

氏名	伊藤 孝明		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第 8416 号		
学位授与年月	平成 29年 12月 31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	Peroxiredoxin I plays a protective role against UVA irradiation through reduction of oxidative stress. (ペルオキシレドキシニン I は酸化ストレスを減少させることにより UVA 照射に対する防御的役割を果たす)		
主査	筑波大学教授	博士 (医学)	原 尚人
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	松井 裕史
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	佐々木 薫
副査	筑波大学助教	博士 (医学)	新開 泰弘

論文の内容の要旨

伊藤孝明氏の博士学位論文は、マウス胚線維芽細胞 (MEF) を用いて、UVA に対するペルオキシレドキシニン I の細胞の防御的役割の探索を行ったものである。その要旨は以下のとおりである。

(目的)

ペルオキシレドキシニン I (Prx I) は酸化ストレスに防御的役割を果たす抗酸化タンパク質ファミリーの一つである。これまでの研究によりペルオキシレドキシニン(Prx)は H₂O₂ のような過酸化物を除去することにより細胞を酸化障害から保護したり、ラジカル反応を停止するような抗酸化物の重要なファミリータンパク質であることが判明している。また皮膚の UVA 曝露は細胞レベルでの活性酸素種 (ROS)を増やし、脂質やタンパク質及び核酸を傷つけてアポトーシスに導いている。最近の研究によれば、UVA 曝露が ROS を生み出し、結果として細胞内の酸化還元バランスの変化及び p53 のミトコンドリアへの移行を生じることが示されている。しかし Prx I の UVA 刺激に対する役割は不明であった。これに対して著者はペルオキシレドキシニン I ノックアウトマウスから得られたマウス胚線維芽細胞 (MEF)を用いて UVA 刺激による変化に対するペルオキシレドキシニン I の防御的役割について検討した。

(対象と方法)

Prx I ホモ欠損マウス(Prx I (-/-)) (OmniBank, Lexicon Pharmaceuticals, Inc.)及び野生型(Prx I (+/+)) マウスの MEF を 13.5 日 Prx I (-/-) 及び Prx I (+/+) 胎児より製作し対象としている。UVA 照射線量は 325nm 発光波長の FL20SBLB ランプ (Toshiba, Tokyo, Japan) を用い、320 nm 以下の波長はフィルターで遮蔽して UVA を照射しラジオメーター(UVR-305/365; Toshiba, Tokyo, Japan)を用いて測定。細胞の生死の判定は 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay 分析で測定している。アポトーシスは Annexin V-FLUOS Staining Kit(Roche Diagnostic. Co, Tokyo)で処理した後、フローサイトメトリーで評価し、ROS 産生及びミトコンドリア損傷の検出は共焦点レーザ走査顕微鏡(TSC SP2, Leica Microsystems, Tokyo, Japan)を用いて得られた蛍光像より評価している。各遺伝子産物の産生量を評価するためにウェスタンブロット分析ならびに定量的リアルタイム PCR 分析を行っている。

(結果)

著者はまず、Prx I (+/+) 及び Prx I (-/-) MEF に 10J/cm²、12.5 J/cm²、15 J/cm²、17.5 J/cm² の各線量の UVA を照射し、MTT 分析を使用して細胞の生存率を評価したところ Prx I (-/-) MEF では全ての線量で感受性がより高いことを見出した。さらにフローサイトメトリーを用いた分析から、Prx I (-/-) 細胞が UVA 誘導アポトーシスに対してより感受性が高いことを示した。ウェスタンブロットティングでは、p53 の発現は UVA 照射した Prx I (-/-) 及び (+/+) MEF の両者でみられ、更に p53 のベースレベルは Prx I (+/+) MEF に比べ Prx I (-/-) で大幅に高値であったことを示す一方で、Bcl-2 及び Bcl-xL の発現は UVA-処理 Prx I (+/+) MEF に比較して UVA 処理 Prx I (-/-) MEF で大幅に減少したことを示した。

一方著者は、定量的リアルタイム PCR において p21、Noxa、PUMA、及び Bax の mRNA 発現量が Prx (+/+) MEF に比べ Prx I (-/-) MEF で全て増加していることを見出した。DCFH-DA による蛍光シグナルは、UVA の 5 J/cm² 照射をうけた Prx I (-/-) MEF において強く検出され、フローサイトメトリーにより定量化した ROS 生成は Prx I (+/+) MEF と比較して Prx I (-/-) MEF において大幅に増加していた。また、Nrf2 及び Nrf2 制御下にある酸化ストレス誘導タンパク質の発現に対する UVA 照射の影響を検討した結果、ウェスタンブロットティングで Prx I (-/-) MEF において Prx I (+/+) MEF と比較して発現は有意に低い事を示した。HO-1 及び GCLM 遺伝子の発現を定量的リアルタイム PCR で分析した結果 UVA 照射は発現を増加させるも Prx I (-/-) MEF においては Prx I (+/+) MEF と比較して有意に低かった。I κ B のタンパク質発現レベルをウェスタンブロットティングにより調べた結果、Prx I (+/+) MEF における I κ B の発現が UVA 処理後に有意に減少していた。これに対して、Prx I (-/-) MEF における I κ B タンパク質発現はコントロールでも UV 処理細胞においてもほとんど検出されなかった。定量的リアルタイム PCR 分析では UVA 照射は Prx I (-/-) 及び (+/+) MEF の両者において TNF α 及び IL-6 mRNA 発現を引き起こしていた。一方、UVA で誘導された TNF α 及び IL-6 の値は Prx I (-/-) 細胞中で大幅に上昇していたと報告している。

(考察)

著者は Prx I (-/-) MEF は Prx I (+/+) MEF と比較して UVA に対して顕著に感受性が高く、その結果

アポトーシスの誘導が増加することを発見し p53 及び Bax、Noxa、PUMA、及び p21 などの p53 調節アポトーシス促進遺伝子、並びに抗アポトーシスタンパク質の Bcl-2 及び Bcl-xL の発現を調べた結果、Prx I (-/-) MEF におけるアポトーシスの増加は p53 シグナルに関連していることが示唆された、としている。次に著者は Prx I (-/-) MEF 中の UVA 誘導アポトーシスは過剰な酸化ストレスにより生ずると仮定し、ROS レベルを調べたところ、ROS が除去できずに過剰な酸化ストレスの蓄積に至り、アポトーシスが誘導されることがわかったとしている。さらに Nrf2 及び Nrf2-制御遺伝子の UVA による誘導を調べたが、HO-1 及び GCLM の発現レベルは Prx I (+/+) MEF と比較して Prx I (-/-) において減少しており、これにより Prx I (-/-) 細胞において増加した p53 は Nrf2 と相互作用して Nrf2 の標的遺伝子の抑制へと導くという仮説を提唱している。これらの現象について、最近の論文で p21 は Nrf2 のプロテアソーム分解を起こすことが示されたことより、酸化ストレスに対する反応において p53、p21、及び Nrf2 間の相互作用が存在する可能性も考えられた。本研究において、Prx I (-/-) MEF 中の I κ B タンパク質は UV 照射前後ともほとんど検出されなかったことから、Prx I (-/-) MEF のベース状態においては NF κ B シグナル伝達がすでに惹起されている可能性が考えられる、としている。UVA 照射に続いて、TNF α 及び IL-6 の Prx I (-/-) MEF 中における発現は増強されていることから、Prx I (-/-) MEF は炎症反応をおこしやすい素因をもっているか、または Prx I 欠損による炎症反応に関連する他のメカニズムに影響されている可能性があることを考察している。

(結論)

著者は、本論文で Prx I (-/-) MEF は Prx I (+/+) MEF と比較して UVA に対して顕著に感受性が高く、その結果アポトーシスの誘導が増加することを発見した。また、それが、p53 を介するシグナルの異常を介して行われていることを発見した。さらに、炎症性のサイトカインの発現が上昇している事を明らかにした。以上より、UVA 照射に対するアポトーシスに対して Prx I は活性酸素を何らかの形で制御することによって保護的に働いている可能性を考察している。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究では、先行論文で Prx I がシスプラチンに対して検討がなされたことを端緒に、UVA との関連に着目して、UVA 誘導のアポトーシスに対して Prx I が保護的役割を果たすことを明らかにしている。UVA による細胞傷害において Prx I がいかに生体防御に利用されているかを、Prx I ノックアウトマウスという分子生物学的にもっとも正確な方法で証明し、そのメカニズムに迫っていることが評価できる。今回の研究では、p53 シグナル系のアポトーシスを介していること、炎症性のサイトカインに異常が認められることまでは理解されているが、展望としてさらなる Prx I 作用点の検討から、より詳細な UVA に対する PrxI の果たす機序の解明につながることを考えられ、今後の研究にも期待がもてる。

平成 29 年 11 月 8 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論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判断した。

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