

受賞者

清水 重臣

東京医科歯科大学難治疾患研究所病態細胞生物学分野

研究テーマ

オートファジー細胞死の変調による発癌機構の解析とこれを基盤とした癌治療法の開発

1、はじめに

個体発生過程で観察される生理的なプログラム細胞死は、形態学的にアポトーシス(タイプ1細胞死)、オートファジーを伴う細胞死(タイプ2細胞死)、細胞内小器官の膨潤と小胞の出現を伴うガリソゾームの関与がない細胞死(タイプ3細胞死)に分類されてきた。アポトーシスに関しては、分子機構の全体像やその生理的意義が解明されつつある一方、タイプ2、タイプ3細胞死に関する知見は現在までほとんど明らかにされていない。オートファジーは、ユビキチンプロテアソーム系と並立するバルクな蛋白質分解系であり、日常的な蛋白質代謝や飢餓応答時のアミノ酸供給などを行なう生存に必須な細胞機能である。一方、細胞に強いストレス(DNA傷害等)が加わった際には、オートファジーは無秩序に亢進し細胞死が誘導される。オートファジーの基本的プロセスやこれに関与する遺伝子(ATG5をはじめとする約30種類の蛋白質)は既に同定されており、その生理的、病理的役割に関する知見は蓄積されつつある^{1,2)}。一方、オートファジー細胞死に関しては、我々がその存在を報告³⁾して以来、関連論文が多数提出され、その生理的、病理的役割、ならびに細胞死の実行メカニズムは着目を集めている。今回は、発癌メカニズムとオートファジー細胞死との関連を検討した。

2、方法

細胞培養 マウス胎仔線維芽(MEF)細胞は野生型B6マウスの胎生14.5日より調整し、SV40T抗原を導入して不死化した。MEF細胞とHeLa細胞はDMEMメディウムにて培養した。Bcl-xL過剰発現MEF細胞は、不死化したMEF細胞にpCAGGS-Bcl-xLをAmaraにて遺伝子導入し、恒常的にBcl-xLを発現する細胞を回収した。Bcl-xL過剰発現HeLa細胞は、HeLa細胞にpCAGGS-Bcl-xLをリポフェクションにて遺伝子導入し、恒常的にBcl-xLを発現する細胞を回収した。

細胞死測定法 細胞死の測定は、Annexin-V染色法、propidiumiodide (PI) 染色法、CellTiterBlue (CTB) 測定法にて行なった。3.5x10⁶個の細胞を6wellの培養皿に撒き、24時間後にエトポシド(20 μ M)を、3-メチルアデニン(10mM)、SP600125(1 μ M)等と同時に添加し、24時間後の細胞死の多寡を測定した。Annexin-V染色法では、Cy3ラベルしたAnnexin-Vを細胞に添加し5分後にフローサイトメーターを用いてAnnexin-V-Cy3陽性細胞数を測定した。PI染色法では、PIを細胞に添加し5分後にフローサイトメーターを用いてPI陽性細胞数を測定した。CTB測定法では、CTB溶液を細胞に添加し1時間後に蛍光マイクロプレートリーダーを用いて細胞生存率を測定した。

3、結果

1、がん細胞におけるオートファジー細胞死の検討

多くの細胞では様々なストレスを加える事によりアポトーシスが誘導される。この為、オートファジー細胞死の多寡を正確に測定することはできない。我々は生体から取り出した初代培養細胞とがん細胞におけるオートファジー細胞死に対する感受性の差異を正確に求める為に、マウス胎仔線維芽細胞

胞(mouse fibroblast cell:MEF細胞) (初代培養細胞の代表) とHeLa細胞 (がん細胞の代表) に充分量の抗アポトーシス分子Bcl-xLを導入することによって、アポトーシス抵抗細胞を作出した。次に我々はCellTiterBlue測定法 (CTB測定法) (細胞の生死を細胞質におけるCTB試薬の還元状態で測定する) によって細胞死の多寡を評価した。MEF細胞にBcl-xLを発現した細胞をエトポシドにて24時間処理した後にCTB測定法にて生存率を測定すると、58%に低下していた (図1A)。本細胞はannexinV染色やPI染色に陰性であることから、アポトーシスではなく別の様式の細胞死にて死に至っているものと考えられた。実際にアポトーシスの必須要件であるカスパーズの活性化は観察されず、またカスパーズの阻害剤によって細胞死が緩和される事も無かった。一方で、この細胞死はオートファジーの阻害剤である3-メチルアデニンによって顕著に抑制されたことから、オートファジー細胞死にてMEF細胞が死に至っているものと考えられた。実際に電子顕微鏡にて多くのオートファジーが観察されている。

一方、がん細胞であるHeLa細胞にBcl-xLを発現させた細胞においては、CTB測定法においても生存率の低下は観察されず、この為、3-メチルアデニンの投与効果もみられなかった (図1B)。これらの結果

より、初代培養細胞においてはアポトーシスの抑制によりオートファジー細胞死が観察されるのに対し、がん細胞ではアポトーシスを抑制してもオートファジー細胞死は観察されないものと思われた。この結果は、細胞の種類を変えても同様であった。

図1

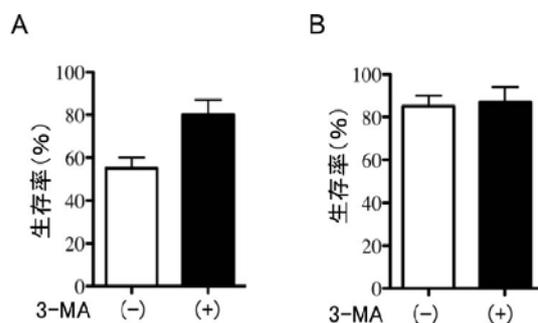


図1 アポトーシス抵抗性HeLa 細胞におけるオートファジー細胞死の非誘導

Bcl-xL を過剰発現させたMEF 細胞(A)とBcl-xL を過剰発現させたHeLa 細胞(B)に抗癌剤エトポシド(20 μ M)を投与し、24 時間後の細胞生存率をCTB 測定法を用いて測定した。エトポシドと同時にオートファジー阻害剤である3-MA(10 mM)を添加した。

2、オートファジー細胞死におけるJNKの関与

さらに、オートファジー細胞死に関連する分子を探索する為に、種々の細胞機能を抑制する阻害剤を添加して、その反応を観察したところ、JNK阻害剤であるSP600125の添加によってオートファジー

図2

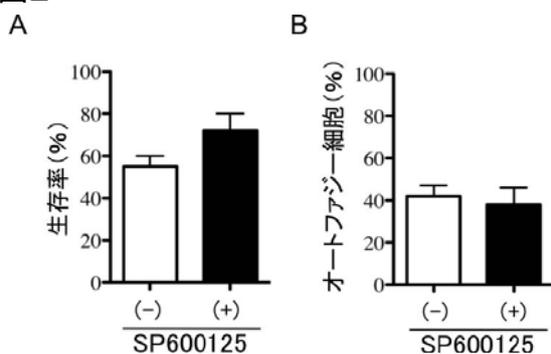


図2 アポトーシス抵抗性MEF 細胞のオートファジー細胞死におけるJNK の関与

Bcl-xL を過剰発現させたMEF 細胞に抗癌剤エトポシド(20 μ M)を投与し、24 時間後の細胞生存率(CTB 測定法)(A)とオートファジー細胞数(蛍光顕微鏡)(B)を用いて測定した。エトポシド投与と同時にJNK 阻害剤であるSP600125(10 μ M)を添加した。

細胞死が有意に観察される事を見出した。即ち、MEF/Bcl-xL細胞にエトポシドと同時にSP600125を添

加し24時間後の細胞死の多寡を、CTB測定法を用いて検討すると、図2に示すように細胞死は大きく抑制されたのである。一方、SP600125投与によるオートファジーの程度には変化は見られなかった。これらの結果は、オートファジーからオートファジー細胞死が誘導される過程でJNKの活性化が重要な役割を担っている事を示している。現在、さらにがん細胞におけるJNK活性化の多寡を検討しているところである。

考察

オートファジーと発癌の関連に関しては、①オートファジー調節分子であるタイプ1PI3キナーゼが発癌に関与していること、②オートファジー実行分子であるBeclin1のヘテロノックアウトマウスにおいて発癌率が異常に高いこと4)、等の事実により、その関連は強く示唆されている。しかしながら、オートファジーと発癌の関連を説明するメカニズムに関しては、2つの考え方が並立している。一つは、オートファジーにより排除されるべき変異ペルオキシソームなどから過剰の酸化ストレスが発生しDNAの変異率が上昇するという説（生に貢献するオートファジーの異常による発癌）であり、もう一つは、オートファジー細胞死が誘導されずに、本来死ぬべき細胞が生存し発癌に至るという説（オートファジー細胞死の異常による発癌）である。しかしながら、本稿に記した実験によって、癌細胞においては、生に貢献するオートファジーは正常に誘導されるのに対し、オートファジー細胞死が誘導されにくい事が明らかとなった。この為、癌細胞においてはオートファジーの誘導からオートファジー細胞死の実行に至る経路に障害がある事が考えられた。

さらに、オートファジー誘導の下流でオートファジー細胞死の実行に至る機構に関連する分子を探したところ、JNKの関与が示唆された。JNKの異常と発癌との関連に関しては様々な報告があるが、その一因にはオートファジー細胞死が関わっているものと考えられた。

謝辞

病態代謝研究会より助成頂きましたことにより、上記研究を推進することが可能となりました。ここに厚く御礼申し上げます。なお、本論文は現在投稿準備中です。

文献

- 1) Mizushima N, et al: Cell Struct. Funct. (2002) 27: 421-429
- 2) Levine B, et al: Dev. Cell (2004) 6: 463-477
- 3) Shimizu S, et al: Nature Cell Biol. (2004) 6: 1221-1228
- 4) Qu, X. et al. : J. Clin. Invest. (2003) 112: 1809-1820.