

東北薬科大学

審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	タツ タケオ 立田 岳生（宮城県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	薬学 第 123 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 2 項該当
学位論文題名	カエル卵由来シアル酸結合性レクチン（レクザイム） の抗腫瘍作用機構の解明
論文審査委員	主査 教授 仁田 一雄
	副査 教授 石川 正明
	副査 教授 顧 建国

カエル卵由来
シアル酸結合性レクチン (レクザイム) の
抗腫瘍作用機構の解明

東北薬科大学大学院薬学研究科
分子生体膜研究所 分子認識部門

立田 岳生

目 次

緒論	1
本論	5
第一章 SBL は Jurkat 細胞に対しミトコンドリア障害を 起因とするカスパーゼ依存性アポトーシスを誘導する	
第一節 序	5
第二節 実験材料および実験方法	6
第三節 結果	10
第四節 考察	20
第二章 SBL 誘導アポトーシスにおける小胞体ストレスの関与	
第一節 序	24
第二節 実験材料および実験方法	25
第三節 結果	27
第四節 考察	36

第三章 SBL は悪性中皮腫細胞にアポトーシスを誘導し
TRAIL と相乗的な抗腫瘍作用を示す

第一節 序	40
第二節 実験材料および実験方法	41
第三節 結果	43
第四節 考察	55

第四章 SBL 誘導アポトーシスは Hsp70 の減少により阻害される

第一節 序	58
第二節 実験材料および実験方法	59
第三節 結果	60
第四節 考察	64

総括	66
----	----

論文目録	69
------	----

謝辞	70
----	----

引用文献	71
------	----

緒 論

近代病理学の基礎を築いた Virchow は、当時の最新技術であった細胞組織学の手技を用いて、すべての病気は細胞の異常に起因する、という細胞病理学を確立した。¹⁾ Virchow は、組織学的所見から、細胞の病変を①炎症性病変、②新生性病変（腫瘍）、③発育錯誤性病変（奇形）、④変性性病変（老化など）、に分類した。多くの疾患の原因が細胞の異常によるという概念は、現在の医学の基礎となっている。近代生命科学において、分子レベルの考察が発達し、細胞の病変は、“一つの細胞が生存し続け、ある時期に細胞分裂を起こし、同じ形質の細胞を複製していくためには、核酸とタンパク質が必要であることはいうまでもなく、核酸とタンパク質の合成や代謝機構に重大な欠陥が生じると、単に病変にとどまらず、細胞は死に至ると考えられた。つまり、細胞の病気は、個々の細胞の生存維持に必須な機能の異常であるというよりは、むしろ生存維持に必須ではないが、緊急時の対応に必要な細胞の調節機能の異常や、個々の細胞の、生存維持とは別の細胞認識の異常である。”と解釈されるようになった。

現代では、ヒトゲノムをはじめ、各種生物のゲノム配列が明らかになり、バイオインフォマティクス技術により塩基配列から遺伝子の探索、さらに遺伝子からタンパク質の生産およびその機能解析と、生命科学研究が飛躍的に発展している。一方で、生体内のタンパク質や脂質の多くが糖鎖修飾されていることが見いだされており、糖鎖によりそれらの分子機能が制御されていることが明らかになっている。また、糖鎖遺伝子ノックアウトマウスの研究からは、胎生期または出産直後に致死に至る遺伝子も報告されており、²⁾ 糖鎖が生命維持自体に重要な役割を担うことも示されている。したがって、生体内におけるタンパク質などの機能性分子の性状を解析するためには、糖鎖機能を含めた機能解明が不可欠となっている。糖鎖が細胞同士の認識、接着、分化・増殖および老化など様々な生命現象にどのように関与しているかを解明する“グライコミクス”という概念は 1960 年代から示されていた。がんや炎症性疾患の患者の血清中に、シアル酸を含む糖タンパク質が増加することは、1950 年代から報告されていたが、細胞のがん化に対応して糖鎖に異常が認められることが明確に示されたのは、1960 年代の後半である。³⁾ 最初に糖脂質、次いで糖タンパク質に関して、細胞のがん化に伴い糖鎖異常が普遍的に起こることが見いだされた。1980 年代になって、がん細胞には反応するが、正常細胞との反応性の少ない単クローン抗体の調製法が確立された。その多くが糖鎖に反応するものであることが明らかとなり、腫瘍マーカーとしての糖鎖抗原がクローズアップされた。⁴⁾ 1990 年代に入り、がん細胞の表面糖鎖が単なる腫瘍マーカーではなく、実際のがんの転移、浸潤に深い関わりをもつことが明らかになってきた。現在では、がん細胞特異的糖鎖に反応する抗体やタンパク質分子が、がんの診断や予後診断に利用されるとともに、治療への応用も期待されている。

糖鎖を認識する分子の中でも、動植物から微生物まで普遍的に存在しているレクチンは、細胞生物界における糖鎖情報の理解に大きく貢献してきた。レクチンの最初の発見は、1888 年にヒマ (*Ricinus communis*) 種子由来のタンパク質に赤血球を凝集させる作用のあることが見いだされた

ことである。⁵⁾ 当初、レクチンの検索は、主に植物を材料として行われた。植物レクチンへの関心は、その糖特異性に着目した糖鎖の検出および同定の道具としての利用価値に集中し、レクチン自体の役割にはあまり関心が向けられず、1960年代初めまでは限られた研究者にしか注目されていなかった。ところが、1960年 Nowell らが、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) レクチンがリンパ球膜表面の複合糖質に結合し、リンパ球の分裂を引き起こすマイトジェン活性のあることを発見した。⁶⁾ さらに、Aub らが、コムギ胚芽 (*Triticum vulgaris*) レクチンに悪性腫瘍細胞表面の糖鎖に結合し、凝集させる活性のあることを報告すると、⁷⁾ レクチン研究は一気に脚光を浴びるようになった。1980年に Goldstein らにより、レクチンは、“2 価以上の結合価をもち、赤血球などを凝集し、多糖類や複合糖質を沈降させ、結合特異性が単糖やオリゴ糖による凝集阻害反応により規定される、免疫学的産物以外の糖結合タンパク質である”と定義された。⁸⁾ 1982年、Ashwell らは、ガラクトースを末端にもつアシアロ糖タンパク質と特異的に結合するタンパク質を肝細胞表面に見だし、糖特異的なエンドサイトーシス受容体であることを明らかにした。⁹⁾ このことが本格的な動物レクチンに関する研究の端緒であるといえる。現在まで、受精、発生、免疫、ウィルス感染などは、いずれも糖鎖とそれを認識するタンパク質であるレクチンとの特異的な相互作用に起因することが明らかにされている。このように、糖鎖の機能を理解しようとする試みに利用されてきたレクチンは、近年の生命科学の進歩において、生体における情報分子として位置づけられる糖鎖の受け手として注目されている。ポストゲノム時代に入った今日では、レクチンアレイを用いた新規腫瘍マーカーの探索など、グリコーム解析と呼ばれる最先端の技術に応用されている。^{10, 11)}

当研究室では、レクチンの糖鎖生物学に関する研究を行ってきた。ウシガエル (*Rana catesbeiana*) 卵由来のレクチンは、種々のがん細胞を凝集し、その凝集がシアロ糖タンパク質やガングリオシドで阻害されることから、新規のシアル酸結合性レクチン (sialic acid-binding lectin ; SBL) として Kawauchi らにより発見された。¹²⁻¹⁴⁾ SBL の凝集活性は、がん細胞に対しては認められるが、赤血球や他の正常細胞では認められない、興味深いものであった。さらにその凝集阻害実験の結果から、その凝集作用は、シアル酸単独では阻害されないが、ムチンなどのシアル酸を含む糖タンパク質で強く阻害され、それをシアリダーゼ処理したアシアロ体では阻害が減弱すること、あるいは細胞自体をシアリダーゼ処理することによりその凝集が減弱することから、SBL によるがん細胞の凝集は、細胞表面のシアル酸を含む複合糖質への結合に起因するものと考えられている。その後、SBL は、アミノ酸残基数 111 のシングルポリペプチド鎖から成る塩基性タンパク質であることが明らかになり、¹⁵⁾ またアミノ酸配列分析の結果から、種々のリボヌクレアーゼ A ファミリーメンバーと、相同性を有することが明らかになった (Table 1)。^{16, 17)}

Table 1. Protein sequence identity between SBL and various RNase A superfamily.

Source	Frog		Bovine	Human			
Name	SBL	Onconase (ONC)	RNase A	hPR (RNase1)	EDN (RNase2)	ECP (RNase3)	ANG (RNase5)
Identity	-	49%	28%	26%	25%	25%	35%

リボヌクレアーゼは、その配列を基に、リボヌクレアーゼ A, T1, T2, H, L, あるいは P ファミリーのサブグループとそれ以外のものに分類される。¹⁸⁻²¹⁾ リボヌクレアーゼ A ファミリーメンバーの特徴としては、分子量が 14 kDa 程度と比較的小さく、ピリミジン塩基を特異的に認識し切断する活性を有し、最適 pH は 7-8 であることなどが知られている。²¹⁾ またその構造中には、触媒活性を担う 3 つのアミノ酸残基 (1 つのリシンと 2 つのヒスチジン) と、3 から 4 つのジスルフィド結合がよく保存されている。²²⁾ このメンバーに属すタンパク質は、そのアミノ酸配列を相互に比べた際、100% に近い相同性を示すものもあれば 20% 程度しか示さないものもあり、多様性に富むが、その三次構造においては、N 末端の α -ヘリックス構造や、 β -バレル構造の位置など、立体的な相似性が高い。SBL は、そのアミノ酸配列中に触媒活性を担う 3 つのアミノ酸残基が保存されていること (Fig. 1),

SBLENWATFQQKHII.....NTPII NCNTIMDNIIYVGGQCKRVNTFIISSATTVKAIC.....TGVI.NMNV..	60
ONCEDMLTFQKKHIT.....NTRDVDCDNIMSTNLF....HCKDKNTFIYSRPEPVKAIC.....KGI IASKNV..	57
RNase A	...KETA AAKFERQHMDSSSTAASSSNYCNGMMKSRNL.TKDRCKPVNTFVHESLADVQAVCSQKNVACKNGQT..NCYQ	74
hPR (RNase1)	...KESRAKKFQRQHMDSDSSPSSSSTYCNGMRRRN.M.TQGRCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFGEKVTCKNGQG..NCYK	74
EDN (RNase2)	KPPQFTWAQWFETQHINMTSQG.....CTNAMQVINN.YQRRCKNQNTFLLTTFANVNVVCGNPNMTCPSNKTRKNCHH	73
ECP (RNase3)	RPPQFTWAQWFAIQHISLNPPR.....CTIAMRAINN.YRWRCKNQNTFLRITTFANVNVVCGNQSIRCPHNRTLNNCHR	73
ANG (RNase5)	..QDNSRYTHFLTQHYDAKPG.GRDDRVCESIMRRRGL.T.SPCKDINTFIHGKRSIKAIC.....ENKNG..NPHR	66
	★ ★	
SBLLSTTRFQLNTCTRTSITP.....RPCPYSSRTETNYICVKCENQ.....YPVHFAGIGRCP.	111
ONCLTTSEFYLSDC...NVTG.....RPCKYKLLKSTNKFCVTCENQ.....APVHFVGVGSC..	104
RNase A	SY.....STMSITDC...RETGSS..KYPNCAYKTTQANKHII VACEGN.....PYVPVHFDASV....	124
hPR (RNase1)	SN.....SSMHITDC...RLTNGS..RYPNCAYRTSPKERHII VACEGS.....PYVPVHFDASVEDST	128
EDN (RNase2)	SG.....SQVPLIHC...NLTTSPQNI SNCRYAQT PANMFYIVACDNRDQRDPGYPVVPVHLDRII....	134
ECP (RNase3)	SR.....FRVPLLHC...DLINPGAQNI SNCTYADRPGRRFYVACDNRDPR.DSPRYPVVPVHLDRTTI....	133
ANG (RNase5)	ENLRISKSSFQVTTCC...KLHGGS..PWPPCGYRATAGFRNVVACENG.....LPVHLDQSI FRRP	123
	★	

Fig. 1. Amino acid sequence alignment of various RNase A superfamily members.

Asterisks indicate conserved amino acids for RNase activity.

および 4 つのジスルフィド結合をもつことが明らかにされており、またその三次構造も他のリボヌクレアーゼ A ファミリーメンバーに酷似している (Fig. 2)。また、実際の酵素活性に関しても、ピリミジ



Fig. 2 3-dimensional structures of RNase A superfamily members.

ン塩基特異的なリボヌクレアーゼ活性をもつことが示され、²³⁾ SBL がリボヌクレアーゼ A ファミリーに属することが明らかになっている。¹⁶⁾ これらのことから、SBL は、レクチン活性、リボヌクレアーゼ活

性を合わせもつ多機能性タンパク質であり、酵素活性をもつレクチンという意味でレクザイム (leczyme ; lectin+enzyme) と呼ばれている。^{24, 25)}

リボヌクレアーゼは、RNA の代謝のみならず、老化や生体防御機構など様々な生物学的機能をもつが、特筆すべきことの一つに、抗腫瘍活性がある。抗腫瘍活性をもつことが報告されているリボヌクレアーゼの代表として、真菌 (*Aspergillus giganteus*) 由来の α -sarcin, 細菌 (*Bacillus intermedius*) 由来の binase, 植物 [オタネニンジン (*Panax ginseng*)] 由来の ginseng RNase 1, 両生類 [ヒョウガエル (*Rana pipience*)] 由来の onconase などが挙げられるが、²⁰⁾ これらリボヌクレアーゼによる抗腫瘍活性は、がん細胞に選択性があることや、その活性が RNA を標的とするという新しい機序によることから、リボヌクレアーゼが新領域の抗がん剤になり得ると期待されている。近年では、新規の天然リボヌクレアーゼの探索の他、遺伝子工学技術を用いたリボヌクレアーゼ変異体作成など、リボヌクレアーゼの抗腫瘍活性に関する研究が盛んに行われている。²⁶⁾

SBL は、上述のようにレクチン活性およびリボヌクレアーゼ活性をもつことが示されており、さらにその抗腫瘍活性についても検討され、*in vitro* で マウス白血病細胞 P388 細胞や L1210 細胞の増殖を、*in vivo* で S-180, Ehrlich および Mep II 腹水がん細胞の増殖を抑制することが報告されている。^{17, 27)} またこの作用は、SBL の「細胞表面のシアル酸を含む糖鎖を認識して結合する」レクチン活性と「細胞の生存に必要な RNA を分解する」リボヌクレアーゼ活性が協働することにより発揮されると考えられている。²⁵⁾ SBL は従来の DNA 複製を標的とする抗がん剤とは異なる、“RNA” を標的とした新しい抗がん剤としての応用が期待される。一方で、その抗腫瘍作用機序の解明が重要な課題となっている。本研究では、SBL の臨床応用を目標に、SBL の抗腫瘍作用機構の解明を試みた。第一章では、数種のヒト白血病細胞株に対する SBL の有効性およびその作用機序解析について、第二章では SBL 誘導アポトーシスにおける小胞体ストレスの関与について、第三章では、悪性中皮腫細胞に対する SBL の有効性と、SBL および Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) における相乗的抗腫瘍効果について、第四章では、SBL 誘導アポトーシスに影響を及ぼすことが見いだされた Hsp70 について、それぞれ詳述する。

本 論

第一章

SBL は Jurkat 細胞に対しミトコンドリア障害を起因とする カスパーゼ依存性アポトーシスを誘導する

第一節 序

従来、抗がん剤の主な標的は DNA の複製であった。抗がん剤の起源は、第二次世界大戦中に兵器として使用されたナイトロジェンマスタード (アルキル化剤) と言われ、^{28, 29)} それ以降、数々の抗がん剤が開発されてきた。20 世紀以降に使用されてきた抗がん剤は主に、アルキル化剤、白金製剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、微小管重合阻害に分類することができるが、これらは全て、DNA 複製に作用する薬剤である。これら抗がん剤の開発により、がん治療は格段に進歩したが、その低い選択性による副作用や耐性の発現などは、化学療法における大きな課題として残った。21 世紀に入ると、フィラデルフィア染色体陽性白血病を標的とする imatinib に代表される分子標的薬や、³⁰⁾ B 細胞にのみ発現する cluster of differentiation (CD) 20 を標的とする抗ヒト抗体である rituximab などの抗体製剤が開発された。³¹⁾ それら分子標的薬などの開発に見られるように、現代の抗がん剤開発研究においては、正常細胞に対する毒性を最小限にとどめ、がん細胞の薬剤耐性を克服できるような、生物学的メカニズムを基にしたより選択的な薬剤の開発が期待されている。³²⁾

リボヌクレアーゼは RNA の加水分解を触媒する酵素の総称である。リボヌクレアーゼは様々な生物学的役割をもち、RNA の代謝の他、老化や、病原体に対する防御機構、植物の自家受精を防ぐ自家不和合性などにも関連している。^{19, 21)} いくつかのリボヌクレアーゼ種ではさらに、血管新生活性や神経障害性、抗腫瘍活性、免疫抑制活性なども報告されている。³³⁾ ウシ膵臓由来のリボヌクレアーゼ、リボヌクレアーゼ A (EC 3.1.27.5)³⁴⁾ は、抗腫瘍活性をもつ可能性が報告された最初のリボヌクレアーゼであり、その活性は *in vitro*,³⁵⁻³⁷⁾ *in vivo*³⁸⁻⁴¹⁾ 両方で報告された。リボヌクレアーゼ A による抗腫瘍作用の観察には多量の酵素が必要であったが、近年ではより活性の強い数種のリボヌクレアーゼが報告されている。リボヌクレアーゼにより誘導される細胞毒性のメカニズムは i) リボヌクレアーゼの細胞表面への結合と細胞内への取り込み, ii) 細胞質への移行, iii) 細胞内リボヌクレアーゼ阻害タンパク質 [ribonuclease inhibitor (RI)] からの回避, および iv) 細胞内 RNA の分解, の 4 ステップからなると考えられている。各ステップにおける効率は、リボヌクレアーゼの細胞毒性に大きな影響を与えることが知られている。^{24, 42)} 新規抗がん剤として期待されてい

るリボヌクレアーゼの一種に, onconase (ONC) がある. ONC は細胞毒性および細胞増殖抑制活性をもつこと,⁴³⁾ tumor necrosis factor (TNF) やビンクリスチンなどの種々の抗がん剤と相乗作用を示すことなどが報告され,^{35, 44)} 現在, 悪性中皮腫や非小細胞性肺癌に対する臨床試験が進行中である.⁴⁵⁾ ONC は a) ヒト RI に対する親和性が低く, 高い毒性を示す点, b) 多種類のがんに対して有効性をもつ点, c) 副作用に関し, 限定的で可逆的な腎毒性があるものの, 重篤な副作用がみられないなど, 臨床応用における利点が報告されている.²⁰⁾ これら ONC の抗がん剤としての有用性を示す臨床研究や, binase など抗腫瘍作用が認めらる他のリボヌクレアーゼの研究により,⁴⁶⁾ 新規リボヌクレアーゼの探索やリボヌクレアーゼ変異体を用いた新規薬剤の開発研究が現在活発に行われている.

当研究室では, ウシガエル (*Rana catesbeiana*) 卵より単離したシアル酸結合性レクチン (SBL) に関する研究を行ってきた. レクチン活性およびリボヌクレアーゼ活性を併せもつ SBL は, マウスあるいはマウス由来細胞を用いた *in vivo* および *in vitro* の実験から抗腫瘍作用をもつことも認められている.^{17, 27)} SBL は ONC に対し 50 % 程度の相同性を持ち, ONC と同様にヒト RI に対する親和性が低いことも明らかになっている.¹⁶⁾ しかしながら, ONC にはレクチン活性が報告されていないことなど,⁴⁷⁾ SBL と ONC の機能には, 違いがある可能性がある. Liao らにより単離された RC リボヌクレアーゼは SBL と同一分子であるが,^{48, 49)} RC リボヌクレアーゼが ONC に比べ, より悪性細胞に選択的に細胞死誘導効果を示すという興味深い報告もなされている.⁵⁰⁾ 一方で, SBL の抗腫瘍作用には未だ不明な点が多く, またヒト白血病細胞に対する有効性の検討は不十分である. そこで, 本章では, 数種のヒト白血病細胞をに対する SBL の抗腫瘍作用を検討し, その作用機序の解析を行った

第二節 実験材料および実験方法

1. 材料

SBL は, 既報¹⁴⁾ に従って分離精製したものを, 12 mM リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.4 [phosphate buffered saline (PBS)] に溶解し (終濃度 200 μ M), 実験に使用した. Etoposide (ETO) および doxorubicin (DOX) は Sigma-Aldrich 社より購入した. TRAIL は R&D Systems 社より購入し, カスパーゼ阻害剤 (z-VAD, z-IETD, z-LEHD) は Medical & Biological Laboratories (MBL) 社より購入した. 各種抗体は以下のものを使用した. 抗 β -actin (Sigma-Aldrich 社製), 抗カスパーゼ -9 (MBL 社製), 抗カスパーゼ -8, 抗カスパーゼ -3 および抗 Bid (Cell Signaling Technology 社製), 抗シクロム c, 抗 ERK1/2 (pT202/pY204), 抗 ERK1, 抗 JNK/SAPK (pT183/pY185), 抗 JNK/SAPK, 抗 p38 (pT180/pY182) および抗 p38

(Becton-Dickinson 社製) 抗体, Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG (Zymed 社製) および HRP 標識抗ラビット IgG (Cedarlane 社製) 抗体.

2. 細胞培養

ヒト急性T細胞性白血病 Jurkat 細胞, ヒト慢性骨髄性白血病 K562 細胞, Adriamycin (ADR) 耐性 P 糖タンパク質過剰発現 K562 細胞 (K562/ADR), バーキットリンパ腫 Raji 細胞, および前骨髄球性白血病 U937 細胞は, 東北大学医学研究所医用細胞資源センターより供与されたものを用いた. これらの細胞は, 10 % 非働化ウシ胎児血清 (BioWest 社製), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), penicillin G (100 unit/mL) を含む RPMI 1640 培地 (日水製薬社製) を用い, 37 °C, 飽湿, 5 % CO₂ 条件下で培養した.

3. Total RNA の抽出

SBL で処理した細胞を Trizol (Invitrogen 社製) (300 μL) 中でホモジナイズし, 5 分間室温で放置した. その後, クロロホルム (60 μL) を加え, 15 秒間振とうし, 2 分間放置後, 12000 rpm で 15 分間遠心分離した. 上清に, イソプロピルアルコール (150 μL) を加え, 10 分間放置後, 12000 rpm で 10 分間遠心分離した. 上清を捨て, ゲル状の沈殿に 75 % エタノール (150 μL) を加え, 12000 rpm で 10 分間遠心分離した後, 上清を捨て, 風乾したものを H₂O (40 μL) で溶解した. 得られた RNA (1 μg) を, 18 % ホルムアルデヒドを含む 2 % アガロースゲルにより電気泳動し, エチジウムブロミド (EtBr) で染色後, UV 照射して泳動像を観察した.

4. WST-8 アッセイおよびトリパンブルー色素排除試験

細胞増殖抑制効果の測定は, cell counting kit-8 (CCK-8, 同仁化学社製) を用い, インストラクションマニュアルに従って行った. 細胞は 2×10^4 cells/well になるよう 96 穴プレートに播種した. Jurkat 細胞は SBL を 0.01~10 μM , ETO を 1~200 μM , DOX を 0.1~50 μM になるように, K562, K562/ADR, Raji および U937 細胞は, SBL を 0.0001~10 μM , ETO を 0.005~800 μM , DOX を 0.0001~50 μM になるよう培養液に加え, 72 時間培養した (濃度はすべて終濃度で示した). 培養後, CCK-8 溶液を各ウェルに 10 μL 加え, 4 時間反応させた後, マイクロプレートリーダーで 450 nm および 600 nm の吸光度を測定した. IC₅₀ (細胞増殖を 50% 抑制する濃度) は GraphPad Prism 3.0 software を用いて算出した.

細胞毒性はトリパンブルー色素排除試験により測定した. 細胞は 2×10^4 cells/well になるよう 96 穴プレートに播種した. SBL 処理後, 0.25 % トリパンブルー溶液を添加し, 染色された細胞を死細胞として計測し, 細胞の生存率とした.

5. 核の形態観察

SBL で処理した細胞を回収後, PBS で洗浄し, 4 % パラホルムアルデヒドで 15 分間固定処理した. その後 PBS で洗浄し, Hoechst 33258 (Wako 社製) を終濃度 50 μ M になるように加えて核を染色した後, Prolong gold antifade reagent (Molecular Probes 社製) を用いてスライドガラスにマウントし, Zeiss Axioscope 2 蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss 社製) で確認した.

6. DNA 断片化の観察

SBL で処理した細胞を, cell lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10 mM EDTA, 0.5 w/v % sodium-N-lauroylsarcosinate] に懸濁し, リボヌクレアーゼ A (10 mg/mL) を加えて 50 $^{\circ}$ C, 30 分間, さらに proteinase K (10 mg/mL) を加えて 50 $^{\circ}$ C, 60 分間処理した. 得られた DNA を 1.8 % アガロースゲルを用いて電気泳動した.

7. アネキシン V の結合とヨウ化プロピジウム (PI) の取り込みの測定

アネキシン V の結合と PI の取り込みの測定は MEBCYTO apoptosis kit (MBL 社製) を用いた. 細胞を回収後 PBS で洗浄し, binding buffer に懸濁後, fluorescein isothiocyanate (FITC) - アネキシン V および PI を加えて 15 分間反応させ, FACScalibur (Becton Dickinson 社製) を用いて測定した.

8. カスパーゼ活性の測定およびカスパーゼ阻害剤の処理

カスパーゼの活性測定には colorimetric protease assay kit (MBL 社製) を用いた. 細胞を回収後, cell lysis buffer に懸濁し, 氷上で 10 分間反応させた. その後, 12,400 rpm で 1 分間遠心分離し, 上清を試料とした. 試料のタンパク質量を, DC protein assay kit (Bio-Rad 社製) により測定し, 試料溶液 50 μ L (1 μ g/ μ L) を調製し, 使用直前に調整した 2 x reaction buffer (10 mM DTT を含む) を等量添加後, 基質 [カスパーゼ -3, -8 および -9 に対しそれぞれ DEVD-*para*nitoroanilide (pNA), IETD-pNA および LEHD-pNA] を 5 μ L (終濃度 200 μ M) 加え, 37 $^{\circ}$ C で 2 時間反応後, 波長 405 nm による吸光度を測定した.

カスパーゼの阻害は benzyloxycarbonyl (z)-VAD-fluoromethylketone (fmk) (全カスパーゼ阻害剤), z-IETD-fmk (カスパーゼ-8 阻害剤) および z-LEHD-fmk (カスパーゼ-9 阻害剤) を用いて行った. 各カスパーゼ阻害剤 (50 μ M) は, 種々のアポトーシス誘導剤処理 30 分前に培地中に添加した.

9. ウェスタンブロットティング

細胞を extraction buffer [150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA (pH 8.0), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 tablet/10 ml protease inhibitor cocktail (Roche 社製)] に溶解して全細胞溶解液を得た。オルガネラ (ミトコンドリア) 画分 あるいは細胞質画分は ProteoExtract subcellular proteome extraction kit (Merck 社製) を用い、インストラクションマニュアルに従い調製した。それぞれのタンパク質量は、DC protein assay kit (Bio-Rad 社製) により測定した。タンパク質試料は SDS-PAGE 後、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (GE Healthcare 社製) に転写し、転写した膜を 5 % スキムミルクにより室温で 1 時間処理した。その後、その膜を TBST [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20] で洗浄し、1 次抗体 (各標的タンパク質に対する抗体) と反応させ、さらに膜を洗浄後、2 次抗体 (各 1 次抗体に対する HRP 標識抗体) と反応させた。各抗体との反応は、それぞれ室温で 2 時間または 4 °C で 16 時間行った。膜上の対象タンパク質は ECL Western blotting detection reagents and analysis system (Amersham 社製) を用いて検出した。

10. ミトコンドリア膜電位 (MMP) 低下の検出

MMP 低下は、5, 50, 6, 60-tetrachloro-1, 10, 3, 30-tetraethyl-benzamidazolocarboxyanin iodide (JC-1, AnaSpec 社製) を用いて検出した。培養細胞に、200 μ M JC-1 を、終濃度 2 μ M になるよう添加し、37 °C、15 分間反応させた。細胞を回収し、PBS で洗浄後、PBS 懸濁液とし、FACScalibur (Becton-Dickinson 社製) を用いて、MMP 低下に伴う JC-1 の蛍光変化を検出した。

11. 統計学的処理

実験結果は、平均値と標準偏差で示した。有意差検定は two-tailed Student's t-検定、もしくは分散分析 (ANOVA) 後の Bonferroni 検定により行い、危険率 5 % を有意差ありと判定した。

第三節 結果

1. SBL は多剤耐性細胞を含む数種のヒト白血病細胞株に対し細胞増殖抑制作用を示す

ヒト白血病細胞に対する SBL の細胞増殖抑制効果を明らかにするため、WST アッセイにより SBL 処理細胞の生存率を測定し、種々の細胞に対する SBL の IC₅₀ 値を算出した。その結果、SBL は用いたすべての細胞に対し細胞増殖抑制作用を示し、その IC₅₀ 値は Jurkat 細胞において最も低い値 (0.15 μM) が得られた (Table 1)。臨床で用いられる DNA 傷害型薬剤である ETO や DOX では P 糖タンパク質過剰発現細胞に対する細胞毒性が認められなかったが、SBL は多剤耐性の有無に関係なく低い IC₅₀ 値 (0.36 μM) を示した。

Table 1. Inhibitory effect of SBL, ETO and DOX on the viability of human leukemia cell lines

Cell name	Characteristics	IC ₅₀ (μM)		
		SBL	ETO	DOX
Jurkat	T-cell leukemia	0.15 ± 0.07	2.09 ± 0.78	1.10 ± 0.71
K562	erythroleukemia	1.39 ± 0.92	13.23 ± 3.86	3.51 ± 1.84
K562/ADM	P-glycoprotein-overexpressing K562 cells	0.36 ± 0.18	N/A	N/A
U937	promyelocytic leukemia	0.81 ± 0.24	0.46 ± 0.09	0.34 ± 0.27
Raji	Burkitt's lymphoma	0.88 ± 0.54	0.49 ± 0.04	0.28 ± 0.19

Cells were treated with SBL, ETO or DOX for 72 h. IC₅₀ is defined as the concentration which resulted in a 50% decrease in cell viability. Each value indicates the mean ± S.D. of three different experiments performed in triplicate.

2. SBL は細胞内 RNA を分解し、Jurkat 細胞に対し細胞毒性を発揮する

SBL は、ピリミジン塩基特異的なリボヌクレアーゼ活性をもつことが報告されている。^{16, 23)} そこで、SBL が細胞内で実際に RNA を分解するか否か検討するため、SBL 処理細胞から RNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動により細胞内 RNA の分解を観察した。その結果、SBL (2 μM) 処理 3 時間より RNA の分解が観察され、時間依存的に増加した (Fig. 1A)。次に、SBL の Jurkat 細胞に対する細胞毒性をトリパンブルー色素排除試験により測定したところ、濃度 2 μM において SBL 処理 24 時間以降から、また 48 時間処理において 0.2 μM 以上で、それぞれ時間、濃度依存的な細胞毒性が認められた (Fig. 1B, C)。また、SBL (2 μM) 処理により、24 時間後から顕著な細胞増殖抑制効果が認められた (Fig. 1D)。

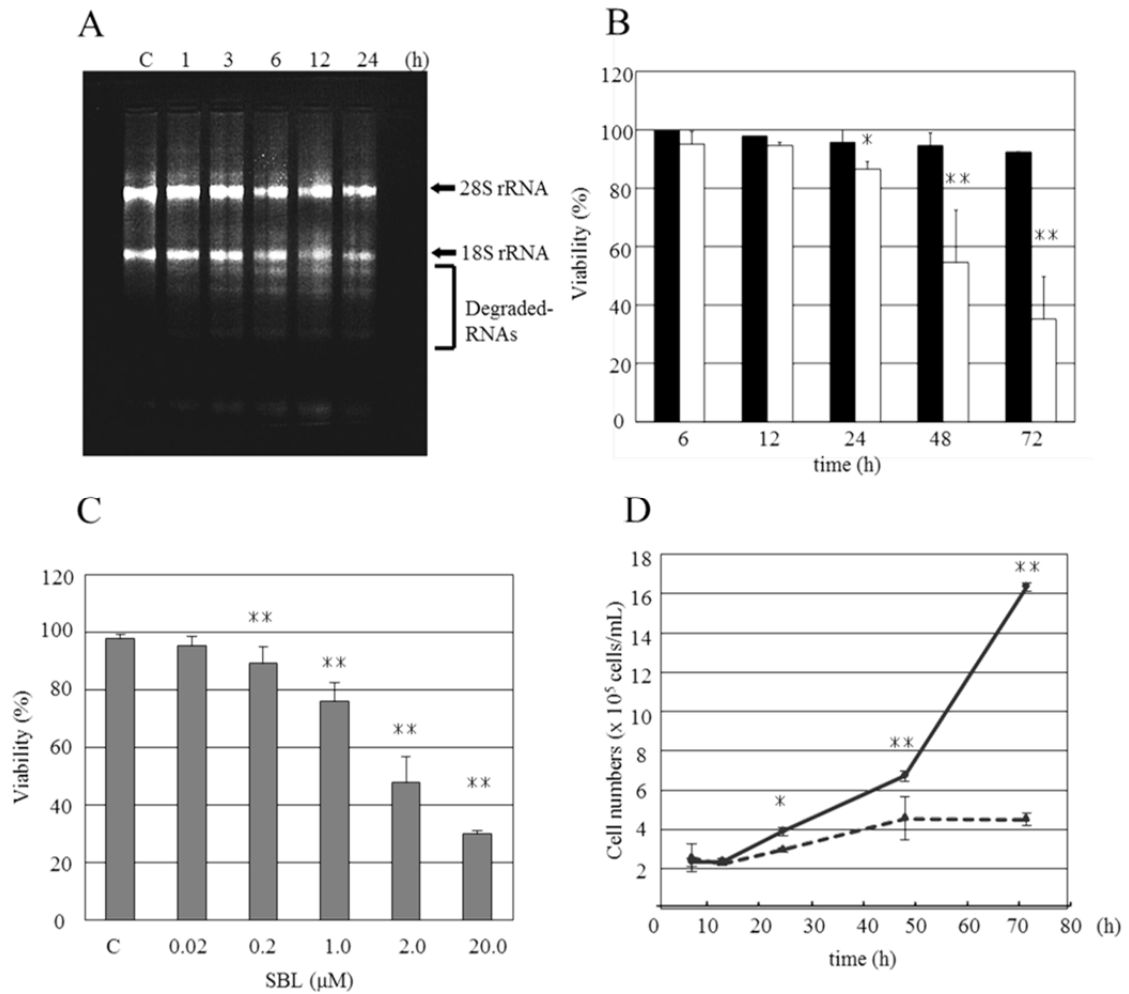


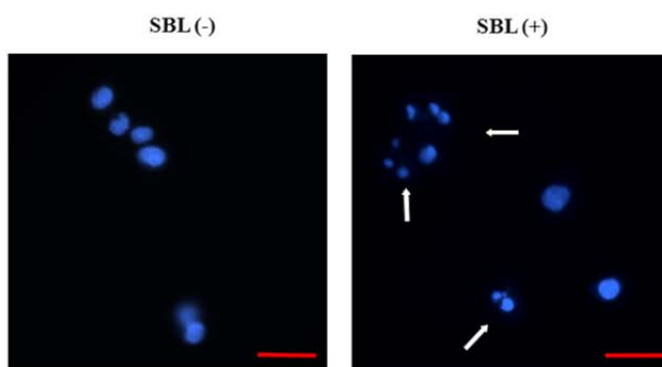
Fig. 1. SBL degrades cellular RNA and inhibits cell proliferation of Jurkat cells.

(A) Cells were treated with SBL (2 μM) for indicated time and RNA was extracted. Then, electrophoresis was performed on 1.5% agarose gel. C, control. Degraded RNAs were seen under 18S rRNA. (B) Cells were treated with (dotted column) or without (filled column) SBL (2 μM) for indicated time. Cell viability was evaluated by trypan blue dye exclusion assay. (C) Cells were treated with SBL at various concentrations for 48 h. Cell viability was evaluated by the method described above. C, control. (D) Cells were treated with (dotted line) or without (solid line) SBL (2 μM) for indicated time and total cell number were counted. Each value represents the mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control.

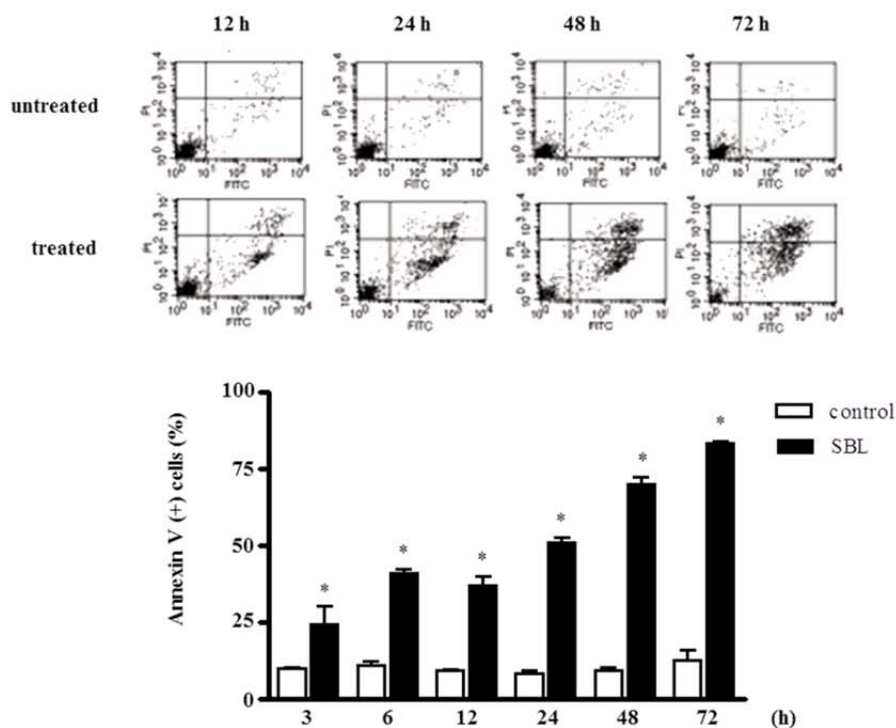
3. SBL は Jurkat 細胞にアポトーシスを誘導する

SBL による細胞毒性に関与するメカニズムを明らかにするため、まず初めに、細胞核の形態学的変化を、Hoechst 33258 染色により観察した。その結果、典型的なアポトーシス様変化である核の凝縮および断片化が SBL (2 μ M) 処理 Jurkat 細胞で観察された (Fig. 2A)。また同様に、特徴的なアポトーシスの生化学的変化として知られる、細胞膜外層側へ移行した phosphatidylserine (PS) に対する アネキシン V の結合が、SBL 処理 (2 μ M) 3 時間後から (Fig. 2B)、カスパーゼ-9、-8 および -3 の活性化が SBL 処理 3-6 時間後から観察された (Fig. 2C)。さらにゲノム DNA の断片化が濃度依存的に観察されたことから (Fig. 2D)、SBL の Jurkat 細胞に対する細胞毒性は、アポトーシスに起因することが明らかになった。

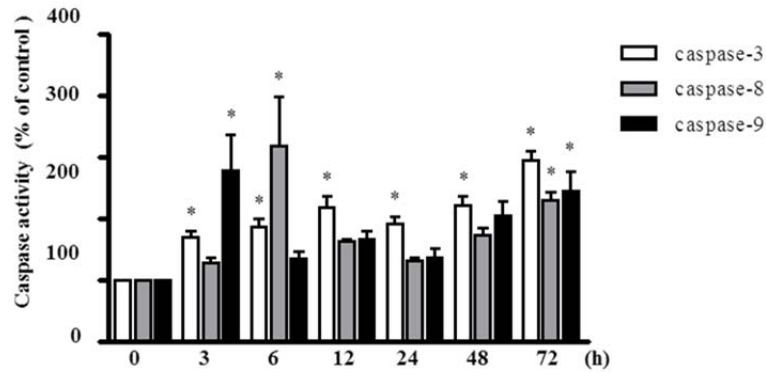
A



B



C



D

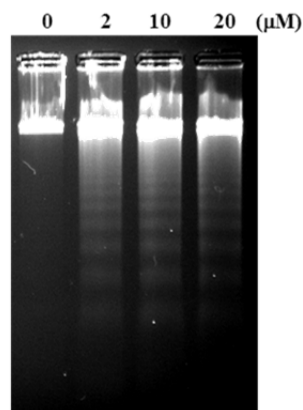


Fig. 2. SBL induces apoptosis in Jurkat cells.

(A) Morphological changes of nuclei in SBL-treated Jurkat cells. Cells were treated with SBL (2 μM) for 48 h, and stained with Hoechst 33258. Nuclei were observed using fluorescent microscope. SBL-untreated (left panel) and -treated (right panel) cells. Arrows indicate apoptotic nuclei. Magnification; 40 x (scale: 10 μm). (B) Time-dependent changes of FITC-annexin V binding and PI incorporation in SBL-treated Jurkat cells. Cells were treated with SBL (2 μM) for indicated time. Then, analysis of annexinV-bound versus PI incorporated cells was performed by FACScalibur. In lower panel, the percentage of cells with annexin V positive was represented. Each value represents the mean \pm S.D. of three independent experiments. *, $p < 0.05$ versus untreated cells. (C) caspase activity of SBL-treated Jurkat cells. Cells were treated with SBL (2 μM) for indicated time. Then, the activity of each caspase was measured using fluorometric assay kit. (D) DNA fragmentation in SBL-treated Jurkat cells. Cells were treated with SBL at indicated concentrations for 48 h, and DNA was prepared from the cells. DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis, and stained with ethidium bromide.

4. SBL 誘導アポトーシスはカスパーゼの活性化に依存し、カスパーゼ-9の活性化はカスパーゼ-8よりも強く誘導される

SBLにより誘導されるカスパーゼ活性化の詳細を明らかにするため、カスパーゼ阻害剤を用いた実験を行った。全てのカスパーゼに対する阻害剤である z-VAD-fmk (50 μ M) 前処理により、SBL 誘導細胞死は顕著に抑制され (Fig. 3A), また DNA 断片化も完全に抑制された (Fig. 3B). 次に、カスパーゼ -8, -9 および -3 それぞれの特異的阻害剤存在下 (50 μ M) での、抑制パターンをウェスタンブロットングにより観察した (Fig. 4B). その結果、z-LEHD-fmk (カスパーゼ -9 阻害剤) 前処理により、カスパーゼ-8の活性化は顕著に阻害された。一方で、z-IETD-fmk (カスパーゼ -8 阻害剤) 前処理ではカスパーゼ -9の活性化は阻害されず、またカスパーゼ -9の活性化は z-VAD-fmk もしくは z-LEHD-fmk 前処理においても影響を受けなかった。z-DEVD-fmk (カスパーゼ -3 阻害剤) はカスパーゼ -8, -9 どちらの活性化にも影響を与えなかった。これらのことから、SBL は、Jurkat 細胞に対してカスパーゼ依存的なアポトーシスを誘導し、その際、カスパーゼ活性化カスケードの上流でカスパーゼ -9の活性化が引き起こされることが明らかになった。

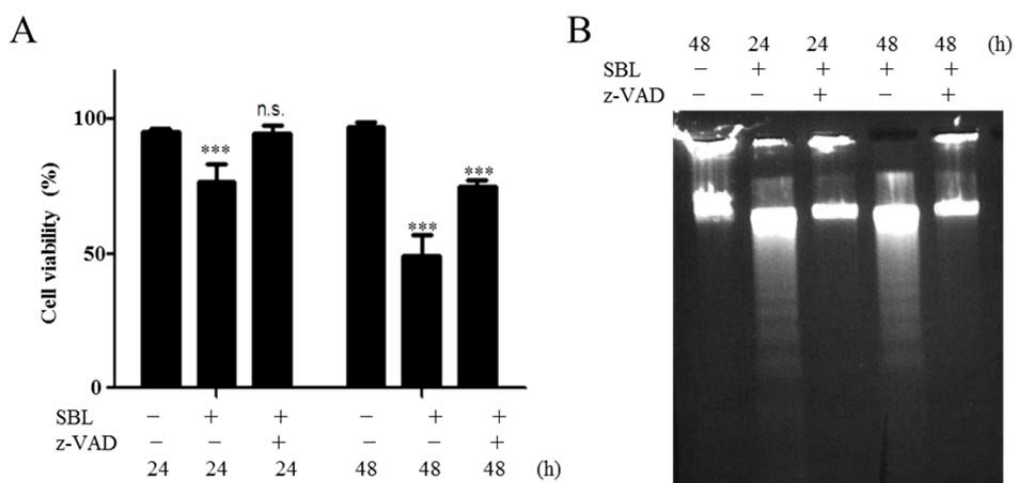


Fig. 3. SBL-induced apoptosis is dependent on caspases.

(A) Effect of z-VAD-fmk on SBL-induced cell death. Cells were treated with (striped column) or without (dotted column) z-VAD-fmk (50 μ M) for 30 min, and subsequently treated with SBL (2 μ M) for indicated time. Cell viability was evaluated by trypan blue dye exclusion assay. Control (black column). Bars, mean \pm S.D. ***, $p < 0.001$. (B) Effect of z-VAD on DNA fragmentation in SBL-treated cells. Cells were treated with or without z-VAD-fmk (50 μ M) for 30 min, and subsequently treated with SBL (2 μ M) for indicated time. Then, DNA was prepared from the cells. DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis, and stained with ethidium bromide.

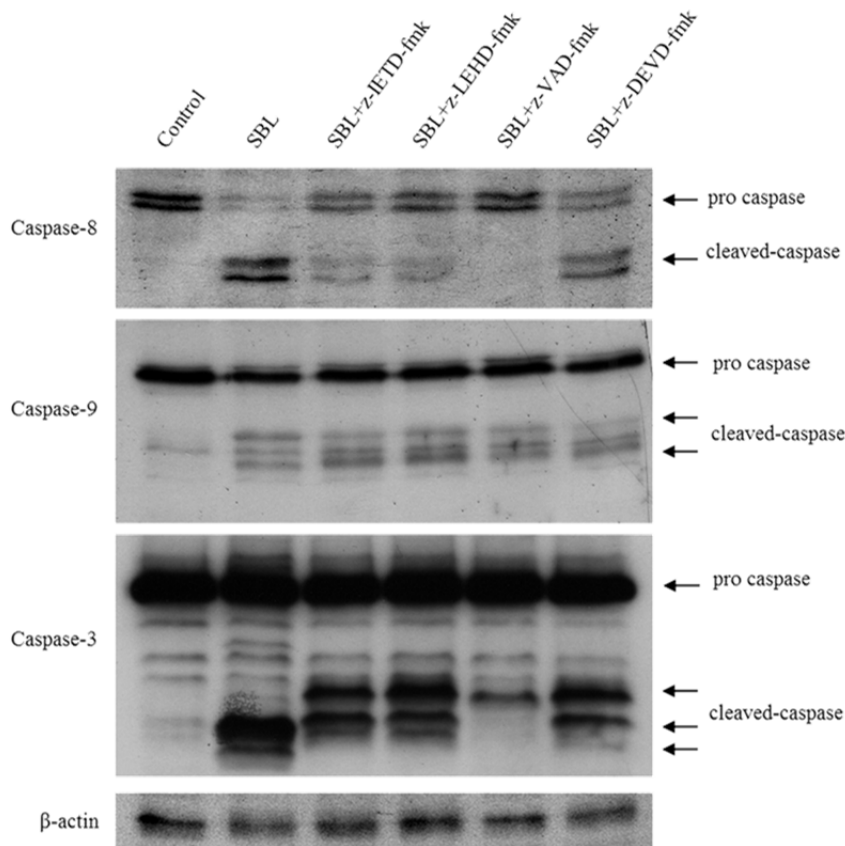


Fig. 4. Effects of caspase inhibitors on SBL-induced caspase activation in Jurkat cells.

Cells were treated with or without caspase inhibitor (50 μ M) for 30 min, and subsequently treated with SBL (2 μ M) for 12 h. Then, whole cell lysate was separated by SDS-PAGE in 15 % gel, and subjected to Western blot analysis using specific antibodies. β -actin was probed to demonstrate equal loading.

5. SBL は p38 および JNK の活性化を誘導する

ある種の化学療法剤や細胞毒性を示す物質は、mitogen-activated protein kinases (MAPKs) の活性を引き起こすことが報告されている。⁵¹⁾ SBL 処理細胞において、extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-jun N-terminal kinase (JNK)/stress-activated protein kinase および p38 が活性化されるか否か、それぞれの活性化体であるリン酸化体の検出をウェスタンブロットティングにより行った (Fig. 5). その結果、p38 の持続的な活性化が SBL (2 μ M) 処理 1 時間後か検出された。さらに JNK の活性化も SBL 処理 1 時間後から検出され、6~9 時間後に最大となった。一方、この条件下において ERK の活性化は認められなかった。これらのことから、SBL 処理直後から p38 および JNK が活性化されることによりアポトーシスが誘導されている可能性が示唆された。

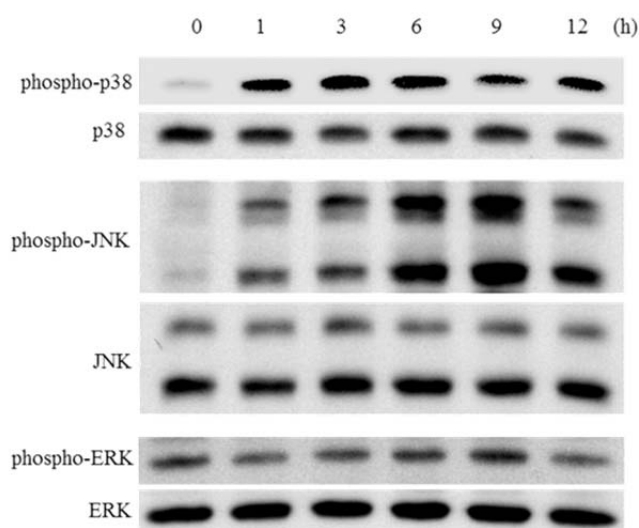


Fig. 5. SBL induces activation of p38 and JNK but not activation of ERK.

Cells were treated with SBL (2 μ M) for indicated time, and phosphorylation status of p-38, JNK and ERK were determined by Western blot analysis. Expression of total p38, JNK and ERK was also determined to confirm equal amount of protein loading in each gel lane.

6. SBL はカスパーゼ活性化の上流でミトコンドリア異常を引き起こす

カスパーゼ-9 はミトコンドリア経路によるアポトーシスのイニシエーターカスパーゼとして知られている。ここで著者は、ミトコンドリア異常に注目して実験を行った。アポトーシスのプロセスにおいて、ミトコンドリアでは、MMP の低下が観察される。SBL (2 μ M) 処理細胞における MMP を、JC-1 (MMP 検出蛍光色素) を用いて測定したところ、SBL 処理 12 時間後から時間依存的な MMP 低下が確認された (Fig. 6A)。また同様に、アポトーシス時におけるミトコンドリア異常の指標となる、シトクロム c のミトコンドリアから細胞質への移行、およびこのシトクロム c の移行に関わる Bid の切断 (切断された Bid, t-Bid はミトコンドリアに移動する) が、それぞれ SBL 処理 6 時間から観察され、SBL 処理細胞におけるミトコンドリア異常が確認された。SBL 誘導アポトーシスにおけるミトコンドリア異常とカスパーゼ活性化の関係を明らかにするため、カスパーゼ阻害剤存在下における SBL 処理細胞の生存率および MMP 低下を観察し、また、TRAIL (デスレセプター経路でアポトーシスを誘導する) 処理細胞および ETO (ミトコンドリア経路でアポトーシスを誘導する) 処理細胞と比較検討した。各アポトーシス誘導剤処理 48 時間後において、z-VAD-fmk (50 μ M) 前処理は TRAIL (5 ng/mL) による細胞毒性を完全に抑制したが、SBL (2 μ M) による細胞毒性は影響を受けず、ETO (200 μ M) においても SBL と同様の傾向が得られた (Fig. 7A)。同様に、TRAIL による MMP 低下は z-VAD-fmk 前処理により完全に抑制されたが、SBL または ETO による MMP 低下は部分的抑制に留まった (Fig. 7B)。さらに、TRAIL による MMP 低下では、z-IETD-fmk (50 μ M) 前処理は z-VAD-fmk と同程度に抑制する傾向が観察されたが、z-LEHD-fmk (50 μ M) 前処理では影響が認められず、SBL または ETO による MMP 低下では、z-IETD-fmk あるいは z-LEHD-fmk 前処理は z-VAD-fmk でみられるような阻害は認められなかった (Fig. 7C)。

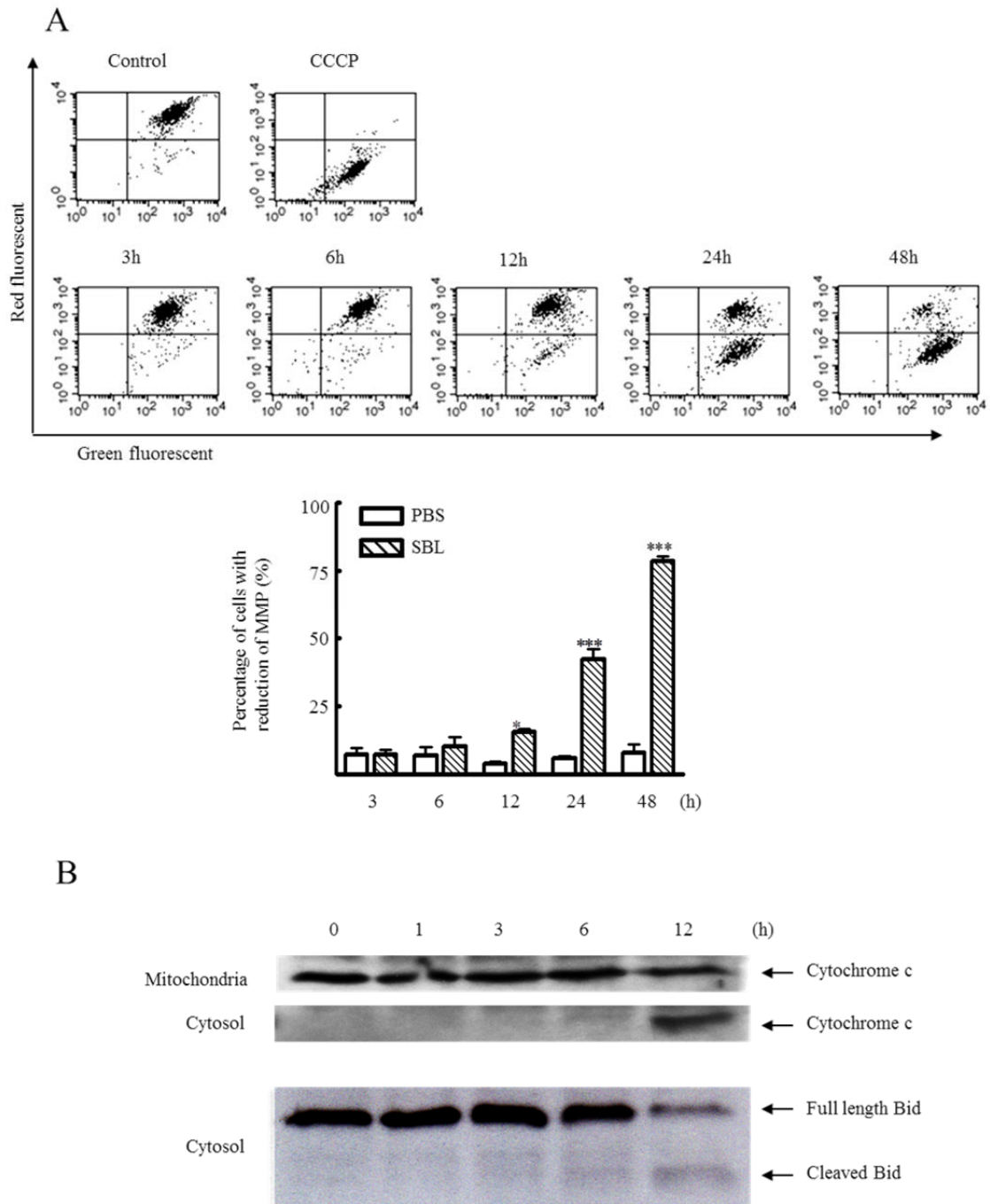
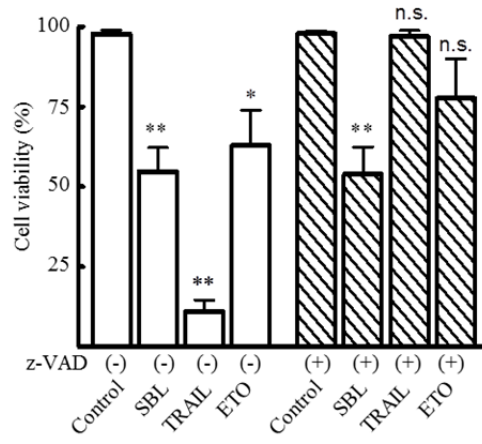


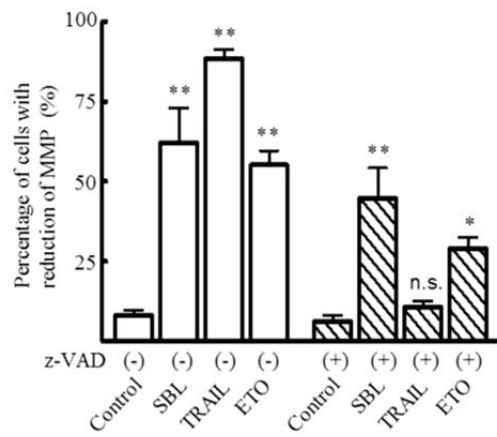
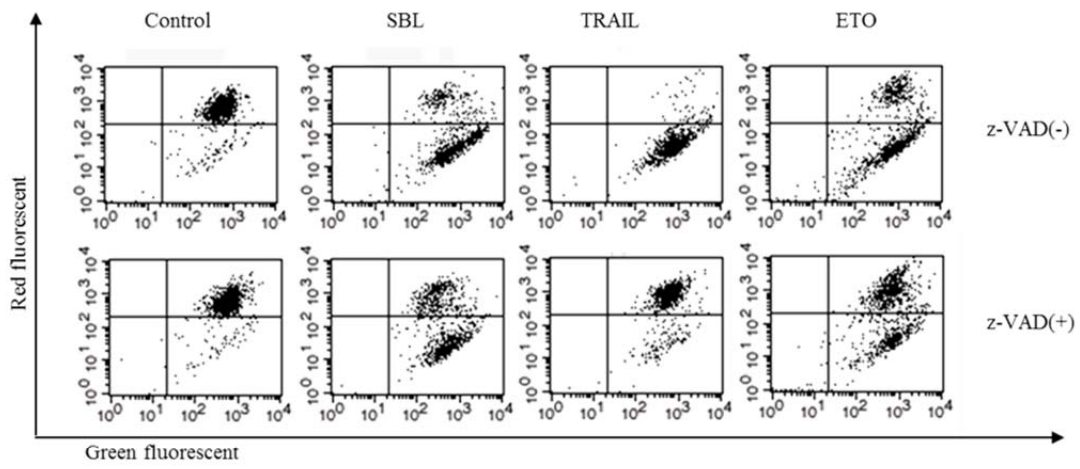
Fig. 6. SBL induces mitochondrial perturbation in Jurkat cells.

(A) Effect of SBL on MMP. Cells were treated with or without SBL (2 μ M) for indicated time. Then, the cells were stained with JC-1 (mitochondria selective dye), and analyzed using FACScalibur. In lower panel, the percentage of cells with reduced MMP [lower right quadrant of each dot plot] was represented. Each value represents the mean \pm S.D. of three independent experiments. (B) Release of cytochrome C from mitochondria to cytosol, and Bid cleavage in SBL-treated cells. Cells were treated with SBL (2 μ M) for indicated time. Then, organelle and cytosol fractions were separated by SDS-PAGE in 15 % gel, and subjected to Western blot analysis using 抗cytochrome C antibody and 抗 Bid antibody.

A



B



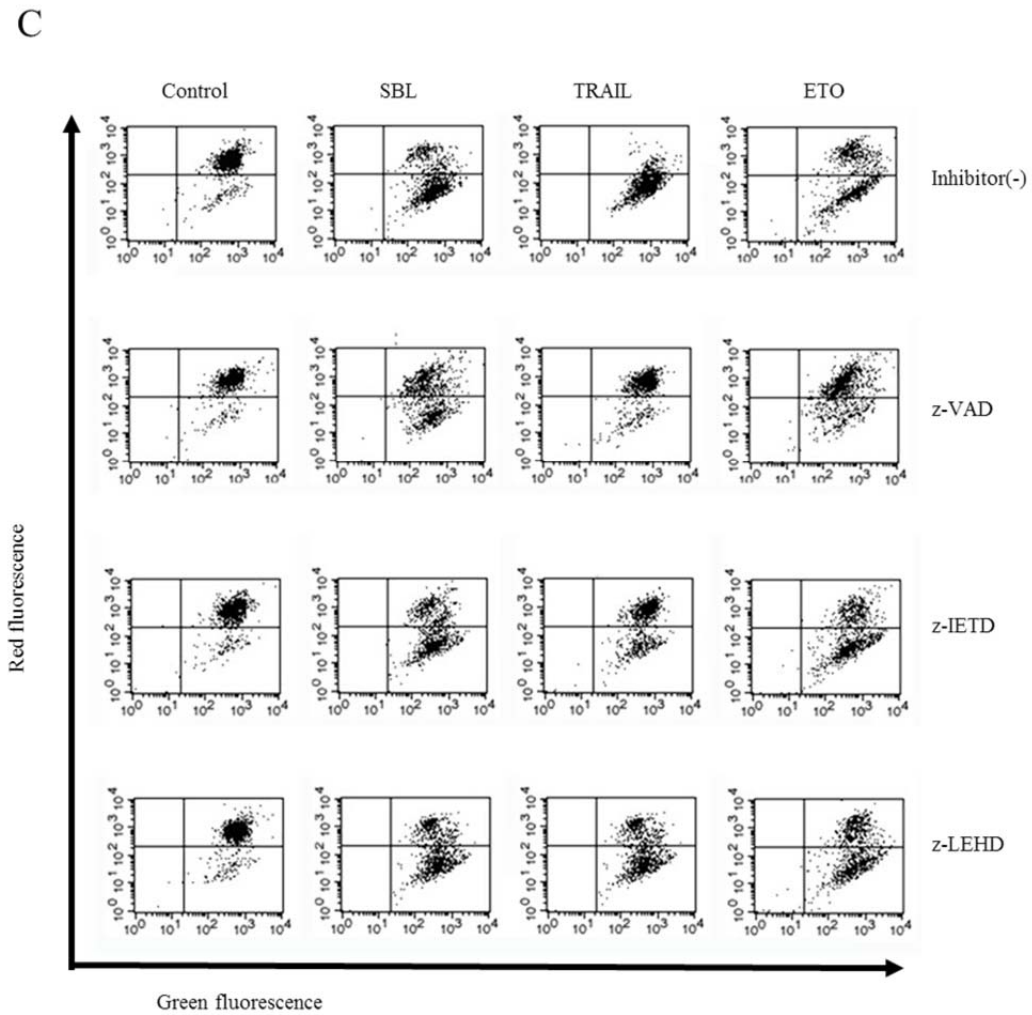


Fig. 7. Mitochondrial perturbation occurs in advance of caspase activation.

(A) Effect of z-VAD on viability of SBL-, TRAIL- or ETO-treated cells. Cell viability was evaluated by trypan blue dye exclusion assay. Cells were treated with or without z-VAD-fmk (50 μ M) for 30 min, and subsequently treated with SBL (2 μ M), TRAIL (5 ng/mL) and ETO (200 μ M) for 48 h. (B) Effect of z-VAD-fmk on SBL-, TRAIL-, or ETO-induced loss of MMP. MMP were measured in the same method as described in Fig. 6. In the lower panel, the percentage of cells with reduced MMP was represented. Each value represents the mean \pm S.D. of three independent experiments. (C) Effect of z-IETD-fmk or z-LEHD-fmk on loss of SBL-induced mitochondrial membrane potential. Cells were treated with or without each caspase inhibitor (50 μ M) for 30 min, and subsequently treated with SBL (2 μ M), TRAIL (5 ng/mL) and ETO (200 μ M), for 48 h. Then, MMP was measured in the same method as described above.

第四節 考察

SBL は 前述の通り、赤血球や他の正常細胞は凝集しないが、種々のがん細胞を凝集する。¹⁴⁾ さらに種々のがん細胞に対し細胞毒性を示すが、正常ヒト肺線維芽細胞 WI-38 や 正常ヒト中皮由来細胞 Met-5A には細胞毒性を示さず (データ未発表), また正常ヒト皮膚線維芽細胞 HFW, 正常マウス胚線維芽細胞 NIH-3T3/3,⁵²⁾ 正常ヒト新生児包皮由来細胞 HS-68,⁴⁹⁾ 正常ハムスター腎由来細胞 BHK-21⁵³⁾ などの正常細胞でも細胞毒性が認められないことが報告されている。SBL による凝集活性および細胞毒性は、細胞をシアリダーゼ処理することにより阻害されることから、SBL のがん細胞選択性にはがん細胞表面のシアル酸が寄与していると考えられている。²⁷⁾ 本研究では、臨床で用いられる ETO や DOX は多剤耐性細胞に細胞毒性を示さない一方で、SBL が多剤耐性を含む種々のヒト白血病細胞に対して細胞毒性を示すことを明らかにした (Table 1)。がん細胞の薬剤に対する耐性は、異なる構造をもつ複数の薬剤に対しても起こることがあり、その現象は多剤耐性と呼ばれ、がん治療における問題点となっている。多剤耐性の対象になり得る抗がん剤の多くは疎水性、あるいは両親媒性の天然化合物で、タキサン (paclitaxel や docetaxel), ビンカアルカロイド (vinorelbine, vincristine や vinblastine), アントラサイクリン (DOX, daunorubicin や epirubicin), エピポドフィロトキシシン (ETO や teniposide) など多種におよび,⁵⁴⁻⁵⁸⁾ 主な原因は P 糖タンパク質のような ATP-binding cassette (ABC) transporter の過剰発現であると考えられている。⁵⁸⁾ 細胞毒性を示すリボヌクレアーゼの一種である PE5 (核移行シグナルを付加されたヒト膵臓リボヌクレアーゼの変異体) は、乳がん由来多剤耐性細胞 [ADR 耐性 MCF-7 (MCF-7/ADR)] の P 糖タンパク質の発現を減少させることが報告されている。⁵⁹⁾ 本研究においては、SBL 処理多剤耐性細胞における P 糖タンパク質の発現等に関する詳細は明らかになっていないものの、SBL は P 糖タンパク質過剰発現 K562 細胞に対し、その親細胞株である K562 細胞よりも低い IC₅₀ 値で細胞増殖抑制効果を示し、P 糖タンパク質の発現量にかかわらず抗腫瘍効果を示すことが示唆された。これらのことから、SBL が現在頻用されている DNA 傷害型抗がん剤に代わる新しい治療薬になりうる可能性があると考えられる。

アポトーシスは、分化、免疫、また化学療法剤により誘導される細胞死など、様々な生物現象で重要な役割を担うプロセスである。⁶⁰⁾ がん治療においては、アポトーシスの誘導が効率的な治療の要因と考えられている。古くから、アポトーシスのシグナルは、デスレセプター経路もしくはミトコンドリア経路で誘導されることが知られており、どちらの経路においても最終的にはエフェクターカスパーゼとして知られるカスパーゼ -3 が活性化されることでアポトーシスプロセスが完遂される。⁶¹⁾ アポトーシスの実行期において観察される、クロマチンの凝集、核の断片化、ヌクレオソーム単位でのゲノム DNA の断片化などは典型的なアポトーシス様変化としてよく知られている。本研究において著者は、SBL 処理された Jurkat ではアポトーシスに典型的な形態学および生化学的変化が観察される

ことを示した (Fig, 2). また, SBL による DNA 断片化は z-VAD-fmk 前処理により完全に抑制され, カスパーゼ依存性のアポトーシスが進行することが明らかとなった.

いくつかの抗がん剤や RNA 毒性 (ribotoxic stress) を引き起こす天然毒素は, MAPK の活性化を誘導することが報告されている.^{51, 62)} Ribotoxic stress に関し, He らは, deoxynivalenol (DON), anisomycin, satratoxin G (SG) や ricin などの ribotoxin がマウスマクロファージ細胞 RAW 264 細胞において p38, JNKs および ERK を活性化することを発見した.⁶³⁾ また, *jnk1* および *jnk2* をノックアウトした mouse embryo fibroblast (MEF) 細胞を用いた実験では, ONC の細胞毒性が減弱され, JNK が ONC の細胞毒性に重要であることが報告されている.⁶⁴⁾ さらに Fang らは, ニガウリ由来の細胞毒性を示すリボヌクレアーゼ MC2 が, MCF-7 細胞においては p38, JNK および ERK を,²¹⁾ Hep G2 細胞においては ERK と JNK を活性化し, それを起因とするアポトーシスを誘導することを明らかにしている.⁶⁵⁾ 一般に p38 および JNK の活性化はアポトーシス促進的に,^{51, 66)} ERK の活性化は抗アポトーシス的に, また刺激や細胞の種類によってはアポトーシス促進的に作用することが広く受け入れられているものの,^{67, 68)} 細胞毒性を示すリボヌクレアーゼと MAPK との関連においてはいくつかの複雑な機構が報告されている. Costro らは, 前述の PE5 は MCF-7/ADR に対して JNK の不活性化を介したアポトーシスを誘導し, 一方でこの細胞における ONC 誘導アポトーシスでは JNK の活性化状態に変化が認められないことを発見している.⁶⁹⁾ 本研究において著者は, SBL が ERK のリン酸化は誘導しないものの, p38 および JNK を活性化することを明らかにした. この p38 および JNK の活性化は SBL 処理 1 時間後から観察され, ミトコンドリア異常が認められる時間帯よりも早く観察された. 著者は p38 阻害剤 (SP600125) および JNK 阻害剤 (SB203580) による SBL の細胞死誘導効果に対する影響を検討したが, これら阻害剤は SBL による細胞毒性に影響を示さなかった (データ未発表). これらの現象の理由としてはいくつか考えられ, SBL の細胞表面への結合あるいは細胞内への取り込み自体が MAPK の活性化の原因になり, SBL による細胞毒性に MAPK の活性化は関与しない場合, または MAPK の活性化を阻害することによって細胞死を誘導する代替経路が誘導される場合などが考えられる. SBL 誘導アポトーシスにおける p38 および JNK 活性化の意義は今後の検討課題である.

Wolf と Green らは, エフェクターカスパーゼであるカスパーゼ -3 は, イニシエーターカスパーゼであるカスパーゼ -8 を切断し, 活性化することを明らかにしている.⁷⁰⁾ カスパーゼ -8 の活性化は Bid の特異的な分解を引き起こし, truncated Bid (tBid) を生成する. tBid は細胞質からミトコンドリアへと移動し, 抗アポトーシス性の Bcl-2 ファミリータンパク質と相互作用することでミトコンドリアから シトクロム c の放出を引き起こす.⁷¹⁻⁷⁵⁾ さらにはシトクロム c の放出が caspase-9 の活性化を誘導することになり, 結局, カスパーゼ -8 の活性化が シトクロム c の持続的な放出とそれに続くカスパーゼ-9, カスパーゼ-3 の活性化によりアポトーシスシグナルの増強を誘導するという結果を

生む。⁷⁶⁾ アポトーシスにおけるカスパーゼカスケードの活性化が一度誘導されると、そのシグナル増強により、カスパーゼ -8, -9 および -3 それぞれが活性化されることになる。一方、実験系の検出感度によっては、各イベントが起こる時系列の正確な把握が困難になる場合があるが、このことは、アポトーシスのプロセスにおいて、ある刺激に対してどのシグナル経路が応答するかを決定する際の問題点となる。そこで、本研究において著者は、特異的カスパーゼ阻害剤、MMP 低下の検出試薬を用い、SBL により誘導される MMP の低下に対するカスパーゼ阻害剤の影響を観察し、TRAIL および ETO により誘導される MMP 低下に対するそれらの影響と比較検討した。その結果、TRAIL による MMP 低下は z-VAD-fmk 処理により完全に抑制されたが、SBL による MMP 低下は ETO と同様、z-VAD-fmk 前処理による影響を受けなかった (Fig. 7A and B)。これらのことは、SBL による細胞死誘導効果はカスパーゼの活性化に依存したアポトーシスにより起こり、そのシグナル経路においてはミトコンドリア障害がカスパーゼの活性化よりも上流で起きていることを示している。

本章では、多機能性タンパク質である SBL が多剤耐性細胞を含む種々のヒト白血病細胞に対し細胞増殖抑制効果を示すことを明らかにした。SBL 誘導アポトーシスのシグナル解析を行ったところ、カスパーゼの活性化に依存しないミトコンドリア異常が起こることが示された。SBL によるアポトーシス誘導効果において、予想される作用機序を Fig. 8 に示す。SBL は細胞表面に結合後、がん細胞内に取り込まれ RNA を分解する。その後、ミトコンドリア障害が誘導されるが、このプロセスには p38 や JNK の活性化が関与している可能性がある。最終的にアポトーシスシグナルは、カスパーゼの活性化により増強され、アポトーシスの実行、細胞死へと導かれると考えられる。本章ではまた特異的 カスパーゼ 阻害剤、MMP 検出試薬の組合わせによりアポトーシスシグナルの詳細な解析が可能になることを示した。SBL は、がん細胞に対し、RNA をターゲットとするこれまで知られていなかった機序によりアポトーシスを誘導し、また多剤耐性の有無にかかわらず抗腫瘍効果を示すことから、現在頻用される DNA 傷害型薬剤に代わる抗がん剤として期待される。

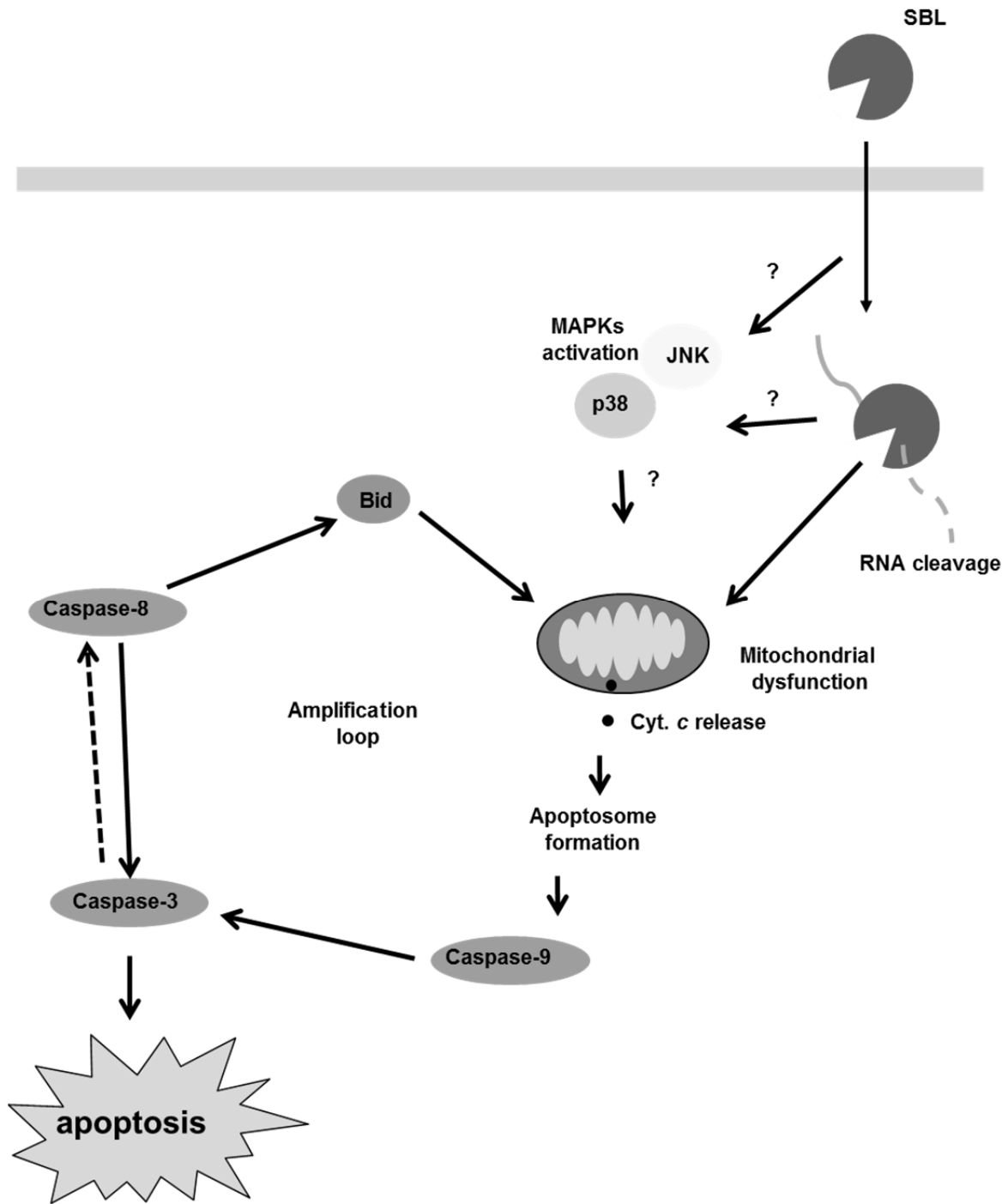


Fig. 8. Proposed model for apoptotic mechanism induced by SBL in Jurkat cells.

SBL binds to cell surface and internalizes into tumor cells. SBL degrades cellular RNA, and this ribotoxic stress triggers mitochondrial perturbation. Then, apoptotic signal is amplified by caspase activation, and leads cell death. Dotted arrow indicates the activation of caspase-8 induced by activated caspase-3 reported by Wolf and Green.⁷⁰⁾

第二章

SBL 誘導アポトーシスにおける小胞体ストレスの関与

第一節 序

化学療法に用いられる抗腫瘍薬の多くは、がん細胞に対しアポトーシスを誘導する。^{77, 78)} アポトーシスは生理的な細胞死の形態であり、正常な分化、組織の恒常性あるいは病理的状況下において重要な役割を担っている。^{79, 80)} 第一章で述べたように、アポトーシスを誘導するシグナル経路としては、外因性経路 (デスレセプター経路)^{81, 82)} および 内因性経路 (ミトコンドリア経路)^{83, 84)} の二つの経路がよく知られている。しかし、最近になりもう一つの経路、小胞体 [endoplasmic reticulum (ER)] ストレス経路が発見され、がん治療における新しい標的として注目を集めるようになった。⁸⁵⁾

小胞体は、 Ca^{2+} の貯蔵オルガネラであるとともに、脂質やステロール合成あるいは細胞膜タンパク質や分泌タンパク質の合成・品質管理を担う細胞内小器官である。真核細胞の膜タンパク質や分泌系タンパク質は、小胞体で生合成された後、膜小胞に包まれてゴルジ体に輸送され、その後、機能を発現する目的地 (細胞外やオルガネラ) に輸送される。mRNA から翻訳された直後のポリペプチドは、機能をもったタンパク質になるために適切な高次構造が形成される必要があり、このプロセスは“フォールディング”と呼ばれる。小胞体におけるフォールディングでは、糖鎖付加やジスルフィド結合の形成といった修飾も行われる。小胞体内で正しくフォールディング・修飾されたタンパク質は、小胞輸送によってゴルジ体へと輸送され、更なる修飾を受けて成熟タンパク質となる。一方で、ある頻度で正しくフォールディングされない不良タンパク質ができることがある。このような不良タンパク質は通常、カルネキシンや immunoglobulin heavy chain binding protein/glucose regulated protein 78 (Bip/GRP78) などの小胞体シャペロンによるリフォールディングを受けて正規のルートに戻されるか、あるいは小胞体関連タンパク質分解機構 [endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD)] により分解される。このように、小胞体では、小胞体シャペロンによるフォールディングと ERAD による分解の 2 つの作用により、タンパク質の合成と品質管理が同時になされている。小胞体ストレスは、この 2 つの作用のバランスが破綻した結果、小胞体内腔に不良タンパク質が蓄積した状態であり、小胞体はこのようなストレスに対し、unfolded protein response (UPR) と呼ばれる一連の反応や、ERAD 因子の転写誘導を介して対応することが明らかになっている。⁸⁶⁻⁸⁸⁾

UPR は、inositol requiring enzyme 1 (IRE1), activating transcription factor 6 (ATF6), PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) という 3 種のタンパク質を起点としている。

これら 3 種のタンパク質は、いずれも小胞体膜に存在する膜貫通タンパク質であり、小胞体内腔での不良タンパク質の蓄積を察知するセンサーとして、さらに、小胞体ストレスのシグナルを細胞質側へ伝達する分子として機能している。⁸⁹⁾ 一方で、過度の小胞体ストレスにより、UPR や ERAD でもストレスが回避されない場合、蓄積した不良タンパク質は、小胞体ストレス性アポトーシスの誘導により、細胞ごと排除される。小胞体ストレス依存性アポトーシスの主なシグナルは、アポトーシス誘導性転写因子 C/EBP homology protein (CHOP/GADD153) やアポトーシス誘導性 Bcl-2 ファミリータンパク質、小胞体からミトコンドリアへの直接的なカルシウムの流入により伝達されと考えられている。^{90, 91)} 小胞体ストレスを介したアポトーシスは、アルツハイマー病⁹²⁾ やパーキンソン病、⁹³⁾ 糖尿病⁹⁴⁾ などのいくつかの病態や、bortezomib,⁹⁵⁾ nelfinavir⁹⁶⁾ に代表される薬剤性の細胞死メカニズムに関与することが報告され、小胞体ストレスを標的とするがん治療が新しい戦略として期待されている。⁹⁷⁾

第一章において著者は、SBL が多剤耐性細胞を含む数種のヒト白血病細胞に対し抗腫瘍作用を示し、それがカスパーゼ依存性アポトーシスによるものであることを明らかにした。また、その過程において、著しいミトコンドリア異常が上流のイベントとして起きることを述べた。しかし、SBL の伝達する細胞死誘導シグナルには不明な点も多いため、本章では、SBL 誘導アポトーシスにおける小胞体ストレスの関与の有無について検討した。

第二節 実験材料および実験方法

1. 材料

SBL は、第一章、第二節、第 1 項に述べた方法で調製した。Thapsigargin (TG; Calbiochem 社製) は、3 mM dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶液として使用した。カスパーゼ-4 阻害剤 (z-LEVD-fmk) および抗カスパーゼ -4 抗体は MBL 社より購入した。抗 Bip/GRP78 抗体は Becton-Dickinson 社より購入した。

抗カスパーゼ -8, -9 および -3 抗体、ならびに各種 カスパーゼ-阻害剤 (z-VAD, z-IETD, z-LEHD) は、第一章、第二節、第 1 項にあるものと同様のものを用いた。

2. 細胞培養

Jurkat 細胞は、第一章、第二節、第 2 項に述べた方法で培養した。

3. subG1 population の検出

細胞を回収後, PBS で洗浄し, PBS 懸濁液とした. 測定用 propidium iodide (PI) 溶液 [0.2 % Triton X-100, 4 mM EDTA (pH 8.0), 20 µg/mL リボヌクレアーゼ A, 40 µg/mL PI を含む PBS] を等量添加し, すみやかに FACScalibur にて細胞の DNA 含量を測定した. G1 ピークよりも少ない DNA 含量を示す細胞集団を subG1 population とみなした.

4. ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは, 第一章, 第二節, 第 9 項に述べた方法で行った.

5. X-box binding protein 1 (XBP-1) splicing の検出

Total RNA の抽出は, 第一章, 第二節, 第 3 項に述べた方法で行った. Reverse transcription (RT) 反応は ReverTra Ace (Toyobo 社製)を用いて行った. 得られた total RNA (1 µg) を template として用い, PCR チューブに oligo (dT)₁₂₋₁₈ 1.0 µL, リボヌクレアーゼ free H₂O を加え全量を 13.0 µL とし, 70 °C で 10 分間反応した後, 1 分間以上氷冷し, 5 x RT buffer 4.0 µL, 10 mM dNTP mix 2.0 µL を加え, 42 °C で 5 分間反応した. 次に, ReverTra Ace 1.0 µL (100 U) を添加し, 42 °C で 50 分間, さらに 99 °C で 5 分間反応することにより, cDNA を合成した. XBP-1 splicing は Nakamura らの方法に準じて検出した.⁹⁸⁾ PCR 反応は, template cDNA 4.0 µL に, 酵素反応溶液 [10 µM forward primer (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'), 10 µM reverse primer (5'-TCCACCACCTGTTGCTG-3') 各 1.5 µL, 10 mM dNTP mix 4.0 µL, 10 x PCR buffer 5.0 µL, Animal Taq DNA polymerase (ABgene 社製) 0.5 µL (2.5U), H₂O 33.5 µL] 46 µL を加え全量を 50 µL とし, 94 °C で 30 秒間, 58 °C で 30 秒間, 72 °C で 30 秒間を 23 サイクル行い増幅した. XBP-1 総量の発現上昇を確認するため, 一部を 1.5 % アガロースゲル電気泳動後, EtBr 染色により確認した. また, spliced form の増加を検出するため, 残りの一定量に制限酵素溶液 [Apa I 1.0 µL (10 U), 10 mg/mL BSA 0.25 µL] を添加し, 37 °C, 90 分間制限酵素処理を行った. 制限酵素反応産物を, 2.5 % アガロースゲル電気泳動後, EtBr 染色により確認した.

6. カスパーゼ 阻害剤の処理

カスパーゼ 阻害剤の処理は, 第一章, 第二節, 第 8 項に述べた方法で行った. z-LEVD (カスパーゼ-4 阻害剤) は, DNA 断片化の観察においては 2, 10, 30 µM で, 他の実験においては 30 µM で使用した.

7. DNA 断片化の観察

DNA 断片化の観察は, 第一章, 第二節, 第 6 項に述べた方法で行った.

8. 核の形態観察

核の形態観察は、第一章、第二節、第 5 項に述べた方法で行った。

9. アネキシン V の結合とヨウ化プロピジウム (PI) の取り込みの測定

アネキシン V の結合と PI の取り込みの測定は、第一章、第二節、第 7 項に述べた方法で行った。

10. MMP 低下の検出

MMP 低下の検出は、第一章、第二節、第 10 項に述べた方法で行った。

11. 統計学的処理

統計学的処理は、第一章、第二節、第 11 項に述べた方法で行った。

第三節 結果

1. SBL 処理 Jurkat 細胞において、時間依存的な sub G1 population の増加とカスパーゼの活性が観察される

著者は第一章において、SBL が Jurkat 細胞に対しアポトーシスを誘導することを示した。より詳細なシグナル経路を明らかにするため、まず初めに SBL 誘導アポトーシスにおけるアポトーシス様変化の時間経過を観察した。アポトーシス時には、細胞の核およびクロマチン DNA の断片化と、アポトーシス小体と呼ばれる油滴状の断片の出現により、sub G1 population と呼ばれる、DNA 含量が 2N より少ない細胞集団が観察され、これらはアポトーシスの指標になると理解されている。フローサイトメトリーにより SBL 処理 Jurkat 細胞の DNA 含量を測定したところ、時間依存的な sub G1 population の増加が認められ、SBL 処理 (2 μ M) 24 時間後では約 22 %、48 時間後では約 44 % の細胞が sub G1 期に移行していた (Fig. 1)。また同時に、小胞体ストレス誘導剤 (endoplasmic reticular Ca^{2+} -ATPase 阻害剤) である TG 処理においても、時間依存的な sub G1 population の増加が認められ、sub G1 期に移行した細胞の割合は TG 処理 (3 μ M) 24 時間後では約 18 %、48 時間後では約 26 % であった。さらに、SBL 処理 Jurkat 細胞におけるカスパーゼ -8, -9, -3 の活性化をウェスタンブロッティングにより検討したところ、カスパーゼ -8 は SBL 処理 3 時間後から、カスパーゼ -9 は 1 時間後からそれぞれに顕著な活性型フラグメントの

増加が観察された。カスパーゼ -3 の活性化による プロカスパーゼ -3 の減少は, SBL 処理 24 時間後から観察された (Fig. 2).

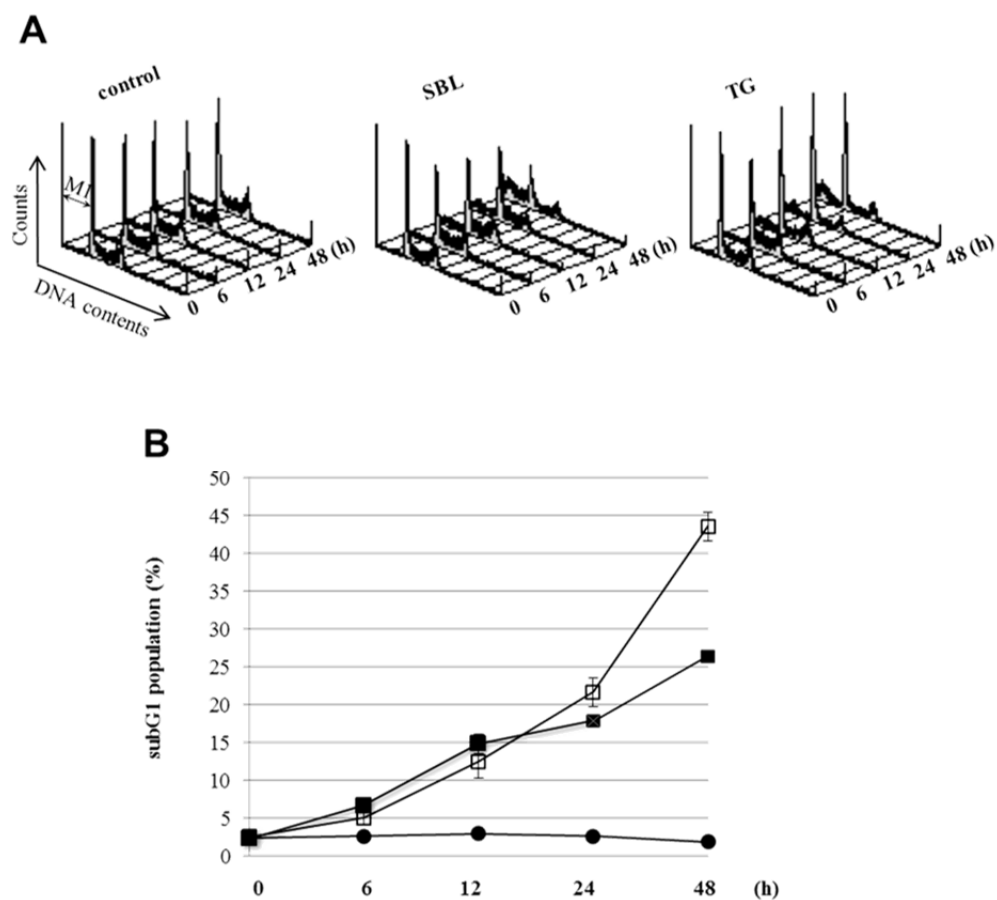


Fig. 1. SBL induces time-dependent increment in subG1 population.

Jurkat cells were treated with SBL (2 μ M) and TG (3 μ M) for indicated times. The cells were washed once with PBS, centrifuged and stained with PI. Then, DNA content was measured using FACSCalibur. M1 range represents subG1 population (A), and the percentage is indicated in the line graph (B). Closed circle, open square and closed square represent control, SBL-treated and TG-treated cells, respectively.

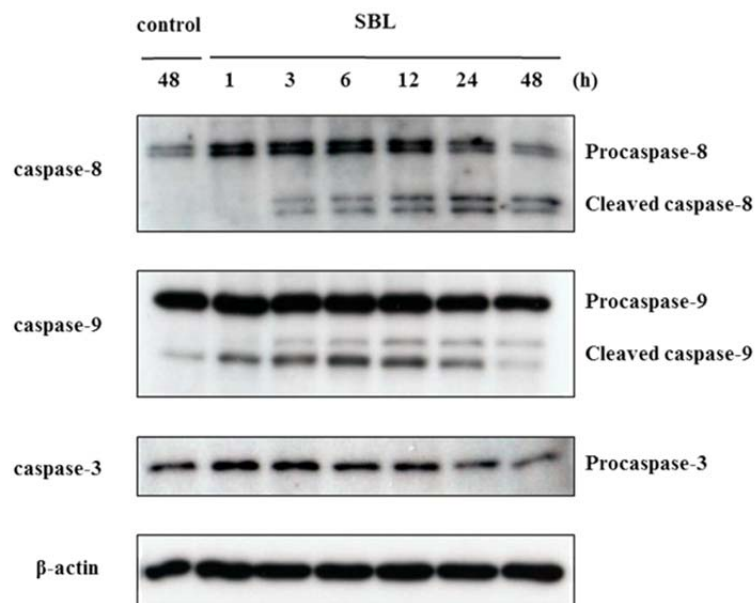


Fig. 2. SBL induces time-dependent caspase activation.

Jurkat cells were treated with SBL (2 μ M) for indicated time. Whole cell lysates were collected, and activation of caspase-8, -9 and -3 was detected by western blot analysis. β -actin was used as loading control.

2. SBL は小胞体ストレスシグナルを誘導する

SBL 処理により, Jurkat 細胞に小胞体ストレスおよび小胞体ストレス性アポトーシスが誘導されるか否かを調べるため, 小胞体ストレスの指標となる UPR のターゲット, Bip/GRP78 および カスパーゼ -4 の活性化をウェスタンブロットティングにより観察し, また XBP-1 mRNA の発現上昇および XBP-1 スプライシング量の増大を RT-PCR 後の制限酵素処理により検出した. その結果, SBL 処理後 6 時間から 48 時間にかけて Bip/GRP78 の発現上昇が観察され, 24 時間から 48 時間後にかけて, カスパーゼ -4 の活性化を示すプロカスパーゼ -4 の減少が観察された (Fig. 3A). XBP-1 mRNA は, 小胞体ストレス時に IRE1 の リボヌクレアーゼドメインによりスプライシングを受ける. この時スプライシングされる 26 ヌクレオチド [nucleotide (nt)] イントロンの領域には *Apa* I 切断サイトが存在するため, PCR で増幅後, *Apa* I により unspliced form を切断し, より小さな断片とすることで spliced form との判別を容易にすることができる (Fig. 3B upper). Spliced form および unspliced form を合せた XBP-1 の発現量は SBL 処理により増加したが, spliced form の発現量は, SBL 処理により変化しなかった (Fig. 3B lower).

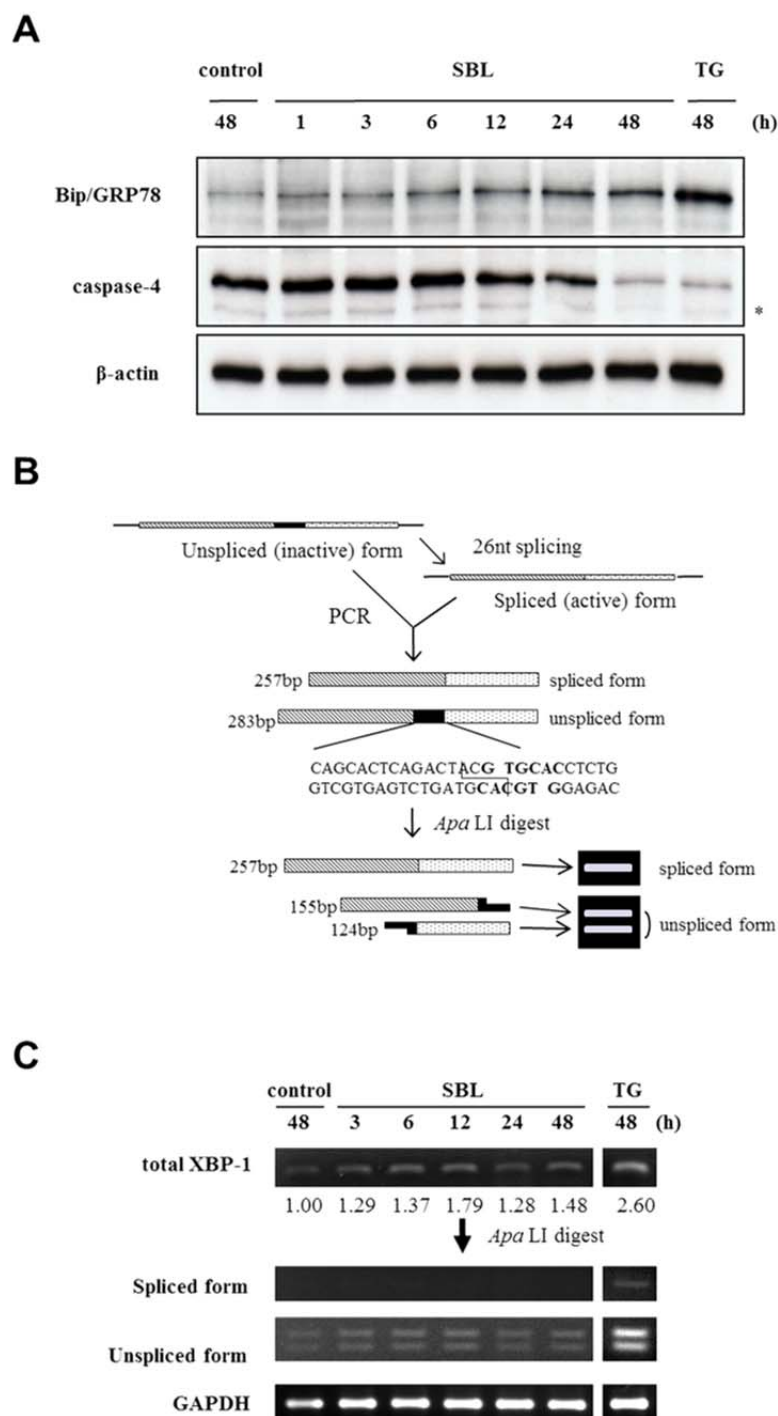


Fig. 3. Activation of ER stress signaling in SBL-treated Jurkat cells.

(A) Expression of Bip and activation of caspase-4 in SBL-treated Jurkat cells. Jurkat cells were treated with SBL (2 μ M) or TG (3 μ M) for indicated times. Whole cell lysates were subjected to western blot analysis for detecting Bip/GRP78 and caspase-4. *, non-specific band. (B) Digestion with *Apa*LI made it easier to discern the expression of spliced and unspliced form of XBP-1. The scheme for distinguishing spliced form from unspliced form of XBP-1 is presented. (C) Expression of XBP-1 in SBL-treated Jurkat cells. Jurkat cells were treated with SBL (2 μ M) or TG (3 μ M) for indicated times, and RT-PCR was done by use of XBP-1 mRNA. The total expression of XBP-1 was analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. Products of RT-PCR were subsequently digested with *Apa*LI for 90 min, to detect inactive or active form derived from XBP-1 DNA. After digestion, the products were electrophoresed using 2.5% agarose gel and stained with EtBr. The total XBP-1 bands were quantified by densitometry, and expressed as a ratio of the intensity of XBP-1 to GAPDH (XBP-1/GAPDH).

3. カスパーゼ -4 の活性化は SBL 誘導アポトーシスに關与する

SBL が誘導するアポトーシスへの小胞体ストレスの寄与を調べるため、カスパーゼ -4 阻害剤 (z-LEVD-fmk) を用い、SBL により誘導されるアポトーシスが抑制されるか否か検討した。その結果、SBL による DNA の断片化は、z-LEVD-fmk の濃度 10 μM 以上で濃度依存的に抑制され (Fig. 4A), また 30 μM において核の断片化もほぼ完全に抑制された (Fig. 4B)。さらに、アネキシン V-PI 法によりアポトーシス細胞を検出したところ、SBL 処理により約 54 % の細胞が アネキシン V 陽性となるのに対し、z-LEVD-fmk (30 μM) を前処理した細胞では約 36 % と、およそ 20 % 減少した (Fig. 4C)。以上の結果から、SBL が誘導するアポトーシスには、小胞体ストレスによるカスパーゼ -4 の活性化が深く關与していることが示唆された。

A

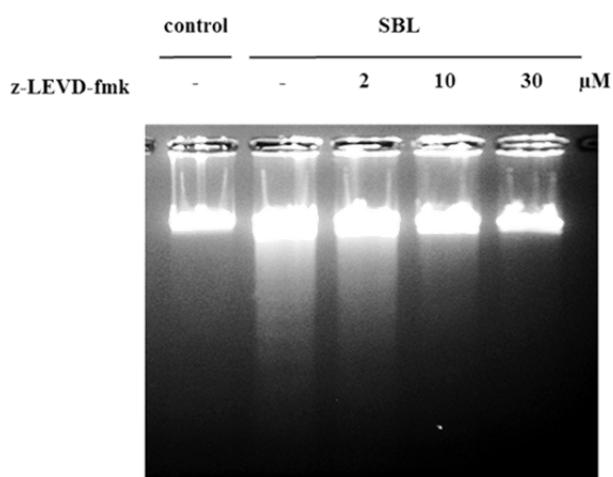
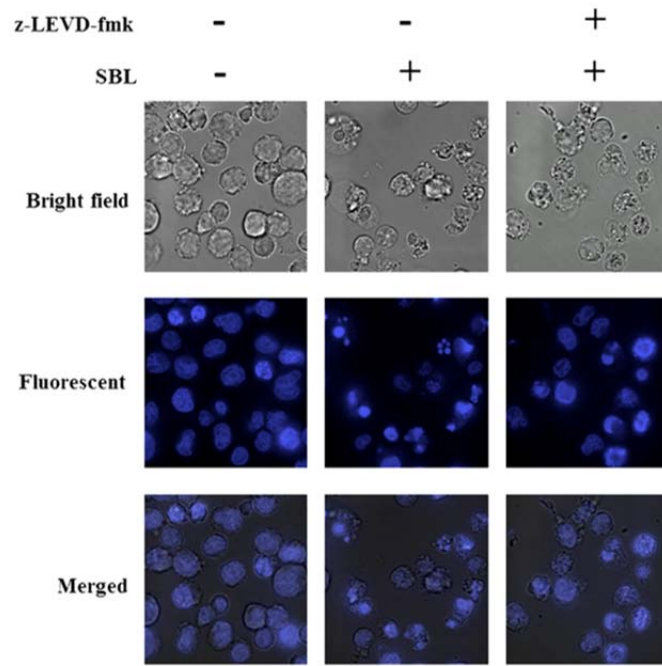
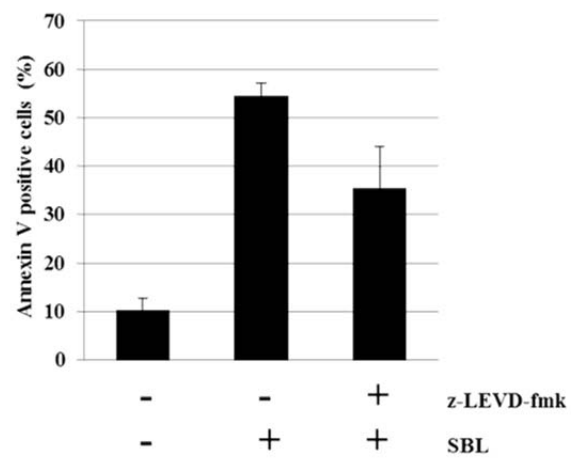
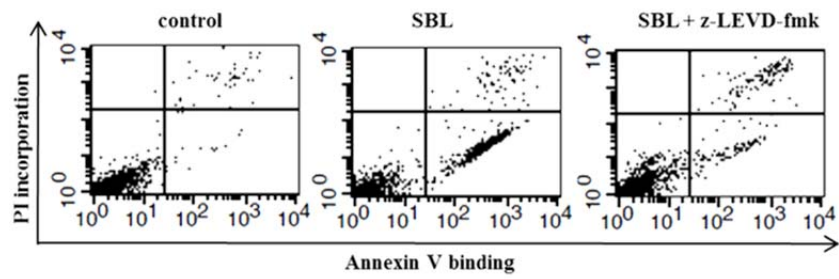


Fig. 4. Participation of ER stress to SBL-induced apoptosis in Jurkat cells.

(A) Effect of z-LEVD-fmk on SBL-induced DNA fragmentation. Jurkat cells were pretreated with indicated concentrations of z-LEVD-fmk for 30 min, and treated with SBL (2 μM) for 24 h. DNA was prepared from the cells. DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis, and stained with EtBr. (B) Effect of z-LEVD-fmk on SBL-induced nuclear fragmentation. After pretreatment of Jurkat cells with z-LEVD-fmk (30 μM) for 30 min, the cells were treated with or without SBL (2 μM) for 48 h. Then, the cells were stained with Hoechst 33258, and nuclear fragmentation images were taken. (C) Effect of z-LEVD-fmk on SBL-induced apoptosis. The cells were treated with z-LEVD-fmk (30 μM) for 30 min, and with or without SBL (2 μM) for 24 h. Then, analysis of Annexin V-bound versus PI-incorporated cells was performed by FACScalibur. Percentages of cells divided into lower right-hand (LR) and upper right-hand (UR) quadrant are indicated.

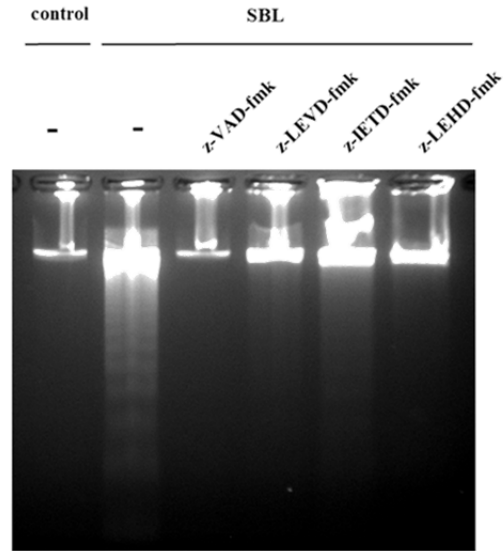
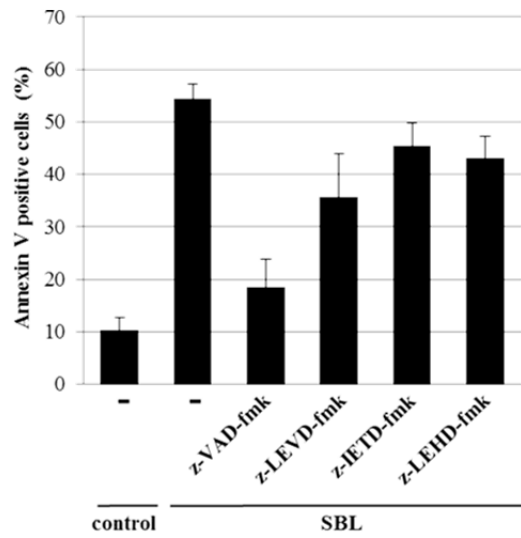
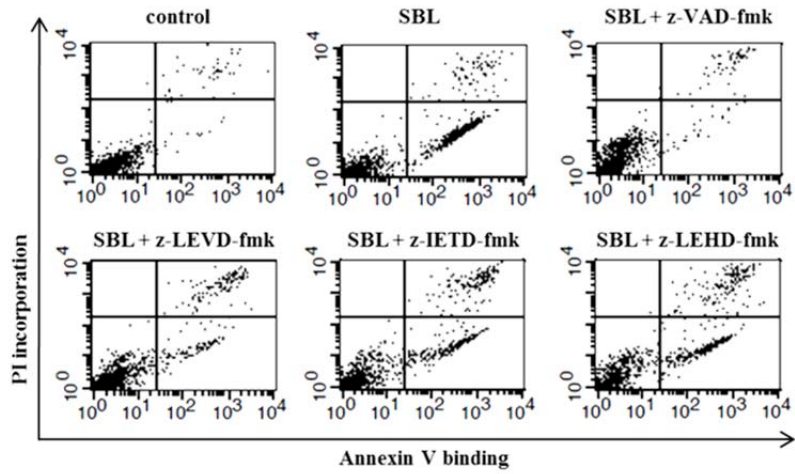
B**C**

4. z-LEVD-fmk は, SBL によるカスパーゼ -9 の活性化およびミトコンドリア障害には関与しない

前述のように, アポトーシスのシグナル伝達経路としては, デスレセプター経路, ミトコンドリア経路, そして小胞体ストレス経路が知られている. これら 3 経路のイニシエーターカスパーゼは, それぞれ -8, -9 および -4 であるとされている. SBL 処理により, これらのカスパーゼの活性化が認められた (Fig. 2, 3). そこで, SBL が誘導するアポトーシスに, どの酵素が優先的に寄与しているのかを明らかにする目的で, それぞれに特異的な阻害剤を用いて, SBL 誘導アポトーシスへの影響を比較した. その結果, SBL (2 μ M) による DNA の断片化は, z-VAD-fmk (50 μ M) の前処理により完全に抑制されたほか, z-LEVD-fmk (30 μ M), z-LEHD-fmk (50 μ M) の前処理によって顕著に抑制され, ほぼコントロールレベルまで回復した. それに対し, z-IETD-fmk (50 μ M) の前処理では, 他の阻害剤に比べると抑制効果は弱く, ほとんど抑制が認められなかった (Fig. 5A). また, アネキシン V-PI 法により各カスパーゼ阻害剤のアポトーシス抑制効果を比較したところ, z-VAD-fmk の前処理で約 36 %, z-LEVD-fmk 前処理では約 19 %, z-IETD-fmk 前処理では約 9 %, z-LEHD-fmk 前処理では約 12 % の抑制効果が認められた (Fig. 5B). z-LEVD-fmk および z-LEHD-fmk による SBL 誘導アポトーシスの阻害が観察されたことから, これら阻害剤の SBL によるカスパーゼ活性化および Bip/FRP78 の発現上昇に対する影響を検討した. その結果, z-LEVD-fmk で前処理した細胞では, カスパーゼ -8 の活性化が抑制されていたのに対し, カスパーゼ -9 の活性化は, SBL のみを処理した時と同等であった. 一方, z-LEHD-fmk で前処理した細胞では, カスパーゼ -8 とカスパーゼ -4 の活性化が抑制されていた. また, Bip/GRP78 の発現上昇は, z-LEVD-fmk または, z-LEHD-fmk 前処理によっても抑制されなかった (Fig. 6A). 第一章では, SBL が強いミトコンドリア障害を引き起こすことを明らかにした. ここで, z-LEVD-fmk および z-LEHD-fmk 前処理により, SBL が誘導する MMP 低下が抑制されるか否かを JC-1 を用いて検討した. その結果, z-LEVD-fmk, z-LEHD-fmk いずれの処理においても MMP 低下は抑制されなかった (Fig. 6B).

Fig. 5. Comparison of effects of four caspase inhibitors.

(A) Effect of caspase inhibitors on SBL-induced DNA fragmentation. After pretreatment of Jurkat cells with caspase inhibitors (50 μ M for z-VAD-fmk, z-IETD-fmk and z-LEHD-fmk; 30 μ M for z-LEVD-fmk) for 30 min, the cells were treated with or without SBL (2 μ M) for 24 h. DNA fragmentation was analyzed as described in Fig. 4. (B) Effect of caspase inhibitors on SBL-induced apoptosis. Pretreatment was performed as described in (A), and then the cells were treated with SBL as described in (A). Analysis of Annexin V -binding and PI incorporation was performed as indicated in Fig. 4. Lower panel indicates percentages of cells divided into lower right-hand (LR) and upper right-hand (UR) quadrant.

A**B**

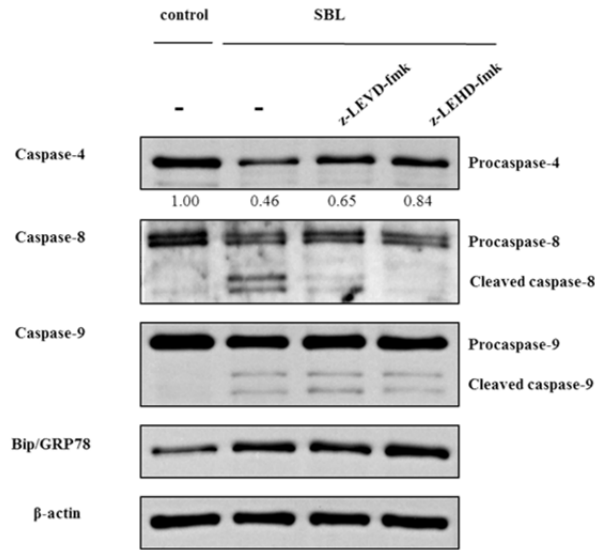
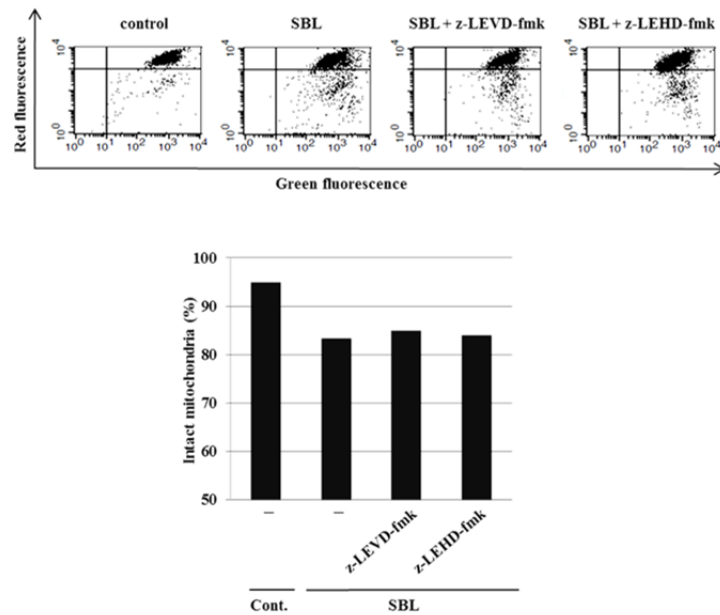
A**B**

Fig. 6. z-LEVD-fmk does not prevent SBL-induced activation of caspase-9 and mitochondrial membrane depolarization.

(A) Effect of z-LEHD-fmk and z-LEVD-fmk on SBL-induced caspase activation in Jurkat cells. After pretreatment of Jurkat cells with caspase inhibitors (50 μ M for z-LEHD-fmk; 30 μ M for z-LEVD-fmk) for 30 min, the cells were treated with or without SBL (2 μ M) for 48 h. Whole cell lysates were subjected to western blot analysis using specific antibodies. The caspase-4 bands in the immunoblot were quantified by densitometry and expressed as a ratio of the intensity of caspase-4 to β -actin (caspase-4/actin). (B) Effect of z-LEHD-fmk and z-LEVD-fmk on SBL-induced mitochondrial damage. After pretreatment of Jurkat cells with caspase inhibitors (50 μ M for z-LEHD-fmk; 30 μ M for z-LEVD-fmk) for 30 min, the cells were treated with SBL (2 μ M) for 24 h. Then, cells were stained with JC-1 dye (2 μ M) and mitochondrial membrane potential was determined by FACSCalibur. The percentage of cells having intact mitochondrial membrane potential is indicated in the lower panel.

第四節 考察

本章では、SBL 誘導アポトーシスへの小胞体ストレスの関与について検討した。小胞体ストレスは、タンパク質の新規合成と品質管理機構とのバランスが乱れた結果、小胞体内腔に異常タンパク質が蓄積した状態であり、細胞は UPR と ERAD により小胞体のフォールディングクリアランスを増大させることで、ストレスを軽減しようとする。ほ乳動物細胞における UPR は、IRE1、ATF6 および PERK の 3 種の小胞体膜貫通タンパク質を起点とする。IRE1 は I 型膜貫通タンパク質で、2 量体化およびリン酸化により活性化される。IRE1 の細胞質側ドメインは、リボヌクレアーゼ活性があり、活性化された IRE1 はそのリボヌクレアーゼ活性により、スプライソソーム非依存的な XBP-1 mRNA のスプライシングを行う。XBP-1 は転写因子として働き、Bip/ GRP78 などのシャペロンや XBP-1、ERAD 因子の転写を誘導することが知られている。⁹⁹⁻¹⁰¹⁾ ATF6 は II 型の膜貫通タンパク質で、異常タンパク質の蓄積を察知すると小胞輸送によりゴルジ体に運ばれ、切断を受け活性化される。切断された N 末端 (細胞質側) フラグメントそのものが転写因子として機能し、IRE1 と同様、シャペロンや XBP-1 の転写を誘導する。⁸⁹⁾ PERK は IRE1 と相同性を有する I 型膜貫通タンパク質であるが、その細胞質側ドメインにキナーゼ活性を有する。リン酸化により活性化された PERK は、このキナーゼ活性により eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) をリン酸化し、全般的な翻訳抑制により小胞体のフォールディング負荷を減少させる。⁸⁸⁾ 一方、eIF2 α のリン酸化は、転写因子である ATF4 の翻訳を上昇させることが知られ、ATF4 の転写誘導活性により CHOP や ATF3 の発現が上昇する。¹⁰²⁻¹⁰⁵⁾

以上のような UPR 関連因子のうち、小胞体分子シャペロンである Bip/ GRP78 およびシャペロンの転写誘導に関わる XBP-1 を指標に、SBL により UPR が誘導されるか否か検討したところ、SBL 処理後、時間依存的な Bip/GRP78 の発現上昇が観察された (Fig. 3A)。また、XBP-1 の発現上昇は、SBL 処理後 48 時間で認められたが、活性型である spliced form の増加は認められなかった (Fig. 3C)。Bip/GRP78 および XBP-1 mRNA の発現上昇が認められたことから、SBL は、Jurkat 細胞に対し、小胞体ストレスによる UPR を誘導することが示された。一方で、活性型 XBP-1 mRNA の発現上昇が認められなかったことから、SBL が誘導する UPR のシグナル伝達は、IRE1 を介さない可能性が示唆された。

SBL 処理により、Jurkat 細胞では、小胞体ストレスに起因する UPR が誘導されることが示されたので、次に、SBL が Jurkat 細胞に対し小胞体ストレス性アポトーシスを誘導するか否かについて検討した。マウスカスパーゼ -12 のヒト相同体である カスパーゼ -4 は、小胞体ストレス性アポトーシスのイニシエーターとして知られている。^{106, 107)} カスパーゼ -4 の活性化をウェスタンブロッティングにより観察したところ、カスパーゼ -4 の活性化を示すプロカスパーゼ -4 の減少が観察され、Jurkat 細胞において、小胞体ストレス性アポトーシスが誘導されることが示唆された (Fig. 3)。

SBL 誘導アポトーシスへの小胞体ストレスの寄与を調べる目的で、カスパーゼ -4 阻害剤である z-LEVD-fmk を用い、SBL が誘導するアポトーシスが抑制されるか否か検討した。その結果、SBL が誘導する DNA の断片化は、z-LEVD-fmk の前処理により、濃度依存的に抑制が認められ (Fig. 4A)、SBL が誘導するアポトーシスにカスパーゼ -4 の活性化が関与していることが示唆された。また、SBL により誘導される核の断片化は、z-LEVD-fmk 前処理によりほぼ完全に抑制され (Fig. 4B)、さらに、アネキシン V-PI 法により測定したアポトーシス細胞の割合も、z-LEVD-fmk 前処理によって顕著に減少した。以上の結果から、SBL が誘導するアポトーシスにおいて、小胞体ストレスに伴うカスパーゼ -4 活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

カスパーゼ -8、-9 および -4 は、先に述べたように、それぞれデスレセプター経路、ミトコンドリア経路および小胞体ストレス経路によるアポトーシスのイニシエーターカスパーゼであることが知られている。SBL が誘導するアポトーシスが、どの経路により強く依存しているのかを調べるため、3 種のカスパーゼの阻害剤、z-IETD-fmk、z-LEHD-fmk および z-LEVD-fmk を用いて比較検討を行った。その結果、z-IETD-fmk 前処理では SBL 誘導アポトーシスに対する影響は弱かったが、z-LEHD-fmk および z-LEVD-fmk 前処理においてアポトーシスの強い阻害が観察され、SBL が誘導するアポトーシスにおいて、3 種のイニシエーターカスパーゼのうち、カスパーゼ -4 とカスパーゼ -9 の活性化がより強くアポトーシスに関与していることが示された。

Cephalodiscus gilchristi 由来の cephalostatin 1 は、Jurkat 細胞に小胞体ストレス性アポトーシスを誘導し、活性化されたカスパーゼ -4 はアポプトソーム非依存的にカスパーゼ -9 を活性化する [apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) のリクルートやシトクロム c の放出を必要としない、つまりミトコンドリア障害に依存しない] ことが知られている。¹⁰⁷⁾ また、TG や tunicamycin などの小胞体ストレス誘導剤によるアポトーシスにおいては、カスパーゼ -4 はカスパーゼ -9 の上流で活性化されることが知られている。¹⁰⁸⁾ SBL 誘導アポトーシスにおいて、カスパーゼ -4 および -9 がより深く寄与していることが示されたことから、SBL もこのような経路でアポトーシスを誘導するのか、あるいは小胞体ストレスとミトコンドリア障害が独立してアポトーシスを誘導するのかについて検討した。その結果、z-LEVD-fmk を前処理した細胞では、カスパーゼ -9 の活性化は SBL 単独処理と同等であった。一方、z-LEHD-fmk を前処理した細胞ではカスパーゼ -4 の活性化は部分的に抑制されていた (Fig. 6A)。このことから、SBL 処理 Jurkat 細胞において、カスパーゼ -4 は、カスパーゼ -9 の上流で活性化されるのではなく、カスパーゼ -9 の活性化がカスパーゼ -4 の活性化を部分的に促進することが示唆された。第一章において、SBL 処理 Jurkat 細胞では、カスパーゼ -8 がカスパーゼ -9 の下流で活性化されることを見いだしている。これらのことをまとめると、SBL による Jurkat 細胞のカスパーゼカスケードは、カスパーゼ -9 をイニシエーターカスパーゼとして、カスパーゼ -4 が活性化され、さらにその下流でカスパーゼ-8 が活性化されることが示唆された。また、カスパーゼ -8 の活性化は、カスパーゼ -9 および -4 の活性化に依存するこ

とから、カスパーゼ -8 は、イニシエーターカスパーゼとしてではなく、Bid の切断を介したアポトーシスシグナルの増強に寄与する可能性が考えられる。一方で、Bip/GRP78 の発現上昇は、z-LEHD-fmk 前処理でも抑制されなかった (Fig. 6A)。このことは、小胞体ストレスの誘導には、ミトコンドリア障害によるカスパーゼ -9 の活性化は関与していないことを示しており、SBL によるミトコンドリア障害と小胞体ストレスの誘導は、それぞれ独立して起こっていることが示唆された (Fig. 7)。そこで次に、SBL が誘導するミトコンドリア異常と、小胞体ストレスを起因とするカスパーゼ -4 の関係を検討するため、MMP 低下に対する z-LEVD-fmk の関与について検討した。その結果、SBL で誘導される MMP 低下は、z-LEVD-fmk 前処理によっても抑制されず (Fig. 6B)、SBL 処理によるカスパーゼ -4 の活性化は、ミトコンドリア異常には寄与しないことが示された。以上のことから、SBL 処理 Jurkat 細胞では、ミトコンドリア障害と小胞体ストレスの誘導はそれぞれ独立して起こり、カスパーゼ -9 がイニシエーターカスパーゼとして活性化され、活性化されたカスパーゼ -9 が一部 カスパーゼ -4 を活性化することが示唆された (Fig. 7)。また、SBL と TG を比較した場合、SBL 処理の方が sub G1 期に移行する細胞が多いにもかかわらず、TG 処理の方が Bip/ GRP78 のような小胞体ストレス関連因子をより強く誘導する (Fig. 1, 2) こともまた、SBL が優先的に小胞体ストレス性アポトーシスを誘導するのではないことを反映していると考えられる。

本章において、SBL 誘導アポトーシスのメカニズムを小胞体ストレスおよびカスパーゼの活性化に焦点をあてて検討した結果、SBL は小胞体ストレス経路およびミトコンドリア経路という二つの経路を独立に活性化し、アポトーシスを誘導することが示唆された。第一章において著者は、SBL が p38 および JNK MAPK を活性化することを示したが、これまでに、MAPK の活性化や Bcl-2 ファミリータンパク質などの他の分子が小胞体ストレスに関与しているという報告もある。^{109, 110)} 今後、これらの分子と SBL 誘導小胞体ストレスの関係を調べることで、さらなる作用機序の詳細が明らかになるものと期待される。

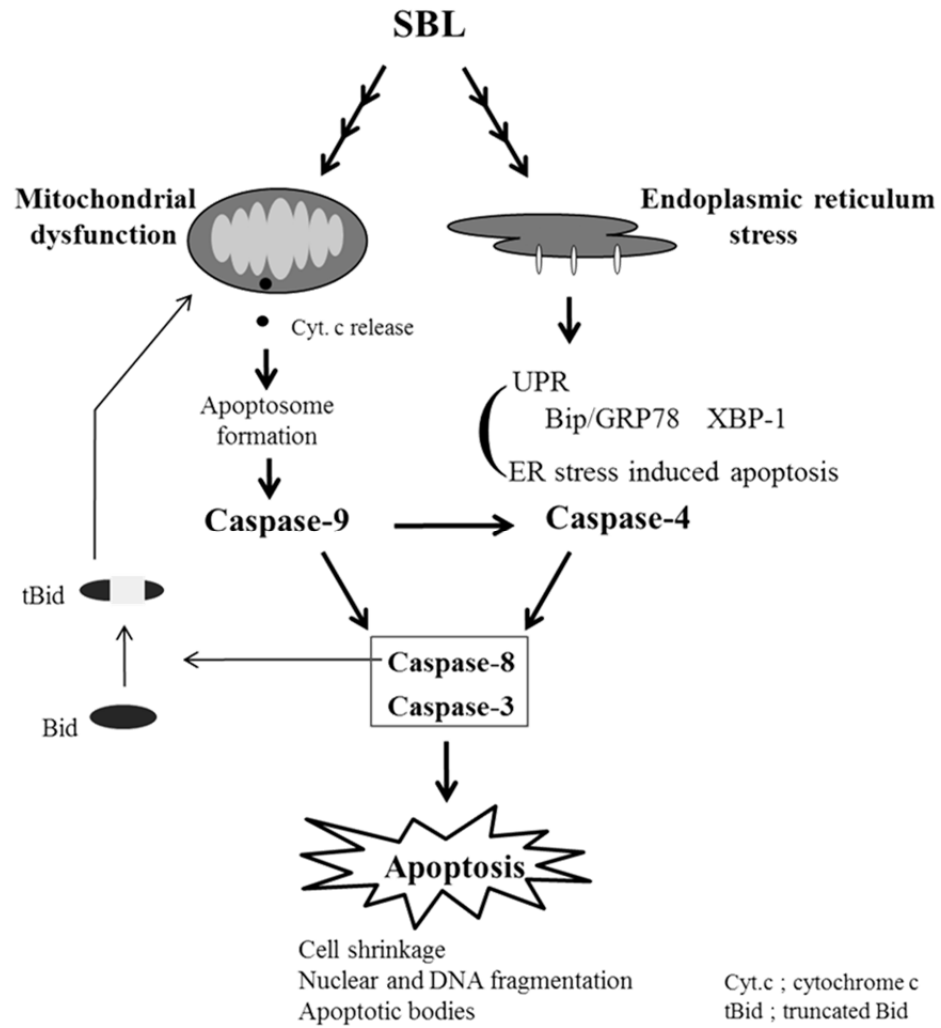


Fig. 7. Proposed scheme of various apoptotic pathways involved in SBL-induced apoptosis in Jurkat cells.

SBL internalizes into cells, transduces apoptotic signals both in mitochondria and ER. Caspase-9 is activated in mitochondrial pathway, and precedes the apoptotic process. UPR is induced in ER stress pathway, and then caspase-4 is activated. Activation of caspase-9 contributes partially to activation of caspase-4.

第三章

SBL は悪性中皮腫細胞にアポトーシスを誘導し TRAIL と相乗的な抗腫瘍作用を示す

第一節 序

悪性中皮腫は、胸膜、腹膜、心膜に由来する、中皮細胞から発生する高浸襲性の悪性腫瘍である。¹¹¹⁾ その主な原因は、アスベストへの暴露にあると考えられているが、がん化のメカニズムについては不明な点が多い。また、アスベストは、優れた性能と廉価のため、多くの産業、特に、建築資材の繊維、素材として使用されてきた。アスベストが、世界中で長きにわたり、広範に使用されてきたこと、さらに、悪性中皮腫が 30 ~ 40 年という長い潜伏期間を経て発症に至ることから、世界の悪性中皮腫患者は、今後 20 年で急激に増加することが見込まれている。^{112, 113)} 我が国においても例外ではなく、悪性中皮腫による死者は 1995 年には 500 人であったが、2003 年に約 900 人、2007 年に約 1100 人、2012 年には約 1400 人と着実に増加しており、¹¹⁴⁾ 今後 40 年間で 10 万人にもなると見積もられている。¹¹⁵⁾ 悪性中皮腫の臨床上最も懸念される問題は、化学療法、放射線療法、手術療法を含む従来の治療法に抵抗性を示し、生存期間中央値、5 年生存率がそれぞれ 1 年未満、1 % 以下と、極めて予後不良な疾患であるという点である。^{116, 117)} 現在、種々の薬物療法および新規抗がん剤が臨床試験進行中であるが、その有効性が認められ、使用されているのは、2004 年 2 月に米国で、次いで 2007 年 1 月に我が国で製造販売承認を受けた新規抗がん剤、pemetrexed と cisplatin の併用のみである。これらのことから、悪性中皮腫に対する有効な新規治療法の開発は急務となっている。

リボヌクレアーゼは、tRNA の成熟段階で働くリボヌクレアーゼ P や、RNAi 機構における Dicer タンパク質など多種にわたり、タンパク質による RNA の成熟、機能調節などを担っている。^{118, 119)} また、古くから研究されたリボヌクレアーゼとして、ウシ膵臓由来リボヌクレアーゼ A が挙げられ、Raines は「リボヌクレアーゼ A は、20 世紀中で最も研究された酵素である」と述べている。³⁴⁾ リボヌクレアーゼ A は、1) 原材料の入手が容易、2) 精製が簡単、3) 低分子量である、などの理由で幅広く利用され、ピリミジン塩基特異的な切断、³⁴⁾ アミノ酸配列と三次構造の関連性、¹²⁰⁾ タンパク質のフォールディングなど¹²¹⁾ に関連する優れた研究が数多く報告されてきた。また、興味深いことに、がん細胞をリボヌクレアーゼ A で処理すると、*in vivo*、*in vitro* どちらの条件においても細胞毒性を示すことが明らかとなった。^{122, 123)} これらの研究は、リボヌクレアーゼが化学療法剤となり得る可能性を示唆する最初の研究となったが、がん細胞に対する選択性が低いなどの問題点があった。し

かし、その後の研究で、がん細胞特異的に細胞毒性を示すリボヌクレアーゼが報告されている。¹²⁴⁾ その一つに、onconase (ONC) がある。⁴³⁾ ONC は、ヒョウガエル (*Rana pipiens*) の卵から分離されたアミノ酸残基数 104 から成る分子量 12000 のタンパク質で、悪性腫瘍に選択的に作用し、タンパク質合成の阻害およびアポトーシスを誘導する。^{32, 125)} この抗腫瘍作用は、*in vivo* および *in vitro* 両方の実験的腫瘍モデルにおいて証明されている。また、骨髄抑制作用や脱毛作用等の重大な副作用を誘発しないことも報告されており、現在米国では、悪性中皮腫を含む数種のがんに対して臨床試験が進行中である。

著者はこれまでに、レクチン活性およびリボヌクレアーゼ活性を併せもつ SBL が、種々のヒト白血病細胞に対し、ミトコンドリア経路および小胞体ストレスを介したアポトーシス誘導作用により抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。本章では、難治性腫瘍である悪性中皮腫細胞に対する SBL の有効性を検討するため、3 種の悪性中皮腫細胞 (MESO-1, MESO-4 および H28) と 1 種の正常中皮由来細胞 (MeT-5A) に対する SBL の抗腫瘍作用、悪性細胞選択性ならびにその作用機序について検討した。また悪性中皮腫に対して効果的な治療法を模索するため、SBL と TRAIL との併用効果を検討し、その有効性と作用機序を解析した。

第二節 実験材料および実験方法

1. 材料

SBL は、第一章、第二節、第 1 項に述べた方法で調製した。抗 Bim, 抗 Bik, 抗 Bax および抗 Bid 抗体は Cell Signaling Technology より購入した。抗 GAPDH 抗体および Bid specific siRNA は Ambion より購入した。ETO, TRAIL, および各種抗体 [抗 β actin, 抗カスパーゼ-8, -9, -3, 抗 ERK1/2 (pT202/pY204), 抗 ERK1, 抗 JNK/SAPK (pT183/pY185), 抗 JNK/SAPK, 抗 p38 (pT180/pY182) および抗 p38 抗体] は第一章、第二節、第 1 項にあるものと同様のものを用いた。

2. 細胞培養

Meso-1 および Meso-4 細胞は、理化学研究所バイオリソースセンターより、また H28, Met-5A 細胞は、American Type Culture Collection より購入したものを用いた。H28, Meso-1 および Meso-4 細胞は、RPMI1640 培地 (日水製薬社製) を、MeT-5A 細胞は、炭酸水素ナトリウム (1.25 g/L), 上皮細胞成長因子 (3.3 nM), ヒドロコルチゾン (400 nM), インスリン (870 nM),

HEPES (20 mM) を含む Medium199 with Earle's BSS and L-glutamine (Sigma 社製) を用い、第一章、第二節、第 2 項に述べた方法で培養した。

3. コロニー形成法

SBL (0.2, 2, 5, 10, 20 μ M) で 48 時間処理した細胞を、トリプシン処理により回収し、培地で 2 回洗浄後、MESO-1, MESO-4, H28 および MeT-5A 細胞をそれぞれ 5×10^3 個/mL, 1×10^4 個/mL, 1×10^4 個/mL および 3×10^4 個/mL になるように調整した。この細胞懸濁液 (100 μ L) を、それぞれ 4 mL の培地に加えて、12 日間培養した。上清除去後、2 % パラホルムアルデヒドで 15 分間固定し、0.1 % クリスタルバイオレットで 10 分間染色した。コロニーは、Quantity One 4.5.2 (Bio-Rad) により観察し、colony counter にて定量した。

4. アネキシン V の結合とヨウ化プロピジウム (PI) の取り込みの測定

アネキシン V の結合と PI の取り込みの測定は、第一章、第二節、第 7 項に述べた方法で行った。

5. ウェスタンブロットティング

ウェスタンブロットティングは、第一章、第二節、第 9 項に述べた方法で行った。

6. Combination index (C.I.) の算出

薬剤併用による効果が、相乗効果であるか否かを判定するため、C.I.を用いた。^{126, 127)} C.I. は以下の式で求めた。

$$C.I. = C_{SBL,X} / IC_{X,SBL} + C_{TRAIL,X} / IC_{X,TRAIL}$$

X % の増殖抑制効果を示す濃度を inhibitory concentration (IC_x) とした。C_{SBL,X} と C_{TRAIL,X} は、SBL と TRAIL 併用時における IC_x である。また、IC_{X,SBL} と IC_{X,TRAIL} は、SBL あるいは TRAIL の単剤処理における IC_x である。C.I.の値が < 1 で相乗効果、> 1 で拮抗効果となる。本研究において、75 % の増殖抑制効果を示す濃度を求め (X=75), C.I.を算出した。併用処理は、SBL の濃度を 0.5 μ M で、もしくは、TRAIL の濃度を 1 ng/mL で固定した。増殖抑制効果は WST-1 assay を用いて測定した。

7. MMP 低下の検出

MMP 低下の検出は、第一章、第二節、第 10 項に述べた方法で行った。

8. siRNA を用いた Bid の発現抑制

siRNA の H28 細胞への導入は、lipofection 法により行った。H28 細胞は 60 mm culture dish に播き、24 時間前培養した。10 μ M の Bid 特異的 siRNA (sense, GGG AUGAGUGCAUCACAAATT, 抗 sense, UUUGUGAUGCACUCAUCCCTG) 18 μ L (終濃度 30 nM) と lipofectamin 2000 10 μ L それぞれに 480 μ L, 490 μ L の Opti-MEM を加え、5 分間静置後、それらを混合し、さらに 20 分間静置した。その後、細胞培養液を Opti-MEM 5 mL に置換し、siRNA-lipofectamine 溶液全量を培地に加え、4 時間培養した後、元の細胞培養液に置換した。48 時間後、トリプシン処理により細胞を回収して適切な密度に播き直し、24 時間前培養後、さらに siRNA を導入した。導入後 48 時間培養した細胞を実験に用いた。

10. 統計学的処理

統計学的処理は、第一章、第二節、第 11 項に述べた方法で行った。

第三節 結果

1. SBL は悪性細胞選択的な細胞増殖抑制作用を示す

3 種の悪性 (MESO-1, MESO-4, H28) および正常中皮細胞 (MeT-5A) に対する SBL の細胞増殖抑制効果を、コロニー形成法により検討した。未処理細胞および SBL (0.2 ~ 20 μ M) で 48 時間処理した細胞をそれぞれ回収し、SBL 非存在下で 12 日間培養した。その結果、SBL 処理濃度 5, 10 および 20 μ M におけるコロニー形成率は、MESO-1 細胞において、それぞれ 70 %, 30 % および 5 % 以下、MESO-4 細胞において、20 %, 15 % および 5 % 以下、H28 細胞において、いずれも 5 % 以下であるのに対し、MeT-5A 細胞では 90 %, 65 % および 60 % 以上であった。また、SBL に対する感受性は H28 > MESO-4 > MESO-1 > MeT-5A の順に高かった (Fig. 1A, B)。このことから、正常細胞は悪性細胞に比べ、SBL に抵抗性を示した。

2. SBL は悪性細胞選択的にアポトーシスを誘導する

悪性中皮腫細胞に対する SBL の細胞増殖抑制効果がアポトーシスの誘導によるものか否か検討を行った。アネキシン V の結合について検討した結果、H28 細胞と同様に、MESO-1 および MESO-4 細胞においても、SBL 処理 48 時間後からアネキシン V 陽性細胞の増加が認められ、以後時間依存的に陽性率が増加した。一方、MeT-5A 細胞では、72 時間処理においてもアネキシン V 陽性細胞の増加は認められなかった (Fig. 2A)。次に、H28 細胞と MeT-5A 細胞におけるカ

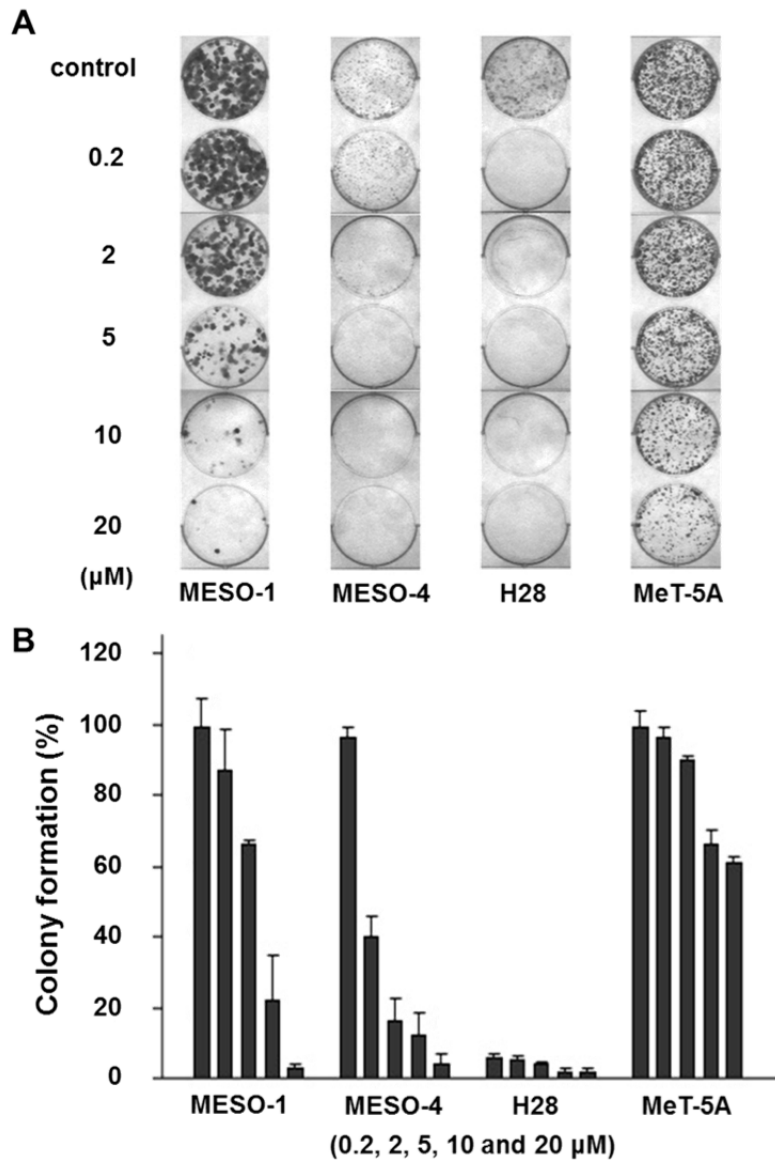
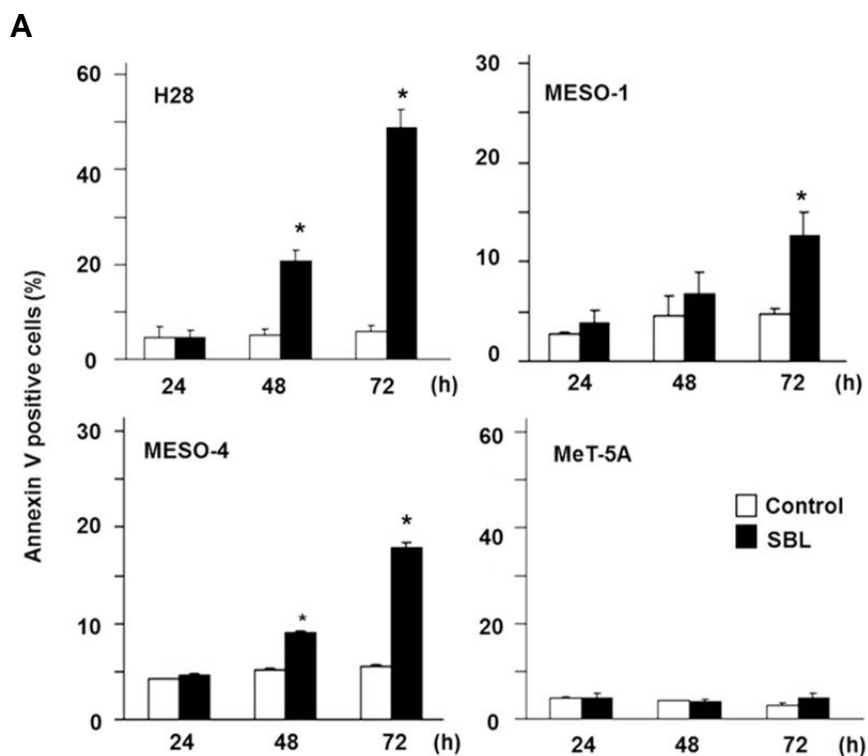
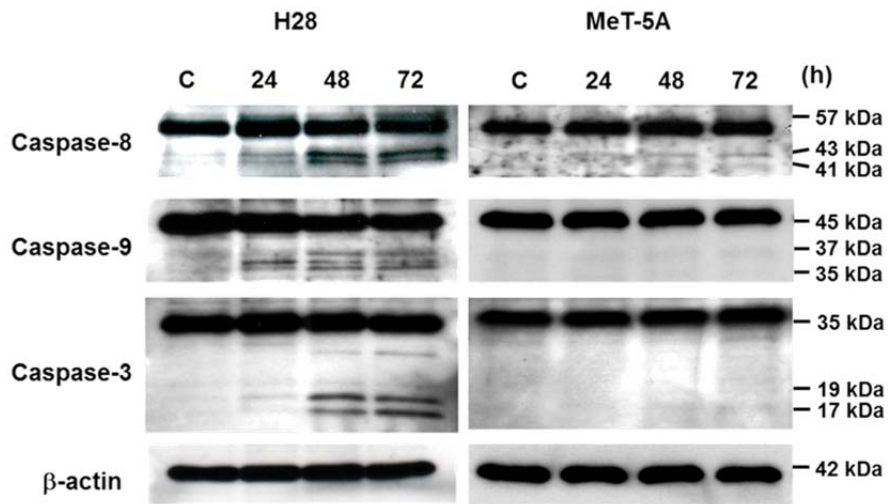
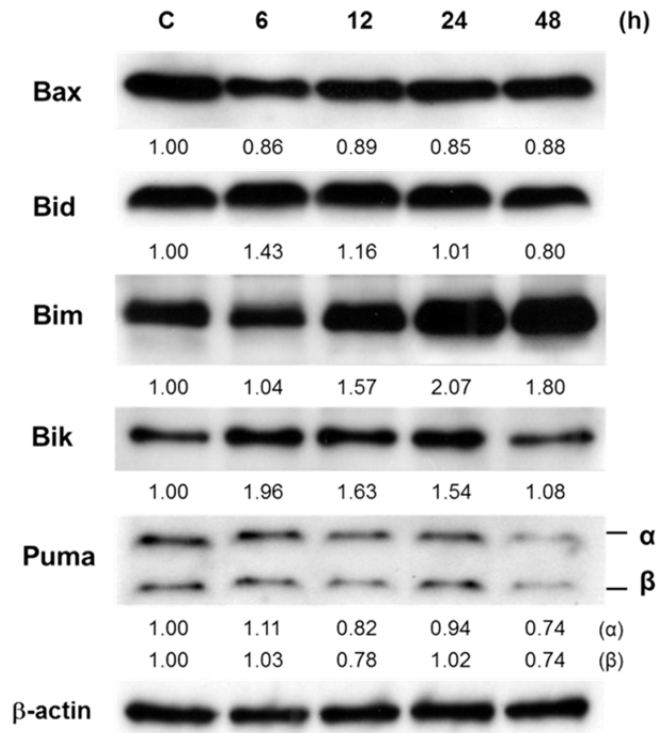


Fig. 1. Effect of SBL on clonogenic potential of malignant mesothelioma cells and non-malignant mesothelial MeT-5A cells.

(A) Cells were precultured for 24 h, then treated with increasing doses of SBL (0.2, 2, 5, 10 and 20 μM) for 48 h. After treatment, cells were washed with medium, and plated in 6 well plate (MESO-1: 500, MESO-4 and H28: 1000, MeT-5A: 3000 cells / well, respectively). After 12 days, the colonies were fixed with 2 % paraformaldehyde, and stained with 0.1% crystal violet. (B) Assays were done in triplicate, and average of colony counts represented graphically.

スパーゼ -3, -8 および -9 の活性化の有無をウェスタンブロッティングにより観察した。その結果、H28 細胞においては、SBL 処理 48 時間後からカスパーゼ -3, -8 および -9 の顕著な活性化が認められた。一方、MeT-5A 細胞では、これらの活性化は認められなかった (Fig. 2B)。以上の結果から、SBL が悪性細胞選択的にアポトーシスを誘導することが明らかになった。SBL 誘導アポトーシスの作用機序を明らかにする目的で、Bcl-2 ファミリーに属するアポトーシス促進タンパク質、Bax, Bid, Bim, Bik, Puma の発現変化をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、SBL 処理による Bax および Puma の発現の上昇、Bid の切断による活性化は認められなかったが、6, 12 および 24 時間処理において Bik の、24 および 48 時間処理においては Bim の発現が上昇する傾向にあった (Fig. 2C)。また、SBL 処理 H28 細胞において、MAPK の活性化が認められるか否かが明らかにするため、それぞれの活性化体であるリン酸化体の検出をウェスタンブロッティングにより行った。その結果、SBL 処理 24 時間から total p38 の増加が観察された。また、リン酸化 p38 および JNK の増加が SBL 処理 24 時間、12 時間からそれぞれ観察された (Fig. 2C)。一方、ERK のリン酸化は SBL 処理 12 時間後から減少傾向にあった。これらのことから、SBL が悪性細胞選択的にアポトーシスを誘導することが明らかになり、またそのアポトーシスに際して、Bim や Bik などの Bcl-2 ファミリータンパク質や、p38 や JNK などの MAPK が関与する可能性が示唆された。



B**C**

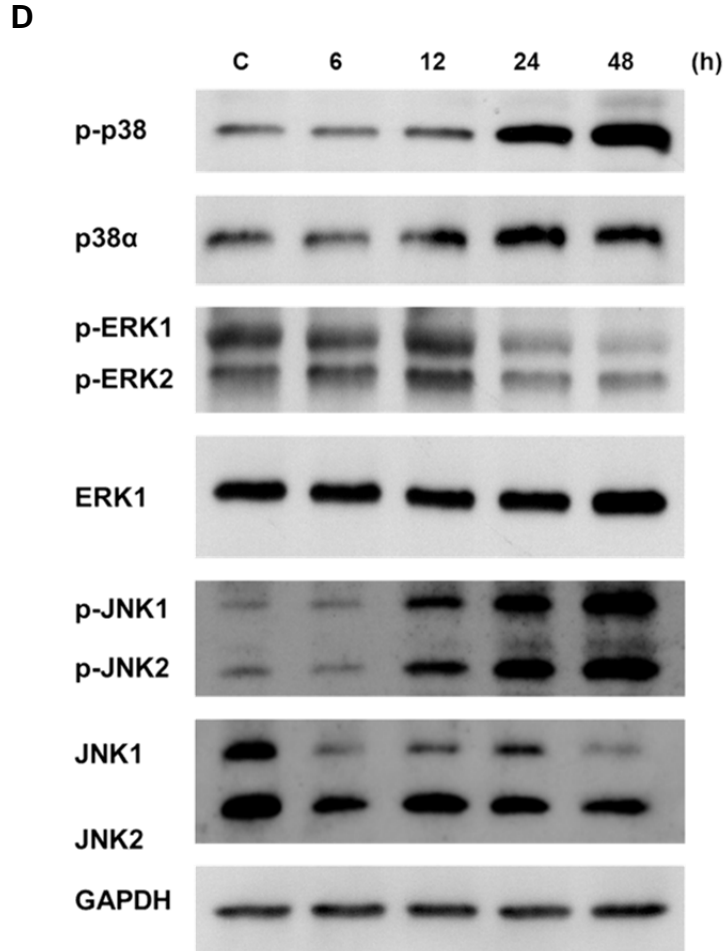


Fig. 2. SBL induces apoptosis in malignant mesothelioma cells.

(A) Binding of annexin V in SBL-treated cells (H28, MESO-1, MESO-4 and MeT-5A). Cells were treated with SBL (5 μ M) for indicated time. The percentage of annexin V positive cells was determined using flow cytometric analysis. Data are expressed as mean \pm S.D. of three independent experiments. *, $P < 0.05$ versus control. (B) caspase activation in SBL-treated H28 and MeT-5A cells. H28 and MeT-5A cells were treated with SBL (5 μ M) for indicated time. The activation of caspase-8, -9 or -3 was determined by Western blotting. β -Actin was used as a standard to ensure equivalent loading of cell extracts. (C) Effect of SBL on expression of proapoptotic Bcl-2 family protein. H28 cells were treated with SBL (5 μ M) for indicated time. Expression of Bax and BH3-only proteins (Bid, Bim, Bik and Puma) was determined. Bands in the Western blot were quantified by densitometry and expressed as a ratio of intensity of bands to β -actin (respective bands / actin). (D) Phosphorylation pattern of MAPKs in SBL-treated H28 cells. H28 cells were treated with SBL (5 μ M) for indicated times. Expressions of each protein were detected by Western blotting. GAPDH was used as a standard to ensure equivalent loading of cell extracts.

3. SBL と TRAIL の併用処理はアポトーシスの増強に起因する相乗的抗腫瘍効果を示す

次に, SBL の抗腫瘍効果が増強される, 他の薬剤との併用についての検討を行った. Fas ligand や TNF α は, がん細胞に対する選択性が低いことが報告されている. 一方で, TRAIL はその選択性の高さから抗がん剤として期待されている分子である. そこで SBL と TRAIL の併用処理により, 細胞増殖抑制効果の増強が認められるか否か, WST-8 assay を用いて検討した. SBL (5 μ M) 24 時間もしくは TRAIL (2 ng/mL) 24 時間の単独処理 H28 細胞の生存率は, それぞれ 66.7 %, 70.9 % であるが, 併用処理群では, 24.7 % まで低下し, 細胞増殖抑制効果の著しい増強が認められた (Fig. 3A). また, この併用効果が, 相乗的か否かを判定するため C.I. を求めた. SBL の濃度を 0.5 μ M で固定もしくは TRAIL の濃度を 1 ng/mL で固定し, 併用した場合, それぞれの C.I. は 0.63 と 0.68 となり, どちらも 1 以下であったことから, この効果は相乗的であると判断した (Table 1). 悪性中皮腫細胞において, TRAIL と ETO との併用による細胞増殖抑制効果の増強は, アポトーシスの促進によることが報告されている.¹²⁸⁾ そこで, SBL と TRAIL の併用においても, 同様にアポトーシスの促進が認められるか否か, アネキシン V の結合と PI の取り込みを検討した. その結果, TRAIL と ETO の併用処理と同様に, SBL または TRAIL 単独処理に比べ, 併用処理で顕著なアネキシン V 陽性細胞の増加が認められ, またこの作用は Met-5A 細胞では認められなかった (Fig. 3B). さらに, 併用処理におけるカスパーゼ -3, -8 および -9 の活性化を検討したところ, SBL または TRAIL 単独処理に比べ, 併用処理でカスパーゼ -3, -8 および -9 の強い活性化が認められた (Fig. 3C). これらのことから, SBL と TRAIL の併用処理による相乗的細胞増殖抑制効果は, アポトーシスの増強に起因することが明らかになった.

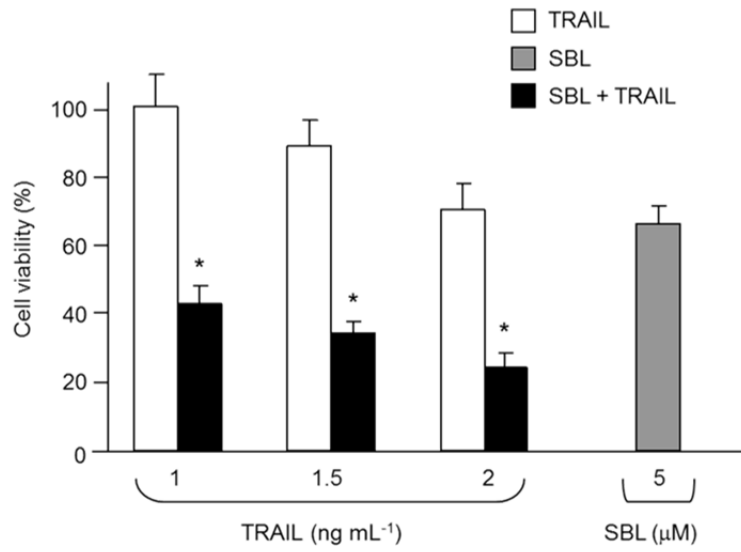
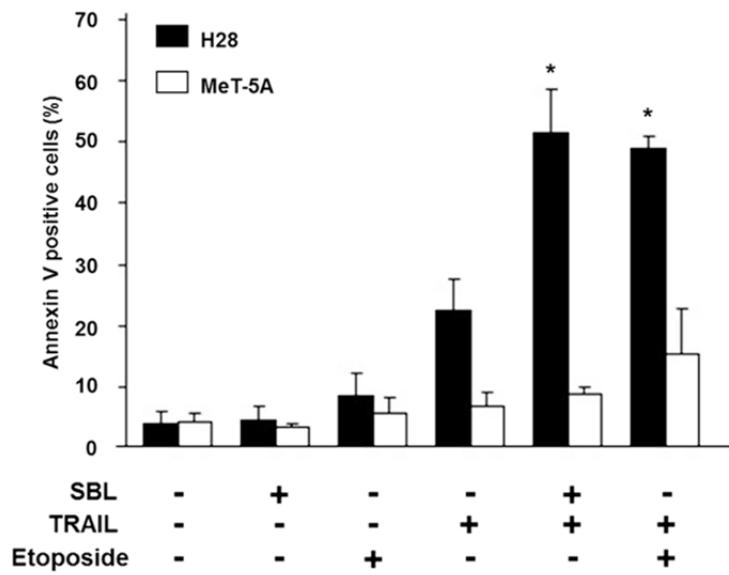
4. SBL と TRAIL の併用によるアポトーシスの増強は Bid により仲介される

次に, SBL と TRAIL の併用において, どのようにしてアポトーシスの増強が引き起こされるのかを明らかにするため, これまでに TRAIL との併用効果について報告されている知見をもとに研究を行った.

Table 1. Calculation for the combination of SBL and TRAIL

combination index (C.I.)	
SBL (0.5 μ M)	TRAIL (1 ng/mL)
0.63	0.68

C.I. values of >1 and <1 indicate drug antagonism and synergism, respectively.

A**B**

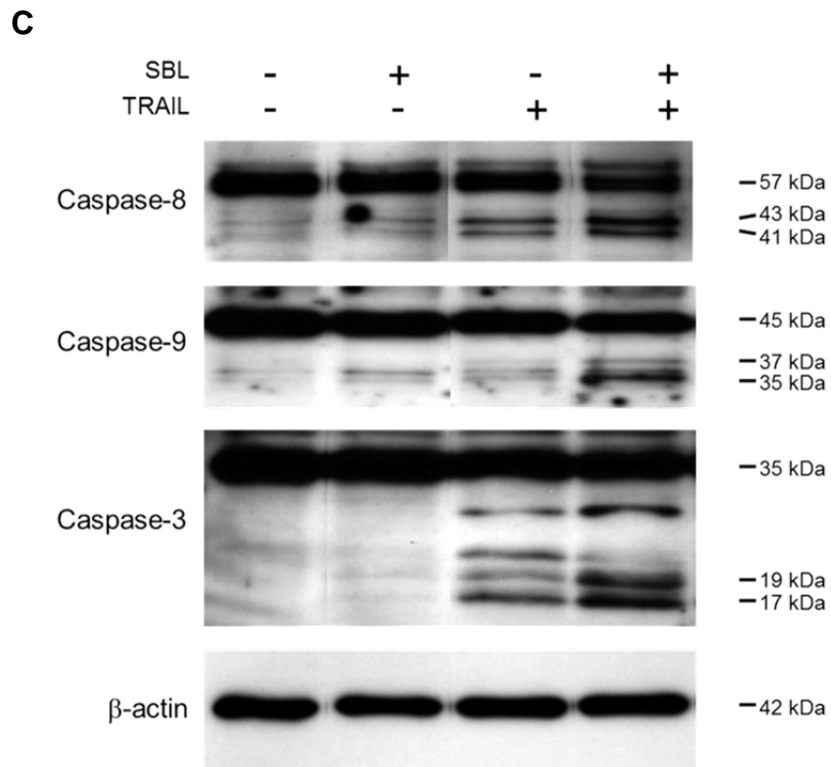


Fig. 3. Combinatorial treatment with SBL and TRAIL shows synergistic cytotoxicity.

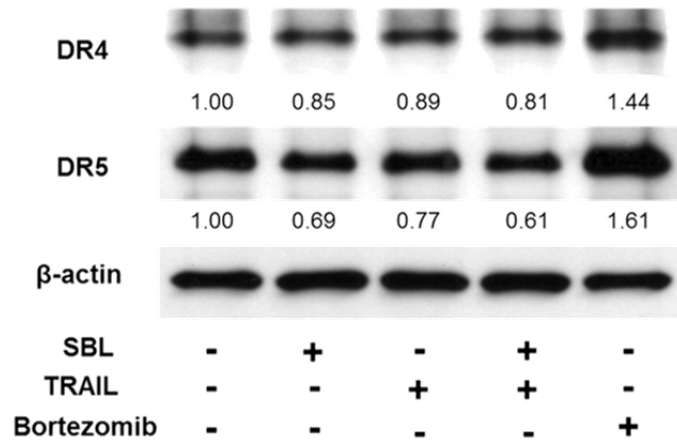
(A) Cytotoxic effect of combination of SBL and TRAIL in H28. Cells were treated with SBL (5 μ M) and/or TRAIL (1, 1.5 and 2 ng/mL) in combination for 24 h. The viability was determined by WST-1 assay. Data are expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments in triplicate. *, $p < 0.05$ versus SBL alone. (B) Binding of annexin V in combination-treated cells. H28 or MeT-5A cells were treated with SBL (5 μ M), ETO (50 μ M) and/or TRAIL (2 ng/mL) for 24 h. The percentage of annexin V positive cells was determined using flow cytometric analysis. Data are expressed as mean \pm S.D. of three independent experiments. *, $p < 0.02$ versus TRAIL alone. (C) caspase activation in combination-treated H28 cells. Cells were treated with SBL (5 μ M) and/or TRAIL (2 ng/mL) for 24 h. The activation of caspase-8, -9 or -3 was determined by Western blotting. β -Actin was used as a standard to ensure equivalent loading of cell extracts.

Bortezomib は、細胞膜上の TRAIL のレセプターである death receptor (DR) 4 および 5 の発現量を増加させ、TRAIL の感受性を増大すると報告されている。^{129, 130)} そこで、H28 細胞を SBL (5 μ M), TRAIL (2 ng/mL) を単独もしくは併用処理し、DR4 および 5 の発現変化が認められるか否かウェスタンブロッティングにより検討した。その結果、ポジティブコントロールとして用いた bortezomib を除き、単独処理および併用処理、いずれにおいても発現の上昇は認められなかった (Fig. 4A)。これらのことから、SBL と TRAIL の併用によるアポトーシスの増強に、DR4 および 5 の発現は関与しないことが明らかになった。

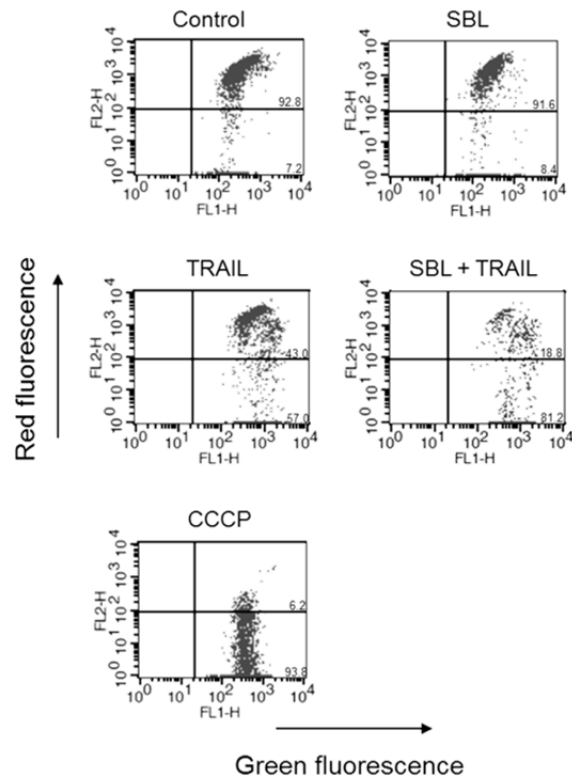
アポトーシスでみられるミトコンドリア異常の指標として、MMP の低下が挙げられる。また、TRAIL と ETO の併用処理によるアポトーシスでは、ミトコンドリア異常が重要であることが示唆されている。¹²⁹⁾ そこで、SBL と TRAIL の併用処理によるアポトーシスに、ミトコンドリアが関与するか否か、JC-1 を用いて検討を行った。その結果、TRAIL と ETO の併用処理と同様に、SBL または TRAIL 単独処理に比べ、併用処理で MMP 低下細胞の増加が認められた (Fig. 4B)。TRAIL と ETO の併用処理によるミトコンドリア介在性アポトーシスには、特異的な切断を受けることで活性化する Bid の活性化が重要であることが報告されている。¹²⁹⁾ そこで、SBL と TRAIL の併用処理により、Bid の切断、すなわち活性化が認められるか否か、切断される前の full length Bid の発現をウェスタンブロッティングにより観察した。その結果、TRAIL と ETO の併用処理と同様に、SBL または TRAIL 単独処理に比べ、併用処理で Bid 切断の増強が認められた (Fig. 4C)。

次に、併用効果における Bid 活性化の重要性を明らかにするため、siRNA を用いて Bid の発現を抑制し、SBL (5 μ M) および TRAIL (2 ng/mL) 24 時間処理した H28 細胞のアネキシン V の結合を測定した。さらに、カスパーゼ -8 の活性化をウェスタンブロッティングにより観察した。その結果、siRNA により、Bid の発現の抑制が確認された際、SBL と TRAIL の併用処理によるアネキシン V 陽性細胞の増加は認められなかった (Fig. 4D, E)。また、Bid の発現抑制により、カスパーゼ -8 の活性化は抑制された (Fig. 4F)。これらの結果より、併用効果において、Bid の活性化が重要であること、さらにその活性化はカスパーゼ -8 の活性化に関与していることが示唆された。

A

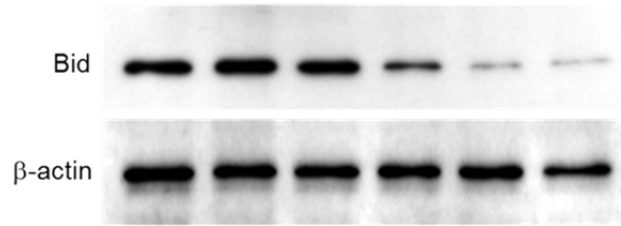
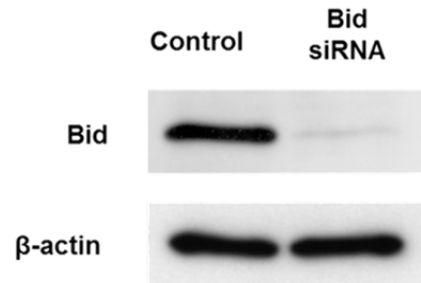
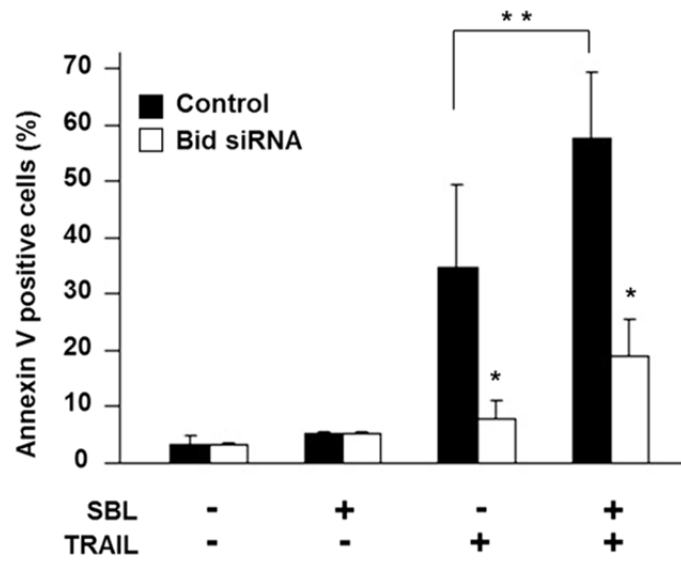


B



C

SBL	-	+	-	-	+	-
TRAIL	-	-	-	+	+	+
Etoposide	-	-	+	-	-	+

**D****E**

F

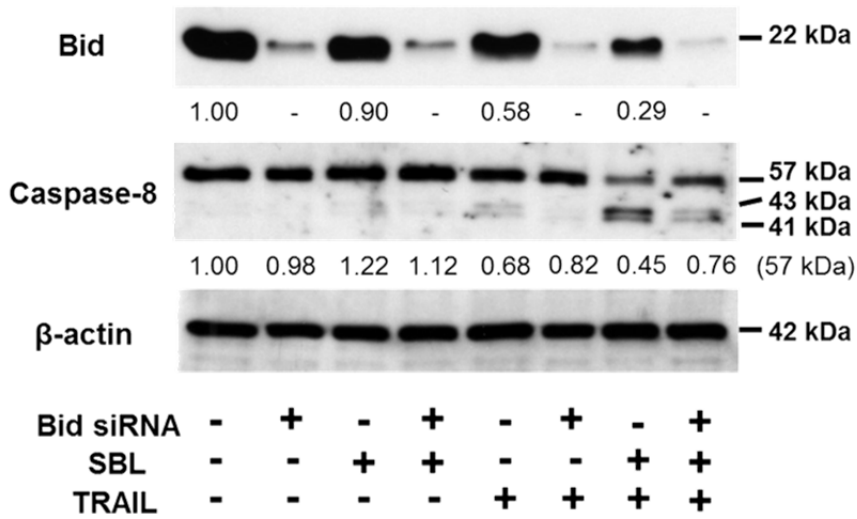


Fig. 4. Mechanistic analysis of synergistic effect of SBL and TRAIL.

(A) Effect of SBL on expression of DR4 and DR5. H28 cells were treated with SBL (5 μ M) and/or TRAIL (2 ng/mL) in combination for 24 h. Expression of DR4 and DR5 was determined Western blotting. Bortezomib (10 nM), known to up-regulate DR4 and DR5, was used as positive control. Bands in the Western blot were quantified by densitometry, and expressed as a ratio of intensity of bands to β -actin (respective bands / actin). (B) Change of MMP in combination-treated H28 cells. Cells were treated with SBL (5 μ M) and/or TRAIL (2 ng/mL) for 24 h, and then exposed to JC-1 for 30 min. Change of MMP was determined using flowcytometric analysis. The percentage of cells divided into lower right-hand (LR) quadrant and upper right-hand (UR) quadrant was indicated. (C) Bid-mediated synergistic effect in combinatorial treatment with SBL and TRAIL. Bid cleavage in combination-treated H28 cells. Cells were treated with SBL (5 μ M), ETO (50 μ M) and/or TRAIL (2 ng/mL) for 24 h. The cleavage of Bid was determined by Western blotting. β -actin was used as a standard to ensure equivalent loading of cell extracts. (D) RNA knock-down of Bid. H28 cells were subjected to two sequential rounds of transfection with Bid-specific siRNAs or vehicle (control). Bid expression is almost abrogated by the specific RNAi; there is no effect on expression of actin. (E) Effect of RNA knock-down of Bid on apoptotic facilitation between SBL and TRAIL in H28 cells. H28 cells subjected to two sequential rounds of Bid specific RNAi were treated with SBL (5 μ M) and/or TRAIL (2 ng/mL) for 24 h. Percentage of annexin V positive cells were determined using flowcytometric analysis. Data are expressed as mean \pm S.D. of three independent experiments. $p < 0.02$ versus control transfected with vehicle (*) or TRAIL alone (**). (F) Effect of RNAi knock-down of Bid on caspase-8 cleavage facilitated by combination of SBL and TRAIL in H28 cells. H28 cells transfected with Bid-specific siRNAs or vehicle were treated with SBL (5 μ M) and/or TRAIL (2 ng/mL) for 24 h. Bid expression and caspase-8 activation was detected by Western blotting. Bands in the Western blot were quantified by densitometry, and expressed as a ratio of intensity of bands to β -actin (respective bands / actin).

第四節 考察

本章では、SBL が数種の悪性中皮腫細胞に対し細胞増殖抑制効果を示し、一方で正常中皮由来細胞に対してはその効果を示さないことを明らかにし (Fig. 1), またその効果は、アポトーシスの誘導によることを示した。第一章、第二章およびこれまでに明らかにされている SBL の性質からも、SBL が、がん細胞選択的な、RNA をターゲットとした新しい分野における抗がん剤として応用できる可能性が示唆された。

多剤併用療法は、悪性中皮腫に限らず、多くの腫瘍に対する基本的治療法の一つである。薬剤は異なる作用機序のものが併用され、その利点は、1) 治療効果の上昇、2) 薬剤耐性獲得の軽減、3) 薬剤の使用量減少による副作用の軽減などが挙げられる。本章では SBL と TRAIL による併用効果について検討した。TRAIL は、炎症シグナルの誘導を伴わずに、がん細胞選択的にアポトーシスを誘導することから注目されたサイトカインである。TRAIL の効果は、DNA 傷害性薬剤、放射線照射あるいは翻訳阻害剤など、併用により増強することが知られており、悪性中皮腫においても、その併用効果が報告されている。^{129, 131, 132)} 現在、DR 4 に対するモノクローナル抗体である mapatumumab が、非小細胞肺癌や非ホジキンリンパ腫などに対する新規抗がん剤として期待されているなど、¹³³⁾ TRAIL とその受容体をターゲットとした研究が積極的に行われている。現在、TRAIL は多剤併用療法への応用を目的として、種々の薬剤との併用効果が広範に調べられているが、その中で、bortezomib や α -tocopheryl succinate (α -TOS) は、細胞膜上の DR4, DR5 の発現量を増加させ、TRAIL の感受性を増大させることが報告されている。^{129, 130, 134)} そこで、SBL または TRAIL 単独処理もしくは併用処理における、DR 4 と DR 5 の発現変化を確認したところ、ポジティブコントロールとして用いた bortezomib を除く、いずれの処理においても、DR4 と DR5 の発現上昇は認められなかった (Fig. 4A)。このことから、SBL と TRAIL の相乗効果において、DR 4, DR 5 の発現調節は関与しないことが示唆された。

Fas リガンドや TNF などのサイトカインは、膜表面に存在する受容体に結合して、外因性経路によりアポトーシスを誘導することが知られている。¹³⁵⁾ それらのリガンドとそれに対する受容体の結合により、death inducing signaling complex (DISC) の形成が起こり、カスパーゼ -8 の活性化が誘導される。¹³⁵⁾ その後、活性型カスパーゼ -8 は、細胞の種類により二つの異なった経路にてシグナルを伝達する。¹³⁶⁾ 一つは、活性型カスパーゼ -8 が直接的にカスパーゼ -3 などのエフェクターカスパーゼを活性化する経路である。¹³⁷⁻¹⁴⁰⁾ もう一つは、活性型カスパーゼ -8 が Bid の切断を介してミトコンドリア異常を惹起し、カスパーゼ -9 の活性化後、エフェクターカスパーゼを活性化する経路である。^{136, 140)} これらは、いかなる要因によって制御されているか不明だが、前者の経路が働く細胞は Type I 細胞 [SKW6.4 細胞 (ヒト B リンパ芽球由来) や H9 細胞 (ヒト T リンパ腫) など]、後者の経路が働く細胞は Type II 細胞 [Jurkat や CEM 細胞 (ヒト急性リンパ芽球性白血

病)など]と区別されている。Gerwin らにより樹立された悪性中皮腫細胞である M28 細胞は、TRAIL が関与するアポトーシスシグナルに、ミトコンドリアと Bid が重要な役割を担っていることから、Type II 細胞であると考えられている。¹³¹⁾ 本章において、SBL と TRAIL の併用による相乗的細胞増殖抑制効果の機序について検討した。その相乗的効果はアポトーシスの促進によるものであることが示され、その際、ミトコンドリア異常が亢進していることが明らかになった (Fig. 3, 4B)。また、このアポトーシスの増強は、Bid 活性化の増強を伴い、それがカスパーゼ -8 活性化などのアポトーシスシグナルの促進に重要な働きをしていることが示唆された。本実験に用いた H28 細胞において、Bid 活性化の増強が TRAIL 誘導アポトーシスを促進させていることは、H28 が Type II 細胞に分類されることを示していると考えられる。

興味深いことに、Abayasiriwardana らは、28S rRNA に結合し、翻訳を阻害する anisomycin が、ribotoxic stress を誘導する濃度において、Bim を介したミトコンドリア異常の閾値低下を引き起こし、TRAIL との併用効果を示すことを見いだした。またその際、Bim の安定化に JNK が寄与する可能性を報告している。¹³²⁾ また、Nikrad らは、プロテアソーム阻害剤である bortezomib が、DR 発現上昇のほかに、Bik および Bim の発現上昇を介して TRAIL との併用によるアポトーシス増強に寄与すると報告している。¹⁴¹⁾ 本章においては、SBL 処理 H28 細胞において、Bik および Bim の発現上昇が観察された。Anisomycin は、JNK と ERK の活性化を誘導し p38 の活性化は誘導しないことが報告されているのに対し、SBL では ERK ではなく p38 および JNK が活性化されていることが示された。これらの知見から、複数の薬剤の併用時において、Bcl-2 ファミリータンパク質や MAPK がその相乗効果に重要な働きを担っている可能性が考えられる。

以上のことを踏まえ、SBL と TRAIL の併用により誘導されるアポトーシス増強に関し、予想される作用機序を Fig. 5 に示した。併用によるアポトーシスの増強はミトコンドリア異常、カスパーゼ-9 の活性化、エフェクターカスパーゼの活性化を介し、さらにカスパーゼ-8 および Bid の活性化が増強される、この一連の amplification loop の活性化によるものと考えられる。また SBL により誘導されるアポトーシスシグナルに、Bik や Bim あるいは JNK や p38 が関与している可能性がある。この SBL と TRAIL の併用効果は、がん細胞選択的に観察されること、またこのような作用機序による治療法がこれまでにないことなどから、SBL と TRAIL の併用療法は、悪性中皮腫に対する有効な治療法になり得ると考えられる。

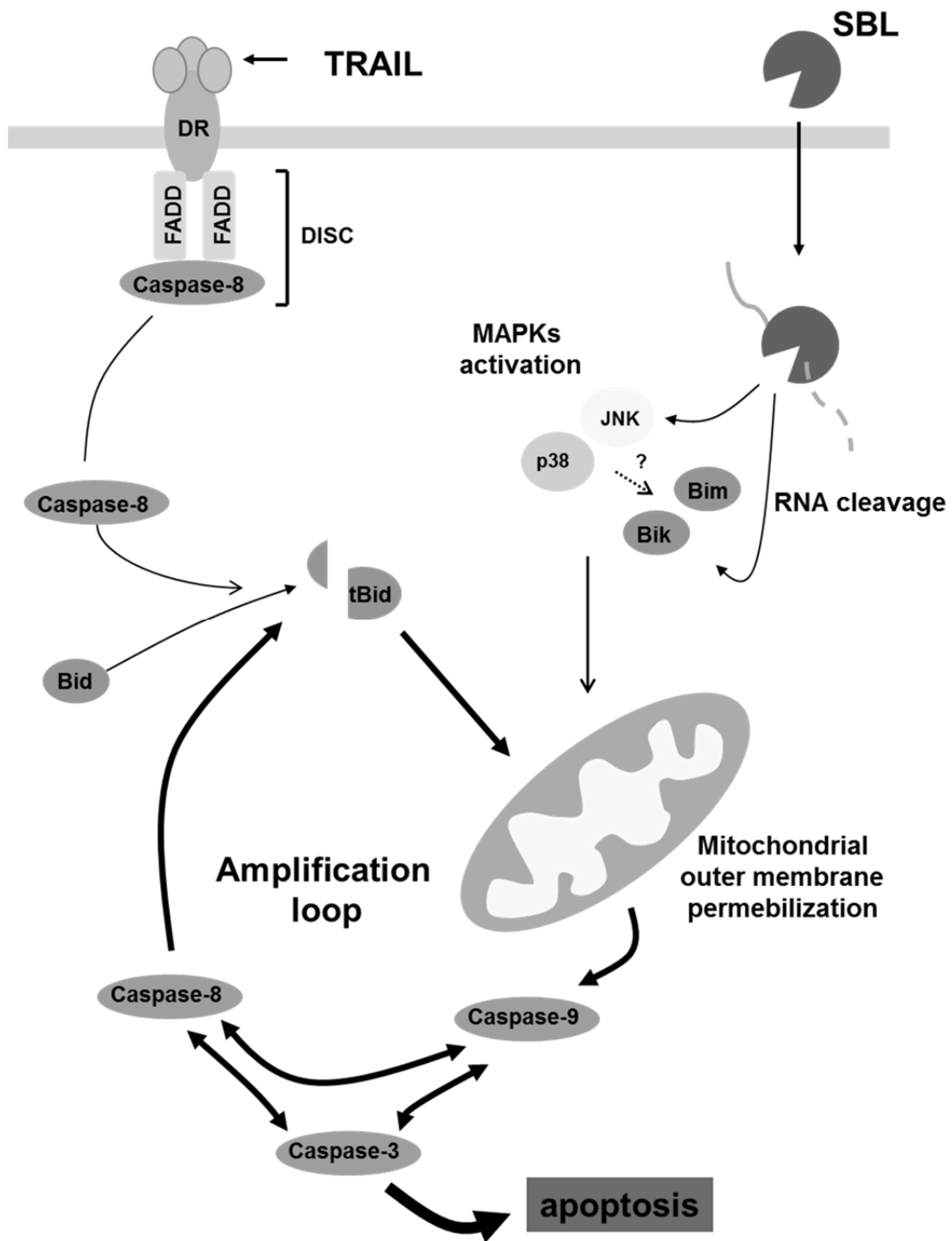


Fig. 5. Proposed model for mechanism of apoptosis amplified by SBL and TRAIL in H28 cells.

SBL catalyzes cleavage of cellular RNAs, and increases expression of Bik and Bim, phosphorylation of p38 and JNK MAPKs. On the other hands, TRAIL activates DR mediated by death-inducing signaling complex (DISC), which is formed by recruitment of Fas-associated death domain protein (FADD) and caspase-8. Caspase-8 activates Bid. These two signals induce apoptotic “amplification loop” (thick line) associated with mitochondrial outer membrane permeabilization and caspase activation.

第四章

SBL 誘導アポトーシスは Hsp70 の減少により阻害される

第一節 序

細胞は種々のストレスに対し、熱ショックレスポンスを引き起こし、そこでは細菌から高等生物に至るまで、種を越えて進化的に保存されている一連の熱ショックタンパク質 (Hsp) が誘導される。これら Hsp は分子シャペロンであり、細胞の損傷回復や防御機構において重要な役割を担っている。

¹⁴²⁾ Hsp は、ストレス時に誘導される stress-inducible type と、常在性の constitutive type の二種類に大別される。近年の研究で、各種 Hsp 独自の特異的な機能が明らかになりつつある。Hsp70 ファミリーには、stress-inducible type である Hsp70 や constitutive type であり細胞質や核小体に局在している Hsc70、小胞体に存在する BiP 等が含まれるが、近年、Hsp70 ファミリーが細胞死に密接に関与しているという興味深い報告が多数なされている。Hsp70 は JNK の活性化を抑制することによりアポトーシスを抑制すること、¹⁴³⁾ あるいはサイトゾルタンパク質の apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1) と結合し、Apaf-1 にプロカスペーゼ -9 がリクルートされるのを阻害することにより、アポトーシスシグナルを抑制することなどが報告されている。

¹⁴⁴⁾ 一方、Hsp70 がアポトーシスを促進するという報告もあり、Liossis らは、Hsp70 が Jurkat T 細胞において TCR/CD3 や Fas/Apo-1/CD95 で仲介されるアポトーシスを増強することを報告している。¹⁴⁵⁾ Hsc70 は細胞質に局在し、特異的なストレス下において核へ移行することが明らかになっているが、¹⁴⁷⁾ さらに、細胞表面にも発現し、様々なレセプター分子と相互作用するという報告もなされている。¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾ また、Hsp70 および Hsc70 に関し、それらが細胞表面の glycosphingo-lipid-enriched microdomain (GEM) 存在し得ることも明らかにされている。^{150, 151)}

SBL は、緒論で述べた通り、種々のがん細胞を凝集し、その凝集はシアロ糖タンパク質やガングリオシドで阻害される。また SBL による P388 細胞の凝集および細胞増殖抑制効果は、細胞をシアリダーゼで前処理することにより低下することなどから、P388 細胞膜上に発現しているシアロ糖タンパク質レセプター (SBL レセプター ; SBLR) の存在が考えられている。さらに、最近の研究から、SBLR が GEM に存在するという可能性も示唆されている (データ未発表)。本章では、SBL 誘導アポトーシスにおける Hsp の関与を、GEM での発現が報告されている Hsp70 および Hsc70 に注目して検討した。

第二節 実験材料および実験方法

1. 材料

SBL は、第一章、第二節、第 1 項に述べた方法で調製した。抗 SBL 抗血清は本研究室において、常法に従い SBL をウサギに免疫注射して得られたものを使用した。抗 Hsp70 および Hsc70 抗体は Stressgen 社より購入した。Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat 抗 rabbit 抗体は Cedarlane 社から購入した。Quercetin は Cayman Chemical Company 社からより購入した。

2. 細胞培養

P388 細胞は東北大学医学研究所医用細胞資源センターより供与されたものを用い、細胞は、第一章、第二節、第 2 項に述べた方法で培養した。

3. カスパーゼ-3 活性の測定

カスパーゼ-3 活性の測定は、第一章、第二節、第 8 項に述べた方法で行った。

4. SBLR, Hsp70 および Hsc70 の発現確認

SBLR 発現の検出のため、P388 細胞に SBL を加え、氷中で 30 分間反応させた後、抗 SBL 抗体を加え、氷中で 30 分間反応後、FITC 標識 goat 抗 rabbit IgG 抗体を加え、氷中で 30 分間反応させた。Hsp70 および Hsc70 の発現の検出ため、P388 細胞に抗 Hsp70 抗体、抗 Hsc70 抗体を加え、氷中で 30 分間反応後、FITC 標識 goat 抗 rabbit IgG 抗体を加え、氷中で 30 分間反応させた。反応後、PBS で 2 回洗浄し、FACScalibur によりそれぞれの蛍光シグナルを測定した。

5. ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは、第一章、第二節、第 9 項に述べた方法で行った。

6. RT-PCR 法

Total RNA の抽出は、第一章、第二節、第 3 項に述べた方法で行った。RT-PCR 法は Hsp70 および Hsc70 遺伝子特異的 primer を用い、第二章、第二節、第 5 項に述べた方法で行った。

7. トリパンプルー色素排除試験

トリパンプルー色素排除試験は、第一章、第二節、第 4 項に述べた方法で行った。

8. DNA 断片化の観察

DNA 断片化の観察は、第一章、第二節、第 6 項に述べた方法で行った。

9. 統計学的処理

統計学的処理は、第一章、第二節、第 11 項に述べた方法で行った。

第三節 結果

1. SBL 処理 P388 細胞においてカスパーゼ -3 が活性化される

第一章において、SBL は Jurkat 細胞に対し、核の凝縮・断片化、アネキシン V の結合や DNA の断片化を引き起こし、アポトーシスを誘導することを示した。本章では、SBL の P388 に対するアポトーシス誘導効果をカスパーゼ -3 の活性化を指標に観察した。DEVD-pNA 用いた カスパーゼ-3 の活性測定の結果、SBL 処理により カスパーゼ-3 の活性化が誘導され、その活性は 6 時間後において最大となった (Fig. 1)。このことから P388 細胞では、SBL 処理 6 時間後にアポトーシス実行期に入ることが示唆された。

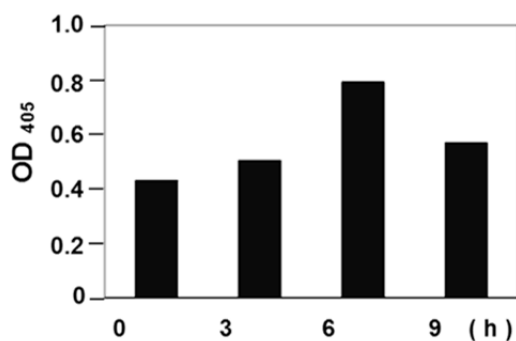


Fig. 1. Effect of SBL on the activation of caspase-3 in P388 cells.

Cells were treated with SBL (2µM) for indicated time. Caspase-3 activity was examined by use of DEVD-pNA.

2. SBLR, Hsp70 および Hsc70 は P388 細胞膜上に発現する

第一章で述べたように、SBL はがん細胞の膜表面に結合後、細胞内に取り込まれ、細胞毒性を示すと考えられており、その細胞膜上には SBLR の存在が示唆されている。そこで、細胞膜の SBLR, Hsp70 および Hsc70 の発現をフローサイトメーターにより観察した。その結果、P388 細胞において、SBLR, Hsp70 および Hsc70 の全ての発現が認められた (Fig. 2)。

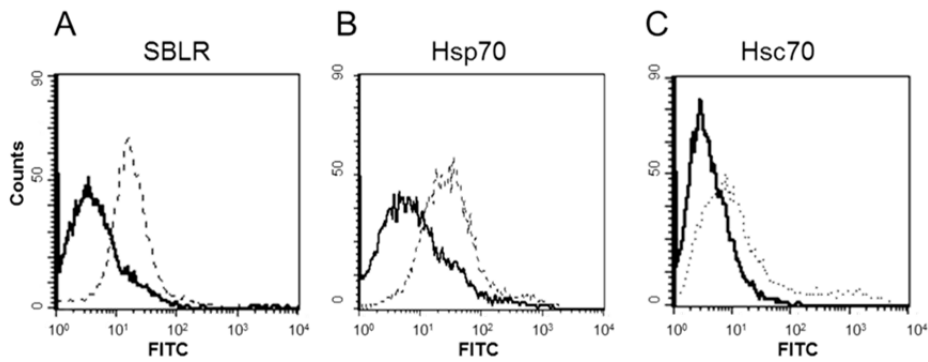


Fig. 2. Flowcytometric analysis of heat shock proteins on P388 cell surface.

SBLR (A), Hsp70 (B) and Hsc70 (C) on P388 cell surface were analyzed by flowcytometry using respective antibodies (dotted line). Solid line indicates control cells for each experiment.

3. SBL 処理により，細胞質の Hsp70 および Hsc70 が増加する

Hsp70 および Hsc70 の細胞膜上の存在が明らかになったことから，次に，これらの局在が，SBL 処理により変化するか否かを検討した．細胞を SBL で処理後，細胞を膜，細胞質および核画分に分画し，それぞれにおける Hsp70 および Hsc70 の発現量をウェスタンブロッティングにより測定した．その結果，膜画分の Hsp70 発現量は，SBL 処理 6 時間後において，未処理コントロールに比べ 34 % の減少が認められ，その後徐々に増加した (Fig. 3A)．一方，細胞質画分では，Hsp70 および Hsc70 いずれにおいても，処理後 3 時間において一過性の上昇が認められ，また核画分においても 9 時間処理において一過性の上昇が認められた (Fig. 3B, C)．このことから，Hsp70 および Hsc70 の局在は，SBL 処理により変化することが判明した．興味深いことに，カスパーゼ -3 の活性化が起こる直前に，細胞質画分の Hsp70 および Hsc70 の発現量が最大となることが明らかになった．

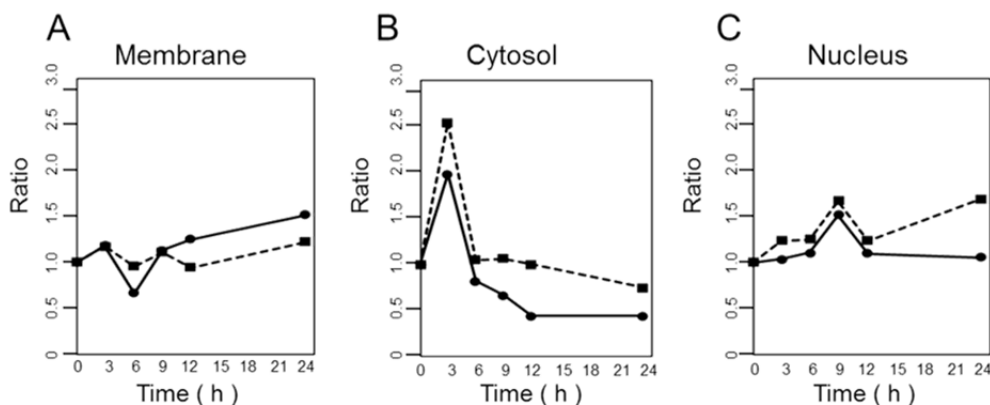


Fig. 3. Distribution of Hsp70 and Hsc70 in SBL-treated P388 cells.

Each fraction (A: membrane/organelle, B: cytosol, and C: nucleus) was extracted from SBL-treated P388 cells. The levels of Hsps were detected by Western blot analysis. Hsp70: solid line, Hsc70: dotted line.

4. Quercetin は Hsp70 の発現を抑制する

SBL の抗腫瘍効果と, Hsp70 および Hsc70 の関係を明らかにするため, Hsp70 の発現を減少させることが知られている quercetin を用いた実験を行った. Quercetin は, Hsp の誘導抑制に関与することが報告されているフラボノイド化合物で, 熱ショック転写因子 [heat shock transcription factor (HSF)] の一種である HSF1 の DNA への結合を抑制, あるいは HSF1 の発現を減少させることで, Hsp70 の mRNA レベルでの発現を抑制することが報告されている.¹⁵²⁾ Quercetin 処理 P388 細胞における Hsp70 および Hsc70 の発現を RT-PCR 法またはウェスタンブロッティング法により検出したところ, quercetin 処理 12 時間より, Hsp70 mRNA の発現は約 60 % 減少し, さらにタンパク質レベルでは約 50 % の減少が認められた (Fig. 4). 一方で, Hsc70 の発現に対する quercetin の影響は, mRNA レベル, タンパク質レベルいずれにおいても認められなかった.

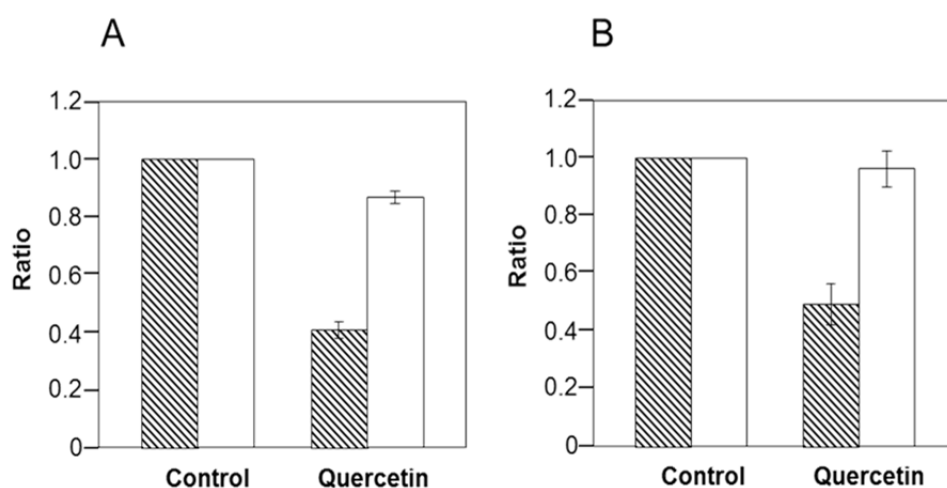


Fig. 4. Effect of quercetin on mRNA expression and protein level of Hsp70 or Hsc70.

Cells were treated with quercetin (5 μ M) for 12 h. Expression of Hsp70 (black column) and Hsc70 (dotted column) at mRNA level (A) and protein level (B) were determined by RT-PCR and Western blot analysis, respectively.

5. SBL の P388 細胞への結合は quercetin の影響を受けない

Quercetin 処理により Hsp70 の発現低下が認められたので, 次に, Hsp70 の発現減少が SBL の機能に影響を及ぼすか否か検討した. Quercetin 処理細胞に対する SBL の結合性をフローサイトメーターを用いて観察したところ, quercetin 処理および未処理細胞において, SBL の結合性に变化は認められなかった (Fig. 5).

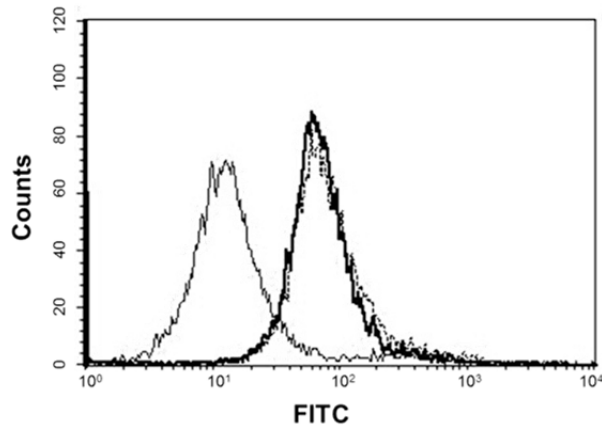


Fig. 5. Effect of quercetin on binding of SBL to P388 cells.

Cells were treated with (bold line) or without (dotted line) quercetin (5 μM) for 12 h. After treatment with SBL and 抗 SBL antibody in the same way as described in materials and methods, the cells were analyzed by FACSCalibur. Control, thin line.

6. Quercetin は SBL による抗腫瘍効果減弱させる

次に, Hsp70 の発現減少が SBL の抗腫瘍効果に影響を及ぼすか否か検討した. P388 細胞に及ぼす SBL の細胞毒性およびアポトーシス誘導効果に対する quercetin の影響を, トリパンプル一色素排除試験または DNA 断片化の観察により検討したところ, quercetin 処理により SBL 誘導細胞死の減弱および DNA 断片化の抑制が認められた (Fig. 6A, B). これらのことから, SBL による抗腫瘍効果において, Hsp 70 が重要な役割を担っている可能性が示唆された.

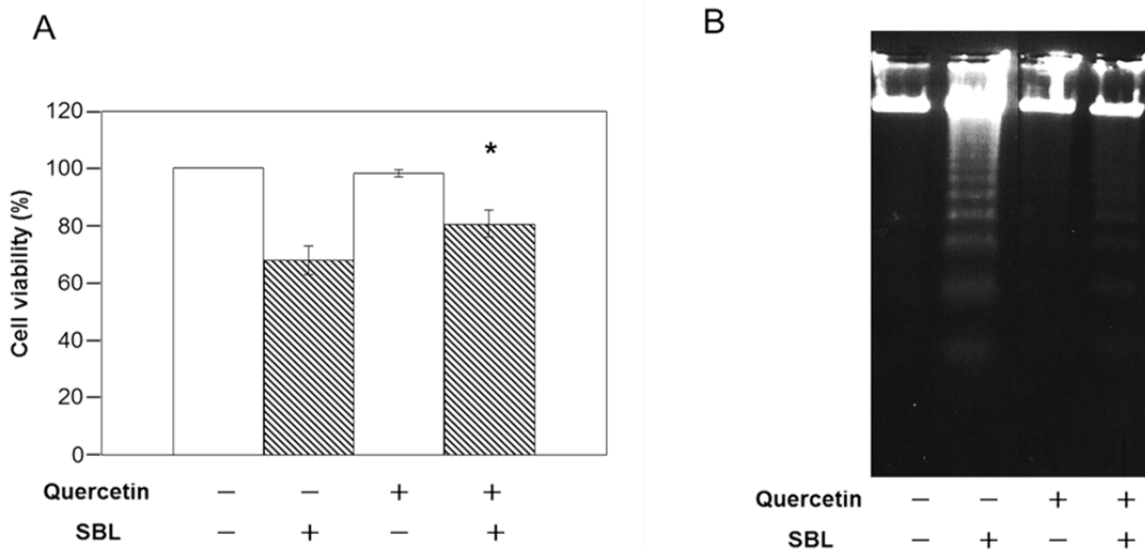


Fig. 6. Effect of quercetin on SBL-induced cytotoxicity.

After pretreatment with quercetin (5 μM) for 12 h, the cells were incubated with SBL (2 μM) for 24 h. (A) The viable cells were counted by trypan blue exclusion assay. (B) Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from SBL-treated P388 cells. * $p < 0.05$ versus SBL alone.

第四節 考察

がん細胞に対して細胞毒性を示す数種のリボヌクレアーゼは、RNA を標的にするという新しい機序により抗腫瘍作用を示すことから、新規抗がん剤として期待されている。第一章で述べたように、リボヌクレアーゼにより誘導される細胞毒性のメカニズムは、i) リボヌクレアーゼの細胞表面への結合と細胞内への取り込み ii) 細胞質への移行 iii) 細胞内 ribonuclease inhibitor (RI) からの回避 iv) 細胞内 RNA の分解、のステップからなると考えられており、これら各ステップにおける効率は、リボヌクレアーゼの細胞毒性に大きな影響を与えることが知られている。⁴²⁾ SBL の P388 細胞に対する凝集活性および細胞毒性は、細胞をシアリダーゼ処理することで阻害されることが明らかにされており、²⁷⁾ SBL のシアロ糖タンパク質レセプターへの結合とその取り込みは、SBL の抗腫瘍効果の発現に重要であると考えられている。さらに最近の知見から、SBLR が細胞膜表面の GEM に存在する可能性が示唆されている (データ未発表)。

本章では、GEM に存在することが報告されている Hsp70 および Hsc70 の、SBL による抗腫瘍効果への関与の可能性について検討した。まず初めに、Hsp70 および Hsc70 の発現を検討した結果、これらが SBLR と同様に P388 細胞膜上に発現していることが明らかになった (Fig. 2)。また SBL 処理細胞における両者の細胞内局在を観察したところ、SBL 誘導アポトーシスが実行期に入る直前に、細胞質で Hsp70 および Hsc70 が著しく増加するという興味深い知見を得た (Fig. 1, 3)。次に、これら Hsp が機能的に SBL 誘導細胞死に関与するか否か、Hsp の発現を抑制することが知られるフラボノイド化合物、quercetin を用いた実験により検討した。Quercetin 処理 P388 細胞において、Hsp70 の減少が mRNA レベル、タンパク質レベルともに確認されたが (Fig. 4)、この条件下において、SBL の P388 細胞に対する結合性に変化はなかった (Fig. 5)。Hsp70 はメチル化、あるいは O-結合型 N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) の付加によりその機能が制御されることが報告されているが、Hsp70 自体がシアロ糖タンパク質であるという報告は今のところない。^{153, 154)} これらのことは Hsp70 自体は SBLR ではないことを示唆しているものと考えられる。一方で、quercetin による Hsp70 の発現減少は、SBL 誘導アポトーシスの抑制を引き起こすことが明らかになり (Fig. 6)、Hsp70 が SBL の抗腫瘍効果に密接に関与する可能性が示唆された。

Hsp 類、特に Hsp70 ファミリーに関し、それらが種々の細胞膜上レセプターと相互作用していることが知られており、特に Hsp 70 および Hsc 70 は CD14, CD40 あるいは toll-like receptor ファミリーと相互作用することが明らかにされている。¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾ また興味深いことに、Guerrero と Moreno は、Hsc 70 が GEM 上で integrin $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ と複合体を形成して rotavirus のレセプターとして機能し、ウィルスの細胞膜への接着と細胞内への取り込みに関与する可能性を報告している。¹⁵⁸⁾ 本研究では、Hsp70 の発現減少は SBL の細胞膜への結合性に影響を与えないが、SBL 誘導アポトーシスを抑制することが明らかになった。上述の通り、細胞毒性を示すリボヌクレアーゼの細胞内への取り込みや細胞質への移行なども、リボヌクレアーゼに対する細胞の感受性に影響を与

えることから, Hsp70 は, P388 細胞膜上において SBLR と何らかの形で相互作用し, SBL の細胞内への取り込みや局在に関与し, SBL のアポトーシス誘導効果に影響を及ぼす可能性が考えられる. Hsc70 の発現は quercetin 処理で減少せず, その機能解析は行えなかったが, 本研究における quercetin 処理条件下では SBL のアポトーシスが完全には抑制されなかったことから Hsc70 あるいは他の Hsp が SBL の機能に関与する可能性もあり, これらを明らかにすることで, SBL の抗腫瘍効果や細胞選択性に関わる研究が発展することが期待される.

総 括

本研究では、SBL の臨床応用への可能性を追求することを目的に、SBL の抗腫瘍作用について、その有効性、作用機序ならびに他の薬剤との併用について検討した。

第一章では、数種のヒト白血病細胞株に対する SBL の有効性およびその作用機序について検討したところ、SBL が多剤耐性を含む種々のヒト白血病細胞に対して細胞毒性を示すことが明らかになった。SBL 誘導アポトーシスのシグナル解析から、その作用機序として、SBL はがん細胞表面に結合した後、取り込まれ、細胞内で RNA を分解し、その後、ミトコンドリアの障害を引き起こし、最終的に、カスパーゼカスケードを活性化する。これらのことから、アポトーシスシグナルが増強され、細胞死に至ると予想された。さらに、このプロセスには p38 や JNK の活性化が関与している可能性が示唆された。

第二章では、がん治療における標的として注目を集める小胞体ストレスの、SBL 誘導アポトーシスに対する関与について検討した。その結果、SBL は、小胞体ストレスによる UPR を誘導することが示され、またカスパーゼ -4 の活性化による小胞体ストレス性アポトーシスを誘導することが示唆された。SBL 誘導アポトーシスに対する小胞体ストレスの関与について検討した結果、SBL が誘導するアポトーシスにおいて、ミトコンドリア障害と小胞体ストレスはそれぞれ独立して誘導されることが示された。また、アポトーシスのシグナル伝達において、ミトコンドリア障害によるカスパーゼ -9 の活性化が、一部カスパーゼ -4 の活性化に関与している可能性が示唆された。

第三章では、難治性腫瘍である悪性中皮腫細胞に対する SBL の有効性と、SBL および TRAIL における相乗的抗腫瘍効果ならびにその作用機序について検討した。悪性中皮腫および正常中皮由来細胞を用いた実験から、SBL が悪性細胞選択的にアポトーシスを誘導することが示された。さらに SBL と TRAIL の併用により相乗的アポトーシス誘導効果が認められた。この併用効果においては、ミトコンドリア異常、カスパーゼ-9 の活性化、カスパーゼ -3 の活性化を介し、さらにカスパーゼ -8 および Bid の活性化が増強されるという、一連の amplification loop の活性化によることが示唆された。また SBL により誘導されるアポトーシスシグナルに、Bik や Bim あるいは JNK や p38 が関与している可能性が示された。

第四章では、GEM に存在することが報告されている Hsp70 および Hsc70 が、SBL の抗腫瘍効果に及ぼす影響について検討した。その結果、Hsp70 および Hsc70 が、SBL と同様に P388 細胞膜上に発現していることが明らかになり、また SBL 誘導アポトーシスが実行期に入る直前に、細胞質の Hsp70 および Hsc70 が著しく増加するという興味深い知見を得た。また、quercetin による Hsp70 の発現減少は、SBL の P388 細胞に対する結合性に変化を与えないが、SBL 誘導アポトーシスの抑制を引き起こすことが明らかになり、Hsp70 が SBL の抗腫瘍効果に密接に関与している可能性が示唆された。

糖鎖研究が飛躍的に発展している今日、レクチンはその糖鎖を特異的に認識する性質から、新規腫瘍マーカーの探索ツールや診断薬などへの応用が期待されている。Narimatsuらは、レクチンクロマトグラフィー、免疫学的染色、レクチンアレイ解析等の糖鎖解析技術を応用し、肝細胞がんや胆管癌の新規マーカー候補分子を発見している。^{159, 160)} また Chenらは、病態に付随した糖タンパク質の量的変動を特異的なモノクローナル抗体で、また糖鎖修飾という質的变化を改変レクチンプローブで検出するという新しい診断法を報告している。¹⁶¹⁾ さらに、古くから研究されているレクチンである、コンカナバリン A や、ヤドリギレクチンは、それらがオートファジーに関連した抗腫瘍作用を示すことから、抗がん剤としての可能性が報告されている。^{162, 163)}

細胞膜上において、シアル酸は、通常、糖脂質や糖タンパク糖鎖の非還元末端に付加されており、分子のコンフォメーションや、認識・結合などに重要な役割を担っている。¹⁶⁴⁾ 細胞表面の糖鎖変化はがんの特徴の一つであるが、特にシアル酸の変化は、転移や浸潤などの悪性形質に密接に関わっていると考えられている。^{165, 166)} 近年でも、がん細胞表面のシアル酸高発現が、胃がんの転移と相関するという報告や、¹⁶⁷⁾ またシアル酸を標的とするイヌエンジュレクチンを、がん細胞の増殖や転移の抑制に応用する試みがなされている。¹⁶⁸⁾ SBL のレクチン活性に関しては、未だ不明な点も多いが、ムチンによる凝集阻害実験などの結果から、がん細胞への結合には、シアル酸を含む O- 結合型糖鎖の関与が示唆されており、²⁷⁾ これが SBL の悪性細胞選択性に関与している可能性がある。抗がん剤への応用が期待されているリボヌクレアーゼのがん細胞選択性に関しては、1) がん細胞表面では、シアル酸や硫酸基により陰性電荷が増加し、塩基性タンパク質であるリボヌクレアーゼの結合が促進されること、¹⁶⁹⁾ 2) がん細胞内のゴルジ体の変異により、リボヌクレアーゼの細胞内輸送が正常細胞とは違うこと¹⁷⁰⁾ などがその選択性の要因となる可能性として報告されている。しかし、その詳細は明らかになっておらず、SBL のがん細胞選択性のメカニズムを明らかにすることが、リボヌクレアーゼによる細胞の認識・結合機構の解明に大きく役立つ可能性がある。²⁰⁾

細胞毒性をもつリボヌクレアーゼは、その新しい機序による抗腫瘍効果から、がん治療への応用が期待され、近年でも新規リボヌクレアーゼを探索する研究が生物種を問わず行われており、ホンシメジ由来 LS リボヌクレアーゼ、¹⁷¹⁾ ニガウリ由来リボヌクレアーゼ MC、²¹⁾ ヒョウガエル由来 amphinase ¹⁷²⁾ などに抗腫瘍活性が見いだされている。また、抗 CD 74 抗体や、抗 human EGFR-related 2 (HER2) 抗体とリボヌクレアーゼを融合させることで特定のがん細胞に対する選択性を高めようとする試みや、^{173, 174)} 核移行シグナルを付加することにより リボヌクレアーゼの細胞内局在を変化させ、その作用を増強させる研究、¹⁷⁵⁾ さらにはヒト血清アルブミンと融合させ、特定の臓器への蓄積を防ぐことで薬物動態学的に副作用を軽減させようとする研究など、¹⁷⁶⁾ 最新の遺伝子工学・タンパク質工学技術を駆使し、がん細胞選択性あるいは抗腫瘍活性を増強するようなタンパク質変異体、融合タンパク質の作製を試みる研究も盛んに行われている。このように、リボヌクレアーゼは新規抗がん剤として期待される一方で、その作用機序、特にがん細胞選択性や、リボ

ヌクレアーゼ活性による RNA 切断後、どのようにしてアポトーシスシグナルを伝達することになるのかについては、大きなブラックボックスとなっており、解決すべき課題である。

本研究において、レクチン活性およびリボヌクレアーゼ活性を併せもつ多機能性タンパク質である SBL は、多剤耐性細胞を含む種々のがん細胞に対し、悪性細胞選択的な抗腫瘍効果を示し、これまで用いられてきた DNA 傷害型薬剤に代わる、新しい抗がん剤として応用できる可能性が示唆された。また、特筆すべきは、難治性がんとして社会的関心の高まっている悪性中皮腫に対して、SBL は選択的な抗腫瘍効果を示し、さらに TRAIL との相乗的な併用効果も確認されたことである。本疾患に対する現行の非常に限られた薬物療法に、新たに効果的な選択肢を加えられる可能性が生まれてきた。筆者は、レクザイム (SBL) の抗腫瘍メカニズムについて、細胞生物学的にさらに詳細に理解することにより、レクザイムをより安全で有効性の高い抗がん剤として利用できるようにする研究に邁進し、現在、そして将来にわたって、がんで苦しむ人たちに貢献できることを希求する。

論文目録

本論文の第一章から第四章までの内容は、それぞれ以下の雑誌に公表した.

1. Sialic acid-binding lectin (lecyzme) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells
Int. J. Oncol., 2013, **43**(5), 1402-1412.
2. Involvement of ER stress in apoptosis induced by sialic acid-binding lectin (lecyzme) from bullfrog eggs
Int. J. Oncol., 2013, **43**(6), 1799-1808.
3. Sialic acid-binding lectin (lecyzme) induces apoptosis to malignant mesothelioma and exerts synergistic anti-tumor effect with TRAIL
Int. J. Oncol., in press (DOI: 10.3892/ijo.2013.2192)
4. Down-regulation of Hsp70 inhibits apoptosis induced by sialic acid-binding lectin (lecyzme)
Oncol. Rep., in press (DOI: 10.3892/or.2013.2814)

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、

仁田 一雄 教授 に衷心より感謝申し上げます。

また、御校閲、御助言を賜りました薬物治療学 石川 正明 教授 ならびに細胞制御学 顧 建国 教授 に深く感謝申し上げます。

有益なる御助言、多大なる御協力を頂きました 箱守 仙一郎 教授 に深く感謝申し上げます。

有益な御教示ならびに御協力を頂きました 細野 雅祐 准教授 に深く感謝申し上げます。

本研究にご協力頂きました 菅原 栄紀 助教 ならびに附属癌研究所第一部および分子認識学教室 諸氏に厚く感謝申し上げます。

最後に、本研究において、終始御激励を賜りました理事長・学長・高柳 元明 博士に深く感謝の意を表します。

引用文献

1. Rudolf V, 梶田昭 (訳) “細胞病理学”, 朝日出版社, 東京, 1988.
2. Furukawa K., Takamiya K., Okada M., Inoue M., Fukumoto S., Furukawa K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1525**, 1-12 (2001).
3. Hakomori S.I., Murakami W.T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **59**, 254-261 (1968).
4. Matsusako T., Muramatsu H., Shirahama T., Muramatsu T., Ohi Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 1218-1222 (1991).
5. Sharon N., Lis H., "Lectin", Chapman and Hall, New York, 1989, pp.6-7
6. Nowell P.C., *Cancer Res.*, **20**, 462-466 (1960).
7. Aub J.C., Tieslau C., Lankester A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **50**, 613-619 (1963).
8. Goldstein I. J., Hughes R. C., Monsigny M., Osawa T., Sharon N., *Nature*, **285**, 66 (1980).
9. Ashwell G., Harford J., *Annu. Rev. Biochem.*, **51**, 531-554 (1982).
10. Kuno A., Uchiyama N., Koseki-Kuno S., Ebe Y., Takashima S., Yamada M., Hirabayashi J., *Nat. Methods*, **2**, 851-856 (2005).
11. Matsuda A., Kuno A., Ishida H., Kawamoto T., Shoda J., Hirabayashi J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **370**, 259-263 (2008).
12. Kawauchi H., Sakakibara F., Watanabe K., *Experientia*, **31**, 364-365 (1975).
13. Sakakibara F., Kawauchi H., Takayanagi G., Ise H., *Cancer Res.*, **39**, 1347-1352 (1979).
14. Nitta K., Takayanagi G., Kawauchi H., Hakomori S., *Cancer Res.*, **47**, 4877-4883 (1987).
15. Titani K., Takio K., Kuwada M., Nitta K., Sakakibara F., Kawauchi H., Takayanagi G., Hakomori S., *Biochemistry*, **26**, 2189-2194 (1987).
16. Nitta K., Oyama F., Oyama R., Sekiguchi K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Hakomori S., Titani K., *Glycobiology*, **3**, 37-45 (1993).
17. Nitta K., Ozaki K., Tsukamoto Y., Furusawa S., Ohkubo Y., Takimoto H., Murata R., Hosono M., Hikichi N., Sasaki K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Tsuiki S., Hakomori S., *Cancer Res.*, **54**, 928-934 (1994).
18. Aravind L., Koonin E.V., *Methods Enzymol.*, **341**, 3-28 (2001).

19. Deshpande R.A., Shankar V., *Crit. Rev. Microbiol.*, **28**, 79-122 (2002).
20. Fang E.F., Ng T.B., *Biochim. Biophys. Acta*, **1815**, 65-74 (2011).
21. Fang E.F., Zhang C.Z., Fong W.P., Ng T.B., *Apoptosis*, **17**, 377-387 (2012).
22. Cho S., Beintema J.J., Zhang J., *Genomics*, **85**, 208-220 (2005).
23. Okabe Y., Katayama N., Iwama M., Watanabe H., Ohgi K., Irie M., Nitta K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Oyama F., Titani K., Abe Y., Okazaki T., Inokuchi N., Koyama T., *J. Biochem.*, **109**, 786-790 (1991).
24. Nitta K., Ozaki K., Tsukamoto Y., Hosono M., Ogawa-konno Y., Kawauchi H., Takayanagi Y., Tsuiki S., Hakomori S., *Int. J. Oncol.*, **9**, 19-23 (1996).
25. Nitta K., *Methods Enzymol.*, **341**, 368-374 (2001).
26. Benito A., Ribo M., Vilanova M., *Mol. Biosyst.*, **1**, 294-302 (2005).
27. Nitta K., Ozaki K., Ishikawa M., Furusawa S., Hosono M., Kawauchi H., Sasaki K., Takayanagi Y., Tsuiki S., Hakomori S., *Cancer Res.*, **54**, 920-927 (1994).
28. Goodman L.S., Wintrobe M.M., Dameshek W., Goodman M. J., Gilman M. A., McLennan M. T., *J. Am. Med. Assoc.*, **132**, 126-132 (1946).
29. Joensuu H., *Lancet Oncol.*, **9**, 304 (2008).
30. Buchdunger E., Matter A., Druker B.J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1551**, M11-18 (2001).
31. Plosker G.L., Figgitt D.P., *Drugs*, **63**, 803-843 (2003).
32. Costanzi J., Sidransky D., Navon A., Goldsweig H., *Cancer Invest.*, **23**, 643-650 (2005).
33. D'Alessio G., *Trends Cell Biol.*, **3**, 106-109 (1993).
34. Raines R.T., *Chem. Rev.*, **98**, 1045-1066 (1998).
35. Rybak S.M., Pearson J.W., Fogler W.E., Volker K., Spence S.E., Newton D.L., Mikulski S.M., Ardelt W., Riggs C.W., Kung H.F., Longo D.L., *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 747-753 (1996).
36. Kim D.H., Kim E.J., Kalota A., Gewirtz A.M., Glickson J., Shogen K., Lee I., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **599**, 53-59 (2007).
37. Ita M., Halicka H.D., Tanaka T., Kurose A., Ardelt B., Shogen K., Darzynkiewicz Z., *Cancer Biol. Ther.*, **7**, 1104-1108 (2008).
38. Halicka H.D., Murakami T., Papageorgio C.N., Mittelman A., Mikulski S.M., Shogen K., Darzynkiewicz Z., *Cell Prolif.*, **33**, 407-417 (2000).

39. Tsai S.Y., Hsieh T.C., Ardelt B., Darzynkiewicz Z., Wu J.M., *Int. J. Oncol.*, **20**, 891-896 (2002).
40. Mikulski S.M., Viera A., Darzynkiewicz Z., Shogen K., *Br. J. Cancer*, **66**, 304-310 (1992).
41. Rutkoski T.J., Kink J.A., Strong L.E., Schilling C.I., Raines R.T., *Bioconjug. Chem.*, **21**, 1691-1702 (2010).
42. Haigis M.C., Kurten E.L., Raines R.T., *Nucleic Acids Res.*, **31**, 1024-1032 (2003).
43. Ledoux L., Brachet J., *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 290 (1955).
44. Deptala A., Halicka H.D., Ardelt B., Ardelt W., Mikulski S.M., Shogen K., Darzynkiewicz Z., *Int. J. Oncol.*, **13**, 11-16 (1998).
45. Ardelt W., Ardelt B., Darzynkiewicz Z., *Eur. J. Pharmacol.*, **625**, 181-189 (2009).
46. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N., *Bioessays*, **30**, 781-790 (2008).
47. Nitta K., *Methods Mol. Biol.*, **160**, 363-373 (2001).
48. Liao Y.D., *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1371-1377 (1992).
49. Liao Y.D., Huang H.C., Leu Y.J., Wei C.W., Tang P.C., Wang S.C., *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4097-4104 (2000).
50. Tang C.H., Hu C.C., Wei C.W., Wang J.J., *FEBS. Lett.*, **579**, 265-270 (2005).
51. Mansouri A., Ridgway L.D., Korapati A.L., Zhang Q., Tian L., Wang Y., Siddik Z.H., Mills G.B., Claret F.X., *J. Biol. Chem.*, **278**, 19245-19256 (2003).
52. Liao Y.D., Huang H.C., Chan H.J., Kuo S.J., *Protein Expr. Purif.*, **7**, 194-202 (1996).
53. Hu C.C., Lee Y.H., Tang C.H., Cheng J.T., Wang J.J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 1229-1236 (2001).
54. Thomas H., Coley H.M., *Cancer Control.*, **10**, 159-165 (2003).
55. Ambudkar S.V., Dey S., Hrycyna C.A., Ramachandra M., Pastan I., Gottesman M.M., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 361-398 (1999).
56. Krishna R., Mayer L.D., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **11**, 265-283 (2000).
57. Stavrovskaya A.A., *Biochemistry (Mosc.)*, **65**, 95-106 (2000).
58. Ozben T., *FEBS. Lett.*, **580**, 2903-2909 (2006).
59. Castro J., Ribo M., Puig T., Colomer R., Vilanova M., Benito A., *Invest. New Drugs*, **30**, 880-888 (2012).
60. Elmore S., *Toxicol. Pathol.*, **35**, 495-516 (2007).
61. Grutter M.G., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 649-655 (2000).

62. Bunyard P., Handley M., Pollara G., Rutault K., Wood I., Chaudry M., Alderman C., Foreman J., Katz D.R., Chain B.M., *Mol. Immunol.*, **39**, 815-827 (2003).
63. He K., Zhou H.R., Pestka J.J., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **265**, 10-18 (2012).
64. Iordanov M.S., Wong J., Newton D.L., Rybak S.M., Bright R.K., Flavell R.A., Davis R.J., Magun B.E., *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, **4**, 122-128 (2000).
65. Fang E.F., Zhang C.Z., Zhang L., Fong W.P., Ng T.B., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**, 1351-1360 (2012).
66. Dasmahapatra G., Lembersky D., Kramer L., Fisher R.I., Friedberg J., Dent P., Grant S., *Blood*, **115**, 4478-4487 (2010).
67. Chen J., Rusnak M., Luedtke R.R., Sidhu A., *J. Biol. Chem.*, **279**, 39317-39330 (2004).
68. Wilhelm S.M., Carter C., Tang L., Wilkie D., McNabola A., Rong H., Chen C., Zhang X., Vincent P., McHugh M., Cao Y., Shujath J., Gawlak S., Eveleigh D., Rowley B., Liu L., Adnane L., Lynch M., Auclair D., Taylor I., Gedrich R., Voznesensky A., Riedl B., Post L.E., Bollag G., Trail P.A., *Cancer Res.*, **64**, 7099-7109 (2004).
69. Castro J., Ribo M., Navarro S., Nogues M.V., Vilanova M., Benito A., *BMC Cancer.*, **11**, 9 (2011).
70. Wolf B.B., Green D.R., *J. Biol. Chem.*, **274**, 20049-20052 (1999).
71. Kuwana T., Smith J.J., Muzio M., Dixit V., Newmeyer D.D., Kornbluth S., *J. Biol. Chem.*, **273**, 16589-16594 (1998).
72. Li H., Zhu H., Xu C.J., Yuan J., *Cell*, **94**, 491-501 (1998).
73. Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X., *Cell*, **94**, 481-490 (1998).
74. Schendel S.L., Azimov R., Pawlowski K., Godzik A., Kagan B.L., Reed J.C., *J. Biol. Chem.*, **274**, 21932-21936 (1999).
75. Wei M.C., Zong W.X., Cheng E.H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A.J., Roth K.A., MacGregor G.R., Thompson C.B., Korsmeyer S.J., *Science*, **292**, 727-730 (2001).
76. Viswanath V., Wu Y., Boonplueang R., Chen S., Stevenson F.F., Yantiri F., Yang L., Beal M.F., Andersen J.K., *J. Neurosci.*, **21**, 9519-9528 (2001).
77. Muller M., Strand S., Hug H., Heinemann E.M., Walczak H., Hofmann W.J., Stremmel W., Krammer P.H., Galle P.R., *J. Clin. Invest.*, **99**, 403-413 (1997).

78. Fulda S., Sieverts H., Friesen C., Herr I., Debatin K.M., *Cancer Res.*, **57**, 3823-3829 (1997).
79. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R., *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257 (1972).
80. Arends M.J., Donaldson Y.K., Duvall E., Wyllie A.H., Bird C.C., *J. Pathol.*, **165**, 301-309 (1991).
81. Ashkenazi A., Dixit V.M., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 255-260 (1999).
82. Ashkenazi A., Dixit V.M., *Science*, **281**, 1305-1308 (1998).
83. Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., Wang X., *Cell*, **90**, 405-413 (1997).
84. Green D.R., *Cell*, **94**, 695-698 (1998).
85. van Huizen R., Martindale J.L., Gorospe M., Holbrook N.J., *J. Biol. Chem.*, **278**, 15558-15564 (2003).
86. Martinez I.M., Chrispeels M.J., *Plant Cell*, **15**, 561-576 (2003).
87. Pakula T.M., Laxell M., Huuskonen A., Uusitalo J., Saloheimo M., Penttila M., *J. Biol. Chem.*, **278**, 45011-45020 (2003).
88. Harding H.P., Zhang Y., Ron D., *Nature*, **397**, 271-274 (1999).
89. Kadowaki H., Nishitoh H., Ichijo H., *J. Chem. Neuroanat.*, **28**, 93-100 (2004).
90. Csordas G., Thomas A.P., Hajnoczky G., *EMBO J.*, **18**, 96-108 (1999).
91. Tabas I., Ron D., *Nat. Cell Biol.*, **13**, 184-190 (2011).
92. Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Xu J., Yankner B.A., Yuan J., *Nature*, **403**, 98-103 (2000).
93. Imai Y., Soda M., Inoue H., Hattori N., Mizuno Y., Takahashi R., *Cell*, **105**, 891-902 (2001).
94. Araki E., Oyadomari S., Mori M., *Intern. Med.*, **42**, 7-14 (2003).
95. Nawrocki S.T., Carew J.S., Dunner K. Jr, Boise L.H., Chiao P.J., Huang P., Abbruzzese J.L., McConkey D.J., *Cancer Res.*, **65**, 11510-11519 (2005).
96. Gills J.J., Lopiccolo J., Tsurutani J., Shoemaker R.H., Best C.J., Abu-Asab M.S., Borojerdi J., Warfel N.A., Gardner E.R., Danish M., Hollander M.C., Kawabata S., Tsokos M., Figg W.D., Steeg P.S., Dennis P.A., *Clin. Cancer Res.*, **13**, 5183-5194 (2007).
97. Gallerne C., Prola A., Lemaire C., *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 1356-1366 (2013).
98. Nakamura M., Gotoh T., Okuno Y., Tatetsu H., Sonoki T., Uneda S., Mori M., Mitsuya H., Hata H., *Leuk. Lymphoma*, **47**, 531-539 (2006).

99. Travers K.J., Patil C.K., Wodicka L., Lockhart D.J., Weissman J.S., Walter, P., *Cell*, **101**, 249-258 (2000).
100. Shen X., Ellis R.E., Sakaki K., Kaufman R.J., *PLoS Genet.*, **1**, e37 (2005).
101. Yoshida H., Matsui T., Hosokawa N., Kaufman R.J., Nagata K., Mori K., *Dev. Cell*, **4**, 265-271 (2003).
102. Harding H.P., Zhang Y., Bertolotti A., Zeng H., Ron D., *Mol. Cell*, **5**, 897-904 (2000).
103. Scheuner D., Song B., McEwen E., Liu C., Laybutt R., Gillespie P., Saunders T., Bonner-Weir S., Kaufman R.J., *Mol Cell.*, **7**, 1165-1176 (2001).
104. Ma Y., Brewer J.W., Diehl J.A., Hendershot L.M., *J. Mol. Biol.*, **318**, 1351-1365 (2002).
105. Oyadomari S., Mori M., *Cell Death Differ.*, **11**, 381-389 (2004).
106. Hitomi J., Katayama T., Eguchi Y., Kudo T., Taniguchi M., Koyama Y., Manabe T., Yamagishi S., Bando Y., Imaizumi K., Tsujimoto Y., Tohyama M., *J. Cell Biol.*, **165**, 347-356 (2004).
107. Rudy A., Lopez-Anton N., Dirsch V.M., Vollmar A.M., *J. Nat. Prod.*, **71**, 482-486 (2008).
108. Jiang C.C., Chen L.H., Gillespie S., Wang Y.F., Kiejda K.A., Zhang X.D., Hersey P., *Cancer Res.*, **67**, 9750-9761 (2007).
109. Zong W.X., Li C., Hatzivassiliou G., Lindsten T., Yu Q.C., Yuan J., Thompson C.B., *J. Cell Biol.*, **162**, 59-69 (2003).
110. Hung J.H., Su I.J., Lei H.Y., Wang H.C., Lin W.C., Chang W.T., Huang W., Chang W.C., Chang Y.S., Chen C.C., Lai M.D., *J. Biol. Chem.*, **279**, 46384-46392 (2004).
111. Mutsaers S.E., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 9-16 (2004).
112. Peto J., Hodgson J.T., Matthews F.E., Jones J.R., *Lancet*, **345**, 535-539 (1995).
113. Robinson B.W., Musk A.W., Lake R.A., *Lancet*, **366**, 397-408 (2005).
114. Gemba K., Fujimoto N., Kato K., Aoe K., Takeshima Y., Inai K., Kishimoto T., *Cancer Sci.*, **103**, 483-490 (2012).
115. Murayama T., Takahashi K., Natori Y., Kurumatani N., *Am. J. Ind. Med.*, **49**, 1-7 (2006).
116. Sugarbaker D.J., Norberto J.J., *Chest*, **113**, 61S-65S (1998).

117. Ceresoli G.L., Locati L.D., Ferreri A.J., Cozzarini C., Passoni P., Melloni G., Zannini P., Bolognesi A., Villa E., *Lung Cancer*, **34**, 279-287 (2001).
118. Kikovska E., Svard S.G., Kirsebom L.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 2062-2067 (2007).
119. Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J., *Nature*, **409**, 363-366 (2001).
120. Anfinsen C.B., *Science*, **181**, 223-230 (1973).
121. Privalov P.L., *Adv. Protein Chem.*, **33**, 167-241 (1979).
122. Ledoux L., Baltus E., *Experientia*, **10**, 500-501 (1954).
123. Ledoux L., *Nature*, **175**, 258-259 (1955).
124. Darzynkiewicz Z., Carter S.P., Mikulski S.M., Ardelt W.J., Shogen K., *Cell Tissue Kinet.*, **21**, 169-182 (1988).
125. Porta C., Paglino C., Mutti L., *Biologics*, **2**, 601-609 (2008).
126. Zhao L., Wientjes M.G., Au J.L., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 7994-8004 (2004).
127. Gordon G.J., Mani M., Maulik G., Mukhopadhyay L., Yeap B.Y., Kindler H.L., Salgia R., Sugarbaker D.J., Bueno R., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **61**, 549-558 (2008).
128. Broaddus V.C., Dansen T.B., Abayasiriwardana K.S., Wilson S.M., Finch A.J., Swigart L.B., Hunt A.E., Evan G.I., *J. Biol. Chem.*, **280**, 12486-12493 (2005).
129. Koschny R., Ganten T.M., Sykora J., Haas T.L., Sprick M.R., Kolb A., Stremmel W., Walczak H., *Hepatology*, **45**, 649-658 (2007).
130. Liu X., Yue P., Chen S., Hu L., Lonial S., Khuri F.R., Sun S.Y., *Cancer Res.*, **67**, 4981-4988 (2007).
131. Liu W., Bodle E., Chen J.Y., Gao M., Rosen G.D., Broaddus V.C., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **25**, 111-118 (2001).
132. Abayasiriwardana K.S., Barbone D., Kim K.U., Vivo C., Lee K.K., Dansen T.B., Hunt A.E., Evan G.I., Broaddus V.C., *Mol. Cancer Ther.*, **6**, 2766-2776 (2007).
133. Belyanskaya L.L., Marti T.M., Hopkins-Donaldson S., Kurtz S., Felley-Bosco E., Stahel R.A., *Mol. Cancer*, **6**, 66 (2007).
134. Tomasetti M., Andera L., Alleva R., Borghi B., Neuzil J., Procopio A., *FEBS Lett.*, **580**, 1925-1931 (2006).
135. Nagata S., *Cell*, **88**, 355-365 (1997).

136. Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., Peter M.E., *EMBO J.*, **17**, 1675-1687 (1998).
137. Enari M., Talanian R.V., Wong W.W., Nagata S., *Nature*, **380**, 723-726 (1996).
138. Hasegawa J., Kamada S., Kamiike W., Shimizu S., Imazu T., Matsuda H., Tsujimoto Y., *Cancer Res.*, **56**, 1713-1718 (1996).
139. Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Litwack G., Alnemri E.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 14486-14491 (1996).
140. Takahashi A., Hirata H., Yonehara S., Imai Y., Lee K.K., Moyer R.W., Turner P.C., Mesner P.W., Okazaki T., Sawai H., Kishi S., Yamamoto K., Okuma M., Sasada M., *Oncogene*, **14**, 2741-2752 (1997).
141. Nikrad M., Johnson T., Puthalalath H., Coultas L., Adams J., Kraft A.S., *Mol. Cancer Ther.*, **4**, 443-449 (2005).
142. Snoeckx L.H., Cornelussen R.N., Van Nieuwenhoven F.A., Reneman R.S., Van Der Vusse G.J., *Physiol. Rev.*, **81**, 1461-1497 (2001).
143. Mosser D.D., Caron A.W., Bourget L., Denis-Larose C., Massie B., *Mol. Cell Biol.*, **17**, 5317-5327 (1997).
144. Beere H.M., Wolf B.B., Cain K., Mosser D.D., Mahboubi A., Kuwana T., Tailor P., Morimoto R.I., Cohen G.M., Green D.R., *Nat. Cell Biol.*, **2**, 469-475 (2000).
145. Liossis S.N., Ding X.Z., Kiang J.G., Tsokos G.C., *J. Immunol.*, **158**, 5668-5675 (1997).
146. Welch W.J., *Physiol. Rev.*, **72**, 1063-1081 (1992).
147. Bausero M.A., Page D.T., Osinaga E., Asea A., *Tumour Biol.*, **25**, 243-251 (2004).
148. Calderwood S.K., Mambula S.S., Gray P.J. Jr, Theriault J.R., *FEBS Lett.*, **581**, 3689-3694 (2007).
149. Sugawara S., Kawano T., Omoto T., Hosono M., Tatsuta T., Nitta K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 101-109 (2009).
150. Chen S., Bawa D., Besshoh S., Gurd J.W., Brown I.R., *J. Neurosci. Res.*, **81**, 522-529 (2005).
151. Hosokawa N., Hirayoshi K., Kudo H., Takechi H., Aoike A., Kawai K., Nagata K., *Mol. Cell Biol.*, **12**, 3490-3498 (1992).
152. Broquet A.H., Thomas G., Masliah J., Trugnan G., Bachelet M., *J. Biol. Chem.*, **278**, 21601-21606 (2003).

153. Cho H.S., Shimazu T., Toyokawa G., Daigo Y., Maehara Y., Hayami S., Ito A., Masuda K., Ikawa N., Field H.I., Tsuchiya E., Ohnuma S., Ponder B.A., Yoshida M., Nakamura Y., Hamamoto R., *Nat. Commun.*, **3**, 1072 (2012).
154. Kazemi Z., Chang H., Haserodt S., McKen C., Zachara N.E., *J. Biol. Chem.*, **285**, 39096-39107 (2010).
155. Asea A., Kraeft S.K., Kurt-Jones E.A., Stevenson M.A., Chen L.B., Finberg R.W., Koo G.C., Calderwood S.K., *Nat. Med.*, **6**, 435-442 (2000).
156. Ashkenazi A., *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 420-430 (2002).
157. Becker T., Hartl F.U., Wieland F., *J. Cell Biol.*, **158**, 1277-1285 (2002).
158. Guerrero C.A., Moreno L.P., *Acta Virol.*, **56**, 63-70 (2012).
159. Narimatsu H., Sawaki H., Kuno A., Kaji H., Ito H., Ikehara Y., *FEBS J.*, **277**, 95-105 (2010).
160. Matsuda A., Kuno A., Matsuzaki H., Kawamoto T., Shikanai T., Nakanuma Y., Yamamoto M., Ohkohchi N., Ikehara Y., Shoda J., Hirabayashi J., Narimatsu H., *J. Proteomics*, **85**, 1-11 (2013).
161. Chen Y., Hu D., Yabe R., Tateno H., Qin S.Y., Matsumoto N., Hirabayashi J., Yamamoto K., *Mol. Biol. Cell*, **22**, 3559-3570 (2011).
162. Liu B., Min M.W., Bao J.K., *Autophagy*, **5**, 432-433 (2009).
163. Fu L.L., Zhao X., Xu H.L., Wen X., Wang S.Y., Liu B., Bao J.K., Wei Y.Q., *Cell Prolif.*, **45**, 477-485 (2012).
164. Miyagi T., Wada T., Yamaguchi K., Shiozaki K., Sato I., Kakugawa Y., Yamanami H., Fujiya T., *Proteomics*, **8**, 3303-3311 (2008).
165. Dennis J.W., Granovsky M., Warren C.E., *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 21-34 (1999).
166. Hakomori S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 10231-10233 (2002).
167. Wang F.L., Cui S.X., Sun L.P., Qu X.J., Xie Y.Y., Zhou L., Mu Y.L., Tang W., Wang Y.S., *Cancer Detect. Prev.*, **32**, 437-443 (2009).
168. Ochoa-Alvarez J.A., Krishnan H., Shen Y., Acharya N.K., Han M., McNulty D.E., Hasegawa H., Hyodo T., Senga T., Geng J.G., Kosciuk M., Shin S.S., Goydos J.S., Temiakov D., Nagele R.G., Goldberg G.S., *PLoS. One*, **7**, e41845 (2012).
169. Makarov A.A., Ilinskaya O.N., *FEBS Lett.*, **540**, 15-20 (2003).
170. Bracale A., Spalletti-Cernia D., Mastronicola M., Castaldi F., Mannucci R., Nitsch L., D'Alessio G., *Biochem. J.*, **362**, 553-560 (2002).

171. Zhang R.Y., Zhang G.Q., Hu D.D., Wang H.X., Ng T.B., *Biochem. Genet.*, **48**, 658-668 (2010).
172. Singh U.P., Ardelt W., Saxena S.K., Holloway D.E., Vidunas E., Lee H.S., Saxena A., Shogen K., Acharya K.R., *J. Mol. Biol.*, **371**, 93-111 (2007).
173. Chang C.H., Sapra P., Vanama S.S., Hansen H.J., Horak I.D., Goldenberg D.M., *Blood*, **106**, 4308-4314 (2005).
174. Glinka E.M., Edelweiss E.F., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M., *Gene*, **366**, 97-103 (2006).
175. Bosch M., Benito A., Ribo M., Puig T., Beaumelle B., Vilanova M., *Biochemistry*, **43**, 2167-2177 (2004).
176. Zhao H.L., Xue C., Du J.L., Ren M., Xia S., Cheng Y.G., Liu Z.M., *J. Control Release*, **159**, 346-352 (2012).