

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	甲斐 慎一
論文題目	Hydrogen Sulfide inhibits hypoxia- but not anoxia-induced hypoxia-inducible factor 1 activation in a von Hippel-Lindau- and mitochondria-dependent manner （硫化水素はvon Hippel-Lindau 蛋白とミトコンドリアを介して低酸素における低酸素誘導性因子1活性化を抑制するが、無酸素における活性化は抑制しない）		
（論文内容の要旨）			
近年、硫化水素が生体内で産生されていることが明らかになり、一酸化窒素と一酸化炭素に続く第3のガス状シグナル伝達物質として広く認識され、その生理活性や作用機序が解明されつつある。一方、低酸素誘導性因子 Hypoxia-inducible factor 1（HIF-1）は、各種解糖系酵素、グルコース輸送蛋白、血管内皮増殖因子、造血因子など多様な遺伝子の発現を転写レベルで制御し細胞の低酸素応答において中心的な役割を果たしている。一酸化窒素や一酸化炭素が HIF-1 の活性に及ぼす影響についての報告は散見されるが、硫化水素が HIF-1 活性化に及ぼす影響についての報告は少ない。今回、硫化水素が HIF-1 活性化に及ぼす影響について検討した。 まず培養細胞株において、硫化水素ドナー投与が低酸素（1%酸素）下における HIF-1 活性に及ぼす影響について検討した。HIF-1 活性評価のために、HIF-1 の転写活性を反映するαサブユニット（HIF-1α）発現量をウェスタンブロット法により評価し、HIF-1 標的遺伝子発現を半定量的リアルタイム PCR 法により検討した。ヒト肝癌細胞株 Hep3B 細胞において、硫化水素ドナーである硫化水素ナトリウム（NaHS）は低酸素暴露（4 時間）による HIF-1 活性化を濃度依存性に抑制し、他の硫化水素ドナーである硫化ナトリウムを用いた実験でも同様の結果が得られた。また、ヒト神経芽細胞腫株 SH-SY5Y 細胞、ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞においても、NaHS は低酸素による HIF-1 活性化を抑制した。無酸素（0.1% 酸素）下でも、これらの細胞株における HIF-1 活性化が認められたが、NaHS は HIF-1 活性化を抑制しなかった。プロテアソーム阻害薬、蛋白合成阻害薬を用いた実験により、NaHS は HIF-1α 蛋白の分解を促進することにより低酸素誘導性 HIF-1 活性化を抑制することが示唆された。さらに、HIF-1α 蛋白分解に関与する von Hippel-Lindau（VHL）蛋白を欠失する細胞（RCC4 細胞）およびミトコンドリア DNA 欠失細胞（EB8 細胞）において NaHS は低酸素誘導性 HIF-1 活性化に影響を与えなかったことから、NaHS の作用には VHL 蛋白とミトコンドリアが重要な役割を果たしていると考えられた。 次に、6 週齢の BALB/CA マウスを低酸素（10%酸素）に 4 時間暴露し、NaHS 腹腔内投与群と対照群で HIF-1 標的遺伝子の発現誘導を比較した。NaHS 投与群では脳と腎臓における低酸素による HIF-1 標的遺伝子の発現誘導が抑制された。 以上の結果は、硫化水素は哺乳類細胞において低酸素誘導性 HIF-1 活性化を抑制すること、その作用には VHL 蛋白およびミトコンドリアが関与していることを示しており、硫化水素は生体内における細胞内酸素ホメオスタシスの制御に重要な役割を果たしていると考えられる。			

(論文審査の結果の要旨) 低酸素誘導性因子 Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) は、細胞の低酸素応答において中心的な役割を果たしている。本研究は、硫化水素が HIF-1 活性化に及ぼす影響について検討したものである。培養細胞株を用いた実験では、硫化水素ドナーである硫化水素ナトリウム (NaHS) 投与が低酸素下における HIF-1 活性化を抑制することが示された。無酸素下でも HIF-1 活性化が認められたが、NaHS は HIF-1 活性化を抑制しなかった。プロテアソーム阻害薬、蛋白合成阻害薬を用いた実験により、NaHS は HIF-1 α 蛋白の安定化を抑制する結果低酸素誘導性 HIF-1 活性化を抑制することが示唆された。さらに HIF-1 α 蛋白分解に関与する von Hippel-Lindau (VHL) 蛋白を欠失する細胞 (RCC4 細胞) およびミトコンドリア DNA 欠失細胞 (EB8 細胞) を用いた実験から NaHS の作用には VHL 蛋白とミトコンドリアが重要な役割を果たしていると考えられた。マウスを用いた実験では、NaHS 投与により脳と腎臓において低酸素誘導性 HIF-1 標的遺伝子発現が抑制された。本研究の結果は、硫化水素が VHL 蛋白およびミトコンドリアを介して低酸素誘導性 HIF-1 活性化を抑制することを示し、硫化水素が細胞内酸素ホメオスタシスの制御に重要な役割を果たすことを示唆する。
以上の研究は硫化水素が低酸素誘導性因子1の活性化に与える影響の解明に貢献し、麻酔科学及び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24年12月11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。
要旨公開可能日： 年 月 日以降