

氏名	かた おか あき ひろ 片 岡 昭 浩
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 1901 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	Association of high molecular weight DNA fragmentation with apoptotic or non-apoptotic cell death induced by calcium ionophore (カルシウムイオノフォアによって誘導されるアポトーシスによる死とアポトーシスによらない死との高分子のDNA断片化に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 淀 井 淳 司 教 授 古 庄 卷 史

論 文 内 容 の 要 旨

アポトーシスにおいてはDNAの低分子(約180 bpの整数倍)断片化が一つの指標と考えられてきたが、最近の報告では高分子(200 kbp及び30 kbp)断片化も重要な役割を担っていることが示唆されている。本研究では、(1)この高分子のDNA断片化がアポトーシスにのみ特異的なものかどうか、(2)高分子DNA断片化を司るエンドヌクレアーゼ活性が無刺激の細胞に内在するのか、内在するのならばどのようなイオン要求性を示すのかについてヒト白血病細胞株を用いて検討した。

(1) A23187とThapsigarginは細胞内カルシウムを増加させ、ともに細胞死を起こすことが知られている。これらの薬剤を一定時間添加すると、骨髓性白血病細胞株のHL-60は形態的にアポトーシスを示した。この時にいわゆるラダーパターンと呼ばれるDNAの低分子断片化がアガロースゲル電気泳動法にて確認され、パルスフィールド法にてDNAの高分子断片化がみられることも確認された。一方、A23187とThapsigarginによってTリンパ性白血病細胞株のMOLT-4は形態的にネクローシスを示し、ラダーパターンもみられなかったのにも関わらず、DNAの高分子断片化がアポトーシス時同様に認められた。また、これらのDNA断片化はエンドヌクレアーゼの阻害作用を持つ亜鉛イオンにて抑制された。

(2) Autodigestion(様々なイオン存在下に細胞の分離核と細胞質をmixさせる方法)を用いて解析したところ、DNAの高分子断片化を司る内在性のエンドヌクレアーゼが両細胞株に確認された。さらに、イオン依存性についても検討したところ、アポトーシスを呈しやすい細胞(HL-60)においては内在性のエンドヌクレアーゼがマグネシウムに強い依存性を示し、ネクローシスを呈しやすい細胞(MOLT-4)ではカルシウムにのみ強く依存していた。これらの内在性のエンドヌクレアーゼ活性はともに亜鉛イオンによって抑制されることが確認された。細胞質と分離核を混合するautodigestionと分離核のみのautodigestionを比較することにより内在性のエンドヌクレアーゼ活性の細胞内局在性を調べたが、両細胞株

とも細胞核中ではなく細胞質内に存在することが示された。また、DNA の高分子断片化を誘導するエンドヌクレアーゼ活性がカルシウムイオノフォアで刺激されたあとで両細胞の細胞質中から核中に移動していることも超遠心法にて確認された。

本研究において、DNA の高分子断片化はアポトーシスのみに特異的ではなくネクローシスにおいてもみられることが初めて示された。また、DNA の高分子断片化を司る内在性のエンドヌクレアーゼの存在も確認し、そのイオン要求性と局在性を初めて検討した。以上のように、細胞死のメカニズムを明らかにする上で重要な知見を得ることができた。

論文審査の結果の要旨

本論文はアポトーシスとネクローシスにおける DNA の高分子断片化とそれに関与するエンドヌクレアーゼの性質について検討したものである。アポトーシスにおいては DNA の高分子（200 kbp 及び 30 kbp）断片化が重要な役割を担っていることが示唆されているが、ネクローシスにおいて調べた報告はこれまでにない。

本研究では HL-60 におけるアポトーシスの場合同様、MOLT-4 細胞におけるネクローシスの際にも DNA の高分子断片化が認められた。また、Autodigestion 法によって、DNA の高分子断片化を司る内在性のエンドヌクレアーゼが両細胞株中に確認され、HL-60 においてはマグネシウムに強い依存性を示し、MOLT-4 ではカルシウムにのみ強く依存する事が示された。また、エンドヌクレアーゼ活性は両細胞株とも細胞質内に存在することが示された。

以上の研究は、DNA の高分子断片化がアポトーシスのみに特異的ではないことを初めて示し、また、それを司る内在性エンドヌクレアーゼの存在と、そのイオン要求性及び局在性を初めて明らかにしたものであり、細胞死のメカニズムの解明に寄与する所が多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 9 年 2 月 21 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。