

氏名（本籍）	岡村 和幸（ 埼玉県 ）		
学位の種類	博 士（ 環境学 ）		
学位記番号	博 甲 第 6958 号		
学位授与年月日	平成26年 3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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	無機ヒ素曝露によるリンパ球の G0/G1 期停止とセネッセンスの機序		
主査	筑波大学教授（連携大学院）	学術博士	野原恵子
副査	筑波大学教授	薬学博士	熊谷嘉人
副査	筑波大学准教授（連携大学院）	博士（医学）	小池英子
副査	筑波大学助教	博士（医学）	新開泰弘

論 文 の 要 旨

現在、天然由来の無機ヒ素の摂取による慢性ヒ素中毒が、東南アジアや南米をはじめとする国々で発生し、大きな環境問題となっている。主な症状として皮膚疾患や発癌のほか、免疫抑制が報告されている。これらの被害を防ぐためには無機ヒ素の摂取を抑えることが必要であるが、対策がとられてもなお被害が繰り返し起こっていることから、影響の機序を理解することによって、被害の軽減や予防を可能としていくことが必要と考えられる。

無機ヒ素による免疫抑制の機序の一つとして、リンパ球の増殖抑制作用が報告されている。先行研究では、無機ヒ素がリンパ球において細胞周期を調節する Rb ファミリータンパク質である p130 タンパクを増加させること、増加した p130 タンパクが細胞周期進行に関与する転写因子 E2F の働きを抑え E2F 標的遺伝子の発現を抑制すること、その結果、細胞周期が G0/G1 期で停止し細胞増殖が抑制されることが明らかになっている。そこで本研究では、無機ヒ素によるリンパ球の増殖抑制がいつに始まるかを明らかにするために、無機ヒ素（亜ヒ酸）が p130 タンパクを増加させる分子機序の解明を行った。

p130 増加の機序として、本研究ではリン酸化・ユビキチン化を介したプロテアソーム分解の経路に着目した。マウス B リンパ腫細胞株 A20 細胞に亜ヒ酸を 24 時間曝露することによって増加した p130 は、プロテアソーム阻害剤 MG-132 でタンパク分解を阻害した場合に蓄積する p130 と比較して、リン酸化およびユビキチン化が低下していることが認められた。このことから、亜ヒ酸曝露による p130 の増加は、リン酸化の低下によるプロテアソーム分解の抑制により引き起こされることが考えられた。次に、p130 のリン酸化を制御する cdk4 と複合体を形成し、cdk4 の活性を阻害するサイクリン依存性キナーゼインヒビター (CDKI) に着目し検討を行った。その結果、CDKI の 1 つである p16 タンパク質が亜ヒ酸曝露により増加することが明らかとなった。さらに、亜ヒ酸曝露により増加した p16 は低リン酸化体であり、特にこの低リン酸化 p16 が cdk4 と複合体をつくることが明らかになった。p16 を siRNA でノックダウンすると p130 のタンパク質量が減少したことから、p16 は p130 の量を調節する上流の因子であることが確認された。

以上のことから、無機ヒ素は低リン酸化 p16 を増加させ、低リン酸化 p16 が cdk4 と複合体を形成することによって p130 のリン酸化を阻害し、その結果プロテアソーム分解が抑制されることによって

p130 が蓄積し、蓄積した p130 が G0/G1 期停止をおこす、という、無機ヒ素による細胞増殖抑制の新規機序を見出した。

次に、A20 細胞に対する最大 14 日間の亜ヒ酸曝露の影響を 24 時間曝露の場合と比較した。その結果、長期間亜ヒ酸を曝露した細胞では、p130 がより顕著に増加し、G0/G1 期停止が亢進することが明らかとなった。さらに、長期間亜ヒ酸曝露した細胞では、培地から亜ヒ酸を除いた際の細胞増殖の回復が遅れ、細胞の巨大化や扁平化といった形態学的な変化をおこすことが明らかとなった。これらの特徴は不可逆的な細胞増殖抑制であるセネッセンスと一致しており、セネッセンスのマーカーである SA- β gal 活性も検出された。このことから長期亜ヒ酸曝露によって、リンパ球でセネッセンスがおこることが新たに明らかになった。セネッセンスは DNA 損傷の蓄積により誘導されることが報告されていたため、DNA 損傷修復経路の遺伝子発現を検討したところ、DNA 損傷を誘導する *Aid*, *Apobec1* の発現量が顕著に増加し、DNA 損傷を修復する多くの遺伝子の発現が減少することが明らかとなった。これらの結果から、長期無機ヒ素曝露はリンパ球において DNA 損傷を蓄積し、セネッセンスを誘導する可能性が示された。

審 査 の 要 旨

無機ヒ素の細胞増殖への影響機序としては、これまでに各種シグナル伝達経路の構成因子の発現変化などが報告されてきた。しかしこれまでの報告の多くは、作用経路を断片的に示すものであった。これに対して本研究は、無機ヒ素が細胞増殖制御の上流に位置するサイクリン依存性キナーゼインヒビター p16 をリン酸化レベルで制御することを初めて明らかにし、その p16 が細胞周期を制御する Rb ファミリータンパク質メンバー p130 の量を調節し、リンパ球増殖抑制の実際のエフェクター分子である E2F の機能を制御するという作用経路の全体像を明らかにするために、重要な知見をもたらした。またリンパ球への無機ヒ素の長期曝露が DNA 損傷誘導に関わる酵素群の遺伝子発現を増強し、リンパ球にセネッセンスを誘導するという新規性の高い可能性を示す結果を得た。これらの成果は学術的に極めて高い意義をもつと判断された。

平成 26 年 1 月 29 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（環境学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。