

氏 名	伊 藤 辰 哉
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2488 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	Reversible inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by exposure of hypoxic cells to the volatile anesthetic halothane (吸入麻酔薬であるハロタンは、低酸素条件下の細胞で誘導される低酸素誘導性因子 1 の活性化を可逆的に抑制する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 乾 賢 一 教 授 柴 崎 浩 教 授 福 田 和 彦

論 文 内 容 の 要 旨

動物における低酸素への応答は、炭水化物の代謝経路の変化、血管の収縮拡張による血液供給の再構築など多様であるが、遺伝子発現の観点から、新たな遺伝子発現を伴うものと、伴わないものに大別される。動脈体の低酸素性興奮や肺血管の収縮などは遺伝子発現を伴わない反応であり、従来生理学的に詳しく検討されてきた。一方、近年の分子生物学の成果から、ほぼ全ての有核細胞は低酸素を感知しそれに特異的に反応して遺伝子発現を調節する原理的には共通の機構を持つことが明らかになっている。この機構の中心に位置する転写因子として低酸素誘導性因子 1 (HIF-1) が知られている。HIF-1 は α サブユニット (HIF-1 α) と β サブユニット (HIF-1 β) から構成される 2 量体であり、標的遺伝子の発現制御域に存在する特異的な塩基配列 (HRE) を認識して酸素分圧依存性に遺伝子発現を促す。HIF-1 β は酸素濃度に関係なく細胞内に安定に発現しており転写活性化能を持たないのに対して、HIF-1 α は様々な段階で酸素分圧依存性調節を受ける制御サブユニットである。培養細胞における研究から、HIF-1 α 蛋白発現量と HIF-1 α 転写活性化能の酸素分圧依存性調節が低酸素誘導性遺伝子応答の基礎となっていることが明らかにされている。

揮発性麻酔薬は、いわゆる麻酔作用の他に、低酸素性肺血管収縮の抑制に代表される生体の低酸素応答を修飾する作用も有することが知られている。しかしながら、揮発性麻酔薬の低酸素誘導性遺伝子応答に対する影響を検討した研究はこれまで報告されていない。申請者らは今回、揮発性麻酔薬ハロタンの低酸素誘導性遺伝子応答に及ぼす影響を HIF-1 の活性化を指標に検討した。

申請者らは、ヒト肝細胞由来細胞株 Hep3B を用い、低酸素依存性遺伝子発現と HIF-1 α の転写活性化能をルシフェラーゼ活性の誘導を利用したレポーターアッセイで、HIF-1 α 蛋白質の低酸素依存性細胞内蓄積を抗 HIF-1 α 抗体を用いたウェスタンブロットで検討した。その結果、ハロタンは enolase 1 遺伝子あるいは VEGF 遺伝子由来の HRE に依存する低酸素 (1%O₂) 誘導性遺伝子発現を抑制し、低酸素により誘導される HIF-1 α 蛋白質の細胞内蓄積を可逆的に抑制することが明らかになった。これらの抑制効果は 0.5%ハロタンですでに観察されて 1%ハロタンで飽和し、2%ハロタンを用いてもさらなる抑制効果は観察されなかった。さらに、ハロタンは低酸素により誘導される HIF-1 α 転写活性化能も抑制した。以上の結果は、ハロタンは HIF-1 α 蛋白質の蓄積、転写活性化能の両方を抑制することにより低酸素誘導性 HIF-1 活性化を阻害することを示している。

HIF-1 活性化は酸素分圧の変化に対応して非常に迅速に起こり、細胞の好氣的代謝から嫌氣的代謝への転換、低酸素性細胞死の過程にも深く関与していることが報告されている。HIF-1 は肝臓に限らず脳、肺、腎臓、筋肉、骨など全身の組織で発現しており、今回の申請者らの結果は、揮発性麻酔薬ハロタンは全身の組織における低酸素応答を抑制する可能性を示唆している。今後、揮発性麻酔薬の低酸素誘導性遺伝子応答に対する影響を in vivo で検討することは、臨床的にも意義が大きいと考えられる。

論文審査の結果の要旨

酸素は動物の生存にとって必須の分子であり、その不足つまり低酸素は、脳卒中、心筋梗塞、慢性肺疾患はもとより移植臓器障害の発生にも関わっている。一方で、発生の過程にみられるように、生理的な低酸素が司る生体内反応も多く明らかになっている。しかしながら、麻酔臨床で現在広く用いられている揮発性吸入麻酔薬が、生体の遺伝子発現を伴う低酸素応答にいかなる影響を与えるかについては従来報告がなかった。

低酸素誘導性の遺伝子応答においてヘテロ二量体転写因子、低酸素誘導性因子1 (hypoxia inducible factor 1, HIF-1) が、中心的な役割を果たしていることはすでに明らかにされている。申請者らは、ヒト肝臓癌由来の樹立細胞株 Hep3B を用い、HIF-1 の活性化に揮発性吸入麻酔薬ハロタンが与える影響について、細胞生物学的手法と分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、ハロタンは、濃度依存のかつ可逆的に HIF-1 の制御サブユニットである HIF-1 α の細胞内蛋白質発現を阻害するとともに、転写活性化能を阻害することにより HIF-1 の支配遺伝子の低酸素性発現誘導を抑制することが明らかになった。さらに、非低酸素下で HIF-1 の活性化作用をもつ二価陽イオン、塩化コバルトあるいは鉄キレート剤、デスフェリオキサミンによる HIF-1 活性化も、ハロタンにより抑制されることが明らかになった。これらの結果から、ハロタンは HIF-1 α の低酸素誘導性の安定化を阻害することが推測された。

以上の研究は、低酸素に対する遺伝子応答に及ぼす臨床的に使用される薬物の影響の解明に貢献し、麻酔科学のみならず広く臨床医学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、本学位申請者は、平成14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、合格と認められたものである。