

審査の結果の要旨

氏名 田中 浩

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は、腫瘍細胞に対し選択的にアポトーシスを誘導する。さらに、TRAILは動物モデルにおいても顕著な毒性なしに抗腫瘍効果を示し、がん治療への臨床応用が期待されている。リコンビナントTRAILやその受容体を標的としたモノクローナル抗体は現在臨床試験第I相および第II相にある。TRAILは受容体であるdeath receptor 4 (DR4) またはDR5との結合により、細胞内においてFADDやcaspase-8などからなるdeath-inducing signaling complex (DISC) の形成を誘導することでアポトーシスを引き起こす。一方、TRAILはアポトーシスシグナルだけでなく、抗アポトーシス性の転写因子NF- κ Bを活性化することも知られており、NF- κ B経路の阻害はTRAILによる細胞死を増強する。細胞内のNF- κ Bは通常、I κ Bとの結合によって細胞質にとどめられている。細胞がサイトカイン刺激を受けると、IKK複合体によりI κ Bがリン酸化される。リン酸化を受けたI κ Bはユビキチン-プロテアソーム系によって分解され、遊離したNF- κ Bは核へと移行し、アポトーシス抑制に働く標的遺伝子群を転写誘導する。TRAILが誘導する細胞死はこれら両経路のバランスによって制御されると考えられている。田中はこれまでに、PDK1がIKK β を介してNF- κ Bを活性化することでTRAIL耐性に寄与することを明らかにしていた。

本研究において、田中はTRAILによる細胞死誘導経路の解明を目的として、TRAIL受容体の結合タンパク質を探索した結果、PRMT5を見出した。さらにPRMT5はNF- κ Bの活性化に寄与することで、TRAIL誘導性アポトーシスを負に制御することを明らかにした。

まず、FLAGタグならびにHisタグを持つDR4をHeLa細胞に発現させ、抗FLAG抗体とNiカラムによってDR4複合体を精製した。複合体に含まれるタンパク質を質量分析にて解析した結果、新規DR4結合因子としてPRMT5を同定した。

次に、PRMT5のTRAIL感受性への関与を明らかにするために、siRNAを用いてPRMT5をノックダウンし、TRAIL処理時の細胞生存率をMTS法によって測定した。その結果、PRMT5を標的とするsiRNAを導入したHeLa細胞ではTRAILによる細胞毒性が増加することを見出した。また、この感受性化は、caspase阻害剤Z-VADの添加によって消失することと、Annexin V染色の亢進を伴うことから、アポトーシスの促進であると考えられた。PRMT5のノックダウンは、用いた全てのがん細胞株で同様の感受性化を引き起こしたが、正常線維芽細胞株では感受性化は認められなかった。以上より、がん細胞においてPRMT5はTRAILが誘導する細胞死を抑制していることを明らかにした。

さらに、TRAIL感受性の変化の機構について検討した。DR4/DR5の発現には変化がなかったため、DR4を安定発現するHT1080細胞を用いてTRAIL刺激によるDISC形成を調べた。DR4と共沈

するFADDには差がなかったが、PRMT5ノックダウン時にはTRAILが誘導するI κ B α 分解が阻害されることを見出した。詳しく解析した結果、このI κ B α 分解阻害は、上流のIKK複合体のキナーゼ活性抑制に起因することと、TNF- α 処理時には見られず、TRAIL刺激選択的であることが示唆された。次に、I κ B α の下流に位置するNF- κ Bの活性化をレポーターアッセイによって定量した結果、I κ B α の分解と一致して、TRAILによるNF- κ B活性化はPRMT5ノックダウンにより顕著に減弱することを見出した。さらに、NF- κ B標的遺伝子として知られるIAPファミリーに注目し、定量RT-PCRを行った結果、TRAILによるcIAP1およびcIAP2 mRNAの発現誘導が、PRMT5 siRNAによって抑制されることが示された。

次に、NF- κ B活性の低下がTRAIL感受性に寄与するかどうかを確認するため、IKK阻害剤であるBMS-345541を用いた。BMS-345541存在下のHeLa細胞では、確かにTRAILの細胞毒性の増強が見られ、加えて、TNF- α 処理においても生存率が低下した。これに対して、PRMT5へのsiRNAは前述のようにTRAILへの感受性を引き起こすものの、TNF- α の毒性には大きな影響を与えなかった。従って、I κ B α の分解およびNF- κ Bの活性化に対する阻害効果と同様に、PRMT5のノックダウンはTRAILが誘導する細胞死を選択的に増強することが示された。

最後に、PRMT5の下流におけるNF- κ B経路の重要性を解明するために、PRMT5をノックダウンしたHT1080細胞にGFPタグを付加した活性化型のIKK β を遺伝子導入し、TRAIL処理を行った。核の凝縮および断片化を指標としてアポトーシスを定量したところ、PRMT5のノックダウンにより過半数の細胞がアポトーシス様の染色像を呈したが、活性化型IKK β の発現はこのアポトーシスを大幅に減少させた。これらの結果から、PRMT5はNF- κ Bの活性化を介してTRAILによるアポトーシスを阻害していることが考えられた。

以上のように、本研究において田中は、新規DR4結合タンパク質として同定されたPRMT5が、TNFRスーパーファミリーの中でもTRAIL受容体であるDR4/DR5と選択的に結合することを見出した。また、PRMT5はTRAILによるNF- κ B活性化に寄与することで、TRAIL誘導性アポトーシスに対し抑制的に働いていることを明らかにした。TRAILの臨床応用を進める上では、一部のがん細胞が示す耐性の克服が大きな課題となる。本研究の成果から、PRMT5を分子標的とすることによってTRAILの抗腫瘍効果を選択的に増強できる可能性が期待される。これらの成果は、博士（薬学）の値するものと評価できる。