

氏 名 やま もと ひで かず
山 本 秀 和
学位(専攻分野) 博 士 (医 学)
学 位 記 番 号 医 博 第 2198 号
学位授与の日付 平 成 12 年 3 月 23 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 Heat shock preconditioning reduces oxidative protein denaturation and ameliorates liver injury by carbon tetrachloride in rats.
(熱ショック前処置による四塩化炭素起因酸化的ストレスによる蛋白変性及び肝障害に対する耐性に関する研究)

論文調査委員 (主 査)
教 授 福 田 和 彦 教 授 今 村 正 之 教 授 山 岡 義 生

論 文 内 容 の 要 旨

(背景) 外科領域に於いて虚血再灌流傷害の軽減は未だ未解決の問題であるが、そのメカニズムとして、再灌流時の酸化的ストレスによる細胞障害の関与が強く示唆されている。酸化的ストレスのターゲットは主として細胞膜の脂質であると考えられていたが、近年細胞内蛋白質も重要なターゲットの一つとして注目されてきた。ラジカルにより細胞内蛋白質は変性し、その機能を失って細胞死につながると考えられている。その酸化的ストレスによる細胞障害を防ぐ方法の一つに熱ショック前処置が有効であることが *in vitro* で証明されており、その前処置により誘導される熱ショック蛋白質 (HSP 72) の関与が示唆されているが、詳細については未だ明らかにされていない。今回、肝臓に選択的に酸化的ストレスを誘導する四塩化炭素を用い、熱ショック前処置により、酸化的ストレスによる肝臓障害が軽減されるメカニズムとして、その重要なターゲットである脂質の過酸化及び蛋白質の変性と、HSP 72 の関与につき検討した。

(方法) 雄性 Wistar ラットをコントロール群 (C 群: 麻酔のみ) と熱ショック前処置群 (HS 群: 麻酔下に 42℃ の恒温槽で全身を 15 分間加温する。) の二群に分けた。熱ショック前処置 48 時間目の HSP 72 の誘導を Western-blotting 法にて確認した。また熱ショック前処置から 48 時間の回復を待って、致死量の四塩化炭素 (2.5 ml/kg) を胃内投与した。変性脂質、及び変性蛋白質の評価として、四塩化炭素投与前、及び投与後 12 時間の肝組織を採取し、組織内過酸化脂質 (TBARS) 及び免疫組織染色による HNE 修飾蛋白質を定量し比較した。肝障害の評価は、四塩化炭素投与後 24 時間における血清中肝逸脱酵素 (AST, ALT, LDH)、肝組織内高エネルギーリン酸化合物 (ATP, EC) の定量にて行った。さらに四塩化炭素投与後 7 日目の生存率を両群にて比較検討した。

(結果) HSP 72 の発現は HS 群にのみ認められた。術後 7 日目の生存率は、HS 群は C 群に比して有意に良好であった (C 群: 6 / 13, HS 群: 13 / 13, $P = 0.0052$)。肝逸脱酵素、高エネルギーリン酸化合物量のいずれも、HS 群は C 群に比べて有意に良好な結果を得た。

	AST	ALT	LDH	ATP	EC
C 群	17,071 ± 3,333	15,723 ± 3,741	97,475 ± 30,317	1.25 ± 0.07	0.71 ± 0.03
HS 群	8,268 ± 2,054	6,122 ± 1,792	47,720 ± 19,674	1.99 ± 0.33	0.77 ± 0.03
P 値	0.0003	0.0002	0.0071	0.0003	0.0097

TBARS は、四塩化炭素投与前、及び投与後 12 時間とも両群間に有意差を認めなかった。HNE 修飾蛋白は投与前では両群とも殆どみられなかったが、投与後 12 時間では C 群で著明に産生されているものの、HS 群では産生は有意に抑制されていた (C 群: 中央値 111.8 範囲 52.1 ~ 219.4, HS 群: 中央値 25.5 範囲 12.1 ~ 60.5, $P = 0.0163$)。

(考察) *in vitro* だけでなく、*in vivo* においても、熱ショック前処置により酸化的ストレスによる障害が軽減されることが

証明された。しかしながら従来よりラジカルによる細胞障害のメカニズムの一つとされていた脂質過酸化に対し、熱ショック前処置は影響を与えないと考えられた。逆に、もう一つの重要なターゲットである蛋白質の変性は、熱ショック前処置によりその産生が抑制されていた。熱ショック前処置によりあらかじめ細胞内に誘導されていた HSP 72 がラジカルによる蛋白変性を阻害したことにより、細胞内高エネルギーリン酸化合物濃度を保ち、細胞死を防ぎ、肝障害を軽減したと考えられた。

論文審査の結果の要旨

外科領域において虚血再灌流障害の軽減は未解決の問題であるが、近年自己防御機構の1つである熱ショック反応を利用した熱ショック前処置による肝虚血再灌流障害軽減効果が注目されている。その著しい軽減効果のメカニズムとして、熱ショック前処置により誘導され、シャペロンとして作用する熱ショック蛋白質の関与が考えられているが、未だその詳細についての報告は少ない。申請者は今回このメカニズム解明にあたり、虚血再灌流障害の増悪因子の1つである酸化的ストレスに注目し、肝臓に選択的に酸化的ストレスを誘導する四塩化炭素を用いて、熱ショック前処置が酸化的ストレスによる肝臓障害を軽減する可能性、およびその際の重要なターゲットである脂質および蛋白質の変性に与える影響と、熱ショック蛋白質の関与につき検討した。熱ショック前処置ラット及びコントロールラットに四塩化炭素を投与し、その後の生存率を比較、さらに血清肝逸脱酵素、肝エネルギー代謝、変性脂質及び蛋白質の定量を行った。この研究において、申請者は熱ショック前処置により生存率の向上、肝逸脱酵素上昇の抑制、エネルギー代謝の維持が認められ、障害が軽減されることを示した。また、変性脂質量に差はみられず、変性蛋白質の産生が減少していた。以上より、熱ショック前処置によりあらかじめ細胞内に誘導されていた熱ショック蛋白質が酸化的ストレスによる蛋白変性を阻害する事により、肝障害を軽減していると結論付けた。

以上の研究は生体内での酸化的ストレスに対するストレス応答の機序の解明に貢献し、外科領域における肝虚血再灌流障害の予防的治療として、ストレス応答を臨床応用する根拠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 12 年 1 月 19 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。