

氏名	さ えき とし や 佐伯俊哉
学位の種類	博士(再生医科学)
学位記番号	甲第6号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Expression of oxidative stress-related molecules in circulating leukocytes and urine in patients with chronic viral hepatitis (慢性ウイルス性肝炎患者の循環白血球及び尿中における酸化ストレス関連分子の発現)
学位論文審査委員	(主査) 山田一夫 (副査) 村脇義和 汐田剛史

## 学位論文の内容の要旨

酸化ストレスは、慢性肝疾患や肝細胞癌の進展に関与していることが報告されている。酸化ストレスとは活性酸素・フリーラジカルによる酸化反応とそれに対する抗酸化反応のバランスが崩れ、酸化反応優位になった状態をいう。活性酸素の一つであるヒドロキシラジカルは、DNAの塩基修飾を引き起こす。その結果の生成される 8-hydroxy-2'-deoxyguano- sine(8-OHdG)は、種々の肝疾患の病態と関連していると共に、DNA 酸化障害のマーカーとなっている。また、4-hydroxy-2-nonenal(4-HNE)及び 4-hydroxy-2-hexenal(4-HHE)は、脂肪酸の酸化二次性生成物であり、脂質過酸化のマーカーである。

一方、酸化反応に対する抗酸化反応を行う活性酸素消去系蛋白としては、superoxide dismutase-1(SOD-1)、catalase、glutathione peroxidase-1(GPx-1)、thioredoxin(TRX)などがある。これらは様々な酸化ストレスに対する生体応答と密接に関連しており、酸化ストレスのマーカーとなる。

今回、我々は、肝疾患患者における白血球中脂質過酸化および尿中 DNA 酸化障害産物の意義を明らかにするため、慢性ウイルス性肝炎患者の白血球中の 4-HNE、4-HHE、catalase、SOD-1、GPx-1、TRX の発現及び尿中の 8-OHdG 量を測定し、検討を行った。

## 方法

対象は、インフォームドコンセントの得られた慢性ウイルス性肝疾患患者で、慢性肝炎(CH)27例、肝硬変(LC)14例、肝細胞癌(HCC)89例の130例で、34例の健常者を対照とした。白血球中 4-HNE、4-HHE、catalase、SOD-1、GPx-1 及び TRX 量をウエスタンブロット法で測定し、 $\beta$

-actin に対する相対比で表した。また、尿中 8-OHdG 量は ELISA 法にて測定し、各種臨床パラメーターと比較検討した。肝疾患患者肝生検組織を、抗 4-HNE 抗体、抗 4-HHE 抗体、抗 SOD-1 抗体、抗 GPx-1 抗体及び抗 catalase 抗体にて免疫組織化学染色を行った。

## 結 果

白血球中 4-HNE/ $\beta$ -actin は、健常者と比較して肝疾患患者で有意に増加した( $P<0.01$ )。4-HNE/ $\beta$ -actin は AST、ALT と有意に正の相関を認めた(各々 $P<0.01$ )。白血球中 4-HHE/ $\beta$ -actin は、健常者に比較して CH で有意に増加した( $P<0.05$ )。catalase/ $\beta$ -actin 及び SOD-1/ $\beta$ -actin は、健常者に比較して肝疾患において有意に増加が認められた(各々 $P<0.05$ )。脂質過酸化のマーカーと活性酸素消去系蛋白との関係では、4-HNE/ $\beta$ -actin は、それぞれ catalase/ $\beta$ -actin、SOD-1/ $\beta$ -actin と有意に正の相関を認めた(各々 $P<0.01$ )。尿中 8-OHdG は、慢性ウイルス性肝疾患の有無により有意な変動を認めなかった。

免疫組織染色では、肝疾患患者肝組織は、抗 4-HNE 抗体、抗 catalase 抗体及び抗 SOD-1 抗体にて染色された。

## 考 察

脂質過酸化のマーカーである 4-HNE の循環白血球での増加は、慢性ウイルス性肝炎と関連性があると考えられた。脂質過酸化のマーカーとして知られている Malondialdehyde(MDA)が、慢性 C 型肝炎患者では末梢血単核球において増加するとの報告と一致する。慢性ウイルス性肝炎患者の循環白血球での酸化ストレスマーカーの発現増加の理由として以下の二点が考えられる。第一の理由は、循環白血球が肝臓を通過する際にフリーラジカルに曝されることである。肝臓での酸化ストレスの発生が、循環白血球の酸化還元状態に影響を与えていることが考えられる。第二の理由として、肝炎ウイルスがリンパ球に対して直接的に影響し、活性酸素種産生を引き起こすことが考えられる。

SOD-1、catalase、GPx-1 及び TRX などの抗酸化蛋白は、種々の酸化ストレスに対して発現が増強することが知られている。今回、脂質過酸化のマーカーである 4-HNE の増加に伴い、SOD-1、catalase の発現増加が認められ、慢性ウイルス性肝疾患において活性酸素種の産生亢進に応じて、活性酸素消去系の発現が亢進していると考えられた。

循環白血球の 8-OHdG は、慢性 C 型肝炎患者では増加することが報告されている。しかし、今回の尿中 8-OHdG は、慢性ウイルス性肝疾患で増加を認めなかった。

## 結 語

慢性ウイルス性肝疾患の循環白血球中では、脂質過酸化関連物質及び抗酸化蛋白発現量が増加しており、慢性ウイルス性肝炎の病態と酸化ストレスの関連が示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、肝疾患患者における循環白血球中の酸化ストレスマーカーの変動および DNA 酸化障害産物の尿中排泄の意義を慢性ウイルス性疾患患者 130 例について調べたものである。その結果、循環白血球の脂質過酸化マーカーは肝疾患患者で有意に増加しており、酸化ストレスマーカーである活性酸素消去系蛋白群も健常者に比較して有意に増加していることが明らかにされた。本論文の内容は、慢性ウイルス性肝疾患患者では循環白血球が明らかに酸化ストレスを受けていることを証明したもので、慢性ウイルス肝炎の病態に酸化ストレスが深く関連することを示唆するものであり、明らかに学術の水準を高めるものと認める。