

審査の結果の要旨

氏名 馬場 敦

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 阻害薬である 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、典型的なアポトーシスを来すため、多くの研究がなされている。しかし、分裂を終え分化を終了した成熟神経細胞においても、CPT などの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異常進行が関与することが示唆されているものの、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、様々な遺伝子の転写を負に制御している。今までの研究で、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。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。実験にはラット胎仔の脳皮質より調製した初代培養神経細胞を用いた。

まず、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を検討した。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 による細胞死に対する、CDK 阻害薬 olomoucine と purvaranol A、更に細胞周期を停止させる HDAC 阻害薬 trichostatin A (TSA) の作用を検討した。両 CDK 阻害薬は CPT 曝露後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、細胞死に至らない段階で Rb がリン酸化され、更に TSA 及び olomoucine はいずれもこのリン酸化を抑制した。以上の結果より、CPT による細胞死においても細胞周期の再進行が確認されたが、TSA の神経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 以外の HDAC 阻害薬 suberoyl bis-hydroxamic acid も TSA と同程度に CPT による細胞死を抑制した。また、TSA の保護作用は CPT 曝露後 3 時間までに適用を開始すれば、共添加時と同等であった。Immunoblotting により、TSA によってアセチル化ヒストン量が増加することを確認した。更に、各種 HDAC 阻害薬は CPT と同様にトポイソメラーゼ II 阻害薬 etoposide 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。

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ている。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 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。また、k252a の適用開始時間を変更したところ、CPT 曝露 4 時間までに適用開始すれば同等の抑制を示した。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 機能阻害抗体の適用により k252a と同等の保護作用の抑制が観察されたことから、TSA の作用に BDNF-Trk 系の亢進が寄与することが考察された。

内因性の BDNF が関与していることの傍証として、外因的に BDNF 適用効果を検討したところ、CPT、ETP による細胞死は有意に抑制された。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。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。これらの結果から、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、Immunoblotting によりアセチル化ヒストン量を検出した。CPT 曝露後 4 時間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 共添加により消失し、逆に TSA により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状態にまで回復していた。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。

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。このように本研究は、神経細胞死のメカニズムやその保護に新しい視点を与えるものであり、博士(薬学)の学位に値すると判断した。