



Title	Lipid overloading during liver regeneration causes delayed hepatocyte DNA replication by increasing ER stress in mice with simple hepatic steatosis
Author(s)	Hamano, Mina
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/26315
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

〔論文題名: Thesis Title〕 **Lipid overloading during liver regeneration causes delayed hepatocyte DNA replication by increasing ER stress in mice with simple hepatic steatosis.** (肝再生過程における脂質の過剰負荷はマウス単純性脂肪肝モデルにおいて小胞体ストレスを増加させ、DNA複製の遅延を誘発する。)

専攻名 : 内科系臨床医学専攻
Division

学位申請者 : 濱野 美奈
Name

〔目的 (Purpose)〕

これまで、脂肪肝の再生障害に関する検討は遺伝子改変モデルを用いたものが多い。一方で、食餌誘発性単純性脂肪肝モデルを用いた肝再生障害の報告は少なく、特に肝臓への脂質蓄積そのものが肝再生に与える影響については不明な点が多い。そこで、今回は、食事誘発性単純性脂肪肝モデルマウスを用い、肝臓への脂質蓄積が肝再生過程に及ぼす影響について検討した。さらに、本過程における小胞体ストレスの関与についても検討した。

〔方法 (Methods)〕

C57Bl/6J mice 8週令雄に高脂肪食 (HFD) または通常食 (CD) を9週間給餌後、70%部分肝切除 (PHx) を施行した。肝再生過程における肝細胞増殖をBrdU免疫組織染色、PCNA蛋白発現 (ウエスタンブロッティング法)、細胞周期関連遺伝子 (*cyclin D1/E2/A2/B1*, *Foxm1*) 発現 (real-time RT-PCR法) で評価した。増殖因子のシグナル伝達についてはMet, EGFR, Akt, Erk1/2のリン酸化 (ウエスタンブロッティング法) で評価した。また、肝重量回復率を算出し、肝機能の推移を血中ALT値、総ビリルビン値、アルブミン値で評価した。肝内脂質蓄積はOil red O染色と脂質抽出物中の中性脂肪、脂肪酸定量で評価した。肝内小胞体ストレスについては小胞体ストレス関連遺伝子 (*GRP78*, *IRE1 α* , *ATF6*, *PERK*, *sXBP-1*, *CHOP*) 発現 (real-time RT-PCR法) で評価し、GRP78, sXBP-1については蛋白発現 (ウエスタンブロッティング法、免疫組織染色) でも評価した。小胞体ストレスを軽減する目的で、化学シャペロン的一种であるタウロウルソデオキシコール酸 (TUDCA) の前投与を行い、小胞体ストレスの軽減が肝再生過程に及ぼす影響について評価した。

〔成績 (Results)〕

HFD投与により、マウスは体重増加を示し、単純性脂肪肝、脂質異常症、耐糖能障害を呈した。PHx後36時間で脂肪肝では正常肝に比し、BrdU陽性細胞数、PCNA蛋白発現、Foxm1, cyclin A2遺伝子発現が有意に低く、肝再生が遅延した。PHx後24時間で脂肪肝では正常肝に比し、Erk1/2のリン酸化が有意に低下した。肝重量回復率はPHx後6日目までは両群で有意な差を認めず、PHx後8日目では脂肪肝では正常肝に比し、肝重量回復率が低下した。血中ALT値は両群でPHx後12時間にピークを示し、脂肪肝では正常肝に比し有意に高値だった。血中総ビリルビン値、アルブミン値は両群で差を認めなかった。両群で肝再生過程において肝内長鎖脂肪酸の蓄積増加を認めたが、脂肪肝でより顕著であった。肝再生過程において、両群で分子シャペロンであるGRP78の発現は遺伝子・蛋白レベルでともに増加した。PHx後24時間で脂肪肝では正常肝に比し、GRP78蛋白発現が有意に高かった。IRE1 α , ATF6, PERK遺伝子発現は両群で差を認めなかった。脂肪肝では正常肝に比し、sXBP-1, CHOP遺伝子発現が有意な上昇を示した。さらに、PHx後24時間の脂肪肝においてのみ、sXBP-1蛋白発現を確認した。TUDCA前投与により、PHx後両群で認めたGRP78の発現増強は遺伝子・蛋白レベルいずれにおいても著明に低下した。また、脂肪肝で認めたsXBP-1, CHOP遺伝子発現は軽減した。さらに、TUDCA前投与により、脂肪肝でのみ確認されsXBP-1蛋白発現は消失した。TUDCA前投与により、PHx後に脂肪肝で認めたErk1/2のリン酸化低下や細胞周期関連遺伝子、PCNA蛋白、BrdU陽性細胞の発現遅延は改善した。

〔総括 (Conclusion)〕

食餌誘発性単純性脂肪肝では肝切除後の再生遅延を認め、その分子機構として肝内に蓄積する脂質により誘発される小胞体ストレスの関与が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 濱野 美奈

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	大阪大学教授 竹原 徹郎
	副 査	大阪大学教授 下村 伸一郎
	副 査	大阪大学教授 森 正樹

論文審査の結果の要旨

脂肪肝の再生障害は多くの遺伝子改変モデルで報告されてきたが、食餌誘発性脂肪肝モデルでの再生障害の報告は少なく、その機序は十分に解明されていない。今回申請者は食事誘発性単純性脂肪肝モデルを用い、肝臓への脂質蓄積が再生に及ぼす影響をERストレスに着目し検討を行った。PHx後36時間で脂肪肝では正常肝に比し、BrdU陽性細胞数、PCNA蛋白発現、細胞周期関連遺伝子発現が有意に低く、肝再生が遅延した。PHx後24時間で脂肪肝では正常肝に比し、Erk1/2のリン酸化が有意に低下した。両群で肝再生過程において肝内長鎖脂肪酸の蓄積増加を認めたが、脂肪肝でより顕著であった。肝再生過程において、両群でGRP78の発現は遺伝子・蛋白レベルとともに増加した。PHx後24時間で脂肪肝では正常肝に比し、GRP78蛋白発現が有意に高く、sXBP-1、CHOP遺伝子発現が有意な上昇を示した。さらに、PHx後24時間の脂肪肝においてのみ、sXBP-1蛋白発現を確認した。TUDCA前投与により、小胞体ストレスは改善し、PHx後に脂肪肝で認めたErk1/2のリン酸化低下や細胞周期関連遺伝子、PCNA蛋白、BrdU陽性細胞の発現遅延は改善した。以上より食餌誘発性単純性脂肪肝の再生遅延の分子機構として肝内に蓄積する脂質により誘発される小胞体ストレスの関与を示した点において、本研究は新規且つ臨床的に意義が高い研究と考えられる。

以上により、申請者は学位の授与に値すると考えられる。