The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Thioredoxin reductase gene expression by peroxynitrite in human umbilical vein endothelial cells
Author(s)	朴, 用軾
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43727
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【23】

氏　　名	朴（ぼく）　用（よん）　軾（しく）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16820　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学　位　論　文　名	Thioredoxin reductase gene expression by peroxynitrite in human umbilical vein endothelial cells （ヒト臍帯血管内皮細胞における peroxynitrite によるチオレドキシン還元酵素遺伝子の発現）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　谷口　直之 （副査） 教　授　多田　道彦　　教　授　岡本　光弘

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

一酸化窒素（NO）は血管拡張、神経伝達など多彩な生理作用を有するが、過剰産生されるとスーパーオキサイドと反応し、酸化力の強いペルオキシ亜硝酸（peroxynitrite）が合成される。peroxynitrite は各種生体分子を酸化、ニトロ化し、生体に酸化ストレスを与え、特に血管系では動脈硬化や炎症などに関与していると考えられている。一方、血管内皮細胞は酸化ストレスに対して強い耐性を持つこと、酸化ストレスによる障害がセレン（selenium）によって保護されることが報告されている。活性中心にセレノシステインを有するセレン含有タンパク質には、抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼやチオレドキシン還元酵素（TR）がよく知られている。さらに TR は、ヒト臍胎血管内皮細胞に多く存在する。そこで本研究は、血管内皮細胞において TR が peroxynitrite による酸化ストレス抵抗性に重要な役割を担っているか否かを検討した。

【方法ならびに成績】

ヒト胎盤から TR を精製し、in vitro における peroxynitrite の TR に対する影響を検討した。その結果、peroxynitrite ドナーである SIN-1（3-(4-morpholinyl)sydonimine hydrochloride）と peroxynitrite は TR 活性を濃度依存的に阻害し、その阻害は不可逆的であった。

つぎに血管内皮細胞をヒト臍胎より単離、継代培養し、そのヒト臍帯血管内皮細胞内の TR 活性が peroxynitrite によって阻害されるか否かを検討した。その結果、細胞内でも SIN-1（1 mM）によって TR 活性が阻害された。しかしいったん低下した TR 活性は24時間後には peroxynitrite 刺激前のレベルに回復した。in vitro における TR 活性の阻害が不可逆的であったことから、TR が新たに誘導された可能性が示唆された。そこで SIN-1や peroxynitrite をヒト臍帯血管内皮細胞に添加し、TR 遺伝子の発現をノーザンブロット法により検討した。その結果 SIN-1や peroxynitrite の添加により TR の mRNA レベルが 6 時間後から著明に上昇した。さらにウェスタンブロット法により TR のタンパク質レベルも SIN-1及び peroxynitrite 濃度依存的に上昇することが認められた。

peroxynitrite による TR の発現誘導は、活性酸素の消去剤である N-acetylcysteine をヒト臍帯血管内皮細胞に前処理することにより抑制された。そのことより peroxynitrite により TR が不活性化され、細胞内の酸化ストレスが上昇することにより、TR 遺伝子が誘導されたことが示唆された。さらにアクチノマイシンDやシクロヘキシミドを

添加するとTRの発現誘導が抑制されることから、peroxynitriteによるTRの発現誘導にはtranscriptional activationが必要であることが示唆された。また、COS-1細胞とヒト肺癌細胞であるA549細胞を用いてperoxynitriteによるTRの発現を調べた結果、それらの細胞ではTRの発現誘導が認められなかった。従ってperoxynitriteによるTRの発現誘導はヒト臍帯血管内皮細胞に特異的であることが示唆された。

【総括】

精製したTRにおいてもヒト臍帯血管内皮細胞内においてもperoxynitriteによってTRの活性が低下した。しかし、ヒト臍帯血管内皮細胞ではperoxynitriteによって低下したTR活性が24時間後には回復した。そのメカニズムとして、peroxynitrite添加によりヒト臍帯血管内皮細胞に酸化ストレスが引き起こされ、それが刺激となり、6時間後からTR mRNAならびにTRタンパク質が発現誘導されることが明らかとなった。COS-1細胞やA549細胞ではこのようなTR発現誘導は認められなかった。以上の結果より、ヒト臍帯血管内皮細胞はTR発現を介した酸化ストレスに対するユニークな保護メカニズムを有していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

一酸化窒素（NO）は血管拡張、神経伝達など多彩な生理作用を有するが、過剰産生されるとスーパーオキサイドと反応し、酸化力の強いペルオキシ亜硝酸（peroxynitrite）が合成される。peroxynitriteは各種生体分子を酸化、ニトロ化し、生体に酸化ストレスを与え、特に血管系では動脈硬化や炎症などに関与している。一方、血管内皮細胞は酸化ストレスに対して強い耐性を持つこと、酸化ストレスによる障害がセレンによって保護されることが報告されている。本研究は、血管内皮細胞においてセレン含有タンパク質であるthioredoxin reductase（TR）がperoxynitriteによる酸化ストレス抵抗性に重要な役割を担っているか否かを検討した。精製したTRにおいてもヒト臍帯血管内皮細胞内においてもperoxynitriteによってTRの活性が低下した。しかし、ヒト臍帯血管内皮細胞ではperoxynitriteによって低下したTR活性が24時間後には回復した。そのメカニズムとして、peroxynitrite添加によりヒト臍帯血管内皮細胞に酸化ストレスが引き起こされ、それが刺激となり、6時間後からTR mRNAならびにTRタンパク質が発現誘導されることが明らかとなった。COS-1細胞やA549細胞ではこのようなTR発現誘導は認められなかったことから、ヒト臍帯血管内皮細胞はTR発現を介した酸化ストレスに対するユニークな保護メカニズムを有していることが示唆された。本研究は酸化ストレス保護メカニズムの解明に寄与するもので、博士の学位論文に値するものと認められる。