

がんと細胞死

今川 佑介
東山 繁樹

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター研究所 腫瘍増殖制御学部 主任研究員

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター研究所 腫瘍増殖制御学部 部長

国立大学法人 愛媛大学

プロテオサイエンスセンター 細胞増殖・腫瘍制御部門 教授
大学院医学系研究科 生化学・分子遺伝学分野 教授

はじめに

Hanahan と Weinberg が 2000 年 に Cell 誌に発表した総説「The Hallmarks of Cancer」の中で、がん化した細胞の特徴として「細胞増殖シグナルの自己充足」、「細胞増殖抑制シグナルに対する不応答」、「プログラム細胞死（アポトーシス）の回避」、「無限の複製能力」、「持続的な血管新生」、「組織への浸潤と転移」の6つが定義付けられている¹。私たちの体の中の老化した細胞や傷害を受けた細胞、不要な細胞は死んで除去されるように細胞自身にプログラムされている。しかし、この細胞が死ぬ仕組みに障害が起こると、異常な細胞が増えて「がん」になる。そこで、がんを排除するために、がん細胞に死を誘導することは非常に重要な戦略である。実際、抗がん剤の多くや放射線治療などは、がん細胞に死を誘導することを目的としている。しかし、既存の抗がん剤に対して抵抗性のあるがんも多く、この試みは現在までに完全には成功していない。さらに、抗がん剤が正常な細胞を傷害することによる副作用も大きな問題である。これらの原因の一つは、生体内で誘導される細胞死の制御メカニズムについての理解が不足していることにある。そこで我々は、生体内において細胞死を制御する仕組みを幅広く研究し、その知見を新たながん治療に応用することを目指している。本項では、がんと細胞死の関わりを概説し、我々がやっている生体内における細胞死の研究と、この研究成果を元にした新たながん治療へのアプローチについて紹介したい。

がんとアポトーシス

がん細胞は複数の機序によって細胞死を回避することが知られている。もっとも一般的にがん細胞で観察される変化は、がん抑制遺伝子 *TP53* の変異もしくは欠損である^{2,4}。*TP53* 遺伝子にコードされる p53 タンパク質は、DNA 損傷やがん遺伝子の活性化（発がん性ストレス）などのストレス条件下で活性化され、細胞ストレスセンサーとして機能する。正常な p53 は転写因子として働き、細胞周期の停止、アポトーシスの誘導、DNA 修復の促進や血管新生の抑制などの重要な細胞機能に関わっている⁵⁻¹⁰。多くの p53 標的遺伝子がアポトーシスの実行に関与していることと、野生型と変異型 p53 を用いた *in vitro* の実験において、抗がん剤や放射線照射によって活性化された p53 が標的遺伝子の転写調節領域に結合する能力とアポトーシスを誘導する能力が相関することから、がん抑制において p53 のアポトーシス誘導能は非常に重要であると考えられている^{5,6,8,11}。p53 の役割はアポトーシスの誘導だけでなく、広く細胞のがん化の抑制に関わっていることから、p53 をターゲットにした新たな抗がん剤の開発が精力的に行われている¹²。

また、B 細胞性リンパ腫において、t(14;18):(q32;q21) 転座によるアポトーシス抑制タンパク質 Bcl-2 の過剰発現と、それにより引き起こされるアポトーシスの抑制が観察されている^{13,14}。このことから、Bcl-2 も抗がん剤の新たな創薬ターゲットになっており、実際に、Bcl-2 阻害剤である Venetoclax が 2016

年に米国 FDA に承認され、現在、慢性リンパ性白血病、小リンパ球性リンパ腫、急性骨髄性白血病の治療薬として使用されている。

これ以外にも、アポトーシスをターゲットとしたがんの分子標的薬として、TRAIL などの細胞死受容体のアゴニストや、IAP の阻害剤などの開発が進められている（図 1 参照）。IAP の阻害剤については比較的開発が進んでおり期待が持てるが、細胞死受容体のアゴニストについては、*in vitro* の解析では良い成績が出るものの、生体内では奏功していない。

シスプラチンやドキシソルビシン、エトポシドを含む多くの細胞傷害性抗がん剤や放射線治療もがん細胞に DNA 損傷を引き起こすことで、がん細胞にアポトーシスを誘導するが、これらの薬剤はすべての DNA を標的とするため正常な細胞も傷害してしまい、このことによる副作用も大きな問題である。さらに、アポトーシスの様々な経路に異常が起きているがん細胞に対して、アポトーシスを誘導しようとする戦略は、ある意味で矛盾を抱えている。そこで我々は、生体内において実行される細胞死の制御メカニズムを幅広く研究し、その知見を新たながん治療に応用することを目指している。

細胞死研究の新たな展開

細胞死の様式には、大きく分けて 2 つのタイプが存在する。1 つは「細胞の自死」とも呼ばれるアポトーシス、もう 1 つは「細胞壊死」と呼ばれるネクロ

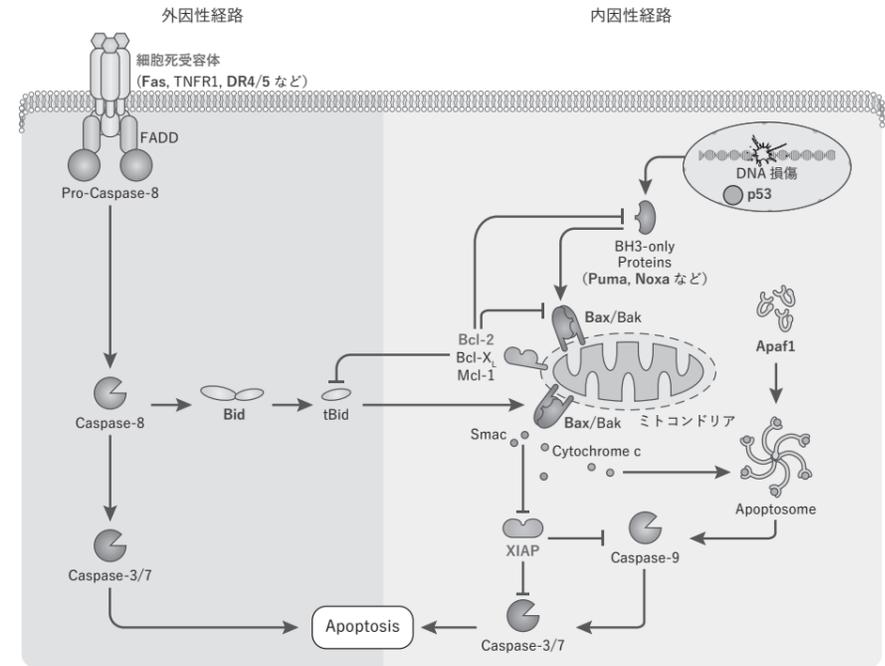


図 1) アポトーシス経路と創薬ターゲット

アポトーシス経路は主にミトコンドリアを介した内因性経路と細胞死受容体を介した外因性経路の 2 つに分けられる。外因性経路は tumor-necrosis factor (TNF)、Fas ligand、TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) などのリガンド分子が、それぞれの受容体である TNF receptor 1 (TNFR1)、Fas、death receptor 4/5 (DR4/5) に結合することにより、細胞死受容体と Fas-associated death domain protein (FADD)、Pro-Caspase-8 が複合体を形成し誘導される。形成された複合体内で Pro-Caspase-8 が切断 / 活性化され、下流の実行カパーゼである Caspase-3 および Caspase-7 を切断 / 活性化する。その結果、DNase による DNA の断片化などを介してアポトーシスが実行される。一方で、内因性経路は DNA 損傷などの各種ストレスによって、Puma や Noxa といった BH3-only タンパク質を介した、Bax/Bak の活性化によりミトコンドリアから Cytochrome c が放出されることによって誘導される。細胞内で Caspase-9 を含むアポトソーム複合体を形成し、下流のエフェクター分子である Caspase-3 および Caspase-7 を切断 / 活性化することにより誘導される。これらのアポトーシスの実行に必要な因子のうち、アポトーシスの外因性経路に関わる Fas/CD95、DR5 などの細胞死受容体や細胞シグナル因子 Fas リガンドをコードする遺伝子、および、ミトコンドリアを介したアポトーシスに関わる遺伝子 BAX、PUMA、NOXA、*BID* が p53 により転写誘導される。さらに、より下流のアポトーシス経路で働く Apaf1 や Caspase-9 や Caspase-6 をコードする遺伝子も p53 によって誘導される。このことから、p53 はこれらの遺伝子の転写誘導を通して、発がん性ストレスに対してアポトーシスを誘導し、細胞のがん化を抑制していると考えられる。また、直接的に細胞死に関わる分子に加え、細胞死を抑制するたんぱく質として、チトクローム c の放出に関与する Bcl-2 ファミリー、Caspases の抑制に関わる Inhibitor of apoptosis protein (IAP) ファミリーがアポトーシスの制御に重要な分子として存在しており、これらはがんの分子標的として抗がん剤の創薬ターゲットとして注目されている。

シスである。図 2 に示すように、アポトーシスで死に行く細胞は自身に備わったプログラムで小さく断片化し、体内の異物を排除するマクロファージによって除去される。この細胞の死には、周囲の細胞に大きな影響を与えずに死んでいくため、静かな細胞死と呼ばれている。一方、ネクローシスは、死の過程で細胞膜が破綻し内容物が周囲に漏れ出る。このため、周囲の細胞に炎症などの影響を与えられている。また、図 1 に示すように、アポトーシスの実行メカニズムの詳細が明らかになる一方で、ネクローシスの制御機構が近年まで明らかにされてこなかったため、「アポトーシス = 制御された生理的

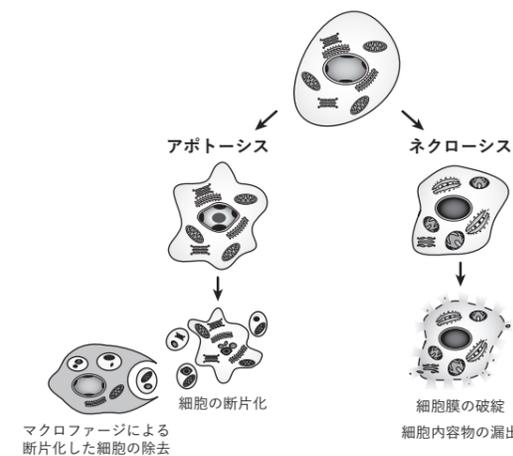


図 2) アポトーシスとネクローシスの一般的な特徴

細胞にアポトーシスの刺激が入ると、クロマチンが凝集し、同時に細胞膜の波打ちが観察される。その後、核と細胞質が断片化され、マクロファージなどの食細胞により貪食除去される。この時、細胞小器官の膨潤などは観察されない。一方、ネクローシスの刺激が細胞に入ると、一般に細胞小器官が膨潤し、最終的に細胞膜が破綻して細胞の内容物が周囲に漏出する。

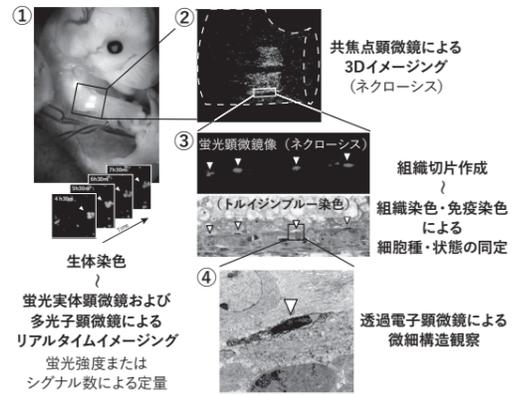


図3) 独自の in vivo 細胞死イメージング法の概要
 生きたマウス胎仔および成体マウスにアポトーシスとネクローシスを識別可能な生体染色色素(アクリジンオレンジおよびヨウ化プロビジウム(PI))を注入し蛍光観察することで、実体顕微鏡を用いたマクロおよびリアルタイムの観察から、電子顕微鏡による超微細構造の観察まで、染色された細胞の位置情報を保ったまま、定量性を持って、アポトーシスとネクローシスを識別して観察が可能である。

- ① (上) 生体染色後の E14.5 のマウス胎仔の実体蛍光顕微鏡像。四角で囲った領域に強く観察される白色のシグナルが、我々が同定した骨形成領域で観察されるネクローシスのシグナル。(下) その領域の細胞死を多光子顕微鏡により長時間リアルタイム観察を行った図。
- ② 骨形成領域を共焦点顕微鏡で観察した死細胞の 3D イメージング。
- ③ 生体染色後のマウス胎仔から作製した組織切片像。
- ④ 標識された死細胞の透過電子顕微鏡像。

な細胞死」「ネクローシス=制御できない偶発的な細胞死」というイメージが定着してきた。先に述べた Hanahan と Weinberg の総説の中でも「programmed cell death (Apoptosis)」と記述され、プログラム細胞死(制御された細胞死)とアポトーシスを同義に扱っている¹。そのため、抗がん剤も主にごん細胞にアポトーシスを誘導することを主眼に開発されている。しかし近年、表1に示す様な、遺伝子によって制御されたネクローシス型細胞死の存在が広く知られるようになり、その考えが変わり始めている。最近では、アポトーシスとネクローシスといった分類ではなく、熱や物理的損傷などの外傷により引き起こされる細胞死を「偶発的細胞死 (Accidental Cell Death)」、遺伝子によりコードされた細胞死を「制御された細胞死 (Regulated Cell Death)」と呼ぶことが提案されている¹⁵。

そこで我々は、生理的な条件下の生体内で実行される細胞死について、独自の in vivo 細胞死イメージング法(図3参照)を開発して解析を行った。その結果、表1に示すこれまでに明らかにされてきた制御されたネクローシス型細胞死のほとんどが、ウイルス感染や虚血再灌流傷害など病的な場面で観察される一方で、我々はマウス胚発生期の骨形成に関わる新しい生理的なネクローシス型細胞死 (Atg9a 依存的ネクローシス) を同定した¹⁶(図4)。この Atg9a 依存的ネクローシスは、その死細胞周囲に骨形成を誘導するものの、非特異的な炎症は惹起しておらず、何らかの制御機構が働いていると考えられる。このことから、定常状態の生体内においても制御されたネクローシス型の細胞死が実行可能で、さらに、周囲の細胞を炎症等から守る仕組みが備わっていることが示唆された。

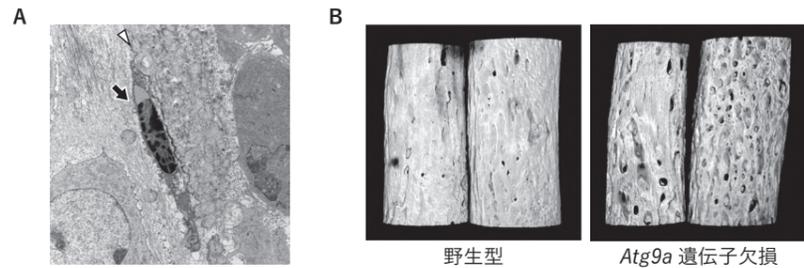


図4) 骨形成に関わる制御されたネクローシス型細胞死

- A: 骨形成領域で観察された死細胞の透過電子顕微鏡像 (矢印) 骨形成領域で新たに同定された細胞死を起こした細胞。細胞膜が破綻し、細胞小器官が膨潤したネクローシス型の形態を示している。また、死細胞の右側で骨の形成が始まっていることが観察できる (死細胞に沿って骨領域と軟骨領域を分ける境界板 (lamina limitans) と呼ばれる電子密度の濃い構造 (矢尻) が観察される)。
- B: Atg9a 遺伝子欠損マウス新生仔の骨表面: (左) 野生型マウスの新生児の骨表面。(右) Atg9a 遺伝子欠損マウスの新生児の骨表面。それぞれ左側が尺骨、右側が橈骨。Atg9a 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスに比べ骨表面が荒く、多くの穴ができてることが確認できる。(Nat Commun 7, 13391 (2016) より改変し転載)

表 1) 制御されたネクローシス型細胞死

名称	特徴	実行因子	関わる現象	参考文献
オートファジー依存的細胞死	オートファジーの亢進	オートファジー関連遺伝子 JNK	アポトーシスの代償	Shimizu, et al., Nat Cell Biol. (2004) ¹⁷
ネトーシス (NETosis)	好中球細胞外トラップ (NET) の放出	NADPH オキシダーゼ PAD4	細菌・ウイルス感染	Brinkmann, et al., Science. (2004) ¹⁸
パイロトーシス (Pyroptosis)	細胞膜の破裂 サイトカインの産生	Caspase-1 Gasdermin D	細菌・ウイルス感染	Fink & Cookson, Infect Immun. (2005) ¹⁹
CypD 依存的細胞死	ミトコンドリア膜透過性遷移現象 (MPT) の関与	CypD	脳の虚血・再灌流傷害など	Nakagawa, et al., Nature. (2005) ²⁰
ネクロプトーシス (Necroptosis)	アポトーシス欠損下で Death Receptor からの刺激により誘導	RIPK1, RIPK3 MLKL	ウイルス感染、神経細胞死など	Degterev, et al., Nat Chem Biol. (2005) ²¹
フェロトーシス (Ferroptosis)	鉄イオン依存的な脂質過酸化が原因	SLC7A11 (xCT) GPx4	神経変性疾患、急性腎障害など	Dixon, et al., Cell. (2012) ²²

終わりに

紙面の都合でそれぞれの細胞死の実行メカニズムについて詳細を述べることは出来なかったが、近年、これまで制御することが不可能だと思われていた細胞死が制御できるようになってきている。さらに、我々が発見した骨形成に関わる Atg9a 依存的ネクローシスのような生理的なネクローシス型細胞死の存在が明らかになったことで、生体内でネクローシス型細胞死を誘導しても、何らかの制御機構によって周囲の細胞を傷害することがないことも明らかになってきた。そこで現在、このようなネクローシス型細胞死の詳細な制御機構を明らかにし、その制御方法を開発することで、既存のアポトーシスをターゲットにした治療法では排除できなかったがん細胞に対する新しい治療法の開発を行っている。この研究はがん細胞に対する新しい武器となるだけでなく、正常な細胞を守る方法にもつながると考えられる。我々の研究グループは、様々な方法を用いて私たちの体の中で起こる細胞死の制御方法について研究を進めており、今後この研究で得られた知見を、がん細胞を排除するための新たな方法へと応用していきたいと考えている。

謝辞

本稿の執筆および研究の遂行にあたり、ご指導を賜りました大阪国際がんセンター 研究所 谷口直之所長、辻本賀

英名誉所長 (大阪大学名誉教授) に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70, doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9(2000).
- 2 Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C. p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53, doi:10.1126/science.1905840(1991).
- 3 Kandoth, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333-339, doi:10.1038/nature12634(2013).
- 4 Soussi, T. & Wiman, K. G. TP53: an oncogene in disguise. *Cell death and differentiation* 22, 1239-1249, doi:10.1038/cdd.2015.53(2015).
- 5 Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16, doi:10.1038/358015a0(1992).
- 6 Ko, L. J. & Prives, C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10, 1054-1072, doi:10.1101/gad.10.9.1054(1996).
- 7 Velculescu, V. E. & El-Deiry, W. S. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem* 42, 858-868(1996).
- 8 Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331, doi:10.1016/s0092-8674(00)81871-1(1997).
- 9 Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310, doi:10.1038/35042675(2000).
- 10 Vousden, K. H. & Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604, doi:10.1038/nrc864(2002).
- 11 Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. p53 function and dysfunction. *Cell* 70, 523-526, doi:10.1016/0092-8674(92)90421-8(1992).
- 12 Bykov, V. J. N., Eriksson, S. E., Bianchi, J. & Wiman, K. G. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 18, 89-102,

- doi:10.1038/nrc.2017.109(2018).
- 13 Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E. & Croce, C. M. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443, doi:10.1126/science.3874430(1985).
- 14 Bakhshi, A. *et al.* Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18)human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 41, 899-906, doi:10.1016/s0092-8674(85)80070-2(1985).
- 15 Galluzzi, L. *et al.* Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell death and differentiation* 22, 58-73, doi:10.1038/cdd.2014.137(2015).
- 16 Imagawa, Y., Saitoh, T. & Tsujimoto, Y. Vital staining for cell death identifies Atg9a-dependent necrosis in developmental bone formation in mouse. *Nat Commun* 7, 13391, doi:10.1038/ncomms13391(2016).
- 17 Shimizu, S. *et al.* Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6, 1221-1228, doi:10.1038/ncb1192(2004).
- 18 Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-1535, doi:10.1126/science.1092385(2004).
- 19 Fink, S. L. & Cookson, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 73, 1907-1916, doi:10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005(2005).
- 20 Nakagawa, T. *et al.* Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652-658, doi:10.1038/nature03317(2005).
- 21 Degterev, A. *et al.* Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1, 112-119, doi:10.1038/nchembio711(2005).
- 22 Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149, 1060-1072, doi:10.1016/j.cell.2012.03.042(2012).



今川 佑介

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター研究所
 腫瘍増殖制御学部 主任研究員

- 2008年3月 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 博士後期課程修了(博士(バイオサイエンス))
- 2008年4月 大阪大学大学院 医学系研究科 特任研究員
- 2013年4月 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 戦略的研究チーム強化プロジェクト研究員
- 2014年8月 大阪府立成人病センター研究所 研究員
- 2017年4月 一現在 地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター研究所 主任研究員(チームリーダー)
- 2019年1月 一現在 大阪大学大学院 薬学研究科 招へい准教授