

氏 名	まつ だ とも こ 松 田 知 子
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	論 医 博 第 1833 号
学位授与の日付	平 成 15 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Suppression of Heat Shock Protein-70 by Ceramide in Heat Shock-induced HL-60 Cell Apoptosis (熱ショックにより誘導される HL-60 細胞のアポトーシスにおいて、セラミドは、熱ショック蛋白70を抑制する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 畑 龍 俊 教 授 前 川 平 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

セラミドは、多様なスフィンゴ脂質の化学構造上の骨格分子であり、アポトーシスの制御や細胞の分化など、細胞機能の制御において重要な役割を担っている。TNF- α 、抗Fas抗体、放射線、熱ショックなど各種のストレスが、セラミド産生を介し、アポトーシスを誘導する。その際、様々なアポトーシス誘導分子（活性酸素系、JNK など）や細胞生存誘導分子（Rb蛋白、Bcl-2、NF- κ B、c-Myc、MAP Kinaseなど）を調整することで、セラミドによるアポトーシス誘導シグナルが伝達されることが報告されている。

熱ショック蛋白（Hsp）は、熱処理により誘導されるが、定常状態でも存在し、細胞の様々な機能制御のために分子シャペロンとして機能している。Hspファミリー蛋白としてHsp-70、60、90、27などが知られ、それぞれ発現誘導の時間変化や細胞内分布に違いを示す。Hsp-70ファミリーとしては、ストレス誘導型のHsp-70、恒常的に発現しているHsc70、小胞体に存在するBIPなどが報告されているが、特にHsp-70の発現亢進は、熱ショックによるアポトーシス誘導に対する耐性の獲得に関与し、熱ショック・ストレス以外の各種ストレスによるアポトーシスも抑制する。本研究では、白血病細胞株HL-60を熱ショック処理した時に、セラミドがHsp-70とどの様に相互作用するかについて検討した。

HL-60細胞において、熱ショックを加えるとアポトーシス誘導の亢進に伴い細胞内セラミド生成の増加を認めた。細胞内セラミド量は、熱ショック直後から時間依存性に増加し、4時間後には170%まで増加した。また、それぞれ単独ではアポトーシスを誘導しない強度の熱ショックと同時に細胞膜透過性の合成セラミドであるC2-セラミドを添加すると、HL-60細胞のアポトーシス誘導が認められた。このことから、外因性のセラミドは、アポトーシス実行のシグナル伝達経路の増強だけでなく、アポトーシスを抑制するHspの発現阻害に関与している可能性が考えられた。

そこで熱ショック蛋白発現に対するセラミドの影響を検討したところ、C2-セラミドは熱ショックにより誘導されるHsp-70mRNA発現を強力に抑制し、同時にHsp-70蛋白の誘導も抑制した。しかし、Hsp-60およびHsp-90蛋白の誘導は、ほとんど抑制されなかった。次に、セラミドによるHsp-70蛋白の発現抑制機構を検討するために、熱ショックにより誘導される転写因子HSF-1とHSF-2の核内への移行に対するセラミドの効果を見たところ、両者とも核内移行はセラミドによっては影響されなかった。また、ラン・オン実験法により核内での転写調節を検討したところ、セラミドはHsp-70mRNAの転写速度にも影響をあたえなかった。一方、アクチノマイシンDにより新規mRNA合成を阻害した条件下、熱ショックにより増加したHsp-70mRNAの崩壊速度を測定したところ、セラミド添加によりmRNA量の減少が促進される事が判明した。したがって、セラミドは転写後のHsp-70mRNAの安定性に関与し、結果として蛋白発現量の増加を抑制していると考えられた。

以上の結果より、セラミドは熱ショックによるアポトーシスにおいて、抗アポトーシス作用をもつHSP-70mRNAの安定性に影響を与えることによってその蛋白発現を抑制し、より効率的にアポトーシスを誘導することが示された。

論文審査の結果の要旨

スフィンゴ脂質セラミドは、アポトーシスにおける重要なシグナル伝達物質であり、熱ショックによるアポトーシス誘導時に細胞内セラミドは増加する。一方熱処理により誘導される熱ショック蛋白 (Hsp) は、熱ショックを含む各種ストレスによるアポトーシスに対する耐性の獲得に関与する。しかしセラミドとHspのアポトーシス誘導機構における相互関係については明らかでない。申請者は、ヒト白血病細胞株を用いて、熱ショックによるアポトーシス誘導時のセラミド・シグナル増加とHsp発現調節の相互関係とその意義を検討した。

熱処理によるアポトーシス誘導に伴い細胞内セラミド生成は増加し、熱処理と同時に低濃度の膜透過性セラミドを添加すると、アポトーシス誘導は増強された。一方、膜透過性セラミドは熱処理後誘導される Hsp-70 の mRNA 発現および蛋白誘導を強力に抑制した。セラミドは転写因子 HSF-1 の核内移行に伴う活性化に影響せず、Hsp-70 mRNA の転写速度にも影響しなかったが、Hsp-70 mRNA の崩壊速度を促進した。これらの結果より、セラミドは転写後の Hsp-70 mRNA の安定性に関与し、結果として蛋白発現量の増加を抑制すると考えられた。

以上の研究は、アポトーシス誘導におけるセラミド機能の解明に貢献することにより、造血器腫瘍の抗癌剤耐性化の病態解明と将来のセラミドを分子標的とする新規治療法の可能性を示唆する。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15年6月9日実施の論文内容とそれに関連した研究分野の試問を受け、合格と認められたものである。