

安 樹才 論文内容の要旨

主 論 文

Induction of cell death in rat small intestine by ischemia-reperfusion: Differential roles of Fas/Fas ligand and Bcl-2/Bax systems depending upon cell types

(ラット小腸虚血再灌流モデルにおけるアポトーシス誘導と Bcl-2/Bax 系及び Fas/FasL 系の関与)

安 樹才, 菱川 善隆, 小路 武彦

Histochemistry and Cell Biology, 2005 年 掲載予定

長崎大学大学院医学研究科新興感染症病態制御学系専攻
(指導教授: 小路 武彦 教授)

緒 言

小腸は生体内で最も活発な細胞分裂・増殖が起こっている組織である。一方で、放射線、化学物質、虚血状態などで容易に細胞死が誘導されることが知られているが、腸管での細胞死誘導機序については現在でも不明な点が多く残っている。本研究では、ラット小腸虚血再灌流モデルを用いて虚血後の再灌流時間によるアポトーシス細胞数の経時的な変化を検討すると共にアポトーシス関連蛋白である Bcl-2、Bax、Fas、Fas ligand (FasL) の発現動態、更にアポトーシスシグナル伝達系において下流に位置するチトクローム C と活性型カスパーゼ 3 の発現動態について免疫組織化学的に検討した。また、腸管の細胞死誘導機構に対する人為制御について検討するため、プロテアーゼ阻害剤であるロイペプチン投与によるアポトーシス阻害実験を行った。

対象と方法

Wistar ラット (雄、7 週齢、体重 200-300 g) を用い、上腸間膜動脈根部をクリップして 1 時間虚血した後、0 (虚血のみ) 3、6、12、24 時間の小腸再灌流を行い、空腸組織を用いて検討した。対照群として開腹のみを行った。組織は電子顕微鏡 (EM) 用樹脂標本と 4% パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液にて固定後パラフィン包埋標本を用いた。アポトーシス細胞の同定には EM を用いた形態学的解析並びに terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法を行った。Bcl-2、Bax、Fas 及び FasL 並びにチトクローム C と活性型カスパーゼ 3 の蛋白発現については免疫組織化学的に検討した。また、TUNEL 陽性細胞の同定のために T 細胞のマーカー CD3 とマクロファージのマーカー ED1 を用い二重染色を行った。更にプロテアーゼ阻害実験として、3 時間再灌流群に虚血 1 時間後 10 mg/kg と 50 mg/kg のロ

イペプチンを腹腔内投与した。

結 果

1) 正常及び対照群では TUNEL 陽性細胞は絨毛先端部のみに認められた。虚血再灌流では、絨毛部分の上皮において、再灌流 0、3、6 時間群で増加し、陰窩及び粘膜固有層では再灌流 3、6 時間群で増加を示した。また、絨毛、陰窩の上皮及び粘膜固有層の TUNEL 陽性細胞について EM で観察したところ、ネクローシス細胞は見られなかった。粘膜固有層における TUNEL 陽性細胞と CD3 発現の局在が一致した。2) Bcl-2 の発現は正常、対照及び虚血のみ群では、絨毛部分の上皮と粘膜固有層に認められたが、再灌流 3、6 時間群では顕著に減少した。Bax の発現は、再灌流時間の違いによる変化は認められなかった。3) Fas は正常と対照群では認められなかったが、再灌流 3、6 時間群では粘膜固有層において Fas 及び FasL 発現の増強が見られた。4) チトクローム C は正常と対照群では絨毛上皮のみに認められたが、再灌流 3、6 時間群で発現は減少した。一方粘膜固有層では発現しなかった。5) 活性型カスパーゼ 3 発現は正常と対照群では絨毛上皮及び粘膜固有層に見られ、粘膜固有層において再灌流 3、6 時間で増大した。また、粘膜固有層では TUNEL 陽性細胞と活性型カスパーゼ 3 発現の局在が一致した。6) 阻害実験ではロイペプチン投与による粘膜固有層の TUNEL 陽性細胞は投与量依存的に抑制された。

考 察

一般的に Bcl-2 はアポトーシスに抑制的に作用し、Bax は促進的に作用する。絨毛上皮では、虚血再灌流後に一過的に Bcl-2 の発現が減少したが、Bax 発現は変化しなかったことより同部位では Bcl-2 と Bax の発現比がアポトーシス誘導に關与すると考えられた。一方で粘膜固有層では虚血再灌流後に Fas と FasL の発現が増加すると共に活性型カスパーゼ 3 も増加した。Fas 系のシグナル伝達経路として、カスパーゼ 8 が直接、カスパーゼ 3 を活性化する Type I 細胞死と、カスパーゼ 8 がミトコンドリアからのチトクローム C の放出と Apaf-1 の活性化を介してカスパーゼ 3 を活性化する Type II 細胞死の二つの経路があるが、同部位ではチトクローム C や Bcl-2、Bax には変化がなく、Type I 細胞死機構によりアポトーシスが誘導されると考えられた。

また、ロイペプチン投与により、粘膜固有層ではアポトーシスが抑制されたが、絨毛上皮では活性型カスパーゼ 3 の発現増加もなくロイペプチン投与によってもアポトーシスを抑制されなかったことより、絨毛上皮における細胞死機構においてはカスパーゼの活性化を介しないアポトーシス経路の可能性が示唆された。

以上の結果より、小腸虚血再灌流モデルでの腸管細胞障害ではアポトーシスが誘導され、その機構として、絨毛上皮においては Bcl-2/Bax 系が、粘膜固有層においては Fas/FasL 系がそれぞれ關与し、腸管の細胞の種類によりアポトーシス誘導機構に違いがあることが判明した。更に、腸管細胞死機構への人為制御の可能性も示唆された。