

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	北 沢 将 人
論文審査担当者	主 査 小 泉 知 展 副 査 塩 沢 丹 里 ・ 伊 藤 研 一
論 文 題 目	ASC Induces Apoptosis via Activation of Caspase-9 by Enhancing Gap Junction-Mediated Intercellular Communication (ASC はギャップジャンクションを介した細胞間相互作用によりカスパーゼ 9 を活性化し、アポトーシスを誘導する。)
(論文の内容の要旨)	<p>【背景と目的】 ASC (apoptosis-associated speck like protein containing a CARD) は Pyrin と相同な領域 PYD と CARD を有し、炎症とアポトーシスを制御することが知られている。多くの癌において、ASC の発現はメチル化により抑制されており、ASC は癌抑制因子と考えられている。本研究では癌の細胞間相互作用を介した増殖や細胞死に ASC がどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】 本研究には ASC の発現が欠失したヒト線維肉腫細胞株 HT1080 を用いた。HT1080 細胞に pcDNA3 ベクターと PMX-IRES-GFP ベクター (レトロウイルス) を用いてコントロールと ASC を遺伝子導入し、安定的遺伝子導入細胞を樹立した。また、pSINsi-hU6 と pSINsi-DK I ベクターを用いて p53、 p21 およびコネキシン 43 のノックダウンを行った。pcDNA3 で遺伝子を導入したコントロール細胞と ASC 導入細胞の増殖能はセルカウントとコロニーフォーメーションアッセイで評価した。また、同細胞をヌードマウスの皮下に移植し、12 日目に腫瘍を摘出し、腫瘍の大きさや重量を測定した。摘出した腫瘍組織は Tunnel 染色と Ki-67 染色を行った。一方、PMX-IRES-GFP ベクターで遺伝子導入されたコントロール細胞と ASC 導入細胞は AnnexinV+7-AAD で染色し、細胞死を評価した。また、細胞密度の高い状態と、低い状態で mRNA を抽出し、リアルタイム PCR で、IL-1β、XIAP の発現量を半定量した。次に遺伝子導入細胞 (GFP 陽性) と非遺伝子導入細胞を 1 : 1 に混ぜて、GFP の陽性率をフローサイトメーターで測定し、経時変化を解析した (Competitive assay)。Competitive assay は低細胞密度と高細胞密度の 2 つの条件で開始し、細胞密度による ASC の増殖抑制効果の差を評価した。汎カスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-fmk)、選択的カスパーゼ 1 阻害剤 (Z-YVAD-fmk)、カスパーゼ 9 阻害剤 (Z-LEHD-fmk)、ネクローシス阻害剤 (Necrostatin-1)、ギャップ結合阻害剤 (Carbenoxolone) を用いて、ASC が誘導する細胞死の種類やメカニズムを評価した。また、p53、21 をノックダウンした HT1080 細胞を用いて、同様の Competitive assay を行った。カスパーゼ 9 のプロセッシング (活性化) はウエスタンブロッティングで評価した。</p> <p>【結果】 ASC は HT1080 細胞の増殖を抑制した。特に ASC は細胞密度が高い環境で強力に細胞増殖を抑制したが、低い細胞密度ではその効果は低下した。この高い細胞密度環境での増殖抑制効果は汎カスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-fmk) で有意に減弱した。高い細胞密度環境において ASC の遺伝子導入によりアポトーシスが有意に増加することを AnnexinV+7-AAD 染色で確認した。また、高い細胞密度環境では ASC 導入細胞で NF-κB が転写制御している IL-1β と XIAP の mRNA 量が有意に低下していた。ASC の増殖抑制はカスパーゼ 1 阻害剤 (Z-YVAD-fmk) や p53、p21 のノックダウンでは変化を認めなかったが、カスパーゼ 9 阻害剤 (Z-LEHD-fmk) で有意に減弱した。また、ウエスタンブロッティングにて高い細胞密度環境で ASC がカスパーゼ 9 を活性化することが確認された。さらに、カスパーゼ 9 の活性化はギャップ結合阻害剤やギャップ結合を形成するコネキシン 43 のノックダウンにより抑制されることも明らかとなった。</p> <p>【結論】 高い細胞密度環境ではギャップ結合を介した細胞間相互作用により ASC がカスパーゼ 9 を活性化し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。ASC は NF-κB を抑制することにより、XIAP の発現量を低下させ、それがカスパーゼ 9 の活性化を誘導すると考えられた。ASC は細胞密度のような細胞間相互作用や環境を認識し、腫瘍細胞における細胞競合を担っている分子として新たな癌治療の標的分子となる可能性が示唆された。</p>