

# ラット小腸温阻血・再灌流傷害に対する L-Glutamine の 効果：heme oxygenase-1 の誘導と抗 apoptosis 作用

## 学位論文内容の要旨

### I 目的

小腸移植片は他の固形臓器とは異なり、阻血・再灌流傷害に対して高い感受性を示す。蛋白質構成アミノ酸 L-Glutamine (Gln) の小腸に対する保護効果については以前より指摘されており、われわれは Gln を投与した小腸組織では hemoxygenase-1/HSP32 (HO-1) が高度に発現され、阻血・再灌流傷害に対して耐性が得られることを報告してきたが、その保護的機構については必ずしも明らかではなかった。ラット小腸の阻血・再灌流傷害において apoptosis は重要な因子であり、これを制御することにより傷害を軽減できる可能性がある。Apoptosis を制御するシグナルとして Bcl-2 や Bax などの Bcl-2 family が知られており、HSP70 や HO-1 を過剰発現させた細胞では Bcl-2 も共誘導され虚血に耐性を示すという報告もみられる。これらの知見より Gln の保護的役割として、HO-1 の発現に加えて Bcl-2 family の誘導が関与している可能性が推測された。本研究では、Gln 前投与によるラット小腸組織内 HO-1 の発現と apoptosis 関連蛋白である Bcl-2 family の誘導およびこれらの誘導発現と温阻血・再灌流傷害後の小腸組織の再生過程の関連性について検討した。

### II 方法

Lewis 系雄性ラット (230~295 g) を用いた lactated Ringer (LR) 液 25 ml/kg を静脈内投与した対照群を LR 群、Gln 5 mmol/kg を投与した実験群を Gln 群とした。また、これらの被験薬を投与しない無処置群も設定した。被験薬投与 3, 6, 9, 12, 24 時間後に起始部より 15 から 25 cm までの空腸を採取し、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いた HO-1 と Bcl-2, Bax の遺伝子発現と Western blot 法を用いて HO-1 および Bcl-2, Bax の蛋白発現を解析した。また、60 分間の小腸温阻血・再灌流後 0, 1, 6, 24 時間における小腸の組織を、Haematoxylin & Eosin (H&E) 染色と TdT-mediated d-uridine triphosphate biotin nick end labeling (TUNEL) 染色法を用いて検討した。

### III 結果

Gln 群の HO-1 mRNA は無処置群と比較して 3~24 時間まで有意な発現増強を認めた ( $P<0.05$ )。HO-1 蛋白合成は Gln 投与後 3 時間より増強し、12 時間においてピーク値が観察され、無処置群および LR 群と比較して有意な高発現を示した ( $p<0.05$ )。蛍光免疫染色において無処置群や LR 群では小腸壁全体の HO-1 発現は乏しかったが、Gln 群では投与

後 3 時間より筋層や陰窩を中心として絨毛上皮に至るまで発現の増強が認められた。Bcl-2 mRNA は Gln 投与後 3 時間をピークとして発現が増強したが、無処置群および LR 群では発現性に差はなかった。一方、Bax mRNA は 3 群ともほぼ同程度の発現を示した。Bcl-2 と Bax の mRNA 発現比率は、Gln 投与後 3 時間から 12 時間まで無処置群と比較して有意に増加した ( $P < 0.05$ )。Bcl-2 蛋白合成は無処置群および LR 群でも認めたが、Gln 群では 3 時間後より 24 時間にかけて発現が有意に増強した ( $p < 0.05$ )。Bax の蛋白質発現は Western blot 法では確認できなかった。温阻血・再灌流後の小腸組織所見において、再灌流後 1 時間の無処置群および LR 群では、筋層と陰窩を残して絨毛が脱落して粘膜下層の浮腫と離開を認めたが、Gln 群では絨毛の一部が残存して部分的に上皮の再生も始まり粘膜下層の浮腫もわずかであった。再灌流後 6 時間では、Gln 群は絨毛上皮の再生が良好であったが、無処置群と LR 群では再生は遅延し、絨毛構造の乱れや再生上皮細胞の核異型の他に出血、炎症細胞浸潤、粘膜下層の浮腫などを認めた。再灌流後 24 時間では、Gln 群はほぼ正常絨毛の形態に再生した。LR 群と無処置群では再生絨毛はのびてきたが、上皮細胞の配列の不整と炎症細胞浸潤を認めた。再灌流直後および 1 時間後の残存した小腸組織内の TUNEL 陽性細胞は各群間で差はなかったが、再灌流後 6 時間では Gln 群の残存絨毛と再生した絨毛における TUNEL 陽性細胞の出現は少なかった。一方、無処置群と LR 群では再生した絨毛内に TUNEL 陽性細胞の出現を多く認めた。

#### IV 考察

Gln 投与により小腸組織内に抗酸化物質 glutathione と HO-1 が共誘導性に発現増強して、結果的に再灌流傷害が軽減することを報告してきた。しかし、その保護的メカニズムについては十分に解明されていない。本研究では、Gln のラット小腸における HO-1 と apoptosis 関連遺伝子である Bcl-2 family の遺伝子および蛋白発現性を解析して、温阻血・再灌流後の小腸組織再生過程における形態学的特徴と apoptosis との関連性についても検討した。Gln の前投与によりラット小腸組織に HO-1 mRNA および蛋白質が誘導発現し、同時に apoptosis 抑制遺伝子 Bcl-2 mRNA と蛋白質も発現することが確認された。また、Gln 群では再灌流傷害後の絨毛再生過程が促進され、再生絨毛内の apoptosis が抑制されていることが確認された。以上の結果より、Gln の保護的メカニズムのひとつとして HO-1 と Bcl-2 の共誘導が関与していることが判明した。しかし、本研究ではどのようなシグナルを介してこれらが共誘導されたのかについて直接検討していない。Gln は jun nuclear kinase (JNK) や extracellular signal related kinase などの mitogen-activated protein kinase (MAPK) を活性化させることが報告されている。JNK の活性化によりその下流域の転写因子 AP-1 が活性化され HO-1 が誘導される可能性がある。また、MAPK により転写因子 cAMP response element binding protein (CREB) が活性化され、さらに CREB は Bcl-2 の発現を増強するという報告もある。これら従来の報告と今回の実験結果より、Gln 投与による阻血・再灌流傷害に対する保護効果の少なくとも一つのメカニズムとして、MAPK カスケードを介した HO-1 と Bcl-2 の共誘導が関与している可能性が推察された。しかし、本実験系において Gln 投与下に MAPK が活性化されるのか、その下流域で転写因子 AP-1 や CREB が活性化されるのかなどについては実証されてない。今後 Gln 投与による *in vivo* でのシグナル伝達系の解明に向けてさらなる検討が必要と思われた。

#### V 結語

本研究において、Gln の前投与は小腸組織に HO-1 や Bcl-2 などを誘導して、その後の

阻血・再灌流傷害を軽減させることが判明した。生体にとって有用なアミノ酸である Gln は, donor preconditioning における薬理的な有効戦略として臨床の小腸移植の場における実践が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 藤 堂 省

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

## ラット小腸温阻血・再灌流傷害に対する L-Glutamine の 効果： heme oxygenase-1 の誘導と抗 apoptosis 作用

小腸移植片は他の固形臓器とは異なり、阻血・再灌流傷害に対して高い感受性を示すことが知られている。蛋白質構成アミノ酸 L-Glutamine (Gln) の小腸に対する保護効果については以前より指摘されており、これまで Gln を投与した小腸組織で heme oxygenase-1/HSP32 (HO-1) が高度に発現され、阻血・再灌流傷害に対して耐性を獲得することを報告してきたが、そのメカニズムはまだ明らかにされていない。小腸阻血・再灌流傷害における apoptosis の関与、HO-1 と Bcl-2 の関連を示す文献などから、Gln の保護的役割として HO-1 の発現に加えて Bcl-2 family の誘導が関与している可能性を推測した。本研究では、Gln 前投与によるラット小腸組織内 HO-1 の発現と apoptosis 関連蛋白である Bcl-2 family の誘導発現と温阻血・再灌流傷害後における小腸組織再生過程との関連性について検討した。Lewis 系雄性ラットを用いて、lactated Ringer (LR) 液 25 ml/kg を静脈内投与した対照群を LR 群、Gln 5 mmol/kg を投与した実験群を Gln 群とした。また、無処置群も設定した。被験薬投与 3 から 24 時間後に空腸を採取し、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて HO-1、Bcl-2、Bax の遺伝子発現を、Western blot 法を用いて HO-1、Bcl-2、Bax の蛋白発現を解析し、免疫組織染色法で HO-1 蛋白の局在性を検討した。また、60 分間の小腸温阻血・再灌流直後から 24 時間における小腸の組織を、HE 染色と TdT-mediated d-uridine triphosphate biotin nick end labeling (TUNEL) 染色法を用いて検討した。Gln 群の HO-1 mRNA は 3 から 24 時間まで有意な発現増強を示し、HO-1 蛋白も Gln 投与後 3 時間より増強し、24 時間まで有意な高発現を示した。蛍光免疫染色において、Gln 群では投与後 3 時間より筋層や陰窩を中心として絨毛上皮に至るまで発現の増強が認められた。Bcl-2 mRNA は Gln 群で発現が増強したが、Bax mRNA は 3 群ともほぼ同程度の発現を示した。Bcl-2 と Bax の mRNA 発現比率は、Gln 投与後 3 から 12 時間まで有意に増加した。Bcl-2 蛋白合成は無処置群および LR 群でも認めたが、Gln 群では 3 時間後より 24 時間にかけて発現が増強した。Bax の蛋白質発現は確認できなかった。温阻血・再灌流後 1 時間の小腸組織は無処置群と LR 群では、筋層と陰窩を残して絨毛が脱落し粘膜下層の浮腫と離開を認めたが、Gln 群では絨毛の一部が残存し粘膜下層の浮腫も軽度であった。その後の絨毛上皮の再生は Gln 群において良好で、24 時間後にはほぼ正常絨毛の形態を示したが、無処置群と LR 群では再生が遅延した。再灌流直後と 1 時間後の残存小腸組織の TUNEL 陽性細胞に差はなかったが、再灌流後 6 時間における Gln 群の再生絨毛における TUNEL 陽性細胞は他の群に比べて少なかった。以上の結果より Gln の保護的メカニズムのひとつとして HO-1 と Bcl-2 の

共誘導が関与し、その後の阻血・再灌流傷害を軽減させることが判明した。

審査にあたって、副査の石橋教授から Gln の保護効果はレシipientに対してか、Gln による Bax 抑制の可能性、HO-1 で生成される CO の循環への影響、共誘導に関する検討についての質問があった。申請者は Gln や HO-1 に関する文献や自身のデータを用いて、小腸移植における donor preconditioning を想定したこと、Bax は変化なく、CO はむしろ微小循環を改善すること、共誘導に関わる MAPK の可能性などを回答した。次いで主査の浅香教授から mRNA や蛋白の定量性、組織学的計測、Bcl-2 の発現部位、HO-1 と Bcl-2 の発現は Gln の主要効果か、ノックアウトマウスでの検討などについて質問があった。申請者は文献や自身のデータを用いて mRNA は GAPDH との比で検討したこと、 $\beta$ -tublin で蛋白定量、組織は形態学的な評価であること、陰窩と筋層での Bcl-2 発現を最近確認したこと、Gln は小腸の Fuel であり、epidermal growth factor 増強など他にも効果があること、HO-1 ノックアウトマウスでの検討の必要性などについて回答した。最後に、副査の藤堂教授から HO-1 の阻血・再灌流傷害軽減のメカニズム、空腸と回腸における傷害の違い、小腸での Bcl-2 発現に関する報告例について質問があった。申請者は HO-1、Bcl-2 に関する文献や自身のデータを用いて、HO-1 により heme から生じた biliverdin などが radical scavenger として保護効果を示すこと、再灌流傷害は回腸で非常に強く組織形態評価のため空腸を用いたこと、最近の Bcl-2 関連の文献で発現が示されていることについて回答した。

この論文は小腸温阻血・再灌流傷害に対する L-Gln の保護効果を HO-1 と Bcl-2 の共誘導の面から独創的に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小腸移植への応用が期待された。

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。