TITLE:

Relocation of truncated Bid plays an important role in suppression of tumor necrosis factor α -induced apoptosis in hepatocytes isolated from transgenic mouse(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Shiotani, Tomohiro

CITATION:

Shiotani, Tomohiro. Relocation of truncated Bid plays an important role in suppression of tumor necrosis factor α -induced apoptosis in hepatocytes isolated from transgenic mouse. 京都大学, 2006, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2006-03-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/143864>

RIGHT:

氏 名	しお 谷 とも ひろ 塩 谷 智 裕
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2984 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 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Relocation of Truncated Bid Plays an Important Role in Suppression of Tumor Necrosis Factor α - Induced Apoptosis in Hepatocytes Isolated from Transgenic Mouse. (活性型 Bid の移動は遺伝子導入マウス肝細胞の TNF α 誘導アポトーシスの抑制に重要な役割を果たす)
論文調査委員	(主 査) 教 授 長 澤 丘 司 教 授 千 葉 勉 教 授 下 遠 野 邦 忠

論 文 内 容 の 要 旨

背景と目的：重症感染症などに起因する高 TNF α 血症では肝細胞のアポトーシスが誘導され、肝障害を引き起こす。アルブミンプロモーター下に Creatine kinase (CK) を遺伝子導入したマウス (CK-TG マウス) ではエンドトキシン血症時に肝細胞アポトーシスおよび肝障害が抑制され生存率が改善することが報告されている。この CK-TG マウスでは Creatine の摂食にて野生型 (WT) マウスの肝臓には認められないフォスホクレアチン (PCr) が蓄積する。本研究においては CK-TG マウスから分離培養した肝細胞をもちいて TNF α 誘導アポトーシス抑制の機序について検討した。

方法：WT マウス及び CK-TG マウスの初代培養肝細胞を、培養液に Creatine を添加しない Cr(-)WT 群および Cr(-)CK-TG 群、Creatine を添加した Cr(+)WT 群、Cr(+)CK-TG 群の 4 群に分け、1) 培養開始後の細胞内 PCr, ATP レベルの経時的変化、2) TNF α +Actinomycin D によるアポトーシス誘導後の cell viability, 3) caspase-3 activity の経時的変化、4) 細胞質内 cytochrome c release の変化、5) truncated Bid の細胞質内分布について比較検討した。

結果：1) 培養開始後 6 時間目では、ATP 値は 4 群間に有意の差を認めなかった。PCr 値は Cr(+)WT, Cr(-)WT, Cr(-)CK-TG 各群では 0.1 μ g/mg protein 以下であったが、Cr(+)CK-TG 群では 8.23 μ g/mg protein に増加した。2) アポトーシス誘導 16 時間後の cell viability は Cr(+)WT, Cr(-)WT, Cr(-)CK-TG 群では各々 19.6 $\pm$ 2.1%, 23.5 $\pm$ 1.0%, 22.0 $\pm$ 5.5% であったが、Cr(+)CK-TG 群では 85.0 $\pm$ 3.1% とアポトーシスが著明に抑制されていた。3) caspase-3 activity は、アポトーシス誘導後 6 時間目は 4 群間に有意な差を認めなかった。しかし、10 時間目には Cr(+)WT, Cr(-)WT, Cr(-)CK-TG 群は各々 42 $\pm$ 0.2 倍、39 $\pm$ 1.5 倍、47 $\pm$ 2.2 倍に達したが、Cr(+)CK-TG 群では 8.2 倍と有意に抑制された。4) アポトーシス誘導 7 時間後において Cr(+)WT, Cr(-)WT, Cr(-)CK-TG 各群では細胞質への cytochrome c release を認めたが、Cr(+)CK-TG 群では cytochrome c の細胞質への release は有意に抑制されていた。5) アポトーシス誘導 5 時間後において 4 群とも Bid は同程度に活性化された。しかし、Cr(+)WT, Cr(-)WT, Cr(-)CK-TG 群で認められた truncated Bid のミトコンドリアへの移行は Cr(+)CK-TG 群では有意に抑制された。

結論：Creatine 添加培養液で培養した CK-TG マウスの肝細胞は、TNF α によるアポトーシス誘導刺激に対し抵抗性を示した。このアポトーシスシグナルの抑制機序には truncated Bid のミトコンドリアへの移行の抑制が関与している可能性が示唆された。この結果はアポトーシスが関与する肝障害の抑制への応用が期待できると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は肝細胞障害の原因の一つと考えられている TNF α 誘導アポトーシスについて、野生型では肝細胞に発現しないクレアチンキナーゼを遺伝子導入したマウス肝細胞を用いて、クレアチンキナーゼによるアポトーシス抑制の機序を検討したものである。

本申請者は、ラット脳由来のクレアチンキナーゼを遺伝子導入したマウスの初代肝細胞（CK 肝細胞）をクレアチン添加、非添加の条件で6時間培養を行い、アクチノマイシン D で感作後 $\text{TNF}\alpha$ を投与してアポトーシスの誘導状況を検定した。クレアチンを添加した CK 肝細胞では高エネルギー磷酸化合物であるクレアチン磷酸が蓄積され、非添加の CK 肝細胞や野生型肝細胞に比較し $\text{TNF}\alpha$ によるアポトーシス誘導刺激に対する強い抵抗性を示すことを確認した。そこで、 $\text{TNF}\alpha$ 受容体からカスパーゼ 3 に至る細胞内シグナル伝達系について検討を行ったところ、クレアチンを添加した CK 肝細胞では非添加の CK 肝細胞や野生型肝細胞と同様に Bid の活性化が生じていた。しかし、活性化 Bid の細胞質からミトコンドリアへの移行が抑制され、チトクローム C のミトコンドリアから細胞質への遊離が抑制されていることが明らかとなった。この結果から、活性化 Bid のミトコンドリアへの移行には高エネルギー磷酸化合物の必要性が示唆された。

以上の研究は、 $\text{TNF}\alpha$ 誘導肝細胞アポトーシスが原因である種々の肝疾患についての病態解明や治療法の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2月24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。