

# 論文審査の要旨

|      |           |       |         |
|------|-----------|-------|---------|
| 報告番号 | 総研第 278 号 | 学位申請者 | 宮原 恵弥子  |
| 審査委員 | 主査        | 宮田 篤郎 | 学位      |
|      | 副査        | 松山 隆美 | 副査      |
|      | 副査        | 吉満 誠  | 副査      |
|      |           |       | 博士 (医学) |
|      |           |       | 秋葉 澄伯   |
|      |           |       | 青山 公治   |

## Effect of myeloperoxidase inhibition on gene expression profiles in HL-60 cells exposed to 1,2,4-benzenetriol

(ベンゼントリオール曝露 HL-60 細胞における遺伝子プロファイルへのミエロペルオキシダーゼ阻害の影響)

ベンゼンはヒトにおいて骨髄抑制や急性骨髄性白血病を引き起こすことが知られているが、そのメカニズムの詳細は不明である。我々はベンゼン代謝物の一つである 1, 2, 4-benzenetriol (BT) を曝露すると、myeloperoxidase (MPO) が酸化力の強い次亜塩素酸 (HOCl) の産生を促進し、生じた HOCl が DNA やタンパク質をハロゲン化することを報告した。MPO は骨髄系の細胞に多く発現しておりそれ故にベンゼンの毒性が骨髄細胞特異的に生じるのではないかと考えた。この MPO が重要な役割を果たしているという見地から、ベンゼンの骨髄毒性に MPO がどのように関係しているのかを明らかにするため HL-60 細胞を BT に曝露し MPO 阻害下、非阻害下における遺伝子の発現変動及びアポトーシスの誘導を解析した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) MPO 特異的な阻害剤である 4-Aminobenzoic acid hydrazide (ABAH) や MPO 特異的 siRNA 処理によって、BT 曝露によるアポトーシス誘導は有意に抑制された。
- 2) MPO を発現していない単球系細胞である U937 を BT に曝露しても、有意なアポトーシスの誘導はみられなかった。
- 3) HL-60 細胞を BT に曝露し、1 時間後及び 4 時間後の遺伝子発現変動をマイクロアレイ法で評価した。1 時間後の発現変動遺伝子は 1214 (up-regulation 751, down-regulation 463) また 4 時間後では 1213 (up-regulation 817, down-regulation 396) 遺伝子の発現変動がみられた。
- 4) HL-60 細胞を ABAH で前処理し、BT 曝露を行い 1 時間、4 時間後の遺伝子発現変動を評価した。1 時間後の発現変動遺伝子は 225 (up-regulation 175, down-regulation 50) また 4 時間後では 516 (up-regulation 406, down-regulation 110) 遺伝子の発現変動がみられた。MPO を阻害することで、BT 曝露のみの遺伝子発現変動と比べて、発現変動した遺伝子の数は大きく減少した。MPO 発現のない U937 細胞では BT 曝露による有意なアポトーシスが観察されなかったことと合わせて、BT 曝露の影響は、MPO を主に介することが明らかにされた。
- 5) マイクロアレイで得られた発現変動遺伝子の結果を用い、どのような遺伝子が有意に発現を変動したかを知るために Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) 法を使用して Gene Ontology 解析を行った。BT 曝露群で発現が有意に変動していた遺伝子は、転写、アポトーシス、抗アポトーシス、細胞増殖、炎症、細胞周期関連遺伝子であった。
- 6) 発現変動遺伝子がどのような細胞内代謝・シグナル経路に関与するかを調べるために Pathway 解析を行った。主にアポトーシス、抗アポトーシス経路に関与する遺伝子が有意に変動していた。

以上のことから HL-60 細胞において、BT 曝露によるアポトーシスの誘導には MPO が大きく関与している事が明らかになった。また BT 曝露により HL-60 細胞の遺伝子発現はアポトーシス、抗アポトーシスの両方向へ変動する事が明らかになった。細胞がアポトーシスへ誘導されると再生不良性貧血のような血球減少が生じ、抗アポトーシスへ誘導されると MPO によって生じた HOCl によるハロゲン化 DNA が除去されなくなるため、発がんへの確率が高くなるものと考えられた。

臨床的に、ベンゼンと骨髄毒性の関連性は示されていたが、今回の実験的研究によって、その機序として、MPO が関与することが遺伝子発現を評価することで明らかになった。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。