

## 論文の内容の要旨

肝阻血再灌流における NGFI-B 系遺伝子の発現  
指導教官 幕内雅敏教授

東京大学大学院医学系研究科博士課程

外科学専攻・平成9年入学

学生証番号 77474

氏名 大久保 貴生

### 1. 背景と目的

ステロイド、レチノイン酸、甲状腺ホルモン及びビタミンDの脂溶性ホルモンは細胞膜を透過し特異的核受容体に結合し、この複合体が転写調節因子として標的遺伝子の発現を調節する。1985年以降多くの核受容体の構造が決定され、これらが特徴的な構造を持つことがわかった。これらの特徴的ドメイン構造をもつ蛋白群を核受容体スーパーファミリー(nuclear receptor superfamily)と総称している。このうちリガンドが不明なものはオーファン受容体(orphan receptor)と呼ばれている。Nerve growth factor-induced gene B(NGFI-B), Nur-related factor 1(Nurr1)及び neuron-derived orphan receptor 1(NOR-1)は核受容体スーパーファミリーに属するオーファン受容体である。これらの分子は神経細胞に特異的な機能を持つと考えられていた。NGFI-Bサブファミリーの神経系での役割に注目している研究も散見される。一般的にNGFI-Bサブファ

ミリーに属する遺伝子は神経の分化、発生及びアポトーシスに重要な働きをしていると考えられている。一方で NGFI-B サブファミリーの遺伝子の一つである Nur-related factor 1 (Nurr1) は肝切除後の肝再生との関与が示唆されている。Nurr1 は実際には肝再生の過程で発現するのではなく、肝阻血再灌流障害に伴って発現している可能性があるのではないかと仮説を立て、これを検証した。

## 2. 材料と方法

阻血再灌流障害のモデルとしてラットを用い門脈左枝および肝動脈左枝を 60 分間クランプし肝阻血を行い、再灌流を行った。NGFI-B サブファミリー遺伝子の発現を阻血再灌流障害のモデルのラットの肝臓で reverse transcriptional-polymerase chain reaction (RT-PCR) を用い検討した。このラットの肝臓において NGFI-B 遺伝子発現の局在性を確認するために in situ hybridization を行い検討した。NGFI-B サブファミリーのプロモーター領域に cyclic adenosine-5'-diphosphate response element (CRE) が存在することから phospho-Ser-133-specific cyclic adenosine-5'-diphosphate response element binding protein (pCREB) の発現と NGFI-B サブファミリーとの結合を Western blot 法及び gel shift assay を用いて検討した。プリングル法による肝阻血下に行われた肝切除術の阻血前の検体と肝切除後の標本より得られたヒトの肝臓においても NGFI-B サブファミリー遺伝子の発現を検討した。

## 3. 結果

阻血再灌流障害のモデルのラット肝臓において NGFI-B サブファミリーの遺伝子は肝阻血再灌流後 30 分で発現が認められた。一般的にシクロヘキシミドは蛋白合成を阻害し、ラットの肝臓においてアポトーシスを引き起こすといわれている。前述の Nurr1 の検討ではシクロヘキシミドを投与しているため、この効果

について検証した。NGFI-B サブファミリーの遺伝子の発現量はシクロヘキシミドによって増大した。また *In situ* hybridization にて NGFI-B 遺伝子の発現部位を検討したところ、肝阻血再灌流 30 分後の検体にて NGFI-B mRNA が主に中心静脈周囲の肝細胞に認められた。NGFI-B サブファミリーの遺伝子の発現に CREB と CRE を介した経路の関与が認められるかを検証した。CREB と CRE の結合によって CRE を含む遺伝子の発現が引き起こされ、さらに CREB の転写活性は Ser133 のリン酸化により規制されている。シクロヘキシミド投与群の阻血再灌流障害のモデルのラット肝臓で再灌流後 15 分から CREB Ser133 リン酸化は認められ、再灌流後 30 分で最高値となった。さらにこのリン酸化は再灌流後 60 分まで続いた。human NOR-1 遺伝子のプロモーター領域より CREB binding site を持つ double strand DNA probe (cgtcccaTGGCGTCAcatTGACGTCTcgcattccagg) を用いた gel shift assay にて肝細胞核抽出物はタンパク-ヌクレオチド複合体を形成し、電気泳動にて 2 つの異なるバンドを形成した。Competition analysis において、20 倍濃度のオリゴヌクレオチドにより複合体形成は阻害された。これにより肝臓において CREB が NOR-1 と結合することを明らかにした。手術標本から得られたヒトの検体では NGFI-B サブファミリー遺伝子が阻血前より阻血後に上昇した。NGFI-B 遺伝子発現レベルは NOR-1 遺伝子の約 100 倍、そして Nurr1 遺伝子の約 10 倍の強さを認めた。

#### 4. 検討

本研究においてラット及びヒトにおいて、NGFI-B, NOR-1 及び Nurr1 の遺伝子発現を肝阻血再灌流障害において検討した。NGFI-B mRNA 発現は、中心静脈周囲の肝細胞に認められ、温阻血障害により中心静脈周囲の肝細胞が最も傷害されるという報告を考慮すると NGFI-B mRNA 発現は虚血性障害によって誘発されたことが示唆される。また、本実験ではこれらの遺伝子が再灌流後早期に一過性に

発現していることを示した。この発現パターンは immediate-early gene に特徴的であり、他の生物学的な系においても、しばしば認められるものである。

NGFI-Bサブファミリーのプロモーター領域に CREB 結合領域が認められていることから、CREB と CRE を介した経路が細胞死の過程で NOR-1 遺伝子の早期一過性発現に重要であることが示唆されている。今回の検討でも CREB と CRE を介した経路の関与が認められるかを検証した。CREB と CRE の結合によって CRE を含む遺伝子の発現が引き起こされ、さらに CREB の転写活性は Ser133 のリン酸化により規制されている。抗リン酸化 CREB 抗体を用いた Western blot 法による解析では、阻血再灌流障害のモデルのラット肝臓では、CREB Ser133 リン酸化は再灌流後 15 分から認められ、最高値が再灌流後 30 分で認めることを示した。gel shift assay では実際に NOR-1 遺伝子のプロモーター領域に結合する CREB を示した。immediate-early gene の肝阻血再灌流における役割は未だ明らかではないが、CREB と CRE を介した経路が肝阻血再灌流における NGFI-B サブファミリー遺伝子の早期一過性発現に関与する可能性が示唆される。

## 5. 結論

ヒト及びラットの肝臓における阻血再灌流障害で NGFI-B サブファミリー遺伝子の早期一過性発現が認められた。CREB と CRE を介した経路が肝阻血再灌流における NGFI-B サブファミリー遺伝子の早期一過性発現に重要であることを示唆した。