

本研究は、酸化ストレスにおける細胞死において重要な役割を演じていると考えられる、リン酸化酵素である c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化の時系列変化を 1 細胞レベルで明らかにするため、JNK の活性化を表す FRET プローブを安定的に発現する HT22 細胞株を作成して、HT22 細胞が酸化ストレスをうけて、細胞死に至る過程での JNK の活性化を可視化・定量化を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. HT22 細胞は、継続的に細胞運動を行い、移動距離が長いいため、画像を撮影し、手動で関心領域を囲むだけでは定量化はできない。動く細胞を自動的に追跡し解析をするプログラムを開発し、それをを用いて 1 細胞ごとに定量化を行っている。動く分裂細胞の自動トラッキング・自動 FRET 計測を樹立したことは、本研究のメソッドの優位性の重要なポイントであり、このメソッド樹立は、成果の柱の一つである。
2. JNK FRET プローブを発現する HT22 細胞において、細胞死を誘導するアニソマイシンで刺激すると FRET 効率上昇し、その上昇は JNK の阻害剤で選択的に抑制され、本プローブは、JNK の活性化を反映していることが示された。アクセプター・ドナーの同時蛍光測定、ならびに acceptor photo bleaching 時の donor de-quenching の実証を行い、2つの蛍光団の間の FRET 現象を反映していることが示された。
3. HT22 細胞にグルタミン酸を負荷した場合に、酸化ストレスによる細胞死が生じる。その過程において、JNK の活性化が、細胞死直前と刺激後早期という二つの時間変動でおきていた。刺激後早期の JNK の活性化は、グルタミン酸 3 mM 刺激した時の半数の細胞において観察された。この早期の JNK の活性化は、従来の集団でのウェスタンブロット法では、観察できない現象であり、ライブイメージで、初めて示すことができた。低濃度のグルタミン酸刺激時、治療薬である MC186 投与時には JNK の活性化は可逆的であることが示された。
4. JNK の阻害剤 Inhibitor VIII を投与したところ、早期の JNK の活性化が阻害され、それに伴い細胞死抑制効果がみられ、生存率は 13.5% から 75.0% まで改善した。JNK の阻害剤の細胞死抑制効果は、阻害剤の容量依存的であることも示された。

以上、本論文は、JNK の FRET プローブを安定的に発現する HT22 細胞において、JNK の活性化を可視化、定量化し、JNK の活性化が細胞死の直前のみでなく、酸化ストレスの早期においても活性化が生じ、それには可逆性があることが示された。JNK の活性化を阻害することにより細胞死抑制されることも示された。本研究は、酸化ストレスのプロセスにおける細胞の生死の運命決定において、JNK の活性化の役割を示し、今後の治療法開発へ貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。