

論文の内容の要旨

氏 名 張 文光

指導教官 小野寺 節

論文題目 Studies on apoptosis-inducing factor in human endothelial and cancer cells

(ヒト内皮細胞および癌細胞におけるアポトーシス誘導因子に関する研究)

アポトーシスは、虚血に続発する冠血管内皮傷害および心筋損傷の重要な特徴として同定されています。内皮細胞のアポトーシスは、アテローム性動脈硬化症の早期にもみられます。アポトーシスを制限する戦略が、虚血の結果生じる血管損傷および心筋障害を低減させることが認められています。アポトーシスのダウンレギュレーションは、癌死に至る抗癌剤耐性にとっても重要です。したがって、アポトーシスに至る段階の発現、制御、およびシグナル伝達経路を同定することが重要であります。一般に、アポトーシスはカスパーゼの活性化の結果生じるものであると考えられています。アポトーシス誘導因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) は新しく記述された経路であり、カスパーゼ活性化に依存しない細胞傷害に至るものです。AIF は、正常細胞のミトコンドリアの膜間に位置するフラビンタンパク質です。アポトーシスの誘導時に、AIF はサイトゾルを通じてミトコンドリアから核に移行し、核内でクロマチン凝縮および大規模な DNA 断片化に関与します。ここでわれわれは、ヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC) および前立腺癌細胞 (LNCaP) における AIF の存在を同定し、酸化低密度リポタンパク質 (ox-LDL) 誘導内皮細胞アポトーシスおよびシスプラチン誘導癌細胞アポトーシスにおける AIF の役割を検討しました。この試験は、血管疾患の病因および抗癌剤耐性のメカニズムのわれわれの理解を強化するものと思われま

第 1 章では、ヒト冠動脈内皮細胞におけるアポトーシス誘導因子の同定。逆転写 PCR およびウエスタンブロットを用いて、AIF の mRNA およびタンパク質の発現を測定しました。培養した HCAEC を、ox-LDL (10–40 $\mu\text{g/ml}$)、アンジオテンシン II (10^{-9} – 10^{-6} M)、または TNF- α (0.1–10 ng/ml) で処理しました。AIF は、未刺激の HCAEC ではほとんど検出されませんでした。しかし、ox-LDL での処理により、AIF の発現が濃度および時間依存的に有意に亢進しましたが、アンジオテンシン II または TNF- α での処理ではそれは認められませんでした。DNA 配列解析により、HCAEC における AIF の存在が実証されまし

た。汎カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK で細胞を処理しましたが、ox-LDL に媒介された AIF タンパク質の発現は変化しませんでした。ox-LDL に媒介された AIF 発現のアップレギュレーションは、アクチノマイシン D により阻害され、転写調節が示唆されました。さらに、ox-LDL で細胞を処理し、免疫細胞化学により測定した結果、AIF がミトコンドリアから核に移行しました。これらのデータから、AIF は HCAEC において発現し、ox-LDL によりアップレギュレートされることが示唆されています。

第 2 章では、ヒト冠動脈内皮細胞アポトーシスにおける AIF の役割。本試験は、HCAEC の ox-LDL 誘導アポトーシスにおける AIF の病態生理学的役割を決定するためにデザインされました。細胞を ox-LDL (10–40 $\mu\text{g/ml}$) で 24 時間培養、処理しました。ox-LDL により、AIF の発現が増加し、アポトーシスが生じ (TUNEL 染色および大規模な DNA 断片化により測定)、細胞質から核への AIF の移行が減少しました。HCAEC を汎カスパーゼ阻害剤 zVAD-FMK で前処理しましたが、ox-LDL に反応した AIF 媒介アポトーシスに影響はありませんでした。われわれは、翻訳開始点が重複した相補的配列に結合するヒト AIF mRNA 配列 (AIF-AS) の 5'- TCG CCG AAA TGT TCC GGT GTG GA-3' 位を標的とする特異的アンチセンスオリゴヌクレオチドを開発しました。細胞を AIF-AS で 24 時間前処理し、イムノブロット解析で測定したところ、ox-LDL によりアップレギュレートされた AIF タンパク質が抑制されました。AIF-AS も、アポトーシスおよび AIF の移行を減少させました ($P < 0.01$ 対 ox-LDL 単独)。次にわれわれは、サイトメガロウイルスプロモーターを有する発現ベクター pcDNA3.1 に全長 AIF cDNA を挿入し、AIF の組換えプラスミドを作成しました。プラスミドでトランスフェクトした HCAEC は、AIF の発現、広範なアポトーシス、および細胞質から核への AIF の移行において、2~4 倍の増大を示しました。これら 2 つのアプローチの結果は、AIF が ox-LDL 誘導内皮傷害において重要な役割を果たすことを示しています。

第 3 章では、アテローム性動脈硬化症血管におけるアポトーシス誘導因子の過剰発現。ここでわれわれは、AIF cDNA での内皮細胞のトランスフェクションによる AIF のアップレギュレーションを記述しました。培養ヒト動脈内皮細胞を、pcDNA-AIF (1-10 $\mu\text{g/ml}$) で 24~48 時間トランスフェクトしました。AIF の発現が pcDNA-AIF トランスフェクト細胞において亢進し、コメットアッセイおよび大規模の DNA 断片化により測定した結果、AIF の過剰発現がアポトーシスを引き起こしたことがわかりました。アテローム硬化組織は、ox-LDL と同じくアポトーシス細胞に富むため、われわれは、ヒトアテローム性動脈硬化症血管における AIF の発現を検討しました。正常の動脈域ではアポトーシスまたは AIF がみられなかったのに対し、アテローム性動脈硬化症血管では、著しいアポトーシスおよび

AIFの著明な発現が示されました。免疫染色により、主に増殖と密接したAIFの局在化が示されました。これは、ヒトアテローム硬化組織におけるAIFを初めて示したものです。AIFのアップレギュレーションは、ox-LDLの蓄積の結果であると思われます。

第4章では、アポトーシス誘導因子の核移行は、LNCaP前立腺癌細胞におけるシスプラチン誘導アポトーシスと関連します。前立腺癌は、シスプラチン化学療法に対して抵抗性であると考えられています。シスプラチンに対する抵抗性の新しい原因を同定するために、われわれは、前立腺癌でのシスプラチン誘導細胞死におけるカスパーゼ非依存性アポトーシスを媒介するAIFの役割を探究しました。汎カスパーゼ阻害剤Z-VAD-FMKでの処理と同じく、LNCaP細胞におけるシスプラチン誘導アポトーシスはAIF阻害剤N-アセチル-L-システイン(NAC)により抑制され、NACによるLNCaP細胞の処理はAIFの核への移行を妨げ、AIFの組換え遺伝子の過剰発現はアポトーシスを増加させました。われわれの結果は、AIFが前立腺癌細胞におけるシスプラチン誘導アポトーシスと関連していることを示唆しています。

要約すると、AIFはox-LDLで処理されたHCAECにおいて濃度および時間依存的に発現し、ox-LDLによりアップレギュレートされたAIFの発現は、細胞質から核へのAIFの移行と関連しています。AIF mRNAを標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドは、AIFの発現およびアポトーシスを抑制します。組換えpcDNA-AIFは、AIFの発現およびアポトーシスをアップレギュレートしました。ヒトアテローム性動脈硬化症血管におけるAIFの過剰発現は、進行したアテローム性動脈硬化症の領域でのアポトーシスにおけるAIFの病理学的役割に関する証拠を示しました。AIFの核移行およびAIFの組換え遺伝子の過剰発現は、前立腺癌細胞におけるアポトーシスを増加させました。したがって、AIFは、内皮細胞におけるアポトーシス誘導の病理学的メカニズムであると思われます。また、癌化学療法でのシスプラチンに対する感受性の亢進という点で、AIFは興味深い新規タンパク質であることが判明されるかもしれません。AIF経路は、ヒト内皮細胞および癌細胞におけるカスパーゼおよびその他のアポトーシス経路の重要性を否定するものではありません。