

氏 名	はま 濱 けい 啓 悟
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	論 医 博 第 1895 号
学位授与の日付	平 成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Mitochondrial dysfunction is related to necrosis-like programmed cell death induced by A23187 in CEM cells (CEM細胞で A23187 によって引き起こされるネクローシス様のプログラム細胞死はミトコンドリアの機能障害に関係している)
論文調査委員	(主 査) 教 授 鍋 鍋 島 陽 一 教 授 上 杉 志 成 教 授 清 水 章

### 論 文 内 容 の 要 旨

CEM細胞で A23187 によって引き起こされるネクローシス様のプログラム細胞死はミトコンドリアの機能障害に関係している。

2種類の細胞死の形態のうち apoptosis の分子機構については近年詳細に明らかにされてきた。一方 necrosis についても単に受動的で偶発的な細胞死ではなく、予めプログラムされた一連の現象であることが最近明らかにされつつあるが、その分子機構についてはいまだ不明な点が多い。この apoptosis と necrosis の機構の違いを明らかにするために、カルシウムイオンフォア A23187 に対する骨髓系細胞株、HL60細胞と Tリンパ系細胞株、CEM細胞の反応性の違いについて検討した。

A23187 は HL60 細胞では apoptosis を引き起こすのに対して、CEM 細胞では necrosis を引き起こす。DNA topoisomerase の阻害剤である VP16 は CEM 細胞にも apoptosis を引き起こすことから、CEM 細胞の apoptosis 機構自体には障害はないと考えられる。CEM 細胞におけるこの necrosis は A23187 刺激5分以内に始まり、細胞が収縮し集塊を形成する特徴を示す。電子顕微鏡ではこの段階で細胞膜はインタクトで necrosis の特徴であるミトコンドリアの膨化とクロマチン凝集が観察される。この段階で caspase 3の活性化は見られず、flow cytometry によるミトコンドリア膜電位の検討では、細胞膜がインタクトの段階でミトコンドリア膜電位の低下が観察された。A23187 に10分間曝露した後 wash out する実験では、HL60 細胞では6時間後に apoptosis はほとんど見られないのに対し、CEM 細胞では6時間後にかなりの necrosis が観察された。このことから CEM 細胞における necrosis は10分以内の早期に決定されていることがわかる。

この CEM 細胞における necrosis はミトコンドリアの Na/Ca exchanger の阻害剤である clonazepam や CGP37157 で阻害されるが、ミトコンドリアの permeability transition pore (PTP) の阻害剤である cyclosporin A には影響されない。そこで A23187 による細胞内カルシウム濃度 ( $[Ca]_i$ ) とミトコンドリア内カルシウム濃度 ( $[Ca]_m$ ) の変化を調べた。 $[Ca]_i$  の変化を flow cytometry で測定する方法についてはこれまでに報告されているが、この方法を応用して  $[Ca]_m$  の変化についても同様に測定し得た。CEM 細胞、HL60 細胞ともに  $2\mu M$  の A23187 刺激によって  $[Ca]_i$  は1分以内に同程度上昇し、その後 HL60 細胞では急速に、CEM 細胞では緩徐に低下した。clonazepam 前処置による  $[Ca]_i$  に対する影響は見られなかった。CEM 細胞、HL60 細胞ともに  $[Ca]_m$  は clonazepam の前処置によって上昇したが、 $2\mu M$  の A23187 刺激によっては clonazepam 前処置の有無に関わらず大きな変化を示さなかった。

A23187 は CEM 細胞の  $[Ca]_i$  を急速に上昇させ、ミトコンドリアに作用して機能障害をおこし necrosis を引き起こすと考えられるが、この機能障害は PTP には関係なく、 $[Ca]_m$  に影響されており、これまで報告されているものと別の機構が関与している可能性を示唆している。この2つの細胞株の A23187 刺激に対する反応性の違いは、急激な  $[Ca]_i$  変化に対するミトコンドリア膜の反応性の違いによるものと考えられる。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞死の機構を明らかにするため、A23187 に対する造血系細胞株、HL60 と CEM の反応性の違いについて検討した。

A23187はHL760にはapoptosis, CEMにはnecrosisを引き起こす。CEMのnecrosisは刺激5分以内に始まり、電顕上細胞膜は正常でミトコンドリア膨化とクロマチン凝集が見られ、caspase 3活性化は見られず、ミトコンドリア膜電位低下が見られた。このnecrosisはミトコンドリアNa/Ca exchanger阻害剤であるclonazepamやCGP37157で抑制されるが、PTP阻害剤であるcyclosporin Aでは抑制されなかった。細胞内Ca濃度([Ca]<sub>i</sub>)は、両細胞株とも、刺激1分以内に上昇後、HL60では急速に、CEMでは緩徐に低下した。clonazepam前処置は[Ca]<sub>i</sub>に影響を与えなかった。ミトコンドリア内Ca濃度([Ca]<sub>m</sub>)はともにclonazepam前処置で上昇したが、A23187刺激では変化しなかった。A23187はCEMの[Ca]<sub>i</sub>を急速に上昇させ、ミトコンドリアに作用して機能障害をおこしnecrosisを引き起こすと考えられるが、PIPには関係なく、これまでの報告と別の機構が関与している可能性を示唆している。

以上の研究は新しい細胞死の機序解明に貢献し、新規がん治療開発に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認める。

なお、本学位授与申請者は、平成18年1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。