

## 論文の内容の要旨

論文題目 ASK1-p38 MAPK 経路による ATP 誘導性 macrophages 細胞死の制御機構

氏名 石井 絢

### 【背景】

マクロファージが感染・炎症病巣において種々の刺激を受けて細胞死を引き起こす現象は、アポトーシスの代表的な例として良く知られている。しかしながらその詳細な分子メカニズムの解明はこれまでほとんど為されていない。ATP もこのようなマクロファージにアポトーシスを誘導する刺激分子の一つとして以前から認知されていた。ATP はあらゆる細胞に多量に存在する生体のエネルギー源であるが、近年その細胞外シグナル伝達分子としての広範な役割が注目を集めている。

一方当研究室では、Apoptosis Signal-regulating Kinase (ASK) 1 が酸化ストレスなど様々なストレス刺激を感受して、Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) ファミリーメンバーである c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase (JNK) や p38 MAPK を活性化し、アポトーシスを誘導することを報告してきた。更に最近、ASK1 がマクロファージにおいて TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  などの代表的な炎症性サイトカインの産生やファゴサイトーシスなど、自然免疫において重要な機能

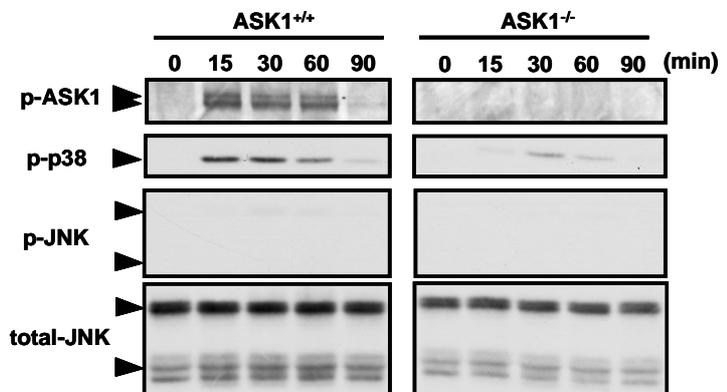


Fig. 1 ASK1<sup>+/+</sup>およびASK1<sup>-/-</sup> SDM<sub>s</sub>における 3 mM ATP処置による MAPKの活性化

を制御していることが明らかとなり、マクロファージの生理応答制御への ASK1 の積極的な関与が示されつつある。

私はマクロファージの機能解析を進める過程で、ASK1<sup>-/-</sup>マウスの脾臓由来初代培養マクロファージ (Spleen-Derived Macrophages ; SDMs) において、ATP による p38 の活性化が消失していることを見出した (Fig. 1)。上述の通り ASK1 はアポトーシスの重要な制御分子であることから、本研究ではマクロファージにおける ATP 誘導性アポトーシスの分子メカニズムを、ASK1-p38 経路の関与を中心に解明することを目的とした。

## 【方法と結果】

### 1. ATP および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は p38 経路の活性化を介してアポトーシスを誘導する

マクロファージ系 cell line である RAW264.7 細胞では、ATP 処理によってアポトーシスに特徴的な現象である DNA fragmentation が引き起こされる。本細胞を用いてアポトーシスに対する MAPK 経路の関与を検討した。各種特異的 MAPK 阻害剤前処置の後に ATP 刺激を行ったところ、p38 阻害剤 (SB202190, SB203580) によってアポトーシスが抑制されることがわかった (Fig. 2)。この時 JNK 阻害剤 (SP600125) や p38 阻害剤の不活性型構造類似体 (SB202474) では全く抑制されな

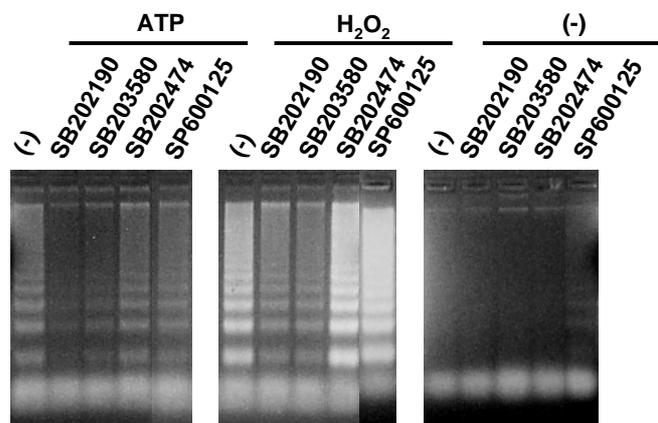


Fig. 2 2 mM ATPおよび0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6 hr刺激に対する各種MAPK阻害剤 (20 μM) の影響

かったことから、ATP 誘導性アポトーシスが p38 を介していることが強く示唆された。一般的に JNK 依存的アポトーシスは多くの細胞で報告されているが、p38 依存的アポトーシスに関する報告は僅かであり、マクロファージに特徴的な制御機構であると考えられる。実際、多くの細胞種でアポトーシスを誘導することが知られている過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 刺激も、RAW264.7 細胞においては p38 を介してアポトーシスを引き起こすことが明らかとなった (Fig. 2)。

### 2. ATP 誘導性アポトーシスには ROS 産生が関与している

Fig. 2 で示した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と ATP によって誘導されるアポトーシスの類似性から、共通の細胞内シグナル伝達機構が存在する可能性が考えられた。そこで ATP 誘導性アポトーシスが活性酸素種 (Reactive Oxygen Species ; ROS) の産生を介しているかを調べるために、ATP および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激により引き起こされる DNA fragmentation への抗酸化剤の影響を調べた。抗酸化剤の前処置によって ATP および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘導性 DNA fragmentation が抑制されたことから (Fig. 3)、ATP によって引き起こされるアポトーシスへの ROS の関与が示唆された。更に ROS 特異的な蛍光プローブを用い、ATP 刺激により RAW264.7

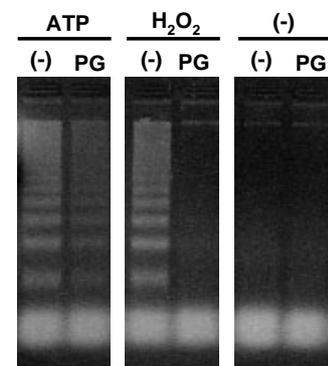


Fig. 3 2 mM ATPおよび0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6 hr刺激に対する抗酸化剤 propyl gallate (PG) 20 μMの影響

細胞内で ROS が産生されることを確認した。したがって ATP 誘導性アポトーシスは、おもに ROS 産生を介して引き起こされるものと考えられる。また、阻害剤を用いた実験によって、この ROS はミトコンドリア由来である可能性が強く示唆された。

### 3. P2X<sub>7</sub> 受容体が ATP による p38 依存性アポトーシスに必要なである

細胞外の ATP は主として細胞膜表面上に多種類存在する P2 プリン受容体を介して細胞内にシグナルを伝達する。特にマクロファージにおける ATP 誘導性アポトーシスには、P2X<sub>7</sub> 受容体が主に働いていることがわかっている。実際に P2X<sub>7</sub> 受容体特異的なアンタゴニストである KN62 および Brilliant Blue G (BBG) を前処置することで、

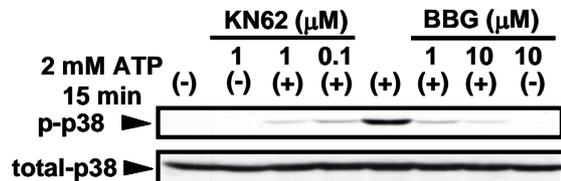


Fig. 4 ATPに対するP2X<sub>7</sub>受容体特異的アンタゴニストの影響

ATP によって誘導されるアポトーシスが完全に抑制された。前述の通り RAW264.7 細胞における ATP 誘導性アポトーシスは p38 の活性化に依存していることから、p38 の活性化が実際に P2X<sub>7</sub> 受容体を介しているか否かを検討した。KN62 および BBG 前処置によって ATP による p38 の活性化が濃度依存的に抑制されたこと (Fig. 4)、さらに各種 P2 受容体アゴニストを用いた検討によっても、ATP による p38 の活性化は P2X<sub>7</sub> 受容体を介していることが明らかとなった。また、KN62 が ATP による ROS の産生を抑制したことより、ROS の産生から p38 活性化に至る一連の経路の上流には P2X<sub>7</sub> 受容体が位置し、ATP 誘導性アポトーシスを制御している可能性が示唆された。

### 4. P2X<sub>7</sub> 受容体の C 末端が ATP による p38 活性化に必要なである

これまでに P2X<sub>7</sub> 受容体を介したアポトーシス誘導には、受容体の長い細胞内 C 末端領域が必要であることが示されている。そこで HEK293A 細胞に P2X<sub>7</sub> 受容体、あるいはその C 末端欠損変異体 (P2X<sub>7</sub>ΔC) を一過性に発現させ、ATP 誘導性の p38 活性化に対する C 末端の必要性を検討した。すると

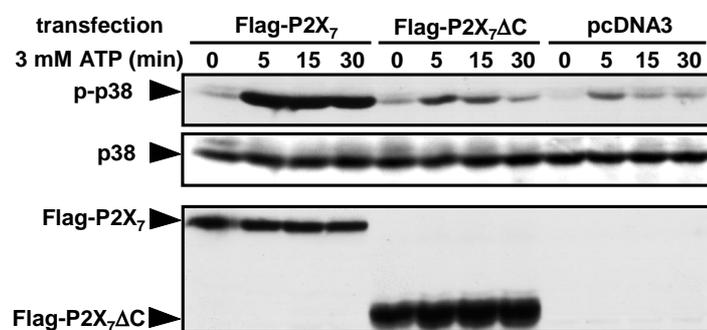


Fig. 5 ATP誘導性p38 MAPK活性化におけるP2X<sub>7</sub>受容体C末端の必要性

Flag-P2X<sub>7</sub> を発現させた細胞は ATP によって p38 が活性化したものの、Flag-P2X<sub>7</sub>ΔC を発現させた細胞では p38 が活性化しなかった (Fig. 5)。したがって P2X<sub>7</sub> 受容体を介した p38 の活性化はその C 末端領域を介して引き起こされ、アポトーシスを誘導していると考えられる。

### 5. ASK1 が ATP 誘導性アポトーシスに必要なである

これまでの実験で、ROS による p38 の活性化が RAW264.7 細胞の ATP 誘導性アポトーシスに必要なことが明らかとなった。Fig. 1 の結果より、マクロファージにおける ATP 依存的な p38 の活性化は ASK1 特異的に制御されていたことから、ATP 誘導性アポトーシスを ASK1 が制御し

ている可能性を検討した。caspase-3 活性および histone-associated-DNA-fragments 量を指標として、ATP 誘導性アポトーシスについて ASK1<sup>+/+</sup>および ASK1<sup>-/-</sup>マウス由来 SDM<sub>s</sub> で比較したところ、ASK1<sup>-/-</sup> SDM<sub>s</sub> ではアポトーシスが顕著に減弱していた (Fig. 6)。また H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激においても ATP と同様 ASK1 依存的なアポトーシスが観察された (Fig. 6)。ASK1<sup>+/+</sup>および ASK1<sup>-/-</sup> SDM<sub>s</sub> において P2X<sub>7</sub> 受容体発現量、ROS 産生量に差が認められなかったことから、ASK1<sup>-/-</sup> SDM<sub>s</sub> におけるアポトーシスの減弱は ASK1-p38 経路の欠失に起因するものと考えられる。これらの結果より、マクロファージにおいて ATP 刺激によるアポトーシス誘導および p38 の活性化に、ASK1 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

**【まとめ】**

本研究では、これまで未解明であったマクロファージにお

ける ATP 誘導性アポトーシスが、以下のような経路を介していることを明らかにした。すなわち細胞外の ATP が P2X<sub>7</sub> 受容体に認識され、受容体の C 末端がミトコンドリアからの ROS の産生を惹起する。産生した ROS は ASK1 の活性化を経て p38 を活性化し、さらにその下流で caspase-3 を活性化してアポトーシスを誘導する (Fig. 7)。

近年マクロファージのアポトーシスの生理的意義の一つとして、炎症反応の終結に重要である可能性が示唆されている。最近 ASK1 がマクロファージからの各種炎症性サイトカインの産生誘導に参与していることが明らかとなっているが、その一方でマクロファージのアポトーシスをも ASK1 が制御しているという今回の結果は、炎症惹起から終結に至るまでの一連の自然免疫応答の制御に ASK1-p38 経路が働いていることを示す結果であり、非常に合目的的であると考えられる。

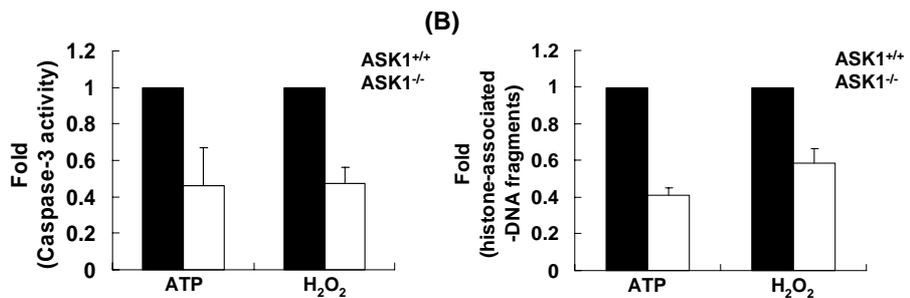


Fig. 6 5 mM ATPおよび0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6 hr刺激によるアポトーシス誘導  
(A) caspase-3活性  
(B) histone-associated-DNA-fragments量

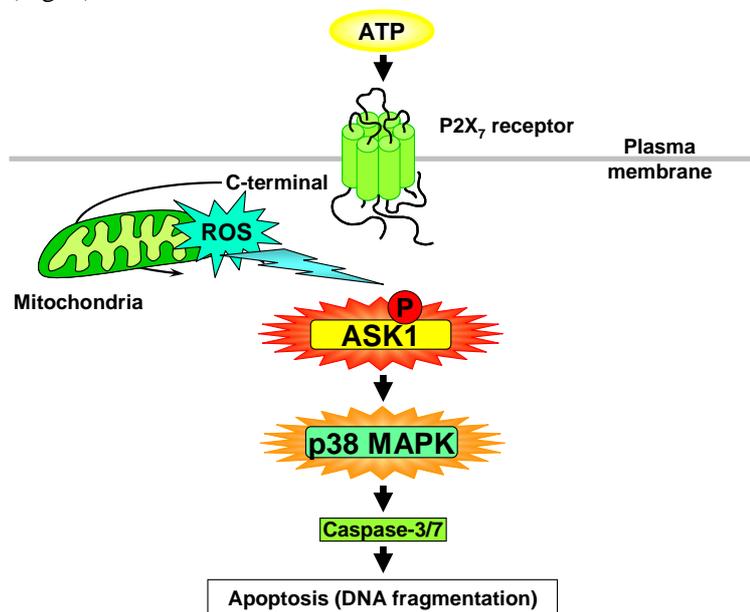


Fig. 7 マクロファージにおけるATP誘導アポトーシスシグナル伝達モデル