

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
井上 彰子	主査 教授 玉 井 浩 副査 教授 大 槻 勝 紀 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 勝 健 一 副査 教授 林 秀 行
主論文題名 Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: dependency on reactive oxygen species, Akt, Bid, cytochrome c, and caspase pathway. (ジクロフェナクによるヒト前骨髄性白血病細胞のアポトーシス誘導機構)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>Diclofenac sodium (DCLF) は non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) の一種であり広く臨床の場で用いられる薬剤である。その副作用としての Reye 症候群、インフルエンザ脳症、汎血球減少、肝腎機能障害などに DCLF によるアポトーシス誘導が関与することが報告されている。さらに、多くの NSAIDs が培養腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導することもよく知られており、一部の白血病に対して NSAIDs による治療が試みられている。しかし DCLF によるアポトーシスの誘導機序はなお明らかでなく、その機序の解明は DCLF の副作用の軽減や抗腫瘍薬としての可能性を知る上でも重要であると考えられる。</p> <p>本研究では、ヒト培養白血病細胞を用いて DCLF によるアポトーシス誘導能及びその機序、さらに DCLF の抗白血病薬としての可能性について検討した。</p> <p>《方 法》</p> <p>ヒト培養前骨髄性白血病細胞 HL-60 を用いて DCLF 処理によるアポトーシスを誘導した。DNA 断片化は蛍光色素 Hoechst 33342 による核染色、diphenylamine 法により検出、測定した。caspase 活性は蛍光合成ペプチドを使用して測定した。Cytochrome <i>c</i> (Cyt. <i>c</i>) の遊離、Bid の分解、Akt のリン酸化はそれぞれの抗体による Western blot 法により検出した。ミトコンドリア膜電位変化は蛍光色素 JC-1 を用いて FACS にて解析した。細胞内活性酸素種 reactive oxygen species (ROS) 生成は蛍光色素 DCFH を用いて FACS にて解析した。脱共役タンパク質 uncoupling protein2 (UCP2) は Northern blot 法により検出した。</p> <p>《結 果》</p> <p>HL-60 細胞では DCLF 処理により、</p> <p>1) 細胞周期において G2/M 期停止をきたすことにより濃度、時間依存的に細胞増殖抑制を示し、アポトーシスに典型的な形態変化(細胞縮化や核の断片化)や DNA 断片化を認めた。DNA 断片化は caspase 阻害剤 (<math>\alpha</math>-VAD-fmk) で抑制されたが、ミトコンドリア膜透過性遷移阻害剤である cyclosporin A では抑制されなかった。</p>	

- 2) Caspase-3、-8、-9 の活性化、ミトコンドリアからの Cyt.c の遊離、ミトコンドリア膜電位の低下を認めた。さらに caspase-8 は caspase-3、-9 と比較して早期より活性化され、Cyt.c の遊離(処理後 3 時間)はミトコンドリア膜電位の低下(処理後 6 時間)に先だって認められた。
- 3) 処理後 3 時間で Bid の分解を認め、それは caspase-8 阻害剤(Ac-IETD-CHO)、Akt のリン酸化を促す pCPT-cAMP で抑制された。また Akt の脱リン酸化を認め、それは pCPT-cAMP により抑制、PI3 キナーゼ阻害剤 (LY294002)により増強された。
- 4) 処理後1時間で ROS 生成が確認され、抗酸化物である N-acetyl-L-cystein はその ROS 生成のみならず Akt の脱リン酸化、caspase-8 の活性化、DNA 断片化をも抑制した。
- 5) Uncoupling protein 2 (UCP2) mRNA の発現量が増加した。また、superoxide dismutase の阻害剤である 2-methoxyestradiol (2-ME) は単剤ではアポトーシスを誘導しない濃度で、HL-60 細胞の DCLF によるアポトーシスに相乗効果を示した。

#### 《考 察》

ミトコンドリアからの Cyt.c 遊離はミトコンドリア膜透過性遷移孔 membrane permeability transition (MPT) pore の開口によることがよく知られている。DCLF による HL-60 細胞のアポトーシスは MPT の阻害剤である cyclosporin A により抑制されなかったことと Bid の分解が認められたことから、MPT pore の開口には依存せず、活性化した caspase-8 により分解された Bid が直接ミトコンドリア膜に作用して Cyt.c を遊離させることにより誘起されることが示唆された。さらに、caspase-8 の活性化は Akt の脱リン酸化に続いて起こり、Akt のリン酸化は DCLF による ROS 生成によって制御されていることを明らかにした。UCP2 は酸化ストレス下において抗酸化的作用を示すことが示唆されているが、DCLF 処理により UCP2 mRNA の発現量が増加したことは、HL-60 細胞が DCLF による ROS 生成に対して、ROS 消去ために反応したものと考えられた。

以上の結果より HL-60 細胞の DCLF によるアポトーシス誘導機序は以下のように考えられた。すなわち、HL-60 細胞は DCLF により ROS を生成し、ROS は Akt を脱リン酸化することで不活性化する。それにより caspase-8 が活性化され Bid を分解し、分解された Bid はミトコンドリアから Cyt.c を遊離させ、caspase-9、-3 を活性化して DNA 断片化を誘起する。

DCLF と、単剤ではアポトーシスを誘導しない濃度の 2-ME とのアポトーシスにおける相乗効果は、比較的低濃度の DCLF でも 2-ME を同時添加することでアポトーシスが誘導されることを示し、DCLF の抗白血病薬としての臨床応用の可能性を示唆すると考えられた。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	井上 彰子
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 芝 山 雄 老 副 査 教授 勝 健 一 副 査 教授 林 秀 行	
主論文題名 Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: dependency on reactive oxygen species, Akt, Bid, cytochrome c, and caspase pathway. (ジクロフェナクによるヒト前骨髄性白血病細胞のアポトーシス誘導機構)			
論文審査結果の要旨			
<p>Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)が様々な培養細胞においてアポトーシスを誘導することはよく知られているが、その機序は明らかでないものが多い。申請者は NSAIDs の一種である diclofenac sodium(DCLF)がヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 においてアポトーシスを誘導することを示すと共に、その誘導機序、さらに DCLF の抗白血病薬としての可能性を検討し、以下の結果を得ている。</p> <p>1) HL-60 細胞は DCLF により細胞周期において G2/M 期停止をきたすことで細胞増殖抑制を示し、濃度、時間依存的にアポトーシスに典型的な形態変化を認めた。</p> <p>2) そのアポトーシスの誘導機序は以下であった: DCLF により生成された活性酸素種が、Akt を脱リン酸化することで不活性化し、それにより caspase-8 が活性化され Bid を分解する。分解された Bid はミトコンドリアから Cyt.c を遊離させ、caspase-9、-3 を活性化して DNA 断片化を誘起する。</p> <p>3) HL-60 細胞において superoxide dismutase (SOD)の阻害剤である 2-methoxyestradiol を添加することで、比較的低濃度の DCLF でもアポトーシスが誘導された。</p> <p>これらの実験結果は HL-60 細胞における DCLF によるアポトーシスの誘導機序を明らかにし、アポトーシスにおける DCLF と SOD 阻害剤との相乗作用を示したものである。これらは DCLF の白血病治療に対する臨床応用の可能性を示唆する重要な知見であると考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項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) Free Radical Biology &amp; Medicine 37(8): 1290-1299, 2004</p>			