さらに, 肝細胞のアポトーシスと肝障害を抑制することが判明した。 細胞選択性のない Nonselective MEND を用いて siRNA を投与した場合に, 肝細胞のアポトーシスおよび肝障害が抑制されなかったのは, LSEC に作用する siRNA の量が LSEC を保護するための治療域に達していなかったためと考えられた。

## 審査の結果の要旨

(批評) これまで, 急性肝障害モデルにおいて, LSEC の障害の後に肝細胞障害が誘導されることが報告されてきた。 しかし, LSEC の障害を抑止することにより, 肝障害の発生が抑止されるかどうかは, LSEC 選択的に作用する DDS 製剤が存在せず評価が困難であった。 そこに, LSEC 選択的に集積する DDS 製剤が開発された。 本研究の意義は, この新しい DDS 製剤を用いた LSEC 選択的なアポトーシス促進因子である Bax 遺伝子の siRNA の集積が可能となった。 それにより LSEC のアポトーシスが効果的に抑制され, 急性肝障害における肝細胞のアポトーシスを軽減できることを見出した点にある。 また, LSEC の障害を抑止することにより, 肝類洞構造が保持されることも判明した。 今後の臨床医学において, 急性肝不全の効果的な治療の開発に繋がる可能性があり, その成果が期待される。

平成 28 年 1 月 7 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

## 審査様式 2 - 1

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。