



Title	Necrotic death pathway in Fas receptor signaling
Author(s)	松村, 博隆
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42663
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	まつ 松 村 博 隆
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16016 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Necrotic death pathway in Fas receptor signaling (Fasを介したネクローシスのシグナル伝達機構)
論文審査委員	(主査) 教授 長田 重一
	(副査) 教授 内山 安男 教授 辻本 賀英

論文内容の要旨

【目的】

細胞死は形態的にアポトーシスとネクローシスに分類される。アポトーシスは、不要な細胞、生体にとって害となる細胞を取り除くための生理的な細胞死であるのに対し、ネクローシスは炎症を惹起し、生体にとって不利に働く細胞死であると考えられている。これまでアポトーシスの過程で起こる細胞質や核の凝縮、染色体DNAの断片化などの細胞内現象に関わる分子が同定されてきたが、ネクローシスの細胞内分子メカニズムに関する知見は極めて乏しい。私は、Fasの下流でネクローシスを誘導するシグナル伝達経路の存在を明らかにし、Fasの活性化によるネクローシス誘導の分子機構の解明を目的とした。

【方法ならびに成績】

Fasを介するアポトーシスのシグナル伝達は、3量体化したFasにアダプター分子FADDが会合し、さらにFADDにカスパーぜ8の前駆体が会合することでDeath inducing signaling complex (DISC)が形成されることにじまる。DISC上でカスパーぜ8は活性化され、下流のシグナルが伝達される。最近、我々の研究室でアゴニスティック抗Fas抗体によるアポトーシス刺激に強い抵抗性を示すJurkat細胞のsublineを見つけた。この抵抗性の原因を調べたところアポトーシス伝達の主要な構成分子カスパーぜ8の発現がないことが示された。しかしながら、このカスパーぜ8欠損細胞株にFK506-binding protein (FKBP)とFADDを連結したキメラ分子 (FKBP-FADD)を導入し、FKBPの架橋によりFADDの多量体化を行うと細胞は死滅した。この細胞死を生化学的に解析すると、下流のカスパーぜの活性化がないことおよび染色体DNAの断片化を伴わないことがわかり、カスパーぜ非依存的な細胞死であると結論づけた。また、この細胞死の形態変化を電子顕微鏡で観察したところ、親株のJurkat細胞にFKBP-FADDを導入しFADDの多量体化で細胞死を誘導すると典型的なアポトーシスになるのに対し、カスパーぜ8欠損細胞株では典型的なネクローシスになることがわかった。従って、FADDの多量体化はネクローシスを誘導すること、この過程はカスパーぜ非依存的であると結論づけられた。

FADDの多量体化によるカスパーぜ非依存的な細胞死でミトコンドリアの膨潤が認められ、その細胞死にミトコンドリアの機能障害が関与していることが強く示唆された。そこでこの細胞死の過程におけるミトコンドリア膜電位の変化を、膜電位に依存してミトコンドリア内に取り込まれる蛍光色素を用いてFACSで解析した。その結果、ネクローシスの過程では、アポトーシスに伴う膜電位の変化より強い膜電位の消失が起こっていることが示された。ま

た、アポトーシスではミトコンドリアから cytochrome C が遊離し、これがカスパーぜ 3 を活性化することが明らかにされているが、FADD を介したネクローシスではミトコンドリア膜電位が消失しているにも関わらず、cytochrome C は遊離しないことが示された。さらに抗酸化剤に属する PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) が特異的にこのネクローシスの過程を抑制し、ネクローシスではアポトーシスとは全く異なるシグナル伝達を介していることが示唆された。次に、Fas を大量に発現するカスパーぜ発現細胞株を用いて、この細胞の Fas による細胞死はカスパーぜの阻害剤のみでは抑制されないこと、カスパーぜの阻害剤と上記の抗酸化剤の共存下ではじめて抑制されることが示され、Fas からの細胞死のシグナル伝達ではアポトーシス、ネクローシス両方のシグナル経路が活性化されうることが明らかとなった。

【総括】

Fas はこれまで細胞内にアポトーシスのシグナル伝達のみを伝えると考えられてきた。しかし、本研究により、Fas はカスパーぜに依存しないネクローシスのシグナルも伝達しうることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

細胞死は形態学的にアポトーシスとネクローシスに分類される。アポトーシスは細胞質や核の凝縮、染色体 DNA の断片化等の特徴的な形態変化を伴い、Fas を始めとしてその細胞内分子機構が詳細に解析されている。一方、ネクローシスは非生理性の細胞死と位置づけられ、その分子機構は不明である。

最近の研究結果より Fas のアダプター分子である FADD の多量体化によりカスパーぜ非依存的にネクローシスが誘導されることが明らかとなっていた。本研究はその細胞死の詳細な生化学的解析により、アポトーシス、ネクローシスの両方のシグナルが FADD の共通のドメインを共有していること、チトクローム C の遊離のないミトコンドリアの機能障害を伴うことを示した。また、抗酸化剤の PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) が特異的にこのネクローシスの過程を制御することを見いだし、ネクローシスではアポトーシスとは全く異なるシグナル伝達を介していることを示唆した。さらに Fas で活性化される細胞死においてもカスパーぜ非依存的にネクローシスが誘導されることを明らかにした。

Fas はこれまで細胞内にアポトーシスのシグナル伝達のみを伝えると考えられてきたが、本研究は Fas の下流でネクローシスを誘導するシグナル伝達経路の存在を明らかとし、学位の授与に値すると考えられる。