



Title	Death-signalling cascade in mouse cerebellar granule neurons
Author(s)	田邊, 宏樹
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40765">https://hdl.handle.net/11094/40765</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	た な べ ひろ き 田 邊 宏 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 3 6 9 7 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Death-signalling cascade in mouse cerebellar granule neurons (小脳顆粒細胞培養系を用いた神経細胞死シグナルカスケードの解析)
論文審査委員	(主査) 教授 辻本 賀英  (副査) 教授 岡野 栄之 教授 内山 安男

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

細胞死は多細胞生物の発生やホメオスタシスの維持に關与する重要な生理機能の1つである。特に哺乳類の神経細胞においては、細胞死は発生期のニューラルネットワーク構築に必要であると同時に、成熟した神経細胞の維持の破綻により神経変性疾患を惹き起こすという二面性を持つことから、その機構解明が急がれている。

神経細胞も他の細胞と同様に形態的にアポトーシスを起こし死ぬことが知られており、そのメカニズムの一部は他のリネエジの細胞と共有していることが考えられるが、神経細胞死には de novo の RNA および蛋白合成が必要との報告もあり、そのカスケードの詳細は明らかでない。中枢神経系の神経細胞死のモデルとして、ほぼ均一な細胞集団として培養できる小脳顆粒細胞初代培養があり、この細胞は培養液中のカリウムの濃度を 25mM から 5mM にすると、核および DNA の断片化を伴う典型的なアポトーシスを起こして死ぬことが知られている。

そこで本研究では、小脳顆粒細胞初代培養系を用い、RNA 合成阻害剤アクチノマイシン D (Act-D)、蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX)、神経栄養因子 IGF-1 及び BDNF、細胞死抑制因子 Bcl-2、caspase インヒビター z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB (z-D) を手がかりとして、神経細胞死におけるシグナルカスケードの解析を行った。

#### 【方法】

小脳顆粒細胞の培養：小脳顆粒細胞は生後7日目の C57BL/6J マウスあるいは bcl-2 トランスジェニックマウスから調整した。単離した小脳をトリプシンと DNase I で処理し、10%ウシ胎児血清入りの DMEM で攪拌し、1 cm<sup>2</sup> あたり 2.5x10<sup>6</sup>個の密度で poly-D-lysine でコートしたディッシュにまいた。実験には in vitro で7日間培養し成熟分化した小脳顆粒細胞を用いた。

細胞死の誘導と細胞死の検出：細胞死は、KCl の濃度を 25mM から 5mM にし、同時に血清を除去するという方法により誘導した。実験群として細胞死誘導と同時に Act-D, CHX, IGF-1, BDNF, 25mMKCl (high K<sup>+</sup>), z-D を加えたもの、あるいは bcl-2 トランスジェニックマウス由来細胞を用い、それぞれの細胞死に対する影響を調べた。死細胞/生細胞の判定は、細胞死誘導24時間後の位相差顕微鏡による観察及びヘキスト 33342 (10 μM) 核染色像の違いにより行ない、それぞれの数をカウントすることにより細胞の生存率 (viability) を求めた。

活性化された c-Jun の検出：細胞死誘導後の細胞より抽出したサンプルを SDS-PAGE に展開後、リン酸化された

c-Jun にのみ反応する抗体を用いた Western blot 法により行なった。

ミトコンドリア膜電位 ( $\Delta\Psi$ ) の変化：細胞死誘導時におけるミトコンドリア  $\Delta\Psi$  の変化を、 $\Delta\Psi$  依存的に取り込まれる Rhodamin123 (10  $\mu$ M) の染色により蛍光顕微鏡下 (excitation 448nm; emission 525nm) で観察し、蛍光強度により相対的に数値化した。

Caspase-3 (様) プロテアーゼ活性の測定：細胞死誘導時における Caspase-3 (様) プロテアーゼの活性化を DEVD-MCA を基質として蛍光により測定した。

#### 【成績】

培養液中の血清を除去すると同時にカリウムを高濃度 (25mM) から生理的濃度 (5mM) にすることにより細胞死を誘導すると、無処置の小脳顆粒細胞では、c-Jun の一過性の増加、ミトコンドリア  $\Delta\Psi$  の低下、caspase-3 (様) プロテアーゼの活性化、核の断片化及び細胞体と軸索の変性を伴うアポトーシスが経時的に観察された。CHX を投与した群では上記のすべての事象が顕著に抑制され、Act-D, IGF-1, BDNF, high  $K^+$  を投与した群及び bcl-2 トランスジェニックスマウス由来小脳顆粒細胞では、c-Jun の増加はみられたが、 $\Delta\Psi$  の低下、caspase-3 (様) プロテアーゼの活性化及び核の断片化は顕著に抑えられ、細胞死も抑制された。一方 z-D を投与した群では、caspase-3 (様) プロテアーゼの活性化及び核の断片化が顕著に抑えられたが、位相差顕微鏡による観察では無処置群と同様に細胞体及び軸索の変性を示し、細胞死自体は抑制されていないと考えられた。

#### 【総括】

近年、神経細胞死誘導時に起こる種々の事象や、関与する分子の解析がおこなわれてきたが、そのシグナル伝達機構は未だ明らかでない。今回我々は、小脳顆粒細胞初代培養細胞死系をモデルとし、種々の細胞死阻害剤を用いて神経細胞死におけるシグナルカスケードの解析を行った。

神経細胞死誘導時にみられる各事象 (c-Jun の活性化、 $\Delta\Psi$  の低下、caspase-3 の活性化、核の断片化) の経時変化及び各種細胞死阻害剤の各事象に対する影響を考慮すると、蛋白質合成阻害剤の作用点は c-Jun の活性化よりも細胞死カスケード上上流に位置し、RNA 合成阻害剤、神経栄養因子、Bcl-2 の作用点は c-Jun 活性化より下流でミトコンドリア  $\Delta\Psi$  低下よりも上流に位置すると考えられた。一方、caspase インヒビターは caspase の活性化や核の変性を止められるが  $\Delta\Psi$  の低下を止められないと同時に細胞質の変性も止められないことから、caspase の活性化は  $\Delta\Psi$  の低下よりカスケードの下流に位置し、細胞質の変性を惹き起こすシグナルは別に存在する可能性が考えられた。ミトコンドリア膜に局在する Bcl-2 により  $\Delta\Psi$  低下を抑制すると細胞死自体を止めることができることを考え合わせると、細胞質の変性と核変性のシグナルは  $\Delta\Psi$  低下より下流で発せられているものと思われる。

以上研究の結果より、神経細胞死誘導時に見られる事象は、c-Jun の活性化  $\rightarrow$  de novo の遺伝子発現  $\rightarrow$  ミトコンドリア  $\Delta\Psi$  の低下  $\rightarrow$  caspase-3 (様) プロテアーゼの活性化 / 細胞質の変性  $\rightarrow$  核の縮小・断片化  $\rightarrow$  細胞死の順に進行すると予想された。

#### 論文審査の結果の要旨

神経細胞はその発生過程で 20-80% の死が認められ、また神経変性疾患では多くの神経細胞の死が観察されることから、神経細胞死の分子メカニズムの解明は神経発生のみならず神経変性疾患の予防及び治療の観点からも非常に重要である。本研究は、今まで不明な点が多かった神経細胞死のシグナル伝達機構の枠組みを明らかとするため、小脳顆粒細胞初代培養系をモデルとし、種々の細胞死抑制因子を手掛かりとして解析を行い、神経細胞死シグナルカスケードが、c-Jun の活性化  $\rightarrow$  de novo の遺伝子発現  $\rightarrow$  ミトコンドリア膜電位の低下  $\rightarrow$  caspase の活性化 / 細胞質の変性  $\rightarrow$  核の縮小・断片化  $\rightarrow$  死、の順に進行することを示した。

以上の知見は、今後の詳細な神経細胞死分子メカニズム解明へ向けての指針となるばかりでなく、神経変性疾患の治療に貴重な手掛かりを与えあるものであり、学位授与に値するものであると考える。