

平成21年5月1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590257
 研究課題名（和文） ヒトTRAILレセプターの細胞内局在とTRAILによるアポトーシス誘導制御の解析
 研究課題名（英文） Contribution of intracellular TRAIL receptor to regulation of apoptosis induced by TRAIL
 研究代表者
 小島 裕子 (KOJIMA YUKO)
 順天堂大学・医学研究科・助教
 研究者番号：60232312

研究成果の概要：

[1] 腫瘍壊死因子関連タンパク質の一つで細胞死を誘導する“TRAIL”が結合する、膜受容体タンパク質”DR5”は、TRAIL耐性の腫瘍細胞では核内に格納され、その結果、TRAILにより誘導される細胞死の脅威から逃れている可能性があることが示唆された。TRAIL耐性の腫瘍細胞の核内DR5を、細胞膜へ発現させることで、細胞死を誘導できることが明らかになった。
 [2] 胆汁うっ滞性疾患において、胆管上皮細胞上のTRAIL/DR5を介して、重篤な胆管炎と肝障害が引き起こされる危険性があり、TRAIL/DR5を標的としたヒトへのがん抗体療法を行う上で、副作用に注意する必要性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：抗腫瘍免疫・アポトーシス・TRAIL・DR5・腫瘍細胞・局在・がん抗体療法・胆管閉塞

[1]

1. 研究開始当初の背景

(1) TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) は、TNFファミリーに属するII型細胞表面膜タンパク質で、mRNAレベルでの発現は、ほとんどの正常組織・細胞に認められる。この分子が持つ機能の最も注目すべき特徴は、腫瘍細胞や形質転換細胞にはアポトーシスを誘導するが、正常細胞にはアポトーシスを誘導しない点である。生体にとって有利なこの性質が、どのような機構で維持されるのか興味深い。

(2) TRAIL に対して複数のレセプターが同

定されているが、このうち、膜貫通型のDR4とDR5は、細胞内領域に細胞死のシグナルを伝達するドメインを有し、アポトーシスを誘導する。これに対し、DcR1とDcR2は細胞内領域を欠損した、アポトーシス非誘導性の抑制性レセプターで、DR4、DR5と競合することによりアポトーシスを阻害すると考えられている。そのため、TRAILによるアポトーシスの誘導は、そのレセプターによって調節されていると考えられていた。しかし、次第にシグナル伝達経路が明らかにされ、TRAILの機能発現調節機構は複雑で、レセプタータンパク質の発現レベルでは説明がつか

かず、局も含めた詳細な解析はなされていない。いずれのレセプターも、mRNA レベルでは TRAIL と同様に広範な組織に見られることから、細胞膜への発現調節が、機能発現の一つの鍵を握っているものと推察される。(3) 腫瘍細胞の抗がん剤に対する感受性は様々で、TRAIL に対する感受性も同様である。抗がん剤も TRAIL も効かない腫瘍細胞に対して、両者を併用すると相乗的に効果が高まるケースがあるとの報告がある。この相乗的な効果のメカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

(1) これまでの実験で、細胞膜で機能する TRAIL レセプターが、腫瘍細胞やある種の正常細胞では、未刺激の状態でも細胞質や核にも局在することが観察されており、DR4, DR5, DcR2 には核移行シグナルも存在する。そこで、TRAIL 感受性の異なる腫瘍細胞株で、膜と細胞内での TRAIL レセプターの局在を観察し、TRAIL 感受性との関係を調べる。

(2) TRAIL でアポトーシスを誘導した場合の局在の変化を解析し、各レセプターの局在の変化が、TRAIL の機能発現の増強に寄与するかを明らかにする。

(3) TRAIL 感受性が低く抗がん剤に対する感受性も低い腫瘍細胞に対して、抗がん剤と TRAIL を併用し、TRAIL レセプタータンパク質の発現レベルの変化は少なく、且つ、相乗的にアポトーシスを誘導し得る条件がないかを調べる。その時の各レセプターの局在の変化を解析することで、実際に臨床的ながん治療の場において、抗がん剤が効きにくい難治性の腫瘍に対して、単に抗腫瘍効果を持つタンパク質の発現レベルを調節するだけでなく、そのタンパク質の細胞での局在も重要であって、それをコントロールすることが治療に有効かどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト腫瘍細胞株について、フローサイトメトリー (FACS) と共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) で、DR4, DR5, DcR1, DcR2 の細胞膜及び細胞内発現を調べた。また、各細胞株に rTRAIL を添加して、誘導される細胞死を測定した。

(2) (1)で核内に DR5 が局在していた細胞株に対して、細胞質から核内へタンパク質の運搬を担う Importin β の siRNA を移入して Importin β をノックダウンした上で、(1)と同様の実験を行い比較した。

(3) Importin β をノックダウンした細胞について、抗 DR5 抗体で免疫沈降した後、ウェスタンブロットを行い、抗 Importin β 抗体で検出した。

(4) (1)で用いた細胞株について、主に細胞骨格に作用する抗がん剤を用いて、薬剤感受性を(1)と同様に測定した。rTRAIL を薬剤と同時に、または後に添加した場合の細胞死を測定し、抗がん剤単独と rTRAIL 単独の細胞死と比較検討した。

(5) (4)の結果から腫瘍細胞に対して、薬剤が TRAIL と相乗的に細胞死を誘導する条件で、DR5 の発現を CLSM で解析した。

4. 研究成果

(1)① FACS による解析の結果、TRAIL 感受性の高い腫瘍細胞株は、DR4, DR5, DcR2 が細胞膜に発現していた。TRAIL 感受性の低い腫瘍細胞株は、DR5 のみが細胞膜に発現しているのに加え、DR5 と DcR2 が細胞内に多く検出された。なお、DcR1 の発現はいずれも弱かった。

② CLSM による DR5 の細胞内局在を解析した結果、TRAIL 高感受性の腫瘍細胞株は、細胞質に局在していた (図 1) のに対して、TRAIL 低感受性の腫瘍細胞株では、核に局在していた (図 2)。これは、正常細胞培養株と類似していた (図 3)。なお、DcR2 は細胞質の他、核内に検出された。

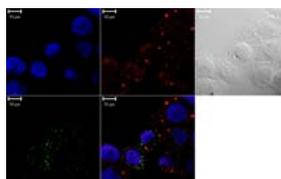


図 1 TRAIL 高感受性腫瘍細胞株 (DR5: 赤色, 核: 青色, ゴルジ装置: 緑色)

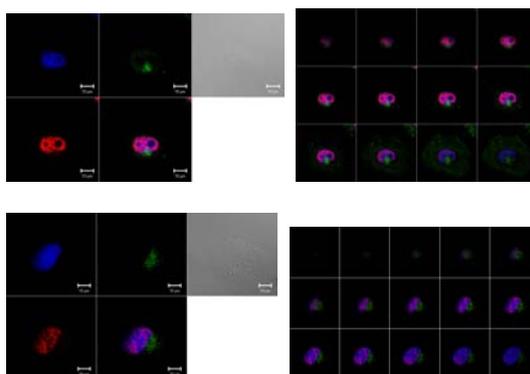


図 2 TRAIL 低感受性腫瘍細胞株 (DR5: 赤色, 核: 青色, ゴルジ装置: 緑色)

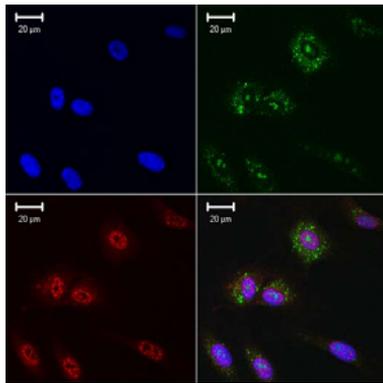


図3 ヒト正常細胞培養株
(DR5: 赤色, 核: 青色,
ライソゾーム: 緑色)

(2) ① TRAIL 低感受性腫瘍細胞株の Importin β をノックダウンすると, DR5 は核内ではなく細胞質へと局在が劇的に変化した. なお, コントロール siRNA を移入した細胞では変化はなかった (図4).

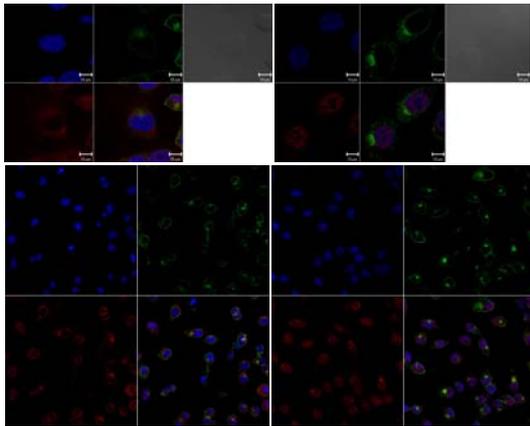


図4 siRNA を移入した TRAIL 低感受性腫瘍細胞株 (左: Importin β, 右: コントロール)

② ①の細胞の TRAIL 感受性は, Importin β のノックダウンにより有意に上がった (図5).

25 ng/ml rTRAIL 添加

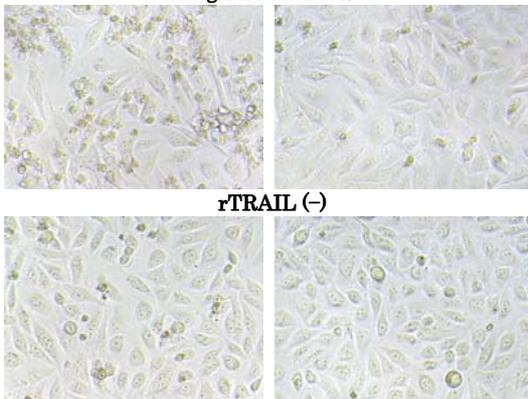


図5 TRAIL 感受性 (左: Importin β

ノックダウン, 右: コントロール)

③ ①の細胞を FACS で解析すると, Importin β をノックダウンした細胞では, 細胞全体の DR5 の発現量にはほとんど変化が無いにもかかわらず, 細胞膜への有意な発現の増加が認められ, 核に運ばれなかった DR5 が細胞膜へと運ばれたものと考えられた.

(3) ①の細胞を用いた, 免疫沈降後のウェスタンブロットの結果から, TRAIL 低感受性腫瘍細胞内の DR5 は Importin β と結合していることが確認された (図6). 従って, TRAIL 低感受性腫瘍細胞株では, DR5 は Importin β により核内に輸送されているものと考えられる.



図6 免疫沈降後の Importin β のウェスタンブロット (左: コントロール抗体免疫沈降分画, 中央: 抗 DR5 抗体免疫沈降分画, 右: 細胞可溶性分画)

(4) TRAIL 低感受性の腫瘍細胞株について, 抗がん剤と TRAIL の相乗効果が期待できる条件で DR5 の局在を解析したが, 核内の局在が減少し細胞質に局在する分子が若干増えたものの, (2)で見られたように顕著な変化は, 今回調べた限りでは見出せなかった.

以上の結果を, 図7にまとめる.

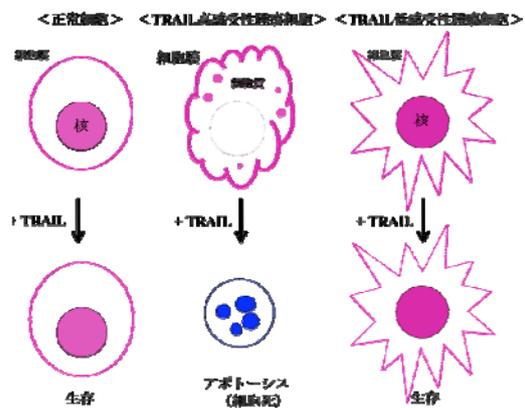


図7 DR5 の局在と TRAIL に対する反応性

TRAIL 感受性が高く, 細胞死を起こしやすい腫瘍細胞では, 細胞死誘導性の TRAIL レセプターである DR5 を, 細胞膜および細胞質に発現しており, TRAIL の添加により効率よく細胞死が誘導される. これに対して, TRAIL 感受性が低く, 細胞死を起こしにくい腫瘍細胞では, 細胞内で合成された DR5 が, Importin と結合して核に運ばれることによって主に核内に DR5 が格納され, TRAIL で

誘導される細胞死を免れていると考えられる。そしてこの制御機構は、正常細胞でも働いている可能性があり、正常細胞を細胞死から保護するための防御機構として機能している可能性も考えられる。従って、抗がん剤に耐性を持つ腫瘍で、核内に DR5 を発現している腫瘍細胞に対しては、細胞分裂の盛んな腫瘍細胞特異的に、DR5 の局在を核から細胞膜に移すことができれば、抗腫瘍効果が期待されがん治療に繋がる可能性がある。

今後、このようながん治療も見据えて、細胞分裂時に核膜の消失と同時に細胞内に分散する DR5 を細胞膜に移行させるような、本実験で行った Importin β ノックダウンに代わる薬物や方法がないかを検討したい。

[2]

1. 研究開始当初の背景

(1) がん免疫療法の一つとして抗体療法があり、がんに対する細胞性免疫を高める抗体を組み合わせることで、ある程度の大きさに達した腫瘍を消失させることも可能であることを、マウスの系において実験的に既に証明している。

(2) 抗 DR5 アゴニスティック抗体の投与は、腫瘍細胞に対して特異的にアポトーシスを誘導することから、海外では既にヒトがん治療の第一相に進んでいる。しかしその一方で、原因不明の副作用の報告も出始めている。

(3) これまでの実験でマウスに抗 DR5 モノクローナル抗体を繰り返し投与すると、BALB/c, DBA/2 マウスではほとんど副作用が見られないのに対し、C57BL/6 (B6), C3H マウスでは激しい黄疸を起こして死亡した (図 8)。



図 8 抗体を投与した B6 マウス (左: コントロール抗体, 右: 抗 DR5 抗体)

(4) 黄疸を起こしたマウスの肝臓の組織を調べると、胆管が激しい炎症を起こし、タマネギ状に閉塞していた (図 9)。

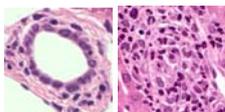


図 9 胆管のヘマトキシリンエオジン (HE) 染色像

(左: 正常, 右: タマネギ状の胆管閉塞)

2. 研究の目的

(1) マウスに抗 DR5 抗体を繰り返し投与した時に、系統によって起こる激しい黄疸と類似の病態が、ヒトの症例にないかを検索する。
(2) (1)より、マウスで見られる黄疸が何に起

因するかを明らかにし、黄疸を起こすメカニズムを解析する。

(3) ヒトにおいても類似の副作用が起きる可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 黄疸を起こしたマウスと類似の病態を示すヒトの症例として、原発性硬化性胆管炎 (PSC) と原発性胆汁性肝硬変 (PBC) が挙げられ、それらとの類似点と相違点を検討する。

(2) 各系統のマウスについて、肝細胞、胆管上皮細胞における TRAIL と DR5 の発現を調べる。

(3) B6 の TRAIL ノックアウトマウス (TRAIL^{-/-}) と DR5 ノックアウトマウス (DR5^{-/-}) について、抗 DR5 抗体に対する野生型 (WT) との反応性の違いを解析する。

(4) (1)~(3)より、黄疸の引き金と考えられる病態を実験的に模倣した場合、抗 DR5 抗体投与で副作用を起こさない系統のマウスにも、黄疸を誘発し得るかを検討し、抗 DR5 抗体投与による副作用のメカニズムを明らかにする。更に、ヒトがん抗体療法において考慮すべきことは何かを検証する。

4. 研究成果

(1) B6 マウスでは、抗 DR5 抗体投与で胆管上皮細胞にアポトーシスが誘導され、胆管周囲に激しい線維化が見られた (図 10)。この変化は、肝内胆管のみならず肝外胆管にも見られた (図 11)。更なる抗体投与でタマネギ状の胆管閉塞となり、胆管上皮細胞のマーカーであるサイトケラチン 19 タンパク質の発現は消失、肝細胞の一部は壊死を起こし、個体死に至った。BALB/c マウスは、胆管・肝細胞共に変化がなかった。B6 に見られるこの病態は、ヒト PSC に酷似していた。

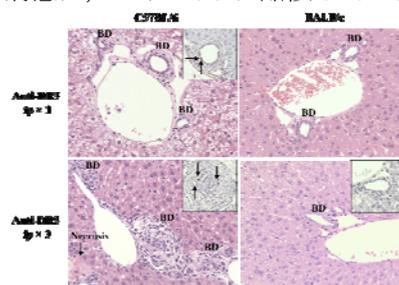


図 10 抗 DR5 抗体投与 (ip) 後の B6 と BALB/c マウスの肝内胆管 (BD) (挿入図矢印: アポトーシス細胞)

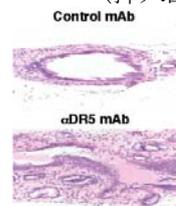


図 11 B6 マウス肝外胆管の HE 染色像 (上: コントロール, 下: DR5 抗体投与)

(2) FACS 及び免疫組織染色の結果より、B6 マウスは BALB/c マウスに比べて胆管上皮細胞膜上の DR5 の発現が高かった。肝細胞膜上にも DR5 は発現していたが、TRAIL 遺伝子導入細胞による細胞傷害活性の測定より、B6 の胆管上皮細胞に対してのみ、高い細胞死が誘導された。これらの結果より、胆管上皮細胞膜上の DR5 が重要であることが示唆された。

(3) B6 の WT, TRAIL^{-/-}, DR5^{-/-} の総胆管を結紮し、胆汁うっ滞モデルを作製し、これらのマウスの生存日数、血中のアルカリフォスファターゼ (ALP) 値、肝内・肝外胆管と肝臓の組織を、経時的に調べた。

① B6 の WT は、Day9 で総胆管周囲や肝内胆管の炎症と肝細胞障害が誘導された。TRAIL^{-/-}, DR5^{-/-} はいずれも軽度で、Day15 で肝内胆管の炎症が見られたが、WT が最も顕著であった。肝障害は、マウス間で差がなかった (図 1 2)。

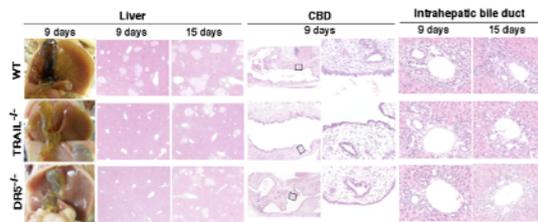


図 1 2 総胆管結紮による胆汁うっ滞モデルマウスの組織像

② 血中 ALP は WT が速やかに上昇したのに対し、TRAIL^{-/-}, DR5^{-/-} では徐々に増加した。

③ WT は Day10 で 9 割のマウスが死亡したのに対して、TRAIL^{-/-}, DR5^{-/-} では Day20 から Day25 まで生存日数が延長した。

④ 抗アシアロ GM1 抗体を投与して、ナチュラルキラー細胞 (NK) を除去した B6 マウスの生存曲線は、WT と同程度であったことから、NK の関与はないものと考えられた。

以上①～④より、総胆管結紮で発症する胆管炎に、TRAIL, DR5 が深く関与していることが示唆された。

(4) B6 と BALB/c について、(3)と同様に総胆管結紮モデルを作製、更に抗 DR5 抗体を投与し、生存日数、各マウスの組織像の他、TRAIL 及び DR5 の発現を免疫組織染色で比較検討した。

① 総胆管結紮 (Ligation) により TRAIL の発現が誘導された。この時の TRAIL の発現レベルは、未処理の B6 マウスに抗 DR5 抗体を投与した時より低かった (図 1 3)。

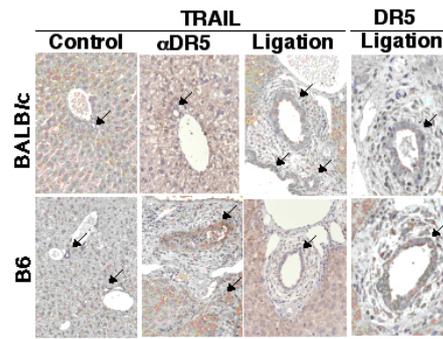


図 1 3 総胆管結紮により誘導される胆管上皮細胞の TRAIL/DR5 の発現

② 総胆管結紮後に抗 DR5 抗体を投与すると、B6, BALB/c のいずれのマウスも胆管炎を発症、タマネギ状の胆管閉塞を起こしてマウスは死亡した (図 1 4)。

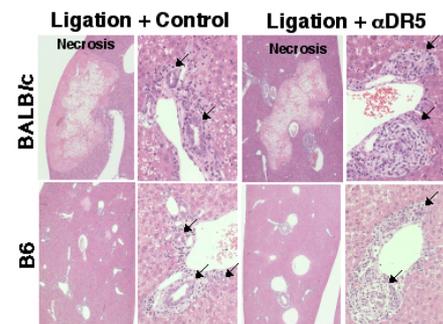


図 1 4 総胆管結紮後の抗 DR5 抗体投与により誘導される胆管炎 (上段: BALB/c マウス, 下段: B6 マウス)

①②より、胆汁のうっ滞が、胆管上皮細胞に TRAIL/DR5 の発現を誘導し、これが抗 DR5 抗体投与と総胆管結紮で重篤な胆管炎を引き起こし、再生不能な肝障害を起こしてマウスが死亡したと考えられた。

(5) (1)と(3)の各マウスについて、コラーゲン線維の組織染色 (Azan 染色) と筋線維芽細胞の免疫組織染色 (抗 α-SMA 抗体染色) を行った。胆管炎の見られたマウスの肝内胆管周囲には、筋線維芽細胞を伴った線維化が見られた (図 1 5, 図 1 6)。

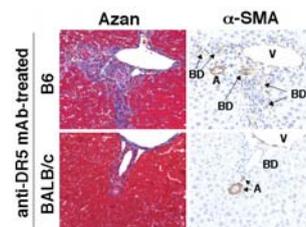


図 1 5 抗 DR5 抗体投与した B6 と BALB/c マウス肝組織像 (コラーゲン線維:

青色, α -SMA 陽性細胞: 褐色,
BD: 胆管, V: 血管)

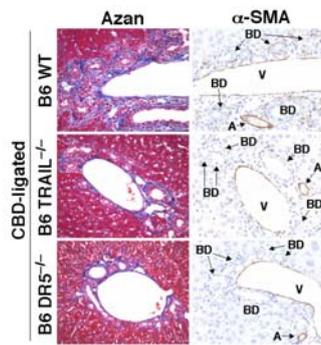


図 1 6 B6 の胆汁うっ滞モデルマウスの各肝組織像 (図 1 5 参照)

(6) ヒト PSC, PBC, 胆石による総胆管閉塞症例の各病理組織より, TRAIL, DR5 の免疫組織染色, アポトーシス細胞の検出を試みた.

① DR5 は, 正常を含め全ての症例で胆管上皮細胞と肝細胞に発現していた (図 1 7).

② TRAIL は, 肝細胞では発現が見られなかったが, 胆管上皮細胞では, PSC と PBC にのみ, 正常肝や胆石症に見られない顕著な発現の増加が認められた (図 1 7).

③ アポトーシス細胞は, PSC と PBC の胆管上皮細胞に, 多数検出された (図 1 7).

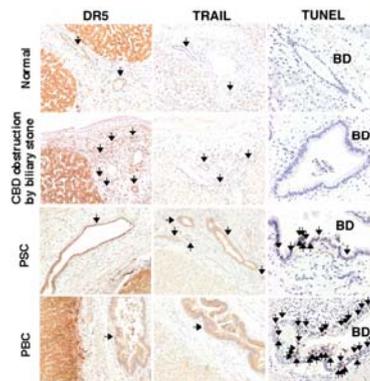


図 1 7 胆管閉塞関連ヒト症例における TRAIL/DR5 の発現とアポトーシス細胞

以上の実験結果をまとめると, 抗 DR5 抗体投与は, 元々 DR5 の発現が高い系統のマウスでは胆管炎を発症, 胆管閉塞を来とし, その結果胆管上皮細胞が DR5 に加えて TRAIL を発現するようになった. この胆管上皮細胞自身の TRAIL/DR5 を介してアポトーシスが誘導され, 線維化を伴う重篤な胆管炎と肝障害が惹起されて, 個体死に至ることが明らかとなった. しかも閉塞した胆管の組織像は, ヒト PSC と酷似しているばかりでなく, その病態においても類似点が多く,

TRAIL/DR5 の発現レベルの変化やアポトーシス細胞の出現などから, ヒトにおいても胆管上皮細胞に発現する TRAIL/DR5 が, 胆管炎や胆汁うっ滞において重要な役割を担っており, DR5 を介するシグナルが増強することで, PSC 様の病態を来すと推察された.

従って, ヒトがん抗体療法において, 抗 DR5 抗体を投与するにあたっては, 胆管閉塞を起こしやすい患者や, 胆管上皮細胞の DR5 発現レベルが元々高いケースでは, 副作用に十分注意する必要がある.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

○Takeda K, ○Kojima Y, Ikejima K, Harada K, Yamashina S, Okumura K, Aoyama T, Fress S, Ikeda H, Hynes NM, Cretney E, Yagita H, Sueyoshi N, Sato N, Nakanuma Y, Smyth MJ, Okumura K. Proc Natl Sci USA, 105 (31): 10895-10900 (2008). (査読: 有)

[学会発表] (計 2 件)

① Kojima Y, Takeda K, Yagita H, Smyth MJ, Okumura K. 第 3 8 回日本免疫学会, 2008.12.1, 京都国際会議場

② Takeda K, Kojima Y, Yagita H, Smyth MJ, Okumura K. 第 3 8 回日本免疫学会, 2008.12.1, 京都国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 裕子 (KOJIMA Yuko)
順天堂大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 60231312

(3) 連携研究者

八木田 秀雄 (YAGITA Hideo)
順天堂大学・医学部・先任准教授
研究者番号: 30182306
竹田 和由 (TAKEDA Kazuyoshi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 80272821
中野 裕康 (NAKANO Hiroyasu)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 70276476
奥村 康 (OKUMURA Ko)
順天堂大学・医学部・特任教授
研究者番号: 50009700

(4) 研究協力者

原田 憲一 (HARADA Kenichi)
金沢大学・大学院医学研究科・准教授