

審査の結果の要旨

氏名 塩入 利一

本研究は、sepsis の病態形成に重要であると考えられる血管内皮細胞障害に関して、初代培養細胞であるヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Venous Endothelial Cells : HUVEC) と グラム陰性菌の菌体成分であるエンドトキシン (lypopolysaccharide : LPS ; *Escheria coli* O111:B4) との関係について研究を行い、下記の結果を得ている。

- 1、 HUVEC より全 RNA を抽出し、real time RT-PCR 法を用い LPS 受容体蛋白質の mRNA の発現状況を検討した。その結果、MD-2 および TLR4 の mRNA 発現は認められたが、CD14 の mRNA 発現はほとんど認めず、HUVEC では LPS 受容体蛋白質のうち、CD14 が欠如していることが示唆された。
- 2、 血清非添加培地に可溶性 LPS 受容体蛋白質 (sCD14, sMD-2) を添加し、内因性アポトーシス阻害物質である FLIP (FADD-like ICE inhibitory proteins) を抑制するため cycloheximide (CHX) の存在・非存在下に、HUVEC を LPS で刺激し、代謝活性のある細胞中の NADH 活性を反映する MTS 法にて細胞の viability を評価した (Cell Viability Assay)。その結果、CHX 存在下では、sCD14 依存性に LPS 刺激による viability の低下がみられたが、CHX 非存在下では、LPS 刺激による viability の低下はみられなかった。よって sCD14 は mCD14 に対し代償的に作用していることが示されたが、sMD-2 にこのような作用は認められなかった。また CHX 非存在下では、HUVEC の自然増殖の影響などにより、viability が修飾されている可能性が考えられた。
- 3、 同様に HUVEC を LPS で刺激を行い、細胞外の LDH 活性を指標とし cytotoxicity を評価した (Cell Cytotoxicity Assay)。その結果、CHX の有無にかかわらず sCD14 共存下で、LPS 依存性に cytotoxicity の上昇を認めた。よって HUVEC では、sCD14 依存性に LPS による細胞障害が惹起されていることが示された。
- 4、 同様に HUVEC を LPS で刺激を行い、細胞内外の caspase-3/7 活性を指標とし、LPS 誘導性のアポトーシスを評価した (Caspase-3/7 Activity Assay)。細胞内では caspase-3/7 活性の上昇はみられなかったが、細胞外では、CHX の有無にかかわらず sCD14 共存下で、LPS 依存性に caspase-3/7 活性の上昇を認めた。よって HUVEC では、内因性アポトーシス阻害物質の影響下においても、LPS により caspase-3/7 が活性化されることが示された。
- 5、 この細胞外の caspase-3/7 活性は、caspase-3/7 の特異的な阻害剤である Z-DEVD-FMK と共に測定すると完全に抑制されたこと、また Western Blot 法にて、活性型の caspase-3 蛋白質の増加も検出されたことから、この活性は少なくとも caspase-3 に起因するものであると考えられた。さらに、細胞外にて LDH 蛋白質の増量や、

caspase-3/7 阻害剤により、LPS 刺激による viability および cytotoxicity の改善を認めたことから、HUVEC では、caspase-3/7 の活性化によりアポトーシスが誘導されているものと考えられた。

以上、本論文はヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Venous Endothelial Cells : HUVEC)における LPS 刺激による細胞障害およびアポトーシス誘導に関する解析から、HUVEC は、CHX を併用しない内因性アポトーシス抑制物質 FLIP の影響下においても、sCD14 依存的に LPS 刺激によりアポトーシスが誘導されることを見出した。したがって、sCD14 の制御などによって、血管内皮細胞のアポトーシスおよび細胞障害の抑制することが、重症敗血症や敗血症性ショックの新たな治療戦略として有用である可能性が示唆され、学位の授与に値するものと考えられる。