

氏名	新田隆士
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2620号
学位授与の日付	平成15年3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	Myoglobin Gene Expression Attenuates Hepatic Ischemia Reperfusion Injury (ミオグロビン遺伝子発現による肝虚血再灌流障害改善効果の研究)
論文調査委員	(主査) 教授 千葉 勉 教授 田中 紘一 教授 山岡 義生

### 論文内容の要旨

【目的】肝臓の低酸素や虚血・再灌流による障害では、肝細胞のミトコンドリア障害によりATPレベルが低下する。ミオグロビンは心筋や骨格筋中で酸素のリザーバーとしてミトコンドリアへの酸素拡散を促進させ、酸化リン酸化能を亢進させる働きがある。そこで、肝臓には存在しないミオグロビン遺伝子を肝細胞に導入し、肝虚血再灌流障害に対する効果を期待し以下の実験を行った。

【方法と結果】ヒトミオグロビン遺伝子を含むアデノウイルスベクター(AdCMVMyo)及びコントロールアデノウイルスベクター(AdCMVLacZ)を、Hep3B細胞(MOI20-100)及びC57BL/6マウス( $1 \times 10^9$  pfu), SDラット( $5 \times 10^9$  pfu)に投与し、以下の実験を行った。

- 1) AdCMVMyo感染後のミオグロビン発現を明らかにするために、Hep3BにMOI50にてAdCMVMyoを感染させ、ミオグロビンmRNA及び蛋白の発現をそれぞれRT-PCR及び免疫染色で確認した。SDラットにおいてもWestern blot及び免疫組織染色にてmyoglobinの蛋白発現を確認した。
- 2) ミオグロビン発現のミトコンドリア機能に対する効果を明らかにするために細胞内ATP量をHPLCにて検討した。AdCMVMyo感染72時間後のHep3B( $26.1 \pm 1.1$  nmol/ $10^6$  cells)およびC57BL/6マウス肝組織( $4.19 \pm 0.2$   $\mu$ mol/g wet liver)では未感染群( $22.9 \pm 1.9$  nmol/ $10^6$  cells,  $3.11 \pm 0.20$   $\mu$ mol/g wet liver)に比し、有意にATPが高値となった。
- 3) 発現ミオグロビンの酸素結合能を明らかにするために分光光度計を用いて差スペクトラムを比較した。AdCMVMyo感染Hep3Bを酸素化、脱酸素化し得られた差スペクトラムは、精製ミオグロビン及びマウス筋肉より得られた差スペクトラムに近似した2峰性のスペクトルであったことより導入ミオグロビン蛋白はヘム蛋白として機能していると考えられた。
- 4) 肝虚血再灌流障害に対するミオグロビン発現の効果をSDラットの20分の全肝虚血モデルにて検討した。AdCMVMyo群では無処置群及びLacZ遺伝子導入群に比し、再灌流後180分の血清、AST、ALT、LDHの有意な改善効果が認められた。HE染色による組織学的検討では、無処置群及びLacZ遺伝子導入群における肝組織内の中心静脈周囲のうっ血・壊死が、ミオグロビン遺伝子導入群では認められなかった。更にミオグロビン発現の肝虚血再灌流障害抑制メカニズムを明らかにするためにラジカルによる蛋白変性の指標としてカルボニル化蛋白をoxyblotにて検出した。無処置群に比べミオグロビン遺伝子導入群で蛋白変性の減少を認めたことより、酸化ストレスの軽減が肝虚血再灌流障害抑制メカニズムのひとつと考えられた。

【結論】アデノウイルスベクターによるミオグロビンの遺伝子導入は、酸素結合能及びATP量の亢進を介して、ラット肝虚血再灌流障害を抑制した。酸素及びATPリザーバーの肝臓への導入は、肝臓外科における肝障害抑制の新たな手段となる可能性が示された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、ミオグロビン遺伝子を、本来その発現のみられない肝臓に導入し、酸素・ATPのリザーバーとして肝虚血再灌流障害改善に寄与するかを、発現したミオグロビンの酸素結合能および細胞内ATP産生亢進効果、血清学的、組織学的改善効果から検討されたものである。

本研究では、ヒトミオグロビン遺伝子を含むアデノウイルスベクター（Adeno-Myo）を遺伝子導入発現ベクターとして用いた。コントロールには、ウイルス非投与群、及び $\beta$ -galactosidase発現アデノウイルスベクター（Adeno-LacZ）を用いた。

① Hep3B細胞にAdeno-Myo感染を起こさせると、ミオグロビンの発現及び酸素結合能、ATP産生亢進効果を示した。

② マウスの尾静脈よりAdeno-Myoを投与すると、肝細胞にATP産生亢進を認めた。さらに、ラットの20分全肝虚血モデルでは、Adeno-Myo投与群における再灌流後180分の血漿逸脱酵素に有意な改善効果を認め、組織学的には、コントロール群において、中心静脈周囲のうっ血・壊死が著明であったが、Adeno-Myo投与群では認められなかった。酸素・ATPリザーバーの肝臓への導入は、肝臓外科における肝障害抑制の新たな手段となる可能性が示された。

以上の研究は肝臓における肝虚血再灌流障害の機序の解明に貢献し、肝臓外科手術領域の臨床応用に寄与するところが大きい。

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15年2月27日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格したものと認められたものである。