

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	菊池 弥奈
論文題目	T 細胞の増殖・生存における caspase-8 の新規機能の解析		
(論文内容の要旨)			
caspase-8 はデスレセプターを介するアポトーシスシグナル伝達経路において重要な役割をもつ一方、細胞の生存にも関与し、胚発生、T 細胞の活性化、腫瘍壊死因子α (TNF-α)などにより誘導されるネクローシスへの抵抗性獲得にも必要とされている。さらに、T 細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスの解析から、caspase-8 欠損 T 細胞では、抗原刺激によって誘導される細胞増殖能が低下することが明らかとなっている。本研究では、T 細胞の増殖や生存維持に caspase-8 がどのように関与しているかについて詳細な分子機構を解明するため、caspase-8 の発現抑制により細胞死が誘導されるマウス T 細胞リンパ腫由来 L5178Y 細胞を樹立し、その解析を行った。 具体的には、テトラサイクリンリプレッサーを用いた short hairpin RNA (shRNA)発現誘導システムをレンチウイルスベクターによって細胞に導入し、薬剤処理により caspase-8 に特異的な shRNA が発現誘導される細胞株を申請者は作製した。この細胞に caspase-8 発現抑制を誘導すると、細胞死の誘導が認められた。caspase-8 は通常では前駆体として存在するが、アポトーシス誘導刺激が入ると、自己の弱いプロテアーゼ活性により自己切断し、活性化型の caspase-8 へと変換され、強いプロテアーゼ活性を有するようになる。このような caspase-8 の機能が、その発現抑制による細胞死の誘導に関与しているか確認するため、本研究で用いた caspase-8 特異的 shRNA が作用できない変異を導入した外来性 WT caspase-8、caspase-8 のプロテアーゼ活性中心に変異を導入した CS mutant、および、caspase-8 の自己切断部位に変異を導入した DE mutant（前駆体としてのみ存在する）を強制発現した細胞株を申請者は作製した。これらの分子を発現した細胞株において、内在性 caspase-8 の発現抑制を行った結果、WT caspase-8 と自己切断が行えない DE mutant の強制発現細胞では、細胞死の回避が認められたが、プロテアーゼ活性を持たない CS mutant 強制発現細胞では認められなかった。これらの結果から、caspase-8 前駆体のプロテアーゼ活性が T リンパ腫由来細胞の増殖と生存に必要であることが明らかとなった。次に申請者は、caspase-8 発現抑制細胞ではどのような細胞死が誘導されているかについて解析を行った結果、アポトーシスに特徴的な染色体の断片化や実行 caspase の活性化が認められた。一方、オートファジー性細胞死に特徴的な LC3 タンパク質の変換が認められ、オートファゴソーム形成因子を阻害することにより細胞死が部分的に抑制された。これらの結果より、caspase-8 発現抑制細胞では、アポトーシスおよび非アポトーシス性細胞死が同時に誘導されていることが示唆された。また、caspase-8 発現抑制細胞では、細胞死の誘導と共に、細胞内の reactive oxygen species (ROS)蓄積量の増加が認められ、ROS scavenger の投与により細胞増殖低下と細胞死からの回復が認められた。一方、ネクロプトーシス関連因子の RIP1 特異的阻害剤の投与、および、RIP3 を発現抑制することによっても、細胞死からの回復が認められた。 これらの結果より、T リンパ腫細胞では、caspase-8 前駆体のプロテアーゼ活性が恒常的に RIP1/RIP3 の活性化を抑制し、RIP1/RIP3 誘因性の ROS 蓄積によって誘導されるアポトーシスおよび非アポトーシス性細胞死から回避させていることが明らかとなった。本研究によりデスレセプターを介するアポトーシスの誘導に必要な不可欠な分子である caspase-8 が、細胞の生存にも同時に寄与していることが示され、caspase-8 は細胞死・細胞生存という 2 つの相反する生物学的機能において重要な役割を持つことが明らかとなった。			

(論文審査の結果の要旨)

caspase-8 は Fas などの death receptor を介して誘導されるアポトーシスに必須の分子であり、外因性経路を介するアポトーシス誘導の初期に活性化される開始 caspase である。ところが、近年になって caspase-8 がアポトーシスの誘導に機能するだけでなく、ネクロプトーシスを含む計画的なネクローシスの阻害に機能することが報告され、注目を集めている。

申請者は、このような caspase-8 の多様な機能を分子レベルで解明するために、caspase-8 の発現抑制を薬剤依存的に誘導する T 細胞株を樹立し、再現性良く caspase-8 の細胞死抑制機能を解析する系を立ち上げることに成功した。これまで再現性の問題などで分子レベルでの解析が困難であった caspase-8 の細胞死抑制機能を詳細に解析することを可能とする系を立ち上げたことは評価に値する。そして申請者による解析の結果、アポトーシスならびに、非アポトーシスであるオートファジー性細胞死とネクロプトーシスが、一つの細胞で同時に誘導されるという興味深い現象を強く示唆する結果を得た。従来、アポトーシスや非アポトーシス細胞死は、一つ一つの細胞では別々に誘導されると考えられていたが、本研究によって、多様な細胞死が一つの細胞で同時に引き起こされるという事実が示された。近年になって、caspase-8 が阻害するネクロプトーシスの誘導には RIP1 と RIP3 というプロテインキナーゼが関与するということが明らかになり、計画的ネクローシスの研究が進んでいる。このような状況のもと、本研究では、アポトーシスも RIP1 と RIP3 の下流で誘導されることを示しており、ネクローシスとアポトーシスという全く異なった種類に分類される細胞死を RIP1 と RIP3 が同時に調節しているという新しい知見を得ることに成功している。それだけでなく、オートファジー性細胞死までもが RIP1 と RIP3 の下流で引き起こされるという結果も得ており、重要な解析系を構築したと考えられる。

本研究によって、caspase-8 によって負に制御される RIP1 と RIP3 の下流で reactive oxygen species の誘導が引き起こされ、それを介してアポトーシス、オートファジー性細胞死、ネクロプトーシスという異なった種類の細胞死が同時に引き起こされるシステムが T 細胞に存在し、これを caspase-8 が負に制御することが示された。細胞死という現象が多様であると明確化された状況のもと、T 細胞における多様な細胞死の制御機構とその実態を示した本論文は意義あるものであり、博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成 25 年 1 月 31 日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日