



Title	Activation of Kupffer cells and caspase-3 involved in rat hepatocyte apoptosis induced by endotoxin
Author(s)	濱田, 栄作
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43100">https://hdl.handle.net/11094/43100</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">大阪大学の博士論文について</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	はま だ えい さく 濱 田 栄 作
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 6 7 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 14 年 3 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	Activation of Kupffer cells and caspase-3 involved in rat hepatocyte apoptosis induced by endotoxin (エンドトキシンによる肝細胞アポトーシスにおける Kupffer 細胞ならびに caspase-3 活性化の関与)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 田 暉  (副査) 教 授 内 山 安 男 教 授 門 田 守 人

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

重症感染症や敗血症では肝障害を発生し、時に肝不全に至ることがある。動物実験モデルにおいては、同様な肝障害が Lipopolysaccharides (LPS) を投与することにより再現される。LPS は、マクロファージ (肝臓においては Kupffer 細胞)、好中球、内皮細胞を活性化し、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、interferon  $\gamma$  等のサイトカインを産生させる。

一方、TNF- $\alpha$  は TNF receptor1 (TNFR1) に結合し、caspase cascade を活性化し、TNFR1 を発現した細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。

本研究は、LPS による肝障害を Kupffer 細胞の活性化とそれに伴う肝細胞アポトーシスを中心に検討した。

#### 【方法】

Sprague-Dawley ラットを用いて in vivo 及び in vitro の実験を行った。

- (1) ラットに E. coli 由来の LPS (0 ~ 500  $\mu$ g/kg body) を静脈投与し、0 ~ 48 時間後に血液・胆汁・肝組織を採取し、TUNEL 法にてアポトーシスを検出した。アポトーシスは電顕及びアガロースゲル電気泳動法にて確認した。
- (2) caspase-3 の合成基質 MCA-DEVDAPK (dnp) を用いて肝組織中の caspase-3 like proteases 活性を測定した。活性型 caspase-3 に対する抗体を用いて活性型 caspase-3 の局在を検討した。
- (3) Kupffer 細胞の機能を抑制するガドリニウム (Gd; 7mg/kg body) を 48 時間および 24 時間前に投与後、LPS (500  $\mu$ g/kg body) を投与し、Kupffer 細胞の関与を検討した。
- (4) 肝細胞及び Kupffer 細胞を分離後、各々単独または両者の混合培養系に LPS (300mg/ml) を添加し、アポトーシス誘導の有無を検討した。
- (5) Kupffer 細胞の培養系に LPS を添加し、2 時間培養した培養液 (conditioned medium) を単離肝細胞に添加し、アポトーシスの誘導の有無を確認し、さらに TNF- $\alpha$  中和抗体によるアポトーシス抑制効果を検討した。
- (6) conditioned medium 中に acetyl-DEVD-CHO (caspase-3 の阻害剤)、acetyl-IETD-CHO (procaspase-3 cleaving enzymes の阻害剤) を添加しアポトーシス抑制効果を検討した。

#### 【成績】

- (1) LPS 投与後胆汁量は減少し、血中ビリルビン値は 24 ~ 48 時間後をピークとして増加した。TUNEL 陽性細胞数

- は LPS 投与後 8 時間をピークとして時間並びに容量依存的に増加した。LPS 投与後の肝組織は電気泳動にて DNA ladder を認め、電顕により TUNEL 陽性細胞はアポトーシスに陥った肝細胞であることが確認された。
- (2) TUNEL 陽性細胞数の推移に一致して caspase-3 like proteases 活性化を認め、TUNEL 陽性細胞の細胞質に活性型 caspase-3 を認めた。
- (3) Gd を前投与により、LPS 投与後の caspase-3 like proteases 活性化は抑制され、TUNEL 陽性細胞数の増加も抑制された。
- (4) 肝細胞または Kupffer 細胞の単独培養系に LPS を投与しても TUNEL 陽性細胞は増加しなかったが、両者の混合培養系においては TUNEL 陽性肝細胞の増加を認めた。
- (5) conditioned medium を添加した肝細胞では TUNEL 陽性細胞が増加し、TNF- $\alpha$  中和抗体添加によりこの増加は抑制された。
- (6) conditioned medium 中に acetyl-DEVD-CHO、acetyl-IETD-CHO を添加することにより TUNEL 陽性細胞の増加は抑制された。

#### 【総括】

- (1) LPS による肝障害についてラットを用い in vivo 及び in vitro で肝細胞アポトーシスを中心に検討した。
- (2) ラットに LPS を投与すると、caspase-3 の活性化と肝細胞アポトーシスを認めた。
- (3) Gd 前投与で Kupffer 細胞を不活性化すると、caspase-3 の活性化は抑制され、肝細胞アポトーシスも抑制された。
- (4) LPS は単離肝細胞にアポトーシスを誘導しなかったが、LPS を投与した Kupffer 細胞の conditioned medium は単離肝細胞にアポトーシスを誘導した。
- (5) conditioned medium による肝細胞アポトーシスは、TNF- $\alpha$  中和抗体、caspase-3 の阻害剤、procaspase-3 cleaving enzymes の阻害剤の添加により抑制された。
- (6) 以上より、LPS による肝障害には、Kupffer 細胞の活性化と同細胞から放出される TNF- $\alpha$  による肝細胞アポトーシスが関与していると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

重症感染症や敗血では様々な程度の肝障害が発症することがあり、時には肝不全に陥り、死にいたることもある。エンドトキシン (LPS) をラットに投与することにより肝細胞にアポトーシスが誘導されることが報告されており、敗血症に伴う肝障害に LPS が重要な役割を担うことが示唆されている。しかし、LPS により誘導される肝細胞アポトーシスの詳細な機構については未だ不明である。本研究は、LPS により活性化された Kupffer 細胞から分泌された chemical mediator が肝細胞に作用し、caspases を活性化し、肝細胞にアポトーシスが誘導されるのではないかと仮説のもとに LPS により誘導される肝細胞アポトーシスの機構を検討したものである。

ラットを用いた in vivo ならびに in vitro の実験を行い以下の結果が得られた。1. ラットに LPS を投与し、時間容量依存性に肝細胞のアポトーシスが認められた。2. アポトーシス誘導に一致して caspase-3 活性が上昇した。3. ガドリニウム処置により Kupffer 細胞を不活化すると肝細胞のアポトーシスは誘導されなかった。4. 分離肝細胞と Kupffer 細胞との混合培養系に LPS を添加すると、肝細胞のみにアポトーシスを認めた。4. Kupffer 細胞に LPS を添加し 2 時間培養後の培養液で肝細胞を培養すると、アポトーシスが誘導された。5. このアポトーシスは TNF $\alpha$  中和抗体ならびに caspases 阻害剤の添加にて抑制された。

以上の結果より、LPS により誘導される肝細胞アポトーシスには活性化した Kupffer 細胞より分泌される TNF $\alpha$  とこれにより肝細胞内で活性化する caspase-3 が関与していることが示され、本研究は博士 (医学) の学位に値するものと考えられる。