



Title	Participation of autophagy in the initiation of graft dysfunction after rat liver transplantation
Author(s)	後藤, 邦仁
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54173
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、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

【132】	
氏 名	こ 後 藤 邦 仁
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 2 6 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 21 年 4 月 16 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	Participation of autophagy in the initiation of graft dysfunction after rat liver transplantation (ラット肝移植後のグラフト機能不全の初期段階にオートファジーが関与する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 内山 安男 (副査) 教 授 吉川 秀樹 教 授 米田 悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

肝移植は末期肝疾患に対する治療法として確立されてきたが、術後早期のグラフト肝機能不全は依然として 5-25%の患者で起きている。肝の冷保存再灌流傷害が原因の一つと考えられているが、そのメカニズムについては未だに不明な点が多い。我々はこれまでに、ラットを用いた肝の冷虚血再灌流傷害のメカニズムを研究する過程で、肝グラフトを長時間冷保存した後に移植すると、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（自食作用）が誘導されることを初めて明らかにした。また、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、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

ム／オートリソソーム像が認められることも報告した。オートファジーは肝細胞を初め、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、一部の細胞質と共に細胞内の不用品小器官などの構成成分を隔離膜と呼ばれる小胞様の構造で包み込み、形成されたオートファゴソームとリソソームが融合することで、生物活性のあるモノマーにまで分解し、再利用する経路である。オートファジーは細胞の生理的な現象であるが、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にも関与することが分かってきた。そこで本研究では、ラット同所性肝移植にみられる冷虚血再灌流に基づくグラフト機能不全におけるオートファジーの役割を明らかにすることを目的とした。

〔方法〕

実験モデルとしてラット同所性肝移植を用いた。ドナーラットから摘出した肝グラフトを保存液 (University of Wisconsin solution : UW 液) 中に入れ 4℃で 24 時間保存した後、同系ラットに移植する。保存液中にオートファジーの抑制剤である wortmannin や、リソソームシステインおよびアスバラギン酸プロテアーゼの抑制剤である leupeptin および pepstatin A などをそれぞれ添加し、各モデルの生存率、肝傷害の程度などを比較検討した。また肝移植後 15 分、30 分、60 分、120 分、180 分に各モデルラットを擬死させ、肝臓、末梢血などを採取し、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。

〔成績〕

wortmannin (100nM) を UW 液中に入れた群 (WM 群) と入れなかった群 (無処置群) で比較検討を行った結果、(1) 生存率は WM 群の方が有意に高かった (90% vs 10%)。 (2) 再灌流後 120 分の血中の AST、ALT は無処置群の方が有意に高く、同時期の TUNEL 陽性細胞数は有意に多かった。TUNEL 陽性細胞の核が大きいことから、透過電子顕微鏡像で確認すると、その領域の肝細胞のほとんどは細胞膜が破綻し、核クロマチンの凝縮も見られず、ネクロシスであると考えられた。 (3) WM 群において LC3 の発現は再灌流後 15 分で有意に低かった。 (4) 透過電子顕微鏡像では、再灌流後 15 分に無処置群で、たくさんのオートファゴソームやオートリソソームを持つ肝細胞が変性し、肝細胞塊となり肝細胞索から離脱している像を多く認めた。また離脱した肝細胞塊は血球細胞とともに類洞を閉塞させ、その中のいくつかの細胞の核は辺縁に濃縮したクロマチンを有していた。同時期の TUNEL 陽性細胞数も無処置群で多く認めたが、caspase-3 や caspase-7 の活性化は認められなかった。 (5) リソソームアスバラギン酸プロテアーゼである cathepsin D の発現は、再灌流後 15 分に無処置群で有意に高く、leupeptin および pepstatin A を UW 液に添加し移植を行った場合、個体の生存率は 100% であった。

〔総括〕

本研究では、ラット肝移植の系において、グラフト肝を長時間冷保存し再灌流すると、再灌流後 15 分以内に肝細胞にオートファジー／リソソーム性の細胞変性が起こり、その変性した肝細胞は小塊として肝細胞索から類洞に遊離してその血流を止めること、その結果、肝小葉内でたくさんの肝細胞がネクロシスに

陥り、最終的にグラフト機能不全が引き起こされることが示唆された。これらのことから、再灌流後早期にオートファジーやリソソームプロテアーゼを抑制することで、肝の冷虚血再灌流傷害を軽減できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

肝移植は末期肝疾患に対する治療法として確立されてきたが、術後早期のグラフト肝機能不全は依然として 5-25% の患者で起きている。本研究では、ラット同所性肝移植の系を用いて、グラフト肝を保存液中で長時間冷保存し再灌流すると、再灌流後 15 分以内に肝細胞にオートファジー／リソソーム性の細胞変性が起こり、その変性した肝細胞は小塊として肝細胞索から類洞に遊離してその血流を止めること、その結果、肝小葉内でたくさんの肝細胞がネクロシスに陥り、最終的にグラフト機能不全が引き起こされることを明らかにした。また、再灌流後早期にオートファジーやリソソームプロテアーゼを抑制することで、肝の冷虚血再灌流傷害を軽減でき、その結果、肝グラフト機能不全を防ぐことができる可能性を示唆しており、今後臨床応用も期待できる。よって学位の授与に値すると考えられる。