

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
山田勝彦	主査 教授 玉井 浩 副査 教授 大槻 勝紀 副査 教授 花房 俊昭 副査 教授 鏡山 博行 副査 教授 清水 章
主論文題名 Cholesteryl-hemisuccinate-induced apoptosis of promyelocytic leukemia HL-60 cells through a cyclosporin A-insensitive mechanism. (コレステリールヘミサクシネートによるヒト前骨髄性白血病細胞(HL-60)のアポトーシス誘導機構とそのサイクロスポリン A 感受性)	
学位論文内容の要旨	
<p>《緒言》 ミトコンドリアはアポトーシス誘導において重要な役割を担うと考えられる。膜透過性遷移(classic Membrane Permeability Transition 以下 classic MPT と略す。)はアポトーシスの初期段階においてしばしば見られる反応の1つだが、それはサイクロスポリン A (CsA)に依存し細胞内カルシウム濃度 $[Ca^{2+}]_i$ によって制御される。近年、ガン治療の分野において、腫瘍細胞をアポトーシスへ誘導する方法が注目を集めている。α-トコフェロール (VE) のコハク酸エステルである α-トコフェロールサクシネート (VES) が、ミトコンドリアの MPT を介してヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 にアポトーシスを誘導することが報告されているが (Free Radical Res.2000;33)、今回コレステロール (C) のコハク酸エステルであるコレステリールヘミサクシネート (CS) も HL-60 にアポトーシスを誘導したので VES と比較しその機構解析を試みた。</p> <p>《方法》 実験にはヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 を用いた。DNA 断片化はアガロースゲル電気泳動による DNA ラダー形成、蛍光色素 hoechst 33342 による核染色、ジフェニールアミン法により検出、測定された。カスパーゼ活性は蛍光合成ペプチドを使用して測定された。シトクロム C の遊離、Bid の修飾、Bax, Bcl-2 の発現、Akt のリン酸化はイムノブロットにより検出された。ミトコンドリアの膜電位変化は蛍光色素 JC-1 を用いてフローサイトメトリー、蛍光顕微鏡で測定、観察された。$[Ca^{2+}]_i$ は蛍光色素 Fura-2 AM の取り込みにより測定された。</p> <p>《結果》 CS は HL-60 に対し、用量及び時間依存的に DNA の断片化を誘導し、アガロースゲル電気泳動による DNA ラダー形成も観察された。しかし C では DNA 断片化を起こさなかった。また CS による DNA 断片化は pan-caspase inhibitor, z-VAD-fmk によって抑制されたが、classic MPT の阻害剤である CsA では促進された。このことから CS により誘導される DNA 断片化は classic MPT ではなくカスパーゼカスケードの活性化に依存すると考えられた。</p>	

次にカスパーゼ活性について検討を行った。CS によりカスパーゼ3活性は DNA 断片化に伴って時間及び CS 濃度依存的に上昇した。カスパーゼ6, 8, 9も CS により軽度活性化を示した。しかしカスパーゼ1は活性化されなかった。

カスパーゼ9の活性化がみられることよりシトクロム C(cyt. c)がミトコンドリアから細胞質に遊離することが示唆される。事実 CS により HL-60 の細胞質分画に cyt. cが発現することをイムノブロット法で確認した。また cyt. cのミトコンドリアからの遊離は z-VAD-fmk によって抑制された。さらにカスパーゼ8によって修飾される Bid はミトコンドリアから cyt. cを遊離させるが、CS による Bid の修飾も z-VAD-fmk によって抑制された。このことは VES の場合と同様、CS の場合も HL-60 におけるミトコンドリアからの cyt. cの遊離に Bid を介した経路が関係していると考えられた。

次に、CS による cyt. cの遊離が classic MPT に依存するかどうかを蛍光色素 JC-1 を用いて検討した。50 μ M CS 投与後、時間依存的に HL-60 のミトコンドリア膜電位は低下した。しかし CS による HL-60 のミトコンドリア膜電位低下は CsA で促進され、z-VAD-fmk、膜透過型 cAMP (pCPT-cAMP) で完全に抑制された。さらに CS による HL-60 の DNA 断片化も z-VAD-fmk、pCPT-cAMP で抑制された。このことから CS によるミトコンドリアからの cyt. cの遊離は、カスパーゼカスケード、そしてなんらかの cAMP 依存性の因子によっておこる、non-classic MPT によるものと考えられた。

また classic MPT は $[Ca^{2+}]_i$ によって制御されるが、VES の場合は HL-60 において $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が見られたが CS の場合は変化がなかった。

pCPT-cAMP は CS による HL-60 の DNA 断片化を完全に抑制した。そこでイムノブロットにより cAMP 依存性プロテインキナーゼである Akt (pleckstrin homology domain-containing protein kinase B)の脱リン酸化を検出した所、50 μ M CS 投与後4-6時間で Akt の脱リン酸化が認められ、それは DNA 断片化の開始と一致すると思われた。

《考察》

最近 non-classic MPT という CsA 非依存的で膨潤や膜電位低下を伴わない cyt. cの遊離が報告されているが、実験データから、CS によるミトコンドリアから細胞質への cyt. cの遊離は non-classic MPT によるもので、ミトコンドリアの膜電位の低下は、カスパーゼ活性の結果によるものと考えられた。また cAMP に依存されるプロテインキナーゼ Akt がカスパーゼ8を制御しているという報告も見られるようになった。今回の実験結果では CS が Akt を脱リン酸化し、pCPT-cAMP で CS による HL-60 の DNA 断片化が著しく抑制されたが、VES の場合も同様の結果を得た。このことから VES, CS によるアポトーシスの初期反応に Akt が関与することが考えられ、CS による HL-60 細胞のアポトーシス誘導過程として、Akt の脱リン酸化、Bid の修飾、カスパーゼ8の活性化、Apaf complex の活性化という機構が考えられた。

また VES により HL-60 において $[Ca^{2+}]_i$ の上昇、蛍光色素 DCFH で測定される ROS の産生が認められることが報告されている。しかし今回の実験ではそのいずれも CS の場合は認められず、VES によるアポトーシス誘導は CS と異なる過程も含まれていると考えられた。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第687号	氏名	山田勝彦
論文審査担当者		主査 教授 玉井 浩	副査 教授 大槻 勝紀
		副査 教授 花房 俊昭	副査 教授 鏡山 博行
		副査 教授 清水 章	
主論文題名			
<p>Cholesteryl-hemisuccinate-induced apoptosis of promyelocytic leukemia HL-60 cells through a cyclosporin A-insensitive mechanism.</p> <p>コレステリールヘミサクシネートによるヒト前骨髄性白血病細胞(HL-60)のアポトーシス誘導機構とそのサイクロスポリン A 感受性</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>《審査結果》</p> <p>申請者はコレステリールヘミサクシネート(CS)が HL-60 細胞に対しアポトーシスを誘導することを示している。CS はアポトーシス誘導作用のあるビタミン E サクシネート(VES)と構造が類似するため、本研究はコハク酸エステルによる癌細胞のアポトーシス誘導機構を解明するための糸口となり得る。</p> <p>今回の実験結果から、Akt の脱リン酸化、Bid の修飾、カスパーゼ8の活性化、Apaf complex の活性化というアポトーシス誘導機構が考えられた。pCPT-cAMP は CS による HL-60 の DNA 断片化を完全に抑制し、cAMP 依存性プロテインキナーゼである pleckstrin homology domain-containing protein kinase B(Akt)の脱リン酸化が関与することが示された。</p> <p>CS は VES と異なり、HL-60 細胞のアポトーシス誘導には$[Ca^{2+}]_i$ の上昇を伴わない。従って両者は異なった機構でアポトーシスを誘導すると考えている。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌)</p> <p>Biochemical Pharmacology 65(3): 339-348, 2003</p>			