

早稲田大学審査学位論文(博士)

博士(人間科学)学位論文

筋肉および神経の変性疾患の細胞死における
カスパーゼの活性化に関する研究

2000年1月

早稲田大学大学院人間科学研究科

武笠毅

博士（人間科学）学位論文

「筋肉および神経の変性疾患の細胞死における
カスパーゼの活性化に関する研究」

2000年1月

早稲田大学大学院人間科学研究科

武笠 毅

指導教授 木村 一郎

「筋肉および神経の変性疾患の細胞死における
カスパーゼの活性化に関する研究」

目次

第1章 序論

1. アポトーシス	1
2. アポトーシスの実行遺伝子	1
3. ノックアウトマウスによるプログラム細胞死の解析	4
4. アポトーシス誘導因子とその分子機構	5
1) Death Factor	
2) 生存因子の除去による細胞死	
3) Anoikis	
4) 細胞周期が関与する細胞死	
5. 疾患とアポトーシス	10
1) 筋疾患と細胞死	
・筋ジストロフィー	
・先天性筋ジストロフィー	
2) 神経変性疾患と神経細胞死	
・アルツハイマー	
・CAGリピート伸長をともなう神経変性疾患	
6. 活性型カスパーゼに対する特異的抗体作製の意義	12

第2章 材料と方法

1. 細胞培養	15
1) P19EC細胞	
2) レチノイン酸による P19 EC 細胞の神経分化	
3) COS細胞	
4) マウスDRG ニューロン	
2. 細胞死の検定	17
1) トリパンブルー染色による細胞死の検出	

2) アガロースゲル電気泳動によるDNA断片化の検出	
3. 酵素活性の測定	18
1) 細胞の回収	
2) カスパーゼ3様酵素活性の測定	
3) 蛋白質の定量	
4) PI3Kの活性測定	
4. RT-PCR	19
1) 細胞および組織からの total RNA の調製	
2) RT-PCR	
3) 定量的 RT-PCR	
5. マウス カスパーゼのPCRクローニング	22
1) PCR産物のクローニング	
2) インサートチェック	
6. プラスミドDNAの調製	23
7. DNA塩基配列の決定	23
8. cDNA libraryのスクリーニング	24
1) プラークハイブリダイゼーション	
2) ヘルパーファージによるサブクローニング	
9. マウス カスパーゼ8 全長および活性型コンストラクトの作製	26
10. EGFP融合カスパーゼの作製	26
11. EGFP融合ポリグルタミンタンパクの作製	26
1) ポリグルタミン伸長遺伝子のPCRクローニング	
2) サザンハイブリダイゼーション	
3) Q11, Q72 コンストラクトの作製	
12. 細胞への遺伝子導入	28
13. マウス カスパーゼ8, 9 活性化切断部位特異的認識抗体の作製	28
1) 活性型カスパーゼ特異的抗体の作製	
2) アフィニティカラムの作製および抗体の精製	
14. イムノブロット	30
1) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動	
2) ウェスタンブロット	

3) 抗体反応	
4) アルカリホスファターゼ発色反応	
15. 免疫染色	32
1) 組織切片の作製	
2) 凍結筋組織切片の作製	
3) 免疫染色	
4) EGFP 融合蛋白質と蛍光標識抗体を用いた二重染色	
16. TUNEL 法によるDNA断片化の検出	33
17. in situ ハイブリダイゼーション	34
1) DIG 標識 RNA プローブの作製	
2) 組織切片を用いた in situ ハイブリダイゼーション	
3) whole mount in situ ハイブリダイゼーション	

第3章 神経細胞死におけるカスパーゼ活性化の分子機構の解析

1. 序論	38
2. 結果	
I. レチノイン酸によるP19神経分化過程における細胞死とカスパーゼ3様酵素 活性化の分子機構	40
1) P19EC細胞の神経分化過程における細胞死とカスパーゼ3様酵素の活性化	
2) P19EC細胞の神経分化過程におけるカスパーゼ3,7およびbcl-2の発現の検出	
3) Wortmanninによるカスパーゼ3様酵素活性とアポトーシスの促進	
4) FGFファミリーによるカスパーゼ3様プロテアーゼ活性の抑制	
5) FGFRからのシグナル伝達とカスパーゼ3様酵素活性	
6) P19EC細胞の神経分化過程におけるカスパーゼ3活性化断片(p20/17)の検出	
7) bFGFRシグナルによるカスパーゼ3様酵素活性の抑制の分子機構	
8) P19EC細胞の神経分化に対するbFGFの効果	
II. マウスDRGニューロンにおける神経細胞死とカスパーゼ3様酵素活性化の検出	45
1) in situ hybridization 法によるマウス胚におけるカスパーゼ3 mRNA発現の 検出	

2) NGF除去によるDRGニューロンへの細胞死誘導とカスパーゼ3様酵素 活性の検出	
3. 考察	47
第4章 カスパーゼファミリーの活性化断片特異的抗体の作製とそれらを用いた筋変性疾患、神経変性疾患におけるアポトーシスの解析	
1. 序論	51
2. 結果	
I. 先天性筋ジストロフィーマウス (dy/dy) 骨格筋におけるカスパーゼ3, 9の 活性化	54
1) RT-PCR による筋細胞における細胞死関連遺伝子の発現	
2) 生存因子除去による筋細胞死の誘導とカスパーゼ3の活性化	
3) 筋疾患モデルマウス骨格筋におけるカスパーゼ3, 9の活性化とアポトーシス	
II. 神経変性疾患における神経細胞死とカスパーゼファミリーの関与	55
1) DRPLA 患者ゲノムDNAにおけるCAG リピート伸長の検出	
2) ポリグルタミンの核内凝集とカスパーゼ8の活性化	
3. 考察	56
第5章 総括的考察	59
参考文献	62
論文リスト	79
図	81
謝辞	125

筋肉および神経の変性疾患の細胞死における カスパーゼの活性化に関する研究

第1章. 序論

1. アポトーシス

アポトーシス (apoptosis) は、多細胞生物の発生過程における形態形成や生体の防御、恒常性の維持に働いており、生体の維持に不可欠な細胞死である。アポトーシスの過程は遺伝子によって制御されており、能動的な細胞の死といえる。

アポトーシスの概念は、今から25年ほど前に Kerr, Wyllie, Currie によって細胞死の形態観察により提唱されたものである。損傷や病死によるネクローシス (necrosis ; 壊死) では細胞は膨潤し崩壊するが、アポトーシスを起こした細胞では、細胞の縮小および粒子化といった明らかに異なる様子を示すことを見い出した。アポトーシス (apoptosis) という言葉は、apo (off, 離れる) とptosis (falling, 離れる) を合わせた合成語であり、「生」の特徴であるミトトーシス (mitosis : 細胞分裂) に対比させて名付けられた (Kerr et al., 1972)。

アポトーシスを起こした細胞は特徴的な形態変化を示す。核の凝集、断片化がおこり、細胞自体が断片化してアポトーシス小体といった小顆粒が形成される (Arends et al., 1990)。また、生化学的には、核 DNA のヌクレオソーム単位での断片化が生じ、アポトーシスの指標とされている。

2. アポトーシスの実行遺伝子

アポトーシスの研究は、当初細胞の形態学的な観察から始まった。近年になってアポトーシスの制御に関する重要な遺伝子が次々にクローニングされ、アポトーシスの引き起こされる分子機構が明らかになりつつある。

アポトーシスの分子遺伝学的な解析は、遺伝学的解析が可能で細胞死を観察する上で優れたモデルである線虫 (*Caenorhabditis elegans* : *C. elegans*) の研究によって明らかにされたところが多い。多細胞生物の発生過程において、特定の場所で特定の時期に細胞死が起きることは、プログラム細胞死 (programmed cell death : PCD) として古くから知られている (Saunders ,

1966 ; Lockshin , 1974) 。線虫の場合、卵から成虫に至る過程の細胞系譜が明らかになっており、発生過程で 1090 個の細胞が生じ、必ず 131 個の特定の細胞が特定の発生ステージで死ぬことがわかっている (Ellis et al., 1991a) 。この死んでいく細胞の約 8 割は神経系の細胞に由来し、他は上皮、筋、生殖系列などに由来している。これらのプログラム細胞死は、核や細胞の凝縮、細胞の断片化といったアポトーシスの特徴を示す。

Horvitz らは、この細胞死に異常のみられる突然変異体 (cell death abnormal : ced 変異体) を 10 種類 (ced-1 ~ ced-10) 同定し、その相互関係を明らかにした (Ellis et al., 1991a) 。その結果、線虫において、プログラム細胞死に働く 14 の遺伝子が同定された。まずはじめに細胞死変異体として細胞の貪食異常に関与する遺伝子である ced-1, ced-2 が見い出され (Hedgcock et al., 1983) , 次いで細胞死の実行に関わる遺伝子として ced-3, ced-4 が発見された (Ellis et al., 1986) 。ced-3, ced-4 は、細胞死に必須な遺伝子であり、これらの変異体では死ぬべき 131 個の細胞死がすべて阻害され、131 個の余分な細胞を持った個体が生じる。一方、ced-3, ced-4 とは逆に突然変異体の表現型から細胞死の抑制に関与する因子として ced-9 が見い出された

(Hengartner et al., 1992) 。ced-9 は細胞死を抑制し細胞死が作動するかどうかを制御する遺伝子で、この機能が欠失すると過剰な細胞死が引き起こされる。また、ced-3, ced-4 は細胞死を起こさない細胞でもオンの状態になっていて、ced-9 によって抑制されている (Ellis et al., 1991b) 。

これらの遺伝子の解析が進むに従って、線虫の細胞死関連遺伝子に対応する哺乳類の相同遺伝子が発見されてきた。

まず Ced-3 は、遺伝子構造の解析から哺乳動物のインターロイキン 1 β 変換酵素 (interleukin-1 β converting enzyme : ICE) とアミノ酸レベルで 28 % の相同性を持っていることが明らかになった (Yuan et al., 1993 ; Miura et al., 1993) 。その後、脊椎動物において ICE / Ced-3 相同遺伝子が次々と単離され、ファミリーを形成していることがわかってきた。これらの遺伝子群は、カスパーゼ (caspase) ファミリーと呼ばれ、現在までに十数種類が発見されている。カスパーゼは、いずれも活性中心にシステイン残基をもつシステインプロテアーゼで、プロテアーゼ活性部位のアミノ酸配列 (QACXG) が共通に保存

されており、基質をその特定配列のアスパラギン酸のC末端側で切断する。ced-3は、構造および基質特異性の面からICE（カスパーゼ1）よりも、カスパーゼ3（CPP32）（Fernandes-Alnemri et al., 1994）の方により近似していることが明らかになった（Xue et al., 1996）。

また、1994年にはced-9が哺乳類のbcl-2と相同な遺伝子であることが明らかとなった（Hengartner et al., 1994）。bcl-2はced-9とアミノ酸レベルで23%の相同性を持っており、BH1, BH2（Bcl-2 homology）と呼ばれる領域においてより相同性が高く、機能的にも保存されていることが認められた。後に、bcl-2の類縁遺伝子が次々とみつき、ファミリーを形成していることがわかった。bcl-2ファミリーは、その機能から大きく細胞死を抑制するグループと細胞死を促進するグループに2分される。前者には、bcl-2, bcl-xL, などが、後者にはbax, bak, bad, bidなどが発見されている。

一方、ced-4の哺乳類における相同遺伝子は長く同定されていなかったが、1997年にWangらのグループによりapaf-1（apoptotic protease activating factor: Apaf）が、ced-4の相同遺伝子として明らかにされた（Zou et al., 1997）。Apaf-1は、Ced-4と相同性を示す領域に加え、Ced-3と相同性をもつ部位、およびWD-40と呼ばれる蛋白質結合領域をもつ。Ced-4と相同性をもつ領域にはdATP結合部位があり、dATP, Apaf-2, Apaf-3の存在下で、Apaf-1がカスパーゼ3の活性化を引き起こすことが示された。後に同グループの詳細な解析により、Apaf-2はシトクロムc、Apaf-3はカスパーゼ9であることが示された（Li et al., 1997）。ミトコンドリアから放出されたシトクロムcは、Apaf-1とdATPの存在下でカスパーゼ9を活性化し、活性化されたカスパーゼ9がカスパーゼ3を活性化することにより、最終的にアポトーシスに特異的な細胞の変化をもたらす。一方、細胞死の抑制に働くBcl-2ファミリーは、ミトコンドリアからのシトクロムcの放出を阻害し、Apaf-1とカスパーゼ9に結合することで細胞死の抑制に働くと考えられている。

これらのことから、細胞死の実行における基本的なシステムとして、線虫におけるCed-3, Ced-4, Ced-9の関係は進化を通して、哺乳類のカスパーゼファミリー, Apaf-1, Bcl-2ファミリーの関係として保存されていることがわかった。

3. ノックアウトマウスによるプログラム細胞死の解析

近年までに、いくつかの細胞死実行遺伝子のノックアウトマウスが作製され、個体のプログラム細胞死におけるこれらの遺伝子の働きが遺伝学的に解析されている。

カスパーゼファミリーのノックアウトマウスとしては、カスパーゼ1のノックアウトマウスが最初に作製された (Kuida et al., 1995) が、顕著な細胞死の変化をみせなかった。それに対して、カスパーゼ3のノックアウトマウスでは中枢神経系において顕著な異常をみせている。脳において、細胞死の減少による神経細胞の増加により髄液の交通路が遮断され、かなりの数のノックアウトマウスが水頭症を発症していた (Kuida et al., 1996)。

カスパーゼ3の上流に位置するカスパーゼ9のノックアウトマウスでは、カスパーゼ3の異常とよく似ているが、カスパーゼ9の方が異常が認められた範囲が広く、その程度が重かった。中枢神経系において顕著な異常がみられ、神経上皮細胞の増加が激しく、神経組織が頭蓋の外に飛び出してしまう状態がみられた。また、活性型カスパーゼ3陽性の神経細胞が著明に減少していた (Kuida et al., 1998)。

ced-4の相同遺伝子、Apaf-1のノックアウトマウスは胎生致死で、その表現型はカスパーゼ9のノックアウトマウスとよく似ており、中枢神経系において顕著な異常をみせ、脳、頭部の特徴的な形態異常を示した (Yoshida et al., 1998; Cecooi et al., 1998)。

一方、細胞死の抑制に関わるBcl-2のノックアウトマウスでは、リンパ球系細胞、皮膚の色素上皮細胞、小腸、神経系などでアポトーシスの増強がみられた (Veis et al., 1993; Nakayama et al., 1994)。Bcl-xのノックアウトマウスでは、神経系の異常はカスパーゼ3もしくは9のノックアウトマウスに比べると、ちょうど逆の表現型を示した。脳および脊髄の、細胞周期を停止して分化しつつある未成熟神経細胞が存在する領域に多くの細胞死が認められた。本来この領域の未成熟神経細胞はプログラム細胞死を起こすことが知られているが、Bcl-xノックアウトマウスでは本来の数と比較して多量に細胞死を引き起こしていることが明らかとなった。Bcl-xが未熟な神経細胞の生存に必須であり、そのアポトーシスの抑制にBcl-xが働いていることが予想された。また末

梢神経節の神経細胞の多くもTUNEL法により細胞死を起こしていることが認められている (Motoyama et al., 1995)。

これらの遺伝子変異マウスの解析により, Apaf-1 →カスパーゼ9 →カスパーゼ3 を介したアポトーシス機構が脳の発生, 形態形成に重要な役割を果たしていることが示された。また, 同時にApaf-1→カスパーゼ9 →カスパーゼ3 が, 発生における唯一のアポトーシス誘導機構でないことも示唆され, 個体発生の過程ではApaf-1 および類似物質と多くのカスパーゼが複雑にアポトーシスを制御しているものと推察されている。各論で述べるが, 本研究は神経系におけるプログラム細胞死の分子機構解明を一つの目的としており, レチノイン酸で神経分化するマウスのテラトカルチノーマ由来のP19 EC 細胞を用いて, その過程でおこる細胞死を神経系でのプログラム細胞死のモデルとして, カスパーゼ3 の関与とその制御機構を中心に解析を行った。

4. アポトーシス誘導因子とその分子機構

細胞が外部から, なんらかのシグナルを受け取ることによっても, アポトーシスは開始される。TNF (tumor necrosis factor), Fas リガンド(Fas ligand : FasL), といった細胞外からの Death Factor のシグナルは細胞膜上の特異的レセプターを介して細胞内に伝達され, アポトーシスを誘導する。また, 生存に必要な増殖因子が除かれたり, 細胞同士あるいは細胞外基質との接着が破壊された場合や, 病理的なストレスによっても, それがシグナルとなってアポトーシスが開始される (McConkey et al., 1990)。特定のアポトーシスシグナルに対する感受性は細胞ごとに異なる。

1) Death Factor

FasL, TNF といったDeath Factor によるアポトーシスの誘導機構は比較的によく解析されている。TNF はCarswellらによってマウスに移植した肉種に壊死を起こす因子として発見された, さまざまな生理活性をもつ多機能性のサイトカインである (Pennica et al., 1984 ; Tracey et al., 1994 ; Yamazaki, 1995)。TNF は, FasL, CD 40 リガンドとともにTNF ファミリーを形成している。

Death Factor のシグナル受容体として、TNF レセプター (tumor necrosis factor receptor : TNFR) や Fas が知られており、これらは構造の相同性から TNF / NGF レセプターファミリーを形成している。この TNF / NGF レセプターファミリーには、TNFR のほかに Fas , 低親和性 NGF レセプター p75 (p75 NGFR) , CD 40, CD 24, OX.40 が含まれ、細胞外にシステインに富む繰り返し構造を共通にもっている。

TNFR, Fasは、細胞膜の外側にリガンド結合部位、内側であるC末端側にアポトーシスのシグナル伝達に必要な領域 death domain (DD) を有している (Tartaglia et al., 1993) 。 DDに結合して、death シグナルを細胞内でカスパーゼに伝えるアダプター蛋白質としてTRADD (TNFR1-associated Death Domain protein) , FADD (Fas-associated Death Domain protein) , RIP (receptor interacting protein) がクローニングされている (Hsu et al., 1995 ; Chinnaiyan et al., 1995 ; Stanger et al., 1995) 。

Fas を介した細胞死のシグナル伝達の分子機構はよく解明されている。FasL がその受容体であるFas に結合すると、Fas の細胞内領域にあるDD に、FADDがそのC端にあるDDを介して会合する。一方、FADDは、N端にDED (death effector domain) と呼ばれる領域を持ち、このDEDを介して同様にN端にDEDを持つカスパーゼ8 が会合する (Muzio et al., 1996) 。こうして、Fas, FADD, カスパーゼ8 の複合体 (death-inducing signaling complex ; DISC) が形成され、DISC の中でカスパーゼ8 は活性化される。活性化されたカスパーゼ8 は、下流のカスパーゼをプロセッシングして活性化する (図1) 。一方、TNFR1 の場合、TRADD, FADDを介したアポトーシス誘導のほかにも、NF- κ Bの活性化を介したアポトーシスの抑制など多彩なシグナル伝達経路を持っている。

また、同一ファミリーに属するp75 NGFR の場合、DD の存在が明らかではなく、TNFRやFasと同様に、細胞死に関与するか否か不明であったが、p75 NGFR を発現させたニューロンは細胞死を誘導されること、また、この細胞死はp75 NGFR に対するモノクローナル抗体で抑制されることから、p75 NGFR も細胞死に関係することが示唆されている (Frade et al., 1996) 。 p75 NGFR の欠損が前脳のコリン作動性ニューロンの細胞死を抑制することから、p75

NGFR は特殊なニューロンの細胞死に関係していることが明らかになっている (Van der zee et al., 1996)。こうした結果から、神経特異的な液性因子が p75 NGFR を介して神経細胞死に関与している可能性も考えられている。

2) 生存因子の除去による細胞死

アポトーシスは細胞の生存に必要な液性因子の除去によっても誘導される。

PDGF (platelet-derived growth factor), IGF (insulin-like growth factor), FGF (fibroblast growth factor), NGF (nerve growth factor) などの各種増殖因子は、それらのチロシンキナーゼ型レセプターを介して PI3K (phosphatidylinositol 3'-kinase) を活性化する (Arcaro et al., 1993)。PI3K は Akt を活性化し (Marte et al., 1996), Akt によりリン酸化された Bad は、Bcl-xL との Bad / Bcl-xL ヘテロダイマーを形成できなくなる。その結果、アポトーシスを抑制する機能をもつ Bcl-xL / Bcl-xL のホモダイマー形成が増大し、細胞死の抑制に働く (Franke et al., 1997; Dudek et al., 1997) (図 2)。

神経細胞は発生過程で多くの細胞がアポトーシスにより消失することが知られている (Oppenheim et al., 1991)。神経細胞の生存には標的細胞からの神経栄養因子や、求心性入力といった生存のためのシグナルが必要であり、これらを十分に受け取ることができなかつた細胞がアポトーシスによって死んでいくものと考えられている (Korsching et al., 1993)。神経栄養因子としては、NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NT-3 (neurotrophin-3) などが知られている。実際、NGF, BDNF, NT-3 や、それらのチロシンキナーゼ型レセプターである Trk A, B, C のノックアウトマウスでは多くの後根神経節 (dorsal root ganglia: DRG) や三叉神経節などの末梢神経系のニューロンが細胞死を起こす。In vitro でも血清, NGF を培養液中から除去すると、DRG のニューロンに細胞死が誘導される (Snider et al., 1994)。血清除去により誘導される PC12 細胞の神経細胞死は、NGF の添加によって抑制される。この NGF による細胞死の抑制は、PI3K の特異的な阻害剤である Wortmannin によって阻害されることから、PI3K は神経細胞の生存にとって必須なシグナルであることが示された (Yao et al., 1995)。また、こうした神経栄養因子の除去による DRG の細胞死は、Bcl-2 によっても抑制される

(Garcia et al., 1992)。

一方、脳など中枢系の神経細胞は、末梢神経細胞と異なり、単一の神経栄養因子やそのレセプターの欠損では大きな影響を受けない。しかし、複数の神経栄養因子およびレセプターを欠損させることにより、海馬、皮質の神経細胞がアポトーシスを起こすことから、中枢神経細胞は複数の神経栄養因子やFGFファミリーなどの生存因子によってその生存が維持されていると考えられている。

3) Anoikis

インテグリンなどによるECM (extra cellular matrix)との結合も、細胞の生存維持に働いていることが示唆されてきた (Howlett et al., 1995; Zhang et al., 1995)。上皮細胞や内皮細胞はECMに対する接着が阻害されると、細胞の形態変化やDNA断片化を伴うアポトーシスが誘導される (Meredith et al., 1993; Frisch et al., 1994)。また、Bcl-2がこうした接着依存性の細胞死を抑制することが知られている (Frisch et al., 1994)。

Frischらは、こうした上皮細胞や内皮細胞の細胞接着依存性のアポトーシスをラテン語のhomelessにちなんで、アノイクス (anoikis) と呼ぶことを提唱している。この接着依存性のアポトーシスは上皮、内皮細胞だけでなく、骨格筋細胞、神経芽細胞などの分化の過程でも引き起こされる現象であると考えられる。インテグリンは α , β 鎖からなるヘテロダイマーでこれまでに20種類以上が報告されている。インテグリンからのシグナル伝達の経路については、これまでに、Bcl-2の発現量の変化 (Zhang et al., 1995), Rho, FAK, PTEN, MAPK, PKC (JNK) などの活性化, また細胞内pHの変化, Ca^{2+} 流入の変化が報告されている (Howe et al., 1998)。最近、インテグリンに結合するFAKがAktを活性化することが明らかにされており、よって、ECMからインテグリンを介したシグナルは、増殖因子のチロシンキナーゼ型レセプターを介したシグナル同様に、AktからBadのリン酸化により、Bcl-xLを機能的な状態におくことで細胞の生存に働いていると考えられている (図2)。

4) 細胞周期が関与する細胞死

細胞死は細胞周期の進行とも深い関連があり、DNA修復過程やさまざまな

細胞分化の過程で細胞死が起こることが知られている。特に p53, c-myc の関与が示唆されている。

p53 の機能としては、DNAに損傷を受けた細胞の細胞周期をG1 期で止めてDNA修復の時間かせぎをすること、また、異常を起こした細胞に積極的にアポトーシスを誘導することで癌化を抑制することが示唆されている (Lowe et al., 1993 ; Clarke et al., 1993) 。G1期からS期への細胞周期の移行は、Rb とサイクリンによって制御されている。CDK (cyclin-dependent kinase) 4 / 6, サイクリンD 複合体によって Rb はリン酸化されると、転写因子 E 2 F と結合できなくなり、遊離した E 2 F はDNA 合成に必要な遺伝子の発現を誘導して細胞周期をG1からS期に移行させる。一方、p53 は p21 の発現を誘導し、p21 は CDK4 / 6, サイクリンD 複合体を阻害することで細胞周期をG1期に停止させる。c-myc も細胞周期のG0 / G1 期からS期への移行に関わっている。

p53 の下流にはBcl-2 ファミリーが存在するとの報告 (Miyashita et al., 1995) や、myc の下流にはFasシグナルが存在するという報告がある (Dong et al., 1997) 。また、カスパーゼ9 の欠損やApaf-1 のノックアウトマウスは p53 のノックアウトマウスと同様な形質を示すことから (Kuida et al., 1998), 細胞周期と関連する細胞死にはカスパーゼ活性化の関与も示唆されている。

p53 に結合し、細胞周期を調節しているRb はカスパーゼの基質でもある

(Janicke et al., 1996) 。また、細胞周期に関与するサイクリンはプロテアゾームにより分解されることが知られているが (King et al., 1994) , プロテアゾーム阻害剤は細胞死を誘導したり、分化を誘導することが知られている。こうした細胞死でもカスパーゼが活性化されることが見い出されている (Fujita et al., 1996) 。

ビタミンAの誘導体であるレチノイン酸は様々な癌細胞の再分化を誘導することが知られているが、細胞分化の過程で細胞死を誘導する。レチノイン酸により神経細胞分化するP19 EC 細胞は、その分化過程に多くの神経前駆体細胞でDNA 断片化をともなう細胞死が生じる。その細胞死はBcl-2 ファミリーにより抑制される (Okazawa et al., 1996) ことから、神経細胞分化に伴う細胞死にもカスパーゼファミリーの活性化が示唆された。各論で述べるが、本研究では、このP19 EC 細胞の細胞死におけるカスパーゼ3 の関与について解析を

行っている。

5. 疾患とアポトーシス

筋肉や神経の遺伝性変性疾患においては、細胞が進行性に死んで(変性して)行く。近年になって、これらの疾患の原因遺伝子が解明されてきている。また、この細胞死がアポトーシスの様式をとっていることが明らかになってきた。

1) 筋疾患と細胞死

・筋ジストロフィー

筋ジストロフィーは代表的な筋疾患であり、筋繊維の壊死、再生を主病変とし、遺伝性で進行性筋力低下を示す疾患の総称である。症状や発症過程からいくつかのタイプに分類されている。Duchenne 型筋ジストロフィーや、Becker 型筋ジストロフィーにおいては原因遺伝子としてジストロフィン

(dystrophin) が解明されている (Hoffman et al., 1987)。さらに、いくつかのタイプの筋ジストロフィーの原因遺伝子が、筋細胞膜の基底膜蛋白質であるメロシン (ラミニン $\alpha 2$) や、ジストロフィン結合蛋白質の1つである α サルコグリカン、 β および γ サルコグリカンの遺伝子であることが明らかとなり、筋ジストロフィーの病態と筋細胞膜の異常の関連が強く示唆されている。

筋ジストロフィーにおける筋細胞死は従来まで単に「壊死」としてとらえられてきたが、DNAの断片化といったアポトーシスの様式をとった細胞死であることが明らかになってきている。Duchenne 型筋ジストロフィーのモデルマウスであるmdx マウス (Matsuda et al., 1995; Smith et al., 1995) や、 γ サルコグリカン欠損マウスにおいて (Hack et al., 1998)、DNA断片化を伴うアポトーシス形式の細胞死が検出されている。また、mdx マウスにおいてはDNA断片化を示すアポトーシス様細胞死が先行し、後にネクローシス様の細胞死へ移行するとの報告もある (Tidball et al., 1995)。これは、培養細胞系で、アポトーシスの実行過程においてカスパーゼの活性化プロセスを阻害すると、ネクローシス様細胞死へ移行するという近年の報告例との関連が想起される (Vercammen et al., 1998a; Vercammen et al., 1998b)。

しかしながら、筋ジストロフィーにおいて筋細胞膜の異常からアポトーシスにいたる分子機構は明らかになっていない。

・先天性筋ジストロフィー

先天性筋ジストロフィー (Congenital muscular dystrophy : CMD) は、出生時または生後数ヵ月以内に筋力低下を示すタイプの筋ジストロフィーで、脳形成障害または知能障害を伴う福山型と伴わない非福山型の2種類におもに分類される (Kobayashi et al., 1996)。さらに、非福山型先天性筋ジストロフィーにはメロシン欠損が報告されている (Helbling-Leclerc et al., 1995)。メロシンを欠損し常染色体劣勢遺伝のジストロフィー症を示す *dy/dy* マウスは、先天性筋ジストロフィーのモデルマウスとして知られている (Sunada et al., 1994)。

ラミニンはインテグリン $\alpha 7 \beta 1$ を介してECMからの筋細胞の生存シグナルとして作用しており、近年の研究でラミニン $\alpha 2$ の欠損が、*in vivo* および *in vitro* で筋細胞にアポトーシスを誘導することが報告されている (Vachon et al., 1996 ; Vachon et al., 1997 ; Miyagoe et al., 1997)。メロシンの変異は、先天性筋ジストロフィーの原因として考えられているが、メロシンからの生存シグナルがどのような分子機構によって筋細胞死を制御しているかについては明らかではない。

2) 神経変性疾患と神経細胞死

・アルツハイマー病

アルツハイマー病の病態として、顕著な老人斑と神経原線維変化の増大がみられる。

この老人斑の主成分はアミロイド β (amyloid β : $A\beta$) という β シート構造をとる蛋白質である。後に、 $A\beta$ は、アミロイド前駆体蛋白質 (amyloid precursor protein : APP) と名付けられたI型膜貫通蛋白質の膜貫通領域近傍に位置する42アミノ酸であることが明らかになった。APPから異常に切り出された $A\beta$ が、不溶性になって沈着し神経変性を引き起こすとの説が提唱されている。APPには、カスパーゼ3, 6に基質として認識されるアミノ酸配列があり、カスパーゼ3, 6によるAPPの切断が病因に関与しているとの報告があ

る (Barnes et al., 1998 ; Gervais et al., 1999 ; Pellegrini et al., 1999 ; LeBlanc et al., 1999) 。一方, 蓄積されたA β がカスパーゼ3を活性化し神経細胞死を誘導するとの説もある(Uetsuki et al., 1999) 。

・ C A G リピート伸長をともなう神経変性疾患

遺伝性神経変性疾患には, その患者において原因遺伝子内のC A G リピートが異常に伸長していることが確認されているものがある。例として, ハンチントン舞踏病 (Huntington's disease : HD) , マシャドージョセフ病 (Machado-Joseph disease : MJD) , 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (dentatorubral-pallidoluysian atrophy : DRPLA) , 遺伝性脊髄小脳変性症 1 型, 2 型, 6 型, 7 型, および球脊髄性筋萎縮症, といった神経変性疾患が知られており, 共通にニューロンの変性と消失といった神経細胞死を示す。

これらの疾患においてC A G リピートはいずれも原因遺伝子のコード領域内に存在し, C A G リピートの伸長はポリグルタミンをコードする。

Perutz らは, ポリグルタミンは水素結合を介して互いに結合し, 異常に伸長したポリグルタミンが細胞内で凝集して神経細胞に障害をきたす可能性を示唆した(Perutz et al., 1994) 。実際に, これらの疾患の患者の障害を受ける部分の神経細胞において, 原因遺伝子産物のポリグルタミンを含む凝集体が核内封入体として存在することが明らかになった (DiFiglia et al., 1997 ; Paulson et al., 1997) 。また, 培養細胞系で異常伸長したポリグルタミンを発現させると凝集体が形成され, アポトーシスが誘導されることが示された(Ikeda et al., 1996) 。アポトーシスが誘導されるメカニズムとして, 近年になってポリグルタミン凝集体が細胞死の実行を担うカスパーゼファミリーのカスパーゼ8を活性化することが報告されている (Sanchez et al., 1999 ; Miyashita et al., 1999) 。

6. 活性型カスパーゼに対する特異的抗体作製の意義

カスパーゼファミリーはアポトーシスの実行過程において, 中心的な役割を果たすプロテアーゼである。カスパーゼファミリーは活性の無い (低い) 前駆体 (不活性型, プロカスパーゼ) として生合成される(Thornberry et al., 1998) 。そして, 数カ所を切断されて活性型となる。カスパーゼの基本構造と

して、N端側からプロドメイン、大サブユニット、小サブユニットからなり、長いプロドメインを持ちオリゴマー形成により自己活性化するイニシエーターカスパーゼ（上位のカスパーゼ；カスパーゼ8，9など）と、短いプロドメインを持つエフェクターカスパーゼ（下位のカスパーゼ；カスパーゼ3，6，7など）に分類される。アポトーシス誘導時には、上位のカスパーゼが、下位のカスパーゼをプロセッシングして活性化していくプロテアーゼカスケード（カスパーゼカスケード）が機能する（Cohen, 1997）（図1）。カスパーゼの基質としてはさまざまな核や細胞質の蛋白質が知られており、細胞死の過程に関わるものとしては、DNA断片化をもたらすDNA分解酵素CAD（caspase-activated DNase）の抑制因子ICAD（inhibitor of CAD）（Enari et al., 1998）や、DNAの修復に関わるポリADPリボースポリメラーゼ（poly(ADP-ribose) polymerase : PARP）などが存在する（Nicholson et al., 1995）。

各種細胞死におけるカスパーゼの関与を解明するためには、カスパーゼの活性化を検出する必要がある。組織および細胞集団の細胞死において、酵素活性を測定したり、市販されている不活性型を認識する抗体を用いてイムノブロットを行うことにより、不活性型断片の減少を検出することによってカスパーゼの活性化を見い出すことができる。しかしながら、このような方法では、用いる基質が必ずしも酵素に特異的でないこと、さらに生体内で起こるアポトーシスは、組織の細胞全体に必ずしも集中的に多量に起こるわけではなく、ごく一部の細胞のみに散発的に起こることが多いことから、組織および細胞集団全体ではカスパーゼの活性化を直接検出することは困難である。

Saido, Ohmiらは、フォドリンおよびカルパインの切断部位に対するペプチド抗体を作製し、組織特異的なプロテアーゼの活性化を検出した（Saido et al., 1993；Kikuchi et al., 1995）。この抗体は、切断前の蛋白質は認識せず活性化して切断された断片を認識する。また、Kourokuらは、活性型のカスパーゼ3を特異的に認識する抗活性型抗体を作製し、マウス発達過程におけるカスパーゼ3の活性化を調べている（Kouroku et al., 1998）。これは、活性化して切断されたカスパーゼ3大サブユニットのC端側5アミノ酸を抗原として、抗体を作製したものである。

●本研究の目的

各論で述べるが、本研究は主に二つの研究課題を中心に行われている。一つはレチノイン酸によるP19EC細胞の神経細胞分化過程で観察される細胞死を、発生過程に観察される中枢神経系でのプログラム細胞死のモデルとして、カスパーゼ3活性化と制御の分子機構の解析である。もう一つは各種カスパーゼの切断点特異的な抗活性型抗体を作製し、カスパーゼファミリーが筋、神経変性疾患に見られる細胞死に関与しているかを明らかにすることである。

第2章 材料と方法

実験で使用した材料と方法は、第3章と第4章について重複する箇所が多いので本章でまとめて記述する。

1. 細胞培養

1) P19 EC 細胞

P19 EC 細胞は、10 cm 細胞培養皿 (Becton Dickinson : FALCON 3003) で、 α MEM (minimum essential medium) (Sigma) に10% (v/v) の牛胎児血清 (fetal bovine serum : FBS)

(EQUITECH-BIO, LOT No.SFB30-732) を加えた培養液を用いて CO₂ インキュベーター中で、37°C、5% CO₂ の条件で培養を行った。P19 EC 細胞の継代は、ピペットで培養液を細胞にふきつけて培養皿から剥がし、1日置きに1/10 および1/20 に希釈して行った。長期間継代を行うと神経細胞への分化能を失う可能性が高いため、10% DMSO-FBS に懸濁して液体窒素中に保存しておいた細胞を1~2ヵ月ごとに戻して実験に使用した。

2) レチノイン酸による P19 EC 細胞の神経分化

P19 EC 細胞の神経分化誘導は、McBurney らの原法に従って行った (McBurney et al., 1982) 。

細胞密度を 1×10^5 / ml に調整し、1 μ M の全トランスレチノイン酸 (以降ことわらない限り、レチノイン酸と表記) (Sigma) 存在下で細胞接着性の低い10 cm バクテリア用培養皿 (Becton Dickinson : BBL Stacker dish) を用いて2-3日間培養し、細胞凝集塊を形成させた。その後、1,500 \times g、5分間の遠心で細胞を回収し、レチノイン酸を含まない培養液で2回洗った後、通常の10 cm 細胞培養皿に移した。レチノイン酸を除いた培養液で、2-3日培養することで神経細胞へと分化させた。また、全トランスレチノイン酸以外にも9シスレチノイン酸、レチノール、(各Sigma) を用いて同様に神経分化誘導を行った。

3) COS 細胞

COS 細胞は、10 cm 細胞培養皿で 10 % (v/v) FBS - α MEM を用いて CO₂ インキュベーター中で、37°C、5 % CO₂ の条件で培養を行った。COS 細胞の継代は、培養液を取り除きリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline : PBS) で細胞を洗浄した後、トリプシン溶液 (0.1 % トリプシン-0.05 % EDTA-PBS) を加えて 37°C、2 分間処理して培養皿から剥がし、1 日置きに 1 / 10 および 1 / 20 に希釈して植え継いだ。

4) マウス DRG ニューロン

E 14.5 のマウス胚から DRG ニューロンを調製し初代培養を行った。妊娠マウス (ICR ; 日本クレアより購入) をジエチルエーテル (和光) を用いた過麻酔により屠殺し、胚を摘出した。胚から脊椎骨を取り出し、眼科用ハサミとピンセットを用いて、脊椎骨の両側にある後根神経節を摘出した。培養皿の中で、眼科用ハサミを用いて神経節を小片に切り分けた後、0.25 % トリプシン (Difco) , 0.01 % DNase I (Sigma) を含む α MEM 中で、37°C で 10 分間インキュベートした。FCS を 2 ml 程度加えて反応を止め、ピッペッティングして細胞を分散させた。1,500 × g , 1 分 , 4 °C で遠心して細胞を集め、上清を取り除いて血清入りの培養液に懸濁し、セルストレイナー (70 μ m ナイロンメッシュ) (Becton Dickinson : FALCON) を通して細胞塊を取り除いた後、細胞数を測定し適切な細胞密度に調整した。

培養皿はポリエチレンイミンであらかじめコーティングしたものをを用いた。ポリエチレンイミン (ナカライ) を、0.15 M ホウ酸緩衝液 (pH8.4) で 10 % に希釈し、ろか滅菌して室温で保存した。使用時に 0.15 M ホウ酸緩衝液 (pH8.4) で 5 倍に希釈して細胞培養皿の表面が完全に浸るように加え、一晩おいてコーティングした。アスピレーターでポリエチレンイミン溶液を取り除き滅菌水で 2 回洗い、使用するまで血清入りの培養液で浸しておいた。

培養液は、 α MEM に 10 % (v/v) FBS - α MEM に、5g / l グルコース、5 μ M cytosine β - D-arabinofuranoside (Sigma), 10 ng / ml NGF 7S (和光) を加えたものをを用いた。CO₂ インキュベーター中で、37°C、5 % CO₂ の条件で 4 - 7 日間培養をした。実験に使用する前日に、細胞分裂を阻害する cytosine

β -D-arabinofuranoside (混入する神経細胞以外の細胞の増殖を抑えるために添加) を含まない培養液に取り替えた。

2. 細胞死の検定

1) トリパンプルー染色による細胞死の検出

セルスクレイパーを用いて細胞を培養皿からはがし、滅菌スピッツ (栄研) に回収した。細胞数が少ないときは、 $1,500 \times g$, 5分間, 4°C で遠心して細胞を集め上清を捨てて1 ml 程度の培養液に細胞を懸濁して濃縮した。細胞懸濁液と0.5%トリパンプルー溶液 (Flow) を1:1で混合し血球計算板 (エルマ) で、染色されていない生細胞と青色に染色された死細胞の数を計測した。死細胞数/総細胞数から、細胞の死亡率を算出した。3試料について計測し、平均±標準偏差(SD)を求めた。

2) アガロースゲル電気泳動によるDNA断片化の検出

DNA断片化の検出は、Pringentらの改良法 (Pringent et al., 1993) に基づいて行った。回収した細胞のペレットに、DNA抽出用緩衝液 (20mM Tris-HCl (pH7.4) - 20mM EDTA (pH8.0) - 1% Triton X-100) $400 \mu\text{l}$ を加えて懸濁後、氷上に10分間置いた。10 mg / ml RNase A (Boehringer Mannheim) $2 \mu\text{l}$ を加え 37°C で1時間インキュベート後、20 mg / ml proteinase K (和光) $1 \mu\text{l}$ を加えさらに 37°C で1時間インキュベートした。

インキュベーション後、フェノール/クロロホルム抽出を行い、1/10量の3M酢酸ナトリウム (pH5.2) と2.5倍量の99.5%エタノールを加えて -80°C で30分間冷却した。 $7,500 \times g$, 15分間, 4°C の遠心でDNAを沈殿として回収し、70%エタノールで洗浄後、TE buffer (10 mM Tris HCl (pH7.5) - 1 mM EDTA (pH8.0)) に溶解した。DNA溶液は、 $0.2 \mu\text{g} / \text{ml}$ のエチジウムブロマイドを含む1.8%アガロースゲル (FMC) で電気泳動して断片化の検出を行った。

3. 酵素活性の測定

1) 細胞の回収

セルスクレイパーを用いて培養皿から細胞を剥がし、培養液ごと滅菌スピッツに回収し、 $1,500 \times g$, 5分, 4°C で遠心して細胞を集めた。上清を捨てて、冷却したPBSに細胞を懸濁して1.5 ml マイクロ遠心チューブ (アシスト) に移し、 $5,000 \times g$, 5分, 4°C で遠心 (HIMAC-150, 日立製作所) した後、上清を捨ててペレットとして回収した。回収した細胞のペレットは -80°C で保存した。

2) カスパーゼ3様酵素活性の測定

回収した細胞のペレットは、あらかじめ冷却した0.2% Triton X-100 - PBSに懸濁し数回ピペティングした後、氷上に10分間置いた。 $5,000 \times g$, 5分, 4°C で遠心分離して得られた上清を細胞抽出液として酵素活性測定に用いた。

カスパーゼ1の酵素活性は、カスパーゼ1の基質として知られている pro IL1- β の蛍光標識合成ペプチド Ac-YVAD-MCA (Thornberry et al., 1992) (ペプチド研) を、カスパーゼ3様の酵素活性は、カスパーゼ3の基質として知られている PARPの蛍光標識合成ペプチド Ac-DEVD-MCA (Nicholson et al., 1995) (ペプチド研) をそれぞれの基質として測定した。100 μl の系で、細胞抽出液 10 μl , 100 μM 蛍光標識合成ペプチド, 1 mM dithiothreitol (DTT), 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) に調整し、 37°C で20分間インキュベートした後、0.2M Tris-HCl (pH 9) 1.3 ml, 10% SDS 100 μl を加えて反応を停止させた。蛍光光度計 (F-3000, 日立製作所) を用い、励起光 380 nm で波長460 nmの蛍光強度を測定した。蛍光強度の測定値は3試行の平均値 \pm 標準偏差 (SD) をとり、蛋白質量 1 mg, 反応時間 1 分間 相当の値に換算して、酵素活性の指標とした。

3) 蛋白質の定量

細胞抽出液の蛋白質濃度はBradford法によって求めた (Bradford et al., 1976)。蒸留水で5倍希釈したBradford試薬 (BIO RAD) 1 mlに細胞抽出液 1 μl を加えて、分光光度計 (220A, 日立製作所) で595 nmの吸光度を測

定した。1 mg / ml のウシ血清アルブミン (BSA : bovine serum albumin) (sigma) 溶液をスタンダードとして検量線を作成し、蛋白質濃度を計算した。

4) PI3Kの活性測定

PI-3K活性の測定は Arcaro & Wymann の方法 (Arcaro et al, 1993) によって行った。回収した細胞を溶出液 (20 mM Tris-HCl pH (7.5) - 1 mM MgCl₂ - 1 mM CaCl₂ - 137 mM NaCl - 1 mM Na₃VO₄ - 1% NP-40 - 10% グリセロール - 1 mM PMSF - 10 μg / ml ロイペプシン) に溶解した。13,000rpm, 10分間遠心分離し、上清に抗 PI3K (p85) 抗体 (MBL) を加えて 4°C, 一晩放置した。形成した免疫複合体を、混合したプロテインG と Aにより免疫沈降にて共沈させた。この共沈物を 20 mM Hepes 緩衝液 (pH 7.4) に溶解した後、反応液 (20 mM Tris-HCl pH 7.5 - 10 mM MgCl₂ - 10 mM ATP - 200 μg / ml フォスファチジルイノシトール - 200 μg / ml フォスファチジルセリン - 1m Ci γ-[³²P]ATP) で 25°C, 10分間インキュベートした。これらを薄層クロマトグラフィ用プレート (メルク) にスポットし、展開液 (クロロホルム / メタノール / 25% アンモニア溶液 / 蒸留水 ; 86:76:10:14) で展開して薄層クロマトグラフィを行った。展開後のプレートは、BAS 2000 image analyzer (フジ) で結果を解析をした。

4. RT-PCR

1) 細胞および組織からの total RNA の調製

細胞および組織から total RNA の抽出は、グアニジン溶液と塩化セシウム超遠心による方法 (Sambrook et al, 1989) を用いて行った。細胞および組織に、4M guanidinium thiocyanate (GT) 溶液を加え、19Gの注射針をとりつけたシリンジ (テルモ) で液の出し入れを十数回繰り返して懸濁し、あらかじめ塩化セシウム溶液 (5.7 M CsCl - 0.1 M CH₃COONa (pH 5.0) - 5 mM EDTA) を加えておいた超遠心チューブ (Beckman) に移した。GT 懸濁液と塩化セシウム溶液の容積比が 2 : 1 となるように加え、50,000×g, 2時間, 20°Cで遠心した (TL 100 : Beckman) 後、上清を捨て RNA の沈殿を冷却し

た80%エタノールで2回洗浄してから、ETS buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5) - 5 mM EDTA - 1% SDS) に溶解した。フェノール抽出を2回繰り返し、エタノール沈殿後、RNA沈殿を蒸留水に溶解した。

2) RT-PCR

つづいて、total RNAからcDNAを合成した。

まず、Total RNAs (1 μ g) にRandom hexamer (Perkin Elmer) 1 μ l を加え、70°C、10分でアニーリング後、氷上にて2分間静置した。10× RT-PCR buffer (100 mM Tris-HCl (pH8.3) - 500 mM KCl - 25 mM MgCl₂) 1 μ l, 2.5 mM dNTPs 2 μ l, 0.1M DTT 1 μ l, 0.5U/ μ l RNase inhibitor (宝酒造) 0.5 μ l, MMLV Reverse Transcriptase (GIBCO) 0.5 μ l を加え、37°C 1時間の逆転写酵素反応によりcDNAを合成した。99°C、10分で反応を停止させた後、蒸留水 40 μ l を加えPCR (polymerase chain reaction) に用いた (Saiki et al, 1988)。

cDNA 溶液 1 μ l, 1.25 μ M プライマー (フォワードおよびリバース), 0.2 mM dNTPs, 0.5 Units Taq ポリメラーゼ (Promega), 10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂ を組成とする20 μ l の系で、PCR 反応を行った。PCR は、95°C 2分を1サイクル、95°C 1分と60°C 1分を35サイクル、60°C 7分を1サイクルで行った。

プライマーは以下の配列のものを用いた。

・マウス カスパーゼ8

5'-CAGGCTTGCCAAGGAAGTAA-3'

5'-TCTTCCGTAGTGTGAAGGTG-3'

PCR 産物は 0.2 μ g/ml のエチジウムブロマイドを含む2% アガロースゲルで電気泳動して結果を確認した。

3) 定量的 RT-PCR

レチノイン酸によるP19 EC 細胞の神経分化過程における カスパーゼ3, 7,

bcl-2, FGFR-1, 2, 3, 4 の発現量の変化をRT-PCRにより調べた。増幅されたPCR産物の量が鋳型cDNA量と比例するような少ないサイクル数を設定して定量的なPCRを行った。また, mRNA量のコントロールとしてmG3PDHの発現をみた。

bcl-2, mG3PDH, FGFR-1, 2, 3, 4 は, 95°C 2分を1サイクル, 95°C 1分と60°C 1分を30サイクル, 60°C 7分を1サイクルでPCRを行った。カスパーゼ3, 7は両者に共通配列のプライマーを使って, 95°C 2分を1サイクル, 95°C 1分と60°C 1分を27サイクル, 60°C 7分を1サイクルでPCRを行った。プライマーは以下の配列のものを用いた。

・カスパーゼ3, 7共通配列プライマー

5'-ATTCAGGC(C/T)TGCCG(T/A)GG(T/G)AC-3'

5'-AGTTC(C/T)TT(G/T)GTGAGCATGGA-3'

・bcl-2

5'-AAGAATTCCGGGAGAACAGGGTATG-3'

5'-AAGGATCCGGTAGCGACGAGAGAAG-3'

・mG3PDH

5'-CTCATGCCACAGTCCATGC-3'

5'-CTCTTGCTCAGTGTCCCTTGC-3'

・FGFR-1

5'-TTCTGGGCTGTGCTGGTCAC-3'

5'-GCCAACCTTGTAGCCTCCAA-3'

・FGFR-2

5'-TTCATCTGCCTGGTCTTGGT-3'

5'-AATAAGGCTCCAGTGCTGGTTTC-3'

・FGFR-3

5'-CTAGTGTTCTGCGTGGCGGT-3'

5'-TTCTTATCCATTCGCTCCGG-3'

・FGFR-4

5'-CTGTTGAGCATCTTTCAGGG-3'

5'-CGTGGAAGGCCTGTCCATCC-3'

PCR産物は0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロマイドを含む3%アガロースゲルで電気泳動して結果を確認した。

5. マウス カスパーゼ8のPCR クローニング

1) PCR産物のクローニング

PCR産物は、3'端にチミジン1塩基の突出末端をもつTベクターを使用するTAクローニング法によりクローニングした (Mead et al, 1991)。Tベクターとして、pGEM-T-Easy Vector (Promega) を用いた。PCR産物溶液4.5 μl に、Tベクター (50 ng / μl) 0.5 μl , Ligation-kit ver.2 sol. I (宝酒造) 5 μl を加え、16 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間でライゲーションを行った。

つづいて、JM109コンピテントセルをライゲーション産物でトランスフォーメーションした。JM109コンピテントセル100 μl にライゲーション産物5 μl をゆるやかに混ぜて、氷中で30分間放置した。次に42 $^{\circ}\text{C}$ 、45秒の熱ショックを加え、さらに氷中に2分置いた。SOC培地 (2% tryptone - 0.5% yeast extract - 0.05% NaCl - 2.5 mM KCl - 10 mM MgCl₂ - 10mM MgSO₄ - 20 mM グルコース) を900 μl 加え37 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間振とう培養後、0.1M IPTG, 4% X-gal, 各40 μl を塗ったアンピシリン入(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) LB (Luria-Bertani ; 1% Tryptone-0.5% Yeast extract-1% NaCl) アガープレートにスプレッターでプレーティングし、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。

2) インサートチェック

トランスフォーメーション後、インサートチェックは大腸菌のコロニーをテンプレートにしてPCR法により行った。白色コロニーを選択して滅菌したつまようじでアンピシリン入LBアガープレートと96穴 Thermo Well (Coster) に植菌した。

クローニングしたそれぞれのPCR産物の両端にあるプライマーを用いて、95 $^{\circ}\text{C}$ 2分を1サイクル、95 $^{\circ}\text{C}$ 1分と60 $^{\circ}\text{C}$ 1分を35サイクル、60 $^{\circ}\text{C}$ 7分を1サイク

ルのPCRを行った。PCR産物は0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルで電気泳動して目的長のDNA断片の生成を確認した。目的長のインサートをもつコロニーはプラスミドDNAを調製するために、アンピシリン入LB液体培地10mlに植菌して37°Cで一晩振とう培養した。

6. プラスミドDNAの調製

プラスミドDNAの調製は、QIAGEN Plasmid Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。以下試薬等は全てキットのものを用いた。

37°C, 一晩培養液を1,500 $\times g$, 5分で遠心して菌体を集めた。上清を捨てP1 (50 mM Tris-HCl (pH8.0) - 10 mM EDTA - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA) 1mlを加え懸濁後, 500 μl ずつ2本の1.5ml マイクロ遠心管に分注した。それぞれにP2 (200 mM NaOH - 1% SDS) 500 μl を加え5分間室温で放置した。次にP3 (3 M CH₃COOK (pH5.5)) 500 μl を加え氷中に10分間放置した。

6,000 $\times g$, 10分遠心し, その上清をそれぞれ1.5 ml マイクロ遠心管に移し, 再度6,000 $\times g$, 10分遠心した。この上清は, QBT (750 mM NaCl - 50 mM MOPS pH7.0 - 15% イソプロピルアルコール) 1mlで平衡化したQIAGEN-Tip 20に通した。QIAGEN-Tip 20をQC (1 M NaCl - 50 mM MOPS pH7.0 - 15% イソプロピルアルコール) 1mlで4回洗浄した。その後, QF (1.25 M NaCl - 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) - 15% イソプロピルアルコール) 800 μl でプラスミドDNAを溶出した。DNA溶液にイソプロピルアルコール560 μl を加え, 室温で6,000 $\times g$, 30分間遠心した。上清を除去し70%エタノールでDNAの沈殿を洗浄後, 蒸留水に溶解した。

7. DNA塩基配列の決定

DNA塩基配列はA.L.F.II 全自動DNAシーケンサー (Pharmacia) を用いて解析した。シーケンスサンプルは, Taq DNA ポリメラーゼを用いた Auto Cycle Sequencing 法により調製した。

0.6 ml チューブにddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, (Pharmacia) を2 μl ずつ入れ, A,C,G,T 反応用チューブとした。reaction buffer 2 μl , dNTPs mix 5 μl , dilution buffer 1.5 μl , 蛍光標識 primer 2 μl (以上,

Pharmacia, Auto Cycle Sequencing 用試薬), Taq DNA ポリメラーゼ (5 Unit / μ l) 0.5 μ l (promega), DNA 溶液 7 μ l (DNA 5 μ gを含む), を混合した後, 4 μ l ずつA,C,G,T 反应用チューブに分注した。ミネラルオイル 20 μ l を重層して, 95°C 36 秒, 50°C 36 秒, 72°C 84 秒 を17サイクル, つづいて, 95°C 36 秒, 72°C 84 秒 を13サイクルのPCR 反応を行った。PCR 終了後, stop.sol (Pharmacia) 4 μ l を加え, 95°C で3 分間熱変性させてから DNA シークエンスに用いた。

8. cDNA libraryのスクリーニング

マウス カスパーゼ 8 の全長を含むclone を得るために, PCR クローニングしたDNA 断片をプローブとして, P19RA cDNA library (Stratagene) から 5×10^5 のプラークをスクリーニングした。ファージ (λ ZAP II) の宿主大腸菌としてXL-1 Blue MRF' を用いた。XL-1 Blue MRF' は, 10 mM MgSO₄, 0.2 % マルトースを含むLB 10 ml で 37 °C, 一晚培養後, 1,500 \times g, 5分で遠心して菌体を集め, 10 mM MgSO₄ 3 ml に懸濁し氷中に20 分以上おいた。ファージ液を加えて, 37 °C, 20 分で感染させた後, 約 60 °C に保温しておいたLB top アガー (0.7 % アガロースを含むLB) 5 ml を加えてLB アガープレート上に重層した。37 °C, 8 時間インキュベートしてプラークを形成させた。

1) プラークハイブリダイゼーション

ニトロセルロースフィルター (PROTRAN BA 85 : S&S) をLB top アガー上に約 3 分間静置してプラークのリフティングを行った。フィルターは, アルカリ溶液 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) で 5 分間処理してアルカリ変性後, 中和液 (0.5 M Tris-HCl (pH 7.5) - 1.5 M NaCl) で 5 分間中和し, 2 \times SSC で洗浄してから3MM ろ紙上に置いて風乾した。つづいて80°C で2 時間ベーキングした。

プラークハイブリダイゼーションのプローブとして, PCR クローニングしたマウス カスパーゼ 8 のEcoRI 断片を使用した。

フィルターを 50% ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液 (Hybridization buffer tablets PRN 131 : Amersham) (5 \times SSC - 1 % SDS - 1 % protein blocker - 50 % ホルムアミド) で, 42°C で2 時間 プレハイブリダ

イゼーションした後, Megaprime DNA labelling System (Amersham) を用いてランダムプライム法で ^{32}P α dCTP で標識した DNA プロブを加え, 42°Cで一晩ハイブリダイゼーションをした。フィルターは, 2×SSC-0.1% SDS 溶液および0.1×SSC-0.1% SDS 溶液で42°C, 1時間の洗浄を各々2回行い, BAS 2000 で結果を解析をした。陽性プラークのみられたフィルターは, -80°Cに2日間おいてX線フィルムに感光した。X線フィルムの陽性シグナルとLBアガープレート上のプラークを照合し, 陽性と思われるプラークをLB top アガーごとピペットマンで吸い取り, SM (suspension medium) に懸濁した。

単一の陽性プラークを分離するまで, 2次および3次スクリーニングのプラークハイブリダイゼーションを行った。

2) ヘルパーファージによるサブクロニング

cDNA library から分離したファージのクローンは, ヘルパーファージを用いた *in vivo* excision により λ ZAP II から pBluescript SK(-)へサブクロニングした。

XL-1 Blue MRF'は, 10 mM MgSO₄, 0.2% マルトースを含むLB 10 ml で 37°C, 一晩培養後, 3,500 rpm, 5分で遠心して菌体を集め, 10 mM MgSO₄ 3 mlに懸濁し氷中に20分以上おいた。XL-1 Blue MRF'懸濁液 200 μ l, ExAssist helper phage 液 (Stratagene) 1 μ l, クローニングしたファージ液 1 μ lを混合し, 37°C, 15分間インキュベーションした。LB 3 ml を加えて 37°C, 3時間振とうした後, 65°C, 20分の熱処理を加えて, 5,000 \times g, 15分, 4°Cで遠心した。この上清 10 μ lを, 10 mM MgSO₄に懸濁したSOLR 200 μ lに加え, 37°C, 15分インキュベーションした。つづいて 50-1 μ lを適当量のLBに懸濁して, アンピシリン入LBプレートにプレーティングし, 37°Cで一晩インキュベートした。

コロニーを選択してPCR法によるインサートチェック, プラスミドDNAの調製, DNA sequence による塩基配列の確認を行った。

cDNA library からクローニングしたマウスカスパーゼ8のクローンは, 終止コドンの5'側 812 bp からをコードしており, 全長は含んでいなかった。

9. マウス カスパーゼ 8 全長および活性型コンストラクトの作製

cDNA library から分離したclone をもとに、マウス カスパーゼ 8 の全長および活性型コンストラクトを作製した。カスパーゼ 8 は、細胞に強発現させるとDED を介して会合し、自己活性化して細胞死を誘導するので、DEDを除いたコンストラクトを作製した。各コンストラクトは以下の配列のプライマーを使用して、95℃ 2分を1サイクル、95℃ 1分と60℃ 2分を10 サイクル、60℃ 7分を1サイクルの PCR により作製した。PCR産物は、TA クローニング法によりpGEM-T easy vector にクローニングした。

・マウス カスパーゼ 8 (-DED)

5'-TCACGGACTTCAGACAAAG-3'

5'-TTAGGGAGGGAAGAAGAG-3'

・マウス カスパーゼ 8 活性型 (-DED)

5'-TCACGGACTTCAGACAAAG-3'

5'-TCAATCCACTTCTAAAGT-3'

10. EGFP (enhanced green fluorescent protein)

融合カスパーゼ8 の作製

pEGFP - C1 Vector (Clontech)を用いて、N端にEGFPを融合したカスパーゼ8 の発現系を作製した。

マウス カスパーゼ 8 全長 (-DED)、マウス カスパーゼ 8 活性型 (-DED)、それぞれのEcoRI断片を、pEGFP - C1のEcoRIサイトにサブクローニングした。

11. EGFP融合ポリグルタミンタンパクの作製

1) ポリグルタミン伸長遺伝子のPCRクローニング

CAG リピートを含むDNA断片は、DRPLA患者および健常者各3名の白血球から調製したゲノムDNAを鋳型として、95℃ 2分を1サイクル、95℃ 1分、60℃ 1分、72℃ 1分を30 サイクル、72℃ 10分を1サイクルの PCR により増幅した。

プライマーは以下の配列のものを用いた。

5'-CACCAGTCTCAACACATCACCATC-3'

5'-CCTCCAGTGGGTGGGGAAATGCTC-3'

PCR産物は0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエチジウムブロマイドを含む3%アガロースゲルで電気泳動して結果を確認した。また、TAクローニング法によりpGEM-T-Easy Vectorにクローニングし、DNA sequenceにより塩基配列の確認を行った。

2) サザンハイブリダイゼーション

電気泳動終了後のアガロースゲルを、強アルカリ液 (0.5 M NaOH - 1.5 M NaCl) , 弱アルカリ液 (0.04 M NaOH - 1.5 M NaCl) で各々15分ずつ振とうしDNAを変性させた。トレーに台を置きその上に3MMろ紙を敷き弱アルカリ液に浸した。その上にアルカリ変性させたゲル、ナイロンフィルター (Hybond-N+ : Amersham) , 3MMろ紙2枚、ペーパータオル、重りを載せた。室温で20時間以上置きナイロンフィルターにDNAを転写した。フィルターは、2 \times SSCで洗浄後、ハイブリダイゼーションをした。プローブは、CAGリピート伸長遺伝子のEcoRI断片を用いた。50%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液で、42 $^{\circ}\text{C}$ で2時間プレハイブリダイゼーションした後、 ^{32}P α dCTPで標識したプローブを加え、42 $^{\circ}\text{C}$ で一晩ハイブリダイゼーションをした。フィルターは、2 \times SSC - 0.1% SDS溶液および0.1 \times SSC - 0.1% SDS溶液で42 $^{\circ}\text{C}$ 、1時間の洗浄を各々2回行い、BAS 2000で結果を解析をした。

3) Q11, Q72 コンストラクトの作製

ポリグルタミン伸長遺伝子Q11およびQ72コンストラクトは、PCRクローニングした健常者およびDRPLA患者のポリグルタミン伸長遺伝子のDNA断片を鋳型として、95 $^{\circ}\text{C}$ 2分を1サイクル、95 $^{\circ}\text{C}$ 1分、60 $^{\circ}\text{C}$ 2分を10サイクル、60 $^{\circ}\text{C}$ 7分を1サイクルのPCRにより作製した。プライマーは以下の配列のものを用いた。

5'-ATGCATCACCACCAGCAACAGCAA-3'

5'-CTAGGGCCCAGAGTTTCCGTGATG-3'

PCR産物はTAクローニング法によりpGEM-T-Easy Vectorにクローニングし、DNA sequenceにより塩基配列の確認を行った。

PCRクローニングしたQ11, Q72のEcoRI断片は、pEGFP-C1 VectorのEcoRIサイトにサブクローニングしてN端にEGFPを融合したpEGFP-Q11, Q72の発現系を作製した。

12. 細胞への遺伝子導入

培養細胞への遺伝子導入（トランスフェクション）はリン酸カルシウム法により行った。

トランスフェクション前日にCOS細胞を6 cm細胞培養皿（Becton Dickinson : FALCON）1枚あたりに 2×10^5 個にまきなおした。翌日、トランスフェクションの2時間前に新鮮な培養液に交換した。1.5 ml マイクロ遠心管にDNA溶液 220 μ l (DNA 10 μ g分を含む)と2.5 M CaCl₂ 30 μ lを入れ、そこに2×HBS (HEPES buffered saline) (pH7.05) 250 μ lを一滴ずつよく混ぜながら添加した。室温で30分間放置した後、細胞上に均一になるようにゆっくりと滴下した。トランスフェクション開始から5時間後、DNA溶液を含む培養液をアスピレーターで除去し細胞を培養液で2回洗った後、新鮮な培養液を加えた。

13. マウスカスパーゼ8, 9活性化切断部位特異的認識抗体の作製

1) 活性型カスパーゼ特異的抗体の作製

活性型カスパーゼの切断部位に対する特異的抗体の作製は、西道や大海らによるフォドリンおよびカルパインの切断部位に対する抗体作製法に基づいて行った (Saido et al., 1993 ; Kikuchi et al., 1995)。

マウスカスパーゼ8, 9の活性化切断部位の5アミノ酸に加え、N末端に担体に結合させるためのシステインを付加した計6アミノ酸のペプチドを合成した(サワデーテクノロジー)。合成ペプチドをKLH(Keyhole Limpet Hemocyanin) (Sigma) に結合させたものをウサギ(ニュージーランドホワイト種, 医科学動物研究所) に免疫し、アフィニティクロマトグラフィーにより

抗体を精製した。

・合成ペプチドとKLHの結合

まず、合成ペプチドをKLHへ結合させた。KLH 10 mg を0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 2 mlに溶解した。1 mg のMBS(m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) (Sigma) をN, N'-ジメチルホルムアミド (ナカライタスク) 67 μ lで溶かしたMBS溶液をこれにゆっくり加え、室温で30分以上振とうした。あらかじめ0.2M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) で平衡化したセファデックスG-25ゲルろ過カラム (ϕ 0.8 \times 30cm) (BIO RAD) にアプライし、同緩衝液にて流出画分を分取した。各流出画分について、波長 280 nm にて吸光度を測定し、KLHとMBSの複合体であるKLH-MBSを形成している画分について集めた。なお、カラムを用いる一連の操作は4 $^{\circ}$ Cで行った。

このKLH-MBS 溶液 0.4 ml に、2.5 mg / 0.1 ml の濃度で合成ペプチドを加え、室温、4時間以上振とうし、KLH-ペプチド結合物とした。分注して-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

・抗原による免疫

このKLH-ペプチド結合物を抗原としてウサギを免疫した。初回免疫では結核菌死菌を含むFreund complete adjuvant (Gibco) を用いた。これを 23G 注射針 (テルモ) をつけた注射筒を用いて1 ml 測り取り、さらにもう1本の同様な注射筒でKLH-ペプチド結合物を吸いとった後、接続管を装着して2本の注射筒を連結した。注射筒の内筒を交互に動かし、液を移動させることによって均一なエマルジョンを作製した。

ウサギを固定し、70%エタノールであらかじめ拭いた背中などの皮下数カ所にエマルジョンを注射した。追加免疫として2回目以降はFreund complete adjuvantの代わりに結核菌死菌を含まないFreund incomplete adjuvant (Gibco) を用いて約2週間毎、計3回にウサギに追加免疫を行った。初回免疫から数えて3および4回目免疫後にウサギ抗血清を採取した。ウサギを固定用箱に入れ、耳の血管を拡張させた後、アルコール綿で拭き中央の動脈に19Gの翼状針(テルモ)を刺し血液を採取した。37 $^{\circ}$ C、2時間で放置後さらに4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。1,500 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 5分間遠心分離し、血清を集め分注して-30 $^{\circ}$ Cで保存した。

2) アフィニティカラムの作製および抗体の精製

AH-セファロース4B (Pharmacia) 約1.5gを0.5M NaCl溶液および蒸留水で洗浄し、10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) で平衡化した後、N,N'-ジメチルホルムアミド 1.4 ml で溶解したMBS 20 mg 分をゆっくりと加え室温で80分間振とうした。これをガラスろ過器を用いて0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) で洗浄し再び同緩衝液4 ml で膨潤させ、蒸留水に溶かした合成ペプチドを5mg / 0.2 ml 加えた。水酸化カリウム溶液を用いてpH 6.5に調整し、4℃で一晩振とうした。その後、終濃度 75 mMになるように2-メルカプトエタノール(Sigma)を加え、さらに4℃, 2.5時間振とうしガラスろ過器を用いて50 mM Tris-HCl (pH7.4)で洗浄し、樹脂に結合していないペプチドおよび試薬を洗浄した。この樹脂を注射器外筒 (テルモ) にカラムとして充填した。

血清を、上記のペプチドを結合させたアフィニティカラムに載せ、3, 4回繰り返しカラムを通して抗体を結合させた後、0.5M NaCl - 50mM Tris-HCl (pH7.4)で2回洗浄した。0.1M グリシン-HCl (pH2.5) によって溶出し、酸性下による活性低下を防ぐため、あらかじめ冷却した2M Tris-HCl (pH8.0) 中に分取した。波長280nmにて吸光度を測定し、蛋白質量の多い画分を実験に使用した。終濃度 0.02 %になるように防腐剤としてアジ化ナトリウムを加えて4℃に保存した。

なお、カスパーゼ3の活性型特異的抗体は、Kourokuらの作製した抗体を供与していただいたものを使用した(Kouroku et al., 1998)。

14. イムノプロット

1) SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

(SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

SDS-PAGE はLaemmli法によって行った (Laemmli et al., 1970)。電気泳動はスラブゲル装置 (和科盛) を用いた。試料に5×SDS-PAGE sample buffer (終濃度 50 mM Tris-HCl (pH6.8) - 2% SDS - 0.1% ブロモフェノールブルー - 10% グリセロール)を加え、95℃, 5分間の熱処理を行った。12% ま

たは10 %分離ゲルを用いて、80Vの定電圧で分子量マーカー (Amersham) とともに泳動した。

2) ウエスタンブロット

SDS-PAGE 終了後、アクリルアミドゲルからニトロセルロースフィルターに蛋白質を転写した。セミドライタイプ転写装置 (バイオクラフト) の (-) 電極板の上にあらかじめTransfer Buffer (20%メタノール-Tris 3g /l-グリシン14.4 g/l) に浸した3MMろ紙を5枚重ね、この上にTransfer Bufferでリンスしたアクリルアミドゲルをのせた。ゲルの上にTransfer Bufferを浸したニトロセルロースフィルター (Schleicher & Schuell) 1枚と3 MM ろ紙3枚を重ねた。(+) の電極板をのせ、フィルター1 cm² あたり2 mA の定電流で50 分間通電した。

3) 抗体反応

フィルターを、G+ milk (0.5 % スキムミルク - 0.1 % Triton-X 100 - 0.3 % ヤギ血清 - 0.1 % NaN₃-PBS) 中で室温で30 分間振とうしブロッキングをした。つづいて、G+ milkで希釈した一次抗体の反応液中でフィルターを4℃、一晚振とうした。各抗体は以下のように希釈して用いた。

- ・抗GFP抗体 (Boehringer Mannheim) ×1 / 1000
- ・抗活性型カスパーゼ3抗体 ×1 / 500
- ・抗活性型カスパーゼ8抗体 ×1 / 500
- ・抗活性型カスパーゼ9抗体 ×1 / 500,

次にフィルターを、PBS milk (0.5 % スキムミルク - 0.1 % Triton-X 100 - PBS) で5分間ずつ5回、室温で振とうして洗浄した。二次抗体として、アルカリフォスファターゼ標識した抗マウスまたはウサギイムノグロブリン抗体 (Promega) を使用した。二次抗体をG+ milk で7500倍に希釈した抗体反応液中でフィルターを室温、40分間振とうした。この後、一次抗体反応の時と同様に洗浄し、発色反応を行った。

4) アルカリホスファターゼ発色反応

フィルターをアルカリホスファターゼ buffer (100 mM Tris-HCl (pH9.5) - 100 mM NaCl - 5 mM MgCl₂) に移し, 5 分間室温で振とうした。次にアルカリホスファターゼ Buffer に NBT (nitro blue tetrazolium), BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate) を加えた発色反応液中で発色反応を行った。適当なところで反応を止めフィルターを蒸留水で洗った。

15. 免疫染色

1) 組織切片の作製

妊娠マウス(ICR: 日本クレア) から胚を摘出し, 4% パラホルムアルデヒド - PBS 中で4°C, 一晩で振とうして固定した。30% (w/v) sucrose - PBS で置換し, さらに4°C, 一晩で振とうした後, OCT コンパウンド (MILES) で包埋した。クリオスタットで6 μmの厚さに切り, あらかじめベクターボンド試薬 (Vector) によりコートしたスライドガラス上に切片を固定した。

2) 凍結筋組織切片の作製

2 週齢のdy/dy マウス (メロシン欠損マウス) およびB6マウスは過剰エーテル麻酔により屠殺し, 骨格筋組織を摘出した。筋組織は, 液体窒素で冷却したイソペンタン中で瞬間凍結した。つづいてクリオスタットで6 μmの厚さに切り, あらかじめベクターボンド試薬によりコートしたスライドガラス上に切片を固定して凍結切片を作製した。

以下, 免疫染色, TUNEL 法, in situ ハイブリダイゼーションにおいて, スライドガラス上に固定した組織切片の反応や洗浄の操作は, ことわらないかぎり立型染色瓶を用いて室温で行った。

3) 免疫染色

スライドガラス上に固定した組織切片を PBS で5分間2回洗浄し, 切片に付着しているOCTコンパウンドを洗い落とす。2% H₂O₂ - PBSにて5分間処理

した後、PBS で5分間3回洗浄した。さらに10 mM 過ヨウ素酸-PBSにて20分間処理し、再びPBSにて5分間5回洗浄した。G+milk 中で1時間ブロッキングした後、1次抗体反応液に浸し、3日間4℃に放置した。以降、免疫染色において2次抗体反応からアビジン-ビオジン標識までは、ベクタステインABC-PO (ウサギIgG) キット (Vector) の試薬を使用した。切片を、PBS milk で10分間6回洗浄した後、ビオチン化抗ウサギイムノグロブリン抗体 (キット付属) をG+milk 1 ml あたり2.5 μ l 加えた2次抗体反応液中に37℃、1時間置いた。つづいて、PBS milk で10分間5回洗浄後、PBS milk 1 ml あたりアビジンDH、ビオチン化ペルオキシダーゼ (ともにキット付属) 各5 μ l を加えた標識反応液中に37℃、1時間置いた。

PBS で5分間5回洗浄後、発色反応液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.5) -0.02 % DAB - 0.005 % H₂O₂) 中に切片を移し、発色反応を行った。

4) EGFP 融合蛋白質と蛍光標識抗体を用いた二重染色

トランスフェクション前日にCOS 細胞およびP19 EC 細胞を、3.5 cm 細胞培養皿 (Becton Dickinson : FALCON) の底面に置いたカバーガラス上にまきなおした。翌日、リン酸カルシウム法によりEGFP 融合遺伝子のトランスフェクションを行った。

細胞は、4% パラホルムアルデヒド-PBS で室温、20分間放置して固定し、PBSで5回洗浄した。G+milk でブロッキング後、G+milkで希釈した1次抗体反応液を加えて4℃で1晩振とうした。PBS milkで5回洗浄後、二次抗体反応液としてG+milkで200倍希釈したテキサスレッド標識抗ウサギイムノグロブリン抗体を使用し、37℃、1時間反応させた。

PBSで5回洗浄後、グリセロールで封入した。共焦点レーザー (CSU-10、ヨコカワ) を用いて解析した。

16. TUNEL 法によるDNA断片化の検出

抗活性型カスパーゼ3抗体による免疫染色を行ったマウス組織切片で、つづいてTUNEL 法 (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated

dUTP-biotin nick end labeling) によるDNA断片化の検出 (Gavrieli et al., 1992) を行い, 同一組織切片上でカスパーゼ3の活性化とアポトーシスの発生を調べた。

免疫染色は, 前項に記述したとおりの方法で行った。免疫染色終了後, apop tag (Oncor) を用いてTUNEL法によりDNA断片化の検出を行った。

切片をPBSで3分間4回洗浄した。37℃にて1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ Proteinase K-PBS中で5分間処理した後, エタノール:酢酸=2:1の混合液に浸し, -20℃, 5分間放置して固定した。組織切片をPBSで5分間2回洗浄した後, Equilibration buffer (キット付属) を2滴滴下して室温で10分置いた。次にTdT酵素反応液 (キット付属) 54 μl を滴下し, 加湿槽にスライドを入れて37℃で1時間インキュベーションした。あらかじめ37℃に加温しておいた反応停止, 洗浄液 (キット付属) で30分間洗浄し, さらにPBSで1回洗浄した。TBST (0.1% (w/v) Tween-20 - TBS) で5分間2回洗浄し, 0.5% ブロッキング試薬-TBST中に1時間おいてブロッキングした。アルカリホスファターゼ標識抗DIG (digoxigenin) 抗体 (Boehringer Mannheim) を0.5% ブロッキング試薬-TBSTで2,000倍に希釈した抗体反応液を切片上に滴下しスライドガラスを加湿槽に入れ4℃で一晩置いた。

2 mM レバミゾール-TBST中で10分間3回洗浄し, 発色反応液 (100 mM Tris-HCl (pH9.5) - 100 mM NaCl - 50 mM MgCl₂ - 0.1% (w/v) Tween-20 - 2 mM レバミゾール) 中で10分間振とう後, 発色反応液 1 ml あたり nitroblue tetrazolium (NBT) 溶液 4.5 μl , X-Phosphate 3.5 μl を加えた発色液中に移し, 染色瓶全体をアルミホイルで包んで暗所に置いた。

発色停止液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0) - 1 mM EDTA (pH8.0)) で10分間2回洗浄した後, 水分を取り除いてグリセロールで封入しカバーガラスをかけた。

17. in situ ハイブリダイゼーション

1) DIG 標識 RNA プロブの作製

マウスカスパーゼ3および7のDIG標識したRNAプロブを作製した。RNAプロブの鋳型DNAとして, カスパーゼ3はcDNAの5'側797 bpの

EcoRI断片を、カスパーゼ7は cDNA の5'側 810 bp のEcoRI - Xho I断片を pBluescript SK(-)へサブクローニングしたものを使用した。それぞれの鋳型 DNA は、制限酵素処理により直線化した。これらの直線化DNA 1 μ gを鋳型として、DIG RNA labeling mix (Boehringer Mannheim) 2 μ l, 35 Units T7 または T3 (Gibco) RNA ポリメラーゼ, 40 Units RNase inhibitor (宝酒造), 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 6 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 10 mM DTT, 2 mM spermidin を組成とする 100 μ l の系で、37°C 2時間の反応によりRNA を合成した。0.2 M EDTA (pH 8.0) を 2 μ l 加えて反応を停止させ、1/10 倍量の 4 M LiCl と3 倍量の100% エタノールを加えて-80°Cに20分間おきエタノール沈殿を行った。沈殿をDEPEC 処理蒸留水に溶かし、一部を 0.2 μ g/ml のエチジウムブロマイドを含む2% アガロースゲルで電気泳動してRNA の合成を確認した。RNA 濃度を測定し、DIG標識RNAプローブとして使用した。

2) 組織切片を用いた in situ ハイブリダイゼーション

(Wilkinson et al., 1992)

・ハイブリダイゼーション

スライドガラスに固定した組織切片はPBT (0.1% Tween-20 - PBS) で10分洗浄してから、1 mg/ml Proteinase K-PBT 中で37°C, 10分間インキュベーションした。PBTで1分間3回洗浄後、4% (w/v) パラホルムアルデヒド - PBS 中で20分間固定し、PBTで1分間2回洗浄してハイブリダイゼーションを行った。DIG 標識したRNA プローブを加えたハイブリダイゼーション溶液 (5 \times SSC - 50 μ g/ml yeast RNA - 1% SDS - 50 μ g/ml heparin - 50%ホルミアルド) 50 μ l を切片上に滴下しカバーガラスを載せてハイブリダイゼーションオープン (MHS-04; EYELA) 中で、70°C, 一晚ハイブリダイゼーションを行った。

・洗浄～抗体反応

洗浄液1 (5 \times SSC - 1% SDS - 50%ホルミアルド) で65°C, 30分の洗浄を2回行った後、洗浄液2 (2 \times SSC - 50%ホルミアルド) で65°C, 30分の洗浄を2回行った。

洗浄の操作の間に抗体反応液を調製した。ヤギ血清 (コージンバイオ) を

6,000×g, 4℃で5分間遠心した上清を70℃で30分間加熱して補体およびアルカリホスファターゼの不活化を行った。つづいて、1%ヤギ血清(不活化済)-5mg/ml レバミゾール-TBSTを加えた溶液で、アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体を5,000倍に希釈し、4℃で30分間振とうしたものを抗体反応液とした。洗浄液2による洗浄後、TBSTで3回洗い、10%ヤギ血清(不活化済)-5mg/ml レバミゾール-PBST中で1時間、室温で振とうした。抗体反応液100μlを切片上に滴下しスライドグラスを加湿槽に入れ、4℃で一晩置いた。

・発色反応

TBST中で20分間3回室温で振とうし、発色反応液(100mM Tris-HCl (pH9.5)-100mM NaCl-50mM MgCl₂-0.1%(w/v) Tween-20)で5分間洗った後、発色反応液1mlあたり nitroblue tetrazolium (NBT) 溶液4.5μl, X-Phosphate 3.5μlを加えた発色液中に移し染色瓶全体をアルミホイルで包んで暗所に置いた。

発色停止液(10mM Tris-HCl (pH8.0)-1mM EDTA (pH8.0))で10分間2回洗浄した後、水分を取り除いてグリセロールで封入しカバーグラスをかけた。

3) whole mount in situ ハイブリダイゼーション

(Conlon et al., 1993)

・マウス胚の固定

妊娠マウスから胚を摘出し、4%パラホルムアルデヒド-PBS中で4℃、一晩で振とうして固定した。翌日、PBTで5分間2回洗浄後、25%メタノール-PBT, 50%メタノール-PBT, 75%メタノール-PBT, 100%メタノールの順に5分ずつ振とうして、メタノール置換し、-30℃で一晩おいた。次に、75%メタノール-PBT, 50%メタノール-PBT, 25%メタノール-PBT, PBTの順に5分ずつ振とうしPBTに置き換えた。

・ハイブリダイゼーション

6% H₂O₂-PBTで1時間処理後、PBTで5分間3回洗浄した。つづいて、10μg/ml Proteinase K-PBTで15分間処理後、2mg/ml グリシン-PBT, 0.2% グルタルアルデヒド-4%パラホルムアルデヒド-PBTでそれぞれ5分

において再固定した。PBTで5分間2回洗浄後、ハイブリダイゼーション溶液(5×SSC-50 μg/ml yeast RNA-1% SDS-50 μg/ml heparin-50%ホルミアルド)中にマウス胚を移し、ハイブリダイゼーションオープンを用いて70℃、1時間振とうしてプレハイブリダイゼーションをした。つづいて、DIG標識RNAプローブを加えたハイブリダイゼーション溶液に換えて、70℃、一晩ハイブリダイゼーションを行った。

・洗浄～抗体反応

ハイブリダイゼーション終了後、洗浄液1(5×SSC-1% SDS-50%ホルミアルド)で70℃、30分の洗浄を2回行った後、洗浄液2(10 mM Tris-HCl (pH7.5)-0.5 M NaCl-0.1% Tween-20)で70℃、10分、室温5分間2回の洗浄を行った。洗浄液2にRNase Aを100 μg/mlの濃度で加えた溶液中で37℃、15分間2回振とうしてRNase処理をした。処理後、洗浄液2、洗浄液3(2×SSC-50%ホルミアルド)で室温で各5分、洗浄液3で70℃、30分間2回、TBSTで5分間3回の洗浄を行った。マウス胚を10%羊血清-TBST中で90分間振とう後、アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体を1%羊血清-TBSTで5,000倍に希釈した抗体反応液に移し、4℃で一晩振とうした。

・発色反応

マウス胚を、2 mM レバミゾール-TBST中で5分間3回、4℃で1時間3回洗浄を行った。さらに、2 mM レバミゾール-TBST中で4℃で一晩振とうした。

発色反応液(100 mM Tris-HCl (pH9.5)-100 mM NaCl-50 mM MgCl₂-0.1% (w/v) Tween-20-2 mM レバミゾール)中で10分間3回振とう後、発色反応液1 mlあたり nitroblue tetrazolium (NBT) 溶液 4.5 μl, X-Phosphate 3.5 μlを加えた発色液中に移し、染色瓶全体をアルミホイルで包んで暗所に置いた。発色を確認後、発色停止液(10 mM Tris-HCl (pH8.0)-1 mM EDTA (pH8.0))で10分間3回洗浄した。マウス胚は写真撮影後、4℃の暗所に保存した。

第3章 神経細胞死におけるカスパーゼ活性化の分子機構の解析

1. 序論

多細胞生物の正常な形態形成のためには、発生過程において特定の時期に特定の細胞が死ぬプログラム細胞死 (programmed cell death : PCD) が重要である。PCDは、発生学の現場から提唱されたものだが、現在ではアポトーシスの概念の一つとしてとらえられている。神経系は、その発生分化過程においてアポトーシスが顕著におこる系として知られている。シナプスの形成過程においては、過剰に生産された神経細胞の20-80%は細胞死を起こし消失する。

個体の発生過程における神経細胞死は、2つの型に大きく分類される。一つは、発生の早期に起こる細胞死で、これは神経管がまだ閉じる前の時期からみられ、まだ分裂を続けている神経上皮細胞やごく若い神経細胞における細胞死である (Blaschke et al., 1996)。もう一つは、発生の比較的后期に起こる細胞死で、神経細胞が分化成熟し標的細胞とシナプス形成した時期にみられ、従来より naturally occurring neuronal death と呼ばれてきたものである

(Ferrer et al., 1990)。とくに末梢神経系においては、神経細胞の生存に標的細胞からの神経栄養因子や、求心性入力を介したセカンドメッセンジャー (Ca^{2+} など) といった生存のためのシグナルが必要であり、これらを充分に受け取ることができなかった大部分の神経細胞がアポトーシスによって死んでいくものと考えられている (Oppenheim et al., 1991)。神経栄養因子としては、NGF, BDNF, NT-3などが知られている。これらの因子や、そのチロシンキナーゼ型レセプターである Trk A, B, C のノックアウトマウスでは多くの後根神経節 (dorsal root ganglia : DRG) や三叉神経節などの末梢神経細胞が細胞死を起こす (Snider et al., 1994)。In vitro でも血清, NGF を培養液中から除去すると、DRGニューロンに細胞死が誘導される。

カスパーゼファミリーは、アポトーシスの実行過程において中心的な役割を果たしているプロテアーゼであり、多くのアポトーシス例においてその関与が報告されている。血清やNGFの除去によるDRGニューロンの神経細胞死は、

Crm Aや bcl-2 によって抑制される。また、In vitro の運動神経のアポトーシスがカスパーゼ 1 の阻害剤によって抑制されることも報告されている

(Milligan et al., 1995)。こうしたことから、末梢神経細胞死の分子機構にはカスパーゼファミリーの関与が示唆されてきた。

一方、発生の早期に起こる神経細胞死はシナプス形成以前のため、神経生存因子の欠如では説明がつかず、いまだ不明な点が多い。神経系のプログラム細胞死を誘導する因子については、その多くが明らかでないが BMP-4 が前脳の脈絡叢細胞や菱脳の神経冠前駆体細胞の細胞死に関与していることが知られている (Graham et al., 1994)。菱脳や指間の細胞死には BMP-4 とともにレチノイン酸シグナルの関与が示唆されている (Zou et al., 1996)。また、ニワトリ胚の神経管の背腹軸の分化に伴ってホメオボックス遺伝子 Msx-2 が神経管の最背側に発現するが、この領域は神経管の分化に伴って神経細胞死のみられる位置と一致するとの報告がある (Takahashi et al., 1990)。Msx-2 は、BMP-4 によって発現が誘導されることが知られている。このように、発生早期に起こる神経細胞死は神経細胞の分化過程と関連している可能性が高い。こうした発生初期の脳に見られるプログラム細胞死にも、カスパーゼが関与していることが Kuida らのカスパーゼ 3 ノックアウトマウスの解析により明らかにされてきた (Kuida et al., 1996)。

我々は、発生初期の脳でのプログラム細胞死におけるカスパーゼ 3 の分子機構を明らかにするために、神経細胞分化のモデル系として知られている P19 EC 細胞を用いて研究を行った。P19 EC 細胞は、McBurney らにより樹立されたマウステラトカルチノーマ細胞で、1 μ M のレチノイン酸存在下で細胞接着性の低い培養皿を用いて細胞間の凝集を高めたような状態で 2 日間程度培養することにより、神経細胞の前駆体であるネスチン陽性の神経上皮細胞へと分化させることができる。さらに、レチノイン酸非存在下で、細胞接着性のある培養皿で培養することにより 2-3 日で MAP-2, NF, A2B5 陽性の神経細胞へと分化させることが可能である (McBurney et al., 1982)。この神経分化の過程で、Rb, サイクリンなどの細胞周期の制御に関与する遺伝子やさまざまな神経分化に関係する遺伝子、MASH, HES などの発現がみられる。さらに、神経分化した P19 EC 細胞は、GABA 受容体を発現し、コリンアセチルトラン

スフェラーゼ活性を持つことから、中枢神経系のコリン作動性ニューロンに近い細胞に分化するものと思われる。形態、機能からレチノイン酸により分化誘導したP19 EC細胞由来の神経細胞は中枢神経系に近い性格を持っていると考えられる。よって、中枢神経系における未分化細胞から成熟神経細胞への神経分化過程を培養系で再現することが可能であり、神経細胞分化に関与する遺伝子とその機能解析の研究系として、最適なモデルとして使われている。また、P19 EC細胞は神経上皮細胞へと分化する過程で、DNA断片化を伴うアポトーシスが観察される (Slack et al., 1995 ; Okazawa et al., 1996) ことから、神経細胞死の研究素材としても適している。

本研究では、中枢神経細胞分化のモデル系であるレチノイン酸によるP19 EC細胞神経分化の系と、発生過程のマウスDRGニューロンを用いて神経細胞死の分子機構について検討した。なかでも、カスパーゼカスケードの下流に位置し、アポトーシスの実行に直接関与するカスパーゼ3に着目して神経細胞死におけるその活性化機構について解析した。

2. 結果

1. レチノイン酸によるP19神経分化過程における細胞死とカスパーゼ3様酵素活性化の分子機構

1) P19EC細胞の神経分化過程における細胞死とカスパーゼ3様酵素の活性化

P19 EC細胞を、神経分化誘導の条件である1 μ Mの全トランスレチノイン酸存在下の細胞凝集状態で培養すると、48時間以内にアポトーシスの指標であるDNA断片化が検出された (図3A)。それに伴いカスパーゼ3様プロテアーゼの天然基質として知られるPARPの116 kDaから85 kDaへの切断が生じた (図3B)。

また、カスパーゼ3の合成基質Ac-DEVD-MCAを用いて、この過程におけるカスパーゼ3様酵素活性を測定した結果、著明な活性の上昇がDNA断片化やPARPの切断に先行して、24時間から36時間にかけて一過性に検出された

(図3C)。

レチノイン酸処理によるP19 EC細胞におけるカスパーゼ3様酵素活性の上昇は、カスパーゼ阻害剤であるAc-DEVD-CHO, Ac-YVAD-CMKによって濃度依存的(1-10 μ M)に抑制された(図4A)。カスパーゼ3様酵素活性の抑制に対応して、レチノイン酸により誘導されていた細胞死とDNAの断片化も抑制された(図4B, C)。

これらの結果から、レチノイン酸によるP19 EC細胞の神経分化過程で観察される細胞死にはカスパーゼ3様プロテアーゼの関与が明らかになった。

また、DNAの断片化およびカスパーゼ3様酵素の活性化は、全トランスレチノイン酸だけでなく、9シスレチノイン酸によってももたらされた。しかし、P19 EC細胞に対して神経分化誘導能をもたないレチノールでは、DNAの断片化もカスパーゼ3様酵素の活性化もみられなかった(図5A, B)。

P19 EC細胞が成熟した神経細胞へ分化するのに必要な凝集状態での培養過程を経ずとも、レチノイド処理のみでもわずかではあるがDNAの断片化が検出され(図5A)、カスパーゼ3様酵素は活性化されることが確認された(図5B)。

2) P19EC細胞の神経分化過程におけるカスパーゼ3, 7およびbcl-2の発現の検出

レチノイン酸は核内受容体を介して、遺伝子発現を調節している。レチノイン酸処理によるP19 EC細胞の神経分化過程において、増大するカスパーゼ3様酵素を同定し、その分子機構を調べる目的で、2種類のカスパーゼ3様酵素、カスパーゼ3, 7のmRNA発現量の変化を両者に共通する塩基配列のプライマーを用いた定量的RT-PCRにより調べた。

このプライマーによるマウスカスパーゼ3, 7のPCR産物の塩基長は、それぞれ341bp, 349bpと近接しており、そのままではアガロースゲル上での分離が困難なため、マウスカスパーゼ3のPCR産物をEcoRI処理することで分離した。

この結果P19 EC細胞の神経分化過程において、マウスカスパーゼ3, 7の発現量に変化はみられなかった(図6)。一方、カスパーゼの活性化を抑制す

ることが知られているbcl-2はOkazawaらの報告 (Okazawa et al., 1996) と同様に、レチノイン酸処理下でわずかながらmRNA発現量の減少がみられた (図6)。

3) Wortmanninによるカスパーゼ3様酵素活性とアポトーシスの促進
P19 EC細胞の神経分化過程においてカスパーゼ3様酵素活性が著明に増大するのに対し、カスパーゼ3, 7の発現量、およびbcl-2の発現量がほとんど変動しないことから、カスパーゼ3様酵素の活性化にリン酸化などによる修飾が関与していないかを検討した。PI3Kは生存因子による細胞生存の情報伝達系に存在することが知られていることから、PI3Kとカスパーゼ活性化制御との関係について検討した。

PI3Kの阻害剤であるWortmanninは、P19 EC細胞において 10^2 nMでPI3K活性を完全に抑制した (図7A)。レチノイン酸処理下のP19 EC細胞において、PI3K活性を抑制する濃度 (10^2 - 10^3 nM) のWortmanninはカスパーゼ3様酵素活性を増大させた (図7B)。このときに、DNA断片化の促進もみられた (図7C)。

しかし、P19 EC細胞にレチノイン酸処理を施さずに、カスパーゼ3様酵素活性が検出されないような細胞では、Wortmanninのみの処理ではカスパーゼ3様酵素活性の増大も細胞死の促進もみられなかった (図7B, C)。一方、Wortmannin (1 - 10^3 nM) 存在下において、カスパーゼ3, 7およびbcl-2のmRNA発現量の変化はみられなかった。よって、WortmanninによるPI3Kの抑制は、直接カスパーゼ3様プロテアーゼの発現の増大や、カスパーゼを抑制するbcl-2の発現量の減少といった調節を引き起こすものでなく、むしろレチノイン酸によるP19 EC細胞の神経分化過程で増大するカスパーゼ3様酵素活性をなんらかの機構を介して正に調節していることが考えられる。別の言い方をすれば、PI3Kはカスパーゼ3様酵素活性を負に調節することにより、細胞の生存を維持している可能性が考えられた。

4) FGFファミリーによるカスパーゼ3様酵素活性の抑制

細胞増殖因子、生存因子の情報伝達系は、その受容体に結合したPI3Kの活

性化が関与していると考えられてきた (Arcaro et al, 1993)。最近, その分子機構の解析が急速に進展し, PI3Kの生成物であるホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸 (PI-3,4,5-P) がAktを活性化し, その活性化Aktにより, Badがリン酸化されることが明らかとなった。リン酸化されたBadは14-3-3と強い親和性があるため, Bcl-xLと結合できなくなり, 細胞死を抑制する活性をもつBcl-xLのホモダイマーの量が増え, 結果として細胞の生存維持に働くことが明らかにされた (Franke et al., 1997; Dudek et al., 1997)。PI3Kの阻害剤であるWortmanninは, PI3K活性を阻害することにより下流であるAktの活性化を抑制しBadとBcl-xLのヘテロダイマーを形成を促進することにより細胞の生存を負に調節することが考えられる。

Bcl-xLをP19 EC細胞に強発現させると, レチノイン酸による神経分化過程で観察されるカスパーゼ3様酵素の活性化が抑制された。よって, Bcl-xLはカスパーゼ3様酵素の活性化を抑制することにより, 神経分化過程のP19 EC細胞のアポトーシスを抑制していることが考えられた (図8A)。

そこで, どのような増殖, 生存因子がPI3K→Akt→Bad / Bcl-xLを介した機構でカスパーゼ3様酵素活性を調節しているかを調べた。各種増殖因子によって, 1 μ Mのレチノイン酸で30時間処理したP19 EC細胞におけるカスパーゼ3様酵素活性の上昇は, 濃度依存的に抑制された。特に, bFGF (FGF-2), FGF-9は, カスパーゼ3様酵素の活性化に対して1 ng / mlで顕著な抑制を示した (図9A, B)。

bFGFについて, レチノイン酸処理によるP19 EC細胞の神経分化過程におけるカスパーゼ3様酵素の活性化および細胞死の抑制を調べた。10 ng/mlのbFGFを添加することによって, カスパーゼ3様酵素活性およびDNA断片化は顕著に抑制された (図10A, B, C)。

5) FGFRからのシグナル伝達とカスパーゼ3様酵素活性

bFGFからの生存シグナルの伝達機構を調べるために, まず, レチノイン酸処理によるP19 EC細胞の神経分化過程におけるFGFレセプターの発現をRT-PCRで調べた。RT-PCRの結果, FGFR1は597bpと330bp, FGFR2は629bp, 383bp, 289bp, FGFR-3は446 bp, FGFR-4は550bp, のDNA断片が得られ

た。FGFR 1, 2 に複数のDNA断片が検出されたのはそれぞれのスプライシングによる。いずれのPCR産物もDNA sequenceによって目的のFGFRが生成されていることを確認した。

P19 EC 細胞の神経分化過程で、FGFR 1, 2, 3の発現量はほとんど変化がみられなかったが、FGFR 4の発現量は神経分化とともにやや減少をみせた(図11A)。

FGFRはチロシンキナーゼ活性を持っているので、チロシンキナーゼの阻害剤であるハービマイシンA (100nM) を添加して、P19 EC 細胞におけるカスパーゼ3様酵素活性の変化を調べた。その結果、ハービマイシンAはレチノイン酸処理下のカスパーゼ3様酵素活性を増大させた。そして、bFGFによるカスパーゼ3様酵素活性の抑制を阻害した(図11B)。これらの結果から、FGFRのチロシンキナーゼ活性は、カスパーゼ3様酵素の活性化を抑えることで細胞死の抑制に働いていることがわかった。

6) P19EC 細胞の神経分化過程におけるカスパーゼ3活性化断片

(p20/17)の検出

Kourokuらの作製した活性化カスパーゼ3を特異的に認識する抗p20/17抗体(抗活性化型カスパーゼ3抗体)を用いて(Kouroku et al., 1998), イムノブロットによりレチノイン酸処理によるP19 EC 細胞の神経分化過程におけるカスパーゼ3の活性化を検出した。

レチノイン酸処理下のP19 EC 細胞においてカスパーゼ3活性化断片(p20/17)が出現し、bFGFを添加することによって消失することがわかった(図10B)。また、bFGF処理後1時間以内にカスパーゼ3の活性化断片(p20/17)が消失した。また、bFGFは、カスパーゼ3の活性化に伴う活性化断片(p20/17)の生成を抑制した(図10B, 12C)。このように、bFGFはカスパーゼ3の活性化へのプロセッシングを抑制することで、カスパーゼ3および細胞死を抑制していることがわかった。

7) bFGFRシグナルによるカスパーゼ3様酵素活性の抑制の分子機構

bFGFの、P19 EC 細胞における細胞死抑制の作用機序を調べるために、レ

チノイン酸処理下のP19 EC 細胞にbFGF の短時間処理を行ない、33 時間後のカスパーゼ3 様酵素活性を調べた。レチノイン酸添加開始後3 時間のbFGF 処理だけでカスパーゼ3 様酵素活性は60% 抑制された。bFGF によるカスパーゼ3 様活性の抑制効果は非常に短時間で現われることから、レチノイン酸によるP19 EC 細胞の分化の方向を変えることで作用するのではなく、FGFRを介したリン酸化シグナルによるものであることが示唆された(図12A)。

レチノイン酸処理下のP19 EC 細胞にbFGFを添加すると時間依存的にPI3K が活性化された。このPI3Kの活性化は 10^2 nM のWortmannin によって抑制された(図13A)。

また、bFGFはBad をリン酸化し、Wortmannin はbFGFによるBad のリン酸化を抑制した。(図13B) これらの結果から、bFGFは、PI3K →Akt →BAD のリン酸化の経路を使ってカスパーゼ3 様酵素の活性化を抑制し、P19 EC 細胞における細胞死の抑制に働いていることが示唆された。

8) P19EC 細胞の神経分化に対するbFGF の効果

P19 EC 細胞を、神経細胞分化誘導の条件である1 uMのレチノイン酸存在下で細胞凝集状態で培養し神経細胞へと分化させた。抗MAP-2 抗体を用いた免疫染色により、神経細胞への分化を確認した。このときに、bFGF 処理によりアポトーシスおよびカスパーゼ3 様酵素の活性化を抑制しても、P19 EC 細胞は抗MAP-2 抗体陽性の神経細胞へと分化した(図14)。

II. マウスDRG ニューロンにおける神経細胞死とカスパーゼ3 様酵素の活性化

1) in situ ハイブリダイゼーション法によるマウス胚における

カスパーゼ3 mRNA発現の検出

カスパーゼ3 様酵素の活性化が、レチノイン酸によるP19 EC 細胞の神経分化過程における細胞死に深く関与していることが明らかとなったので、実際の発生過程における神経細胞のプログラム細胞死にカスパーゼ3 様酵素が関与し

ているか否かを調べる目的で、in situ ハイブリダイゼーション法を用いてマウス胚におけるカスパーゼ3および7の発現について解析を行った。

E10.5のマウス胚で、RNAプローブによるwhole mount in situ ハイブリダイゼーションを行い、カスパーゼ3の発現を調べた。カスパーゼ3のmRNAは後根神経節、三叉神経節を含む末梢神経系に強く発現がみられた(図15 a)。しかし、脳、脊髄などの中枢神経系における発現は比較的弱かった。これらのシグナルは、生体内のmRNAと結合するアンチセンス方向のRNAプローブによるハイブリダイゼーションでのみ検出された。(図15 b) マウス胚の切片上でのin situ ハイブリダイゼーションの結果、カスパーゼ3のmRNAは顔面神経節(図15 c)と後根神経節(図15 d)に強く発現がみられた。これらのシグナルは、生体内のmRNAと結合するアンチセンス方向のプローブでのみ検出された(図15 e)。しかし、カスパーゼ7の強いシグナルは神経系で観察されなかった。

2) 血清、NGF除去によるDRGニューロンへのアポトーシス誘導とカスパーゼ3様酵素活性の検出

in situ ハイブリダイゼーション法により、カスパーゼ3 mRNAの発現が強くみられたDRGから神経細胞を調製した。血清とNGFを除去することによりアポトーシスを誘導し、神経細胞死へのカスパーゼ3の関与を調べた。

カスパーゼ3様酵素活性は時間経過とともに増大し、それに伴ってDNA断片化が検出された。しかし、カスパーゼ1様酵素活性は変化しなかった(図16 a)。また、血清とNGF除去によるカスパーゼ3様酵素活性の増大は、カスパーゼ3様酵素の阻害剤であるAc-DEVD-CHOによって抑制された。しかし、カスパーゼ1様酵素の阻害剤であるAc-YVAD-CHOでは抑制されなかった(図16 b)。DNA断片化も同様に、Ac-DEVD-CHOによって抑制されたが、Ac-YVAD-CHOでは抑制されなかった(図16 c)。これらの結果から、DRGの細胞死においてカスパーゼ1様酵素よりも、むしろ、カスパーゼ3様酵素の方が深く関与していることが示唆された。

3. 考察

(1) レチノイン酸によるP19 EC 細胞の神経分化過程における細胞死
本研究では、神経細胞分化のモデル系であるレチノイン酸によるP19 EC 細胞の神経分化の系を用いて、神経分化過程に発生するアポトーシスの分子機構について詳細な検討をした。

レチノイン酸はビタミンAの類縁体であるレチノイドの1種で、光学異性体として全トランスレチノイン酸とシス-レチノイン酸が存在する。レチノイン酸の核内レセプターは、RAR (retinoic acid receptor), RXR (retinoid x receptor) の2種類が存在し、RAR には、全トランス、9-シス-レチノイン酸がともに結合するが、RXR には9-シス-レチノイン酸のみが結合する。レチノイン酸レセプターは転写因子として働き、RAR-RXR またはRXR-RXR といった2量体を形成して、それぞれ特定の応答配列に結合して遺伝子の発現を制御する。

レチノイン酸は、P19 EC 細胞の神経分化に関連するさまざまな遺伝子の発現を制御することにより、神経分化を誘導していることが考えられるが、実際にどの遺伝子の発現を制御することにより神経細胞分化を制御しているか否かは明らかでない。また、P19EC細胞の場合、成熟した神経細胞へ分化するには単にレチノイン酸処理するだけでなく、凝集状態での培養過程が必要である。よって、凝集過程においても、細胞表面の接触によるシグナル伝達など神経分化に関わるなんらかの分子機構が働いているものと思われる。例えば、ショウジョウバエにおけるNotch は、神経分化した細胞に発現し細胞間相互作用により周囲の隣接した細胞に対して側方抑制を行うが、P19EC 細胞の神経分化過程において、Notch の哺乳類相同遺伝子が働いているとの報告もある (Nye et al., 1994)。このように、凝集過程のP19EC細胞のにおいて細胞間相互作用により機能するなんらかの因子が働いている可能性がある。

一方、神経分化過程におけるP19EC 細胞のアポトーシスについては、G1期からS期への細胞周期の移行との関与が指摘されている。Slack らは、Rb ファミリーに結合する変異型 E1A をP19 EC 細胞に強発現することで、神経分化に伴う細胞死が誘導されることを報告している (Slack et al., 1995)。また、Ninomiya らは、レチノイン酸による神経分化過程のP19EC 細胞において、

G1からS期に移行するときに細胞死が起きているとの報告をしている (Ninomiya et al., 1997)。

本研究の結果、P19 EC 細胞の細胞死の実行にカスパーゼ3様酵素が重大な関与をしていることがわかった。全トランスレチノイン酸だけでなく、神経分化誘導能をもつ9シスレチノイン酸によってもP19 EC 細胞にアポトーシスおよびカスパーゼ3様酵素の活性化がもたらされた。しかし、神経分化誘導能をもたないレチノールでは細胞死は誘導されなかった(図5)。

また、P19EC細胞が成熟した神経細胞へ分化するのに必要な凝集状態での培養過程を経ずとも、レチノイン酸処理のみでわずかではあるがカスパーゼ3様酵素は活性化され細胞死が生じた(図5)。P19 EC 細胞は、レチノイン酸処理単独で細胞増殖が抑制され、神経細胞の前駆体であるネスチン陽性の神経上皮細胞の段階に分化する。よって、カスパーゼ3様酵素の活性化や細胞死の誘導は神経上皮細胞へと分化する時点から生じており、この細胞死は神経上皮細胞への分化と関連して発生していることが示唆される。

bFGFによってアポトーシスおよびカスパーゼ3様酵素の活性化を抑制しても、P19EC細胞は神経細胞へと分化した(図14)ことから、アポトーシスは神経分化にとって必ずしも必須の過程ではないものと思われる。

P19 EC 細胞は、レチノイン酸処理を行うだけでなく、加えて細胞凝集状態におくことで、カスパーゼ3様活性やDNA断片化が飛躍的に増大した(図5)。よって、レチノイン酸処理により神経上皮細胞へと分化したP19 EC 細胞においては、その生存維持に細胞接着によるシグナルが重要となっていることが考えられる。上皮細胞や内皮細胞においては、細胞外基質への接着からインテグリン→FAK→Akt→BAD, といったリン酸化の生存シグナルが働いており、細胞外基質への接着を失うことでアポトーシスが誘導されるanoikisという現象が知られている(Meredith et al., 1993; Frisch et al., 1994)。ECM→インテグリンのシグナルはbFGF, NGFなどの液性因子の生存シグナルにより置き換えることが可能であり、bFGF, NGFなどの液性因子も、その受容体からPI3K→Akt→BADのリン酸化の経路を使って細胞の生存に働く。

本研究では、Bcl-xLやPI3Kの活性化能をもつbFGFがカスパーゼ3の活性化を抑制することにより、レチノイン酸によるP19 EC 細胞の神経分化過程で

の細胞死を抑制していることを明らかにした。こうした結果から、レチノイン酸処理されたP19 EC細胞は、ECMからの生存シグナルに強く依存する神経上皮細胞へと分化したことにより、ECMからの生存シグナルが欠除した非付着性の凝集状態におくことで、顕著なカスパーゼ3様酵素の活性化と細胞死をおこすものと考えることができる。bFGFによるPI3K / Aktの活性化は、Bcl-xLを介してカスパーゼ3の活性化を抑制することで細胞死を抑制し、また、WortmaninnはPI3K / Aktの活性を抑制することによりカスパーゼ3の活性化を促進するものと思われる。

以上のことから、レチノイン酸によるP19 EC細胞の神経分化過程におけるアポトーシスの誘導には、

- 1)レチノイン酸による神経（上皮）細胞への分化あるいは増殖抑制に伴うアポトーシス
 - 2)分化した神経上皮細胞が細胞接着を失うことによるアポトーシス
- といった2つのプロセスが存在していることが考えられる。

(2) マウス発生過程におけるカスパーゼ3の発現

発生過程において、神経細胞はnaturally occurring neuronal deathと呼ばれるアポトーシスによって大半が消失することが知られている。この細胞死の調節機構として、神経生存因子による神経細胞の生存維持が提唱されてきた。十分な神経生存因子を受け取ることのできなかつた神経細胞にはアポトーシスが誘導されると考えられている。in vitroにおける血清やNGFの除去によるDRGニューロンの神経細胞死には、カスパーゼファミリーの関与が示唆されてきた。

本研究の結果、カスパーゼ3のmRNA発現は、E10.5のマウス胚において顔面神経節、後根神経節、をはじめとする末梢神経系に強くみられた（図15a, c, d）。そして、DRGニューロンにおいて、血清、NGF除去による神経細胞死に伴いカスパーゼ3様酵素の活性化がみられた。これらは、カスパーゼ3様酵素の阻害剤であるAc-DEVD-CHOによって抑制された。これらの結果から、DRGニューロンの神経細胞死の分子機構にカスパーゼ3様酵素が関与していることが明らかになった（図16）。

しかし、カスパーゼは不活性な前駆体（プロカスパーゼ）としてつくられ、

上位のカスパーゼや他の因子などによってプロセッシングされることで初めて活性をもつ。したがって、mRNAが発現していてもその部位で必ずしもカスパーゼが活性化しているとはいえない。Kouroku, Uraseらは活性型カスパーゼ3に対する特異的抗体とTUNEL法を用いてマウス神経系発達過程におけるアポトーシスとカスパーゼ3の活性化の関係を調べている。その結果によると、後根神経節および三叉神経節での、カスパーゼ3の活性化および細胞死はmRNAの発現より遅れて検出されている。そして、カスパーゼ3の活性化とプログラム細胞死は一致して起こっていることを報告している(Kouroku et al., 1998)。また、最近Uraseらは、Bcl-xL欠損マウスでの神経細胞死を活性型カスパーゼ3に対する特異的抗体を用いて解析することにより、線虫でのced3とced9の関係がマウス神経細胞のプログラム細胞死において、カスパーゼとBcl-xLの関係として保存されていることを明らかにしている(Urase et al., 1998)。したがって、こうした生体におけるカスパーゼの作動をみるには、カスパーゼのmRNAの検出に加えて活性型カスパーゼの特異的認識抗体の併用が重要であるといえる。

一方、近年では、各種ニューロトロフィックファクターやそのレセプター、カスパーゼファミリーやBcl-2ファミリーのノックアウトマウスが次々と作製され、これらの遺伝子の働きが個体レベルで解析され明らかになりつつある。

ニューロトロフィックファクターであるNGF, NT-3, BDNFや、そのレセプターTrkA, B, Cのノックアウトマウスでは、後根神経節や三叉神経核などの末梢神経細胞に細胞死がみられており、これらの因子が神経細胞の生存に必要なことが明らかにされている(Snider et al., 1994)。

カスパーゼファミリーについては、カスパーゼ1のノックアウトマウスでは、顕著な神経細胞死の変化をみせなかったが(Kuida et al., 1995)、カスパーゼ3のノックアウトマウスは脳などの中枢神経系に、細胞死の減少による顕著な異常をみせている(Kuida et al., 1996)。本研究においても、DRGニューロンの神経細胞死に伴いカスパーゼ1様酵素の活性化はみられず、また、カスパーゼ1様酵素の阻害剤によって神経細胞死やカスパーゼ3様酵素の抑制もみられなかったことから、神経細胞死において、カスパーゼ1はカスパーゼ3ほど重大な関与はしていないように思われる。

第4章 カスパーゼファミリーの活性化断片特異的抗体の 作製とそれらを用いた筋変性疾患，神経変性疾患 におけるアポトーシスの解析

1. 序論

カスパーゼファミリーは，アポトーシスの実行過程において中心的な役割を果たしているプロテアーゼであり，哺乳類においては，12種類以上の分子種から構成されていることがわかっている。カスパーゼファミリーは活性の低い不活性型の前駆体として生合成され（Thornberry et al., 1998），数カ所を切断されて活性型となり機能を持つ。したがって，生体内でのカスパーゼの活性化をみるには，カスパーゼの mRNA の発現や蛋白質の発現をみるだけでは不十分であるといえる。

また，カスパーゼファミリーには，アポトーシス誘導時には，上位のカスパーゼが，下位のカスパーゼをプロセッシングして活性化していくカスパーゼカスケードが機能する（Cohen, 1997）。したがって，アポトーシスの過程において活性化するカスパーゼの分子種を明らかにすることは，アポトーシス実行の分子機構を理解するうえで非常に重要である。カスパーゼの活性化の検出方法としては標識合成ペプチド基質を用いた酵素活性の測定が広く行われている。しかし，新規のカスパーゼが発見されることで，同一の基質を分解する複数のカスパーゼが存在することが明らかになってきた。例えば，合成基質 Ac-DEVD-MCAの場合，カスパーゼ3だけでなくカスパーゼ7によっても分解される。よって，合成基質を用いた酵素活性の測定だけでは，特定のカスパーゼの活性化を検出するのは難しい。また，培養細胞系における薬剤などによるアポトーシス誘導とは異なり，生体の組織内におけるアポトーシスは細胞全体に一樣に起こるのではなく，ごく一部の細胞のみに散発的に起こり，死細胞は速やかに消滅してしまうことが多い。したがって，カスパーゼの活性化も少数の細胞において，比較的短時間発生することが考えられる。このような場合において，酵素活性の測定やイムノブロットによる活性型断片の検出は難しいといえる。

Saido, Ohmi らは、フォドリンおよびカルパインの切断部位に対するペプチド抗体を作製し、組織特異的なプロテアーゼの活性化を検出した (Saido et al., 1993; Kikuchi et al., 1995)。Kouroku らは、活性型のカスパーゼ3を特異的に認識する抗活性型抗体を作製し、免疫染色によりマウス発達過程におけるカスパーゼ3の活性化を調べている (Kouroku et al., 1998)。これは、活性化して切断されたカスパーゼ3大サブユニットのC端側5アミノ酸を抗原として、抗体を作製したものである。

この抗体作製法を応用してカスパーゼカスケードの上位に位置するカスパーゼ8, 9の切断点特異的な抗体を作製した。カスパーゼ9は、さまざまな刺激によりミトコンドリアから流失したチトクロームcにより、活性化されたApaf-1と結合することによって、自己切断し活性化して下位のカスパーゼ3などを活性化する。一方、カスパーゼ8は細胞外からのdeath signalによって活性化し、下位のカスパーゼを活性化することが知られている。さらに、Bidを介してミトコンドリアからチトクロームcの放出を誘導することから、カスパーゼ9の上流から作用していることも考えられている (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Gross et al., 1999)。

本研究では、これらのカスパーゼに対する活性型特異的抗体を用いて、筋肉、神経の変性疾患における細胞死において、カスパーゼファミリーの活性化機構について検討した。

筋肉、神経の変性疾患における細胞死は、長い間原因不明の細胞の壊死とされてきた。しかし、近年になってこれらの細胞死がアポトーシス様式の細胞死であることが明らかとなった。

筋ジストロフィーは筋線維の壊死、再生を主病変とする筋疾患の総称である。この筋ジストロフィーにおける筋細胞の死が、DNAの断片化を伴うアポトーシスの様式をとった細胞死であることが明らかになってきている (Matsuda et al., 1995; Smith et al., 1995; Hack et al., 1998)。また、原因遺伝子の解明から、筋ジストロフィーの病態と筋細胞膜の異常との関連が強く示唆されている。筋細胞の基底膜の主要な構成成分であるメロシンが、筋細胞の生存維持に深く関わっていることが報告されている (Vachon et al., 1996)。メロシンはM鎖をもつラミニンファミリーの1種である。ラミニンは筋細胞膜上からのジ

ストログリカンと結合してジストロフィンを介してアクチン線維を維持するとともに、インテグリン $\alpha 7 \beta 1$ と結合してFAK \rightarrow Akt \rightarrow Badのリン酸化を介して筋細胞の生存に関与していると考えられている。非福山型先天性筋ジストロフィーにはメロシン欠損が報告されている (Helbling-Leclerc et al., 1995)。メロシンを欠損し常染色体劣性遺伝のジストロフィー症を示す dy / dy マウスは、先天性筋ジストロフィーのモデルマウスとして知られている (Sunada et al., 1994)。メロシン欠損から筋細胞死に至る分子機構は明らかではないが、このような背景から anoikis 様の細胞死との関連が示唆される。

近年になって、CAGリピートの伸張を原因遺伝子にもつ遺伝性神経変性疾患の患者の神経細胞では、核内に凝集物の蓄積が観察される (DiFiglia et al., 1997; Paulson et al., 1997) ことが報告されている。原因遺伝子産物そのものは核内に蓄積しないが、プロセッシング産物であるポリグルタミン領域を含むペプチドは核内に凝集し、細胞死を誘導することが知られている (Ikeda et al., 1996)。垣塚らは、これら遺伝性神経変性疾患が核内でのポリグルタミンの蓄積が原因とであるとの仮説を提唱するとともに、これら疾患を総称してポリグルタミン病と呼ぶことを提唱している。

今年になり、核内で凝集したポリグルタミンがカスパーゼ8などを活性化して神経細胞死をもたらすことが報告された (Sanchez et al., 1999; Miyashita et al., 1999)。また、アルツハイマー病においても、カスパーゼの関与が示唆されている (Barnes et al., 1998; Gervais et al., 1999; Pellegrini et al., 1999; LeBlanc et al., 1999; Uetsuki et al., 1999)。

2. 結果

1. 先天性筋ジストロフィーマウス (dy/dy) 骨格筋におけるカスパーゼ 3, 9の活性化

1) RT-PCR による筋細胞における細胞死関連遺伝子の発現

未分化中胚葉細胞株 10T/2 とマウス筋芽細胞株C2C12 細胞を用いてカスパーゼとbcl-2 ファミリー, apaf-1の発現をRT-PCR で調べた。10T/2, C2C12ともに, カスパーゼファミリーは, 3, 6, 7, 8, 9, 12, の発現がみられ特にカスパーゼ 12 の発現が強くみられた。bcl-2 ファミリーについては, bcl-x, bax, bak の発現がみられたが, bcl-2, bad の発現はわずかであった。また, apaf-1 も10T/2 とC2C12で同様に発現していた (図 17)。

2) 生存因子除去による筋細胞死の誘導とカスパーゼ 3 様酵素の活性化

C2C12 細胞を生存因子を除いた状態に置き, 筋細胞死の誘導とカスパーゼ 3 様酵素の活性化を調べた。培養液から血清を除去 (-/-), 血清除去後に Wortmaninnを添加 (-/WT), 血清除去後に細胞接着性が低い状態に移行 (-/Agg), 血清除去後にWortmaninnを添加しさらに細胞接着性が低い状態に移行 (Agg / WT), の条件下でそれぞれ培養した。低接着性条件での培養には, 細胞接着性が低いバクテリア用培養皿を用いて行った。

血清除去後, 7時間ほどでカスパーゼ 3 様活性の上昇がみられ, 19時間後にはDNA 断片化もみられた (図 18)。血清除去に加えWortmaninnを添加することで顕著なカスパーゼ 3 様酵素の活性化とDNA断片化がみられた (-/WT)。さらに加えて, 細胞接着性が低い状態におくことでその効果は増強された (Agg / WT)。

3) 筋疾患モデルマウス骨格筋におけるカスパーゼ 3, 9の活性化とアポトーシス

2週齢のdy/dy マウス (メロシン欠損マウス) およびB6マウス (対照) の

骨格筋におけるカスパーゼ3, 9の活性化の関係を連続切片を用いた二重染色法により調べた。

抗活性化型カスパーゼ3抗体に陽性な筋線維はdy/dyマウスにみられたが(図19a), 対照のB6マウスではみられなかった(図19b)。dy/dyマウスでは1%以上の筋線維が陽性だった。また, dy/dyマウスで抗活性化型カスパーゼ3抗体に陽性な全ての筋線維は, 抗活性化型カスパーゼ9抗体にも陽性であった(図19c)。

よって, カスパーゼ9→カスパーゼ3といったカスパーゼ活性化のカスケードが作動していることが示唆された。

(図19)

dy/dyマウスの筋組織切片で, 抗活性化型カスパーゼ3抗体による免疫染色とTUNEL法の二重染色を行った(図20)。

dy/dyマウスではTUNEL陽性の筋線維において, 同時に抗活性化型カスパーゼ3抗体でも陽性のものがみられ, dy/dyマウスの骨格筋におけるアポトーシスにおいてカスパーゼ3の活性化が検出された(図20c)。しかしながら, TUNEL陰性だが抗活性化型カスパーゼ3抗体で陽性(図18b), TUNEL陽性だが抗活性化型カスパーゼ3抗体に陰性(図20d)の筋線維も存在した。

II. 神経変性疾患における神経細胞死とカスパーゼファミリーの関与

1) DRPLA患者ゲノムDNAにおけるCAGリピート伸長の検出

DRPLA患者および健常者各3名のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った結果, DRPLA患者のゲノムDNAでは, 60から70リピートものCAGリピートの伸長がみられた(図21A)。

pEGFP-Q72, Q11をCOSにトランスフェクションし, 抗GFP抗体によるイムノブロットで発現を調べた。アミノ酸配列から予測される分子量は, Q72が39 kDa, Q11が31 kDaだが, イムノブロットの結果, それぞれ46 kDaと37 kDaにバンドが検出された(図21B)。

2) ポリグルタミンの核内凝集とカスパーゼ8の活性化

pEGFP-Q72, Q11をP19EC細胞でそれぞれ過剰発現させた。pEGFP-Q72は核内で凝集体を形成していたが、-Q11では凝集体の形成はみられなかった(図22)。

抗カスパーゼ8活性型抗体を用いてポリグルタミンの核内凝集とカスパーゼ8の活性化を調べたところ、pEGFP-Q72の核内凝集体と一致してカスパーゼ8の活性化がみられた。細胞質においては、カスパーゼ8の活性化はみられなかった。

一方、-Q11では凝集体を形成せずカスパーゼ8の活性化もみられなかった。(図22)

3. 考察

(1) dy/dy マウス筋線維にみられるカスパーゼ3, 9の活性化と細胞死の解析

本研究では、メロシン欠損マウス(dy/dyマウス)の骨格筋線維においてTUNEL法によるアポトーシスの検出と、活性型カスパーゼ3, 9に対する特異的認識抗体を用いてカスパーゼ3, 9の活性化の検出を行った。

本研究の結果、メロシン欠損マウス(dy/dyマウス)の筋線維において、カスパーゼ3の活性化を伴うアポトーシス(DNA断片化)が検出された。また、カスパーゼ9, 3の活性化が同一の筋線維で検出されたことから、カスパーゼ9 → カスパーゼ3といったカスパーゼ活性化のカスケードが作動していることが明らかになった。ラミニン/インテグリンからのリン酸化のシグナルはBadをリン酸化することで、Bcl-xLのホモダイマー形成を促し、カスパーゼの抑制に働く機能的な状態にする。dy/dyマウスでは、メロシンからの生存シグナルを欠損しているためBcl-xLの働きが抑えられ、そのために、カスパーゼ9活性化の抑制が弱くなっており、カスパーゼ9 → カスパーゼ3の活性化カスケードが作動しやすくなっているものと考えられる。

カスパーゼ3の活性化とアポトーシスの検出においては、同一筋線維において、TUNEL陰性だが抗活性型カスパーゼ3抗体で陽性(図20b)、TUNEL陽性だが抗活性型カスパーゼ3抗体に陰性(図20d)の筋線維も存在もみられ

た。これは、異なる進行状況のアポトーシス像をとらえているものと考えられる。つまり、TUNEL 陰性だが抗活性型カスパーゼ 3 抗体で陽性 (図20b) の筋線維は、カスパーゼ 3 の活性化は生じているがDNA 断片化は進んでいないもの、TUNEL 陽性だが抗活性型カスパーゼ 3 抗体に陰性の筋線維 (図20d) は、カスパーゼ 3 の活性化のピークが過ぎてアポトーシスの終了に近いものと考えられる。また、カスパーゼ 3 の活性化が検出されない筋線維については、別のカスパーゼ活性化のカスケードが働いていることも考えられる。カスパーゼカスケードの下流に位置するカスパーゼとしては、3 以外にも 6, 7 などが知られており、また、マウスにおいて骨格筋ではカスパーゼ 3 よりもカスパーゼ12 が強く発現していることが知られており (Craen et al., 1997), 筋細胞死の実行に関与していることが推測される。

ところで、dy/dy マウスは、メロシンを欠損しているため全ての筋線維においてメロシン/インテグリンからの生存シグナルを欠如していることになる。それにもかかわらずTUNEL 陽性や、カスパーゼ 3 の活性化が全ての筋線維においてみられたわけではなかった。dy/dy マウスは、生後 2-3 週頃より後肢のひきずりと痙攣を発症し、進行性の筋力低下と筋萎縮を示し、生後 5-6 ヶ月以内に死亡する。したがって、同時に全ての筋線維が細胞死するわけではない。本実験で、TUNEL 陽性の筋線維の割合がそれほど多くなかったのは dy/dy マウスの発症の進行状況とも一致しているといえる。このように、全ての筋線維で同時に細胞死が起きないのは、細胞死を促進または抑制する因子の発現量が筋線維ごとに異なる可能性が考えられる。骨格筋線維は、種々の分類法により多くの生化学的性質の異なる筋線維タイプに分類される。さらに、筋線維タイプタイプの構成要素から、骨格筋は、おもに白筋 (速筋, fast muscle) と赤筋 (遅筋, slow muscle) に分けられる。したがって、筋線維ごとに細胞死関連遺伝子の発現量が異なるために、細胞死の誘導に対する耐性も異なり、筋細胞死の進行状況が違ってくることが推測される。

本研究の結果、カスパーゼの活性化が組織内の細胞全体に一様に起きるのではなく、ごく一部の細胞のみに散発的に起こるような現象に対して、抗活性型カスパーゼ抗体の使用によるカスパーゼ活性化細胞の検出が非常に有効であることが明らかとなった。現在、他の活性型カスパーゼを認識する抗体として、

カスパーゼカスケードの上位に位置するカスパーゼ8と、下位に属するカスパーゼ6の活性化を検出する抗体の作製に成功している。今後、筋細胞死において9 → 3以外にどのようなカスパーゼが活性化されるのか明らかにしていくつもりである。

(2) 神経変性疾患における神経細胞死とカスパーゼファミリーの関与

本研究では、活性化したカスパーゼ8を特異的に認識する抗体を用いた結果、カスパーゼ8はポリグルタミン凝集塊とともに核内でのみ活性化していることが明らかになった(図22)。

細胞質から核内への物質の移行には核膜孔を通過する必要がある。核膜孔はイオンのような低分子や分子量20-40kDa程度の小さな蛋白質は自由に通すが、大きな分子は(場合によっては小さな分子も)通ることができない。このような蛋白質の核膜孔の通過には、NLS配列(nuclear localization signal:核移行シグナル)をもつことが必要であり、ATPとGTPを消費するactive nuclear transportによって核内へ輸送される。しかし、カスパーゼ8や本研究で用いたEGFP融合ポリグルタミン遺伝子EGFP-Q72は、核移行シグナルをもっておらず、これらが核内へ移行するシステムは不明である。また、本研究の結果、カスパーゼ8が細胞質ではなく、ポリグルタミン凝集塊とともに核内でのみ活性化することが明らかになったが、この活性化のシステムについても不明である。

カスパーゼ8はDEDにより、細胞死シグナルの受容体Fasとアダプター分子FADDを介して複合体(death-inducing signaling complex:DISC)を形成し、このDISCのなかでカスパーゼ8は活性化される。近年、DISCの構成分子としてImaiらによって新規分子FLASH(FLICE-associated huge protein)がクローニングされた。細胞がdeath signalを受容していないときでもFLASHは、カスパーゼ8と結合した状態で存在している。また、FLASHは核外移行シグナル(NES)や核内移行シグナル(NLS)をもっている。したがってカスパーゼ8は、ポリグルタミン凝集塊とともにFLASHを介して核内へ移行し、オートプロセッシングにより活性化されて下位のカスパーゼを活性化していることも考えられる。実際に、Fasを介したアポトーシス誘導が、

active nuclear transport を阻害するWGA (wheat germ agglutinin ; 小麦胚凝集レクチン) によって抑制されるとの報告がある。(Yasuhara, 1997)
今後の研究において、カスパーゼの核内移行システムの解析や、核内でのカスパーゼ活性化機構の解析が必要になってくるものと思われる。

第5章 総括的考察

線虫において、細胞死の実行を支配する遺伝子 *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* が発見され、脊椎動物でのこれらホモログとしてシステインプロテアーゼであるカスパーゼファミリー、チトクロームcの結合蛋白質であるApaf-1とBcl-2ファミリーが同定された。*in vitro*や細胞レベルでは、三者の関係は進化的に保存されていることが、多くの研究から明らかとなっている。また、個体においても、カスパーゼ3, 9やApaf-1の欠損マウスで、脳での神経細胞死が抑制され、脳形成異常が見い出されおり、*bcl-x*欠損マウスでは後脳、末梢神経細胞での大量の細胞死が見られることから、神経系でのプログラム細胞死にこうした遺伝子の関与が明らかになっている。最近、浦瀬らはカスパーゼ3の活性化断片を特異的に認識する抗活性化型抗体を用いて、*bcl-x*の欠損マウスでの後脳、末梢神経細胞でカスパーゼ3の活性化が起こっていることを報告しており、*ced-9/Bcl-x*と*ced-3/カスパーゼ*の関係は進化的に保存されていることが明らかとなっている(Urase et al., 1998)。

しかしながら、哺乳類の発生過程の脳でプログラム細胞死の開始を指令する因子やシグナルについては、依然明らかでない。脳神経細胞のプログラム細胞死の指令するシグナルを研究するにあたり、発生過程における神経細胞分化と細胞死を実験系として用いることができれば、こうした研究の展開に大いに役立つはずである。われわれは、レチノイン酸により神経細胞分化し、その過程で細胞死するP19 EC細胞に注目し、その細胞死の機構を解析した。この細胞死を、
・レチノイン酸による神経上皮細胞への分化の細胞死、
・神経上皮細胞のAnoikisの細胞死、
としてとらえることができるのではないかというのが、われわれの結論である。Anoikisによって神経上皮細胞が脳でプログラム細胞死しているかについてはこれからの課題であるが、ECMやFGFファミリーなどの保護因子、それにBcl-2ファミリーが非特異的な細胞死を調節して、脳の

形態形成や機能に必要なプログラム細胞死を実行していることは明らかと思われる。

一方、レチノイン酸は単独で神経細胞を含む多くの細胞を分化誘導、増殖抑制するとともに細胞死を誘導することが知られており、とくに指間や菱脳でのプログラム細胞死に関与することが知られている (Zou et al., 1996)。レチノイン酸による神経上皮細胞分化で観察されるわずかな細胞死とカスパーゼ3の活性化は、生体内でのプログラム細胞死の指令因子としてレチノイン酸が関与している可能性を完全に否定するものではない。最近、藤田らはBMP-4は単独ではP19 EC細胞のカスパーゼの活性化や細胞死を誘導しないが、レチノイン酸と協調して付着性のP19 EC細胞の細胞死を、カスパーゼ9と3の活性化を介して促進することを明らかにしている (Fujita et al., 1999 in press)。このようにレチノイン酸は他の因子と協調することにより、発生過程における脳神経細胞のプログラム細胞死に関与している可能性が十分考えられる。

一方、ヒト筋変性疾患、神経変性疾患にみられる細胞死の機構については、その多くは不明であったが、最近、このような変性疾患の細胞死にも、カスパーゼの活性化が実行に関与しているとの報告がなされている。変性疾患では、プログラム細胞死と同様、実際の疾患部でどのカスパーゼの活性化がなされているかが、特に重要である。われわれは、カスパーゼの活性化に必須であるカスパーゼファミリー全メンバーの切断点を同定するとともに、切断点に対する特異抗体である活性化抗体を作製し、免疫染色法により生体内疾患部でのカスパーゼの活性化を同定しようと試みた。メロシン欠損の先天性筋ジストロフィーのモデルマウスであるdy/dyマウスの筋組織では抗活性化型カスパーゼ3, 9抗体陽性の筋線維が観察され、メロシン/インテグリンのシグナル欠損がカスパーゼ3, 9の活性化を誘導し、細胞死をもたらすことが明らかとなった。今後、カスパーゼの活性化を抑制する阻害剤や筋細胞生存因子による筋細胞死予防の治療法の開発が可能かもしれない。

また、こうした抗活性化型抗体は、細胞内でのカスパーゼ活性化の場所を特定するのに役立つ。CAGリピートの伸長を原因とするハンチントン舞踏病、DRPLAなどの神経変性疾患では、ポリグルタミンによる核内凝集が細胞死を誘導すると考えられてきたが (DiFiglia et al., 1997; Paulson et al., 1997),

今年になり、カスパーゼ8の活性化がポリグルタミンにより誘導されることが報告された (Sanchez et al., 1999; Miyashita et al., 1999) ものの、どのようにカスパーゼ8を活性化するか不明であった。われわれはカスパーゼ8の抗活性型抗体を作製し、カスパーゼ8がポリグルタミン凝集とともに核内で活性化されることを明らかにすることができた。この発見は今後、ポリグルタミンがどのように細胞質内のカスパーゼ8を核内で活性化させるかという問題を提起するとともに、こうしたCAGトリプレットリピート病の発症の分子機構解明と治療法の開発に大いに役立つものと思われる。このようにカスパーゼは発生過程でのプログラム細胞死のみならず、各種変性疾患においても細胞死の実行に関与していることが明らかとなった。

参考文献

- Arcaro, M., and Wymann, M.P. (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate in neutrophil responses. *Biochem. J.* 296, 297-301.
- Arends, M.J., Morris, R.G. and Whillie, A.H. (1990). Apoptosis The role of the endonuclease. *Am.J.Pathol.* 136 , 593-601.
- Barnes, N.Y., Li, L., Yoshikawa, K., Schwartz, L.M., Oppenheim, R.W., Milligan, D.W. (1998) Increased production of amyloid precursor protein provides a substrate for caspase-3 in dying motoneurons. *J Neurosci.* 18, 5869-5880.
- Blaschke, A.J., Staley, K., and Chun, J. (1996) Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development*, 122, 1165-1174.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254.
- Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B.I., Roth, K.A., and Gruss, P. (1998) Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94, 727-737.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain containing protein, and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.

Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Brid, C.C., Hooper, M.L. and Wyllie, A.H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362, 849-852.

Cohen, G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-16.

Conlon, R., and Herrman, B. (1993) Detection of messenger RNA by *in situ* hybridization to postimplantation embryo whole mounts. *Method in Enzymology.* 225, 373-383.

Craen, M.V., Vandenabeele, P., Declercq, W., Brande, I.V., Loo, G.V., Molemans, F., Schotte, P., Crielinge, W. V., Beyaert, R., and Fiers, W. (1997) Characterization of seven murine caspase family members. *FEBS Letters* 403, 61-69.

Darmon, A.J., Nicholson, D.W., and Bleackley, R.C. (1995) Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377, 446-448.

DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., and Aronin, N. (1997) Aggregation of Huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990-1993.

Dong, J., Naito, M., and Tsuruo, T. (1997) c-Myc plays a role in cellular susceptibility to death receptor-mediated and chemotherapy-induced apoptosis in human monocytic leukemia U937 cells. *Oncogene* 15, 639-647.

Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., and Greenberg, M.E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-665.

Ellis, H.M., Horovitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C.elegans*. *Cell* 44, 817-829.

Ellis, R.E., Jacobson, D.M. and Horovitz, H.R. (1991a). Genes required for engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 129, 79-94.

Ellis, R.E., Horovitz, H.R. (1991b). Two *C.elegans* gene control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development* 112, 591-603.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E.S. (1994). CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem*. 269, 30761-30764.

Ferrer, I., Serrano, T., and Soriano, E. (1990) Naturally occurring cell death in the subicular complex and hippocampus in the rat during development. *Neurosci Res*. 8, 60-66.

Frade, J.M., Rodriguez-Tebar, A., and Brade, Y.-A. (1996) Induction of

cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383, 166-168.

Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C., and Toker, A. (1997) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275, 665-668.

Frisch, S.M., and Francis, H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124, 619-626.

Fujita, E., Mukasa, T., Tsukahara, T., Arahata, K., Omura, S., Momoi, T. (1996) Enhancement of CPP32-like activity in the TNF-treated U937 cells by the proteasome inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 74-79.

Garcia, I., Martinou, I., Tsujimoto, Y., and Martinou, J-C. (1992) Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* 258, 302-304.

Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119, 493-501.

Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., Vaillancourt, J.P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M.S., Clarke, E.E., Zheng, H., Van Der Ploeg, L.H., Ruffolo, S.C., Thornberry, N.A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R.J., Roy, S., Nicholson. (1999) Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 97, 395-406

Graham, A., Koentges, G., and Lumsden, A. (1994) The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature* 372, 684-686.

Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliam, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S.J. (1999) Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release but tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 274, 1156-1163.

Hack, A.A., Ly, C.T., Jing, F., Clendenin, C.J., Sigrist, K.S., Wollmann, R.L., McNally, E.M. (1998) γ -Sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J. Cell Biol.* 142, 1279-1287.

Hedgcock, E.M., Sulston, J.E. and Thomson, J.N. (1983). Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220, 1277-1279.

Helbling-Leclerc, A., Zhang, X., Topaloglu, H., Cruaud, C., Tesson, F., Weissenbach, J., Tome, F.M., Schwartz, K., Fardeau, M., Tryggvason, K. and Guicheney, P. (1995) Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 11, 216-218.

Hengartner, M.O., Ellis, R.E. and Horvitz, H.R. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494-499.

Hengartner, M.O., and Horvitz, H.R. (1994) *C. elegans* cell survival gene

ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene bcl-2. Cell: 665-676.

Hoffman, E.P., Brown, Jr. R.H., and Kunkel, L.M. (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchene muscular dystrophy locus. Cell 51, 919-928.

Howe, H., Aplin, A.E., Alahari, S.K., and Juliano, R.L. (1998) Integrin signaling and cell growth control. Curr. Opin. Cell. Biol. 9, 701-706.

Howlett, A., Bailey, N., Damsky, C., Peterson, O., Bissell, M. (1995) Cellular growth and survival are mediated by $\beta 1$ integrins in normal human breast epithelium but not in breast carcinoma. J. Cell. Sci. 108, 1945-1957.

Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. Cell 81, 495-504.

Ikeda, H., Yamaguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S., and Kakizuka, A. (1996) Expanded polyglutamine in the Machad-Joseph disease protein induces cell death *in vitro* and *in vivo*. Nature. Genet. 13, 196-202.

Janicke, R.U., Walker, P.A., Lin, X.Y., and Porter, A.G. (1996) Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. EMBO J. 15, 6969-6978.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br.J.Cancer. 26, 239-257.

Kikuchi, H., and Imajoh-Ohmi, S. (1995) Activation and possible involvement of calpain, a calcium-activated cysteine protease, in down-regulation of apoptosis of human monoblast U937 cells. *Cell Death Different.* 2, 195-199.

King, R.W., Jackson, P.K., and Kirschner, M.W. (1994) Mitosis in transition. *Cell* 79, 563-571.

Kobayashi, O., Hyashi, Y., Arahata, K., Ozawa, E., and Nonaka, I. (1996) Congenital muscular dystrophy: Clinical and pathologic study of 50 patients with the classical (Occidental) merosin-positive form. *Neurology* 46, 815-818.

Korsching, S. (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J. Neurosci.* 13, 2739-2748.

Kouroku, Y., Urase, K., Fujita, E., Isahara, K., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Momoi, M.Y., Momoi, T. (1998) Detection activated caspase-3 by a cleavage site-directed antiserum during naturally occurring DRG neurons apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 247, 780-784.

Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S., and Flavell, R.A. (1995) Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267, 2000-2003

Kuida, K., Zheng, T.S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., Flavell, R.A. (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384, 368-372.

Kuida, K., Hayda, T.F., Kuan, C., Gu, Y., Yaya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., Flavell, R.A. (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase-9. *Cell* 94, 325-337.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

LeBlanc, A., Liu, H., Goodyer, C., Bergeron, C., Hammond, J. (1999) Caspase-6 role in apoptosis of human neurons, amyloidogenesis, and Alzheimer's disease. *J Biol Chem* . 274, 23426-23436

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

Lockshin, R.A., (1974). Programmed cell death. *Life Science* 15, 1548-1565.

Lowe, S.W., Schmit, E.M., Smith, S.M., Osborne, B.A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse

thymocytes. *Nature* 362, 849-852.

Marte, B.M., and Downward, J. (1997) PKB/Akt : connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. *Trends Biochem. Sci.* 22, 355-358.

Matsuda, R., Nishikawa, A., and Tanaka, H. (1995) Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J. Biochem.* 118, 959-964.

McBurney, M.W., Jones-Villeneuve, E.M.V., Edwards, M.K.S. and Anderson, P.J. (1982). Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* 299, 165-167.

McConkey, D.J., Orrenius, S., and Jondal, M. (1990). Cellular signalling in programmed cell death (apoptosis). *Imm. Today* 11, 120-121.

Mead, D.A., Pey, N.K., Herrstadt, C., Marcil, R.A. and Smith, L.M. (1991). A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Bio Technology* 9, 657-663.

Meredith, J.E.Jr., Schwartz, M. (1993) The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell.* 4, 953-961.

Milligan, C.E., Prevette, D., Yaginuma, H., Homma, S., Cardwell, C., Fritz, L.C., Tomaselli, K.J., Oppenheim, R.W., and Schwartz, L.M. (1995) Peptide inhibitors of the ICE protease family arrest programmed cell death of motoneurons in vivo and in vitro. *Neuron* 15, 385-393.

Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E.A. and Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C.elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*. 75, 653-660.

Miyagoe, Y., Hanaoka, K., Nonaka, I., Hayasaka, M., Nabeshima, Y., Arahata, K., Nabeshima, Y., Takeda, S. (1997) Laminin α 2 chain-null mutant mice by targeted disruption of the *Lama2* gene: a new model of merosin (laminin 2)-deficient congenital muscular dystrophy. *FEBS Lett*. 415, 33-39.

Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* 80, 293-299.

Miyashita, T., Matsui, J., Ohtsuka, Y., U, M, Fujishima, S., Okamura-Oho, Y., Inoue, T., and Yamada, S. (1999) Expression of extended polyglutamine sequentially activates initiator and effector caspases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 724-730.

Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K.-i, Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., Loh, D.Y. (1995) Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in *Bcl-x*-deficient mice. *Science* 267, 1506-1510.

Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., and Dixit, V.M. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.

Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Sawa, H., and Loh, D.Y. (1994). Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3700-3704.

Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, T-T., Yu, V.L. and Miller, D.K. (1995) Identification and inhibition of the ICE/Ced-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43.

Ninomiya, Y., Adams, R., Morriss-Kay, G.M., and Eto, K. (1997) Apoptotic cell death in neuronal differentiation of P19 EC cells: cell death follows reentry into S phase. *J. Cell Physiol.* 172, 25-35.

Nye, J.S., Kopan, R., and Axel, R. (1994) An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development* 120, 2421-2430.

Okazawa, H., Shimizu, J., Kamei, M., Imafuku, I., Hamada, H., and Kanazawa, I. (1996) Bcl-2 inhibits retinoic acid-induced apoptosis during the neural differentiation of embryonal stem cells. *J. Cell Biol.* 132, 955-968.

Oppenheim, R.V. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14, 453-501.

Paulson, H.L., Perez, M.K., Trottier, Y., Trojanowski, J.Q., Subramony, S.H., Das, S.S., Vig, P., Mandel, J.L., Fischbeck, K.H., and Pittman, R.N. (1997) Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in

spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19, 333-344.

Pellegrini, L., Passer, B.J., Tabaton, M., Ganjei, J.K., D'Adamio, L. (1999) Alternative, non-secretase processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein during apoptosis by caspase-6 and -8. *J Biol Chem.* 274, 21011-2016

Pennica, D., Nedwin, G.E., Hayflick, J.S., Seeburg, P.H., Derynck, R., Palladino, M.A., Kohr, W.J., Aggarwal, B.B., and Goeddel, D.V. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312, 724-729.

Perutz, M.F., Johnson, T., Suzuki, M., and Finch, J.T. (1994) Glutamine repeats as polar zipper: their possible role in inherited neurodegenerative disease. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5355-5385.

Pringent, P., Blanpied, C., Aten, J., and Hirsch, F. (1993) A safe and rapid method for analyzing apoptosis-induced fragmentation of DNA extracted from tissues or cultured cells. *J. Immunol. Methods* 160, 139-140.

Saido, T.C., Tsuchiya, T., Suzuki, K., and Kawashima, S. (1993) Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain. *Biol. Chem.* 268, 25239-25243.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharft, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.

Sambrook, D., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*

: A Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sanchez, I., Xu, C., Juo, P., Kakizaka, A., Blenis, J., and Yuan, J. (1999) Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 22, 623-633.

Saunders Jr, J.W. (1966). Death in embryonic systems. *Science* 154, 604-612.

Slack, R.S., Skerjanc, I.S., Lach, B., Craig, J., Jardine, K., and McBurney, M.W. (1995) Cells differentiating into neuroectoderm undergo apoptosis in the absence of functional retinoblastoma family proteins. *J. Cell Biol.* 129, 779-788.

Smith, J., Fowkes, G., and Schofield, P.N. Programmed cell death in dystrophic (mdx) muscle is inhibited by IGF-II. (1995) *Cell Death Differ.* 2, 243-251.

Snider, W. (1994) Function of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us. *Cell.* 77, 627-638.

Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.H., Kim, E., Seed, B. (1995). RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell* 81, 513-523.

Sunada, Y., Bernier, S.M., Kozak, C.A., Yamada, Y., Campbell, K.P. (1994) Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus. *J. Biol. Chem.* 269, 13729-13732.

Takahashi, Y., and Le Douarin, N. (1990) cDNA cloning of a quail homeobox gene and its expression in neural crest-derived mesenchyme and lateral plate mesoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87, 7482-7486.

Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H.W. and Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74, 845-853.

Thornberry, N.A., Bull, G.B., Calaycay, R.J., Chapman, T.K., Howard, D.A., Kostura, J.M., Miller, K.D., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J. (1992) . A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.

Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y.A. (1998) Caspases : Enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

Tidball, J.G., Albrecht, D.E., Locensgard, B.E., and Spencer, M.J. (1995) Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. *J.Cell .Sci.* 108, 2197-2204.

Tracey, K.J., Cerami, A. (1994) Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu.Rev.Med.* 45, 491-503.

Uetsuki, T., Takemoto, K., Nishimura, I., Okamoto, M., Niinobe, M., Momoi, T., Miura, M., Yoshikawa, K. (1999) Activation of neuronal caspase-3 by intracellular accumulation of wild-type Alzheimer amyloid precursor protein. *J Neurosci .* 19, 6955-664.

Urase, K., Fujita, E., Miho, Y., Kouroku, Y., Mukasa, T., Yagi, Y., Momoi, M.Y., and Momoi, T. (1998) Detection of activated caspase-3 (CPP32) in

the vertebrate nervous system during development by a cleavage site-directed antiserum. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 111, 77-87.

Vachon, P.H., Loechel, F., Xu, H., Wewer, U.M., Engvall, E. (1996) Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. *J. Cell. Biol.* 134, 1483-1497.

Vachon, P.H., Xu, H., Liu, L., Loechel, F., Hayashi, Y., Arahata, K., Reed, J.C., Wewer, U.M., Engvall, E. (1997) Integrins (alpha7beta1) in muscle function and survival. Disrupted expression in merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* 100, 1870-1881.

Van der zee, C.E., Ross, G.M., Riopelle, R.J., and Hagg, T. (1996) Survival of cholinergic forebrain neurons in developing p75NGFR-deficient mice. *Science* 274, 1729-1732.

Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229-240.

Vercammen, D., Brouckaert, G., Denecker, G., Van de Craen, M., Declercq, W., Fiers, W., Vandenabeele, P. (1998a) Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J. Exp. Med.* 188, 919-930.

Vercammen, D., Beyaert, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., Vandenabeele, P. (1998b) Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 187, 1477-1485.

Wilkinson, D.G. (1992) Whole mount in situ hybridization of vertebrate embryos. In *in situ hybridization: A Practical Approach* (ed. D.G. Wilkinson) Oxford IRL Press, NY, 75-83.

Xue, D., Shaham, S. and Horvitz, H.R. (1996) The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. *Genes. Dev.* 10, 1073-1083.

Yao, R. and Cooper, G.M. (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science*, 267, 2003-2006.

Yasuhara, N., Eguchi, Y., Tachibana, T., Imamoto, N., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y. (1997) Essential role of active nuclear transport in apoptosis. *Genes. Cells.* 2, 55-64.

山崎正利 (1995) . *臨床免疫.*, 27, 259-268.

Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. (1989). A cell-killing monoclonal antibody (anti Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 169, 1747-1756.

Yoshida, H., Kong, Y., Yoshida, R., Elia, A.J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J.M., Mak, T.W. (1998) Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell* 94, 739-750.

Yuan, J. Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horovitz, H.R. (1993) . The *C.elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to

mammalian Interleukin 1 β -converting enzyme. *Cell*, 75, 641-652.

Zhang, Z., Vouri, K., Reed, J., Rouslahti, E. (1995) The $\alpha 5 \beta 1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and upregulates bcl-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 6161-6165.

Zou, H., and Niswander, L. (1996) Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* 272, 738-741.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

論文リスト

- Mukasa, T., Momoi, T., and Momoi, M.Y. (1999) Activation of caspase-3 apoptotic pathways in skeletal muscle fibers in laminin alpha2-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 139-142.
- Miho, Y., Kouroku, Y., Fujita, E., Mukasa, T., Urase, K., Kasahara, T., Isoai, A., Momoi, M.Y., Momoi, T. (1999) bFGF inhibits the activation of caspase-3 and apoptosis of P19 embryonal carcinoma cells during neuronal differentiation. *Cell Death Differ.* 6, 463-470.
- Urase, K., Fujita, E., Miho, Y., Kouroku, Y., Mukasa, T., Yagi, Y., Momoi, M.Y., and Momoi, T. (1998) Detection of activated caspase-3 (CPP32) in the vertebrate nervous system during development by a cleavage site-directed antiserum. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 111, 77-87.
- Yamagata, T., Tsuru, T., Momoi, M.Y., Suwa, K., Nozaki, Y., Mukasa, T., Ohashi, H., Fukushima, Y., Momoi, T. (1997) Genome organization of human 48-kDa oligosaccharyltransferase (DDOST). *Genomics* 45, 535-540.
- Mukasa, T., Khoroku, Y., Tsukahara, T., Momoi, M.Y., Kimura, I., Momoi, T. (1997) Wortmannin enhances CPP32-like activity during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells induced by retinoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 192-197.
- Mukasa, T., Urase, K., Momoi, M.Y., Kimura, I., Momoi, T. (1997) Specific expression of CPP32 in sensory neurons of mouse embryos and activation of CPP32 in the apoptosis induced by a withdrawal of NGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 770-774.

- Urase, K., Mukasa, T., Igarashi, H., Ishii, Y., Yasugi, S., Momoi, M.Y., Momoi, T. (1996) Spatial expression of Sonic hedgehog in the lung epithelium during branching morphogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 161-166.

- Fujita, E., Mukasa, T., Tsukahara, T., Arahata, K., Omura, S., Momoi, T. (1996) Enhancement of CPP32-like activity in the TNF-treated U937 cells by the proteasome inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 74-79.

- Yamagata, T., Muroya, K., Mukasa, T., Igarashi, H., Momoi, M.Y., Tsukahara, T., Arahata, K., Kumagai, H., Momoi, T. (1995) Hepatocyte growth factor specifically expressed in microglia activated Ras in the neurons, similar to the action of neurotrophic factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 231-237.

- Yokota, C., Mukasa, T., Higashi, M., Odaka, A., Muroya, K., Uchiyama, H., Eto, Y., Asashima, M., Momoi, T. (1995) Activin induces the expression of the *Xenopus* homologue of sonic hedgehog during mesoderm formation in *Xenopus* explants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207, 1-7.

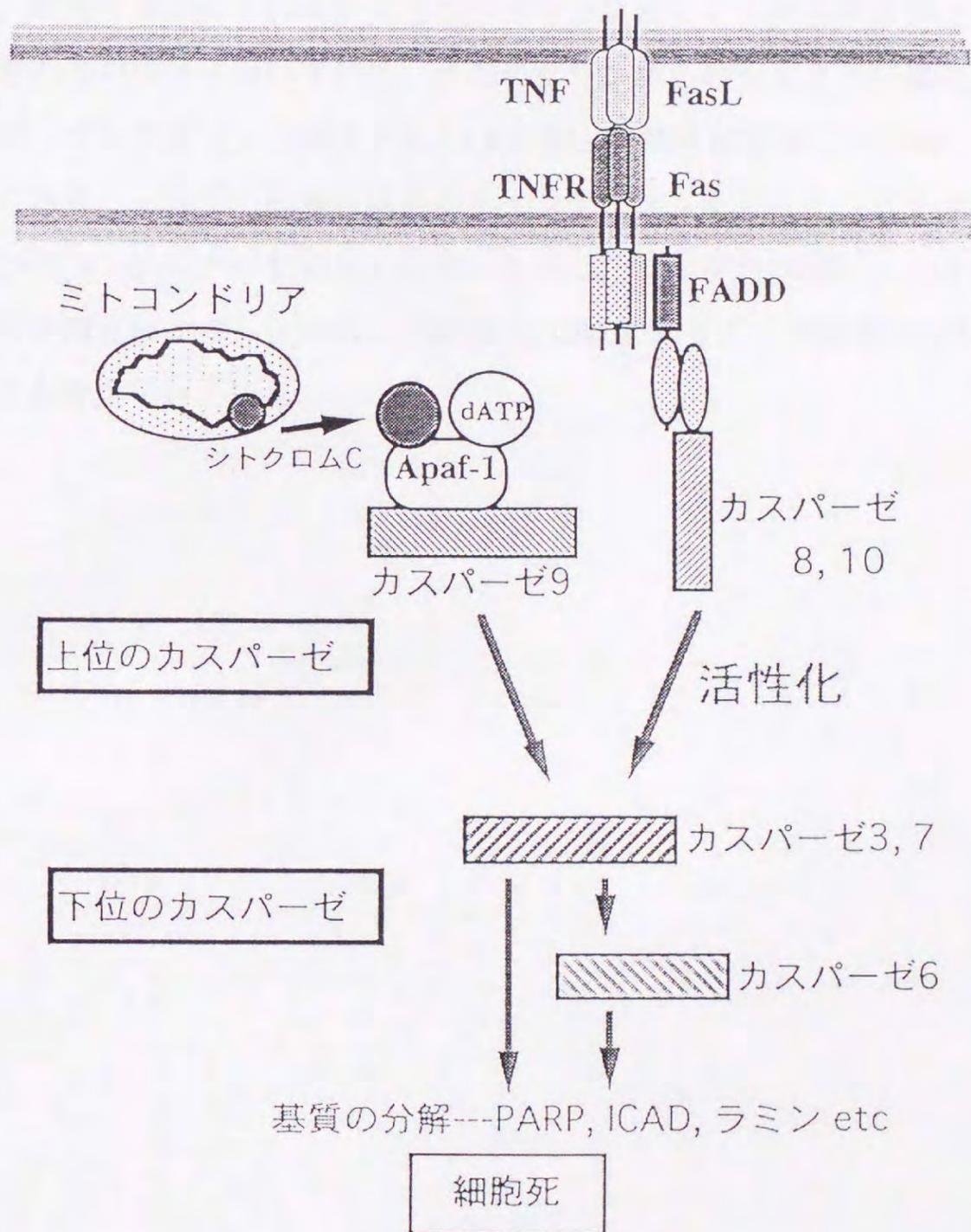
・ 図1

カスパーゼの活性化機構

アポトーシス誘導時には、上位のカスパーゼ、カスパーゼ8、9などが、下位のカスパーゼ3、6、7などを順次プロセッシングして活性化していくカスパーゼカスケードが機能する。下位のカスパーゼの基質としては、DNAの修復に関わるPARPや、DNA分解酵素CADの抑制因子ICADなど、さまざまな核や細胞質の蛋白質が知られている。

主要なカスパーゼの活性化機構としては、FasやTNFなどのdeathシグナルにより、上位のカスパーゼ8、10が活性化され、下位のカスパーゼを活性化する経路と、ミトコンドリアから放出されたシトクロムcがApaf-1、dATPと、カスパーゼ9に結合して活性化し、下位のカスパーゼを活性化する経路がある。

図 1



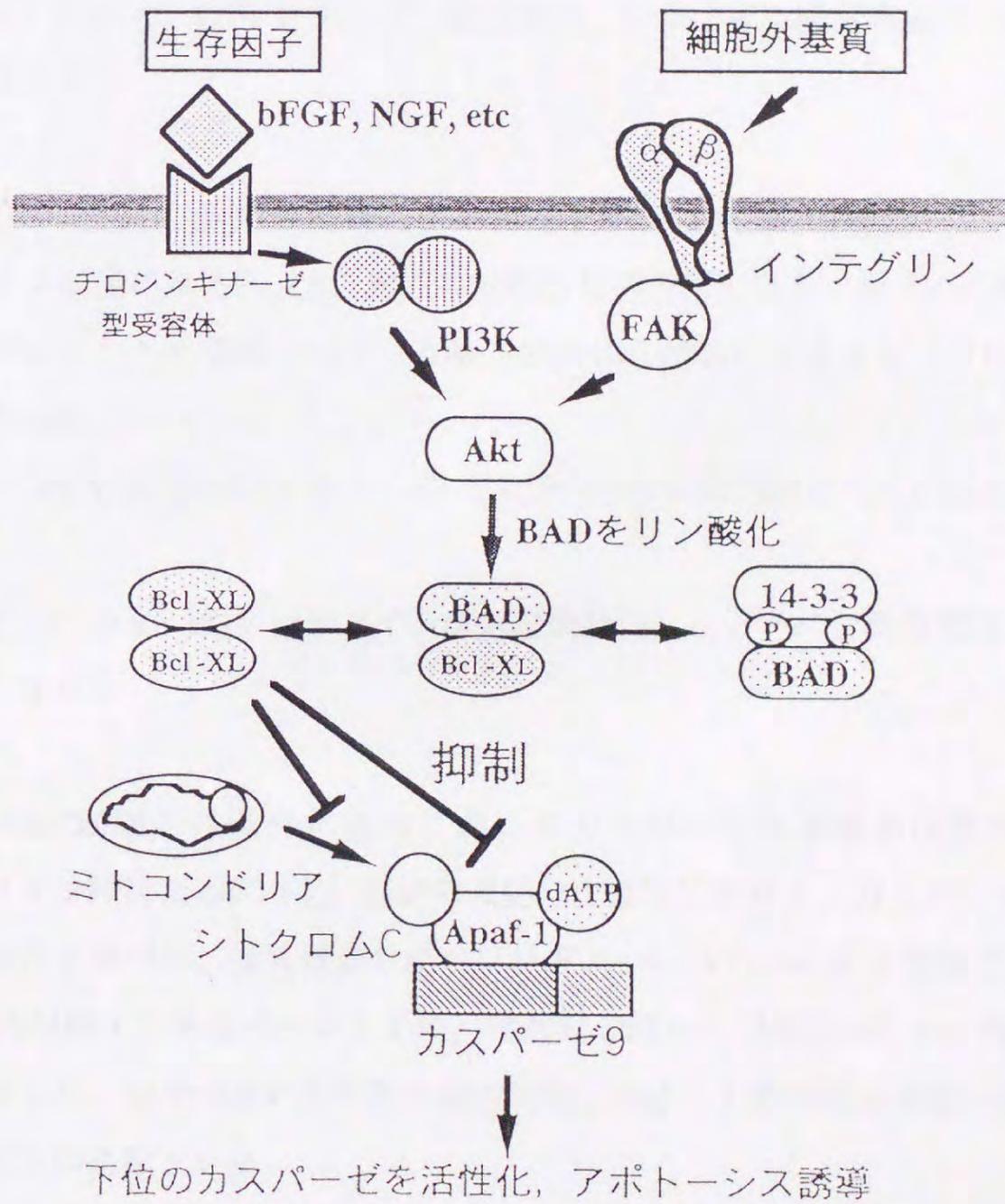
・ 図2

生存因子によるアポトーシスの抑制

FGFやNGFなどの各種増殖因子はアポトーシスを抑制して細胞の生存維持に働く。増殖因子のチロシンキナーゼ型レセプターに結合したPI3KはAktを活性化し、活性化Aktにより、Badがリン酸化される。リン酸化されたBadは14-3-3タンパクと強い親和性があるため、Bcl-xLと結合できなくなり、細胞死を抑制する活性をもつBcl-xLのホモダイマーの量が増え、結果として細胞の生存維持に働くと考えられている。

また、液性の増殖因子のほかにインテグリンなどによる細胞外基質との結合も、細胞の生存維持に働いている。インテグリンからのシグナル伝達の経路については、インテグリンに結合するFAKがAktを活性化することが明らかにされてきており、よって、細胞外基質からインテグリンを介したシグナルは、増殖因子のチロシンキナーゼ型レセプターを介したシグナル同様に、AktからBadのリン酸化により、Bcl-xLを機能的な状態におくことで細胞の生存に働いていると考えられている。

図 2



・ 図3

P19EC細胞の神経分化過程における細胞死とカスパーゼ3様酵素の活性化

A) P19EC細胞の神経分化過程におけるDNA断片化の検出

P19 EC 細胞を、神経分化誘導の条件である $1 \mu\text{M}$ の全トランスレチノイン酸存在下の細胞凝集状態で培養して、1日ごとに細胞を回収した。細胞からDNAを調製して、1.8%アガロースゲルで電気泳動し、アポトーシスの指標であるDNA断片化を検出した。

左より、P19 EC 細胞 レチノイン酸処理前、レチノイン酸処理後1日目、2日目、3日目

B) P19EC細胞の神経分化過程におけるPARPの切断の検出

レチノイン酸によるP19 EC 細胞の神経分化過程における、カスパーゼ3様プロテアーゼの天然基質PARPの切断を抗PARP抗体によるイムノプロットにより検出した。

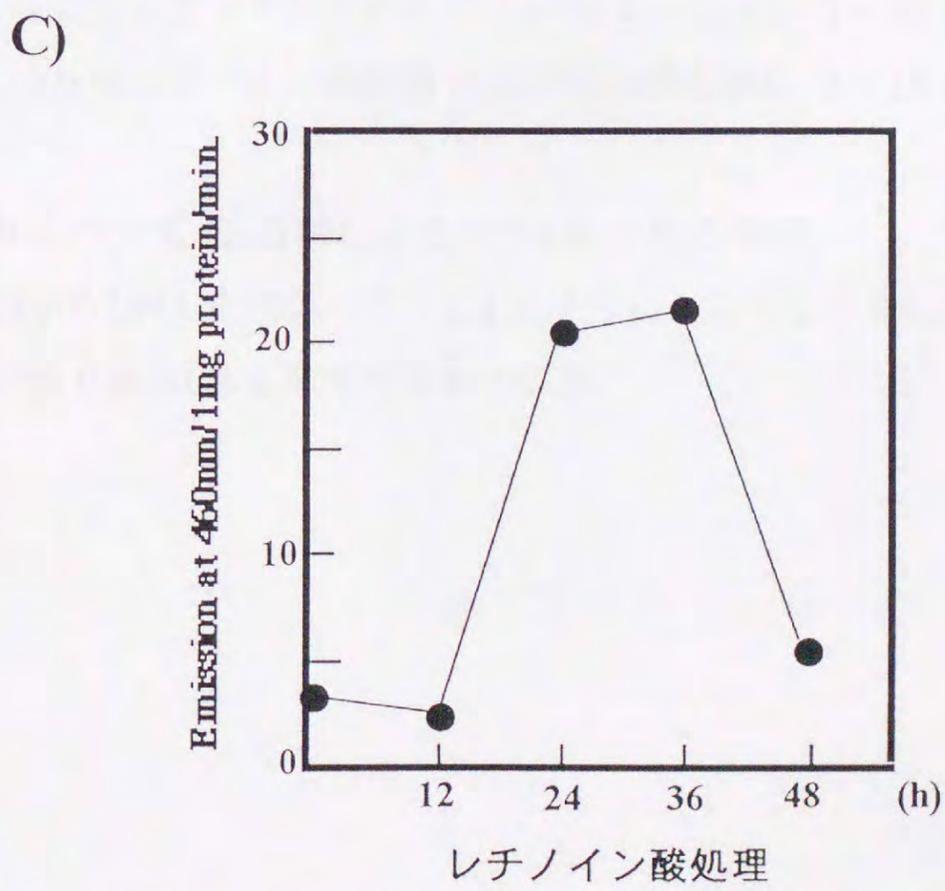
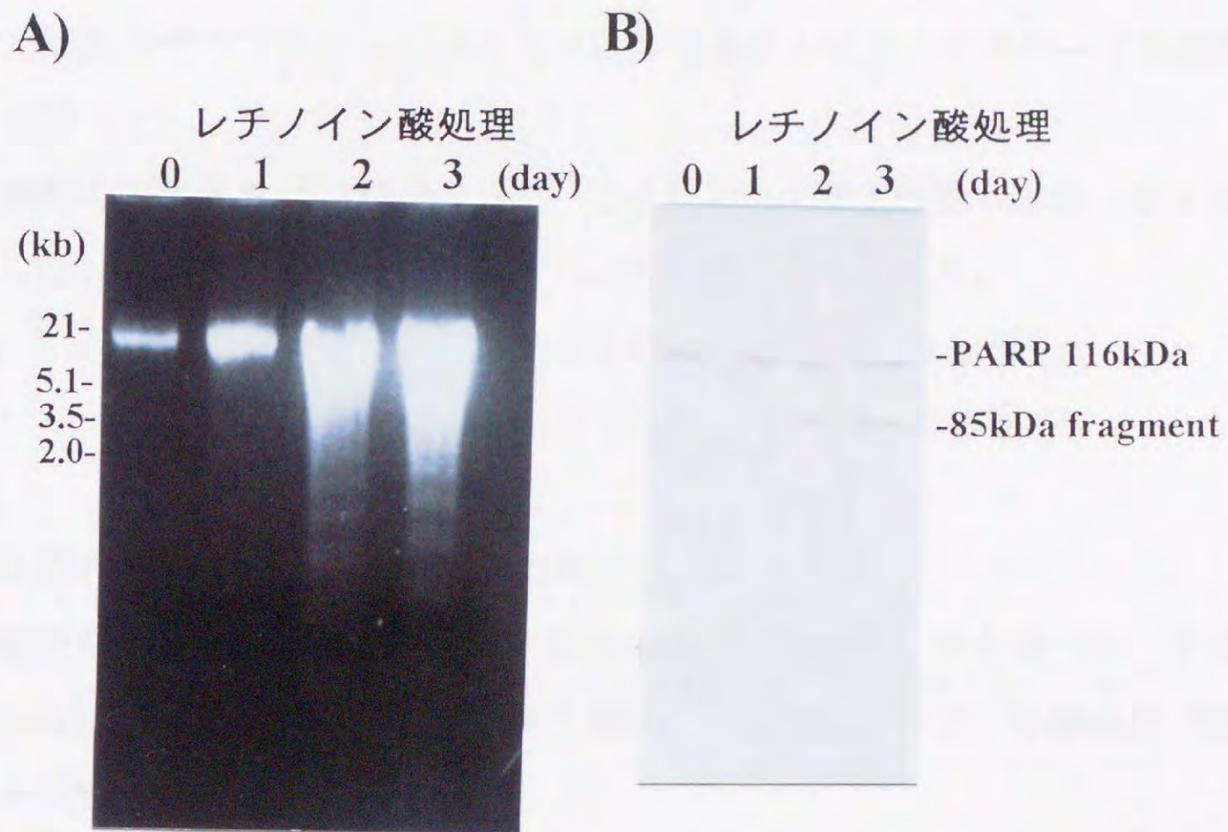
PARP 116 kDa はPARP 全長、85 kDa fragment は切断されたPARPの断片を示す。

左より、P19 EC 細胞 レチノイン酸処理開始前、レチノイン酸処理後1日目、2日目、3日目

C) P19EC細胞の神経分化過程におけるカスパーゼ3様酵素活性の検出

レチノイン酸によるP19 EC 細胞の神経分化過程における、カスパーゼ3様酵素の活性を調べた。蛍光標識合成ペプチド Ac-DEVD-MCA を基質として、 37°C で20分間インキュベートした後、励起光 380 nm で波長 460 nm の蛍光強度を測定した。蛍光強度の変化量を蛋白質量 1 mg 、1分間相当の値に換算して酵素活性の指標とした。

図 3



・ 図4

カスパーゼ阻害剤によるP19EC細胞のアポトーシスの抑制

1 μ M のレチノイン酸処理下のP19 EC 細胞におけるカスパーゼ3様酵素活性の上昇およびアポトーシスは、カスパーゼ阻害剤であるAc-DEVD-CHO, Ac-YVAD-CMKによって濃度依存的(1-10 μ M)に抑制された。

A) カスパーゼ阻害剤によるカスパーゼ3様酵素活性の抑制

蛍光標識合成ペプチド Ac-DEVD-MCA を基質として、カスパーゼ3様酵素活性を調べた。

蛍光強度の変化量を蛋白質量 1 mg, 1 分間相当の値に換算した後、阻害剤を添加しないサンプルの数値を100%として相対値を算出した。

- 1 μ Mレチノイン酸処理 + Ac-DEVD-CHO 1-10 μ M
- 1 μ Mレチノイン酸処理 + Ac-YVAD-CMK 1-10 μ M

B) カスパーゼ阻害剤による細胞死の抑制

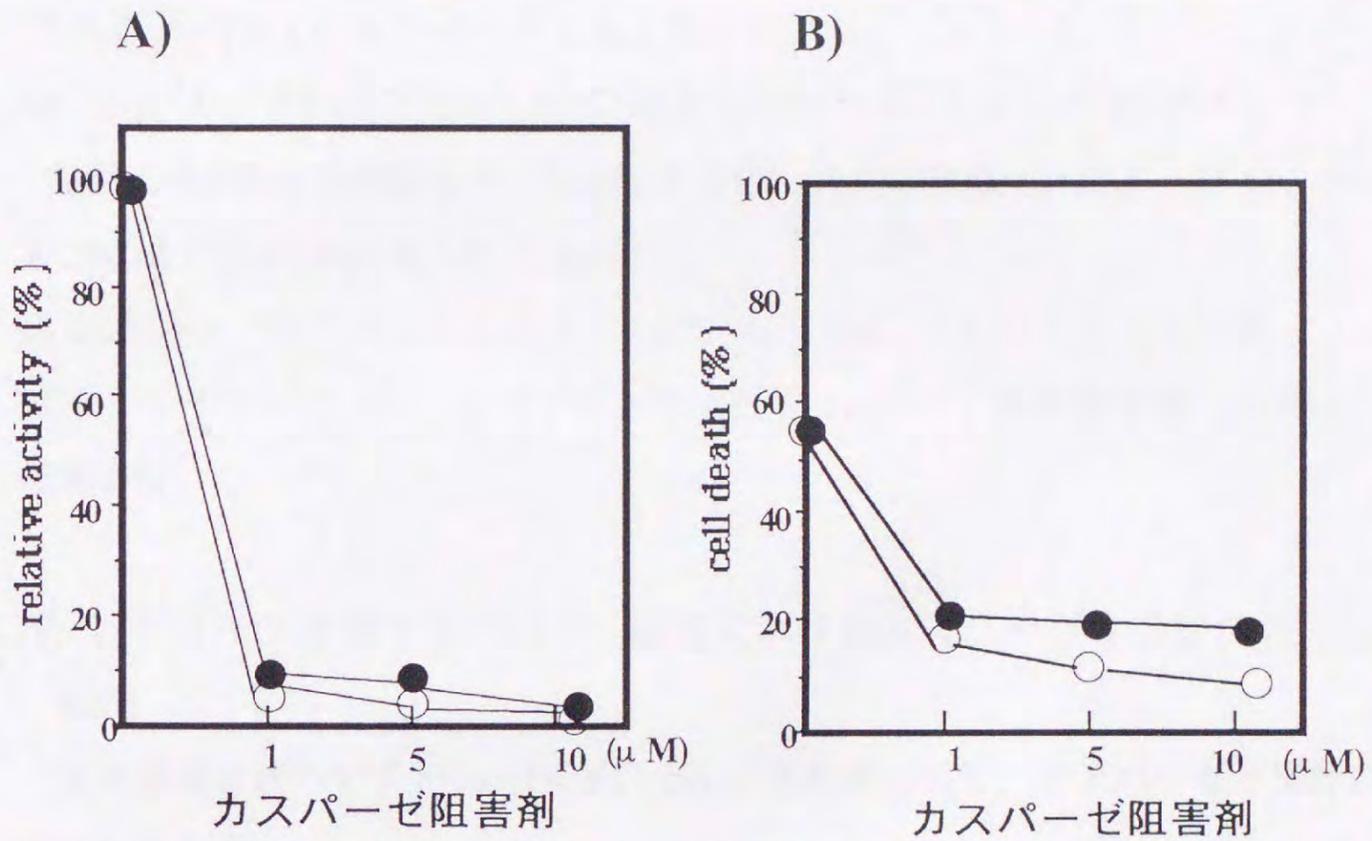
細胞を回収して、トリパンブルー染色により細胞の死亡率を調べた。染色されていない生細胞と青色に染色された死細胞の数を計測して、死細胞数/総細胞数から細胞の死亡率を算出した。

- 1 μ Mレチノイン酸処理 + Ac-DEVD-CHO 1-10 μ M
- 1 μ Mレチノイン酸処理 + Ac-YVAD-CMK 1-10 μ M

C) カスパーゼ阻害剤によるDNA断片化の抑制

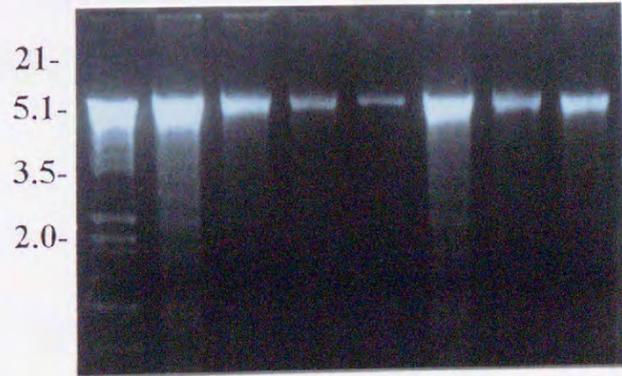
細胞からDNAを調製して、1.8%アガロースゲルで電気泳動し、アポトーシスの指標であるDNA断片化を検出した。

図 4



C)

AC-DEVD-CHO AC-YVAD-CMK
(kb) M 0 1 5 10 1 5 10 (μM)



・ 図5

レチノイド処理下のP19EC 細胞におけるDNA断片化および
カスパーゼ3様活性の検出

P19 EC 細胞を各種レチノイド誘導体 $1\mu\text{M}$ 存在下で、それぞれ細胞凝集状
態または非凝集状態で48時間まで培養した。12時間ごとに細胞を回収して
DNA断片化およびカスパーゼ3様活性を調べた。

A) レチノイド処理下のP19EC 細胞におけるDNA断片化の検出

細胞からDNAを調製して、1.8%アガロースゲルで電気泳動し、アポトーシ
スの指標であるDNA断片化を検出した。

all trans RA : 全トランスレチノイン酸, 9 cis RA : 9シスレチノイン酸,
ROH : レチノール, (-) : レチノイドで未処理, Agg(-) : 非凝集培養, Agg(+) :
凝集培養

B) レチノイド処理下のP19EC 細胞におけるカスパーゼ3様活性の
検出

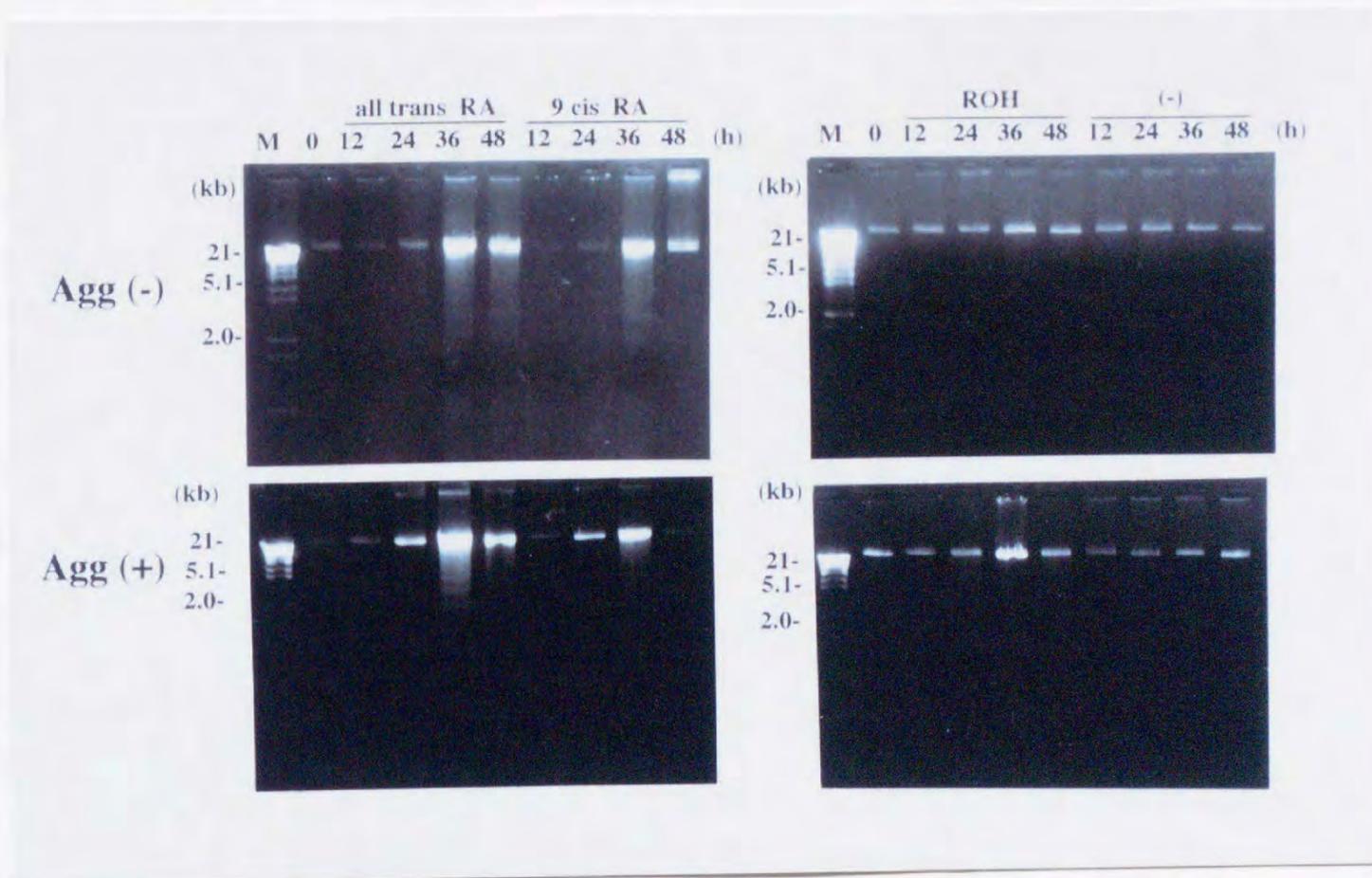
蛍光標識合成ペプチド Ac-DEVD-MCA を基質として、カスパーゼ3様酵素
活性を調べた。

蛍光強度の変化量を蛋白質量 1 mg, 1分間相当の値に換算して酵素活性の指
標とした。

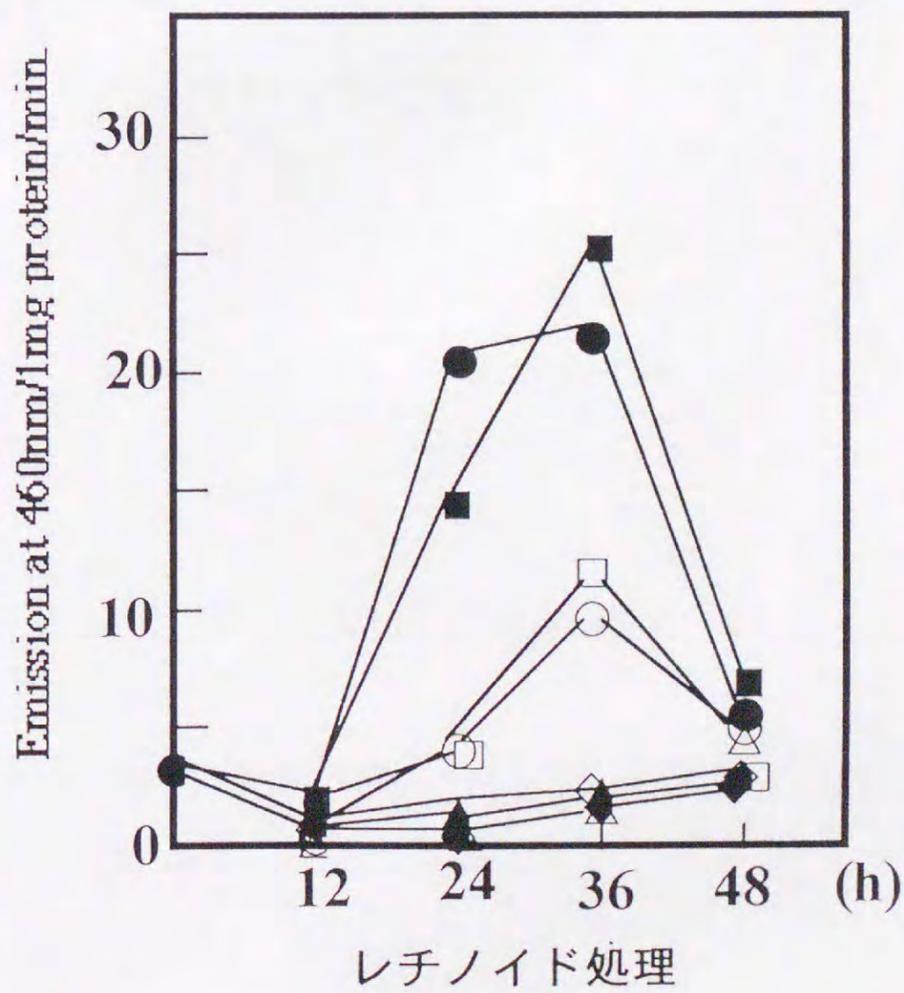
○全トランスレチノイン酸/非凝集培養, ●全トランスレチノイン酸/凝集培
養, □9シスレチノイン酸/非凝集培養, ■9シスレチノイン酸/凝集培養,
△レチノール/非凝集培養, ▲レチノール/凝集培養, ▼レチノイドで未処理
/凝集培養

図 5

A)



B)



・ 図6

レチノイン酸処理によるP19EC細胞の神経分化過程における
カスパーゼ3,7およびbcl-2の発現

P19 EC細胞を1 μ Mのレチノイン酸存在下の細胞凝集状態で48時間まで培養した。

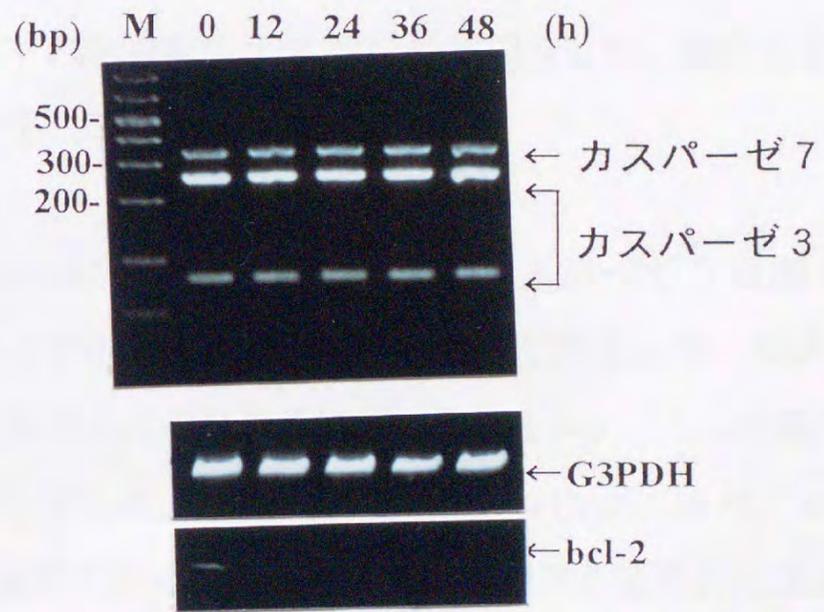
12時間ごとに細胞を回収してRNAを調製し、定量的RT-PCRによりカスパーゼ3,7およびbcl-2の発現量の変化を調べた。

2種類のカスパーゼ3様酵素, カスパーゼ3,7は両者に共通配列のプライマーを用いてRT-PCRを行った。マウスカスパーゼ3,7のPCR産物の塩基長はそれぞれ341bp, 349bpと近接しているため, カスパーゼ3のPCR産物をEcoRI処理することで分離した。

また, RNA量のコントロールとして, mG3PDHの発現をみた。

左より, M:分子量マーカー, P19 EC細胞レチノイン酸処理前, レチノイン酸処理後12-48時間

図 6



・ 図7

WortmanninによるP19EC 細胞のカスパーゼ3 様酵素活性と
アポトーシスの促進

A) Wortmannin によるP19EC 細胞のPI3K 活性の抑制

PI3Kの阻害剤 Wortmannin は, P19 EC 細胞において 10^2 nMでPI3K 活性を完全に抑制した。

ori : サンプル添加位置, PI3P : ホスファチジルイノシトール3リン酸

P19 EC 細胞を Wortmannin $1 - 10^3$ nM および, 1μ Mのレチノイン酸存在下または非存在下の細胞凝集状態で36 時間培養した。細胞を回収し, カスパーゼ3 様酵素活性, DNA 断片化を調べた。

B) WortmanninによるP19EC 細胞のカスパーゼ3 様酵素活性の増加

蛍光標識合成ペプチド Ac-DEVD-MCA を基質として, カスパーゼ3 様酵素活性を調べた。蛍光強度の変化量を蛋白質量 1 mg, 1 分間相当の値に換算して酵素活性の指標とした。 $10^2 - 10^3$ nMのWortmannin は, レチノイン酸存在下のP19 EC 細胞におけるカスパーゼ3 様酵素の活性化を促進した。

○RA (-) : レチノイン酸なし + Wortmannin $1 - 10^3$ nM

●RA (+) : レチノイン酸処理 + Wortmannin $1 - 10^3$ nM

C) WortmanninによるP19EC 細胞のアポトーシスの促進

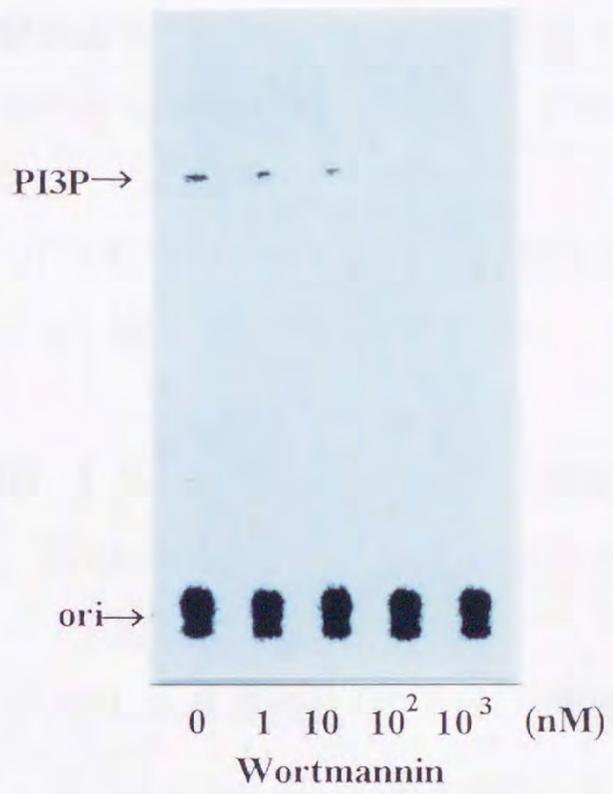
アポトーシスの指標であるDNA 断片化を検出した。 $10^2 - 10^3$ nMのWortmannin は, レチノイン酸存在下のP19 EC 細胞におけるDNA 断片化を促進した。

RA (-) : レチノイン酸なし + Wortmannin $1 - 10^3$ nM

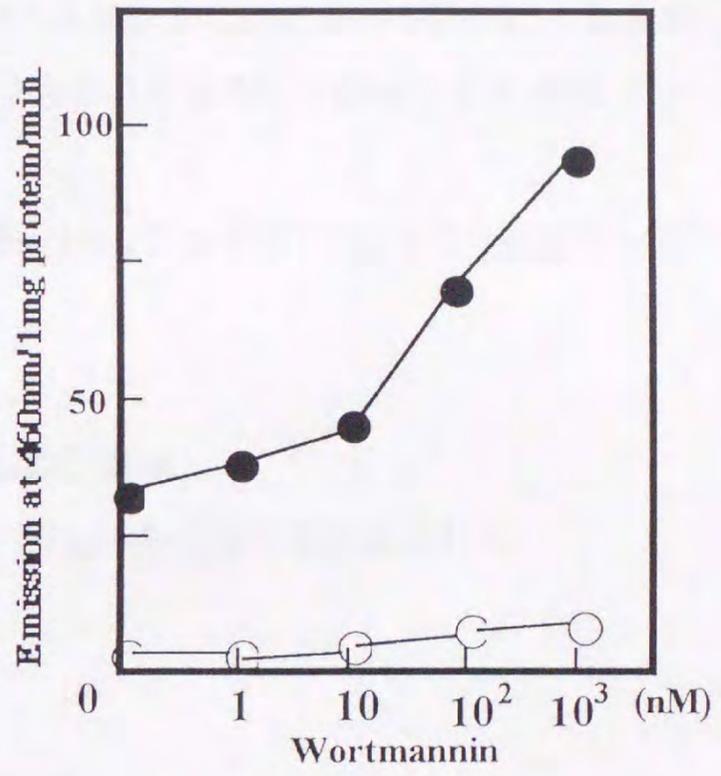
RA (+) : レチノイン酸処理 + Wortmannin $1 - 10^3$ nM

図 7

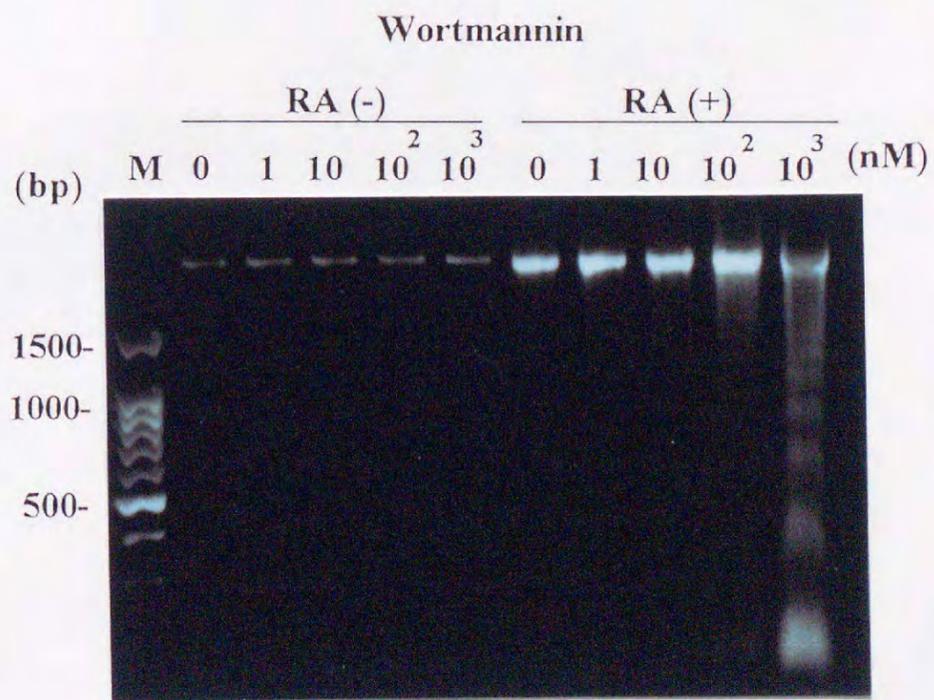
A)



B)



C)



・ 図8

Bcl-xL強発現によるP19EC細胞のカスパーゼ3様酵素活性化の抑制

A) Bcl-xL強発現によるP19EC細胞のカスパーゼ3様酵素活性化の抑制

Bcl-xLをP19 EC 細胞に強発現させると、レチノイン酸処理による神経分化過程に観察されるカスパーゼ3様酵素の活性化が抑制された。カスパーゼ3様酵素活性は、蛍光標識合成ペプチド Ac-DEVD-MCA によって調べた。蛍光強度の変化量を蛋白質量 1 mg, 1 分間相当の値に換算して酵素活性の指標とした。

○P19EC細胞をレチノイン酸処理, ●Bcl-xLを強発現したP19EC細胞をレチノイン酸処理

B) イムノブロットによるBcl-xL発現の確認

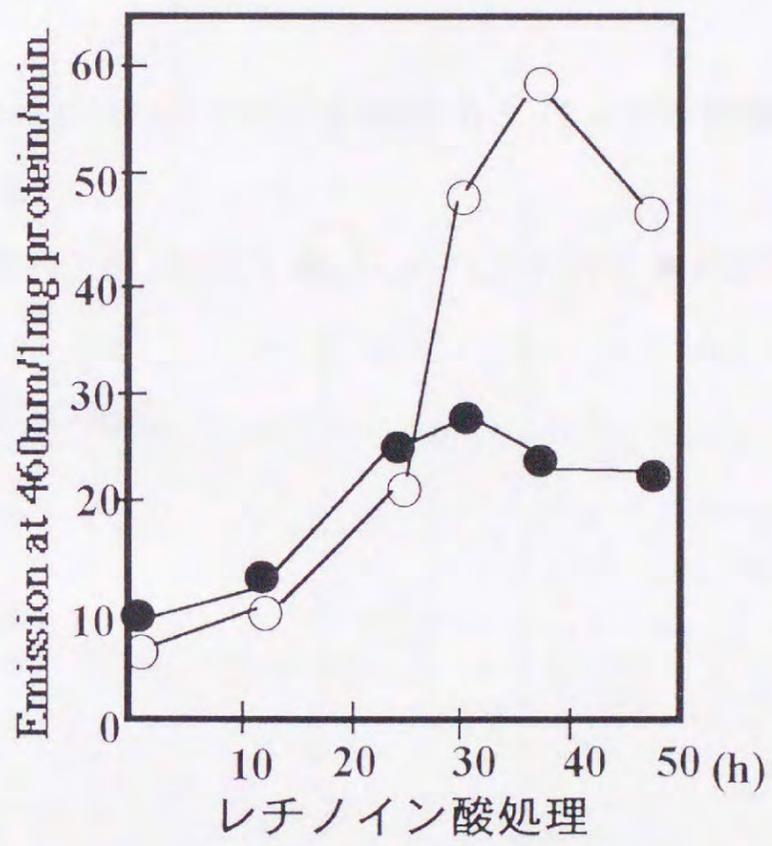
抗Bcl-xL抗体によるイムノブロットでBcl-xLの強発現を確認した。

- : P19EC細胞

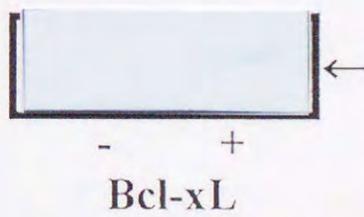
+ : Bcl-xLを強発現したP19EC細胞

図 8

A)



B)



・ 図9

各種生存因子によるP19EC細胞のカスパーゼ3様酵素活性化の抑制

1 μ M のレチノイン酸処理 30 時間におけるP19 EC 細胞のカスパーゼ3様酵素活性は、FGF ファミリーをはじめとする各種増殖因子により濃度依存的に抑制された。カスパーゼ3様酵素活性は、蛍光標識合成ペプチド Ac-DEVD-MCA によって調べた。蛍光強度の変化量を蛋白質量 1 mg, 1 分間相当の値に換算して酵素活性の指標とした。

A) 各種増殖因子によるP19EC細胞のカスパーゼ3様酵素活性化の抑制

レチノイン酸処理P19 EC 細胞 + ●HGF, ○bFGF, ▲EGF, △NGF

B) FGF ファミリーによるP19EC細胞のカスパーゼ3様酵素活性化の抑制

レチノイン酸処理P19 EC 細胞 + ●aFGF, ○bFGF, ▲FGF4, △FGF7, ■FGF9,

破線は未処理P19 EC 細胞

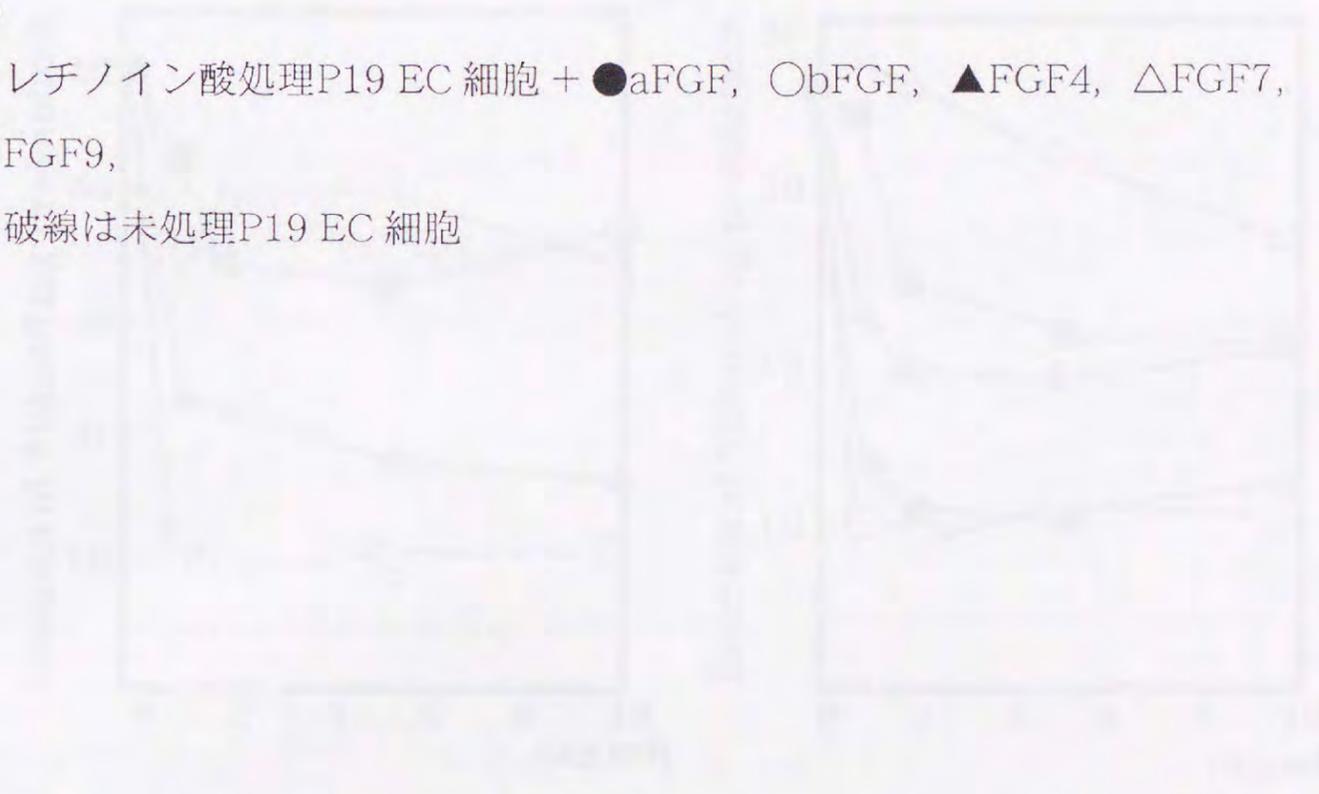
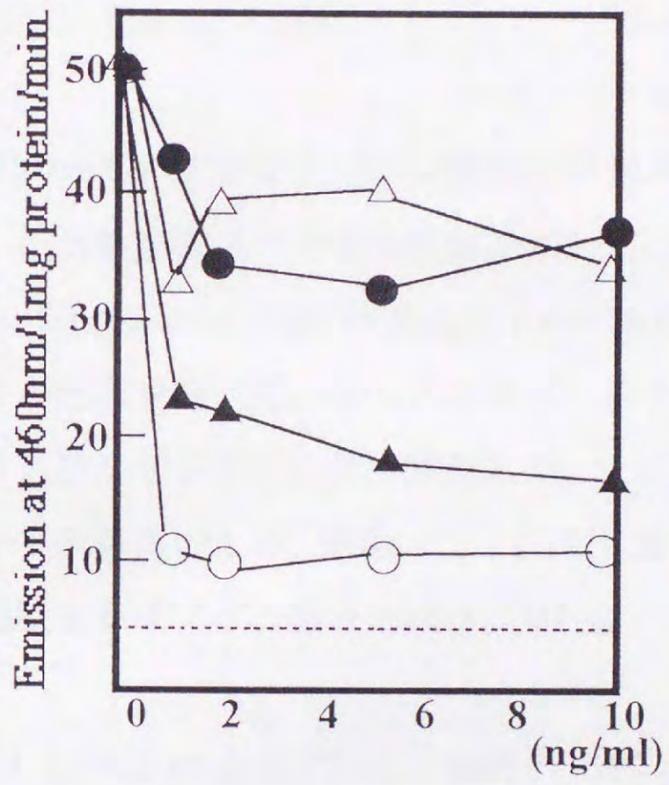
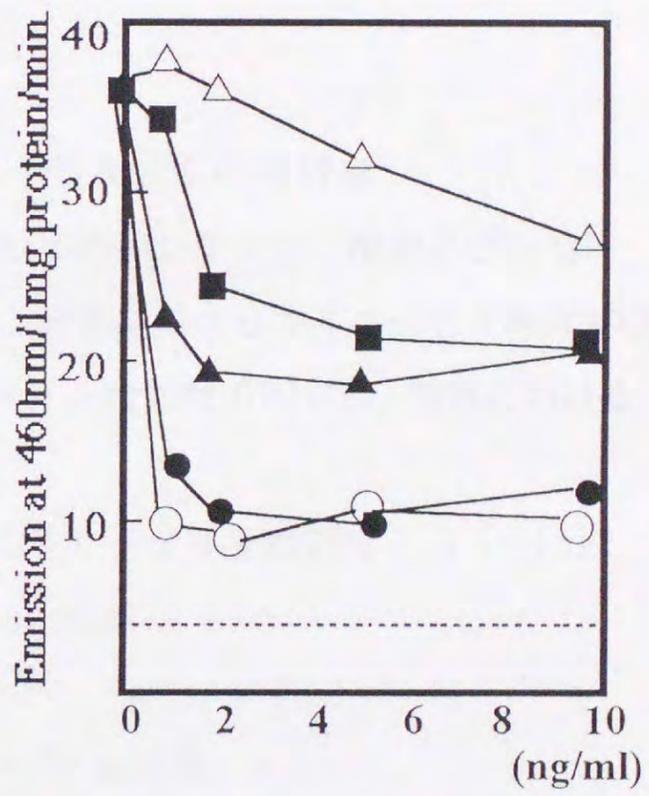


图 9

A)



B)



・ 図10

bFGFによるP19EC細胞のカスパーゼ3様酵素活性およびアポトーシスの抑制

1 μ M のレチノイン酸処理によるP19 EC 細胞の神経分化過程におけるカスパーゼ3様酵素の活性化およびアポトーシスは、bFGF (10 ng / ml) によって抑制された。

A) bFGFによるP19EC細胞のカスパーゼ3様酵素活性の抑制

カスパーゼ3様酵素活性は、蛍光標識合成ペプチド Ac-DEVD-MCA によって調べた。蛍光強度の変化量を蛋白質量 1 mg, 1 分間相当の値に換算して酵素活性の指標とした。

○レチノイン酸処理P19 EC 細胞, ●レチノイン酸処理P19 EC 細胞 + bFGF (10 ng / ml)

B) bFGFによるP19EC細胞のカスパーゼ3活性化の抑制

抗活性型カスパーゼ3抗体を用いて、1 μ M のレチノイン酸およびbFGF (10 ng / ml) で30 時間処理下のP19 EC 細胞におけるカスパーゼ3 活性型断片の出現を調べた。bFGF 処理は、レチノイン酸処理のP19 EC 細胞におけるカスパーゼ3 の活性化を抑制した。

1 : 未処理P19 EC 細胞, 2 : P19EC細胞をレチノイン酸処理, 3 : P19EC細胞をレチノイン酸 + bFGF (10 ng / ml) 処理

C) bFGFによるP19EC細胞のアポトーシス抑制

細胞を回収してDNA を調製し、アポトーシスの指標であるDNA 断片化を検出した。

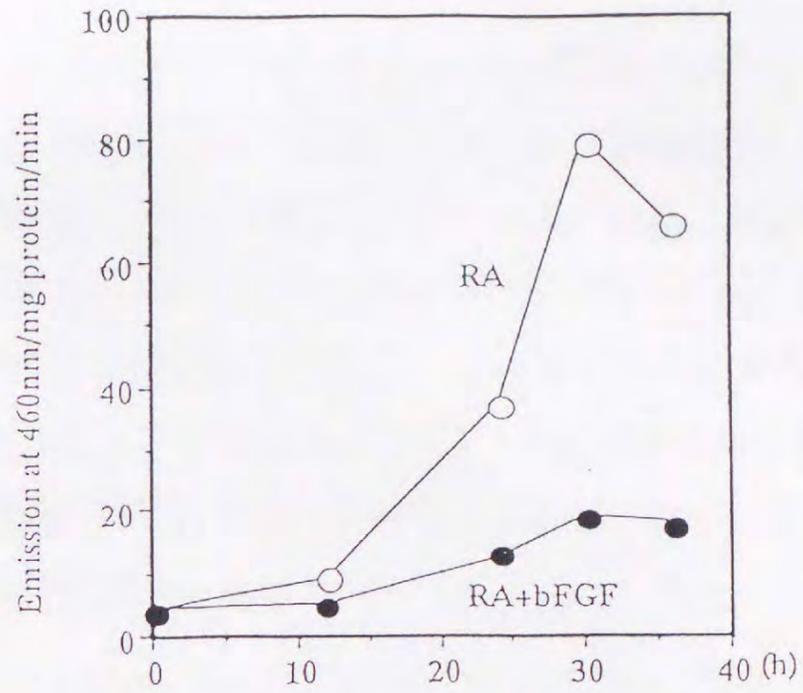
1 μ M のレチノイン酸処理によるP19 EC 細胞の神経分化過程において、bFGF (10 ng / ml) によってアポトーシスは抑制された。

RA : P19EC細胞をレチノイン酸処理,

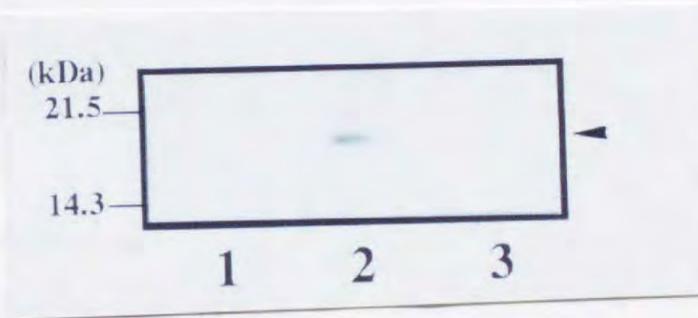
RA + bFGF : P19EC細胞をレチノイン酸 + bFGF (10 ng / ml) 処理

図10

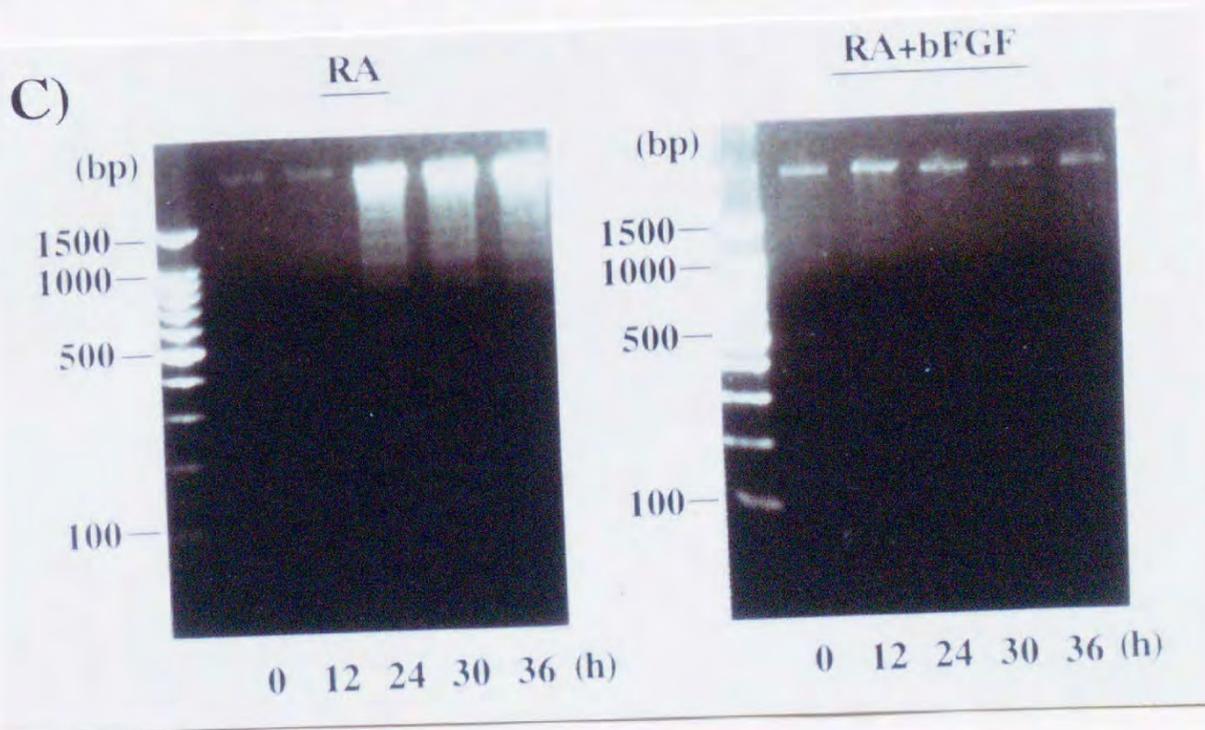
A)



B)



C)



・ 図11

FGFRからのシグナル伝達とカスパーゼ3様酵素活性の変化

A) レチノイン酸処理によるP19EC細胞の神経分化過程におけるFGFRの発現

P19 EC 細胞を、1 μ Mのレチノイン酸存在下の細胞凝集状態で48時間培養した。12時間ごとに細胞を回収してRNAを調製し、定量的RT-PCRによりFGFレセプターの発現量の変化を調べた。RT-PCRの結果、FGFR1は597bpと330bp、FGFR2は629bp、383bp、289bp、FGFR-3は446bp、FGFR-4は550bp、のDNA断片が得られた。FGFR1、2に複数のDNA断片が検出されたのはそれぞれのスプライシングによる。P19 EC 細胞の神経分化過程で、FGFR1、2、3の発現量はほとんど変化がみられなかったが、FGFR4の発現量は神経分化とともにやや減少をみせた。

B) ハービマイシンAによるP19EC細胞のカスパーゼ3様酵素活性の変化

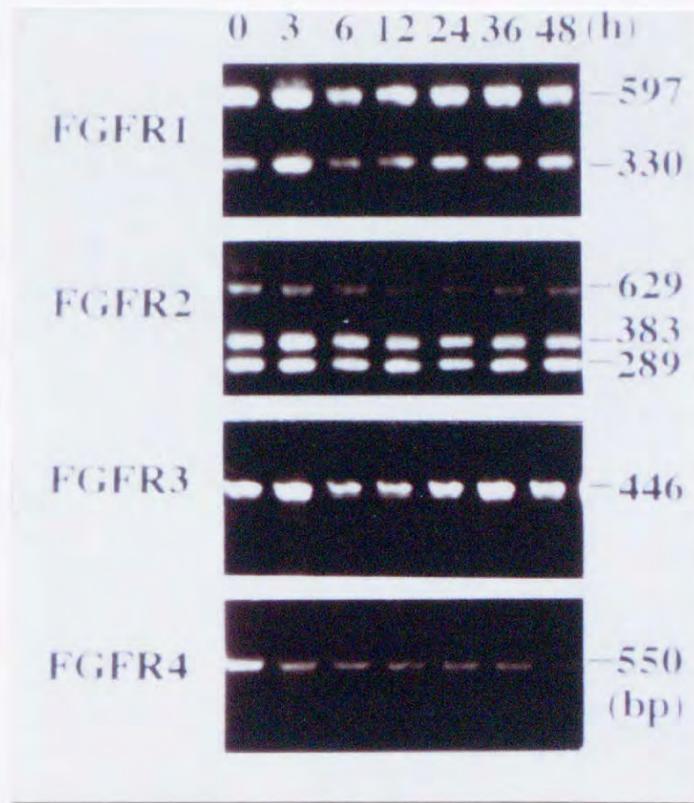
チロシンキナーゼの阻害剤であるハービマイシンA (100 nM) を添加して、レチノイン酸 (1 μ M) およびbFGF (10 ng / ml) 存在下におけるP19 EC 細胞のカスパーゼ3様酵素活性の変化を調べた。ハービマイシンAはレチノイン酸処理下のカスパーゼ3様酵素活性を増大させた。そして、bFGFによるカスパーゼ3様酵素活性の抑制を阻害した。

カスパーゼ3様酵素活性は、蛍光標識合成ペプチド Ac-DEVD-MCA によって調べた。蛍光強度の変化量を蛋白質量 1 mg, 1分間相当の値に換算して酵素活性の指標とした。

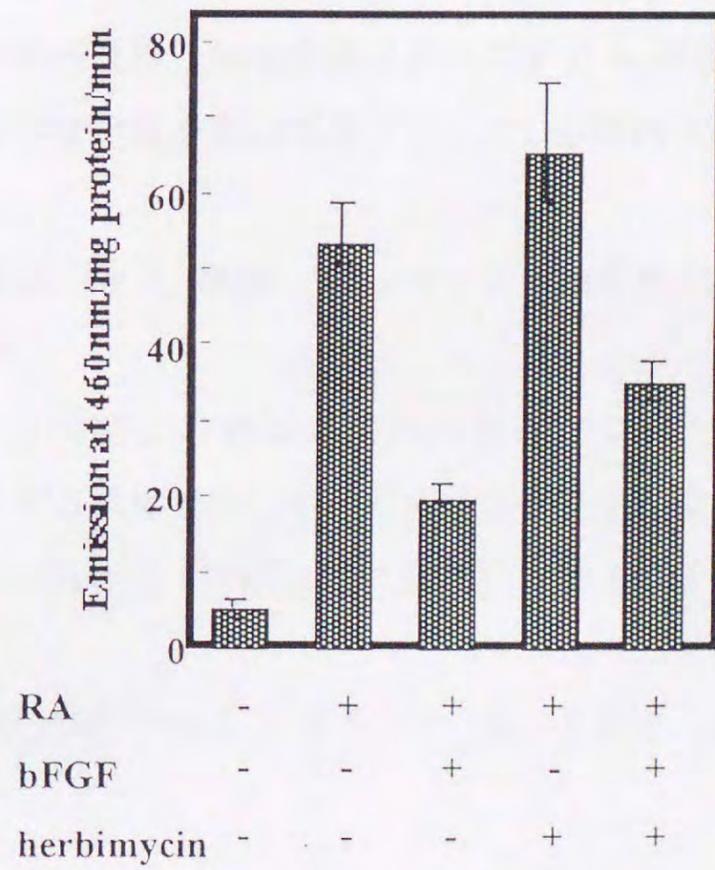
RA : 1 μ Mレチノイン酸, bFGF : bFGF (10 ng / ml) , herbimycin : 100 nMハービマイシンA

図 11

A)



B)



・ 図12

bFGFの短時間処理によるP19EC細胞のカスパーゼ3様酵素活性化の抑制

A) bFGFの短時間処理によるP19EC細胞のカスパーゼ3様酵素活性化の抑制

P19 EC 細胞を、 $1\mu\text{M}$ のレチノイン酸存在下の細胞凝集状態で33時間培養した。この間に、bFGF (10 ng / ml) を短時間添加して、33時間後のカスパーゼ3様酵素活性の変化を調べた。カスパーゼ3様酵素活性は、レチノイン酸処理33時間のサンプルの活性値を100%，未処理のサンプルの活性値を0%，として相対値を算出した。

□レチノイン酸処理， ■レチノイン酸 + bFGF， 斜線：未処理，

P19 EC 細胞の培養33時間における各処理の期間を示す。

P19 EC 細胞を、 $1\mu\text{M}$ のレチノイン酸存在下の細胞凝集状態で培養した。30時間後、bFGF (10 ng / ml) を添加して、時間経過における、カスパーゼ3様酵素活性の変化およびカスパーゼ3の活性化型へのプロセッシングを調べた。

B) bFGF添加後、3時間におけるカスパーゼ3様酵素活性の抑制

カスパーゼ3様酵素活性は、蛍光標識合成ペプチド Ac-DEVD-MCA によって調べた。蛍光強度の変化量を蛋白質量1 mg，1分間相当の値に換算して酵素活性の指標とした。

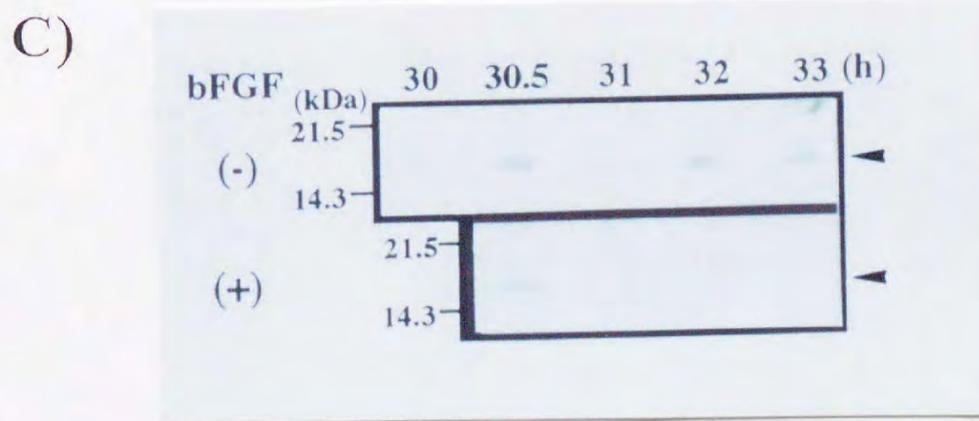
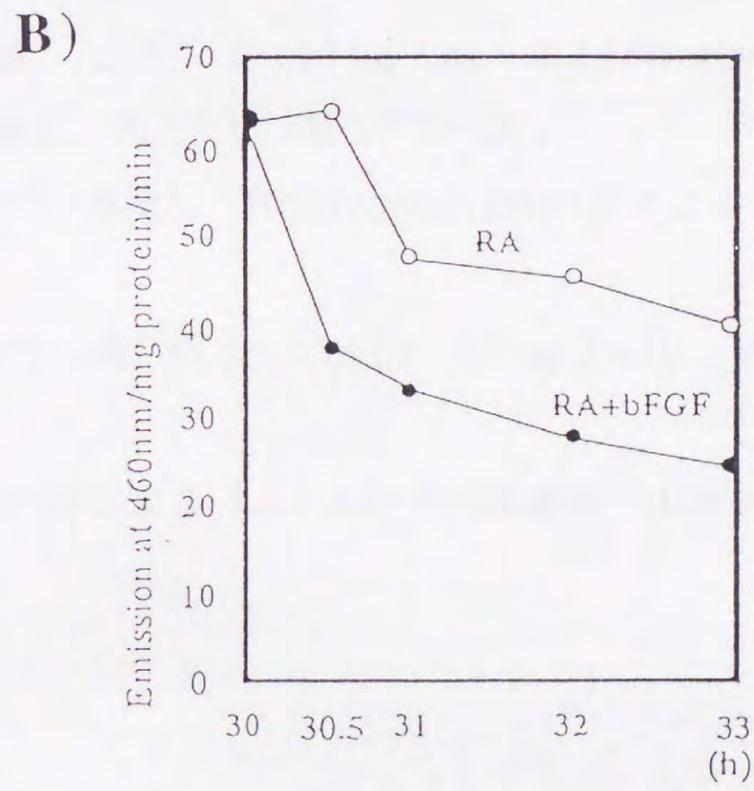
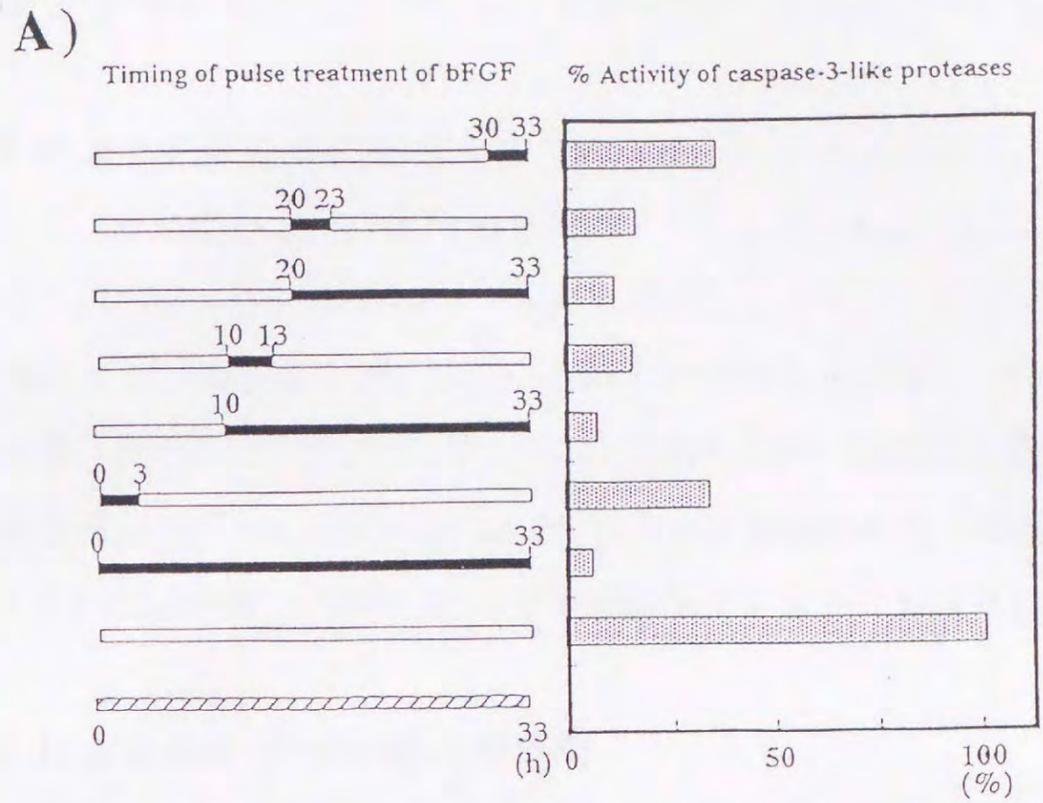
○レチノイン酸処理P19 EC 細胞， ●レチノイン酸処理P19 EC 細胞 + bFGF (10 ng / ml)

C) bFGF添加後、3時間におけるカスパーゼ3のプロセッシングの抑制

抗活性化型カスパーゼ3抗体を用いて、カスパーゼ3活性化型断片 (p20/17) の出現を調べた。bFGF 処理後1時間以内にカスパーゼ3の活性化断片は消失した。

(-) : レチノイン酸処理， (+) : レチノイン酸 + bFGF (10 ng / ml)

図12



・ 図13

bFGFRシグナルによるカスパーゼ3様酵素活性の抑制の分子機構

A) bFGFによるPI3Kの活性化とWortmanninによる抑制

1 μ Mレチノイン酸存在下の細胞凝集状態で、P19 EC細胞を24時間培養した。bFGF (10 ng/ml) を添加後、細胞を回収してPI3Kの活性化を調べた。bFGF添加により、時間依存的にPI3Kが活性化された(左図)。また、bFGF添加20分後、PI3Kの阻害剤Wortmanninを加えPI3Kの抑制を調べた。

PI3Kの活性化は 10^2 nMのWortmanninによって抑制された(右図)。

ori: サンプル添加位置, PI3P: ホスファチジルイノシトール3リン酸

B) bFGFによるBadのリン酸化の抑制

P19 EC細胞にBadを強発現させて、1 μ Mレチノイン酸存在下の細胞凝集状態で24時間培養した。bFGF (10 ng/ml) およびWortmannin (100nM) を添加して30分後に、Badのリン酸化を調べた。

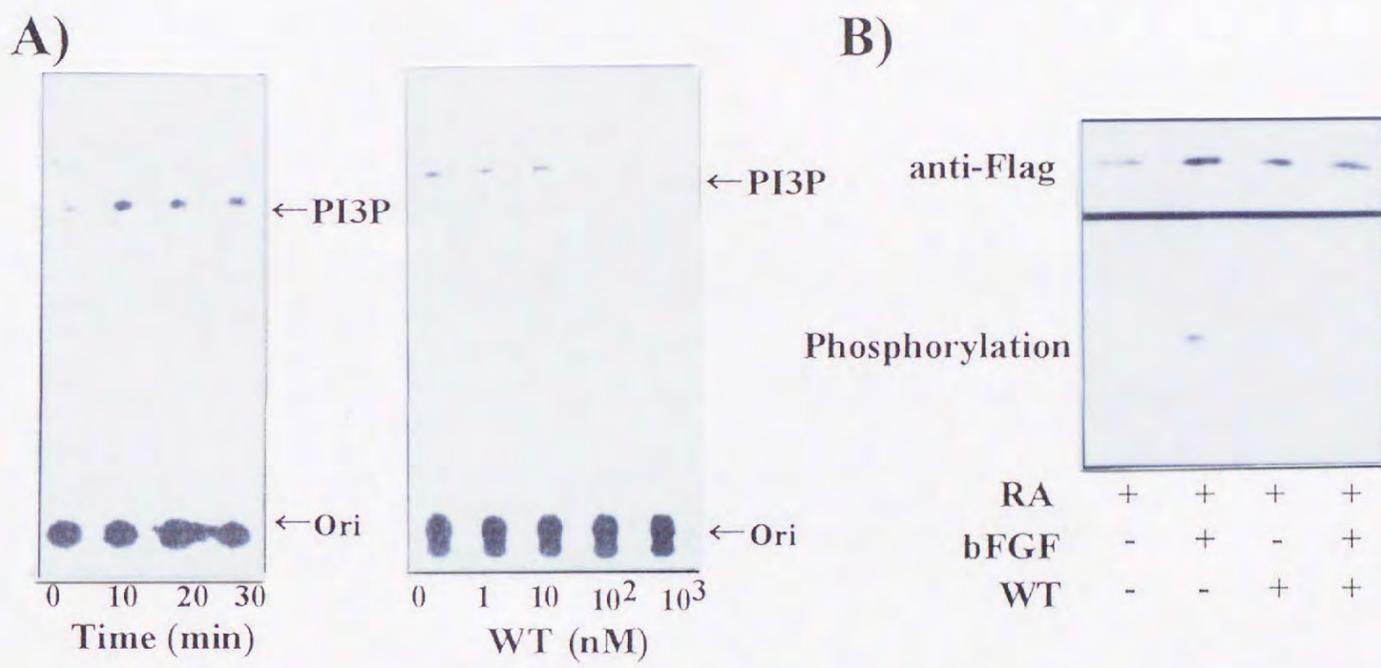
bFGFはBadをリン酸化し、WortmanninはbFGFによるBadのリン酸化を抑制した。

RA: 1 μ Mレチノイン酸, bFGF: bFGF (10 ng/ml), WT: 100 nM

Wortmannin

上から、抗FLAG抗体によるFLAG Badの発現確認, Badのリン酸化の検出

図13



・ 図14

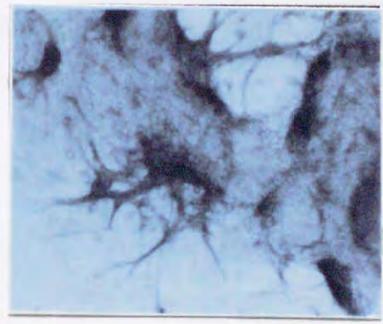
P19EC 細胞の神経分化に対するbFGF の効果

P19 EC 細胞を、神経細胞分化誘導の条件である $1 \mu\text{M}$ のレチノイン酸存在下の細胞凝集状態で36時間培養し、神経細胞へと分化させた。抗MAP-2抗体を用いた免疫染色により、神経細胞への分化を確認した。bFGF (10 ng / ml) 処理を加えてアポトーシスおよびカスパーゼ3様酵素の活性化を抑制しても、P19 EC 細胞は、抗MAP-2抗体陽性の神経細胞へと分化した。

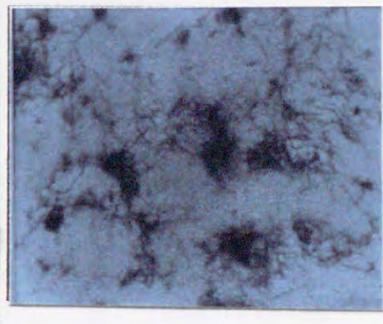
RA : $1 \mu\text{M}$ レチノイン酸処理, RA+bFGF : $1 \mu\text{M}$ レチノイン+ bFGF (10 ng / ml) 処理

图14

RA



RA+bFGF



・ 図15

in situ ハイブリダイゼーション法によるE 10.5マウス胚における
カスパーゼ3 mRNA発現の検出

(a), (b)

E10.5のマウス胚で、RNAプローブによるwhole mount in situ ハイブリ
ダイゼーションを行い、カスパーゼ3のmRNA発現を調べた。

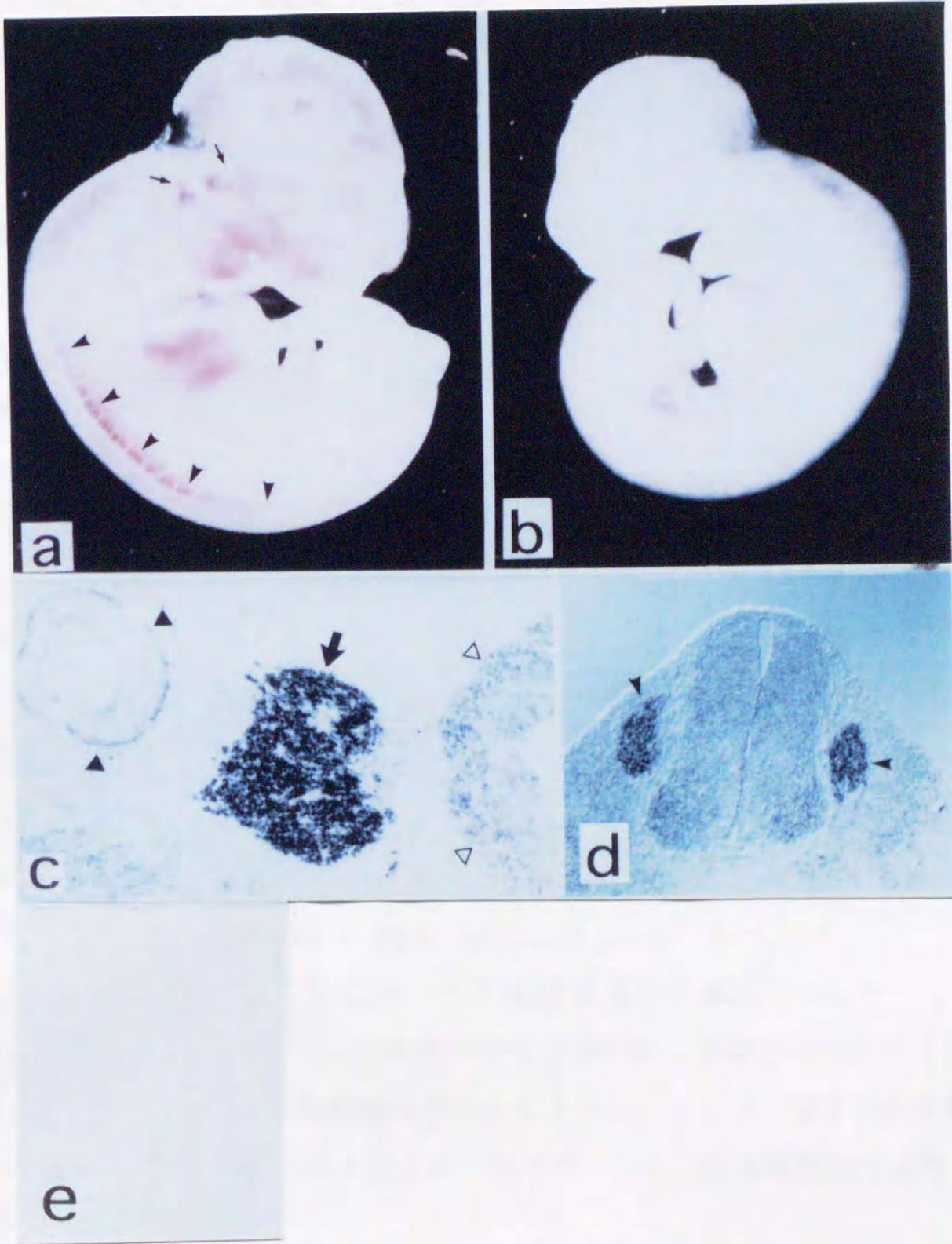
(a)カスパーゼ3 アンチセンスプローブ, (b)カスパーゼ3 センスプローブ(対
照)

矢頭：後根神経節, 矢印：三叉神経節。

(c), (d), (e)

E10.5 マウス胚組織切片によるin situ ハイブリダイゼーションでカスパーゼ
3 mRNAの発現を調べた。(c) 顔面神経節, (d) 後根神経節, に強く発現が
みられた。(e)カスパーゼ3 センスプローブ (対照)

図15



・ 図16

血清, NGF 除去によるDRGニューロンへのアポトーシス誘導と
カスパーゼ3様酵素活性の検出

a) 血清, NGF 除去によるDRGニューロンへのアポトーシス誘導と
カスパーゼ活性の検出

DRGニューロンの培養液中から, 血清とNGF を除去してアポトーシスを誘導した。時間経過とともにDNA 断片化が検出された。また, カスパーゼ3様酵素活性は時間経過とともに増大したが, カスパーゼ1様酵素活性は変化しなかった。

酵素活性測定の基質としてカスパーゼ1様酵素はAc-YVAD-MCA, カスパーゼ3様酵素はAc-DEVD-MCA をそれぞれ用いた。基質を分解して1分あたり1 nM のMCAを生成する酵素活性を1U とした。

○カスパーゼ1様酵素活性, ●カスパーゼ3様酵素活性

血清とNGF を除去した培養液中で, DRGニューロンを5時間培養した。NGF, カスパーゼ阻害剤の添加によるカスパーゼ3様酵素活性およびアポトーシスの抑制を調べた。

1 : + NGF (10ng/ml) , 血清, 2 : - NGF (10ng/ml) , 血清, 3 : + NGF (10ng/ml) , 4 : - NGF (10ng/ml) , 血清, + 20 μ M Ac-DEVD-CHO, 5 : - NGF (10ng/ml) , 血清, + 20 μ M Ac-YVAD-CHO

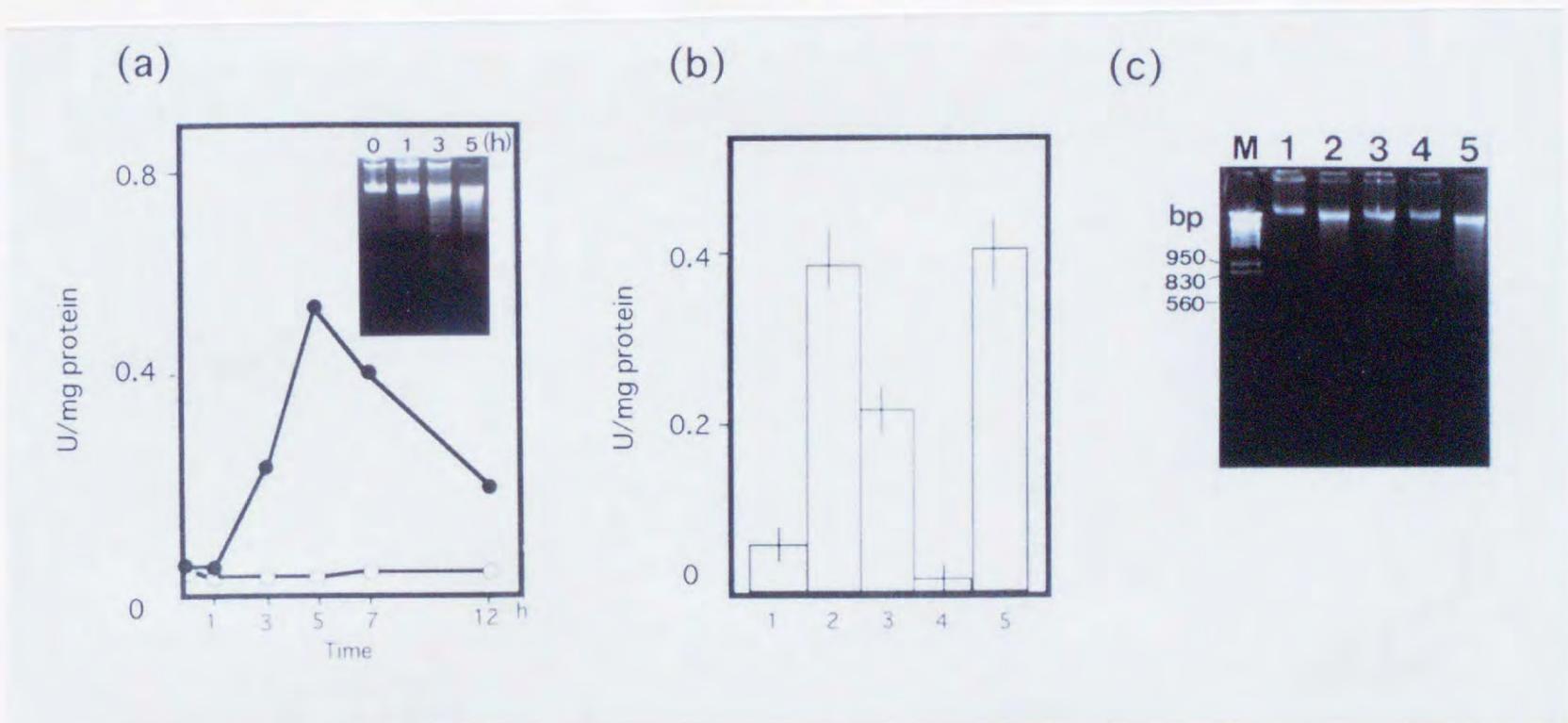
b) カスパーゼ阻害剤によるカスパーゼ3様酵素活性の抑制

酵素活性測定の基質としてAc-DEVD-MCA を用いた。基質を分解して1分あたり1 nM のMCAを生成する酵素活性を1U とした。カスパーゼ3様酵の阻害剤Ac-DEVD-CHOおよびNGF により, カスパーゼ3様酵素の活性化は抑制された。

c) カスパーゼ阻害剤によるカスパーゼ3様酵素活性およびアポトーシスの抑制

アポトーシスの指標であるDNA 断片化を検出した。カスパーゼ3様酵素の阻害剤Ac-DEVD-CHOおよびNGF により, DNA 断片化は抑制された。

图16



・ 図17

筋細胞における細胞死関連遺伝子発現の検出

未分化中胚葉細胞株 10T/2 とマウス筋芽細胞株C2C12 細胞を用いてカスパーゼとBcl-2 ファミリー, Apaf-1の発現をRT-PCR で調べた。

1 : 10T/2, 2 : C2C12



図17



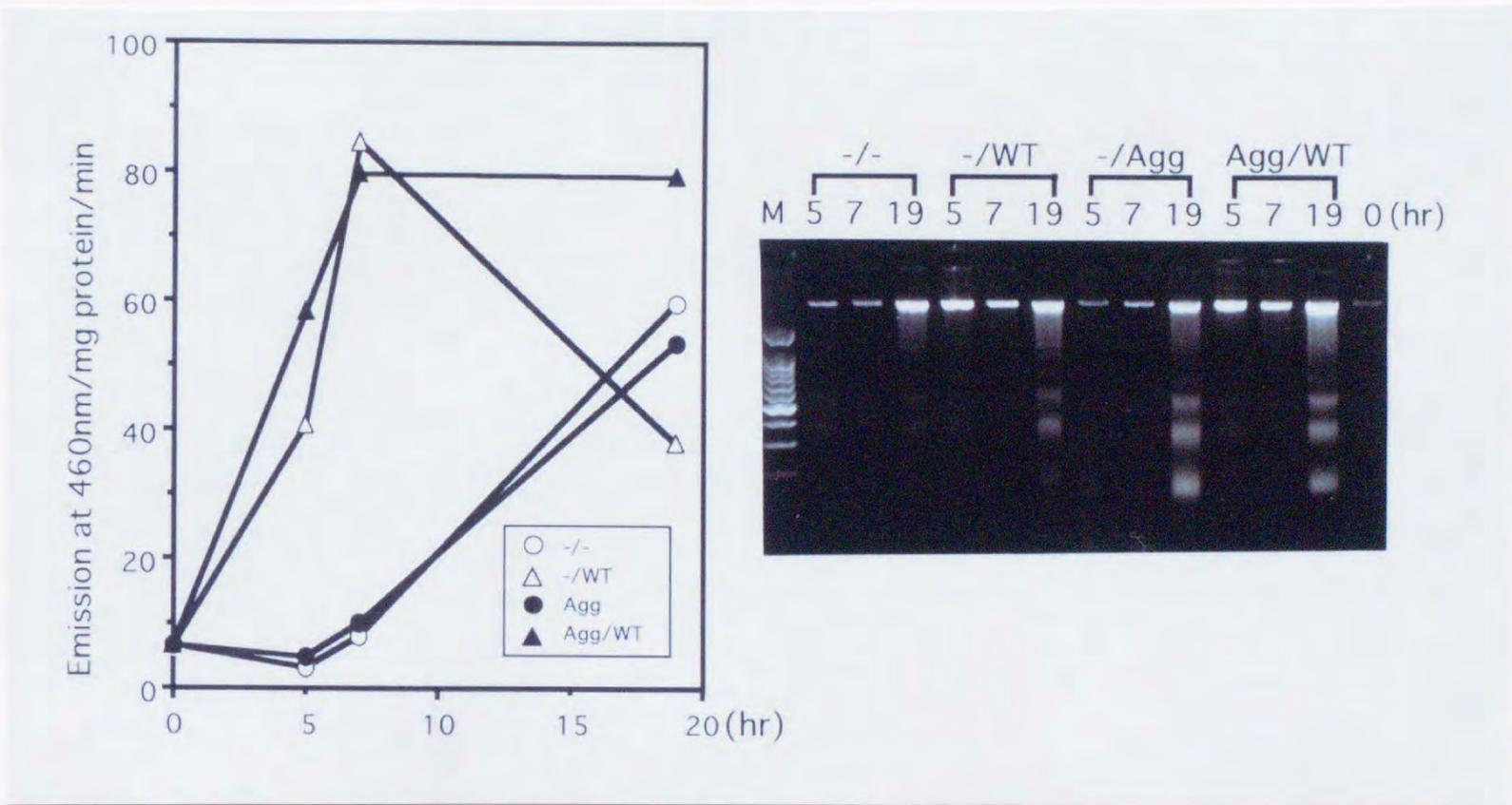
・ 図18

生存因子除去による筋細胞死の誘導とカスパーゼ3様酵素の活性化検出

C2C12細胞を生存因子を除いた状態に置き、筋細胞死の誘導とカスパーゼ3様酵素の活性化を調べた。血清除去後、7時間ほどでカスパーゼ3様活性の上昇がみられ、19時間後にはDNA断片化もみられた。血清除去に加えWortmaninnを添加することで顕著なカスパーゼ3様酵素の活性化とDNA断片化がみられた。さらに加えて、細胞接着性が低い状態におくことでその効果は増強された。

(-/-) : 血清除去, (-/WT) : 血清除去+100 nM Wortmaninn 添加, (-/Agg) : 血清除去+細胞接着除去, (Agg/WT) : 血清除去+100 nM Wortmaninn 添加+細胞接着除去

図18



・ 図19.

筋疾患モデルマウス骨格筋におけるカスパーゼ3, 9の活性化検出

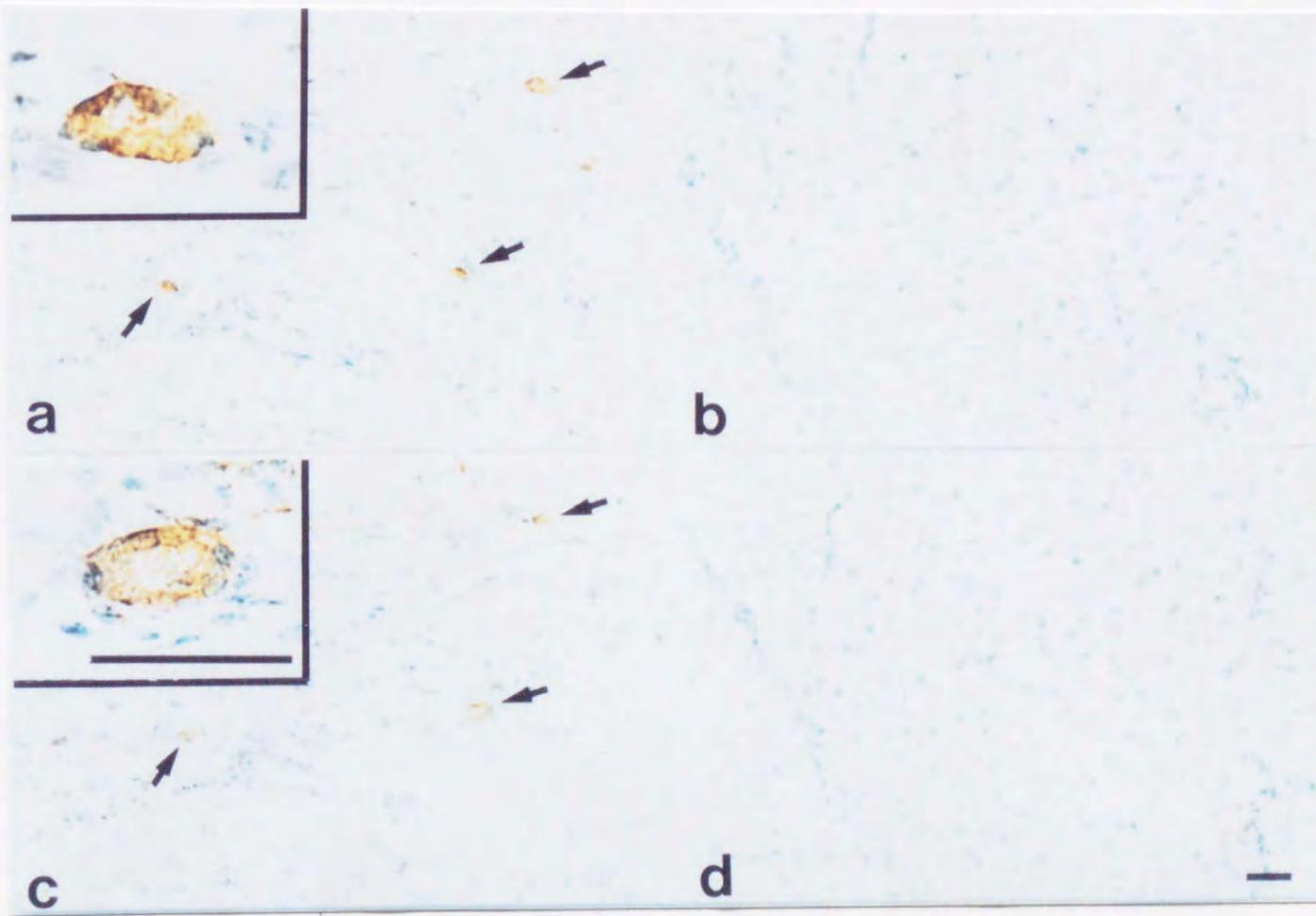
2週齢のdy/dy マウス (メロシン欠損マウス) の骨格筋におけるカスパーゼ3, 9の活性化の関係を連続切片を用いた二重染色法により調べた。

a, c) dy/dy マウス (メロシン欠損マウス), b, d) B6 マウス (対照)

a, b) 抗活性化型カスパーゼ3抗体による免疫染色, c, d) 抗活性化型カスパーゼ9抗体による免疫染色

矢印: 陽性の筋線維

図19



・ 図20

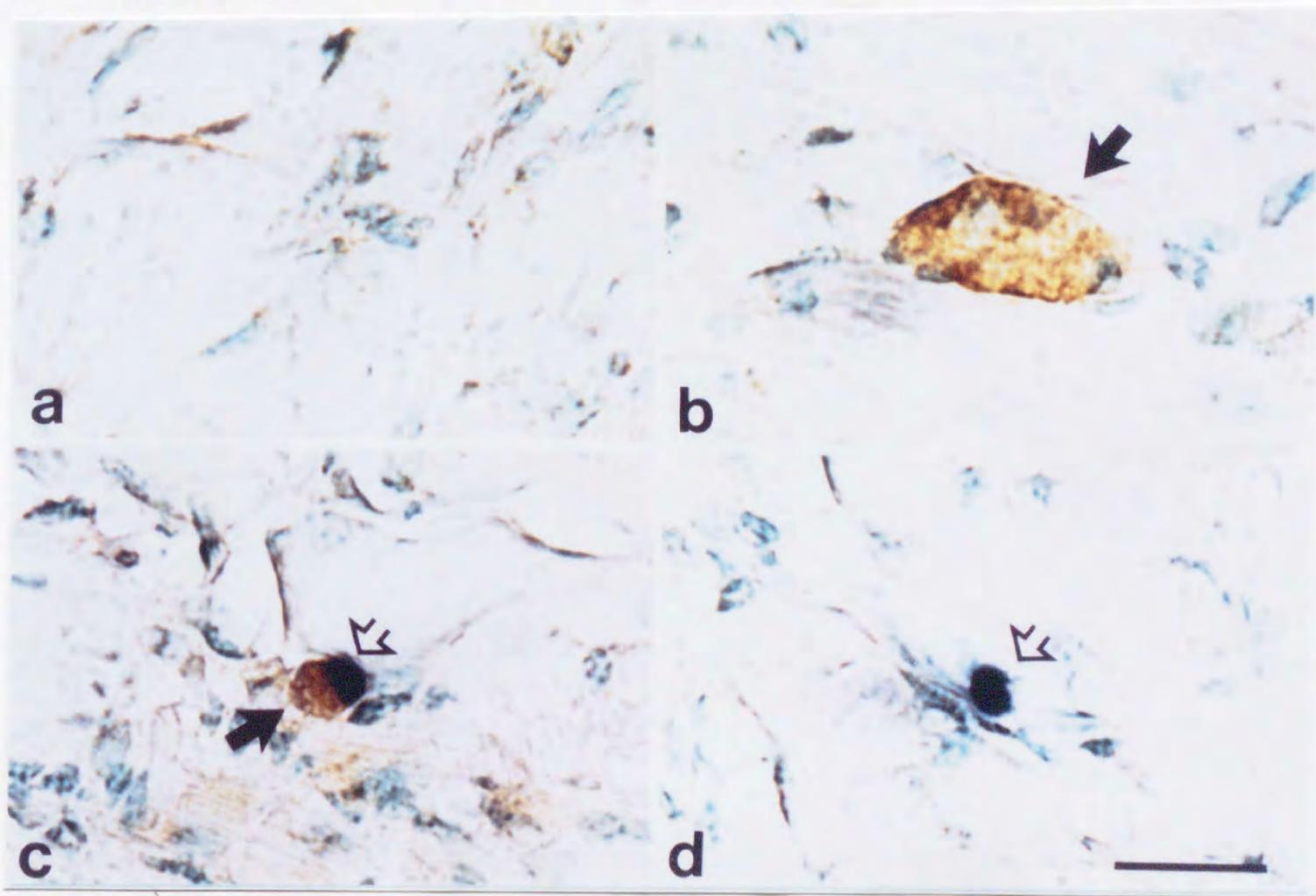
筋疾患モデルマウス骨格筋におけるカスパーゼ3の活性化と
アポトーシスの検出

2週齢のdy/dy マウス（メロシン欠損マウス）の筋組織切片で、抗活性化型カスパーゼ3抗体による免疫染色とTUNEL法の二重染色を行った。

a) 正常筋線維, b) 抗活性化型カスパーゼ3抗体陽性筋線維, c) TUNEL および抗活性化型カスパーゼ3抗体陽性筋線維, d) TUNEL 陽性筋線維

白矢印：TUNEL 陽性（紺），黒矢印：抗活性化型カスパーゼ3抗体陽性（茶）

图20



・ 図21

DRPLA患者ゲノムDNAにおけるCAG リピート伸長の検出

A) DRPLA患者ゲノムDNAにおけるCAG リピート伸長の検出

DRPLA患者および健常者各3名のゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。DRPLA患者のゲノムDNAでは、60から70リピートものCAG リピートの伸長がみられた。

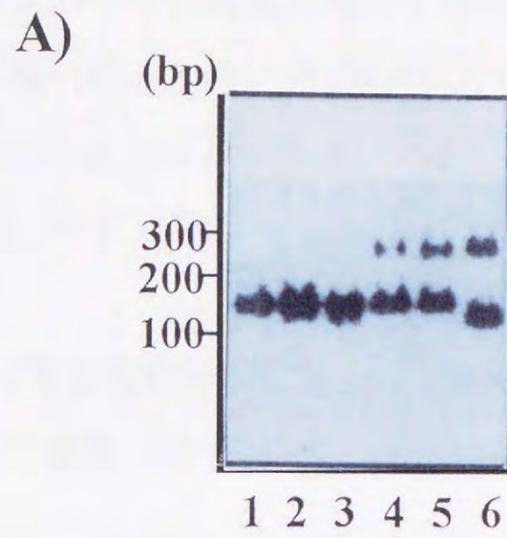
1, 2, 3 : 健常者ゲノムDNA, 4, 5, 6 : DRPLA患者ゲノムDNA,

B) EGFP 融合ポリグルタミン遺伝子発現系の作製

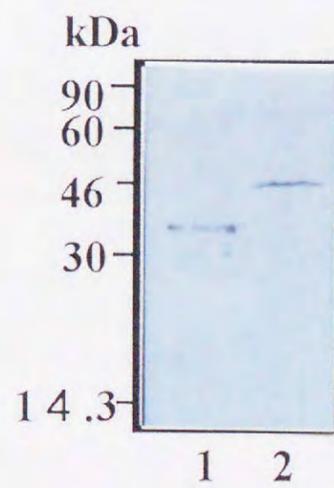
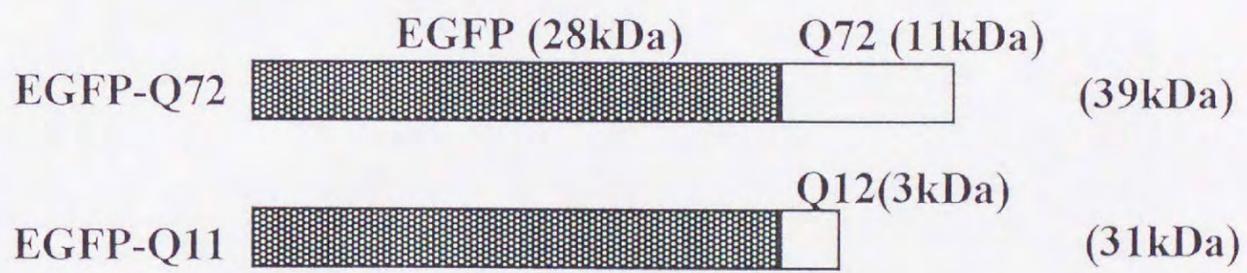
pEGFP-Q72, Q11をCOSにトランスフェクションし、抗GFP抗体によるイムノブロットで発現を調べた。アミノ酸配列から予測される分子量は、Q72が39 kDa, Q11が31 kDaだが、イムノブロットの結果、それぞれ46 kDaと37 kDaにバンドが検出された。

1 : pEGFP-Q11, 2 : pEGFP-Q72

図21



B)



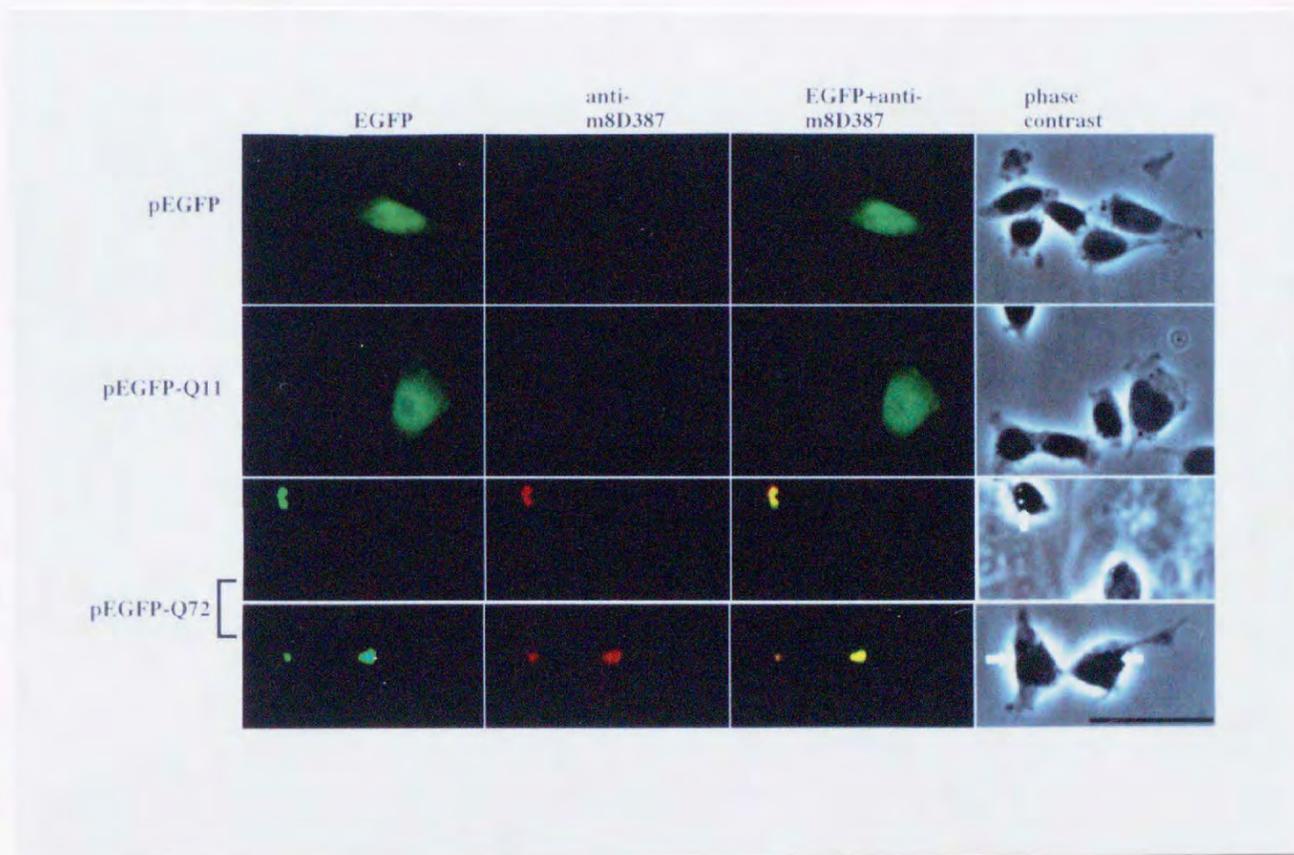
・ 図22

ポリグルタミンの核内凝集とカスパーゼ8の活性化

pEGFP-Q72, Q11をP19EC細胞でそれぞれ過剰発現させた。pEGFP-Q72は核内で凝集体を形成していたが、-Q11では凝集体の形成はみられなかった。抗活性化型カスパーゼ8抗体を用いてポリグルタミンの核内凝集とカスパーゼ8の活性化を調べたところ、pEGFP-Q72の核内凝集体と一致してカスパーゼ8の活性化がみられた。細胞質においては、カスパーゼ8の活性化はみられなかった。一方、-Q11では凝集体を形成せずカスパーゼ8の活性化もみられなかった。

EGFP : EGFP融合蛋白質の発現 (緑色) , anti-m8D387 : 抗活性化型カスパーゼ8抗体による免疫染色 (赤色) , phase constrast : 位相差顕微鏡像

図22



謝辞

四年間に渡って研究の御指導いただいた木村一郎先生に心から深謝申し上げます。副査を快く引き受けてくださった小室輝昌先生，並木秀男先生にも御礼申し上げます。本研究を行うにあたり多大な援助と親身な御指導をいただいた，国立精神神経センター神経研究所 疾病研究第5部の桃井隆先生に対して深く感謝いたします。また，実験を行うにあたり様々な御協力をいただいた疾病研究第5部の高鹿依子様，浦瀬香子様，藤田恵理子様，三保泰子様に厚くお礼申し上げます。

