

氏 名	白 潔
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2589 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	Critical roles of thioredoxin in nerve growth factor-mediated signal transduction and neurite outgrowth in PC12 cells. (PC12 細胞における神経成長因子によるシグナル伝達と神経突起伸長に対するチオレドキシンの役割)
論文調査委員	(主 査) 教 授 笹 井 芳 樹 教 授 井 出 千 束 教 授 淀 井 淳 司

論 文 内 容 の 要 旨

背景と目的：チオレドキシシン (TRX) は細胞内外の酸化還元 (レドックス) 環境を調節する分子量 12kD の多機能蛋白である。TRX は様々な酸化ストレスにより誘導され、抗酸化作用を示すほか、細胞内のシグナル伝達分子や転写因子の活性制御にも関わっている。

また、TRX は中枢コリン作働性ニューロンの神経栄養因子として報告されたほか、神経細胞保護活性を有することも知られている。本研究においては、神経細胞の分化・再生における TRX の役割を解析することを目的とした。

結果：(1)神経成長因子 (NGF) をラット褐色細胞腫由来神経細胞株 PC12 細胞に投与すると、TRX が蛋白及び mRNA レベルで誘導された。この誘導が TRX 遺伝子のプロモーターのどの領域を介しているかを解析するため、プロモーター領域の種々の変異体を作製しルシフェラーゼアッセイにより解析したところ、cAMP-responsive element (CRE) を含む -263 から -217 の領域に NGF 反応部位が存在することが判明した。この CRE に変異を挿入した場合には NGF による TRX 遺伝子発現は消失し、さらにゲルシフトアッセイで、NGF により CRE に CRE 結合蛋白 (CREB) の結合を認めた。これらの事より TRX 遺伝子の NGF による発現誘導には CRE を介した調節機構が重要であることが明らかになった。

(2)TRX が様々な刺激により核移行し、核へのシグナル伝達に重要な役割を果たしていることが報告されている。今回、NGF によるシグナル伝達においても TRX の核移行を証明した。また、NGF のシグナル回路には MAP kinase kinase (MEK) が関連していると報告されているので TRX 遺伝子発現及び核移行は MAP kinase kinase (MEK) 阻害剤である PD98059 の影響を検討したところ、両者共抑制された。したがって、NGF による TRX の誘導および核移行には MAP kinase が関与することが明らかになった。

(3)次に、TRX が NGF による神経突起伸長作用と NGF によるシグナル伝達調節に関与している可能性を検討した。TRX の活性部位のシステインをセリンに置換し還元活性を無くした変異 TRX (32S/35S) の強制発現あるいは TRX のアンチセンスベクターの導入により、NGF による PC12 細胞の神経突起伸長が阻害された。また変異体 TRX (32S/35S) の導入により NGF による CRE 依存性 c-fos 遺伝子発現が阻害された。以上の結果より、TRX は NGF による神経細胞活性化・分化のシグナル伝達機構において必須な役割を演じていると考えられた。

考察：TRX を用いた神経細胞の分化・再生促進作用の再生医学への応用、さらには変性神経疾患への臨床応用への可能性が期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

チオレドキシシン (thioredoxin; TRX) は細胞内外の酸化還元 (レドックス) 環境を調節する分子量 12kD の多機能蛋白である。TRX は様々な酸化ストレスにより誘導され、抗酸化作用を示すほか、細胞内のシグナル伝達分子や転写因子の活性制御にも関わっている。また、TRX は中枢コリン作働性ニューロンの神経栄養因子として報告されたほか、神経細胞保

護活性を有することも知られている。しかしその機構はまだ明らかではない。

本研究においては、神経成長因子 NGF による神経突起の伸長における TRX の役割を解析することを目的とした。

本申請者はラット褐色細胞腫由来細胞株 PC12 細胞を用いて、NGF による TRX の誘導機構を調べた。TRX の誘導には TRX 遺伝子調節領域の cyclic AMP responsive element (CRE) を介した制御機構が重要であることを明らかにした。また、TRX の活性中心の変異体の発現ベクターや TRX の antisense vector を用いて、TRX が NGF による神経突起伸長作用と NGF によるシグナル伝達機構において必須な役割を演じている結果を明らかにした。

以上の研究は、NGF による神経細胞活性化・分化のシグナル伝達の解明に貢献し、さらに TRX を用いた神経細胞の分化・再生促進作用の再生医学への応用、さらには変性神経疾患などへの臨床応用への可能性に寄与するところが多い。従って、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、本学位授予申請者は平成15年2月19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。