



Title	Induction of cell death by chimeric L-selectin-Fas receptors
Author(s)	早坂, 晴子
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40021
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	早坂 晴子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13010 号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	Induction of cell death by chimeric L-selectin-Fas receptors (L-selectin-Fas キメラ受容体を介した細胞死の誘導)
論文審査委員	(主査) 教授 宮坂 昌之 (副査) 教授 平野 俊夫 教授 辻本 賀英

論文内容の要旨

【目的】

L-セレクチン(L-selectin)は炎症やホーミングの際に白血球が血管内皮細胞と相互作用するのに重要な分子である。L-selectinはほとんど全ての白血球に発現し、血管内皮細胞上のリガンドと相互作用することで白血球の初期の接着に深く関与していると考えられている。本研究ではL-selectinと細胞死誘導因子Fasのキメラ受容体を作製し、L-selectinのシグナルが細胞死のシグナルに変換できるかを確かめ、さらにキメラ受容体におけるL-selectinの細胞外領域の要求性について解析した。

【方法】

遺伝子組み換えによって、L-selectinの細胞外ドメインとFasの細胞内ドメインの融合遺伝子を作製した。L-selectin由来またはFas由来の膜貫通領域をもつキメラ受容体をそれぞれ作製した。また、L-selectinは白血球の活性化にともない細胞外の膜近傍領域がプロテアーゼにより切断されているので、切断に関与する領域に欠失をもつキメラ受容体を作製し、細胞死の誘導能に影響があるかを解析した。各キメラ受容体はヒト急性白血病細胞株Jurkatに強制的に発現させた。

各キメラ受容体を高発現するクローニングを選択し、L-selectinのリガンドであるfucoidinおよび抗L-selectin抗体で刺激することで細胞死が誘導されるかを解析した。細胞死の判定はPropidium Iodide(PI)とHoechst 33342の染色で判定した。PIとHoechst 33342での染色では、Hoechstで染色され、核の断片化のみられない細胞を生細胞、核の断片化のみられる細胞をアポトーシス細胞、PIで染色され、核の断片化のみられない細胞をネクローシス細胞とした。

【結果】

1) fucoidinによる融合蛋白質発現細胞における細胞死誘導

L-selectinのシグナルをFasのシグナルに変換できるかを解析するために、L-selectin-Fasキメラ受容体をfucoidinで処理し、細胞死がおこるかどうかを解析した。fucoidin処理により、膜貫通領域がL-selectin由来、Fas由来のいずれのキメラ受容体発現細胞株においても細胞死が誘導された。L-selectinに結合しないmannanの処理では細胞死の誘導はみられなかった。

2) 抗 L-selectin 抗体 (HRL 2, HRL 3) による細胞死の誘導

各キメラ受容体発現細胞株を抗 L-selectin 抗体で処理し、細胞死が誘導できるかを解析した。リガンド結合部位を認識する抗 L-selectin 抗体 (HRL 3) およびリガンド結合部位以外の部位を認識する抗体 (HRL 2) で処理したところ、HRL 3 によってのみ細胞死が誘導され、HRL 2 では細胞死の誘導はみられなかった。それぞれの抗体の作用の違いがキメラ受容体の架橋の程度の違いによるものかを解析するために、標識した抗体でキメラ受容体のクラスター形成を比較したところ、すくなくとも同程度に架橋されていることがわかった。このことから、細胞死の誘導には、キメラ受容体の架橋だけでなく L-selectin のリガンド結合部位への刺激が必要であることが示唆された。

3) 膜近傍のプロテアーゼ切断領域である 15 アミノ酸を欠失しているキメラ受容体導入細胞株においても fucoidin 処理および HRL 3 抗体処理により細胞死が誘導された。一方、プロテアーゼ切断領域である 15 アミノ酸に加えてさらに 15 残基欠失したキメラ受容体導入細胞株では細胞死の誘導はみられなかった。このことからプロテアーゼ切断領域の欠失はキメラ受容体の細胞死誘導能に影響しないこと、さらに欠失させた 15 アミノ酸残基が細胞死誘導能に影響することが示唆された。

【総括】

本研究により、接着分子と Fas の組み換え分子（キメラ受容体）を介して細胞死が誘導できることがわかった。また、細胞死の誘導にはキメラ受容体のリガンド結合部位への刺激が必要であることが示唆された。

本法は接着分子の細胞外領域の要求性などの解析に応用可能であると思われる。

論文審査の結果の要旨

L-セレクチン (L-selectin) は、炎症やホーミングの際に白血球が血管内皮細胞と相互作用する為に必要な接着分子である。本研究では、L-selectin の細胞外ドメインと Fas の細胞内ドメインの融合遺伝子（キメラ受容体）を作製し、L-selectin とリガンドとの相互作用を細胞死として検出するとともに、キメラ受容体のシグナル伝達における L-selectin の細胞外領域の要求性について解析した。

L-selectin 由来または Fas 由来の膜貫通領域をもつキメラ受容体をそれぞれ作製した。また、白血球の活性化にともないプロテアーゼにより切断される領域に欠失をもつキメラ受容体を作製し、細胞死の誘導能に影響があるかを解析した。各キメラ受容体はヒト急性白血病細胞株 Jurkat に恒常に発現させた。各キメラ受容体を高発現するクローンが、L-selectin のリガンド (fucoidin) による刺激、あるいは抗 L-selectin 抗体刺激によりアポトーシスをおこすかを解析した。その結果、膜貫通領域が L-selectin 由来、Fas 由来のいずれのキメラ受容体発現細胞株においても fucoidin 処理により細胞死が誘導された。また、リガンド結合部位を認識する抗 L-selectin 抗体処理でのみ細胞死が誘導されたことから、細胞死の誘導には L-selectin のリガンド結合部位への刺激が必要であることが示唆された。プロテアーゼ切断領域を欠失しているキメラ受容体導入細胞株においても fucoidin 処理および抗体処理により細胞死が誘導された。このことからキメラ受容体の細胞死誘導にプロテアーゼによる切断は影響しないことが示唆された。本研究は接着分子 L-selectin の構造と機能を詳細に解析したものであり、博士号の授与に値すると考えられる。