

論文内容要旨

論文題目

ラット肝部分切除後の肝再生時における胆汁由来細胞外小胞の肝細胞に与える影響について

責任講座： 内科学第二講座

氏名： 菅原心平

【内容要旨】(1,200字以内)

【背景】肝臓の高い再生能力のメカニズムを明らかにするために、これまで研究が盛んに行われてきたが未だに全容は不明である。肝内には血管と同様に胆管も張り巡らされているが、胆管内を流れる胆汁と肝再生の関連についてはほとんど検討されていない。また、細胞外小胞(Extracellular vesicle: EV)はあらゆる細胞から放出されており、内部には細胞由来の蛋白質や核酸が含まれ様々な生命活動に関与している。胆汁中にも EV が存在することも示されており、本研究では肝再生と胆汁 EV の関係を明らかにするため、ラット肝部分切除モデルの胆汁 EV が肝細胞に与える影響について検討した。

【方法】SD ラット(8週齢、オス)を用い、胆管カニューレションラットを作成した。このラットに70%肝部分切除術(Partial hepatectomy: PH) / sham 手術を施行し、経時的に胆汁を採取した。サイズ排除クロマトグラフィー法を用いて採取した胆汁から EV を抽出し、透過型電子顕微鏡検査(Transmission Electron Microscope: TEM)、ナノ粒子トラッキング解析(Nano tracking analysis: NTA)で解析した。次に蛍光標識した胆汁 EV をラット肝細胞株(BRL-3A)に添加し24時間培養後に蛍光顕微鏡で観察した。次いで、PH12時間後 / PH24時間後 / sham 手術後の胆汁 EV(それぞれ PH12-EV / PH24-EV / sham-EV) をラット肝細胞株に添加し、24時間後に回収した細胞から RNA を抽出しトランスクリプトーム解析を行った。さらに、ラット肝細胞株に PH24-EV、sham-EV を添加し培養、MTS アッセイにて増殖能を検討した。

【結果】ラット胆汁より抽出した EV 抽出液中には、TEM および NTA で EV の存在が確認できた。また、NTA では PH12 時間後に肝重量あたりの胆汁中へ放出される EV 数が有意に増加していた。さらに、in vitro では肝細胞株に胆汁 EV が取り込まれることが確認された。トランスクリプトーム解析では、肝細胞株に PH24-EV を添加した群(PH-24 群)は、sham-EV を添加した群(sham 群)に比べ、発現が増加・減少する遺伝子を多数認めた。さらに細胞周期に着目し GO 解析を行うと、sham 群に比べ PH-24 群では 28 種類の遺伝子で発現増加が見られ、その中には細胞周期を促進させる遺伝子や肝再生を促すとされる遺伝子も見られた。そこで、胆汁 EV が肝細胞の増殖に及ぼす影響を検証したところ、PH24-EV は濃度依存的に肝細胞の増殖させることが明らかとなった。

【結論】本研究では PH 後に胆汁 EV が増加すること、また、PH 後の胆汁 EV は肝細胞株の増殖を促進させること、さらに、肝細胞内では細胞周期を促す遺伝子の発現が増加することが明らかとなった。

令和 4 年 1 月 8 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：菅原 心平

論文題目：ラット肝部分切除後の肝再生時における胆汁由来細胞外小胞の肝細胞に与える影響について

審査委員：主審査委員 北中 千史

副審査委員 欠畑 誠治

副審査委員 山崎 健太郎



審査終了日：令和 4 年 1 月 6 日

【 論文審査結果要旨 】

肝臓は極めて再生能力が高い臓器であり、例えばラット肝臓の場合、70%切除後約1週間で切除前の状態を回復する。しかしながら肝臓のこの高度な再生能がいかなる機序によりもたらされているかについては未だ不明な点が多い。肝臓内には血管同様胆管が張り巡らされており、かつ胆汁成分は腸管循環により効率良く再利用されることから、胆汁に含まれる増殖刺激因子が肝臓内を循環することで再生時の肝細胞の活発な増殖が誘導されている可能性が考えられるが、これまでのところその増殖刺激因子として細胞外小胞に着目しこのような可能性について検証を行なった研究は皆無である。そこで申請者は「肝細胞から胆汁に分泌された細胞外小胞が部分肝切除後の肝再生に重要な役割を果たしている」との仮説のもと本学位研究を行なった。仮説検証に必要な実験を行うため、申請者はラット胆管と十二指腸の間に体外を経由する透明カニューレを手術的に介在させカニューレから随時胆汁が採取可能なモデルを用いて、70%部分肝切除の有無が胆汁中の細胞外小胞量に与える影響並びに胆汁内細胞外小胞のラット肝細胞の増殖や遺伝子発現に与える影響について検討を行なった。その結果、

- 1) 部分肝切除により胆汁中の細胞外小胞量が増加すること、
- 2) 部分肝切除後24時間時点の胆汁に含まれる細胞外小胞に培養肝細胞を暴露すると、肝細胞による細胞外小胞の取り込みとともに細胞増殖の促進が見られること、また、その細胞増殖促進を説明する細胞周期関連遺伝子の発現変化が肝細胞内で起きていること、

等が明らかとなった。以上の結果は「部分肝切除により胆汁への細胞外小胞の分泌が促進され、胆汁を介して肝細胞に至った細胞外小胞が残存幹細胞によって取り込まれ、細胞周期調節遺伝子の発現制御を通じてその増殖を促進することで肝再生に寄与している」という仮説を支持するものであり、肝再生における胆汁中の細胞外小胞の役割に光を当てる先駆的な成果と言える。このような成果は、現時点で得られている実験結果からは胆汁に含まれる細胞外小胞以外の因子が、あるいは細胞外小胞が胆汁分泌以外の経路により、肝再生に寄与している可能性が必ずしも除外されていないこと、また、細胞外小胞内容の構成要素やそれによる細胞増殖促進機序が明らかにされていないなど、今後取り組むべきと考えられる課題が多々ある点を考慮しても、十分に学位に値するものと考えられた。

ただし、学位論文における研究方法の記載において一部不十分な点が認められたことから、この点に適切に対応する論文の改訂を条件に本審査委員会は本研究が学位（医学）の授与に値するものと判定する。（1,098字）

（1, 200字以内）