



Title	Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death.
Author(s)	中川, 崇
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45477">https://hdl.handle.net/11094/45477</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	なか がわ たかし
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19340 号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. (サイクロフィリンDに依存したミトコンドリア膜透過性遷移はネクローシスを制御するがアポトーシスには関与しない。)
論文審査委員	(主査) 教授 久保 武 (副査) 教授 長田 重一 教授 戸田 達史

## 論文内容の要旨

## 【目的】

ミトコンドリアの permeability transition (PT) は、カルシウム依存的に膜透過性亢進がおこり、膜電位の低下、swelling、そして最終的にミトコンドリアの機能不全へと陥る現象である。PT は PT pore と呼ばれる複合体を介して起こると考えられ、構成分子として Voltage dependent anion channel (VDAC) や Adenine nucleotide translocator (ANT) 、 Cyclophilin D (Cyp D) などが想定されているが、その正確な分子機構は不明である。一方、Bcl-2 family によるミトコンドリアの外膜の透過性亢進とそれに伴う cytochrome c の漏出はアポトーシスのシグナル伝達において中心的な役割を果たしている。アポトーシスにおけるミトコンドリアの外膜の透過性亢進と PT との関連は、長年議論の中心となっているが、いまだ明確な結論は出ていない。今回我々は、それを明らかにすべく、PT を制御する分子の一つと考えられている Cyp D のノックアウトマウスを作成し PT ならびに細胞死に対する影響についての詳細な解析を行った。

## 【方法ならびに成績】

Cyp D ノックアウトマウスは正常に出生、発育し外見上は特に異常は示さなかつたが、Cyp D ノックアウトマウスの肝臓から単離したミトコンドリアはカルシウム刺激による PT は起こさず、Cyp D は PT に必須の分子であることが示された。またこの単離ミトコンドリアではカルシウム刺激による cytochrome c の漏出も起こらなかつた。しかしながら Bax や Bid による cytochrome c の漏出は正常に起こり、Cyp D ノックアウトマウスから調整した MEF、thymocyte、hepatocyte は、アポトーシス刺激によりコントロール細胞と同程度にアポトーシスを起こした。また Cyp D ノックアウトマウスに放射線を照射し小腸のアポトーシスを誘導した場合でも、コントロールと同様にアポトーシスが起こつた。

一方、これらの細胞に過酸化水素やカルシウムイオノフォアなどにより細胞死を誘導すると Cyp D 欠損細胞ではコントロール細胞に比べて細胞死が抑制された。これらの細胞死においては、カスペースの活性化や核の断片化は見られず、形態的にもネクローシスと考えられた。そこでこの細胞死の抑制が、PT の欠如に起因しているかいないかを

調べるために、hepatocyte をカルシウムイオノフォアで刺激し、その時の膜電位の低下とミトコンドリアへのカルシウムの取り込みを調べた。その結果 Cyp D 欠損 hepatocyte では、カルシウムイオノフォア刺激による膜電位の低下はコントロール細胞と比較し抑制されており、またその際ミトコンドリアへの過大量のカルシウムの取り込みが見られた。さらに心筋梗塞のモデルである心臓の虚血再灌流障害の実験においても、Cyp D ノックアウトマウスでは著明に心筋細胞の障害が抑制された。

### 【総括】

Cyp D は PT の制御に必須の分子であり、過酸化水素やカルシウムイオノフォアなどによる細胞死（ネクローシス）や虚血再灌流障害において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。しかしながら、少なくとも Bak/Bax などを介したアポトーシスにおいては Cyp D ならびに PT の関与は否定的であった。また Cyp D は心筋梗塞などの虚血性疾患の治療の分子ターゲットと成りうる可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

細胞死の制御機構においてミトコンドリアの膜透過性変化は中心的な役割を果たしている。アポトーシス時のミトコンドリア膜透過性亢進において、Bax/Bak は必須の分子であり、一方でミトコンドリアには permeability transition (PT) と呼ばれるサイクロスボリン A 感受性の膜透過性亢進機構の存在が知られている。アポトーシス時の膜透過性亢進と PT との関連は長い間議論の的となっていたが、明確な結論は出ていなかった。そこで本研究では、PT を制御する分子の一つと考えられているサイクロフィリン D (CypD) のノックアウトマウスを作成し、PT の細胞死への役割について解析を行った。CypD ノックアウトマウスから単離したミトコンドリアにおいてはカルシウム刺激などによる PT は起こらず、CypD は PT に必須の分子と考えられた。一方、このミトコンドリアにアポトーシス刺激であるリコンビナント Bid を投与した際には正常ミトコンドリアと同程度の cytochrome c 漏出が観察された。また CypD ノックアウトマウスから調整した embryonic fibroblast、thymocyte、hepatocyte に様々なアポトーシス刺激を添加すると正常細胞と同程度のアポトーシスが誘導された。一方、これらの細胞を過酸化水素やカルシウムイオノフォアなどの PT を惹起する薬剤で刺激し、ネクローシスを誘導すると、CypD 欠損細胞は正常細胞に比べて細胞死が抑制された。また心筋梗塞モデルである、心臓の虚血再灌流障害の実験においてもノックアウトマウスは心筋障害が著明に抑制された。以上の結果より CypD は PT に必須の分子であると考えられた。また、少なくとも Bak/Bax を介したアポトーシスにおける PT ならびに CypD の関与は否定的であった。一方、ROS やカルシウムといった刺激による necrotic cell death を PT が制御していることが明らかとなった。

本研究の成果は、PT を介した細胞死制御の機構解明に大きく貢献し、さらに CypD は虚血性疾患などの治療の分子ターゲットとなりうる可能性を示した。以上より、本研究は学位の授与に値すると考えられる。