

氏 名	みやはら こ と ね やす こ 宮原(小刀欄) 裕 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2844 号
学位授与の日付	平成 17 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	Short-term delay of Fas-stimulated apoptosis by GM-CSF as a result of temporary suppression of FADD recruitment in neutrophils: evidence implicating phosphatidylinositol 3-kinase and MEK1-ERK1/2 pathways downstream of classical protein kinase C (GM-CSF は cPKC を介する PI3K および MEK1-ERK1/2 の活性化により FADD の Fas への会合を抑制し Fas 誘導好中球アポトーシスを遅延させる。)
論文調査委員	(主 査) 教 授 前 川 平 教 授 湊 長 博 教 授 長 澤 丘 司

論 文 内 容 の 要 旨

好中球は細菌や真菌の侵入部位に集積しこれら病原微生物を貪食、殺菌した後、アポトーシス細胞死に陥りマクロファージにより除去される。このアポトーシスによる好中球の除去は炎症反応の終息に重要な役割を担っており、それが過度に抑制されると炎症反応が延長し組織障害を起こしうる。炎症局所においては様々な因子が好中球アポトーシスを調節しており、それらのバランスが崩れることが好中球機能亢進に基づく病態の形成に関わっている。

本研究では、アポトーシス抑制作用を有し様々な炎症病態に関与する炎症性サイトカイン GM-CSF の生存シグナルが死の受容体 Fas によって誘導されるアポトーシスシグナルとどのように相互作用するかを検討した。

ヒト正常好中球に、抗 Fas 抗体とシクロヘキシミド (CHX) によりアポトーシスを誘導した。GM-CSF は、Fas 誘導アポトーシスの中心経路である caspase cascade に対して、その最初の段階の procaspase-8 の活性化を阻害した。そこで、Fas と procaspase-8 を架橋して DISC と呼ばれる複合体を形成させるアダプター蛋白 FADD に対する GM-CSF の影響を解析した。細胞を抗 Fas 抗体で刺激後に、別の抗 Fas 抗体を用いて免疫沈降を行うことにより、好中球から DISC を免疫沈降した。GM-CSF で前処理した細胞では、FADD の Fas に対する会合が抑制され、GM-CSF がこの段階で Fas のシグナルを阻害することが明らかとなった。次に 2 次元電気泳動により FADD を解析したところ、好中球に等電点および SDS-PAGE での泳動度の異なる 5 つのスポットが検出され、翻訳後修飾の異なる FADD 分子の存在が示唆された。そして、また GM-CSF によりそれらのスポットの比率が変化した。

classical PKC (cPKC) の阻害剤 Gö6976, PI3K の阻害剤 LY294002, MEK1 の阻害剤 PD98059 を用いた解析により、GM-CSF が cPKC を介して PI3K と MEK1-ERK1/2 経路を活性化すると考えられた。cPKC の阻害、または PI3K と MEK1 の同時阻害によって、GM-CSF による FADD の Fas への会合の抑制および FADD の翻訳後修飾の変化が共に解消された。また、これらの GM-CSF の FADD への影響は、可逆的な変化であった。以上より、GM-CSF が cPKC の下流に平行して存在する PI3K と MEK1-ERK1/2 を活性化することにより FADD を可逆的に修飾し、FADD の Fas への会合を抑制することにより、Fas 誘導アポトーシスを遅延させることが明らかとなった。

本研究では ex vivo で GM-CSF と Fas のシグナルのクロストークを解析することで、好中球アポトーシスの制御機構についての新しい洞察が得られた。今後の研究課題としては、GM-CSF による FADD 分子の翻訳後修飾の実体の解明が挙げられる。さらに、生体内での生死シグナルのクロストークの解明のために、GM-CSF や Fas リガンドの炎症局所での濃度、他のサイトカインとの相互作用など in vivo での解析を進めることが重要と考える。

論文審査の結果の要旨

好中球は細菌や真菌の侵入部位に集積し病原微生物を貪食、殺菌した後、アポトーシスに陥いる。このアポトーシスによる好中球の除去は炎症反応の終息に重要な役割を担っており、それが過度に抑制されると炎症反応が延長し組織傷害を起こしうる。本研究は、アポトーシス抑制作用を有し様々な炎症病態に関与する GM-CSF の生存シグナルが死の受容体 Fas によって誘導されるアポトーシスシグナルとどのように相互作用するかを検討したものである。

健常人末梢血好中球に、抗 Fas 抗体とシクロヘキシミド (CHX) によりアポトーシスを誘導した。GM-CSF で前処理した細胞では、FADD の Fas に対する会合が抑制された。また 2 次元電気泳動において、好中球には翻訳後修飾の異なる 5 つの FADD 分子が存在することが示唆され、GM-CSF によりそれらのスポットの比率が変化した。次に classical PKC (cPKC)、PI3K、MEK1 の阻害剤を用いてこれらの GM-CSF の作用機序を検討した。その結果、GM-CSF は、cPKC の下流に平行して存在する PI3K と MEK1-ERK1/2 を活性化することにより、FADD を可逆的に修飾し、Fas への会合を抑制すると考えられた。

本研究は、好中球アポトーシスの制御機構解明に貢献し、炎症性疾患等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17年2月17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。