OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Mcl-1 and Bcl-xL Cooperatively Maintain Integrity of Hepatocytes in Developing and Adult Murine Liver
Author(s)	疋田, 隼人
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54195
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【127】

氏名	疋田隼人（ひきたはやと）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第　23696　号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学位論文名	Mcl-1 and Bcl-xL Cooperatively Maintain Integrity of Hepatocytes in Developing and Adult Murine Liver （Mcl-1とBcl-xLの協調は肝細胞の発生と恒常性の維持に必須である）
論文審査委員	（主査） 教授 林　紀夫 （副査） 教授 森　正樹　教授 辻本 賀英

論文内容の要旨

〔目的〕

細胞がアポトーシスに陥るかどうかは、アポトーシス抑制蛋白質と促進蛋白質のバランスによって決定づけられている。アポトーシス抑制蛋白として現在までBcl-2、Bcl-xL、Mcl-1、Bcl-w、Bfl-1の5つが知られている。しかし肝細胞においてBcl-2の発現は認めない。またBcl-w及びBfl-1ノックアウト（KO）マウスの肝臓は野生型マウスと異なる表現型を示さないと報告され

ている。一方、Bcl-xL及びMcl-1 KOマウスは胎生致死であり、その肝臓における解析は困難であった。以前、私の所属する研究室では、肝細胞特異的なBcl-ｘL KOマウスを作成し、肝細胞ではBcl-xLが重要な抗アポトーシス蛋白としての役割を果たしていることを報告した。すなわち、肝細胞におけるBcl-xLの欠損は肝細胞アポトーシスを常に惹起させることを証明した。しかしMcl-1の肝細胞における役割は依然不明である。そこで、今回私はMcl-1の肝細胞における役割、及びBcl-xLとの関係を検討することを目的とした。

〔　方法ならびに成績　〕

アルブミンプロモーター下にCreを発現する*AlbCre*マウスとMcl-1遺伝子をloxP配列で挟んだ$mcl\text{-}1^{flox/flox}$マウスを交配させることで、肝細胞特異的Mcl-1ヘテロマウス（Mcl-1 +/-）及びKOマウス（Mcl-1 -/-）を作成した。6週齢の時点で血清ALT及び血清caspase3/7活性を測定し、肝組織をHE染色及びTUNEL染色にて評価した。Mcl-1-/-はMcl-1 +/+と比較して有意に血清ALT、caspase3/7活性が高く、その肝組織像では多数のアポトーシス細胞を認めたが、Mcl-1 +/-はMcl-1 +/+と同様にこのような肝障害は認めなかった。この結果は以前報告された肝細胞特異的Bcl-xL KO(Bcl-xL -/-)及びヘテロマウス(Bcl-xL +/-)の表現型と類似していた。また、この肝障害はアポトーシス促進蛋白の１つであるBidをKOすることにより改善を認めた。以上より、肝細胞ではBcl-xLと同様Mcl-1も重要な抗アポトーシス蛋白としての役割を果たしていることが明らかとなった。

次にMcl-1とBcl-xLとの関係を検討するために、Mcl-1 -/-を、Bcl-x遺伝子をloxP配列で挟んだ$bcl\text{-}x^{flox/flox}$マウスと交配することにより、肝細胞特異的Bcl-xL Mcl-1ダブルKOマウスを作成した。Bcl-xL +/- Mcl-1 +/-は、それぞれ単独のヘテロマウスでは認めなかった持続的なアポトーシスによる肝障害を認めた。一方、Bcl-xL -/- Mcl-1 +/-、Bcl-xL +/- Mcl-1 -/-、Bcl-xL -/- Mcl-1 -/-は、遺伝子検査を施行した3週齢では1匹も認めなかった。そこで、これらのマウスが胎生致死である可能性を検討するため、出生直前である胎生18.5日の胎児を解析した。胎生18.5日では、Bcl-xL -/- Mcl-1 +/-、Bcl-xL +/- Mcl-1 -/-、Bcl-xL -/- Mcl-1 -/-はそれぞれメンデルの法則に従って発生しており胎生致死は否定された。しかしこれらマウスの肝臓は、出生後も長期に生存するBcl-xL +/+ Mcl-1 +/+及びBcl-xL +/- Mcl-1 +/-の肝臓と比較し有意に小さく、肝細胞数が著しく低下していた。さらにこれらの肝細胞数が低下したマウスは生後1日以内に血清アンモニア及び総ビリルビンの上昇を伴い死亡することが判明した。

〔　総　　括　〕

私は、５つあるアポトーシス抑制蛋白の中でBcl-xLとMcl-1の２つが、協調して肝細胞をアポトーシスから防御し、胎児期の肝臓形成、及び出生後の肝細胞の生存を維持させていることを解明した。またその作用はBcl-xLとMcl-1の総遺伝子量に依存していた。すなわち、Bcl-xLとMcl-1の合計４つある対立遺伝子のうち、3つの対立遺伝子が保たれていれば肝細胞はアポトーシスを回避できるが、2つの対立遺伝子が欠損すると、恒常的なアポトーシスに陥り、3つ以上の対立遺伝子が欠損すると、正常な肝臓形成そのものが行われないことを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

細胞の生死を支配するアポトーシスはアポトーシス促進蛋白と抑制蛋白質のバランスで決定されている。肝細胞にはアポトーシス抑制蛋白質としてBcl-xLだけでなく、Mcl-1も発現している。Bcl-xLは肝細胞の維持に必須の蛋白質であることは知られているが、Mcl-1の役割は不明であった。そこで、肝細胞特異的Mcl-1ノックアウトマウスを用いて、肝細胞におけるMcl-1の意義及びBcl-xLとの関係を検討した。肝細胞におけるMcl-1はBcl-xLと同様に、その欠損は細胞のアポトーシスを誘導することから、肝細胞の維持には必須の蛋白であることが示された。さらに、肝細胞特異的Bcl-xL/Mcl-1ダブルノックアウトマウスを用いて、Mcl-1の抗アポトーシス作用はBcl-xLとの遺伝子量依存的な協調が存在することも明らかにした。

以上の結果は、肝細胞の生と死の制御を今後解明していく上で非常に有意義かつ重要な研究であり、学位の授与に値すると考えられる。