

## 肝虚血再灌流障害における アポトーシスの関与とその制御

岩坂 日出男\*, 鶴 島 雅 子\*, 宮 川 博 司\*, 野 口 隆 之\*

### 要 旨

自然な細胞死であるアポトーシスは現在、種々の病態形成に重要な働きをしていることが明らかになってきた。肝臓においても肝炎や肝発癌などにアポトーシスが関与し、肝でのアポトーシスの理解が病因の解明や治療に役立つようになってきた。これまで虚血再灌流障害は壊死による細胞障害のみが注目されていた。ラットを用いた肝の虚血再灌流障害モデルを作成し、盲腸結紮穿刺敗血症モデルと比較すると、再灌流部の肝組織でTUNEL陽性細胞が増加していること、またインターロイキン1 $\beta$ が増加し、アポトーシスのシグナル伝達系のcaspaseが活性化されていることが示唆され、さらに肝組織でのFasの発現が亢進していることが判明した。これにより肝虚血再灌流障害でもアポトーシスがその病態形成に重要な役割をはたしていることが示唆された。また生体防御に働く熱ショック蛋白質をあらかじめ誘導した後、虚血再灌流を行うと、障害程度が軽減され、TUNEL陽性細胞も減少していることが確認された。これにより熱ショック蛋白質をあらかじめ誘導しておくことによりアポトーシスが制御できる可能性が示唆された。

### はじめに

アポトーシスは細胞壊死とは異なる細胞の生理的な死としてとらえられている。壊死つまりネクローシスが病理学的な細胞の死であるのに対してアポトーシスは積極的に自らを消滅させる機構が

働くことにより生じる細胞死である。Kerr等はこのアポトーシスが発生学の分野だけでなく、すべての細胞において新旧細胞の交代、不要となった細胞や有害細胞の排除などの細胞動態に重要な意義をもつことを提唱した<sup>1)</sup>。このアポトーシスを提唱する以前からKerrはラットの肝臓の阻血実験で核の濃縮した丸い細胞を確認し、アポトーシスの原型となるshrinkage necrosisとして、通常の壊死とは異なる細胞死であることを報告していた<sup>2)</sup>。多くの器官での恒常性は細胞増殖と細胞死のバランスによって調節されている。この時の細胞死の多くはアポトーシスによって調節されているが、このアポトーシスの異常が種々の病態形成に関与し、癌、ウイルス感染、免疫疾患、神経変性疾患やAIDS等で重要な役割を果たしていることが近年明らかになってきている<sup>3)</sup>。肝臓でも多くの薬物がネクローシスだけでなく、アポトーシスを誘導することが知られていて、これにはエタノール、銅、胆汁酸、アセトアミノフェンがあり、これにFasが関与していることが報告されている<sup>4)</sup>。Fasはアポトーシスに関与するシグナル伝達系として重要であるが、肝においても抗Fas抗体をマウスの腹腔内に投与すると劇症肝炎の像に類似した広範囲な肝細胞のアポトーシスが生じ、急性肝不全となり、マウスが数時間以内に死亡してしまうことが確認されている<sup>5)</sup>。

ラットを用いた肝の虚血再灌流実験でのアポトーシスの関与を(実験1)で明らかにし、生体防御に関係する熱ショック蛋白質によりアポトーシスの制御が可能かどうかを判断するため(実験2)を行った。

\*大分医科大学麻酔学教室

実験 1

方法

Wistar系雄性ラット体重200-300gを用いて以下の3群を作成した。

肝虚血再灌流群：ラット8匹を用いてセボフルラン麻酔下に腹部を正中切開し、左肝動脈と門脈を血管鉗子にて圧迫することにより、血流遮断を行う。この後、麻酔から覚醒させ、血流遮断1時間後に再度麻酔下に開腹し、血管鉗子を除去することにより、血流の再開通をもたらす、これにより、肝の虚血再灌流障害モデルを作成した。

盲腸結紮穿刺敗血症群：ラット7匹を用いて麻酔下に腹部正中切開を行い、回盲部の盲腸移行部を結紮し、盲腸末端を19G針にて一回穿刺し、敗血症モデルを作成した。

シャム群：ラット5匹を用いて、麻酔下に腹部正中切開をし、肝門部を明らかにし、閉腹を行った。

各群モデル作成から6時間後に麻酔下に擬死させ、右房から6ml脱血し、EDTA管にて直ちに遠心した。その後、分離された上清をマイナス80度にて凍結し、ELISA法による各種サイトカイン、可溶性Fasの測定に用いた。また擬死後、同時に肝左葉を摘出し、一部は直ちに液体窒素にて凍結保存し、蛋白の抽出に用いた。また残りの左葉は

6%ホルマリンにて固定し、組織標本の作成に用いた。数値は平均±標準偏差で示し、統計学的処理はANOVA, Student t-testにて行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

組織標本をTUNEL染色してみると、虚血再灌流群ではTUNEL陽性細胞が確認されたが、盲腸結紮穿刺敗血症群、シャム群では確認されなかった。免疫蛍光抗体法によるFasの確認では障害された肝細胞に一致して、Fasが染色されてくるが、肝障害の少ない盲腸結紮穿刺敗血症群、シャム群ではFasは余り染色されてこないことが判明した。これを肝臓から抽出した蛋白質を用いてWestern blotにかけると、Fasのバンド形成が蛍光染色と同様に虚血再灌流群で顕著に認められた。さらに図1に示すように血中に出現する可溶性Fas (sFas)も虚血再灌流群で高値を示していた。図2、図3に $TNF\alpha$ と $IL-1\beta$ の変化を示した。これで分かるように盲腸血結紮穿刺敗血症モデルでは炎症性サイトカインである $TNF\alpha$ の上昇が最も高く、これについて虚血再灌流群が上昇している。しかし、 $IL-1\beta$ では逆に盲腸結紮穿刺敗血症モデルよりも虚血再灌流モデルでの上昇が著しいことが注目される。

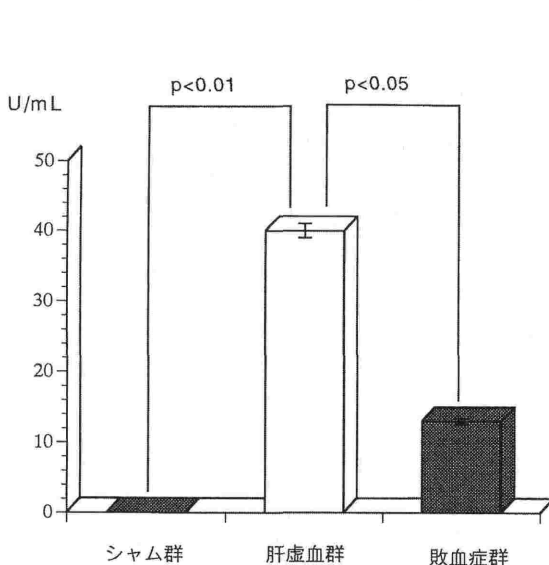


図1 sFasの群間での比較

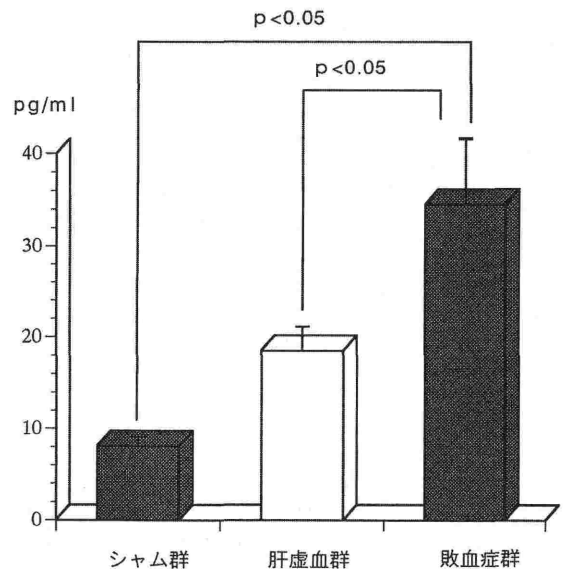


図2  $TNF\alpha$ の群間での比較

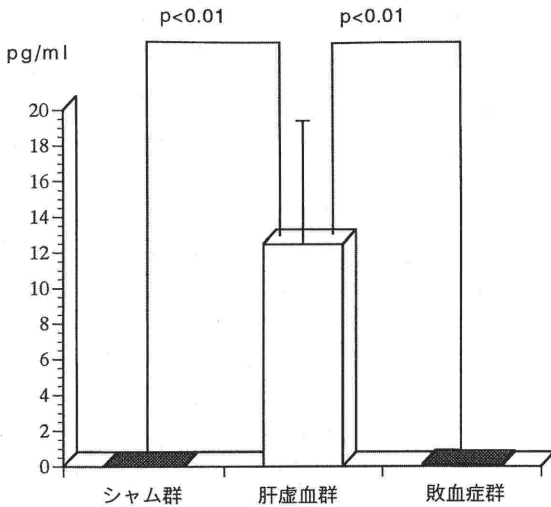


図3 IL-1βの群間での比較

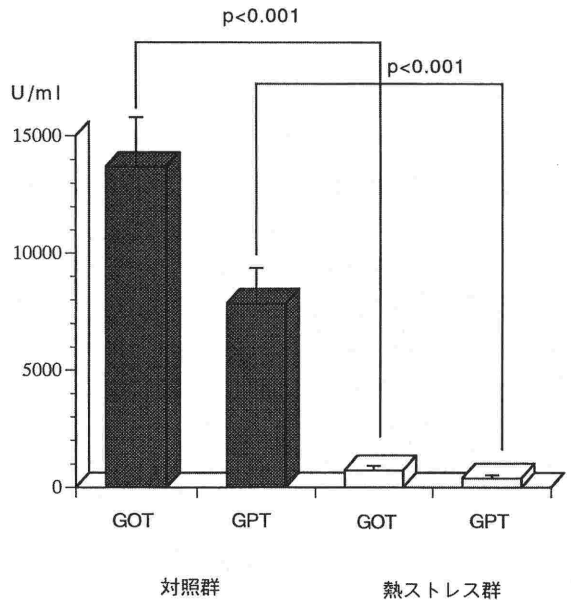


図4 肝酵素の群間での比較

## 実験 2

### 方法

熱ショック蛋白質の誘導：ラットをセボフルラン全身麻酔下に加温ブランケットを用いて、直腸温が42度になるように加温し、その後この状態を15分維持する方法で熱ストレスを加えることにより熱ショック蛋白質の誘導を試みた。ラットを2群に分け、1群は熱ストレス群とし、上記の熱ストレス負荷後2日を経過したラット5匹とした。対照群は熱ストレスを加えていないラット5匹とした。肝の虚血再灌流の実施は実験1と同様に行った。両群のラットを再灌流後24時間目で擬死させ、やはり実験1と同様に採血と組織の摘出を行い、測定に用いた。

### 結果

熱ショック蛋白質の誘導：熱ショック蛋白質、とくにHSP 70の発現をNorthern blotとWestern blotにより確認した。HSP 70 mRNAは熱ストレス負荷後3時間で上昇し始め、6時間目にピークとなり、以後は速やかに減少した。HSP 70蛋白としては12時間目より増加し、24時間、48時間と発現が増加していることが確認された。これによって熱ストレス群では虚血再灌流時にはすでに肝にHSP 70が誘導されているものと考えられる。2群における肝組織でのmRNAとHSP 70蛋白の出現を再灌流6時間目でみみると、虚血再灌流群ではmRNAレベルでの誘導は確認されないが、

蛋白レベルでは肝組織で発現が確認された。これに対して対照群ではmRNAレベルでも確認されるし、肝組織でも確認された。これはあらかじめHSP 70を誘導していることにより障害ストレスに対して遺伝子レベルでの新たな誘導がかかっていないことを示唆していると考えられる。HE染色で見た肝組織レベルでの障害は対照群では肝静脈を中心に、肝細胞壊死とTUNEL法でアポトーシスの発現が確認されたのに対して、熱ストレス群では障害も軽減しているし、TUNEL染色でのアポトーシスも減少していた。図4に血中のGOT、GPTの値を示したが、熱ストレス群で有意な低値を示している。図5、図6にTNF-αとIL-6の変化を示したが、やはり熱ストレス群で有意に低値を示し、これは侵害刺激がHSP 70の誘導により軽減したことを示している。

## 考 察

一般に肝細胞の分裂増殖は1000個に1個以下の程度でしか生じていないとされている。従って、正常肝では肝細胞の0.1%–0.5%以下でしかアポトーシス細胞は発現していない。肝虚血再灌流後にはTUNEL染色陽性細胞が増加することより障害にアポトーシスがなんらかの関わりを持っていることが推察される。そして障害組織でのFas発

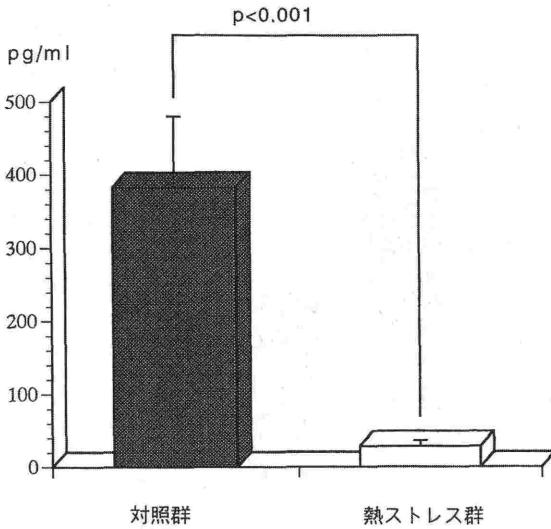


図5 IL-6の群間での比較

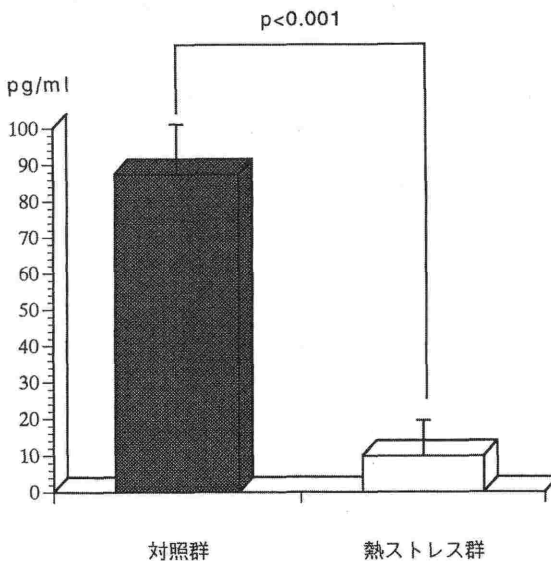


図6 TNF-αの群間での比較

現の増加, 血中での sFas の増加より肝虚血再灌流障害でのアポトーシスには Fas 肝炎と同様に Fas 依存性の細胞障害が関与しているものと考えられる。Fas は分子量45,000の TNF 受容体ファミリーに属する I 型膜タンパク質であり, Fas リガンドと結合することによってアポトーシス誘導シグナルが細胞内に伝達され細胞死が誘導されると考えられている。Fas は活性化 T 細胞をはじめとする免疫系細胞に高度に発現が見られるとされ

るが, 非リンパ系の組織である肝にもよく発現するとされている<sup>4,5)</sup>。われわれの実験でも肝障害組織では Fas の発現の亢進が確認されたため, 肝虚血再灌流障害での Fas の役割は小さくないと考えられる。

また, 虚血再灌流障害のサイトカイン反応の特徴としては, サイトカインネットワークの活性化が著しいと考えられる, 盲腸結紮穿孔モデルよりも IL-1β が高値を示していたことである。哺乳動物での interleukin-1β converting enzyme, ICE はアポトーシスの研究で有名な線虫のプログラム細胞死実行遺伝子である ced-3 に相当する。ICE は基質特異性の高いシステインプロテアーゼであり, IL-1β 前駆体を二つのアスパラギン酸残基で切断することにより IL-1β が形成される。したがって肝虚血再灌流群で IL-1β が高値を示していたことは ICE の活性化が高まっていることを間接的に示唆しているものと考えられる。ICE ファミリープロテアーゼはアポトーシスの実行に中心的な役割を果たしていると考えられ, ヒトでも多くの ICE 様プロテアーゼが確認され, これらは caspase という名で統一され, この過剰発現はアポトーシスを実行すると考えられている。従って肝虚血再灌流でも caspase の活性化によるアポトーシスが実行されているものと考えられる。以上の結果から肝虚血再灌流障害において, その障害の発生機序の一つとしてアポトーシスが関与し, これは Fas を介した細胞障害シグナルが活性化され, さらに caspase の活性化が生じアポトーシスによる細胞死が実行されているものと考えられる。

熱, 金属イオン, 放射線, 活性酸素, 糖の欠乏などの刺激によって誘導される蛋白質を熱ショックタンパク質 (以下 HSP と略す) という。HSP は種々のストレス刺激によって誘導され, 細胞レベルでストレスによって生じた異常蛋白質を修復または排除することによって細胞を防御する働きを有している。HSP は当初, ストレスによってのみ誘導されると考えられていたが, 細胞に本来, 構成的に存在し, 新生蛋白質の folding を助けたり, 蛋白質の会合が正しく行われるように補助する, いわゆる分子シャペロンとしての働きも有していることが明らかになってきた。なんらかのストレス刺激が加わると, HSP の転写因子である,

Heat shock factor が3量体を形成し、これがHSP遺伝子の上流にある、Heat shock elementを活性化し、HSPの転写、翻訳が行われHSPが合成される。この反応はストレスに対して迅速に行われるが、著者らの結果でも分かるように、あらかじめストレス刺激が加わる前にHSPを誘導しておけば、ストレス時により効果的に細胞を守ることが可能であると考えられる。Polla等はHSPとアポトーシスの関係において、ミトコンドリアレベルでのHSPの関与を証明している<sup>6)</sup>。アポトーシスの初期の段階ではミトコンドリアの膜電位が変異し、その後アポトーシスの過程が進行していくが、あらかじめHSPを誘導しておくと、アポトーシス刺激に対してもミトコンドリアの膜電位の変異が生じなく、これによってアポトーシスが抑制されるとしている。他にもセラミドからのアポトーシスの刺激伝達のSAPK/JNK活性の抑制をHSP70が行いアポトーシスの進行を抑制する可能性も示唆されている<sup>7)</sup>。このようにあらかじめHSPを誘導しておくことによりアポトーシスの抑制が生じ、これにより組織障害を軽減できる可能性がある。

著者らは今回HSPの誘導に、熱ストレスを用いたが、これ以外には実験的には亜ヒ酸によってHSPを誘導する方法がある。しかし、両方法とも臨床に応用するには、熱ストレスは侵襲が過大であり、亜ヒ酸は有毒物質である。Hirakawa等はGeranylgeranylacetone (GGA)の作用機序として胃粘膜でのHSPの発現を証明している<sup>8)</sup>。われわれもGGA投与により手術侵襲モデルで侵襲が軽減されることを確認している(投稿中)。GGA

により副作用なくHSPの誘導が生体においても可能であれば新たな生体防御の方法が見いだされるものと期待される。

以上、肝虚血再灌流において、その障害機序にアポトーシスが関与し、これをHSPをあらかじめ誘導することにより、障害を軽減できる可能性があることを報告した。

## 文 献

- 1) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR : Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 : 239-257, 1972
- 2) Kerr JFR : Shrinkage necrosis : A distinct mode of cellular death. *J Pathol* 105 : 13-20, 1971
- 3) Thompson CB : Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267 : 1456-1462, 1995
- 4) Galle PR, Hofman WJ, Walczak H, et al : Involvement of the CD95 (Apo-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 182 : 1223-1230, 1995
- 5) Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, et al : Lethal effects of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364 : 806-809, 1993
- 6) Polla BS, Kantengwa S, Francois D, et al : Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 : 6458-6463, 1996
- 7) Mosser D, Caron AW, Bourquet L, et al : Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17 : 5317-5327, 1997
- 8) Hirakawa T, Rokutan K, Nikawa T, et al : Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 111 : 345-357, 1996