

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト単芽球細胞 U937 を用いた LPS 誘導アポトーシスに関する研究

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 12 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 桑原 卓

生物は生命を維持するため、その基本単位である細胞を作り続けている。しかし一方で、役割を終えて不要となった細胞は、能動的細胞死であるアポトーシスにより除かれる。細胞はアポトーシス時に核の凝縮と細胞の断片化などの形態変化を示す。こうした形態的特徴はアポトーシスの後期に観ることができる。アポトーシスシグナルは大きく分けて 2 つの経路により形態変化を示す後期段階へ至る。1 つは細胞外の刺激を受け取った受容体から始まる経路である。デス受容体 Fas は Fas リガンドや細胞障害性抗 Fas 抗体からデス刺激を受け取る。この結果、Fas の細胞質ドメインでアダプター分子 FADD (Fas-associated death domain containing protein) とカスパーゼ-8 により構成される DISC (細胞死誘導複合体) を形成する。この複合体によりカスパーゼ-8 は活性化する。カスパーゼ-8 は下流分子、例えばカスパーゼ-3 などを切断してアポトーシスを進める。もう一方の経路はミトコンドリア脱機能による経路である。細胞内の恒常性を保てなくなると、ミトコンドリアは膜電位消失を伴う脱機能に陥る。この際、ミトコンドリアから漏出したシトクロム *c* は、アダプター分子 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) などと共に Apoptosome と呼ばれる複合体を形成する。Apoptosome 形成によりカスパーゼ-9 が活性化され、さらに下流のカスパーゼ-3 を切断、活性化する。刺激や細胞の性質により、受容体経路のシグナルはミトコンドリア経路へと伝達される。つまり、2 つの経路がクロストークするのである。このクロストークは主に、DISC 中で活性化したカスパーゼ-8 により切断された Bid によるものと考えられている。しかしながら、カスパーゼ活性と Bid の切断以外の分子メカニズムが受容体からミトコンドリア間のシグナル伝達に関与している可能性も充分に残されている。

アポトーシスは様々の要因により引き起こされる。私が所属する研究室において、インターフェロン γ (IFN γ) あるいはレチノイン酸により分化誘導したヒト単芽球細胞株 U937 (それぞれ U937IFN と U937RA と表記) の培養液へ死滅赤痢菌あるいは病原因子欠損赤痢菌を添加したところ、未分化 U937 細胞 (以下、U937 細胞と表記) と U937RA 細胞は死なないが、U937IFN 細胞はアポトーシスを起こすことが見いだされている。この結果は、病原因子と異なる分子が U937

細胞の分化状態特異的にアポトーシスを誘導することを示唆する。このことから、私は 1)細菌が持つ病原因子ではなく菌体成分の LPS がアポトーシス誘導因子ではなからうか、2)LPS の有するアポトーシス誘導能への感受性が細胞分化により変化するのではないかと考え、リポ多糖 (LPS) を誘導因子とし、IFN γ 処理により感受性となった U937 細胞のアポトーシスについて解析した。

LPS が U937 細胞にアポトーシスを誘導し得るか解析した。各細胞へ LPS を作用させた後、細胞生存率を測定した。LPS 刺激により、U937IFN 細胞の生存率は 24 時間後に約 65%まで低下したが、U937 細胞と U937RA 細胞の生存率は減少しなかった。U937IFN 細胞の死細胞像をヘマトキシリン染色により観察したところ、アポトーシスに特徴的な核凝縮が確認できた。さらに、細胞抽出液中のカスパーゼ活性 (人工蛍光基質分解活性) の上昇が認められ、この酵素の細胞内基質である poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) の限定消化がイムノブロット法で検出された。LPS の特異的吸収剤ポリミキシン B で前処理することにより、核凝縮、カスパーゼ活性および PARP 切断の誘導能は中和された。以上のことから、LPS が特定の分化状態の細胞にアポトーシスを誘導することが確認できた。

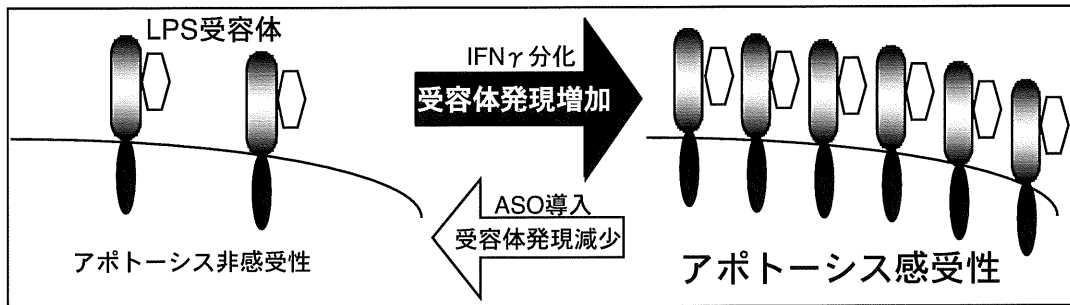
次に、細胞分化による LPS 誘導アポトーシスの感受性変化の原因を探った。IFN γ による刺激効果とアポトーシス誘導分子が LPS であることを考え、LPS 受容体を構成する Toll 様受容体 4 (TLR4) と MD-2 に着目した。フローサイトメトリー法により細胞表面の TLR4 を、また RT-PCR 法により MD-2 の mRNA 転写量を各分化細胞間で比較した。U937IFN 細胞の TLR4 と MD-2 は、他の 2 つの細胞に比べ、明瞭に高発現していることが判明した。FADD、カスパーゼ-8、Bid、Bax および Bcl-2 といったアポトーシス関連分子の発現は分化細胞間でほとんど差異を示さなかった。

感受性変化に必要なのは IFN γ 処理なのか、あるいは TLR4 の高発現なのかを明らかにするために、TLR4 の過発現を U937 細胞で試みたが、クローンを樹立できなかった。そこで、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) を用いて、IFN γ による分化状態を維持したまま TLR4 の発現を低下させ、アポトーシスがどのように影響されるかを検討した。TLR4 低発現 U937IFN 細胞では LPS による核断片化と PARP 切断が見られなかった。さらに、TLR4 の中和抗体を用いた機能中和条件下の U937IFN 細胞は LPS によるカスパーゼ活性が低下し、PARP 限定消化も抑制された。

LPS や IFN γ により TNF α や Fas などの発現が誘導され、これらが二次的にアポトーシスを誘導していることが考えられる。しかしながら、TNF α や Fas の中和抗体存在下において LPS 誘導アポトーシスは負に制御されなかった。細胞膜透過ドメイン (ヒト免疫不全ウイルス TAT タンパク質の 49~57 アミノ酸残基) を持つタンパク質やペプチドは培養細胞内へ導入することができることを利用し、Fas や TNF 受容体の細胞質側で機能するアダプター分子である FADD の機能欠失変異体に細胞膜透過ドメインを付加した組換えタンパク質を細胞内へ導入した。この結果、Fas 誘導アポトーシスは阻止されたが LPS によるそれは全く影響がなかった。これは、LPS 受容体が直接アポトーシスシグナルを伝達すること、LPS 受容体の細胞質ドメインで DISC (様複合体) が形成されていないことをそれぞれ意味する。

以上の結果から、IFN γ により発現増加した LPS 受容体が LPS 誘導アポトーシスの感受性亢進に深く関与しているこ

とが明らかとなった。単球細胞が分化により LPS 誘導アポトーシスに感受性となる直接の原因の一つであると考えられる (下図)。



次に LPS 受容体が引き金となるアポトーシスの分子機構について検討した。Fas 誘導アポトーシスは受容体から始まる経路としてよく解析されている。(下表右側: Fas 誘導アポトーシスと表記)。この系と比較しながら U937IFN 細胞の LPS 誘導アポトーシス (下表中央; 網かけ部) のメカニズムを解析した。この結果, 下表に示した相違点が見いだされた。相違点に沿って述べる。

	U937IFN 細胞 LPS 誘導アポトーシス	Fas 誘導アポトーシス
BH4 ドメイン	アポトーシスを抑制する	アポトーシスを抑制しない
ミトコンドリア脱機能	カスパーゼ阻害剤に非感受性	カスパーゼ阻害剤に感受性
p38	アポトーシスに関与	アポトーシスに関与しない
アダプター分子	TRAF6	FADD

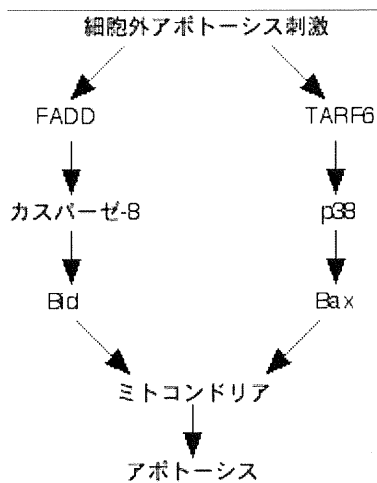
FADD 機能欠失変異体を用いた実験結果から, U937IFN 細胞における DISC 様複合体の関与は考え難い。そこで, LPS 誘導アポトーシスがミトコンドリア経路に依存

するか否かを検討した。Bcl-2 は, BH (Bcl-2 homology) 4 ドメインによりミトコンドリア脱機能を抑制することでアポトーシスを阻害する。BH4 ドメインと細胞膜透過ドメインとを直列につないだペプチドを合成し, U937IFN 細胞へ導入することでミトコンドリア保護条件を作った。この細胞を LPS で刺激したところ, PARP 切断と核凝縮とがそれぞれ抑制された。一方, Fas 誘導アポトーシスは抑制されなかった。ミトコンドリア保護によりアポトーシスが抑制されたことから, LPS はミトコンドリア脱機能 (膜電位消失など) を誘導していることが考えられる。実際, 別の実験において, LPS は膜電位消失を引き起こしていることが示された。この膜電位消失には, 細胞質からミトコンドリアへ転位し, 脱機能を誘導する分子 Bax が関与することが見いだされた。こうした LPS によるミトコンドリア脱機能は広域カスパーゼ阻害剤存在下でも誘導された。一方, Fas 誘導アポトーシスでは, ミトコンドリア脱機能は広域カスパーゼ阻害剤により抑制された。

カスパーゼに依存しない Bax 活性化機構を検討するため, ストレス応答タンパク質キナーゼ (SAPK) である p38 と JNK (c-jun N-terminal kinase) に着目した。通常 SAPK は, 刺激に対し 5~30 分間程度強く活性化された後, 下方制御される一過的応答を示すが, アポトーシス時は数時間の持続的活性状態となる。抗リン酸化抗体を用いたイムノブロット法により, LPS で刺激した各 U937 細胞の SAPK 活性状態を解析した結果, U937IFN 細胞で p38 の持続的活性化が検出された。他の分化状態の細胞は一過性の p38 活性化を示した。一方, JNK はいずれの細胞においても LPS 刺激に対して顕著な活性化を示さなかった。p38 の阻害剤である SB 試薬存在下で LPS を作用させたところ, Bax のミトコンドリア転位,

PARP 切断およびカスパーゼの活性化のそれぞれが阻害されたが、カスパーゼ阻害剤は p38 の活性化を抑制しなかった。
 なお、抗 Fas 抗体刺激は p38 を活性化しなかった。

LPS 刺激により p38 は TRAF (TNF receptor associated factor) 6 と TAB (TAK1-binding protein) 1 と複合体を形成し、典型的な MAP キナーゼカスケードと独立して活性化される。TRAF6 の機能欠失変異体に細胞膜透過ドメインを付加した組換えタンパク質を調製し、U937IFN 細胞へ導入した。導入細胞において、Fas 誘導アポトーシスは抑制されなかったが、LPS 誘導アポトーシスは抑制された。



これまで、細胞外アポトーシス刺激は受容体 → FADD → カスパーゼ-8 → Bid と伝達され、ミトコンドリアへ到達すると考えられてきた (左図: 左側, 前項の表右側: Fas 誘導アポトーシスと表記)。しかしながら、本検討の結果から、受容体 → TRAF6 → p38 → Bax と經由してミトコンドリアへ伝わるといった、新規のシグナル経路の存在が示唆された (左図: 右側, 前項の表中央)。この経路はミトコンドリア脱機能の上流でカスパーゼの活性化を必要としない点でも、従来知られていたメカニズムと異なる。

まとめ

デス受容体を活性化することなく、菌体成分 LPS は TLR4 を介して U937IFN 細胞へアポトーシスを誘導することが判明した。IFN γ は U937 細胞に作用し、LPS 受容体発現を増大させたが、結果として、このことが LPS 誘導アポトーシスの感受性亢進に関与していると考えられる。FADD 機能欠失変異体により抑制されず、また、ミトコンドリア保護により阻害されたことから、LPS 誘導アポトーシスは、DISC 形成とそれに続くカスパーゼ活性化を伴わず、ミトコンドリア脱機能に依存すると考えられる。ミトコンドリア脱機能の誘導は、LPS 刺激により持続的に活性化した p38 とそれに続く Bax 転位によると示唆された。この経路は、従来の DISC 形成系と異なり、受容体シグナルがミトコンドリア経路へクロストークする新たな系の一つと考えられる。