

審査の結果の要旨

氏名 桑原 卓

本研究は感染時の細菌除去過程において重要な役割を演じていると考えられる細菌感染誘導性アポトーシスの機構を解明するため、ヒト単芽球細胞株 U937 をインターフェロン γ (IFN) やレチノイン酸 (RA) で分化誘導する系にて、アポトーシスの解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 細菌感染刺激のうちリポ多糖 (LPS) 刺激が IFN 分化 (U937IFN) 細胞にアポトーシスを誘導していることを見いだした。未処理 U937 細胞やレチノイン酸処理 (U937RA) 細胞は LPS 刺激によるアポトーシスを起こさなかった。U937 細胞は IFN 処理により LPS 誘導性アポトーシス感受性を獲得することを意味している。LPS 刺激は腫瘍壊死因子受容体や他のデス受容体を介することなく、LPS 受容体からアポトーシスカスケードを直接活性化していることが明らかとなった。
2. IFN 処理は LPS 受容体の発現量を増大させ、このことが LPS 誘導性アポトーシス感受性化の原因の一つであることが示唆された。フローサイトメトリー法と Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction 法を用いた解析から、LPS 受容体を構成する Toll 様受容体 4 (TLR4) と MD-2 とが、IFN 処理により増大していることが判明した。アンチセンスオリゴヌクレオチド導入により TLR4 発現量を減少させた場合、LPS 誘導性アポトーシスは抑制された。また、抗体により受容体機能を中和し、活性のある受容体数を減少させた場合もアポトーシスは阻害された。LPS はアポトーシス刺激だけでなく、細胞生存側への刺激も入力する。しかしながら、Nuclear factor for κ chain in B cell (NF κ B) 経路や extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路は U937 細胞, U937IFN 細胞, および U937RA 細胞間で優位な差を示さなかった。したがって、LPS 受容体発現量の増加がアポトーシス感受性化に密接に関与していると考えられる。
3. LPS 誘導性アポトーシスでは、ミトコンドリア経路が支配的に関与してい

ることが示唆された。受容体の細胞質ドメインで形成される細胞死誘導複合体 (DISC) において、アポトーシス刺激はカスパーゼ-8 の活性化を誘導する。DISC 形成に関与する Fas associated death domain (FADD) の機能欠失変異タンパク質は Fas 誘導性アポトーシスを阻害したが、LPS 誘導性アポトーシスを抑制しなかった。アポトーシスの細胞内変化の一つとして知られるミトコンドリア脱機能は、DISC 中でのカスパーゼ-8 活性化が必要である。LPS 刺激時では、カスパーゼ阻害剤存在下でもミトコンドリア脱機能は誘導された。したがって、DISC 形成とカスパーゼ-8 活性化を伴う経路 (受容体経路) は関与していないことが考えられる。Bcl-2 ファミリータンパク質の Bcl-2 homology ドメイン 4 (BH4) はミトコンドリア脱機能を抑制する。BH4 によるミトコンドリア保護条件では LPS 誘導性アポトーシスは抑制された。ミトコンドリア脱機能は LPS 刺激による Bax のミトコンドリアへの転位によることが明らかとなった。このことから、LPS 刺激によるミトコンドリア脱機能がアポトーシスに必須であることが示唆された。

4. LPS 受容体からミトコンドリアへのシグナル伝達は p38 が担っていることが示唆された。受容体の下流でカスパーゼが活性化していないことから、別の伝達様式を調べた。LPS 刺激後、アポトーシスを示した U937IFN 細胞のみで p38 の持続活性化が認められた。U937 細胞や U937RA 細胞は一過性の活性化を示した。p38 の特異的阻害剤 SB203580 存在下において、LPS 誘導性アポトーシスは抑制された。また、Bax の転位も阻害されたことから、p38 は Bax の上流で活性化され、アポトーシスシグナルに関与していると考えられる。

以上、本論文はヒト単芽球細胞株 U937 において、食細胞分化に伴い LPS 受容体が量的かつ機能的に変化することを見いだした。さらに、LPS 刺激は p38 を活性化し、Bax によるミトコンドリア脱機能を誘導していることを明らかとした。本研究はこれまで未知であった単球・マクロファージ分化における細菌感染誘導アポトーシスのメカニズムおよびその意義を解明するうえ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する。