

Title	Participation of autophagy in the degeneration process of rat hepatocytes after transplantation following prolonged cold preservation
Author(s)	盧, 震輝
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45386
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	盧 震 輝
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 3 2 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学 位 論 文 名	Participation of autophagy in the degeneration process of rat hepatocytes after transplantation following prolonged cold preservation (長期冷保存-移植後の肝細胞変性過程におけるオートファジーの関与)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 白 倉 良 太 教 授 林 紀 夫

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

肝移植における虚血再灌流傷害についてこれまで多くの研究がなされてきたが、そのメカニズムについては未だに不明な部分が多い。我々は肝の冷保存再灌流傷害のメカニズムを研究する過程で、冷保存の段階だけではなく、再灌流後の肝細胞中にもオートファゴソーム（自食小胞）やオートリソソームが多数存在することに気付いた。オートファジー（自食作用）は肝細胞を初め、身体を構成する細胞が持つ主要な分解経路の一つであり、細胞内の古くなった構成要素（サイトゾルや細胞内小器官を含む）を生物活性のあるモノマーにまで分解して、再利用する経路である。正常な細胞内代謝の一環であるが、飢餓状態や多くの病的状態でオートファジーは誘導され、細胞の活性維持に不可欠の機構として知られている。近年、オートファジー関連遺伝子の発見により、この現象を分子レベルで解析することが可能になり、オートファジーが細胞の分化や死などにも関与することが分かってきた。本研究では、ラット肝移植に伴う長期冷保存-再灌流障害をオートファジーの観点から、生化学、免疫組織化学、超微形態学的手法を用いて検討した。

〔方法ならびに成績〕

実験モデルとしてラット同所性肝移植を用いた。肝グラフトを臓器保存液 (University of Wisconsin solution) (UW液) 中に入れ 4℃で 24 時間保存した後、同系ラットに移植した。肝グラフトは冷保存前および冷保存後と、移植後再灌流開始 30 分、1 時間、2 時間後にそれぞれ摘出した。

1) オートファゴソームのマーカー蛋白である LC3 の免疫染色では、冷保存後のグラフト中の肝細胞に弱いび慢性的 LC3 陽性反応と陽性顆粒の存在を認めた。再灌流開始後 30 分のグラフトでは、LC3 陽性顆粒を持つ細胞の数と細胞内の陽性顆粒の数は高い頻度で認められた。その後時間経過とともに陽性細胞やその顆粒の数も減少した。クッパー細胞のマーカーである ED2 と抗 LC3 抗体を用いた二重染色を行ったところ、再灌流後 1 時間より類洞に沿った多くの ED2 陽性のクッパー細胞に LC3 陽性の粗大顆粒状の構造物が共存していた。おそらく、クッパー細胞が細胞死に陥った肝細胞を貪食した結果と推察された。

2) LC3 は、オートファジー誘導時に LC3-I (18 kD の細胞質型) から LC3-II (16 kD の膜付着型) に転換され、LC3-II の量がオートファゴソーム形成と正の相関を示すことが知られている。各時点で肝組織の抽出液中の LC3 の分子型をウェスタンブロッティング法で解析したところ、LC3-II の発現は再灌流開始後 30 分でピークとなり、その後漸減した。また、LC3-II/LC3-I も全く同じ傾向を示した。これらの結果は免疫組織細胞化学反応の結果と一致していた。

3) 透過電子顕微鏡を用いて同様に各時点で採取したグラフトの微細形態を調べた。その結果、24 時間の冷保存により、肝細胞には不定形の物質を含む腔胞 (オートファジー性腔胞) や新たに形成されたオートファゴソームが認められた。再灌流開始後 30 分になると、これらの腔胞や新たな小胞膜構造に包まれたオートファゴソームが数多く認められた。また、たくさんのオートファゴソームを持った肝細胞が類洞内に離脱している像もみられた。また再灌流開始後 60 分のグラフトでは、類洞のクッパー細胞には貪食した顆粒が多く認められた。中には、多くのオートファゴソームやオートリソソームと濃縮した核を有する細胞を貪食したクッパー細胞も認められた。これらの像は LC3 と ED2 に対する免疫染色の結果と一致していた。

[総括]

本研究は、ラット肝移植において、冷保存の段階だけではなく再灌流後の肝細胞中にオートファジーが誘導されることを初めて明らかにした。冷保存の段階でのオートファジーは、保存液である UW 液中にアミノ酸が含まれていないため、飢餓状態と同様の条件下に誘導されたものと考えられる。この状態は、再灌流によって改善される。しかし再灌流後の肝細胞にはより強くオートファジーが誘導されることが明らかとなった。おそらく、ストレス性のオートファジー反応と思われる。さらに、変性あるいは死んだ肝細胞には多くのオートファゴソーム/オートリソソーム像が認められたことから、オートファジーが肝細胞の変性過程に関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

臓器移植の実施に際して、摘出された臓器の機能は低温保存と移植後血流再開時に傷害される。従って、低温保存・再灌流傷害を最小限に抑制することは、臓器移植術成功のために重要であるが、その傷害のメカニズムについては未だに不明な点が多い。オートファジー (自食作用) は細胞が持つ主要な細胞内構成成分の分解経路の一つであり、細胞内の古くなった構成要素を再利用するため分解する経路と考えられている。本研究は、ラット肝移植を用いた肝の長期冷保存・再灌流障害モデルにおいて、移植肝にオートファジーの現象が認められることを、生化学、免疫組織化学、超微形態学的手法を用いて証明したものである。オートファジーのマーカー蛋白である LC3 に対する抗体を用いた免疫染色で、冷保存再灌流後 30 分に肝細胞中に最も多く LC3 タンパクの発現を認め、その後時間経過とともに発現は減弱した。クッパー細胞のマーカー蛋白である ED2 と LC3 の二重染色を行ったところ、再灌流後 1 時間より類洞内の ED2 陽性細胞内に LC3 陽性顆粒が共存する像を多く認め、クッパー細胞が細胞死に陥った肝細胞を貪食した結果と推察された。またウェスタンブロット法および透過電子顕微鏡像にても上記と同様の所見が確認された。さらに、変性あるいは死肝細胞には多くのオートファゴソーム/オートリソソーム像が認められたことは、オートファジーが肝細胞の冷保存・再灌流傷害過程に関与することを示唆している。肝の冷保存・再灌流傷害における細胞傷害のメカニズムの解明は、傷害の軽減法の開発を可能にするもので、学位の授与に値すると考える。