

令和元年6月20日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10173

研究課題名(和文) 肝虚血再灌流傷害におけるミトファジー機構の解明と新規予防法の開発

研究課題名(英文) Parkin-dependent mitophagy in hepatic ischemia-reperfusion injury

研究代表者

矢永 勝彦 (Yanaga, Katsuhiko)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：70220176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝切除術または肝臓移植における肝虚血再灌流障害について、ミトファジーに焦点を当て、ミトファジーのイニシエーターであるParkinの働きについて明らかにした。c57cl/6jマウスを用いた70%肝虚血再灌流モデルでは、再灌流後6時間にミトコンドリア障害やアポトーシスシグナルおよび肝逸脱酵素の上昇などを認めたが、24時間以降は漸減し障害が回復する所見を認めた。その一方で、Parkin欠損マウスにおいては、再灌流後24時間以降での肝逸脱酵素およびアポトーシスシグナルが野生型と比較し上昇しており、肝虚血再灌流障害後期においてはParkinが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝系統的切除手術では出血量制御目的で肝血流を一時的に遮断するため医原的な肝虚血再灌流傷害を引き起こす。また生体肝移植においても摘出した肝臓グラフトは必然的な虚血状態となり、移植後の肝機能傷害の原因となる。当該研究では細胞が本来持つ生体防御機構の一つであるミトファジーに着目し、開始因子の一つであるパーキンタンパクの虚血再灌流障害における働きを明らかにした。パーキンは障害を受けたミトコンドリアの代謝に関与し、パーキンタンパク欠損状態では細胞死シグナルが増強することが判明した。そのため今後はパーキンタンパク発現を増加させるなど、肝虚血再灌流障害における新たな防御機構の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the hepatic ischemia-reperfusion injury (IRI), mitochondria are injured by the reactive oxygen, and subsequently induces caspase signals-dependent cell apoptosis. On the other hand, the cells dissolve these dysfunctional mitochondria by mitophagy. We examined the function of Parkin protein coded by PARK2 which is the causative gene of Parkinson's disease and plays a key role in the mitophagy. We established 70% IRI model using c57bl/6 and PARK2 K.O. mice. Inflammatory reaction and hemorrhage were observed at 1 hour (h) after reperfusion by H&E stain. Swollen abnormal mitochondria appeared at 3 h by electron microscopy. Apoptosis signals were elevated after 1 hour after reperfusion and declined in 24 h. The serum aminotransferase and parkin protein were parallel to the behavior of apoptosis signals. The serum aminotransferase levels were higher in PARK2 K.O. mice compared as that in wild type in the late phase of IRI. The hepatic IRI was enhanced under the PARK2 defect condition.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝虚血再灌流障害 オートファジー ミトファジー アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内環境の恒常性を維持することは生命活動を継続する上で不可欠な要素である。ストレス環境に晒された細胞内では異常蛋白、異常ミトコンドリアが蓄積するが、これらを適切に分解処理するオートファジーは全ての真核生物で保存される根源的な機構である。一般的に低酸素ストレス下におかれた細胞では、ミトコンドリアが活性酸素により障害され、カスパーゼを介した細胞死を誘導する。一方で、細胞はオートファジーを利用してこれらの機能不全に陥ったミトコンドリアを分解すること(マイトファジー)によって細胞環境を維持している。人体における臓器虚血・再灌流による酸化ストレス下でも同様の生体防御機構が働いていることが明らかになり、実際に心筋梗塞や脳梗塞でもマイトファジーの亢進が確認されている。また近年、Narendra¹らは若年性 Parkinson 病の原因遺伝子である PARK2 と PINK1/PARK6 がそれぞれコードする蛋白質 Parkin と PINK1 が、マイトファジーに関連することを明らかにし、酸化ストレス下における働きが注目されている。一方、肝系統的切除手術では出血量制御目的で肝血流を一時的に遮断するため医原的な肝虚血再灌流傷害を引き起こす事が知られている。また生体肝移植においても摘出した肝臓グラフトは必然的な虚血状態となり、移植後の肝機能傷害の原因となる。そのため申請者らは肝虚血再灌流障害の機構を解明すべく、温虚血と冷虚血による傷害度の差異 (Ikeda T, Yanaga K, et al. Hepatology 1992)、移植肝の再加温傷害の制御 (Wakiyama S, Yanaga K, et al. Br J Surg 1997)、肝移植後の炎症性サイトカイン性制御による虚血再灌流傷害の制御 (Hashimoto K, Yanaga K, et al. Transplantation 2000, Ikegami T, Yanaga K, et al. Br J Surg 2001) などについて報告してきた。これらの肝虚血再灌流傷害の防御機構としてマイトファジーの関連が示唆されているが、その機序は明らかになっていない部分も多く、また効果的な予防法がないことが現状である。

今回、申請者らは肝虚血再灌流傷害における Parkin、マイトファジーを介した生体防御機構について解明し、マイトファジーを標的とした新たな肝虚血再灌流傷害の軽減策を検討する。

2. 研究の目的

本研究は肝切除術または肝臓移植における虚血差還流障害について、マイトファジーに焦点をあて、その機構を解明するものである。さらにマイトファジーのイニシエーターである Parkin の働きを明らかにする。虚血再灌流傷害の新たな予防法を検討する。本研究は動物実験において検証され、実証された結果は将来的に臨床研究への応用を目標とするトランスレーショナルスタディである。

3. 研究の方法

マウス虚血再灌流モデルの作成 (in vivo)

C57BL/6J 系統のマウスを麻酔、除痛下に開腹し、血管クリップ(20g)を用い肝血流を遮断し、70%肝温阻血状態を形成した。任意時間血流を遮断したのち、血管クリップを外して血流を再開させ再灌流モデルを作成する。In vivo 実験は全て本学動物実験施設にて行い、動物実験室専属スタッフによる適切な指示のもと研究を行った。

虚血後 48h まで再灌流させ、継時的なマイトファジー、Parkin、アポトーシスの評価を行った。

評価項目および方法

ミトファジーの評価	電子顕微鏡、蛍光顕微鏡、Western Blot 法 (LC3-、SQSTM1、TOMM20)
アポトーシスの評価	Western Blot 法 (cleaved caspase-9, cleaved caspase-3, cytosolic cytochrome c)、蛍光顕微鏡 (TUNEL 染色法)
Parkin の評価	Western Blot 法、Quantitative RT-PCR (PARK2 mRNA)
細胞活性の評価	MTT assay, FACS

PARK2 欠損マウスを用いて、上記と同様の方法を用い評価し、野生型マウスとの比較検討を行った。

4. 研究成果

虚血時間による肝障害の形態的变化

虚血時間は 20 分または 60 分に設定し、再灌流後 0 時間、1 時間、3 時間、6 時間、24 時間、48 時間での病理学的所見を評価した。まず 60 分虚血では再灌流後 1 時間より出血性変化を認め、3 時間より壊死性変化を伴う領域が観察された。その後、壊死領域の拡大を認めた。電子顕微鏡による観察では虚血再灌流後 3 時間でミトコンドリアの著明な膨化とライソゾームの蓄積を認めた。その一方で、20 分虚血では病理学的に出血性変化および壊死性変化に乏しい所見であった。

虚血再灌流障害による生化学的变化

肝逸脱酵素 (AST/ALT) の変化に関しては、60 分虚血後 1 時間から 24 時間後までいずれも 1,000 IU/L 以上と測定限界値を上回っており、再灌流後 24 時間で 300-400 台へと低下した。20 分虚血では再灌流後 0 時間より上昇を始め、6 時間後に最高値 (AST/ALT=463.6 ± 146.6 / 606 ± 188.0 IU/L) となり、24 時間後に減衰し、48 時間後に正常化 (AST/ALT=60.3 ± 1.15 / 17.3 ± 0.6 IU/L) した。ミトコンドリアを介したアポトーシスシグナルである Cytochrome C, Cleaved caspase-9, Cleaved PARP に関しては、血清肝逸脱酵素と相関した発現変化を認め、再灌流後 1 時間からタンパク発現上昇を認め、同様に 24 時間後より減衰した。Parkin タンパクに関してはアポトーシスシグナルと同じ挙動を示していた。以上より、虚血再灌流障害によりミトコンドリア障害が起こり、ミトファジー要求が高まるため Parkin タンパク発現が上昇すると考えられた。一方で、ミトファジーで処理できない異常ミトコンドリアから Cytochrome C が細胞質に放出されアポトーシスシグナルカスケードが活性化する現象が観察された。

PARK2 欠損マウスと野生型マウスの比較検討

続いて PARK2 欠損マウス (B6.129S4-Park2^{tm2Shn}/6J) を用いて虚血再灌流障害における野生型マウスとの比較検討を行った。まず当該マウスが Parkin タンパク未発現であり、血清肝逸脱酵素の正常値が野生型と同様であることを確認した。虚血再灌流後に関しては再灌流後 6 時間まで両群に差を認めなかったが、24 時間以降では統計学的有意差を以て PARK2 欠損マウス群で肝逸脱酵素が高い結果となった。アポトーシスシグナルに関しても同様に 24 時間後以降での Cytochrome C および Cleaved caspase-9 の発現上昇を認めた。さらに H.E. 染色では脱核肝細胞領域の増加を認めた。以上より、肝虚血再灌流障害では

Parkin タンパク欠損状況下では肝逸脱酵素およびアポトーシスシグナルの上昇が遷延し、肝障害からの回復が遅れることが明らかとなった。Parkin タンパクは肝虚血再灌流障害晩期における細胞防御機構において重要な役割を果たしていることがわかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

第31回日本肝胆膵外科学会・学術集会

題名「Parkin-dependent mitophagy in hepatic ischemia-reperfusion injury」

演者 Yoshihiro Shirai, Ryoga Hamura, Takashi Horiuchi, Tomohiko Taniyai, Yohta Shimada, Nobuhiro Saito, Yumi Kanegae, Toya Ohashi, Katsuhiko Yanaga

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：白井祥睦

ローマ字氏名： Yoshihiro Shirai

所属研究機関名：東京慈恵会医科大学

部局名：外科学講座 消化器外科

職名：助教

研究者番号(8桁): 10785364

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。