

RCAS1発現による細胞周期停止およびアポトーシス誘導機構の解析

西中川拓也

〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1 福岡大学薬学部 免疫・分子治療学分野

Analysis of cell cycle arrest and apoptosis induced by RCAS1 expression

Takuya Nishinakagawa

Department of Immunological and Molecular Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Science,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

A tumor-associated antigen RCAS1 (receptor binding cancer antigen expressed on SiSo cells) induces cell cycle arrest and apoptosis to a putative RCAS1 receptor (RCAS1-R) expressing cells such as T, B, natural killer cells. And its expression is related with clinical poor prognosis of some malignant tumor. It is suggested that the expressing RCAS1 on tumor cells might play an important role in evasion from host immune system resulting tumor progression, invasion and metastasis. However, the mechanism of RCAS1 induced cell cycle arrest and apoptosis has not been clear. In this study, we established a mouse L cell line transformed with tetracycline induced rcas1 gene expression system and analyzed RCAS1 functions. We showed that RCAS1 induced cytochrome c release and activation of caspase-3 for apoptosis. Moreover, we investigated cell cycle associated proteins and revealed that cyclin D3 decreased significantly and no change was seen in the expression levels of the other proteins. These results suggest that cyclin D3 is one of the key target molecules in the RCAS1-RCAS1-R signaling pathway.

Keywords: RCAS1, cell cycle, apoptosis

緒言

RCAS1 (receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells) は、子宮頸部腺癌細胞株 SiSo を免疫原として得られた IgM 型マウスモノクローナル抗体 22-1-1 が認識する腫瘍関連抗原である [1, 2]。免疫組織学的検討より、RCAS1 は子宮頸部腺癌以外にも、子宮内膜、皮膚、乳腺、肝臓、胆嚢、胃、リンパ球、肺、脾臓など多くの癌組織に発現することが示されている。各癌種において、癌の浸潤度の進行に伴って RCAS1 の染色性が増強し、RCAS1 の発現が強い症例ほど術後5年以降の生存率において RCAS1 の発現が弱い症例と比べて大きな差が認められることより、RCAS1 の発現は癌の進行度と相関しており、こ

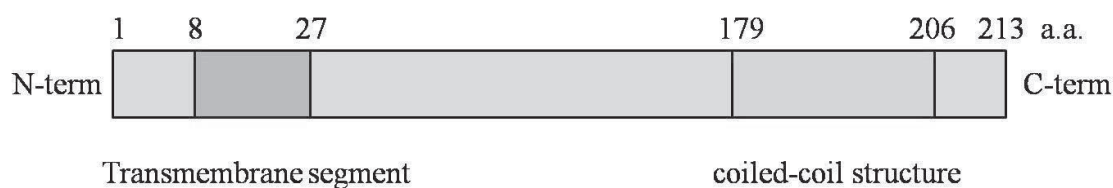


Fig. 1 Structure of RCAS1 molecule [2].

れら癌種の予後因子として非常に有用であることが示唆されている [3-12]。

RCAS1は213のアミノ酸から構成されており、その配列よりN末に膜貫通ドメイン、C末にcoiled-coilドメインを持つⅡ型の膜タンパク質で、coiled-coil構造によってオリゴマーを形成すると考えられている [2, Fig.1]。また、K562細胞（ヒト慢性骨髄性白血病由来細胞株）をはじめとする幾つかの樹立細胞株、活性化T細胞およびNK細胞は、その膜表面にRCAS1に対するputative receptor (RCAS1-R)を発現していることが明らかとなっている [2]。RCAS1発現細胞株SiSoは培養上清中にRCAS1を分泌しており、SiSoの培養上清をRCAS1-R陽性細胞株に添加すると、細胞増殖は著明に抑制され、細胞死（アポトーシス）が誘導される [2]。さらに、臨床病理組織の検討において、RCAS1陽性癌組織周囲の浸潤性リンパ球の死細胞数はRCAS1陰性癌組織と比較して有意に増加していたことが報告されている [13]。以上より、RCAS1は癌細胞排除に働くT細胞やNK細胞などの免疫細胞に対して細胞増殖抑制および細胞死を誘導し、癌細胞の免疫機構からの逸脱に深く関わっていることが示唆されている。このRCAS1の生物学的機能、特に標的細胞に対する細胞増殖抑制および細胞死誘導機構の解明は、癌細胞の免疫機構からの逸脱を阻害する方法の開発、ひいては新規癌治療法の確立につながる可能性があると考えられる。そこで、本研究ではRCAS1による細胞増殖抑制および細胞死誘導機構を解析するために、ドキシサイクリンの添加によってRCAS1遺伝子の発現が誘導されるRCAS1発現誘導型安定形質転換細胞株を樹立し、そのメカニズムについての解析を行った。

1. RCAS1発現誘導型安定形質転換細胞株の樹立およびRCAS1 molecule (intracellular RCAS1), 22-1-1抗原 (cell surface RCAS1) の発現の経時的解析

細胞レベルにおけるRCAS1の機能を解析するために、RCAS1-Rを発現していると考えられるマウスL細胞に、ドキシサイクリンの存在下で発現が誘導されるRCAS1遺伝子を導入し、RCAS1発現誘導型安定形質転換細胞株 (L/ind RCAS1) を樹立した。さらに、L/ind RCAS1におけるドキシサイクリン添加後のRCAS1 molecule (intracellular RCAS1) および22-1-1抗原 (cell surface RCAS1) の発現を、それぞれwestern blotting, Flow cytometryを用いて経時的に解析した。

その結果、Fig. 2に示すようにRCAS1 molecule, 22-1-1抗原はそれぞれドキシサイクリン誘導4, 6時間後から発現が認められ、誘導時間の延長とともにその発現量は増加した。

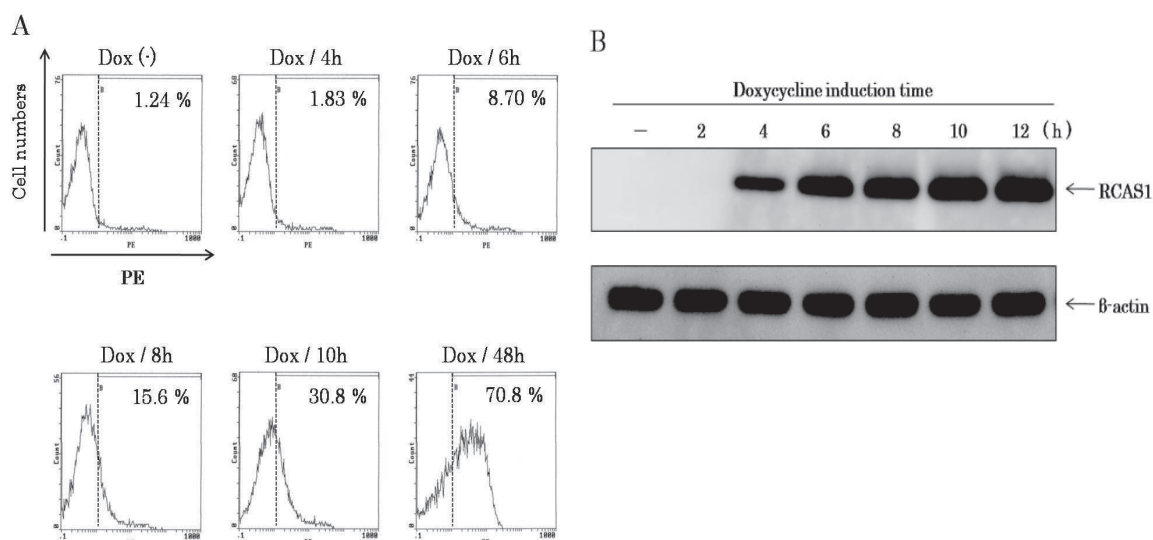


Figure 2. The expression of 22-1-1 antigen (A) and RCAS1 molecule (B) in L/ind RCAS1.

2. RCAS1発現による細胞形態変化観察および細胞生存率の測定

L/ind RCAS1におけるRCAS1発現誘導後のアポトーシスを検出するために、位相差顕微鏡による細胞形態変化の観察、DAPI染色によるクロマチンの凝縮を蛍光顕微鏡を用いて観察した。また、RCAS1発現後のL/ind RCAS1の細胞生存率をWST-1 assayにより測定した。その結果、ドキサイクリンによるRCAS1発現誘導後、アポトーシスの特徴であるcell volume shrinkageやmembrane blebbingが観察され、DAPI染色によるクロマチンの凝縮も検出された (Fig. 3A)。さらに、ドキサイクリン添加24, 48, 72 hr後の細胞生存率はそれぞれ $66.80 \pm 3.92\%$, $32.97 \pm 0.55\%$, $22.07 \pm 1.12\%$ を示した (Fig. 3B)。

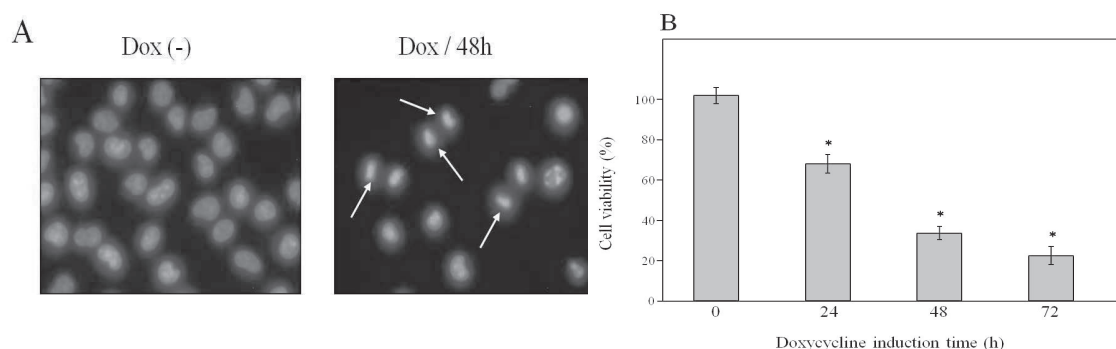


Figure. 3 Observation of chromatin condensation by DAPI staining (A) and analysis of cell viability (B) of L/ind RCAS1.

3. アポトーシス関連分子の解析

アポトーシスシグナルの多くはcaspaseカスケードを介して細胞死を誘導することが明らかとなっている。Caspaseカスケードは、Fasをはじめとするデスレセプターを介する経路とミトコンドリアを介する経路の二つに大別される。本研究において、RCAS1によるアポトーシス誘導シグナルがデスレセプター経路あるいはミトコンドリア経路のどちらを介する経路なのかを明らかにするために、活性化caspase-8

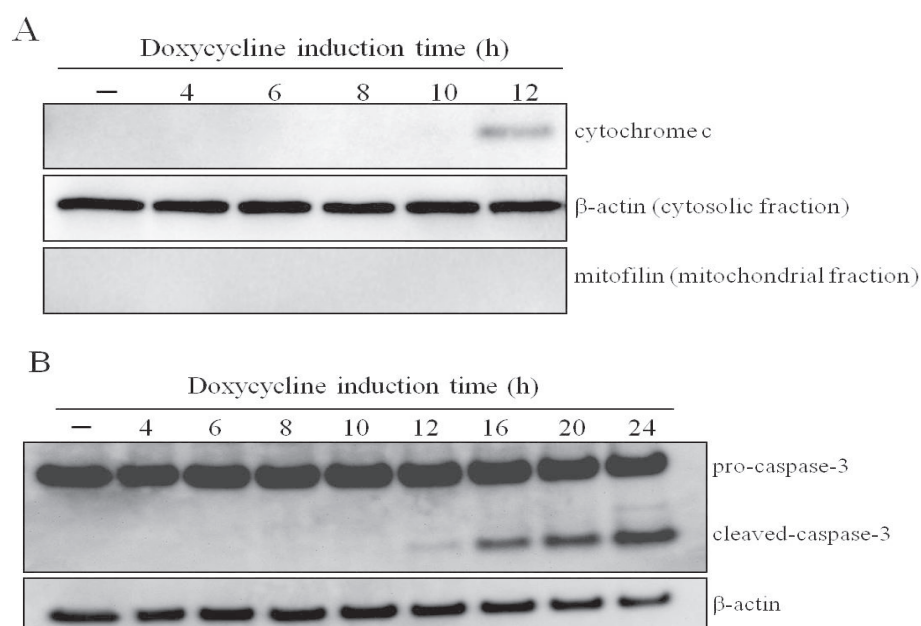


Figure 4. Analysis of apoptosis associated molecules, cytosolic cytochrome c (A) and cleaved-caspase-3 (B).

(デスレセプター経路関連分子), 細胞質画分内cytochrome c (ミトコンドリア経路関連分子), および活性化caspase-3(アポトーシス実行caspase)の細胞内発現量を western blotting 法により解析した。その結果, ドキシサイクリン誘導12時間後において細胞質画分内cytochrome c および caspase-3の活性化が認められ, 活性化caspase-3の発現量は誘導時間の延長に従って増加していた (Fig. 4)。その一方で, caspase-8の活性化は見られなかった。以上の結果より, RCAS1によるアポトーシスはミトコンドリアを介する経路であることが強く示唆された。

4. 細胞周期関連分子の解析

RCAS1はcell cycle G1 arrestによる細胞増殖抑制を誘導することがすでに報告されており, 本研究においても細胞形態変化像のタイプラプス解析により, RCAS1発現によるアポトーシス誘導に先行して, 細胞周期抑制が誘導されていることが確認された。しかしながら, RCAS1による細胞周期抑制の分子レベルにおけるメカニズムについては明らかにされていない。そこで, RCAS1発現後のL/ind RCAS1における細胞周期G1期関連分子の量的変動を経時的に解析した。その結果, ドキシサイクリンによる誘導6時間後からサイクリンD3のみが特異的に減少しているのが確認され, その減少は誘導時間の延長と平行な傾向を示し, 誘導12時間後におけるサイクリンD3の発現量はコントロールの約40%だった (Fig. 5A)。一方で, cyclin D1, cyclin D2, cyclin E, cdk 4, cdk 6およびp19, p27の量的変動はみられなかった (Fig. 5B)。

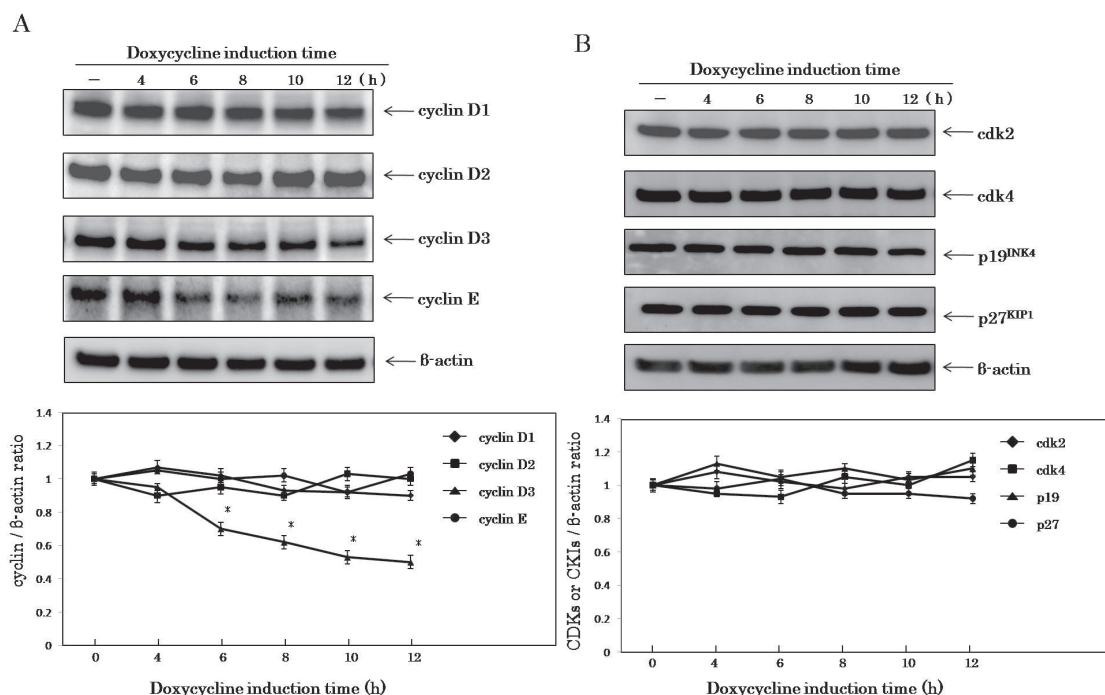


Figure 5. Analysis of cell cycle associated proteins by western blotting.

結論

今回, RCAS1発現誘導型安定形質転換細胞株を樹立し, RCAS1による細胞周期抑制およびアポトーシス誘導機構についての解析を行った。Fig. 6にドキシサイクリン添加後のL/ind RCAS1の経時的所見を示す。RCAS1の発現によりミトコンドリアから細胞質へのcytochrome cの漏出およびcaspase-3の活性

化が認められたことより、RCAS1によるアポトーシスシグナルがミトコンドリアを介する経路であることが強く示唆された。また、22-1-1抗原の発現が認められるドキシサイクリン誘導6時間後には、細胞周期関連タンパク質のうち cyclin D3のみが特異的に減少することより、cyclin D3がRCAS1によるアポトーシスシグナルの上流に位置し、そのターゲット分子の一つであることが示唆された。

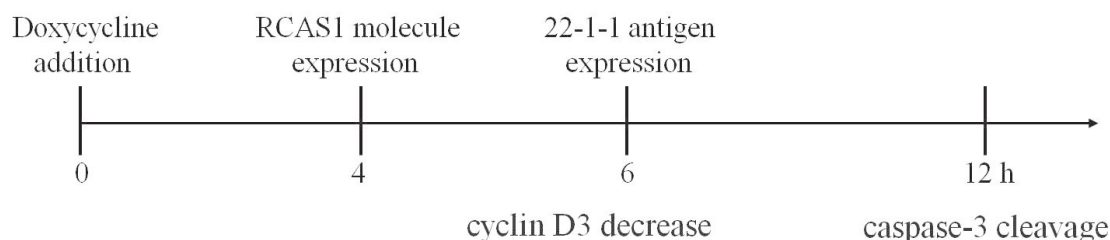


Fig. 6 L/ind RCAS1における経時的所見

癌の発生、進展の初期においてNK細胞あるいは活性化T細胞による癌細胞の認識と除去は癌の抑止に特に重要であると考えられている。RCAS1が免疫細胞に対して細胞増殖抑制・細胞死を誘導するリガンド分子であることが示唆されていることから、RCAS1の生物学的機能の解明は、癌細胞の免疫監視機構からのエスケープを阻止する新規癌治療法の開発につながることを期待される。

謝辞

本研究に終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部免疫・分子治療学 中島学教授ならびに有益な御助言と御校閲を賜りました福岡大学薬学部微生物薬品化学 鹿志毛信広教授、福岡大学薬学部免疫・分子治療学 遠城寺宗近准教授に深謝致します。最後に、本研究を遂行するにあたり、御協力頂きました福岡大学薬学部免疫・分子治療学のスタッフ、大学院生および特別実習生諸氏に感謝致します。

参考文献

1. Sonoda K, Nakashima M. *et al.* A novel tumor-associated antigen expressed in human uterine and ovarian carcinomas. *Cancer* 77: 1501-1509, 1996.
2. Nakashima M, Sonoda K. *et al.* Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nature Med.* 5: 938-942, 1999.
3. Kaku T, Sonoda K. *et al.* The prognostic significance of tumor-associated antigen 22-1-1 expression in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 5: 1449-1453, 1999.
4. Sonoda K, Kaku T. *et al.* The clinical significance of tumor-associated antigen RCAS1 expression in the normal, hyperplastic, and malignant uterine endometrium. *Gynecol. Oncol* 79: 424-429, 2000.
5. Takahashi H, Iizuka H. *et al.* RCAS1 antigen is highly expressed in extramammary Paget's disease and in advanced stage squamous cell carcinoma of the skin. *J. Dermatol. Sci* 26: 140-144, 2001.
6. Suzuki T, Inoue S. *et al.* EBAG9/RCAS1 in human breast carcinoma: a possible factor in endocrine-immune interactions. *Br. J. Cancer* 85: 1731-1737, 2001.
7. Noguchi K, Enjoji M. *et al.* Expression of tumor-associated antigen RCAS1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 168: 197-202, 2001.

8. Oshikiri T, Hida Y. *et al.* RCAS 1 as a tumour progression marker: an independent negative prognostic factor in gallbladder cancer. *Br. J. Cancer* 85: 1922-1927, 2001.
9. Kubokawa M, Nakashima M. *et al.* Aberrant intracellular localization of RCAS 1 is associated with tumor progression of gastric cancer. *Int. J. Oncol* 19: 695-700, 2001.
10. Ohshima K, Muta K. *et al.* Expression of human tumor associated antigen RCAS 1 in Reed-Sternberg cells in association with Epstein Barr virus infection: a potential mechanism of immune evasion. *International Journal of Cancer* 93: 91-96, 2001.
11. Izumi M, Nakanishi Y. *et al.* Expression of tumor-associated antigen RCAS 1 correlates significantly with poor prognosis in non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 92: 446-451, 2001.
12. Hiraoka K, Hida Y. *et al.* High expression of tumor-associated antigen RCAS 1 in pancreatic ductal adenocarcinoma is an unfavorable prognostic marker. *Int. J. Cancer* 99: 418-23, 2002.
13. Okada K, Nakashima M. *et al.* Expression of tumor-associated membrane antigen, RCAS 1, in human colorectal carcinomas and possible role in apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes. *Mod Pathol.* 16:679-85, 2003.