HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 硫化水素は生存シグナルの増強とNrf2の核内移行を介して肝温虚血再灌流障害を軽減する［論文内容及び審査の要旨］ |
| Author(s) | 島田, 慎吾 |
| Description | 配架番号：2124 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(医学) |
| Dissertation Number | 甲第11600号 |
| Issue Date | 2014-12-25 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/57782 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Shingo_Shimada_abstract.pdf, 論文内容の要旨 |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　島田　慎吾

## 学 位 論 文 題 名

硫化水素は生存シグナルの増強と Nrf2 の核内移行を介して肝温虚血再灌流障害を軽減する
(Hydrogen Sulfide Ameliorates Hepatic Warm Ischemia and Reperfusion Injury via Augmentation of Survival Signals and Nuclear Translocation of Nrf2)

【背景と目的】

虚血再灌流障害(IRI)は移植後早期のグラフト機能不全の原因となる。さらに、IRI はタンパク合成や細胞増殖も阻害し、移植後早期のグラフト機能不全はもとより、急性・慢性拒絶のカスケードを増強することも知られている。したがって、IRI の軽減は、ドナー源の拡大と術後成績向上の両方に有効な方策と考えられる。IRI の急性期では、Akt は mTOR-p70s6k や STAT3 を含む生存・抗アポトーシス・細胞増殖のシグナルにおいて主要な役割を担っている。硫化水素(Hydrogen sulfide; $H_2S$)は悪臭を発する有毒ガスとして知られているが、近年はラットやマウスの心臓、腎臓、肺、小腸、肝臓などで IRI を軽減し、炎症性サイトカインやアポトーシスを抑制することが知られている。心筋や小腸では PI3K/Akt/p70S6k カスケードの増強や Nrf2 の核内移行の促進が IRI を軽減することが報告されているが肝臓では報告がない。本研究では 1) $H_2S$ の肝保護作用、抗酸化作用、抗炎症作用、抗アポトーシス作用を確認すること。2) 肝臓において $H_2S$ が PI3K/Akt/p70S6k カスケードを増強させるかどうかを明らかにすること。3) 肝臓において $H_2S$ が Nrf2 の核内移行を促進するかを明らかにすること。4) $H_2S$ が肝再生に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

本研究は「北海道大学動物実験に関する規定」に従って実施した。C57BL/6J マウスに対して 75 分間の 70%肝部分虚血を行った。マウスは 3 群に分けた(n=6)。NaHS (+) group: 再灌流 10 分前に $H_2S$ の供与体である NaHS 1mg/kg を静脈内投与した。NaHS (-) group: 生理食塩水を静脈注射した。Sham group: 門脈の遮断を施行せずに、同様な手術操作を行った。再灌流 6 時間後(R6h)の肝組織を光学顕微鏡で観察した。評価法は、類洞のうっ血[0-4]、肝細胞質の空胞化[0-4]、肝実質の壊死[0-4])の合計スコアを用いた。R6h の血漿中の ALT を測定した。再灌流 3 時間後(R3h)、R6h の血漿中の TNF-α、IL-6、IL-1β、IFN-γ、IL-17、IL-23 および CD40L を Bioplex (Bio-Rad, Hercules, CA)を用いて測定した。ウエスタンブロット法にて R6h の肝組織の p-PDK-1、p-Akt、p-mTOR、p-p70s6k、 cleaved caspase-3、HO-1、Thioredoxin-1 (TRX-1)を評価した。アポトーシスの評価は、再灌流 24 時間後(R24h)の肝凍結切片を蛍光 TUNEL staining kit (Promega, Madison, WI)を用いて行った。肝組織過酸化脂質の評価は、R6h の肝組織の Malondialdehyde (MDA) + 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)を LPO586 kit (Oxis International, Foster City, CA)を用いて測定した。さらに、R6h の肝組織の凍結切片をウサギポリクローナル抗 Nrf2 抗体(Abcam Cambridge, UK)で免疫染色し、観察した。R24h のパラフィン包埋切片をマウス抗 PCNA 抗体で免疫染色し、観察した。

【結果】

1)肝障害：肝障害スコアおよび血漿 ALT の平均は NaHS の投与によって障害は有意に軽減していた。2)サイトカイン・ケモカイン：R3h の測定した血漿中サイトカイン・ケモカインは NaHS(-) group において、Sham group より上昇していたが、NaHS(+) group では上昇が有意に軽減していた。R6h の CD40L 以外の血漿中サイトカイン・ケモカインは R3h と比較して NaHS(-) group、NaHS(+) group とも低下していた。IL-6、IL-1β、IFN-γ は NaHS(+) group で NaHS(-) group と比べて有意に低下していた。3)生存シグナル：p-PDK1 は NaHS(-) group で Sham group に対して著明に減弱していたが、NaHS(+) group では減弱の程度を軽減していた。p-Akt は NaHS(-) group で Sham group に対して減弱していたが、NaHS(+) group では、むしろ最も増強していた。p-mTOR と p-p70S6k は Sham group も NaHS(-) group もほぼ同様であったが、NaHS(+) group では、有意に増強していた。4)アポトーシス：NaHS(-) group では多数の TUNEL 陽性細胞を認めたが、NaHS(+) group では有意に低下していた。さらに、NaHS(-) group では Sham group に対し、cleaved caspase-3 が増強していたが、NaHS(+) group では抑制されていた。5)酸化ストレス：MDA＋4-HNE は NaHS(-) group では著明に増加していたが、NaHS(+) group では有意に増加を抑制していた。免疫染色では Sham group では Nrf2 の核内移行はほとんど見られなかったが、NaHS(-) group では核内移行がみられ、NaHS(+) group では、核内移行の増強が見られた。核タンパクのウエスタンブロットでも同様な所見であった。さらに、HO-1、TRX-1 ともに NaHS(-) group に対して NaHS(+) group では発現が増加していた。6)細胞増殖：PCNA 陽性肝細胞の割合は NaHS(-) group では Sham group に比して減少していたが、NaHS(+) group では、むしろ最も増加していた。

【考察】

われわれは本研究において、マウス肝 IRI における $H_2S$ の保護効果を確認した。NaHS 投与により組織障害、アポトーシス、酸化ストレス、炎症を軽減した。さらに、肝再生の促進が示唆された。この機序の一つとして、Nrf2 の核内移行の促進と、その下流である HO-1、TRX-1 などの抗炎症、抗酸化を示す経路が示された。また、NaHS 投与により p70s6k やその上流のキナーゼである mTOR、Akt、PDK-1 のリン酸化を維持することで肝 IRI を軽減することを証明した。さらに、$H_2S$ が再灌流早期に IL23-IL17 を抑制し、クッパー細胞や好中球、リンパ球(CD4+/Th17)の活性化を抑えることが示唆された。さらに本研究では STAT3 自体は評価していないが、NaHS を投与することで STAT3 を介した肝再生機構が起きている可能性が示唆された。

【結論】

$H_2S$ は PI3K/Akt/p70S6k カスケードを増強させ、Nrf2 の核内移行を促進することで抗酸化、抗炎症、抗アポトーシス効果を示し、肝虚血再灌流障害を軽減するのみならず、肝再生にも有益な効果を与える可能性が示唆された。