今日の話題

代償性増殖と酸化ストレス 死細胞が周囲の生細胞の増殖を促進する

生体内で生じた死細胞は速やかに周囲に存在するマクロファージなどの食細胞により貪食され排除される。この過程は生体の恒常性維持にとって非常に重要であり、この過程が障害されると死細胞の残存を引き起こし、炎症の持続や自己免疫疾患などを引き起こす可能性がある⁽¹⁾。それでは、死細胞は単に貪食されるだけで、周囲の細胞や食細胞に対して何の生体応答も誘導しないのであろうか？ これまでアポトーシス細胞を貪食した食細胞にはトレランスが誘導されることは知られていた。本総説では、死細胞がある状況においては積極的に何らかの因子を産生・放出し、生体の恒常性維持に関与しているという観点から、これまでの報告および最近のわれわれの結果をもとに概説したい。

代償性増殖 (compensatory proliferation) という現象は、今から30年以上も前の1977年にHaynieとBryantらにより報告されていた。すなわち、発生過程のショウジョウバエの幼虫の翅原基に放射線照射をし、約50%の細胞にアポトーシスを誘導しても、最終的に正常に成長することが報告された。このことは、発生過程において大量の細胞死が誘導されても、周囲に存在する細胞が代償的に増殖し、生体の恒常性を保っていることを意味している。その後長らくこの代償性増殖という現象は、細胞死の結果生じた組織の欠損を周囲の細胞が単に増殖して埋めている (passive model) のか、あるいは死細胞から積極的に何らかの因子が放出された結果、周囲の細胞に積極的に増殖を誘導している (active model) かにについての結論は出ていなかった。2004年になりSteller

らが“死につつあるが、死んでいない細胞 (undead cells)”を遺伝学的に誘導するという方法を用いて、発生過程において生じる代償性増殖には、死細胞から積極的に放出される増殖因子が関与していることを明らかにした⁽²⁾。詳しい説明に入る前にショウジョウバエのアポトーシス経路について説明したい (図1)。ショウジョウバエでは、アポトーシス誘導刺激によりReaper, Hid,

図1 ■ ショウジョウバエおよび哺乳類におけるアポトーシス経路の相同性 (主に内因性経路)

ショウジョウバエおよび哺乳類ともにアポトーシス誘導刺激によりReaper, Hid, Grimの発現誘導や, Smac, HtrA2などがミトコンドリアから放出される。これらの分子により最終的にはIAPファミリーの分解が誘導され、Droncおよびカスパーゼ9が活性化され、最終的にはエフェクターカスパーゼが活性化し、アポトーシスが誘導される。注意点；この図はショウジョウバエとの相同性を協調するために極端に簡略化しており、哺乳類細胞にはデスレセプターを介するアポトーシス誘導経路 (外因性経路) が存在し、さらにミトコンドリアから放出されるチトクロムcはIAPに無関係にカスパーゼ9を活性化できる。

Grim (ヒトに相同するのは BH3 only Bcl-2 ファミリー分子) などの細胞死誘導因子の発現が誘導され, *Drosophila* inhibitor of apoptosis (Diap) 1 と呼ばれるショウジョウバエの IAP ホモログを分解する. IAP はカスパーゼ 9 のホモログである Dronc を恒常的に分解し細胞死を抑制していることから, IAP の発現が低下すると Dronc が蓄積し, ショウジョウバエのカスパーゼ 3 ホモログである DrICE や Dcp-1 を活性化し, 最終的にはアポトーシスが誘導される. ショウジョウバエのシステムの有利な点は p35 と呼ばれるバキュロウイルスのアポトーシスインヒビターを細胞に発現させることで, エフェクターカスパーゼである DrICE や Dcp-1 は抑制されているが, イニシエーターカスパーゼである Dronc の活性化が起こっている細胞 (undead cells) を作製することができるという点である.

Steller らは undead cells を誘導することで, passive model と active model の論争に決着をつけることに成功した. 仮に passive model が正しいのであれば, p35 を発現させてアポトーシス誘導刺激を加えても, 細胞死の実行がブロックされているので (undead cells), 組織の欠損は生じず代償性増殖は誘導されない (図 2A). 一方で, active model が正しいとすれば, undead cells は持続的に増殖因子を産生されることから, 周囲の細胞は過剰に増殖することが予測される. 実際に p35 を発現させ

undead cells を誘導することで過剰な増殖が誘導されたことから, 代償性増殖は active process であることが証明され, 死細胞から p53 や JNK 依存性に放出される Wingless (Wg; Wnt ホモログ) や Dpp (Decapentaplegia; TGF β ホモログ) が関与していることが示された⁽³⁾ (図 2B). さらにその後の研究から前述したような活発に増殖の見られる発生過程だけではなく, 増殖の停止した休止期にある細胞集団 (たとえば視神経細胞) でも, 代償性増殖が誘導されることが報告され, その場合にはエフェクターカスパーゼ依存性に Hedgehog (Hh) シグナルが誘導されることが明らかとなった (図 2B).

それでは代償性増殖という現象は, 哺乳類であるマウスやわれわれの生体のなかでも見られる現象なのであるか? 以前より細胞死に伴いさまざまな因子が放出されることが報告されている⁽⁴⁾. なかでも Danger-associated molecular pattern (DAMP)s と総称される分子は, Toll-like receptors などの特異的なレセプターを介して細胞死に伴う炎症や組織修復に関与していることが示されていることから, これらの因子のなかに代償性増殖に関与する因子が含まれている可能性がある. 事実, 死細胞内においてカスパーゼ 3 や 7 依存性に calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) が活性化し, prostaglandin E (PGE)₂ 産生が誘導され, その結果代償性増殖が亢進し, 組織修復や腫瘍細胞の増殖が促進さ

図 2 ■ ショウジョウバエにおける代償性増殖

A) Passive model と active model. P35 発現細胞にアポトーシス誘導刺激を加えた場合に, passive model では細胞死が実行されないために, 代償性増殖は誘導されないが, active model では, 持続的に増殖因子が undead cells から放出され過剰な代償性増殖が誘導される. B) 代償性増殖に関与する増殖因子. 発生過程にある活発に増殖している細胞では(左), JNK や p53 依存性に Wg や Dpp が産生放出され, 代償性増殖 (CP) に関与する. 一方で休止期にある視神経細胞(右)では, エフェクターカスパーゼ依存性に Hh が産生され, CP に関与する.

1. ラジカル種 (不対電子をもっている); 相手の電子を奪いにくる (相手を酸化する)

スーパーオキシド ($\cdot\text{O}_2^-$)
 ヒドロキシルラジカル ($\text{HO}\cdot$)
 ヒドロペルオキシラジカル ($\text{HOO}\cdot$)

下線: 狭義の活性酸素種

2. ノンラジカル種

過酸化水素 (H_2O_2)
 一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)
 ペルオキシナイトライト (ONOO^-)
 脂質ヒドロペルオキシド (LOOH)
 次亜塩素酸 (HOCl)

図3 ■ 活性酸素種とは

活性酸素種は大きくラジカル (不対電子をもつ) とノンラジカル (不対電子をもたない) に大別でき、下線を引いた分子が狭義の活性酸素種。不対電子を有することで、相手 (酸化する標的分子) の電子を強く奪う。

れることが報告された⁽⁵⁾。また、化学発がん剤による肝発がんモデルを用いた研究では、肝細胞が死ぬことにより肝死細胞を貪食したクッパー細胞からIL-1 α が産生され、IL-1 α 依存性に産生されたIL-6が代償性増殖に関与することが示された⁽⁶⁾。さらに肝死細胞の亢進したマウスでは、代償性増殖が亢進した結果、肝発がんが亢進することが示された。これらの結果は、ショウジョウバエで認められた代償性増殖という現象が、哺乳類においても保存されていることを示している。ショウジョウバエにおいても複数の代償性増殖に関与する経路が存在することを考慮すると、ショウジョウバエから進化を遂げた哺乳類においても、PGE₂やIL-6経路以外にも死細胞から放出され同様の機能を担う経路が複数存在することが十分考えられる。

活性酸素種 (ROS) とは文字どおり活性化された酸素の状態であり、それ自身が不対電子をもつ狭義の活性酸素種 (スーパーオキシドやヒドロキシルラジカルなど) と、それをもたない活性酸素種 (たとえば過酸化水素など) に分類される (図3)。ROSは標的となるタンパク質、脂質、DNAなどを酸化することでさまざまなシグナル伝達経路を活性化する⁽⁷⁾。細胞内におけるROSの産生される場所は大きく2つに分けられ、一つは細胞膜に存在しNADPH依存性に酸素分子を一電子還元することによってスーパーオキシドを産生するNADPH oxidase複合体であり、もう一つはミトコンドリアである。ミトコンドリアにおいては、積極的にROSが産生されるわけではなく、ATPを産生する電子伝達系で、副産物としてスーパーオキシドが産生される。これまで研究によりROSと細胞死は密接に関与していることが示されている⁽⁸⁾。最近の研究からROSと組織修復が密接に

関与していることが報告された。ゼブラフィッシュの尾部損傷治癒モデルを用いた解析から、損傷部位ではNox依存性にROS産生が誘導されることが報告された⁽⁹⁾。興味深いことに、損傷に伴うROS産生を抑制すると、損傷部位への好中球の遊走が著しく阻害された。好中球の浸潤が創傷治癒の最初のステップであることを考慮するならば、この結果は外科的な傷害に伴い産生されるROSが創傷治癒に積極的に関与していることを示している。さらに最近このときに見られる好中球の浸潤は、SRKファミリーに属するLynが酸化ストレス依存性に活性化され、さらにその下流でERKが活性化されることが必須であることが明らかにされた。また、酸化修飾を受けた脂質がToll-like receptor (TLR)2のリガンドとなり、血管新生を促進していることが報告されている。これらの報告はマウスやヒトにおいても組織傷害時に産生されるROSが組織修復に積極的な役割を果たしている可能性を示唆している。

以上のような背景を考慮し、筆者らは酸化ストレス依存性に発現誘導される遺伝子群のなかに、細胞死に伴い発現が誘導され、組織修復に関与する遺伝子が存在するのではないかと仮説を立てた。そこで、酸化ストレスに伴って発現誘導される分子をDNAマイクロアレイにより網羅的に同定した。その結果、IL-6サイトカインファミリーに属するIL-11がROS依存性に発現が上昇することを見いだした。これまでの研究からIL-11はSTAT3経路を活性化すること、その発現はIL-1 α やTGF β などのサイトカインによって誘導されることが報告されており、IL-11は細胞増殖や血管新生、抗アポトーシスにかかわる遺伝子の発現を誘導することが知られていた。また、マウスへのIL-11投与は造血作用、血小板生成、小腸粘膜の保護など多彩な働きを示すことが報告されていた⁽¹⁰⁾。しかしながら、ROSとIL-11の関連性については不明であったことから、われわれはROSによるIL-11の発現誘導機構および、酸化ストレスにより誘導されるIL-11の機能について解析を行った。ROSはMAPキナーゼ経路やAKT経路を活性化することが知られている。そこで、これら経路の活性化を特異的に抑制したところ、興味深いことにIL-11の発現誘導はROSによる持続的なERK経路の活性化に依存していることが明らかとなった。また遺伝子発現調節機構を解析した結果、ERK経路の下流でリン酸化・活性化される転写因子AP-1の構成因子の一つであるFra-1の活性化

がIL-11の産生には必須であることがわかった。これまでに持続的なJNKの活性化はアポトーシス誘導に関与していることが知られていたが⁽¹¹⁾、持続的なERK経路の活性化は神経細胞の分化に重要であることが示されているものの、いまだ生理的および病理的な意義において不明な点が多かった。この点で、われわれの研究は細胞死に伴うROS依存的なERKの活性化がIL-11というサイトカイン産生に関与していることを初めて明らかにしたことになる⁽¹²⁾。

次に酸化ストレスにより誘導されるIL-11の機能を明らかにするために、解熱鎮痛剤の一つであるアセトアミノフェン（APAP）を用いた肝障害マウスモデルを用いて解析を行った。APAPの過剰摂取は抗酸化分子であるGSHの肝臓内枯渇を誘導し、APAP代謝物が肝細胞内のタンパク質や核酸と結合するため、肝細胞のネクロシスやアポトーシスを誘導する⁽¹³⁾。そしてGSHの枯渇に伴い肝細胞に強い酸化ストレスが誘導される。事実マウスにAPAP過剰投与を行うと、強い肝障害および肝臓内GSH量の減少に伴い、肝臓内のIL-11 mRNA量が著しく増大し、血清IL-11値の上昇が見られた。また、肝障害誘導前にIL-11受容体アゴニストの事前投与を行うと、APAP肝障害および酸化ストレスの減弱が見られただけでなく、肝細胞の組織修復に伴う細胞増殖が促進されていた。一方、IL-11の機能欠損モデルであるIL-11受容体欠損マウスではAPAP投与による肝障害が増悪し、酸化ストレスの亢進、および肝細胞の細胞増殖の減少が見られた。以上より細胞死に伴って誘導される酸化ストレスが、IL-11の産生を誘導することで細胞増殖を促進していることが明らかとなった。われわれの研究は、細胞死に伴う酸化ストレスが代償性増殖に関与していること、またIL-11が酸化ストレスと代償性増殖を仲介する因子であることを初めて明らかにしたことになる（図4）。

また、IL-11受容体アゴニスト投与群の肝臓では抗酸化作用のあるヘムオキシゲナーゼ1（HO-1）や低分子量熱ショックタンパク質の一つであるHsp25の発現量が増大することから、IL-11の抗酸化作用にはこれらのタンパク質が関与している可能性が高い。また、IL-11の産生は酸化ストレス依存性に誘導されること、そして酸化ストレスが関与している急性腸管虚血による障害や心筋梗塞後の心不全時に見られる心筋線維化がIL-11投与により改善することなどを総合すると、IL-11は酸化ス

図4 ■ IL-11を介した酸化ストレスと代償性増殖モデル

細胞死に伴い酸化ストレスが誘導され、死細胞内でERK2/Fra-1依存性にIL-11の産生が誘導される。一方、産生されたROSは周囲の生細胞に働きかけ、周囲の細胞からのIL-11産生を誘導する。これらが相まって代償性増殖を誘導する。

トレスによる臓器障害に対するネガティブフィードバック機構の中心的な分子である可能性がある。このことはIL-11の投与が、酸化ストレスが病態の増悪に関与するさまざまな疾患の治療法として有効である可能性を示している。一方で、胃がんや大腸がんなどのマウスモデルにおいてIL-11の発現が亢進しており、IL-11受容体欠損マウスではがんの形成が抑制されることが報告されている。実際にヒトにおいても、IL-11の発現は胃がんや大腸がんなどで亢進していることも明らかにされている⁽¹⁴⁾。さらにROSやSTAT3の活性化は、がん化と密接に結びついていることが示されている⁽¹⁵⁾。これまで炎症とSTAT3を仲介する因子としてIL-6が注目されてきたが、IL-11が少なくともある状況においては、ROSによるSTAT3の活性化を仲介している可能性が高い。また、酸化ストレスが病態の増悪に関与しているような慢性疾患においては、IL-11の産生をブロックする低分子化合物が開発されれば、そのような慢性疾患の有効な治療法となる可能性もある。

創傷治癒や代償性増殖の過度の亢進や持続は、発がんと密接に結びついている可能性がある。事実ショウジョ

ウバエの系では, undead cellsを誘導することで, 代償性増殖が亢進した結果, 過剰な増殖が誘導されることが示されている⁽³⁾。仮に抗がん剤に耐性のがん細胞を“undead cells”と考えるならば, これらの細胞から増殖因子が持続的に放出され, 周囲のがん細胞に増殖シグナルを発している可能性も考えられる。また, 抗がん剤や放射線照射などにより大多数のがん細胞に細胞死を誘導した場合に, これらのがん死細胞からPGE₂やIL-11などを含めて複数の増殖因子が放出される可能性があり, これらの因子が残存したがん細胞の増殖をさらに促進し, 化学療法や放射線療法に対する抵抗性や, その後の再発に関与している可能性もある。実際のところ代償性増殖という現象がどれだけヒトの発がんやがん治療抵抗性に関与しているのかは, 今後の研究結果を待たなくてはならないが, がん治療を考えるうえで, これまでにない新たな視点を提供してくれる可能性がある。

また, 哺乳類で報告されている代償性増殖に関与する因子はわれわれの報告も含め, 成獣でのモデルを用いて同定された因子であることから, 発生過程における代償性増殖に関与する因子は, 全く別の因子である可能性もある。仮にそうだとするならば, 胎生期において代償性増殖に関与する因子を同定するための新たなモデルの開発が必要と考えられる。現在われわれは発生過程においてモザイク状に細胞死を誘導することのできるマウスモデルを樹立しており, このマウスモデルを用いることで, 発生過程において代償性増殖に関与する新たな因子の同定が可能となると考えられる。

- 1) S. Nagata *et al.* : *Cell*, **140**, 619 (2010).
- 2) H. D. Ryoo *et al.* : *Dev. Cell*, **7**, 491 (2004).
- 3) A. Bergmann *et al.* : *Sci. Signal*, **3**, re8 (2010).
- 4) H. Kono *et al.* : *Nat. Rev. Immunol.*, **8**, 279 (2008).
- 5) F. Li *et al.* : *Sci. Signal*, **3**, ra13 (2010).
- 6) T. Sakurai *et al.* : *Cancer Cell*, **14**, 156 (2008).
- 7) V. J. Thannickal *et al.* : *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **279**, L1005 (2000).
- 8) H. Nakano *et al.* : *Cell Death Differ.*, **13**, 730 (2006).
- 9) P. Niethammer *et al.* : *Nature*, **459**, 996 (2009).
- 10) X. Du *et al.* : *Blood*, **89**, 3897 (1997).
- 11) H. Nakano : *Trends Immunol.*, **25**, 402 (2004).
- 12) T. Nishina *et al.* : *Sci. Signal*, **5**, ra5 (2012).
- 13) J. A. Hinson *et al.* : *Handb. Exp. Pharmacol.*, **196**, 369 (2010).
- 14) T. Putoczki *et al.* : *J. Leukoc. Biol.*, **88**, 1109 (2010).
- 15) H. Yu *et al.* : *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 798 (2009).

(中野裕康, 順天堂大学医学研究科)

プロフィール

中野 裕康 (Hiroyasu NAKANO)

＜略歴＞1984年千葉大学医学部医学科卒業／呼吸器内科医としての臨床研修を経て, 千葉大学大学院医学研究科博士過程修了。1995年順天堂大学医学部免疫学助手。2000～2003年戦略的創造研究推進事業「さきがけ」PRESTO研究員(兼任)。2007年より順天堂大学医学部免疫学准教授。＜研究テーマと抱負＞細胞死・酸化ストレス・炎症の三つのキーワードを中心に研究を展開中。興味のある学生や大学院生はご連絡ください (E-mail: hnakano@juntendo.ac.jp) ＜趣味＞読書 (メデカルスリラーもののpaperbacks), 映画, 演劇