

氏 名	わた なべ みつ まさ 渡 邊 光 正
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2773 号
学位授与の日付	平 成 16 年 5 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	Increase of nuclear ceramide through caspase-3-dependent regulation of the "sphingomyelin cycle" in Fas-induced apoptosis. (抗 Fas 抗体によるアポトーシス誘導時における細胞核でのカスパーゼ-3 依存性スフィンゴミエリンサイクルを介したセラミドの増加)
論文調査委員	(主 査) 教 授 前 川 平 教 授 米 原 伸 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

スフィンゴ脂質は生体膜の構成成分として細胞膜の構造維持, 細胞間相互作用や細胞間認識への関与, また膜ミクロドメインの構成成分として細胞外刺激に対する受容体機能調節を行うが, 近年, 細胞のシグナル伝達やその制御に直接関与することが明らかになった。またプログラムされた細胞死であるアポトーシスは様々なストレスにより誘導することができるが, このときに細胞内でセラミド量の増加を伴い, そのセラミドが脂質セカンドメッセンジャーとして機能することが示唆されている。セラミド産生代謝に関わる酵素はスフィンゴミエリナーゼ (SMase), スフィンゴミエリン合成酵素 (SMS), グルコシルセラミド合成酵素, セラミド合成酵素, セラミダーゼなどが存在し, 特に SMase と SMS より構成される「スフィンゴミエリン・サイクル」の制御と細胞機能調節との関連が注目されている。それぞれのセラミド関連酵素について細胞内の局在が明らかにされつつあるが, アポトーシスにおける核でのセラミドの産生と代謝, およびその役割に関しては未解明の部分が多い。そこで, T リンパ性白血病細胞株 Jurkat 細胞において抗 Fas 抗体を用いたアポトーシス誘導時の核でのセラミドの産生および代謝の意義を検討した。

抗 Fas 抗体により Jurkat 細胞にアポトーシスを生じさせ, annexin V にてアポトーシスを検出し, 同時にセラミド量の変化を diacylglycerol kinase (DGK) assay を用いて測定したところ, 時間および抗 Fas 抗体の濃度依存的にアポトーシスが増加し, それとともにセラミド量が膜分画のみならず, 核分画でも増加した。また, 共焦点レーザースキャン顕微鏡下で抗セラミド抗体を用いて観察したところ, セラミドが生合成の場である小胞体のみならず, 核で増加していることが示唆された。次にその条件下で C6-4-nitorobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD) スフィンゴミエリンを用いてスフィンゴミエリナーゼ活性を, C6-NBD セラミドを用いてグルコシルセラミド合成酵素活性とスフィンゴミエリン合成酵素活性を, C12-NBD セラミドを用いてセラミダーゼ活性をそれぞれ測定したところ, 中性スフィンゴミエリナーゼ活性の増加を核および膜分画で, スフィンゴミエリン合成酵素活性の低下を核分画のみで認めた。一方, その他の酵素活性は変化しなかった。さらにスフィンゴミエリン合成酵素の特異的阻害薬の D-609 を添加することで, 核分画でのスフィンゴミエリン合成酵素活性を抑制し, D-609 と抗 Fas 抗体共存条件でアポトーシス誘導を相乗的に増強した。さらにカスパーゼ-3 活性を acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-a-4-methyl-coumaryl-7-amide (DEVD-MCA) の水解反応により測定したところ, 細胞質に遅れて核でも活性の増加を認めたが, この活性の増加はカスパーゼ-3 の特異的阻害薬の DEVD-chloromethyl ketone (CMK) により阻害され, アポトーシスも抑制された。さらに DEVD-CMK は核での中性フィンゴミエリナーゼ活性の増加とスフィンゴミエリン合成酵素活性の低下を阻害し, 結果的にセラミドの増加も阻害した。

以上より, 抗 Fas 抗体誘導アポトーシスにおける Jurkat 細胞のセラミド増加は, これまで細胞膜での中性スフィンゴミエリナーゼ活性の増加により生じると考えられていたが, 核分画では中性スフィンゴミエリナーゼ活性の増加のみならずスフィンゴミエリン合成酵素活性の低下によりセラミドが増加することが示された。従って, 抗 Fas 抗体は, カスパーゼ-3 を介して核での「スフィンゴミエリン・サイクル」を制御することでセラミドを増加させる方向へバランスを取り, アポ

トーシスを誘導していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

セラミドはアポトーシス誘導時に細胞内で増加し、脂質セカンドメッセンジャーとして機能していることが示唆されているが、アポトーシスにおける核での、その産生と代謝、および役割に関しては未解明の部分が多い。本研究は、抗 Fas 抗体による Jurkat 細胞のアポトーシス誘導時の核でのセラミドの産生および代謝の意義を検討したものである。抗 Fas 抗体誘導アポトーシスにおける Jurkat 細胞のセラミド量を測定したところ、膜分画のみならず核分画でも増加を示した。次に、セラミドの産生・代謝酵素を測定したところ、核分画では中性スフィンゴミエリナーゼ活性の増加とスフィンゴミエリン合成酵素活性の低下が認められた。さらにスフィンゴミエリン合成酵素の特異的阻害薬により、セラミド量とアポトーシスの相乗的増加がみられ、この核での変化はカスパーゼ-3 の特異的阻害薬により阻害された。以上より抗 Fas 抗体誘導アポトーシスにおけるセラミド量の増加は、カスパーゼ-3 を介した「スフィンゴミエリン・サイクル」により制御されていると考えられた。

本研究はアポトーシス誘導時における、核でのセラミドの機能の解明に貢献し、アポトーシスの機構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のあるものと認める。なお、本学位申請者は平成16年3月26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。