

主 論 文 要 旨

報告番号	甲 ㊦ 第	号	氏 名	田 中 真 之
主 論 文 題 名				
Gene transfer of high-mobility group box 1 box-A domain in a rat acute liver failure model (ラット急性肝不全モデルにおけるHMGB1 box-A domainの遺伝子導入)				
(内容の要旨)				
<p>High-mobility group box 1 (HMGB1) は、敗血症など各種の病態で組織に障害がおこると壊死した細胞の核内から放出され、様々な受容体と結合することで、さらなる炎症を引き起こす新たな炎症性メディエーターとして注目されている。2003年にはYangらによってHMGB1の構成因子であるbox-AタンパクがHMGB1の阻害タンパクであることが報告された。そこで本研究ではHMGB1 box-A domainがencodeされたアデノウイルスベクター (Adex box-A) を作成し、Adex box-Aをラット急性肝不全モデルに感染させ、box-Aタンパクを発現させることで、HMGB1動態を中心に病態改善効果を検討した。</p> <p>HMGB1 box-A domainをencodeするアデノウイルスベクター野生型を1種類 (WT)、タンパク分泌効率の高い変異型を2種類 (S39A、N37A) 作成した。まずはin vitroの実験を行った。Hela細胞に3種類のAdex box-Aを感染させ、Western blot法にてbox-Aタンパクの発現を確認したところ、Adex box-A感染後48時間において変異型S39Aのbox-Aタンパクの発現が最大であったため、以降の実験では変異型S39AのAdex box-Aを使用した。次に遺伝子導入によって産生されたbox-Aタンパクの生理活性を検証すべく、HMGB1刺激によるマクロファージからのTNFα産生抑制試験を行った。マクロファージであるRAW264.7細胞を培養し、上清にHMGB1タンパクと、Adex box-Aを感染させたHela細胞の上清を加えることでTNFα産生を抑制することを確認した。次にin vivoの実験を行った。Wistar系雄性ラットの門脈内にAdex box-Aを投与することで肝細胞にAdex box-Aを感染させ、72時間後に肝組織の免疫染色およびWestern blot法にてbox-Aタンパクの発現が最大となることを確認した。そこで、ラット急性肝不全モデルにて検証するために、まずは、D-galactosamineをWistar系雄性ラットの腹腔内に投与することでラット急性肝不全モデルを作成した。Adex box-A 投与後72時間で効果が最大となることを利用し、Adex box-A (2.6×10^9 pfu) を門脈内投与し、72時間後にD-galactosamine (2.0 g/kg) をWistar系雄性ラットに腹腔内投与した。その時点から12,24,48時間ごとに血清および肝組織のサンプルを集め、血液生化学検査、肝組織PCR法、組織学的評価を行った。同様にコントロールベクターであるAdex LacZ (2.6×10^9 pfu) を門脈内投与したAdex LacZ群を対照群とした。肝・胆道系酵素、血清HMGB1においては48時間の時点で、また、肝組織中のTNFα・IL-6などの炎症性サイトカインのmRNAレベルは24時間の時点で、Adex box-Aの効果が最大となった。急性肝不全では肝細胞が壊死し、核内からHMGB1が放出されるわけだが、肝の組織学的評価ではAdex box-A投与群においてコントロールベクターであるAdex LacZ群に比較して肝炎の所見の改善、肝組織中HMGB1の放出を抑制した。さらに生存率を検討すべく、D-galactosamine (2.8 g/kg) を投与したラット急性肝不全モデルにてAdex box-A (2.6×10^9 pfu) を門脈内投与したところ、Adex box-A投与群がAdex LacZ群に比較して生存率が有意に延長した。</p> <p>これらの結果からAdex box-Aを投与することでラット急性肝不全モデルの病態改善効果を認め、Yangらが報告したHMGB1の構成因子であるbox-AタンパクがHMGB1の結合する受容体に結合し、シグナル伝達を阻害することを裏付けた。box-Aタンパクは生理的タンパクでないため、本研究ではアデノウイルスベクター (Adex box-A) を用いてin vitro、in vivoともにbox-Aタンパクの産生に成功し、かつ生理的活性および性能を確認できた初めての報告となる。今後はbox-Aタンパクのメカニズムの解明とともに、他の炎症性疾患でのAdex box-Aの有用性を研究したい。</p>				