

氏名	山 下 浩 平
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2230 号
学位授与の日付	平成 12 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	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Caspases mediate tumor necrosis factor- α -induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. (カスパーゼは好中球において腫瘍壊死因子 (TNF- α) 誘導アポトーシスを実行し、活性酸素産生の低下調節作用を有する)

論文調査委員 (主査) 教授 上田國寛 教授 淀井淳司 教授 内山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

好中球は生体内に侵入する病原体に対し、種々の傷害因子を産生、分泌することにより生体防御の第一線を担っている。一方、その強い傷害作用のために、好中球の機能亢進が成人呼吸窮迫症候群 (ARDS) やベージェット病などの病態形成に深く関与すると指摘されている。好中球機能亢進に基づく病態形成の機序として、種々の走化性因子や炎症性サイトカインなどの関与のもとに、好中球の持続的動員、活性化、アポトーシスの阻害などにより、組織傷害が引き起こされると考えられる。

炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF- α) や顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) は、炎症性病態の形成に重要な役割を果たすとともに、好中球アポトーシスを制御することが明らかにされている。前者はアポトーシス促進に、後者はアポトーシス抑制に作用する。そこで、TNF- α や GM-CSF による好中球アポトーシスの制御と機能との関係並びに好中球アポトーシスの分子機序を、アポトーシスの実行分子であるカスパーゼ (caspase) に焦点を当てて解析した。

アポトーシスは cycloheximide (CHX) 存在下に TNF- α によって誘導した。アポトーシスの評価は DNA 断片化と phosphatidylserine の細胞膜外への表出を指標とし、それぞれ propidium iodide と annexin-PE を用いたフローサイトメトリーで検討した。また好中球機能は、組織傷害を引き起こす最も重要な因子と考えられる活性酸素の産生能を指標とし、種々の刺激 (FMLP, opsonized zymosan, PMA) に対する活性酸素産生量を cytochrome C 還元法で測定した。

TNF- α + CHX 処理により 3 時間で 90% 以上の好中球にアポトーシスが誘導された。アポトーシスに伴い caspase の基質である gelsolin が限定分解され、caspase 阻害剤である zVAD-fmk の前処理により濃度依存的にアポトーシスは抑制された。

アポトーシスに伴い、種々の刺激に対する活性酸素産生は低下した。しかし zVAD-fmk で前処理しアポトーシスを抑制すると、活性酸素産生は前値に回復した。GM-CSF は zVAD-fmk と同様に、TNF- α 誘導アポトーシスを抑制し活性酸素産生を増強した。また zVAD-fmk + GM-CSF で前処理した場合、単独処理以上の効果は認められず、それぞれの増強作用は主に caspase の活性化の阻害によることが示唆された。

好中球のアポトーシスの機構に関する解析を目的としたアフィニティーラベリングやウエスタンブロット法による検討では、caspase-8, caspase-3, 18 kDa の大サブユニットをもつ caspase (T 18) の活性化が認められた。また好中球には、Fas 誘導 Jurkat 細胞アポトーシスにおいて活性化される pro-caspase-6, pro-caspase-7 が認められなかった。更に、無処理好中球細胞質抽出液に組み換え caspase-8 を反応させた場合、caspase-3 と T 18 の活性化が認められ、caspase-8 が caspase-3 や T 18 の上流に存在することが示された。

以上より、好中球のアポトーシスはその変化に伴って活性酸素産生を制御すること、従ってアポトーシスを介した好中球機

能異常がある種の病態形成に関与し得ること、また caspase の活性化がアポトーシス機序の中心を成すことが示された。

論文審査の結果の要旨

好中球は活性化されることにより炎症病態を形成する一方、機能を終えた好中球は脱活性化され、アポトーシスに陥り、炎症は収束に向かう。この好中球アポトーシスを誘導する代表的因子が TNF- α であり、また TNF- α は炎症病態において重要な役割を果たすことが知られている。そこで申請者は、アポトーシスの阻害に注目して、アポトーシスと好中球機能との関連並びにアポトーシスの分子機構解析について検討を行った。

申請者はまず、TNF- α により好中球アポトーシスを誘導する系を確立した。そして、アフィニティーラベリング法やウェスタンブロット法などを用いて、アポトーシスに伴い caspase-8, caspase-3, 18 kDa の大サブユニットをもつ caspase が活性化すること、Jurkat 細胞と異なり好中球には pro-caspase-6 や-7 が認められないことを明らかにした。また、アポトーシスに伴い種々の刺激に対する好中球の活性酸素産生能が低下すること、caspase 阻害剤 zVAD-fmk の処理によりそれが回復することを示した。更に GM-CSF が zVAD-fmk と同様にアポトーシスを抑制し活性酸素産生能を回復されること、これらが caspase の活性化阻害によることを明らかにした。以上から、caspase は TNF- α 誘導好中球アポトーシスを実行し、活性酸素産生能低下調節作用を持つことが示された。

以上の研究は、好中球の機能制御に関する機序解明に貢献し、好中球が深く関与する炎症病態の機構解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 12 年 2 月 8 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。