

アポトーシスはカスパーゼの活性化の結果生じると考えられている。しかしながら、最近明らかにされたアポトーシス誘導因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) による経路はカスパーゼ活性化に依存せずに細胞傷害に至る経路である。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、アポトーシス誘導時に、ミトコンドリアから核に移行し、クロマチン凝縮および大規模 DNA 断片化に関与する。申請者は、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 の存在を確認し、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前立腺癌細胞アポトーシスにおける AIF の役割を検討した。

第 1 章では、HCAEC における AIF の発現をしらべた。HCAEC を、ox-LDL (10-40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、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、逆転写 PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて、AIF の mRNA およびタンパク質の発現を測定した。ox-LDL 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たが、アンジオテンシン II または TNF- α 処理で発現亢進は認められなかった。ox-LDL による 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 により阻害された。これらの結果から、AIF は HCAEC で発現し、ox-LDL によりアップレギュレートされることが示された。

第 2 章では、HCAEC アポトーシスにおける AIF の役割をしらべた。ox-LDL 処理により、AIF の発現が増加、細胞質から核へ移行し、アポトーシスが生じた (TUNEL 染色および大規模な DNA 断片化により確認)。HCAEC を汎カスパーゼ阻害剤 zVAD-FMK で前処理したが、ox-LDL による AIF 媒介アポトーシスには影響しなかった。HCAEC を、ヒト AIF mRNA 配列の 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 (AIF-AS) で 24 時間前処理したところ、ox-LDL によりアップレギュレートされた AIF タンパク質発現が抑制された。また、アポトーシスと AIF の核移行も減少した。次に、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製した。プラスミドでトランスフェクトした HCAEC では、AIF の発現と細胞質から核への移行およびアポトーシス細胞数が、2~4 倍増加した。

第 3 章では、ヒトのアテローム性動脈硬化症血管における AIF の発現を検討した。正常の動脈では AIF の発現増加とアポトーシスはみられなかったのに対し、アテローム性動脈硬化症の血管では、AIF の著明な発現と著しいアポトーシスが観察された。また、免疫染色により病変部に密接して AIF が局在していた。これはヒトアテローム硬化病変における AIF の発現を初めて示したものである。

第 4 章では、LNCaP のシスプラチン誘導細胞死における AIF の役割をしらべた。LNCaP のシスプラチン誘導アポトーシスは、汎カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK ばかりでなく AIF 阻害剤 N-アセチル-L-システイン (NAC) によっても抑制された。NAC 処理は AIF の核移行を妨げた。また、AIF 遺伝子の過剰発現によりアポトーシスが増加した。これらの結果は、前立腺癌細胞のシスプラチン誘導アポトーシスにも AIF が関連していることを示すものである。

以上、HCAEC では ox-LDL 処理、LNCaP ではシスプラチン処理によって AIF の発現を介したアポトーシス経路が進行することが示唆された。また、ヒトアテローム性動脈硬化症血管では AIF が過剰発現して内皮細胞のアポトーシスを誘発することが示された。これらの結果から、AIF は動脈硬化および癌の治療において興味深い新規タンパク質であると考えられた。従って、審査委員一同は申請者が博士 (獣医学) に十分に相当すると判定した。