

学 位 論 文 題 名

放射線で誘導される

Fas 介在性アポトーシスシグナルの解析

学位論文内容の要旨

アポトーシスは細胞にプログラムされた細胞死のメカニズムであり、不要になった細胞を排除するための重要な手段である。放射線は悪性腫瘍の治療に用いられている反面大量に被曝した場合その障害は死を招く。この放射線の相反する作用について、アポトーシス細胞内情報伝達経路を理解することは細胞死の誘導とその防護に関する情報を与えてくれる。しかし、現段階ではアポトーシス誘導のメカニズムに関する情報は依然として乏しい。本研究では、その基礎的知見を得るためヒト白血病由来株化細胞 MOLT-4 を用いて、放射線誘発アポトーシスの細胞内情報伝達経路の解析を行った。本研究では、放射線によって誘導されるアポトーシス情報伝達経路に新規のタンパク質合成がどのように関わっているかを明らかにし、放射線によって産生されたその新規アポトーシス誘導因子の同定を試みた。その目的のため、ストレス応答性リン酸化酵素である SAPK/JNK とカスパーゼファミリーを中心に、それらに対するタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドの影響を調べた。解析方法として、形態学的な観察、ウェスタンブロット法、ゲルシフト法、フローサイトメトリー法等を用いた。

7.5 Gy の X 線照射による MOLT-4 細胞のアポトーシス誘導は、0.5 $\mu\text{g/ml}$ のシクロヘキシミド処理で抑制された。このとき同時に、シクロヘキシミドによるカスパーゼ-3 とカスパーゼ-8 活性化の抑制が観察された。一方、ストレス応答性のリン酸化酵素である SAPK/JNK の活性化が X 線照射 30 分後で見られたが、シクロヘキシミドでは抑制されなかった。しかし、その下流である c-Jun の発現および転写因子 AP-1 の活性化はシクロヘキシミドによって抑制された。この AP-1 による転写産物としてカスパーゼ上流の Fas リセプターに着目したところ、X 線照射 2 時間後から急速に発現が増加し、更にシクロヘキシミドによるこの発現の完全な抑制が観察された。アポトーシスにおけるこの Fas の関与を更に明らかにするため、Fas の中和抗体で処理したがアポトーシス誘導は抑制されなかった。一方、

免疫沈降法で調べたところ Fas と FADD の会合が検出され、Fas が実際に活性化されていることが確認された。しかも、この会合はシクロヘキシミドで抑制された。またカスパーゼ-9 の活性化に関わるミトコンドリアからのチトクロム *c* 脱離も X 線照射で誘発され、タンパク質合成に依存的であった。

以上の結果により、MOLT-4 細胞における放射線誘発アポトーシスは、新規に合成されたタンパク質によって実行される経路であることが示された。すなわち、アポトーシス誘導に重要なカスパーゼ活性化の経路として、SAPK/JNK の活性化により Fas 発現が誘導され、この発現増加がリガンドに非依存的な FADD との会合を誘起し、カスパーゼ-8 とカスパーゼ-3 を活性化し、アポトーシスを誘導していることが明らかにされた。一方、ミトコンドリアからのチトクロム *c* 脱離によるカスパーゼ-9 とカスパーゼ-3 の活性化経路もカスパーゼ-8 とは別にタンパク質合成依存性シグナルとして存在していることも明らかにされた。本研究は、放射線誘発アポトーシスにおける新たな情報伝達経路の存在を明らかにした。すなわち、現在まで放射線や酸化ストレスによって活性化すると考えられてきたミトコンドリアを中心としたアポトーシスシグナルに加え、Fas 過剰発現によるカスパーゼ-8 依存性のアポトーシスの存在を示した。本研究で得られた知見は、細胞死メカニズムを論ずる上で、貴重な情報を与えたものと結論される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 桑 原 幹 典
副 査 教 授 伊 藤 茂 男
副 査 教 授 葉 原 芳 昭
副 査 助 教 授 稲 波 修

学 位 論 文 題 名

放射線で誘導される

Fas 介在性アポトーシスシグナルの解析

アポトーシスは放射線によって誘導されることが知られている。その一方で、多くの研究から放射線はストレス応答性リン酸化酵素SAPK/JNKを活性化することが明らかにされている。このSAPK/JNKはその下流の転写因子AP-1(c-Jun/c-Junホモダイマー)を活性化し、新たにタンパク質合成を誘導する。しかしながら、その蛋白質合成がアポトーシス誘導に与える影響についてはほとんど明らかにされてはいない。そこで、上記博士論文提出者はヒト白血病由来株化細胞MOLT-4を用い、シクロヘキシミド(CHX)によりタンパク質合成を抑制し、それが放射線誘発アポトーシスならびにアポトーシスシグナル伝達経路に与える影響について調べ、その情報をもとにアポトーシスシグナル伝達経路の解明を試みた。

MOLT-4細胞を7.5 GyX線照射したところアポトーシスが観察され、そのアポトーシスは0.5 μ g/mlCHXにより有意に抑制された。このことから、放射線によるアポトーシス誘導に蛋白質合成が要求されることが判明した。このCHXの効果をSAPK/JNK活性化について調べたところ、活性化に対し何ら影響は見られなかった。しかしながら、SAPK/JNKによりアップレギュレートされるc-Junの発現とそのホモダイマーAP-1の活性化は抑制されていた。AP-1の転写産物はそのコンポーネントc-Junそれ自身であることから、CHXはその発現を抑制していることが明らかとなった。AP-1の転写産物は他にFasがあることから、それについても調べたところ、X線照射後急速に発現するFasがCHXにより完全に抑制されていることが判明した。つまり、CHXによるc-Junの自己複製の阻害はAP-1の量的な増加を抑制し、その結果Fasの発現抑制に繋がったものと解釈された。Fasはアポトーシス誘導因子であるので、その下流のアポトーシス実行酵素カスパーゼ-3とカスパーゼ-8の活性化についても調べた。その結果、CHXは当然のことながらそれらの活性化も抑制した。Fasの活性化についてはFas/FADD会合体の検出することにより確認された。この会合体形成もCHXで抑制された。CHXによ

りFasの発現が抑制されたため、会合体形成が不可能になったものと思われた。

以上の研究により、MOLT-4細胞における放射線誘発アポトーシスは新規に合成された蛋白質によって実行される経路であることが示された。すなわち、SAPK/JNKの活性化によりFas発現が誘導され、この発現増加がFADDとの会合を誘起し、カスパーゼ-8とカスパーゼ-3を活性化し、アポトーシスを誘導していることが明らかにされた。本研究は、放射線誘発アポトーシスに新たなシグナル伝達経路の存在を明らかにしたことになり、したがって、審査員一同は上記博士論文提出者高橋賢次の博士論文が北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文審査に合格と認めた。