

京都大学	博士（医学）	氏名	竹本 研史
論文題目	<b>Necrostatin-1 protects against reactive oxygen species (ROS)-induced hepatotoxicity in acetaminophen-induced acute liver failure</b> <small>(ネクロスタチン-1は活性酸素種による急性アセトアミノフェン肝障害に対して防衛的に働く)</small>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p><b>【背景】</b> 解熱鎮痛剤として広く使用されているアセトアミノフェン (APAP) は、過剰摂取等により肝障害を誘発することが知られ、その病態形成には、肝細胞壊死が強く関与することが示されている。これまで、細胞壊死は偶発的で無秩序な細胞死と考えられてきたが、近年、receptor-interacting protein kinase (RIPK)1 あるいは RIPK3 といったシグナル伝達因子により管理・調節された RIPK 依存的壊死 (ネクロプトーシス) が報告され、注目を集めている。その後、RIPK 依存的壊死が様々な疾患に関与する可能性が示唆されてきたが、APAP 肝障害との関連は不明であった。本研究では、RIPK 依存的壊死の阻害剤であるネクロスタチン-1 (Nec-1) を用いた in vivo ならびに in vitro の解析により、薬剤性肝障害における RIPK 依存的壊死の関与について検証した。</p> <p><b>【方法】</b> マウス (8-10 週齢) に Nec-1 (12.5 mg/kg) もしくは溶媒 (DMSO) を経静脈投与した後 APAP (800 mg/kg) を腹腔内投与し、6 時間後の肝組織と血液サンプルを用いて、RIPK1 ならびに RIPK3 の局在や、Nec-1 が肝障害に与える影響について検討した。また初代培養肝細胞を用いて、Nec-1 の肝細胞保護効果を検討するとともに、種々のタンパク質や活性酸素種 (ROS) の発現を解析した。さらに、過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 250 μM) や S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP; 2 mM) を用いて、外因性 ROS に対する Nec-1 の肝細胞保護効果についても検討を加えた。</p> <p><b>【結果】</b> マウス肝臓組織と初代培養肝細胞の両方において、APAP 投与により RIPK1 の活性化の指標であるリン酸化が観察された。また免疫組織化学染色により、CYP2E1 を高発現部位で、APAP 肝細胞壊死の好発部位でもある中心静脈周囲に、RIPK1 と RIPK3 の局在を認めた。動物モデルでは、Nec-1 投与群における肝逸脱酵素や各種サイトカインの有意な抑制、肝壊死巣の縮小が観察された。また、初代培養肝細胞における検討では、Nec-1 処理により、細胞内 ROS 産生の低減とともに、APAP 肝細胞障害の軽減を観察したが、APAP の代謝に関わる CYP2E1 の発現や、APAP の無毒化に伴うグルタチオンの枯渇速度には影響がなかった。他方、Nec-1 自身は抗酸化作用を有しないことが示されたが、Nec-1 処理した肝細胞は、外因性 ROS に対しても抵抗性を示すことが明らかとなった。</p> <p><b>【考察】</b> APAP による RIPK1 の活性化が確認され、Nec-1 が APAP による肝細胞死を抑制しうることから、APAP による肝障害には RIPK 依存的壊死が関与することが明らかになった。また、APAP 肝障害の誘因と報告されている ROS の産生抑制が Nec-1 による薬剤性肝障害の抑制機序であることが示唆された。さらに、Nec-1 は外因性 ROS に対しても肝細胞障害を抑制したが、Nec-1 に明らかな抗酸化作用を有しないことから、直接的な抗酸化作用ではなく、ROS に対する抵抗性を獲得した結果、細胞死を回避するものと考えられた。以上により、RIPK 依存的壊死の経路を阻害することは薬剤性劇症型肝不全の防御に有益である可能性が示された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

アセトアミノフェン (APAP) による急性肝障害の病態形成には、肝細胞の細胞壊死が関与することが報告されている。細胞壊死は、これまで無秩序で偶発的な細胞死であると考えられてきたが、最近になり receptor-interacting protein kinase (RIPK)1 や RIPK3 等のシグナル伝達因子により能動的に制御される「制御性壊死」の存在が明らかとなり、種々の疾病との関わりに注目が集まっている。申請者は、RIPK1 の阻害剤であるネクロスタチン-1 (Nec-1) を用いた APAP 肝障害の動物モデル実験や、初代培養系を用いた細胞生物学的解析により、薬剤性肝障害における RIPK 依存的制御性壊死の関与について検証を行った。

病理学的な解析により、APAP 障害の好発部位である肝臓中心静脈周囲に、APAP 代謝酵素である CYP2E1、並びに、RIPK1 と RIPK3 を発現する肝細胞を認めた。またマウス肝臓と初代培養肝細胞の両者において、APAP 投与により、制御性壊死の指標である RIPK1 のリン酸化が誘導された。動物モデルを用いた Nec-1 の予防投与によって、肝壊死巣の縮小と、肝逸脱酵素の減少や各種サイトカインの抑制といった肝障害の軽減が示され、APAP 肝障害に、RIPK 依存的制御性壊死が関与することが示された。また培養系を用いた検討により、Nec-1 による細胞内 ROS 産生の低減が、APAP 肝障害の軽減に繋がるという知見を得た。さらに、Nec-1 処理した肝細胞が、外因性 ROS に対しても抵抗性を示すことを解明し、動物モデルにおける Nec-1 の肝保護効果が、APAP による直接の肝細胞壊死を防ぐ効果と、壊死細胞由来因子による二次的細胞壊死への防御効果の二重の作用機序によるものであることが示唆された。以上の研究は薬剤性肝障害における RIPK 依存的制御性壊死の病態学的意義を解明したものであり、制御困難であると考えられていた薬剤性急性肝不全の理解と治療法開発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 26 年 12 月 3 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