



Title	Cytoprotective effect of Prostaglandin I2 analogues on superoxideinduced hepatocyte injury
Author(s)	中野, 博史
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40331">https://hdl.handle.net/11094/40331</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 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

氏 名	中 野 博 史
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 6 5 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 7 月 8 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Cytoprotective effect of Prostaglandin I <sub>2</sub> analogues on superoxide-induced hepatocyte injury (スーパーオキサイドによる肝細胞傷害による Prostaglandin I <sub>2</sub> 誘導体の細胞保護効果)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 松 田 暉 教 授 祖 父 江 憲 治

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目 的】

肝臓の虚血あるいは保存後の再灌流傷害において、oxygen-derived free radicals (OFRs), 特に superoxide (SO) が重要な役割を果たしていることが報告されてきた。これらの OFRs は、Kupffer cell あるいは活性化した好中球から発生するとされており、肝細胞に対して外部から傷害を与えられられる。そこで、我々は肝臓の再灌流傷害モデルとして、SO を培養肝細胞の buffer 中で発生させる実験系を考案し、傷害初期に細胞内 free Ca<sup>2+</sup> 濃度が上昇していることを既に報告した。一方、Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) 誘導体が肝の虚血再灌流傷害に対して保護効果を有することが報告されてきたが、その機序の詳細については不明である。そこで、ラット培養肝細胞 SO を負荷するモデルにおいて、PGI<sub>2</sub> 誘導体の肝細胞保護効果の機序について検討した。

### 【方 法】

初代培養肝細胞は、雄性 Wister rat から Seglen の collagenase 灌流法により採取し、24時間培養後に実験に供した。Hypoxanthine (HX) 250 μM と xanthine oxidase (XO) 75 mU/ml を培養肝細胞の buffer 中に直接添加することにより SO を発生させて、肝細胞傷害を誘導した。PGI<sub>2</sub> 誘導体としては OP2507 と OP41483 の 2 種類を用いた。PGI<sub>2</sub> 誘導体は HX+XO 添加の 1 時間前から加えておき (preincubate), 添加後も同濃度とした。肝細胞傷害の程度は、buffer 中に逸脱してくる LDH 活性を 5 時間まで経時的に測定して判定した。傷害の機序解析のため、SO 負荷後 30 分間の傷害初期における肝細胞内の free Ca<sup>2+</sup> 濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) を fura-2, ARGUS を用いて測定した。肝細胞内の cyclic AMP (cAMP) 濃度は EIA で測定した。さらに、細胞膜を容易に通過しうる cAMP 誘導体, dibutyryl-cAMP (db-cAMP) を 0.01 mM-10 mM の濃度で添加し、その効果を検討した。

### 【成 績】

HX+XO を添加して SO を負荷し、肝細胞傷害を誘導すると、LDH の逸脱は 30 分後より始まり、以後経時的に上昇して 4-5 時間で plateau に達した。PGI<sub>2</sub> 誘導体添加群では、3, 5 時間後の LDH 逸脱が濃度依存性に抑制された。OP2507 は 10, 100 ng/ml, OP41483 は 100 ng/ml を至適濃度として、それを超えると、共に細胞保護効果は減弱した。

OP2507添加群の5時間後のLDH活性は、対照群の $367 \pm 3$  Wroblewski units (WU)に対して、1 ng/ml :  $283 \pm 63$  WU, 10 ng/ml :  $202 \pm 10$  WU, 100 ng/ml :  $230 \pm 28$  WU, 1000 ng/ml :  $246 \pm 47$  WUであった。次に preincubate の施行群と非施行群とを比較すると、前者で有意に傷害が抑制され、preincubate の効果が示唆された。PGI<sub>2</sub> 誘導体添加群における preincubate 直後の細胞内 cAMP 濃度は、対照群  $196 \pm 95$  fmol/ $2 \times 10^5$  cells に対して、OP2507添加群では、10 ng/ml :  $681 \pm 178$  fmol/ $2 \times 10^5$  cells, 100 ng/ml :  $796 \pm 407$  fmol/ $2 \times 10^5$  cells と上昇していた。この上昇が有意な添加濃度は、LDH 活性からみた細胞保護効果の至適濃度と一致していた。また、db-cAMP は、10, 100 mM 添加群において LDH 逸脱を有意に抑制し、PGI<sub>2</sub> 誘導体の効果を再現した。すなわち、PGI<sub>2</sub> 誘導体は SO 負荷前から加えられることにより、濃度依存性に傷害抑制効果を認め、その効果は細胞内 cAMP 濃度の上昇を介していると考えられた。次に、傷害初期30分間の  $[Ca^{2+}]_i$  を測定すると、対照群では前値の  $181 \pm 26$  nM から SO 添加30分後には  $795 \pm 63$  nM にまで上昇するのに対して、OP2507, 10 ng/ml 添加群で  $280 \pm 33$  nM, 100 ng/ml 添加群では  $378 \pm 64$  nM と有意に上昇を抑制した。この効果は、LDH 活性からみた細胞傷害抑制、preincubate 直後の cAMP 濃度の上昇とも濃度的に一致していた。また、db-cAMP の10, 100 mM 添加群において、傷害初期の  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を同様に抑制した。

#### 【総括】

PGI<sub>2</sub> 誘導体は SO 負荷による肝細胞傷害を抑制し、その機序には、細胞内の cAMP 濃度の上昇を介した、 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇抑制が関与していることが示された。

### 論文審査の結果の要旨

臓器の阻血再灌流傷害では、活性酸素が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。本研究は、阻血再灌流肝傷害のモデルとして、培養肝細胞 O<sub>2</sub> を発生させる系を用いて、Prostaglandin I<sub>2</sub> 誘導体の肝細胞保護効果並びにそのメカニズムを検討したものである。Prostaglandin I<sub>2</sub> 誘導体はスーパーオキシドによる肝細胞傷害に対して抑制効果を有しており、その作用機序には、細胞内の cAMP 濃度の上昇を介した、細胞内 free Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇の抑制が関与していることが認められた。これは、肝再灌流傷害の発生機序の解明につながり、Prostaglandin I<sub>2</sub> 誘導体の傷害抑制の臨床応用をも期待でき、非常に有意義なことであり、学位に値すると考える。