

論文審査の要旨

報告番号	総研第 428 号	学位申請者	指宿 りえ
審査委員	主査	堀内 正久	学位 博士 (医学)
	副査	谷本 昭英	副査 原 博満
	副査	西尾 善彦	副査 橋口 照人

Human neutrophil peptide-1 promotes alcohol-induced hepatic fibrosis and hepatocyte apoptosis.

(ヒト好中球ペプチド<human neutrophil peptide : HNP>-1 は、アルコールによる肝線維化と肝細胞アポトーシスを促進する)

アルコール性肝障害 (ALD) の特徴的な病理学的所見として肝組織への好中球浸潤が挙げられる。また、重症型アルコール性肝炎では、末梢血中の好中球数が著明に増加し、白血球除去療法は、有効な治療法と考えられている。しかし、ALD における白血球の病的意義は十分解明されていない。学位申請者らは、好中球から分泌されるヒト好中球ペプチド (HNP) -1 に着目して検討した。方法として、CAG プロモーターで発現する HNP-1 トランスジェニック (TG) マウスを作製し、TG 及び野生型 (WT) マウスに、10% エタノール水を 8 週もしくは 24 週間経口にて自由投与し、脂肪肝、肝線維化を誘導し、HNP-1 の影響を検討した。肝組織中の遺伝子発現は RT-PCR 法、蛋白発現は Western blot 法で解析した。脂肪肝は Oil-Red O 染色と肝中性脂肪含量、肝線維化は Sirius-Red 染色と AZAN 染色、肝星細胞活性化は α SMA 染色と α SMA 蛋白発現、Kupffer 細胞は F4/80 と CD68 染色、肝組織中のアポトーシスは TUNEL 法で評価した。アポトーシス関連の micro RNA は、miScript miRNA PCR array を用いて評価した。In vitro では、ヒト肝癌細胞株 SK-Hep1 のアポトーシスに及ぼす HNP-1 の影響について検討した。カスパーゼ 3/7 活性と DNA の断片化を定量測定し、アポトーシスを評価した。In vitro 実験における micro RNA は、target-specific miScript primer assay を用いて、リアルタイム PCR で評価した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

エタノールを投与した HNP-1 TG マウスは、エタノール投与の WT マウスと比較して

- ① 24 週で ALT は有意に高値を示したが、8 週と 24 週のいずれも脂肪肝の程度に差はなかった。
- ② 24 週では有意に肝線維化が進行し、肝組織中 collagen 1 蛋白は有意に高発現し、 α SMA 陽性細胞数と α SMA 蛋白発現は有意に高値を示し、肝星細胞は有意に活性化していた。
- ③ 24 週では炎症細胞浸潤が多く認められ、F4/80、CD68 陽性の Kupffer 細胞は有意に増加し、肝組織中の CD14、TLR4、NF κ B-p65、IL6 の蛋白発現は有意に高発現していた。
- ④ 24 週では肝細胞アポトーシスは促進していた。また、肝組織中の caspase-3、caspase-8、cleaved-PARP、p-ASK1、ASK1、p-JNK、JNK1、JNK2、Bax、Bak、Bim は、全て有意に高発現し、Bcl2 の蛋白発現は有意に低値であった。
- ⑤ 24 週で、肝組織中の 5 つの micro RNA (miR-7a-5p、miR-15b-5p、miR-27a-3p、miR-34a-5p、miR-125a-5p、miR-183-5p) の発現が有意に高く、その中でも特に miR-34a-5p の差が顕著であった。SK-Hep1 を用いた In vitro の実験では、HNP-1 は単独で濃度依存的にカスパーゼ 3/7 を活性化させ、DNA の断片化を誘導し、その作用はエタノール 100mM の存在下でも同様であった。また、エタノール 100mM の存在下で、HNP-1 は caspase 3、p-ASK1、ASK1、p-JNK、Bax の蛋白発現を増加させ、Bcl2 の発現を有意に低下させた。この結果は、in vivo の結果と同様であった。さらに、microRNA の解析では、エタノール 100mM の存在下で HNP-1 は、miR-34a-5p の発現を濃度依存的に増加させた。

エタノール投与 HNP-1 TG マウスを用いた解析で、HNP-1 は脂肪肝に影響しないが、ALD における肝線維化を促進することが示唆された。また、HNP-1 は Kupffer 細胞を増加させ、肝細胞アポトーシスを促進することが示された。マクロファージと T リンパ球の走化性因子である HNP-1 は、Kupffer 細胞の肝への浸潤促進と活性化により肝細胞障害を促進し、間接的に肝線維化を促進することが推測される。さらに、HNP-1 は、カスパーゼ 3/7 を介して肝組織中および肝癌細胞株のアポトーシスを誘導し、Bcl2 発現低下、miR-34a-5p 発現増加を誘導したことから、HNP-1 は ALD 時に miR-34a-5p の発現促進、Bcl-2 の発現低下を介して肝細胞アポトーシスを促進すると考えられた。肝細胞アポトーシスは、肝線維化促進に作用することから、HNP-1 の ALD における肝線維化促進に、肝細胞アポトーシスを介した機序が存在する可能性がある。ALD の病態進展における HNP-1 の関与が示唆され、今後のさらなる研究に興味もたれる分野である。

本研究は、ALD 動物モデルを作成し、ALD の病態における HNP-1 の影響を検討したものであり、その結果、好中球から分泌される HNP-1 は、ALD において、肝線維化と肝細胞アポトーシスを促進することが示唆された。また、HNP-1 による肝細胞アポトーシス促進には Bcl2 発現抑制と miR-34a-5p 発現促進が関連する可能性を示した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。