

審査の結果の要旨

氏名 石井 絢

マクロファージが種々の刺激を受けて細胞死を引き起こす現象は、アポトーシスの代表的な例として良く知られている。しかしながらその詳細な分子メカニズムの解明はこれまでほとんど為されてこなかった。ATP もこのようなマクロファージにアポトーシスを誘導する刺激分子の一つとして以前から認知されていた。ATP はあらゆる細胞に多量に存在する生体のエネルギー源であるが、近年その細胞外シグナル伝達分子としての広範な役割が注目を集めている。

Apoptosis Signal-regulating Kinase (ASK) 1 は酸化ストレスなど様々なストレス刺激を感受して、Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) ファミリーメンバーである c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK) や p38 MAPK を活性化する MAPK kinase kinase として機能し、アポトーシスなどの生理応答を誘導することが知られている。最近、ASK1 がマクロファージの自然免疫において重要な機能を制御していることが明らかになるなど、マクロファージの生理応答制御への ASK1 の積極的な関与が示されつつあった。本研究はマクロファージにおける ATP 誘導性アポトーシスの分子メカニズムを、ASK1-p38 経路の関与を中心に詳細に解析したものである。以下に本研究によって得られた主要な知見をまとめる。

1. ATP は ROS 産生を介して p38 経路の活性化、及びアポトーシスを誘導する

マクロファージ系 cell line である RAW264.7 細胞では、ATP 処理によってアポトーシスが引き起こされる。本細胞を用いてアポトーシスに対する MAPK 経路の関与を検討したところ、ATP 誘導性アポトーシスが p38 を介していることが強く示唆された。更なる検討の結果 ATP 誘導性アポトーシスが活性酸素種 (Reactive Oxygen Species ; ROS) の産生を介していることが抗酸化剤実験、及び ROS 特異的な蛍光プローブを用いた実験によって明らかとなった。また、阻害剤を用いた実験によって、この ROS はミトコンドリア由来である可能性が強く示唆された。

2. P2X₇ 受容体が ATP による p38 依存性アポトーシスに必要である

細胞外の ATP は主として細胞膜表面上に多量に存在する P2 プリン受容体を介して細胞内にシグナルを伝達する。特にマクロファージにおける ATP 誘導性アポトーシスでは、細胞内シグナル伝達機構は未知であったものの、P2X₇ 受容体が主に働いていることがわかってきた。P2X₇ 受容体アンタゴニスト及び各種 P2 受容体アゴニストを用いた検討によって、ATP による p38 の活性化は P2X₇ 受容体を介していることが明らかとなった。また、P2X₇ 受容体アンタゴニストが ATP による ROS の産生を抑制したことより、ROS の産生から p38 活性化に至る一連の経路の最上流には P2X₇ 受容体が位置し、ATP 誘導性アポトーシスを制御している可能性が示唆された。分子生物学的解析の結果、この P2X₇ 受容体を介した p38 の活性化はその C 末端領域を介して引き起こされ、アポトーシスを誘導していると考えられた。

3. ASK1 が ATP 誘導性アポトーシスに必要な

脾臓由来の初代培養マクロファージ細胞 (Spleen-derived macrophages ; SDMs) を用いて更に検討すると、ATP 依存的な p38 の活性化はほぼ ASK1 特異的に制御されていることが明らかとなった。そこで ATP 誘導性アポトーシスについて ASK1 の寄与を検討したところ、ASK1^{+/+}と比較して ASK1^{-/-} SDMs ではアポトーシスが顕著に減弱していた。また ROS を模倣する H₂O₂ 刺激においても ATP 同様、ASK1 依存的なアポトーシスが観察された。ASK1^{+/+}および ASK1^{-/-} SDMs において P2X₇ 受容体発現量、ROS 産生量に差が認められなかったことから、ASK1^{-/-} SDMs におけるアポトーシスの減弱は ASK1-p38 経路の欠失に起因するものと考えられた。したがって、マクロファージにおける ATP 誘導性アポトーシスおよび p38 の活性化に、ASK1 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

以上より本研究によって、これまで未解明であったマクロファージにおける ATP 誘導性アポトーシスが、以下のような経路を介していることが明らかとなった。すなわち細胞外の ATP が P2X₇ 受容体に認識され、受容体の C 末端がミトコンドリアからの ROS の産生を惹起する。産生した ROS は ASK1 の活性化を経て p38 を活性化し、さらにその下流で caspase-3 を活性化してアポトーシスを誘導する。

近年マクロファージのアポトーシスの生理的意義の一つとして、炎症反応の終結に重要である可能性が示唆されている。最近 ASK1 がマクロファージからの各種炎症性サイトカインの産生誘導に関与していることが明らかとなっているが、その一方でマクロファージのアポトーシスをも ASK1 が制御しているという今回の結果は、炎症惹起から終結に至るまでの一連の自然免疫応答の制御に ASK1-p38 経路が働いていることを示す結果であり、非常に合目的である可能性を提示したものである。

本研究は ASK1 の新たな生理的刺激として ATP を見だし、これまで未知であったマクロファージにおける ATP 誘導性アポトーシス制御機構を詳細に解明した報告である。MAPK 経路と自然免疫系路との複雑なクロストークの解析を進めるにあたって非常に重要な礎となり得る点において画期的であり、また p38 依存的なアポトーシス誘導シグナル伝達機構解明への方向性を示した点でも意義深いことから、本研究を博士 (薬学) の学位を授与するに値するものと認めた。