

氏名(本籍)	ひさ 久	はら 原	まこと 真(北海道)
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第2,149号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	ICE/CED-3 Family Executes Oligodendrocyte Apoptosis by Tumor Necrosis Factor (腫瘍壊死因子(TNF)によるオリゴデンドロサイトアポトーシス実行に関与するICE/CED-3ファミリーについての研究)		
主査	筑波大学教授	医学博士	三輪正直
副査	筑波大学教授	医学博士	中内啓光
副査	筑波大学教授	医学博士	岡戸信夫
副査	筑波大学講師	医学博士	山本三幸

## 論文の内容の要旨

### (目的)

オリゴデンドロサイト(OLG)は中枢神経において、髄鞘形成に不可欠なグリア細胞である。中枢神経脱髄疾患である多発性硬化症(MS)は免疫担当細胞の異常な反応によりOLGが特異的に障害され細胞死(アポトーシス)が起こり脱髄を生じることが知られている。MSでは中枢内に浸潤したT細胞、マクロファージ/ミクログリア系の細胞から産生される腫瘍壊死因子(TNF)、リンホトキシン(LT)、インターフェロン $\gamma$ (IFN $\gamma$ )などのサイトカインがOLGを障害すると考えられている。一方細胞内のアポトーシス実行遺伝子としてICE/CED-3ファミリー(現在の呼称はカスパーゼファミリーが一般的であり、以上これに統一)が知られており現在までに14個の遺伝子が同定されている。本実験では主に初代培養系を用いてOLGにカスパーゼファミリーが存在していることを確認し、サイトカイン投与により細胞死が生じる際にカスパーゼファミリーが関与しているかを検討した。

### (方法)

1) まずOLGを用いて実験する前に、使用する化合物が培養系で使用可能かどうかを確認するために、HeLa細胞の一過性発現系を用いて観察した。実験を実施し、機能解析を行った。カスパーゼ遺伝子として*ice*(*caspase-1*), *ich-1*(*caspase-2*), *ich-3*(*caspase-11*)の下流にコードする蛋白質のC末端側に*lacZ*遺伝子由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ蛋白質を連結させた融合蛋白質を発現させるプラスミドを作製し、哺乳類細胞株のHeLa細胞を用いてトランスフェクションによる一過性発現系にてこれらが発現させ、48時間後細胞を固定しX-Gal染色にて染色された細胞の形態により細胞死阻害効果を観察した。次に培養液中にTNF- $\alpha$ (10ng/ml)とシクロヘキシミド(CHX)(10 $\mu$ g/ml)を投与し48時間後にトリパンブルー染色にて生存率を算出した。さらに強力な広範囲のカスパーゼファミリー阻害剤として知られているZ-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB(40 $\mu$ g/ml)を同時に投与し効果を確認した。

2) 胎生18日前後のICRマウス胎児の全納を摘出し、細切した後T-フラスコ中、10%ウシ胎児血清(FBS)を含有したDMEMにて約一週間で飽和細胞密度の状態まで培養した。フラスコを震盪し遊離したOLGの全駆細胞のO-2A細胞のみを回収し、2%FBS含有DMEM培地で培養しO-2A細胞をOLGへと文化させた。

3) OLGからRNAを抽出し*caspase-1*, *-2*, *-3*の特異的なプライマーを用いてRT-PCRを行った。次にHeLa

細胞の要領で培養液中に TNF- $\alpha$  (100ng/ml) を投与しアポトーシスを TUNEL 法で観察した。また TNF- $\alpha$  と caspase-1 様プロテアーゼに特異的なペプチド型阻害剤である Ac-YVAD-CHO (100 $\mu$ M), caspase-3 様プロテアーゼに特異的なペプチド型阻害剤である Ac-DEVD-CHO (100 $\mu$ M), p35 様の特異性を示す阻害剤 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB (40 $\mu$ g/ml) を同時に投与し72時間後に培養皿に付着している OLG の数を計量した。

(結果)

TNF/CHX を HeLa 細胞に投与するとカスパーゼ分子を活性化しアポトーシスが認められ、Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB がこれを抑制した。一方マウス胎児脳から取り出した OLG の全駆細胞を低血清状態で分化させた成熟 OLG に caspase-1, -3 が存在することを RT-PCR 法によって明らかにした。TNF- $\alpha$  を投与後36時間において TUNEL 法によりアポトーシスを認めた。この系に Ac-YVAD-CHO, Ac-DEVD-CHO, Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB を TNF- $\alpha$  と共に投与したところ著明な抑制効果を観察した。しかしセリンプロテアーゼ阻害剤である TLCK, Leupeptin は抑制できなかった。これらの阻害剤の中では Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB が最も効果があり、次に Ac-YVAD-CHO, Ac-DEVD-CHO の順であった。

(考察)

OLG は TNF- $\alpha$  に対して感受性があり、カスパーゼファミリーを介してアポトーシスが誘導されることが示唆された。興味深いことにカスパーゼファミリーの中でも caspase-1 様プロテアーゼ阻害剤を用いた方が caspase-3 様プロテアーゼ阻害剤を用いた場合よりも細胞死抑制効果が強かった。現在のところ細胞死の最終的な実行は caspase-3 系の分子が司ると考えているが、OLG では TNF- $\alpha$  による細胞死において、caspase-1 様プロテアーゼが関与することが示唆された。

## 審査の結果の要旨

本研究は、初代培養系におけるオリゴデンドロサイト (OLG) がサイトカイン TNF- $\alpha$  に対して感受性を有し、アポトーシスが誘導されることを明らかにし、カスパーゼファミリーが関与している可能性が高いことを阻害剤を用いた実験で明らかにしたものである。本研究は、オリゴデンドロサイトの特異的障害によると考えられる多発性硬化症等の脱髄疾患の病態解明や治療法の開発などに応用できる可能性が示されたものとして価値がある。今後の課題は、(1) が脱髄が生じている生体においてオリゴデンドロサイトが実際にアポトーシスを生じていることの証明、(2) caspase の関与が脱髄疾患、殊にオリゴデンドロサイトに対してどの程度関与しているかの検討が必要である。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。