

「脳を守る」

平成9年度採択研究代表者

桐野 高明

(東京大学医学部 教授)

## 「遅発性神経細胞死の分子機構」

### 1. 研究実施の概要

一過性脳虚血後の海馬遅発性神経細胞死はきわめて緩徐に進行し、受動的破壊による細胞死とは異なる。その上流では神経細胞特有の機構による細胞死の決定機構がはたらき、その間は、神経細胞死は可逆性で治療可能であり、最終的にアポトーシス共通の経路に達すると、不可逆に進行すると考えられる。アポトーシスの上流での神経細胞特有の分子機構を解明し、治療可能域を探ることが本研究のねらいである。

当該研究は、これまで主として、形態学的変化、代謝変化、遺伝子発現、タンパク質発現の面から検討がおこなわれてきた。その概要は以下のとおりである。すなわち、短時間の虚血（齧歯類を用いた実験モデルでは 3-10 分）の後、脳血流・エネルギー(ATP)代謝・グルコース代謝などの代謝パラメータは復旧する。形態学的に見ても、細胞死を示す所見は少なくとも虚血の 24 時間後までは認めない。神経細胞は正常の膜電位を保持して電気的な活動も示す。ストレス蛋白 (hsp70, ubiquitin) などの mRNA の発現もおこなう。しかしこれらの mRNA からタンパク質への翻訳は強く抑制される。同部位では平常時から calcineurin タンパク質が高発現している。また、虚血に際して conjugated-type ubiquitin の蓄積と free ubiquitin の減少が認められ、ubiquitin/proteasome タンパク質分解系の機能低下が疑われる。また、この間に、p53 のタンパク質レベルでの蓄積が認められ、bax, bcl-xL, Nedd-2, caspase-3 等アポトーシス関連遺伝子の mRNA の発現が上昇する。虚血後 24 時間前後で caspase-3 活性が上昇する。また、虚血後 24~48 時間で、TUNEL 陽性細胞が出現し、genomic DNA の internucleosomal fragmentation が認められる。このような変化を経て、虚血から 3-4 日経過すると、海馬 CA1 錘体細胞の大部分は死んで消滅する。これらの知見に基づいて、我々は、calcineurin と proteasome がこの遅発性神経細胞死に関与しているのではないかと仮説をたて、それを検証した。その結果、calcineurin の高発現により、神経細胞が種々の刺激に対して脆弱となること、proteasome 機能の低下により、神経細胞死が誘導されることが明らかになった。今後はさらに、これらの分子の相互関係、特に細胞

死を上流で制御する因子、たとえば p53 との相互関係などを中心に解析を進めていく予定である。

## 2. 本年度の成果概要

### (1) 神経細胞死における calcineurin および proteasome の関与

神経細胞死への関与が示唆されている calcineurin と proteasome 機能についてその関与について直接的に検討したところ、calcineurin の高発現は神経細胞を脆弱にし、さらに高い発現ではアポトーシスが誘導されること、proteasome の機能低下は直接アポトーシスを誘導することが明らかになった。

### (2) p53 による caspase-3 mRNA の発現制御

p53 の発現および p53 の転写活性を上げる薬剤をもちいると caspase-3 の発現が上昇するため caspase-3 のプロモータ上流域の塩基配列を検索したところ、p53 の結合領域が存在することが明らかになった。

### (3) ras 高発現による細胞死

グリア細胞内において変異型 ras 遺伝子を高発現させると、caspase 依存性の apoptosis でもなく、また、necrosis でもない形態をとる細胞死が誘導されることが明らかになった。

## 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○Morikawa E, Mori H, Kiyama Y, Mishina M, Asano T, Kirino T: Attenuation of focal ischemic brain injury in mice deficient in the epsilon1 (NR2A) subunit of NMDA receptor. *J Neurosci* 18:9727-9732 1998

○Kawahara N, Ide T, Saito N, Kawai K, Kirino T: Propentofylline potentiates induced ischemic tolerance in gerbil hippocampal neurons via adenosine receptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:472-475, 1998

○Kawai K, Nakagomi T, Kirino T, Tamura A, Kawai N: Preconditioning in vivo ischemia inhibits anoxic long-term potentiation and functionally protects CA1 neurons in the gerbil. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:288-296, 1998

○Shinoura N, Ohashi M, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Saito I, Hamada H: Construction, propagation, and titer estimation of recombinant adenoviruses carrying proapoptotic genes. *Hum Gene Ther* 9:2683-2689, 1998

○Shinoura N, Yoshida Y, Sadata A, Hanada KI, Yamamoto S, Kirino T, Asai A, Hamada H: Apoptosis by retrovirus- and adenovirus-mediated gene transfer of Fas ligand to glioma cells: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 9:1983-1993, 1998

他 1 件