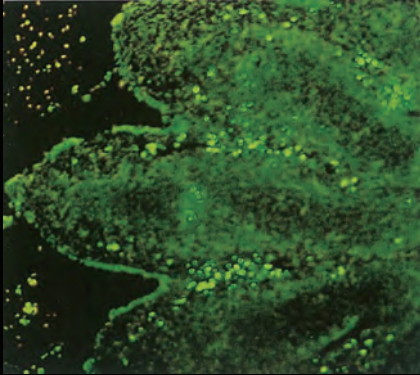
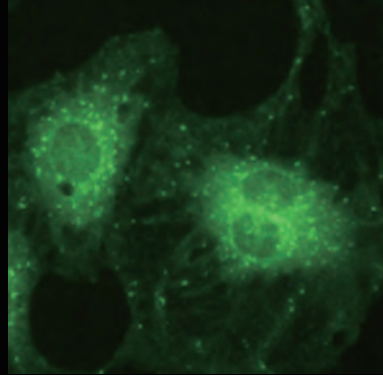


8. 細胞の死

死に意味はあるのか？



マウス指間間葉細胞
アポトーシスによって指間が形成されてゆきます。
写真提供：京都大学医学部解剖学教室 森千里先生



オートファジーが起きている細胞の免疫蛍光染色像
オートファゴソームをドット状の蛍光として観察できます。
LC3 抗体による飢餓状態のNRK 細胞の免疫蛍光染色。

8-1. プログラムされた死「アポトーシス」

細胞の死は、2種類あります。プログラムされていない死「ネクローシス」と、プログラムされた死「アポトーシス」です。

ネクローシスでは、突然の損傷などによって、細胞が膨張破裂して細胞の内容物を放出し、その一部は周りの組織に害を与える炎症反応を引き起こします。これに対して、アポトーシスでは、死のプログラムにしたがって、細胞が凝縮し、細胞骨格が壊れ、核膜が分断され、DNA は断片化し、最終的にはアポトーシス小体と呼ばれる小さな凝集体になり、マクロファージに貪食され、消化された成分は再利用されます。ネクローシスのような炎症は起こさないとされています。

アポトーシスは、「多細胞生物で個体を健康的な状態に保つために細胞が自ら死を選択すること」だと捉えることもできます。様々な状況で起きることが知られており、脊椎動物の神経系の発生過程では、神経細胞の約半数がアポトーシスによって死んでいきます。また、マウスの足指の形成では、指と指の間の細胞がアポトーシスを起こして無くなることにより、指の間の隙間が形成されます(図、マウス指間間葉細胞)。成体の組織では、細胞分裂によって増える細胞とアポトーシスによって死んでゆく細胞は、釣り合いがとれています。

アポトーシスの進行は、カスパーゼファミリーのプロテアーゼに依存しています(参照:「シグナル伝達ポスター」p.135)。カスパーゼは、通常プロカスパーゼとよばれる不活性化型の状態にありますが、アポトーシスを誘導するシグナルによって活性化型に変わり、次々と他のカスパーゼを活性化します。カスパーゼ以外にアポトーシスを調節している因子として Bcl ファミリー

Pick Up from MBL

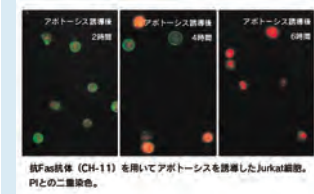
アポトーシス関連製品

MBL では、細胞にアポトーシスを誘導する抗 Fas 抗体をはじめ多数のアポトーシス関連抗体、キットを揃えています。また、シグナル伝達カスケードに関わるタンパク質に対する抗体も揃えていますので、是非ご利用ください。

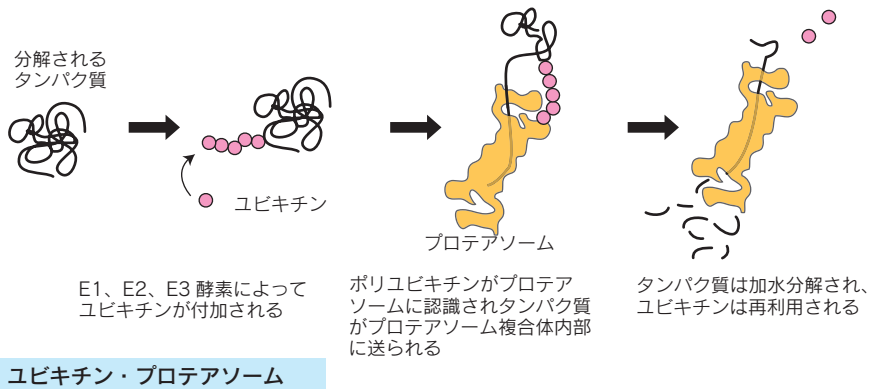
詳細は、MBL ライフサイエンスサイト (<http://ruo.mbl.co.jp/product/apoptosis/>) をご覧ください。



Annexin V Assay Kits の使用例



抗Fas抗体 (CH-11) を用いてアポトーシスを誘導したJurkat細胞、PIとの二重染色。



が知られています。Bak や Bax のようにミトコンドリアからシトクローム c を細胞質に放出してアポトーシスを促進するものもありますが、Bcl のようにアポトーシスを抑制するものもあります。外部からのシグナルとしては Fas、TNFR のような受容体から入るもの、あるいは、他の細胞から放出されるパーフォリン、グランザイムなどがあります。また、紫外線などによってもアポトーシスは引き起こされます。

8-2. 不要な物質のリサイクルシステム 「ユビキチン・プロテアソーム系」

ユビキチン・プロテアソーム系は、ユビキチンが多数結合したタンパク質をプロテアソームが選択的に分解するシステムです。最初に、E1、E2、E3 という酵素によって、不要となったタンパク質にユビキチンとよばれる小さなタンパク質が次々に付加（ユビキチン化）されていきます。多数のユビキチンが結合したタンパク質は、プロテアソームに認識され、プロテアソーム複合体内部に送られて、ATP 依存的に迅速かつ不可逆的に分解されます。

ユビキチン・プロテアソーム系は、免疫細胞における抗原提示、細胞が分裂するときの細胞周期の調節などにも重要な役割を果たしており、ユビキチン・プロテアソーム系の異常は、がんや感染症などの発症に関与すると考えられています。

8-3. 自分を食べる「オートファジー」

オートファジーは、真核生物における細胞内分解経路の一つです。プロテアソームが、ユビキチン化されたタンパク質を標的として選択的に分解するのに対し、オートファジーでは、細胞内で小胞に包み込んだものをまるごと消化します^{※1}。機能しなくなった細胞内小器官や侵入してきた細菌・ウイルス

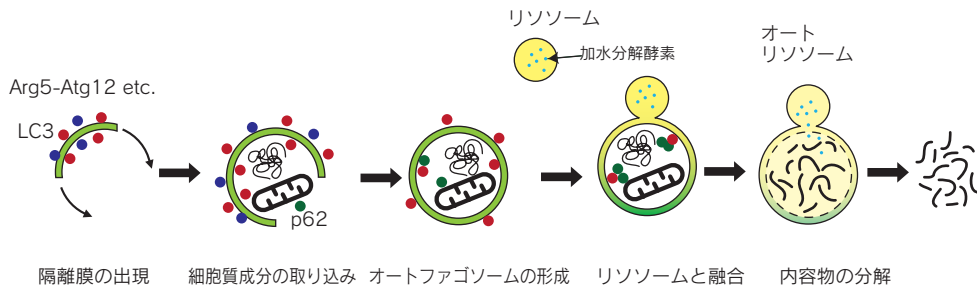
Pick Up from MBL

ユビキチン・プロテアソーム系関連製品

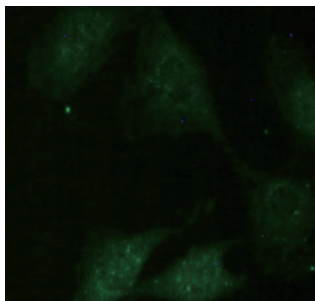
MBL はユビキチン・プロテアソーム系関連製品を取り揃えております。詳細は、MBL ライフサイエンスサイト (<http://ruo.mbl.co.jp/product/ub/>) をご覧下さい。



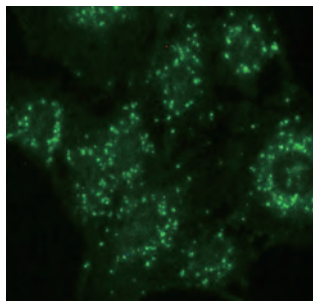
※1 バルク分解系と呼ばれます (bulk: ひとまとめにする、一括する)。



オートファジー



NRK 細胞 (栄養状態)



NRK 細胞 (飢餓状態)

飢餓状態の細胞を LC3 に対する抗体で蛍光染色すると、オートファゴソームをドット状の染色像として観察できる。

抗 LC3 抗体によるオートファジーの検出

スを膜で包み込み、「オートファゴソーム」という小胞を形成します。オートファゴソームは、加水分解酵素をもった細胞小器官「リソソーム」と融合し、オートファゴソームの内容物は分解されます。リソソームは、約 70 種類もの分解酵素をもっており、タンパク質、脂質、糖、核酸など、何でも分解できます。これらの仕組みで分解された物質は再利用され、不要なものは小胞に包まれて細胞膜まで運ばれ、膜の融合で細胞外に捨てられます（エクソサイトーシス）。しかし、分解しきれなくなると、タンパク質の集積・凝集がおこり、細胞は最終的な解決手段として自殺します。これは、オートファジーを伴ったプログラム細胞死として、アポトーシスとは区別されています。

細胞は、栄養が十分に与えられない状態（飢餓状態）におかれると、オートファジーを起こし、自分の細胞の一部を分解します（図。抗 LC3 抗体によるオートファジーの検出）。そのため、オートファジーは、当初、細胞が飢餓状態を生き抜くために自己消化することで栄養源を確保する仕組みだと理解されていました。しかし、通常的环境下でも、ユビキチン・プロテアソーム系と並んで、細胞成分の分解・リサイクルに働いていることがわかってきました。

また、オートファジーが長期間抑制されていると、腫瘍が発生しやすくなりますが、一度発生してしまった腫瘍細胞にとって、オートファジーは一時

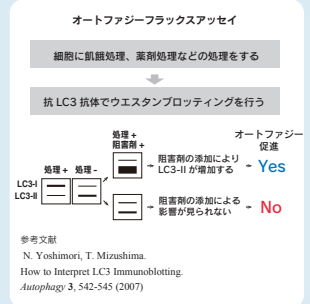
Pick Up from MBL

オートファジー関連製品

MBL は、オートファジー関連抗体・キットを、多数、開発・販売しています。

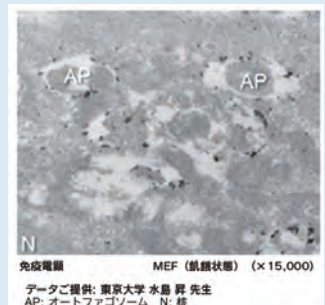
Autophagy Watch

抗 LC3 抗体とオートファジー経路の阻害剤がセットになっており、これらを用いてウエスタンブロッティングを行うことでオートファジー誘導の有無を調べる「オートファジーフラックスアッセイ」ができます。



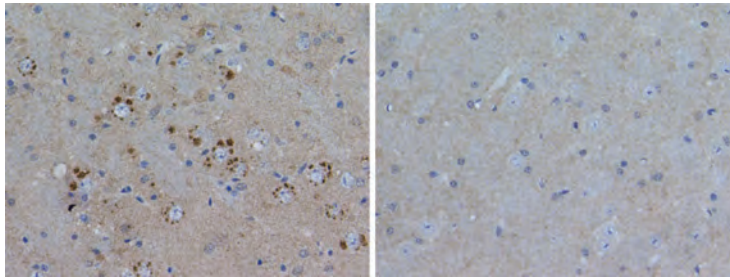
抗 LC3 抗体

Anti-LC3 mAb (M152-3) の使用例



詳細は、MBL ライフサイエンスサイト (<http://ruo.mbl.co.jp/product/autophagy/>) をご覧ください。





Atg5 conditional knockout

Wild

Atg5 conditional knockout マウスの脳をリン酸化 p62 (S403) 抗体で染色すると褐色の染色像が確認される。

抗リン酸化p62(S403)抗体による選択的オートファジーの検出

的な栄養供給システムとして、また腫瘍細胞の品質管理にも必要となります。がん治療の研究ではオートファジーを阻害する研究がおこなわれています。

さらに、オートファジーは、細菌感染防御、抗原提示、細胞死、発生、老化や各種の疾患への関連していることが報告されています。

選択的オートファジー

オートファジーは、細胞内で小胞として取り込んだ空間を丸ごと消化することから、非選択的な分解システムと考えられていました。しかし、近年、ミトコンドリアなどの特定のオルガネラや細菌、連結したユビキチンが結合したタンパク質（ポリユビキチン化タンパク質）が選択的に分解されることが分かってきました。これを「選択的オートファジー」と呼びます。

選択的オートファジーと p62

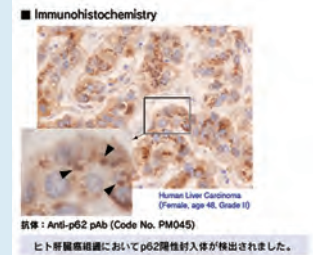
オートファゴソームには選択性がないため、選択的に分解される物質とオートファゴソームをつなぐ「アダプタータンパク質」が必要となります。そのアダプタータンパク質が「p62」です。p62 は、自身の 403 番目のセリン残基 (S403) のリン酸化により、選択的オートファジーを制御していることが報告されています。p62 は、細胞質中で分散しているか、p62 小体^{*1} とよばれる構造体の構成因子として存在しています (図、抗リン酸化 p62 (S403) 抗体による選択的オートファジーの検出)。p62 の S403 リン酸化を特異的に促進する薬剤の開発は、異常タンパク質の細胞内への蓄積を特徴とするアルツハイマー病、パーキンソン病などさまざまな神経変性疾患 (参照: 7-4、神経細胞が損傷される疾患「神経変性疾患」p.86) の治療への応用が期待されています。

また、351 番目のセリン残基 (S351) がリン酸化されている p62 と、生体防御関連因子の相互作用が明らかになり、この相互作用に対する阻害剤は、ヒトの肝がんの治療薬として期待されています^{*2}。

Pick Up from MBL

抗 p62 抗体

最近、p62 はオートファゴソームマーカーである LC3 に直接結合し、オートファジーにより選択的に分解されることが判明しました。実際、肝臓または脳特異的オートファジー欠損マウスにおいては、p62 は過剰に蓄積し、ユビキチン・p62 陽性の封入体が形成されました。重要なことに、ユビキチン・p62 陽性封入体は、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患やアルコール性肝炎、脂肪肝、肝臓患者組織においても確認されています。現在、これら疾患の発症とオートファジーによる p62 代謝不全の関連に注目が集まっています。



*1 p62 小体は、p62 を含んだオートファゴソーム、オートファゴリソーム、p62 の凝集体 (セクエストローム) の総称です。

*2 ヒトの肝がん細胞では p62 が異常に蓄積し 351 番目のセリン残基 (S351) がリン酸化され、生体防御経路 (Keap1-Nrf2 経路) が活性化されることが報告されました。肝がん細胞でも選択的オートファジーがおき、生体防御が効率的に働くため、がん細胞の生存が可能になっていると考えられています。

8-4. 疾患「パーキンソン病・クローン病」

パーキンソン病

ユビキチン・プロテアソーム系の遺伝子に変異がおこると、神経系の細胞に異常なタンパク質の蓄積がみられることが知られています。パーキンソン病の特徴は、細胞内にレビー小体という凝集体が蓄積することです。ユビキチンを活性化する酵素の遺伝子変異が原因の一つと考えられています。また、レビー小体を蓄積しないタイプのパーキンソン病も知られていて、その原因は、細胞内で損傷し機能が低下したミトコンドリアを分解処理するパーキンという、ユビキチンリカーゼ遺伝子の変異であることがわかりました。パーキンは、膜電位を消失した損傷ミトコンドリアに集積し、ユビキチン化します。それがきっかけとなり、損傷ミトコンドリアは、オートファジーによって分解されます。損傷ミトコンドリアが残ったままになると、活性酸素の発生源となって細胞を傷つけます。このようなオートファジーによるミトコンドリアの選択的分解は、「マイトファジー」と呼ばれています。パーキンソン病の一部は、マイトファジーの異常によるものと考えられます。

クローン病

ATG16L1 は、オートファゴソームを作るのに必要な因子ですが、その遺伝子変異とクローン病・潰瘍性大腸炎の病態の関連が注目されています。腸管上皮細胞でのオートファジー機能がうまく働かないと、パネート細胞（腸管細胞の一種）が成熟できないために、腸管バリア機能が低下し、慢性持続性の炎症が起こるのではないかと考えられています（参照：9-5. 腸管は最大の免疫器官「腸管免疫」p.103）。

8-5. 増えつづける細胞「がん」

がん細胞とは、特定の遺伝子の変異により細胞増殖の制御が効かなくなり、無秩序に増殖するようになった異常な細胞のことです。

細胞の増殖は、増殖因子が受容体に結合してはじまります。増殖因子がないときには、Rb や p53 という細胞分裂抑制因子が細胞の増殖を抑えています。増殖因子が受容体に結合しなくても、受容体やシグナル伝達経路に関する遺伝子に異常が生じ、細胞増殖が抑制されなくなると、がんが誘発されます。一方、体細胞でのがん抑制因子が、遺伝子変異によって機能が低下したり、なくなったりした場合にもがん化が起こります。例えば、p53 遺伝子の変異は多くのがん細胞で見られることが知られています。正常細胞では p53 タンパク質はごく微量しか存在しませんが、p53 遺伝子に突然変異が生じると半減期が延長し、変異 p53 タンパク質が細胞核内に蓄積します。がん細胞が壊れ、変異 p53 が体内に出て行くとそれに対する自己抗体が作られます。p53 に対する自己抗体はがんの早い段階から出現するため、変異 p53 タンパク質を検出するよりも早期にがんを発見することが可能です。

Pick Up from MBL

MESACUP™ anti-p53 テスト

MBL は、食道がん、大腸がん、乳がんの診断の補助に有用な ELISA 法による MESACUP™ anti-p53 テストを販売しています。

- ◎ 腫瘍マーカーとして初の自己抗体測定キットです。
- ◎ 既存マーカーより早期がんの検出率が高くなります。

詳細は MBL 臨床検査薬サイト (<http://ivd.mbl.co.jp/search/detail/7640.html>) をご覧ください。



基礎研究用にはこちらの ELISA キットもごさいます。

Total p53 ELISA Kit

Phospho-p53 Ser46 ELISA Kit

Phospho-p53 Ser392 ELISA Kit

詳細は MBL ライフサイエンスサイト (<http://ruo.mbl.co.jp/product/discovery/p53.html>) をご覧ください。



また、ある遺伝子型のヒトパピローマウイルス（HPV）の持続感染が子宮頸がんの発症原因になることも知られています。

がんが、遺伝子の変異やウイルスの感染によって引き起こされることが証明され、遺伝子産物を標的とした抗がん剤が多数開発されました。がんの個性にあわせた分子標的薬は、従来の抗がん剤にくらべ副作用が少ないこと、投与前に効果のある程度予測できることが特徴です。しかし、がん細胞は変異しつづけ、分子標的薬の耐性を獲得していくことが報告されています。薬剤耐性をもったがんに対応する治療のために、遺伝子検査はますます重要になっています。

また、エピジェネティクスレベルでのがん研究も進んでいます。例えば、肺がん、乳がん、前立腺がんでは、がん抑制遺伝子に結合しているヒストン H3 の 27 番目のリジンがメチル化されるとがん抑制遺伝子が働かなくなり、転移したり悪性化します。これまで、がんは、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の塩基配列の変異と考えられていましたが、エピゲノムの変化もその一因となることが明らかになりました。さらに、がんの発症で、microRNA 量の減少や増加がみられることが報告されています。慢性リンパ性白血病では、microRNA の miR-15a と miR-16a 遺伝子が働かなくなることが原因の一つとして考えられています。一方、小細胞肺がんでは、miR-17-92 が著しく増加しています。miR-17-92 が標的とする遺伝子には、腫瘍抑制遺伝子や細胞周期を調節する遺伝子が含まれています。

いきものコラム ハダカデバネズミ「がんにならない生き物」

ハダカデバネズミは、アフリカに生息するげっ歯類の一種です。地中に穴を掘って、平均 80 頭ほどの群れで生活しています。体表にはほとんど毛がありません。また、同じ大きさのマウスに比べて寿命が約 30 年と 10 倍近く長いので、研究の対象になってきました。

さらに、長年の研究の中で、ハダカデバネズミにがんが発見されたことはありません。ハダカデバネズミは、ガンマ線を打ち込んだり、腫瘍を移植したり、発がん物質を注射したりしても、がんにならないのです。

そのメカニズムは研究者達の注目を集め、一定のサイズに達した細胞群に新たな細胞を増殖させない「過密」遺伝子として知られている *p16* という遺伝子が、がんを防いでいるとする論文や、ハダカデバネズミに特異的に見られる「密度の高いヒアルロン酸」が細胞の増殖を調整して、がんを防いでいるとする論文が発表されています。



Pick Up from MBL

がん関連診断薬・研究用試薬

MBL では、腫瘍マーカーの測定試薬や、xMAP® (Luminex®) テクノロジーによる MEBGEN™ シリーズ、ジェノサーチ™ シリーズで遺伝子変異の検出やウイルスの遺伝子型の判定ができる試薬を開発・販売しています。

■腫瘍マーカー

乳がんマーカー測定試薬

ステイシア MEBLux™ テスト

BCA225

多発性骨髄腫の診断基準である FLC 定量試薬

FREELITE® 試薬

尿路上皮がんマーカー測定試薬

Bladder チェック [NMP22]

■遺伝子変異の検出

RAS 遺伝子変異検出キット

MEBGEN™ RASKET キット

大腸がん治療における抗 EGFR 抗体薬の投薬前検査に有用です。

■ウイルスの遺伝子型の判定

ハイリスクヒトパピローマウイルス (HPV) 核酸タイピングキット

MEBGEN™ HPV キット

ハイリスク HPV のタイピングは子宮頸がんの発症リスク管理・治療方針の選択に有用です。

ヒトパピローマウイルス (HPV) の遺伝子タイプ判定用キット

GENOSEARCH™ HPV 31

HPV 遺伝子タイプ 31 種類を「高感度」に「全て同一感度」に検出可能です。