

|             |                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | こ ばやし すすむ<br>小 林 進                                                                                                                                                                                                              |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                                                                       |
| 学 位 記 番 号   | 医 博 第 2585 号                                                                                                                                                                                                                    |
| 学位授与の日付     | 平 成 15 年 3 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 | Calpain - mediated X - linked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia<br>(好中球アポトーシスにおける X-linked inhibitor of apoptosis の カルパインによる分解と、その慢性好中球性白血病における異常) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 前 川 平 教 授 中 畑 龍 俊 教 授 内 山 卓                                                                                                                                                                                        |

### 論 文 内 容 の 要 旨

好中球は骨髄で産生され、循環血液中に移動した後、血管壁を通過して組織に移行する。好中球はそこで病原体を貪食、殺菌し、役割を終えると速やかにアポトーシスに陥り、マクロファージによって貪食される。この産生とアポトーシスとのバランスによって、好中球数並びに総体としての好中球機能が制御されると考えられている。従ってアポトーシスの異常は体内の好中球数に影響を与える可能性がある。本研究は好中球アポトーシスの機序解明を目的として、特にアポトーシス実行分子カスパーゼの阻害蛋白である X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) に注目し、その好中球アポトーシスにおける動態および役割について検討した。

分離した正常好中球において  $\text{TNF}\alpha$  によりアポトーシスを誘導すると、ウェスタンブロット法にて時間とともに XIAP の消失が認められた。これはカルパイン阻害剤であるカルペプチンにより阻害され、XIAP の消失にカルパインが関与している可能性が考えられた。また、好中球をカルシウムイオノフォアで刺激しカルパイン活性を上昇させると XIAP の消失が認められた。さらに精製された  $\mu$  および  $m$  カルパインは、共に、組換えタンパクとして精製された XIAP を *in vitro* で直接切断した。これらの所見から、好中球アポトーシスの過程でカルパインが XIAP を切断していることが示唆された。好中球には、カルパイン活性が恒常的に存在する。 $\text{TNF}\alpha$  で処理した好中球において、XIAP はまずカルパインによって切断され、その後カスパーゼによって切断されていた。また、*in vitro* で精製カルパインによって切断された精製 XIAP はカスパーゼ 3 活性を抑制しなかった。これらのことから、カルパインによる XIAP の切断により、カスパーゼ 3 が XIAP による抑制から解放され、さらにカスパーゼ 3 が XIAP を切断するポジティブフィードバックの存在が示唆された。好中球をカルペプチンで前処理すると、 $\text{TNF}\alpha$  誘導アポトーシスは遅延した。以上の所見から、好中球の恒常的なカルパイン活性は、XIAP を徐々に切断することによって、カスパーゼ 3 の活性化、ひいてはアポトーシスを促進していると考えられた。

次に、成熟好中球の著しい増加を特徴とする慢性好中球性白血病 3 例について検討したところ、患者好中球においてカルパイン活性が低下していた。ウェスタンブロット法では  $\mu$  カルパイン大サブユニット発現量の減少が認められた。また、患者好中球を  $\text{TNF}\alpha$  で処理した場合の XIAP の消失は遅延し、カスパーゼ 3 の活性は低下していた。更に、患者好中球のアポトーシスは抗 Fas 抗体刺激、 $\text{TNF}\alpha$  誘導、自発的アポトーシスすべてにおいて遅延していた。これらの所見から、少なくとも慢性好中球性白血病の一部の症例では、カルパインの活性低下が、XIAP の分解を遅延させ、カスパーゼ 3 の活性低下とアポトーシスの遅延をもたらして好中球増多に寄与している可能性が示された。

以上の結果から、好中球のアポトーシスにはカルパインによる XIAP の切断が関与していること、さらにこの機構の異常がアポトーシスを遅延させ慢性好中球性白血病などの疾患での好中球増加につながりうることを示された。

## 論文審査の結果の要旨

生体内の好中球数は、産生とアポトーシスとのバランスによって制御されていると考えられ、従ってアポトーシスの異常は好中球数を変動させ、また諸種病態形成に係わっている可能性がある。本研究は好中球アポトーシスの機序解明を目的とし、特にアポトーシス実行分子カスパーゼの阻害蛋白の1つである X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) に焦点を当て、その動態および役割について検討したものである。

TNF $\alpha$  でアポトーシスを誘導した好中球において、ウェスタンブロット法にて XIAP の消失が認められた。その機序を解析したところ、カルパインが XIAP を切断し、切断された XIAP はカスパーゼ3 活性を抑制できなくなるため、その結果としてアポトーシスを促進すると考えられる結果を得た。

次に、3 例の慢性好中球性白血病の好中球において、 $\mu$  カルパイン大サブユニット発現量の減少およびカルパイン活性の低下が認められ、アポトーシス誘導時の XIAP 消失の遅延およびカスパーゼ3 活性化の遅延が認められた。これらは本疾患好中球のアポトーシス遅延並びに好中球数増加に深く関与すると考えられた。

本研究は、好中球アポトーシス機構解明に貢献し慢性好中球性白血病をはじめ好中球数に異常を示す諸疾患の病態解明に寄与し、さらに治療の新しい観点を提供している。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15年1月27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。