

(別紙様式第3号)

## 論 文 要 旨

論 文 題 目 Expression of anti-apoptotic protein, Bcl-2, in liver regeneration  
after a partial hepatectomy  
(部分肝切除後の肝再生における Bcl-2 発現の及ぼす影響)

氏名 澤村安勝 

【目的】	部分肝切除後肝再生モデルにおける
肝再生	停止の機序は未だ明らかでないが、ア
ポトーシス	が関連しているとする報告もある。
我々は	本研究において、アポトーシス抑制や
細胞増殖	に關与する蛋白である Bcl-2 の肝再生
における	役割を、ラット部分肝切除モデルで
検討した。	
【方法】	雄性 Wistar ラット (200-350 g) を 3 群に分け
以下の	遺伝子導入を行った。Group 1, 2 において
は、肝切除	3 日前に、アデノウイルスベクター
ーを使用	する遺伝子導入法を用い、human Bcl-2 お
よび marker	LacZ 遺伝子を経静脈投与によりラット
肝臓に	発現させた (Group 1: AxCAbcl-2、Group 2:
AxCALacZ	、各 $1 \times 10^9$ pfu/ml)。Group 3 は非導入コントロ
ールとして	生食を 1ml 投与した。部分肝切除後
肝再生	モデルである 70% 肝切除は、Higgins と Anderson
の報告に	基づいて中葉と左葉の根部で結紮・
切除する	方法で行った。70% 肝切除後 12, 24, 48, 72 時
間と、7, 14, 21	日の時点で各群 (各 n=4) を犠牲
死させた。	肝増加率を肝再生率および、肝細

胞の分裂能を PCNA Labeling Index (PCNA LI) にて検討した。  
 2000個の肝細胞のうちの陽性細胞の数を算出し  
 PCNA LI とした。遺伝子導入効率は X-gal 染色に  
 て、human Bcl-2 の発現は免疫染色で検討した。さ  
 らに、外来性 human bcl-2 mRNA、代表的増殖因子と  
 して内因性 bcl-2 family の発現にも関与する HGF の  
 発現を、RT-PCR (human Bcl-2, rat HGF) にて定量的に検討し  
 た。肝再生後期に発現が認められるアポトー  
 シス細胞の定量を ssDNA の免疫染色によって検  
 討した。統計学的分析は分散分析の one-factor analysis  
 of variance and Fisher's protected least significant difference にて評価した。

**【結果】** X-gal 染色では 12 時間後に 40 % の肝細  
 胞で陽性となり、その後 14 日後まで発現が認  
 められた。human Bcl-2 の発現も 12 時間後にピーク  
 の 45 % に達し、肝切 14 日後まで発現が認めら  
 れた。肝再生率は肝切 24 時間後で、Group 1 (26.1 ±  
 7.2 % ) が、Group 2 (14.7 ± 6.8 % ) および、Group 3 (13.6 ±  
 5.0 % ) に比し有意に高値であったが ( $P < 0.05$ )、  
 肝再生後期には有意差を認めなかった。PCNA  
 LI では、肝切後 24 時間で Group 1 (47.2 ± 9.9 % ) が

Group 2 (  $19.0 \pm 7.8\%$  ) および Group 3 (  $19.2 \pm 15.2\%$  ) に比  
し、有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。

導入された外来性 Bcl-2 mRNA は、肝切除後 72 時間  
まで確認された。一方、HGF mRNA に関しては、  
Bcl-2 遺伝子導入をした Group 1 で肝切除後 12 時間  
において、その発現レベルが有意に減少して  
いた。アポトーシス細胞の定量では肝切除後  
14 日目で、Group 1 ( $5.67 \pm 1.53$  positive cells/10 fields per tissue) が Group 2  
(  $18.33 \pm 7.57$  positive cells/10 fields per tissue) に比して、有意な  
減少を示した。

【結語】外来性 Bcl-2 の遺伝子導入は部分肝切  
除後の肝再生後期において、アポトーシスを  
抑制したが、肝再生停止機序は抑制できな  
かった。しかし肝再生早期において HGF の発現  
を抑制しながらも、肝細胞増殖を促進するこ  
とが示された。これらの結果は、Bcl-2 遺伝子  
が肝再生において重要な役割を果たしている  
ことが明らかとなり、劇症肝不全や肝移植後  
の肝再生が急務とされる病態への臨床応用が  
期待される。

(別紙様式第7号)

## 論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 第 号 論文博	氏名	澤 峯 安 勝
論文審査委員	審査日	平成18年 / 月24日	
	主査教授	渡部久実 (印)	
	副査教授	吉井 興 志 孝 (印)	
	副査教授	高須 信 行 (印)	
(論文題目)			
Expression of anti-apoptotic protein, Bcl-2, in liver regeneration after a partial hepatectomy (部分肝切除後の肝再生における Bcl-2 発現のおよぼす影響)			
(論文審査結果の要旨)			
上記の論文に関して、研究の背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準につき慎重かつ公正に検討し、以下の審査結果を得た。			
1. 研究の背景と目的 部分肝切除後の肝再生モデルにおける肝再生停止の機序については未だ不明な点が多いが、アポトーシスが関連しているとの報告もある。本研究では、アポトーシス抑制や細胞増殖の regulator として機能する Bcl-2 をアデノウィルスベクターによる遺伝子導入手技を用いて肝臓へ過発現させ、ラット部分肝切除後の肝再生において、Bcl-2 が肝細胞増殖、肝再生停止機構及び重要な成長因子として知られる Hepatocyte growth factor (HGF) の発現へどのような影響をおよぼすかを検討した。			
2. 研究内容 【方法】雄性 Wistar ラットを3群に分け以下の遺伝子導入を行った。Group 1, 2 で、肝切除3日前に、アデノウィルスベクターを使用して、human Bcl-2 および marker LacZ 遺伝子を経陰茎静脈投与でラット肝臓に発現させた (Group 1: AxCBcl-2, Group 2: AxCALacZ)。Group 3 は非導入コントロールとして生食を投与した。部分肝切除後肝再生モデルとして 70%肝切除を行った。70%肝切除後経時的に犠牲死させた。肝重量増加を肝再生率で検討し、肝細胞の分裂能を PCNA Labeling Index (PCNA L. I) にて検討した。肝再生後期に発現が認められるアポトーシス細胞の定量を ssDNA の免疫染色によって検討した。統計学的分析は分散分析にて評価した。			

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
  - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。

【結果】肝再生率は肝切 24 時間後で、Group 1 ( $26.1 \pm 7.2\%$ ) が、Group 2 ( $14.7 \pm 6.8\%$ )、Group 3 ( $13.6 \pm 5.0\%$ ) に比し有意に高値であったが ( $P < 0.05$ )、肝再生晩期には有意差を認めなかった。PCNA L.I では、肝切後 24 時間で Group 1 ( $47.2 \pm 9.9\%$ ) が Group 2 ( $19.0 \pm 7.8\%$ ) および Group 3 ( $19.2 \pm 15.2\%$ ) に比し、有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。HGF mRNA は Group 1 で肝切除後 12 時間において、Bcl-2 遺伝子導入により HGF 発現レベルが有意に減少し、ていた。ssDNA では肝切除後 14 日目で、Group 1 ( $5.67 \pm 1.53$  positive cells/10 fields per tissue) が Group 2 ( $18.33 \pm 7.57$ ) に比して、アポトーシス細胞数の有意な減少を示した。

以上の結果より部分肝切除後の肝再生モデルにおける Bcl-2 の遺伝子導入は、肝細胞増殖因子 HGF の早期での発現は抑制するものの、肝細胞増殖を促進させことにより肝再生において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

### 3. 研究成果の意義の学術的水準

アポトーシス抑制遺伝子 Bcl-2 をアデノウィルスベクターによって、肝臓へ特異的に過発現させ、肝増殖能、肝再生停止機構を 3 週間の長期にわたり、分析した研究は他に類がなく、また、肝再生後期のアポトーシスを抑制し、より再生を促進しようとした試みは独創性に富むものである。

本研究は肝再生の増殖能・停止機構の解明に一端を開き、国際的にも高く評価されるものであると判断した。

以上より、本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。