

細胞死（アポトーシス）のシグナル伝達機構と生体における役割

－アポトーシス実行因子カスパーゼ 8 を中心に－

酒 巻 和 弘

京都大学大学院生命科学研究所

細胞死（アポトーシス）は、高等生物の発生過程における形態形成・恒常性維持・免疫系を含めた生体防御・或いは老化などに深く関与しており、生体にとって必要不可欠な生命現象である。ヒトではアポトーシスの制御機構が異常になると、アポトーシスの促進化による免疫不全や神経変性疾患等が発症し、抑制化が起きると自己免疫疾患や癌等の重病を引き起こすことになる。このためアポトーシスの制御機構は、非常に精密且つ複雑に調節されている。アポトーシスの誘導には、サイトカイン・抗原・ウイルス・薬剤・放射線・活性酸素など多種多様な因子が関わっているのに対し、アポトーシスの実行段階では、カスパーゼと称する一連のシステイン-プロテアーゼが実行因子として中心的な役割を担っている。つまり、アポトーシスの誘導シグナルがカスパーゼ-カスケードに伝えられ、段階的にカスパーゼが活性化して種々の蛋白質を切断する。このプロテアーゼを介

する不可逆的な反応が細胞を死に導くのである。これまでに、哺乳類では 14 種類のカスパーゼが同定されているが、そのうちアポトーシスのシグナル伝達にはカスパーゼ 2・カスパーゼ 8・カスパーゼ 9・カスパーゼ 10 が initiator 分子として、その下流の effector 分子としてカスパーゼ 3・カスパーゼ 6・カスパーゼ 7 が関与することが明らかとなっている(1)。

サイトカンである TNF や Fas リガンドが細胞表面にあるそれぞれのレセプターに結合すると、アポトーシス誘導シグナルが細胞に伝わり、細胞は数時間後には消滅してしまう。カスパーゼ 8 は、これらレセプター（デスレセプターと総称）が活性化されて細胞内にアポトーシス誘導シグナルを伝えるために最初に関わる分子である。図 1 に示すように、アポトーシスの刺激が入ると、アダプター分子 FADD を介してカスパーゼ 8 はレセプターに結合し複合体を形成する。その中でカスパー

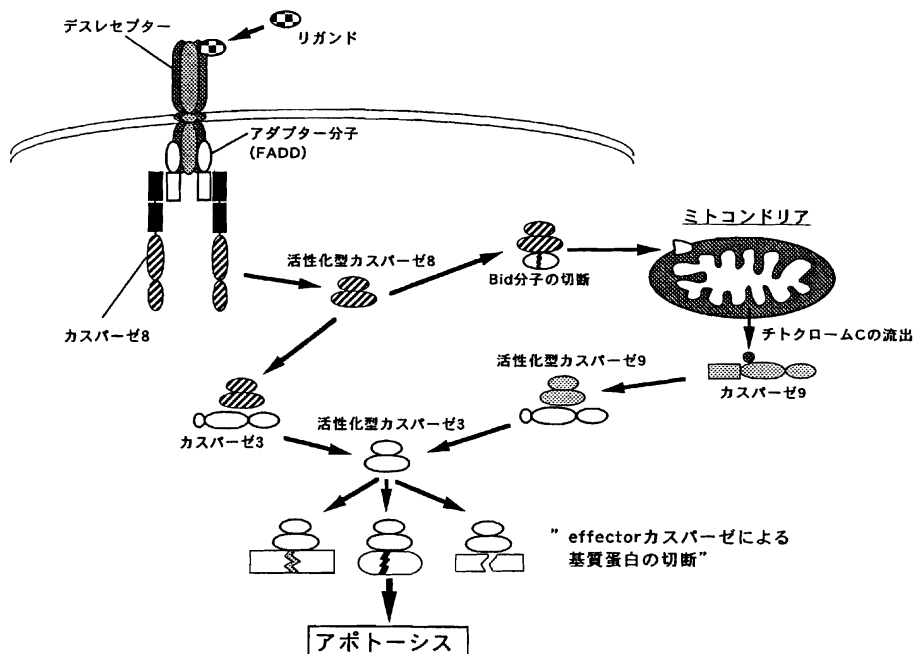


図 1 デスレセプターを介するアポトーシス誘導シグナル伝達経路の模式図

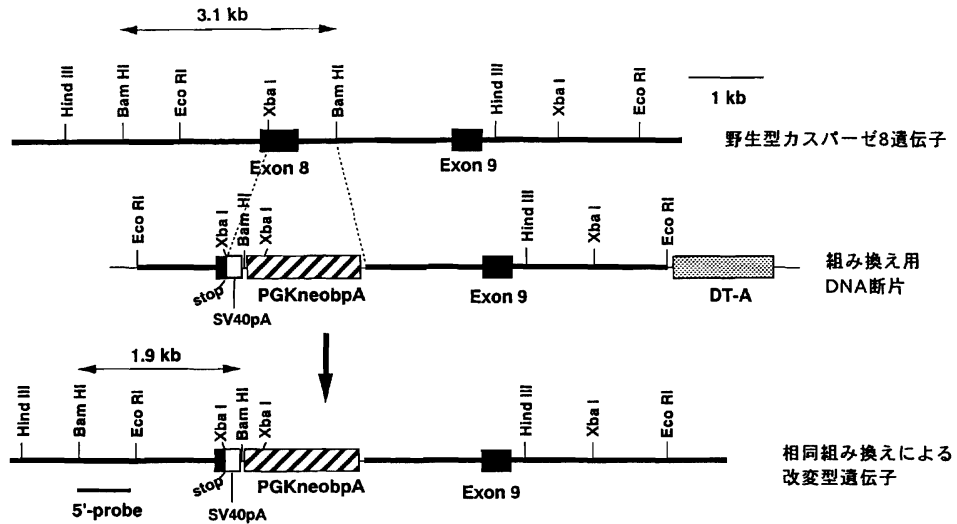


図2 相同組み換えによる ES 細胞への変異型カスパーゼ 8 遺伝子の導入 文献(3)を改変

表 1 カスパーゼ 8 遺伝子欠損ヘテロマウス同士の交配によって出来た個体の解析

	各接合型の個体数 (%)			ホモ接合型胚の 異常な個体数 (%)
	野生型(+/+)	ヘテロ(+/-)	ホモ(-/-)	
3-4 週齢仔マウス	22 (30)	51 (70)	0 (0)	
14.5-20 日胚	48 (36)	71 (53)	15 (11)	15/15 (100)
12.5 日目胚	18 (32)	31 (58)	6 (10)	6/6 (100)
11.5 日目胚	48 (27)	100 (60)	24 (13)	24/24 (100)
10.5 日目胚	72 (33)	87 (42)	54 (25)	3/54 (6)
9.5 日目胚	16 (34)	21 (46)	9 (20)	0/9 (0)
8.5 日目胚	6 (37)	8 (50)	2 (13)	0/2 (0)

文献 (3) より改変.

ゼ 8 は活性型に変換し細胞質へと移動する。そして、effector 分子であるカスパーゼ 3 やカスパーゼ 7 を切断し活性化する。またカスパーゼ 8 は、Bcl-2 ファミリーの一つである Bid を切断する。切断された Bid の断片がミトコンドリアに移行し、細胞質へのチトクローム C の流出を促し、ミトコンドリアを介したアポトーシスのシグナル伝達系を活性化する。直接カスパーゼ 8 により、或いはミトコンドリアを経由したシグナルにより活性化されたカスパーゼ 3 やカスパーゼ 7 は、転写因子・核蛋白・構造蛋白・酵素など 200 種類を超える基質蛋白質を切断する。その結果として、細胞が生きる能力を失うことになる。このようにカスパーゼ 8 は、レセプターを介したアポトーシス誘導シグナル伝達には必須な分子である(2)。

これまでの研究によりカスパーゼ 8 を介するアポトーシスのシグナル伝達経路は大筋で明らかに

なったものの、一方で生体における役割については不明な点が多い。そのため、我々はカスパーゼ 8 の遺伝子欠損マウスを作製し、カスパーゼ 8 が機能しなくなった場合に生体においてどのような影響が認められるか調べた(3)。カスパーゼ 8 の遺伝子欠損マウスの作製は、これまでに汎用されている発生工学的手法に従って行った。まず図2

に示す相同組み換えの方法で、染色体上のカスパーゼ 8 遺伝子対の一つが改変した ES (embryonic stem cell) 細胞株を樹立した。次に、この ES 細胞株を正常胚と混ぜて F0 世代となるキメラマウスを作出し、さらに野生型マウスと交配させて F1 の仔を産出した。仔マウスの中にカスパーゼ 8 遺伝子を欠損した個体の有無を PCR 法で調べ、変異マウスが含まれていることを確認した。変異マウスは遺伝子型がヘテロであるために、正常に生育した。そこで、さらにヘテロ変異マウス同士を交配させて、ホモ変異マウスを産出することを試みた。しかしながら、ホモ変異マウスは全く生まれてこなかった(表 1)。このことは、ホモ変異マウスが胚発生途中で死亡していると考えられた。我々は、発生段階の異なった胎児を妊娠マウスより摘出し、遺伝子型並びに形態を調べた。解析結果から、ホモ型変異胚は 10.5 日目までは正常に

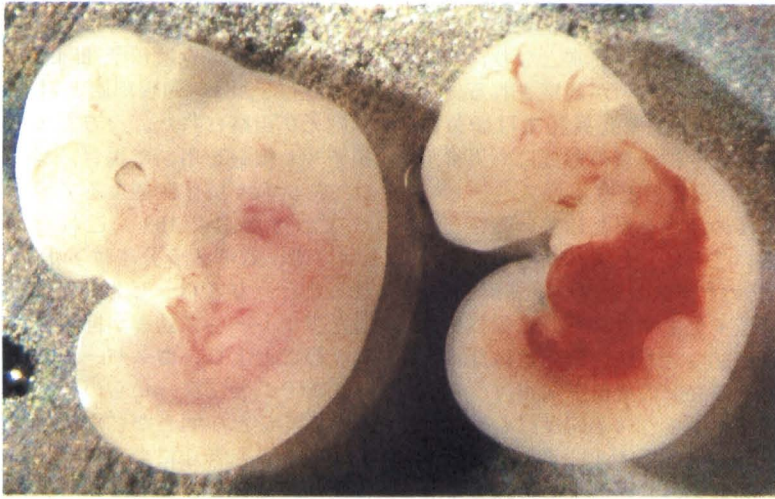


図3 発生 11.5 日目マウス胚の形態図
左：野生型、右：カスパーゼ 8 遺伝子欠損ホモ接合型

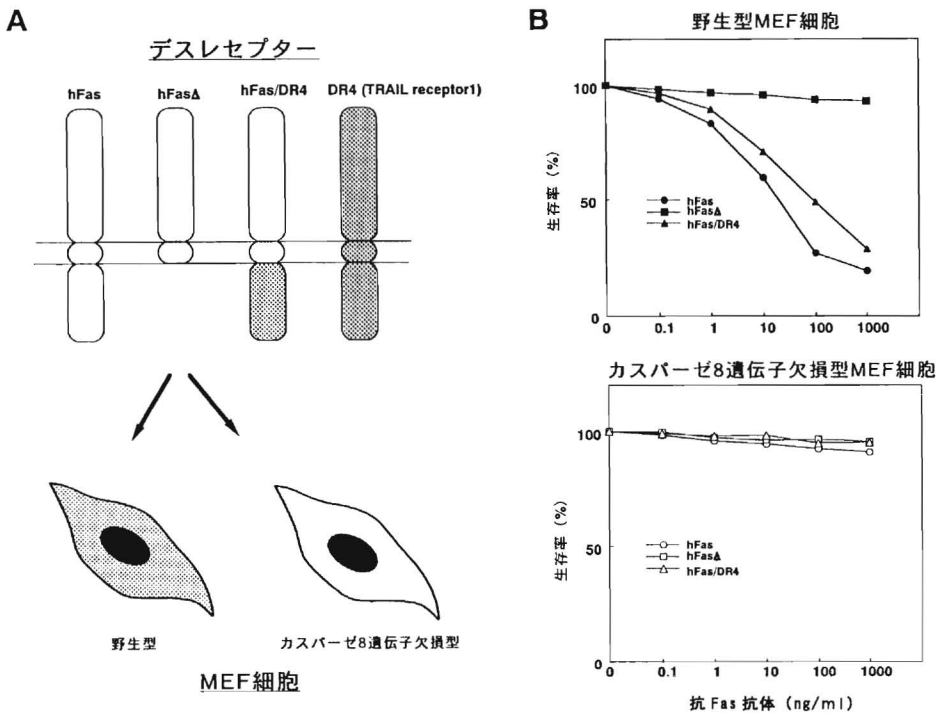


図4 デスレセプターを介するアポトーシス誘導にカスパーゼ 8 は必要である

発生するが、11.5 日目以降になると全ての個体において発生異常が認められた(表 1)。図 3 は、発生異常となった 11.5 日目のホモ型変異胚を示す。この変異胚は、心臓が発生異常となり、その結果心腔に血が溜まっているのが観察される。このような症状以外に、ホモ型変異胚では卵黄嚢(yolk sac)の血管形成や神経管の形成にも異常が認められた(3)。これらのことは、カスパーゼ 8 が胚発生期に何らかの役割を果たしていることを意味する。興味深いことに、カスパーゼ 8 と関わりのある Fas を含めたデスレセプター・Bid・カスパーゼ 3 の各遺伝子欠損マウスも既に作製されているが、いずれのマウスも胚性致死とはならず生まれてくる。唯一 FADD の遺伝子欠損マウスがカスパーゼ 8 遺伝子欠損マウスと同様に心臓に異常が生じ胚性致死となる。しかし、FADD 遺伝子欠損マウスでは、卵黄嚢の血管形成や神経管の形成に異常があるのか定かではない。このように我々の研究によりカスパーゼ 8 が胚発生に必要な分子であることが明らかとなったが、その生理的役割については残念ながら未だ明らかにできていない。

また我々がカスパーゼ 8 の研究を始めた時期に、カスパーゼ 8 が Fas だけでなく TNF レセプターや TRAIL レセプターなどの他のデスレセプターからのアポトーシス誘導シグナル伝達にも関わっているという報告がなされた。そこで我々は、デスレセプターのうち、何れのデスレセプターを介したアポトーシス誘導にカスパーゼ 8 が必須であるのか検証した。カスパーゼ 8 を欠損した細胞株が実験に必要であったので、我々はカスパーゼ 8 遺伝子を欠損した胚発生 10 日目のホモ胚と同腹の野生型胚よりそれぞれ繊維芽細胞(以後 MEF 細胞と略称)の単離を試み、樹立化に成功した。これらカスパーゼ 8 遺伝子欠損型 MEF 細胞と野生型 MEF 細胞の両細胞株に外からデスレセプターを導入し、レセプターを活性化することにより細胞にアポトーシスを誘導出来るか調べた(図 4)。今回導入遺伝子として用いたのは、ヒトの Fas 遺伝子(hFas)・細胞内領域を欠いた変異型のヒト Fas 遺伝子(hFas Δ)・DR4(別名 TRAIL レセプター-1)の細胞内領域と Fas の細胞外領域を有するキメラ遺伝子(hFas/DR4)の 3 種類である(図 4A)。いずれの遺伝子産物も細胞表面に発現すれば、アポトーシスを誘導できるアゴニスティックな抗 Fas 抗体と結合できる。両細胞株にそれぞれ 3 種類の遺伝子を導入し、様々な濃度の抗 Fas 抗体で細胞を刺激した後に生存率を調べた(図 4B)。野生型 MEF 細胞の場合、抗 Fas 抗体で処理すると hFas を発現している細胞では濃度依存的に細胞が死ぬようになる。しかし、hFas Δ を発現している細胞

は全く抗 Fas 抗体刺激に反応せずアポトーシスは起こらない。既に明らかなことではあるが、Fas によるアポトーシス誘導には細胞内領域を必要とする。またキメラ遺伝子 hFas/DR4 を発現している細胞は、hFas 発現細胞と同様に濃度依存的な細胞死が観察された。一方カスパーゼ 8 遺伝子欠損型 MEF 細胞を用いた場合、どの遺伝子を発現させても抗 Fas 抗体刺激によるアポトーシスは観察されなかった(図 4B)。これらの実験結果は、hFas/DR4 のキメラ分子はアポトーシスを誘導できること、カスパーゼ 8 を欠くと Fas や DR4 を介したアポトーシス誘導が抑制されることを示す。以上のことより、カスパーゼ 8 は Fas ばかりでなく TRAIL レセプターからのアポトーシス誘導にも関与することが明らかになった。その後同様な研究が他の研究者らによって行われ、カスパーゼ 8 は現在知られているデスレセプター全てにおいて、そのアポトーシス誘導のシグナル伝達に必須であることが証明されている(4)。

カスパーゼ 8 を活性化するアポトーシスのシグナル伝達経路は、必ずしもデスレセプターを介する経路だけではない。“anoikis”と言われる現象は、接着性の培養細胞が剥がれたままの状態となると、細胞死が起きる現象である。この anoikis にカスパーゼ 8 がアダプター分子 FADD と共に関与することが示されている(5)。このアポトーシスのシグナル伝達経路は、デスレセプターに非依存的であり、起因となる分子としてインテグリンが考えられている。またさらに、デスレセプターと FADD の両者に非依存的なカスパーゼ 8 活性化経路も最近見つけられた(6)。ハンチントン病は、ハンチンチン蛋白の構造変化が引き金となる神経変性疾患であり、神経細胞でアポトーシスが誘発される。このアポトーシス誘導シグナル伝達にカスパーゼ 8 が関与していることが証明された。ポリグルタミン化したハンチンチン蛋白に Hip-1 分子と Hipp1 分子が結合して複合体を形成するが、その中にカスパーゼ 8 が引き込まれ活性化するのである。

上述したようにカスパーゼ 8 が機能しないと、例え上流の因子が活性化されたとしても細胞死は起きない。生体防御機構として、細胞障害性免疫細胞が Fas/Fas リガンドの系を使って有害となった標的細胞を除去することが知られているが、標的細胞でカスパーゼ 8 が活性化しないとこの防御機構が全く機能しないことになる。ある種のがん細胞では Fas が発現しているにも拘わらず、細胞障害性免疫細胞の刺激に対し抵抗性を示す。これは、カスパーゼ 8 が標的細胞内で活性化されないためであると考えられた。それを裏付けるように、悪性の神経繊維芽細胞腫(neuroblastoma)など数

種類のがん細胞において、カスパーゼ 8 の発現抑制や遺伝子欠損が起きていることが最近明らかとなった(7)。これらのことは、カスパーゼ 8 ががん抑制因子として細胞内で働くことを強く示唆する。

またさらにカスパーゼ 8 は両生類のアフリカツメガエルや魚類のゼブラフィッシュにも存在する。我々は、両動物由来のカスパーゼ 8 をヒトの培養細胞に導入した実験により、両分子がアポトーシス誘導能を保持していることを確認した。このことは、カスパーゼ 8 が種を越えて魚類から哺乳類まで脊椎動物の間で構造とその機能が保存されていることを示す。興味深いことに、無脊椎動物の昆虫(ショウジョウバエ)にもカスパーゼ 8 に相当する遺伝子(Dredd)が見つまっているが、この遺伝子産物は細胞死ではなく自然免疫に関与することが報告されている(8)。

又、双子の片割れと称しても過言ではないカスパーゼ 10 は、カスパーゼ 8 と蛋白構造も酷似しており Fas や FADD との複合体形成時にもその中に含まれ活性化される(9)。それでは、カスパーゼ 10 とカスパーゼ 8 はお互いどのような役割分担を担っているのだろうか? 現段階ではそれに対する答を見出せないままである。加えて、ヒトにはカスパーゼ 10 とカスパーゼ 8 の両方が存在するのに対し、マウスではカスパーゼ 8 しかないのがゲノム構造より明らかとなっている。一方アフリカツメガエルでは、カスパーゼ 8 とカスパーゼ 10 の両方が同定されている。カスパーゼ 10 とカスパーゼ 8 の機能の違いを探る前に、このような種間によってカスパーゼ 10 の有無が認められるために、本当にカスパーゼ 10 は必要なのかという疑問が生じてくる。カスパーゼ 10 遺伝子に変異が生じると自己免疫疾患を発症するという報告があり、カスパーゼ 10 の特異的な役割が少なくともヒトには存在していると思われる。

今回、我々の研究成果や最近の知見をまとめ合わせると、カスパーゼ 8 が Fas などのデスレセプターを介するアポトーシス誘導に、anoikis に伴うアポトーシスに、そして神経変性疾患のハンチントン病で誘発されるアポトーシスに必要不可欠であることが判った。これまでに知られていた生理学的細胞死や病理学的細胞死の少なくとも一部は、カスパーゼ 8 が関与していたのである。しかし、胚発生におけるカスパーゼ 8 の役割については、直接アポトーシスと関係あるのか定かでない。これまでとは全く別なカスパーゼ 8 の役割が存在するのかもしれない。細胞死(アポトーシス)の研究は、この 10 年間で急速に発展してきた。その中でも特にカスパーゼと称するプロテアーゼが実行因子として同定されてからは、アポトーシスの

シグナル伝達経路が容易に理解できるようになった。このことにより、これまでお互い関連性があると考えも及ばなかった二つの疾患が、実は 1 種類のカスパーゼ分子が亢進的に活性化或いは逆に失活した場合に現れた症状であることも判ってきた。今後は、ストレスに伴うアポトーシスの作用機序の解明やアポトーシスが絡んだ疾患の原因究明や治療法確立など臨床応用的な研究へと広がって行くことが期待できる。また基礎的な研究として、発生の形態形成の際にみられるアポトーシスの制御機構の解明も今後残された課題であると思われる。

引用文献

1. Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-6 (1998).
2. Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 10964-7 (1999).
3. Sakamaki, K. et al. Ex vivo whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart. *Cell Death Differ* in press.
4. Chen, M. & Wang, J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* **7**, 313-9 (2002).
5. Frisch, S. M. Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis. *Curr Biol* **9**, 1047-9 (1999).
6. Gervais, F. G. et al. Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nat Cell Biol* **4**, 95-105 (2002).
7. Teitz, T. et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* **6**, 529-35 (2000).
8. Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R. S., Abrams, J. M. & Lemaitre, B. The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep* **1**, 353-8 (2000).
9. Wang, J., Chun, H. J., Wong, W., Spencer, D. M. & Lenardo, M. J. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 13884-8 (2001).