



Title	Hypoxia Stimulates Release of the Soluble Form of Fas Ligand That Inhibits Endothelial Cell Apoptosis
Author(s)	茂木, 正樹
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43107
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	茂木 正樹
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学 位 記 番 号	第 16476 号
学 位 授 与 年 月 日	平成13年7月4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	Hypoxia Stimulates Release of the Soluble Form of Fas Ligand That Inhibits Endothelial Cell Apoptosis 低酸素ストレス下における可溶型Fasリガンド産生促進と血管内皮細胞のアポトーシス抑制効果
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 萩原 俊男
	(副査) 教授 長田 重一 教授 辻本 賀英

論文内容の要旨

酸化LDLなどの動脈硬化促進因子が内皮細胞にアポトーシスを誘導し、エストロゲンなどの抗動脈硬化因子が内皮細胞のアポトーシスを抑制することから、内皮細胞のアポトーシスを抑制することが動脈硬化の発症を予防できる可能性がある。ところで、Fasリガンド(FasL)は、腫瘍壞死因子(tumor necrosis factor α ; TNF α)ファミリーに属するII型膜蛋白でFas発現細胞にアポトーシスを誘導する。Fasは、ほとんど全ての細胞に発現するが、FasLの発現は活性化T細胞やNK細胞などに制限されている。最近、内皮細胞にFasLが発現し、Fasを発現する炎症細胞にアポトーシスを誘導することによって血管壁内への炎症細胞の浸潤を抑制する可能性が報告された。また、FasLがTNF α と同様に、ある種のメタロプロテアーゼによって膜型から可溶型(sFasL)に変化することが明らかにされている。しかし、その生理作用は明らかでない。本研究は、sFasLの生理作用を明らかにする目的で、低酸素ストレスによる内皮細胞のアポトーシス誘導機構におけるsFasLの役割について検討した。

【方法】

内皮細胞は1%低酸素インキュベーターを用いて低酸素ストレスを加えた。内皮細胞におけるFasLのmRNAの発現をRT-PCR法にて、FasLのタンパクの発現をウエスタンプロティング法、免疫組織染色法とフローサイトメトリー法で、培養液中のsFasL産生量をウエスタンプロティング法とELISA法で、また細胞中のFLIPタンパクの発現をウエスタンプロティング法にて検討した。また、アポトーシスはアネキシン抗体を用いたフローサイトメトリー法で測定した。

【結果】

- 1) Fasの下流にあり、Fasを介したアポトーシスを抑制するタンパクであるFLIPの発現が低酸素ストレスにより低下したことから、低酸素ストレス下ではFasを介したアポトーシスに対する感受性が亢進していることが示唆された。
- 2) これに対してFasLは、低酸素ストレス後3時間でFasL mRNAの発現上昇を認め、6時間後に細胞内FasLのタンパク量の増加を認めた。しかし、この細胞内FasLの増加は一過性であり、12-24時間後には元のレベルに復した。そこで、培養上清中のsFasL濃度を測定したところ、12時間後より培養液中のsFasL濃度の増加を認めた。
- 3) 低酸素ストレスにより内皮細胞にアポトーシスが誘導されたが、低酸素ストレス後の培養上清を別の新たな内皮

細胞に加えて低酸素ストレスを加えるとアポトーシスは有意に抑制された。しかし、この培養上清による抗アポトーシス作用は FasL 中和抗体を加えることにより消失したことから、培養上清による抗アポトーシス作用は sFasL を介していることが示唆された。

- 4) FasL を遊離するメタロプロテアーゼの特異的阻害剤である KB8301を添加すると sFasL の產生が抑制されるとともに、低酸素ストレスによるアポトーシスが増強した。実際、リコンビナント sFasL を外的に加えたところ低酸素ストレスによるアポトーシスが有意に抑制された。以上の結果より、内皮細胞は低酸素ストレス下において、抗アポトーシス作用を有する sFasL を產生することが示唆された。

【総括】

本研究は、内皮細胞の抗アポトーシス機構における可溶型 FasL の重要性を明らかにした。すなわち、低酸素ストレスにより内皮細胞にアポトーシスが導かれるが、内皮細胞は、適応機構として、自ら FasL の產生を亢進し sFasL の遊離を促進することにより低酸素ストレスによるアポトーシスを抑制することを明らかにした。したがって、本研究は、アポトーシスの観点から、動脈硬化の発症、進展機序を考える上で重要な知見を与えると考える。

論文審査の結果の要旨

アポトーシスによる内皮細胞の消失は、血栓形成などを介して心血管イベントの発症を惹起する可能性がある。内皮細胞にはアポトーシス受容体 Fas が発現し、そのリガンドである Fas リガンド (FasL) も恒常的に発現するが、通常は内皮細胞は Fas を介するアポトーシスに対して抵抗性を示す。また、FasL はある種のメタロプロテアーゼによって切断され可溶型 (sFasL) に変化することが知られているが、その生理機能は明らかではなかった。このような背景の中で、本研究は、内皮細胞が低酸素ストレス下では Fas のシグナルを下流で抑制する FLICE inhibitory protein (FLIP) の発現が抑制されることによって Fas を介したアポトーシスに対して感受性が亢進することを明らかにした。しかし、この時同時に内皮細胞からは sFasL の產生が促進されること、また、この產生された sFasL が低酸素ストレスによる内皮細胞のアポトーシスを抑制することを明らかにした。すなわち、本研究によって、内皮細胞の低酸素ストレスによるアポトーシス機構における sFasL の生理作用が初めて明らかになった。したがって、本研究は、学位の授与に値すると認めるものである。