

[別紙2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 大久保 貴生

本研究は Nerve growth factor-induced gene B (NGFI-B), Nur-related factor 1 (Nurr1) 及び neuron-derived orphan receptor 1 (NOR-1) による NGFI-B サブファミリー遺伝子発現を肝阻血再還流障害の潜在的決定要素として、ラット肝阻血再灌流モデル及び手術検体から得られたヒト肝臓を用い、検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. ラット肝阻血再灌流モデル用いた reverse transcriptional-polymerase chain reaction (RT-PCR) による解析の結果、NGFI-B サブファミリー mRNA 発現量が阻血再灌流後 30 分で一過性の発現をすることが示された。NGFI-B サブファミリー mRNA の発現量は internal standard RNA を用いた定量 RT-PCR にて定量され経時の変化のあることが示され、NGFI-B サブファミリーの各メンバーは異なったレベルの発現をすることが示された。
2. 肝臓にアポトーシスを誘導し、immediate-early gene の発現を増強するとされるシクロヘキシミドを投与したラット肝阻血再灌流モデルを用いた検討の結果、シクロヘキシミド投与のみでも NGFI-B サブファミリー mRNA 発現が認め、アポトーシスを起こす過程において、NGFI-B サブファミリーが発現することが示された。RT-PCR による検討を行ったところ、NGFI-B サブファミリー mRNA の発現はシクロヘキシミド投与により増強しており、NGFI-B サブファミリーが immediate-early gene の特徴を持つことが示された。
3. FITC 標識アンチセンス NGFI-B プローブを用いた *in situ* hybridization をシャム手術を施行したラットの肝臓とシクロヘキシミド投与した肝阻血再灌流後 30 分のラット肝臓に行ったところ、シクロヘキシミド投与したラット肝阻血再灌流 30 分後の検体にて NGFI-B mRNA が中心静脈周囲の肝細胞に主に発現していることが示された。
4. NGFI-B ファミリーのプロモーター領域に CREB (cyclic adenosine-5' -diphosphate response element binding protein) 結合領域

が認められていることと、NGFI-B サブファミリー遺伝子の発現に CREB と CRE(cyclic adenosine-5' -diphosphate response element) を介した経路が関与していることとされていることより、活性型 CREB である pCREB(phospho-Ser-133-specific cyclic adenosine-5' -diphosphate response element binding protein) の発現を抗 pCREB 抗体による Western blot 法を用いて、解析したところ、ラット肝阻血再灌流後 15 分から 60 分に一過性の pCREB の発現が示された。NOR-1 遺伝子のプロモーター領域より設計された 2 つの CREB binding site を持つ double strand DNA probe を用い、ラット肝細胞培養株より調整された核抽出液中で、gelshift assay を行ったところ、NOR-1 遺伝子のプロモーター領域に結合する CREB が示された。したがって CREB と CRE を介した経路が肝阻血再灌流における NGFI-B ファミリー遺伝子の早期一過性発現に関与すると考えられた。

5. インフォームドコンセントを得たうえで、肝切除によって得られた阻血前および阻血後のヒトの検体を用いて、RT-PCR を行ったところ、NGFI-B サブファミリー遺伝子が阻血前より阻血後に上昇することが示された。定量 RT-PCR による検討では、NGFI-B サブファミリーの各メンバーは異なったレベルの発現を示された。

以上、本論文は RT-PCR による検討から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を明らかにし、この NGFI-B サブファミリー遺伝子の発現には CREB と CRE を介した経路が関与することを示唆した。本研究ではこれまで神経の分化、発生およ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た NGFI-B サブファミリー遺伝子を肝阻血再灌流障害にて検討したところは独創的であり、いまだ十分解明されたとはいえない NGFI-B サブファミリー遺伝子の役割及び、肝阻血再灌流障害の機序に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。