

学 位 論 文 要 旨

博士課程 ①・乙	第 35 号	氏 名	山口 優也
[論文題名]			
Arsenic acid inhibits proliferation of skin fibroblasts, and increases cellular senescence through ROS mediated MST1-FOXO signaling pathway (英文題名)			
The Journal of Toxicological Sciences, in press			
ヒ酸は皮膚線維芽細胞の増殖を阻害し、ROS を介した MST1-FOXO シグナル伝達経路を通じ細胞老化を増加させる (邦文題名)			
[要 旨]			
<p>ヒ素に汚染された地下水の飲料によるヒ素中毒は、インドやバングラデシュなど発展途上国で公衆衛生上問題となっている。自然界に存在するヒ素は大気、土壌、および水に存在する天然金属鉱物であり、単体としてのヒ素、無機及び有機ヒ素化合物に分類され、無機ヒ素化合物は強い毒性を有する。ヒ素中毒作用の一つとして皮膚に対する障害、例えば色素異常、角化症、およびボーエン病などを引き起こすとされている。一方で、無機ヒ素化合物は中医学で抗ガン剤として使われてきた。近年、<i>in vitro</i> の研究においては白血病細胞に対してアポトーシスを誘導させることや、肺癌細胞の細胞増殖を阻害することが報告されている。ヒ素は細胞内の reactive oxidative species (ROS) を上昇させ、DNA への酸化ストレスを増加させることが知られているが、ヒ素による細胞増殖阻害の分子メカニズムは十分明らかにされていない。そこで、申請者はマウス皮膚線維芽細胞 (m5S) を用いて、無機ヒ素化合物の一種であるヒ酸による細胞増殖阻害に関わる分子メカニズムを調べた。まず、ヒ酸 (0.5, 1.0, 5.0, 7.5, 10 ppm) 添加 16 時間後の細胞増殖への影響を MTT assay で測定したところ、10 ppm ヒ酸添加における細胞数が対照群に比べ有意に減少していた。さらに、10 ppm ヒ酸添加における経時的な細胞数を調べたところ、細胞数は最初に播種した細胞数と変化がなかった。このことから、ヒ酸 (0.5, 1.0, 5.0, 7.5, 10 ppm) 添加 16 時間後の細胞毒性を LDH assay で測定したところ、添加群は対照群と比較して差がなかったことから、この添加濃度においては細胞死ではなく細胞増殖を阻害することが分かった。次に、ヒ酸 (0.5; 1.0, 5.0, 7.5, 10 ppm) 添加 16 時間後の細胞内 ROS の変化を測定したところ、ヒ酸添加濃度依存的に上昇し、1.0 ppm 以上で有意だった。そこで、m5S 細胞の DNA への酸化ストレスを調べるために、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG を検出しところ、10 ppm ヒ酸添加により 8-OHdG 陽性細胞が対照群の約 3 倍に有意に増加していた。ROS は様々なシグナル伝達経路に関与し、その経路の一つに serine/threonine kinase Akt (Akt) がある。さらに、Akt 経路の下流の一</p>			

つに Forkhead box O (FOXO) transcription factors である FOXO1 や FOXO3a がある。FOXO はアポトーシス、細胞増殖、代謝および老化といった生理的、または腫瘍形成など様々な病理的な現象に関わっている。FOXO の細胞内の局在は FOXO の活性化や機能を調節する上で重要である。FOXO が Akt によるリン酸化を受けると FOXO は核外へ移行し、ターゲット遺伝子の転写活性を阻止する。反対に、酸化ストレス条件下では mammalian Ste20-like protein kinase (MST1) が FOXO1 の ser212 や FOXO3a の ser207 をリン酸化すると FOXO1 や FOXO3a は核内へ移行しターゲット遺伝子の転写活性を促進する。ゆえに、western blotting で Akt と MST1 のリン酸化を調べたところ、Akt のリン酸化は低下し、MST1 のリン酸化は上昇していた。そこで、FOXO1 や FOXO3a の細胞内局在を蛍光免疫染色法で調べたところ、核内に発現していることが確認できた。さらに、核抽出タンパク質を western blotting で調べたところ、FOXO1 及び FOXO3a が有意に増加していた。FOXO1 や FOXO3a の核内移行は細胞増殖や老化に関与しているとの報告があり、細胞周期の変化を調べた。FACS 解析を行った結果、G1 期は有意に減少し、G2/M は有意に増加していたが、S 期には変化がなかった。この FACS 解析の結果から細胞老化が強く疑われ、senescence β -galactosidase staining kit を用いて細胞老化を確認したところ、添加群は対照群と比較して多くの細胞が陽性に染まり、ヒ酸添加により細胞老化へ導かれていることが分かった。

以上のことから、ヒ酸添加による細胞増殖の阻害は、細胞内 ROS 上昇に伴う酸化ストレスが MST1-FOXO シグナル伝達経路を活性化し、細胞周期を変化させ細胞老化へ導いた結果であると考えられる。

備考 論文要旨は、和文にあつては 2, 000 字程度、英文にあつては 1, 200 語程度とする。