

氏名	工藤健司
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第2682号
学位授与の日付	平成23年4月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	Translational control analysis by translationally active RNA capture/microarray analysis (TrIP-Chip) (翻訳活性化された RNA を分析するための新しい方法に関する研究)
主論文公表誌	Nucleic Acids Research 第38巻 第9号 e104頁 2010年
論文審査委員	(主査) 教授 山本 雅一 (副査) 教授 新田 孝作, 齋藤加代子

論文内容の要旨

〔目的〕

これまで遺伝子発現の転写調節に多くの研究がなされてきたが、近年では non-coding microRNA といった転写後の翻訳調節因子が発達・細胞サイクル・薬剤耐性などに大きく関与していると注目されてきた。翻訳調節活性を分析するために、これまでショ糖密度勾配超遠心法にて polysome を分離する方法が用いられてきたが、この方法は多くの細胞数を要する (10^9 個程度) ため、限られた細胞検体たとえば臨床サンプル・生検検体や循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell: CTC) などへの応用の障害となっていた。我々は蛋白質新生時に生じるシャペロンである hsp70 family 抗体を磁気ビーズに結合することで効率のよい polysome 分離方法を考案した。

〔対象および方法〕

腫瘍細胞は HCT-116 大腸癌細胞株を用いた。HCT-116 大腸癌細胞株に対する $5\mu\text{M}$ の 5FU 曝露は、TS および p53 遺伝子の過剰発現を導入することがこれまでの研究で明らかにされているため、これらの2つの遺伝子を positive control として用いた。蛋白質検出はウェスタンブロット法を用いた。hsp70 family のシャペロンを効率よく捕捉するため、我々は異なる磁気ビーズと異なる hsp70 family 抗体を結合させ、3種類の抗原結合磁気ビーズを作製した。培養した細胞 10,000 個を分離したのち処理し、その細胞溶解物の 1/10 (1,000 個分) と準備しておいた磁気ビーズとを混合しインキュベートした。そののち磁石を用い polysome 複合体を分離抽出した。この polysome 複合体から mRNA を精製し qRT-PCR を施行、同時にキットを用いて増幅させた後、micro array を施行した。その遺伝子発現解析を Gene Spring software (Agilent, CA, USA) にて行い、さらに DAVID bioinformatics を用い Gene Ontology 解析を施行した。

〔結果〕

TS 遺伝子を過剰発現するプラスミドを導入した細胞株を本手法とそうでないもので分離・抽出したところ、本手法のみ新生 TS 蛋白および TSmRNA を検出した。HCT-116 大腸癌細胞株に対し、 $5\mu\text{M}$ の 5FU により 24 時間曝露させたものと control の TS および p53 遺伝子発現と蛋白質を比較した。蛋白質では TS・p53 蛋白共に、5FU 曝露で増加したが総 mRNA では薬剤による変化が見られないものの、本手法を用いた mRNA 抽出においては蛋白質と同様の結果を得た。本手法により精製された mRNA を増幅しアレイ解析を施行した結果から 4 倍以上の過剰発現が導入された遺伝子から 10 種類をランダムに選択し、本手法で抽出した mRNA の qRT-PCR 結果と比較したところ相関関係を認めた ($p < 0.02$)。

〔考察〕

5FU 耐性にかかわる遺伝子が既知の総 mRNA の抽出のみでは変化を認識できず見逃されてきた可能性が示唆され、またこれまでに知られているその他の薬剤耐性関連遺伝子も本手法において発現亢進を確認し得た。

〔結論〕

本手法は、転写後調節される遺伝子を少ない細胞数で検出可能とする新たな手法として、臨床検体や CTC への応用、さらには次世代の DNA シーケンシングとの併用も期待される。

論文審査の要旨

蛋白質新生時に生じるシャペロンである hsp70 family 抗体と磁気ビーズを結合させた抗原結合磁気ビーズを作製し、転写後翻訳調節活性分析において効率のよい polysome 複合体の分離方法を考案した。

HCT-116 大腸癌細胞株に対し、5FU 曝露の有無で TS および p53 遺伝子発現と蛋白質を比較したところ、蛋白質では TS・p53 蛋白共に 5FU 曝露で増加したが総 mRNA では薬剤による変化が見られない一方、本手法を用いた mRNA 抽出においては蛋白質と同様の結果を得た。本手法で得られた polysome 複合体から抽出した mRNA を精製し qRT-PCR, micro array で従来のショ糖密度勾配超遠心法と比較したところ、従来法の 1/106 もの少ない細胞数 (1,000 個以下) でも同等の結果が得られた。

本手法は転写後調節遺伝子を検出可能とする新たな手法として限られた細胞数の臨床検体への応用が期待される。

6

氏名	井野純 ^{ジュン}
学位の種類	博士 (医学)
学位授与の番号	乙第 2683 号
学位授与の日付	平成 23 年 5 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当 (博士の学位論文提出者)
学位論文題目	Dynamic observation of mechanically-injured mouse femoral artery reveals an anti-inflammatory effect of renin inhibitor (直接的レニン阻害薬の血管における抗炎症効果の検討)
主論文公表誌	Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 第 29 巻 1858-1863 2009 年
論文審査委員	(主査) 教授 新田 孝作 (副査) 教授 尾崎 眞, 永井 厚志

論文内容の要旨

〔目的〕

レニン・アンジオテンシン系は、高血圧、糖尿病および心血管病変などの病態に関与していることが解明されている。アリスキレンは、臨床的に初めて登場した直接的レニン阻害剤である。本研究では、動脈硬化の初期段階に起こる血管内皮細胞への血球接着に与えるアリスキレンの効果について検討した。

〔対象および方法〕

正常血圧のマウス (C57BL/6) に、アリスキレン 10mg/kg/day あるいはリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS) を 2 週間投与した。13 日目にポリエチレン製のカフを右大腿動脈へ留置し、24 時間後に蛍光色素で染色したマウスの血球を投与して、カフ傷害を起こした部位への接着現象の違いを、生体内顕微鏡 (in vivo microscopy : IVM) により比較した。また、傷害血管の蛋白質および RNA を回収し、炎症反応に関与するシグナル伝達を検討した。さらに、tumor necrosis factor α (TNF- α) の刺激下のヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell : HUVEC) に対する THP-1 細胞の接着現象について flow assay を行い、アリスキレンの効果を検討するとともに、炎症反応に関与するシグナル伝達への影響についても検討した。