

## 免疫學及其於生物醫學之應用報告

### Apoptosis 的 TRAIL 機轉與免疫應用

生科院分生所

g944278 史德芬

細胞計劃性死亡 (programmed cell death) 也稱為細胞凋亡 (apoptosis) 在複雜的生物系統中維持發育及細胞間的恆定具有絕對的重要性。Apoptosis 是一種細胞受環境刺激後，在基因調控之下所產生的自然死亡現象，故亦稱之為細胞程式死亡，與 necrosis (細胞壞死) 有所區別。Necrosis 一般被認為是細胞在受到物理性傷害而造成的惡性死亡，其特徵包含胞器遭受嚴重破壞及細胞膜喪失完整性等，而這些現象都不是在基因調控之下所產生的。與 necrosis 不一樣的是發生 apoptosis 的細胞中，可發現細胞質中產生小泡囊、染色質濃縮以及 DNA 斷裂等現象。Apoptosis 與 necrosis 二者在生物體內主要的差別是在於前者不會引起發炎反應。總而言之，apoptosis 是一種對周圍細胞及組織傷害最小的一種細胞自殺性死亡。

在細胞發育的自然過程中細胞增生常常會遭受到 apoptosis，在發育與免疫反應中，lymphocytes 更是常常遭受到 apoptosis。為什麼細胞會有 apoptosis 的現象呢？通常會引起 apoptosis 是兩種不同的理由，一是在 mitosis 的時候，apoptosis 是發育必經的過程，例如嬰兒在發育過程中，將連結的細胞利用 apoptosis 而使五個手指頭分開來。另一種 apoptosis 的發生是在於組織完整性受到威脅的時候，像是在免疫系統中的細胞中，當 cell-mediated immune responses 減小，這些受影響的細胞會被移除以預防身體完整性受攻擊。Cytotoxic T lymphocytes 即為利用 apoptosis 移除受到 virus 感染的細胞，缺乏這種 apoptosis 的機制會引起相關的自體免疫疾病 lupus erythematosus 與 rheumatoid arthritis。此外對於某些腫瘤細胞而言，化學治療或是放射線治療引起腫瘤細胞的 apoptosis。

Apoptosis 在免疫調節及腫瘤發生中的角色是目前極受到重視的。當入侵者引起免疫反應發生時 T 細胞與 B 細胞，會增生對抗外來抗原。當完成這項工作的時候，這些淋巴細胞會被以 apoptosis 的方法移除到只剩下少數的記憶細胞。少數的人會遭遇到 apoptosis 的基因缺陷，而多半這是因為 Fas 的基因突變，這類的免疫問題稱為 autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS)。他有幾種特

色，首先是在淋巴結裡有淋巴細胞的聚集，而有放大的效應產生；再來是有自體免疫的反應發生而產生自體免疫疾病，像是 hemolytic anemia、thrombocytopenia；還有淋巴細胞的癌化現象出現。在大部分的 ALPS 病人身上多是生殖細胞的突變，身體中的每一個細胞都帶有此基因。另外有少部分的例子是在體細胞中的骨髓前驅細胞發生，這是一種 genetic mosaics — 某些淋巴細胞是正常的，某些卻不正常，不正常的細胞通常最後會成為淋巴結與血液主要的成分。而就癌症發生方面，引起某些腫瘤的病毒會藉由延遲 apoptosis 而導致腫瘤發生，比如 human papilloma viruses (HPV) 就由此引發子宮頸癌其中的產物 E6 蛋白，可以與促進 apoptosis 的 p53 結合而抑制 apoptosis。某些癌症細胞不需要病毒參與製造抑制 apoptosis 的物質，B-cell leukemias 和 lymphomas 藉由 Bcl-2 的轉位 (Translocation) 表現出高程度的 Bcl-2，因此可以抑制 apoptosis；此外 Melanoma 細胞也會抑制 Apaf-1 的基因表現來避免細胞被 apoptosis。其他的癌症細胞會表現高程度的 FasL，可用以毒殺任何會表現 Fas 以殺死癌症細胞的 cytotoxic T cell (CTL)。

Apoptosis 有三種可能的機轉，首先是藉由細胞本身引起的訊號傳遞；再來是由 death activator 結合細胞表面受器觸發的細胞死亡，這包括了 TNF- $\alpha$  Lymphotoxin Fas ligand；第三種則為由具危險性的 reactive oxygen species 引起的 apoptosis。其中腫瘤壞死因子及其受體 [TNF (Tumor Necrosis Factor) / TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor)] 家族蛋白，在生物系統中媒介著 apoptosis 的作用上扮演了極重要的角色。而且在這個家族中有數個成員表現出具有調節 apoptosis 訊息且影響著免疫系統的能力。

腫瘤壞死因子家族 (ligand family) 中特定的細胞激素和它們共軛的受體家族 (receptor family) 之間的結合可以引起相當多不同的生理功能，包含 proliferation、costimulation、differentiation 和 apoptosis，而其中又以 apoptosis 的功能最受到重視。TNFR-1 和 Fas (或稱 Apo-1 或 CD95)，是這類分子中啟動細胞自殺反應的典型。此第二型的膜蛋白，其胺端在細胞內、羧端在細胞外，由序列及結晶學上的研究知道配體的胞外小區 (extracellular domain) 具有相當高的相似性，除了 TNF 及 LT 之間會有 heterotrimer 形成 (結合不同的受體)，一般配體之間 (可溶性或膜蛋白) 是以 homotrimer 的形式存在。TNF 和 FasL (也叫 Apo-1L 或 CD95L) 經由和它們具有 death region 的受體 TNFR-1、Fas 結合可引起 apoptosis，目前共有五個屬 TNF 受體超級家族分子中的

成員。據了解有 death region 且能傳遞死亡訊息，這些成員包含 TNFR-1、Fas、和三個最近選殖出來的 death receptor：DR3、DR4 及 DR5。DR3 的配體已知為 Apo3L，而 DR4 和 DR5 是 TRAIL 的 death receptor。這些 death receptor 的細胞外區域蛋白序列上具有相當的同源性：具有高度保守性的假重複 (pseudorepeats) 部分，為第一型膜蛋白 (N 端在細胞外 C 端在內)—DR4 與 DR5 有 64% 的相似性。另外，這些 death receptor 也以在 C 端帶有一段約 80 個胺基酸組成具有保守性的 Death Domain 為特色，而此 death domain 的功能顧名思義就是用以傳遞死亡訊息。這些 death domain 是蛋白質和蛋白質之間作用的 motif，藉由受體上的 death domain 與細胞內具有 death domain 的 adapter protein 結合，造成訊息複體 (complex) 的連結，致最終招攬 pro-apoptotic protease caspases (類似於 *Caenorhabditis elegans* 死亡基因 CED-3) 的加入，帶領細胞走向 apoptosis。

Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) 又稱為 Apo-2 ligand，是屬於 TNF family type II 的膜蛋白。在 1995 年被發現，在蛋白質序列上與 FasL 具有高度相似性 (以胞外受體結合區最為相似)，並且也像 FasL 一樣，可以引起相當多不同起源的轉型細胞株快速地進行細胞凋亡。不同的是 TRAIL 已經被證明只在各種腫瘤與 transformed cell 中引起 apoptosis 而不會發生在正常的細胞。不像 Fas ligand (FasL) 與 TNF 被限制在組織中分布，它的表現不局限在刺激過的 T 細胞或是免疫特權部位如睪丸和眼睛的前腔室，TRAIL mRNA 廣泛的表現在各種組織與細胞種類間。近來，TRAIL 的功能表現被觀察到在各種會藉由未知機轉引起目標細胞 apoptosis 的免疫細胞表面，這些細胞包含了藉由 cellular transformation 刺激的 natural killer cells (NK) dendritic cells (DC) monocytes 與 T cells，因此推測 TRAIL 扮演腫瘤細胞中選擇引起 apoptosis 的角色。

TRAIL 的功能被他所需要作用的 receptor 所調節，他可以 binding 五種 TRAIL receptor，其中兩種是帶有功能性 death domain (DD) 的訊號受器，而另外三種則是 decoy receptor。這種訊號受器又稱為 death receptor 4 (TRAIL-R1) 與 death receptor 5 (TRAIL-R2)。處理 TRAIL 後短時間內，DR4 與 DR5 的 DD 會與一個在 adaptor protein FADD (Fas-associated protein with death domain) 相似的 domain 相連結，造成 pro-caspase-8 與 10 的填補，進而形成 DISC (death-inducing signaling complex)。一旦 DISC 形

成，就會促進活化蛋白質 pro-caspase-8 與 10 自我解離，以釋放出可以依序切割與活化下游 caspase 的活化態 caspase8 而導致 apoptosis。TRAIL 引起 caspase8 的活化最後也會切割 Bid 並活化 mitochondrial apoptotic pathway。

TRAIL 引發的 apoptosis 與其特殊的表現有腫瘤選擇性，因此被假設為由 TRAIL 引發的 apoptosis pathway 會藉數種機轉緊密調節來控制細胞自發性死亡。其中一種機轉包括 apoptosis 的細胞抑制劑稱為 c-FLIP (FLICE inhibitory protein)，他存在 c-FILP<sub>L</sub> 與 c-FILP<sub>S</sub> 兩種 splice variant。c-FILP<sub>L</sub> 包含兩個 death effector domains(DED)與由 p17 與 p12 兩個 subunits 組成的一個 inactive 的 caspase domain。換句話說，c-FILP<sub>S</sub> 缺乏完全的 caspase domain，但是能有兩個 DEDs。DED 是一種重要的 protein interaction domain，可以在 DISC 中讓 TNF receptor family 填補 caspase。進一步說，c-FILP<sub>L</sub> 的 341 位置有特殊的 caspase 切割區，推測是藉由 caspases 來調節 c-FILP<sub>L</sub> 的功能。的確，另一個 c-FLIP variant--c-FLIP<sub>p43</sub> 是全長的 c-FILP<sub>L</sub> 切割後的產物。

c-FLIP 已經顯示出會干擾 TNF。Fas 及 mitochondrial apoptosis 上游的 TRAIL-induced death receptor signaling pathways 藉由在 DISC 層面上和 FADD 與/或 FLICE/caspase8 結合去調節，而後抑制 caspase cascade 的活性。然而現在通過 c-FLIP variant 調節 apoptosis 有更明確的腳色。例如，c-FILP<sub>L</sub> 被發現有相對的兩個功能，在表現量高的時候會抑制 Fas-induced caspase-8 的填補與活化，在低濃度下卻又會促進 caspase-8 的活化；c-FILP<sub>S</sub> 卻顯示出他會抑制 TRAIL-induced DISC 的形成與 apoptosis。因此，c-FLIP protein 是 death ligand-induced apoptosis 的重要調節者，不同程度還有活性的 c-FLIP variants 可以在 DISC 下調節 death ligand-induced caspase 的活性。

為了要抑制不需要的 apoptosis，TRAIL 與 TRAIL receptor 的表現和功能在各種的組織受到緊密的調節。這個特化的機制必須包括生理功能的調節與 TRAIL-induced apoptosis 的腫瘤選擇性。這會進一步在各種免疫過程和引發腫瘤選擇細胞死亡的能力來強調 TRAIL 的相關性。利用符合一段 c-FILP<sub>L</sub> 的 caspase domain 的 region 並與 DR5 的 death domain 有特殊作用的一個 peptide ligand，證明了 c-FILP<sub>L</sub> 和 DR5 的 death domain 在 in vitro pull-down assays 和在哺乳動物的內生性蛋白質 in co-immunoprecipitation 的研究中都有 interaction。這個 interaction 發生在缺乏 TRAIL 和沒有 FADD 的狀

況下。此外，用 TRAIL 處理會導致 c-FLIP<sub>L</sub> 從 DR5 釋放出來，進而允許 FADD 與 caspase-8 complex 填補到受器上。最後，對於細胞膜對於 c-FLIP peptide 的通透性符合 c-FLIP<sub>L</sub> domain 與 DR5 結合引發了自然的 ligand-independent apoptosis。

TRAIL 與 TRAIL receptor 廣泛的表現在各種組織中，由 TRAIL receptor 引起的 ligand-independent 自發性訊號導致不恰當的 apoptosis。因此從 TRAIL receptor 所造成的訊號必須受到細胞機轉的確認。在 DISC 中，c-FLIP 已經被視為通過連接與抑制 caspase8/10 的 death receptor 來調節 apoptosis 的重要調節者。然而，最近被報導當 c-FLIP 在 DISC 中表現，其功能較像 caspase8 的 activator 而非 inhibitor。此點藉由 c-FLIP 會抑制 death receptor 引起的 apoptosis 的機轉已經可以說明。且 c-FLIP<sub>L</sub> 直接與 DR5 receptor 作用並且在形成 DISC 之前優先調節 TRAIL-induced apoptosis。c-FLIP<sub>L</sub> 的角色就是 DISC 上游的 cell death 調節者，這相似於近來定義稱為 silencer of death domain(SODD) 的 TNF signaling 蛋白質調節者。SODD 抑制從 TNF-R1 經由 receptor 的 pre-associating 與預防 active signaling complex 形成自發性訊號。在刺激下，TNF-induced receptor 聚集成 trimer 引發 SODD 從 TNFR-1 上快速解離，然後 active signaling complex 的聚集形成。相似的情形再 TRAIL 刺激下觀察到 c-FLIP<sub>L</sub> 從 DISC 解離下來。FADD 與 caspase8 同時填補到 DR5 DISC 並活化 caspase8。有趣的是 c-FLIP<sub>L</sub> 從 DR5 解離會伴隨著 c-FLIP<sub>p43</sub> (缺乏 DR5 binding domain) 的發生，所以推測 c-FLIP<sub>L</sub> 的釋放會引起他的 proteolytic processing，並且最後會引起 類似 SODD 的活性。

縱上所述，這些研究證明在 DR5 與 c-FLIP<sub>L</sub> 間的直接作用指出在 death receptor 層面上的 death signaling 的抑制作用，尤其是在 death receptor 層面上的 death signaling 抑制作用可能是由正常細胞中的 c-FLIP<sub>L</sub> 表現來預防不想要的 apoptosis 的機轉。由此依賴 FADD/caspase 8 相對 c-FLIP<sub>L</sub> 的比例，DR5 可能用 c-FLIP<sub>L</sub> 或 FADD/caspase 8 填補。這個點子也藉由觀察到 c-FLIP<sub>L</sub> 在某個人類腫瘤細胞中的持續機轉用以限制 TRAIL 引發的 apoptosis 中 over-expression 所支持。這些腫瘤對於 TRAIL signaling 的限制可能會是因為 DR5 與 c-FLIP<sub>L</sub> 的 pre-association 導致 DISC 形成被抑制所造成。例如，NF- $\kappa$ B 在之前已被 report 為通過與 c-FLIP<sub>L</sub> 連接 TRAIL 與 IKK2 而被有效的活化。因此，DR5 與 c-FLIP<sub>L</sub> 作用被 cellular-membrane 通透 c-FLIP<sub>L</sub> peptide 破壞(符合 DR5 會與 c-FLIP<sub>L</sub> 結合)將會造成自發性 apoptosis 的增加。這個 DR5/c-FLIP<sub>L</sub> 抵制

apoptosis signaling complex 的調節的貢獻與型式會與 FADD/caspase-8 DISC 相抗衡而決定細胞的生與死。

在醫學運用方面，TRAIL 本身具訊息傳導之功能，傳遞訊息給 T 細胞，增強 T 細胞活化時之增殖反應，及干擾素(interferon- $\gamma$ ，IFN- $\gamma$ ) 的產生。TNT-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL 或稱為 Apo2L) 因此被認定為免疫 T 細胞活化之重要之細胞表面分子，過去認為 TRAIL 是 co-stimulation 分子，研究更發現 TRAIL 本身即可增加 T 細胞活化。為了尋找 TRAIL 引發 T-cell 活化時參與之其他細胞分子，利用蛋白質體學技術找可能的對象，對未來研究 TRAIL 與 T 細胞活化將是重要的工具；此外又因為 TRAIL 在各種細胞轉化中導致細胞凋亡但不對正常細胞產生影響。TRAIL 也可在體外之系統中引起癌細胞死亡，在與其他抗癌藥物合併使用，可加強 TRAIL 對於癌細胞的細胞毒殺作用。韓國 Yonsei 大學醫學院的科學家報導出 IFN- $\gamma$  導致肝癌細胞死亡的機轉，建立了兩個 B 型肝炎相關的肝癌細胞系 SNU354 和 SNU368，IFN- $\gamma$  在肝癌細胞系 SNU368 中能促使 apoptosis 和 caspase-3 活性增加，但是在 SNU354 不會發生。IFN- $\gamma$  能導致幾個 apoptosis 調節基因的 mRNA 表達變化，如 Fas 表達、caspase-1 和腫瘤壞死因子相關 apoptosis 分子 TRAIL。特別是在兩個細胞系中 IFN- $\gamma$  導致 TRAIL mRNA 表現量增加，促使 IFN- $\gamma$  的作用通過 TRAIL 介導凋亡途徑導致 apoptosis。最後的結論是 IFN- $\gamma$  的活化在 TRAIL 調節的 apoptosis 中扮演一個引導者(inducer)的角色。

美國癌症研究人員對參與癌細胞 apoptosis 的 TRAIL 蛋白可以與神經幹細胞結合在一起，追蹤和破壞人類神經膠質母細胞瘤。神經幹細胞與 TRAIL 聯合應用將有可能為一種治療神經膠質瘤新方法。來自洛杉磯 Cedars-Sinai 醫學中心的 Maxine Dunitz 神經外科研究所 Dr. John S. Yu 等人以前曾經用自體神經幹細胞通過組織工程學方法分泌出白細胞介素-12 (IL-12) 來治療實驗性神經膠質瘤，已經證實神經幹細胞不僅能夠誘導細胞毒性 T 細胞分泌 IL-12，它還能夠通過釋放出 TRAIL 來誘導細胞凋亡。在小鼠身上接種人類神經膠質母細胞瘤細胞，然後用分泌 TRAIL 的神經幹細胞進行治療，結果發現能夠顯著選擇性誘導腫瘤 apoptosis，抑制腫瘤及周圍衛星灶的生長。細胞凋亡僅限於腫瘤組織中，在正常大腦實質中未見到細胞死亡。這項研究被認為有可以通過幹細胞在向腦腫瘤細胞中傳送各種治療性蛋白質，應用這一系列抗癌機轉，直接向腫瘤組織中治療神經幹細胞癌症。

*Mycobacterium bovis* Bacillus calmette-Guerin(BCG) 從 1976 年就開始被來治療乳癌，但是他的抗癌的機轉一直都未被全盤了解。BCG 是潛在性的免疫刺激物而使其正常的製造出包含 IFN 的 Th1 cytokine 免疫反應。近來研究顯示出 CpG oligodeoxynucleotid 經由 IFN 的製造，會引發 TRAIL 表現給予含有高量的 CpG motifs 的 *Mycobacterial* DNA。研究中發現 TRAIL 在 BCG 治療乳癌有扮演重要的角色。

TRAIL 引發的 apoptosis 在免疫上的研究當然不只有針對癌症的部分，另外在對於 AIDS 的治療也有相當程度的研究。因為 TRAIL 可以增進免疫 T 細胞的活化作用，或許會成為最新治療 HIV 的藥物。還有缺乏 TRAIL 引發的自體免疫問題科學家們也正在尋求方法治療。TRAIL 雖然目前是一個很熱門的主題，但是其實他的機制還不是完全被解開。對於他可以治療癌症的部分，也需要進一步的探討，這還有一大段需要我們參與研究的地方，目前有些藥廠積極研發相關的藥品對於 TRAIL 的應用有很大的進步。但是對於 TRAIL 的有無副作用部分的相關研究卻是非常的少這是值得我們再深入研究探討。

#### Reference:

1. Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1999) *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 255 - 260
2. Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 12687 - 12690
3. Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M. E. (1998) *Eur. J. Biochem.* **254**, 439 - 459
4. Yamada, H., Tada-Oikawa, S., Uchida, A., and Kawanishi, S. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 130 - 133
5. Esposti, M. D. (2002) *Apoptosis* **7**, 433 - 440
6. Zimmermann, K. C., Bonzon, C., and Green, D. R. (2001) *Pharmacol. Ther.* **92**, 57 - 70
7. Korsmeyer, S. J., Gross, A., Harada, H., Zha, J., Wang, K., Yin, X. M., Wei, M., and Zinkel, S. (1999) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **64**, 343 - 350
8. Takenobu, T., Tomizawa, K., Matsushita, M., Li, S. T., Moriwaki, A., Lu, Y. F., and Matsui, H. (2002) *Mol. Cancer Ther.* **1**, 1043 - 1049
9. Adams, J. M., and Cory, S. (1998) *Science* **281**, 1322 - 1326
10. Meier, P., and Silke, J. (2003) *Nat. Cell Biol.* **5**, 1035 - 1038

11. Jiang, Y., Woronicz, J. D., Liu, W., and Goeddel, D. V. (1999) *Science* **283**, 543 - 546
12. Tschopp, J., Martinon, F., and Hofmann, K. (1999) *Curr. Biol.* **9**, R381 - 384
13. Takada, H., Chen, N. J., Mirtsos, C., Suzuki, S., Suzuki, N., Wakeham, A., Mak, T. W., and Yeh, W. C. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4026 - 4033
14. MacFarlane, M. (2003) *Toxicol. Lett.* **139**, 89 - 97
15. Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 22532 - 22538
16. Fesik, S. W. (2000) *Cell* **103**, 273 - 282
17. Thomas, L. R., Stillman, D. J., and Thorburn, A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 34343 - 34348
18. Leverkus, M., Neumann, M., Mengling, T., Rauch, C. T., Brocker, E. B., Krammer, P. H., and Walczak, H. (2000) *Cancer Res.* **60**, 553 - 559
19. Yang, X. (2002) *Cancer Biol. Ther.* **1**, 407 - 408
20. Kataoka, T., Budd, R. C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmeler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacsovics, M., and Tschopp, J. (2000) *Curr. Biol.* **10**, 640 - 648
21. Tai-Guang Jin, Alexei Kurakin, Nordine Benhaga, Karon Abe, Mehrdad Mohseni, Ferry Sandra, Keli Song, Brian K. Kay, and Roya Khosravi-Far(2004)JBC. **279**, 55594 - 55601,
22. Shin EC, Ahn JM, Kim CH, Choi Y, Ahn YS, Kim H, Kim SJ, Park JH. (2001) *Int J Cancer.* **93**, 262-8
23. Ichikawa K, Liu W, Zhao L, Wang Z, Liu D, Ohtsuka T, Zhang H, Mountz JD, Koopman WJ, Kimberly RP, Zhou T. (2001) *Nat Med.* **7**, 954-60.
24. Herbeuval JP, Hardy AW, Boasso A, Anderson SA, Dolan MJ, Dy M, Shearer GM. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 13974-9.