

「脳を守る」
平成9年度採択研究代表者

桐野 高明

(東京大学大学院医学系研究科 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。これまでにcalcineurinによる細胞死のカスケードの下流にp53が存在すること、さらにこのp53はその15番目のserineがATMによりリン酸化を受けていることが明らかになった。この事象はfibroblastとglia細胞で確認されている。また、海馬CA1領域で、一過性前脳虚血後、遅発性神経細胞死に先立って、proteasomeの機能が低下し、それが不可逆であることを明らかにした。また、それがproteasomeのサブユニットの再会合障害によるものであることを明らかにした。さらに、多くの細胞でp53によりcaspase-3遺伝子の発現が促進されることがわかっているが、我々は、caspase-3遺伝子の第1イントロンにp53の結合領域が存在し、それが転写活性化能を有することを明らかにした。また、gene chipを用いて、ラット一過性全脳虚血後、遅発性神経細胞死に先行して発現の変動する遺伝子をスクリーニングしたところ、これまでに報告のあるHSP70など246の遺伝子発現が上昇し、213の遺伝子発現が低下した。

2. 研究実施内容

(1) calcineurin高発現による神経細胞死の機序に関する研究

これまでにcalcineurin高発現により神経細胞死が誘導されることを明らかにしてきたが、今回、その下流の分子機序の解明を試みた。その結果、p53ノックアウトマウスより作製したMEF細胞でcalcineurinによる細胞死は抑制されることが明らかになった。このことはcalcineurinによる細胞死にはp53が必須であることを示している。また、p53野生型の細胞では、p53の蓄積が認められ、しかも、15番目のserineがリン酸化されたp53が蓄積することが明らかになった。また、p53の15番目のserineをリン酸化することがわかっているATMを欠失した細胞

と、ATMが野生型の細胞で比較すると、calcineurinによるアポトーシスが前者で抑制されることが明らかになり、calcineurinによるアポトーシスはATMによるp53のリン酸化が必須であることが明らかになった。この事象はfibroblastとglia細胞で確認されている。

(2) 海馬CA1細胞におけるATP依存性proteasome機能の非可逆的回復不全に関する研究

我々は以前より、一過性前脳虚血後海馬CA1領域において選択的に、conjugated-formのコビキチンが蓄積し、free-formのコビキチンが減少し、これらが元に回復しないことを見いだしていた。そこで、この現象が一過性前脳虚血後の海馬CA1領域のproteasome機能回復不全によるとの仮説を立て、それを検証した。砂ネズミを用いて、一過性前脳虚血後、経時的に断頭して脳を取り出し、snap frozenしたのち100 μmの凍結切片を多数作製し、そこから、海馬CA1領域、CA3領域、および大脳皮質を掻き出し、それぞれlysateを調整し、proteasome活性を測定した。その結果、海馬CA3領域および大脳皮質領域では、proteasome活性は一過性前脳虚血後一旦低下するものの6時間程度で正常レベルまで回復するが、海馬CA1領域では低下したままであることが明らかになった。次にこのproteasome機能回復不全は、一過性前脳虚血後、ATP枯渇により26s proteasomeが20sと700PAに解離したものが、血流再開によりATPが回復した後も、海馬CA1領域では何らかの理由により、20s分画と700PAの再会合が障害されているのが原因であるとの仮説を立て、それを検証した。断頭後20分経過し、ATPが完全に枯渇した状態の脳から大脳皮質および海馬全体を取り出し、それぞれlysateを作製した。それらにin vitroでATPを加え（in vitro ATP-regeneration system）、proteasomeの20sから26sへの再会合の有無を超遠心分離法を用いて比較検討した。その結果、海馬では大脳皮質に比較して、ATP添加後も26sへの再会合が有意に低いことが明らかになり、何らかの機序により、この再会合が阻害されていることが示唆された。

(3) p53によるcaspase-3遺伝子発現調節に関する研究

我々は、caspase-3遺伝子の発現が、p53そのものあるいはp53を活性化する薬剤等により上昇することより、caspase-3遺伝子発現がp53により直接制御されているという仮説をたて、それを検証した。その結果、caspase-3遺伝子の開始コドンの上流約3 kb、第1イントロンの中にp53が結合するp53 binding consensus sequenceを見出した。gel motility shift assayにてその塩基配列がp53に結合すること、CAT assayによりその塩基配列が転写活性化能を有することを証明した。

(4) 遅発性神経細胞死の動物モデルとして、ラットの一過性前脳虚血6分を用いた。また、本モデルでは2分の短時間虚血を3日前に負荷しておく、6分虚血後に

も90%近い神経細胞が生存することを確認してある。すなわち2分虚血後には、遅発性神経細胞死に対する耐性が誘導されている。シャム群、2分虚血群、6分虚血群の3群を用いて、虚血後1時間から48時間まで、海馬CA1領域からmRNAを抽出し、oligonucleotide high density microarray(GeneChip)を用いて約8800の遺伝子(ESTを含む)の発現変化を検討した。虚血後の発現が、正常群、シャム群のものより再現性を持って2倍以上の上昇ないし1/2以下の低下を示したものを有意な変化とみなした。本基準により、246遺伝子が上昇(約28%)、213遺伝子が低下(約24%)、重複を除外して合計443遺伝子が変化を示した(約5%)。これら443遺伝子の階層的クラスタリング解析では、発現パターンを大きく6型に分類することができた。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

Shinoura N, Yamamoto N, Yoshida Y, Fujita T, Saito N, Asai A, Kirino T, Hamada H. Adenovirus-mediated gene transduction of IkappaB or IkappaB plus Bax gene drastically enhances tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis in human gliomas. *Jpn J Cancer Res* 91 : 41-51, 2000

Shinoura N, Ohashi M, Yoshida Y, Kirino T, Asai A, Hashimoto M, Hamada H. Adenovirus-mediated overexpression of Fas induces apoptosis of gliomas. *Cancer Gene Ther* 7 : 224-232, 2000

Shinoura N, Muramatsu Y, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H. Adenovirus-mediated transfer of caspase-3 with Fas ligand induces drastic apoptosis in U-373MG glioma cells. *Exp Cell Res* 256 : 423-433, 2000

Shinoura N, Yamamoto N, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H. Adenovirus-mediated transfer of caspase-8 in combination with superrepressor of NF-kappaB drastically induced apoptosis in gliomas. *Biochem Biophys Res Commun*. 271 : 544-552, 2000

Shinoura N, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H. Adenovirus-mediated transfer of p53 and Fas ligand drastically enhances apoptosis in gliomas. *Cancer Gene Ther*. 7 : 732-738, 2000

Shinoura N, Saito K, Yoshida Y, Hashimoto M, Asai A, Kirino T, Hamada H. Adenovirus-mediated transfer of bax with caspase-8 controlled by myelin basic protein promoter exerts an enhanced cytotoxic effect in gliomas. *Cancer Gene Ther*. 7 : 739-748, 2000

Shinoura N, Koike H, Furitu T, Hashimoto M, Asai A, Kirino T, Hamada H. Adenovirus-mediated transfer of caspase-8 augments cell death in gliomas : implication for gene therapy. *Hum Gene Ther*. 11 : 1123-1137, 2000

Shinoura N, Sakurai S, Asai A, Kirino T, Hamada H. Transduction of Apaf-1 or Caspase-9 induces apoptosis in A-172 cells that are resistant to p53-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 272 : 667-673, 2000

Shinoura N, Yamamoto N, Asai A, Kirino T, Hamada H. Adenovirus-mediated Transfer of Fas Ligand Gene Augments Radiation-induced Apoptosis in U-373MG Glioma Cells. *Jpn J Cancer Res.* 91 : 1044-1050, 2000

Shinoura N, Sakurai S, Asai A, Kirino T, Hamada H. Transduction of a Fiber-mutant Adenovirus for the HSVtk Gene Highly Augments the Cytopathic Effect towards Gliomas. *Jpn J Cancer Res.* 91 : 1028-1034, 2000

Zhu L, Saito N, Abe O, Okubo T, Yamada H, Kawahara N, Asai A, Kirino T. Changes in the apparent diffusion coefficient of water and T2 relaxation time in gerbil hippocampus after mild ischemia. *Neuroreport.* 11 : 3333-3336, 2000

Shinoura N, Muramatsu Y, Asai A, Han S, Norii A, Kirino T, Hamada H : Degree of apoptosis induced by adenovirus-mediated transduction of p53 or p73 depends on the p53 status of glioma cell. *Cancer Letters* 160 : 67-73, 2000