

氏名	さわ い ひろ ふみ 澤 井 宏 文
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 1847 号
学位授与の日付	平成 9 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	Role for ceramide in apoptosis of leukemia cells (白血病細胞のアポトーシスにおけるセラミドの役割)

論文調査委員 (主査)
教授 野田 亮 教授 永田和宏 教授 大熊 稔

論 文 内 容 の 要 旨

近年、スフィンゴ脂質の基本骨格をなすセラミドの細胞内シグナル伝達分子としての役割が明らかになってきた。ヒト白血病細胞 HL-60 の 1α , 25ジヒドロキシビタミン D_3 による単球系への分化の早期において細胞内セラミド量の一過性の増加が認められ、また、細胞膜透過性セラミドにより HL-60 細胞の単球系細胞への分化が生じることが報告され、セラミドの細胞分化における働きが示唆された。その後、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、放射線、抗 Fas 抗体などのアポトーシス誘導刺激によってもセラミドの増加が認められ、アポトーシスにおけるセラミドの役割が注目を浴びるようになった。

セラミドのアポトーシス・シグナル伝達経路について検討するために、まず、転写因子 AP-1 を構成し、TNF- α などの刺激による発現の増強が報告されている癌遺伝子 *c-jun* に対するセラミドの効果を調べた。HL-60 細胞を細胞膜透過性合成セラミド (C_2 -セラミド) で処理しノーザンブロット法にて *c-jun* mRNA 量の変化を調べたところ 1—2 時間をピークとして一過性に *c-jun* mRNA 量の増加を認め、また、核 run-on アッセイにより約 4 倍の転写活性の増加を認めた。さらに、ゲルシフト法にてセラミドによる AP-1 の DNA 結合活性の増加を認めた。セラミドによるアポトーシスにおける AP-1 の活性化の意義を調べるため、AP-1 の活性化を阻害することが報告されている curcumin, あるいは、*c-jun* のアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてセラミドによるアポトーシスに対する効果を見たところ、これらとの共処理によりアポトーシスが阻害されることがわかった。すなわち、セラミドによるアポトーシス誘導において AP-1 の活性化が重要な役割を果たすことが示唆された。

さらに、セラミドのアポトーシスにおける役割を明らかにするために以下の実験を行った。protein kinase C (PKC) は diacylglycerol (DAG) により活性化され細胞増殖などに関与することが知られているが、セラミドによるアポトーシスが PKC 活性化分子である DAG や TPA により阻害されることが報告された。セラミドと DAG には構造上の類似性があるが *in vitro* の実験系においてはセラミドは PKC 活性に影響しないことが報告されているので、別のアプローチとして PKC の細胞内局在性に対するセラ

ミドの効果を検討した。細胞を細胞質分画と膜分画に分離し、各 PKC アイソザイムに対する抗体を用いたウェスタンブロットにて、PKC δ および ϵ の膜から細胞質への移行がセラミド添加後 2—5 分をピークとして認められた。スフィンゴミエリナーゼ的作用によっても PKC δ および ϵ の細胞質への移行が見られたが、PLC、PLD、PLA₂ によっては見られなかった。TNF- α や抗 Fas 抗体を用いた実験においても PKC- δ 、 ϵ の細胞質への移行が認められた。次に、セラミドによるアポトーシスが TPA により阻害されることを確認し、この実験系においてセラミドによる PKC δ 、 ϵ の細胞質への移行が TPA により阻害され、逆に、TPA による PKC δ 、 ϵ の膜への移行がセラミドにより阻害されることを認めた。また、スタウロスポリンに PKC δ 、 ϵ を膜へ移行させる作用があり、セラミドによるアポトーシスがスタウロスポリンによっても阻害されることを見出した。これらの結果から、セラミドによるアポトーシス誘導において PKC δ および ϵ の膜から細胞質への移行が重要な役割を果たすことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、近年新たな細胞内シグナル伝達分子として注目されているセラミドの白血病細胞のアポトーシスにおける役割に関するものである。セラミドによる白血病細胞のアポトーシス誘導において *c-jun* 遺伝子の発現増強および c-Jun 蛋白により構成される転写因子 AP-1 の DNA 結合活性の亢進が認められ、さらに、*c-jun* のアンチセンスオリゴヌクレオチドによりセラミドによるアポトーシスの抑制が観察された。また、セラミドあるいはセラミドを介するアポトーシス誘導刺激 (TNF- α 、抗 Fas 抗体) によりプロテインキナーゼ C (PKC) δ および ϵ の膜分画から細胞質分画への移行が観察され、逆に TPA やスタウロスポリンにより PKC δ ・ ϵ の細胞質から膜への移行が誘導されるとセラミドによるアポトーシスが阻害された。これらのことから、セラミドによるアポトーシス誘導に転写因子 c-Jun / AP1 の活性化及び PKC δ ・ ϵ の膜分画から細胞質分画への移行が関与することが示唆された。

以上の研究は、セラミドを介する白血病細胞のアポトーシス誘導機構の解明に貢献し、白血病の発症機序の解明や新たな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 9 年 1 月 27 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。