

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第609号	氏名	嵯峨邦裕
審査委員会委員	主査氏名	柴田 洋孝	②
	副査氏名	宮崎 吳士	③
	副査氏名	花田 俊勝	④
<p>論文題目  <b>Secondary Unconjugated Bile Acids Induce Hepatic Stellate Cell Activation</b>            (二次非抱合型胆汁酸は肝星細胞の活性化を誘導する)</p> <p>論文掲載雑誌名  <b>International Journal of Molecular Sciences</b></p> <p>論文要旨  <b>【緒言】</b>近年、肥満や糖尿病に起因する肝細胞癌が増加している。そのメカニズムとして腸内細菌叢および胆汁酸の組成変化に伴う肝星細胞 (HSC) の活性化が推測されている。本研究では HSC の網羅的遺伝子発現解析を行い、さらに各種胆汁酸が HSC の活性化に及ぼす影響につき検討した。</p> <p><b>【方法】</b>1) ヒト HSC 細胞株 LX-2 に対し二次非抱合型胆汁酸であるデオキシコール酸による処理を行ったのち、DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行った。2) 次に 9 種類の胆汁酸 (①一次抱合型胆汁酸: グリココール酸、グリコケノデオキシコール酸、②一次非抱合型胆汁酸: コール酸、ケノデオキシコール酸、③二次抱合型胆汁酸: グリコウルソデオキシコール酸、グリコデオキシコール酸、④二次非抱合型胆汁酸: デオキシコール酸、リトコール酸、ウルソデオキシコール酸) を HSC に添加後 48 時間の培養上清の Interleukin-6 (IL-6) 濃度を測定した。3) 同様の実験系において、HSC の活性化や静止状態につき、各状態のマーカーである <math>\alpha</math>-smooth muscle actin (<math>\alpha</math>-SMA) および Glial fibrillary acidic protein の免疫蛍光染色を行い、フローサイトメトリーにより活性化 HSC の割合を <math>\alpha</math>-SMA の発現をマーカーとして比較した。</p> <p><b>【結果】</b>1) DNA マイクロアレイによる pathway 解析の結果、Tumor Necrosis Factor (TNF) シグナルに属する多くの遺伝子群、特に IL-6 を含む NF<math>\kappa</math>B 経路の上昇を認めた。            2) 9 種類の胆汁酸の中で二次非抱合型胆汁酸群が上清中 IL-6 濃度の有意な上昇を認めた。            3) 二次非抱合型胆汁酸の添加により、HSC の内皮下突起が放射状に延長し、myofibroblast 様に変化して、有意な <math>\alpha</math>-SMA の発現増強を認めたことから HSC の活性化が示唆された。</p> <p><b>【結論】</b>二次非抱合型胆汁酸により、HSC の活性化は最も強く誘導される。二次非抱合型胆汁酸による HSC の強い活性化誘導は、肥満に起因する肝細胞癌のメカニズムの解明や新たな治療ターゲットの開発につながると考えられた。</p> <p>本研究は、肥満に関連する肝細胞癌発症のメカニズムとして二次非抱合型胆汁酸による HSC 活性化が関与することを明らかにしたもので、今後の新しい治療開発につながることが考えられた。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第609号	氏名	嵯峨邦裕
審査委員会委員	主査氏名	柴田 洋孝	審
	副査氏名	宮崎 英士	印
	副査氏名	花田 俊勝	審
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について、以下の質問を受けた。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・肝星細胞は肝臓全体でどの程度存在し、蓄積しているビタミンAとどのように関連しているか？</li> <li>・本研究はすべてLX-2細胞株のみで行っているが、肝細胞など他の細胞でも同じ現象が起きるか？</li> <li>・肝星細胞の活性化とはどのような指標でどのように定義されているのか？</li> <li>・肝星細胞の活性化した後の筋線維芽細胞様変化は可逆性があるのか？</li> <li>・一旦活性化して筋線維芽細胞化した肝星細胞の運命は？</li> <li>・LX-2細胞株はどれぐらいの継代数の細胞で実験を行ったのか？</li> <li>・一次、二次胆汁酸、抱合型、非抱合型胆汁酸の間で異なる作用がでるのはなぜか？</li> <li>・胆汁酸吸着薬コレステミドを投与すると生体では肝星細胞はどのような影響を受けるか？</li> <li>・マイクロアレイ解析を行う際にデオキシコール酸で処理したのは予備実験の結果からか？</li> <li>・マイクロアレイの結果を評価する中でTNF signaling pathwayに焦点を当てた理由は？</li> <li>・糞便中に含まれる2次胆汁酸産生菌の量を測定することは可能か？</li> <li>・本研究における新知見は、胆汁酸DCAによる肝星細胞刺激によってTNFシグナルが活性化されることか？</li> <li>・DCAとLTAを混合して肝星細胞を刺激しているが、LTAがTLR-2を活性化することからLTA単独刺激でも炎症が生じるのではないか？</li> <li>・各図説明文において、サンプル数を記すべきではないか。</li> <li>・図4のTNFR1発現レベルの実験ではばらつきが大きいため有意差がないとのことであるが、サンプル数を増やすことで有意差がついたのではないか。</li> <li>・添加実験において、対象コントロールにDMSOが含まれているか。</li> <li>・図5において、一次胆汁酸により炎症反応がむしろ抑制されているが、これはどう説明できるか。</li> <li>・図6説明文において、後半部の詳細な説明は本文中に記載すべきではないか。</li> <li>・図7において、<math>\alpha</math>-SMAの発現をFACS解析で示しているが、ウエスタンブロットの方がより明らかに示せたのではないか。</li> <li>・Discussion中に詳細な図の説明が含まれているが、Resultのほうに記載すべきではないか。</li> </ul> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。