

氏 名	ふじ さわ あき ひろ 藤 澤 章 弘
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3180 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Disease-associated mutations in CIAS1 induce cathepsin B-dependent rapid cell death of human THP-1 monocytic cells. (疾患に関連した CIAS1 遺伝子の変異は、THP-1 細胞にカテプシン B 依存性の急速な細胞死を誘導する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 三 森 経 世 教 授 瀬 原 淳 子 教 授 長 田 重 一

論 文 内 容 の 要 旨

背景；CIAS1 (cold-induced autoinflammatory syndrome 1) は、3 つの自己炎症性疾患、すなわち、familial cold autoinflammatory syndrome (FCAS, MIM #120100)、Muckle-Wells syndrome (MWS, MIM #191900)、および CINCA 症候群 (Chronic infantile neurological, cutaneous, articular syndrome, MIM #607115) の原因遺伝子であることが明らかとなっている。これら 3 疾患は、いずれも CIAS1 の missense 変異によって生じ、同一スペクトル上にある疾患群と考えられている。CIAS1 は cryopyrin と呼ばれる蛋白をコードし、主に単球の細胞質で発現している。Cryopyrin は C 末端に leucine-rich repeats 領域を持ち、何らかの微生物特異的配列を認識する受容体として働くと考えられているが、具体的なリガンドは同定されていない。しかしながら、各疾患に認められる CIAS1 変異体では、リガンド結合時と同様な構造変化が起こり、活性型として働くと考えられている。Cryopyrin の機能として、下流分子である ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) を介した NF- κ B の活性化や、caspase-1 を介した IL-1 β の活性化亢進が知られている。また細胞死にも関与すると考えられているが、CIAS1 変異体の機能や細胞死への関与を明らかにしたものはなかった。そこで、疾患関連 CIAS1 変異体の細胞死への関与とその機構について検討した。

方法；疾患関連の変異をもつ CIAS1 変異体を作成し、ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞に遺伝子導入した。導入から 3 時間後に annexin-V および 7-AAD 染色を行い、フローサイトメトリーによる解析を行った。さらに、遺伝子導入後に細胞から逸脱した LDH の測定、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いた形態学的検討、ウェスタンブロットによるカスパーゼの活性化検討を行なった。また、フローサイトメトリーを用いてライソゾームとミトコンドリア機能の評価を行った。

結果と考察；疾患関連 CIAS1 変異体を THP-1 細胞に導入すると、導入から 3 時間で急速な細胞死が誘導されることが確認できた。さらに、各変異体によって誘導される細胞死の程度は、FCAS, MWS, CINCA における疾患の活動性と非常に相関した。CIAS1 変異体によって誘導される細胞死は、ネクロシスとしての特徴を多く有しており、カスパーゼの活性化は認められなかった。しかし、細胞死はライソゾーム酵素であるカテプシン B の特異的阻害剤 CA-074-Me によって著明に抑制された。さらに変異体導入によってライソゾーム酵素の細胞質への漏出やミトコンドリア膜電位の低下が誘導されたが、いずれも CA-074-Me により著明に抑制された。以上の結果から、疾患関連 CIAS1 変異体により誘導される細胞死は、カテプシン B 依存性の programmed cell death であることが示唆された。

結論；今回の研究で CIAS1 の活性化により、THP-1 細胞にカテプシン B 依存性の細胞死が誘導されることが明らかとなった。炎症を惹起し得るネクロシス様の細胞死が誘導されることは、CIAS1 が細胞内微生物認識受容体として機能するということを考える上で、非常に興味深い知見であると思われた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

CIAS1 遺伝子は cryopyrin とよばれる蛋白をコードし、その構造から微生物に対する細胞内受容体として働くと考えら

れている。CIAS1 遺伝子の変異は、cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) と総称される 3 つの自己炎症性疾患、すなわち Familial cold autoinflammatory syndrome, Muckle-Wells syndrome および、CINCA 症候群と関連している。各疾患に認められる CIAS1 変異体は、NF- κ B の活性化や IL-1 β の活性化亢進を誘導することが知られる一方、細胞死との関連は明らかではなかった。

申請者らは、CAPS に関連した変異を持つ CIAS1 変異体をヒト単球系細胞株 THP-1 に遺伝子導入すると急速な細胞死が誘導され、さらに、その細胞死はネクロシスとしての特徴を多く有し、ライソゾーム酵素であるカテプシン B の特異的阻害剤 CA-074-Me によって抑制されることを明らかにした。

この結果は、細胞内受容体としての cryopyrin の機能解明に貢献すると共に、誘導される細胞死が炎症をおこしうるネクロシス様であることから、さまざまな炎症所見を呈する CAPS の臨床症状の解明にもつながる可能性を示しており、今後の病態解明へ寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものとみとめる。

なお本学位授与申請者は、平成 19 年 12 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。