

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	小林 佑輔
学位授与の条件	学位規則第 4 条第① 2 項該当		
論文題目 Mitochondrial DNA is a key driver in cigarette smoke extract-induced IL-6 expression (ミトコンドリア DNA は喫煙による IL-6 発現誘導の主要な寄与分子である)			
論文審査担当者			
主査	教授	服部 登	印
審査委員	教授	保田 朋波流	
審査委員	准教授	岩本 博志	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>背景・目的： 喫煙は冠動脈疾患を始めとした動脈硬化性心血管疾患の独立した危険因子であり，炎症はその主病態のひとつである。これまでに著者らの研究室では，タバコの煙のガス相（ニコチンやタールを含まないタバコ煙抽出物；Cigarette smoke extract (CSE)）をヒト臍帯静脈内皮細胞；human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) に曝露させると核(n)及びミトコンドリア(mt)の DNA に損傷が生じ，DNA が細胞質や細胞外へと蓄積し，その細胞質 DNA が炎症を惹起することを見いだしている。しかしながら，核由来の細胞質 DNA とミトコンドリア由来の細胞質 DNA のどちらが炎症の誘発に重要なのか，また CSE のどの化学成分がこの炎症に関与しているのかは分かっておらず，本研究ではその解明を目的として検討を行った。</p> <p>方法： タバコの煙には 7000 種類以上の成分が含まれていることが知られているが，これらの多くは半減期が極めて短い。今回は血管の慢性炎症やアテローム性動脈硬化症を引き起こす可能性の高い，半減期が比較的長く CSE の細胞毒性因子として報告されている不飽和カルボニル化合物の Acrolein (ACR)，Methyl vinyl ketone (MVK)，2-cyclopenten-1-one (CPO) の 3 成分を化学成分の候補として検討した。臭化エチジウムブロマイド；ethidium bromide (EtBr) は遺伝子の複製及び転写を特異的に阻害する DNA/RNA 合成阻害剤であるが，細胞に対し低容量 (0.1-2µg/ml) で長期間処置を行うことで，核の複製及び転写に影響を与えることなく，mtDNA の複製及び転写を抑制することが分かっている。これを利用した mtDNA 欠失細胞は mtDNA の役割を研究するための重要なツールとなっている。今回 EtBr 50ng/ml で 7 日間 HUVECs を培養することで mtDNA を枯渇させた HUVECs を作成し実験に使用した。</p> <p>結果： 1. HUVECs を，アポトーシスを誘発させない最大濃度の ACR，MVK，あるいは CPO で単独刺激すると，DNA の 2 本鎖切断；Double-strand breaks (DSBs) のマーカーである phosphorylated histone H2AX (γH2AX) foci は有意に蓄積したものの細胞質への遊離 DNA の蓄積や炎症性サイトカインの発現の増加は認められなかった。 2. HUVECs を 3 成分の混合物 (ALL) に曝露すると，DSBs の蓄積に加え，DNA の酸化的損傷，細胞死を誘発しない程度のミトコンドリア外膜透過性；Mitochondrial Outer Membrane Permeability (MOMP) の亢進 (minority MOMP)，核及びミトコンドリア DNA の細胞質への蓄積，炎症性サイトカインである IL-6 と IL-1α mRNA の発現増加が認められた。 3. ALL または CSE によって引き起こされる細胞質への mtDNA の蓄積と炎症性サイトカインの発現の増加は，活性酸素種；reactive oxygen species (ROS) のスカベンジャーである N-Acetyl-L-cysteine (NAC) による前処置を行うことで抑</p>			

制された。

4. EtBr 処置で mtDNA を枯渇させた HUVECs では, ALL または CSE 曝露による IL-6 の発現増加が抑制された。

結論:

CSE の 3 成分である ACR, MVK, CPO の組み合わせによる刺激は, HUVECs において核及びミトコンドリアの DNA 損傷, minority MOMP の誘導と細胞質遊離 nDNA 及び mtDNA の蓄積を引き起こし, 炎症性サイトカイン発現の増加を誘導した。以上の結果から, CSE 成分中の ACR, MVK, CPO は CSE 誘導性炎症において重要な役割を果たすと考えられた。さらに重要なこととして, CSE によって誘導されるミトコンドリア DNA の酸化的損傷及び minority MOMP によって放出された細胞質遊離 mtDNA は, IL-6 発現誘導の主要な寄与分子である可能性が示唆された。

本論文は心血管疾患の病態に強く寄与している炎症惹起の分子メカニズムの一部を明らかにした重要な研究であり, 今後下流分子を検討することにより心血管疾患の治療ターゲットが明らかになる可能性がある。

よって, 審査委員会委員全員は, 本論文が小林 佑輔に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。