

氏名	いわ 井 一 也
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医博第 2631 号
学位授与の日付	平成 15 年 5 月 23 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	医学研究科血液病態学専攻
学位論文題目	Ceramide increases oxidative damage due to inhibition of catalase by caspase-3-dependent proteolysis in HL-60 cell apoptosis (セラミドは HL-60 細胞のアポトーシスにおいてカタラーゼをカスパーゼ-3 依存性に蛋白分解し抑制することにより酸化障害を増加させる)
論文調査委員	(主査) 教授 淀井淳司 教授 前川平 教授 内山卓

論 文 内 容 の 要 旨

スフィンゴ脂質であるセラミドは、種々のストレスが惹起する細胞死を制御する重要なシグナル分子の一つとして認識されてきた。ROS (活性酸素種) による細胞障害が白血病細胞においてアポトーシスを誘導する際に、セラミド産生が増加することが報告されている。一方、セラミドは ROS 産生を増加するとともに ROS スカベンジャーであるグルタチオンを制御することによりアポトーシスを効率的に誘導することが知られている。これまでアポトーシス誘導時にセラミド・シグナルの下流で、蛋白分解酵素カスパーゼ-3 が重要な働きをしていることが知られているが、ROS とカスパーゼ-3 との関係は不明であった。

我々は、ヒト骨髄性白血病細胞株 HL-60 を用いて、セラミドによるアポトーシスにおける酸化障害とカスパーゼ-3 の役割を明らかにするべく検討した。2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCGH-DA) を用いて細胞内 ROS 産生を測定すると、5 μ M の細胞膜透過性 C2-セラミド (N-acetyl sphingosine), または 20 μ M の H2O2 を 12 時間添加しても、それぞれ単独では ROS 産生はほとんどみられなかった。5 μ M の C2-セラミドを 12 時間処理の後、20 μ M の H2O2 を添加すると ROS 産生が相乗的に亢進され、アポトーシスに至る細胞も増加した。また ROS による酸化障害の指標とした TBARS (thiobarbituric acid reactive substance) の産生も亢進された。これらから、セラミドは ROS スカベンジャー機構を抑制している可能性が示唆された。これまで、セラミドによるグルタチオンの抑制は報告されているが、セラミドとカタラーゼとの関連は詳しくは明らかになっていない。C2-セラミドはカタラーゼ活性を時間および濃度依存特性に低下させた。この結果は抗カタラーゼ抗体による免疫沈降後の酸素活性測定によっても確認された。次に、カタラーゼ mRNA 及び蛋白の変化をノーザンとウエスタン・プロテイング法により検討したところ、カタラーゼ活性が低下する 12 時間では蛋白レベルでの低下がみられたものの、mRNA の低下がみられたのは 36 時間以降であり、セラミドによるカタラーゼ活性の抑制は mRNA の低下によるものではないことが示唆された。

H2O2 が誘導するアポトーシスと TBARS 産生の C2-セラミドによる亢進は、カスパーゼ-3 のインヒビターである DMQD-CHO の存在下ではみられず、セラミドによるアポトーシスおよび酸化障害はカスパーゼ-3 を介していると考えられた。また、C2-セラミドによるカタラーゼ活性の低下が DMQD-CHO により回復されることから、カスパーゼ-3 はセラミドがカタラーゼを抑制する上流で働くことが考えられた。免疫沈降法により抗カスパーゼ-3 抗体によりカタラーゼが、また、抗カタラーゼ抗体によりカスパーゼ-3 が共沈してきた結果より、カタラーゼにはカスパーゼ-3 の蛋白切断点である DXXD 構造がないものの、カスパーゼ-3 が直接カタラーゼを分解している可能性が考えられた。in vitro で精製カタラーゼにリコンビナントのカスパーゼ-3, -6, -8, -9 を添加してカタラーゼ活性を測定したところ、カスパーゼ-3 によってのみ活性の低下をみた。また、カタラーゼをカスパーゼ-3 とインキュベートし SDS-PAGE にて分離するとカタラーゼ蛋白の減少と分解産物と思われるフラグメントが検出された。

以上の結果より、セラミドはカスパーゼ-3 の活性化を介してカタラーゼ蛋白を分解しカタラーゼ活性を低下させる機構、

すなわちスカベンジャーの抑制を介してROSの酸化障害を亢進し、抗アポトーシス・シグナルを阻害する事によって効果的にアポトーシスを誘導すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

スフィンゴ脂質であるセラミドは、種々のストレスが惹起する細胞死を制御する重要なシグナル分子の一つとして認識されてきた。本研究は、ヒト骨髓性白血病細胞株HL-60を用いて、セラミドによるアポトーシスにおける酸化障害とカスパーゼ-3の役割を検討したものである。

DCGH-DAを用いて細胞内ROS産生を測定し、5 μ Mの細胞膜透過性C2-セラミドまたは20 μ MのH2O2を12時間添加しても、それぞれ単独ではROS産生はほとんどみられなかったが、5 μ MのC2-セラミドで12時間処理の後、20 μ MのH2O2を添加することによりROS産生が亢進したことから、セラミドはROSスカベンジャー機構を抑制している可能性が考えられた。

C2-セラミドはカタラーゼ活性を時間および濃度依存性に低下させた。カタラーゼmRNA及び蛋白の変化を検討したところ、カタラーゼ活性が低下する時間とmRNAの低下がみられた時間の関係より、セラミドによるカタラーゼ活性の抑制はmRNAの低下によるものではないことが示唆された。

C2-セラミドによるカタラーゼ活性の低下がDMQD-CHOにより回復されることから、カスパーゼ-3はセラミドがカタラーゼを抑制する上流で働くことが考えられ、免疫沈降法およびSDS-PAGEにより、カスパーゼ-3が直接カタラーゼを分解していることを示した。

以上の研究は、セラミドの誘導するアポトーシスにおいて、カスパーゼ-3とカタラーゼの関係の解明に貢献し、白血病の病態究明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15年3月10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。