

氏 名	近 藤 則 彦
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2697 号
学位授与の日付	平成 16 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 病 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Redox-sensing release of human thioredoxin from T lymphocytes with negative feedback loops (ネガティブフィードバックを伴うヒトチオレドキシンのT細胞からのレドックス応答性分泌)
論文調査委員	(主 査) 教 授 湊 長 博 教 授 内 山 卓 教 授 淀 井 淳 司

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

チオレドキシン (TRX) は細胞内の酸化還元 (レドックス) 状態を調節することにより細胞の恒常性を保つ働きをする代表的な因子である。さらにこの分子は典型的な分泌シグナルのシグナルペプチドをもたないにもかかわらず細胞外に放出されサイトカイン様ケモカイン様作用を示すことが知られている。しかしこの分泌機構およびその制御については明らかになっていない。今回この機構を明らかにするために、TRX および TRX 変異体 (TRX-CS; C32S/C35S) を導入した Jurkat 細胞株を樹立し、酸化ストレスに対する TRX の分泌について検討した。

【結果】

- 【1】 Jurkat 細胞株に TRX-WT (Wild-type) および TRX-CS (C32S/C35S), Vector それぞれを形質転換し、強発現細胞株を樹立した。それらの細胞を 50 μ M 過酸化水素で刺激し、細胞外へ分泌された TRX を解析したところ TRX-WT のみが検出された。変異体である TRX-CS は分泌されなかった。この分泌は、ネクローシスによる漏出でないことも確認された。
- 【2】 次に細胞株を過酸化水素で刺激し (上記と同濃度) アポトーシスを検討したところ、TRX-WT 発現細胞株はコントロール細胞株と比較してカスパーゼ 3 活性が低く、アポトーシスになると増加する sub-G1 群も少なかった。一方、TRX-CS 発現細胞株はコントロール細胞株と比較してカスパーゼ 3 活性は高く、sub-G1 群も増加していることが確認され、TRX 変異体細胞株は過酸化水素により細胞死が更新することが観察された。
- 【3】 TRX を処理することにより過酸化水素による TRX の分泌は、濃度依存的に抑制されることが確認された。さらにこの前処理による TRX 分泌阻害は 37 度では誘起されるが 4 度においては誘起されなかった。また、37 度における TRX の前処理により細胞内の活性酸素種 (ROS) 量を減少することができた。しかしながら 4 度ではその活性は弱いことが観察された。
- 【4】 TRX-CS 発現細胞株に TRX 前処理後、過酸化水素により刺激し、カスパーゼ 3 を測定した。37 度における前処理ではカスパーゼ活性を抑制できたが、4 度ではできなかった。さらにこの TRX-CS 細胞株ではアポトーシスが TRX の前処理により濃度依存的に抑制された。
- 【5】 TRX-WT は時間依存的にとりこまれることが明らかになった。

【考察】

本研究において、TRX は酸化ストレスによりジスルフィド結合依存的に細胞外へ分泌されることが明らかになった。また、この分泌は細胞外 TRX により調節されることが示唆された。この調節機構には、細胞外 TRX が細胞内に取り込まれて作用するのではなく、TRX の細胞膜を介した ROS 産生の抑制作用が一部関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

チオレドキシン (TRX) は細胞内の酸化還元 (レドックス) を介して細胞の恒常性を保つ働きをする代表的な因子である。TRX は様々な酸化ストレスにより典型的な分泌シグナルであるシグナルペプチドをもたないにもかかわらず細胞外に放出されサイトカイン様ケモカイン様作用を示すことが知られている。しかしながら、この放出制御機構については十分に解析されていない。本研究では、酸化ストレスによる細胞内からの TRX 放出制御機構および放出された細胞外 TRX における TRX の生物学的作用について検討した。

本申請者は、TRX-WT (Wild-type) および TRX-CS (C32S/C35S) 遺伝子を Jurkat T 細胞に導入した高発現細胞株を用いた解析により、TRX の過酸化水素による細胞外への放出に活性部位が必要であることを明らかにした。さらに、この放出は、TRX 自身により抑制されるというネガティブフィードバック機構があることを明らかにした。

また、細胞外 TRX の生物学的作用として、過酸化水素による細胞死抑制が観察された。細胞外 TRX はカスパーゼ 3 の活性も抑制し、さらに細胞内の過酸化水素種を減少させることができた。また、細胞外 TRX は、細胞内に取り込まれることも明らかし、多面から酸化ストレスの軽減に作用している可能性が示唆された。

以上の研究は、酸化ストレスによる TRX の放出制御機構を分子レベルで解析しただけでなく、細胞外に放出された TRX が直接、間接的に酸化ストレスに対して防御的に作用していることを明らかにした。これは、酸化ストレスによる疾患に対する TRX の治療法に寄与するところが多い。

したがって、本研究は博士 (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16年1月20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。