

氏名(本籍)	ま みや たかし 間 宮 孝 (茨城県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 5111 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	「HO-1 による肝庇護効果の検討」－肝細胞特異的ヘムオキシゲナーゼ 1 欠損マウスを用いて－		
主査	筑波大学教授	理学博士	石井 哲 郎
副査	筑波大学教授	博士(医学)	檜 澤 伸 之
副査	筑波大学講師	博士(医学)	近 藤 匡
副査	筑波大学講師	博士(農学)	中 川 嘉

論 文 の 内 容 の 要 旨

目的：ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) は、ヘムをビリベルジンや一酸化炭素に分解する酵素である。HO-1 は、脾臓・肝臓など多くの臓器に発現しており、酸化ストレスやその他のストレス刺激で強く誘導され、その代謝産物が抗酸化機能を示すことが証明されている。ヘムの代謝産物であるビリベルジンが還元されて生成されるビリルビンは、過酸化水素消去作用を持ち、もう一つの代謝産物である一酸化炭素は、酸化ストレスによるアポトーシスを抑制することが報告されている。抗酸化酵素としての HO-1 の生理的な役割を考察する上で、遺伝子破壊マウスの解析は重要であるが、HO-1 全欠損マウスは、貧血と臓器内鉄蓄積により高頻度で胎生致死となる。本研究では、肝臓における HO-1 の抗酸化機能を評価するため、肝実質細胞特異的 HO-1 欠損 (HO-1 肝 KO) マウスを作製し解析を行った。

対象と方法：条件付き遺伝子破壊マウスの作製は、Cre/loxP のシステムを用いて行った。ES 細胞を用いた相同組換えにより、HO-1 遺伝子の第3から第5エクソンを loxP 配列で挟む遺伝子座を持つマウスを作製した。同マウスを、アルブミン遺伝子プロモーター制御下に Cre 組換え酵素を発現するマウスと交配し、肝実質細胞で HO-1 を欠損した HO-1 肝 KO マウスを樹立した。欠損の効率をサザンプロット法、イムノプロット法にて評価し、欠損の細胞特異性は、HO-1 抗体を用いた免疫染色により行なった。生体防御系遺伝子の発現は、定量的 PCR 法にて解析した。肝臓におけるラジカル消去能の評価は、尾静脈よりニトロキシラジカルである (3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl) を静注し、*in vivo* EPR 法を用いてラジカルの半減時間を測定し評価した。肝障害モデルとして、四塩化炭素を腹腔内投与し、経時的に肝障害の程度を組織像と血清中のマーカー酵素の測定により評価した。

結果：HO-1 肝 KO マウスは、出生率に異常を認めず、また、平常時の肝臓の組織像、血清学的な解析でも著明な変化を認めなかった。同 KO マウスの肝臓全体における HO-1 遺伝子の欠損率はサザンプロット法によるとおよそ 60% であり、HO-1 の蛋白質の発現は、免疫プロット法では対照マウスの約 3 分の 1 に低下し

ていた。免疫染色の結果、平常時の肝臓では、クッパー細胞で強い HO-1 の発現を認めたが、肝実質細胞ではヘミン処理しても HO-1 発現誘導は見られないので、残存する HO-1 タンパク質はクッパー細胞など肝実質細胞以外の細胞における発現と考えられた。

平常時の HO-1 肝 KO マウスの肝臓における転写因子 Nrf2 制御下にある生体防御系遺伝子の発現を定量的 PCR にて解析したところ、NAD(P)H：キノン酸化還元酵素、グルタチオン・S- 転移酵素 -P1, チオレドキシニン還元酵素 -1 遺伝子は有意に誘導されていた。グルタチオン・S- 転移酵素 -A4, グルタミン酸 - システインライゲース触媒サブユニット遺伝子は、有意差はないが HO-1 肝 KO マウスが高い傾向にあった。これらの結果は、HO-1 肝 KO マウスの肝臓は、これら生体防御系遺伝子が誘導される弱い酸化ストレス状態になっていることを示唆している。さらに、肝臓でのラジカル消去能を *in vivo* EPR にて個体レベルで評価したところ、HO-1 肝 KO マウスの肝臓では、ラジカル消去能が対照マウスと比較して有意に低いことが示された。

四塩化炭素は肝臓において代謝され、活性体であるトリクロロメチルラジカルになり肝障害を生じるとされている。四塩化炭素高容量 (300 μ l/kg) 投与では、対照と HO-1 肝 KO マウスどちらも同程度に障害を受けたが、低容量 (30 μ l/kg) 投与では、HO-1 肝 KO マウスの方が有意に血中 AST・ALT レベルが上昇し、酸化障害を伴う壊死範囲の拡大を認めた。

考察：HO-1 肝 KO マウスの肝臓では、異物代謝系、抗酸化系遺伝子群の発現が誘導されていることとラジカル消去能が有意に減少しているため、HO-1 は平常時の肝実質細胞において抗酸化的な役割を果たしていることが示された。また、HO-1 が四塩化炭素による急性肝障害に際して、肝保護効果に寄与していることを示したが、HO-1 が反応産物のビリルビンなどを介してラジカル消去を担っているためと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、肝臓における HO-1 の抗酸化的な役割を評価するために、肝臓特異的に HO-1 遺伝子を破壊したマウスを作成し、その抗酸化機能を対象マウスと比較した研究である。EPR を用いたラジカル消去の定量評価など解析にやや不十分な点があるが、肝臓における HO-1 の抗酸化機能を定量評価したすぐれた研究であり評価できる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。