

京都大学	博士 (医学)	氏名	和田 征大
論文題目	CAAT/Enhancer Binding Protein-Homologous Protein Deficiency Attenuates Liver Ichemia/Reperfusion Injury in Mice (CHOP 欠損はマウスにおける肝虚血再灌流障害を軽減する)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>【背景】 肝虚血再灌流障害は肝臓手術後における肝機能不全の主な原因のひとつである。虚血再灌流によって助長される肝移植後のグラフト不全や肝切除後の肝不全は多臓器不全に進展し、死に至る場合もある。また虚血再灌流による肝実質へのダメージは、術後の腫瘍再発を促進する可能性も示唆されている。 小胞体ストレスとは、小胞体内に正常に折りたたまれていない異常蛋白が蓄積した状態のことである。さまざまな状況により傷害を受けた細胞で、小胞体ストレスが引き起こされる。小胞体ストレスを回避するための機構として小胞体ストレス応答がある。小胞体ストレス応答は蓄積した異常蛋白を解消するための保護的なシステムだが、その保護能力を上回る傷害がもたらされた場合、細胞は apoptosis を選択する。 小胞体ストレス応答に関連した apoptosis では transcriptional factor CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)が重要な役割を果たしており、CHOP ノックアウトマウスを用いた研究では様々な疾患の軽減が報告されている。心筋・腎臓・神経細胞においては虚血再灌流障害の改善も報告されている。本研究の目的は CHOP 欠損により肝虚血再灌流障害に軽減がみられるかを明らかにすることである。</p> <p>【方法】生後 7 週から 11 週の野生型マウス C57BL6(WT)と CHOP ノックアウトマウス C57BL6 back ground(CHOP KO)の肝臓 70%に対して血流遮断を 60 分間施行した後、血流を再開した。Sham 群では血流遮断以外の手順を同様におこなった。その後各時間において肝組織と血液を採取した。肝虚血再灌流障害における野生型マウス肝臓での CHOP 発現の評価及び、両群における小胞体ストレス発現の評価を行った。肝障害の評価は再灌流後 6 時間における血液中の肝酵素 (ALT&AST)、肝臓の H&E 染色、好中球浸潤の定量により行った。Apoptosis を含む細胞死の評価として TUNEL 染色及び cleaved-caspase 3 protein を評価した。また CHOP が影響を与えるとされる bcl-2 family protein を評価した。</p> <p>【結果】肝虚血再灌流障害後の肝臓では、野生型マウスにおいて著明なCHOP発現の上昇を認めることをReal-time PCRおよびwestern blottingで確認した。次に、免疫染色を用いてCHOPを発現する細胞が主に肝細胞であることを確認した。Real-time PCRにより小胞体ストレスマーカーであるGRP78及びCHOPの上流分子であるATF4を測定し、肝虚血再灌流障害が両群において小胞体ストレスを誘導していることを確認した。野生型マウス肝臓におけるCHOPの発現はmRNA・タンパクともに再灌流後3時間でピークとなり、両群での小胞体ストレスマーカーも再灌流後3時間でピークとなっていた。CHOPノックアウトマウスにおいて肝障害は有意に軽減されており、ALT/ASTの低下(WT ALT: 8437.5 ± 699.3 IU/L, AST: 3787.5 ± 312.6 IU/L vs. CHOP KO ALT: 5083.8 ± 830.2 IU/L, AST: 2543.4 ± 259.5 IU/L; P < 0.05)、H&E染色におけるsuzuki scoreの改善(WT 8.4 vs. CHOP KO 5.5; P < 0.05)、好中球浸潤の減少(MPO陽性細胞 WT 19.4 ± 1.5個/HPF vs. CHOP KO 15.5 ± 0.5個/HPF; P < 0.05)を認めた。TUNEL染色でもCHOPノックアウトマウスにおいて apoptosis, necrosisを示す肝細胞は減少していた(TUNEL陽性細胞 WT: 47.2±6.4個/HPF vs. CHOP KO: 24.1±1.0個/HPF; P < 0.05)。またapoptosisの指標となるcleaved-caspase 3 proteinはCHOPノックアウトマウスにおいて有意に減少していた。Bcl-2 familyのうち、アポトーシス促進因子であるBaxの発現はCHOPノックアウトマウスにおいて有意に減少していたが、アポトーシスを抑制するBcl-2, Bcl-xLの発現は両群に差がなかった。</p> <p>【結論】CHOP 欠損によりマウス肝虚血再灌流障害が軽減されることを示した。今後、小胞体ストレスという観点から肝虚血再灌流障害に対する治療を模索していく上で、CHOP の役割の解明は有用であると考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

肝虚血再灌流障害は、肝臓手術後の肝機能不全の主な原因の1つである。CAAT/Enhancer Binding Protein-Homologous Protein (CHOP) の欠損は他臓器では虚血再灌流障害を軽減する報告があるが、肝臓における報告はまだない。

本学位申請者はCHOP 欠損が肝虚血再灌流障害を軽減するかどうかについて検討した。野生型およびCHOP ノックアウト (CHOP^{-/-}) マウスを用いて70%/60分の肝虚血再灌流モデルを作成した。肝虚血再灌流障害は、再灌流後3時間において両群のマウスで小胞体ストレスを誘導し、野生型マウスではCHOP 発現を上昇させた。再灌流後6時間においてCHOP^{-/-}マウスでは血清肝酵素上昇の抑制、H&E 染色 (Suzuki score) の改善および好中球浸潤の軽減が見られ、肝虚血再灌流障害は軽減した。

再灌流後6時間において野生型マウスに比較しCHOP^{-/-}マウスではTUNEL 陽性細胞は減少し、cleaved-caspase 3 の発現の上昇は抑制された。またCHOP^{-/-}マウスではアポトーシス促進因子であるBax の発現の上昇が抑制された。

肝虚血再灌流障害はCHOP 発現を誘導するが、CHOP 欠損はアポトーシスを阻害することにより肝虚血再灌流障害を軽減する可能性が示された。

以上の研究は肝虚血再灌流障害におけるCHOP の役割の解明に貢献し肝臓手術や肝臓手術における肝虚血再灌流障害の改善に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成30年9月20日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降