OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	https://hdl.handle.net/11094/41840
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	小澤 健太郎（おざわ けんたろう）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 15207 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 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. （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） 教授 遠山 正彌 （副査） 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、また小胞体に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、アポート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うといわれ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。

【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光顕、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うといわれ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。