

平成21年6月19日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19890250  
 研究課題名（和文） アデノシン誘導アポトーシスにおける細胞内情報伝達経路の同定、治療法確立への試み

研究課題名（英文） Identification of signal transduction underlying adenosine-induced apoptosis.

## 研究代表者

矢口 貴博（YAGUCHI TAKAHIRO）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：30434947

研究成果の概要：HuH-7 肝ガン細胞にアデノシン誘導アポトーシス（細胞死）を引き起こすとミトコンドリアの膜電位の低下がおこる。ミトコンドリア膜電位の低下は、アデノシンが細胞内に取り込まれ、AMPに変換された後、AMPKが活性化されることにより引き起こされることを明らかにした。さらにはミトコンドリアの膜電位保持に関わる Bcl ファミリーの一つである Bcl-XL が AMPK の標的となっていることが示唆された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：分子生物・生化学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：アデノシン、アポトーシス、HuH-7、Bcl-XL

## 1. 研究開始当初の背景

我が国において悪性新生物は死亡率第一位の疾病であり、年々増加傾向にある。高齢化が進み、今後この数はさらに増加していくものと考えられる。ガン治療には、「外科療法」、「化学療法」、「放射線療法」の3つがある。なかでも化学療法・放射線療法には種々の副作用がある。現在使用されている抗ガン剤のほとんどが、ガン細胞に対する選択性がなく、正常細胞も殺すのが現状である。従って、ガン細胞に対して選択的かつ特異的に作用し、正常細胞に対しては無害な抗ガン剤の開発は急務である。

## 2. 研究の目的

アデノシンデアミナーゼ（ADA）欠損症という疾病がある。ADAは生体内でアデノシンをイノシンに分解する酵素で、このADAを持たない患者の多くで消化管の潰瘍がよく起こるという報告がある。そのメカニズムの詳細は不明であるが、体内の高濃度アデノシンに細胞死誘導作用があると推察できる。そこで生体内物質であるアデノシンを利用してガン治療に応用しようとする当該研究の発想に至った。

### 3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア膜電位測定。

①アデノシン誘導アポトーシスの際、ミトコンドリア膜電位の変化について Depsipher 試薬を用いて検討。

②ミトコンドリア膜電位保持に関与する Bclファミリーの発現変化(mRNA、蛋白質レベル)および局在(ミトコンドリア or 細胞質)について検討。

(2) 強制発現用ベクターの構築。

①Bcl-XL、DIABLO のクローニングおよび発現ベクターの構築。

②GFP 融合蛋白質の構築。

(3) アデノシントランスポーターによって細胞内に取り込まれたアデノシンが AMP に変換されることで AMPK を活性化しているのかについて検討。

①アデノシン処理時の AMPK のリン酸化レベルの検討。

②AMPK の siRNA を用いたときのミトコンドリア膜電位の変化について検討。

(4) ミトコンドリア膜電位低下の際の Bcl-XL の役割解析。

①Bcl-XL 強制発現系を用いてアデノシン誘導ミトコンドリア膜電位の低下に与える Bcl-XL の効果について検討。

②超遠心法により細胞分画を行い Bcl-XL の局在について検討。

(5) ミトコンドリア膜電位低下時にみられる DIABLO の漏出について検討。

①DIABLO-GFP 融合蛋白質を用いて、アデノシン処理によりミトコンドリアから細胞質への漏出を検討。

②内因性の DIABLO の局在を、超遠心法を用いて細胞分画を行い検討 (Western blotting 法施行)。

③DIABLO の siRNA を用いてノックダウンしたときのアデノシン誘導アポトーシスに与える効果について解析。

(6) 漏出した DIABLO がアポトーシスに与

える効果について検討

①IAP-3 遺伝子のクローニングおよび発現ベクターの構築。

②アデノシン処理の際、細胞質内における DIABLO と IAP-3 の相互作用について検討(免疫沈降法を用いる)。

(7) DIABLO と IAP-3 の相互作用と Caspase-3 の活性化について検討。

①IAP-3 強制発現系を用いて、アデノシン処理後の Caspase-3 活性化を解析。

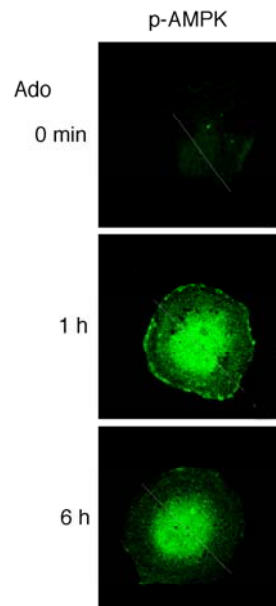
②IAP-3 の siRNA を用いてノックダウンした時の、アデノシン処理後の Caspase-3 の活性化について検討。

### 4. 研究成果

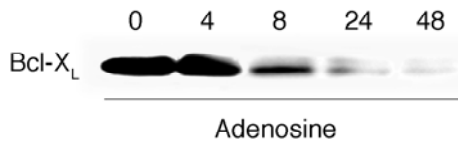
肝ガン細胞 HuH-7 を用いてアデノシン誘導アポトーシスの際の細胞内情報伝達経路について解析を行った。以前の研究において、アデノシンはアデノシントランスポーターを介して細胞内に取り込まれることでアポトーシスを誘導していることを明らかにしている。ここでは、取り込まれたアデノシンが AMP に変換された後の細胞内情報伝達経路を同定するものである。以下にその結果を報告する。

(1) アデノシンはアデノシントランスポーターにより細胞内に取り込まれ AMP に変換。

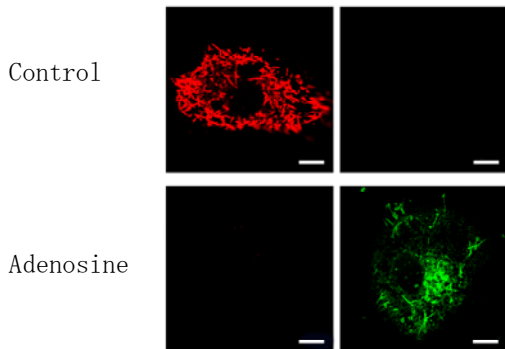
(2) 細胞内の AMPK リン酸化レベルが増加。



(3) ミトコンドリア膜電位保持に關与する Bcl-XL の発現減少。



①Bcl-XL の局在がミトコンドリア膜近郊から細胞質側へと変化。



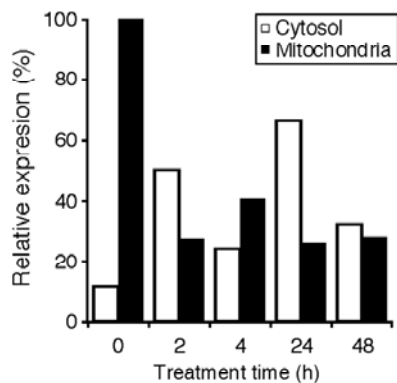
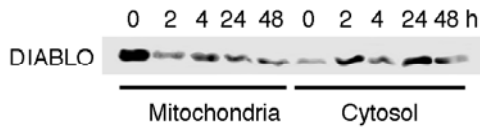
②Bcl-XL 強制発現によりアデノシン誘導ミトコンドリア膜電位の低下抑制。

(4) ミトコンドリア膜電位の低下による DIABLO の漏出確認。

①内因性の DIABLO の局在がアデノシン処理によりミトコンドリアから細胞質へと移行。

②アデノシンにより DIABLO-GFP 融合蛋白質がミトコンドリアから細胞質へと移行。

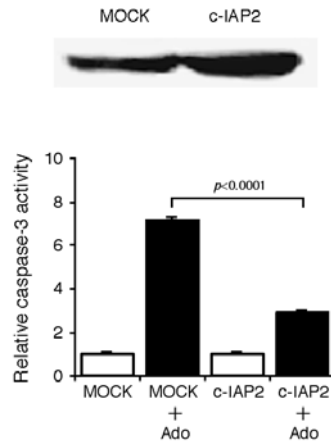
③DIABLO のノックダウンすることによりアデノシン誘導アポトーシスが減少。



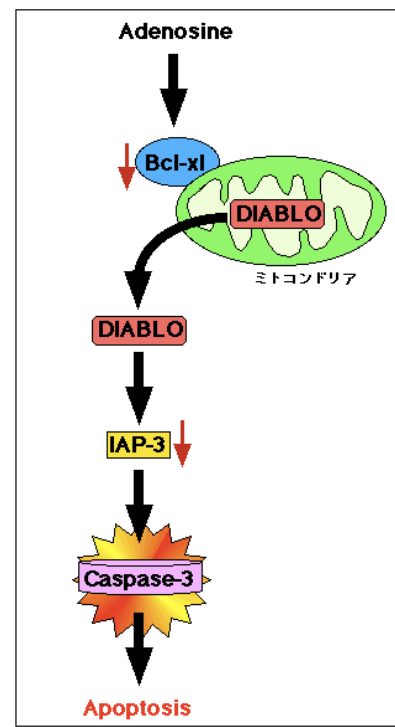
(5) DIABLO と IAP-3 相互作用と Caspase-3 の活性化について検討

①IAP-3 強制発現系を用いて、アデノシン処理を行うとアポトーシスの割合が低下。

②IAP-3 強制発現系を用いて、アデノシン処理を行うと Caspase-3 の活性化が抑制。



以上の結果をまとめると、



現在は、

(1) Bcl-XL が AMPK の直接のリン酸化の標的となることでミトコンドリア膜から細胞

質へと移行するののかについて考察。

①Bcl-XL のリン酸化部位に変異を入れ、AMPK のリン酸化部位を同定。

②変異 Bcl-XL 過剰発現系を用いて、アデノシン処理によるミトコンドリア膜電位変化について考察。

(2) 別の肝ガン細胞 HepG2 細胞においてもアデノシン誘導アポトーシスが見られることより、HuH-7 細胞と同様に細胞死のメカニズム解析。

## 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)

①Yang D. Yaguchi T. Hideyuki Yamamoto. Tomoyuki Nishizaki  
Intracellularly transported adenosine induces apoptosis in HuH-7 human hepatoma cells by downregulating c-FLIP expression causing caspase-3/-8 activation.  
Biochem Pharmacol. 73(10) 2007  
1665-1675 有

[学会発表] (計 5 件)

### ①矢口貴博

アデノシンはHuH-7、HepG2ヒト肝癌細胞を異なった経路でアポトーシスを誘導する  
分子生物学会 2008年12月9-12日 国際会議場

### ②矢口貴博

HuH-7、HepG2 におけるアデノシン誘導アポトーシスの際の遺伝子発現変化解析  
日本アポトーシス研究会 2008年8月1-2日 メルパルク京都

### ③楊冬琴

アデノシンはミトコンドリア障害/DIABLOの発現増大/IAP発現抑制/カスパーゼ-3活性化経路によりヒト HuH-7 肝癌細胞アポトーシスを誘導する。  
日本分子生物学会 2007年12月11-15日 パシフィコ横浜

### ④楊冬琴

Adenosine induces apoptosis in HuH-7 cells by downregulating c-FLIP expression causing caspase-3/8 activation.  
日本癌学会 2007年10月3-5日 パシフィコ横浜

### ⑤楊冬琴

アデノシンによって誘導される HuH-7 肝癌細胞アポトーシスの新規細胞内情報伝達経路

日本アポトーシス研究会 2007年8月3-4日 東邦大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢口 貴博

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：30434947

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者