

氏 名 おかだ しゅうこ 岡田 修子

学位の種類 博士 (医学)

学位授与年月日 平成 22 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 抑制性転写因子 **Bach1** による **HO-1** 発現制御を介した表皮細胞での酸化ストレス応答

論文審査委員 主査 教授 相場 節也
教授 篠澤 洋太郎 教授 井樋 栄二

論文内容要旨

生物は環境の変化を受容し、その変化に対応して生体の恒常性を維持している。特に表皮細胞は、生体の最外層で常に外界と接しており、紫外線や化学物質などの様々なストレスに直接暴露されている。ストレスによって炎症性サイトカインの惹起、DNA の損傷などが生じ、様々な皮膚疾患、皮膚老化につながる。私は酸化ストレスにさらされた際に生じる反応機序を抑制性転写因子 **Bach1** に注目して解析を行った。

マウス表皮細胞を培養し、細胞中の **Bach1** の発現量を増減させることで **Bach1** の働きを解析した。

Bach1 は **MARE** を持った配列に結合して転写を抑制的に制御した。さらに **HO-1** の転写調節領域の **MARE** に直接に結合していた。次に表皮細胞において、**Bach1** 遺伝子を配列特異的 **siRNA** を使って減少させた表皮細胞、さらに **Bach1** ノックアウトマウスの表皮細胞を用いて解析を行った。酸化ストレス負荷により、**HO-1** は通常よりさらに発現亢進を示した。**HO-1** は抗酸化作用があるが、細胞中の **ROS** はコントロールと比較して減少はなかった。一方、アデノウイルスベクターを用いて **Bach1** を過剰発現させると、酸化ストレスを加えても表皮細胞では **HO-1** の誘導が生じず、**HO-1** 機能不全の状況が作られた。この状況下では、細胞内 **ROS** が増加していた。また **HO-1** は、表皮細胞の分化の過程でも誘導される。分化に伴った **HO-1** の発現にも **Bach1** が作用しているか調べた。分化に伴った **MARE** 領域の活性化はみられなかった。さらに分化の過程において **Bach1** を過剰発現しても、**HO-1** の発現誘導の抑制は生じなかった。分化における **HO-1** の発現調節に関しては、**Bach1** 以外の因子が関与している可能性が高いことが分かった。

以上の私の解析から **Bach1** は酸化ストレスに対応して **HO-1** が誘導される機序を転写レベルで負に制御していることが明らかになった。この際、**Bach1** の発現が低下すると **HO-1** の発現が亢進するが、活性酸素量に変化しないのは、細胞内のヘムの量が限られているためかもしれない。**HO-1** は表皮細胞の分化に伴っても発現するが、分化に伴う誘導は **Bach1** に依存しないと思われた。

審査結果の要旨

博士論文題名.....抑制性転写因子 Bach1 による HO-1 発現制御を介した表皮細胞での酸化ストレス応答.....

所属専攻・分野名内科学.....専攻.....皮膚科学.....分野.....

氏名岡田 修子.....

研究の要旨: 表皮細胞は、生体の最外層で常に外界と接しており、紫外線や化学物質などの様々なストレスに直接暴露されている。この報告は、酸化ストレスにさらされた際に生じる反応機序を抑制性転写因子 Bach1 に注目して解析を行った。マウス表皮細胞を培養し、細胞中の Bach1 の発現量を増減させることで Bach1 の働きを解析した。

Bach1 は MARE を持った配列に結合して転写を抑制的に制御した。さらに HO-1 の転写調節領域の MARE に直接に結合していた。次に表皮細胞において、Bach1 遺伝子を配列特異的 siRNA を使って減少させた表皮細胞、さらに Bach1 ノックアウトマウスの表皮細胞を用いて解析を行った。酸化ストレス負荷により、HO-1 は通常よりさらに発現亢進を示した。HO-1 は抗酸化作用があるが、細胞中の ROS はコントロールと比較して減少はなかった。一方、アデノウイルスベクターを用いて Bach1 を過剰発現させると、酸化ストレスを加えても表皮細胞では HO-1 の誘導が生じず、HO-1 機能不全の状況が作られた。この状況下では、細胞内 ROS が増加していた。

また HO-1 は、表皮細胞の分化の過程でも誘導される。分化に伴った HO-1 の発現にも Bach1 が作用しているか調べた。分化に伴った MARE 領域の活性化はみられなかった。さらに分化の過程において Bach1 を過剰発現しても、HO-1 の発現誘導の抑制は生じなかった。分化における HO-1 の発現調節に関しては、Bach1 以外の因子が関与している可能性が高いことが分かった。

以上から Bach1 は酸化ストレスに対応して HO-1 が誘導される機序を転写レベルで負に制御していることが明らかになった。この際、Bach1 の発現が低下すると HO-1 の発現が亢進するが、活性酸素量に変化しないのは、HO-1 の基質である細胞内のヘムの量が限られているためかもしれないと考察される。HO-1 は表皮細胞の分化に伴っても発現するが、分化に伴う誘導は Bach1 に依存しないと思われた。

斬新さ: 従来の Bach1 ノックアウトマウスを用いた解析では、Bach1 を欠損させることが抗酸化物質として重要な働きをする HO-1 の発現が亢進し、酸化ストレスによる組織障害が軽減する。疾患の治療的側面から Bach1 を欠損させることが、細胞組織の酸化ストレス耐性を高め、生体にとって好ましいことだと考えられている。過去の報告とは異なり、通常の表皮細胞においては、Bach1 の欠損および HO-1 の高発現が必ずしも有益ではないことを報告した最初の報告である。

重要性: 表皮細胞においても酸化ストレス応答において Bach1 が HO-1 を負に制御していることを転写レベルで明らかにした。今までに、アトピー性皮膚炎や尋常性乾癬といった炎症性皮膚疾患で、病変部の HO-1 発現増加が報告されている。通常の表皮細胞においては、HO-1 の高発現は有益ではないことが示されたが、酸化ストレスが関与するアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患レベルにおいて Bach1 およ

びHO-1がどのような働きをするのか、この研究のように通常の細胞における解析を踏まえた上で、今後の疾患レベルにおける研究につながる報告だと考えられる。

実験方法の正確性: 実験は周到に練られた計画のもとに行われ、再現性、正確性が高いと考えられる。通常の表皮細胞、siRNAによるBach1 ノックダウン、Bach1 ノックアウトマウスを用いた解析、アデノウイルスベクターを用いたBach1 の過剰発現など、様々な material を用いて実験しており、多角的に信頼性の高い研究である。

表現の明瞭さ: これまでの問題点を明確に指摘し、研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考ええる。

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。