

論文題目「ヒト単芽球様細胞株 U937 における細胞分化に伴ったアポトーシス感受性の変化」

指導教官 大海 忍 助教授

東京大学大学院医学系研究科

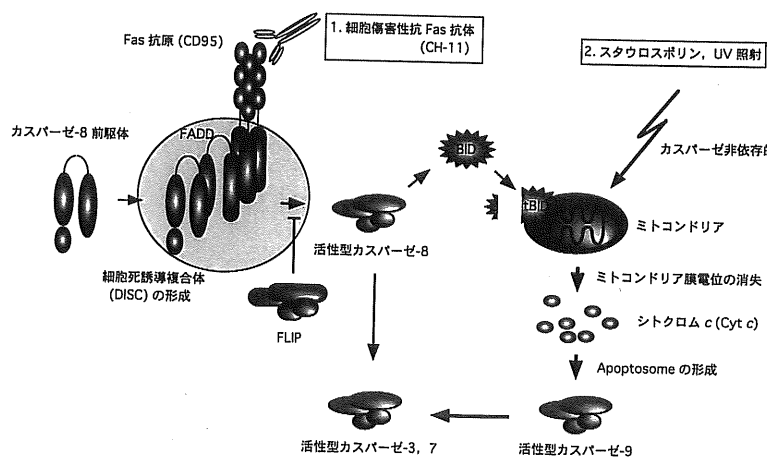
平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 新倉 雄一

アポトーシスは細胞死の一つの形態であり、細胞増殖、分化と同様、正常な個体の発生やその維持において重要な役割を担っている。アポトーシスを起こしている細胞ではカスパーゼと呼ばれる一群のシステインプロテアーゼの活性化が認められ、種々の基質を切断することにより細胞死を実行する。哺乳動物におけるアポトーシス誘導には

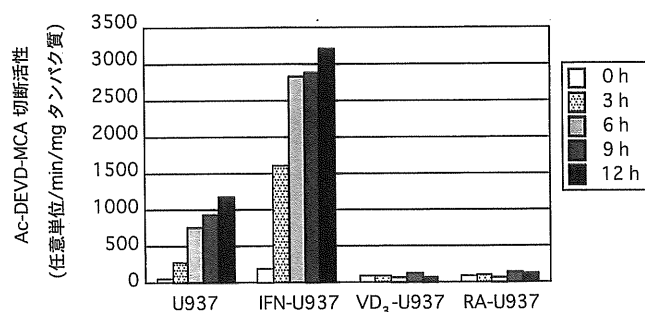


は二つの経路が存在する。一つは Fas など
に代表される細胞表面受容体を介する経路で、
もう一つはミトコンドリアを介した経路である（左図参照）。どちらの経路においても、
細胞内外からの細胞死誘導シグナルはカスパーゼ活性化という細胞死シグナルへと変換、
増幅されて細胞死を実行する。Fas リガンド
や細胞傷害性抗 Fas 抗体により Fas が刺激

されると、Fas の重合に伴って細胞死誘導複合体 (DISC) が形成される。DISC は Fas, カスパーゼ-8 およびアダプター分子 FADD から構成されている。DISC 上で自己切断、活性化したカスパーゼ-8 は、下流のカスパーゼ-3, 7 を切断、活性化する。一方、UV 照射、薬剤処理などのストレスに曝露された細胞では、ミトコンドリアの膜電位消失に伴ったシトクロム c 漏出が認められる。シトクロム c は dATP, アダプター分子 Apaf-1 と共に Apoptosome と呼ばれる複合体を形成する。同複合体上で自己切断、活性化したカスパーゼ-9 は、下流のカスパーゼ-3, 7 を切断、活性化する。また、ある種の細胞では Fas を介したアポトーシスの際、このミトコンドリアを介したカスパーゼ活性化を主要な経路としている。こうした細胞ではカスパーゼ-8 による BID の切断が細胞死実行に必要である。切断された BID (tBID) はミトコンドリアへ移行し、膜電位消失、シトクロム c 漏出を誘導する。

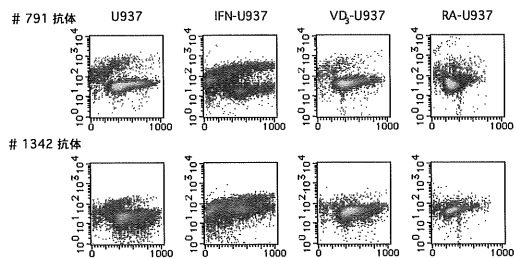
ヒト単芽球様細胞 U937 はインターフェロン・ガンマ (IFN), 活性型ビタミン D₃ (VD₃) および全トランスレチノイン酸 (RA) 処理により CD11b 陽性の単球・マクロファージ様細胞へ分化することから, 食細胞分化のモデル細胞として広く用いられている。以前当研究室において, これら分化した細胞が Fas を介したアポトーシスに対して異なる感受性を示すことが見出された (Kikuchi et al., *J Leuc Biol.* 60, 778-783)。つまり, IFN 処理細胞 (IFN-U937) は未分化細胞に比べて高感受性を示したのに対し, VD₃ および RA 処理細胞 (それぞれ VD₃-U937, RA-U937) は耐性を獲得していた。末梢血単球由来マクロファージも Fas を介したアポトーシスに対して耐性を示すことが後に報告されており, U937 に特異的な表現型でないことが明らかとなっている。本研究では U937 の食細胞分化に伴った Fas 刺激に対する感受性変化のメカニズム解明を目指して解析を行った。

これまでアポトーシスの指標としてアポトーシス細胞に特徴的な形態変化を用いてきたが, 本研究では細胞死実行に関与するカスパーゼの活性化を指標に解析を進めた。未分化 U937 は, 細胞傷害性抗 Fas 抗体 (CH-11) 処理によりアポトーシスを起こす。その細胞抽出液には活性化したカスパーゼが存在するため, 蛍光基質 (Ac-DEVD-MCA) の切断に伴った蛍光強度増大が認められる。IFN-U937 においてはカスパーゼ活性化が未分化細胞に比べて顕著に増大していたが, Fas 耐性を示す VD₃- および RA-U937 においては全く検出されなかった (左図参照)。イムノプロットによる解析からも, 活性化を伴うカスパーゼ-3, 7, 8 のプロセッシングおよびそれに伴った基質



poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), BID の切断がアポトーシス細胞において検出された。一方, Fas 耐性細胞では一切, 認められなかった。以上の結果より, 細胞分化に伴った U937 の Fas 感受性の変化は, カスパーゼ活性化のレベルで起きていることが明らかとなった。

Fas 耐性を示す数多くの細胞において, FLIP の発現量増大が認められる。FLIP はカスパーゼ-8 に類似した構造を持つが, プロテアーゼ活性を有しないため, 内在性ドミナントネガティブとして機能している。FLIP 自身は DISC 上でのカスパーゼ-8 活性化を促進するが, その際に生じる切断断片は近傍で新たに起こるカスパーゼ-8 活性化を阻害する。したがって, 発現量増大による Fas 耐性化は, DISC 上での切断断片の蓄積によるものである。VD₃ 処理による FLIP 発現量増大は一過性であったのに対し, RA 処理では定常的に FLIP 発現量増大が認められ Fas 耐性化への FLIP の関与が期待された。そこで FLIP の機能解析を目指し, FLIP 切断部位特異抗体 (#1342-Ab) を作成した。同抗体はカスパーゼ-8 による切断で生じた FLIP 断片の切断末端を特異的に認識する抗体である。また, カスパーゼ-8 自己切断末端に対する特異抗体も作成した (#791-Ab)。同抗体の切断部位特異性は, 種々の合成ペプチドを用いた ELISA, および組み換えタンパク質, 細胞抽出液を用いたイムノプロットにより確認されている。同抗体をフローサイトメトリーへ応用することにより, 各細胞におけるカスパーゼ-8 のプロセッシングおよび FLIP の



分化誘導した各細胞へCH-11を添加してアポトーシスを誘導した。作成した切断部位特異抗体を用いて、カスパーゼ-8およびFLIPの切断を経時的にフローサイトメトリーにより解析した。縦軸は切断に呼応したFITCによる蛍光強度、横軸はPI染色によるDNAの状態を示す。

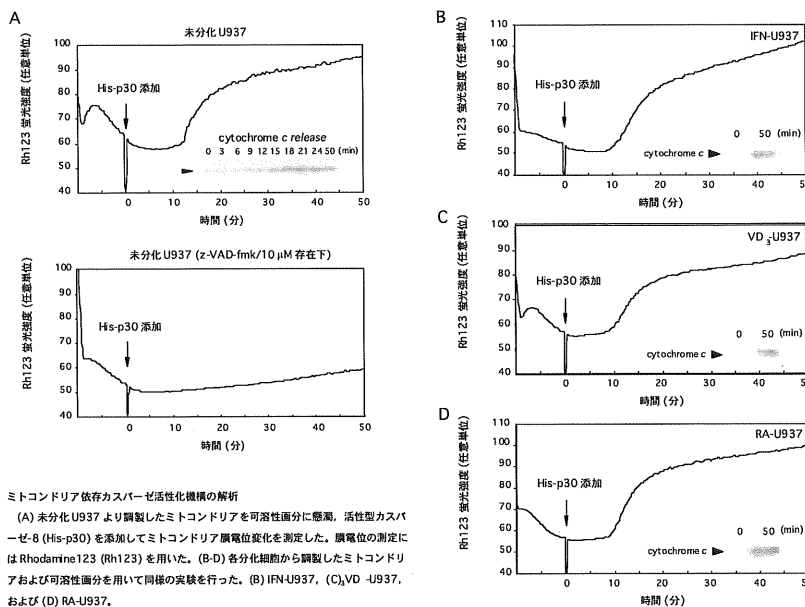
切断の度合いや切断の認められた細胞の割合に関する情報を得ることができた (Niikura et al., *J Biochem.* 132, 53-62)。興味深いことに、切断の認められた細胞における縦軸の蛍光強度の増大 (抗体結合量に呼応) は、Fas 感受性に関わらず一定であった。これは細胞当たりの切断断片量が同じであることを示しており、細胞内シグナルの強度が同程度であることを示唆するものであった (左図参照)。VD₃- および RA-U937 におい

て認められたカスパーゼ-8 切断陽性細胞はごく僅かであり、これら Fas 耐性細胞では DISC 上でのカスパーゼ活性化が全く起きていない、もしくはその後のミトコンドリアを介したシグナル増幅が行われていないと推測された。

また、FLIP 切断も一部の細胞にしか検出されず、Fas 耐性化への FLIP の関与は認められなかった。

前述の通り、Fas 刺激初期のカスパーゼ-8 活性化が微弱であった場合、細胞死を実行するのにシグナルを増幅する必要がある。U937 における DISC は非常に不安定であり、そこで活性化されるカスパーゼ-8 はごく僅かである。

したがって、ミトコンドリア経路は DISC 形成と同様、U937 の Fas 感受性に大きな影響を及ぼす。その経路は

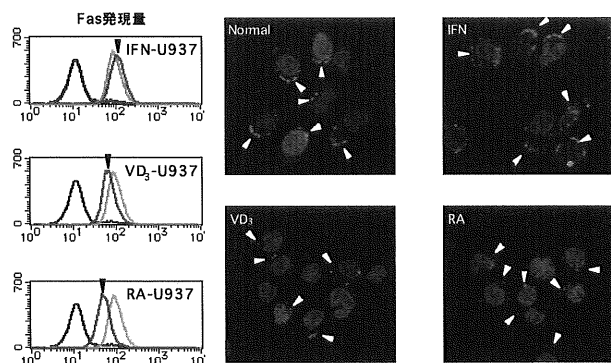


ミトコンドリア依存カスパーゼ活性化機構の解析
(A) 未分化 U937 より調製したミトコンドリアを可溶性画分に懸濁、活性化型カスパーゼ-8 (His-p30) を添加してミトコンドリア膜電位変化を測定した。膜電位の測定には Rhodamine 123 (Rh123) を用いた。(B-D) 各分化細胞から調製したミトコンドリアおよび可溶性画分を用いて同様の実験を行った。(B) IFN-U937, (C) VD₃-U937, および (D) RA-U937。

単離したミトコンドリアを細胞質画分に懸濁、活性化したカスパーゼ-8 (His-p30) を添加することにより *in vitro* で再現することができ、His-p30 添加に伴ったミトコンドリア膜電位の消失、およびシトクロム c の漏出が観察される (左図参照)。Rhodamine123 (Rh123) は膜電位依存的に取り込まれる蛍光色素で、膜電位消失に伴いミトコンドリアから漏出する (蛍光強度増大)。

これはカスパーゼ阻害剤 (z-VAD-fmk) により抑制され、カスパーゼ-8 活性化に依存した現象であることが確認された。分化誘導した各細胞より単離したミトコンドリアを用いて解析した結果、いずれのミトコンドリアもカスパーゼ-8 活性化に反応してシトクロム c 漏出する機能を保持していた。シトクロム c 漏出後に起こる Apoptosome を介したカスパーゼ活性化もいずれのサンプルにおいて同程度検出されたことから、各分化細胞においてミトコンドリア経路が機能していることが直接的に明らかとなった。これは Fas 刺激初期にカスパーゼ-8 が活性化されれば、ミトコンドリア経路を通じて同じようにシグナルは増幅され、細胞死が実行されることを示唆するものであった。

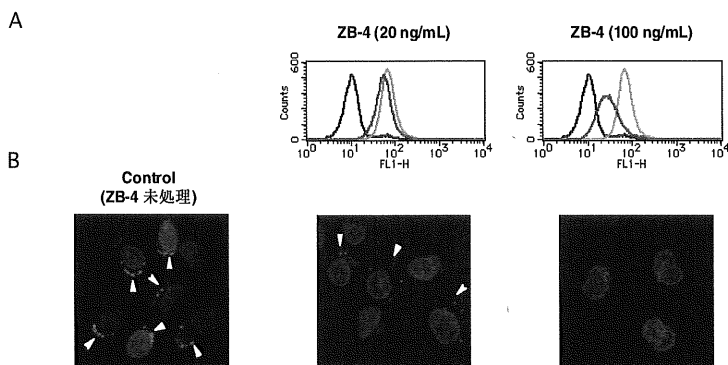
ここまでの実験より、細胞分化に伴った Fas 感受性の変化がミトコンドリアを介したシグナル増幅経路の変化によるものでないことが明らかとなっている。そこでシグナルの入口である Fas の解析を行った。Fas 感受性変化と対応するように IFN-U937 においては Fas 発現量の増大が、一方 Fas 耐性を示す VD₃- および RA-U937 では



発現量の減少が認められた (左図参照)。Fas 刺激に伴った Fas の重合の解析を試みたところ、未分化および IFN-U937 において Fas 重合による点状の蛍光が細胞表面で認められた。一方、VD₃- および RA-U937 においては Fas 重合が減弱していた (左図参照)。

ZB-4 は非細胞傷害性抗 Fas 抗体であり、CH-11 の Fas への結合を阻害する中和抗体として用いられている。

したがって、ZB-4 で段階的に Fas を中和することで、CH-11 が結合しうる Fas の数を制御することができる。そこで VD₃- および RA-U937 における Fas 発現量 (CH-11 結合量) と比較しながら、CH-11 結合量の変化が Fas 重合に及ぼす影響を検討した (右図参照)。その結果、ZB-4 (20 ng/mL) 処理細胞 (VD₃-U937 に相当) において Fas の重合が顕著に抑制され、Fas 耐性細胞における重合の減弱が Fas 発現量減少によるものであることが明らかとなった。

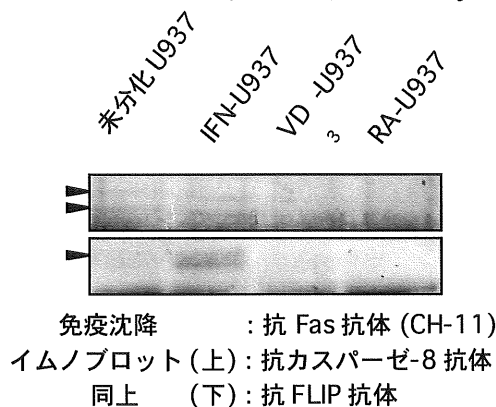


ZB-4 による Fas 発現量および Fas 重合の制御
(A) ZB-4 の使用濃度 (20, 100 ng/mL) を変えることにより、CH-11 が結合できる Fas の数 (見かけの Fas 発現量) を制御した。ZB-4 前処理は培養条件下で 1 時間行った。横軸は Fas 発現量に反応した FITC による蛍光強度を示す。青はコントロール、緑は未処理細胞、赤は ZB-4 処理細胞を示す。(B) 各細胞を CH-11 にて刺激し、Fas 重合を誘導した。矢印は Fas の重合が認められた細胞を示す。核は TO・PRO 3 (blue) にて染色した。

最後に Fas 直下のシグナリングを解析するため、各分化細胞からの DISC 単離を試みた。その結果、未分化および IFN-U937 において、Fas 刺激に伴ったカスパーゼ-8 の Fas への結合が認められた (右図参照)。一方、VD₃- および RA-U937 においては減弱していた。当初、Fas 耐性化への関与が期待された FLIP は Fas 耐性細胞より単離した DISC 中には検出されず、むしろ Fas 高感受性を示す IFN-U937 において認められた。DISC 上の FLIP は速やかにカスパーゼ-8 にて切断され、DISC から解離していることが明らかとなり、カスパーゼ-8 活性化促進に機能していることが示唆された。

以上より、ヒト単芽球様細胞株 U937 の食細胞分化に伴った

Fas 感受性の変化は、Fas の量的変化を初めとする Fas 近傍における変化によるものであることが示唆された。



免疫沈降 : 抗 Fas 抗体 (CH-11)
イムノプロット (上): 抗カスパーゼ-8 抗体
同上 (下): 抗 FLIP 抗体