#### 小児がん血液疾患における細胞死

(文責 小児科 足立 壯一)

1. はじめに

癌治療において細胞死の機序を解明することは、新規治療法の開発や耐性化の 克服などの治療成績の向上や、副作用の軽減など、患者治療に直結する重要な 研究である。In vitro の培養系における各種白血病や癌細胞株の研究から細胞 死の1つであるアポトーシスについては、機序の解明が進んでいる。しかしな がら、生体内での細胞死の機序は不明のことが多く、また固形腫瘍における細 胞死では、近年、アポトーシス以外の細胞死が注目されている。本稿ではアポ トーシス、非アポトーシスの細胞死について解説し、我々の研究室で行ってい る癌細胞の細胞死の機序の検討の一部も紹介する。

2. アポトーシスについて

1972年にKerrらが、能動的でプログラムされた細胞死として提唱したアポ トーシスは、細胞サイズの縮小やクロマチンの凝縮、核の断片化などの特徴を 示す。1992年に cystein protease の一種である caspase 1が発見されて以 来、現在13種類の caspase が同定され、アポトーシスを誘導する刺激により、 最初に活性化される initiator caspase (caspase2. 8. 9. 10)と、その下流で 活性化される effector caspase (caspase3, 6, 7)などの caspase が証明され、 アポトーシスの機序の解明が進んだ。図1に示すようにアポトーシスの機序と して、2つのカスパーゼ依存性の経路が考えられている。1つは TNF receptor や Fas receptor, TRAIL receptor と結合して caspase 8 が活性化される extrinsic pathway で、活性化された caspase 8 が caspase 3 を活性化して DNA の断片化を起こす。もう1つは、抗癌剤や放射線照射などの DNA 障害に引き続 いて、ミトコンドリアに機能障害を引き起こす系である。ミトコンドリアから チトクローム c が放出され、caspase 9 を活性化し、活性化された caspase 9 と チトクローム c、Apaf-1 が複合体(apoptosome)を形成して下流の caspase 3 を 活性化する。一方、図1に示すように、カスパーゼ非依存性の経路も多く報告 され、ミトコンドリアの外膜と内膜に存在する蛋白が関与している。Kroemer ら が1996年に発見したアポトーシスの際にミトコンドリアから核へ転移する AIFを始め、Omi/Htra2, Endonuclease Gが、カスパーゼ非依存性細胞死におい て報告されている。従来から、種々の抗癌剤を in vitro の培養系に投与した際 にアポトーシスにて細胞死をきたす、数多くの論文が発表されている。その1 例として、近年、我々の研究室の今井が報告したヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)阻害剤の骨肉腫細胞株に対する in vito 及び in vivo のアポトーシス誘 導機序を紹介する。<sup>1)</sup>

骨肉腫は、思春期以後に好発する腫瘍で初診時に転移のある症例の予後は不良 である。また癌抑制遺伝子である p53 や RB の変異が多く報告されており、これ らの遺伝子変異と細胞死の関係を研究するのに適した腫瘍である。近年、急性 前骨髄性白血病の融合遺伝子 PML/RARαを標的遺伝子とした抗腫瘍効果が報告 された HDAC 阻害剤は他の癌種に対しても、有望な薬剤である。図2に示すよう に、我々は HDAC 阻害剤の1種である FR901228 (depsipeptide)が各種骨肉腫細 胞株に対して、p53 及び RB の変異の有無にかかわらず、in vitro において非常 に低濃度 (IC50 で nM レベル)で細胞死を誘導することを見出した。In vitro に おいてヒストンのアセチル化(H3.H4)は細胞死が誘導される時間(24時間) 後)より、早期の1時間後から見られ、DNAの断片化 (sub GI 分画)が時間依存 性に増加し、アポトーシスであることが証明された。(図3) FR 投与により、骨 肉腫細胞株に Fas ligand の発現が mRNA レベル、蛋白レベルで共に誘導され(図) 4)、caspase 8 の活性化(40/36KD の band の出現)に引き続いて caspase 3 の 活性化(17KD の band の出現)が見られた(図5)。Fas の経路が細胞死に密接 に関わっていることは、抗 FasL 中和抗体(図 6 a)や、FADD-DN や vFLIP(Fas 経路の下流に関与する分子)の発現(図6b)によりアポトーシスが減少するこ とからも示された。同時に重要なことは、in vivo においても FR のアポトーシ ス誘導及び抗腫瘍効果を証明できたことである。2種類の骨肉腫細胞株(OST, Takao)を BALB/c ヌードマウスに皮下移植して腫瘍形成した系において、FR は 濃度依存性に抗腫瘍効果を示し (図7a)、TUNEL 染色陽性のアポトーシス細胞を 誘導した(図7b)。

3. 非アポトーシスについて

A) ネクローシス

近年、表1に示すように、癌治療におけるアポトーシス以外の細胞死の機序が 注目されており、 特に固形腫瘍の治療における生体内の細胞死は非アポトーシ

スの機序がより重要ではないかと考えられてきている。我々の研究室の岡田は、 BCR-ABL 陽性ヒト白血病細胞株に対して、広域カスパーゼ阻害剤 zVAD を用いて イマチニブ(STI571)の細胞死誘導機序を解析したところ、以下の興味ある現 象が観察された。<sup>2)</sup> In vitro において、イマチニブを投与すると、核の断片化 を示す典型的なアポトーシス細胞が観察されたが、zVAD を併用した時には、ア ポトーシス細胞が観察されず、細胞全体が縮小し、核が濃縮された細胞が光学 顕微鏡下で見られた。(図8)この現象を電子顕微鏡下で、経時的に検討したと ころ、イマチニブ単独投与時は典型的なアポトーシス細胞から、ネクローシス 細胞への変遷が見られた(図9、上段)のに対し、zVAD 併用時は、核のクロマ チンが凝集し、細胞質に空泡がみられる細胞が、典型的なネクローシス細胞へ 変化する現象が観察された。(図9、下段)当時は下段中央の細胞に対する詳細 な検討をしていないが、空泡の内部にオルガネラが見られており、後述する autophagic cellの可能性がある。イマチニブ投与時にアポトーシスが誘導され ることを生化学的に検証したのが図10である。イマチニブ投与3時間後から DNA fragmentation (図10a)と sub G1 分画細胞の増加 (図10b) が見られ、 zVAD 併用により、DNA fragmentation と sub G1 分画細胞の増加のいずれも抑 制された。また、カスパーゼ3、8の活性はもちろん zVAD によって抑制されて おり、カスパーゼ非依存性の細胞死であることが示された。このイマチニブと zVAD 併用時の新しい細胞死の機序を詳細に検討したのが、図11-図15である。 まずミトコンドリアの膜電位を PI/DiOC6 の二重染色でフローサイトメトリーに て解析した。DiOC6 陰性、PI 陰性分画がアポトーシス細胞の特徴とされている が、ネクローシスをきたすイマチニブと zVAD 併用時にも、DiOC6 陰性、PI 陰性 分画が観察され、ミトコンドリア膜電位の低下が証明された。(図11)図12 に示すように、ミトコンドリアから放出される様々な因子により、細胞死が誘 導されることが証明されている。我々のカスパーゼ非依存性の系においても活 性酸素 (ROS) 産生能や AIF, チトクローム c 等を検討したが、図13のウェスタ ンブロッティング法に示すように、Omi/HtrA2のミトコンドリアから細胞質への 遊離のみが見られた。トリプシン様セリンプロテアーゼ活性阻害剤(TLCK, TPCK) を用いて Omi/HtrA2 の働きをブロックすると、細胞死(図14)及びミトコン ドリアの膜電位低下(図15)が効率的に抑制されることを観察した。以上の 現象のまとめを図16に示す。BCR-ABL 陽性白血病細胞がイマチニブにより細胞 死に至る経路は、ミトコンドリアの下流において、カスパーゼを介するアポト

ーシスと Omi/HtrA2 を介するネクローシスとに分岐することが示された。この ようなネクローシス細胞をきたすプログラムされた細胞死は他の薬剤にても誘 導される。我々の研究室の濱畑はカルシウムイオノフォアである A23187 が、T リンパ性白血病細胞株 CEM に対して、in vitro においてネクローシスを誘導し、 ミトコンドリアの Na/Ca exchanger であるクロナゼパムや CGP 投与によりネク ローシスが抑制されることを報告している。

B) senescence & mitotic catastrophe

腫瘍細胞株に対する抗癌剤や放射線照射によって誘導されたアポトーシスを、 Bcl-2 等で抑制しても、細胞が増殖してコロニーを形成するまでには至らない。 この時、癌細胞は senescence あるいは mitotic catastrophe となり、最終的に は死滅する。多剤耐性因子(MDR1)により、アポトーシス耐性とした Hela 細胞株 に放射線照射をした時の細胞死を検討したデータを図17に示す。

表1に示したように、senescenceの指標として SA-β-gal (C, F) を、mitotic catastrophe として micronuclei (B, E)を検討した。MDR1 陽性とするとアポト ーシスが抑制され(A)、mitotic catastrophe (B) と senescence (C) が誘導さ れるが、コロニー形成能は変化しなかった。(D) Senescence は元来は、培養細 胞が telomere の短縮により、細胞周期が停止して増殖しなくなる現象で、 telomeraseの活性によって抑制され、replicative senescence と定義されてい る。一方、DNA 損傷により、細胞周期が停止し、replicative senescence と同 様の形態を示しながら、telomere の短縮の見られない系が報告された。この系 はRas の変異によっても誘導され、accelerated senescence と定義されている。 いずれの senescence も細胞は大きく扁平化し、細胞内顆粒の増加、SA- $\beta$ -gal 染色陽性が指標となる。図18は SA- $\beta$ -gal 染色陽性を最初に報告した若年者 と老人の皮膚の所見である。また p53-p21-p16の経路の関与がノックアウトや、 アンチセンス RNA を用いた繊維芽細胞で報告されている。Doxurubicin や cisplatin 等の DNA 障害をきたす抗癌剤で、大腸癌細胞株 HCT116 等、種々の固 形腫瘍株へ senescence の誘導が報告されている。Senescence の誘導は in vitro のみならず、in vivo においても報告されている。一方 senescence となった細 胞は細胞分裂をしないものの、炎症性サイトカイン等の種々の蛋白を分泌する ことにより、近隣の細胞に影響を与え、肝細胞では発癌機構との関連も示唆さ れている。TGF  $\beta$  は p53 非依存性に p21 を活性化して、senescent 細胞を腫瘍化 することが報告されており、今後、抗癌剤による senescence への誘導を臨床応

用するためには、発癌や近隣細胞への副作用の機序の検討も重要と考えられる。 次に mitotic catastrophe であるが、細胞分裂の異常により染色体分離ができ ず、大きな細胞となり、nuclear envelope と micronuclei を特徴とする。放射 線照射や抗癌剤(etoposide, taxol, cisplatin 等)により、mitotic catastrophe が誘導される。癌細胞の多くは細胞周期の G1 期の checkpoint の破綻を来して いるため G1 期に停止せずに G2 期に進行する。そのため G2 期の checkpoint が 特にmitotic catastrophe の抑制に重要である。G2期を制御する ATM, ATR, Chk1, Chk2, p53 等の遺伝子をノックアウトや、G2 期の阻害薬(カフェイン、UCN-01, okadaic acid 等)により mitotic catastrophe が促進される。Mitosis checkpoint に関与する蛋白 Mad2 の欠損により、未熟な細胞分裂、染色体不分離が起こり、 異数倍数体ができる。紡錘体の checkpoint の活性化には kinetochore (動原体 ; 有糸分裂中期に紡錘糸が染色体に付着している小粒)にある BubR1 や Mad2 等の 蛋白の関与が報告されており、紡錘糸 checkpoint の異常により、紡錘体に働く 抗癌剤 taxol に耐性となる。佐谷らは近年、p53 欠損癌細胞において、抗癌剤や 放射線投与後に誘導される mitotic catastrophe を経時的に蛍光顕微鏡下にビ デオで観察し、細胞が死滅する前の precatastrophic phase を報告した。BubR1 や Mad2 を RNA 干渉法により、抑制すると catastrophic death も抑制されたこ とより、紡錘糸 checkpoint の障害は抗癌剤の耐性と関与すると考えられた。今 後、mitotic catastrophe の機序の研究は vincristine 等のビンカアルカノイド の抗癌剤治療において重要と思われる。

C) Autophagy

オートファジーとは元来は飢餓状態の時に、個体を守るために自己の細胞を貪 食することであり、細胞死とは無関係な現象であった。しかし、近年、種々の 抗癌剤や放射線照射後にオートファジーの誘導が報告され、一躍脚光を浴びつ つある。(表2)図19に示すようにオートファジーは以下の3種類に分類され ている。(1)マクロオートファジー;狭義のオートファジー。最も分解活性の 高い経路で、リソゾームによる非選択的な分解である。細胞質中にオルガネラ を取り込んだ 500m<sup>2</sup>um 程度の大きさで二重膜構造体の autophagosome が見ら れるのが特徴である。分解中のオルガネラを autolysosome と呼び、 autophagosomeとautolysosomeを合わせて autophagic vacuoleと言われる。(2) シャペロン介在性オートファジー: autophagosome を介さずにタンパク質が直接 リソゾーム膜を透過して内腔に輸送される。分解基質が細胞質のシャペロン

(hsc70)によって認識される選択的な分解である。(3) ミクロオートファジー: リソゾーム膜が嵌入して、細胞質の一部を取り込み分解するもので、酵母で観 察される。オートファジーの機序については酵母において研究が進み、数多く のAtg(以前はApgとも呼ばれた)が分離精製された。図20に示すごとく、アポ トーシスにおけるカスパーゼのように Atg のネットワークがアートファジーに 関与している。特に autophagosome の形成には Atg12-Atg5 結合が重要で、Atg5 が欠損すると autophagosome は形成されない。電子顕微鏡での形態を図21、 図22Aに示す。細胞質内に二重膜に包まれたオルガネラを内部に持つ autophagosome が見られており、図22Aでは内部にミトコンドリアを含んでい る。また LC3(Atg8 の mammalian homologue)の膜への移行(autophagosome へ移 行すると LC3-1 から LC3-11 に変換される)が見られることが、オートファジー には必須であり、生化学的なマーカーとなる。図22Bでは飢餓状態で誘導され たオートファジーが PI3K 阻害剤である 3-methyadenine (3-MA) によって抑制さ れていることを示している。最初にオートファジーと癌細胞の関係を報告した のは、乳癌細胞株 MCF7 でのオートファジーの誘導と in vivo における癌化に関 与する beclin1 (Atg6 の mammalian homologue) である。アポトーシスを促進する Bcl-2 ファミリー遺伝子である、Bax と Bak のダブルノックアウトマウスの MEF (繊維芽細胞)に 抗癌剤 VP16 を投与すると、アポトーシスは見られなかった が、オートファジーは誘導された。また、このオートファジーは前述の 3-MA に より抑制され、アポトーシス抑制 Bcl-2 ファミリー遺伝子の Bcl-2 や Bcl-X の高発現により促進された。一方、Bcl-2はBeclin1と結合することにより、 オートファジーを抑制することが、種々の癌細胞において in vitro 及び in vivo において報告され、オートファジーが癌細胞の細胞死を抑制するのか、促進す るのかも含めて未解決の問題は多い。我々の研究室の渡部は、rhabdoid 腫瘍株 に前述の HDAC 阻害剤である depsipeptide を投与し、in vitro、in vivo におい て共にオーとファジーを観察し、カスパーゼ非依存性細胞死への関与が報告さ れている AIF の核への移行が、このオートファジーに必須であるという非常に 興味深い現象を見出した(submitted)。

おわりに

癌細胞における細胞死の機序について解説した。臨床医にとっては、実際に、 抗癌剤治療を行った時に、人体内でどのようなメカニズムで癌細胞が死ぬのか、 京都がん研究会メールマガジン 第45号(2007年12月)

どのような機序で耐性化するのかが興味のあるところである。Imatinib を始め とする分子標的療法も盛んであるが、癌細胞における新しいシグナル伝達経路 が見つかれば、その経路を標的とする新規治療の開発にも結びつく可能性があ る。本稿を読まれた若い先生方が、将来の難治性小児血液、癌患者の将来の治 療に結びつく研究への情熱を持っていただける一助となれば幸いである。

文献(他の参考文献は図に記載しています)

1) Imai T, Adachi S, Nishijo K., et al. FR901228 induces tumor regression associated with induction of Fas ligand and activation of Fas signaling in human osteosarcoma cells. Oncogene 2003; 22: 9231-9242

2) Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. Nat Rev Cancer 2004; 4: 592-603

3) Hamahata K, Adachi S, Matsubara H, et al. Mitochondrial dysfunction is related to necrosis-like programmed cell death induced by A23187 in CEM cells. Eur J Pharmacol 2005; 516: 187-196

図1 アポトーシスの機序



Nat Med 2005; 11: 725-730

			FR901228
Cell lines	p53	Rb	<i>IC</i> <sub>50</sub> ( <i>nM</i> )
HOS	mt	wt	1.2
<b>U2OS</b>	wt	wt	2.3
Saos2	mt	mt	2.6
<b>MG63</b>	mt	wt	2.7
G292	mt	wt	2.9
OST	wt	wt	3.2
<b>OS690</b>	wt	mt	3.6
Takao	mt	mt	7.3

**2** FR901228 IC<sub>50</sub> and characteristics of human oseteosarcoma cell lines

### 図 3 FR901228 induces apoptosis and increases acetylation of histone H3 and H4 in human osteosarcoma cells





### ☑ 4 FR901228 up-regulates FasL expression



### ⊠ 5 FR901228 activates caspase-8 and caspase-3



### Ø 6 Requirement of Fas/FasL system for FR901228-induced apoptosis



### 図 7 FR901228 inhibits tumor growth in human osteosarcomas in vivo



Table1   Characteristics of different types of cell death						
	Type of cell death	Morphological changes			Biochemical features	Common detection methods
		Nucleus	Cell membrane	Cytoplasm		
	Apoptosis	Chromatin condensation; nuclear fragmentation; DNA laddering	Blebbing	Fragmentation (formation of apoptotic bodies)	Caspase-dependent	Electron microscopy; TUNEL staining; annexin staining; caspase-activity assays; DNA-fragmentation assays; detection of increased number of cells in subG1/G0; detection of changes in mitochondrial membrane potential
	Autophagy	Partial chromatin condensation; no DNA laddering	Blebbing	Increased number of autophagic vesicles	Caspase-independent; increased lysosomal activity	Electron microscopy; protein-degradation assays; assays for marker-protein translocation to autophagic membranes; MDC staining
	Mitotic catastrophe	Multiple micronuclei; nuclear fragmentation	-	-	Caspase-independent (at early stage) abnormal CDK1/cydin B activation	Electron microscopy; assays for mitotic markers (MPM2); TUNEL staining
	Necrosis	Clumping and random degradation of nuclear DNA	Swelling; rupture	Increased vacuolation; organelle degeneration; mitochondrial swelling	-	Electron microscopy; nuclear staining (usually negative); detection of inflammation and damage in surrounding tissues
	Senescence	Distinct heterochromatic structure (senescence- associated heterochromatic foci)	-	Flattening and increased granularity	SA-β-gal activity	Electron microscopy; SA-β-gal staining; growth-arrest assays; assays for increased p53, INK4A and ARF levels (usually increased); assays for RB phosphorylation (usually hypophosphorylated); assays for metalloproteinase activity (usually upregulated)

CDK1, cycline-dependent kinase 1; MDC, monodansylcadaverine; MPM2, mitotic phosphoprotein 2; SA-β-gal, senescence-associated β-galactosidase; RB, retinoblastoma protein.

Nat Rev Cancer 4:592-603, 2004

図8 Imatinib induces classical apoptosis, while zVAD+imatinib induces atypical cell death.



#### 図9 Atypical cell death exhibits necrotic morphology. original magnification, $3000 \times$











zVAD+ imatinib

imatinib



☑ 10 Internucleosomal DNA fragmentation and decrease in DNA content are not observed in zVAD+imatinib-induced atypical cell death. DNA ladder and cell cycle analysis



# $\boxtimes 11$ Mitochondrial transmembrane potential is lost in the early phase of necrosis.





TRENDS in Molecular Medicine Vol.8 No.5 May 2002

# ☑ 1 3 Omi/HtrA2 is the only candidate mediator of necrosis.Cell fractionation and western blotting



## $\boxtimes$ 14 Serine protease activity is required for the execution of necrosis.



## $\boxtimes$ 1 5 Serine protease activity is required for the execution of necrosis.







Cancer Res 2000; 60: 2576-2578

### **\square** 18 SA-β-gal in human skins



#### A;皮脂腺 B;エクリン腺 C,D; 若年者真皮、表皮 E, F; 老年者真皮 G,H; 老年者表皮

Proc Natl Acad Sci USA 92; 9363-9367, 1995

#### Therapies that induce autophagy in cancer cells

Treatment	Proposed target	Cancer type
Tamoxifen	Oestrogen receptor	Breast cancer
Temozolomide	DNA	Malignant glioma
γ-Irradiation	DNA	Breast cancer, prostate cancer, colon cancer, malignant glioma
Sodium butyrate and SAHA	HDAC	Cervical cancer that overexpresses BCL-X <sub>L</sub>
Hyperthermia	Unknown	Malignant glioma
Arsenic trioxide	Multiple targets (for example, mitochondria)	Malignant glioma
Resveratrol	Multiple targets (for example, oestrogen receptor and mitochondria)	Ovarian cancer
Soybean B-group triterpenoid saponins	Unknown	Colon cancer
Rapamycin	mTOR	Malignant glioma

HDAC, histone deacetylase; mTOR, mammalian target of rapamycin; SAHA, subercylanilide hydroxamic acid.

Nat Rev Cancer 2005; 5: 726-734

### 図19 Different proteolytic pathways



### 図 2 0 Atg genes are required for autophagic vacuole formation



Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6: 505-510

図 2 1 Double-membrane structures known as autophagosomes



Nat Rev Mol Biol 2005; 6: 439-448









Oncogene 2004; 23: 2891-2906