

医研第314号

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Downregulation of citrin, a mitochondrial AGC, is associated
with apoptosis of hepatocytes

(ミトコンドリアのアスパラギン酸・グルタミン酸輸送体シトリンの発現抑制は
肝細胞のアポトーシスと関連する)

氏 名 澤田 茂樹 

論 文 要 旨

【 背 景 と 目 的 】

シトリンはミトコンドリア内膜に局在するアスパラギン酸・グルタミン酸輸送体

(aspartate-glutamate carrier : AGC) であり、主に肝臓で発現する。シトリン欠損症は、常染色体劣性の遺伝形式を示し、新生児肝内胆汁うっ滞症や成人発症Ⅱ型シトルリン血症 (adult-onset type Ⅱ citrullinemia : CTLN2) を引き起こす。シトリンをコードする SLC25A13 遺伝子の突然変異が原因である。シトリン欠損症では AGC の機能不全により、中性脂肪が合成され、脂肪肝を形成するが、今回、CTLN2 症例の剖検所見として肝細胞にアポトーシスが起きていることを見いだした。本研究の目的は、シトリンの肝細胞における生理学的意義の解明である。

【 方 法 】

ヒト正常肝および、肝癌細胞株 SK-Hep-1、HuH-7、PLC/PRF/5、Hep3B、HepG2、SNU-423、SNU-449 を用いた。アポトーシスは TUNEL 法で検出し、細胞生存率

の解析には WST-8 法を用いた。シトリンのタンパク質レベルでの発現は単クローン抗体を用いた免疫組織染色とウェスタンブロット法にて、また mRNA レベルでの発現は RT-PCR 法にて解析した。シトリン遺伝子のノックダウンは U6 プロモーターの下流にヘアピン shRNA を合成するプラスミド DNA の電気穿孔法による導入により行った。カスパーゼ -3/7、-9 のプロテアーゼ活性は基質の分解物の定量にて、またカスパーゼ -3 の分解やカスパーゼ -3 の基質である PARP の分解はウェスタンブロット法にて調べた。ミトコンドリアの膜間領域に存在するチトクローム c の放出や Bcl ファミリータンパク質の発現もウェスタンブロット法を用いて解析した。

【 結 果 】

CTLN2 症例の肝における脂肪蓄積と線維化に加えて、肝細胞のアポトーシスを新たに見いだした。本症例ではシトリンタンパク質の発現が認められず、一方、正常肝およびすべての

肝癌細胞株にシトリン mRNA およびタンパク質の発現を認めた。Hep3B 細胞におけるシトリンのノックダウンは細胞生存率の低下とアポトーシスを誘導した。また、カスパーゼ -3/7 および -9 の活性化とミトコンドリアからのチトクローム c の放出も確認された。さらに、シトリンのノックダウンは Bcl-2 ファミリータンパク質の中でもミトコンドリア外膜の透過性の亢進に必須でありアポトーシスを促進する Bax および Bak タンパク質の発現増強とミトコンドリアの膜透過性を抑制し、アポトーシスを抑止する Bcl-2 や Bcl-xL タンパク質の発現低下を誘導した。

【 結 論 】

肝細胞のミトコンドリア内膜に局在するシトリンは AGC としての機能に加えて、ミトコンドリアの膜透過性を制御することにより肝細胞の生存維持にも関与していることが示唆された。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	* 課程博 論文博	第 号	氏 名	澤田 茂樹
論文審査委員		審査日	平成 20 年 1 月 28 日	
		主査教授	高山 千利	
		副査教授	西 巻 正	
		副査教授	松 崎 吾朗	
(論 文 題 目)				
Downregulation of citrin, a mitochondrial AGC, is associated with apoptosis of hepatocytes				
(論文審査結果の要旨)				
上記論文に関して、研究にいたる背景と目的、研究内容、および研究成果の意義と学術的水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。				
1. 研究の背景と目的				
シトリンはミトコンドリア内膜に局在するアスパラギン酸・グルタミン酸輸送体 (aspartate-glutamate carrier : AGC) であり、主に肝臓で発現する。シトリン欠損症は、常染色体劣性の遺伝形式を示し、新生児肝内胆汁うっ滞症や成人発症 II 型シトルリン血症 (adult-onset type II citrullinemia : CTLN2) を引き起こす。シトリンをコードする SLC25A13 遺伝子の突然変異が原因である。シトリン欠損症では AGC の機能不全により、中性脂肪が合成され、脂肪肝を形成するが、今回、CTLN2 症例の剖検所見として肝細胞にアポトーシスが起きていることを見いだした。本研究の目的は、シトリンの肝細胞における生理学的意義の解明である。				
2. 研究内容				
ヒト正常肝および、肝癌細胞株 SK-Hep-1、HuH-7、PLC/PRF/5、Hep3B、HepG2、SNU-423、SNU-449 を用いた。アポトーシスは TUNEL 法で検出し、細胞生存率の解析には WST-8 法を用いた。シトリンのタンパク質レベルでの発現は単クローン抗体を用いた免疫組織染色とウェスタンブロット法にて、また mRNA レベルでの発現は RT-PCR 法にて解析した。シトリン遺伝子のノックダウンは U6 プロモーターの下流にヘアピン shRNA を合成するプラスミド DNA の電気穿孔法による導入により行った。カスパーゼ-3/7、-9 のプロテアーゼ活性は基質の分解物の定量にて、またカスパーゼ-3 の分解やカスパーゼ-3 の基質である PARP の分解はウェスタンブロット法にて調べた。ミトコンドリアの膜間領域に存在するチトクローム c の放出や Bcl-2 ファミリータンパク質の発現もウェスタンブロット法を用いて解析した。				

研究結果を以下に示す。

CTLN2 症例の肝における脂肪蓄積と線維化に加えて、肝細胞のアポトーシスを新たに見いだした。本症例ではシトリンタンパク質の発現が認められず、一方、正常肝およびすべての肝癌細胞株にシトリン mRNA およびタンパク質の発現を認めた。Hep3B 細胞におけるシトリンのノックダウンは細胞生存率の低下とアポトーシスを誘導した。また、カスパーゼ-3/7 および-9 の活性化とミトコンドリアからのチトクローム c の放出も確認された。さらに、シトリンのノックダウンは Bcl-2 ファミリータンパク質の中でもミトコンドリア外膜の透過性の亢進に必須でありアポトーシスを促進する Bax および Bak タンパク質の発現増強とミトコンドリアの膜透過性を抑制し、アポトーシスを抑止する Bcl-2 や Bcl-xL タンパク質の発現低下を誘導した。

3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究は、肝細胞のミトコンドリア内膜に局在するシトリンが AGC としての機能に加えて、ミトコンドリアの膜透過性を制御することにより肝細胞の生存維持にも関与していることを示唆した初めての報告である。今後はシトリンノックアウトマウスを用いた解析も予定しており、今回の論文成果をさらに確証する結果が期待される。

本研究は、肝細胞の生存維持の解明の上で重要な研究であり、かつ、その研究は国際的にも認められた高水準のものであると評価された。

以上により、本論文は学位授与に十分値するものであると判断した。

- 備 考
- 1 用紙の規格は、A4 とし縦にして左横書きとすること。
 - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。