

|             |                                                                                                                                                                                                           |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | 平 田 大 二                                                                                                                                                                                                   |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                                 |
| 学 位 記 番 号   | 医 博 第 2056 号                                                                                                                                                                                              |
| 学位授与の日付     | 平 成 10 年 11 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 | Caspases are Activated in a Branched Protease Cascade and Control Distinct Downstream Processes in Fas-induced Apoptosis<br>(Fas誘導アポトーシスにおいて、カスパーゼは分枝するプロテアーゼカスケードを形成して活性化し、異なる下流でのアポトーシス過程を制御する)<br>(主査) |
| 論 文 調 査 委 員 | 教 授 野 田 亮 教 授 藤 田 潤 教 授 内 山 卓                                                                                                                                                                             |

### 論 文 内 容 の 要 旨

Fas刺激により誘導されるアポトーシス細胞死は、生体において、T細胞の仲介する免疫反応の収束、immune privilegeの維持、自己抗体産生の防止、癌細胞やウイルス感染細胞の排除など、免疫系の制御に中心的役割を持つと考えられている。一方、線虫のアポトーシスに必須のプロテアーゼ、CED-3のヒトホモログであるcaspasesが、ヒトのアポトーシスにおいても中心的役割を担っていることが明らかになってきた。caspaseはプロセッシングにより活性化されるまではプロエンザイムとして存在し、アポトーシスの刺激によって、複数種のpro-caspasesがカスケードを形成して活性化すると推測されている。そこで、そのカスケードの同定を試み、その下流での生化学的、形態学的変化との相関を検討した。

二つの新規な合成ペプチドであるVEID-CHO, DMQD-CHOが、caspase-6, -3をそれぞれ選択的に阻害できることを明らかにした。活性化caspaseに特異的に結合するビオチン化ペプチド、YV (bio) KD-aomkを用いたアフィニティー・ラベリング法による検討で、Fas刺激されたヒトJurkat T細胞では、caspase-8活性化の下流で、caspase-3, -6, -7が段階的に活性化されてくることがわかっていた。そこでこれらのcaspaseのカスケードを同定するために、あらかじめ細胞をDMQD-CHOあるいはVEID-CHOで前処理し、caspase-3またはcaspase-6の活性化を阻害した状態で、抗Fas-IgM抗体で刺激した。その結果、前者ではcaspase-3と同時にcaspase-6の活性化も阻害されたが、caspase-7活性は保たれた。一方、後者でcaspase-6の活性化を阻害しても、caspase-3, -7の活性化に影響はなかった。また、リコンビナントの活性化caspase-3を無処理の細胞質抽出液に添加すると、caspase-6の活性が誘導されたが、caspase-7の活性化はみられなかった。in vitroではcaspase-7はpro-caspase-3をプロセッシングできないことが知られている。以上のことから、caspase-8の下流でcaspase-3とcaspase-7が各々独自に活性化され、次いで、caspase-3がcaspase-6を活性化するというカスケードの存在が強く示唆された。

次に、これらのカスケードにおける、個々のcaspaseの役割を、それぞれの阻害剤を使って検討した。その結果、caspase-6は核蛋白のひとつであるNuMAの切断、核の縮小化および断片化を仲介し、caspase-3はcaspase-6とは異なった部位でのNuMAの切断、DNA断片化、クロマチンの凝集を仲介することが示唆された。またcaspase-3は、アポトーシス小体の形成とそれを仲介する蛋白であるPAK-2の切断、phosphatidylserine (PS) の細胞膜表面への表出といった核外でのアポトーシス変化にも関与することが示唆された。これらと対照的に、caspase-3, caspase-6とは異なったcaspase (おそらくcaspase-7) は、ミトコンドリア膜電位の低下と、細胞質の縮小という現象の上流に位置していると考えられた。

以上の所見は、複数のcaspasesがプロテアーゼカスケードに沿って活性化され、各々の活性化caspaseはアポトーシスの

生化学的, 形態学的変化に独自の役割を果たしていることを示している。

## 論文審査の結果の要旨

インターロイキン-1 $\beta$ 転換酵素ファミリープロテアーゼ (caspase) がアポトーシス細胞死において中心的な役割を果たすことが報告されている。しかしその活性化機序と具体的な役割は充分には明らかにされていない。本研究はビオチン化ペプチドを用いたアフィニティ・ラベリング法を用いて, ヒトJurkat細胞をFasで刺激した時に複数のcaspaseがどのようなプロテアーゼカスケードを形成して活性化されるかを明らかにし, またその時観察される生化学的, 形態学的変化と個々のcaspaseとの関連を解析したものである。

Fasで刺激するとまずcaspase-8が活性化され, 続いてcaspase-8によってcaspase-3と-7が独立に活性化を受け, さらにcaspase-3によってcaspase-6が活性化されることを明らかにした。一方caspase-6が核の縮小並びに断片化を媒介し, またcaspase-3がDNA断片化, クロマチン凝集, アポトーシス小体の形成並びにphosphatidylserineの細胞表面への表出を媒介することを明らかにした。またcaspase-3, -6以外のcaspaseにより, 細胞質縮小, ミトコンドリア膜電位低下が誘導されると考えられた。

本研究は, アポトーシス細胞死の分子機構の解明に貢献し, 癌や自己免疫疾患などの病態解明や, 治療応用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, 本学位授与申請者は, 平成10年11月6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。