

—総説—

ヌクレオソーム単位での DNA 断片化を伴わない 細胞死の解析

井口和弘^{a)}、臼井茂之^{a)}、石田良司^{b)}、平野和行^{a)}

要約： DNA のヌクレオソーム単位での断片化はアポトーシスの特徴的変化の一つであるが、断片化の欠損するアポトーシスも報告されている。本研究では、アポトーシスの核変化誘導機序の解明のために、DNA 断片化を伴わない細胞死におけるその欠損原因の解析を行った。(1) ヌクレオソーム単位での DNA 断片化欠損はネオカルチノスタチンにより誘導された Molt-4 細胞のアポトーシスにおいて認められた。この時、DNA 断片化に必須であるとされている DNA fragmentation factor (DFF) は Molt-4 細胞において正常に機能していたことから、DFF だけで DNA 断片化の誘導を説明することはできないと考えられた。(2) イミダゾールによる細胞内酸性化は DNA 断片化を抑制したが、細胞内 pH の中性化により断片化誘導が認められた。このことはアポトーシスにおける DNA 断片化誘導には細胞内 pH が中性付近に保持されることが必要であることを示唆する結果である。(3) 亜鉛とノコギリヤシ果エキスは前立腺癌細胞株にヌクレオソーム単位での DNA 断片化を欠損した細胞死を誘導し、この時の細胞死のタイプは主としてネクローシスであった。これらの知見はアポトーシスの実行過程の解明に重要な情報を与える。

索引用語： アポトーシス、ネクローシス、オリゴヌクレオソーム単位での DNA 断片化

Cell Death Associated with No Oligonucleosomal DNA Fragmentation

Kazuhiro IGUCHI^{a)}, Shigeyuki USUI^{a)}, Ryoji ISHIDA^{b)}, Kazuyuki HIRANO^{a)}

Abstract: Oligonucleosomal DNA fragmentation is a hallmark of apoptosis, however the fragmentation does not always occur in apoptotic cell death. In the present study, we examined the cause of no oligonucleosomal DNA fragmentation in the cell death to clarify the ladder formation mechanism during apoptosis. (1) Oligonucleosomal DNA fragmentation was not observed in neocarzinostatin (NCS)-induced apoptotic Molt-4 cells. DNA fragmentation factor (DFF), which is essential for the apoptotic ladder formation, was found to be functionally expressed in these cells, suggesting that the DFF expression is not sufficient to induce the oligonucleosomal DNA fragmentation. (2) Intracellular acidification by imidazole inhibited the formation of oligonucleosomal DNA fragmentation and the neutralization in these cells induced DNA fragmentation. This result suggests that maintaining intracellular pH in the neutral range is essential for the induction of apoptotic DNA fragmentation. (3) Zinc and the extract from *S. repens* induced cell death, associated with no oligonucleosomal DNA fragmentation in prostatic cancer cell lines. Zinc and the extract-treated cells exhibited mainly necrotic features. These findings provide important information about the execution phase of apoptosis.

Key phrases: apoptosis, necrosis, oligonucleosomal DNA fragmentation

1. 緒言

細胞が死に至る経路は一般的に、「アポトーシス」と「ネ

クローシス」の 2 通りに分けて考えられている。アポトーシスは内在的なメカニズムによる自己破壊的な細胞死であり、細胞核の断片化を伴い、その形態は極めて特徴

^{a)} 岐阜薬科大学薬剤学教室 (〒502-8585 岐阜市三田洞東 5-6-1)

Laboratory of Pharmaceutics, Gifu Pharmaceutical University (5-6-1, Mitahora-higashi, Gifu502-8585, JAPAN)

^{b)} 愛知県一宮保健所 (〒491-0867 愛知県一宮市古金町 1-3)

Aichi Prefectural Ichinomiya Public Health Center (1-3, Kogane-machi, Ichinomiya, Aichi491-0867, JAPAN)

的である。一方、ネクローシスは加熱や虚血など急激な細胞環境の変化に伴う物理的および化学的な傷害による細胞死である。ネクローシスは漠然とアポトーシスに対する細胞死として捉えられており、正確に定義されていないが、細胞容積の増大や細胞膜の破壊を伴うことが知られている。

アポトーシスはもともと細胞死の形態に基づき定義された概念であるが、現在ではその形態学的特徴と生化学的特徴によって定義されている¹⁻⁸⁾。アポトーシス細胞の形態学的特徴として、クロマチンの異常凝縮¹⁻³⁾、細胞表面の水疱形成、アポトーシス小体の形成^{1,2)}が挙げられ、またその生化学的特徴として、caspase ファミリープロテアーゼの活性化⁴⁻⁶⁾、ヌクレオソーム単位での DNA 断片化⁷⁾ およびホスファチジルセリン (PS) の細胞外膜への露出⁸⁾が挙げられる。これらのアポトーシス細胞に特徴的な変化は、以下に述べるアポトーシスの情報伝達機構が遂行された結果としての現象である。

アポトーシスの情報伝達機構は便宜的に誘導、決定、および実行の 3 つの過程に分けて考えることができる^{9, 10)} (Fig. 1)。誘導段階はアポトーシスの刺激が細胞に導入される過程、決定段階は細胞死の不可逆点 (point of no-return) を通過する過程、すなわち細胞に導入された刺激を細胞がアポトーシスシグナルとして受け取ってから caspase-3 が活性化されるまでの過程、実行段階は caspase-3 活性化以降の最終的な形態変化を示す過程である。アポトーシスの誘導段階と決定段階は、シグナルの種類や細胞の種類によって多様性を示すが、その概略は細胞死の受容体 (Fas, TNFR) を活性化する経路^{11, 12)} とミトコンドリアへシグナル伝達される経路^{13, 14)} に分類され、ともに caspase-3 活性化へと導かれる。すなわち、細胞死の受容体を活性化する経路は、死の受容体と死のリガンドが結合した後、蛋白-蛋白間相互作用により caspase-8 が活性化された後、caspase-3 の活性化が

誘導される。一方でミトコンドリアへシグナルが伝達される経路は、cytochrome c の細胞質への放出を引き金として、アポトソーム (cytochrome c, Apaf-1, caspase-9 複合体) 形成により caspase-3 活性化に至る。

アポトーシスの実行段階は、誘導および決定段階により caspase-3 活性化に収束された細胞死のシグナルが、細胞内タンパク質および核酸の分解を引き起こし、最終的なアポトーシス細胞に特有の形態変化をもたらす過程である。この実行段階で観察される共通の現象としては、細胞の縮小¹⁻³⁾、核クロマチンの異常凝縮¹⁻³⁾、核の断片化⁷⁾、被食¹⁵⁾があり、これらの現象はアポトーシスの定義にもなっている。この一連の過程は、核内や細胞質で起こる特定の蛋白質の限定分解や、DNA のヌクレオソーム単位での断片化といった反応により遂行される。これらの反応を司る因子として、caspase や DNA エンドヌクレアーゼの解析が進められている¹⁶⁻²⁶⁾。

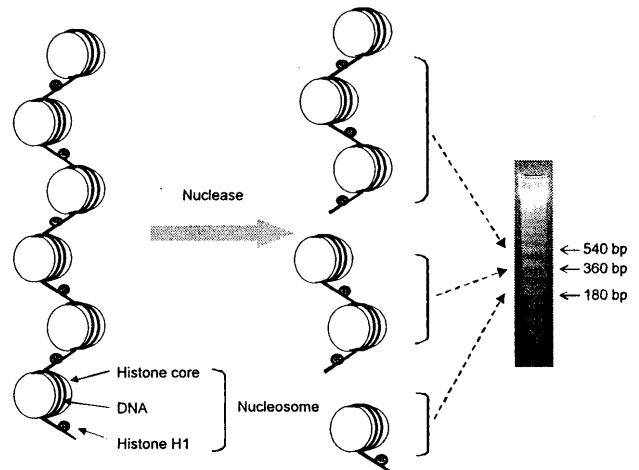


Fig. 2 Oligonucleosomal DNA fragmentation in apoptotic cells

アポトーシスにおけるヌクレオソーム単位 (180~200 bp の整数倍) での断片化 DNA の出現は、1980 年に Wyllie⁷⁾ によって見出された。彼はアポトーシス細胞の DNA を抽出してアガロースゲル電気泳動で分離すると 180~200 bp の整数倍の梯子状の泳動像が検出されることを示した。この DNA 断片化は現在においてもアポトーシスの hallmark (生化学的指標) として、細胞死の判別に広く利用されている。このような DNA 断片の形成は、真核細胞の DNA が核内でクロマチンと呼ばれる構造体で存在することに起因している^{27, 28)}。クロマチンはヌクレオソームという基本構造単位から成り立つ複合体であり、この構造を形成することにより、膨大な情報量を持つ長い DNA が核内でコンパクトにまとめられている^{27, 28)}。ヌクレオソームはヒストン 8 量体 (ヒストンコア) の周りに二本鎖 DNA が約 2 回巻き付き、リンカー部分においてヒストン H1 で結ばれた DNA-タンパク質

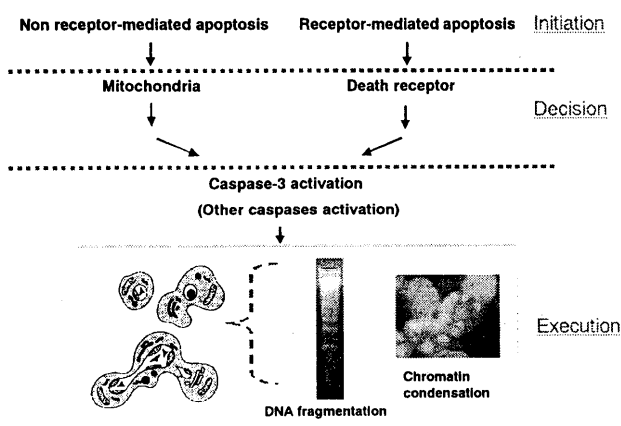


Fig. 1 Intracellular signaling of apoptotic cell death

の繰り返し構造であり、180~200 bp の DNA を含んでいる^{29, 30)}。アポトーシスでは、エンドヌクレアーゼがヌクレオソームのリンカー部分を切断することから、ヌクレオソームのオリゴマーが生じることとなり、ゆえに180~200 bp の整数倍の DNA 断片が検出される (Fig. 2)。

このようなアポトーシスにおける DNA 断片化を触媒するヌクレアーゼは現在までに数多く報告され、混沌とした状態にある¹⁶⁻²⁶⁾。例えば、細胞内の Ca イオン濃度上昇により活性化される Ca²⁺, Mg²⁺-dependent DNase¹⁶⁻¹⁹⁾ (NUC18, DNAS1L3, DNase γ)、pH 低下により活性化される DNase II^{20, 21)}、caspase により活性化される DNA fragmentation factor-40 [DFF-40 (CAD/CPAN)]²³⁻²⁶⁾ などがある候補として挙げられており、これらのヌクレアーゼのアポトーシスにおける役割が詳細に検討されている。近年、ヌクレオソーム単位での DNA 断片化は、アポトーシスにおいて例外なく誘導が認められるのではなく、DNA 断片化を欠損したアポトーシスも報告されている³¹⁻³⁴⁾。

本研究では、DNA 断片化を欠損する各種細胞死の解析を行うことによって、アポトーシスにおけるオリゴヌクレオソーム単位での DNA 断片化誘導機序の解明を試みた。

2. ヌクレオソーム単位での DNA 断片化欠損細胞における DFF の機能解析

アポトーシスに伴うヌクレオソーム単位での DNA 断片化を触媒するヌクレアーゼとして、NUC18¹⁶⁾、DNase γ ¹⁸⁾、DNAS1L3¹⁹⁾、DNase II^{20, 21)}、DFF-40²³⁻²⁶⁾ 等が報告されている。これらのヌクレアーゼのなかで、DFF-40 は caspase により活性化を受けるため、細胞死の進行の面から考えると合理的であり、アポトーシスにおける DNA 断片化を司る酵素として特に注目されている。

DFF-40 は正常細胞では DFF-45 (ICAD) に結合してヘテロ二量体で存在している²³⁻²⁶⁾。DFF-45 は DFF-40 のヌクレアーゼ活性を抑制する内在性の阻害因子としての機能、および DFF-40 の折り畳み構造を制御する分子シャペロンとしての機能を有するタンパク質である^{23-26, 35, 36)}。アポトーシス誘導に伴い、DFF-45 は caspase-3 により限定分解を受けて、DFF-40 の阻害作用を失うため、DFF-40 は核内でヌクレアーゼとして作用する^{23-26, 37)}。このように、DFF-40 の活性化は DNA 断片化の形成過程において、重要な役割を果たしていると考えられている。

本項では、アポトーシス誘導時にヌクレオソーム単位での DNA 断片化の欠損する Molt-4 細胞^{31, 32)} (Fig. 3) を用いて、DNA 断片化の誘導における DFF の役割について検討した結果を総括する。

Molt-4 細胞における DNA 断片化の欠損が DFF-40 および DFF-45 の発現レベルで説明できるかどうか検討した結果を Fig. 4 に示す。DNA 断片化誘導が認められる HL-60、Jurkat、NALL、LNCaP 細胞および断片化の認められない Molt-4 細胞における DFF の発現量を半定量的 RT-PCR 法にて求めたところ、DFF-40 発現量は HL-60 および LNCaP 細胞で、また DFF-45 発現量は NALL-1 および LNCaP 細胞で、他の細胞株に比べて高値を示したが、Molt-4 細胞の DFF 発現量は他の細胞株に比べて大きな違いは認められなかった。次に、DNA 断片化欠損原因を DFF-40 のヌクレアーゼ活性の有無で説明できるかどうかについて検討した。DFF 複合体の免疫沈降物を調製し、caspase-3 の存在下および非存在下にて、そのプラスミド分解活性の有無を調べた結果、Fig.

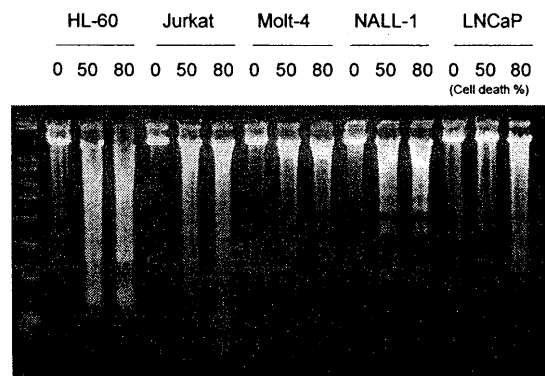


Fig. 3 Lack of oligonucleosomal DNA fragmentation in Molt-4 cells.

Cells were treated with NCS for 24 h and the cellular DNA was electrophoresed on 2.0% agarose gels.

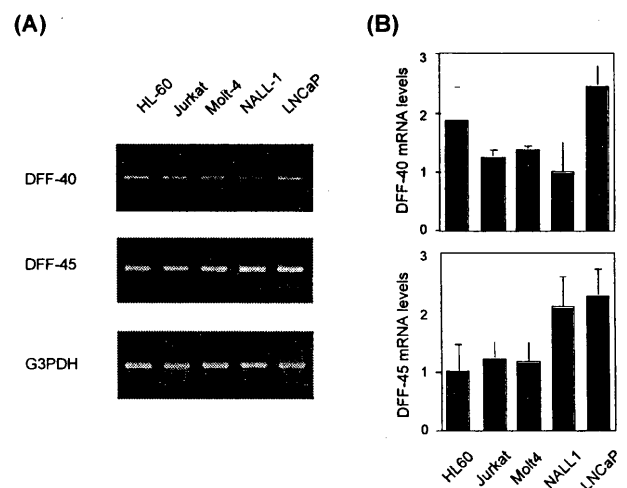


Fig. 4 Relative abundance of DFF-45 and DFF-40 mRNA transcripts.

(A) Constitutive expression of DFF-45, DFF-40 and G3PDH mRNA were analyzed by RT-PCR with specific primers. (B) Band intensity analysis was performed using NIH Image program. Columns indicate band intensities relative to the minimum intensity. The intensities were normalized relative to the G3PDH standards.

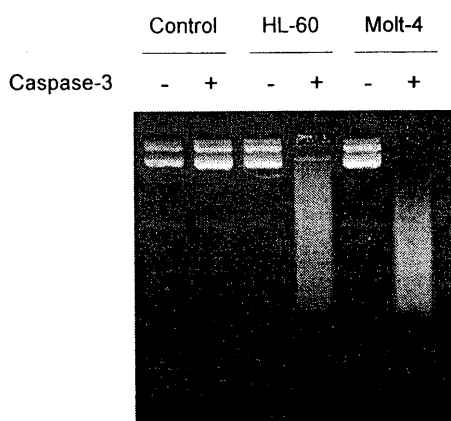


Fig. 5 The DNase activities of DFF immunoprecipitated with DFF-45.

HL-60 and Molt-4 cytosol were immunoprecipitated with anti-DFF-45 IgG. The DNase activities were assayed in the presence or absence of 370 ng caspase-3.

5 に示すように、Molt-4 細胞から調製した DFF 複合体は、HL-60 細胞から調製したものと同様、caspase-3 存在下においてプラスミド分解活性を示した。これらの結果から、Molt-4 細胞におけるヌクレオソーム単位での DNA 断片化の欠損は DFF-40/-45 の機能的な欠損に起因するものではないことが判明した。

アポトーシスにおける DFF-45 の限定分解は caspase-3 によって媒介されることが知られている^{23-26, 37)}。すなわち、caspase-3 が細胞内で活性化されなければ DNA 断片化には至らない。そこで、NCS 処理による Molt-4 細胞のアポトーシス誘導時に caspase-3 の活性化および DFF-45 の分解が認められるか否かを検討した。その結果、procaspase-3 と DFF-45 の限定分解 (Fig. 6) が認められたことから、DFF-40 の活性化シグナルは正常に機能していると考えられた。

Molt-4 細胞において DFF-40 が活性化されるにもかかわらず、ヌクレオソーム単位での DNA 断片化が認められない原因として、以下の可能性が考えられる。(1) DFF-40 のヌクレアーゼ活性は histone、high mobility group protein、トポイソメラーゼ II 等により増強することが知られている³⁸⁻⁴⁰⁾。すなわち Molt-4 細胞ではこれらの因子の発現量に異常がある可能性が考えられる。

(2) Molt-4 細胞のクロマチン構造は DNA 断片化の起きやすい HL-60 細胞の構造と異なっているとの報告⁴¹⁾があるため、Molt-4 細胞の核 DNA はヌクレアーゼに対して抵抗性を示す可能性がある。(3) アポトーシスに関与するヌクレアーゼとして DFF 以外のものも報告されており¹⁶⁻²²⁾、NCS によって引き起こされる Molt-4 細胞のアポトーシスは DFF 以外のヌクレアーゼが関与している可能性が考えられる。DFF-40 ノックアウトマウスの解析より、DFF-40 は 50-300 kbp での断片化に必須であることが明らかにされ⁴²⁾、アポトーシスにおける

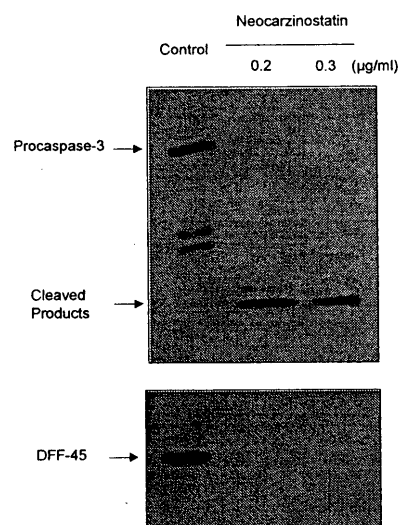


Fig. 6 Activation of caspase-3 and cleavage of DFF-45 in NCS-treated Molt-4 cells.

(A) Molt-4 cells were treated with NCS for 24 h and the cell extracts were subjected to SDS-PAGE, transferred to membrane and probed with anti-caspase-3 and anti-DFF-45 antibody, respectively.

DNA 断片化は 50-300 kbp での切断の後に、ヌクレオソーム単位で切断されるといった 2 段階進行説が支持されている。ヌクレオソーム単位での DNA 断片化は、DFF-40 による 50-300 kbp での断片化以降、他のヌクレアーゼの活性化によってもたらされる可能性が考えられる。

3. ヌクレオソーム単位での DNA 断片化誘導における細胞内 pH の影響

アポトーシスの誘導および決定段階において細胞内の酸性化が認められることが知られている⁴³⁻⁴⁷⁾。細胞内酸性化はアポトーシスのシグナル伝達系において、caspase-3 活性化の上流に位置し、ミトコンドリア機能不全の誘導、NAD(P)H 酸化、H₂O₂ 産生に関与していることが報告されている⁴³⁻⁴⁶⁾。また procaspase-3 から活性化型 caspase-3 への変換は、酸性条件下において有利に進行することが報告されている^{47, 48)}。このように、アポトーシスの初期段階の進行に細胞内 pH の低下が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあるが、実行段階における細胞内 pH の影響は未だ不明である。

イミダゾールは細胞膜透過性の有機弱塩基であり、細胞内 pH に影響を与えることが知られている⁴⁹⁻⁵¹⁾。イミダゾールを HL-60 細胞に添加したところ、ヌクレオソーム単位での DNA 断片化を伴わない細胞死が誘導された (Fig. 7)。本項では、イミダゾール処理 HL-60 細胞を用いて、アポトーシスの実行段階における DNA 断片化形成と細胞内 pH の関連について検討した結果を総括する。

イミダゾールにより HL-60 細胞に誘導されるヌクレオソーム単位での DNA 断片化の欠損する細胞死において、procaspase-3 および DFF-45 の限定分解が認められた (Fig. 8)。また、イミダゾール処理 HL-60 細胞の細胞内 pH を測定したところ、Fig. 9 に示すように、イミダゾール処理細胞において細胞内の酸性化が認められた。

そこで、DNA 断片化欠損と細胞内 pH の関係を明らかにする目的で、イミダゾール処理後の細胞内 pH を調整することにより、核変化の誘導が可能か否かを検討した。細胞内 pH の調整は、イミダゾール含有培地を pH 5.5~7.5 に調整したイミダゾール不含の培地に交換することによって行った。その結果、交換培地の pH が 6.5~7.5 の時に細胞内 pH が 7.0 以上となり、この時、ヌクレオソーム単位での DNA 断片化が誘導された (Fig. 10)。その一方で、交換培地の pH が 6.0 以下の時は DNA 断片化は認められなかった。さらに、NCS 処理細胞におい

ても交換培地の pH と DNA 断片化の関係はイミダゾール処理細胞の場合と同様、細胞内 pH が中性付近であるときは DNA 断片化が認められるが、酸性の時は認められなかった (Fig. 10)。以上の結果から、アポトーシスの実行段階に細胞内の中性化が必要であることが示唆された。アポトーシス実行段階の進行において必須である caspase-3 の至適 pH は中性からアルカリ性であるため^{52, 53)}、細胞内中性化は実行段階の進行の面から見ると合理的である。その一方で、procaspase-3 の proteolysis による活性化 caspase-3 への変換において細胞内 pH が酸性付近である方が効率的であると報告されている^{47, 48)}。

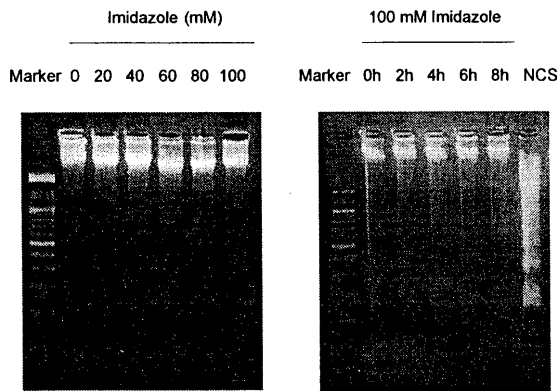


Fig. 7 Lack of oligonucleosomal DNA fragmentation in imidazole-treated HL-60 cells.

The cells were treated with imidazole and the cellular DNA was electrophoresed on 1.75% agarose gels.

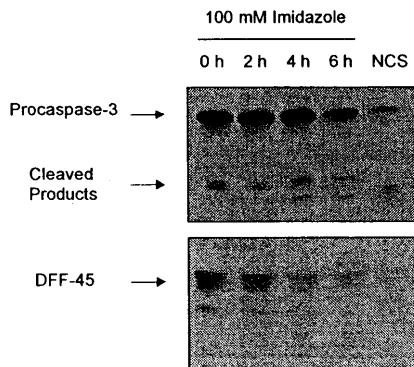


Fig. 8 Activation of caspase-3 and cleavage of DFF-45 in imidazole-treated HL-60 cells.

HL-60 cells were treated with 100 mM imidazole for indicated times and the extracts were subjected to SDS-PAGE, transferred to membrane and probed with anti-caspase-3 and anti-DFF-45 antibody, respectively.

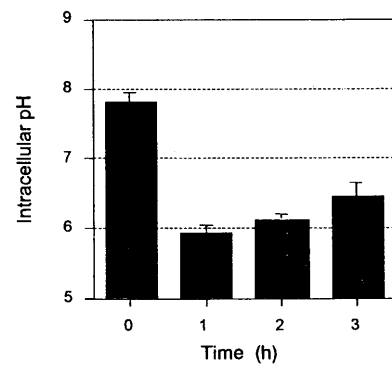


Fig. 9 Induction of intracellular acidification by imidazole in HL-60 cells.

HL-60 cells were treated with 100 mM imidazole for indicated times. The cells were loaded with BCECF-AM and analyzed by flow cytometry for intracellular pH.

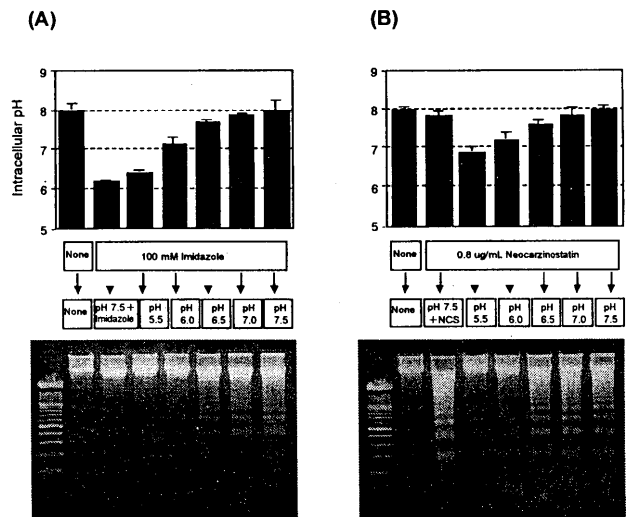


Fig. 10 Oligonucleosomal DNA fragmentation in imidazole- (A) or NCS- (B) treated HL-60 cells.

Cells were treated with or without 100 mM imidazole for 2 h (A) or 0.8 µg/mL NCS for 1.5 h (B) and then placed in fresh medium adjusted to various pH values. The cells were loaded with BCECF-AM and analyzed by flow cytometry for intracellular pH (Upper panels). The cells were incubated for another 2 h, and then the cellular DNA was extracted and electrophoresed on 1.75% agarose gels (Lower panels).

これらのことより、アポトーシス初期では酸性であった細胞内 pH が、procaspase-3 の proteolysis 後から実行期にかけて中性側にシフトする可能性が考えられた。

4. 前立腺癌細胞におけるヌクレオソーム単位での DNA 断片化を伴わない細胞死の解析

前立腺癌は欧米において特徴的に多い癌であり、米国では男性死亡率の第 2 位を占める⁵⁴⁾。日本においても、人口の高齢化と生活環境の欧米化により、近年の前立腺癌の増加率は著しく高い⁵⁵⁾。前立腺癌はその特徴の 1 つとして、非癌前立腺組織と同様、アンドロゲン感受性の増殖を示すことが知られている。そのため、前立腺癌の治療としてアンドロゲン除去療法（外科的去勢等により体内のアンドロゲンを除去する方法）が試みられ、実際に約 80%の症例で腫瘍の縮小が認められる^{56, 57)}。しかしながら、アンドロゲン除去により奏功した前立腺癌も時間の経過とともに抵抗性を獲得し、多くの場合、アンドロゲンの非存在下においても増殖可能なホルモン不応癌として再燃する⁵⁷⁾。現在、ホルモン不応性を獲得した前立腺癌に効果的な治療法はなく、予後は著しく不良である。したがって、ホルモン不応癌に対する薬剤の開発や内分泌療法の効果増強が化学療法に求められている。

アンドロゲン除去療法による腫瘍の縮小は、前立腺癌細胞における増殖シグナルの欠落に起因するアポトーシス誘導の結果として生じる⁵⁸⁾。これより推察できるように、アンドロゲン除去療法に抵抗性を示すホルモン不応性の前立腺癌細胞は、アポトーシス誘導に対し耐性を獲得していることが多く、既存の抗癌剤の効果が得られにくい。このため、ホルモン不応癌に対する薬剤は典型的なアポトーシス誘導以外の細胞死誘導作用について視野に入れることが重要である。我々はホルモン不応性を獲得した前立腺癌に対して有効な薬剤を検索する目的で、前立腺癌由来 LNCaP および PC-3 細胞（両細胞ともホルモン非存在下において増殖可能である⁵⁹⁻⁶¹⁾）の生存率に与える各種薬剤の影響について調べたところ、亜鉛およびノコギリヤシ (*S. repens*) エキスに細胞死誘導作用のあることを見出した。亜鉛は前立腺組織に豊富に存在することの知られている微量必須金属であり^{62, 63)}、前立腺疾患との関連で多くの報告が見られる⁶⁴⁻⁶⁷⁾。また、ノコギリヤシ果エキスは前立腺肥大症や前立腺炎に対し欧米を中心に広く用いられているサプリメントである⁶⁸⁻⁷⁰⁾。これらの薬剤により誘導される細胞死はともにオリゴヌクレオソーム単位での DNA 断片化を欠損していた (Fig. 11)。本項では、これらの細胞死の DNA 断片化欠損原因について解析した結果を総括する。

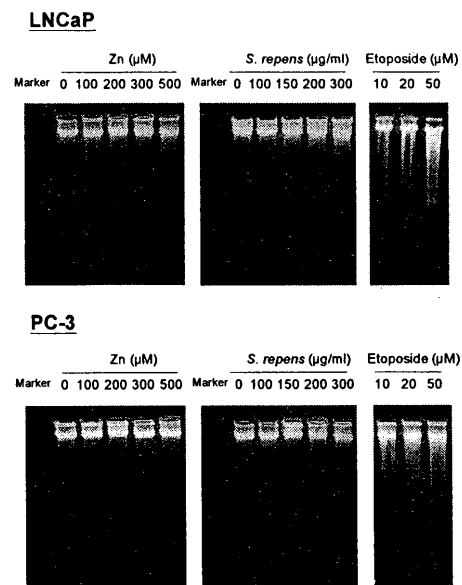


Fig. 11 Lack of oligonucleosomal DNA fragmentation in zinc and the extract from *S. repens*-treated human prostatic cancer cells.

4-1. 亜鉛により誘導される前立腺癌細胞の細胞死

亜鉛処理後の LNCaP および PC-3 細胞ともに、procaspase-3 および DFF-45 の分解は認められなかった。さらに、亜鉛処理後の両細胞において、ホスファチジルセリンの細胞外膜への露出は認められなかった (Fig. 12)。これらの結果から、亜鉛による細胞死は典型的なネクローシスであることが判明した。

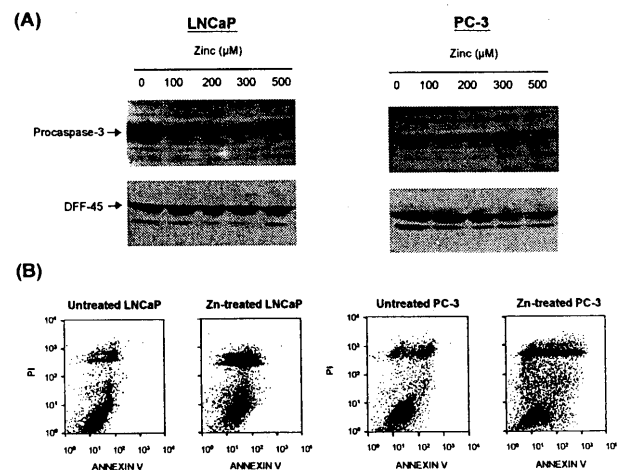


Fig. 12 Zinc induced necrosis in human prostatic cancer cells.

LNCaP and PC-3 cells were exposed to 500 and 200 μM zinc, respectively. (A) The cells were treated with zinc and the cell extracts were subjected to SDS-PAGE, transferred to membrane and probed with anti-caspase-3 and anti-DFF-45 antibody, respectively. (B) Flow cytometric analysis of cells stained with annexin V-fluorescein and PI.

4-2. ノコギリヤシ果エキスにより誘導される前立腺癌細胞の細胞死

ノコギリヤシ果エキス中の成分を薄層クロマトグラフィーにより分離したところ、細胞死誘導成分の1つとしてミリストオレイン酸を同定した(成績未掲載)。ミリストオレイン酸処理細胞は、ノコギリヤシ果エキス処理の場合と同様に、ヌクレオソーム単位の DNA 断片化が欠損していた(成績未掲載)。ノコギリヤシ果エキスおよびミリストオレイン酸処理後の LNCaP 細胞の核クロマチ

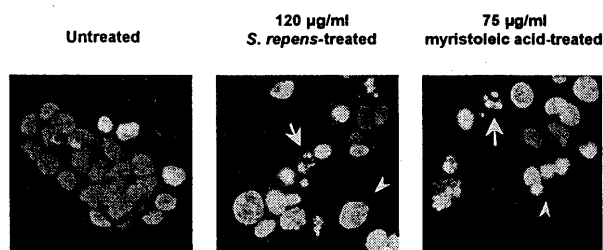


Fig. 13 Nuclear morphological analysis of LNCaP and PC-3 cells treated with the extract from *S. repens*.

LNCaP cells were stained with Hoechst 33342 and propidium iodide, and then examined under a fluorescence microscope. Arrows and arrowheads show cells undergoing apoptosis and necrosis, respectively.

ンは、異常凝縮の認められる細胞と認められない細胞の両者が混在しており、アポトーシス細胞に特有の異常凝縮が認められる細胞は全細胞数の10%程度であった(Fig. 13, Table 1)。また、caspase 阻害剤 Z-VAD-fmk の前処理後、ノコギリヤシ果エキスおよびミリストオレイン酸を処理した場合、アポトーシスによる細胞死の抑制(クロマチンの異常凝縮細胞の減少)が認められた(Table 1)。これらの結果から、ノコギリヤシ果エキス、およびその細胞死誘導成分の1つであるミリストオレイン酸は、前立腺癌細胞にアポトーシスとネクローシスの混合型の細胞死を誘導することが明らかになった。死細胞の内、アポトーシス細胞の割合はノコギリヤシ果エキスおよびミリストレイン酸処理ともに、全細胞数の10%程度であり、大部分がネクローシス細胞であった。今回用いた DNA 断片化検出法は、サンプル中にアポトーシス細胞が $1 \sim 3 \times 10^5$ 細胞以上存在しない場合は検出することができない⁷¹⁾。従って、ノコギリヤシ果エキスおよびミリストレイン酸により誘導された細胞死において DNA 断片化が検出されなかった理由として、サンプル中のアポトーシス細胞数が検出限界以下であったものと考えられた。

以上の結果より、亜鉛、ノコギリヤシ果エキスおよびミリストレイン酸による細胞死におけるヌクレオソーム単位の DNA 断片化欠損は、細胞死のタイプが主としてネクローシスであることに起因するものと考えられた。

Table 1 Effect of caspase inhibitor on cell death induced by the extract from *S. repens* and myristoleic acid

| | (% of total cells) | | |
|--|--------------------|-----------|----------|
| | Viable | Apoptotic | Necrotic |
| Control | 82.0 | 0.0 | 18.0 |
| 100 µM Z-VAD-fmk | 84.5 | 0.2 | 15.4 |
| 130 µg/ml extract | 36.8 | 16.5 | 46.8 |
| 130 µg/ml extract + Z-VAD-fmk | 48.6 | 0.3 | 51.2 |
| 100 µg/ml myristoleic acid | 9.5 | 8.8 | 81.8 |
| 100 µg/ml myristoleic acid + Z-VAD-fmk | 18.2 | 0.9 | 80.9 |

LNCaP cells were treated with the extract from *S. repens* and myristoleic acid in the absence or presence of caspase inhibitor (100 µM Z-VAD-fmk). After 24 h, % of viable, apoptotic, and necrotic cells were determined.

5. 総括

アポトーシスの本質の一つは、DNA の遺伝情報を消去することにあると考えられている。アポトーシスはクロマチンの異常凝縮やヌクレオソーム単位の DNA 断片化等の核変化を伴うことが知られ^{1-3, 7)}、これらを遂行する因子として、各種エンドヌクレアーゼが注目されている。最近、ヌクレオソーム単位の DNA 断片化を司るヌクレアーゼとして DFF、DNase γ 、DNase II が同定され¹⁶⁻²⁶⁾、なかでも DFF は caspase-3 によって活性化されることから注目されている。本研究では、DNA 断片化の生じない細胞死を解析し、ヌクレオソーム単位の DNA 断片化はネクローシスで生じないこと、およびアポトーシスにおいても欠損する場合のあることを見出した。またこれらの細胞死の解析により、DFF が正常に機能しているだけではヌクレオソーム単位の DNA 断片化の誘導に十分ではないこと、および細胞内 pH の中性化がアポトーシスの核変化の進行に必要なことを明らかにした。

従来、アポトーシス細胞は最終的に同様な生化学的特徴を示すことから、caspase 群によるタンパク質分解カスケードの下流に位置する最終共通経路の存在が示唆されてきた。しかし、その解析が進むにつれ DNA 断片化を触媒するヌクレアーゼを中心とするアポトーシスの実行段階にも、誘導および決定段階と同様に多様性のあることが明らかとなってきた¹⁶⁻²⁶⁾。本研究によって得られた結果は、血球系細胞株および前立腺細胞株の解析により得られたものであり、細胞種や細胞死誘導因子により異なることも予想される。今後、アポトーシスシグナル、細胞種、または分化状態に応じてこれらのヌクレアーゼ

がどの様に使い分けられているのかを明らかにしていくことが重要である。

6. 謝 辞

本研究は岐阜薬科大学薬剤学教室で行われたものであり、研究の遂行に当たり御協力を頂きました同教室の諸氏に厚く御礼申し上げます。

また、ノコギリヤシ果エキス成分の分離、同定をして頂きました岐阜薬科大学薬品化学教室の廣田耕作、佐治木弘尚 両先生に深く感謝致します。

7. 参考文献

- 1) Kerr, J.F. *J. Pathol.* **107**, 217-219 (1972).
- 2) Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257 (1972).
- 3) Wyllie, A.H., Beattie, G.J., and Hargreaves, A.D. *Histochem. J.* **13**, 681-692 (1981).
- 4) Barinaga, M. *Science* **280**, 32-34 (1998).
- 5) Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., Elliston, K.O., Ayala, J.M., Casano, F.J., Chin, J., Ding, G.J., Egger, L.A., Gaffney, E.P., Limjuco, G., Palyha, O.C., Raju, S.M., Rolando, A.M., Salley, J.P., Yamin, T., Lee, T.D., Shively, J.E., MacCross, M., Mumford, R.A., Schmidt, J.A., and Tocci, M.J. *Nature* **356**, 768-774 (1992).
- 6) Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E.S. *J. Biol. Chem.* **269**, 30761-30764 (1994).
- 7) Wyllie, A.H. *Nature* **284**, 555-556 (1980).
- 8) Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. *J. Immunol.* **148**, 2207-2216 (1992).
- 9) Balla, A., Toth, B., Timar, G., Bak, J., and Krajcsi, P. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 769-777 (2001).
- 10) Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C., and Perez, J.M. *Mol. Pharmacol.* **59**, 657-663 (2001).
- 11) Nagata, S. *Cell* **88**, 355-365 (1997).
- 12) Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. *Science* **281**, 1305-1308 (1998).
- 13) Green, D.R., and Reed, J.C. *Science* **281**, 1309-1312 (1998).
- 14) Herr, I., and Debatin, K.M. *Blood* **98**, 2603-2614 (2001).
- 15) Ren, Y., and Savill, J. *Cell Death Differ.* **5**, 563-568 (1998).
- 16) Gaido, M.L., and Cidlowski, J.A. *J. Biol. Chem.* **266**, 18580-18585 (1991).
- 17) Pandey, S., Walker, P.R., and Sikorska, M. *Biochemistry* **36**, 711-720 (1997).
- 18) Shiokawa, D., and Tanuma, S. *Biochem. J.* **33**, 713-720 (1998).
- 19) Yakovlev, A.G., Wang, G., Stoica, B.A., Simbulan-Rosenthal, C.M., Yoshihara, K., and Smulson, M.E. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1999-2005 (1999).
- 20) Barry, M.A., and Eastman, A. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 440-450 (1993).
- 21) Torriglia, A., Perani, P., Bross, J.Y., Chaudun, E., Treton, J., Courtois, Y., and Counis, M. *Mol. Cell Biol.* **18**, 3612-3619 (1998).
- 22) Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. *Nature* **412**, 95-99 (2001).
- 23) Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. *Cell* **89**, 175-184 (1997).
- 24) Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. *Nature* **391**, 43-50 (1998).
- 25) Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T., and Wang, X. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8461-8466 (1998).
- 26) Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. *Nature* **391**, 96-99 (1998).
- 27) Isenberg, I. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 159-191 (1979).
- 28) von Holt, C. *Bioessays* **3**, 120-124 (1985).
- 29) McGhee, J.D., and Felsenfeld, G. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 1115-1156 (1980).
- 30) Kornberg, R.D., and Klug, A. *Sci. Am.* **244**, 52-64 (1981).
- 31) Yanagisawa-Shiota, F., Sakagami, H., Kuribayashi, N., Iida, M., Sakagami, T., and Takeda, M. *Anticancer Res.* **15**, 259-265 (1995).
- 32) Falcieri, E., Martelli, A.M., Bareggi, R., Cataldi, A., and Cocco, L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 19-25 (1993).
- 33) Jänicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R., and Porter, A.G. *J. Biol. Chem.* **273**, 9357-9360 (1998).
- 34) Meinhardt, G., Roth, J., Totok, G., Auner, H., Emmerich,

- B., and Hass, R. *Exp. Cell Res.* **247**, 534-542 (1999).
- 35) Sakahira, H., Iwamatsu, A., and Nagata, S. *J. Biol. Chem.* **275**, 8091-8096 (2000).
- 36) Zhang, J., Liu, X., Scherer, D.C., Kaer, L., Wang, X., and Xu, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12480-12484 (1998).
- 37) Wolf, B.B., Schuler, M., Echeverri, F., and Green, D.R. *J. Biol. Chem.* **274**, 30651-30656 (1999).
- 38) Toh, S.Y., Wang, X., and Li, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250**, 598-601 (1998).
- 39) Liu, X., Zou, H., Widlak, P., Garrard, W., and Wang, X. *J. Biol. Chem.* **274**, 13836-13840 (1999).
- 40) Durrieu, F., Samejima, K., Fortune, J.M., Kandels-Lewis, S., Osheroff, N., and Earnshaw, W.C. *Curr. Biol.* **10**, 923-926 (2000).
- 41) Kuribayashi, N., Sakagami, H., Iida, M., and Takeda, M. *Anticancer Res.* **16**, 1225-1230 (1996).
- 42) Zhang, J., Lee, H., Lou, D.W., Bovin, G.P., and Xu, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 225-229 (2000).
- 43) Petit, P.X., Gendron, M.C., Schrantz, N., Métivier, D., Kroemer, G., Maciorowska, Z., Sureau, F., and Koester, S. *Biochem. J.* **353**, 357-367 (2001).
- 44) Hirpara, J.L., Clément, M.V., and Pervaiz, S. *J. Biol. Chem.* **276**, 514-521 (2001).
- 45) Iwama, K., Nakajo, S., Aiuchi, T., and Nakaya, K. *Int. J. Cancer* **92**, 518-526 (2001).
- 46) Liu, D., Martino, G., Thangaraju, M., Sharma, M., Halwani, F., Shen, S., Patel Y.C., and Srikant, C.B. *J. Biol. Chem.* **275**, 9244-9250 (2000).
- 47) Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q.L., Tsien, R.Y., and Reed, J.C. *Nat. Cell Biol.* **2**, 318-325 (2000).
- 48) Roy, S., Bayly, C.I., Gareau, Y., Houtzager, V.M., Kargman, S., Keen, S.L., Rowland, K., Seiden, I.M., Thornberry, N.A., and Nicholson, D.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 6132-6137 (2001).
- 49) Gottlieb, R.A., Nordberg, J., Skowronski, E., and Babior, B.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 654-658 (1996).
- 50) Yamamoto, D., Kiyozuka, Y., Uemura, Y., Yamamoto, C., Takemoto, H., Hirata H., Tanaka, K., Hioki, K., and Tsubura, A. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **126**, 191-197 (2000).
- 51) Yamamoto, D., Uemura, Y., Tanaka, K., Nakai, K., Yamamoto, C., Takemoto, H., Kamata, K., Hirata, H., and Hioki, K. *Int. J. Cancer* **88**, 121-128 (2000).
- 52) Stennicke, H.R., and Salvesen, G.S. *J. Biol. Chem.* **272**, 25719-25723. (1997)
- 53) Garcia-Calvo, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Zamboni, R., Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. *Cell Death Differ.* **6**, 362-369 (1999).
- 54) Boyle, P., Maisonneuve, P., and Napalkov, P. *Urology* **46**, 47-55 (1995).
- 55) Sasagawa, I., and Nakada, T. *Arch. Androl.* **47**, 195-201 (2001).
- 56) Huggins, C., and Hodges, C.V. *Cancer Res.* **1**, 293-297 (1941).
- 57) Emmett, J.L., Green, L.F., and Papantoniou, A. *J. Urol.* **83**, 471-484 (1960).
- 58) Kyprianou, N., English, H.F., and Isaacs, J.T. *Cancer Res.* **50**, 3748-3753 (1990).
- 59) Marcelli, M., Cunningham, G.R., Walkup, M., He, Z., Sturgis, L., Kagan, C., Mannucci, R., Nicoletti, I., Teng, B., and Denner, L. *Cancer Res.* **59**, 382-390 (1999).
- 60) Marcelli, M., Cunningham, G.R., Haidacher, S.J., Padayatty, S.J., Sturgis, L., Kagan, C., and Denner, L. *Cancer Res.* **58**, 76-83 (1998).
- 61) Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F., and Jones, L.W. *Invest. Urol.* **17**, 16-23 (1979).
- 62) Mawson, C.A., and Fischer, M.I. *Nature* **167**, 859 (1951).
- 63) Mawson, C.A., and Fischer, M.I. *Can. J. Med. Sci.* **30**, 336-339 (1952).
- 64) Gyorkey, F., Min, K., Huff, J.A., and Gyorkey, P. *Cancer Res.* **27**, 1348-1353 (1967).
- 65) Ogunlewe, J.O., and Osegbe, D.N. *Cancer* **63**, 1388-1392 (1989).
- 66) Fair, W.R., Couch, J., and Wehner, N. *Urology* **7**, 169-177 (1976).
- 67) Nishi, Y. *J. Am. Coll. Nutr.* **15**, 340-344 (1996).
- 68) Wilt, T.J., Ishani, A., Stark, G., MacDonald, R., Lau, J., and Mulrow, C. *JAMA* **280**, 1604-1609 (1998).
- 69) Champault, G., Patel, J.C., and Bonnard, A.M. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **18**, 461-462 (1984).
- 70) Breu, W., Hagenlocher, M., Redl, K., Tittel, G., Stadler, F., and Wagner, H. *Arzneimittelforschung* **42**, 547-551 (1992).
- 71) 大山ハルミ、下川卓志、(1999) 新アポトーシス実験法、(編集) 辻本賀英、刀祢重信、山田武、羊土社、東京、pp59-66.

* 本総説は岐阜薬科大学博士論文（乙第 272 号）の内容
を中心にまとめたものである。