

学位論文題名

TRAIL-Mediated Cytotoxicity:  
Impacts of soluble TRAIL and TRAIL microvesicles

(細胞性 TRAIL による標的細胞死におよぼす  
分泌型 TRAIL の調節機構の解析)

学位論文内容の要旨

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は、APO-2 リガンドとも呼ばれ、TNF ファミリーに属する II 型膜貫通型蛋白である。TRAIL は TNF ファミリーの中でも、免疫制御や T 細胞の細胞死に関わる FasL と相同性が最も高いとされる。ヒトでは、TRAIL は TRAIL 受容体である TRAIL-R1 (Death Receptor-4) と TRAIL-R2 (Death Receptor-5) の 2 つの細胞死誘導性受容体と結合し、カスパー経路を通じて細胞死を誘導する。また TRAIL および TRAIL 受容体は様々な組織で発現している。TRAIL には、細胞膜上に発現する細胞性 TRAIL の他に、酵素的に細胞外領域のみが切断され遊離する可溶性 TRAIL (sTRAIL) と microvesicles として分泌される TRAIL microvesicles (vTRAIL) が存在すると考えられている。しかしながら、これら分泌型 TRAIL の生物学的活性は明らかとなっていない。

細胞性 TRAIL は、主として活性化 T 細胞、単球・マクロファージ、NK 細胞、樹状細胞に発現し、TRAIL を介した細胞死は、末梢血活性化 T 細胞や関節滑膜に認められることから、多くの免疫疾患の制御機構に関与すると考えられている。この他、TRAIL による細胞死は子宮や眼における免疫特権、ウイルス感染細胞や腫瘍細胞の生体からの排除にも関与すると考えられている。一方、TRAIL を介した細胞死は正常組織では認められないことから、腫瘍に対して重合化リコンビナント可溶性 TRAIL を用いた治療法が検討され、その有効性が報告されている。TRAIL 機構の臨床応用には、細胞性および分泌型 TRAIL の細胞死誘導活性や相互作用を検討する必要がある。

本研究では、TRAIL の生物学的活性を明らかにするため、ヒト TRAIL 遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した細胞株を用いて、培養上清から分泌型 TRAIL を分離し、Jurkat を標的細胞として細胞死誘導能を検討した。

ヒト TRAIL 遺伝子を導入した細胞として、マウス由来である TRAIL-PA317 細胞および TRAIL-3T3 細胞を用いた。またコントロール細胞には Krox-PA317 細胞と NIH-3T3 細胞を用いた。培養上清を回収し、遠心にて細胞を除去した後、超遠心にて沈降成分 (Vesicle preparation; VP) と上清 (Vesicle-free-supernatant; VFS) に分離して実験に用いた。以下に結果の要約を示す。

1) TRAIL 発現を FACS にて解析したところ、TRAIL-PA317 細胞および TRAIL-3T3 細胞では TRAIL 発現を認めしたが、Krox-PA317 細胞と NIH-3T3 細胞では発現を認めなかった。Jurkat 細胞を標的細胞として細胞死誘導活性を検討したところ、TRAIL-PA317 細胞および TRAIL-3T3 細胞では細胞死が誘導されたが、Krox-PA317 細胞と NIH-3T3 細胞では細胞死は誘導されなかった。

2) 超遠心にて分離された VP と VFS の細胞死誘導活性を検討したところ、TRAIL-PA317 細胞由来の VP および VFS では標的細胞の細胞死を誘導したが、Krox-PA317 細胞由来の VP と VFS はともに細胞死を誘導しなかった。また、Cell lysate、VP、VFS の TRAIL 蛋白構造を Western blot 法にて解析したところ、vTRAIL は細胞性 TRAIL と同様に、細胞膜貫通型の全長性 TRAIL であったのに対し、sTRAIL は細胞外領域のみから構成されることが明かとなった。また、細胞性 TRAIL から分泌される TRAIL 蛋白量を ELISA にて計測したところ、sTRAIL は vTRAIL に比して大量に分泌されていた。一方、蛋白質濃度で比較したところ、sTRAIL に比べ vTRAIL はより強力に標的細胞に細胞死を誘導した。

3) 細胞性 TRAIL の細胞死誘導活性に対して sTRAIL および vTRAIL がどのような干渉作用を有しているか、TRAIL 発現細胞と標的細胞の環境下に vTRAIL または sTRAIL を添加し検討したところ、vTRAIL は TRAIL 発現細胞による細胞死誘導を相加的に増強させたのに対し、sTRAIL は TRAIL 発現細胞の細胞死誘導を抑制した。

以上より、本実験系においては、細胞性 TRAIL のみではなく、分泌型 TRAIL として、sTRAIL および vTRAIL が存在していることが確認された。また sTRAIL の分泌量が多いことから、細胞性 TRAIL の細胞膜上の TRAIL 発現制御には、vTRAIL よりも sTRAIL の分泌が大きな役割を担っていることが考えられた。一方、細胞死誘導活性に関しては、vTRAIL は細胞性 TRAIL の有する細胞死誘導活性を保持していたのに対し、sTRAIL は細胞死誘導活性を大部分喪失していることが判明した。この細胞死誘導活性の違いは、各々の分泌型 TRAIL の蛋白構造の差異によるものと考えられた。さらに、細胞性 TRAIL の標的細胞への細胞死誘導に対して vTRAIL は相加的に、sTRAIL は抑制的に作用し、それぞれ異なる干渉作用を有していることが考えられた。

本実験結果から、TRAIL を高発現する異常細胞からは、大量の sTRAIL が分泌され、正常の細胞性 TRAIL と TRAIL 受容体との結合を阻害し、免疫機構に変調をきたすことなどの病態が想定される。今後、sTRAIL および vTRAIL の生体内における役割を解析することにより、自己免疫疾患の制御や腫瘍治療への応用、すなわち、TRAIL 機構の人為的制御による新たな治療法の開発が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

## TRAIL-Mediated Cytotoxicity: Impacts of soluble TRAIL and TRAIL microvesicles

(細胞性 TRAIL による標的細胞死におよぼす

分泌型 TRAIL の調節機構の解析)

Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は、TNF ファミリーに属する II 型膜貫通型蛋白である。TRAIL は免疫制御や T 細胞の細胞死に関わる FasL と相同性が最も高いとされる。ヒトでは、TRAIL は TRAIL 受容体と結合し、カスパーズ経路を通じて細胞死を誘導する。TRAIL には細胞膜上に発現する細胞性 TRAIL の他に、酵素的に切断され遊離する可溶性 TRAIL (sTRAIL) と microvesicles として分泌される TRAIL microvesicles (vTRAIL) が存在すると考えられている。しかしながら、これら分泌型 TRAIL の生物学的活性は明らかとなっていない。また TRAIL 機構の臨床応用には、細胞性および分泌型 TRAIL の細胞死誘導活性や相互作用を検討する必要がある。TRAIL の生物学的活性を明らかにするため、ヒト TRAIL 遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した細胞株を用いて、培養上清から分泌型 TRAIL を分離し、Jurkat を標的細胞として細胞死誘導能を検討した。ヒト TRAIL 遺伝子導入細胞としてマウス由来である TRAIL-PA317 細胞を用いた。培養上清を回収し遠心にて細胞を除去した後、超遠心にて沈降成分 (Vesicle preparation; VP) と上清 (Vesicle-free-supernatant; VFS) に分離して実験に用いた。TRAIL 発現を FACS にて解析したところ、TRAIL-PA317 細胞で TRAIL 発現を認めた。Western blot 法にて、vTRAIL は細胞性 TRAIL と同様の約 32kDa であったのに対して、sTRAIL は約 20kDa の小さな分子サイズであることが確認された。Jurkat 細胞を標的細胞として細胞死誘導活性を検討したところ、TRAIL-PA317 細胞では細胞死が誘導され、可溶性 TRAIL 受容体添加にて完全に抑制され、コントロール細胞では細胞死は誘導されなかった。vTRAIL と sTRAIL の細胞死誘導活性を検討したところ、vTRAIL は用量依存性に強力に細胞死を誘導したが、sTRAIL では殆ど細胞死を誘導しなかった。vTRAIL および sTRAIL の蛋白量を ELISA にて計測したところ、sTRAIL は vTRAIL に比して大量に分泌されていた。一方、蛋白質濃度で比較したところ、sTRAIL に比べ vTRAIL はより強力に標的細胞に細胞死を誘導した。細胞性 TRAIL の細胞死誘導活性に対して sTRAIL および vTRAIL がどのような干渉作用を有しているか、TRAIL 発現細胞と標的細胞の環境下

に vTRAIL または sTRAIL を添加し検討したところ、vTRAIL は TRAIL 発現細胞による細胞死誘導を相加的に増強させたのに対し、sTRAIL は TRAIL 発現細胞の細胞死誘導を抑制した。以上より本実験系においては、細胞性 TRAIL、sTRAIL および vTRAIL が存在していることが確認された。また細胞性 TRAIL 誘導性細胞死に sTRAIL が負の制御を担っていることが考えられた。質疑応答では、主査から紹介があった後、申請者はスライドを用いながら約 15 分に渡って学位論文内容の発表を行った。その後、副査秋田弘俊教授から、1) Jurkat 細胞以外の細胞株での細胞死について、2) 内在性に TRAIL を発現した細胞での検討について、3) 癌治療への応用の可能性についての質問があった。次いで副査小池隆夫教授から、1) sTRAIL について腫瘍自体が sTRAIL を分泌している可能性について、2) microveicles を liposome 化して治療に応用する可能性についての質問があった。次いで主査畠山鎮次教授から、1) PA-317 細胞自体がウイルスベクターを産生している可能性について、2) budding 様式による TRAIL 以外のシステムについて 3) Cr-release 法以外でのアポトーシスの検討について、4) vTRAIL は細胞性 TRAIL とほぼ同様の作用であるが、sTRAIL は抑制性の機能しか存在しないのかどうかについての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者はこれまでの文献的報告および実験結果を引用し、概ね適切に回答した。

この論文は、TRAIL 誘導性細胞死における sTRAIL の役割を明らかにした点で高く評価され、今後の TRAIL 機構解析の進展および腫瘍や自己免疫疾患の治療への臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。