

氏名	はら だ のぶ こ 原 田 信 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2772 号
学位授与の日付	平成 16 年 5 月 24 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	Inactivation of the small GTPase Rac1 protects the liver from ischemia/reperfusion injury in the rat に関する研究 (small GTPase Rac1 活性抑制による、肝虚血再灌流障害の抑制)
論文調査委員	(主 査) 教授 千葉 勉 教授 今村 正之 教授 田中 紘一

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】各臓器の虚血再灌流障害において、reactive oxygen species (ROS) が障害発生に大きく関与していることが知られているが、近年 Rho GTPase super family の一種である Rac1 が、*in vitro* の系で ROS 産生及び転写因子 NF- κ B の活性を制御していることが報告されている。Rac1 は、細胞骨格・細胞運動の制御に直接関与する因子として知られているが、細胞周期の進行、JUN/SAPK キナーゼを活性化させるシグナルの伝達、細胞接着にも関与している。しかし、Rac1 が *in vivo* の系における虚血再灌流後に、ROS 産生・NF- κ B 活性に関していかなる役割を有しているかは、まだ解明されていない。我々は再灌流後の ROS の発生を抑制することを目的に、Rac1 の dominant negative form (変異体遺伝子) を、adenovirus vector を用いてラットの肝臓に強制発現させ、虚血再灌流後の ROS 産生・肝障害の程度を比較した。

【方法】ヒト N17rac1 の cDNA を、自己増殖能欠損 adenovirus (Ad5) に組み込み、Ad5N17rac1 を作成した。2.5×10⁹ pfu の Ad5N17rac1、Ad5LacZ (control virus) を、それぞれ雄性 SD ラット (250g) の尾静脈から投与した。感染72時間後、ウェスタンブロット法にて、肝における Ad5N17rac1 の蛋白発現を確認し、以下の実験を行った。肝虚血再灌流は、プリンゲル法による20分間の血流遮断の後、クランプ解除により再灌流を行った。再灌流後の血清 AST・ALT を計測し、摘出した肝臓の病理学的変化を検討した。肝臓内での ROS の産生量を検討するため、ROS による変性蛋白質量を Oxyblot kit (INTERGEN) にて測定した。また肝組織から核蛋白を抽出し、NF- κ B の核内での蛋白発現をウェスタンブロット法・免疫染色法にて、核内での活性をゲルシフト法にて検討した。さらに、NF- κ B の標的遺伝子である inducible nitric oxide synthetase (i-NOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α) の発現を RT-PCR 法にて検討した。

【結果】血清 AST・ALT 値は、再灌流30分・2時間・6時間後に、Ad5N17rac1 群で有意に低値であり、HE 染色では、Ad5LacZ 群で認められた中心静脈周囲優位の肝細胞壊死が Ad5N17rac1 群ではほぼ完全に抑制されていた。Oxyblot kit による変性蛋白量は、Ad5N17rac1 群において有意に抑制されていた。さらに、Ad5LacZ 群では、NF- κ B の核内での蛋白発現及び活性化、i-NOS・TNF- α の発現を認めたが、Ad5N17rac1 群ではそれらはいずれも抑制された。NF- κ B(p65) の免疫染色法では、Ad5N17rac1 群において、多くの non-parenchymal cells (NPCs) 及び肝細胞において、虚血再灌流後の p65 の核移行が抑制されている像を認めた。

【結語】Rac1 は *in vivo* の系での虚血再灌流後の ROS 産生・NF- κ B 活性化に必要である。N17Rac1 の保護的効果によって、NPCs における NF- κ B の抑制、NPCs・肝細胞における ROS 産生抑制が惹起されたと説明できる。Rac1 活性抑制は、肝虚血再灌流障害の抑制に関する有用な戦略になりうる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、肝臓外科における肝虚血再灌流障害を抑制するための新たな分子標的を明らかにすることをその目的とした。本申請者は、ラジカル産生や転写因子 NF- κ B の活性化に関与する Rho small GTPase のひとつ Rac1 に着目した。この

Rac1 の dominant negative mutant (N17rac1) をラット肝に遺伝子導入することにより N17Rac1 蛋白を発現させ、ラットの肝虚血再灌流障害を著明に抑制しうることを、肝逸脱酵素値・病理組織像の検討により明らかにした。さらにラット肝組織を用いたウェスタンブロット法により、虚血再灌流後に N17Rac1 が ROS による変性蛋白質量を減少させることを証明した。加えて核蛋白のウェスタンブロット法・ゲルシフト法、免疫染色法、RT-PCR 法を用いて、虚血再灌流後に N17Rac1 が、NF- κ B の核移行・DNA 結合能、標的遺伝子の mRNA の発現を抑制することを証明した。このことは、ROS 産生・NF- κ B 活性抑制が、N17rac1 遺伝子導入による肝虚血再灌流障害抑制のメカニズムのひとつである可能性を示唆している。

以上の研究は、肝虚血再灌流障害の軽減に向けた新たな治療法として有用である可能性を示唆するばかりでなく、虚血再灌流時の肝における Rac1 と ROS 産生・NF- κ B 活性との関係を示した点が有意義であり、新たな治療戦略の開発に寄与するところが多い。

従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成16年3月22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。