

学位論文題名

アポトーシス死細胞による自己補体活性化機構に関する研究

学位論文内容の要旨

アポトーシスを起こした細胞は細胞内容物を閉じ込めたアポトーシス小体へと分断し、周囲の食細胞などに速やかに取り込まれ処理される。一方、補体系は異物の除去に働く生体防御系で、その働きの一つに異物をC3フラグメントで標識し、食細胞による貪食を増加させる作用がある。

筆者は、生体内でのアポトーシスを起こした細胞のクリアランス機構と補体系の関係について着目し、『もし補体系の異物除去作用がアポトーシス死細胞にも働くならば、その貪食除去が促進されるのではないか』と考え解析を行った。その結果、本来同種細胞上では活性化を引き起こさない補体系が、アポトーシスを起こした細胞上では活性化されることを見だし、さらにその活性化機構と貪食処理の促進効果についての解析を行った。以下に、研究結果についてまとめる。

1) アポトーシス死細胞による同種補体の活性化の解析

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) の生細胞および死細胞をヒト血清で処理し、解析を行うと、死細胞にのみC3フラグメントの沈着が認められ、この沈着はアポトーシスの急速な進行と平行して増加していた。また、C3フラグメントの沈着は血清の濃度と処理時間に依存していた。従って、死細胞へのC3フラグメントの沈着は補体の活性化を介したものであることが示唆された。

補体の活性化経路には古典的経路と第二経路が存在する。そこで活性化経路について検討したところ、死細胞へのC3フラグメントの沈着は第二経路を介したものであることが示唆された。

死細胞に沈着したC3フラグメントは数種の受容分子にエステル結合で共有結合しており、ほとんどがiC3bに変換されていることが明らかとなった。

アポトーシス死細胞の補体制御膜蛋白質は生細胞の半分程度に減少していたが、補体活性化の原因はこれらの減少によるものではなく、新たな同種補体活性化因子の発現が原因であると考えられた。

以上の結果から、(1)アポトーシスを起こしたHUVECは補体活性化能を発現し、補体を活性化してC3フラグメントを沈着させること、(2)アポトーシス死細胞へのC3フラグメントの沈着は補体第二経路の活性化によるものと考えられること、(3)沈着したC3フラグメントは数種の受容分子にエステル結合により共有結合しており、ほとんどがiC3bに変換されていること、(4)アポトーシス死細胞による補体の活性化は、細胞死に伴い新たに発現してくる未知の自己補体活性化因子によるものであると考えられること、などが示唆された。

2) アポトーシス死細胞の貪食処理におけるC3フラグメント沈着の影響

HUVECで見られた死細胞による同種補体の活性化が、他の細胞のアポトーシスでも起こるかどうかを、抗Fas抗体処理によりアポトーシスを誘導したJurkatを用いて解析した。その結果、HUVECの場合と同様に、死細胞にのみ補体第二経路の活性化によるC3フラグメントの沈着が認められた。従って、Fas刺激によるアポトーシスでもHUVECの場合と同じような機構でC3フ

ラグメントの沈着がおこることが示唆され、死細胞による同種補体の活性化がHUVECに特異的なものではないことが明らかとなった。

死細胞の同種補体活性化因子がアポトーシスに伴い生合成される蛋白質であるかを蛋白質合成阻害剤を用いて解析したところ、阻害効果は認められなかった。従って、死細胞の同種補体活性化因子はアポトーシスに伴い生合成されてくる蛋白質ではなく、あらかじめ細胞内にプールされている分子と考えられた。

アポトーシス死細胞に沈着したC3フラグメントが死細胞の貪食除去を促進するかについて解析を行った。その結果、アポトーシス死細胞に沈着したC3フラグメントは死細胞の貪食除去を促進させる効果があることが示唆された。

以上の結果から、(1)アポトーシス死細胞による同種補体の活性化はHUVECだけでなく、Jurkatにおいても認められること、(2)死細胞の同種補体活性化因子はアポトーシスに伴い生合成される蛋白質ではなく、あらかじめ細胞内にプールされている分子と考えられること、(3)アポトーシス死細胞に沈着したC3フラグメントは死細胞の貪食除去を促進する効果を持つこと、などが示唆された。

3) アポトーシス死細胞による補体活性化機構の解析

死細胞の血清処理時間を変え、経時的にC3フラグメント-受容分子複合体の形成を解析したところ、還元条件下のSDS-PAGEで155 kDaを示す受容分子複合体が最初に形成されることが明らかとなった。補体の活性化に伴い生成するC3bは、まず最も近傍の活性化分子自体に結合すると考えられることから、この155 kDaの複合体に同種補体活性化分子が含まれている可能性が考えられた。

次に、C3フラグメント-受容分子複合体の構造を2次元SDS-PAGEにより解析した。その結果、C3フラグメント-受容分子複合体のC3フラグメントはすべてiC3bに変換されていること、C3bを安定に保持するような複合体は形成されないこと、C3フラグメントと受容分子間の結合はエステル結合であること、などが示唆された。^[35S]-Met, Cysを用いて細胞蛋白質の標識を行い、受容蛋白質を解析すると^[35S]により標識された48 kDa, 85 kDa, 87 kDaなどの受容蛋白質が確認された。なお、85 kDaと87 kDaの蛋白質は155 kDaの複合体に由来していた。これらのN末端アミノ酸配列を決定したところ、すべてC4dのN末端と完全に一致した。また、それ以外の配列は同定出来なかった。C4dは血清に由来すると考えられたことから、死細胞の同種補体活性化因子は、N末端がブロックされた40 kDaの蛋白質と考えられた。

アポトーシス死細胞による補体活性化機構について解析したところ、正常血清中では古典的経路と第二経路が同時に活性化されていることが示唆され、先に反応が進行する古典的経路の方がC3フラグメントの沈着に対する寄与が大きいと考えられた。

アポトーシス死細胞による古典的経路の活性化には血清中の抗体は関与しておらず、死細胞にC1sが直接結合することにより始動するものと考えられた。また、C4フラグメントとC3フラグメントの両方を結合した受容分子は極めて限定されており、先の155 kDa複合体に含まれる40 kDaの細胞蛋白質が、死細胞のC1s結合分子と考えられた。

以上の結果から、(1)C3フラグメント-受容分子複合体は、還元条件下のSDS-PAGEで155 kDaを示す複合体が最初に形成されることが、(2)この155 kDa複合体には、iC3bの α'_N 鎖とC4d、およびN末端がブロックされている細胞由来の蛋白質が含まれること、(3)死細胞へのC4dの沈着は古典的経路の活性化によるものであること、(4)正常血清中では、先に反応が進行する古典的経路の方がC3フラグメントの沈着に対する寄与が大きいと考えられること、(5)死細胞による古典的経路の活性化は、死細胞にC1sが直接結合することにより起こると考えられること、(6)155 kDa複合体に含まれる細胞蛋白質(40 kDaと推定される)が、死細胞のC1s結合分子と考えられること、などが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	長澤	滋治
副査	教授	横澤	英良
副査	助教授	高橋	和彦
副査	助教授	澤田	均

学位論文題名

アポトーシス死細胞による自己補体活性化機構に関する研究

細胞死は形態学的に二つの様式、すなわちアポトーシスとネクローシスに分けられる。アポトーシスは器官形成における不要組織の脱落や胸腺での自己応答性リンパ球の細胞死の機構として注目されている。アポトーシス細胞は細胞内容物を封入したアポトーシス小体となり、周囲の食細胞により貪食処理されるため、周辺組織に対して炎症を惹起することがない静かな細胞死といえる。

アポトーシスに至る細胞内情報伝達機構に関する研究は花盛りであるが、アポトーシス小体が排除される機構に関しては殆ど研究が進められていない。

補体は約20種類の血清蛋白質からなる酵素系で、抗体非依存性に感染菌などの異物を攻撃する生体防御機構である。補体の主な防御活性は、標的異物表面に補体フラグメント、iC3b、を標識し、iC3bをリガンドとする食細胞による貪食処理を促進することである。補体は自己細胞に対しては攻撃をしない自己寛容機構を備えているため、正常細胞表面では補体活性化は進行しない。

本研究は、自己細胞がアポトーシスを起こすと、自己補体により異物として識別され、iC3bで標識されることを発見し、その機構を詳細に解析したものである。

本論文は、

1:アポトーシス死細胞による同種補体の活性化機構

- 2: アポトーシス死細胞の貪食処理におけるC3フラグメントの沈着の影響
 - 3: アポトーシス死細胞における同種補体活性化分子の探索
- の3部から構成されている。

1: アポトーシス死細胞による同種補体の活性化機構

ヒト血管内皮細胞を成長因子を欠損した培地で培養すると、細胞が剥がれて浮遊するが、この死細胞はヒト補体を活性化し、iC3bで標識されることを発見した。その活性化機構が抗体非依存的な第二経路と呼ばれる経路を会して進行することを精製した補体成分を用いた再構成実験により証明した。さらに、この現象はリンパ球でも観察されることを明らかにした。

2: アポトーシス死細胞の貪食処理におけるC3フラグメントの沈着の影響

アポトーシス死細胞はマクロファージによって貪食処理されるといわれている。アポトーシス死細胞を補体処理したことにより、マクロファージによる貪食処理が2倍以上促進した。この貪食処理効果は、iC3bに対する抗体やiC3bレセプターに対する抗体により抑制されたことから、補体標識による貪食促進効果が確認された。

3: アポトーシス死細胞における同種補体活性化分子の探索

iC3bは活性化分子に共有結合を介して結合する特性がある。この共有結合はエステル結合によるもので、ヒドロキシルアミン処理で開裂する。したがって、1次元で電気泳動した試料をヒドロキシルアミン処理すると、iC3bと結合分子は開裂して2バンドに分かれる。この原理に従いアポトーシス死細胞を補体処理し、iC3b-膜分子複合体を免疫沈殿で回収し、2次元電気泳動で結合分子を解析したところ、iC3b-活性化分子は分子量12万であり、ヒドロキシルアミン処理すると、4-5万の膜蛋白質が分離することを明らかにした。この分子がアポトーシスに伴って細胞表面に発現する活性化分子である可能性が高いと予想される。

本研究は、アポトーシス死細胞が補体を活性化することを初めて明らかにした独創性の高いものである。これまで、補体は自己寛容性であり、自己

補体を活性化させる分子の報告はなく、本研究は国際的にも高く評価されており、博士(薬学)の学位を受けるに値する業績と評価した。