

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 新 倉 雄 一

本研究は初期免疫において重要な役割を担っている単球・マクロファージの細胞分化ならびに細胞死の制御機構を明らかとするため、ヒト単芽球様細胞株 U937 をインターフェロン・ガンマ (IFN- γ) や活性型ビタミン D₃ (VD₃), 全トランスレチノイン酸 (RA) などにより分化誘導する系を用いて、食細胞分化に伴った細胞死受容体 Fas を介したアポトーシスに対する感受性の変化について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. カスパーゼ-8 およびその基質 FLIP に対する切断部位特異抗体を作製し、カスパーゼ-8 活性化を *in situ* にて検出する系を確立した。フローサイトメトリーによる解析の結果、Fas 感受性変化は刺激初期におけるカスパーゼの活性化、もしくはその後のミトコンドリアを介したシグナル増幅の変化に基づくものあることを示した。
2. 単離ミトコンドリア、細胞質画分、および活性型カスパーゼ-8 を用いた *in vitro* での解析より、細胞分化に関わらずいずれのミトコンドリアもカスパーゼ-8/BID の経路でシトクロム c を放出する機能は保持していることが明らかとなった。
3. シトクロム c 添加に依存したカスパーゼ活性化は分化誘導した各細胞抽出液において同程度検出されたことから、ミトコンドリアからシトクロム c が放出されれば Fas 感受性に関わらず同程度のカスパーゼ活性化が起こることが明らかとなった。以上より、Fas 感受性変化はミトコンドリアを介したシグナル増幅経路における機能的変化によ

るものでなく、刺激初期におけるカスパーゼ活性化の変化によるものであることが示唆された。

4. Fas 感受性と相関するように、IFN- γ 処理細胞において Fas の発現量が増加していたのに対し、VD₃ および RA 処理細胞においては Fas の発現量は減少していた。興味深いことに、VD₃ および RA 処理細胞においては Fas により誘導される Fas の重合が著しく減弱しており、非細胞傷害性抗 Fas 抗体を用いた競合実験により、この減弱が Fas 発現量の減少によるものであることが明らかとなった。
5. Fas 刺激に依存した DISC 形成能を解析した結果、VD₃ および RA 処理細胞において DISC 形成能が減弱していた。一方、IFN- γ 処理細胞における DISC 形成能は未分化細胞と同程度であり、DISC 形成能では Fas 高感受性を説明することはできなかった。
6. IFN 処理細胞より単離した DISC 中に FLIP のバンドを見出した。FLIP が DISC 上におけるカスパーゼ-8 活性化を促進することがすでに報告されており、IFN 処理細胞における Fas 高感受性への FLIP の関与が示唆された。

以上、本論文はヒト単芽球様細胞株 U937 において、食細胞分化に伴い Fas が量的また機能的に変化することを見出した。本研究はこれまで不明であったマクロファージにおける Fas 耐性のメカニズムおよびその意義を解明する上で重要な貢献をなし、免疫学の発展に寄与するところが大きい。したがって、本論文は学位の授与に値するものと考えられる。