

氏 名	ひ した て る とし 日 下 輝 年
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2393 号
学位授与の日付	平 成 13 年 5 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	Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in a myelodysplastic syndrome (MDS)-derived cell line P39. (骨髄異形成症候群由来 P39 細胞におけるアポトーシスではチトクローム c を介さずライソゾーム由来の酵素によってカスパーゼ-3が活性化される)
論文調査委員	(主 査) 教 授 鍋 島 陽 一 教 授 西 川 伸 一 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

アポトーシスは多くの場合、ミトコンドリアの膜電位の破綻が早期に引き起こされ、ミトコンドリアの機能を障害するとともにチトクローム c が逸脱し caspase-3 が活性化される。しかしながら、骨髄異形成症候群由来 P39 細胞を用いて etoposide でアポトーシスを誘導した場合、チトクローム c の逸脱を伴わないアポトーシスが観察された。さらに、etoposide で処理した P39 細胞ではフローサイトメトリーにてミトコンドリアの膜電位 ($\Delta\Psi_m$) の変化が検出されなかった。

pH 感受性蛍光プローブである FITC-dextran を用いたフローサイトメトリーでは、etoposide 処理後90分までは経時的な蛍光強度の上昇が認められ、P39 細胞では etoposide 処理によってライソゾーム pH が上昇することが示唆された。また、細胞内 ATP 濃度を経時的に観察したところライソゾーム pH の上昇に先行して細胞内 ATP 濃度が低下していた。ライソゾームの膜に存在し、ライソゾーム内の pH を至適に維持する vacuolar H⁺-ATPase の特異的阻害剤である bafilomycin A 及び concanamycin A1 は P39 細胞ではアポトーシスを誘導したが、HL60 細胞ではほとんどアポトーシスを惹起しなかった。etoposide でアポトーシスを誘導した P39 細胞では、caspase-3 の活性化に引き続いて DNA ラダーの形成がみられたが、ライソゾーム由来プロテアーゼの阻害剤である E-64d は caspase-3 の活性化を抑制し、濃度依存性にアポトーシスを抑制した。また、ウェスタンブロット法では etoposide 処理後 1 時間では無処理細胞の 2 倍、4 時間では無処理細胞の約 10 倍量のカテプシン L が検出され、P39 細胞のアポトーシスにおけるカテプシン L の関与が示された。

これらの知見から、etoposide 処理による P39 細胞のアポトーシスでは、細胞内 ATP の低下がライソゾームの機能不全を引き起こしてライソゾーム酵素であるカテプシン L が漏出し、caspase-3 の活性化に関与していることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

骨髄異形成症候群由来 P39 細胞を用いて etoposide でアポトーシスを誘導したところ、従来報告されているものとは異なるミトコンドリアの関与しないアポトーシス機構の存在が示唆されたため、その解析を行った。pH 感受性蛍光プローブである FITC-dextran を用いて調べたところ、P39 細胞では etoposide 処理によってライソゾーム pH が上昇し、その上昇に先行して細胞内 ATP 濃度が低下した。vacuolar H⁺-ATPase の特異的阻害剤は P39 細胞ではアポトーシスを誘導したが、HL60 細胞では殆どアポトーシスを惹起しなかった。さらに、etoposide でアポトーシスを誘導した P39 細胞では caspase-3 の活性化後 DNA ラダーの形成がみられたが、ライソゾーム由来プロテアーゼの阻害剤である E-64k はアポトーシスを抑制した。この抑制実験及びウェスタンブロット法の結果から、当該プロテアーゼとしてカテプシン L が考えられた。これらの知見から、etoposide 処理による P39 細胞のアポトーシスでは、細胞内 ATP の低下によるライソゾームの機能不全によってライソゾーム酵素が漏出し、caspase-3 の活性化に関与していることが示唆された。

本研究は、アポトーシスの分子機構の解明に貢献し、骨髄異形成症候群や白血病などの血液疾患、その他の癌の病態解明

や治療応用に寄与するところが多い。

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13年3月16日実施の論文内容とそれに関係した試問を受け、合格と認められたものである。