

学位論文題名

A High Expression of Heme Oxygenase-1 in the Liver of LEC Rats at the Stage of Hepatoma : The Possible Implication of Induction in Uninvolved Tissue

(担癌LECラット肝臓におけるヘムオキシゲナーゼ-1の発現)

学位論文内容の要旨

I. 目的

生体は活性酸素をはじめとした種々の外的ストレスに曝されており、自己防御系として抗酸化酵素や抗酸化物質が機能している。活性酸素は多くの病態、すなわち、虚血再還流障害、動脈硬化、各種の炎症性疾患、糖尿病、がん、神経疾患との関係で論議されており、これらの病態と活性酸素およびその消去系としての抗酸化酵素の関連性について多くの研究がなされてきている。

ヘムオキシゲナーゼ(Heme Oxygenase:HO)はHemeを分解しBiliverdinと鉄、一酸化炭素(CO)を生成する反応を触媒する。生成されたBiliverdinはBiliverdin ReductaseによりBilirubinへ変換され、アルブミンと結合したBilirubinは活性酸素種(Reactive Oxygen Species)を消去し抗酸化物質として作用する。また、同時に産生されるCOは一酸化窒素(NO)と同様に細胞内cGMP濃度を上昇させることにより血管拡張性や細胞増殖制御などに重要な役割を果たしている。HOはHemeからBilirubinを産生する経路の律速酵素であり、誘導型HO-1と構成型HO-2、HO-3の3種類のアイソザイムからなる。HO-1は、重金属・サイトカイン・ヒートショック・過酸化水素など様々な刺激により32kDaのHO蛋白が誘導される。

LECラット(Long Evans Cinamon Rats)はLong-Evans系ラットの閉鎖系より北海道大学において確立された肝炎・肝癌自然発症ラットである。生後4-5カ月でその約80%に急性肝炎を自然発症し、1年以上の長期生存ラットではほぼ全例に肝細胞癌が発生する。また、LECラットはWilson病の原因遺伝子であるATP7Bと相同の遺伝子に変異を有しており、銅輸送系に機能障害を有する。LECラットの肝機能障害は肝臓における銅の蓄積と密接に関係しており、Wilson病のモデル動物でもある。

近年HOは抗酸化酵素の一つとして捉えられてきたが、病態に伴う生体内発現変化は検討されたことがない。LECラットは炎症や発癌に伴うストレス刺激下におかれているが、一方HOもストレス刺激による誘導が顕著に認められる。以上より病態とHOの発現変化を検討する上でLECラットは適当なモデル動物と考えられ、HOの抗酸化酵素としての役割をより一層明らかにすることを目的として、本研究をおこなった。

II. 方法

LECラットおよび対照として同じLong-Evans系のLEAラットを用い、肝臓をはじめとする各臓器におけるHO mRNAおよび蛋白の発現を特異的cDNA probeを用いたNorthern Blottingおよび抗体を用いたWestern Blottingにて検討した。黄疸形成の有無は、肉眼所見により判断した。

### III. 結果

#### 1. HOの組織分布（正常若年期）

肝炎発症前の正常若年として用いた16週齢ではLEC/LEAともにHO-1の発現は脾臓で最も高く、肝臓における発現は他の臓器とほとんど変わらなかった。一方HO-2の発現量に臓器特異的变化は認められなかった。

#### 2. HOの組織分布(黄疸期・肝癌期)

黄疸期のLECラット（20週齢）については、脾臓におけるHO-1発現量に健常時との差はなかったが、肝臓および腎臓では著明な誘導が認められ、肺においても発現量が増加していた。また、肝癌期（97週齢）では、肝臓および肺におけるHO-1 mRNA発現が依然として高値を示しており、肝炎期を境としてHO-1の発現には大きな差が認められた。

#### 3. 肝臓でのHO発現の週齢変化

ここで用いたLECラットのうち、16、20週齢が肝炎期（黄疸なし）に、97週齢は肝癌期に相当する。HO-1 mRNAは肝炎期以降、いったんは発現が低下するものの肝癌期には再び高値を示していた。一方LEAラットでは、HO-1,2の発現の週齢による変化は認められなかった。

#### 4. 癌部および非癌部におけるHO-1発現

担癌肝組織における発現量を94週齢LECラット2個体について検討した。組織を肉眼的に癌部および非癌部に分けて検討したところ、癌部においてはHO-1発現はmRNA、蛋白ともに低下しているのに対して、非癌部においてはいずれも亢進しており、この非癌部における発現の亢進が肝癌期で高値を示す原因と考えられた。

### IV. 考察

HOは生体内におけるヘム分解の律速酵素である。ヘム分解産物として、Biliverdine、Fe、COが等モル産生される。BiliverdineはさらにBilirubinとなり、抗酸化剤として作用する。生体内におけるCOはHOによる系からその大部分が産生される。COはHeme鉄に強力に結合する結果、グアニル酸シクラーゼを活性化しcGMPを介した作用を示す。一つは血管拡張作用であり、肝類洞における血流はおもにCOにより制御されている。HO-1は各種のストレス刺激により誘導され、生体内において血流制御から抗酸化能にいたる幅広い生理活性を有するが、発癌に伴う発現変化はこれまで検討されたことがない。

肝炎期におけるHO-1の大量発現には肝炎に伴い産生されている炎症性サイトカインの関与が予想され、癌化に伴うHO-1発現の上昇にも癌組織から産生されたサイトカインが関与していると考えられる。HOが誘導される結果としてBilirubinの産生量も増加し、結果として抗酸化能が増大していると考えられる。また肝炎期を過ぎてもHO-1の発現が低下せず高値を維持していることから、Bilirubinを介したHOの抗酸化作用が代償的に高まっている可能性がある。

HO-1発現の亢進により増加したCOによる血管拡張作用により組織血流の増大が生じる。非癌部に

けるHO-1発現の亢進は肝類洞等の微小血管を拡張し炎症巣に対する血流を増大させ、貪食細胞系を介した抗炎症作用が発揮されやすくなることが考えられる。また腫瘍組織は血流要求性が高く正常組織との血流分布不均衡を生じ、正常組織の灌流血液量が相対的に減少することが知られている。しかし、非癌部におけるHO-1発現の亢進によりCO産生が増加し、COによる血管拡張作用の結果、正常組織における血管抵抗が減少し相対的な血流分布不均衡を補正することにもなっていると考えられる。血流の維持は、炎症性に障害を受けた肝細胞を保護することにもなり、肝機能保持にも関与していると考えられる。

このように、肝炎・肝癌自然発症モデルであるLECラットにおけるヘムオキシゲナーゼ発現の変化から、CO、Bilirubinを介したHOの生体防御機構の存在が予想された。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 島 顕  
副 査 教 授 藤 田 博 美  
副 査 教 授 守 内 哲 也

### 学位論文題名

## A High Expression of Heme Oxygenase-1 in the Liver of LEC Rats at the Stage of Hepatoma : The Possible Implication of Induction in Uninvolved Tissue

(担癌LECラット肝臓におけるヘムオキシゲナーゼ-1の発現)

ヘムオキシゲナーゼ(以下HO)は、ラジカル産生能を有するヘムを消去するのみならず、産物であるビリルビンが抗酸化能を有することが明らかとなり、近年、抗酸化酵素としての役割に注目が集まってきている。また、HOは同時に細胞内cGMP濃度の上昇を介して血管拡張作用をしめす一酸化炭素(CO)を産生する。これまで、HOの病態変化に応じた発現に関する検討は少なく、特に癌に関連したものはなかった。本研究は、肝炎肝癌自然発症モデル動物であるLECラットの病態の推移に関連したHOの発現変化を検討することにより、その生理的特徴を明らかにした。HO発現を特異的cDNA probeを用いたノーザンブロット法と合成ペプチド抗原から作成したポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロット法および免疫組織染色により検討した。また、対照群としてはLEAラットを用いた。LECラットの週齢変化に応じた肝臓でのHO発現を検討した結果、肝炎期を境とした肝癌期まで持続する誘導型HO-1の発現亢進を認めた。つづいて肝炎期、肝癌期におけるHO発現を各種臓器で検討した。通常、HO-1の高発現臓器は脾臓のみであるのに対して、黄疸を伴った肝炎期においては、肝臓をはじめ腎臓、肺においてもHO-1の発現は上昇していたが、HO-2発現に差は認められなかった。一方、黄疸を伴わない同週齢LECでは、脾臓以外におけるHO-1誘導は認められなかった。肝癌期には、肝臓におけるHO-1発現の再上昇が認められた。これは、非癌部における発

現が亢進しているためであったが、一方癌部においては、むしろ低下していた。免疫組織学的検討から、癌周囲組織の肝実質細胞においてHO-1の発現が亢進しており、肝癌組織においてはいずれの細胞においても発現は認められなかった。癌組織におけるHO発現を検討したのは、本研究がはじめてである。

上記の実験結果から、HO-1誘導により産生されたビリルビンが脂質過酸化等を抑制し抗酸化能を示している可能性示唆され、また同時に産生されたCOが肝類洞を中心とした肝微小循環を改善し、炎症巣および癌周辺部組織における血流分布不均衡を是正している可能性を示した。活性酸素種を消去することにより抗酸化能を示すのみならず、COによる血流の増加による生理的な環境改善をも含めた抗酸化能をHOは示している可能性を示唆する事象が本研究より示された。学位論文の公開発表に際して副査の藤田教授から、ヘム分解系としてのHOの発現亢進がヘム合成分解系全体に果たす役割について、COとNOの生理的条件下での作用の違いについて、副査の守内教授からは、癌組織における発現低下の原因として考えられる機序と病態との関連性について、LECラットにおける抗酸化酵素の一般的な役割と病態の関連性について、循環器外科の安田教授から劇症肝炎期における腎組織における高発現と炎症との直接的な関連性についての質問がされ、主査の北畠教授からは、このHOによる抗酸化機構が循環器領域において今後の発展として期待されることについての質問があったが、申請者は実験結果に基づいて、また文献的知識を駆使して誠実にかつ、概ね適切に解答し得た。

ヘムオキシゲナーゼを介した活性酸素消去系は、酵素学的反応にくわえ血流の改善による生理的環境改善を伴うことから、特に循環器領域における役割に関して発展が期待されるものと評価される。

審査員一同は、申請者の豊富な学識にあわせて、この研究が関連領域研究の進展に与える成果を評価し、申請者が博士（医学）を受けるに十分な資格を有するものと判定した。