

「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働き、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。これまでに大脳皮質培養神経細胞においてcalcineurinの高発現により、血清減少、Ca²⁺ ionophore刺激等のsublethalな刺激によって容易にcytochrome cおよびcaspase-3-like protease依存性のアポトーシスが誘導されることが明らかになった。また、大脳皮質培養神経細胞において、proteasome阻害剤によるproteasome機能低下により、cytochrome cおよびcaspase-3-like protease依存性のアポトーシスが誘導されることが明らかになった。さらに、断頭後、ATP枯渇状態の大脳皮質および海馬のlysateにATPを復したとき、大脳皮質ではproteasomeの20s分画と700PAの再会合がおり、26s機能が回復するが、海馬組織ではそれが障害されていることが明らかになった。今後、calcineurinの下流にp53が作用しているとの仮説、海馬におけるATP依存性proteasome機能回復の不全の原因にcalcineurinが関与しているとの仮説を立て、それらを検証する予定である。

2. 研究実施内容

(1) calcineurin高発現による神経細胞の脆弱性増強に関する研究

脳の中でも特に海馬CA1細胞に高発現しているcalcineurinは神経細胞を脆弱化するとの仮説を検証した。大脳皮質培養神経細胞において、アデノウイルスを用いてcalcineurinをそれ自体ではアポトーシスを誘導しない程度(中等度)に発現させた場合、血清の半減、あるいは、低濃度のA23187 (Ca²⁺ ionophore) による短時間刺激等のそれ自体ではアポトーシスを起こさないようなsublethalな刺激によって容易にアポトーシスが誘導されることが明らかになった。また、これらのアポトーシスはミトコンドリアからのcytochrome cの放出を介し、caspase-3-like protease依存性に起こっていることが明らかになった。このアポトーシスは

calcineurinの阻害剤であるcyclosporin AやFK506によって軽減されること、また、Bcl-XLの発現により抑制されることが明らかになった。

(2) proteasome機能低下による神経細胞死に関する研究

大脳皮質培養神経細胞において、z-LLL-alあるいはlactacystin等のproteasome阻害剤を用いてproteasome機能を低下させると、急速にアポトーシスが誘導されることが明らかになった。このアポトーシスはミトコンドリアの膜電位の低下およびそれに続くミトコンドリアから細胞質へのcytochrome cの放出を伴い、caspase-3-like proteaseの活性依存性に誘導されることが明らかになった。このアポトーシスはproteasome阻害機能を有さないz-LLLにより競合的に阻害され、また、Bcl-xL発現あるいはcaspase-3阻害剤によって抑制されることが明らかになった。この際、caspase-3阻害剤ではミトコンドリアの膜電位低下は抑制されずcaspase-3-like proteaseの活性のみ抑制されるが、Bcl-xLでは、ミトコンドリアの膜電位低下およびcaspase-3-like protease活性の両者とも抑制されることが明らかになった。

(3) 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

上記のように、神経細胞においてproteasome機能が細胞の生存に重要な役割を果たしていることは明らかである。一方、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200 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、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 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Asai A, Qiu J-h, Narita Y, Chi S, Saito N, Shinoura N, Hamada H, Kuchino Y, Kirino T: High-level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J Biol Chem* 274:34450-34458, 1999

Mochizuki T, Kitanaka C, Noguchi K, Muramatsu T, Asai A, Kuchino Y: Physical and functional interactions between pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the pim-1-mediated activation of the c-myc signaling pathway. *J Biol Chem* 274:18659-18666, 1999

Ide T, Takada K, Qiu JH, Saito N, Kawahara N, Asai A, Kirino T: Ubiquitin stress response in postischemic hippocampal neurons under nontolerant and tolerant conditions. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:750-756, 1999

Shinoura N, Yoshida Y, Tsunoda R, Ohashi M, Zhang W, Asai A, Kirino T, Hamada H: Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of gliomas. *Cancer Res* 59:3411-3416, 1999

Shinoura N, Yoshida Y, Nishimura M, Muramatsu Y, Asai A, Kirino T, Hamada H: Expression level of Bcl-2 determines anti- or proapoptotic function. *Cancer Res* 59:4119-4128, 1999

Shinoura N, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H. Relative level of expression of Bax and Bcl-XL determines the cellular fate of apoptosis/necrosis induced by the overexpression of Bax. *Oncogene* 18:5703-5713, 1999

Shinoura N, Muramatsu Y, Nishimura M, Yoshida Y, Saito A, Yokoyama T, Furukawa T, Horii A, Hashimoto M, Asai A, Kirino T, Hamada H. Adenovirus-mediated transfer of p33ING1 with p53 drastically augments apoptosis in gliomas. *Cancer Res* 59:5521-5528, 1999

Qiu JH, Asai A, Chi S, Saito N, Hamada H, Kirino T: Proteasome inhibitors induce cytochrome-c/caspase-3-like protease-mediated apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 20: 259-265, 2000

Shinoura N, Satou R, Yoshida Y, Asai A, Kirino T, Hamada H: Adenovirus-mediated transfer of Bcl-X(L) protects neuronal cells from bax-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 254: 221-231, 2000

Yamaoka K, Mishima K, Nagashima Y, Asai A, Sanai Y, Kirino T: Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *J Neurosci Res* 59:722-730, 2000