Osaka University Knowledge Archive

Title	Mechanism of Hepatocyte Apoptosis under Sustained Endogenous Oxidative Stress
Author(s)	石原, 康宏
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46473
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏　　名　石原康宏（いしはら　やすひろ）

博士の専攻分野の名称　博　士（理　学）

学位記番号　第　20029　号

学位授与年月日　平成18年3月24日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

理学研究科生物科学専攻

学位論文名　Mechanism of Hepatocyte Apoptosis under Sustained Endogenous Oxidative Stress
（持続的な内因性酸化ストレス下で引き起こされる肝細胞アポトーシスの機構）

論文審査委員　（主査）
教　授　金澤　浩

（副査）
教　授　小倉　明彦　　徳島文理大学教授　嶋本　典夫
教　授　滝澤　温彦

論文内容の要旨

活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）の生成と消去は正常の細胞ではバランスがとれているが、ROSの過剰生成またはその消去系の異常により細胞は酸化ストレス状態に陥る。酸化ストレスが細胞増殖、細胞分化、アポトーシスなど生理的現象に関与していることも明らかになりつつあるが、その機構については大半が未知である。当研究室では、細胞内抗酸化酵素であるカタラーゼ及びグルタチオンペルオキシダーゼを、それぞれの特異的阻害剤である3-amino-1-2-4-triazole（ATZ）、mercaptosuccinic acid（MS）により阻害した時、初代肝細胞における過酸化脂質量が増大し、培養12時間後より核凝縮及びヌクレオソーム単位のDNA断片化を伴うアポトーシスが引き起こされることを報告している。しかしながら、アポトーシスの機構について詳細な検討はなされていない。そこで、まず、ROSと細胞死の関連について検討し、その後、本アポトーシスの実行因子を探索した。

酸化ストレスとアポトーシスとの関連を、酸化ストレスに対する暴露時間、細胞内酸化還元状態（redox state）に焦点をあてて検討した。ATZ+MS処置により細胞内ROS量は、培養後9時間まで未処置細胞の約2倍に増加した。また、細胞内GSH量は6時間後、タンパク質SHは9時間後から時間依存的に減少した。細胞をATZ+MSで処置し、6時間後に培地交換により薬剤を除去したところ、薬剤処置により増加したROS量は未処置細胞レベルまで減少し、アポトーシスは起こらなかった。このとき、GSH量も薬剤除去により、未処置細胞レベルまで回復した。また、GSH合成阻害剤であるbuthionine sulfoximineで前処置した細胞にATZ+MSを添加したところ、アポトーシスの実行が早まった。これらの結果は、ATZ+MS処置が誘導する肝細胞アポトーシスが、持続的なROS量の増加により引き起こされること、アポトーシスに先立って細胞内redox stateが酸性側へシフトすることを示している。

Caspaseはアポトーシスの実行において中心的な役割を果たすプロテアーゼ群である。そこで、本アポトーシスにおけるcaspaseの関与を検討した。ATZ+MS処置により誘導されるアポトーシスは、caspase-3阻害剤DEVD-CHO、或いは汎caspase阻害剤z-VAD-fmk処置により抑制されず、アポトーシスの実行過程においてcaspase-2、-3、-6、-7、-8、-9の活性化も見られなかった。また、caspase-3のプロセシングも検出されなかった。加えて、caspase-3のSH基はATZ+MS処置により培養時間に比例して失われた。従って、本アポトーシスはcaspase非依存的であり、

このcaspase非依存性は持続的な酸化ストレスがcaspaseを酸化状態に留めていることに起因すると考えられる。

本アポトーシスにおいては非常に明瞭なDNAラダーが観察される。Caspase非依存的に働くapoptotic DNaseとしてEndonuclease G (EndoG) が報告されている。そこで、本系におけるEndoGの関与を検討した。ラット肝cDNAライブラリーよりラットEndoG cDNAを新規にクローニングし、EndoG組換えタンパク質を作製した。組換えEndoGは、10 mM過酸化水素存在下という厳しい酸化ストレス条件下でさえ、単離核にヌクレオソーム単位のDNA断片化を引き起こした。ATZ+MS処置により、ミトコンドリアの膜電位は細胞死に先立って減少し、EndoGのミトコンドリアから核への移行が観察された。EndoGに対するsiRNAを細胞に導入した時、EndoG mRNA及びEndoGタンパク質の発現はともに抑制され、EndoG siRNA導入細胞をATZ+MSで刺激すると、control siRNA導入細胞と比較して、DNA断片化が有意に抑制された。これらの結果は、EndoGは厳しい酸化ストレス条件下で機能するDNaseであること、EndoGが本アポトーシスにおけるDNA断片化の実行因子であることを示唆している。

本研究により、初代肝細胞をATZ+MSで処置することにより持続的な細胞内ROS量の増加、細胞内酸化が起こり、その結果、アポトーシスが誘導されること、このアポトーシスにおいて、caspaseはそれ自身の酸化のために機能せず、ミトコンドリアに局在するEndoGが酸化ストレス刺激により核へ移行しDNAの断片化を実行することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

申請者は、Mechanism of hepatocyte apoptosis under sustained endogenous oxidative stressと題する博士論文を提出した。この研究においては、活性酸素を不活性化する酵素機能を阻害する薬物を細胞に加えることにより細胞内に内因性の酸化ストレスを創出し、細胞のアポトーシスを人為的に誘導することに成功している。また、その結果、この場合では従来アポトーシスにおける主要な細胞内機能因子として知られていたカスパーゼの機能がむしろ阻害されること、代わってDNA分解酵素のEndo Gがミトコンドリアから放出されるという新たな機構の存在を証明した。

国際誌に研究成果は発表されている。主査1名、副査3名を含む公開の場で予備審査、本審査を行ない、研究成果の発表および質疑応答を行った結果、博士論文内容に値するとの判断が下された。論文内容と上記の公聴会結果を総合し、本論文は、博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。