

審査の結果の要旨

氏名 長畑智之

本研究はラットの正常肝臓、LPS 投与ラット肝臓発現遺伝子を包括的に検索する中でエンドトキシンの肝臓標的遺伝子を明らかにすること、ラットの肝臓発現遺伝子とヒト、マウス肝臓発現遺伝子を比較することよりラットが代謝、毒性試験などに適切な動物であることを検証するために Long SAGE 解析、Affymetrix GeneChip 解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 肝毒性は、胆汁酸うっ滞により引き起こされる肝細胞アポトーシス、炎症性肝傷害、cytochrome P450 2E1 依存性酸化的ストレスやコラーゲン沈着、NO、スーパーオキシドによる脂質過酸化、ミトコンドリアの機能不全などの影響が原因となり引き起こされていると報告されており、今回の結果からもこれらに関係する多くの遺伝子が多く観察された。
2. NO、スーパーオキシドによる脂質過酸化に関しては、LPS 刺激により superoxide dismutase の発現上昇が認められ、LPS 投与により肝臓内に生じた superoxide の代謝が活発に行われスーパーオキシドによる傷害を排除しようと働いていることが示唆された。
3. 炎症性肝傷害に関しては、クッパー細胞、好中球などによる接着分子、ケモカイン、サイトカイン誘導による ROS などの影響が報告されており、正常ラット肝臓の発現プロファイルに対し、LPS 投与により顕著に遺伝子発現が上昇するものとして mig, IL-1beta, CD14 antigen, interferon gamma inducing factor binding protein, GRO などのサイトカイン、ケモカイン、LPS 関連受容体に分類される遺伝子が観察され LPS により誘発される炎症反応との関わりが示唆された。
4. 本研究結果とマウス、ヒトの正常肝臓における結果から代謝を司る主な薬物代謝酵素 (P450) などの発現について比較したところ、マウスにおいては cytochrome 2C、3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase、UDP-glucose dehydrogenase、alcohol dehydrogenase、aldehyde reductase、aldehyde oxidase、aldehyde dehydrogenase などが顕著に変化する上位の遺伝子として認められていた。それに対しラットにおいては、それらの代謝酵素、各種酵素の他、cytochrome P450 3A2、2C6、1A2、3A18、2D18、2C39、arginase I、isocitrate dehydrogenase I、carboamyl-phosphate synthetase I など主な薬物代謝型チトクロム P450 分子種をマウスと比較しても多く顕著に発現していることが認められた。また、ヒト正常肝臓でのデータと比較してもラットのライブラリーの方がより上位に薬物代謝酵素などを発現している傾向が強いことも観察出来、ラットはヒト、マウスに比べ、代謝酵素を上位発現していることが判り、薬物の毒性評価などにおいてもマウスよりもラットの方が有用なモデル動物であると

考えられた。

5. solute carrier family 3 member 1, solute carrier family 27 member 32, FXFD-domain-containing ion transport regulator 2, organic anion transporter, kidney specific organic anion transporter, solute carrier family 26 member 1 などの取り込み型トランスポーターの LPS 投与による顕著な発現減少が認められた。これに対し、排出型 transporter 2, ATP-binding cassette subfamily B (MDR/TAP) の LPS 投与による発現減少が認められた。これらの因子の変動により取り込み、排出型のバランスが崩れ、代謝物の肝内うっ滞が LPS による急性障害により引き起こされていると考えられた。マウスにおける TCDD における遺伝子解析データと比較してもラットの肝臓での遺伝子発現において LPS 投与により数多くのトランスポーターの発現変動が確認でき LPS により誘発される肝傷害で発現変動する包括的遺伝子発現情報が明らかとなったことは重要であると考えられた。

6. Long SAGE 解析により、Affymetrix GeneChip 解析で同定出来なかった LPS 応答遺伝子を多く同定出来た。Affymetrix GeneChip 解析では、正常ラット肝臓、LPS 投与ラット肝臓発現遺伝子に関しては Long SAGE 解析と一致することが観察されたが、両者で発現変動する遺伝子に関しては一致が観察されず、cDNA microarray 解析に比べ Long SAGE 解析は定量性に優れた遺伝子検索法であることが示唆された。

以上、本論文はラット正常肝臓、LPS 投与ラット肝臓、正常肝臓に対して LPS 投与で発現上昇、減少する遺伝子を Long SAGE 法を用いて解析し、各々遺伝子上位 100 を同定することが出来、エンドトキシンによる肝傷害機序解明のための基礎情報を提供するものと期待される。また、ラットが毒性試験に適切な動物であるという実証には至らなかったが、正常ヒト肝臓、正常マウス肝臓に比べ薬物代謝酵素、トランスポーターをコードする遺伝子がより多く上位発現していることが観察され、ヒトゲノム配列解読完了が宣言された今、生命現象の分子レベルでの解明、様々な疾患に対する新規治療法の開発、併用薬の酵素誘導に起因する二次疾患の阻止、テーラーメイド医療、疾患の診断、予防、薬効、副作用の予測、環境化学物質による毒性等においてこれらのデータが広く有効活用されることが期待される。今後、これらの肝薬物代謝酵素、トランスポーターを含んだ発現情報をもとに、より精度の高い新たな薬物毒性スクリーニングシステム、薬物毒性、環境化学物質、肝毒性チップなどの作成、評価に有用であると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。