

ラット小腸温阻血再灌流障害に対する L-Glutamine 誘導性 Heme oxygenase-1 の効果

学位論文内容の要旨

I 目的

移植医療において小腸は他の固形臓器と異なる特徴を有している。それは、小腸が常に外界と接しており、腸内細菌により移植片自体が複雑な免疫反応に修飾され、かつ単層円柱上皮による管腔構造が阻血再灌流障害に対して高い感受性を示すことによる。そのため、臨床の安全な小腸冷却保存時間は 12 時間以内であり、小動物実験でも 24 時間の保存がいまだ確立していない。従来より、照射後腸炎、薬剤誘発性腸炎や腸内細菌叢の菌交代現象などに対して、L-Glutamine(L-Gln)の保護効果が報告され、またラット小腸から分離した細胞培養系において、酸化ストレスや熱処理後に引き起こされた組織障害が L-Gln 投与によって抑制されたが、そのメカニズムの一つとしてストレス蛋白質(heat shock protein : HSP)の発現による細胞保護効果が指摘されている。

本研究では、種々の HSPs の中でもとくに抗酸化作用を有する heme oxygenase-1 / HSP32 (HO-1)に着目し、L-Gln を前投与したラット小腸内組織における HO-1 の発現性ならびに小腸温阻血再灌流傷害に対する耐性の獲得のメカニズムについて、生体内の主要な抗酸化物質である reduced glutathione(GSH)量との相互関係の面から検討した。さらに、小腸陰窩の enterochromaffin 細胞に存在し再灌流障害時に小腸内腔に放出される serotonin や、組織中マクロファージから放出される tumor necrosis factor- α (TNF- α)などの放出能からみた細胞傷害度および移植後生存率など多面的な解析を行った。

II 方法

実験動物には 6～8 週齢の Lewis 系雄性ラットを用いた。L-Gln 液 5 mmol/kg を尾静脈より 20 分間の持続静脈内投与した群を L-Gln 群とした。同様に lactated Ringer (LR)液を投与した群を LR 群とし、無処置のラットを用いた群を新鮮対照群とした。

1. L-Gln 投与後の小腸組織内抗酸化物質の発現

被験薬投与後 2、4、6、24 時間に開腹し、摘出した小腸片を免疫組織染色で HO-1 の発現を検討した。さらに、小腸組織内 HO-1 量を ELISA および Western blot 法にて、また組織内 GSH 量を calorimetric 法にて測定した。

2. 小腸温阻血モデルにおける L-Gln の効果

Megison らの方法に準じて、上腸間膜動脈(SMA)を遮断した小腸温阻血モデルを作成した。被験薬投与後 24 時間に温阻血負荷し、小腸組織内 serotonin を免疫組織染色にて検討した。さらに小腸腔内に放出された serotonin 量も測定した。また、温阻血再灌流後の門脈血中の TNF- α 値を測定した。

3. 同所性小腸移植モデルにおける L-Gln の効果

被験薬投与後 24 時間に全小腸を摘出して、60 分の温阻血負荷後に小腸移植を行い、一週間生存率を検討した。さらに、小腸摘出時、温阻血終了直後および移植再灌流後 60 分における移植片内 GSH 量の推移を検討した。

III 結果

1. 小腸組織内抗酸化物質の発現

免疫組織染色において、HO-1 は新鮮対照群および LR 群に比べ、L-Gln 群では 6 時間をピークに 24 時間まで小腸全体特に絨毛、陰窩および筋層に強く発現が認められた。また、L-Gln 群で組織内 GSH 値の増加も確認された。

2. 小腸温阻血モデル

免疫組織染色において、L-Gln 群は阻血後小腸陰窩の serotonin は LR 群に比較して多数残存し、小腸内腔への放出量も LR 群に比べ低値な傾向にあった。温阻血再灌流後の門脈血内 TNF- α 値は、L-Gln 群にて測定可能値以下に著明に抑制された。

3. 同所性小腸移植モデル

移植後生存率で L-Gln 群は 6/6 と LR 群の 1/6 に比べ有意に延長が認められた。

また、移植片内 GSH 値は各ポイントにおいて LR 群と比較して有意に高値を維持した。

IV 考察

従来より、"conditionally essential amino acid"である L-Gln の小腸組織に対する細胞保護効果が報告され、そのメカニズムの一つとして HSP の発現による細胞保護効果が指摘されている。

本研究では HSP の中でもとくに抗酸化作用を有する HO-1 に着目した。HO は prooxidant であるヘムを分解し、同時に産生される biliverdin や biliverdin reductase によって変換された bilirubin はその強力な抗酸化作用によりストレス刺激からの細胞障害を抑制する。また、同様に産生される CO は nitric oxide と同様なガス状メディエーターであり、血管トーンスを減少させることが知られている。HO のうち、誘導型の HO-1 はあらゆる種類のストレス、とくに酸化ストレスを受けた場合に強く誘導されるので酸化ストレスに対する sensitive marker として考えられている。今回免疫組織染色や Western blot 法、ELISA などの解析により、L-Gln が HO-1 を誘導することが示された。

本研究ではさらに生体内の主要な抗酸化物質である GSH や小腸の細胞障害のマーカーである serotonin および TNF- α との関連性や移植後生存率など多面的な解析を試みた。GSH の前駆物質である L-Gln 投与により小腸組織 GSH 量は増加し、再灌流後も LR 群と比較してその相対的低下が阻止された。さらに、温阻血モデルにおいて L-Gln の前投与により温阻血後の小腸内腔に放出される serotonin 量は抑制される傾向にあり、再灌流後 LR

群では経時的に門脈血中 TNF- α 活性が増加したが、L-Gln 群では測定限界値以下に著明に抑制された。さらに、移植後生存率の著明な改善も認められた。

以上より、本研究における温阻血障害を受けた小腸組織に対する L-Gln の効果は、serotonin や TNF- α の放出抑制ならびに生存率の改善として認められたが、donor preconditioning として積極的に HO-1 や GSH などの細胞保護物質を誘導することと関連することが示唆された。

V 結語

L-Gln の経静脈的前投与により、HO-1 は小腸全体に強く発現され、GSH 値も増加した。温阻血再灌流後の serotonin および TNF- α の放出が抑制され、小腸移植における生存率の改善も認められたことから、L-Gln の前投与は安全な細胞保護物質の誘導法として今後小腸移植への応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 堂 省

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

ラット小腸温阻血再灌流障害に対する L-Glutamine 誘導性 Heme oxygenase-1 の効果

移植医療において小腸は他の固形臓器と異なり、外来抗原・細菌により特有な免疫反応に修飾され、構造上阻血再灌流障害に感受性が高い。腸粘膜に保護効果を示すアミノ酸として L-Glutamine(L-Gln)が知られており、その作用機序の一つとしてストレス蛋白質(HSP)の誘導が考えられている。申請者は種々の HSP の中でもとくに抗酸化作用を有する heme oxygenase-1 / HSP32 (HO-1)に着目し、L-Gln を前投与したラット小腸内組織における HO-1 の発現性ならびに小腸温阻血再灌流障害に対する耐性の獲得のメカニズムについて、主要な抗酸化物質である reduced glutathione(GSH)量との相互関係の面から検討した。さらに、小腸陰窩の enterochromaffin 細胞に存在し再灌流障害時に小腸内腔に放出される serotonin や、組織中マクロファージから放出される tumor necrosis factor- α (TNF- α)などの放出量からみた細胞傷害度および移植後生存率など多面的な解析を行った。実験動物には 6~8 週齢の Lewis 系雄性ラットを用いて、L-Gln 液 5 mmol/kg を尾静脈より投与した群を L-Gln 群とし、同様に lactated Ringer 液を投与した群を LR 群、無処置のラットを用いた群を新鮮対照群とした。まず、L-Gln 投与後の HO-1 の発現の局在を免疫組織染色で検討し、その発現量を ELISA および Western blot 法にて測定した。また組織内 GSH 量を calorimetric 法にて測定した。次に上腸間膜動脈(SMA)を遮断した小腸温阻血モデルにおける L-Gln の効果を、小腸腔内に放出された serotonin 量および再灌流後の門脈血中の TNF- α 値にて検討した。さらに同所性小腸移植モデルにおいて 60 分温阻血負荷後の一週間生存率および移植片内 GSH 量の推移について検討した。L-Gln 投与後の小腸組織における HO-1 の発現量は 6 時間をピークに 24 時間まで小腸全体特に絨毛、陰窩および筋層に強く発現が認められた。また、組織内 GSH は、L-Gln の投与後 HO-1 と共誘導性に増加し、再灌流後も LR 群と比較して高値を維持した。小腸組織傷害度の指標となる serotonin は L-Gln 投与により抑制される傾向にあり、また温阻血再灌流後の門脈血内 TNF- α 値は、測定可能値以下に著明に抑制された。温阻血後移植されたラットは、L-Gln 群では、全例一週間以上生存

し、LR 群と比較して著明な改善が認められた。L-Gln により HO-1 が誘導され、また生体内の主要な抗酸化物質である GSH も増加し、再灌流後も LR 群と比較してその相対的低下が阻止された。さらに、温阻血モデルにおいて L-Gln の前投与により温阻血後の小腸内腔に放出される serotonin 量は抑制される傾向にあり、再灌流後 LR 群では経時的に門脈血中 TNF- α 活性が増加したが、L-Gln 群では測定限界値以下に著明に抑制された。さらに、移植後生存率の著明な改善も認められた。以上のことから、細胞毒性のないアミノ酸である L-Gln の経静脈的前投与は安全な細胞保護因子の誘導物質として、また移植後の粘膜再生促進物質として今後小腸移植への応用が期待された。

審査にあつて、石橋教授から実験モデルの臨床的意義について、free radical との関係や、HO-1 の活性・発現部位についての質問があつた。申請者は抗酸化作用についての文献、申請者自身のデータを用いて、临床上生体小腸移植における donor preconditioning を想定していること、今回の実験系では radical scavenger としての活性は測定してはいないが、L-Gln 投与により GSH や HO-1 が増加し、文献的には radical scavenger として働くとの報告があること、また HO-1 は小腸において強く誘導されるが、心臓や肝臓など他の臓器にも誘導されることなどを回答した。次いで浅香教授から L-Gln による HO-1 発現の機序および確認方法、TNF- α との関係、GSH の関与の程度につき質問があつた。申請者は HO-1 やセロトニンに関する文献、申請者自身のデータを用いて L-Gln が HO-1 を誘導するシグナル伝達の経路の仮説、今後の課題として HO-1 発現の検証には HO-1 の mRNA の測定や HO-1 のノックアウトマウスでの検討が必要なこと、L-Gln が TNF- α を抑制する機序について、L-Gln の細胞保護効果には GSH、HO-1 や HSP などが相乗的に働いていると考えられることなどを回答した。最後に、藤堂から L-Gln 投与による保護効果の組織学的評価、L-Gln の臨床応用についての質問があつた。申請者は L-Gln に関する文献、自身のデータを用いて、組織学的に L-Gln の前投与により小腸の絨毛上皮の再生が促進されること、临床上 L-Gln は水に溶解されにくく分解が速いという問題があるが、それにはダイ・ペプチドという方法が考えられることなどを回答した。

この論文は独創的で、小腸阻血再灌流障害に対する L-Gln の保護効果と HO-1 の面から検討したことで高く評価され、今後安全な細胞保護物質の誘導法として今後小腸移植への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。