

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46473">https://hdl.handle.net/11094/46473</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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	石原康宏
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 のプロセッ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。