

称号及び氏名 博士(獣医学) 藤澤 可恵

学位授与の日付 平成22年9月30日

論文名 Toxicologic Pathological Study on Expression Patterns of Heat Shock Protein 25 and Adipophilin in Different Rat Hepatic Failure Models
(異なるラット肝障害モデルにおける Heat shock protein 25 と Adipophilin の発現動態に関する毒性病理学的研究)

論文審査委員 主査 山手 丈至
副査 中村 洋一
副査 松尾 三郎

論文要旨

はじめに

人々の生活環境には、自然界に存在する化学物質のみならず、生活の向上を求めて作出された様々な化学物質がある。化学物質の多くは肝臓で代謝されることから、肝臓は毒性試験において重要な検査器官である。化学物質により誘発される肝病変としては、肝細胞の壊死、アポトーシス、変性、肥大、萎縮などがあり、その病変の程度、拡がり、出現頻度により毒性が評価される。化学物質による肝病変の推移（傷害、炎症、増悪、回復）と、その機序を毒性病理学的に解析することは、化学物質の生体へのリスク評価の際に重要である。肝病変は、基本的には、化学物質により影響を受けた肝細胞とそれに反応する炎症細胞との相互の係わりにより惹起される。その関連には、多彩な炎症性サイトカインや抗炎症性因子が複雑に係わることで、病変の進展に重要な役割を演じる。

Heat shock protein 25 (Hsp25) は、熱ショック蛋白ファミリーの1つで、細胞障害及びアポトーシスの抑制作用、抗炎症性作用などが報告されている。しかし、化学物質により傷害された肝臓での発現動態と毒性病理学的な意義に関する研究は少ない。Adipophilin (Adp) は、PAT (Perilipin, Adp, TIP47) ファミリーの1つで、脂肪滴の周囲に存在する蛋白である。低酸素条件下の培養細胞では Adp の発現が上昇するとの報告はあるが、肝障害との関連や毒性病理学的な意義は検討されていない。

本研究の第 1, 2 章では, 肝病変を惹起する 2 種の化学物質, 各々チオアセトアミド (TAA) 及び四塩化炭素 (CCl₄), をラットに投与し, 誘発される肝病変と Hsp25 あるいは Adp の発現動態との関連を毒性病理学の観点から解析した. これらの研究により, Hsp25 と Adp が肝細胞の傷害の程度に関連して出現することが示された. そこで, 第 3 章では, 現在メタボリックシンドロームとの関連で注目されている非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) のモデルを, ラットに高脂肪食を負荷することで作出し, その病態と Hsp25 及び Adp の発現動態との係わりについて解析した.

第 1 章 TAA 誘発肝障害モデルにおける Hsp25 及び Adp の発現動態

TAA は肝臓において, flavin-containing monooxygenase によって代謝され, 求電子代謝物である TAA S-oxide となり, 小葉中心領域の肝細胞に壊死を引き起こす. 6 週齢の雄性 CrI:CD(SD)ラットに TAA 300 mg/kg を単回腹腔内投与し, 投与後 1, 2, 3, 5, 7, 10 日に剖検した. 投与後 1-3 日において ALT 及び AST 活性の有意な上昇がみられた. この上昇を反映し, 投与後 1 日には, 小葉中心領域の肝細胞が凝固壊死を起こし, 2 日後には, その壊死部は単核球を主体とした炎症細胞により置換された. 投与後 3 日には, 小葉中心部の病変領域が縮小し, 投与後 5 日以降は元の組織像に回復した. 単核細胞は, 免疫染色により ED1 陽性の浸潤マクロファージで, さらに小葉中心部の病変の辺縁には ED2 陽性のマクロファージが反応していた. TAA 誘発肝病変の形成に異なるマクロファージが関与することが示された.

免疫組織化学的に, 対照群のラットに Hsp25 陽性肝細胞は見られなかった. TAA 投与群では, 投与後 2 日から病変部周囲の肝細胞が Hsp25 に対し陽性を示し, 投与後 3 日には反応の程度が増強した. 投与後 5 日以降はその発現が減じ, 消失した. この Hsp25 の免疫組織化学的発現は, Hsp25 の mRNA 発現動態と一致した. Hsp25 陽性肝細胞は, ED1 陽性マクロファージの病巣を取り囲むように存在し, さらに ED2 陽性マクロファージと接していたことから, Hsp25 の発現は炎症性マクロファージと関連することが示された. 活性化マクロファージから産生される tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), osteopontin (OPN) の mRNA 発現と Hsp25 発現の関連を解析したところ, 両者の発現はほぼ一致した. 以上より, Hsp25 の発現は炎症性マクロファージに対する抗炎症性作用を反映し, その発現はマクロファージから産生される因子により誘導されることが示唆された.

免疫組織化学的に, 対照群の肝臓では, クッパー細胞や肝星細胞が Adp に対し陽性を示した. TAA 投与群では, 投与後 1-3 日にはマクロファージ以外に病変部周囲の肝細胞が陽性を示したが, 脂肪染色により脂肪滴は検出されなかった. Hsp25 と Adp の二重免疫染色により, Adp 陽性の多くの肝細胞が Hsp25 に対しても陽性を示した. また, Adp の mRNA 発現は Hsp25 の発現変動と一致していた. 以上より, Adp の発現は, 脂肪滴形成によるものではなく, Hsp25 と同様に抗炎症性作用として現れる可能性が示唆された.

第2章 CCl₄ 誘発肝障害モデルにおける Hsp25 及び Adp の発現動態

CCl₄ は、肝臓において反応性代謝物であるフリーラジカルを生成し、小葉中心領域の肝細胞に壊死を引き起こす。CCl₄ 2 mL/kg の単回経口投与実験を TAA と同条件下で行った。投与後 1-3 日に ALT 及び AST 活性の有意な上昇がみられ、投与後 5 日以降に回復した。病理組織学的検査では、投与後 1 日に小葉中心領域の肝細胞に凝固壊死がみられ、2 日後にはその病変部は ED1 陽性のマクロファージにより置換され、3 日後には病変領域が縮小した。投与後 5 日以降は、その病変は回復した。投与後 1-3 日の病変部周辺には、腫大肝細胞がみられ、さらに同部位には活性化した ED2 陽性マクロファージが反応していた。CCl₄ 誘発肝病変の形成においても異なるマクロファージが関与することが示された。

投与後 1 日に小葉中心部の凝固壊死を起こした肝細胞が Hsp25 に対し強陽性を示した。同部位には TUNEL 染色陽性のアポトーシス細胞がみられ、アポトーシス細胞も Hsp25 を発現していた。Hsp25 陽性所見は、投与後 2-3 日では病変部周囲の肝細胞にみられ、その発現肝細胞は ED2 陽性マクロファージと近接して存在した。第 1 章と同様に、Hsp25、TNF- α 、MCP-1、OPN の mRNA 発現を解析したところ、Hsp25 の mRNA 発現は TNF- α 、MCP-1、OPN の発現動態とほぼ一致した。以上より、CCl₄ 誘発肝病変における Hsp25 の発現は、投与後 1 日ではアポトーシスに対する抑制作用として、その後 2 日と 3 日では TAA と同様に抗炎症性作用として機能する可能性が示された。

Adp 陽性所見は、投与後 1 日には、小葉中心領域の病変部位及び周囲の肝細胞にみられた。投与後 2-3 日では、Adp 陽性細胞は小葉中心領域の病変部周囲の肝細胞に集簇して認められた。二重免疫染色により、投与後 1 日では凝固壊死を示す多くの肝細胞が、2-3 日後では病変部周囲の一部の肝細胞が Hsp25 と Adp を共発現した。また、TAA モデルと同様に Adp mRNA の発現は Hsp25 の発現動態と一致した。以上より、Adp の発現は Hsp25 と同様に抗アポトーシス/抗細胞障害作用や抗炎症性作用と関連する可能性が示された。

第3章 脂肪肝モデルの病態解析と Hsp25 及び Adp の発現動態

4 週齢の雄性 Crl:CD(SD)ラットに高脂肪食を 10 週間給餌した後、剖検した。給餌 21 日目以降、体重の有意な増加が認められた。血漿中の総ビリルビン、総コレステロール値は上昇したが、ALT 及び AST 活性、トリグリセライド (TG) 値に変化は認められなかった。肝臓中のコレステロール及び TG 含量は増加した。また、肝薬物代謝酵素の活性が低下した。組織学的には、高脂肪食群では、小葉辺縁領域の肝細胞に微細な脂肪滴が確認された。しかし、肝細胞の壊死や炎症反応は認められなかった。NASH は、脂肪肝から脂肪性肝炎へ移行する病態で、今回のモデルは、NASH の前駆病変と考えられた。

脂肪肝において Hsp25 陽性細胞、ED1 及び ED2 陽性マクロファージの増加は認めら

れなかった。一方、脂肪変性を示す肝細胞に Adp が発現していた。Hsp25, TNF- α , MCP-1 の mRNA の発現上昇は認められなかったが, Adp mRNA は有意な発現上昇が認められた。以上より, NASH 前駆病変においては, 脂肪変性が進んでいるにも拘らず, 肝細胞傷害や炎症反応がないことから, Hsp25 が発現しておらず, かつ Adp の発現は脂肪滴蓄積にのみに係る低い発現上昇と考えられた。

まとめ

1. TAA 誘発肝障害モデルにおいて, Hsp25 は, ED1 及び ED2 陽性マクロファージと関連した抗炎症性作用として発現し, 活性化マクロファージから産生される因子により誘導される可能性を示した。
2. CCl₄ 誘発肝障害モデルにおいて, Hsp25 の発現は抗炎症性作用のみでなく, 抗アポトーシス/抗細胞障害作用もあることが示された。
3. TAA 及び CCl₄ モデルにおいて, Adp の分布とその mRNA 発現動態が Hsp25 のそれとほぼ同様であったことから, Adp にも抗アポトーシス/抗細胞障害作用及び抗炎症性作用がある可能性が示唆された。
4. 脂肪肝モデルでは, 脂肪変性と関連する Adp の軽度の発現が認められたが, Hsp25 の発現はなかった。これは肝細胞傷害や炎症反応が惹起されていないことを反映すると考えられた。
5. Hsp25 及び Adp は, 肝病変形成において重要な役割を演じるとともに, その病変の進展を毒性病理学的に評価する際に有用な指標となることが分かった。

審査結果の要旨

肝臓は化学物質により最も毒性が発現する器官である。化学物質による肝病変の形成（変性, 傷害, 炎症, 増悪, 回復）と, その機序を毒性病理学的に解析することは, 化学物質の生体へのリスク評価の際に重要である。

Heat shock protein 25 (Hsp25) は, 熱ショック蛋白ファミリーの1つで, 細胞障害及びアポトーシスの抑制作用, 抗炎症性作用などが報告されている。Adipophilin (Adp) は, 脂肪滴の周囲に存在する蛋白である。これら2種の蛋白と肝障害との関連, そして毒性病理学的な意義は十分には検討されていない。そこで3つの異なるラット肝障害モデルを用いて, これら蛋白の発現動態を解析し, 肝病変との関連を毒性病理学の観点から解析した。得られた成績の概要は以下の通りである。

第1章では、求電子代謝物により壊死を引き起こすチオアセトアミド (TAA) による肝障害モデルを用いた。TAA 投与により小葉中心領域の肝細胞が凝固壊死を起こし、その壊死部は時間経過と共に、単核球を主体とした炎症細胞により置換された。浸潤した炎症細胞は、ED1(CD68)あるいはED2(CD163)に陽性を示す2種類のマクロファージであった。これらのマクロファージに近接した肝細胞がHsp25に対し陽性を示した。さらに、活性化マクロファージから産生される tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), osteopontin (OPN) の mRNA 発現とHsp25発現動態はほぼ一致した。以上より、Hsp25の発現は炎症性マクロファージに対する抗炎症性作用を反映し、その発現はマクロファージから産生される因子により誘導されることが示唆された。一方、Adpの発現は、Hsp25のそれと一致し、二重免疫染色によりこれらの蛋白に対する共陽性細胞が多数検出された。Adpは、肝病変形成においてHsp25と類似の作用を示す可能性が示唆された。

第2章では、フリーラジカルにより壊死を引き起こす四塩化炭素 (CCl₄) による肝障害モデルを用いた。CCl₄ 投与により、小葉中心領域の肝細胞が凝固壊死を起こし、その後単核球を主体とした炎症細胞により置換された。単核細胞は、ED1あるいはED2陽性マクロファージであった。Hsp25の発現は、CCl₄ 投与1日後では、アポトーシス細胞を含む小葉中心部の凝固壊死した肝細胞に認められた。投与2日後以降は、マクロファージに近接した病変部周囲の肝細胞に認められ、その発現動態はTAA投与モデルと同じであった。以上より、CCl₄モデルにおけるHsp25の発現は、抗細胞障害作用及び抗炎症性作用として機能することが示唆された。また、CCl₄モデルにおいても、Adpの発現はHsp25のそれと一致し、AdpはHsp25と類似の機能がある可能性が示唆された。

第3章では、高脂肪食負荷により作成した脂肪肝モデルを用いた。本モデルでは、体重増加、血漿中の総ビリルビン、総コレステロール値の上昇、肝臓中のコレステロール及びトリグリセライド含量の増加、肝薬物代謝酵素活性の低下が認められ、組織検査により小葉辺縁領域の肝細胞に小滴性脂肪変性が確認された。しかし、肝細胞の壊死や炎症性マクロファージの出現は認められず、脂肪性肝炎の前駆病変と考えられた。このモデルでは、Hsp25陽性肝細胞は出現せず、かつTNF- α とMCP-1のmRNAの発現上昇も認められなかった。一方、脂肪変性を示す肝細胞にAdpが発現していた。以上より、この脂肪肝モデルでは、脂肪変性が進んでいるにも拘らず、肝細胞傷害や炎症反応がないことからHsp25の発現に至らず、一方、Adpの発現は、TAAやCCl₄モデルと異なり、脂肪変性に関わる変化と考えられた。

以上の研究成果により、**Hsp25** 及び **Adp** の発現は、肝病変の形成において重要な役割を演じるとともに、化学物質による肝毒性の進展を毒性病理学的に評価する際に有用な指標となることを明らかにした。この研究内容は、医学・獣医学の発展、さらには毒性病理学の新たな展開に資するものである。従って、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。