

氏名 (本籍) 澤田元史 (岐阜県)
 学位の種類 博士 (医学)
 学位授与番号 甲第 479 号
 学位授与日付 平成 13 年 7 月 18 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 Mechanisms of apoptosis induced by etoposide (VP-16), a DNA-damaging agent, in glioma cells
 1) Ordering of ceramide formation, caspase activation, and Bax/Bcl-2 expression during etoposide-induced apoptosis in C6 glioma cells
 2) Influence of Bax or Bcl-2 overexpression on the ceramide-dependent apoptotic pathway in glioma cells
 3) p53 regulates ceramide formation by neutral sphingomyelinase through reactive oxygen species in human glioma cells
 審査委員 (主査) 教授 坂井 昇
 (副査) 教授 中島 茂 教授 森 秀樹

論文内容の要旨

難治性悪性グリオーマの新しい治療戦略を開発することは、神経腫瘍学の領域の極めて大きな課題であり、その糸口の1つとしてアポトーシス誘導が考えられる。アポトーシスによる細胞死は個体の発生・分化のみならず、癌や自己免疫疾患をはじめとする各種病態の形成に深く関与することが明らかにされてきた。しかし、FasやTNF- α が細胞外のアポトーシス誘発分子として同定されたのに対して、細胞内の情報伝達メカニズムには不明な点が多い。シグナル分子としてはBcl-2ファミリーとカスパーゼを中心に解析がなされており、Bcl-2ファミリーはミトコンドリアからのチトクロームcの遊離を制御し、カスパーゼ3の活性化を調節していることが明らかにされている。また、セラミド・スフィンゴミエリナーゼ (SMase) 系を中心とした膜脂質シグナリングの関与も注目されており、セラミドが様々なアポトーシス刺激のセカンドメッセンジャーとして機能している可能性が指摘されている。しかし、トポイソメラーゼIIを阻害する抗癌剤エトポシド (VP-16) のように、DNA損傷を惹起しp53を蓄積させる刺激によるアポトーシスシグナルについては不明な点が多い。近年、癌細胞はアポトーシス機構が破綻した細胞としてとらえられており、アポトーシスメカニズムを正常化させることが、癌治療のひとつの選択肢であるとの考えも提唱されている。そこで申請者は本研究において、未だ十分な知見が得られていないグリオーマ細胞のアポトーシスメカニズムを明らかにする目的で、VP-16刺激によるグリオーマ細胞のアポトーシスに伴うシグナル分子p53、セラミド、Bcl-2ファミリー、カスパーゼの変動を詳細に解析し、それらの相互関連について検討した。

論文 1) では、VP-16は濃度および時間依存的にC6ラットグリオーマ細胞のアポトーシスを誘導し、Hoechst 33258染色による核の形態変化および染色体DNAの断片化 (DNAラダー) が認められた。VP-16添加早期からスフィンゴミエリン量は減少し、中性SMaseを介したセラミド産生が見られた。また、Bcl-2ファミリーの中でもアポトーシス抑制性のBcl-2はmRNAおよびタンパク質レベルで経時的に減少したが、逆にアポトーシスを促進するBax mRNAおよびタンパク質は増加し、Bax/Bcl-2比は上昇した。さらに、ミトコンドリアからのチトクロームcの遊離とカスパーゼ9、3の活性化が認められた。そこで、セラミド、Bcl-2ファミリー、カスパーゼの相互関連を解析するため、カスパーゼ阻害剤および中性SMaseを阻害しセラミドの細胞内含量を減少させるGSH (reduced glutathione) やNAC (N-acetylcysteine)、逆にセラミド代謝を抑制しセラミド量を増加させるグルコシルトランスフェラーゼ阻害剤PDMP (D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol) の効果を検討した。カスパーゼ阻害剤は細胞死を抑制したが、セラミド産生、Bax/Bcl-2比の変動は影響を受けなかった。一方、GSH、NAC、PDMPにより細胞内セラミド量を変動させると、Bax/Bcl-2比の上昇、チトクロ-

μcの逸脱およびカスパーゼ3の活性化と正の相関関係が認められた。したがって、グリオーマ細胞のVP-16によるアポトーシスのメカニズムとして、中性SMase活性化→セラミド産生→Bax/Bcl-2比の上昇→チトクロームcの逸脱→カスパーゼ9, 3活性化のカスケードが存在し、VP-16によるアポトーシス誘導においてセラミドは重要な制御因子として機能していることが推測された。

論文 2) では、Bcl-2ファミリーのセラミドシグナル系への効果を検討した。Bax過剰発現細胞では一過性、恒常性の発現型に関わらず、セラミド産生は影響を受けないが、カスパーゼ9, 3活性化は増強されアポトーシスは亢進した。一方、Bcl-2あるいはBcl-xL過剰発現細胞では、発現量に依存してカスパーゼ活性化および細胞死が抑制され、高発現細胞ではセラミド産生の抑制も見られた。

論文 3) では、DNA損傷により細胞内に蓄積するp53とセラミドシグナル系の関連について解析した。U-87 MGヒトグリオーマ細胞でもVP-16刺激によりC6細胞と同様のアポトーシスカスケードが作動し、p53の蓄積が見られた。ヒトパピローマウィルス (HPV)16型のE6タンパク質はp53のユビキチン化を促進し、p53はプロテアソーム系により分解を受ける。U-87 MG細胞にHPV16 E6遺伝子を導入すると、VP-16によるp53の蓄積は見られず、中性SMase活性化およびセラミド産生は抑制され、アポトーシス細胞は減少した。また、VP-16刺激により活性酸素種 (ROS) が産生されるが、ROSの産生もHPV E6により著明に抑制された。これらの変化は変異型HPV E6では認められなかった。一方、変異型p53を発現しているU-373 MGヒトグリオーマ細胞に活性型p53を導入すると、ROS産生を介した中性SMase活性化とセラミド産生が認められた。さらに、ROSの中ではスーパーオキシド (O₂⁻) が中性SMase活性化と密接に関連していることが明らかとなった。

以上の結果から、グリオーマ細胞のVP-16によるアポトーシスにおいて、DNA損傷の結果蓄積するp53がセラミドおよびカスパーゼ系の活性化を調節していることが明らかとなった。すなわち、グリオーマ細胞のVP-16によるアポトーシスでは、トポイソメラーゼII阻害によるDNA損傷→p53蓄積→ROS産生→中性SMase活性化→セラミド産生→Bax/Bcl-2比の上昇→チトクロームcの逸脱→カスパーゼ9, 3活性化のカスケードが作動している。また、Bcl-2, Bcl-xLによるアポトーシスの抑制は一部セラミド産生阻害に起因すること、Baxはセラミド産生を介することなくアポトーシスを亢進させることが明らかとなった。セラミド産生量に比例してアポトーシス細胞数が増加することから、セラミド産生はVP-16によるアポトーシス誘導の重要な引き金反応の一つであると考えられた。さらに、ROSあるいはセラミドの産生を調節することにより、アポトーシスが制御できる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 澤田元史は、抗癌剤エトポシド (VP-16) によるグリオーマ細胞のアポトーシスシグナルを解析し、トポイソメラーゼIIの阻害によるDNA損傷の結果蓄積したp53がROS産生を誘起し、その下流でROS→中性SMase活性化→セラミド産生→Bax/Bcl-2比の上昇→ミトコンドリアからのチトクロームcの逸脱→カスパーゼ9, 3活性化のカスケードが作動することを明らかにした。

この研究は、グリオーマ細胞のアポトーシスシグナルに新しい知見をもたらす、脳神経外科および神経腫瘍学の発展に少なからず寄与するものと認められる。

[主論文公表誌]

Mechanisms of apoptosis induced by etoposide (VP-16), a DNA-damaging agent, in glioma cells

1) Ordering of ceramide formation, caspase activation, and Bax/Bcl-2 expression during etoposide-induced apoptosis in C6 glioma cells

2000年 Cell Death and Differentiation 7: 761-772

2) Influence of Bax or Bcl-2 overexpression on the ceramide-dependent apoptotic pathway in glioma cells

2000年 Oncogene 19: 3508-3520

3) p53 regulates ceramide formation by neutral sphingomyelinase through reactive oxygen species in human glioma cells

2001年 Oncogene 20: 1368-1378