

氏 名	もり が たけ お 森 賀 威 雄
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2269 号
学位授与の日付	平 成 12 年 7 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Protection by vascular endothelial growth factor against sinusoidal endothelial cell damage and apoptosis induced by cold preservation (冷保存により惹起される類洞内皮細胞の傷害及びアポトーシスに対する血管内皮増殖因子による防御)
論文調査委員	(主 査) 教 授 田 中 紘 一 教 授 山 岡 義 生 教 授 今 村 正 之

論 文 内 容 の 要 旨

肝移植後の primary non-functioning graft の発生機序の一つとして類洞内皮細胞傷害とそれに伴う類洞内微小循環障害が関与していると考えられている。一方、近年類洞内皮細胞の維持・増殖に vascular endothelial growth factor (VEGF) が主要な役割を果たしていることが明らかにされた。本研究では冷保存により惹起される類洞内皮傷害の発生機序の解明と類洞内皮傷害の防止における VEGF の投与の有用性を検討した。

まず Wistar 系雄性ラットより分離した類洞内皮細胞を24時間培養し、更に27時間培養を続けたA群、3時間冷保存し24時間再培養したB群、保存液・培養液に20ng/ml の VEGF を添加しB群と同様に冷保存再培養したC群の3群に分け、位相差顕微鏡・透過型電子顕微鏡 (TEM) により形態観察を行い、WST-1 assay により定量的評価をした。その結果、位相差顕微鏡像と WST-1 assay において viable な培養類洞内皮細胞はA・C群においてB群より多数みられ、TEM にて培養類洞内皮細胞のアポトーシスは分離直後より認められ、その数は培養時間とともに増加し、冷保存後一層促進された。次に摘出肝を UW 液中に24時間冷保存し、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行い、95%O₂ と 5%CO₂ を飽和させた 37°C の Krebs-Henseleit bicarbonate-buffered solution にて再灌流し類洞内皮細胞の機能指標であるヒアルロン酸取り込み率 (HUR) を測定し、6時間再灌流後 TEM 観察と terminal deoxynucleotidyl transferase d-UTP nick end labeling (TUNEL) assay を行った。SEM と HUR は肝摘出24時間前に500ng の VEGF を開腹下で門脈内投与し UW 液に20ng/ml の VEGF を添加した VEGF 投与群と VEGF の溶媒として用いた1%BSA を含む PBS を同様に門脈内投与し UW 液中に添加した VEGF 非投与群の2群について検討し、TEM と TUNEL assay は保存液・再灌流液に20ng/ml の VEGF を添加した VEGF 投与群と上記溶媒を同様に添加した VEGF 非投与群の2群について検討した。その結果、SEM 所見では VEGF 非投与群において類洞内皮の脱落が著明にみられたのに対し、VEGF 投与群では類洞内皮がよく保たれていた。HUR 30分値は VEGF 投与群において VEGF 非投与群に比し有意に高値を示した。TEM 所見と TUNEL assay において類洞内皮細胞にのみアポトーシスが冷保存・再灌流の両方を行った場合にのみ認められ、そのアポトーシスが VEGF 投与により抑制された。

以上より、分離培養類洞内皮細胞は培養中にアポトーシスを生じるが、それは冷保存を行ったあと促進されること、そして摘出肝の冷保存に伴う類洞内皮細胞傷害は主にアポトーシスによるものであるが、それは再灌流を行って初めて出現することを明らかにした。そして本論文ではこれらの冷保存により惹起された類洞内皮細胞のアポトーシスが VEGF により抑制されることを初めて報告した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

冷保存に伴う類洞内皮細胞傷害の発生機序の解明と vascular endothelial growth factor (VEGF) による傷害抑制効果を、ラットの分離培養類洞内皮細胞と肝組織を用いて検討した。

分離類洞内皮細胞を24時間培養した後、更に27時間培養を続けたA群、3時間冷保存し24時間再培養したB群、保存液・培養液に VEGF を添加しB群と同様に冷保存再培養したC群の3群に分け検討した結果、位相差顕微鏡像と WST-1 assay において viable な類洞内皮細胞数は A・C 群においてB群より多く、透過型電子顕微鏡 (TEM) にてアポトーシスをきたした培養類洞内皮細胞の比率は A・C 群においてB群より有意に低かった。摘出肝を24時間冷保存し走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行ったところ、VEGF 投与により類洞内皮の脱落が抑制されるのが観察された。6 時間冷保存後 *ex vivo* 再灌流したときのヒアルロン酸取り込み率は VEGF 投与により有意に上昇した。TEM と terminal deoxynucleotidyl transferase d-uridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) assay において類洞内皮細胞にのみアポトーシスが冷保存・再灌流の両方を行った場合にのみ認められ、VEGF 投与によりその抑制がみられた。

以上より、類洞内皮細胞は分離培養中にアポトーシスをきたすが、それは冷保存を行ったあと促進されること、摘出肝の冷保存に伴う類洞内皮細胞傷害は主にアポトーシスによるものであるが、それは再灌流を行って初めて出現することを明らかにした。そして本論文ではこれらの冷保存により惹起された類洞内皮細胞のアポトーシスが VEGF により抑制されることを初めて報告した。

以上の研究は、肝移植に伴う肝冷保存再灌流傷害の解明に貢献し、肝臓外科学に寄与するところが多い。

従って本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

本学位申請者は、平成12年4月17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。