

## 原 著

ケモカインRANTESによる  
アポトーシス抑制作用

湯尻俊昭

山口大学医学部内科学第三講座 宇部市南小串 1-1-1 (〒755-8505)

Key words : RANTES, CCR5, アポトーシス

## 緒 言

炎症反応では、好中球をはじめリンパ球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ等様々な血球が炎症局所へ浸潤し、生体防御や組織障害に関与している。近年、これらの炎症反応における炎症細胞浸潤に、IL-8などのケモカインが重要な働きをしていることが明らかになってきた。ケモカインは血球細胞の他にも、血管内皮細胞、線維芽細胞、肝細胞、皮膚角化細胞や癌細胞など様々な細胞から、種々の刺激により産生されることが明らかにされている。また機能的にも、遊走活性の亢進、活性酸素、リソゾーム酵素の産生、細胞接着分子の発現亢進など、多彩な作用を示すことが知られている<sup>1)</sup>。

ケモカインレセプターは7回細胞膜貫通部分を保有するG蛋白会合型であり、好中球、単球、T細胞やNK細胞などの血球細胞に発現している。最近、CXCR4やCCR5といったケモカインレセプターが、HIVの細胞侵入に必要なコレセプターとして働くことやregulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES)、macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ やMIP-1 $\beta$ がマクロファージ指向性のHIV感染において可溶性阻害因子として働くことが明らかにされ、AIDS治療の観点からも注目を集めている<sup>2)</sup>。このように多様な機能を有するケモカインとそのレセプターであるが、炎症反応に関わ

る機能以外に細胞死に関する報告はほとんどない。そこで、RANTESレセプターの一つであるCCR5を恒常的に発現させたHEK293細胞を用いて、ストレスによるアポトーシス誘導に対するRANTESの抗アポトーシス作用について検討した。

## 材料と方法

材料 : recombinant human RANTESはR&D systems (Minneapolis, MN)、PD98059はBiomol (Plymouth Meeting, PA)、wortmanninはSigma (St. Louis, MO)、ERK2、Akt1抗体はSanta Cruz Biotech. (La Jolla, CA)、CCR5 FITC conjugated mouse anti-human monoclonal 抗体はPharmingen (San Diego, CA)から購入した。CCR5発現ベクター-pCEP4-CCR5はGary L. Johnson博士 (National Jewish Medical and Research Center, Denver, CO)より供与された。

細胞培養 : ヒト胎児腎細胞由来のHEK293細胞は、DMEM+10% Fetal bovine serum+100 $\mu$ g/ml streptomycin+100units/ml penicillin Gで培養した。

Apoptosis assay : 4時間の血清飢餓状態 (0.1% bovine serum albumin+DMEM) 後に、10分間、示された濃度のRANTESを加え、100J/m<sup>2</sup>の紫外線 (UV-C) 照射あるいは100nM etoposideを加え、16時間インキュベートした。培養上清および細胞をトリプシン処理にて回収し、遠心にて濃縮した後、acridine orangeとethidium bromideにより染色し、形態的に核濃縮や断片化した細胞数をアポトーシス細

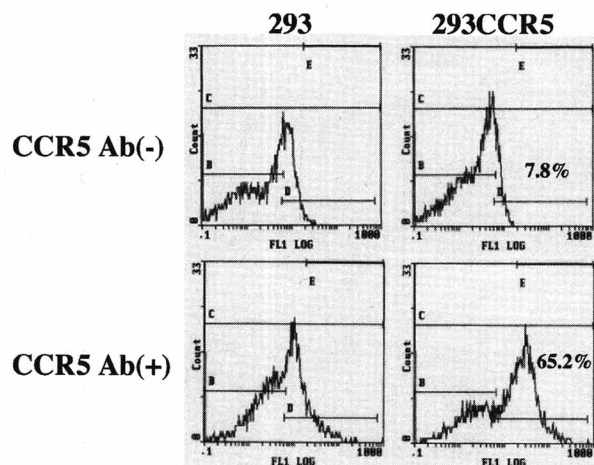


図1：HEK293細胞(293)とCCR5を恒常的に発現させたHEK293細胞(293CCR5)をCCR5 FITC conjugated mouse monoclonal抗体にて標識 (CCR5 Ab(+)) または未標識 (CCR5Ab(-)) の状態でFACS解析を行った。図中にD分画に属する%を示した。

胞とみなし、最低500個計測することにより、定量した。励起波長450-480nm、蛍光波長515nm以上にて観察した。

Extracellular signal-regulated kinase(ERK) assayおよびAkt assay：4時間の血清飢餓状態の後、示された濃度のRANTESを添加し、10分間インキュベートした後、蛋白を抽出した。400mgの蛋白抽出物にERK2またはAkt1抗体を加え、Protein Gセファロースにて沈降後、Epidermal growth factor receptor peptide(661-681) (Biomol, Plymouth Meeting, PA) あるいはcrosstide peptide (Upstate Biotech, Lake Placid, NY) を基質として [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATPと併に加え、Whatman p81 paperに滴下することにより各々のkinase activityを測定した<sup>3,4)</sup>。

## 結 果

CCR5発現HEK293細胞株の樹立；CCR5発現ベクター (pCEP4-CCR5) をリポフェクション法によりHEK293細胞に遺伝子導入し、hygromycinにより選択することによって恒常的に発現した細胞(293CCR5細胞)を得た。CCR5の発現をFITC conjugated CCR5抗体を用いたFACS解析により確認した(図1)。RANTES以外のリガンドであるMIP-1 $\alpha$ によるbinding assayによってもこのレセプターの

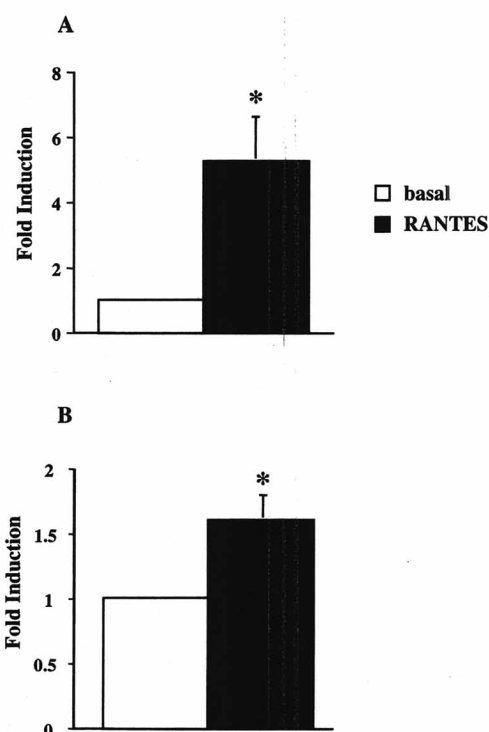


図2：A；ERK assay 4時間の血清飢餓後、最終濃度50nM RANTESを添加し10分間刺激した後、蛋白を抽出し、in vitro kinase assayを行った。

B；Akt assay 上記と同様にしてassayを行った。未刺激下でのkinase activityを1とし、そのfold inductionを示した。それぞれ3回の独立した実験を行い、その平均値とSEMを示した。p valueはいずれも0.05以下であり(\*), 有意な活性化を認めた(Student's t test)。

発現を確認した (データ示さず)。

RANTESによるERKおよびAkt活性化；血清飢餓後の293CCR5細胞にRANTESを10分間添加することにより、ERKおよびAkt活性化を調べた。G蛋白会合型レセプターからのシグナル伝達系にはERKやphosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)が活性化することが報告されていることから、PI3Kの下流に位置するAktの活性化も予想される<sup>5,6)</sup>。RANTESの添加により、ERKやAktは有意な活性化を示した (ともに $p < 0.05$ ) (図2)。確かに、293CCR5細胞においても、これらのシグナル伝達経路が活性化されることを確認した。

紫外線およびetoposideのアポトーシス誘導におけるRANTESの抑制作用；RANTESによる前処置後、紫外線照射あるいはetoposideを添加し、16時間後のアポトーシスを定量した。RANTESはいずれの刺激

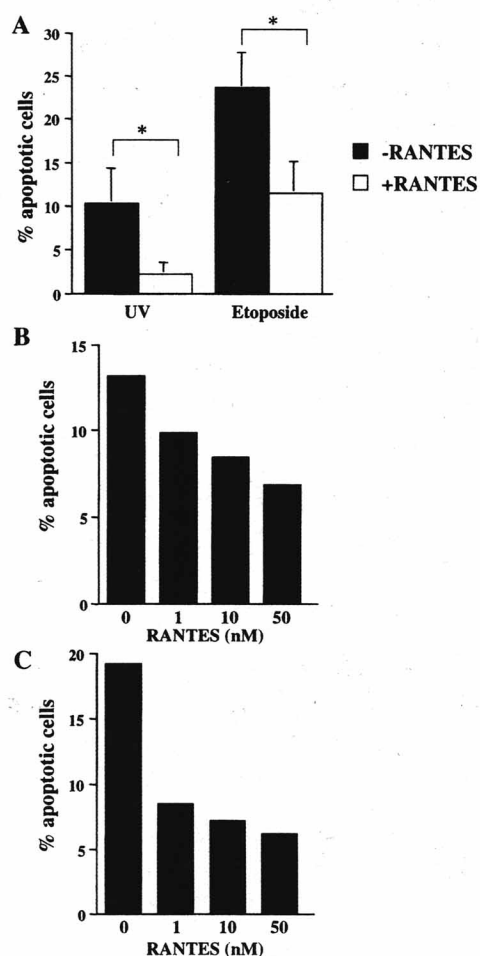


図3：A；293CCR5細胞を用いて、4時間の血清飢餓後に最終濃度50nM RANTESを10分間刺激したものと、していないもので、さらに紫外線照射(UV-C 100J/m<sup>2</sup>)あるいは100nM etoposideを加え、16時間37℃でインキュベートし、アポトーシスを定量した。平均値とSEMを表示した。(n=3) p valueは0.05以下であり(\*), 有意な抑制作用を認めた(Student's t test)。

B；紫外線照射によるアポトーシス誘導におけるRANTESの濃度依存効果

C；etoposideによるアポトーシス誘導におけるRANTESの濃度依存効果

それぞれ3回の独立した実験を行い、代表的なデータを示した。

によるアポトーシス誘導に対しても、有意に抑制作用を示した(ともに $p < 0.05$ ) (図3A)。このアポトーシス抑制効果はRANTES濃度依存性であった(図3B, C)。このことは、RANTESにはアポトーシスを抑制する生存シグナル伝達機構があることを示唆している。

RANTESの抗アポトーシス作用にはAktではなく

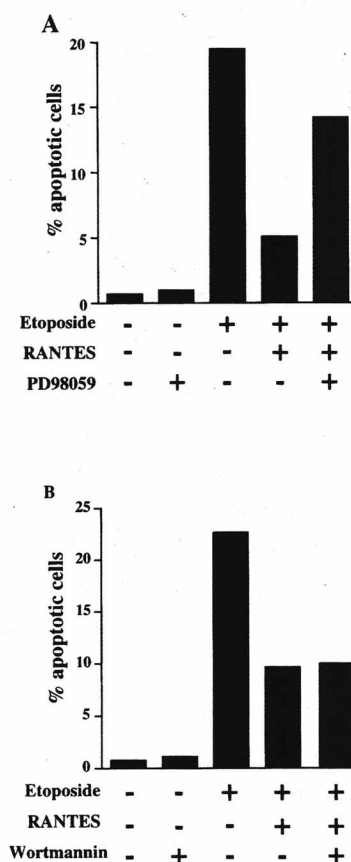


図4：A；PD98059によるRANTESのアポトーシス抑制阻害効果

293CCR5細胞を用いて、4時間の血清飢餓後に25mMのPD98059に1時間暴露し、最終濃度50nM RANTESを10分間刺激し、さらに100nM etoposideを加え、16時間37℃でインキュベートし、アポトーシスを定量した。

B；WortmanninによるRANTESのアポトーシス抑制阻害効果

100nM wortmanninをRANTES添加前1時間暴露し、その他は上記と同様に行った。それぞれ3回の独立した実験を行い、代表的なデータを示した。

ERK活性化が必要である；サイトカインや成長因子によるERK活性化経路は分化増殖だけでなく、生存シグナルにおいても重要であることが報告されている<sup>7,9)</sup>。そこで、特異的にERK活性化経路を阻害するMEK1阻害剤のPD98059を用いて、RANTESの抗アポトーシス作用におけるERKの働きについて検討した。PD98059の前処置によりERK活性化を阻害する

と (データ示さず)、RANTESの抗アポトーシス作用が減少した (図4A)。PD98059添加の有無によるアポトーシスの変動については、有意差検定を行い、有意なアポトーシス抑制阻害作用を示した ( $p < 0.05$ , データ示さず)。すなわち293CCR5細胞を用いたシステムにおいては、ERK活性化経路が生存シグナルに必要であることが示唆された。

さらに、種々の細胞において生存シグナルに必須とされているAkt活性化経路<sup>10,11)</sup>についての検討を行った。PI3K阻害剤であるwortmanninを用いて、上記と同様の方法で解析した。100nM wortmanninはAkt活性化を十分阻害した (データ示さず) が、RANTESによる抗アポトーシス作用には変化を与えなかった (図4B)。wortmanninの有無によるアポトーシスの変動については、有意差検定を行い、有意差は得られなかった ( $p > 0.1$  データ示さず)。すなわち、293CCR5細胞を用いたシステムにおいては、RANTESによる生存シグナルに必ずしもAkt活性化は必要ではないことが示唆された。

## 考 察

ケモカインは、内因性の白血球走化性・活性化作用を有する蛋白質の総称であり、そのプロトタイプとしてIL-8がクローニングされてから10年が過ぎた。その間、実に多くのケモカインとそのレセプターが発見され、さらにケモカインレセプターがHIV感染の補助因子として働く等の画期的な発見がなされ、ケモカインは極めて大きな注目を集めている。しかし、その機能やシグナル伝達経路にはまだ不明な点が多く、現在多くの研究者がしのぎを削っている。

ケモカインの一つであるRANTESは活性化T細胞、血小板、上皮細胞等から分泌され、標的細胞として、単球、T細胞、好塩基球や好酸球に作用する<sup>12)</sup>。興味深いことに、このRANTESやMIP-1 $\alpha$ は生理的濃度でHIVウィルスの複製を阻害することが報告されている<sup>13)</sup>。そこで本研究においては、ケモカインの機能をさらに解明するために、サイトカインや成長因子で認められる生存シグナル伝達機構が、293CCR5細胞を用いたシステムにおいても存在するかどうか確かめてみた。

本研究で用いた293CCR5細胞では、RANTESは

ERKおよびAkt活性化を促した。そして、紫外線照射やDNAトポイソメラーゼ阻害剤のetoposideによるアポトーシスの誘導に対して、RANTESは抗アポトーシス作用を示した。ケモカインによる抗アポトーシス作用については、I-309/TCA-3がマウスTリンパ腫細胞株のデキサメサゾンによるアポトーシスに対して生存方向に働くことが報告されているが<sup>14)</sup>、そのシグナル伝達に関する検討は加えられていない。そこで、それぞれMEK1とPI3Kの特異的阻害剤であるPD98059とwortmanninを用いて、ERKやAktによる抗アポトーシス作用における働きを検討した。まず、ERK活性化経路を阻害することにより、抗アポトーシス作用は減少することが示された。MEKからERKを活性化し、様々な転写因子を調節する経路がこの生存シグナルにとって必要であることを示している。しかし、ERK活性化による抗アポトーシス作用は普遍的にみられるものではなく、Rat-1線維芽細胞での紫外線照射によるアポトーシス誘導において、ERK経路は生存シグナルに関与していないとの報告<sup>10)</sup>や、神経細胞におけるIGF-1の抗アポトーシス作用においてもERK経路は関与せず、PI3K活性化が必要であるとの報告もある<sup>15)</sup>。

またAktはサイトカイン等の刺激によって、Bcl-2ファミリーのBadのリン酸化を促し、Bcl-2やBcl-XLを遊離させることにより、抗アポトーシス作用を示すと言われている<sup>16,18)</sup>。また最近、PDGFの抗アポトーシス作用において、AktはNF $\kappa$ Bの活性化を促すことにより作用することが報告された<sup>19)</sup>。しかし、ERKの場合と同様に、Aktがすべての条件下においてもアポトーシス抑制作用に必要十分であるとは言いがたく、幾つかの生存あるいは細胞死につながるシグナル伝達分子とのバランスや相互作用によって繊細な調節を受けていることが予想される。このことは今後の大きな研究課題と考えられる。

成長因子やサイトカインによる生存シグナル伝達については精力的に研究が進められているが、比較的新規の蛋白であるケモカインについては、この機能の有無が未だ明らかにされていない。本研究ではRANTESをその一つのモデルとして解析を行い、アポトーシスとの関わりを証明した。しかし、HEK 293細胞にCCR5以外のRANTESレセプターが発現している可能性は否定できず、本研究でみられたRANTESの効果が、CCR5のみを介しているか否か、

さらに全てのケモカインとそのレセプターがアポトーシスを抑制する作用を有するか否かについては、今後の検討課題である。またRANTESによる生存シグナルが生理的な状態においても機能しているかについても課題として残る。このためにも、今後、生理的にケモカインレセプターを発現しているprimary T細胞や細胞株において検討を加える必要があると思われる。

## 結 語

ケモカインレセプターCCR5を発現させたHEK293細胞を用いて、紫外線照射や抗癌剤によるアポトーシス誘導をケモカインRANTESが抑制すること、さらに、その抗アポトーシス作用にはERK活性化が必要であることを示した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御校閲を賜りました山口大学医学部内科学第三講座 岡 芳知教授に深謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998 ; **338** : 436-445
- 2) Premack BA, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med* 1996 ; **2** : 1174-1178
- 3) Widmann C, Gerwins P, Johnson NL, Jarpe MB, Johnson GL. MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1998 ; **18** : 2416-2429
- 4) Gibson S, Tu S, Oyer R, Anderson SM, Johnson GL. Epidermal growth factor protects epithelial cells against Fas-induced apoptosis. Requirement for Akt activation. *J Biol Chem* 1999 ; **274** : 17612-17618
- 5) Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 1995 ; **376** : 599-602
- 6) Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 1995 ; **81** : 727-736
- 7) Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995 ; **270** : 1326-1331
- 8) Gardner AM, Johnson GL. Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1996 ; **271** : 14560-14566
- 9) Frasch SC, Nick JA, Fadok VA, Bratton DL, Worthen GS, Henson PM. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *J Biol Chem* 1998 ; **273** : 8389-8397
- 10) Kulik G, Klippel A, Weber MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol* 1997 ; **17** : 1595-1606
- 11) Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN, Hay N. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev* 1997 ; **11** : 701-713
- 12) Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 1990 ; **347** : 669-671
- 13) Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995 ; **270** : 1811-1815
- 14) Van Snick J, Houssiau F, Proost P, Van Damme J, Renaud JC. I-309/T cell activation gene-3 chemokine protects murine T cell lymphomas against dexamethasone-induced apoptosis. *J Immunol* 1996 ; **157** : 2570-2576
- 15) Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao

- R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 1997 ; **275** : 661-665
- 16) del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 1997 ; **278** : 687-689
- 17) Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997 ; **8** : 435-437
- 18) Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell* 1997 ; **91** : 231-241
- 19) Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 1999 ; **401** : 86-90

## RANTES Inhibits Stress-induced Apoptosis

Toshiaki YUJIRI

*Third Department of Internal Medicine, Yamaguchi University School of Medicine,  
1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi, 755-8505, Japan*

### SUMMARY

Chemokines induce cell migration and activation by binding to specific G protein coupled receptors on target cells. The chemokine RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) induces T cell activation and proliferation. In this study, using CCR5-expressed HEK293 cells, RANTES was demonstrated to inhibit stress (UV and etoposide) induced apoptosis through CCR5, a RANTES receptor. RANTES activated extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt, which is downstream from phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K). A MEK1 inhibitor, PD98059, inhibited RANTES-mediated ERK activation and abrogated the anti-apoptotic effects of RANTES, while wortmannin, a PI3K inhibitor, did not. These findings indicate that ERK activation is required for RANTES-mediated inhibition of stress-induced apoptosis.