

博士(医学) 鈴木 淳 司

論文題目

Impact of cell cycle disruption on impaired hepatic regeneration in aged livers with ischemic insult

(虚血性傷害を受けた加齢肝において細胞周期破綻が肝再生障害に与える影響)

論文の内容の要旨

[はじめに]

高齢化社会の到来により、肝切除症例に占める高齢者の割合が増加している。近年の手術技術、周術期管理の向上によって、若年者における肝切除は安全に行える様になった。しかし、現在増加の一途をたどる高齢者に対する肝切除の安全性には一定の見解が得られていない。

肝切除後の肝再生能は加齢により低下し、肝細胞の DNA 合成の減弱、遅延がその原因であると報告されてきた。加齢による DNA 合成能低下のメカニズム解明は急務であるが、未だ詳細は不明である。さらに、肝再生に関する研究の殆どは 70%肝切除モデルが用いられており、通常肝実質切離の際に用いられる Pringle 法による肝虚血再灌流傷害の影響を考慮した肝再生の加齢研究はなく、実臨床を反映しているとは言い難い。そこで、全肝虚血の後に 70%肝切除を施行するラットモデルを作成し、虚血再灌流傷害を受けた残肝の再生反応を若齢ラットと老齢ラットにて比較検討した。

[材料ならびに方法]

実験にあたっては、12 週齢 (人間 12-15 歳相当、若齢群)、18 カ月齢 (同 60-65 歳相当、老齢群) の F344 雄性ラットを用いた。実験に先立ち、全肝虚血に伴う腸管の鬱血を防ぐ目的で、被膜の一部を剥いだ脾臓を皮下に埋め込み門脈-体循環シャントの形成を図った (脾固着モデル)。脾固着モデル作成から 4 週間後、ペントバルビタールによる麻酔下で開腹し、微小血管クリップを用いて肝門部で肝流入血を遮断して 60 分間の全肝虚血を行った。その後、Higgins と Anderson の方法に従い 70%肝切除を施行し、その直後にクリップを除去して残肝を再灌流させて閉腹した。虚血を行わない 70%肝切除のみを施行したモデルをコントロール群とした。肝切除後、1、3、6、24、48 時間目で血液、肝組織を採取し、犠死させた (n=7/各群各時間)。肝切除後 48 時間の生存率、肝障害 (肝酵素、ビリルビン、壊死面積)、アポトーシス、肝再生能 (残肝重量/体重比)、肝細胞の DNA 合成を経時的に検討した。肝再生に重要な肝組織中での Nuclear factor kappa B (NFκB) 活性を Electrophoretic mobility shift assay で解析し、さらに、Interleukin(IL)-6/Signal transducer and activator of transcription 3(STAT3) 経路および Phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)/Akt 経路に関連する蛋白 (STAT3、Akt) および細胞周期関連因子 (Cyclin D1, Cyclin E, Cyclin A) の肝組織中 (核、細胞質別) での発現量およびリン酸化状態をウエスタンブロット法で解析した。

[結果]

肝切除後 48 時間までの生存率は、肝切除のみのコントロール群では若齢、老齢ラットとも 100%であったのに対し、虚血を付加した肝切除モデルでは老齢群 (20%) が若齢群 (53%) に比し低下した。老齢群はビリルビンが持続的に高値を示し、1-3 時間目の肝酵素、3 時間目の肝壊死面積も若齢群に比し高値であった。1-3 時間目のアポトーシスは老齢群で顕著であり、1 時間目の Akt の活性化が老齢群で遅延していた。老齢群では若齢群に比し肝細胞の DNA 合成と残肝重量/体重比は低下したものの、NFκB 活性の増加、24 時間目の血中 IL-6 の著明な増加、1-3、24 時間目以降の STAT3 のリン酸化および核内移行の増加、Cyclin D1 の核内発現増加を認め、若齢群に比し細胞周期 G1 期までの亢進を認め、肝再生の初期反応は著しく増強していた。しかし、細胞周期 G1/S 期のプロモーターである Cyclin E と S 期のプロモーターである Cyclin A の核内発現は若齢群に比し著しく抑制され、細胞周期 S 期への移行が遅延していた。

[考察]

IL-6/STAT3 経路は肝切除後の肝細胞の分化、増殖において非常に重要な役割を担っており、肝再生を促進する主経路の一つと考えられている。IL-6 欠損マウスでは肝切除後の肝細胞における STAT3 の活性化、DNA 合成、有糸分裂が減弱すると報告され、また、肝特異的 STAT3 欠損マウスにおいても肝細胞の増殖反応が減弱するとされる。このような観点から、我々は、IL-6/STAT3 経路の活性化減弱が虚血再灌流傷害を受けた加齢肝の再生遅延の主原因であると仮定した。しかし、今回の研究では、NFκB 活性から IL-6/STAT3 経路に至る肝再生反応が老齢群で強く活性化され、Cyclin D1 も同様に老齢肝で強く核内発現していた。一方、Cyclin E と Cyclin A の発現は老齢肝で著しく抑制されており、細胞周期 S 期への移行遅延が虚血再灌流傷害を受けた加齢肝における DNA 合成能低下のメカニズムに強く関与することが示唆された。過去の報告によると、加齢肝における肝細胞内 Adenosine triphosphate (ATP) は若齢肝に比し低値であり、虚血後ではさらにそれが低下するために、虚血再灌流傷害に対して老齢肝のほうが脆弱であるとされている。細胞周期 G1/S 期移行には ATP が必要であることも諸家の報告で明らかになっており、加齢と虚血再灌流傷害による肝細胞内の ATP 低下が細胞周期 S 期への移行遅延を引き起こし、肝再生遅延の原因になっている可能性が示唆された。

[結論]

肝虚血再灌流傷害を伴うラット大量肝切除モデルにおいて、老齢群では若齢群に比し著明な肝障害と肝細胞のアポトーシスを認め、生存率が低下した。老齢群では初期の肝再生反応は若齢群に比し著しく亢進するものの、細胞周期 S 期への移行遅延により肝再生は遅延した。

論文審査の結果の要旨

肝切除症例に占める高齢者の割合が増加しているが、高齢者に対する肝切除の安全性には一定の見解が得られていない。肝切除後の肝再生能は加齢により低下し、肝細胞の DNA 合成の減弱、遅延がその原因であると報告されてきたがそのメカニズムの詳細は不明である。通常肝実質切離の際に用いられる Pringle 法による肝虚血再灌流傷害の影響を考慮した肝再生の加齢研究はなく、実臨床を反映しているとは言い難い。そこで申請者は実際の肝切除に近い虚血を付加した肝切除モデル実験系を組んで、シグナル伝達因子、細胞周期関連因子の量的、質的な解析を行ない、加齢による肝再生障害の原因を追及した。

若齢および老齢ラットに全肝虚血に伴う腸管の鬱血を防ぐ目的で、被膜の一部を剥いた脾臓を皮下に埋め込み門脈-体循環シャントの形成を図った。4週間後、全肝虚血の後に70%肝切除を施行し、残肝を採取して再生反応を若齢と老齢ラットにて経時的に比較検討した。肝切除後48時間までの生存率は、虚血を付加した肝切除モデルでは老齢群(20%)が若齢群(53%)に比し低下した。老齢群はビリルビン、肝壊死面積、アポトーシス等が若齢群に比し高値であった。また、老齢群では肝細胞のDNA合成と残肝重量は低下し、Aktの活性化の遅延、NFκB活性の増加、血中IL-6の増加、STAT3のリン酸化および核内移行の増加、Cyclin D1の核内発現増加を認めた。しかし、Cyclin EおよびCyclin Aの核内発現は著しく抑制され、細胞周期S期への移行が遅延していた。老齢群では若齢群に比し細胞周期G1後期までの亢進を認め、肝再生の初期反応は著しく増強しているにもかかわらず、G1/Sの進行に障害がありDNA合成開始が抑制されていると推察している。

本研究は実際の肝切除に近いモデル実験系を組んで、加齢による肝再生障害の原因に迫ろうとした研究である。審査委員会ではこの肝虚血再灌流傷害の影響を考慮した点を評価した。また、研究結果として加齢による肝再生障害の原因が、DNA合成の前のCyclin E発現低下というG1/S進行障害にあることを見出した点を新知見として高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 北川 雅敏
副査 前川 真人 副査 杉原 一廣