

(書式12)

氏名	あんどう まさかつ 安藤 正勝
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	2020年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	生理的酸素条件下のマクロファージにおける NRF2 機能の検討
論文審査委員	主査 教授 一ノ瀬 正和 教授 黒澤 一 教授 本橋 ほづみ 教授 宇佐美 修

論文内容要旨

NRF2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2; NFE2L2)は生体の酸化ストレス応答において重要な役割を担っている。NRF2 は非刺激状態では KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) と結合することによりユビキチン化を受け、ポリユビキチン化された NRF2 はプロテアソームで分解されるため、通常状態では NRF2 の機能が抑制されている。一方で、細胞が酸化ストレスや親電子性を有する化学物質に曝露されることで、NRF2 の活性化が誘導され、分解を免れた NRF2 は核内へ移行し、抗酸化酵素や解毒代謝酵素などの生体防御に関わる多数の遺伝子発現を誘導する。NRF2 は上述のような抗酸化作用を発揮することに加え、強い抗炎症作用を有する。NRF2 の抗炎症作用の機序については、酸化ストレス防御に関連する遺伝子発現の上昇による細胞保護効果を介した間接的な作用、炎症性サイトカイン遺伝子の転写に直接影響を及ぼしていることなどが知られている。更に NRF2 の活性化はマクロファージの貪食能や殺菌能を改善する作用が報告されているが、殺菌能の改善についての機序に関しては明らかとなっていない。本研究は「室内気下酸素条件と生理的酸素条件で分化、培養した際にマクロファージの機能が異なる」ことを一つの仮説とした。更に、「生理的酸素条件ではマクロファージにおける NRF2 に対する応答に変化が生じる」ことを二つ目の仮説として検討を行った。RNA-seq (RNA sequencing; RNA シーケンシング) の結果では、生理的酸素条件において、Lysosome, Oxidative phosphorylation, Ribosome の pathway が上昇することを確認した。また生理的酸素条件において、骨髄球系細胞特異的 Keap1 コンディショナルノックアウトマウス(Keap1^{F/F::LysM-Cre}; Keap1-MKO)および Nrf2 完全欠損マウス(Nrf2^{-/-}; Nrf2-KO)から作成した BMDM (bone marrow derived macrophage; 骨髄由来マクロファージ) サンプルを比較した結果、種々の pathway の変化が確認されたが、この中においても Lysosome pathway が NRF2 の活性の上昇によって、発現が上昇することが示唆された。その中で ATP (adenosine triphosphate; アデノシン三リン酸) を分解して水素イオンをリソソーム内に取り込む働きを行う、液胞型プロトン ATPase の遺伝子に着目して検討した。室内気下酸素条件よりも生理的酸素条件において発現が上昇している遺伝子、かつ生理的酸素条件において Nrf2-KO BMDM よりも Keap1-MKO BMDM で上昇する遺伝子を検討したところ、Atp6v0d2, Atp6v1e1, Atp6v1h が該当した。更にその中で、既報の ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation sequencing; クロマチン免疫沈降シーケンシング) の結果を用いて解析したところ、Atp6v0d2 遺伝子の近傍に NRF2 の結合ピークがあり、NRF2 が遺伝子発現に直接作用していると考えられる。生理的酸素条件では、NRF2 の活性化によって、液胞型プロトン ATPase の発現上昇により、リソソーム内の pH 調整に寄与していることが示唆された。

審査結果の要旨

博士論文題目 生理的酸素条件下のマクロファージにおけるNRF2機能の検討

所属専攻・分野名医科学専攻.....呼吸器内科学分野.....

学籍番号 B6MD5012 氏名 安藤 正勝

Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2) は生体の酸化ストレス応答において重要な役割を担っている。NRF2 は非刺激状態では Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) と結合することによりユビキチン化を受け、ポリユビキチン化された NRF2 はプロテアソームで分解されるため、通常状態では NRF2 の機能が抑制されている。一方で、細胞が酸化ストレスや親電子性を有する化学物質に曝露されることで、NRF2 の活性化が誘導され、分解を免れた NRF2 は核内へ移行し、抗酸化酵素や解毒代謝酵素などの生体防御に関わる多数の遺伝子発現を誘導する。NRF2 は上述のような抗酸化作用を発揮することに加え、強い抗炎症作用を有する。NRF2 の抗炎症作用の機序については、酸化ストレス防御に関連する遺伝子発現の上昇による細胞保護効果を介した間接的な作用、炎症性サイトカイン遺伝子の転写に直接影響を及ぼしていることなどが知られている。更に NRF2 の活性化はマクロファージの貪食能や殺菌能を改善する作用が報告されているが、殺菌能の改善についての機序に関しては明らかとなっていない。そのため、「室内気下酸素濃度で培養したマウスの骨髄由来マクロファージと生理的通常酸素条件下で培養したマクロファージを比較し、酸素濃度での差異を検討する」とこと、「生理的通常酸素条件下における NRF2 の活性化および欠損によるマクロファージの差異を比較することにより、生理的な条件下において、NRF2 がマクロファージに及ぼす影響を検討する」ことを目的として本研究を施行した。

RNA-seq の結果では、野生型の骨髄由来マクロファージでは、LPS 投与から 8 時間以降の炎症の比較の後期において、酸素濃度が遺伝子発現に影響を及ぼしていることが明らかとなり、その中でも Oxidative phosphorylation 関連の遺伝子発現が上昇していた。更に LPS 投与前と投与 24 時間後を比較すると、20%酸素濃度ではミトコンドリアの膜電位には変化はなかったが、5%酸素濃度ではミトコンドリアの膜電位の脱分極が亢進していた。更に 5%酸素濃度で NRF2 活性化状態による、LPS 投与後の膜電位を検討したところ、NRF2 の活性化に対応するように、LPS 投与 24 時間後のミトコンドリアの膜電位の脱分極が亢進した。生理的通常酸素条件下における NRF2 活性化による LPS 誘導性の遺伝子発現を検討した結果、Lysosome 関連遺伝子の発現が NRF2 の活性化に応じ上昇すること、その中でも液胞型プロトン ATPase の発現が上昇していることが明らかとなった。これらの結果から、生理的通常酸素条件下の炎症の後期において、NRF2 は酸化的リン酸化による ATP 産生の亢進および液胞型プロトン ATPase の発現上昇による相乗的な作用により、ライソゾーム内の pH の維持に寄与していることが示唆された。

よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。