

アポトーシスの生物学的意義と分子機構

井上 豊 治

Apoptosis : Its Biological Functions and Molecular Mechanism

Bunji INOUE

キーワード：アポトーシス, Fas, TNF 受容体, カスパーゼ, シトクローム c

概 要

アポトーシスは遺伝子に支配された細胞死（プログラム細胞死）で、形態学的・生化学的特徴によってネクローシスと区別されている。その生物学的意義は単に不必要な細胞の除去機構としてだけでなく、生体のホメオスタシスに積極的な役割を演じている。アポトーシスの機構解析は近年著しく進展し、その高度な制御機構の全容が次第に明らかにされつつある。

アポトーシスの分子機構は3つの素過程に分けて考えることができる。第1段階は、細胞内外に発生したアポトーシスの情報を細胞がどのように受容し、伝達するかという誘導過程である。第2段階は、その情報が核まで伝わり、遺伝子発現に変化がもたらされるアポトーシスの決定過程である。そして第3段階は、アポトーシス遺伝子産物の働きにより、DNAの断片化、核の凝縮と断裂、アポトーシス小体の形成と食細胞による貪食除去が行われるアポトーシスの実行過程である。本稿では、これらの素過程に関与する分子の作用と制御機構について最近の知見をまとめ概説した。

はじめに

近年、アポトーシスと呼ばれる細胞死の研究が盛んに行われるようになってきた。細胞死が個体発生や生体の恒常性維持など、基本的な生命現象に重要な役割を果たしていることが認められるようになってきたためである。さらに最近では、アポトーシスが癌、自己免疫疾患、ウイルス感染症など、さまざまな疾患の発症に深く関わっていることが明らかにされつつある。したがって、アポトーシスの分子機構を解明し生命現象における生理的な役割を明らかにすることは、アポトーシスに起因する各種疾患の病態を理解し、適切な治療法や治療薬を開発する上でも極めて重要と考えられる。本稿ではこれまでに明らかにされてきたアポトーシスの生物学的意義と分子機構について概説する。

過程では、死につつある細胞から放出されるものはないのでクリーンな細胞死であり、発生段階で細胞が秩序だって死滅する“プログラム細胞死”は、典型的なアポトーシスによる細胞死の例である^{2,3)}。

アポトーシスは、核クロマチンや細胞質の凝集、180塩基対よりなるヌクレオソーム単位でのDNAの切断、アポトーシス小体の形成に次ぎ、ついにはマクロファージや近隣細胞による貪食除去などの現象によって特徴づけられる。したがって、細胞が膨潤し内容物が流出するネクローシス (necrosis : 壊死) とは形態学的に区別されている (Fig. 1)⁴⁾。因に、apoptosis はギリシャ語の apo (離れて)、ptosis (落ちること) の合成語で、2番目のPは無声音、アクセントは後ろから2番目の音節につけるとされ、アポトーシスと書かれることが多い。

1. アポトーシスとは

アポトーシス (apoptosis) とは、1972年 Kerrら¹⁾によって見出された細胞の死滅過程の一種である。この

(平成13年9月6日受理)

川崎医療短期大学 第一看護科

The First Department of Nursing, Kawasaki College of Allied Health Professions

2. アポトーシスの生物学的意義

アポトーシスは、多くの生理的・病理的要因によって生じる。この細胞死は、生体内で生じた不要細胞や障害細胞を積極的に除去する機構として不可欠な役割を担っている。したがってその過剰な発現や阻害などの異常は、癌、エイズなどのウイルス感染症、自己免疫疾患、アルツハイマー病などの神経変性疾患、放射

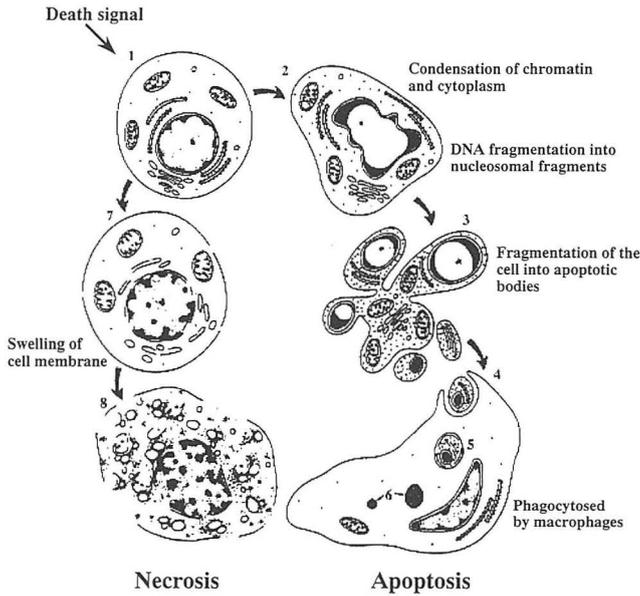


Fig. 1 Apoptosis and necrosis (文献⁹⁾より)

線障害などの様々な疾患の発症や老化と深く関わっている⁹⁾。

アポトーシスの存在意義を一言で言えば、「細胞は死して個体を生かす」の点にあると言える⁶⁾。その生体内での役割と機能は、大きく3つに分けることができる。第1は発生や成長過程における形態形成や組織形成に見られるもの、第2は生体の恒常性の維持に見られるもの、第3は生体防御に関わるアポトーシスである。以下にいくつかの例を挙げてこれらを説明する。

1) 形態形成・変態

個体発生における形態形成では、活発な細胞の増殖・分化が進む一方で、特定の時期に特定の部位で特定の細胞に細胞死が生じ、種に固有な形が作られる(プログラム細胞死)。このような発生過程におけるプログラム細胞死には、a) 形態形成のための細胞死、b) 組織形成のための細胞死、c) 系統発生論的な細胞死がある⁷⁾。

a) は、発生過程で常に見られる器官形成の際の造形や立体構造形成の際に生じる細胞死で、神経管の閉鎖、哺乳類や鳥類の四肢の形態形成、哺乳類の口蓋融合などはその例である。b) は組織の分化に関与する細胞死で、生殖管発生の際のウォルフ管やミュラー管の退縮がその典型例である。c) は、個体発生の過程における痕跡器官の一時的な出現と消失の際に見られるものでヒト胚における尾、前腎や中腎、動脈管などの消失がその例である。

2) 成体の恒常性の維持

生物が生存していくためには「内部環境の恒常性(ホメオスタシス)の維持」が重要である。そのために発生の際だけでなく、成体においても常時大規模な生理的細胞死が起こっている。即ち、臓器を構成する細胞の増殖と機能不全に陥ってくる細胞のアポトーシスによる除去によって細胞動態のバランスが保たれ、臓器の大きさとその機能のホメオスタシスが維持されている。

a. ホルモン依存性の組織退縮

副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)は脳下垂体から放出され、副腎皮質機能を促進するホルモンである。これが欠乏すると副腎の重量低下や細胞分裂像の減少と共に、アポトーシスの増加が観察されている。ACTHの低下は新生児期に生理的に起こり、生後数日間、副腎のアポトーシスが急速に増加する。

前立腺の細胞は、アンドロゲンによる細胞増殖刺激と細胞死の抑制という制御を受けている。ところがラットを去勢すると12~24時間でアンドロゲンレベルが低下し、細胞の増殖速度が減少しはじめる。やがてアポトーシスが起これば組織が退縮する。このことから、アンドロゲンは前立腺細胞の生存因子と考えることができる。

b. 正常な細胞交代

われわれの体内では、毎日膨大な数の細胞が作られ、成人ではそれとほぼ同数の細胞が失われている。即ち、体内の各種臓器では常に活発な細胞増殖が行われ、それに見合ったアポトーシスが常に生じているのである。消化管上皮、皮膚、増血組織、精巣などの細胞再生系と呼ばれる臓器のうち、典型的な細胞再生系である増血組織^{8,9)}では、細胞の分化と制御にアポトーシスが重要な役割を果たしている。

3) 生体防御

免疫系は自己と非自己を認識し、非自己を排除するための重要な生体防御機構であって、その中心的な役割を担っているのがT細胞である。T細胞に関わるアポトーシスは次の3つに大別される。まず、骨髄に由来する増血幹細胞が胸腺内でT細胞として分化・成熟する過程で、自己反応性のクローンを積極的に除去するアポトーシス(負の選択 negative selection)である。次は末梢でのT細胞のアポトーシスで、胸腺での負の選択を免れた自己反応性T細胞の除去と、非自己を排除するために増殖したクローンを元に戻す反応である。最後は、細胞障害性T細胞(CTL, キラーT細胞)

胞)が標的細胞に起こさせるアポトーシスである。即ち、アポトーシスは免疫担当細胞であるリンパ球の形成と“非自己”細胞の排除という形で、二重に免疫系に関わっていることになる。

そのほか多様な病理的要因によってもアポトーシスが生じ、その生体防御反応としての役割が次第に明らかにされつつある。

3. アポトーシスの過程

アポトーシスの分子機構についての研究が現在活発に進められているが、まだ不明な点が多い。ここではアポトーシスの分子機構を理解し易くするために、便宜的にアポトーシスを3つの素過程に分けて述べることにする (Fig. 2)¹⁰⁾。

まず最初に、様々な刺激によってアポトーシスのシグナルが入力されるアポトーシスの誘導過程がある。次にそのシグナルがクロストーク (相互交信) してアポトーシスのスイッチが入る決定過程がある。ここでアポトーシスは可逆性から不可逆性に移行し、最終的にその出力であるアポトーシスの実行過程に入る。

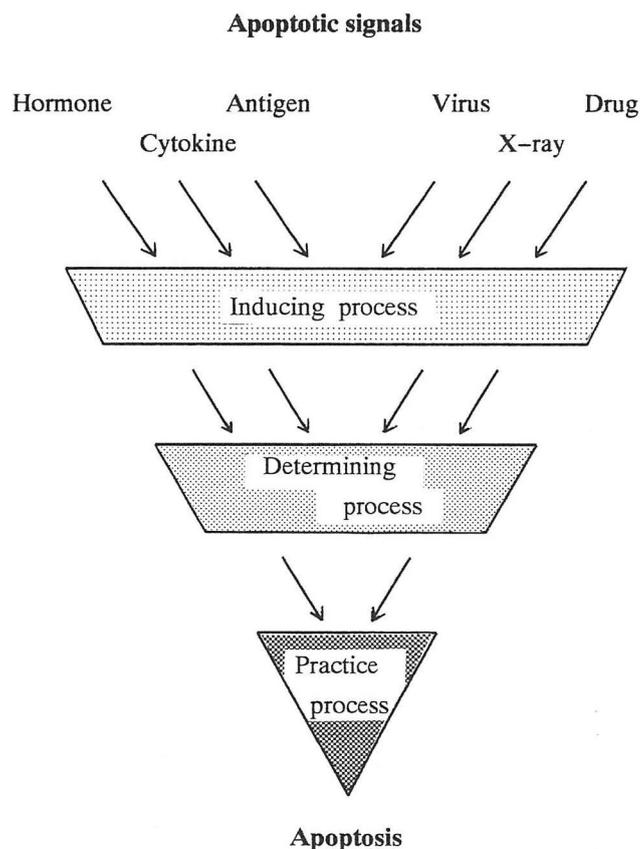


Fig. 2 Processes of apoptosis (文献¹⁰⁾より)

1) 誘導過程

アポトーシスの誘因となる情報には、各種物質代謝系の変動などの内的要因のほか、細胞外からの種々の生理的・非生理的な刺激がシグナルとなって誘導されることが明らかになっている。これらの情報を細胞がどのように受容し、伝達するかが第1段階の誘導過程である。外的な情報 (第1次情報) の多くは細胞膜の受容体を介して細胞内に伝達される。この際、細胞内には新たなシグナル (第2次情報) が生じる。この細胞内情報伝達系がアポトーシスに特有なものなのか、あるいは常時作動しているものと同じ情報伝達系なのか、また、様々なシグナルのアンバランスによって引き起こされるのかなど、多くの問題が残されている。

2) 決定過程

第2次情報が核まで伝わり、アポトーシス関連遺伝子が発現したり、不活性型としての既存のアポトーシス因子が活性化されるのが第2段階の決定過程である。最近、この決定機構には c-myc, bcl-2 ファミリーなど多くの癌関連遺伝子が関与していることが明らかになってきた。これらの遺伝子産物によってアポトーシス関連遺伝子が発現し、アポトーシス誘導や抑制蛋白質の出現、あるいはアポトーシス因子の活性化や抑制蛋白質の消失が起こる。またサイクリン-Cdk (cyclin dependent kinase) 複合体による細胞周期の調節もアポトーシスの決定に深く関わっている。

このように、この過程ではアポトーシスを促進する Bax, Bid など、またアポトーシスを抑制する Bcl-2, Bcl-X_L など多数の因子による複雑な制御機構が解き明かされようとしている。後で述べるように、細胞の生存促進因子によるアポトーシスシグナルの抑制機構とアポトーシス促進因子による生存シグナル抑制機構のクロストークの結果、細胞の生死が決定されるのである。

3) 実行過程

第3段階はアポトーシスの実行過程である。アポトーシス実行因子の出現により、アポトーシスの過程は共通経路に進行すると考えられている。この過程でDNAの規則的な断片化を中心に核の凝縮と断裂、細胞サイズの縮小などが起こり、やがて細胞自身が断片化してアポトーシス小体が形成される。そして最終的には、アポトーシス小体が貪食細胞によって貪食除去されていく。この実行過程にはラミンや PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) の分解、CAD (caspase activated DNase) などが関与するがその詳細な機構はなお明

らかでない。

したがって、これら3つの素過程に関与する分子を同定し、その制御機構を解明することがアポトーシスの全容を明らかにし、その生物学的意義を理解する上で急務となっている。

4. アポトーシスの分子機構

アポトーシスの機構解析は近年著しく進展し、一部の分子機構についてはかなり詳細に解明されてきた¹¹⁾ (Fig. 3)。その1つは腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor: TNF)や Fas (FS7 associated surface antigen) リガンドによる細胞表面受容体を介するアポトーシス誘導機構である。これらの細胞外因子は、それぞれ特異的な受容体である TNF レセプター(TNFR)や Fas 抗原に“殺細胞シグナル分子”として結合し、カスパーゼ・カスケードを活性化することによって^{12,13)} アポトーシスの情報を細胞内に伝達する¹⁴⁾。他の一つは、ミトコンドリアから遊離するシトクローム c (Cyt. c) を含む Apaf (apoptosis protease-activating factor) 複合体形成によるアポトーシス誘導機構である^{15~17)}。

最近の研究から、TNF- α や Fas リガンドのような受容体を介したシグナルで活性化されるカスパーゼ-8が Bid と呼ばれる細胞質因子の Bcl-2 ファミリー蛋白質を切断して活性化し、ミトコンドリアから Cyt. c を遊離させることが明らかになった¹⁸⁾。その結果、受容体を介したアポトーシスの一部がミトコンドリアを経由していることが示され、これら二つのアポトーシス誘導機構が相互に関連していることが明らかにされた。

そのほかにも、カスパーゼ・カスケードとは無関係な転写因子の活性化によるアポトーシス誘導¹⁹⁾や、ミトコンドリアに由来する AIF (apoptosis inducing factor) によるアポトーシス誘導²⁰⁾などが見出されており、いずれも現在、分子レベルの解析が精力的に進められている。さらに、アポトーシスの過程にリソゾーム酵素であるカテプシン B や D が関与することも明らかとなり^{21~23)}、リソゾーム酵素がアポトーシスの実行因子の一員であることも認められるようになってきた。

1) カスパーゼの活性化機構とアポトーシス

アポトーシスの過程ではカスパーゼと呼ばれるシステインプロテアーゼの活性化が重要な役割を果たして

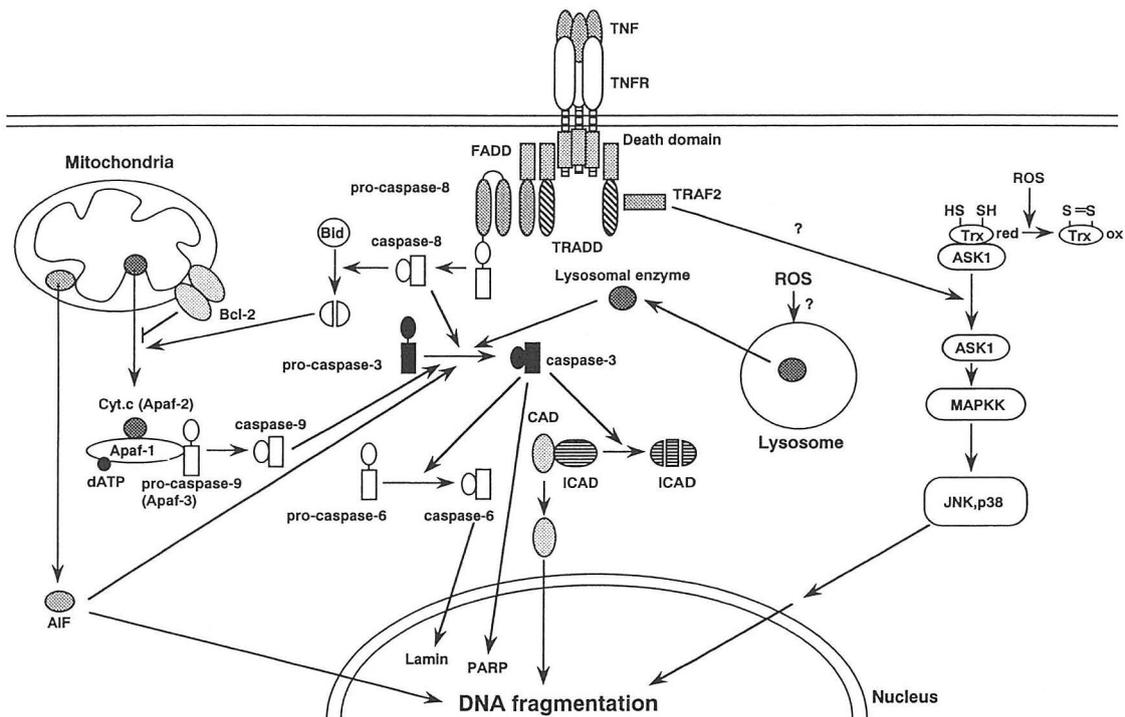


Fig. 3 A proposed mechanism of apoptosis

AIF; apoptosis inducing factor, Apaf; apoptotic protease activating factor, ASK-1; apoptosis signal-regulating kinase-1, CAD; caspase activated DNase, Cyt. c; cytochrome c, FADD; Fas-associated protein with death domain, ICAD; inhibitor of CAD, JNK; c-Jun N-terminal kinase, ROS; reactive oxygen species, TNF; tumor necrosis factor, TNFR; TNF receptor, TRADD; TNF receptor-associated protein with death domain, TRAF 2; TNF receptor-associated factor 2, Trx; thioredoxin (文献¹¹⁾より)

いる。ヒトの場合、これまでに10種類以上のカスパーゼファミリー遺伝子が報告されており、Nicholsonら²⁴⁾は、ペプチドライブラリーを用いた解析からカスパーゼを3つのグループに分類している (Table 1)。

これらの中でグループIIに属するカスパーゼは、アポトーシスを引き起こす分子の分解及び活性化に関与すると考えられているが、中でもカスパーゼ-3はカスパーゼ・カスケード中の下流に位置し、アポトーシスの実行に関与していることが明らかになっている。このカスパーゼ-3は32kDaの不活性型で生合成され(プロカスパーゼ-3)、カスパーゼ・カスケード中の上流に位置する他のカスパーゼ(カスパーゼ-8、-9)や、グランザイムBのようなプロテアーゼによって175番目のアスパラギン酸の後ろで切断されて20kDaと12kDaの断片を生じ、これらが各二分子ずつ結合したヘテロ4量体を形成することで活性型となる。その後、自己分解によりプロドメインを切断して、活性型カスパーゼ-3として機能することが明らかにされている (Fig. 4)。

細胞死のシグナルによるカスパーゼ-3の活性化は、Fas や TNFR などの受容体を介する経路と、ミトコンドリアから放出される Cyt. c による経路に大別される。

(1) 受容体を介するカスパーゼ-3の活性化

TNF- α や Fas リガンドがそれぞれに特異的な受容体に結合すると、受容体の細胞質側にある死の領域 death domain に、アダプター蛋白質 (TRADD, FADD/MORT1) が結合する。続いてこのアダプター蛋白質にプロカスパーゼ-8 が会合してアポトーシスを誘導す

るための高次蛋白質複合体 (death inducing signaling complex : DISC) が形成される¹²⁾。この状態でプロカスパーゼ-8は分解、活性化され、活性型カスパーゼ-8がプロカスパーゼ-3を分解し、活性型カスパーゼ-3を生じることが明らかにされている (Fig. 3)。

(2) ミトコンドリア因子を介するカスパーゼ-3の活性化

ミトコンドリアにアポトーシスシグナルを伝える分子は、主に Bax や Bid などのアポトーシス促進型の Bcl-2 ファミリー蛋白質である。ミトコンドリアがアポトーシスのシグナルを受けるとその膜透過性が亢進し、膜間スペースに存在する Cyt. c や Smac (second mitochondria-derived activator of caspase) などの apoptogenic な蛋白質が細胞質に漏出する。Cyt. c 漏出機構については、ミトコンドリア外膜に局在する

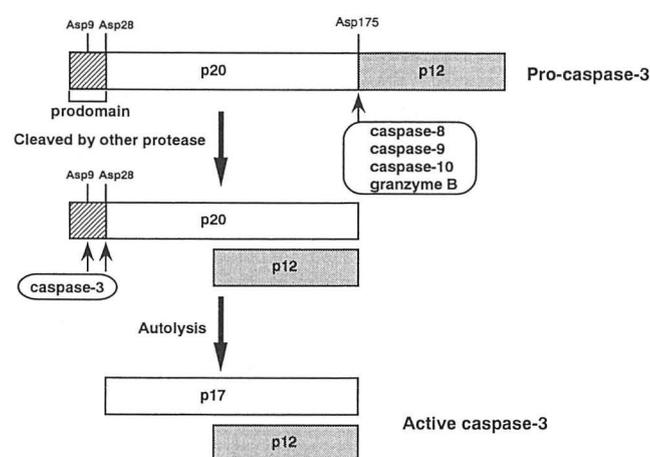


Fig. 4 Processing of caspase-3 (文献²⁴⁾より)

Table 1 The specificity and functions of caspases

Caspase	Optimum sequence (P ₄ -P ₁)	Functions
Group I		
Caspase-1 (ICE)	WEHD	Maturation and secretion of cytokine
Caspase-4 (Tx, ICERel-II, Ich-2)	(W/L) EHD	Apoptosis was induced by overexpression of these caspases.
Caspase-5 (Ty, ICERel-III)	(W/L) EHD	
Group II		
Caspase-2 (Ich-1)	DEHD	Cleavage and activation of apoptosis inducing molecule
Caspase-3 (CPP32)	DEVD	(PARP, ICAD, PKC δ)
Caspase-7 (CMH-1, Mch3, ICE-LAP3)	DEVD	
<i>C. elegans</i> Ced-3	DETD	
Group III		
Caspase-6 (Mch6)	VEHD	Cleavage and activation of group II caspases
Caspase-8 (FLICE, Mach, Mch5)	LETD	Cleavage of other substrates
Caspase-9 (Apaf-3, ICE-LAP6, Mch6)	LETD	
Granzyme B	IEPD	Serine protease

(文献²⁴⁾より)

VDAC (voltage dependent anion channel), 内膜の ANT (adenine nucleotide translocator, ATP/ADP 交換輸送体), マトリックスのサイクロフィリン D などで構成される蛋白質複合体チャネル (permeability transition pore: PTP) に Bax などのアポトーシス促進蛋白質が結合することによってチャネルが開口し, Cyt. c が漏出する. 一方, Bcl-2 や Bcl-X_L などのアポトーシス抑制蛋白質が結合するとチャネルが閉じて Cyt. c の漏出が抑制される²⁵⁾. Cyt. c の漏出機構については, 上記以外にミトコンドリアの浸透圧変化による外膜の機械的破裂によるという説²⁶⁾や, Bax 単独で形成されるチャネルを介するという説²⁷⁾があるが, 両者とも実証性が乏しい.

このような機構で細胞質に漏出した Cyt. c (Apaf-2) は, dATP 存在下で細胞質に分布する Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) に結合する. 続いてこの複合体にプロカスパーゼ-9 (Apaf-3) が会合することで, プロカスパーゼ-9 は分解を受けて活性型カスパーゼ-9 になり, さらにこの活性型カスパーゼ-9 はプロカスパーゼ-3 を分解して活性型カスパーゼ-3 へと導く^{15~17)} (Fig. 4).

カスパーゼ-3 の基質としてはさまざまな蛋白質が明らかにされているが, 中でも CAD に結合して活性を阻害している ICAD (inhibitor of CAD) は, カスパーゼ-3 で直接分解されることが明らかにされている. この ICAD の分解により遊離状態となった CAD は核内に入り, DNA を分解してアポトーシス特有の DNA の断片化を生ずると考えられている^{14,28)}.

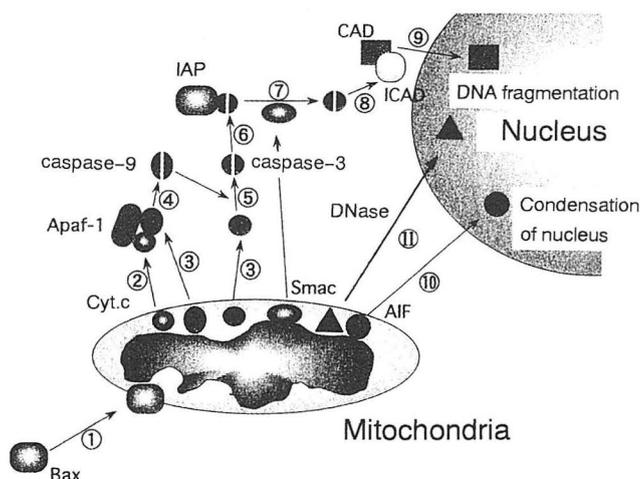
最近, ミトコンドリアは生体エネルギー産生の中で

あるばかりでなく, アポトーシスを制御する重要な場でもあることが認識されるようになった. ミトコンドリアにおけるアポトーシスの調節は, おおよそ次のようにに要約される²⁹⁾ (Fig. 5).

①Bax蛋白質 (Bcl-2ファミリーの一員) がアポトーシスの指令を受けてミトコンドリアに侵入すると, ②Cyt. c がミトコンドリアから細胞質中に漏出する. ③次いで不活性型のカスパーゼ-3 やカスパーゼ-9 がミトコンドリアから放出される. ④Cyt. c, Apaf-1, カスパーゼ-9 が共同してカスパーゼ-9 の一カ所を切断し, カスパーゼ-9 は活性型となる. ⑤カスパーゼ-9 は不活性型のカスパーゼ-3 を活性化する. ⑥IAP (inhibitor of apoptosis protein) がカスパーゼ-3 と結合して, カスパーゼ-3 の活性を一時停止させ, 簡単にはアポトーシスが進行しないようにしておく. ⑦蛋白質 Smac がミトコンドリアから放出され, カスパーゼ-3 と IAP の結合を切断する. ⑧これによってカスパーゼ-3 が活性を示すようになり, CAD と ICAD の結合が切断される. ⑨CAD は核へ移行して DNA が断片化され, ⑩一方, ミトコンドリアから AIF が放出されて核へ移行し, 核の凝集が起こる. ⑪さらにごく最近, エンドヌクレアーゼ G がミトコンドリアから放出されて核へ移行し, DNA の断片化に関わっているとの報告がある³⁰⁾.

そのほか, ガングリオシド GD3 がミトコンドリアを作用部位として, 細胞のアポトーシスを誘導することが明らかになってきた³¹⁾. 即ち, Fas から FADD を介してカスパーゼ-8 の活性化に至るシグナルがミトコンドリアの膜透過性を変化させ, アポトーシス誘導因子 (Cyt. c, AIF) を放出してカスパーゼ-9 の活性化を導く. そのとき同時に, カスパーゼ-8 を活性化するシグナルは PC-PLC (phosphatidylcholine specific phospholipase C) を介して ASM (acidic sphingomyelinase) を活性化してセラミドを生成する. セラミドはゴルジ体に移行し, GD3 合成酵素 (α 2, 8-シアル酸転移酵素) を活性化する. 新たに合成された GD3 はミトコンドリアに移行し, 膜電位低下などのアポトーシスのプロセスを促進するというものである.

以上のような仕組みは, 誤作動によるアポトーシスが簡単に起きないようにミトコンドリアから多数の蛋白質が放出され, 絶妙の調節が行われていることを示唆するもので, アポトーシスの調節におけるミトコンドリアの役割が一層重要視されつつある.



2) リソゾームのアポトーシスへの関与を示唆する研究
 リソゾーム酵素が細胞のネクローシスに関与しているという考えはこれまで一般的に受け入れられてきた。これに対してアポトーシスにおけるリソゾームの関与についての知見は少ない。しかし典型的なアポトーシスとして知られるオタマジャクシ尾部の消失では、尾部の短縮と平行したリソゾーム酵素の増加が観察され³²⁾、リソゾーム酵素がアポトーシスに関与する可能性は古くから示唆されていた。リソゾーム酵素が積極的にアポトーシスに関与することを示したこれまでの研究としては、(1)過剰発現系や阻害剤を用いてリソゾーム酵素(カテプシン群)の関与を示した研究²¹⁻²³⁾、(2)アクリジンオレンジのようなリソゾーム指向性色素を用いて、アポトーシスの際にリソゾームの崩壊が生じていることを示した研究³³⁻³⁶⁾、(3)リソゾームのアルカリ化³⁷⁾や酸化的ストレス³⁴⁾によるアポトーシス誘導の解析などが挙げられる。

これらのうち(2)に関しては、マクロファージ様J-774細胞にアクリジンオレンジを取り込ませ、H₂O₂処理するとOH・ラジカルが発生し、脂質過酸化が生じてリソゾーム酵素が細胞質に遊離することが観察されている³⁸⁾。また、(3)に関してNishiharaら³⁷⁾は、液胞型H⁺-ATPase阻害剤であるコンカナマイシンAやバフィロマイシンAがリソゾームをアルカリ化することにより細胞のアポトーシスを誘導することを示した。さらに、肝門脈結紮後の再還流による肝細胞のアポトーシスでは、虚血—再還流に伴う活性酸素の生成によってリソゾーム酵素が細胞質に遊離すること^{1,39)}、リソゾームを含む粗ミトコンドリアをH₂O₂とFe³⁺ADPで処理するとフェントン反応によりOH・ラジカルが形成され、膜の脂質過酸化に伴ってリソゾーム酵素が遊離すること^{38,40)}などが示されている。

Ishisakaら^{41,42)}は、これらの研究とは別の観点からリソゾーム酵素がアポトーシスに関与している可能性を示した。即ち、ラット肝から分離したリソゾームをジギトニンや活性酸素生成系で処理するとリソゾーム酵素が遊離し、この遊離した酵素がアポトーシスの実行段階で重要な役割を果たすカスパーゼ-3を活性化すること、さらにこの活性化に特異的なシステインプロテアーゼ(カテプシンL様プロテアーゼ)が関与していることを明らかにした。

3) キナーゼを介するアポトーシスの制御に関する研究
 細胞内の情報伝達には種々のキナーゼが関与しており、キナーゼの活性化による蛋白質のリン酸化によ

て情報が伝えられる。アポトーシスの制御においても生存シグナルによるMAPK (mitogen-activated protein kinase) やPI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), Akt (a serine/threonine kinase) などのキナーゼの活性化で転写因子NF- κ B (nuclear factor κ B), CREB (CRE-binding protein) が活性化され、Bcl-2やIAPの発現が促進される結果、アポトーシスが抑制されることで細胞の生死が調整されている(Fig. 6)⁴³⁾。しかしFig. 6に示すように、NF- κ BはTNF α などのアポトーシスシグナルによっても活性化され、また、AktはBadやカスパーゼ-9をリン酸化することによってアポトーシス誘導を抑制することが知られている。このように生存シグナルとアポトーシスシグナルは互いに抑制し合うことによって細胞の生死を制御していると考えられ、両者のクロストークの分子機構についての研究成果が期待されている。

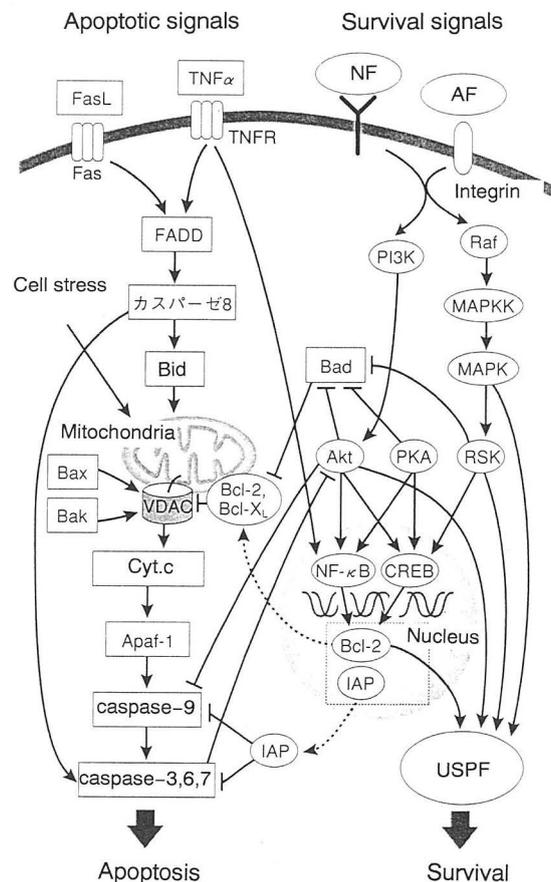


Fig. 6 Crosstalk between survival signals and apoptotic signals
 NF : nutrition factor, AF : adhesion factor
 USPF : unknown survival promotion factor
 → : positive control, —| : negative control
 ○ : survival promotion, □ : apoptosis promotion
 (文献⁴³⁾より改変)

4) P53によるアポトーシス誘導に関する研究

P53は多くのヒト癌細胞で高頻度に遺伝子変異が検出されている代表的な癌抑制遺伝子である。その遺伝子産物であるP53蛋白質は核内で転写活性化因子として多くの標的遺伝子の転写を活性化し、それらの遺伝子産物を介して細胞周期やDNA修復、アポトーシスの誘導などを制御している⁴⁴⁾。特にP53によるアポトーシスの誘導に関しては、DNAの損傷を受けた細胞や癌遺伝子が活性化した異常細胞をアポトーシスによって排除することが、P53の重要な癌抑制機構と考えられている⁴⁵⁾。最近、P53によって発現誘導されるアポトーシスの実行に働く新たな因子として、Noxa⁴⁶⁾やPUMA⁴⁷⁾が同定されている。これらのうちNoxaについては、ミトコンドリア上でこれがBcl-2やBcl-X_Lと結合することによりCyt. cの漏出とカスパーゼの活性化を介してアポトーシスを誘導するものと考えられている。

5. 最近の研究から

ここで、筆者が関係する研究グループによる最近の研究結果から、二題について概要を紹介する。

1) カルニチンによるアポトーシス制御とその機構^{48~50)}

L-カルニチンはミトコンドリア内膜の脂肪酸輸送に必須で、脂肪酸のβ酸化によるエネルギー獲得に大きな役割を果たしている。また、L-カルニチンは脂肪酸によって誘導されるミトコンドリアの膜透過性の変化を抑制し、心筋の虚血一再還流障害を軽減し、アルツハイマー疾患やAIDSに対する改善作用が知られている。そこでL-カルニチンのミトコンドリア機能とアポトーシスに及ぼす影響を明らかにする目的で、分離ミトコンドリアの酸化的リン酸化能、膜透過性の変化によるミトコンドリアの膨潤や膜電位変化、Cyt. cの流出などについて、また、PC12細胞やオタマジャクシ尾部のアポトーシスについてL-カルニチンの作用を検索した。

その結果、①脂肪酸やチロキシンによる分離ミトコンドリアの膜透過性変化やCyt. cの流出はL-カルニチンで抑制され、その作用はcyclosporine Aに類似すること、②L-カルニチンは分離ミトコンドリアの試験管内劣化を抑制し、分離24時間後も高いリン酸化能が維持されること、③PC12細胞の血清除去によるアポトーシスは、L-カルニチン前処理で抑制されること、④チロキシンによるオタマジャクシ尾部のアポトーシスもL-カルニチン前処理で強く抑制されること、など

が明らかになった。

以上の結果から、L-カルニチンはミトコンドリアの膜透過性の変化を阻止することによってアポトーシスを抑制し、一部のアポトーシスはL-カルニチンと脂肪酸の量的均衡によって調節されていることが示唆された。

2) 前骨髄球性白血病細胞における局部麻酔剤誘導アポトーシス⁵¹⁾

麻酔薬は生体膜のリン脂質に作用し、神経細胞だけでなく非神経細胞にも影響を及ぼすことが知られている。また、局部麻酔薬の一つであるジブカインは細胞膜の内層に取り込まれ、プロテインキナーゼCやフォスホオリパーゼA₂などの膜局在性酵素活性に作用することが明らかにされている。さらに最近、ジブカインが培養神経芽細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている⁵²⁾が、その分子機構については十分な解析が行われていない。そこでわれわれは、ジブカインの非神経細胞に対する作用とその分子機構を明らかにする目的で、前骨髄球性白血病細胞(HL-60)を用い、細胞の分化、DNAの断片化とラダー形成、各種カスパーゼの活性化、ミトコンドリア膜透過性の変化とCyt. cの流出などへの影響について検索した。

その結果、ジブカインは、①HL-60細胞の細胞周期と顆粒球への分化を阻止することなく細胞の増殖を阻害すること、②典型的なDNAの断片化とラダー形成が誘導されること、③カスパーゼ-3、-6、-8および-9の活性を促進させること、④ミトコンドリアの膜電位を脱分極し、Cyt. cの細胞質への流出を促進させること、⑤ジブカイン作用後のカスパーゼによってBidが活性化されること、などが明らかになった。

以上の結果から、ジブカインが、Bidの活性化とミトコンドリア膜電位の脱分極による膜透過性の変化によってCyt. cの流出を促進するとともに、カスパーゼ・カスケードを活性化することによってHL-60細胞のアポトーシスを誘導することが示唆された。

おわりに

最近のアポトーシスに関する研究はめざましく、発表論文の数もこの数年間は年間1万件にも達するといわれている。その結果、アポトーシスのメカニズムに関する研究も飛躍的に進展し、その全体像が次第に明らかにされつつある。しかしその反面、この分野の研究は過熱のあまり、十分確認されていないデータの氾濫による混乱状態にあるとの反省点も指摘されている。

その一方で、この分野の研究成果が癌やウィルス感染、神経疾患などの治療に応用できる可能性について大きな期待が寄せられている。こうした中で、本稿ではめざましい勢いで解明されつつあるアポトーシスの分子機構を中心に基礎的研究の現状を紹介してきたが、その目的が十分達成されていないとすればそれは筆者の力量不足によるもので、ご容赦願いたい。

謝 辞

本稿の作成に当たり、貴重な資料の提供とご校閲を賜りました倉敷成人病センター医科学研究所所長 内海耕髓博士に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Kerr JFR, Wyllie AH & Currie AR : Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer* 26 : 239-257, 1972.
- 2) Cohen JJ : Apoptosis, *Immunol. Today* 14 : 126-130, 1993.
- 3) Thompson CB : Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* 267 : 1456-1462, 1995.
- 4) Kerr JFR, Winterford CM & Harmon BV : Apoptosis, *Cancer* 73 : 2013-2026, 1994.
- 5) Carson DA & Ribeiro JM : Apoptosis and disease, *Lancet* 341 : 1251-1254, 1993.
- 6) 山田 武, 大山ハルミ, 刀祢重信, 木崎治俊, 田沼靖一 : アポトーシス—細胞死の機能と機構, 東京 : 日経サイエンス社, p 50, 1995.
- 7) Glüksmann A : Cell death in normal vertebrate ontogeny, *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 26 : 59-86, 1951.
- 8) Koury MJ & Bundurant MC : Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed cell death in erythroid progenitor cells, *Science* 248 : 378-381, 1990.
- 9) Williams GT, Smith CA, Spooner T, Dexter TM & Taylor DR : Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis, *Nature* 343 : 76-79, 1990.
- 10) Tanuma S : In : Apoptosis in normal development and in cancer, Sluysers M ed, London : Taylor & Francis, pp 39-59, 1996.
- 11) 石坂瑠美, 内海俊彦, 矢吹宗久, 勝沼信彦, 内海耕髓 : 特集リソソーム最近の研究, リソソームとアポトーシス, 生体の科学50 : 117-126, 1999.
- 12) Nagata S : Apoptosis by death factor, *Cell* 88 : 355-365, 1997.
- 13) Nicholson DW & Thornberry NA : Caspase : killer proteases, *Trends Biochem. Sci.* 22 : 299-306, 1997.
- 14) Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A & Nagata S : A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature* 391 : 43-50, 1998.
- 15) Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R & Wang X : Induction of apoptotic program in cell-free extracts : requirement for dATP and cytochrome c, *Cell* 86 : 147-157, 1996.
- 16) Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmed M, Alnemri ES & Wang X : Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell* 91 : 479-489, 1997.
- 17) Reed JC : Cytochrome c : can't live with it-can't live without it, *Cell* 91 : 559-562, 1997.
- 18) Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C & Wang X : Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors, *Cell* 94 : 481-490, 1998.
- 19) 一條秀憲, 齊藤正夫, 西頭英起, 武田弘資, 宮園浩平 : ストレスによる細胞死 ASK 1-MAK 経路を介したシグナル伝達, *細胞工学* 17 : 914-951, 1998.
- 20) Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, Daugas E, Geuskens M & Kroemer G : Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease, *J. Exp. Med.* 184 : 1331-1341, 1996.
- 21) Roberts LR, Kurosawa H, Bronk SF, Pesmier PJ, Agellon LB, Leung WY, Mao F & Gores GJ : Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes, *Gastroenterology* 113 : 1714-1726, 1997.
- 22) Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O & Kimchi A : Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon- γ , Fas/APO-1 and TNF- α , *EMBO J.* 15 : 3861-3870, 1996.
- 23) Shibata M, Kanamori S, Isahara K, Ohsawa Y, Konishi A, Kametaka S, Watanabe T, Ebisu S, Ishida K, Kominami E & Uchiyama Y : Participation of cathepsin B and D in apoptosis of PC12 cells following serum deprivation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 : 199-203, 1998.
- 24) Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Timkey T, Garcia-Galvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman TK & Nicholson DW : A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis, *J. Biol. Chem.* 272 : 17907-17911, 1997.
- 25) Shimizu S, Narita M & Tsujimoto Y : Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC, *Nature* 399 : 483-487, 1999.
- 26) Vander Heiden MG, Chandel EK, Williamson EK, Schumacker PT & Thomson CB : Bcl-X_L regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria, *Cell* 91 : 627-637, 1997.
- 27) Saito M, Stanley JK & Paul HS : Bax-dependent trans-

- port of cytochrome c reconstituted in pure liposomes, *Nature Cell Biol.* 2 : 553–555, 2000.
- 28) Liu X, Zou H, Slaughter C & Wang X : DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis, *Cell* 89 : 175–184, 1997.
 - 29) 瀬名秀明, 太田成男 : ミトコンドリアと生きる, 東京 : 角川書店, pp 128–152, 2000.
 - 30) Lily YL, Luo X & Wang X : Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria, *Nature* 412(5) : 95–99, 2001.
 - 31) 古川鋼一, 福本 敏, 井上雅博, 岡田雅彦, 大石秀人, 岡島徹也, 古川圭子 : 特集 糖鎖リモデリングが明らかにする糖鎖の機能, *ガングリオシド GD3 と増殖・アポトーシスシグナル*, *細胞工学*20(2) : 211–216, 2001.
 - 32) Tata JR : Hormonal regulation of metamorphosis, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 25 : 163–181, 1971.
 - 33) Brunk UT, Dalen H, Roberg K & Hellquist HB : Photooxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts, *Free Radic. Biol. Med.* 23 : 616–626, 1997.
 - 34) Roberg K & Ollinger K : Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuring apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes, *Am. J. Pathol.* 152 : 1151–1156, 1998.
 - 35) Neuzil J, Svensson I, Weber T, Weber C & Brunk UT : α -Tocopheryl succinate induced apoptosis in Jurkat T cells involves caspase-3 activation, and both lysosomal and mitochondrial destabilisation, *FEBS Lett.* 445 : 295–300, 1999.
 - 36) Ollinger K & Brunk UT : Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage, *Free Rad. Biol. Med.* 19 : 565–574, 1995.
 - 37) Nishihara T, Akifusa S, Koseki T, Kato S, Muro M & Hanada N : Specific inhibitors of vacuolar type H⁺-ATPase induce apoptotic cell death, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212 : 255–262, 1995.
 - 38) Zdzolsek JM, Zhang H, Roberg K & Brunk UT : H₂O₂-mediated damage to lysosomal membrane of J-774 cells, *Free Rad. Res. Comms.* 18 : 71–85, 1993.
 - 39) 内山安男 : アポトーシスと病態, 発生, 蛋白質核酸酵素 42 : 2311–2316, 1997.
 - 40) Zdzolsek JM & Svensson I : Effect of reactive oxygen species on lysosomal membrane integrity. A study on a lysosomal fraction, *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 60 : 401–406, 1993.
 - 41) Ishisaka R, Utsumi T, Yabuki M, Kanno T, Inoue M & Utsumi K : Activation of caspase-3-like protease by digitonin-treated lysosomes, *FEBS Lett.* 435 : 233–236, 1998.
 - 42) Ishisaka R, Kanno T, Akiyama J, Yshioka T, Utsumi K & Utsumi T : Activation of caspase-3 by lysosomal cysteine proteases and its role in 2, 2'-azobis-(2-aminopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced apoptosis in HL-60 cells, *J. Biochem.* 129 : 35–41, 2001.
 - 43) 鶴田文憲, 増山典久, 後藤由季子 : 特集 シグナル伝達のクロストークを解く, 生存シグナルとアポトーシスシグナルのクロストーク, *実験医学*18 : 1384–1390, 2000.
 - 44) 田中信之 : 特集 疾患とアポトーシス研究の新局面, p 53 による細胞死実行の分子機構, *実験医学*18 : 1793–1797, 2000.
 - 45) Vousden KH : p53 : Death star, *Cell* 103 : 691–694, 2000.
 - 46) Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Takino T, Taniguchi T & Tanaka N : Noxa, BH-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis, *Science* 288 : 1053–1058, 2000.
 - 47) Nakano K & Vousden KH : PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53, *Mol. Cell* 7 : 683–694, 2001.
 - 48) Kanno T, Arita K, Utsumi T, Furuno T, Yoshioka T, Inoue M & Utsumi K, In : *Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine. Mitochondrial membrane permeability transition and its sensitivity to L-carnitine*, Yoshikawa T, Toyokuni S, Yamamoto Y, Naito Y ed, London : OICA INTERNATIONAL, pp 272–279, 2000.
 - 49) Furuno T, Kanno T, Arita K, Asami M, Utsumi T, Doi Y, Inoue M & Utsumi K : Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition, *Biochem. Pharmacol.* 62 : 2001. in press.
 - 50) Kashiwagi A, Kanno T, Arita K, Ishisaka R, Utsumi T & Utsumi K : Suppression of T₃-and fatty acid-induced membrane permeability transition by L-carnitine, *Comparative Biochem. Physiol.* : 2001. in press.
 - 51) Arita K, Utsumi T, Kato A, Kanno T, Kobuchi H, Inoue B, Akiyama J & Utsumi K : Mechanism of dibucaine-induced apoptosis in promyelocytic leukemia cells (HL-60), *Biochem. Pharmacol.* 60 : 905–915, 2000.
 - 52) Kim M, Lee KS, Mathews HL & Wurster RD : Induction of apoptotic cell death in a neuroblastoma cell line by dibucaine, *Exp. Cell Res.* 231 : 235–241, 1997.