

Title	Hydrogen Peroxide Induces Up-regulation of Fas in Human Endothelial Cells
Author(s)	須原, 敏充
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41630">https://hdl.handle.net/11094/41630</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	須原 敏充
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 14497 号
学位授与年月日	平成11年 3月 25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	Hydrogen Peroxide Induces Up-regulation of Fas in Human Endothelial Cells (過酸化水素によるヒト内皮細胞における Fas の発現誘導)
論文審査委員	(主査) 教授 荻原 俊男  (副査) 教授 長田 重一 教授 松澤 佑次

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

Fas (APO-1, CD95) は tumor necrosis factor (TNF) 受容体ファミリーに属する I 型膜タンパクであるが, Fas ligand (FasL), あるいは agonistic な作用を有する抗 Fas 抗体が Cross-Link することにより細胞死のシグナルを伝達する。Fas は生体内において数多くの組織および細胞で発現しているのに対して, FasL は主に活性化 T cell に発現している。Fas/FasL 系は正常では T cell の Selection など発生, 分化, および免疫系において生理的に重要な役割をしていることが知られているが, その機能異常はリンパ系の腫瘍や自己免疫疾患の発症と関係が深いことが明らかにされている。これに対して, 過剰な Fas/FasL 系を介したアポトーシスは組織崩壊や臓器の機能障害を誘導することが知られている。ところで, 血管の恒常性は細胞増殖と細胞死のバランスによって保たれているが, 動脈硬化巣などにおいてはこのバランスが崩れていると考えられる。現在まで動脈硬化巣の形成過程においては細胞増殖のみが注目されてきたが, 最近, 細胞死が亢進している病変の存在することが明らかにされた。しかし, 正常血管を含め血管系における細胞死の詳細なメカニズムは明らかではない。一方, 血管内皮細胞の障害による血管病変, 特に動脈硬化の発症および進展, あるいは炎症反応の増悪過程におけるメカニズムに, 血球系細胞および内皮細胞自身より産生される過酸化水素をはじめとする酸化ストレスが重要な役割を果たしていることが知られている。そこで, 本研究ではヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて過酸化水素が内皮細胞において細胞死のシグナル Fas を発現誘導する可能性について検討した。

#### 【方法ならびに結果】

内皮細胞において, 抗 Fas モノクロナル抗体を用いたフローサイトメトリーによる蛋白レベルでの解析により, 低濃度の過酸化水素 (0.2-1.0mM) を24時間処置すると Fas の発現が濃度依存性に増強された。さらに, ノーザンブロッティングによる mRNA レベルでの解析により, Fas mRNA は過酸化水素処置後6時間より発現誘導され, さらに過酸化水素は濃度依存性に Fas mRNA を増強した。また, 過酸化水素による Fas の発現は, 過酸化水素を分解する酵素であるカタラーゼによって有意に阻害された。次に, 内皮細胞に phosphatase inhibitor である vanadate を処置すると過酸化水素による Fas の発現が著明に増強された。一方, 内皮細胞に tyrosine kinase inhibitor である genistein を処置すると過酸化水素による Fas の発現が抑制された。これらの結果は, 過酸化水素による Fas の発現

誘導には細胞内シグナルとしてチロシン磷酸化が関与していると考えられた。次に、過酸化水素により誘導された Fas にアポトーシス活性が存在するか否かを調べた。過酸化水素を24時間処置した内皮細胞にさらに agonistic な抗 Fas 抗体である CH11 を8時間処置すると、フローサイトメトリーによる propidium iodide 染色を用いた DNA 解析において hypodiploid DNA population の増加を認め (対照細胞: 13.4% vs 過酸化水素および CH11 処置細胞: 41.8%), また、電子顕微鏡による観察において、過酸化水素および CH11 を処置した内皮細胞には、アポトーシスの特徴であるクロマチンおよび細胞質の凝集、核の断片化が観察され、過酸化水素により誘導された Fas にアポトーシス誘導作用が存在することが確認された。

#### 【総括】

血管内皮細胞において、過酸化水素によって細胞死のシグナル Fas の発現が誘導されること、また、その細胞内シグナルとしてはチロシン磷酸化が強く関与していることが示された。以上の結果より、Fas の発現を介したアポトーシスの誘導が、酸化ストレスによる血管内皮細胞の障害メカニズムに関与している可能性があることが示された。したがって、Fas を介したアポトーシスを阻害することによって、酸化ストレスによる内皮細胞障害を抑制できる可能性があると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

Fas (APO-1, CO95) は tumor necrosis factor (TNF) 受容体ファミリーに属する I 型膜タンパクであるが、Fas ligand (FasL)、あるいは agonistic な作用を有する抗 Fas 抗体が Cross-Link することにより細胞死のシグナルを伝達する。Fas は生体内において数多くの組織および細胞で発現しているのに対して、FasL は主に活性化 T cell に発現している。Fas/FasL 系は正常では T cell の Selection など発生、分化、および免疫系において生理的に重要な役割をしていることが知られているが、その機能異常はリンパ系の腫瘍や自己免疫疾患の発症と関係が深いことが明らかにされている。これに対して、過剰な Fas/FasL 系を介したアポトーシスは組織崩壊や臓器の機能障害を誘導することが知られている。ところで、血管の恒常性は細胞増殖と細胞死のバランスによって保たれているが、動脈硬化巣などにおいてはこのバランスが崩れていると考えられる。現在まで動脈硬化の形成過程においては細胞増殖のみが注目されてきたが、最近、細胞死が亢進している病変の存在することが明らかにされた。しかし、正常血管を含め血管系における細胞死の詳細なメカニズムは明らかではない。一方、血管内皮細胞の障害による血管病変、特に動脈硬化の発症および進展、あるいは炎症反応の増悪過程におけるメカニズムに、血球系細胞および内皮細胞自身より産生される過酸化水素をはじめとする酸化ストレスが重要な役割を果たしていることが知られている。本研究では血管内皮細胞において、過酸化水素によって細胞死のシグナル Fas の発現が誘導されること、また、その細胞内シグナルとしてはチロシン磷酸化が強く関与していることを初めて示した。本研究により、Fas の発現を介したアポトーシスの誘導が、酸化ストレスによる血管内皮細胞の障害メカニズムに関与している可能性があることが示された。これらの結果は、Fas を介したアポトーシスを阻害することによって、酸化ストレスによる内皮細胞障害を抑制できると考えられ、動脈硬化の発症および進展の新しい治療法になる可能性がある。従って、本研究は学位の授与に値すると思われる。