

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	腫瘍制御学領域 消化器外科学分野 若狭 悠介
<p>(論文題目)</p> <p>Delay in hepatocyte proliferation and prostaglandin D2 synthase expression for cholestasis due to endotoxin during partial hepatectomy in rats (肝部分切除後ラットにおけるエンドトキシン誘発性胆汁うっ滞に伴う肝再生遅延とプロスタグランジン D2 合成酵素発現)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【緒言】 肝臓は切除を行っても自ら再生する能力を有するユニークな臓器である。肝再生には肝細胞だけでなく、類洞内皮細胞やクッパー細胞が係ること、それらの細胞が産生するサイトカインやケモカインといった chemical mediator を介した、細胞間の複雑な相互作用が重要であることが知られている。一方、大量肝切除後に感染を伴った場合に高ビリルビン血症や高胆汁酸血症が遷延し、肝不全および肝再生遅延を誘発することが知られているがその病態と機序については明らかになっていない。ビリルビンや胆汁酸などの有機アニオンの細胞膜輸送を担っている sodium-dependent taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp)、multidrug-resistance related protein 2 (Mrp2)、organic anion transporting polypeptide 1 (Oatp1)あるいは Oatp2 といった肝細胞膜に局在するトランスポーターと種々の炎症性サイトカインやケモカイン、肝再生関連遺伝子発現に着目し、肝切除後感染性肝不全時における胆汁うっ滞の病態を明らかにすることを本研究の目的とした。</p> <p>【対象と方法】 Sprague-Dawley (SD) 雄性ラットを用い、全身麻酔下に開腹し 70%肝切除を行った後、lipopolysaccharide (LPS) 75μg を下大静脈に注入した。これをラット肝切除後感染性肝不全モデル (LPS+70%肝切除群) として、何らの処置を施さない Control 群、開腹手術のみの Sham 手術群、LPS 単独投与群、70%肝切除群の 5 群に分類し、それぞれ 24、72、168 時間後に各々肝組織、全血を採取した。採取した全血から血漿を分離し、その aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、総ビリルビンおよび胆汁酸値を測定した。肝組織から RNA を抽出した後、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、変動の認められた遺伝子について RT-PCR による定量を行った。タンパク定量と局在確認は Western blotting と免疫組織化学染色で行った。</p> <p>【結果】 LPS+70%肝切除群において、70%肝切除群と比較して有意に術後 24 時間の血漿胆汁酸の上昇が認められた。マイクロアレイおよび RT-PCR では、DNA 複製に関与するリボヌクレオチド還元酵素遺伝子 <i>Rrm2</i> および <i>Pcna</i> の肝での発現は、70%肝切除群においては 24 時間後にピークを認めたが、LPS+70%肝切除群では発現のピークが 72 時間後と遅延し、ピーク値も 70%肝切除群と比べ低値であった。有機アニオントランスポーターについては、術後 24 時間の時点で Sham 手術群と比較し 70%肝切除群および LPS+70%肝切除群において Mrp2 および Oatp1、2 が有意に減少したが、70%肝切除群と LPS+70%肝切除群間で有意差を認めなかった。RT-PCR でケモカインの一種である chemokine ligand 9 (Cxcl9) は LPS 投与群と LPS+70%肝切除群において著明に上昇</p>	

した。抗 Cxcl9 抗体を用いた免疫染色では、LPS 投与群で Cxcl9 陽性細胞が検出され、その数と形態は、M2 型のクッパー細胞のマーカーである CD163 陽性細胞の数および形状に類似することが注目された。抗プロスタグランジン D2 合成酵素 (Ptgds2) 抗体を用いた免疫染色で、LPS+70%肝切除群の肝細胞のみが染色され、肝細胞の増殖が抑制された術後 24 時間で強く染色され、その後、時間経過と共に染色性は低下した。

【考察】

70%肝切除群には認めなかったが、LPS+70%肝切除群においては高胆汁酸血症を認めた。LPS+70%肝切除群と 70%肝切除群の間で、胆汁酸輸送を担う有機アニオントランスポートの有意な変化は認められなかったことから、有機アニオントランスポートの発現減少は感染による胆汁うっ滞の原因ではないと考えられた。DNA 複製に関与する遺伝子である Rrm2 および Pcn1 の発現は LPS+70%肝切除群で有意に減少しており、感染が遺伝子レベルで肝再生遅延をもたらす可能性が明らかとなった。LPS 投与で発現増加が認められた Cxcl9 は炎症や癌において上昇をきたすケモカインとされ、肝臓においてはクッパー細胞が産生するとされている。今回 Cxcl9 との発現に相関を認めた CD163 陽性細胞は M2 マクロファージと考えられることから、Cxcl9 産生は M2 型のクッパー細胞に由来する可能性が考えられた。Ptgds2 は筋ジストロフィー患者の骨格筋に発現することが報告されており、細胞増殖を抑制する可能性が指摘されている。今回 LPS+70%肝切除群のみの肝細胞で Ptgds2 が発現したことから、肝再生時に感染を合併した状態では Ptgds2 が肝細胞の増殖を抑制していることが示唆された。したがって、Ptgds2 は大量肝切除後感染合併例において、肝再生遅延を抑制するターゲットとなり得る可能性が示された。

【結語】

LPS+70%肝切除群における高胆汁酸血症は、胆汁酸輸送を担う有機アニオントランスポートの発現変化によるものではなく、クッパー細胞からの Cxcl9 を介する肝細胞の増殖抑制によることが示唆された。