

論 文 要 旨

論 文 題 目

Adenovirus mediated gene transfer of antiapoptotic protein in hepatic ischemia reperfusion injury: The paradoxical effect of the Bcl-2 expression in the reperfused liver.

(肝虚血再灌流障害に対するアデノウイルスベクターを用いたアポトーシス抑制蛋白の遺伝子導入：再灌流肝におけるBcl-2発現の逆説的效果)

氏 名

大城 崇司






【目的】肝虚血再灌流障害においては、ミトコンドリアの膜機能低下、各種メディエーターの放出と活性化により、肝細胞や類洞内皮細胞にアポトーシスが誘導され、肝障害を引き起こすことが示唆されている。これに対し、Bilbao等はアポトーシス抑制タンパクとして知られるBcl-2を、アデノウイルスベクター(AdV)を用いてマウス肝臓へ遺伝子導入し、肝虚血再灌流障害を著明に抑制しえたと報告した。しかし、Bcl-2はその発現レベルによってはアポトーシスを促進するとの報告もあり、本研究ではAdVを用いてラット肝臓にBcl-2を遺伝子導入し、肝虚血再灌流障害に対する効果を検討した。【実験 In vitro】マーカー-LacZまたはhBcl-2(ヒトBcl-2)を組み込んだAdV(Group1:AxCAilacZ、Group1:AxCAhbc12)を 10^3 m.o.i.の濃度でラット肝癌細胞(FaO細胞)へ感染(遺伝子導入)させ、24時間後にTGF- β 1(5ng/ml)によりアポトーシスを誘導し、TUNEL染色

にてアポトーシス陽性細胞数を計測した。

【実験 In vivo】脾臓皮下固着を施し、門脈体循環シャントを形成した雄性 Wistar rat に、AxCAilacZ (Group 1, n=12)、AxCAhbc12 (Group 2, n=12)、もしくは生理食塩水 (Group 3, n=8) を陰茎静脈より投与 (6×10^9 pfu/ml) し、肝臓への遺伝子導入を行った。遺伝子導入 2 日後に開腹し、肝動脈と門脈を 30 分間遮断後解放し、肝虚血再灌流モデルとした。再灌流後、経時的に (6 時間、1・3 日、2 週間) 血液と肝組織を採取し、血液生化学 (AST、ALT、ヒアルロン酸)、X-gal 染色、RT-PCR・免疫染色 (hBcl-2, Bax)、TUNEL 染色について検討した。【結果】TUNEL 陽性細胞数は、Group II (14.2 ± 1.2 %) が Group I (21.9 ± 1.4 %) に比べ有意に低く、導入 hBcl-2 のアポトーシス抑制作用を確認し得た。肝臓でのマーカー遺伝子発現は、再灌流 6 時間~3 日後において 80% 以上の肝細胞で認められた。

RT-PCR、免疫染色においては、Group 2 のみで hBcl-2 の mRNA 及び蛋白発現を認めた。血清中 AST、ALT、ヒアルロン酸値は、再灌流後 3 日目まで Group 1、3 に比べ Group 2 で高値をとり、再灌流後 1 日目の AST は Group 2 (356 ± 100.1 IU/L) が Group 1 (102.7 ± 15 IU/L) に比し有意に高値をとった。再灌流 1 日後の TUNEL 陽性細胞数 (倍率 100 倍 5 視野での平均 TUNEL 陽性細胞数) も、Group 1 (8.4 ± 0.6)、3 (8.0 ± 0.3) に比し Group 2 (11.4 ± 0.9) で有意に高値をとった。【まとめ】本研究では遺伝子導入された hBcl-2 が、これまでの報告とは逆に、虚血再灌流後の肝臓のアポトーシス及び障害を助長した。AdV に組み込んだ hBcl-2 の構造、プロモーターの違いによりその発現レベルが上昇しことが原因と考えられた。Bcl-2 を用いた遺伝子治療においては、そのアポトーシスに対する作用が諸刃の剣となりうる危険性を認識することが必要である。

報告番号	*課程博 論文博	第 号	氏名	大城 崇司
論文審査委員		平成 13 年 12 月 25 日		
		主査教授	田中 龍夫	 印
		副査教授	福永 利彦	 印
		副査教授	古謝 景春	 印
(論文題目) Adenovirus mediated gene transfer of antiapoptotic protein in hepatic ischemia reperfusion injury: The paradoxical effect of the Bcl-2 expression in the reperfused liver.				
(論文審査結果の要旨)				
<p>上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準などにつき慎重かつ公正に検討し、以下の審査結果を得た。</p>				
<p>1. 研究の背景と目的</p> <p>肝臓外科領域では肝虚血再灌流障害は、肝切除術や肝外傷での出血の制御、また肝移植において直面する不可避の事象で、さまざまな機序により最終的に組織障害、凝固異常、微小循環障害を呈する。近年、その機序の一つとして、肝細胞や類洞内皮細胞にアポトーシスが誘導され、肝障害を引き起こすことが示唆されている。これに対し、アポトーシス抑制蛋白として知られるヒト Bcl-2 (hBcl-2)の遺伝子を、アデノウイルスベクター(AdV)を用いてマウス肝臓へ導入し、肝虚血再灌流障害を著明に抑制したとの報告があるが、一方ではhBcl-2はその発現レベルによってはアポトーシスを促進するとの報告もある。本研究ではAdVを用いてラット肝臓にhBcl-2遺伝子を導入し、肝虚血再灌流障害に対する効果を検討した。</p>				

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

2. 研究内容

ラット肝癌細胞 (FaO細胞) をhBcl-2を組み込んだAdV (10^3 m.o.i.の濃度) で処理して遺伝子導入を行った。24時間後にTGF- β 1(5ng/ml)によりアポトーシスを誘導し、TUNEL染色にてアポトーシス陽性細胞数を計測することにより、導入hBcl-2のアポトーシス抑制作用を確認した。脾臓皮下固着を施し、門脈体循環シャントを形成した雄性Wistar ratに陰茎静脈より同じコンストラクトを1匹あたり 6×10^9 pfu投与し、遺伝子導入を行った。遺伝子導入2日後に開腹し、肝動脈と門脈を30分間遮断後解放し、肝虚血再灌流モデルとした。再灌流後、経時的に(6時間、1、3日、2週間)血液と肝組織を採取し、血液生化学 (AST、ALT、ヒアルロン酸)、X-gal染色、RT-PCR、免疫染色 (hBcl-2, Bax)、TUNEL染色によって検討した。再灌流後3日目までの血清中AST、ALT、ヒアルロン酸値、再灌流後1日後のTUNEL陽性細胞数ともにhBcl-2を導入したグループで高値をとった。このようにBcl-2の強制発現が必ずしもアポトーシスを抑制せず、発現量、細胞種などによって、むしろアポトーシス及び肝障害を促進することが示された。

3. 研究成果の意義と学術的水準

アポトーシス抑制に働くと考えられているBcl-2タンパク質の、肝虚血再灌流障害予防への応用を目標として、その効果をラットで検討したモデル実験である。Bcl-2遺伝子導入、強制発現がアポトーシスの抑制には働かずむしろ促進的に働く場合があることを明らかにし、この様な遺伝子治療がなお慎重な検討を必要とするものであることを報告した意義は大きく、その水準は高い。

以上により、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。