

学 位 論 文 題 名

アデノウイルス E1B19K は塩化コバルトで  
惹起されるアポトーシスを抑制する

学位論文内容の要旨

低酸素状態は動物細胞に様々な影響を与え、細胞分化・血管新生・細胞死など多岐にわたる生物学的效果をもたらす。心筋および脳神経細胞は低酸素刺激に対する感受性が高く、梗塞などによる虚血あるいは呼吸不全による低酸素状態はこれらの細胞に死をもたらし、その結果重篤な臨床病態が誘発される。低酸素により引き起こされる細胞死の本態は、ネクロシスだけでなくアポトーシスが関与することが報告されているが、その分子機構に関する詳細は未だ明らかではない。

低酸素状態で、HIF-1 と呼ばれる転写因子の発現が誘導され、エリスロポエチン、VEGF、解糖系酵素など細胞を低酸素状態に適合させる作用をもつ遺伝子の転写が活性化される。一方、チャイニーズハムスター細胞において、細胞死誘導遺伝子である Bnip3 の転写も活性化されることが最近報告されている。

本研究は、低酸素状態が誘導する細胞死の分子機構の解明を目的として、塩化コバルトにより惹起される低酸素状態下でのアポトーシス関連因子の動態について検討した。

研究方法

p53 欠損ヒト骨肉腫細胞株 Saos2 細胞に pcDNA3-E1B19K またはコントロールベクター pcDNA3 を各々リン酸カルシウム法にて遺伝子導入し、G418 で細胞選択後、E1B19K 強発現細胞株 Saos2-19K および Saos2-pcDNA3 を樹立した。これらの細胞株を最終濃度 1.5mM 塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>) 添加培地にて培養後、以下の実験を行った。

Trypan Blue 分染法による細胞生存検定を行った。次にミトコンドリアの膜電位変化を検出するため、MitoSensor™ で染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

CoCl<sub>2</sub> 添加で生じる細胞死に、caspase が活性化しているか検討するためウエスタンブロッティング法を行った。一次抗体として抗 caspase-9 抗体、抗 caspase-8 抗体および抗 PARP 抗体を用いた。さらに、Bax、Bak、Bad、Bik、Bid、Apaf-1、Bnip3、Bnip3 $\alpha$  の半定量性 RT-PCR を行った。

CoCl<sub>2</sub> 存在下での、HIF-1 $\alpha$  の発現をウエスタンブロッティング法で確認した。次にヒト胎児腎細胞株 293T 細胞に HIF-1 $\alpha$  を強発現させ RNA を抽出後、Bnip3 の半定量性 RT-PCR を行った。

結果と考察

CoCl<sub>2</sub> の添加により Saos2 細胞には形態学的にアポトーシスを示唆する細胞死が顕著に誘導され

た。しかしながら、Bcl-2 の機能的ウイルスホモログである E1B19K を導入した細胞は、CoCl<sub>2</sub> の添加に対して抵抗性を示し、本実験系で誘導される細胞死は Bcl-2 ファミリータンパク質により制御されている可能性が示唆された。アポトーシスは、主に caspase-9、8 などの initiator caspase の活性化によって開始される caspase 活性化経路の存在が報告されている。caspase-9 はアポトーシス刺激によりミトコンドリアから漏出したチトクロム c が Apaf-1 および pro-caspase-9 と apoptosome を形成することで活性化する。この際、ミトコンドリアの膜電位低下が生じるが、本実験においても Saos2 細胞では CoCl<sub>2</sub> 添加 8 時間後から活性化型 caspase-9 のサブユニットが検出され、同時にミトコンドリアの膜電位低下も検出された。一般に単一の initiator caspase の活性化のみでアポトーシスが遂行されることはほとんどなく、一つの細胞障害性刺激が複数の caspase 活性化経路を活性化することが想定されているため、もう一つの代表的な initiator caspase である caspase-8 についても検討を加えた。本実験では CoCl<sub>2</sub> 添加 12 時間後より成熟型の caspase-8 サブユニットの存在が確認され、CoCl<sub>2</sub> の添加により複数の initiator caspase が活性化していることが明らかになった。E1B19K を導入した Saos2 細胞では、CoCl<sub>2</sub> の添加 24 時間後でも caspase-9、8 とともに活性のない pro-caspase の形で細胞内に存在しており、E1B19K は CoCl<sub>2</sub> により惹起される細胞死経路において initiator caspase の活性化を阻害していることが明らかとなった。また、E1B19K は Bcl-2 ファミリーのアポトーシス促進グループに直接結合してそれらのアポトーシス活性を阻害することから CoCl<sub>2</sub> 添加により惹起される低酸素状態ではアポトーシス促進グループの Bcl-2 ファミリータンパク質が誘導されている可能性が示唆された。

そこでアポトーシスの調節を行う Bcl-2 ファミリーの関与を RT-PCR で検討した。Bcl-2 ファミリーはアポトーシス抑制グループ (Bcl-2、Bcl-xl) と促進グループ (Bax, Bak, Bnip3 など) に分けられ、主にミトコンドリア上で作用する。RT-PCR の結果、Saos2-pcDNA3 と Saos2-19K とともに、Bnip3 とそのホモログである Bnip3 $\alpha$  の mRNA の発現量増加が認められた。このことから、CoCl<sub>2</sub> 添加で生じる細胞死の過程では Bnip3 の転写活性化が重要であり、E1B19K は Bnip3 の転写レベルの調整ではなく、Bnip3 が翻訳された後にそのアポトーシス誘導作用を阻害していることが示唆された。

チャイニーズハムスターの Bnip3 は、プロモーター領域に HIF-1 responsive element (HRE) 配列 5'-CGTGTG-3' が存在し、HIF-1 によって直接転写活性化されることが報告されている。ヒト細胞においても同様の転写調節機構が存在するか否かに着目し、HIF-1 $\alpha$  の動態が CoCl<sub>2</sub> 添加によりどのように変化しているかを検討したところ、CoCl<sub>2</sub> 添加 2 時間後から HIF-1 $\alpha$  タンパクの顕著な発現量増加が認められた。現在までにヒト Bnip3 では HRE 配列の存在は報告されていないため、ヒト Bnip3 のプロモーター領域に HRE 配列が存在するかについて、NCBI のデータベース上でゲノム配列を検索した結果、HRE と考えられる CGTGTG 配列の存在が明らかとなり、チャイニーズハムスターと同様の転写調節系がヒトにも存在している可能性が示唆された。さらに HIF-1 がヒト Bnip3 の転写を活性化するか検討するため、HIF-1 $\alpha$  強発現細胞から RNA を抽出し RT-PCR を行った結果、Bnip3 の mRNA 量増加が認められ、HIF-1 は Bnip3 の転写活性化に関与することが示された。

以上より、低酸素状態下で誘導される細胞死には、caspase-9、8 の活性化が大きな役割を果たしており、これらのアポトーシスカスケードの一部は低酸素状態で安定化した HIF-1 $\alpha$  に誘導される Bnip3 の発現レベルの上昇により制御されているものと考えられた。また、低酸素状態下で誘導される細胞死は、E1B19K などのアポトーシス抑制グループの Bcl-2 ファミリータンパク質発現によって克服できる可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	福島和昭
副査	教授	向後隆男
副査	教授	柴田健一郎
副査	助教授	安田元昭

## 学位論文題名

### アデノウイルス E1B19K は塩化コバルトで 惹起されるアポトーシスを抑制する

審査は向後、柴田、安田および福島審査委員全員が出席のもとに、まず論文申請者に対して申請論文の内容の要旨を説明させ、論文の内容について審査委員の口頭試問を行った。以下に申請論文の要旨と審査の内容を述べる。

論文申請者は、低酸素状態が誘導する細胞死の分子機構の解明を目的として実験を行い、本論文は、この細胞死経路に HIF-1 $\alpha$  及び Bnip3 が関与することを報告したものである。低酸素状態は動物細胞に様々な影響を与え、細胞分化・血管新生・細胞死など多岐にわたる生物学的効果をもたらす。低酸素により引き起こされる細胞死の本態は、ネクローシスだけでなくアポトーシスが関与することが報告されているが、その分子機構に関する詳細は未だ明らかではない。低酸素状態では HIF-1 と呼ばれる転写因子の発現が誘導され、エリスロポエチン、VEGF など細胞を低酸素状態に適合させる作用をもつ遺伝子の転写が活性化される一方、チャイニーズハムスター細胞において、細胞死誘導遺伝子である Bnip3 の転写も活性化されることが最近報告されている。論文申請者は、塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>) により惹起される低酸素状態下での HIF-1 $\alpha$  および Bnip3 を含むアポトーシス関連因子の動態について検討した。

#### 【研究方法】

p53 欠損ヒト骨肉種細胞株 Saos2 に E1B19K を遺伝子導入し、E1B19K 強発現細胞株 Saos2-19K を樹立した。最終濃度 1.5mM CoCl<sub>2</sub> 添加培地にて培養後、以下の実験を行った。

E1B19K の細胞死抑制能を Trypan Blue 分染法で判定した。ウエスタン・ブロッティング法にて caspase の活性化及び HIF-1 $\alpha$  のタンパク発現を確認し、さらに半定量性 RT-PCR を行い Bcl-2 ファミリーの関与を検討した。

さらにヒト胎児腎細胞株 293T 細胞に HIF-1 $\alpha$  を強発現させ RNA を抽出後、Bnip3

の半定量性 RT-PCR を行った。

#### 【結果および考察】

CoCl<sub>2</sub> の添加により Saos2 細胞には形態学的にアポトーシスを示唆する細胞死が顕著に誘導されたが、Bcl-2 の機能的ウイルスホモログである E1B19K を導入した細胞は抵抗性を示し、本実験系で誘導される細胞死は Bcl-2 ファミリータンパクにより制御されている可能性が示唆された。アポトーシスは、主に caspase-9、8 などの initiator caspase の活性化により開始される caspase 活性化経路の存在が報告されており、本実験においても Saos2 細胞で caspase-9、8 の活性化が認められたが、E1B19K 発現細胞では活性化が抑制された。E1B19K は Bcl-2 ファミリーのアポトーシス促進グループに直接結合しアポトーシス活性を阻害することから、Bcl-2 ファミリーの関与を RT-PCR で検討した結果、Saos2 および E1B19K 発現細胞ともに、Bnip3 の転写レベルの増加が認められたことから、この細胞死には Bnip3 の転写活性化が重要であり、E1B19K は Bnip3 の翻訳後にそのアポトーシス誘導作用を阻害していることが示唆された。

CoCl<sub>2</sub> 添加によって HIF-1 $\alpha$  タンパクの増加が認められた。HIF-1 がヒト Bnip3 の転写を活性化するか検討するため、HIF-1 $\alpha$  強発現細胞から RNA を抽出し RT-PCR を行った結果、Bnip3 の mRNA 量増加が認められ、HIF-1 は Bnip3 の転写活性化に関与することが示された。

これらのことから、低酸素状態で誘導される細胞死には、caspase-9、8 の活性化が大きな役割を果たしており、これらのアポトーシスカスケードの一部は低酸素状態で安定化した HIF-1 $\alpha$  に誘導される Bnip3 の発現レベルの上昇により制御されているものと考えられた。また、低酸素状態で誘導される細胞死は、E1B19K などのアポトーシス抑制グループの Bcl-2 ファミリータンパク質発現によって克服できる可能性が示唆された。

以上のような概要説明がなされた後、審査担当者より論文内容およびその関連事項、また今後の発展性と研究課題などについても種々の試問がなされた。学位申請者はこれらの質疑に対して明快かつ適切な説明を持って回答し、本研究のみならず、専門および関連領域についても十分な学識と理解を有していることが認められた。

梗塞による虚血や呼吸不全による低酸素状態は、非常に重篤な臨床病態を誘発するが、低酸素刺激により誘導される細胞死の分子メカニズムの解明は、このようなダメージを受けた心筋、脳神経細胞の保存・維持に貢献できる治療法につながる可能性が高い。本研究は、低酸素状態で誘導される細胞死にアポトーシスの特徴である caspase の活性化が伴うこと、また HIF-1 によって Bnip3 が誘導される可能性も報告しており、今後、治療法への分子学的アプローチという点において、さらなる発展が期待される。

以上より、主査ならびに副査は、本研究論文が学位論文として認められ、本学位申請者は博士（歯学）の学位を授与されるに値すると認定した。