

氏名(本籍)	さか くら ゆ き (東京都) 坂 倉 有 紀 (東京都)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 4487 号		
学位授与年月日	平成 19 年 7 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Expression and function of cystine/glutamate transporter in neutrophils (好中球におけるシスチン・グルタミン酸トランスポーターの発現と機能)		
主 査	筑波大学教授	博士(医学)	澁 谷 彰
副 査	筑波大学教授	医学博士	浦 山 修
副 査	筑波大学教授	医学博士	今 川 重 彦
副 査	筑波大学准教授	博士(医学)	竹 越 一 博
副 査	筑波大学准教授	博士(医学)	渡 辺 重 行

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

哺乳類細胞の形質膜上には x_c^- 系というシスチン・グルタミン酸トランスポーターが存在し、細胞外のシスチンと細胞内のグルタミン酸を交換輸送する。 x_c^- 系は xCT と 4F2hc の二つのタンパク質で構成されるが、アミノ酸輸送を行うのは xCT であると考えられている。細胞内に取り込まれたシスチンはシステインへ還元され、生体抗酸化物質であるグルタチオンの合成に寄与する。

好中球は、短命な多形核白血球であり、生体内に細菌などが進入した際に、活性酸素種を産生し殺傷する。好中球自身も炎症部位で強い酸化ストレスに暴露されるため、抗酸化系は自らの防御に重要と考えられているが、好中球における x_c^- 系の存在及び機能についてはよくわかっていない。

本研究では、ヒト及びマウス好中球を用いて x_c^- 系の発現の検討を行った。また、近年作製された xCT 遺伝子欠損マウスを用いて、好中球における x_c^- 系の役割について検討した。

(対象と方法)

ヒトの末梢血から精製した好中球及びマウス腹腔チオグリコレート刺激による腹腔滲出性好中球を用い、xCT 遺伝子の mRNA の発現を RT-PCR 及びノーザンブロッティングにより、シスチン輸送活性 (x_c^- 系活性) をアイソトープ標識シスチンの取り込み測定により検討した。好中球のグルタチオン、システイン量は、蛍光標識後 HPLC により測定した。好中球のスーパーオキシド生成量はホルボールエステル刺激下チトクローム c の還元により測定し、アポトーシスを調べるために、カスパーゼ 3 の活性を測定した。

(結果)

ヒト末梢血由来好中球は xCT 遺伝子の発現及び x_c^- 系活性が認められなかったが、培養によって発現した。好中球の活性化剤であるオプソニン化ゼイモザンやホルボールエステルを添加すると xCT 遺伝子の発

現は誘導された。マウス腹腔滲出性好中球は、採取直後に xCT 遺伝子の発現及び x_c 系活性が認められ、培養によって誘導された。オプソニン化ザイモザンやホルボールエステルの添加で xCT 遺伝子の発現は誘導された。一方、マウス血中好中球は、そのままでは xCT 遺伝子の発現が認められなかった。

xCT 遺伝子欠損マウスの腹腔滲出性好中球の解析を行った。欠損型の腹腔滲出性好中球において、 x_c 系の発現を認めないことを確認した。野生型と比較して、欠損型の腹腔滲出性好中球の細胞内システイン濃度は低い、細胞内グルタチオン濃度に差は認められなかった。培養によって欠損型の細胞内システイン、グルタチオン濃度は急激に低下した。グルタチオン合成の律速酵素である γ GCS 遺伝子は、野生型に比べ欠損型の発現レベルが高かった。また、カスパーゼ 3 の活性は、採取直後の細胞に差は認められなかったが、培養後では欠損型が有意に高かった。スーパーオキシドの生成量は、採取直後の細胞に差は認められなかったが、培養後では欠損型が有意に低かった。

(考察)

ヒト末梢血由来好中球には xCT 遺伝子の発現も x_c 系活性も認められないが、in vitro の培養においては、生体内に比べ酸素分圧が高いため、酸化刺激によって x_c 系活性が発現したことが示唆された。一方、マウス腹腔滲出性好中球は、採取直後に xCT 遺伝子の発現及び x_c 系活性が認められた。腹腔滲出刺激によって、血管から滲出し炎症部位に入った好中球は活性化し、酸化ストレスにさらされたことによって遺伝子が発現し、活性を表すことが示唆された。

xCT 遺伝子欠損マウスの腹腔滲出性好中球の細胞内システイン濃度は、野生型に比べ低下した。野生型では x_c 系が誘導されているのに対し、欠損型では x_c 系が欠損しているために低いことが示唆された。一方、細胞内グルタチオン濃度は同レベルであり、欠損型で γ GCS 遺伝子の誘導レベルが高いために、グルタチオン合成が高まるためと推測された。また、培養によって欠損型の細胞は、有意にアポトーシスが誘導された。欠損型ではグルタチオン濃度が低下したためにアポトーシスが誘導されたことが推測された。スーパーオキシドの生成量は、培養後に欠損型で有意に低下した。スーパーオキシドを産生する酵素である NADPH oxidase の酵素反応にチオール基が必要とされるため、培養によって細胞内グルタチオンが低下した欠損型の細胞で、生成量が低下した可能性が示唆された。

(結論)

x_c 系は、好中球において末梢血中では発現していないが、炎症時に血管から滲出して発現して、シスチンを取り込み、グルタチオン合成に寄与すると考えられる。 x_c 系は、さらなる酸化ストレスにさらされた時に、細胞内グルタチオンレベルを高めて、酸化ストレスから好中球を保護し、細胞死を抑制し、好中球の機能を保持する働きを持つと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、 x_c 系は、好中球において末梢血中では発現していないが、炎症時に血管から滲出して発現して、シスチンを取り込み、グルタチオン合成に寄与する事を明らかにした研究で学術的に価値の高い論文である。よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。