

氏 名	たか しま ゆういちろう 高 島 裕 一 郎
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	論 医 博 第 1729 号
学位授与の日付	平 成 12 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Differential expression of glutaredoxin and thioredoxin during monocytic differentiation. マクロファージの分化過程におけるチオレドキシシンとグルタレドキシシンの発現差についての研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 内 山 卓 教 授 光 山 正 雄 教 授 淀 井 淳 司

### 論 文 内 容 の 要 旨

細胞の活性化におけるシグナル伝達機構には、細胞内で発生する活性酸素とその消去系である抗酸化酵素による細胞内のレドックス環境の形成と維持が極めて重要な役割を持つと考えられている。細胞内の抗酸化機構としては、これまで良く知られたグルタチオンシステムに加えて、チオレドキシシンシステムが関与することが明らかになってきた。チオレドキシシン (TRX) は、レドックス制御タンパク質の一つであり、蛋白質のチオール基に可逆的に作用し、細胞増殖、アポトーシス、遺伝子発現などの種々の細胞機能の調節に重要な役割を果たしている。グルタレドキシシン (GRX) は TRX と類似の活性部位を有するチオレドキシシンスーパーファミリーのひとつで、GSH 依存性に転写因子活性化、HIV-1 ウイルスのプロテアーゼ活性化などに重要な役割を果たしている。GRX は、TRX と同様に基質蛋白の disulfide 結合を還元するほか、GSH 抱合蛋白から GSH を切り離す GSH-disulfide oxidoreductase としても働く。一般に TRX は種々の転写因子を還元し転写活性を亢進させるのに対して、Storz らは大腸菌の OxyR の活性化機構においては GRX が OxyR を還元して転写活性を抑制し、酸化ストレスによりその抑制が解除活性化されると報告している。このように TRX と GRX はともにシステイン基を還元する還元酵素であるが、両者の基質特異性には差があり、従って生体内のシグナル伝達機構も両者による異なるレドックス制御をうけていると推測される。

そこで本研究では、細胞分化過程における活性酸素とレドックス制御分子の役割について解析するため、マウス白血病細胞株 M1 細胞およびヒト白血病細胞株 U937細胞を用いて、マクロファージへの分化過程における、TRX と GRX の変動を Northern blotting および免疫組織染色を用いて解析した。さらに M1 細胞分化過程において、2', 7'-dichlorofluorescein (DCFH) による細胞内過酸化水素量の測定を flow cytometer を用いて行った。Northern blotting の結果、M1 細胞の IL-6 による分化誘導過程において、TRX mRNA は刺激前よりすでに構成的に強発現しており、IL-6 による分化誘導後もその発現は持続した。一方、GRX mRNA は分化前には発現がわずかで分化誘導刺激にともない経時的に顕著に発現の誘導が認められた。免疫組織染色では、M1 細胞において、TRX 蛋白の発現は分化誘導前から強く、分化誘導後も強発現を認めた。一方、GRX 蛋白の発現は、分化誘導前にはわずかで、IL-6 による分化誘導後に発現増強を認めた。また M1 細胞を IL-6 により分化誘導した際、細胞内過酸化水素量の増加を認めた。

ヒト U937細胞においては phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) でマクロファージへ分化誘導する系において、分化とともに GRX mRNA の発現誘導が見られ、TRX mRNA の誘導も増加した。

以上より、マクロファージ分化誘導過程において、1) 細胞内活性酸素量の増加が認められること 2) GRX は顕著な誘導が認められるのに対し、TRX は構成的強発現が認められることが示された (M1 細胞)。これらの結果より、マクロファージ分化に酸化ストレス応答 (レドックスシグナル) が関与するが、TRX と GRX は異なる発現誘導様式を示しており、両者が分化におけるシグナル伝達に異なる役割を持つことが推測された。本研究により、分化誘導におけるレドックス制御機構の関与が明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨

本学位授与申請者は、マクロファージの分化過程においてレドックス制御因子チオレドキシシン (TRX) ならびにグルタレドキシシン (GRX) の変動を解析した。Northern blotting では、IL-6 によるマウス白血病細胞株 M1 細胞分化誘導時、TRXmRNA は分化誘導前後で構成的に強発現しており、GRXmRNA は分化誘導後に経時的に顕著に発現の誘導が認められた。また phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) による U937細胞のマクロファージ分化誘導系においても、分化とともに GRXmRNA の発現誘導が見られ、TRXmRNA の誘導も増加した。免疫組織染色では、M1 細胞において、TRX 蛋白は分化誘導前より分化誘導後にも強発現を認めた。GRX 蛋白は、分化誘導前にはわずかで、分化誘導後に発現増強を認めた。また M1 細胞分化誘導時、latex beads の貪食能の増加および細胞内 peroxide 量の増加を認めた。これらの結果より、TRX と GRX はマクロファージの分化課程において異なる発現誘導様式を示しており、両者の分化におけるシグナル伝達機構の異なる制御様式が推測された。またマクロファージの分化過程において、活性酸素種が発生するとともに TRX や GRX などのレドックス制御因子が発現し、分化におけるシグナル伝達機構はこれらによるレドックス制御を受けていることが示唆された。

以上の研究は細胞分化制御機構の解明に貢献し、新たな細胞分化誘導療法の開発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12年10月26日実施の論文内容とそれに関連した研究分野の試問を受け、合格と認められたものである。