



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death                                                       |
| Author(s)    | 小澤, 健太郎                                                                                                                                         |
| Citation     | 大阪大学, 2000, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/41840">https://hdl.handle.net/11094/41840</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">大阪大学の博士論文について</a>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           | 小 澤 健 太 郎                                                                                                                |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 5 2 0 7 号                                                                                                            |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成12年 3 月 24 日                                                                                                           |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科生理系専攻                                                                                              |
| 学 位 論 文 名     | 150 - kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death.<br>(ORP150は低酸素における細胞死を抑制する) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 遠 山 正 彌<br><br>(副査)<br>教 授 堀 正 二 教 授 辻 本 賀 英                                                                 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

脳梗塞は現在でも死因の上位を占める疾患である。この疾患の治療のため虚血に陥った細胞に細胞保護因子を発現させ、我々は虚血により細胞死を防ぐ目的で低酸素に暴露したアストロサイトの初代培養細胞より新規ストレス蛋白 ORP150を分離し、精製した。ORP150は低酸素、虚血にて誘導されるストレス蛋白であり、その構造上小胞体に局在する熱ショック蛋白の一つと考えられた。ORP150の低酸素における役割を検討するため HEK293細胞に ORP150のアンチセンス方向の mRNA を強制発現させることにより ORP150の発現量を特異的に低下させた細胞株を作成、その性質を調べた。

#### 【方法ならびに成績】

今回低酸素における ORP150の機能を解析するため、HEK-293細胞に ORP150のセンス、アンチセンス方向の mRNA を強制発現させ、それぞれクローン化することにより ORP150の発現量に差がある細胞株を作成した。(以下それぞれセンス細胞、アンチセンス細胞と略す) センス細胞及びアンチセンス細胞は、正常酸素下の ORP150の発現に正常酸素下の細胞増殖、過酸化水素、砒素による細胞死において野生株、もしくはベクターのみ強制発現させた細胞(以下コントロール細胞と略す)とは差がなく、また小胞体中存在する熱ショック蛋白の仲間である GRP78、GRP94の発現量も差がなかった。この細胞株を低酸素に暴露、その viability を評価したところ、野生株、コントロール細胞、センス細胞は低酸素暴露後24時間まではその viability はほとんど増悪しなかったが、アンチセンス細胞は低酸素暴露後18時間から viability は増悪、暴露後24時間後にはほぼ100%の細胞が細胞死となった。

その細胞死をさらに解析するため細胞より DNA を回収してアガロースゲルにて泳動したところ、低酸素暴露したアンチセンス細胞にのみ ladder を認めた。また電子顕微鏡にて低酸素に暴露したアンチセンス細胞を形態学的に検討したところ、低酸素暴露したアンチセンス細胞には核の分断化、アポトーシス小体などアポトーシスに特徴的な所見を得られた。また早期アポトーシスにおこる annexin V の結合も低酸素に暴露したアンチセンス細胞にのみ認められた。またこの細胞死はサイクロヘキシミドにより抑制された。

次にこの細胞死にどのような蛋白が関係しているかを検討するため、現在アポトーシスに関係しているといわれている Caspase 1、Caspase 2、Caspase 3、Caspase 7、Caspase 8、Caspase 9 の活性化を評価したところ、典型的なアポトーシスをおこすといわれているスタウロsporin における細胞死では caspase 8 を除く caspase の活性

化は認められたが、低酸素に暴露したアンチセンス細胞における細胞死においてはどの caspase も活性化は認められなかった。

#### 【総括】

以上より ORP150は低酸素における細胞生存に不可欠な蛋白であること、そして ORP150の発現量が極めて低いアンチセンス細胞を低酸素に暴露すると形態学的にアポトーシスと考えられるような細胞死を生じること、しかしその細胞死の際に現在アポトーシスに深く関係していると考えられる caspase の一群は活性化されないことを証明した。

### 論文審査の結果の要旨

虚血環境下において様々なストレス蛋白が誘導されることはよく知られており、そのストレス蛋白はストレスかで細胞が生き残るための必要であると考えられている。本研究はその第一歩として、新規ストレス蛋白 ORP150の発現量の違う細胞株を HEK293細胞を使って作成、これを低酸素に暴露することにより、低酸素環境における ORP150の働きを検討したものである。

本研究では、まずセンス方向及びアンチセンス方向の ORP150の mRNA を強制発現するようなベクターを作成、lipofection 法により HEK293細胞へ導入、G418によりクローン化した。その細胞を24時間低酸素に暴露すると、野生株、ベクターコントロール、センス方向の ORP150を発現する細胞（以下センス細胞）の viability は保たれていたが、アンチセンス方向の ORP150を発現する細胞（以下アンチセンス細胞）は低酸素暴露後18時間より viability は増悪し、24時間でほぼ100%の細胞が細胞死に至った。

この細胞死をさらに詳しく検討するため、アンチセンス細胞を低酸素に暴露、その際の形態学的変化を顕微鏡、電顕レベルで検討したところ、その細胞死はアポトーシスに特有な形態学的特徴を有していた。次にこの細胞死にどのような蛋白が関係しているかを検討するため、現在アポトーシスに関係しているといわれている Caspase 1、Caspase 2、Caspase 3、Caspase 7、Caspase 8、Caspase 9 の活性化を評価したところ、典型的なアポトーシスをおこしているスタウロスポリンにおける細胞死では Caspase 8を除く Caspase の活性化は認められたが、低酸素に暴露したアンチセンス細胞における細胞死においてはどの Caspase も活性化は認められなかった。

以上より ORP150は低酸素における細胞生存に不可欠な蛋白であること、そして ORP150の発現量が極めて低いアンチセンス細胞を低酸素に暴露すると形態学的にアポトーシスと考えられるような細胞死を生じること、しかしその細胞死の際に現在アポトーシスに深く関係していると考えられる Caspase の一群は活性化されないことを証明した。

本研究は、脳血管障害の治療に結びつくことも期待されるだけでなく、今後の展開として、現在解析されている系とは別の細胞死の系がある可能性を示唆している。以上より本研究は、脳血管障害の遺伝子治療の先駆けとなるきわめて先駆的かつユニークな研究であり、学位に値すると考えられる。