

# 田中 史子 論文内容の要旨

## 主 論 文

IFN- $\gamma$ /JAK/STAT pathway-induced inhibition of DR4 and DR5 expression on endothelial cells is cancelled by cycloheximide-sensitive mechanism:  
Noble finding of cycloheximide to regulate death receptor expression

IFN- $\gamma$ の血管内皮細胞における TRAIL 受容体発現抑制機序：  
JAK/STAT 活性化による DR4 と DR5 の発現抑制

田中史子、川上 純、玉井慎美、中村英樹、岩永 希、和泉泰衛、  
有馬和彦、荒武弘一朗、黄 明国、蒲池 誠、井田弘明、  
折口智樹、江口勝美

International Journal of Molecular Medicine に掲載予定

長崎大学大学院医学研究科内科系専攻  
(指導教授：江口 勝美 教授)

### 緒 言

血管内皮細胞を介する炎症局所への細胞浸潤は炎症と免疫応答の成立に重要なステップである。種々の液性因子がその過程を修飾するが、IFN- $\gamma$ は其中でも必須であり、過去の報告でも血管内皮細胞の MHC class II 抗原や副刺激分子発現を増強するといわれている。リンパ球は血管内皮細胞との相互作用により活性化され、活性化されたリンパ球からは IFN- $\gamma$ など液性因子が産生されるが、これら液性因子はリンパ球と血管内皮細胞の相互作用を修飾する。この相互作用の一つにアポトーシス誘導があげられ、TRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand)は活性化リンパ球に強く発現し、その受容体である DR4(death receptor 4)や DR5(death receptor 5)に結合すると種々の細胞にアポトーシスを誘導する。TRAIL 誘導性アポトーシスを抑制すると様々な自己免疫疾患モデルは増悪し、TRAIL シグナルは炎症および免疫反応に重要な役割を担っている。これらの事実より血管内皮細胞の TRAIL 誘導性アポトーシス制御の研究は炎症と免疫反応の理解に重要と考えられ、今回、私たちは、HUVECs(ヒト臍帯静脈血管内皮細胞)を用いて、IFN- $\gamma$ が TRAIL 誘導性アポトーシスにどのような影響を与えるかについて検討した。

### 対象と方法

1. ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) を用いて以下の実験に使用した。
2. IFN- $\gamma$ の有無で24時間培養後、HUVECsのTRAIL誘導性アポトーシス感受性を以下の方法で検討した。
  - a. フローサイトメトリー法 (FACS) によるDR4とDR5発現の評価。
  - b. recombinant human TRAIL(rTRAIL)添加時のアポトーシスを、ミトコンドリア膜電位の低下 (FACS)、DNA断片化 (FACS) およびcaspase-3/-8/-9活性化 (蛍光基質を用いた酵素活性) で評価。

3. IFN- $\gamma$ によるHUVECsのTRAIL誘導性アポトーシス制御機序を以下の方法で検討した。
  - a. western blottingによるSTAT、Akt、ERKリン酸化とアポトーシス関連蛋白発現の評価。
  - b. Aurintricarboxylic acid (ATA、JAK阻害剤)およびcycloheximide (CHX; 蛋白合成阻害剤)の効果 ; DR4とDR5の発現とTRAIL誘導性アポトーシス感受性

## 結 果

1. HUVECs は DR4 と DR5 を発現し、rTRAIL によりアポトーシスが誘導された。このアポトーシス誘導過程では caspase-3/-8/-9 が活性化され、caspase-8 阻害剤によりミトコンドリア膜電位の低下と DNA 断片化がほぼ完全に抑制された。可溶性 DR による抑制実験では DR4 と DR5 は共に機能性で、DR5 がより優位な受容体と考えられた。
2. IFN- $\gamma$ により HUVECs の DR4 と DR5 の発現および TRAIL 依存性アポトーシスは顕著に抑制された。
3. IFN- $\gamma$ により HUVECs の STAT1 と STAT6 は顕著にリン酸化されたが、STAT3、Akt、ERK のリン酸化は IFN- $\gamma$ により変化しなかった。
4. ATA による STAT1 と STAT6 のリン酸化の抑制により、IFN- $\gamma$ の DR4 と DR5 発現抑制効果および TRAIL 依存性アポトーシスへの抑制効果は解除された。同様の結果は CHX の添加でも確認された。
5. HUVECs の pro-caspase-3/-8/-9、FADD、TRADD、Bcl-2、Bcl-xL、Bax、FLIP、SODD 発現は IFN- $\gamma$ により変化しなかった。

## 考 察

TRAIL 誘導性アポトーシスは、ミトコンドリア非依存性の type cell death とミトコンドリア依存性の type cell death の二つに分類される。HUVECs は DR4 と DR5 をともに発現しており、TRAIL が結合することによりアポトーシスシグナルが伝達された。Caspase-8 阻害剤の結果から HUVECs には type cell death が誘導されると考えられ、また、DR4 と DR5 はともに機能性受容体と考えられた。IFN- $\gamma$ 前処置により DR4 と DR5 の発現および TRAIL 依存性アポトーシスは顕著に抑制された。

IFN- $\gamma$ のシグナルは JAK/STAT を介して伝達がなされる。IFN- $\gamma$ は血管内皮細胞の STAT1 と STAT6 のリン酸化を強く誘導した。STAT3、Akt、ERK のリン酸化は IFN- $\gamma$  刺激では変化がなかった。また IFN- $\gamma$ による STAT1 と STAT6 のリン酸化は JAK/STAT 阻害剤である ATA で抑制され、ATA は IFN- $\gamma$ の DR4/DR5 発現抑制効果と TRAIL 誘導性アポトーシスへの抑制効果も解除した。さらに、蛋白合成阻害剤の CHX は ATA と同様の効果が認められた。これらより IFN- $\gamma$  は JAK/STAT (STAT1、STAT6) を活性化し、何らかの蛋白発現を介して DR 発現を抑制すること、またこの作用が TRAIL 誘導性アポトーシスの抑制につながると考えられた。検討した範囲では、アポトーシスを促進する蛋白 (FADD、TRADD、pro-caspase-3/-8/-9、Bax) やアポトーシスを抑制する蛋白 (FLIP、Bcl-2、Bcl-xL、SODD) の発現は変化なく、詳細な分子機序の解明には RNAi や cDNA array が必要と考えられた。IFN- $\gamma$ /JAK/STAT は炎症と免疫に重要なメディエーターだが、この機序の研究は血管新生・血管増殖の制御機構の解明につながるとも考えられた。