

氏 名	こん どう ただ かず 近 藤 忠 一
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2359 号
学位授与の日付	平 成 13 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	Role of c-jun Expression Increased by Heat Shock- and Ceramide-activated Caspase-3 in HL-60 Cell Apoptosis (HL60 細胞でのアポトーシスにおける温熱ショック及びセラミドにより活性化されるカスパーゼ-3を介した c-jun の役割)
論文調査委員	(主 査) 教 授 上 田 國 寛 教 授 永 田 和 宏 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

スフィンゴ脂質セラミドは様々なストレスによるアポトーシス誘導の重要なシグナルメディエーターであり、セラミドの下流シグナルとして転写因子 c-jun の活性化がアポトーシス誘導に必須であることが知られている。しかし、セラミドによる c-jun の活性化機構の詳細は不明であり、特に温熱ショックによるアポトーシス誘導時のセラミドの役割については知られていない。そこで、申請者は本研究により温熱ショックによるアポトーシス誘導時のセラミドの機能解析を行い、温熱ショックによるアポトーシス誘導時のセラミド産生機構、セラミドにより活性化されるカスパーゼ-3と c-jun の関係を解明した。

1) メイ・ギムザあるいは DAPI 染色にてクロマチン凝集、核の断片化を呈する細胞をアポトーシスと判定すると、37, 40, 42, 44°C 各々30分間の温熱ショック刺激により、温度依存性に白血病細胞株 HL-60 のアポトーシスの誘導がみられた。その際、細胞内セラミド量はブライ・ダイアー法にて脂質を抽出し、大腸菌のジアシルグリセロールキナーゼによるリン酸化を用いてセラミドをセラミド-1-リン酸に変換し (DGK アッセイ法)、その後薄層クロマトグラフィーにより展開分離し測定した。その結果、温熱ショック刺激温度依存性にセラミド量の増加がみられた。次に放射性 [^{14}C] コリンにてスフィンゴミエリン (SM) 標識後、温熱ショック刺激による SM の変化を測定すると、温度依存性に減少がみられた。更に、放射性 [^{14}C] SM を基質としてスフィンゴミエリナーゼ (SMase) 活性を測定すると、温熱ショック刺激、により中性マグネシウム依存性 SMase の活性化がみられたが、酸性及び中性マグネシウム非依存性 SMase の活性は変化がなかった。このことから温熱ショックによるセラミドの生成機構として、中性マグネシウム依存性 SMase の活性化により SM が加水分解されセラミドが生成されることが明らかとなった。

2) 次いで、温熱ショックによるアポトーシス誘導時のセラミドの下流のシグナル伝達経路の解析を施行した。42°C, 30 分間の温熱ショック刺激あるいは 10 μM の C2 セラミド投与により 2 時間後を最強点として c-jun 及び c-fos 転写因子の mRNA の増強がノーザンブロット法により確認された。c-jun のアンチセンスオリゴヌクレオチドを前投与すると温熱ショック刺激及び C2 セラミド投与によるアポトーシス誘導が抑制され、温熱ショックによるアポトーシス誘導には、セラミドを介した転写因子 c-jun の活性化が必須であると考えられた。更に、アポトーシス実行因子として認識されているカスパーゼ-3とセラミドを介した転写因子 c-jun との関わりを検討した。カスパーゼ-3 の特異的な阻害剤である合成ペプチド DMQD-CHO の前投与にて、温熱ショック刺激及び C2 セラミド投与によるカスパーゼ-3 の活性化、c-jun 転写因子の mRNA の増強、アポトーシス誘導は抑制されたが、温熱ショック刺激によるセラミド量の増加は有意な変化がなかった。このことから、カスパーゼ-3 はセラミドの下流に位置し、c-jun 転写因子の活性化に関与していると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

スフィンゴ脂質セラミドはアポトーシス誘導の重要なシグナル伝達物質であり、セラミドの下流シグナルとして転写因子

c-jun の活性化がアポトーシス誘導に必須であることが知られている。しかし、温熱ショックによるアポトーシス誘導時のセラミドの役割については知られていない。本研究は、温熱ショックによるアポトーシス誘導時のセラミドの機能解析を行い、セラミド産生機構、セラミドによる c-jun の活性化機構を解明したものである。

温熱ショックによりヒト白血病細胞株 HL-60 は温度依存性にアポトーシスの誘導がみられ、その際、中性マグネシウム依存性スフィンゴミエリナーゼが活性化され、スフィンゴミエリンが減少しセラミドの増加がみられた。又、c-jun のアンチセンスオリゴヌクレオチド投与により温熱ショックによるアポトーシス誘導が抑制された。更に、カスパーゼ-3 の特異的阻害剤である DMQD-CHO 投与により温熱ショック及びセラミドによる c-jun の mRNA の増強、アポトーシス誘導は抑制された。このことより、セラミドにより活性化されるカスパーゼ-3 を介した c-jun の活性化が温熱ショックによるアポトーシス誘導に重要であると考えられた。

本研究は、アポトーシス誘導におけるセラミドの機能の解明に貢献し、アポトーシス調節異常が関与している血液疾患の病態の究明に寄与するところが多い。従って、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、本学位申請者は平成13年2月15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。