

氏名	たかぶちさとし 高 淵 聡 史
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2848 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Effects of the intravenous anesthetic propofol and the vasodilator nitrates on hypoxia-inducible factor 1 activity (静脈麻酔薬プロポフォールと血管拡張薬亜硝酸薬が HIF-1 の活性に及ぼす影響)
論文調査委員	(主 査) 教 授 乾 賢 一 教 授 淀 井 淳 司 教 授 平 岡 眞 寛

### 論 文 内 容 の 要 旨

生体には低酸素応答機構が存在し、頸動脈小体の興奮、肺血管の低酸素性収縮など、イオンチャネルの活性変化を介する反応と、転写因子を介する遺伝子応答を本体とする反応とがある。後者において中心的な役割を担う分子が低酸素誘導性転写因子 1 (Hypoxia-Inducible Factor 1, HIF-1) である。HIF-1 は  $\alpha$  サブユニット (HIF-1 $\alpha$ ) と  $\beta$  サブユニット (HIF-1 $\beta$ ) からなる 2 量体である。制御サブユニットである HIF-1 $\alpha$  は、酸素存在下ではプロリン水酸化酵素による水酸化修飾と、von Hippel-Lindau 蛋白 (pVHL) との結合を経て、ユビキチン-プロテアソームシステムで分解されるが、低酸素下においてはプロリン水酸化酵素の活性が低下することで、細胞内発現量が増大する。HIF-1 $\alpha$  の発現量は HIF-1 を介する低酸素誘導性遺伝子応答に密接に関連している。HIF-1 はブドウ糖代謝、細胞増殖、血管新生など多岐にわたる生理的現象に関わる遺伝子の発現を誘導し、生体を構成する個々の細胞において各々の環境下で活性が調節され、細胞の機能維持に寄与している。HIF-1 の活性に影響を及ぼす物質として、吸入麻酔薬ハロタンや一酸化窒素 (NO) などが報告されている。今回申請者は、周術期使用薬剤が低酸素応答に及ぼす影響を解明することを目的として、静脈麻酔薬プロポフォールと、亜硝酸薬ニトログリセリン、硝酸イソソルビド、ニトロプルシドナトリウムが HIF-1 活性に及ぼす効果について検討した。

ヒト胎児腎臓細胞 HEK293, ヒト肝癌細胞 Hep3B, ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVECs を用いて、種々の条件下における HIF-1 の活性を分子生物学的手法で解析した。すなわち、HIF-1 の制御サブユニットである HIF-1 $\alpha$  の細胞内蛋白発現量をウエスタンブロット法で、HIF-1 の下流遺伝子の発現量を RT-PCR とレポーターアッセイで検討した。さらに、HIF-1 の合成や分解に及ぼす影響、作用点についても検討した。

プロポフォールは 20%, 5% 酸素下における HIF-1 $\alpha$  の発現量を低下させ、HIF-1 依存性遺伝子発現を阻害したが、HIF-1 $\alpha$  の mRNA の発現量には影響を与えなかった。さらに、プロテアソーム阻害薬 MG132 の共存下で HIF-1 $\alpha$  の細胞内発現を亢進しなかった。対照的に、1% 酸素下ではプロポフォールは HIF-1 の活性化を阻害しなかった。すなわち、プロポフォールは酸素濃度依存的に HIF-1 $\alpha$  の翻訳を抑制することで HIF-1 の活性を阻害することが明らかになった。

一方、ニトロプルシドナトリウムは 20%, 1% 酸素下のいずれにおいても HIF-1 $\alpha$  の発現量を低下させ、HIF-1 依存性遺伝子の低酸素誘導を阻害した。また、HIF-1 $\alpha$  と pVHL との結合を促進し、プロリン水酸化酵素による修飾を受けない HIF-1 $\alpha$  変異体に対しては、その発現量を抑制しなかった。すなわち、ニトロプルシドナトリウムは酸素濃度非依存的にプロリン水酸化酵素の活性を増強する結果、HIF-1 $\alpha$  のプロテアソーム依存的な分解が亢進し、HIF-1 の活性を阻害することが示唆された。ニトログリセリン、硝酸イソソルビドは HIF-1 の活性に影響を及ぼさなかった。これらの亜硝酸薬は NO を介して作用を発揮すると考えられているが、HIF-1 $\alpha$  の発現パターンは、NO 消去剤や可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 阻害剤の共存下で変化しないことから、ニトロプルシドナトリウムの作用は NO-sGC 経路を介するものではないことが示唆された。

以上の結果は、静脈麻酔薬プロポフォールと血管拡張薬ニトロプルシドナトリウムは、HIF-1 を介する低酸素応答を阻

害し、その機序は異なるものであることを示している。HIF-1は広範な生理的現象に関与する転写因子であり、周術期使用薬剤がHIF-1を介する低酸素応答に及ぼす影響に関する知見は周術期管理の観点から重要と考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

周術期に使用される薬物が遺伝子発現を伴う低酸素応答に及ぼす影響については、未解明の部分が多い。本研究では、ブドウ糖代謝、細胞増殖、血管新生など多岐にわたる低酸素性遺伝子発現において中心的な役割を果たす転写因子 Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) の活性に及ぼす周術期使用薬物の影響について、ヒト由来培養細胞を用いて分子生物学的手法により解析した。その結果、静脈麻酔薬プロポフォールは酸素濃度依存的に HIF-1 の制御サブユニットである HIF-1 $\alpha$  の翻訳過程を抑制することにより HIF-1 活性を阻害し、HIF-1 に依存する遺伝子発現を抑制することが示された。一方、血管拡張薬として用いられる亜硝酸薬の中では、ニトロプルシドナトリウムはプロリン水酸化酵素活性を増強し、酸素濃度非依存的に HIF-1 $\alpha$  分解を亢進させ、HIF-1 活性を阻害することが示唆された。ニトログリセリン、硝酸イソソルビドは HIF-1 活性に影響を及ぼさなかった。すなわち、周術期使用薬物は HIF-1 を介する遺伝子発現を伴う低酸素応答を異なる機序により阻害することが明らかになった。

以上の研究は、周術期使用薬物が遺伝子発現を伴う低酸素応答に及ぼす影響の解明に貢献し、麻酔科学ならびに集中治療医学の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年2月17日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。