

学 位 論 文 題 名

Lipid peroxidation during ischemia depends on ischemia time in warm ischemia and reperfusion of rat liver

(ラット肝温阻血灌流モデルにおいて、
阻血中の脂質過酸化は阻血時間に依存する)

学位論文内容の要旨

1. 研究目的

[背景] 温阻血再灌流(IR)において、再灌流後の爆発的な活性酸素種(ROS)の生成により酸化的障害が惹起される。抗酸化剤の阻血前投与が有効なことから、われわれは阻血中に既に酸化ストレスが生じており、再灌流後の酸化的障害、非特異的炎症反応、アポトーシスなどの trigger となることを提唱してきた。しかし、阻血中の酸化ストレス評価は困難であり、定量的に解析した報告は少なく、十分には解明されていない。

[目的] 肝の温阻血中におこる酸化ストレスの程度を明らかにし、再灌流後の細胞機能、障害、個体の予後への関与を明らかにすること。

2. 方法

[モデル]: 雄性 Sprague-Dawley Rat (220 - 280 g)を用い、一晩絶食の後 70%の肝温阻血およびIRを行った。

[デザイン]: ① 温阻血時間が個体の生死に及ぼす影響: 60, 120 分の温阻血を施し、再灌流後の1週生存率を比較した。② 温阻血時間が再灌流後早期の障害に及ぼす影響: 60, 120 分の温阻血を行い、再灌流後 60 分での障害を評価した。③ 温阻血時間と阻血中の酸化ストレスの推移: 30, 60, 120 分の温阻血および sham 手術を施し、酸化ストレスを評価した。

[評価項目]: ① 1週生存率 ②③ 肝障害: 血中 ALT 活性、総ビリルビン測定した。酸化的障害のマーカー: 肝の主構成脂質であるホスファチジルコリン(PC), ホスファチジルエタノラミン(PE)の過酸化物(PC-OOH, PE-OOH; 以下 L-OOHs と記載)を Chemiluminescence-HPLC 法で測定した。マロンジアルデヒドとヒドロキシノネールの和(MDA+4-HNE)は LPO586kit®で測定した。酸化ストレスのマーカー: 酸化型グルタチオン(GSSG)を測定した。抗酸化能: 還元型グルタチオン(GSH), superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), グルタチオンペルオキシダーゼ (c-GPX, PH-GPX)を評価した。

3. 結果

① 1週生存率は60分IRでは100%, 120分IRでは0%であった。②③ 阻血中に L-OOHs, MDA+4-HNE は阻血時間とともに増加したが、阻血 60, 120 分での量を比較すると、L-OOHs は有意に増加したが、MDA+4-HNE の増加は有意ではなかった。GSSG は 120 分阻血で有意に増加したが、30, 60 分の温阻血による酸化ストレスを反映しなかった。GSH は温阻血 30 分で減少し、60 分以降は緩徐に減少した。

60 分 IR 群では、再灌流後 60 分で L-OOHs, MDA+4-HNE, GSSG は速やかに減

少した。GSH は sham の 70%まで回復した。PH-GPX 活性は sham の 82%まで低下したが、c-GPX, Cu/Zn-SOD の活性は変化しなかった。

120 分 IR 群では、再灌流後 60 分で L-OOHs, MDA+4-HNE, GSSG はさらに増加し、GSH はさらに減少した(sham の 21%)。PH-GPX 活性は sham の 47%, Cu/Zn-SOD は 89%に低下した。c-GPX 活性は変化しなかった。120 分 IR 群の再灌流後 60 分の ALT, 総ビリルビン は 60 分 IR 群より有意に高値であった。

4. 考察

120 分 IR では GSH 減少、PH-GPX, Cu/Zn-SOD 活性低下、L-OOHs, 血中 ALT 増加が同時に示され、個体は死亡した。60 分 IR では軽度の PH-GPX 活性低下が見られたが、GSH は回復、L-OOHs は減少し、個体は生存した。IR によって生じる ROS により、防御システム(抗酸化能)が破綻しなければ回復過程を辿り、破綻すると不可逆な障害に進展することが脂質、タンパク、臓器、個体レベルで示された。

L-OOHs は脂質過酸化の 1 次生成物であり、PH-GPX, GSH の存在下に速やかに消去されるため、酸化ストレスによる膜障害を real time に反映する。L-OOHs の増加は、脂質過酸化の速度が PH-GPX による L-OOHs の消去速度を凌駕していることを示す。実際、阻血中に GSH が減少しており、L-OOHs の生成速度は阻血時間依存的に増加した。120 分 IR での再灌流後 60 分の L-OOHs 量の増加には、GSH 減少のみならず PH-GPX 活性の低下も関与していることが初めて示された。

L-OOHs は細胞毒性が殆ど無く、蓄積された L-OOHs がラジカル化して脂質過酸化の連鎖反応を促進することが障害の原因と考えられる。また、阻血中から活性化される PLA2 によるアラキドン酸代謝の亢進(Ogata et al.)、L-OOHs からの過酸化脂肪酸側鎖の切り出しとリジン脂質の増加も障害を増悪させる。

MDA, 4-HNE は L-OOHs が酸素の存在下に分解して生成し、タンパク修飾、GSH の減少、caspase の活性化により細胞を障害する。しかし、低酸素下では生成効率が落ちる可能性があり、阻血臓器の脂質過酸化をリアルタイムには評価できない可能性がある。実際、本実験では、L-OOHs と MDA+4-HNE は阻血中以外では相関したが($r^2 > 0.913$)、阻血中には相関しなかった($r^2 < 0.533$)。MDA+4-HNE の生成速度は阻血 60 から 120 分では減少していた。従来、阻血肝の酸化ストレスが想定されているにも関わらず、TBARS, MDA, 4-HNE などでは阻血時間依存的な酸化ストレスを定量的に評価できなかった理由を明快に説明し得た。

c-GPX, PH-GPX は GSH の存在下に H₂O₂, L-OOHs を消去するため、阻血中の L-OOHs 増加は GSH 減少によって説明し得る。われわれは lethal な IR 後には、再灌流後の ATP 合成能が低下することを報告した(Yokota et al.)。GSH 量は ATP を用いて生合成されるため、120 分 IR で再灌流後に GSH が減少したこともまた、ATP の減少で説明し得る。減少した GSH に見合う GSSG の増加が無いことは、細胞からの漏出、グルタチオン抱合、タンパクとの結合による、総グルタチオン(GSH+GSSG)の減少が関与すると考えられる。

肝では温阻血中に阻血時間依存的に酸化ストレス・障害が起こっていた。阻血中に高度の酸化的障害を受けた肝は、再灌流後に抗酸化能の破綻、酸化的障害の増悪をきたし、細胞死、臓器不全、個体死へと進展する。このことは酸化的障害に対する治療の window period は阻血中であり、阻血前に治療を開始するべきであることの論理的根拠となる。また、阻血終了時から再灌流後 60 分までの酸化的障害、抗酸化分子量、抗酸化酵素の活性を精査することで、臓器、個体の予後を予測できる可能性が示唆された。これらの知見は肝温阻血再灌流障害における予後予測、診断、治療に寄与することが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 藤 堂 省

学位論文題名

Lipid peroxidation during ischemia depends on ischemia time in warm ischemia and reperfusion of rat liver

(ラット肝温阻血灌流モデルにおいて、
阻血中の脂質過酸化は阻血時間に依存する)

肝温阻血再灌流(IR)において、阻血中の酸化ストレスの評価は困難であり、十分には解明されていない。申請者は肝の温阻血中におこる酸化ストレスの程度を明らかにし、再灌流後の細胞機能、障害、個体の予後への関与を明らかにするために、ラットの 70%の肝温阻血および IR を行った。sham 手術, 30, 60, 120 分の温阻血および、60, 120 分の温阻血後に 60 分の再灌流を施した。1 週生存率、血中 ALT 活性、総ビリルビン、肝組織 GSH, GSSG, グルタチオンペルオキシダーゼ (c-GPX, PH-GPX) 活性、Cu/Zn-SOD、脂質過酸化の 1 次生成物であるオキソヘキサヒドロペルオキシド (PC-OOH)、オキソヘキサヒドロペルオキシド (PE-OOH)、2 次生成物であるマロンジアルデヒドと 4-ヒドロキシノネール (MDA+4-HNE) を評価した。

阻血中に PC-OOH, PE-OOH は阻血時間依存的に増加した。一方、MDA+4-HNE は増加したが、その生成速度は阻血 60 分以降はむしろ低下した。GSSG は 120 分阻血で有意に増加、GSH は温阻血 30 分で減少、60 分以降は緩徐に減少した。60 分 IR では再灌流後 60 分で過酸化脂質、GSSG は減少し、GSH は回復した。120 分 IR では再灌流後 60 分で過酸化脂質、GSSG はさらに増加、GSH はさらに減少した。PH-GPX 活性は sham の 47%、Cu/Zn-SOD 活性は 89%に低下した。120 分 IR の再灌流後 60 分の ALT、総ビリルビンは 60 分 IR より有意に高値であった。60, 120 分 IR 後の 1 週生存率は 100%, 0%であった。120 分 IR の PH-GPX 活性の低下が初めて示され、PC-OOH, PE-OOH の増加を支持していた。

温阻血中に阻血時間依存的な酸化障害が生じていた。阻血中に高度の酸化的障害を受けた肝は、再灌流後に抗酸化能の破綻、酸化的障害の増悪をきたし、細胞死、臓器不全、個体死へと進展する。抗酸化治療は阻血前に開始するべきであることが示された。

公開發表後、副査の筒井教授より 1) 脂質過酸化の 1 次生成物と 2 次生成物の測定結果の乖離の理由、2) 抗酸化能の減弱は障害の原因か結果か、3) 臨床応用されている、または、見込まれる抗酸化治療があるか、などの質問があった。それに対して、1) 脂質過酸化の 2

次生成物は 1 次生成物が酸素の存在下に分解、生成し、低酸素下では生成効率が低下する可能性がある。2) 高度の酸化ストレスによってタンパク変性が生じ、抗酸化酵素の活性低下によってさらに酸化ストレスが増悪する、という悪循環が生じたと考えられる。原因でも結果でもあり、さらに詳細な検討が必要である。3) 抗酸化剤であるイブuprofen やニカバネが肝阻血再灌流傷害を軽減すること、また、薬剤や阻血による preconditioning が臨床応用される可能性がある、などの回答があった。主査の浅香教授より、1) 120 分の阻血・再灌流により全てのラットが死亡し、ALT が著しく増加したが、原因は酸化ストレスなのか。2) 四塩化炭素(CCL4) 投与と阻血再灌流では、どちらが脂質過酸化の程度が強いか、相異の理由は何か。3) 阻血肝の酸化ストレスの評価が、移植医療にどのように活かせるか、などの質問があった。それに対して、1) 肝細胞死、細胞崩壊、個体死の原因のすべてが酸化ストレスとは言えない。しかし、細胞死のピークとなるのが再灌流後 6 時間頃であるのに対し、脂質過酸化のピークは再灌流後 5-15 分であり、阻血中にも増悪する。したがって、阻血中から再灌流直後の酸化的障害は阻血再灌流傷害の原因と言える。2) 死亡しない dose の CCL4 投与モデルの方が過酸化脂質量は多い。これは、CCL4 投与では肝の大部分を占める肝細胞が傷害されるのに対し、阻血再灌流では類洞内皮が傷害されることが関係する。3) グラフトの状態評価、グラフトの選択に利用できると考えられる、などの回答があった。最後に副査の藤堂教授より追加のコメントと質問があった。1) 肝阻血再灌流では過酸化脂質量の変化が小さく、評価が難しかった原因は何か、2) 阻血再灌流傷害のメカニズム、酸化ストレスの推移に関する知見をどのように臨床にフィードバックできるか、などの質問があった。それに対して、1) 肝臓移植での評価は大部分を占め、過酸化を受けにくい肝細胞での変化が反映されるが、阻血再灌流傷害の初期のターゲットは類洞内皮であり、局所での酸化ストレスが移植には反映されにくい。肝細胞で活性酸素が生成しても、他臓器より抗酸化能が強く、傷害には至らないこともある。2) 他臓器で臨床応用されている薬剤の肝での有効性を示し、適応を拡大することが早期に抗酸化治療を臨床に還元する道筋と考えられる。ischemic preconditioning の体系化、新規保存液の開発により脂肪肝、心臓ドナーからの移植を実現することが望まれる、などの回答があった。

本論文は肝の阻血時間依存的な阻血中の脂質過酸化を示し、再灌流後の酸化ストレスの増悪との関係を体系的に示した。また、従来、阻血中の脂質過酸化が過小評価されていたことを、脂質過酸化の 1 次、2 次生成物の kinetic によって解明した世界で初めての報告である。抗酸化酵素 PH-GPx が阻血再灌流によって失活することも世界で初めて示した。臓器保存中の酸化ストレスを評価することにより、再灌流後の臓器、個体予後を予測し得ることを示しており、肝移植の安全性向上に寄与することが期待される。また、抗酸化治療を阻血前に開始するべきであることの論拠となる重要な知見と考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。