

2-chloro-2'-deoxyadenosine が誘導するカルシウム 依存性アポトーシスシグナルにおけるラフトの役割

学位論文内容の要旨

アデニンヌクレオシド誘導体 2-chloro-2'-deoxyadenosine (2CdA)は、プリン環の2位の水素を塩素に置換することによりアデノシンデアミナーゼ(ADA)耐性に変換したヌクレオシド抗がん剤である。細胞内では、デオキシシチジンキナーゼ等により三リン酸化され、細胞毒性を発揮することから、比較的 dCK 活性の高い白血病細胞の治療に用いられている。他の多くの抗がん剤と同様に、2CdA の抗腫瘍効果は白血病細胞にアポトーシスを引き起こすことによると考えられている。しかし、そのアポトーシスメカニズムには、まだ不明な点が多い。近年、シグナル伝達において中心的役割を担うと考えられている細胞膜マイクロドメインのラフトが抗がん剤の誘導するアポトーシスに関与するという研究結果が報告されている。そこで、本研究では白血病細胞として MOLT-4 を使用し、2CdA が誘導するアポトーシスにおいて、以前、当教室にて報告されたデスレセプター Fas を介したアポトーシス誘導についてさらに詳細に検討するとともに、デスレセプターを介したアポトーシスとラフトとの関与に焦点を当て、研究を行った。

始めに、2CdA が MOLT-4 細胞にアポトーシスを誘導するメカニズムとして、デスレセプター Fas と DR5 の高発現とその DISC (Death-Inducing Signaling Complex)形成、カスパーゼ-8 および-3 の活性化が関係していることを証明した。この Fas と DR5 の高発現がタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドにより強く抑制されたことから、発現は 2CdA 処理により誘導された新たな蛋白質合成によるものであることが確認された。さらに、これらデスレセプターによる DISC 形成について調べたところ、Fas および DR5 アゴニストならびに Fas および DR5 アンタゴニストのいずれも 2CdA 誘導アポトーシスに影響を与えないことから、DISC 形成はリガンド非依存性に起こるものであることも明らかにした。

次に、ラフトのマーカーとして知られるガングリオシド 1 に結合する試薬 FITC-conjugated cholera toxin B subunit (FITC-CTx)を用いて細胞を染色し、フローサイトメーターおよび蛍光顕微鏡下で観察したところ、2CdA 処理により、それまで均質に細胞膜表面に分布していたラフトが集積したことが確認された。ショ糖密度勾配遠心法によりラフトが含まれると考えられる 1% Triton-X 100 不溶性画分を分離したところ、その中に 2CdA により発現した Fas と DR5 が検出された。さらに、ラフトの破壊剤 M β CD および filipin 処理により 2CdA 誘導アポトーシスが有意に抑制されたことから、2CdA 誘導アポトーシスにおけるラフトの関与が確認された。³H 標識した 2CdA を用いて、細胞内への 2CdA の取り込みを測定したところ、ラフトを破壊しても薬剤

の取り込みには影響は無かった。アポトーシス最終実行因子カスパーゼ-3の活性化についても検討したところ、ラフト破壊はカスパーゼ-3の活性化に影響を与えず、MOLT-4の2CdA誘導アポトーシスにおいてラフトは、カスパーゼ-3の下流に存在するシグナル伝達経路に関わる因子の調節に関与していると考えられた。

アポトーシスシグナルの最終イベントが核内DNAの分解であり、また、2CdA誘導アポトーシスに細胞内 Ca^{2+} の上昇が必要であるとする報告があることから、最後に Ca^{2+} 依存性ヌクレアーゼの活性化について検討した。その結果、2CdA処理した細胞では Ca^{2+} 濃度が上昇し、ラフトを破壊するとその濃度上昇の一部が抑制されることが観察された。そこで、細胞内 Ca^{2+} キレーターBAPTA-AM、細胞外 Ca^{2+} キレーターEGTAで細胞を処理したところ、2CdA誘導アポトーシスの抑制が観察されたが、2CdA誘導ラフトのクラスタリングを抑制しなかった。このことから、細胞外からの Ca^{2+} 流入は2CdAが誘導するラフトのクラスタリングを調節していないこと、また、L型 Ca^{2+} チャネル阻害剤として知られるnifedipine処理でほぼ同程度のアポトーシス抑制が認められたことから、細胞外からの Ca^{2+} 流入は2CdA誘導アポトーシスに必須のものであり、それはラフト内L型 Ca^{2+} チャネルを介しているものと推察された。カスパーゼ-3の活性化については、BAPTA-AM、EGTAならびにnifedipine処理の影響は見られないことから、ラフト内のL型 Ca^{2+} チャネルを介して流入した Ca^{2+} とカスパーゼ-3に依存したヌクレアーゼの活性化がDNAの分解を引き起こしたものと推察された。

以上の様に、本研究は抗がん剤が誘導するアポトーシスメカニズムにおいて、ラフトが関与する新たなメカニズムの存在を明らかにした。この事実は今後の白血病治療薬開発にとって意義ある知見となるものと思われる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	桑原幹典
副査	教授	稲葉陸
副査	助教授	太田利男
副査	助教授	稲波修

学位論文題名

2-chloro-2'-deoxyadenosine が誘導するカルシウム 依存性アポトーシスシグナルにおけるラフトの役割

2-chloro-2'-deoxyadenosine (2CdA)は現在白血病の治療に用いられているヌクレオシド抗がん剤であり、その作用は白血病細胞にアポトーシスを誘導する事とされている。本学位申請者は、白血病細胞としてヒトT細胞系白血病由来株化細胞 MOLT-4 を用い、2CdA が誘導するアポトーシスメカニズムについて研究を行った。これまで 2CdA 誘導アポトーシスのメカニズムに関しては、2CdA がデスレセプターFas の発現を誘導すること、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を必要とすること、類似の抗がん剤の研究から、細胞膜マイクロドメインのラフトの集積が何らかの役割を果たしていることが示されている。そこで、申請者はデスレセプターを介したアポトーシス経路についてさらに詳細に解析するとともに、デスレセプターを介したアポトーシスとラフトの集積ならびに細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇との関係に焦点を当て、研究を行った。

始めに、申請者は 2CdA が MOLT-4 細胞にアポトーシスを誘導するメカニズムとして、デスレセプターFas ならびに DR5 の高発現とその DISC (Death-Inducing Signaling Complex) 形成、カスパーゼ-3 の活性化が関係していることを証明した。さらに、この高発現が 2CdA 処理により誘導された新たな蛋白質合成によるものであること、これらデスレセプターによる DISC 形成はリガンド非依存性に起こるものであることも明らかにした。

次に、申請者は 2CdA 処理後の細胞表面にラフトの不均一な集積が起こり、クラスターが形成されていることを観察した。このラフト画分には Fas と DR5 が含まれていること、MβCD および filipin 処理によるラフト破壊が 2CdA 誘導アポトーシスを有意に抑制することから、2CdA 誘導アポトーシスにラフトが強く関与していると結論した。しかしながら、ラフト破壊がアポトーシス最終実行因子カスパーゼ-3 の活性化に影響を与えなかったことから、ラフトはカスパーゼ-3 の下流のシグナル伝達経路に関与しているものと推察した。

最後に、細胞内 Ca^{2+} の上昇とラフトの関係について検討を行った。2CdA 処理で上昇した細胞内 Ca^{2+} 濃度はラフトを破壊するとその一部が抑制されたが、 Ca^{2+} キレーターはラフトの集積には何ら影響を与えなかった。一方、 Ca^{2+} キレーターはアポトーシス誘導を有意に抑制し、また、L型 Ca^{2+} チャネル阻害剤 nifedipine でもほぼ同程度の抑制が認められたことから、2CdA は L型 Ca^{2+} チャネルを介して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、そのチャネルはラフト内に存在していると推察した。カスパーゼ-3 の活性化については、 Ca^{2+} キレーターならびに nifedipine 処理は何ら影響を与えず、このことから、申請者は、2CdA 誘導アポトーシスにおいて、ラフト内 L型 Ca^{2+} チャネルを介して流入した Ca^{2+} と活性化したカスパーゼ-3 が DNA を断片化させるヌクレアーゼ活性化に必要であると結論した。

以上、本研究で得られた知見は抗がん剤が誘導するアポトーシスにおいて、新たなメカニズムの存在を示唆するものであり、今後の白血病治療薬開発に貴重な知見を与えるものと考えられる。よって、審査員一同は、博士論文提出者高橋恵理子氏の博士論文が北海道大学大学院獣医学研究科規定第6条により行う博士論文の審査に合格と認めた。