

論文の内容の要旨

トポイソメラーゼ阻害薬による神経細胞死の機構解析

平成 14 年度進学

馬場 敦

【序論】

神経細胞死は発達期、あるいは脳血管障害等の病態時など様々な局面において認められ、その機序も多様である。トポイソメラーゼ I 阻害薬 camptothecin (CPT) は DNA に障害を与え、増殖細胞では細胞周期の S 期において細胞を死に至らしめ、アポトーシスの典型として研究されている。しかしながら分裂を終えた分化を終了した神経細胞においても、CPT を含めトポイソメラーゼ阻害薬は、急速な細胞死を惹起する。この細胞死の過程において、細胞周期関連蛋白質の発現および酵素活性の変動に代表される、細胞周期異常進行が関与することが示唆されているものの、細胞死の詳細なメカニズムは不明である。

ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)は、ヒストンアセチル化酵素と共役してクロマチン構造を変化させる酵素であり、HDAC により様々な遺伝子の転写が負に制御されている。我々は神経細胞死の過程において、HDAC 阻害薬が細胞周期阻害蛋白質の発現変動を介して、神経保護作用を呈することを示してきた。以上の知見より本研究では、各種細胞周期停止薬物の神経保護作用とその機構を解析することにより、トポイソメラーゼ阻害薬による神経細胞死の機構を解析した。

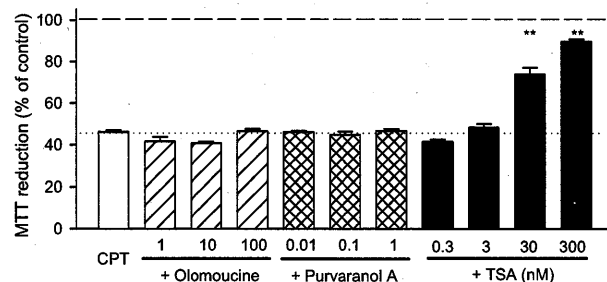


Fig 1 細胞周期停止薬物の保護作用

縦軸は無処置群の細胞生存率 **P<0.01 vs CPT、単位は μ M

【方法】

胎生 18 日齢 Wistar 系ラット大脳皮質より調製した培養神経細胞(Div4)に各種トポイソメラーゼ阻害薬及び被験薬物を適用した。細胞生存率は曝露 12hr 後に MTT 法にて評価した。曝露後一定時間を経過した後に全細胞抽出液を調製し、Western blotting により蛋白発現量の変動を、クロマチン免疫沈降法によりアセチル化ヒストンと結合するクロマチン DNA の変動を検出した。統計は一元配置分散分析の後、Tukey 多群比較により検定した。

【結果】

1. トポイソメラーゼ阻害薬による細胞死に対する、各種細胞周期停止薬物の保護作用の検討

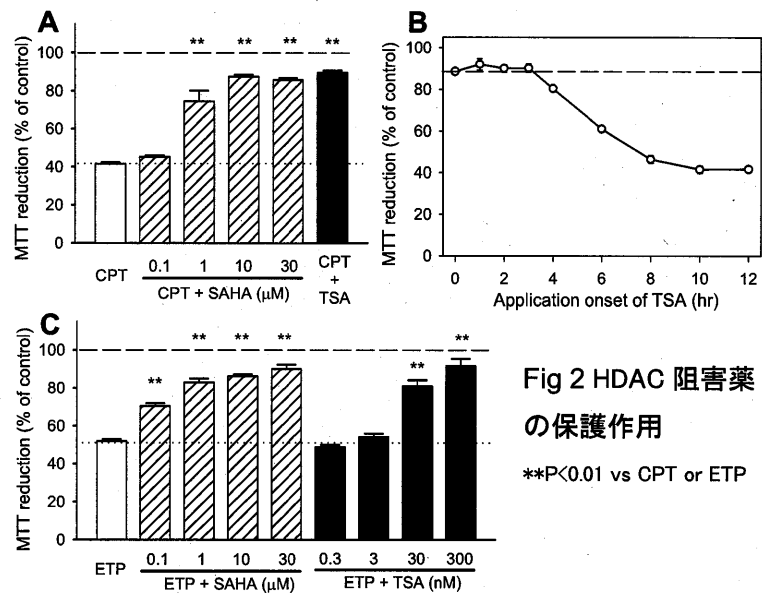
細胞周期進行は cyclin

/cyclin dependent kinase

(CDK)複合体形成に伴う CDK 活性の上昇により制御されている。そこで CPT (10 μM)による細胞死に対し、CDK 阻害薬 olomoucine (1–100 μM)及び purvaranol A (10 nM–1 μM)、更に細胞周期を停止させるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬 trichostatin A (TSA; 0.3–300 nM) の作用を検討した(Fig 1)。両 CDK 阻害薬は CPT 曝露後 12 hr までの細胞死に有意な影響を及ぼさなかったのに対し、TSA は細胞死の約 90%を抑制した。また、CPT 適用後 G1 後期進行の指標である Rb 蛋白質のリン酸化状態を免疫抗体染色を用いて検出したところ、細胞が死に至らない段階で Rb がリン酸化され、更に TSA (300 nM)及び olomoucine (100 μM)はいずれもこのリン酸化を抑制した。以上の結果より、本実験系においても細胞周期の再進行が確認されたものの、TSA の保護作用は細胞周期進行と異なる機構によるものであることが示唆された。

TSA の作用点を探るため、他の HDAC 阻害薬 suberoyl bis-hydroxamic acid (SAHA) の保護作用を検討した(Fig 2A)。SAHA は 1–30 μM の濃度域で CPT の細胞死に対し TSA と同等の保護作用を呈した。また、TSA (300 nM)の保護作用は CPT 曝露後 3 hr までに適用を開始すれば、共添加時と同等であった(Fig 2B)。また、Western blotting 法にて、TSA によりアセチル化ヒストン量が増加することが確認された(Fig 5A)。更に、各種 HDAC 阻害薬は CPT と同様、トポイソメラーゼ II 阻害薬 etoposide (ETP; 5 μM)の細胞死も抑制した。これらの結果より、TSA はトポイソメラーゼ阻害薬による細胞死に対し、単純な拮抗関係でなく、HDAC 活性の調節を介して保護作用を呈する事が示唆された。

Fig 2 HDAC 阻害薬の保護作用
**P<0.01 vs CPT or ETP



2. HDAC 阻害薬の下流で制御される神経保護因子の探索

HDACはクロマチン構造の変化を誘発し、種々の遺伝子発現を負に制御していることが知られている。脳由来神経栄養因子(BDNF)は中枢神経系において細胞の生存・分化を促進する重要な神経保護因子であり、HDACはメチル CpG 結合タンパク MeCP2 と複合体を形成することで BDNF の転写を負に調節しているとされる。以上の知見より、本実験系において HDAC 阻害薬の保護作用に BDNF が関与する可能性を検討した。BDNF の主要な受容体である Trk 型チロシンキナーゼ阻害薬 k252a (100-300 nM)の適用により、CPT、ETP の神経毒性に対し TSA の呈する保護作用は有意に阻害された(Fig 3A, B)。また、k252a (300 nM)の適用開始時間を変更したところ、CPT 曝露 4 hr までに適用開始すれば同等の抑制を示した(Fig 3C)。この時間経過は TSA による保護作用の場合とよく一致していた。更に BDNF 機能阻害抗体(3-10 $\mu\text{g/ml}$)の適用により k252a と同等の保護作用の抑制が観察された(Fig 3D)ことから、TSA の作用に BDNF-Trk 系の亢進が寄与することが考察された。

この仮説の傍証として、外因的に BDNF を適用することによって CPT、ETP の細胞死は有意に抑制された(Fig 4A, B)。k252a の共添加により BDNF の作用が完全に消失したことから、この保護作用は Trk 型受容体を介することが明らかとなった(Fig 4C, D)。TrkB の下流で活性化される主要な情報伝達系について検討したところ、MEK 阻害薬 PD98059 により保護作用は完全に消失

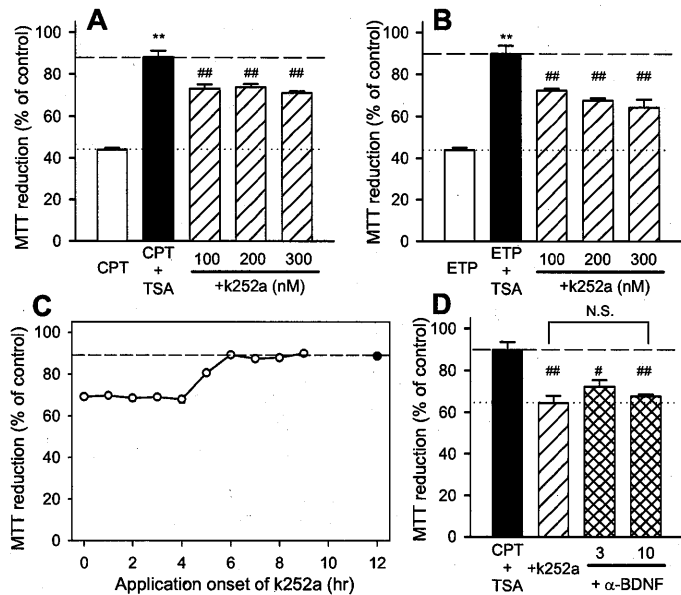


Fig 3 HDAC 阻害薬の保護作用は BDNF-Trk を介する

** $P < 0.01$ vs CPT or ETP, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs CPT+TSA or ETP + TSA

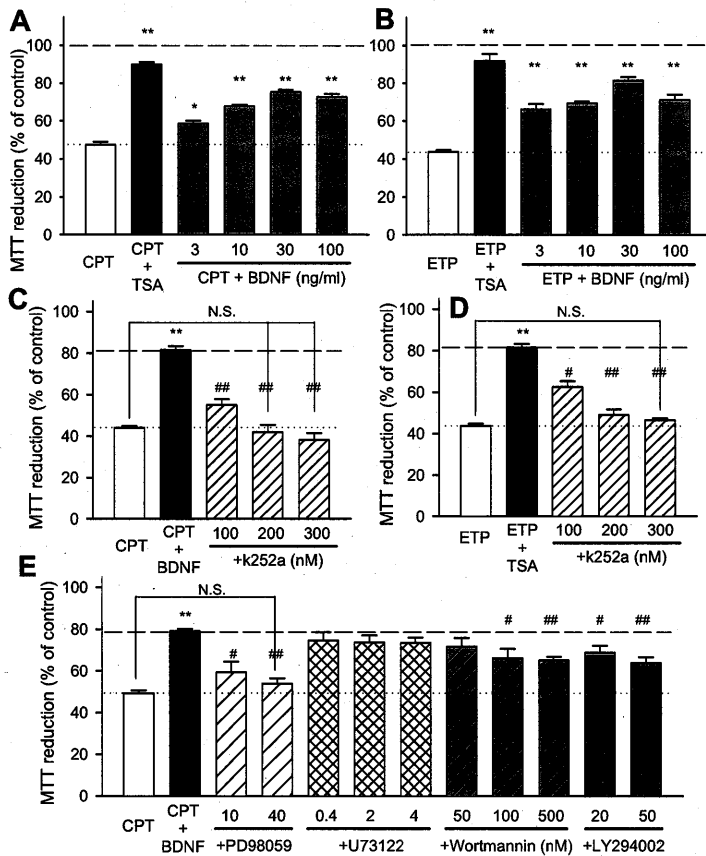


Fig 4 BDNF は CPT、ETP の毒性を軽減する

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CPT or ETP, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs CPT+BDNF or ETP+BDNF 単位は μM

し、PI3 キナーゼ阻害薬 Wortmaninn および LY294002 により部分的に抑制された。この結果から、本実験系での細胞生存の維持には MAPK 及び PI3K 系が重要な役割を果たすことが示唆され、神経細胞死における栄養因子除去モデルの場合とよく一致していた。

HDAC 阻害薬と BDNF の神経保護作用の関係を更に検討するため、Western blotting 法によりアセチル化ヒストン量を検出した(Fig 5A)。CPT 曝露後 4hr までにアセチル化ヒストン量の低下が観察された。この低下は BDNF(30 ng/ml)共添加により消失し、TSA(300 nM)により逆にヒストンの高アセチル化状態が検出された。アセチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、結合している BDNF の exon3, exon4 promoter 領域を検出したところ、CPT 適用により exon3, exon4 いずれの promoter でも結合の低下が観察され、TSA の共添加により通常の結合状態まで回復していた(Fig 5B)。BDNF の各 promoter 領域の活性化機構が異なることを考え合わせれば、CPT による細胞死においては HDAC を介して複数の機構により BDNF の転写が抑制され、TSA はその転写を活性化することで神経保護作用を呈するものと考えられた。

【総括】

本研究において、トポイソメラーゼ阻害薬の細胞死においてヒストン脱アセチル化が亢進し、その下流で BDNF の転写が抑制されることを初めて明らかとした。これまでの知見では中枢神経細胞においても増殖性細胞と同様の機構により細胞死が誘導されるものと考えられてきたが、本研究により BDNF 産生という神経細胞に特異的な機構を介した経路が神経細胞死に寄与することが初めて示唆された。

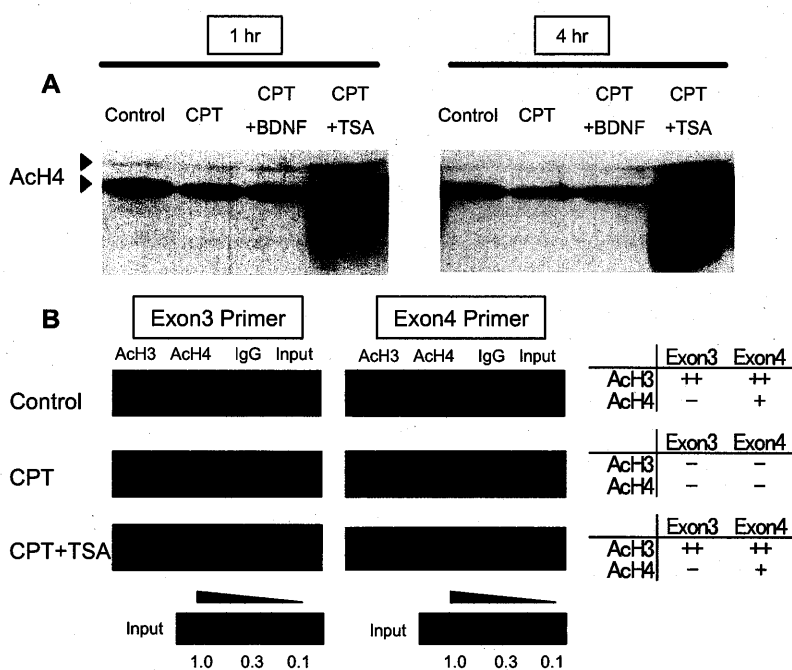


Fig 5 CPT により HDAC 活性が上昇し、BDNF の転写が抑制される

- A CPT (10 μM)、及び BDNF (30 ng/ml)あるいは TSA (300 nM)の共添加、1hr 後(左)、4hr 後の細胞抽出液を用い、抗アセチル化ヒストン H4 抗体を用いて検出した。
- B CPT (10 μM)あるいは TSA (300 nM)の共添加 4hr 後の細胞抽出液より抗アセチル化ヒストン H3 抗体(AcH3)および抗アセチル化ヒストン H4 抗体(AcH4)抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、exon3 promoter 及び exon4 promoter を認識する primer を用いて PCR により結合 DNA を検出した。