

論文要旨

学位論文題目 正常ヒト線維芽細胞 HUC-F2 における酸化ストレス耐性メカニズムの解析
～NR4A1 は酸化ストレス応答遺伝子か？～

清水 友里

活性酸素種による酸化ストレスはDNAなどの生体高分子を酸化し障害を与える。酸化ストレスにより抗酸化酵素の発現が促進されるとされるが、酸化ストレスによって誘導される遺伝子の中には未だ機能が知られていない遺伝子も多く存在する。本研究の目的は正常ヒト線維芽細胞 HUC-F2 を用いて酸化ストレスに対する生体の適応のメカニズムを、細胞の遺伝子発現制御に注目して明らかにすることである。

はじめに、酸化ストレスに反応する遺伝子について、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。過酸化水素添加群でコントロール群と比較して2倍以上に発現した遺伝子を抽出し、その中でリガンドが同定されていないオーファン受容体の一種である NR4A1 遺伝子に着目した。

NR4A1 は、これまでに細胞増殖や細胞生存、アポトーシスに関わると報告されてきた。NR4A1 の発現はそれぞれの細胞でさまざまな刺激により誘導され、多くの細胞株において、刺激を受けるとミトコンドリアに移行してシトクロム c を放出させることにより、アポトーシスを引き起こす引き金となると報告されている。その一方で、NR4A1 はセラミドや腫瘍壊死因子(TNF)により誘導されて細胞死を防ぐと言う報告もある。この矛盾した報告が示すように、NR4A1 が刺激に対して抗アポトーシス作用もしくはアポトーシス促進の作用を示すメカニズムはまだ明らかになっていない。

また、NR4A1 は酸化ストレスに対して、心筋細胞において虚血再灌流障害による酸化ストレスでミトコンドリアに移行してシトクロム c を放出させることにより、アポトーシスを引き起こしたという報告があるが、NR4A1 と酸化ストレスに関する研究は限られていた。これを明らかにすることは酸化ストレスに対する適応機能のメカニズムを解明することにつながると考えられる。

NR4A1 の働きを知るために、RNAi 法で NR4A1 遺伝子の発現抑制を行った。siRNA 試薬添加48時間後に過酸化水素を添加し、酸化ストレスに対する応答を検討した。100、200、300 μM の過酸化水素添加24時間後の細胞増殖を MTT assay 法で測定したところ、100、200 μM でコントロール (si-NC) 群と比較して NR4A1 遺伝子発現抑制 (si-NR4A1) 群の細胞増殖が抑制される傾向が見られ、300 μM で有意に抑制された。このことから NR4A1 遺伝子は酸化ストレスから細胞死を防ぐ役割をしていると考えられる。このことから、NR4A1 が抗アポトーシスの働きをしているのではないかと考え、NR4A1 が酸化ストレスの刺激に対して HUC-F2 細胞においてどのような働きをしているのかを明らかにするために、フローサイトメトリー (FACS) で NR4A1 遺伝子ノックダウン細胞のアポトーシスについて解析を行った。HUC-F2 細胞に si 試薬添加48時間後、過酸化水素 200 μM に2時間暴露して FACS によるアポトーシス

細胞の測定を行ったところ、過酸化水素添加時の初期のアポトーシス細胞の割合が si-NR4A1 群において si-NC 群と比較して有意に上昇した。この結果から、NR4A1 は抗アポトーシス作用を持つことが示唆された。

アポトーシスはカスパーゼカスケードに依存して誘導される。アポトーシスを誘導するストレスにはさまざまな種類があるため、それを感知するための機構もいくつか分散され、細胞には複数の異なるカスパーゼカスケードが存在している。NR4A1 がどのカスケードにおいて作用しているのか明らかにするためにカスパーゼ活性の測定を行った。HUC-F2 細胞に si 試薬添加後、過酸化水素 200 μ M に 2 時間暴露してカスパーゼの活性を測定したところ、過酸化水素添加時に、si-NC 群と比較して si-NR4A1 群のカスパーゼ-8 と-3 の活性が有意に上昇し、カスパーゼ-9 の活性に有意な差は見られなかった。この結果から、si-NR4A1 群において、デス受容体を介する外因性経路の代表的なカスパーゼであるカスパーゼ-8、その下流にあるカスパーゼ-3 の活性が有意に上昇したことから、NR4A1 は外因性経路によるアポトーシスを抑制することが示唆された。

本研究は通常生体内に存在するとされる 200 μ M 程度の過酸化水素による刺激で NR4A1 がカスパーゼ-8 の活性を抑制することにより、主に外因性経路によるアポトーシスを抑制することを HUC-F2 細胞を用いて初めて明らかにしたものである。