

別記様式第 6 号（第 16 条第 3 項，第 25 条第 3 項関係）

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	河原 章浩
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 <i>Depletion of hepatic stellate cells inhibits hepatic steatosis in mice</i> (肝星細胞のアポトーシス誘導による肝脂肪化進展抑制効果の検討)			
論文審査担当者			
主査	教授	岡 志郎	印
審査委員	教授	浅野 知一郎	
審査委員	准教授	上村 健一郎	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は世界的に慢性肝疾患の主な原因となっており、単純脂肪肝から非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）までさまざまな病態を含む。NASH は、NAFLD の中で進行性の病態であり、肝線維症、肝硬変、肝癌へと進行し、肝疾患関連死に寄与する。しかしながら現在のところ、NASH の治療は、生活習慣の改善、合併する糖尿病や、高血圧、脂質異常症に対する治療法はあるものの、NASH に特化した薬剤治療は確立されていない。肝星細胞は肝線維化において中心的な役割を果たす。肝星細胞は肝障害により炎症反応が誘導されると活性化し、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスを産生する。細胞外マトリックスはマトリックスメタロプロテアーゼによって分解されるが、NASH のような慢性的な炎症では分解が間に合わず線維化が蓄積する。このため、肝星細胞は肝線維化の治療標的とされ、さまざまな臨床試験が行われている。活性化肝星細胞は様々なサイトカイン・ケモカインを産生することが報告されている。これらの生理活性物質は、個別では肝脂肪化において抑制的、または促進的に働くものがある。しかしながら、全体として肝脂肪化に与える影響について検討した報告はない。</p> <p>申請者は、活性化肝星細胞より分泌される生理活性因子が肝脂肪化に与える影響について検討した。生後 8 週齢の Black six J マウスにコリン欠乏高脂肪食を 4 週間与え、NASH モデルマウスを作成した。活性化肝星細胞を枯渇するため、アポトーシスへ誘導するグリオトキシンを 1 週間に一度、1mg/kg 腹腔内投与し、肝脂肪化、線維化の程度について比較した。グリオトキシンは真菌由来の代謝物で、肝星細胞のアポトーシスを誘導すること、また、動物モデルにおいて肝線維化を抑制することが報告されている。しかしながら、肝星細胞以外の、Kupffer 細胞や内皮細胞のアポトーシスも誘導するという報告もある。</p> <p>本実験モデルにおいて、肝星細胞が枯渇していることを確認するため、活性化肝星細胞に発現している <math>\alpha</math> SMA の免疫染色を行ったところ、グリオトキシン処理により <math>\alpha</math> SMA 陽性の</p>			

活性化肝星細胞が減少することが示された。一方、グリオトキシンは F4/80 陽性 Kupffer 細胞数には影響を及ぼさなかった。リアルタイム PCR では静止肝星細胞、Kupffer 細胞、内皮細胞のマーカには変化は見られず、活性化肝星細胞のマーカである  $\alpha$  SMA と desmin の遺伝子発現のみグリオトキシンによって減少がみられた。この結果は、本実験において、グリオトキシンが活性化肝星細胞のアポトーシスを選択的に誘導することが示唆された。NASH モデルマウスの肝肉眼像は黄色調であったが、グリオトキシンにて色調は改善した。肝組織中の中性脂肪量も約 50%低下し、ALT 値も有意に改善した。脂質代謝に関する遺伝子について検討したところ PPAR $\gamma$  の発現低下あり、その下流遺伝子で肝臓への脂肪酸の取込みに関与する FATP、Ap2、CD36 の発現が低下した。このことより脂肪酸の取り込み低下が肝脂肪化の改善に寄与していることが示唆された。その他、脂質代謝に関連する遺伝子発現について検討を行ったが、中性脂肪の合成、脂質酸化、脂質排泄に関与する遺伝子発現についてグリオトキシンの投与で変化はみられなかった。また、グリオトキシンの投与にて肝線維化は抑制され、線維化に関連するコラーゲン 1a1、TGF-beta の発現低下が見られた。

細胞実験では、液性生理活性物質が移動できるトランズウェルを使用し、不死化肝細胞株である Hc3716 および、不死化肝星細胞株である LX2 の存在/非存在下で脂肪酸を添加し、培養を行った。BODIPY 染色を行ったところ、LX2 との共培養群においては肝細胞の脂肪化がみられたが、Hc3716 単独群では脂肪化は軽微であった。中性脂肪の定量を行ったところ、顕微鏡所見と一致し、共培養群で中性脂肪量は増加した。また、LX2 存在下では脂肪酸の取込みに関与する CD36 の蛋白発現の増加がみられた。このことより、肝星細胞由来の生理活性物質が肝細胞脂肪化に促進的に働いていることが示唆された。

以上の結果から、本論文は NASH の病態において活性化肝星細胞を制御することは肝線維化のみならず、肝脂肪化の両者を抑制する可能性が示唆され、NASH 治療のターゲットとなりうることを明らかにした。肝脂肪化抑制の機序として、PPAR $\gamma$  が低下することによる脂肪酸取り込みの減少が寄与していることが示唆された。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。