COMMENTARY

癌細胞における抗アポトーシス分子 TUCAN-54 の役割

The Roles of a Novel Anti-apoptotic Protein, TUCAN-54,
in Cancer Cells

上口権二郎*・鳥越俊彦・山本雅明・佐藤昇志

Kenjiro KAMIGUCHI,* Toshihiko TORIGOE, Masaaki YAMAMOTO,
and Noriyuki SATO札幌医科大学医学部第一病理学講座 *Department of Pathology I, Sapporo Medical University School of
Medicine, Sapporo, JAPAN*

Several mechanisms have been described by which malignant cells escape from the immune system and/or chemotherapy. Recently we isolated TUCAN-54 gene that is over-expressed in a wide variety of epithelial cancers but not in normal counterparts. TUCAN-54 inhibited both death receptor-mediated and mitochondria/cytochrome C-mediated apoptosis. Moreover, down-regulation of TUCAN-54 in colon cancer cells by siRNA treatment could increase the sensitivity of the cells to an anti-cancer drug. Finally, we revealed that Fas-associated death domain protein (FADD) was physically associated with TUCAN-54, but not with TUCAN-48. Thus, TUCAN-54 might be a novel tumor-specific anti-apoptotic molecule, which might aggravate malignant potential of cancer cells, such as immunoresistance and chemoresistance.

(Received February 14, 2006; Accepted February 14, 2006)

1. はじめに

悪性腫瘍は、宿主であるわれわれの制御を受けずに無秩序に増殖し、われわれの大切な臓器を侵し、そしてわれわれを死に陥れる¹⁾。大部分の癌細胞はたった1個の正常細胞から発生し、1) 個体の制御を受けずに増殖し、2) 周囲の正常組織を破壊し、3) 血管新生を誘導し個体の栄養や酸素を多量に消費し、4) 遠隔臓器に転移し、5) 遺伝子変異を繰り返す、6) 体の防御機構である免疫システムから逃避し、7) 抗癌剤などにもしだいに耐性を示すようになる。それでは、なぜこのような性質を癌細胞はもっているのか、あるいは、それらの性質を獲得したために癌細胞と呼ばれるのか。その疑問に対する解答は現在も明らかではないが、世界中の研究者により精力的な研究がなされ癌のさまざまな生物学的な特徴が分子レベルで明らかになってきている。

正常細胞は通常はその存在した場所（組織）から離れて生きることは困難で、他の組織に移動した場合、アポトーシスなどにより個体から排除される。この過程が阻害されると、大腸癌が転移先の肝臓や肺でも盛んな増殖を起こし、転移という状態で観察される。一方、癌細胞は自己の

細胞が変化を起こしたものであり、免疫細胞であるTリンパ球からの攻撃を受けることとなる（腫瘍免疫と呼ばれる）。この攻撃はFasやTNF（腫瘍壊死因子）などの分子を介して行われるが、しばしば癌細胞はこれらの分子に対して抵抗性を示し、その結果、癌細胞は免疫監視機構の攻撃から逃れることができる。さらに、癌細胞はしばしば遺伝子変異を起こしながら細胞分裂を繰り返している。このため、増殖に必要な遺伝子の欠失により自ら細胞死を引き起こすようになる場合もあるが（悪性腫瘍はしばしば壊死した細胞を多く含む）、逆に、増殖に必要な遺伝子の過剰発現により増殖速度の増加が見られる場合や、アポトーシス経路のシグナル伝達分子の欠失により免疫系や抗癌剤に耐性を示すようになる場合もある（アポトーシス耐性の獲得）。

最近、われわれが同定した新規のアポトーシス抑制タンパク質、TUCAN-54は、大腸癌、胃癌、乳癌などに強く発現する分子であるが、腫瘍発生部位である、大腸粘膜、胃粘膜、乳腺上皮などにはその発現は一切認めない。このため、この分子の発現こそが、これらの悪性腫瘍に悪性の性質、形質を付与していると考えTUCAN-54の解析を行った。本稿では、病理医として日常感じている腫瘍細胞の性質をTUCAN-54の発現、機能とから述べていただきたいと思います。

* Correspondence to: Kenjiro KAMIGUCHI, *Department of Pathology I, Sapporo Medical University School of Medicine, South-1 West-17 Chuo-ku, Sapporo 060-8556, JAPAN*, e-mail: kkamigu@cc.sapmed.ac.jp

上口権二郎, 札幌医科大学医学部第一病理学講座, 〒060-8556 札幌市中央区南1条西17丁目

2. TUCAN-48 と TUCAN-54 の構造と組織発現

TUCAN (TUCAN-48) と呼ばれる分子は、2001 年にアメリカのグループから同定²⁾された大腸癌に多く発現する分子であり、Fig. 1 に示すように、CARD ドメインという構造をもっている。このドメインは、アポトーシスにかかわるいくつかのシグナル伝達分子がもつドメインで、アポトーシスシグナル分子同士が相互作用する際に重要な役割を果たしている。一方、私たちの研究室では以前より腫瘍免疫機構の研究を行っており、TUCAN-48 が腫瘍免疫治療の標的分子の候補として考え、抗体を作成し、解析を行った。Fig. 2 は 3 名の乳癌患者から採取した乳癌組織 (T) と周囲の正常乳腺組織 (N) のペアのサンプルを用いたウェスタンブロットであるが、TUCAN-48 の発現は腫瘍にも正常乳腺にも認めており、腫瘍特異的ではないことが明らかとなった³⁾。ところが、このとき同時にサイズが少し大きいバンドを認め、このバンドは腫瘍のみに選択的に発現していた (TUCAN-54)。この分子が他の症例でも腫瘍のみに発現するかどうかを検討するため、さらに患者数を増やし、また、大腸癌、胃癌などの他の悪性腫瘍に関しても解析を行った。その結果、TUCAN-54 は幅広い上皮系

Fig. 1. TUCAN-48 (TUCAN) と TUCAN-54 の構造。TUCAN-54 は TUCAN-48 の構造の大部分を含んでいる。CARD (caspase-associated recruitment domain) ドメインはアポトーシスにかかわるシグナル分子が共通してもっているドメインである。

の腫瘍に発現していたが、正常の周囲組織には TUCAN-48 は認めても TUCAN-54 の発現は全く認めなかった。すなわち、例えば大腸癌の場合では、大腸の正常上皮細胞にはもともと TUCAN-54 は発現していないのだが、細胞の腫瘍化 (つまり大腸癌の発生) に伴い、この分子は発現するようになるのである。そこでわれわれは、「腫瘍特異的に発現するからには、腫瘍が生体で生き残るための何らかの強力な作用を有するに違いない」と信じ、この分子を同定し、解析を行った。その結果、Fig. 1 に示すように TUCAN-54 は TUCAN-48 よりも N 末が 80 アミノ酸残基長い。大部分は共通の配列であることがわかった。両者の TUCAN は同じ遺伝子から発現しており、第 4 染色体に存在する。

3. TUCAN-48 と TUCAN-54 のアポトーシスにおける役割⁴⁾

前述したように、TUCAN-48 は、もともとアポトーシスを抑制する分子として同定された。ここで、アポトーシスのシグナル伝達に関してごく簡単に述べる。Fig. 3 に示

Fig. 2. ヒト乳癌組織と周囲正常乳腺組織の TUCAN の発現 (文献 3 より改変) 3 名の乳癌患者の TUCAN の発現をウェスタンブロット法で解析した。TUCAN-48 は正常乳腺 (N) と乳癌組織 (T) の両者に発現するが、TUCAN-54 は乳癌にのみ発現している。

Fig. 3. デスレセプター経路 (A) といわゆるミトコンドリア経路 (B) のアポトーシスシグナルの概略図。(詳細は本文および成書を参照されたい。)

すのは細胞のアポトーシスの経路であるが、これは大きく二つの経路に分けることができる。一つが細胞死受容体(デスレセプター) 経由のアポトーシスシグナル (Fig. 3A) であり、もう一つは、ミトコンドリア経由のもの (Fig. 3B) である。A のデスレセプターには、Fas や TNF 受容体などが含まれる。すなわち、Fas に対するリガンド FasL が Fas (受容体) に結合すると、下流の分子にシグナルが伝達され、最終的に細胞はアポトーシスに陥る。一方、ミトコンドリア経路 (B) では、多くの抗癌剤、放射線・紫外線、低酸素、増殖因子の欠乏などが誘引となり、ミトコンドリアからチトクローム C が遊離され、下流の分子にシグナルが伝達され、細胞はアポトーシスに陥る。これらの両者の経路の伝達には、下流では共通の分子も用いているが、上流では全く別の分子群を用いている。これらのアポトーシス経路が細胞に存在することは、膨大な細胞の集団として構成される個体が不必要な細胞を体内から除去する際に非常に有用であり、悪性度の高くない腫瘍細胞の多くはアポトーシスにより生体から除去されていると考えられている。しかし逆に、これらの経路の破綻は、生体に害を及ぼす細胞の存在を認めることになり、その一部が悪性腫瘍であるといえる。

TUCAN-48 は上記のミトコンドリア経路のシグナル伝達を阻害し、細胞をアポトーシス刺激から保護する分子として報告された。TUCAN-54 は TUCAN-48 の構造の大部分をもっているため、まず、TUCAN-54 が TUCAN-48 と同じ機能をもっているかどうかを解析した。Fig. 4A は、遺伝子導入法により TUCAN-48、TUCAN-54 を Jurkat 細胞に安定発現させ、セリンスレオニンキナーゼ阻害剤である Staurosporine 処理した際のアポトーシス細胞の割合を示している³⁾。コントロール細胞 (Mock) に比較して、TUCAN-48 発現細胞では非常に強いアポトーシス抑制が観察された。また、TUCAN-54 発現細胞においても、TUCAN-48 ほどではないが、強いアポトーシス抑制を認めている。この結果や他の実験結果から、TUCAN-54 はミトコンドリア経由のアポトーシスシグナルを抑制することがわかった。

4. TUCAN-54 のデスレセプター経路のアポトーシス抑制効果

前述したように、TUCAN-54 は正常細胞が腫瘍化する際に初めて発現するが、TUCAN-48 は正常細胞にも恒常的に発現しているタンパク質である。仮に TUCAN-54 の機能が単にミトコンドリア経路 (Fig. 3B) のアポトーシスの阻害であれば、腫瘍細胞にとって TUCAN-54 の発現はさほど有利であるとは思われない。むしろ TUCAN-48 のほうがアポトーシス抑制機能は強く腫瘍細胞にも有利であると考えられる。そこで、次に TUCAN-54 が細胞表面受容体経由のアポトーシスシグナル (Fig. 3A) を抑制するかどうかの解析を行った。Fig. 4B は、アポトーシス受容体である Fas に対する抗体で細胞を処理し、アポトーシス細胞の割合を検討したものである。TUCAN-54 の発現は、Fas 経路のアポトーシスを強く抑制した。一方、TUCAN-48 の発現は、Staurosporine 処理の場合は強く機能して

Fig. 5. TUCAN-54 の発現低下は、ヒト大腸癌細胞株 Colo 205 の抗癌剤 VP-16 の感受性を増加させる (文献 3 より改変)。2 種類の TUCAN-54 特異的 siRNA を用いて Colo205 細胞の TUCAN-54 を発現低下させ、抗癌剤 VP-16 誘導性細胞死を解析した。TUCAN-54 特異的 siRNA 処理細胞 (白棒, 黒棒) の 1 mM VP-16 における細胞死の割合は、コントロール siRNA 処理細胞 (斜線棒) の 100 mM VP-16 における細胞死とほぼ同様であった。

Fig. 4. TUCAN を遺伝子導入した Jurkat 細胞の Staurosporine (A), あるいは抗 Fas 抗体 (B) により誘導されたアポトーシス細胞の割合 (文献 3 より改変)。

いたにもかかわらず (Fig. 4A), Fas 経路のアポトーシス抑制効果はほとんど認めなかった. 図には示さないが, Fas 以外のもう一つの主要なアポトーシス誘導受容体として知られる TNF 受容体経路のアポトーシスも, TUCAN-54 のみが強い抑制効果を示した. したがって, Fig. 4 から, TUCAN-54 は, 主要な二つのアポトーシス経路の両者をたった 1 種類の分子で阻害する機能を持ち, これが癌細胞のさまざまな悪性の形質と強く結びついている可能性が示唆された.

5. TUCAN-54 発現抑制による癌細胞の抗癌剤感受性増加

上記の結果はすべて, TUCAN-54 を外来性に遺伝子導入した実験結果である. したがって, 癌細胞内で内因性に発現する TUCAN-54 が抗アポトーシス作用を持っているのかどうかは明らかにしていない. そこで次に, 実際にヒト癌細胞に高発現する内因性の TUCAN-54 を特異的に発現低下させ (siRNA 法), それらの細胞を抗癌剤処理し, 抗癌剤感受性の変化を検討した. Fig. 5 は, 2 種類の TUCAN-54 特異的 siRNA により TUCAN-54 を一過性に

発現低下させた大腸癌細胞株を抗癌剤 VP-16 処理し, 死細胞 (アポトーシスを起こした細胞) の割合を検討したものである³⁾. コントロール (斜線棒) では, 10 mM から 100 mM の間で, VP-16 による死細胞の割合が約 2 倍になった. ところが, 内因性 TUCAN-54 の発現を下げた siRNA-1 (白棒) および siRNA-2 (黒棒) では, いずれも 0 mM から 1 mM の間で, 死細胞の割合は約 2 倍になっている. また, 1 mM の VP-16 処理では, siRNA1 および siRNA2 は, コントロールの約 2 倍の細胞死が観察された (10 mM でも同様). さらに, 1 mM での TUCAN-54 の発現低下によるアポトーシス細胞の割合 (白棒, 黒棒) は, コントロール (斜線棒) での 100 mM のそれとほぼ同様の割合であり, すなわち, TUCAN-54 の発現低下は抗癌剤の感受性を強く増加させることがわかった.

6. TUCAN-54 によるアポトーシス阻害の分子メカニズム

以上に述べたように, TUCAN-54 は 1) 二つの主要なアポトーシス経路であるデスレセプター経路のアポトーシス (Fig. 3A) とミトコンドリア経路のアポトーシス (Fig. 3B) を抑制し, 2) その発現低下は実際に抗癌剤感受性を増加させることが明らかとなった. それでは一体どのような分子メカニズムによって TUCAN-54 がアポトーシスを抑制するのか. まず, ミトコンドリア経路のアポトーシスに関しては, TUCAN-48 の論文ですでに報告されているが, TUCAN-48 は Fig. 3 の caspase-9 の前駆体 (procaspase-9) と結合することでミトコンドリア経路のアポトーシスを抑制すると考えられている. TUCAN-54 は TUCAN-48 の構造はほとんどすべてもっている (Fig. 1), 同様に TUCAN-54 も caspase-9 と結合することでミトコンドリア経路のアポトーシスシグナルを阻害していると考えている. 次に, TUCAN-54 の Fas 経路のアポトーシス阻害のメカニズムであるが, Fig. 6 に Fas 誘導性アポトーシス経路の概略図を示す. Fas から刺激は, 細胞内の FADD (Fas-associated death domain protein) を介して procaspase-8 に伝えられる. Fig. 7 は, 293 T 細胞に TUCAN-54 あるいは TUCAN-48 とともに FADD を一過性

Fig. 6. Fas 経路のアポトーシスシグナルの概略図 (部分).

Fig. 7. TUCAN-54 は FADD と結合する (文献 3 より改変). 293T 細胞に TUCAN-54 あるいは TUCAN-48 とともに FADD を一過性遺伝子導入し, 抗 TUCAN 抗体で免疫沈降 (I.P.) し, ウェスタンブロット法により TUCAN 分子と FADD 分子の結合を解析した. TUCAN-54 のみが FADD と結合している.

性遺伝子導入し、抗 TUCAN 抗体で免疫沈降し、ウェスタンブロットにより TUCAN 分子と FADD 分子の結合を解析したものである³⁾。Fig. 7 右の免疫沈降 (IP) の結果で、FADD は TUCAN-54 の免疫沈降物内に含まれるが、TUCAN-48 のそれには含まれなかった。したがって、TUCAN-54 のみが特異的に FADD と結合していることがわかった。細胞内での実際のメカニズムは証明していないが、われわれは TUCAN-54 が細胞内で FADD と結合し、Fas からのシグナル伝達を阻害していると考えている。TNF 受容体経路のアポトーシスにおいてもシグナル伝達には FADD を用いているので、同様なメカニズムが推測される。

7. おわりに

癌医学における最近の検査精度の上昇や治療技術の進歩は目覚ましく、数年前には治療不可能であったある種の癌も、現在では治療可能となっている例も少なくない。また、基礎研究においても癌の研究は日々進歩しており、次々と癌細胞の生物学が明らかになってきている。しかし現実の癌で亡くなる人の状況は科学の進歩とは正反対で、日本人

における癌の死亡率は昭和 51 年以降、増加の一途をたどっている。遠い未来になってしまう可能性もあるが、人が癌では死ななくなるような時代に向け、TUCAN-54 の解析が少しでも癌治療医学に役立つことを願っている。

最後となりましたが、私のような若輩を非常にハイレベルな学会にお招き下さり、東京薬科大学・志田保夫先生をはじめ BMS コンファレンスの皆様に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) V. Kumar, A. K. Abbas, and N. Fausto, "Pathologic Basis of Disease," 7th ed., Elsevier Saunders (2004).
- 2) N. Pathan, H. Marusawa, M. Krajewska, S. Matsuzawa, H. Kim, K. Okada, S. Torii, S. Kitada, S. Krajewski, K. Welsh, F. Pio, A. Godzik, and J. C. Reed, *J. Biol. Chem.*, **276**, 32220 (2001). Epub 2001, Jun. 14.
- 3) M. Yamamoto, T. Torigoe, K. Kamiguchi, Y. Hirohashi, K. Nakanishi, C. Nabeta, H. Asanuma, T. Tsuruma, T. Sato, F. Hata, T. Ohmura, K. Yamaguchi, T. Kurotaki, K. Hirata, and N. Sato, *Cancer Res.*, **65**, 8706 (2005).
- 4) 田沼靖一編, "アポトーシスがわかる", 羊土社 (2001).

Keywords: Cancer, Apoptosis, Caspase