

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	細木 弥生
学位論文題目			
Role of the prostaglandin I₂-IP system in liver regeneration			
(肝再生におけるプロスタグランジン I ₂ -IP 系の役割)			
共著者名			
結城 幸一、原 明義、小川 勝洋、 高後 裕、成宮 周、牛首 文隆			
未公表			
研 究 目 的			
<p>肝臓は、外傷、薬剤、感染等による様々な障害に応じ、速やかに再生することが知られている。近年、肝移植や肝切除術の増加に伴い、肝再生機構の解明が重要な課題となっている。一方、肝臓は肝細胞、胆管上皮細胞、星細胞、類洞内皮細胞、Kupffer 細胞などから成っている。これらの細胞の中で、肝細胞は肝臓の全体積の約 90% を占める。また、肝再生時には、まず肝細胞が増殖し、引き続き非実質細胞が増殖して脈管系が形成され、肝が再構築される。従って、肝細胞増殖調節機構の解析が、肝再生機構解明の中心をなすと考えられている。肝細胞増殖は、基本的に priming 因子と増殖因子によって調節されている (引用文献 1、2)。主要な priming 因子として interleukin (IL)-6 や tumor necrosis factor (TNF)-α が知られている。これらの因子は、通常細胞周期の休止期にある肝細胞を増殖期へと移行させる作用を示し、肝再生の初期に重要な役割を果たす。一方、増殖因子として hepatocyte growth factor (HGF) や epidermal growth factor (EGF) が知られており、これらは肝細胞に対し著明な増殖促進作用を示す。</p> <p>プロスタグランジン (PG) とトロンボキサン (TX) より成るプロスタノイドは、生体において多彩な作用を示す。これらの作用は、各プロスタノイドに特異的な受容体を介して発揮される。プロスタノイド受容体として、PGD₂、PGE₂、PGF₂α、PGI₂、TXA₂ に対して各々 DP、EP、FP、IP、TP が知られている。また、EP には EP1 ~ EP4 の 4 種類のサブタイプが存在する。一方、プロスタノイドの肝再生への関与を示唆する報告がある (引用文献 3)。また、臨床の場では、PGE₁ 製剤が肝切除後の肝保護を目的に使用されている。しかし、プロスタノイドの肝再生における役割については不明な点が多く残されている。そこで本研究は、野生型マウスおよびプロスタノイド受容体欠損マウスを用い、プロスタノイドの肝再生における役割を解明することを目指した。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 使用動物
動物は、雄性の野生型マウスおよび PGI₂ 受容体 (IP) 欠損マウス (8~24週齢) を用いた。
2. 肝部分切除モデル
マウスはジエチルエーテル麻酔下で腹部を正中切開後、肝中葉および左外側葉を結紮したのち切除し、約 70% の肝部分切除 (PH) とした。肝除去後、腹壁および皮膚は、各々別に縫合した。PH 後、24、48、72、120、168 時間後に、下大静脈より PBS で肝臓を灌流した後肝臓を摘出し、肝重量とマウス体重を測定した。肝重量回復率は予想肝重量/体重比から換算した。この比率は、野生型および IP 欠損マウスで各々 0.051 ± 0.002 ($n=13$)、 0.053 ± 0.002 ($n=9$) であった。
3. プロスタノイド受容体、cyclooxygenase (COX)、IL-6、TNF- α 、HGF mRNA の発現解析
下大静脈より PBS で肝臓を灌流した後、採取肝組織より RNA を抽出した。ついで、プロスタノイド受容体、COX-1、COX-2、IL-6、TNF- α 、HGF mRNA の発現を RT-PCR 法で解析した。
4. COX-2 阻害薬の肝再生に対する効果
COX-2 選択的阻害薬である SC58125 (10 mg/kg) を 24 時間毎に腹腔内投与し、その PH 後の肝再生に及ぼす影響を解析した。
5. 肝細胞増殖の解析
肝細胞増殖は、bromodeoxyuridine (BrdU) の肝細胞への取り込み率を用いて解析した。BrdU 50 mg/kg を肝除去 1 時間前に腹腔内投与し、下大静脈より PBS で肝臓を灌流した後、4% パラホルムアルデヒドで肝臓を還流固定した。パラフィン包埋した肝臓より組織切片を作成し、抗 BrdU 抗体で免疫染色した。ついで、300 ~ 500 個の肝細胞核に占める陽性肝細胞核の割合を 100 分率で算出した。

成 績

1. 野生型マウスにおける PH 後の COX mRNA の発現変化
COX は、プロスタノイド産生の律速酵素である。COX-2 mRNA の発現レベルは、PH 後 1 時間で著明に増加した。一方、COX-1 mRNA の発現レベルは、PH によって変化しなかった。
2. COX-2 阻害薬の野生型マウスにおける PH 後肝再生に対する効果
対照群では、肝重量は PH 後 120 時間で PH 前の値まで回復した。一方、COX-2 阻害薬である SC-58125 投与群では、肝重量は PH 後 168 時間後においても前値まで回復せず、COX-2 阻害薬は肝再生を遅延させた。
3. 野生型マウス残存肝におけるプロスタノイド受容体 mRNA の発現変化
PH 前の肝組織では、EP2、EP3、EP4、TP、IP mRNA の発現を認めた。PH 後、IP mRNA の発現が著明に増加し、48 時間で前値の約 6 倍となった。他の受容体 mRNA の発現は PH 後変化を認めなかった。また、DP、EP1、FP mRNA は PH 前後で発現を認めなかった。
4. IP 欠損マウスにおける PH 後肝再生の遅延
野生型マウスでは、肝重量は PH 後 120 時間で PH 前の値まで回復した。一方、IP 欠損マウスでは、肝重量回復の遅延を認め、PH 後 168 時間後に PH 前の値まで回復した。
5. IP 欠損マウスにおける PH 後の肝細胞への BrdU 取り込みの遅延
野生型マウス肝細胞における BrdU 取り込み率は、PH 後 48 時間で最大値を示した。一方、IP 欠損マウス肝細胞では PH 後 72 時間で最大値を示し、PH 後肝細胞増殖の開始が遅延していた。
6. PH 後の priming 因子と増殖因子の発現変化
肝再生の際の priming 因子である IL-6 の mRNA 発現を残存肝で比較検討した。野生型マウスでは、PH 後 1 時間で著明な発現増加を認めた。IP 欠損マウスでは、同様の発現経過を認めたが、その発現量は野生型マウスに比較し有意に低下していた。また、別の priming 因子である TNF α の mRNA は、PH 前後で発現の変化を認めなかった。一方、増殖因子である HGF の mRNA は、PH 後有意に増加したが、その程度は野生型と IP 欠損マウスの間で差を認めなかった。

考 案

まず、野生型マウスにおいて PH 後 COX-2 mRNA の発現が有意に増加したことから、COX-2 に由来するプロスタノイドが肝再生に関与する可能性を示した。さらに、COX-2 阻害薬である SC58125 を用いた実験より、COX-2 由来のプロスタノイドが全体として肝再生に促進的に作用することを示した。また、野生型マウスにおいて、IP mRNA の発現が PH 前に比べ PH 後著明に増加していたことから、PGI₂-IP 系の肝再生への関与が示唆された。

IP 欠損マウスと野生型マウスにおける肝重量の回復率および肝細胞増殖について比較検討したところ、いずれも IP 欠損マウスで遅延していた。この結果、PGI₂-IP 系が肝再生において促進的な役割を果たすことを明らかにした。

PGI₂-IP 系が肝再生に促進的に作用する際の機序を解明するため、priming 因子と増殖因子の mRNA 発現の変化を検討した。IP 欠損マウスでは、野生型マウスに比較して IL-6 mRNA 発現量が有意に低値を示した。一方、HGF の mRNA の発現には差を認めなかった。この結果、PGI₂-IP 系は IL-6 の発現亢進を介し、肝再生を促進すると考えられた。

結 論

本研究は、PGI₂ が IP を介して肝切除後の肝再生を促進することを解明した。また、その機序が IL-6 の発現調節を介するものである可能性を示した。この知見は、肝切除術や肝移植術後の肝再生機構の解明に資するのみでなく、術後の肝再生を促す治療薬の開発にも貢献することが期待される。

引 用 文 献

1. Michalopoulos, G.K. & DeFrances, M.C. Liver Regeneration. *Science* **276**: 60-66, 1997
2. Fausto, N. Liver regeneration. *J. Hepatol.* **32**: S19-S31, 2000.
3. Rudnick, D.A., Perimutter, D.H. & Muglia, L.J. Prostaglandins are required for CREB activation and cellular proliferation during liver regeneration. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 8885-8890, 2001.

参 考 文 献

1. Fujino, T., Nakagawa, N., Yuhki, K., Hara, A., Yamada, T., Taayama, K., Kuriyama, S., Hosoki, Y., Takahata, O., Taniguchi, T., Fukuzawa, J., Hasebe, N., Kikuchi, K., Narumiya, S. & Ushikubi, F. Decreased susceptibility to renovascular hypertension in mice lacking the prostaglandin I₂ receptor IP. *J. Clin. Invest.* **114**: 805-812, 2004.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	細木 弥生
審査委員長 谷口隆信 ㊞ 審査委員 高後 裕 ㊞ 審査委員 牛首文隆 ㊞			
学 位 論 文 題 目 Role of the prostaglandin I₂-IP system in liver regeneration (肝再生におけるプロスタグランジン I ₂ -IP 系の役割) 共著者名 結城 幸一、原 明義、小川 勝洋、高後 裕、成宮 周、牛首 文隆 未公表			
肝臓は外傷や感染、炎症、薬物中毒などで組織の損傷が生じた際、速やかに再生して肝機能を維持することが知られている。肝臓は脈管系を含む異なった細胞種の集団であるが、肝細胞が体積の90%を占めておりまた、肝再生時に最初に細胞周期の休止期を脱して増殖を開始するのは肝細胞であることから、肝細胞の増殖調節が肝再生で重要なステップであると考えられている。これに関連して休止期からの離脱を促すプライミング因子としてIL6やTNF- α が、また肝細胞増殖因子としてHGFやEGFなどが同定されている。プロスタグランジンや тромбоキサンからなるプロスタノイド系は生体に広く分布して多彩な生理作用を担っていることが知られており、肝再生における関与を示唆する報告がなされている。しかしながらプロスタノイド受容体に対する特異的阻害薬は少なく、明確な結論を得るには至っていない。今回著者らはプロスタノイド受容体欠損マウスを用い肝部分切除後の肝再生におけるプロスタノイドの役割について検討した。			

著者らは先ずプロスタノイド産生の律速酵素であるCOXと肝再生との関連について検討した。野生型マウスで肝部分切除後、COX 1の発現には変化がなかったがCOX 2の発現は著明に増加し、COX 2特異的な阻害剤の投与によって明らかな肝再生の遅延が認められた。同時に現在知られている全てのプロスタノイド受容体8種類について肝再生時の発現の変化を検討したところ、唯一プロスタグランジンI₂受容体IPだけが著明な発現の増加を示し、他の受容体は発現量の変化が認められないかまたは発現そのものが認められなかった。

そこで著者らは野生型とIP欠損マウスを比較しながら、肝再生におけるIPの機能について検討した。肝部分切除後、野生型においては120時間で肝重量が切除前の値に回復するのに対し、IP欠損型では回復に168時間を要し明らかな遅延が認められた。プロモデオキシウリジンを使った核酸取込の比較においてもIP欠損型で取込増加立ち上がりの遅延があり、これらの結果からIPは肝再生初期から肝細胞増殖促進に寄与していることが明らかとなった。

更に著者らは、既知のプライミング因子や増殖因子に対するIPの関与を検討したところ、IL-6については野生型において観察される肝部分切除後1時間での急激な発現増加がIP欠損型では明らかに減弱していた。HGFについては肝部分切除後で発現増加が見られたが野生型と欠損型で差が無く、またTNF- α についてはいずれのマウスにおいても肝部分切除前後で発現量の変化が認められなかった。これらの結果から肝再生においてIPは促進的に機能し、その促進効果の一部はIL-6の発現増強を介していることが示唆された。

以上この論文で述べられている実験結果並びに考察は、肝再生のメカニズムにおけるプロスタノイドの作用について新しい側面を示したもので、新しい肝保護薬、肝機能回復促進治療等の未来の肝臓治療に道を拓くものと考えます。

申請者に対して諮問を行い、当該分野に関する申請者の知識/経験/見識は課程博士に相応しいものであると判断しました。以上、論文/諮問による審査の結果、博士に値すると判定したことを御報告申し上げます。

平成17年2月4日