

Platelet-activating factor mediates hepatic apoptosis and necrosis in chronic ethanol-fed rats with endotoxin treatment : relationship to Fas/Fas-ligand system

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 室久, 剛 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1113

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 260号	学位授与年月日	平成10年 3月26日
氏名	室久剛		
論文題目	<p>Platelet-activating factor mediates hepatic apoptosis and necrosis in chronic ethanol-fed rats with endotoxin treatment : relationship to Fas/Fas-ligand system (エンドトキシン投与された慢性エタノール飼育ラットにおいて血小板活性因子が肝のアポトーシスと壊死を媒体する : Fas/Fas-ligand システムとの関連)</p>		

博士(医学) 室 久 剛

論文題目

Platelet-activating factor mediates hepatic apoptosis and necrosis in chronic ethanol-fed rats with endotoxin treatment : relationship to Fas/Fas-ligand system

(エンドトキシン投与された慢性エタノール飼育ラットにおいて血小板活性化因子が肝のアポトーシスと壊死を媒介する : Fas/Fas-ligand システムとの関連)

論文内容の要旨

[はじめに]

慢性アルコール症は肝に脂肪化・肝炎・肝硬変を引き起こすことが知られている。このうちアルコール性肝炎 (AH) は肝小葉壊死と好中球浸潤を特徴としその障害機序には好中球の関与が指摘されている。血小板活性化因子 (PAF) は強力な好中球・単球・マクロファージのメディエーターであるが、AH との関係は不明である。近年アルコール性肝障害への apoptosis の関与が報告されているが、AH における壊死炎症反応が apoptosis や Fas/Fas-ligand を介したものであるか否かは検討されていない。慢性アルコール投与ラットに少量のエンドトキシンを投与することで AH に類似した肝炎を惹起できることから AH のモデルとして用いられている。このモデルを用い上記の点を解明するため実験を行った。

[林料ならびに方法]

8 週齢 SD 系雄性ラットを用い LieberDiet (エタノールが総カロリーの36%を占める液体飼料) またはコントロール飼料にて6週間のペア飼育を行った。ペア飼育終了後、頸静脈に留置したPE-50カテーテルからリポポリサッカライド (LPS) 1mg/kgを静脈内投与した。LPS投与1時間前に選択的PAF受容体拮抗剤TCV-309 100 μ g/kgまたは等量の生理食塩水を投与した。LPS投与前(0)、投与後1.5、12、24時間に採血と解剖を行った。0、1.5時間の採血から血清 TNF- α ・IL-8 (CINC/gro) を、0、24時間の採血から血清 ALT を測定した。0、12、24時間の肝組織を HE 染色・TUNEL 法・naphthol AS-D chloroacetate esterase 染色・免疫組織化学 (抗 ED-1・抗 Fas・抗 Fas-ligand)・透過型電子顕微鏡にて評価した。

[結果]

血清 ALT・TNF- α は LPS 投与後いずれも上昇を認めたが、エタノール+LPS 群で有意に高値を示した。TCV-309 前投与は ALT・TNF- α の上昇を抑制した。組織学的にはエタノール+LPS 群で広範な小葉壊死像と肝細胞核の断片化・クロマチン凝集像、好中球・単球の浸潤が認められた。透過型電子顕微鏡像では同群で肝細胞のクロマチン凝集像や核の断片化が認められた。またエタノール+LPS 群では壊死巣に TUNEL 陽性細胞が集積あるいは散在し、壊死巣周辺に多数の Fas 陽性肝細胞と Fas-ligand 陽性の非実質細胞が認められた。この非実質細胞群は形態学的ならびに naphthol AS-D chloroacetate esterase/抗 Fas-ligand 二重染色から好中球であることを確認した。一方、コントロール食飼育群では LPS 投与の有無に関わらず肝細胞に散在性に Fas-ligand の表出が認められたが、エタノール+LPS 群では認められなかった。TCV-309 の前処置にてエタノール+LPS 群での壊死・apoptosis・炎症性細胞浸潤などの形態学的変化および肝細胞上の Fas 表出・好中球上の Fas-ligand 表出は有意に抑制された。

〔考察〕

アルコール性肝炎モデルラットでは血清 TNF- α の上昇を伴った広範な肝壊死と顕著な炎症性細胞浸潤が認められ、人の急性アルコール性重症肝炎と類似した像を示した。肝壊死巣には多数の肝細胞に apoptosis として特徴的な変化が認められ、また apoptosis を介在する受容体としてよく知られた Fas の表出が肝細胞上に認められ、更に Fas 受容体に結合し apoptosis を誘導する Fas-ligand が浸潤した好中球に認められた。これらのことからこのモデルでの肝障害の病態には apoptosis と壊死が混在しており、その機序には好中球を介した Fas/Fas-ligand 系の関与が推定された。一方 Fas-ligand はコントロール群で肝細胞に表出が認められ、正常な肝の防御機構あるいは肝細胞の消長に関与していると考えられた。エタノール+LPS 群では肝細胞上には Fas-ligand 表出は認められず、この制御機構の異常が障害機序に関係していると思われた。PAF 受容体拮抗剤の前処置でこの肝障害は防御されたことから、強力な好中球・単球/マクロファージのメディエーターである PAF はこの肝障害に強く関与していると考えられた。

〔結論〕

ラットアルコール性肝炎モデルでは PAF を介した apoptosis と壊死が起こり、その障害機序には血清 TNF- α の上昇と Fas/Fas-ligand 系の表出が関与すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

アルコール性肝炎は肝細胞壊死と好中球の浸潤を特徴とする。本研究はラットを用いた慢性アルコール飼育動物にリポポリサッカライド (LPS) を投与した肝障害モデルにおける肝細胞壊死の発症機構を解析した。最初に、好中球の誘導因子として知られている血小板活性化因子 (PAF) がこの肝細胞障害の誘導に如何なる役割をしているか PAF 拮抗剤である TCV-309 を用いて解析し、次に肝細胞壊死に Fas/Fas-ligand system を介したアポトーシスが関与しているかどうかを検討した。実験モデルとして Sprague-Dawley ラットにアルコールを含む Lieber-De Carli 流動飼料を 6 ヶ月与え、TCV-309 を前投与後 LPS を静注し、24 時間の経過を解析し、それぞれの適切な対照と比較した。

その結果、以下の所見と結論が得られた。

- 1) アルコール・LPS 肝障害実験モデルにおいて PAF 拮抗剤の前投与によって LPS による血清 ALT 濃度上昇及び、TNF- α 濃度上昇は有意に抑制された。
- 2) PAF 拮抗剤によって LPS による肝への好中球、単球の浸潤および肝細胞壊死が強く抑制されることを明らかにした。
- 3) LPS による肝細胞壊死は、HE 染色による核の形態像、電顕所見さらに TUNEL 法よりアポトーシスが関与していることを示した。
- 4) Fas-ligand が肝に浸潤している好中球に強く発現しており、肝細胞には Fas が発現していることを免疫染色で示した。また、PAF 拮抗剤の投与はこれらの発現が抑制されることを明らかにした。

以上の所見より、申請者は慢性アルコール性肝障害の発生に PAF が重要な役割を果たしていると考え、また LPS によって肝細胞にアポトーシスが生じ、このアポトーシスは FAS/FAS-ligand system を介して働いていると結論した。

審査委員会は以下の点においてこの研究を高く評価した。

- 1) 慢性アルコール性肝障害モデルにおいて PAF-antagonist である TCV-309 が肝障害を抑制することを明かにした。このことはアルコール肝障害に PAF が重要な役割を演じており、PAF 拮抗剤がアルコール性肝障害の治療に使える可能性を示した。
- 2) アルコール・LPS 肝障害モデルにおいて Fas/Fas-ligand system を介したアポトーシスが生ずることを初めて明らかにした。このことはアルコールによる肝細胞障害の発生機序を解明する上で重要な基盤を与えるものと考えられる。

論文の内容の説明の後、論文内容と関連して以下のような点について質疑応答がなされた。

1. Lieber Diet (液体飼料) の栄養組成の特徴、ラットへの与え方、それ自体の肝障害作用の有無について
2. アルコール性肝障害において肝へ好中球が浸潤しやすい理由、また好中球に Fas-ligand が発現することが肝細胞障害の主要な要因になっているか?
3. 慢性アルコール性肝障害で血中 LPS が上昇する理由
4. このアルコール性肝炎実験系において LPS 投与と IL-8 の血中変動および好中球の肝臓への浸潤の相関
5. アルコール感受性が人と同じようにラットでも個体差があるかどうか、またそれはどのように現われるか?
6. この実験系における肝細胞死について、ネクローシスとアポトーシスの基準の定め方について
7. TNF- α の変動と Fas/Fas-ligand system の発現の関連性について
8. PAF 拮抗剤が効力を発揮するのは病的状態について。どのような疾患モデルで使用されているか? また、臨床応用されているか?
9. エンドトキシンの肝障害の作用について、特に虚血性障害のおこる機序について
10. このアルコール性肝障害モデルでおこる細胞障害の局在と肝小葉内での部位との関係について

以上の質問に対する申請者の応答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士 (医学) の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 教授 筒井 祥博

副査 教授 金子 榮蔵 副査 助教授 中村 達