

# (赤澤祐子) 論文内容の要旨

主 論 文

## **Death Receptor 5 Internalization is Required for Lysosomal Permeabilization by TRAIL in Malignant Liver Cell Lines**

(DR5 の Internalization が肝細胞癌のアポトーシス誘導に寄与している)

共著者名

[赤澤祐子, Mott JL, Bronk SF, Werneburg NW, Kahraman A, Guicciardi ME, Meng XW, 河野茂, Shah VH, Kaufmann SH, McNiven MA, Gores GJ.]

(Gastroenterology • 136 巻 7 号 2365-2376 2009 年)

[12 ページ]

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻  
(主任指導教員：河野茂教授)

(緒 言) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は癌細胞のみをアポトーシスに導き、正常の細胞に対しては毒性を持たないため、抗癌剤としての効果が期待されている。TRAIL は細胞膜に存在する Death receptor 4 (DR4) と Death receptor 5 (DR5) に結合することが知られているが、肝細胞癌では2つの受容体のうちどちらを介してアポトーシスが起こるかは知られていない。また TRAIL によるアポトーシスには、リソソームの融解と、リソソーム内に局在するプロテアーゼである、カテプシン B の細胞質内への放出が必要であると報告されているが、このリソソーム融解までのシグナル伝達過程は明らかにされていない。本論文では、TRAIL によるリソソームの融解とアポトーシスが DR4 と DR5 のどちらのレセプターを介して行われるかに注目した。さらに TRAIL 刺激後の TRAIL と受容体の複合体の internalization (細胞膜から細胞質内への移動) と細胞内での局在が、これらの経路に寄与しているかどうかを検索した。

(対象と方法)

細胞はヒト肝細胞癌株である Huh-7 細胞を用い、野生株とともに DR4 あるいは DR5 を標的とした shRNA (DR4-shRNA, DR5-shRNA) を恒常的に発現する細胞株を作成し使用した。TRAIL の internalization は、Flag で標識された TRAIL で細胞を刺激後に、免疫蛍光染色法を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。また受容体の internalization は、GFP で標識した DR5, DR4 のプラスミドを一過性に導入後、全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF) で観察した。リソソームの融解は、カテプシン B に対する免疫蛍光染色法で確認した。アポトーシスの観察は、特有の核の形態を

ジアミジノフェニルインドール (DAPI) 染色後に蛍光顕微鏡で確認し、さらにカスパーゼ 3/7 の活性測定をキットによる定量を行った。

(結 果)

Huh-7 細胞は DR5, DR4 蛋白を発現していた。DR5 の発現抑制下 (shRNA-DR5) では TRAIL によるアポトーシスが抑制されたが、DR4 発現抑制下 (DR4-shRNA) では、アポトーシスは抑制されなかった。DR5-GFP は、TRAIL の刺激によって速やかに細胞膜から細胞質へ移動し、細胞表面から消失した。しかし、DR4-GFP は TRAIL 刺激による明らかな変化が見られなかった。DR5-GFP の internalization は、一般的な受容体の internalization をつかさどる蛋白質である、ダイナミンに依存していた。ダイナミンのドミナントネガティブ変異体を導入すると、TRAIL 刺激後の internalization, リソソーム融解、アポトーシスはすべて有意に抑制された。TRAIL 刺激 60 分後には、DR5-GFP は internalization を経てリソソームに移動して局在した。エンドソームをリソソームへ移動させる役割をもつ蛋白質である Rab7 の発現を siRNA で抑制したところ、DR5 のリソソームへの局在はなくなり、また TRAIL によるリソソーム融解と、アポトーシスも有意に抑制された。

(考 察)

上記の結果より、肝細胞癌における TRAIL によるアポトーシスは DR4 よりも主に DR5 を介して行われていると考えられた。Internalization の初期段階をつかさどる、ダイナミンのドミナントネガティブ変異体を用いると、アポトーシスが抑制されたことから、TRAIL-DR5 の internalization が、リソソーム融解を経てアポトーシスにいたるまでのシグナル伝達に必要であると考えられる。さらに、DR5 は TRAIL 刺激後リソソームに局在し、この受容体がリソソームにいたる経路を Rab7-siRNA を用いて阻害すると、アポトーシスが抑制された。このことから、DR5 がリソソームへ運搬されることが TRAIL によるアポトーシスに寄与していると考えられた。以上より、TRAIL 刺激による DR5 の internalization とリソソームへの輸送が、アポトーシスに貢献していると考えられた。

