

「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の分子機構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、その下流で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20SとPA700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、proteasome機能阻害による神経細胞死の分子機構の下流でp53が必要不可欠であることを見出した。また、マウスにおける一過性全脳虚血後の遅発性神経細胞死モデルを確立した。

2. 研究実施内容

(1) 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のユビキチンが蓄積し、free-formのユビキチンが減少し、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 μ m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速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。

(2) proteasome機能阻害による神経細胞死の分子機構に関する研究

神経細胞以外の細胞ではproteasome機能阻害による細胞死にはp53が関与しているという報告が複数あるもののp53は関与しないという報告もあり、依然controversialである。そこで我々は、神経細胞におけるproteasome機能阻害による細胞死にp53が不可欠であるという仮説を立ててそれを検証した。生後8日目のp53ノックアウトマウスから作製した小脳顆粒細胞の初代培養を用いた。この初代培養細胞にproteasome阻害剤であるz-LLL-alを作用させ、p53の蓄積、細胞死を経時的に観察し、死細胞数をカウントした。P53+/+の細胞にproteasome阻害剤処理をおこなうと、経時的にp53タンパク質の蓄積が認められ、処理後24時間がそのピークであった。また、p53-/-とp53+/+の細胞で細胞死を比較すると、前者で有意に神経細胞死が抑制されていた。また、p53-/-とp53+/+の細胞を混合培養したものにproteasome阻害剤処理をしたところ、p53の発現のある細胞に特異的に核の変形が認められ、細胞死がおこりつつあることが確認できた。以上のことから、神経細胞におけるproteasome機能阻害による細胞死にはp53が不可欠であることが示された。

(3) マウス遅発性神経細胞死モデルの作製

マウスにおける一過性全脳虚血後の遅発性神経細胞死モデルを以下のようにして作製した。麻酔下に両側総頸動脈、脳底動脈を露出し、動脈瘤クリップを用いて2分～16分間の血行遮断を行った後、クリップを除去して血行を再開するというもので、閉創後4日目に灌流固定にてsacrificeしてパラフィン切片を作製し、cresyl violet染色後鏡検した。その結果、6分以下の血行遮断では全く生細胞数は減少せず、8分以上で時間依存的な生細胞数の減少を認めた。また、10分以上の血行遮断で時間依存的にマウスの死亡率が増加してくることが明らかになった。14分の血行遮断で生細胞数は約10%にまで低下し、また、マウスの死亡率は30%であり、至適な血行遮断時間であると判断された。

3. 研究実施体制

(1) 分子機構解析グループ1

- ① 研究グループ長名: 桐野高明 東京大学脳神経外科教授
- ② 研究項目:
 - ・ 海馬CA1領域におけるproteasome機能の解析
 - ・ マウス全脳虚血モデルの作製
 - ・ ラット一過性全脳虚血モデルにおけるproteomics解析

(2) 分子機構解析グループ2

- ① 研究グループ長名: 口野嘉幸 国立がんセンター研究所生物物理部部長
- ② 研究項目: ERストレスによる神経細胞死機序の解明

(3) 治療実験グループ1

- ① 研究グループ長名: 濱田洋文 札幌医科大学分子医学研究部門教授
- ② 研究項目: アポトーシス抑制遺伝子を組み込んだTATタンパク質作製と培養細

胞での効果判定

(4) 治療実験グループ2

① 研究グループ長名:森川栄治 埼玉医科大学総合医療センター脳神経外科講師

② 研究項目:マウス全脳虚血モデルの作製

(5) 治療実験グループ3

① 研究グループ長名:渡邊 卓 杏林大学医学部臨床病理学教室教授

② 研究項目:網膜神経細胞の発生期における細胞死の分子マーカーによる観察

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Shinoura N, Sakurai S, Asai A, Kirino T, Hamada H: Co-transduction of Apaf-1 and caspase-9 augments etoposide-induced apoptosis in U-373MG glioma cells. Jpn J Cancer Res. 92:467-474, 2001
- Shinoura N, Sakurai S, Asai A, Kirino T, Hamada H: Over-expression of APAF-1 and caspase-9 augments radiation-induced apoptosis in U-373MG glioma cells. Int J Cancer 93: 252-261, 2001
- Shinoura N, Sakurai S, Asai A, Kirino T, Hamada H: Caspase-9 transduction overrides the resistance mechanism against p53-mediated apoptosis in U-87MG glioma cells. Neurosurgery. 49: 177-186, 2001
- Kurita H, Kawahara N, Asai A, Ueki K, Shin M, Kirino T: Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in the adult rat brain. Neurol Res. 23:869-874, 2001
- Mochizuki T, Asai A, Saito N, Tanaka S, Katagiri H, Asano T, Nakane M, Tamura A, Kuchino Y, Kitanaka C, Kirino T: Akt protein kinase inhibits non-apoptotic programmed cell death induced by ceramide. J Biol Chem 277:2790-2797, 2001
- Shinoura N, Furitsu T, Asai A, Kirino T, Hamada H: Co-transduction of p27 Kip1 strongly augments Fas ligand- and caspase-8-mediated apoptosis in U-373MG glioma cells. Anticancer Res 21:3261-3268, 2001

(2) 特許出願

なし