

|          |   |        |          |
|----------|---|--------|----------|
| 氏名(生年月日) | スズ<br>鈴   | キ<br>木 | カツラ<br>桂 |
| 本籍       |   |        |          |
| 学位の種類    | 博士(医学)  |        |          |
| 学位授与の番号  | 甲第439号  |        |          |
| 学位授与の日付  | 平成20年2月15日  |        |          |
| 学位授与の要件  | 学位規則第4条第1項該当(医学研究科専攻, 博士課程修了者)  |        |          |
| 学位論文題目   | Phosphorylation of p53 at serine 15 in A549 pulmonary epithelial cells exposed to vanadate: Involvement of ATM pathway<br>(バナジウムによる A549 肺胞上皮細胞の p53 Ser15 リン酸化: ATM 経路の関与) |        |          |
| 主論文公表誌   | Toxicology and Applied Pharmacology 第220巻 83-91頁 2007年  |        |          |
| 論文審査委員   | (主査) 教授 松岡 雅人<br>(副査) 教授 小田 秀明, 永井 厚志   |        |          |

## 論文内容の要旨

### 〔目的〕

遷移金属バナジウムによる大気汚染は化石燃料の燃焼が発生源となり、バナジウムが付着した微小な浮遊粒子状物質は肺胞領域にまで達して沈着する。バナジウムは phosphatase 阻害等の酵素影響の他、DNA 傷害性や発癌性も有しているが、バナジウム曝露が肺胞上皮細胞の DNA 修復や細胞周期制御に関わる p53 蛋白、特にそのリン酸化に及ぼす影響については明らかではない。野生型 p53 を発現するヒト II 型肺胞上皮細胞株 (A549 細胞) を用い、バナジウム曝露による p53 蛋白セリン残基のリン酸化と関与するキナーゼについて検討した。

### 〔方法〕

A549 細胞に 5 価バナジウム ( $\text{NaVO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{VO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ) を血清非存在下で曝露後、リン酸化型・総 p53 蛋白、リン酸化型・総 MAP キナーゼ、ATM および actin を Western blotting により、p53 および GAPDH mRNA レベルを RT-PCR により測定した。野生型および S15A 変異型 p53 遺伝子を A549 細胞に発現させ、 $\text{NaVO}_3$  曝露後、p53-DNA 結合活性と DNA 断片化 (細胞質ヌクレオゾーム) を測定した。

### 〔結果〕

$\text{NaVO}_3$  曝露細胞抽出液より p53 蛋白を免疫沈降後、Ser6, 9, 15, 20, 37, 46, 392 のリン酸化を検討した結果、Ser15 部位のリン酸化が最も顕著であった。 $\text{NaVO}_3$  の曝露濃度 (10~200 $\mu\text{M}$ ) および時間 (8~48hr) に依存して、リン酸化型 p53 Ser15 および総 p53 蛋白量の増加が認められたが、p53 mRNA レベルの変動はなかった。 $\text{Na}_2\text{VO}_4$  および  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  曝露でも p53 Ser15 リン酸化および総 p53 蛋白量の増加が認められた。ERK 経路阻害剤 U0126 および p38 阻害剤 SB203580 の処理では、p53 Ser15 のリン酸化は抑制されなかった。一方、DNA-activated protein kinase・ataxia telangiectasia mutated (ATM) 阻害剤 wortmannin 処理、ATM・ATM-Rad3-related protein 阻害剤 caffeine 処理、および RNA 干渉による ATM ノックダウンにより、 $\text{NaVO}_3$  曝露によるリン酸化型 p53 Ser15 および総 p53 蛋白量の増加が抑制された。catalase および N-acetylcystein 処理による抑制は認めなかった。S15A 変異型 p53 導入細胞では野生型導入細胞に比し、 $\text{NaVO}_3$  曝露による p53-DNA 結合活性上昇と DNA 断片化は各々 17, 15% 低下した。

### 〔考察〕

5 価バナジウム曝露は、A549 細胞の p53 Ser15 のリン酸化および p53 蛋白の蓄積を生じた。p53 Ser15 のリン酸化は、MAP キナーゼではなく、PIKK ファミリーに属する ATM に依存していた。このリン酸化には、活性酸素種の関与は小さいと考えられた。MDM2 結合領域近傍の Ser15 のリン酸化は、MDM2 と p53 蛋白の結合解離を介して、p53 蛋白の分解抑制によるその蓄積を生じる可能性がある。5 価バナジウム曝露により p53 蛋白の DNA 結合活性上昇および A549 細胞の DNA 断片化が認められるが、これらには Ser15 部位リン酸化以外の関与もある。

## 〔結論〕

ヒトⅡ型肺胞上皮細胞株 A549 細胞において、大気汚染金属であるバナジウムの曝露は、ATM を介した p53 Ser15 のリン酸化と p53 蛋白の蓄積を生じる。

## 論文審査の要旨

大気汚染金属であるバナジウム曝露による細胞機能障害やその修復の分子機構は明らかではない。本研究では、野生型 p53 を発現するヒトⅡ型肺胞上皮細胞株(A549 細胞)を用い、バナジウム曝露による p53 蛋白セリン残基のリン酸化と関与するキナーゼについて検討した。

5 価バナジウム曝露は、PIKK ファミリーに属する ATM に依存した p53 Ser15 のリン酸化および p53 蛋白の蓄積を生じた。このリン酸化には、活性酸素種の関与は小さいと考えられた。また、5 価バナジウム曝露により p53 蛋白の DNA 結合活性上昇および DNA 断片化が認められるが、これらには Ser15 部位リン酸化以外の関与もあると考えられた。

本研究成果は、バナジウムの細胞障害発現機構にとどまらず、環境汚染化学物質曝露に対する細胞応答や適応の分子機構を考えるうえでも重要である。本研究成果に基づき、バナジウム吸入曝露実験による更なる検討を要する。

—46—

|          |  |         |         |        |
|----------|--|---------|---------|--------|
| 氏名(生年月日) | ヤマ<br>山                                    | モリ<br>森 | シン<br>伸 | ジ<br>二 |
| 本 籍      |  |         |         |        |
| 学位の種類    | 博士(医学)                                     |         |         |        |
| 学位授与の番号  | 甲第 440 号                                   |         |         |        |
| 学位授与の日付  | 平成 20 年 2 月 15 日                           |         |         |        |
| 学位授与の要件  | 学位規則第 4 条第 1 項該当(医学研究科専攻, 博士課程修了者)         |         |         |        |
| 学位論文題目   | 非挿管患者の呼吸管理に有用であるフローズルーカプノメータに関する研究         |         |         |        |
| 主論文公表誌   | 東京女子医科大学雑誌 第 78 巻 第 2・3 号 103-110 頁 2008 年 |         |         |        |
| 論文審査委員   | (主査) 教授 伊関 洋<br>(副査) 教授 川上 順子, 尾崎 眞        |         |         |        |

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

カプノメータは呼気中の CO<sub>2</sub> 濃度および終末呼気 CO<sub>2</sub> 分圧(etCO<sub>2</sub>)を連続測定でき、麻酔下で気管挿管された患者の呼吸管理に必須である。最近鎮静薬等で呼吸が抑制された自発呼吸の患者にも適用されている。通常は鼻カニューラにより呼気ガスを吸引して離れて置かれた検出部まで導くサイドストリーム方式のカプノメータ(以下、従来方式)を使用する。吸引するため口呼吸や低換気では呼気ガスが希釈されて精度が劣ることがあるが、定量的な評価は報告されていない。本研究では、検出部を小型化し鼻の下に装着して吸引せずに患者の呼気が直接吹き込まれるフローズルー方式のカプノメータ cap-ONE<sup>®</sup>および自発呼吸モデルを開発し、CO<sub>2</sub> 濃度波形(カプノグラム)および etCO<sub>2</sub> の精度を自発呼吸モデルおよびボランティアにより従来方式と比較した。

## 〔対象および方法〕

自発呼吸モデルはマネキン、モデル肺、人工呼吸器からなり、CO<sub>2</sub> 濃度、換気量、呼吸数等を種々設定できる。マネキンにカプノメータを装着し、通常換気と低換気状態において咽頭内で測定したカプノグラムおよび etCO<sub>2</sub> を基準として、鼻呼吸と口呼吸(小さな開口と大きな開口)でのそれらと比較した。さらに、健常人 10 人によるボランティア試験では通常換気において鼻呼吸を基準として口呼吸(小さな開口と大きな開口)でのカプノグラ