

京都大学	博士 (医学)	氏 名	齊藤 俊一
論文題目	Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis (シロスタゾールは肝星細胞の活性化を抑制し、四塩化炭素による肝線維化を軽減する)		
(論文内容の要旨)			
<p><b>目的:</b> 肝線維化は、肝臓でのコラーゲンを主体とする細胞外基質の蓄積を特徴とし、ウイルス、アルコール、自己免疫、胆汁鬱滞、メタボリックシンドローム等、病因の如何にかかわらず慢性肝疾患に共通する病態反応である。また、肝線維症が進展すると肝硬変や肝不全に陥ることから、その防御法の探索は、医学・医療上の大きな課題となっている。慢性肝疾患では、肝実質細胞の障害により誘導された炎症性サイトカインや成長因子が肝星細胞を刺激することにより、肝星細胞の筋線維芽細胞への分化や細胞外基質の産生を惹起することが明らかとなっており、このことから肝星細胞が肝線維化の責任細胞と目されている。本研究では、広く臨床使用される内服抗血小板薬のシロスタゾールについて、マウス肝線維化モデルを用いて個体レベルでの線維化抑制能の検討を行うこと、並びに、肝星細胞への直接作用を検討することを目的とする。</p> <p><b>方法:</b> C57BL/6 マウスに四塩化炭素を腹腔内投与することで肝線維化モデルを作成し、シロスタゾール混餌食と通常食投与群における肝線維化を、HE 染色、免疫組織学的解析、血液生化学的検査、シリウスレッド染色、ヒドロキシプロリン定量法等によって比較解析することで、シロスタゾールの肝線維化抑制効果について個体レベルの検討を行った。さらに、シロスタゾールの肝臓構成細胞群への直接作用を調べるため、マウス初代培養肝星細胞、肝細胞、クッパー細胞を分離し、シロスタゾールが及ぼす細胞形態、増殖、遺伝子発現などへの影響について解析した。</p> <p><b>結果:</b> マウス個体解析において、シロスタゾール群は通常食群に比し、肝線維化が有意に軽減されていた。この時シロスタゾール群では、肝組織中の <math>\alpha</math>-SMA 陽性細胞、即ち、活性化星細胞が有意に減少していることが明らかとなった。一方、シロスタゾールは、四塩化炭素による肝実質細胞障害や、肝炎誘導時のマクロファージ増加数に対しては、顕著な影響を及ぼさないことが示された。これらのことから、シロスタゾールは個体レベルにおいて、肝細胞やマクロファージには限定的な作用しか示さず、特異的に肝星細胞を効能の標的とし、その活性化を抑制することが明らかとなった。そこで、シロスタゾールの肝星細胞活性化への直接作用を検討するため、<i>in vitro</i> の実験系で解析したところ、シロスタゾールは肝星細胞の活性化指標である (a) 細胞増殖、(b) 筋線維芽細胞への分化、(c) I 型コラーゲン <math>\alpha 1</math> の産生、等を有意に抑制した。またこの時、シロスタゾールは濃度依存性に、肝星細胞の強力な増殖刺激因子である PDGF の受容体発現を低下させることが判明した。他方、個体レベルでの解析と同様に、シロスタゾールはクッパー細胞や肝細胞に対してほとんど影響を及ぼさなかった。肝星細胞は活性化段階で、PDGF による刺激を受け、自身も PDGF を産生し、パラクライン/オートクライン作用により活性化し、筋線維芽細胞に分化転換して細胞外基質を産生するようになることが知られるため、シロスタゾールによる肝星細胞活性化制御メカニズムの一端が、PDGF 受容体の発現制御にある可能性が示された。</p> <p><b>結論:</b> 四塩化炭素によるマウス肝線維化モデルにおいて、シロスタゾールは個体レ</p>			

ベルで肝線維化抑制効果を示すとともに、肝星細胞の活性化に重要な PDGF 受容体の発現低下を伴って、直接的に筋線維芽細胞への分化転換や細胞外基質の産生を抑制した。既に長期の臨床応用により、その安全性が確かめられているシロスタゾールを用いた肝線維化抑制戦略は、安全かつ患者への負担が少ないという点で大いに期待される。

(論文審査の結果の要旨)

肝線維化は、肝臓でのコラーゲンを主体とする細胞外基質の蓄積を特徴とし、病因の如何にかかわらず慢性肝疾患に共通する病態反応であり、肝星細胞が筋線維芽細胞へと分化し、細胞外基質を産生することから肝線維化の責任細胞と目されている。

学位申請者は、広く臨床使用される内服抗血小板薬のシロスタゾールがマウス個体解析において肝線維化を有意に軽減しており、さらに肝組織中の  $\alpha$ -SMA 陽性細胞、即ち、活性化星細胞が有意に減少していることを明らかにした。一方、肝細胞やマクロファージには限定的な作用しか示さず、対象の抗血小板薬クロピドグレルは抑制作用を示さないことから、シロスタゾールは、抗血小板作用とは別に特異的に肝星細胞を効能の標的とし、その活性化を抑制することが示された。さらに、初代培養肝星細胞を用いたシロスタゾール添加実験にて肝星細胞への直接作用を検討し、シロスタゾールは肝星細胞の活性化指標である (a) 細胞増殖、(b) 筋線維芽細胞への分化のマーカである  $\alpha$ -SMA の発現、(c) I 型コラーゲン  $\alpha 1$  の産生、を有意に抑制することを示した。またこの時、シロスタゾールは濃度依存的に、肝星細胞の強力な増殖刺激因子である PDGF の受容体発現を低下させることが判明した。これにより、シロスタゾールによる肝星細胞活性化制御メカニズムの一端が、PDGF 受容体の発現制御にある可能性が示された。

以上の研究は内服抗血小板薬シロスタゾールが個体レベルにおいて肝線維化抑制効果を示すとともに、肝星細胞の活性化に重要な PDGF 受容体の発現低下を伴って、直接的に筋線維芽細胞への分化転換や細胞外基質の産生を抑制するメカニズムを示した。既に長期の臨床応用されている薬剤シロスタゾールについて、肝線維化抑制という薬効を新たに見出した。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 25 年 5 月 24 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。