

氏名	植野正也
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2208号
学位授与の日付	平成12年3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	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Thioredoxin-dependent redox regulation of p53 mediated-p21 activation (p53依存性p21活性化におけるチオレドキシシンによるレドックス制御機構に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 武田俊一 教授 野田 亮 教授 山岡義生

論文内容の要旨

チオレドキシシン (TRX) は、細胞内のチオール還元系を構成するレドックス (酸化還元) 制御蛋白で、酸化ストレスを含む各種のストレスで発現誘導され酸化ストレス・細胞組織障害保護作用を示す。細胞内や核内の TRX 標的分子には、ホルモンレセプターや NF- κ B, AP-1 などの転写因子が報告されこれらの TRX によるレドックス制御が注目されている。

抗癌剤耐性や放射線感受性に関与する癌抑制遺伝子 p53 は5つのシステイン残基の酸化還元がその DNA 結合能を制御し、DNA 修復酵素で核内レドックス制御因子である Redox factor-1 (Ref-1) が p53 を活性化させるとの報告も C. Prive らのグループより最近なされた。申請者は、p53 が TRX 標的分子の一員としてレドックス制御を受けるとの仮説の基に TRX と Ref-1 の p53 の活性化に対する作用を解析し以下の結果を得た。

(1) TRX による in vitro p53 DNA 結合能増強

p53 のゲルシフトアッセイを用いた配列特異的 DNA 結合部位への結合能は、TRX 単独で増強されることを証明した。TRX が刺激誘導的に核内へ移行し Ref-1 と結合すると共同研究者らの知見を基に、TRX が Ref-1 による p53 の DNA 結合能を更に亢進することを確認し Ref-1 依存性および非依存性に p53 の DNA 結合能を増強させることを証明した。

(2) 大腸癌細胞株における TRX による p53 依存性 p21 活性化促進

TRX/Ref-1 系の p53 への効果を調べるため、wild type p53 を持たない大腸癌細胞株 WiDr を用い、p21 プロモーター上の p53 responsive element を組み込んだレポーター遺伝子、p53 発現ベクター、TRX 発現ベクターを同時に遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果 p53 と p21 プロモーター上の p53 結合部位の結合が TRX で増強されることが明らかとなった。TRX と Ref-1 遺伝子を同時に導入すると単独群に比べ、相加的に p53 DNA 結合能を増強することも確認した。TRX の活性中心である 32 番と 35 番システイン残基とともにセリン残基に組み替えた変異型 TRX (mTRX) 発現ベクターを高発現させると TRX 及び Ref-1 による p53 特異的 DNA 結合能の増強が抑制されることも証明した。

以上の知見を蛋白レベルで確認するため、TRX・Ref-1 の WiDr 細胞への遺伝子導入による p21 蛋白発現調節を蛋白レベルで確認すると TRX または Ref-1 導入で著明な増強効果を認めた。

(3) 乳癌細胞株における抗癌剤シスプラチナム (CDDP) の TRX 依存性 p53 活性化への関与

癌細胞における TRX 過剰発現と抗癌剤耐性の関係が共同研究者や他の研究者より指摘されている。そこで TRX 依存性 p53 活性化が抗癌剤耐性機構にも関与すると仮説を構築し、CDDP 刺激による TRX 依存性 p53 活性化について解析した。wild-type p53 を持つ乳癌細胞株 MCF-7 で CDDP 刺激による p53 依存性の p21 転写活性増強反応が、mTRX の導入により抑制されることを証明した。これにより、抗癌剤 CDDP 耐性機構に TRX 依存性 p53 活性化が関与することが示された。

以上より TRX は、p 53 依存性 p 21 転写活性を調節することにより細胞周期の G 1 期停止に関わり、抗癌剤や放射線感受性に影響する可能性が示唆された。p 53 が核内 TRX 標的分子の一員であり、p 53/TRX 相互作用の制御が臨床応用へ一助となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

酸化ストレスで発現誘導され、チオール依存性に還元活性により細胞障害保護作用を示すチオレドキン (TRX) は、細胞核内の DNA 修復酵素で核内レドックス制御因子である Ref-1 とともに、NF- κ B, AP-1 などの転写活性を増強することが報告されている。酸化ストレスによる DNA 損傷でひきおこされる G 1 停止や細胞死の誘導に関わる p 53 のシステイン残基の酸化還元状態が、TRX により制御されるかという仮説をたて、p 53 の活性化に対する作用を解析した。

本研究により

- 1) TRX は、wild type p 53 の塩基配列特異的 DNA 結合能を有意に増強させた。
- 2) TRX と Ref-1 は、p 53 依存性の p 21 発現誘導を増強した。
- 3) CDDP 刺激により TRX は、細胞質から核に移行した。
- 4) 実際に、酸化ストレスによる p 53 依存性 p 21 転写活性化に TRX が必要である可能性が示唆された。

これらの知見から TRX は、p 53 依存性 p 21 転写活性化を増強させ細胞組織障害の保護作用に関わる可能性が考えられた。

以上の研究は、p 53 依存性 p 21 活性化機構における TRX の新たな機能の解明に貢献し、癌治療の発展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 2 月 3 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。