アポトーシスの組織細胞化学

小路 武彦, 中根 一穂

長崎大学医学部解剖学第三講座

Histochemical approaches to characterize apoptotic cells

Takehiko Koji and Paul K. Nakane

Department of Anatomy (III), Nagasaki University School of Medicine

Apoptosis is a morphologically distinct set of cell death process, discriminated from necrosis, and is induced through the activation of intrinsic cell-suicide program. To understand better the fundamental process of apoptosis, which is expected to promote us to manipulate cell death to our advantages, cellular analysis of cell death is required since apoptotic cells often co-exist with necrotic ones in tissues. In this study, we attempted several histochemical trials to define a difference between apoptosis and necrosis using hydrocortisone-treated rat thymus and CCl₄-treated rat liver as models of apoptosis and necrosis, respectively. When the fresh frozen sections were stained for acid phosphatase activity, the staining in necrotic hepatocytes was lost, while that in apoptotic thymocytes was well retained, reflecting the integrity of lysosome in apoptosis. In situ nick translation (ISNT) as well as TUNEL, which detect DNA strand breaks, also allowed us to differentiate apoptotic cells from necrotic cells in the frozen sections; the apoptotic nuclei were stained only when the sections were treated with proteinase K (PK), whereas the necrotic nuclei were stained without PK treatment. However, in paraffin sections apoptotic nuclei were stained by these methods without PK treatment. Therefore, the criterion to discriminate both types of cell death did not hold in this case. We also addressed whether the expression of Fas or Fas ligand is a useful histochemical marker of apoptosis. Consequently, a positive correlation was confirmed in ischemia-reperfusion mouse kidney and in ulcerative colites, while it could not be always generalized. Thus, in fact any one of these methods is not absolute singly, but rather mutually supplementary. Currently, for a precise description of cell death, it seems essential to combine various methods including morphological and biochemical approaches.

Key words : apoptosis, necrosis, acid phosphatase, DNA strand breaks, Fas/Fas ligand

はじめに

アポトーシス (apoptosis) は、ネクローシス (necrosis) と区別される細胞死の一形態として Kerr 等 ('72)¹⁾によって提案されたものである。歴史的には、ネクローシスは細胞死に伴う細胞形態の変化を意味したことから、細胞死の分類用語としての使用は不適切であり、ネクローシスの代りに、'oncosis' を使用すべきであるという議論もあるが²⁾、ここでは最近の慣例に従って以下に定義される細胞死の形態として用いる。アポトーシスの形態が胚発生時の programmed cell death で認められることから、両者が同義語のごとく用いられている場合もあるが、これは現時点では正しくない。アポトーシスは特定の増殖因子の除去によっても生じ、glucocorticoid による胸腺細胞死に見られるようにステロイドホルモン依存的に生じるもの、 γ 線等の電離放射線照射によるもの、更には虚血や種々の薬剤で誘起されるものなど極めて多様な刺激に応じて広範に観察されるからである。アポトーシスは核情報に基づいて生じる積極的な能動的な細胞死であると理解されるが、一方核の非存在下でも細胞質のアポトーシス形態が観察されることが示された³⁾⁴⁾。このようにアポトーシスの概念は期待された以上に混沌としている。この様な状況の中で、組織内でのアポトーシスの出現やその機構を検討するためには細胞個々のレベルでのアポトーシス細胞の同定や解析が必須であり組織細胞化学的な検索の必要性がある。

アポトーシスの定義 (図1)

そもそものは電子顕微鏡による形態学的観察から定義付けされたもので、ネクローシスと比較して以下のようにまとめられる。1) アポトーシスでは、かつて shrinkage necrosis と呼ばれた如く、細胞が退縮する。一方、ネクローシスでは細胞膜の損傷から始まり、ミトコンドリアを始めとする細胞内小器官延いては細胞自身の膨化が生じる。2) アポトーシスでは核に於いて、クロマチンの凝集並びに核膜周囲への偏在が生じる。ネクローシスではクロマチン凝集部位が不規則に点在し、いわゆる変性状態を示す。3) 細胞膜の形態が、アポトーシスでは budding を示すが、ネクローシスでは blebbing を示す。4) アポトーシスでは核断片や細胞内小器官を含む細胞片 (apoptotic body) が生じる。ネクローシスでは細胞質成分等の細胞からの流出が起こる。

5) アポトーシスでは、生じた apoptotic body は周囲の細胞に phagocytosis され炎症反応を起こさない。従ってしばしば、アポトーシスで死んだ細胞の周囲の細胞内に apoptotic body が観察される。一方、ネクローシスでは炎症反応を生じ、浸潤してきた血球細胞によって後片付けされる。更に、病理標本等に於いて散在性に分布している死細胞はしばしばアポトーシスであるとされる。又、上皮細胞で基底膜から脱落した死細胞はしばしばアポトーシス像を呈し、この場合には 'anoikis'⁵⁾ と呼ばれて区別されている。

アポトーシス細胞の一般染色

培養細胞等の死細胞染色には、しばしばトリパンブルーやエリスロシン染色が利用されるが、これらの染色法ではアポトーシスとネクローシスを区別できない。アポトーシスでも最終的には膜透過性に変化が生じるものと考えられる。培養細胞で有効な染色法は、DAPI や Hoechst 33342 等で DNA の染色をして核の断片化を観察することである。組織切片を用いた場合、一般的な組織化学で両細胞死を正確に識別するのは困難である。しかしながら、我々は acid phosphatase 活性の酵素組織化学の有効性をモデルの実験で示すことができた⁶⁾。この酵素はライゾゾームに局在するもので、ネクローシスでは膜の integrity の消失と共にその活性の染色強度は激減・消滅するが、アポトーシスではその染色強度が上がりこそすれ、消失することはない。これらの組織化学的判別法の有効性は今後の検討を要するが、その簡便さの故に魅力的である。今後、ミトコンドリアの integrity を指標とした酵素組織化学染色法等も広く検討されるべきものとする。

DNA 鎖切断とアポトーシス

1. 生化学的知見

Wyllie (1980)⁷⁾によって、典型的なアポトーシスを示すグルココルチコイド処理された胸腺細胞の DNA をアガロース電気泳動により解析すると、約 180~200塩基対の倍数からなるバンド群 (apoptotic ladder) が出現することが示され、この ladder は DNA の二本鎖切断が一定の規則をもって生じていることの反映であるとされた。一方、ネクローシスの場合には DNA 電気泳動のパターンはスメアーをなす。しかしながら、種々の例外が知られるようになってきた。Murine mastocytoma P815 細胞を

Morphological Features in Cell Death

図1 ネクローシスとアポトーシスの模式図
説明は本文参照

DEAE-デキストラン等のポリカチオンで処理すると形態的にはネクローシスを示すにも関わらずDNA ladderが生じる⁸⁾。同様に、ジエチルニトロソアミン投与されたラット肝でも同様の観察が報告されている⁹⁾。我々の研究室でも、典型的なネクローシスの系である四塩化炭素 (CCl₄) 投与ラット肝において抽出DNAの電気泳動でladderを観察している⁶⁾。逆に、典型的な形態的アポトーシス像を伴う系でapoptotic ladderが観察されない例も報告されている¹⁰⁾。更に、細胞を加熱処理することによってもDNA ladderの観察が報告されているが、細胞形態からは約2%の細胞がアポトーシス像を示すのみで他の死細胞はネクローシスであったという⁸⁾。

これらの点は、もはやDNA ladderの観察はアポトーシス存在の一傍証にしか過ぎないということを指摘していると共に、更にDNA ladderの検出が全ての死細胞がアポトーシスで死滅していることをも意味しないことを示している。

2. 分子組織細胞化学的解析

生化学的知見に基づいて、DNA鎖切断を特異染色することにより、アポトーシス細胞を細胞個々のレベルで同定することが試みられた。In situ nick translation (ISNT)⁶⁾¹¹⁾は、E. coliのDNA

polymerase Iを利用してDNAに生じたニック部位(一本鎖切断部位)を検出するためのものであり、in situ TdT (TUNEL¹²⁾¹³⁾はterminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)を作用させて主として二本鎖切断部位を検出するために使用される。しかしin situ TdTでは、一本鎖DNAの末端¹⁴⁾や二本鎖DNAのニック部位も標識可能であるので結果の解釈には注意を要する。

アポトーシスとネクローシスのモデルとして、ハイドロコチゾン (10mg/100g BW) 投与rat胸腺とCCl₄ (100 μ l/100g BW) 投与rat肝をそれぞれ作製した⁶⁾。胸腺モデルでは、アポトーシスの定義に基づいて電顕観察により、クロマチンの核膜周囲への濃縮偏在、細胞膜やオルガネラ成分の正常さ、apoptotic bodiesの出現を確認し、肝モデルではhydropic changesやクロマチン変性を認め典型的なネクローシスと判断された。これらモデルの未固定凍結切片を作製し、シラン処理スライドガラスに拾いEtOH/酢酸或いは4% paraformaldehyde/PBS固定した後ISNTを行なった。ISNTは、DNA polymerase I (200 U/ml)を用いてbiotin-11-dUTPを取込ませ (37 $^{\circ}$ C, 3hr)、最終的にhorse-radish peroxidase標識anti-biotin抗体により酵

図2 CCl₄投与ラット肝切片のISNT染色（ネクロシスのモデルとして）

（左上）対照としてSalineを投与したラット肝の凍結切片。Proteinase K (PK) 無処理。（右上）Salineを投与したラット肝の凍結切片。PK処理。（左下）CCl₄投与後18hr後のラット肝凍結切片。PK無処理。（右下）CCl₄投与後18hr後のラット肝新鮮凍結切片。PK処理。ネクロシス肝細胞核のISNT染色強度は、PK処理前後で変化しない。

素免疫組織化学的にシグナルを検出した。アポトーシスが誘起された胸腺細胞核の染色性はISNT反応に先立つproteinase K(PK)処理(1 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C, 5-15min)に依存しており、ネクロシスが誘起された肝細胞核の呈色にはPK処理を必要としなかった。(図2, 図3)。この結果は、アポトーシスでもDNA単鎖切断が生じておりその存在状態はネクロシスとは異なること、並びにアポトーシスとネクロシスはISNTにより識別できることを示している。TdT(200 U/ml)とbiotin-16-dUTPを用いたin situ TdTによるDNA鎖切断の検出においても基本的に同様の染色結果を得ているが、検出感度はISNTに劣る。既に述べたように、両モデルでライソゾーム酵素であるacid phosphatase活性の染

色を行なった結果、胸腺モデルではホルモン投与前後で染色結果に差はなかったが、肝モデルではCCl₄投与により染色が消失した⁶⁾。この結果は、ネクロシスではオルガネラの破壊が顕著で、流出酵素群によるクロマチン処理が進み、ISNTやin situ TdTによる染色性の差を生じた可能性を示唆する。尚、抽出DNAのアガロース電気泳動では、肝モデルでもladderが観察され、ladder形成がアポトーシスの絶対的指標であるという議論に疑問を投げかける。電顕的には少なくともCCl₄投与18hrの肝ではアポトーシス像を認めていない。

特に強調すべきは、in situ TdTで染色された核はアポトーシスを意味しているとはしばしば解釈されているが、ネクロシスの核も理論的にも実際的に

図3 グルコルチコイド投与ラット胸腺切片のISNT染色(アポトーシスのモデルとして)

(左上) 対照として Saline を投与したラット胸腺の凍結切片。PK 無処理。(右上) Saline を投与したラット胸腺の凍結切片。PK 処理。(左下) グルコルチコイド投与後 2hr 後のラット胸腺凍結切片。PK 無処理。(右下) グルコルチコイド投与後 2hr 後のラット胸腺凍結切片。PK 処理。アポトーシス胸腺細胞核の ISNT 染色には、PK 処理を必要とする。

も同時に染色可能な点である。

新鮮凍結切片で ISNT を行うことにより、アポトーシスとネクローシスを識別可能であることを示したが、問題点として DNA の一本鎖切断は細胞の終末分化の際にも認められており、ネクローシスと区別出来ないことが知られる。又パラフィン切片では、proteinase K 処理無しでもアポトーシス核が染色され、両細胞死を区別できない。特に、ホルマリン固定切片等ではギ酸生成による DNA の破壊による background レベルの核染色の増大にも留意する必要がある。これらの DNA 鎖切断の染色法は、明らかな形態変化を起こす以前に細胞死を把握する事ができるので、ヘマトキシリン/エオシン染色よりは高感

度で細胞死を検出可能であった。

アポトーシス誘導因子である Fas と Fas ligand の免疫組織化学的検索

アポトーシスの組織細胞化学的マーカー探索の一環として、Fas 抗原或いは Fas ligand¹⁵⁾の免疫組織化学的或いは in situ hybridization による検討の有効性を検討した。Fas は膜貫通型の糖蛋白質抗原で、この抗原に対する IgM 抗体を作用することによりアポトーシスを引き起こすことが知られる。Fas の天然のリガンドとして Fas ligand が発見され¹⁵⁾、自己免疫疾患等での免疫系に絡んだ役割を中心として、現在大いに注目されている。

我々は、合成ペプチドを抗原として独自に作製した Fas 並びに Fas ligand 抗体¹³⁾や cDNA 或いは合成 oligo-DNA プローブを用いた非放射性 in situ hybridization¹⁴⁾¹⁶⁾によりヒト、マウス、及びラット組織切片上でアポトーシス細胞の出現との関連を検討した。その結果、ヒトでもマウスでも胸腺には Fas が強く発現されているが、染色されるのは一般に T 細胞ではなく上皮細胞であった。グルココルチコイド投与により誘起される T 細胞死との関係も Fas や Fas ligand に対する抗体を用いた免疫組織化学的検索では明白でなかった。又、種々の癌組織でしばしば Fas の発現を観察するが、それらの多くはアポトーシス出現との関連は不明であった。一方、潰瘍性大腸炎での上皮細胞死¹⁷⁾では Fas 発現の関与が示され、更にマウス腎の虚血再灌流モデルでも、outer medulla の尿管管内帯部に誘起されるアポトーシスへの Fas の関与が強く示唆されている¹⁸⁾。これらの結果は、Fas 或いは Fas ligand 発現が必ずしもアポトーシスの存在を意味するものではないが、Fas と Fas ligand の同時局在はその場でのアポトーシス誘導の可能性を強く示唆し、更に可能なアポ

トーシスの組織細胞化学的マーカーとなりえることをも示している。

結 語

ここ数年、アポトーシスに関する曖昧な定義・解釈に基づいた報告が氾濫した結果、アポトーシスの総括的理解に困難を生じている。現在アポトーシスの存在を示すためには、既知の典型的なアポトーシスやネクロシスの結果を念頭において、電顕観察、生化学的な DNA ladder の存在、ISNT や in situ TdT による特徴的な DNA 切断並びに核の断片化の観察、アポトーシス特異的遺伝子発現の検討等を行ない、多面的に列証する必要がある。同時にどの点が典型的でどの点が例外的であるのかを一つ一つ明らかにすべきであろう。実際、その誘導機構の多元性も含め、アポトーシスにも多様性が認められつつある。それらの系統的理解がアポトーシスの素過程の解明につながるものと思われ、又アポトーシスが特定の遺伝子産物によって制御可能だという事実に基づいて、将来の癌治療・遺伝子治療にも大きく貢献するものと期待される。

文

献

- 1) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257 1972
- 2) Majno, G. & Joris, I.: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3-15 1995
- 3) Jacobson, M. D., Burne, J. F. & Raff, M. C.: Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J* 8: 1899-1910 1994
- 4) Schulze-Osthoff, K., Walczak, H., Droge, W. & Krammer, P. H.: Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol* 127: 15-20 1994
- 5) Frisch, S. & Francis, H.: Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124: 619-626 1994
- 6) Hashimoto, S., Koji, T., Niu, J., Kanematsu, T. & Nakane, P. K.: Differential staining of DNA strand breaks in dying cells by non-radioactive in situ nick translation. *Arch Histol Cytol* 58: 161-170 1995
- 7) Wyllie, A. H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556 1980
- 8) Collins, R. J., Harmon, B. V., Gobe, G. C. & Kerr, J. F. R.: Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* 61: 451-453 1992
- 9) Ray, S. D., Sorge, C. L., Kamendulis, L. M. & Corcoran, G. B.: Ca⁺⁺-activated DNA fragmentation and dimethylnitrosoamine-induced hepatic necrosis: Effects of Ca⁺⁺-endonuclease and poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 236: 387-394 1992
- 10) Oberhammer, F., Bursch, W., Tiefenbacher, R., Froschl, G., Pavelka, M., Purchio, T. & Schulte-Hermann, R.: Apoptosis is induced by transforming growth factor- β 1 within 5 hours in regressing liver without significant fragmentation of

- the DNA. *Hepatology* 18:1238-1246 1993
- 11) 小路武彦, 橋本 聡, 中根一穂: アポトーシス研究のための分子細胞生物化学的技術 (辻本賀英, 刀祢重信, 山田 武編). 羊土社 東京 pp.55-60 1995
 - 12) Gavrieli, Y.: Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501 1992
 - 13) Koji, T., Kobayashi, N., Nakanishi, Y., Yoshii, A., Hashimoto, S., Shibata, Y., Anjiki, N., Yamamoto, R., Aoki, A., Ueda, T., Kanazawa, S. & Nakane, P. K.: Immunohistochemical localization of Fas antigen in paraffin sections with rabbit antibodies against human synthetic Fas peptides. *Acta Histochem Cytochem* 27:459-463 1994
 - 14) Koji, T. & Brenner, R. M.: Localization of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rhesus monkey uterus by nonradioactive in situ hybridization with digoxigenin-labeled oligodeoxynucleotides. *Endocrinology* 132:382-392 1993
 - 15) Nagata, S. & Golstein, P.: The Fas death factor. *Science* 267:1449-1456 1995
 - 16) 小路武彦, 中根一穂: 組織細胞化学1995 (日本組織細胞化学会編). 学際企画 東京 pp.139-147 1995
 - 17) Iwamoto, M., Koji, T., Makiyama, K., Kobayashi, N. & Nakane, P. K.: Apoptosis of crypt epithelium in ulcerative colitis. Submitted
 - 18) Nogae, S., Koji, T., Nakanishi, Y., Saito, T., Abe, K. & Nakane, P. K.: Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion kidney model: Appearance of DNA strand breaks and expression of Fas mRNA. *J Am Soc Nephrol* 5:905 1994