

論文内容要旨

論文題目

極性を有する胆管上皮細胞由来細胞外小胞を介した

胆汁うっ滞性胆管周囲炎・線維化機序の解明

責任講座：内科学第二講座 氏名：榎 慶太

【内容要旨】(1,200 字以内)

〔背景〕胆汁うっ滞性肝疾患は、胆石や腫瘍による胆管閉塞、薬剤性、原発性胆汁性胆管炎 (PBC) や原発性硬化性胆管炎 (PSC) などの自己免疫疾患など様々である。その中でも PSC は胆管周囲の炎症と輪状線維化を特徴とするが、その病態メカニズムは未だ解明されていない。胆管上皮細胞は基底膜側と管腔側に分かれる細胞極性を持ち、それぞれの極側から細胞外小胞 (Extracellular Vesicles: EVs) が放出されている。本研究では、胆汁酸暴露環境下で胆管上皮細胞の基底膜側 EVs の組成が変化し、PSC の胆管周囲炎や線維化形成に関与する可能性について検討することを目的とした。

〔方法〕細胞培養プレート内にメンブレン付きインサートを設置し、インサート上でヒト胆管上皮細胞株 (H69) を培養した。インサート上部の管腔側培地にケノデオキシコール酸 (Chenodeoxycholic acid: CDCA) (100 μ M) + IFN γ (50ng/ml) を加え、胆汁酸刺激環境を再現した。胆汁酸刺激を開始して 48 時間後にインサート下部の基底膜側に該当する培養液を回収したのち、超遠心法で EVs を抽出した。比較対象 control EVs として、胆汁酸非刺激の基底膜側 EVs を抽出した。抽出した EVs をヒト THP-1 由来 Macrophage およびヒト肝星細胞株 (LX-2)、ヒト線維芽細胞株 (KMST-6) に添加刺激し、炎症性サイトカインや線維化マーカーの発現について検討した。また、抽出した EVs (胆汁酸刺激の基底膜側 EVs、胆汁酸非刺激の基底膜側 EVs) に関してプロテオミクス解析により EVs 含有蛋白を同定した。さらに、胆汁酸刺激群 EVs で高発現している炎症細胞誘導に関与しうる分子を検証し、それらのリコンビナント蛋白を用いてヒト THP-1 由来 Macrophage への添加刺激を行い、RT-PCR 法で炎症性サイトカイン発現について validation した。

〔結果〕control 群基底膜側 EVs 濃度は 0.80 mg/ml であったが、胆汁酸刺激群基底膜側 EVs 濃度は 1.33 mg/ml であり濃度上昇を認めた。Macrophage に胆汁酸刺激群基底膜側 EVs の添加刺激では、TNF (5.9-fold change)、IL-1 β (1.4-fold change)、IL-6 (4.9-fold change) の発現が、control 群基底膜側 EVs 刺激に比べ有意に上昇していた。また、LX-2 と KMST-6 に胆汁酸刺激群基底膜側 EVs の添加刺激を行うと、LX-2 では TGF- β (2.2-fold change)、KMST-6 では TGF- β (1.3-fold change) の発現が control 群基底膜側 EVs 刺激に比べ有意に上昇していた。プロテオミクス解析では、基底膜側から放出された EVs から 1601 個の EVs 含有蛋白が同定された。胆汁酸非刺激誘導同定蛋白と比較して 2 倍以上発現していた胆汁酸刺激誘導同定蛋白の中で炎症細胞誘導蛋白として Nucleophosmin (NPM)、Nucleolin (NCL)、Midkine (MK) が特定し得た。また、胆汁酸非刺激群には認めずに、胆汁酸刺激誘導同定蛋白の中に高発現している線維化進展蛋白として Leukocyte cell-derived chemotaxin-2 (LECT2) を特定し得た。NPM、NCL、MK のリコンビナント蛋白で Macrophage を刺激すると、炎症性サイトカイン発現の有意な上昇を認めた。

〔結論〕胆汁酸刺激で胆管上皮細胞基底膜側 EVs 組成が変化し、基底膜側 EVs 含有蛋白中の炎症誘導蛋白 (NPM、NCL、MK) や線維化進展蛋白 (LECT2) の発現が増加し、PSC の胆管周囲炎や線維化に関与する可能性があることが示唆された。

令和4年 12月 27日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 榎 慶太

論文題目： 極性を有する胆管上皮細胞由来細胞外小胞を介した胆汁うっ滞性胆管周囲炎・線維化機序の解明

審査委員： 主審査委員 今田 恒夫 
副審査委員 石川 賢一 
副審査委員 二口 亮 

審査終了日：令和 4年 12月 26日

【 論文 審査 結果 要 旨 】

原発性硬化性胆管炎（PSC）は慢性的な胆汁うっ滞により胆管基底膜側の炎症と輪状線維化を示すが、その病態は不明である。本研究では、胆管上皮細胞の極性と細胞間情報伝達を担う細胞外小胞（EVs）に着目し、胆汁酸曝露による胆管上皮細胞の基底膜側から放出される EVs の変化と放出された EVs やそれに含まれる蛋白がマクロファージや肝星細胞、線維芽細胞に与える影響について、培養細胞を用いた実験系で検討した。

初めに、メンブレン付きセルカルチャーインサート上に胆管上皮細胞を培養し、管腔側と基底膜側を分けて EVs 回収が可能な胆汁酸刺激実験系を確立した。次に、基底膜側 EVs 内に含まれる蛋白のプロテオミクス解析を行い、胆汁酸刺激下では、刺激なしと比較して、炎症細胞誘導蛋白である Nucleophosmin、Nucleolin、Midkine や線維化関連蛋白である Leukocyte cell-derived chemotaxin-2 の発現が上昇することを確認した。さらに、胆汁酸刺激で放出された基底膜側 EVs で刺激することで、マクロファージでは炎症性サイトカイン TNF、IL-1 β 、IL-6、肝星細胞と線維芽細胞では線維化に関わる TGF β の発現上昇を確認した。これらの変化は管腔側 EVs による刺激では認めなかった。最後に、上記で同定された各炎症細胞誘導蛋白の単独の刺激でマクロファージにおける炎症性サイトカイン発現が上昇し、3 種類混合刺激で、これらの発現がさらに上昇することを確認した。以上の検討結果により、胆汁酸刺激による胆管上皮細胞基底膜側に放出される EVs の組成の変化、特に炎症誘導蛋白の発現上昇が、胆汁うっ滞による胆管基底膜側の炎症と線維化に関与することを明らかにした。

これまで未解明である慢性的な胆汁うっ滞による胆管周囲炎と線維化の機序を明らかにすることは臨床的な意義がある研究課題である。胆管上皮細胞の極性に着目し、管腔側と基底膜側に分けて EVs を回収分析する実験系は独創性があり、検証の手順も適切である。しかし、本実験モデルが PSC のみに特異的な病態か、今回検討した既知の炎症誘導蛋白以外の因子の関与の可能性、実験に用いたマクロファージの特性、想定される機序における肝星細胞や線維芽細胞の役割、などについて検討を加えることが望まれる。総合的に、本研究論文は、十分な学術的意義があり、適切な研究手法を用いて得られた、医学の進歩に貢献する研究成果を含むことから、指摘事項を改善することで、学位論文に値すると判断される。