

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 綾部 征司

本研究は、近年生体に対する保護作用が明らかにされてきたヘム・オキシゲナーゼ(HO)が産生する一酸化炭素(CO)について、内皮細胞に対する保護的作用および酸化ストレス抑制効果生理活性を明らかにするためにウシ大動脈内皮細胞(BAECs)およびヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)を窒素ガス充満による低酸素にさらすという系においてその cell viability の改善効果をみたもので下記の結果を得ている。

1. BAECs は 48 時間の低酸素状態により cell viability が低下するが、アデノウイルスによる HO-1 遺伝子導入および Hemin による HO-1 誘導と同様に CO250~1000ppm の付加によって改善することがトリパン・ブルー阻害試験および WST-1 アッセイを用いて示された。同様の結果が HUVECs にても認められた。これらの効果は 500ppm で最も効果が強くなった。アネキシン V-FITC およびヨウ化プロピディウムを用いたフローサイトメトリーにてアポトーシス・ネクローシス細胞が低酸素下で増加することが BAECs で示され、これは CO500ppm を低酸素に付加することで抑制された。アポトーシス関連タンパクである Bcl-2/Bax 発現比は低酸素のみの群に対して低酸素に CO500ppm 付加した群で有意に増加が見られた (0.47 ± 0.05 vs. 0.19 ± 0.02 , $n=5$, $p<0.01$)。これらより CO 付加により低酸素での内皮細胞におけるアポトーシスを含めた細胞死を抑制することが示された。

2. BAECs を低酸素に 48 時間曝露すると、細胞内酸化ストレスの増加を反映して DCF 蛍光が著明に増加することが蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーにて示され、N-アセチルシステインと同様に CO500ppm の付加はこの蛍光を抑制した。また外的に過酸化水素 1mM を 4 時間投与するモデルでは CO500ppm 24 時間を前投与することでトリパン・ブルー阻害試験において BAECs の cell viability を改善し、フローサイトメトリーで DCF 蛍光の増加が抑制されることが示された。これらの結果は低酸素による細胞内酸化ストレスおよび外的酸化ストレス付加に対して CO の前投与・同時投与が酸化ストレスを抑制することを示唆した。

3. ルシゲニンを用いた NAD(P)H オキシダーゼ活性測定は低酸素下では BAECs において亢進していることが示され、これは CO500ppm 付加により抑制された。アデノウイルスによる HO-1 遺伝子導入においても低酸素下での NAD(P)H オキシダーゼ活性は抑制された。HO-1-CO 系は reactive oxygen species の発生源の一つと考えられる NAD(P)H オキシダーゼが低酸素で亢進しているのを抑制することが示された。また NAD(P)H のサブユニットである p22-phox、gp91-phox は24時間の低酸素曝露によって増加することが HUVECs で示され、低酸素に CO500ppm を付加することでこれは抑制された。これにより低酸素下での内皮細胞に対する CO の保護効果の一つに NAD(P)H オキシダーゼを含めた酸化ストレス抑制効果が含まれている可能性が示された。

以上、本論文はウシ大動脈内皮細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞において、低酸素曝露および過酸化水素投与を行い、一酸化炭素がこれらの障害に対して保護的に働くことを明らかにした。本研究はこれまで報告されていない毒ガスと考えられていた一酸化炭素の生理活性・細胞保護効果の解明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。