



Title	Negative Feedback Regulation of Activated Macrophage via Fas-mediated Apoptosis
Author(s)	新居延, 忠昭
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42796
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	新 居 延 忠 昭
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 7 4 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 12 年 10 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Negative Feedback Regulation of Activated Macrophage via Fas-mediated Apoptosis (Fas を介したアポトーシスによるマクロファージの活性化調節機構)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 荻 原 俊 男
	(副査) 教 授 金 田 安 史 教 授 辻 本 賀 英

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

最近の免疫組織学的検討から、心筋梗塞の発症に関係の深い不安定プラークにおいては、脂質の沈着とともに多数のマクロファージが集積していることが明らかにされている。マクロファージの集積機構においては、遊走や増殖とともにアポトーシスが関与する可能性がある。しかし、マクロファージにおけるアポトーシス誘導機構は明らかではない。そこで本研究は、マクロファージの活性化機構とアポトーシス誘導シグナルである Fas/Fas ligand (FasL) 系との関係を明らかにすることを目的とした。

【方法】

マクロファージは MRL/MPJ +/+ マウス (野生型マウス) 及び MRL/MPJ lpr/lpr マウス (Fas 変異マウス) の腹腔常在マクロファージを実験に用いた。アポトーシスはフローサイトメーターを用いた propidium iodide 染色による DNA 解析法及び Hoechst33258 を用いた核染色法で測定した。Fas mRNA レベルの測定は RT-PCR 法にて、FasL の蛋白レベルの測定はウエスタンブロット法を用いた。免疫組織化学染色は avidin-biotincomplex (ABC) 法を用いた。細胞内酸化物は蛍光指示薬 DCFH-DA を用いたフローサイトメーター法により測定した。Nitric oxide (NO) 産生量は Greiss 法を用いて測定した。

【成績】

- 1) サイトカイン (IFN- γ , TNF- α 及び IL-1 β) 刺激にてマクロファージは活性化され、大量の NO が産生され、マクロファージ自身にアポトーシスが誘導された。しかし、このサイトカインによるアポトーシスは NO 合成阻害薬で抑制された。また高濃度の NO ドナー NOC-12 もマクロファージにアポトーシスを誘導したことから、サイトカインによって活性化されたマクロファージは、NO を介して自身にアポトーシスを誘導することが示唆された。しかし、このサイトカインや NO によるマクロファージのアポトーシスは FasL に対して拮抗阻害作用を有する Fas-Fc によって抑制されたことから、NO を介した活性化マクロファージのアポトーシスには Fas/FasL 系が関与すると考えられた。
- 2) 次に、NO が Fas/FasL 系を活性化する可能性を検討したところ、NO はマクロファージにおいて Fas mRNA の発現を増強した。また、NO は培養上清中への可溶性 FasL (sFasL) の遊離を促進したが、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤はこの遊離を抑制した。

- 3) 次に、NO による活性化マクロファージのアポトーシスに Fas/FasL 系が関与することをさらに明らかにするために Fas の loss of function mutation である lpr/lpr マウスから採取したマクロファージを用いて検討した。lpr/lpr マウスから採取したマクロファージは野生型マウスに比べ NO によるアポトーシスに対して抵抗性を示した。また、免疫組織化学染色において lpr/lpr マウスの腎動脈周囲には野生型マウスに比べマクロファージが多数集積していた。
- 4) 次に、アポトーシスがマクロファージの活性化にどのような影響を及ぼすかを明らかにする目的で、Fas を介したアポトーシスシグナルの下流にあるカスパーゼを阻害する薬剤を用いて検討した。その結果サイトカイン刺激にてマクロファージから産生される peroxide は、カスパーゼ阻害剤処置にて増強することが明らかとなった。

【総括】

マクロファージには活性化にともなって自らにアポトーシスを誘導する Negative-feedback 機構が存在し、その過程に NO を介した Fas/FasL 系の活性化が関与する可能性があることを明らかにした。このことは、マクロファージ自身が炎症の遷延化に対する自己防御機構を有することを示唆するものである。従ってカスパーゼ阻害剤はマクロファージのアポトーシスを阻害することで酸化ストレスを増強させ、炎症を遷延化させる可能性があることから慎重な投与が必要であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、動脈硬化の進展に重要な役割を示すマクロファージの活性化と血管壁への集積機構にアポトーシスが関与する可能性を示したものである。すなわち、マクロファージは活性化に伴って大量の NO を産生し自らにアポトーシスを誘導するが、この機序に Fas/FasL 系が関与することを初めて明らかにした。また、Fas/FasL 系の下流のシグナルであるカスパーゼの活性化を阻害するとサイトカインによるマクロファージからの peroxide の産生が増強したことから、マクロファージの活性化にも Fas/FasL 系を介したアポトーシスが重要な役割を果たす可能性を示した。最近、心血管イベントを発症した動脈硬化プラークにおいては、マクロファージが多数集積していることが報告されている。本研究は、動脈硬化プラークにおけるマクロファージの集積や活性化の Negative-feedback 機構として Fas/FasL 系を介したアポトーシスが存在する可能性を示しており、心血管イベントの発症機序を考える上で重要な知見を与えると考える。

以上より、本研究は、学位の授与に価するものと考えられる。