

氏 名	原 富次郎
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3149 号
学位授与の日付	平 成 19 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学位論文題目	Cell surface Thioredoxin-1: Possible Involvement in Thiol-Mediated Leukocyte-Endothelial Cell Interaction through Lipid Rafts (細胞膜チオレドキシンは脂質ラフトを通じて、チオール基を介した白血球と血管内皮細胞の接着制御に関与する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 生 田 宏 一 教 授 長 澤 丘 司 教 授 前 川 平

論 文 内 容 の 要 旨

ヒトチオレドキシシン 1 (hTrx-1) は 105 個のアミノ酸によって構成され、その 32 と 35 番目のシステイン (Cys) 残基間の dithiol/disulfide 交換反応による還元活性を有する酸化還元 (レドックス) 調節蛋白である。細胞内 Trx-1 は様々な酸化ストレスにより誘導され、抗酸化作用や細胞内シグナル伝達分子の制御に関与するほか、シグナルペプチドを介さず細胞外へ放出される。これまで遺伝子組換え hTrx-1 (rhTrx-1) 蛋白の投与による、虚血再灌流障害や、抗癌剤およびサイトカインにより誘発される急性肺傷害の抑制などが報告されているが、細胞外 Trx-1 の分子機構については未だ明らかでないところが多い。今回はその分子機構を解析する目的で、以下の検討をおこなった。

hTrx-1 のアミノ酸配列 35 番目の Cys をセリン (Ser) に置換した変異体 (rhTrx-C35S) を作製し、活性化 Jurkat T 細胞の培養液へ 100ng/ml となるよう添加したところ、rhTrx-C35S は速やかにその細胞膜へ結合した。さらに、hTrx-1 はシグナル伝達に関わる分子群が局在する細胞膜マイクロドメインとして知られる脂質ラフト分画に同定された。以上の結果から、rhTrx-C35S は細胞膜の脂質ラフト上の分子を標的として結合し、細胞内に取り込まれることが示唆された。

次に、rhTrx-C35S は活性化 T 細胞だけでなく、他の細胞種でも脂質ラフトを経由して細胞内へ取り込まれるか否かを検討する目的で、常に脂質ラフトを発現しているヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を用いて実験を行った。rhTrx-C35S を HUVECs の培養液へ添加したところ、HUVECs の細胞膜へ結合して細胞内へ取り込まれることを認めた。また、内因性の hTrx-1 は HUVECs の細胞膜上に発現しており、HUVECs 細胞膜の脂質ラフトにも局在することを認めた。以上の結果から、細胞膜上の hTrx-1 は細胞外にある rhTrx-C35S や hTrx-1 の標的分子の一つである可能性が考えられる。

そこで、活性化させたヒト末梢血多核白血球 (PMNs) の HUVECs への接着における細胞膜上 Trx-1 の役割について検討した結果、抗ヒト Trx-1 マウスモノクローナル抗体の投与が、PMNs の HUVECs への接着を阻害することを認めた。更に、rhTrx の投与も抗体同様に、細胞接着を阻害したが、hTrx-1 の 32 と 35 残基 2 つのシステインをセリンに置換してその還元活性を消失させた変異体は、細胞接着を阻害しなかった。以上の結果から、PMNs の HUVECs への接着には細胞膜上 hTrx-1 が関与していることと、その活性部位にある Cys が重要な働きをしていることが示唆された。

本研究において、血管内皮細胞膜上の Trx-1 は、Cys 残基によるレドックス制御を介した炎症応答に関わる重要な標的分子であることが示され、炎症に対する新しい治療標的分子になることが期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

チオレドキシシン (Trx) は還元酵素活性を有する分子量 12kD の蛋白質である。ヒト Trx は成人 T 細胞白血病由来因子としてクローニングされ、細胞外に放出される事が知られている。また、Trx 欠損マウスは胎生致死である事などから、生理的にも重要な分子であると考えられる。

本研究は Trx の血管内皮細胞に対する生理機能を調べる目的で、Trx の基質結合能を維持するが解離せず、還元活性も失

った変異体 (Trx-C35S) を用いて解析を行った。

Trx-C35S は活性化 Jurkat 細胞膜へ結合し脂質ラフトを經由して細胞内へ移行する事、正常な臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) でも細胞膜へ結合して細胞内へ移行する事が示された。又、Trx-C35S は HUVEC 細胞膜上の Trx を標的分子の一つとする事をウェスタンブロットで示した。一方、HUVEC 細胞膜上には Trx が発現する事をフローサイトメトリーで示し、その一部が脂質ラフトに存在する事も示した。更に、LPS 刺激したヒト白血球 (PMN) は HUVEC に接着するが、抗ヒト Trx 抗体や Trx 蛋白は接着を阻害し、Trx の還元活性を消失させた変異体は接着を阻害しなかった。

以上の結果から、活性化リンパ球や血管内皮細胞の細胞膜上には細胞外 Trx の標的分子群が存在し Trx 自身もそれらに含まれる事、血管内皮細胞膜上の Trx が炎症の場での PMN と HUVEC の接着に関与する可能性を示した。

本研究は、細胞膜 Trx 及びチオール基を介した炎症時の白血球遊走過程におけるレドックス制御機構の関与を明らかにするとともに、炎症の新たな治療標的となる分子機構の研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は、博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 19 年 6 月 12 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。