

B. 研究方法

まず、虚血性神経細胞死のメカニズムを解析するため、ラット新生児の海馬より神経細胞を分離し、低酸素 chamber に入れることにより低酸素負荷を加え、caspase-3 活性、ミトコンドリアからの cytochrome c release、Bcl-2 ファミリー及び ORP150 蛋白質量の定量を行った。

次に Bcl-2 及び ORP150 の培養系での機能を解析するため、各々の蛋白を発現する組み替えアデノウイルスベクターを作製し、低酸素負荷による神経細胞死を防ぎうるか否かにつき検討した。

さらに、生体内における ORP150 の機能を解析するため、ORP150 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、中大脳動脈閉塞モデルによる梗塞サイズと神経機能について検討した。

倫理面への配慮：本実験においては、全ての作業は深麻酔下で行われるため、動物に与える苦痛が最小限にとどめるよう配慮している。また、本実験から得られる成果はヒトの虚血による神経細胞死を防ぐ治療に結びつくものであり、動物が受ける侵襲と比べた場合、本実験の社会的意義は大きいと考えられる。

C. 研究結果

1. 低酸素による神経細胞死とアポトーシス

ラット胎生 18 日の大脳皮質より単離した培養神経細胞を低酸素 chamber に入れることにより低酸素負荷を加えると形態学的には TUNEL positive、また Hochst33258 により核の condensation 或いは fragmentation が見られた。また、この細胞死では実際に caspase の活性化が観察され、さらにこれらの阻害剤が低酸素による細胞死を抑制することがわかった。さらに、低酸素暴露した細胞よりミトコンドリア分画と細胞質分画を採取

し、各分画の cytochrome c の量を Western Blot にて検討するとミトコンドリアの cytochrome c 量が減少し、また細胞質の cytochrome c 量が増加しておりミトコンドリアから細胞質への遊離が起きていることがわかった。

2. 低酸素による細胞死と Bcl-2

低酸素暴露による cytochrome c の遊離及び caspase の活性化以前に Bcl-2 のタンパクレベルは低下するが Bax のタンパクレベルは変化しなかった。また、アデノウイルスベクターを用いた Bcl-2 の過剰発現は低酸素負荷による cytochrome c の遊離、caspase-3 の活性化及び細胞死を有意に抑制した。これらの事実より低酸素により Bcl-2 のタンパクレベルが低下し、この低下によりミトコンドリアより cytochrome c が遊離、その後 caspase-3 が活性化し、アポトーシスに至るパスウェイが考えられた。

3. 低酸素による細胞死と ORP150

ORP150 は小胞体に存在するシャペロンである。培養アストロサイトは低酸素負荷に対し耐性を示すが、一方培養神経細胞は低酸素により細胞死をきたす。この際、アストロサイトにおいては ORP150 が強く誘導されるが、神経細胞においては誘導が弱い。したがって、低酸素下で誘導される ORP150 が細胞の生存に重要な役割を果たしていると推測される。この可能性を立証する為に、初代培養神経細胞に強制的に ORP150 を発現させて、低酸素下での生存率について検討したところ、ORP150 の発現は低酸素によるアポトーシスを抑制することがわかった。

4. ORP150 の発現は虚血性神経細胞死を防ぐ

生体内における ORP150 の役割を検討するため ORP150 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。中大脳動脈閉塞モデルによる梗塞サイズを TTC 染色にて検討したところ、トランスジェニックマウスにおいて梗塞サイズの減少が認められ、また虚血後の神経学的スコアも改善した。

C. 考察

分化や発生、免疫細胞系にみられるアポトーシスを介した細胞死は、一般にミトコンドリアを起点とし、それに関するさまざまな因子が同定されている。本稿で概説したわれわれの結果も、低酸素による Bcl-2 タンパクレベルの低下がアポトーシスのトリガー担っていることを示しており、ミトコンドリアを起点とする従来の考えを支持する。しかしながら、それに加えて ORP150 の過剰発現が低酸素による細胞死を抑制するという事実は小胞体を起点とする細胞死の存在を示唆する。デング熱は神経細胞を侵すウイルス感染症であるが、培養神経細胞にデング熱ウイルスを感染させることにより未熟なウイルス構成タンパクが小胞体に蓄積し、細胞死を引き起こす可能性が報告されている。また、マクロファージなどの貪食細胞が取り込んだ変性蛋白・脂質などを処理する際に小胞体由来の活性酸素が細胞死を引き起こす可能性が報告されている。このように低酸素による神経細胞死においてミトコンドリアと小胞体、両者の機能変化がアポトーシスのトリガーになっている可能性がある。

E. 結論

以上より、ミトコンドリアに主に局在する Bcl-2 だけではなく、小胞体に局在する ORP150 が虚血耐性にとっての key factor であることがわかった。今後の研究方向として、小胞体とミトコンドリアのクロストーク、特に小胞体ストレスによる細胞死にミトコンドリアの機能変化が如何に関わっているかを明らかにすることが重要と思われる。また、遺伝子治療によって ORP150 の発現を上昇させておく、或いは ORP150 の発現を誘導させるような薬剤を開発することにより脳梗塞或いは脳血管性痴呆などの虚血性神経細胞死を原因とする疾患の治療となりうる可能性を期待するものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, Okado H, Miyake S, Vitek MP, Yamaguchi A, Tohyama M. A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of NFkB and Bcl-2. *J. Neurochem.* in press.
- 2) Che YH, Tamatani M, Tohyama M. Changes of mRNA for postsynaptic density 95 (PSD-95) and carboxy-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase (CAPON) following facial nerve transection. *Brain Res. Mol. Brain Res.* in press.
- 3) Bando Y, Ogawa S, Yamauchi A, Kuwabara K, Ozawa K, Tamatani M, Yanagi H, Tohyama M. The 150 kDa Oxygen-regulated protein (ORP150) functions as a novel molecular chaperone in the protein transport of the MDCK cells. *Am. J. Physiol.* in press.
- 4) Che YH, Tamatani M, Yamashita T, Gomi F, Ogawa S, Tohyama M. Changes in protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase mRNA following facial nerve transection. *J. Chem. Neuroanat.* 2000; 17:199-206.
- 5) Niitsu Y, Hori O, Yamaguchi A, Bando Y, Tamatani M, Ozawa K, Ogawa S, Tohyama M. Exposure of cultured primary rat astrocytes to hypoxia results in intracellular glucose depletion and induction of glycolytic enzymes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999; 74:26-34.
- 6) Matsuzaki H, Tamatani M, Mitsuda N, Namikawa K, Kiyama H, Miyake S, Tohyama M. Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 1999; 73:2037-2046.
- 7) Ozawa K, Kuwabara K, Tamatani M, Takatsuji K, Tsukamoto Y, Kobayashi T, Yanagi H, Stern DM, Ogawa S, and Tohyama M. ORP150 (150 kDa Oxygen-Regulated Proteins) suppresses hypoxia-

induced apoptotic cell death. J. Biol. Chem. 1999; 274:6397-6404.

- 8) Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H., Miyake S, Mizuno T, and Tohyama M. TNF Induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkB activation In primary hippocampal neurons. J. Biol. Chem. 1999; 274:8531-8538.

2. 学会発表

- 1) 1999年解剖学会（東京）虚血性神経細胞死における低酸素誘導蛋白 ORP150 の役割
- 2) 1999年解剖学会（東京）初代培養神経細胞において TNF は NFkB の活性化を介して Bcl-2 を誘導する
- 3) 1999年神経科学会（大阪）低酸素による神経細胞死のメカニズム:Bcl-2 ファミリーと ORP150 の役割
- 4) 1999年神経化学会（仙台）初代培養神経細胞において TNF は NFkB の活性化を介して Bcl-2 と Bcl-x を誘導する
- 5) 1999年神経化学会（仙台）NF kappa B の活性化は低酸素再酸素化後の神経細胞死を抑制する

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし