

|           |                                                                                                                                                                                                        |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | うち 打 波 ひろし 宇                                                                                                                                                                                           |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                              |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 2503 号                                                                                                                                                                                           |
| 学位授与の日付   | 平 成 14 年 3 月 25 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    | Effect of Heat Shock Preconditioning on NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B pathway during Ischemia-Reperfusion Injury of the Rat Liver<br>(熱ショック前処置がラット肝虚血再灌流時の NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B 経路に与える影響に関する研究) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 千 葉 勉 教 授 田 中 紘 一 教 授 山 岡 義 生                                                                                                                                                             |

### 論 文 内 容 の 要 旨

高度進行肝癌や高度肝機能障害を有する患者に対して行う拡大肝切除や硬変肝切除において虚血再灌流障害は残肝機能を悪化させ、患者の予後を左右する。従来よりストレス応答に関する研究によって、熱ショック前処置の肝虚血再灌流障害に対する軽減効果が報告されてきたが、その機序は未だ不明である。近年、肝虚血再灌流時に転写因子 NF- $\kappa$ B が活性化し、炎症反応の関連遺伝子を誘導することが報告されている。そこで本研究は肝虚血再灌流時における NF- $\kappa$ B が活性化に至る細胞内シグナルと NF- $\kappa$ B 転写産物に対して、熱ショック前処置が及ぼす影響を探究する事により保護機構を解明する事を目的とした。

Wistar 系雄性ラットを 2 群に分け、熱ショック群 (HS 群) には 42°C、コントロール群 (C 群) には 37°C の温水浴を 15 分間施行した。48 時間後、各群に対してプリングル氏法による 30 分の全肝虚血と再灌流を行い、肝組織を採取した。NF- $\kappa$ B の活性化を Gel shift assay にて、NF- $\kappa$ B 抑制蛋白である I- $\kappa$ B の動態を Western blot にて、inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)mRNA の発現を RT-PCR にて比較検討した。I- $\kappa$ B のリン酸化・分解に関与する I- $\kappa$ B kinase (IKK) の活性化は in vitro kinase assay で検討した。

NF- $\kappa$ B 活性化が C 群では再灌流後 60 分から認められたが、HS 群でこの活性化は抑制された。NF- $\kappa$ B の活性化に伴ない C 群では再灌流 120 分後に炎症性メディエーターの mRNA 発現が誘導されたのに対し、HS 群ではこれらの mRNA 発現も有意に抑制された。I- $\kappa$ B は虚血前から I- $\kappa$ B $\alpha$ ,  $\beta$  ともに C 群における発現 (I- $\kappa$ B $\alpha$ : 119.4 $\pm$ 10.2 A. U., I- $\kappa$ B $\beta$ : 152.3 $\pm$ 28.2 A. U.) に比べ、HS 群の発現 (I- $\kappa$ B $\alpha$ : 170.1 $\pm$ 25.3 A. U., I- $\kappa$ B $\beta$ : 237.6 $\pm$ 51.8 A. U.) は有意に増加していた。また、C 群では I- $\kappa$ B は再灌流 30 分後に分解された (I- $\kappa$ B $\alpha$ : 65.3 $\pm$ 20.7 A. U., I- $\kappa$ B $\beta$ : 65.8 $\pm$ 12.0 A. U.) が、HS 群でこの分解は有意に抑制されていた (I- $\kappa$ B $\alpha$ : 136.6 $\pm$ 29.4 A. U., I- $\kappa$ B $\beta$ : 159.5 $\pm$ 66.8 A. U.)。I- $\kappa$ B 分解の主な経路である IKK の活性化を比較したところ両群ともに活性化を認めず、このことから肝虚血再灌流時に起こる I- $\kappa$ B 分解は IKK 非依存性であり、かつ、熱ショック前処置は IKK と無関係に I- $\kappa$ B 分解を抑制することが判明した。

この研究にて熱ショック前処置は NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B 経路を修飾することで肝虚血再灌流後に惹起される炎症反応の減弱に寄与する事が示唆された。熱ショック前処置の I- $\kappa$ B 分解抑制機能に関してはさらなる研究が必要であるが、熱ショック前処置が細胞内の炎症反応を惹起するシグナル伝達経路に介入し得るという知見は、ストレス反応に関わる新たなメカニズムの発見である。今後、このメカニズムをより詳細に追究する事は、ストレス前処置法をより洗練化された形で臨床応用するために役立つと思われる。また、新たな治療戦略に結びつく事も期待される。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

熱ショック前処置は肝虚血再灌流障害を軽減するが、その機序は未だ十分解明されていない。本研究は、肝虚血再灌流時

における NF- $\kappa$ B に関わるシグナル伝達経路に熱ショック前処置が及ぼす影響を追求したものである。

ラットを2群に分け、蒸ショック群 (HS) 群には 42°C、コントロール群 (C 群) には 37°C の温水浴を15分間施行した。48時間後、各群に対し30分の全肝虚血と再灌流を行い、NF- $\kappa$ B の活性化、I- $\kappa$ B の動態、炎症性メディエーターである TNF- $\alpha$ , MIP-2, iNOS の mRNA 発現、IKK の活性化を評価した。C 群で認められた再灌流後の NF- $\kappa$ B の活性化、および TNF- $\alpha$ , MIP-2, iNOS の mRNA 発現が、HS 群では抑制された。I- $\kappa$ B は、虚血前の発現が HS 群で有意に増加していた。また、再灌流後 C 群で認めた IKK 非依存性の I- $\kappa$ B 分解も、HS 群において有意に抑制された。以上の結果から熱ショック前処置が肝虚血再灌流時における NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B 経路の修飾を通じて炎症性メディエーターの発現を抑制することが明らかとなった。この作用は熱ショック前処置が肝臓を虚血再灌流障害から保護する機序の一つと考えられる。

本研究におけるストレス反応と肝保護に関わる新たなメカニズムの発見はストレス前処置法の臨床応用や、肝臓外科手術に伴う侵襲に対する新たな治療戦略の開発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14年3月13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。