

氏 名 前 野 恵 美

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第542号

学位授与の日付 平成13年3月23日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Roles of Disordered Volume Regulation in Apoptosis

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 重本 隆一  
教授 岡田 泰伸  
教授 永山 國昭  
教授 森 泰生  
教授 宮崎 俊一（東京女子医科大学）

## 論文内容の要旨

A major hallmark of apoptosis is normotonic shrinkage of cells. Here, we studied the relation between apoptotic cell shrinkage and apoptotic cell death. Induction of the apoptotic volume decrease (AVD) under normotonic conditions was found to be coupled to facilitation of the regulatory volume decrease (RVD), which is known to be attained by parallel operation of  $\text{Cl}^-$  and  $\text{K}^+$  channels, under hypotonic conditions. Both the AVD induction and the RVD facilitation were found to precede cytochrome c release, initiator caspase (-8, -9) activation, effector caspase (-3) activation, DNA laddering and ultrastructural alterations in four cell types (human lymphoid U937, epithelial HeLa, rat pheochromocytoma PC12 and mouse neuroblastoma X rat glioma hybrid NG108-15 cells) after apoptotic insults with two distinct apoptosis inducers. Also, the AVD was not prevented by a broad-spectrum caspase inhibitor. When the AVD induction and the RVD facilitation were prevented by blocking volume-regulatory  $\text{Cl}^-$  or  $\text{K}^+$  channels, these cells did not show succeeding apoptotic biochemical and morphological events and were rescued from death. Thus, it is concluded that the AVD, which is caused by disordered cell volume regulation, is an early prerequisite to apoptotic events leading to cell death. It was previously reported that hypertonic stress triggers apoptosis in cell types that lack the regulatory volume increase (RVI). In fact, in  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter -deficient CCL39 cells, which were found to lack the RVI mechanism, hypertonic stimulation was found to induce persistent cell shrinkage without following volume recovery, and then lead to succeeding apoptotic events and cell death. When the RVI ability was conferred by transfection of the gene of NHE1 isoform of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter, this cell line failed to exhibit apoptosis under hypertonic stimulation. Taken together, it is concluded that disordered or altered cell volume regulation is a prerequisite to apoptosis.

## 論文の審査結果の要旨

アポトーシスによる細胞死の主要な特徴のひとつは正常浸透圧条件下での細胞収縮である。しかし細胞死と細胞収縮の間にどのような因果関係が存在するのかは、必ずしも明らかではなかった。前野さんはこの細胞収縮を apoptotic volume decrease (AVD) と呼び、低浸透圧刺激で引き起こされる細胞収縮である regulatory volume decrease (RVD) との関係や、チトクローム C 放出、カスパーゼ活性化、DNA ラダー化、電子顕微鏡的な形態変化などアポトーシスにおける諸反応との関係を様々な方法を駆使して検討した。用いた細胞はリンパ系の U937、上皮系の HeLa、神経系の PC12、NG108-15 であり、アポトーシスを誘導するために用いた刺激は、ミトコンドリア系に作用すると考えられている staurosporine (DTS) と細胞膜の受容体に作用すると考えられる death ligand である Fas ligand と TNF $\alpha$ +CHX である。その結果、以下の点が明らかとなった。1) AVD は、RVD にも関係すると思われる容積感受性 Cl<sup>-</sup> チャネルや K<sup>+</sup> チャネルの特異的な拮抗薬で抑制されることから、これらのチャネルの活性化を介している。2) アポトーシスの過程で起こる諸反応 (チトクローム C 放出、カスパーゼ活性化、DNA ラダー化、電子顕微鏡的な形態変化) や神経細胞死そのものが、前述のチャネル拮抗薬で抑制されることや、これらの諸反応よりも時間的に早く AVD が起こることから、AVD はアポトーシスによる細胞死の前段階における必須要件であると考えられる。3) ミトコンドリアのアニオンチャネル VDAC の活性化の有無やカスパーゼ拮抗薬によって AVD が影響を受けないことから、AVD はこれらに依存しない、より上流の過程であることが明らかとなった。4) アポトーシスの過程にある細胞が高浸透圧刺激で引き起こされる細胞膨張である regulatory volume increase (RVI) を示さないこと、RVI 能を欠損した細胞が高浸透圧刺激によってアポトーシスを引き起こすことから、RVI の異常がアポトーシスに関与していることが明らかとなった。以上の結果は、膨大な実験量と明瞭な実験データおよび論理的な考察に基づいていると認められる。学問的にもアポトーシスによる細胞死にとって、容積感受性 Cl<sup>-</sup> チャネルや K<sup>+</sup> チャネルの関係する AVD および RVI の異常が、かなり初期の段階で重要な役割をもっていることを初めて明確に示したものであり、大変興味深い。既にこれらの結果の一部は一流誌に掲載されており、国際的にも高い評価を得ている。従って委員会は全員一致で本論文が博士の学位論文として相応しいものであると判定した。

博士論文の内容の発表および審査委員5名との間での質疑応答を2時間にわたって実施した。前野さんは多くの質問に対して誠実に応じ、自ら行った実験の意義、結果の解釈、関連分野における所見などを的確に解答した。また、既に国際学術誌にこれらの結果の一部を発表していること、学位論文がわかりやすい英語で書かれていることより語学力も充分であると考えられた。従って、審査委員全員により前野さんは学位授与に相応しい学力があると判定した。