The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Prevention of Hypoxic Liver Cell Necrosis by In Vivo Human bcl-2 Gene Transfection
Author(s)	山邉, 和生
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40715
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	山邊和生（やまべかずお）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　13750　号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科外科系専攻
学位論文名	Prevention of Hypoxic Liver Cell Necrosis by *In Vivo* Human *bcl-2* Gene Transfection （ヒト *bcl-2*遺伝子導入による無酸素肝細胞死の緩和）
論文審査委員	（主査） 教授　松田　暉 （副査） 教授　門田　守人　　教授　辻本　賀英

論文内容の要旨

【目的】

肝保存時の無酸素による肝障害は肝移植の成績を左右する重要な問題の一つである。保存液の改良，ドナー肝の栄養状態の改善など種々の試みがなされてきたが，その成績は未だ充分ではない。我々はこれまでに，細胞を用いた系において1）hypoxiaによる細胞死の際に，アポトーシス実行蛋白として知られるcaspaseの活性化がみられること，2）アポトーシス抑制蛋白であるBcl-2の過剰発現により，hypoxiaによるcaspaseの活性化が抑制され，細胞死が緩和されることを報告してきた。今回我々はこれらの知見を基に，HVJ-liposome法を用いて肝にhuman *bcl-2*(*hbcl-2*)遺伝子を導入し，無酸素肝細胞死に対する影響を検討した。

【方法ならびに成績】

1）無酸素肝細胞死の形態学的特徴

無酸素による肝細胞死の多寡を評価するためにKrebs-Henseleit bufferを用いて無酸素肝灌流を行った。細胞死の程度を定量評価するために，灌流終了15分前に細胞膜障害を伴った細胞の核のみに蛍光発色するpropidium iodide(PI)を灌流液に投与した。2時間の無酸素灌流後のPI陽性肝細胞は80%であったが，アポトーシスの指標であるDNA-end-labeling assay陽性細胞は，ほとんどみられなかった。また電顕像では，核は正常形態を保ち，ミトコンドリアの膨大化，細胞質の空胞変性，淡色化を認め，典型的なネクローシス像を呈していた。

2）HVJ-liposome法による *hbcl-2* 遺伝子の導入

chiken β-actin promotorとcytomegarovirus enhancerを伴うpUC-CAGGS plasmidに*hbcl-2* cDNAを挿入した組換えplasmid（pUC-hbcl-2）を作製した。またコントロールとして同じpromotorを持つpAct-LacZ，β-gal plasmidを使用した。HVJ-liposome法を用いて，これらのplasmidをラット肝に遺伝子導入した。これらの蛋白発現は遺伝子導入後4日目に行ったX-gal染色と抗hBcl-2抗体を用いたWestern blot法，蛍光免疫染色にて確認された。またX-gal染色によるβ-gal，および蛍光免疫染色によるhBcl-2の発現効率（一肝割面あたりの陽性肝細胞率）は，各々41.1±3.6%，28.0±5.6%(n=3)であった。

3）*hbcl-2*遺伝子導入による無酸素細胞死の緩和

lac-Z，*hbcl-2*遺伝子を導入したラット肝に2時間の無酸素灌流を行い，灌流終了15分前にPIを投与した。

a）PIによる無酸素細胞死の検討

lac-Z, *hbcl-2*遺伝子導入肝の凍結切片を各々 X-gal染色，FITCラベル抗 hBcl-2 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い，同一視野のPI染色像，X-gal染色像およびFITC染色像を蛍光顕微鏡にて観察した。肝細胞の2時間無酸素灌流後のPI陽性細胞率は*lac-Z*遺伝子導入細胞で88.6±2.8%，*hbcl-2*遺伝子導入細胞で4.1±2.1%であり，*hbcl-2*遺伝子導入により有意に無酸素細胞死が緩和された。

b）電顕による無酸素細胞死の検討

2時間無酸素灌流後の電顕像は，*lac-Z*遺伝子導入肝細胞では，核は正常であるがミトコンドリアの膨大化，細胞質の空胞変性，淡色化を認め，ネクローシス像を呈していたが，*hbcl-2*遺伝子導入肝細胞は正常形態を保っていた。

4）*hbcl-2*遺伝子導入による肝機能障害の緩和

lac-Z，*hbcl-2*遺伝子導入肝に無酸素灌流を行い，1，2，3時間後に採取した肝切片を破砕した後，上清中の肝ミトコンドリア機能の指標であるケント体比（acetoacetate／ β-hydroxybutyrate）を測定した。ケント体比は，*lac-Z*遺伝子導入肝細胞では無酸素灌流1時間目以降は0.2 以下と急激な低下を認めたが，*hbcl-2*遺伝子導入肝細胞では0.8前後で維持された。

【総括】

1）2時間の無酸素灌流による肝細胞死はアポトーシスではなく，ネクローシスであった。2）*hbcl-2*遺伝子をHVJ-liposome法を用いてラット肝へ導入し，hBcl-2蛋白の発現を確認した。3）*hbcl-2*を遺伝子導入することにより，無酸素細胞死は緩和され，肝機能の低下も抑制された。

本研究は，細胞レベルの実験系を臓器に応用し，肝においてもhBcl-2蛋白の過剰発現が無酸素障害を緩和することを証明したものであり，臓器保存障害に応用しうると考えられる。肝障害を対象とした遺伝子治療はこれまで行われておらず，本法は無酸素肝障害の克服の一助となりうることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

本論文は，肝保存時の無酸素による肝障害の緩和を念頭に置き，細胞レベルでの知見を基に，臓器レベルの系でヒト*bcl-2*遺伝子導入が無酸素肝細胞死を抑制しうるか否かを検討したものである。細胞死抑制遺伝子であるヒト*bcl-2*遺伝子をHVJ-liposome法にてラット肝に導入し，無酸素灌流モデルによる無酸素肝細胞死に対する影響を調べた。ヒトBcl-2蛋白の発現は，抗ヒトBcl-2抗体を用いたWestern blot法，蛍光免疫染色にて確認した。細胞死の多寡は，細胞膜破綻の指標となるpropidium iodie(PI)染色にて，細胞死の形態は電顕にて評価した。肝機能低下の程度は，肝ミトコンドリア機能の指標である肝組織中のケトン体比で評価した。本研究により，1）2時間の無酸素灌流により肝細胞の約80%がネクローシスの形態を呈して死に至ること，2）HVJ-liposome法により，ヒト*bcl-2*遺伝子がラット肝に導入されること，3）ヒト*bcl-2*遺伝子を肝に導入することにより，無酸素肝細胞死は緩和され，肝機能の低下も抑制されることが明らかとなった。

本論文の結果は今後，種々の臓器保存障害に応用しうる重要な知見であり，学位に値するものと考えられる。