

A 研究目的

ニューロン、骨格筋細胞や骨細胞は分化に伴って細胞周期が停止するがその機構についてはよくわかっていない。Necdin は、325 個のアミノ酸からなる蛋白質で分裂終了したニューロン、骨格筋細胞軟骨細胞や脂肪細胞に発現している。Human Necdin 遺伝子は染色体 15q11-12 の Prader-Willi 症候群欠損領域に存在し、現在その原因遺伝子と考えられている。Prader-Willi 症候群はゲノムインプリンティングに関与した疾患で、hypogonadism やさまざまな発育障害を特徴としている。Necdin は maternal allele がゲノムインプリンティングされ、paternal allele のみから発現している。Necdin をさまざまな増殖細胞に強制発現させるとその増殖が抑制される。Necdin は、細胞周期に関与する転写因子である E2F1 や p53 と結合しそれらの転写活性を抑制する。また E2F1 や p53 によって誘導されるアポトーシスを抑制する。これらのことから Necdin は細胞増殖やアポトーシスを制御していることが考えられる。本研究においては骨肉腫細胞における核マトリックス上での Necdin と hnRNP U の結合について報告する。また hnRNP U によ

る Necdin の核マトリックスへの分布の変化が Necdin の細胞増殖抑制作用に関与していることを示し、骨肉腫細胞における Necdin の役割について解析した。

B 研究方法

1 酵母 two-hybrid assay

胚性がん P19 細胞より RNA を抽出し 2 本鎖 cDNA を合成し、GAL4 activation domain vector pGAD424 に挿入した。mouse Necdin cDNA (102-325) は GAL4 DNA binding domain vector pGBT9 に挿入した。pGAD424 と pGBT9 は酵母 SFY526 に遺伝子導入し、Leu⁻と Trp⁻ plates で選択した。β-galactosidase 陽性コロニーから plasmid を回収し塩基配列を決定した。また全長 hnRNP U cDNA は P19 細胞 λgt 10 cDNA library よりクローニングを行った。

2 in vitro 結合実験

さまざまな hnRNP U cDNA fragments を PCR にて調整し、pMAL C2 vector に subcloning し、マルトース結合蛋白質融合蛋白質を合成させた。MBP-hnRNP U 融合蛋白質は amylose resin にて精製した。His-tagged Necdin は Sf9 細胞より調整、精製した。MBP-hnRNP U を amylose resin に固定し、His-tagged

Necdin と 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、200 mM NaCl、1 mM EDTA 中で 4°C、30 分間反応させた。結合蛋白質を 20 mM マルトースで溶出し、SDS-PAGE を行い、Necdin に対する抗体で immunoblot で検出した。

3 遺伝子導入と細胞免疫染色

Myc-tagged hnRNP U deletion mutants は cDNA を PCR で合成し、6 X Myc tag pBluescript に挿入し、その後発現 vector pRc/CMV に subcloning した。遺伝子導入はカバーグラスの上に生育させた骨肉腫細胞 SAOS-2 cell へリン酸カルシウム法にて行った。細胞は遺伝子導入後 48 時間で 4% formaldehyde (pH 7.4) で 4°C、20 分間固定し、メタノールで室温 20 分間 permeabilize した。その後 anti-Myc 抗体、anti-Necdin 抗体、anti-Lamin B 抗体と室温 1 時間反応させた。核マトリックスにおける Necdin の局在の変化は、GFP-Necdin と Myc-tagged hnRNP U を共発現させ、Myc あるいは fibrillarin 抗体と共染色をおこなった。

4 核マトリックスの調整

核マトリックスの調整は、He らの方法によった。カバーグラスの上に生育

させた骨肉腫細胞 SAOS-2 cell をまず cytoskeleton buffer (10 mM Pipes (pH 6.8)、100 mM NaCl、300 mM sucrose、3 mM MgCl₂、1mM EGTA、0.5% Triton X-100、2 mM vanadyl ribonucleoside complex、1 X protease inhibitor cocktail and 1 mM PMSF) で 4°C、3 分間抽出した。次にクロマチンを RNase free DNase で消化し、さらに 0.25 M 硫酸で室温 10 分間、2 M NaCl で室温 5 分間抽出した。remnants は固定し免疫染色を行った。immunoblot 用の調整では、cell suspension を上記の方法で抽出し、各抽出間で 600 X g、3 分間の遠心を行った。

5 免疫沈降法による複合体の解析

骨肉腫細胞 SAOS-2 cell に Necdin と Myc-tagged hnRNP U を強制発現させ、遺伝子導入後 48 時間で細胞を回収し、CSK buffer で細胞を抽出し水溶性蛋白質を除去後、沈殿を 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、200 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1% SDS で抽出し免疫沈降に用いた。抽出液を anti-Myc 抗体あるいは anti-Necdin 抗体と 4°C、2 時間反応させ、複合体を Protein A-Sepharose で沈降させ、SDS-PAGE buffer で溶出した。内在性の Necdin と hnRNP U 複合体の検出には HiTrap NHS-activated

affinity column に Necdin あるいは hnRNP U 抗体 IgG を couple させて用い 0.1 M glycine-HCl (pH 2.5) で溶出させて検出した。

6 細胞増殖 assay

骨肉腫細胞 SAOS-2 cell を用いて colony formation assay を行った。SAOS-2 cell に Necdin、hnRNP U あるいは両者を遺伝子導入を行い、48 時間後より G418 を培養液に加えた。10 日後に細胞を固定し 0.4% crystal violet で染色した。また同細胞にさらに pMSCV-puro も遺伝子導入を行い細胞を puromycin で選択した。48 時間後細胞を 10 μ M BrdU で 4 時間反応させ、20 mM glycine-HCl (pH 2.0) を含む 70% ethanol で固定し、anti-BrdU 抗体で染色し BrdU 陽性細胞の割合を算出した。本研究においては、ヒト遺伝子は使用しておらず、また遺伝子改変は、金沢大学組み換え DNA 実験の承認を得たものである。

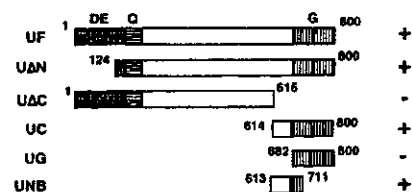
C 研究結果

1 Necdin と hnRNP U の結合

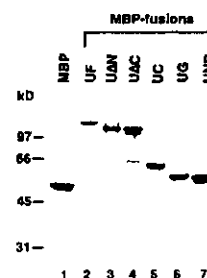
Necdin (102-325) を bait として、胚性がん P19 細胞より作製した cDNA library を酵母 two-hybrid 法でスクリーニングし、hnRNP U を Necdin 結合蛋

白質として同定した。全長 hnRNP U cDNA は P19 細胞 λ gt 10 cDNA library よりクローニングを行った。全長 hnRNP U cDNA は 800 個のアミノ酸からなり報告された塩基配列と一致した。hnRNP U の Necdin 結合領域を決定するためにさまざまな MBP-hnRNP U 融合蛋白質を作成し in vitro 結合実験を行った (Fig 1A)。精製した各融合蛋白質は予想される分子量を示した (Fig 1B)。結合実験では、MBP-UF (1-800) と N 末端を欠失させた U Δ N (Δ 1-123) は Necdin と結合したが、C 末端を欠失させた U Δ C (Δ 616-800) とは結合しなかった。このことから C 末側に Necdin 結合領域が存在していることが示唆された。さらに C 末端の UC (614-800) と UG (682-800) について調べたところ Necdin は UC とは結合したが UG とは結合せず、また実際 UNB (613-711) と Necdin は結合することが示された。

A



B



C

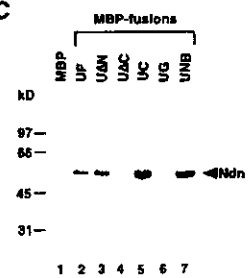


Fig 1 In vitro binding assay for interaction between necladin and hnRNP U. A Diagram of hnRNP U deletion mutants. Full-length hnRNP U (UF, U1-800) and its deletion mutants (U Δ N, U124-800, U Δ C, U1-615, UC, U614-800, UG, U682-800, UNB, U613-711) were produced as MBP-fusion proteins and used for in vitro binding assay. B Expression of MBP-hnRNP U fusion proteins. Purified MBP fusion proteins of hnRNP U deletion mutants (MBP-fusions) were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. Molecular size markers in kDa are at the left. C In vitro binding assay. Purified MBP fusion proteins were immobilized on amylose resin and incubated with His-tagged necladin. Bound His-tagged necladin (Ndn) was eluted by maltose and immunoblotted with antibody C2.

2 核マトリックスにおける Necladin と hnRNP U 複合体

内在性の Necladin および hnRNP U の核マトリックスへの局在を調べるため、まず MBP-hnRNP U (614-800) 融合蛋白質を抗原にして hnRNP U 抗体を作製した。hnRNP U 抗体は、SAOS-2 cell において発現させた Myc-tagged hnRNP U および内在性 120 kDa hnRNP U を認識した (Fig 2A)。P19 細胞を細胞質と核に分画したところ、45 kDa Necladin は細胞質と核両者に発現し、120 kDa hnRNP U は核に主に発現していた (Fig 2B)。次に核マトリックスでの局在を immunoblot 法で検出した (Fig 2C)。

Triton X-100 で抽出される画分には Necladin の 70%、また 10%が核マトリックス画分に存在した。それに対して hnRNP U の 30%が核マトリックス画分に存在した。核マトリックスの主成分のひとつである Lamin B はほとんどが核マトリックス画分に存在した。また細胞免疫染色においても Necladin、hnRNP U、Lamin B とともに核マトリックスへの局在が確認された (Fig 2D)。

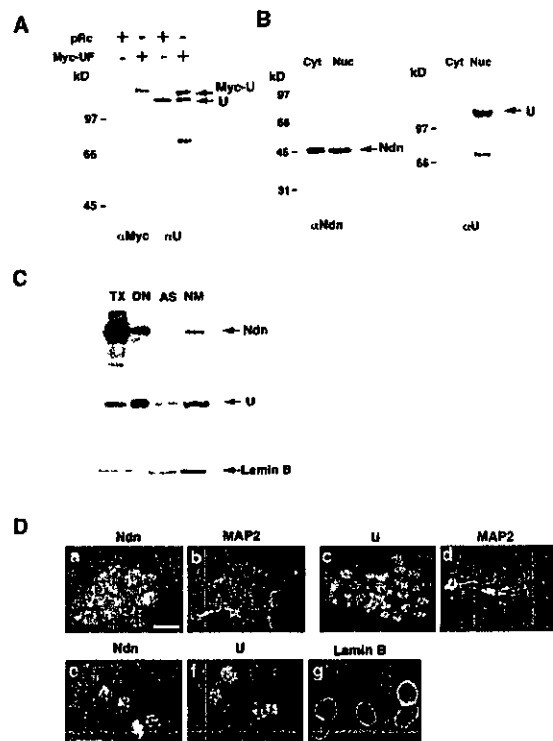


Fig 2 Association of hnRNP U and necladin with neuronal nuclear matrix. A Specificity of anti-hnRNP U antibody. HUT Cell lysates were prepared from SAOS-2 cells transfected with pRc/CMV (pRc) or pRc-Myc-hnRNP U (Myc-UF). Exogenous Myc-tagged hnRNP U (Myc-U)

and endogenous hnRNP U (U) proteins were detected by immunoblotting with anti-Myc antibody (α Myc) or HUT (α U). B Nuclear localization of necdin and hnRNP U. Necdin (Ndn) and hnRNP U (U) in the cytoplasmic (Cyt) and nuclear (Nuc) fractions of P19 neurons were detected by immunoblotting with NC243 (α Ndn) and HUT (α U). C Association of necdin and hnRNP U with neuronal nuclear matrix. The nuclear matrix was prepared from suspended P19 neurons by the sequential extraction procedure. Necdin (Ndn), hnRNP U (U) and lamin B in extracted fractions were detected by immunoblotting with NC243, HUT and anti-lamin B antibody, respectively. Lanes (samples extracted or digested with) TX, 0.5% Triton X 100, DN, 25 U/ml DNase, AS, 0.25 M ammonium sulfate, NM, nuclear matrix fraction after with 2 M NaCl. D Fluorescence immunocytochemistry. P19 neurons were labeled with NC243 for necdin (Ndn) (a) or with HUT for hnRNP U (U) (c) in combination with anti-MAP2 antibody for MAP2 (b,d). The nuclear matrix was prepared in situ and labeled for necdin (Ndn) (e), hnRNP U (U) (f), and lamin B (g). Scale bars (in a for a±d), 20 μ m, (in e for e-g), 10 μ m.

次に *in vivo* における Necdin と hnRNP U 複合体を調べるためまず遺伝子導入を行った SAOS-2 cell を用いて免疫沈降を行った (Fig 3A)。Myc 抗体で免疫沈降を行うと Necdin が Myc-hnRNP U と共沈されたが、Necdin 結合ドメイン

を欠いた Myc-U Δ ND とは共沈しなかった。反対に Necdin 抗体によって Myc-hnRNP U が共沈された。内在性の Necdin と hnRNP U 複合体を調べるため P19 細胞より核抽出液を調製し、hnRNP U 抗体あるいは Necdin 抗体 IgG を couple させた immunoaffinity column を用いた (Fig 3B)。Necdin 抗体 column からは 45 kDa Necdin と 120 kDa hnRNP U の結合が確認され、hnRNP U 抗体 column からも 120 kDa hnRNP U と 45 kDa Necdin の結合が確認された。これらのことから Necdin と hnRNP U が *in vivo* で複合体を形成していることが考えられた。

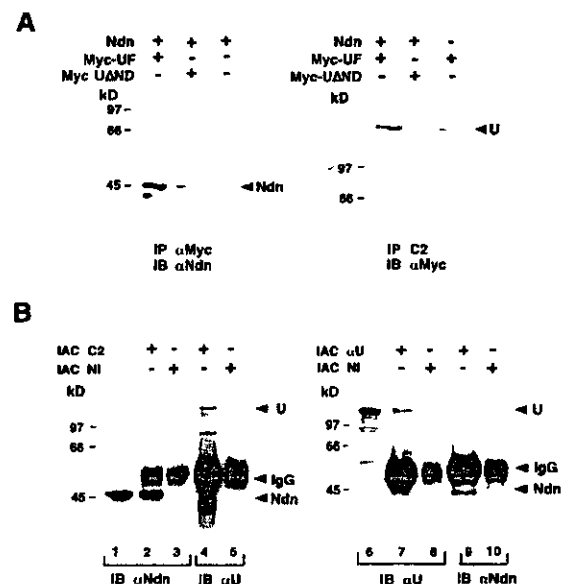


Fig 3 Interactions *in vivo* between necdin and hnRNP U. A Immunoprecipitation of the necdin-hnRNP U complex. SAOS-2 cells were transfected with expression vectors

for necdin (Ndn), Myc-hnRNP U (Myc-UF) and Myc-hnRNP U Δ 613-684 (Myc-U Δ ND) in combination, and the nuclear extract were immunoprecipitated. Left, immunoprecipitation (IP) with anti-Myc antibody (α Myc) and detection (IB) with NC243 (α Ndn). Right, immunoprecipitation with anti-necdin antibody C2 and detection with anti-Myc antibody B. Detection of endogenous necdin-hnRNP U complexes in neuronal nuclear extracts. Nuclear extracts prepared from P19 neurons were applied to the immunoaffinity column (IAC), and endogenous necdin (Ndn) and hnRNP U (U) in purified samples were detected by immunoblotting. Left, immunoaffinity column coupled with anti-necdin IgG (C2) (lanes 2 and 4) and detection (IB) with NC243 (α Ndn) or HUT (α U). Right, immunoaffinity column (IAC) of HUT IgG (α U) (lanes 7 and 9) and detection (IB) with HUT (α U) or NC243 (α Ndn). Lanes 1 and 6, 1/20 of the nuclear extracts, lanes 3, 5, 8 and 10, nonimmune IgG (NI) for negative controls.

3 hnRNP U の核マトリックスへの局在

hnRNP U の核マトリックスへの局在に関与する領域を調べるため、SAOS-2 cell へさまざまな Myc-tagged hnRNP U を発現させ、核マトリックスを *in situ* で調製した (Fig 4)。NLS (nuclear localization signal、218-226) を含むすべての hnRNP U は核に局在していた。NLS を欠失した UC (614-800) は主

に核に局在したが細胞質にも存在した。全長 hnRNP U および C 末端側を含む U Δ N (Δ 1-123)、UC (614-800) は核マトリックスに局在していた。それに対して C 末端側を欠いた U Δ C (Δ 616-800) や U Δ GT (Δ 712-800) は核マトリックスに発現していなかった。このことから hnRNP U の C 末端側 712-800 の領域に核マトリックス結合ドメインが存在すると考えられた。また Necdin 結合ドメインを欠いた U Δ ND (Δ 613-684) は核マトリックスへ局在していたことから、両ドメインはことなっていると考えられた。同様の抽出操作によって Necdin は核マトリックス上で speckle 状に存在し、核マトリックスの主成分である Lamin B は核ラミナに発現していた。さらに hnRNP U や Necdin の核マトリックスへの局在を immunoblot で確認した (Fig 4B)。上記結果と同じく全長 hnRNP U および C 末端側を含む UN (Δ 1-123)、UC (614-800)、U Δ ND (Δ 613-684) は核マトリックスに局在し、C 末端側を欠いた U Δ C (Δ 616-800) や U Δ GT (Δ 712-800) はほとんどが Triton X-100 抽出画分に存在した。Necdin は 20% が、また Lamin B はそのほとんどが核マトリックスに局在した。

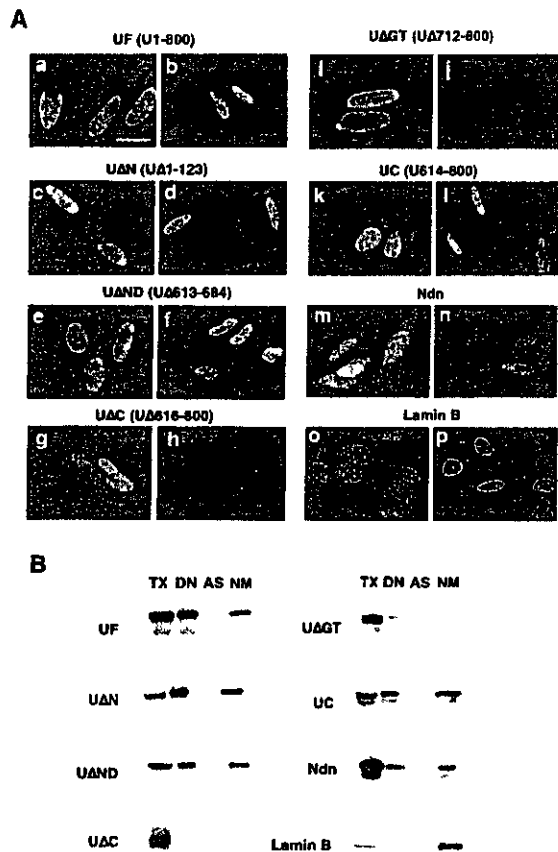


Fig 4 hnRNP U associates with the nuclear matrix through its COOH-terminal region A hnRNP U and neccdin in the nuclear matrix in situ SAOS-2 cells were transfected with pRc/CMV vectors expressing Myc-tagged fusions of hnRNP U deletion mutants (UF U1-800, U Δ N, U Δ 1-123, U Δ ND U Δ 613-684 U Δ C, U Δ 616-800, U Δ GT, U Δ 712-800 UC U614-800) and neccdin (Ndn) Cells were stained with anti-Myc antibody, NC243 or anti-lamin B antibody (a, c, e, g, i, k, m and o) After in situ sequential extraction of the nuclear matrix cells were stained with the same antibodies (b, d, f, h, j, l, n, and p) Scale bar (in a for a-p), 20 μ m B Immunoblot analysis The nuclear matrix

was prepared by the sequential extraction from transfected SAOS-2 cells, and volumetric equivalents of the extracted preparations were immunoblotted with anti-Myc antibody, NC243 or anti-lamin B antibody Lanes (samples extracted or digested with) TX, 0.5% Triton X 100, DN, 25 U/ml DNase, AS, 0.25 M ammonium sulfate, NM, nuclear matrix fraction after extraction with 2 M NaCl

4 Necdin と hnRNP U 共発現による核マトリックス上での局在

hnRNP U との共発現による核マトリックス上での Necdin の分布の変化を調べるため、GFP-Necdin を用いた (Fig 5A)。GFP-Necdin は単独では核マトリックス上では核小体に局在し、fibrillarin と局在が一致した。Myc-hnRNP U と共発現すると Necdin は核マトリックス全体に分布し、hnRNP U の局在と一致した。Necdin 結合ドメインを欠いた U Δ ND (Δ 613-684) にはそのような活性は認められなかった。hnRNP U との共発現では 80% の細胞で Necdin は核マトリックス全体に分布したが、U Δ ND や核マトリックス結合ドメインを欠いた U Δ GT との共発現ではそれぞれ 16% と 4% であった。

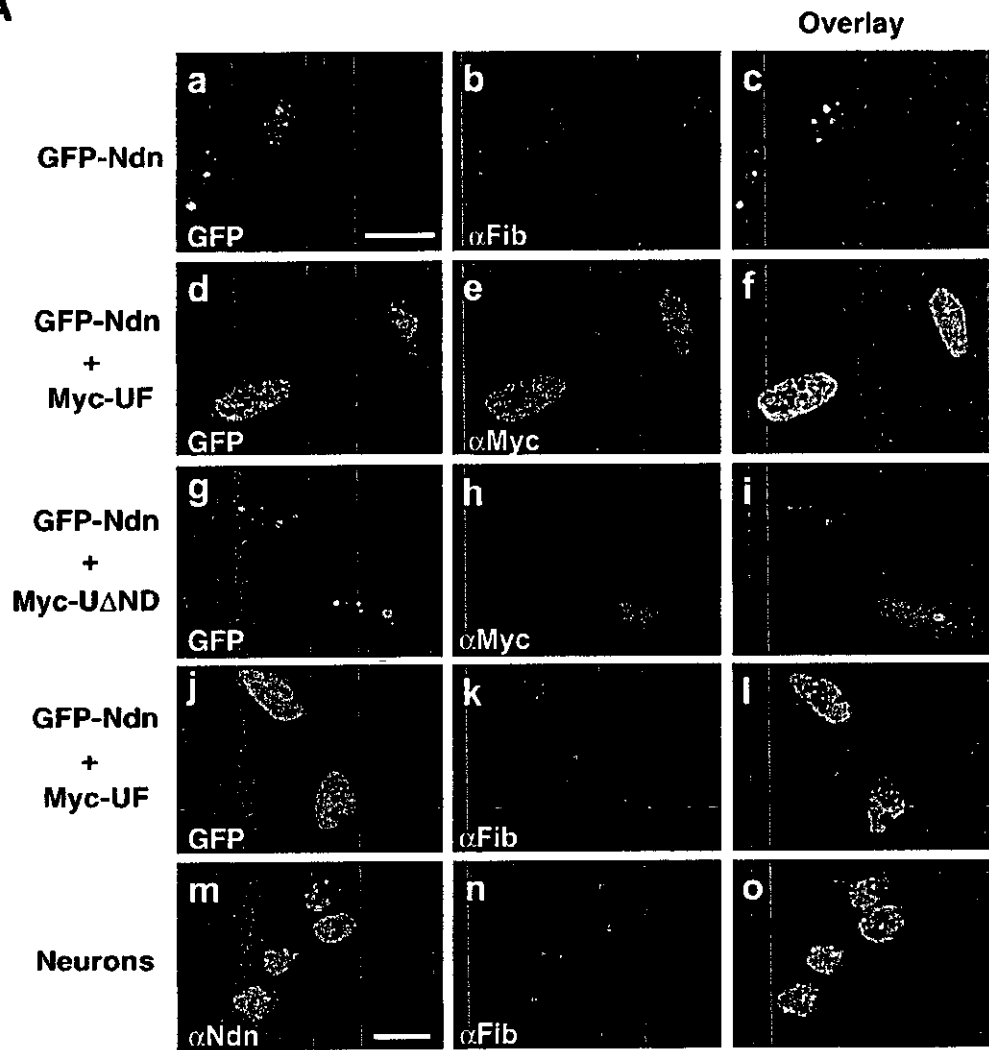
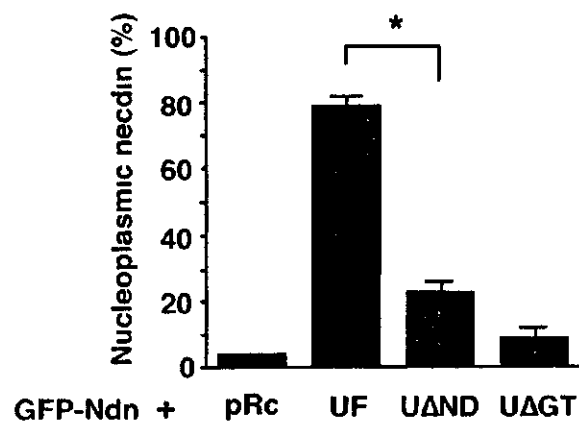
A**B**

Fig 5 hnRNP U recruits necdin to the nucleoplasmic matrix A Translocation of necdin by coexpressed hnRNP U SAOS-2 cells were transfected with combinations of expression vectors for GFP-necdin (GFP-Ndn) (a-l), Myc-hnRNP U (Myc-UF) (d-f and j -l), and Myc-hnRNP U Δ 613-684 (Myc-U Δ ND) (g-i) The nuclear matrix was prepared in situ, immunostained for fibrillar in (α Fib) (b and k, red) or Myc-tag (α Myc) (e and h, red), and observed by fluorescence microscopy GFP, fluorescence of GFP-necdin fusion protein The nuclear matrix of P19 neurons (Neurons) (m-o) was double-labeled with NC243 (α Ndn) (m, green) and anti-fibrillar in antibody (α Fib) (n, red) The images are merged for colocalization (Overlay) Scale bars (in a for a-l) 20 mm, (in m for m-o) 10 mm B Quantification of nucleoplasmic necdin translocated by coexpressed hnRNP U GFP-necdin (GFP-Ndn) was transfected in combination with expression plasmids encoding Myc-hnRNP U (UF) Myc-hnRNP U Δ 613-684 (U Δ ND), Myc-hnRNP U Δ 712-800 (U Δ GT) or pRc/CMV empty vector (pRc) into SAOS-2 cells After the nuclear matrix was prepared in situ, cells showing translocated GFP-necdin were scored in GFP positive cells Each value represents the mean \pm SEM (n=3) * significant at <0.05

5 Necdin と hnRNP U による協調的細胞増殖抑制

次に Necdin と hnRNP U による細胞増殖への影響について colony formation

assay を行った (Fig 6AB)。両者の協調的細胞増殖抑制を調べるため Necdin 単独での作用のほとんどない発現量で実験を行った。この条件では Necdin 単独で 25%、hnRNP U 単独で 7% の抑制であった。それに対して hnRNP U と Necdin の共発現では 90% 以上の抑制が認められた。しかしながら Necdin 結合ドメインを欠いた U Δ ND (Δ 613-684) や核マトリックス結合ドメインを欠いた U Δ GT (Δ 712-800) との共発現ではそのような抑制効果は認められなかった。さらに BrdU incorporation assay で Necdin と hnRNP U による協調的細胞増殖抑制を確認した (Fig 6C)。上記結果と同じく hnRNP U と Necdin の共発現では有意な BrdU 陽性細胞の減少が認められたが、U Δ ND (Δ 613-684) や U Δ GT (Δ 712-800) との共発現ではそのような抑制効果は認められなかった。

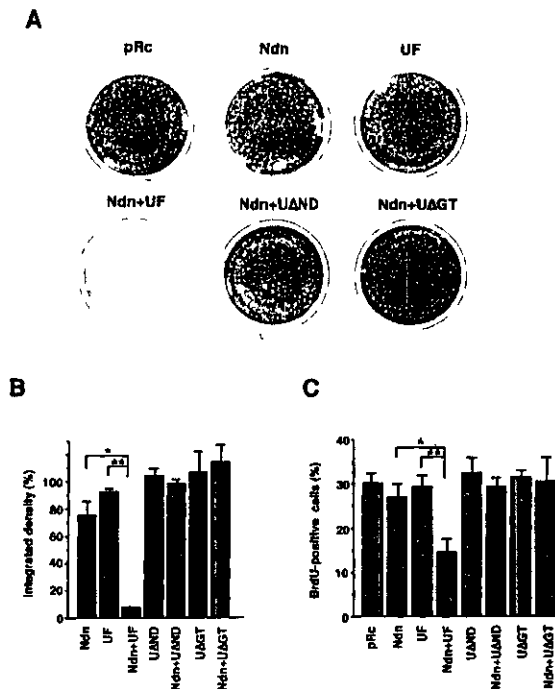


Fig 6 Co-operation between neccdin and hnRNP U in cell growth suppression **A** Colony formation assay SAOS-2 cells were transfected with empty pRc/CMV vector (pRc), pRc-neccdin (Ndn) or pRc-Myc-hnRNP U (UF) pRc-neccdin was transfected in combination with pRc-Myc-hnRNP U (Ndn + UF), pRc-Myc-hnRNP U Δ 613-684 (Ndn + U Δ ND) or pRc-Myc-hnRNP U Δ 712-800 (Ndn + U Δ GT) Cells were cultured in the presence of G418 for 10 days and the drug-resistant colonies were stained with crystal violet **B** Quantification of the colony formation Integrated densities of stained colonies of transfected SAOS-2 cells are presented Each value represents the mean \pm SEM (n=3) (the value of pRc = 100%) * and ** significant at <0.02 and <0.01, respectively **C** BrdU incorporation assay SAOS-2 cells were transfected with expression vectors and pMSCV- puro, and puromycin-resistant transfectants

were labeled with BrdU BrdU-positive cells were counted among >100 cells Each value represents the mean \pm SEM (n=3) * and ** significant at <0.05 and <0.01, respectively

D 考察

本研究において Neccdin と hnRNP U の機能的な結合について明らかとなった。Neccdin は、hnRNP U の 613-711 の領域で結合することが明らかとなったが、hnRNP U はさらに RGG box (695-716) で RNA と結合することが報告されている。また hnRNP U は核マトリックスに局在することが報告され、本研究によって 613-800 の領域がそのトメインであることが明らかとなった。したがってこれらの機能ドメインは異なっていることが考えられる。染色体は、SAR/MAR (scaffold/matrix attachment region) と呼ばれる DNA element で核マトリックスに anchoring されている。hnRNP U は N 末端側の SAF box で、SAR/MAR に結合することが報告されている。したがって hnRNP U が N 末で染色体に、また C 末で核マトリックスへ橋渡ししていることが推測される。本研究において Neccdin と hnRNP U による協調的細胞増殖抑制が示され、またその際には核マトリックス上で Neccdin の分布の変化

が観察された。SAF box を欠いた U Δ N (Δ 1-123)にはこのような協調的作用がないことから (data not shown)、hnRNP U の染色体との相互作用がこの協調的作用に必須であると考えられる。Necdin と同様の細胞増殖抑制能を有する Rb もまた核マトリックス蛋白質である hBRM/hBRG1 との結合がその作用に必須でありことが報告されている。Necdin と hnRNP U の核マトリックスでの相互作用もまた染色体の高次構造の変化を伴い、そのことが細胞分化と密接に連携しているかもしれない。

F 研究発表

1 論文発表

N Kuramoto, K Baba, K Gion, C Sugiyama, H Taniura and Y Yoneda (2002) Xenobiotic response element binding enriched in nuclear and microsomal fractions of rat cerebellum J Neurochem 85, 264-273

M Kobayashi, H Taniura and K Yoshikawa (2002) Ectopic expression of necdin induces differentiation of mouse neuroblastoma cells J Biol Chem 277, 42128-42135

E Hinoi, S Fujimori, T Takarada, H Taniura and Y Yoneda (2002) Facilitation of glutamate release by ionotropic glutamate receptors in osteoblasts Biochem Biophys Res Commun 297, 452-458

Taniura and K Yoshikawa (2002) Necdin interacts with the ribonucleoprotein hnRNP U in the nuclear matrix J Cell Biochem 84, 545-555

2 学会発表

谷浦秀夫、桑島孝明、吉川和明 (2002) Necdin 相同性蛋白質 Dixin-1 による E2F1 依存性ニューロン死の促進作用について。第 102 回日本薬理学会近畿部会、岡山、11 月 15 日

桑島孝明、谷浦秀夫、吉川和明 (2002) Dixin-1, a necdin/MAGE homologous protein, enhances E2F1-induced neuronal apoptosis 第 45 回日本神経化学会、札幌、7 月 17 日

高崎理紗、植月太一、谷浦秀夫、吉川和明 (2002) E2F1 に誘導されるニューロンの細胞死に対する Necdin の抑制作用。第 45 回日本神経化学会、札幌、7 月 18 日

谷浦秀夫、福永典子、植月太一、吉川和明 (2002) Negative regulation of

neural progenitor cell
proliferation by neclin 第 45 回日本
神経化学会、札幌、7 月 18 日

杉山千絵、谷浦秀夫、米田幸雄 (2003)
ラット初代培養神経細胞における代
謝型グルタミン酸レセプター活性化
の影響 第 123 年会日本薬学会、長崎、
3 月 27 日

倉本展行、祇園景子、眞田法子、谷浦
秀夫、米田幸雄 (2002) XRE 結合蛋白
質のラット小脳ミクロソーム画分に
おける局在性 第 25 回日本分子生物
学会年会、横浜、12 月 13 日

眞田法子、祇園景子、倉本展行、谷浦
秀夫、米田幸雄 (2002) ラット小脳ミ
クロソーム画分における XRE 結合蛋白
質局在の可能性 第 32 回日本神経精
神薬理学会年会、群馬、10 月 18 日

伊藤実、祇園景子、倉本展行、谷浦秀
夫、米田幸雄 (2002) ラット小脳由来
初代培養神経細胞の XRE 結合能に対す
る内因性 AhR リガンドの影響 第 32
回日本神経精神薬理学会年会、群馬、
10 月 18 日

厚生労働科学研究費補助金(効果的医療技術の確立推進臨床研究事業)
分担研究報告書

研究課題「骨細胞再生を基礎とする骨及び関節治療薬の開発研究」
(主任研究者 米田幸雄)

分担研究課題「NMDA 受容体を介した神経細胞および骨系細胞の保護作用に関する研究」

分担研究者 荻田喜代一 (摂南大学薬学部 助教授)

研究要旨 N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) は、神経細胞死を誘発するばかりでなく、神経細胞保護作用を有することか細胞培養系を用いた実験により見出されている。しかしながら、生体内における NMDA の神経細胞保護作用についてはほとんど不明である。したがって、本研究では NMDA の神経細胞死防御作用についてインビボ系を用いて解析した。ddY 系雄性マウスにカイニン酸 (30 mg/kg) を腹腔内投与し、一定時間経過後に灌流固定を行った。パラフィン包埋後の海馬冠状切片について、神経細胞死および細胞核内 DNA の断片化を、それぞれニッスル染色法および抗 single-stranded DNA (ssDNA) 抗体を用いた免疫染色法により解析した。カイニン酸投与後 7 日において、海馬 CA1 領域および CA3 領域に神経細胞死が観察された。また、抗 ssDNA 抗体陽性細胞は、カイニン酸投与後 6 時間で CA3 錐体細胞にのみ観察され、投与後 3 日では CA3 および CA1 に抗 ssDNA 抗体陽性細胞が見出された。一方、未処置および NMDA (100 mg/kg) 単独投与動物では、神経細胞死および抗 ssDNA 抗体陽性細胞のいずれも観察されなかった。カイニン酸投与 1 日前に NMDA を前投与すると、CA1 および CA3 の錐体細胞死がほぼ完全に抑制された。この NMDA の細胞死抑制効果は濃度依存的であった。また、NMDA の効果は NMDA 投与後 1 時間から見られるが、投与後 1 日で最も強力であった。しかしながら、NMDA 投与後 4 日目以降では本効果は観察されなかった。さらに、NMDA 前投与はカイニン酸による抗 ssDNA 抗体陽性細胞の発現をほぼ完全に抑制した。以上の結果より、NMDA レセプターの活性化は、カイニン酸誘発性神経細胞死を抑制することが示唆される。また、NMDA は骨系細胞の保護作用をもつ可能性も考えられ、骨系細胞のグルタメイト受容体が骨保護作用に関与することも推察される。

A 研究目的

グルタミン酸は、中枢神経系において主要な興奮性神経伝達物質として働くばかりでなく、記憶形成や学習の生理学的モデルである長期増強現象および長期抑圧現象のようなシナプスの可塑性形成に関与することか知られる (Ghosh and Greenberg, 1995, Katz and Shatz, 1996)。一方、過剰なグルタミン酸はグルタミン酸受容体の過剰興奮およびシスチン/グルタミン酸交換

輸送体の抑制を介して神経細胞障害を起こすことも知られる。すなわち、細胞外グルタミン酸濃度の上昇か、脳虚血、てんかんおよび脳外傷などの急性神経障害およびアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症およびハンチントン病などの慢性神経変性疾患における神経細胞死の共通の機序の一つであると考えられる (Olney, 1978, Choi, 1988, Meldrum and Garthwaite, 1990, Lipton, 1992)。

グルタミン酸受容体は、シクナル応答機

序により代謝調節型とイオンチャネル内蔵型の2種類に分類される (Hollmann and Heinemann, 1994, Schoepfer et al, 1994)。さらに、代謝調節型受容体は Gq 蛋白と共役してホスファチシルイノシトールリン酸の加水分解を調節するグループ I 受容体および Gi 蛋白と共役して cyclic AMP 濃度の低下を引き起こすグループ II・III 受容体に分類される。一方、イオンチャネル内蔵型受容体は3種類の外因性特異的作用薬である N-methyl-D-aspartate (NMDA)、 α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate およびカイニン酸に対する感受性の相違に基づいて分類される。

NMDA 受容体は、グルタミン酸誘発性神経細胞障害の中心的役割を演じている。NMDA 受容体チャネルは通常 Mg^{2+} で遮断されているが、興奮性膜電位変化により Mg^{2+} ブロックが解除されて細胞内への Ca^{2+} 流入が引き起こされる。NMDA 受容体の活性化に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、細胞内の種々の Ca^{2+} 依存性酵素を活性化する。すなわち、phospholipase C、phospholipase A_2 、および calpain などの活性化による細胞膜および細胞骨格蛋白の分解および endonuclease の活性化による DNA の断片化などによって細胞構造を破壊すると考えられる。また、 Ca^{2+} 濃度上昇は一酸化窒素合成酵素を活性化して一酸化窒素の産生を促進する。神経細胞は一酸化窒素と活性酸素ラジカルにより生成された peroxynitrite により障害されるという (赤池, 1995)。さらに、protein kinase (protein kinase C や Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase) および protein phosphatase なども Ca^{2+} により活性化され、細胞核内転写制御因子 [cAMP-response element binding protein、activator protein-1(AP-1) および nuclear factor κ B (NF κ B) など] を活性化すると考えられる。このように、特定遺伝子の発現制御が神経細胞障害メカニズムに何らかの関与を持つ可能性も考えられる (米田、荻田、1997)。phospholipase A_2 の活性化は、アラ

キドン酸およびその代謝産物 (プロスタグランジン類やプロスタサイクリンなど)、あるいは血小板活性化因子 (platelet-activation factor) の産生を促進することが知られる。アラキドン酸は、NMDA 受容体の活性化 (Miller et al, 1992)、アストロサイトおよび神経細胞へのグルタミン酸再取り込みの抑制 (Volterra et al, 1992) およびシナプス前膜上の代謝調節型グループ I 受容体を介するグルタミン酸放出の促進 (Nicoletti et al, 1999) などを引き起こす。また、血小板活性化因子は細胞内 Ca^{2+} 濃度をさらに増加させる (Bito et al, 1992)。これらの現象はすべて細胞内 Ca^{2+} 濃度をさらに上昇させる。このように、NMDA 受容体活性化による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の増幅が細胞破壊につながると考えられる。この細胞破壊がさらに細胞外グルタミン酸濃度の上昇を引き起こして、連鎖的に細胞障害が広がると思われる。

カイニン酸は、急性または亜急性のてんかん様発作を引き起こすが、それに続いて中枢神経系の神経細胞やグリア細胞、ミエリン鞘および血管などにおいて不可逆的な病理学的変化を誘発する強力な興奮毒である (Sperk, 1994)。カイニン酸の腹腔内投与は、マウスやラットにおいて主に辺縁系に神経障害を伴う痙攣を誘発する。特に、海馬錐体神経細胞はカイニン酸による興奮毒性に対して極めて脆弱である (Sperk et al, 1983)。ゲッ歯類におけるカイニン酸誘発性発作は、行動学および病理学的相同性のためヒトにおける側頭葉てんかんのモデルとして広く使われている (Ben-Ari, 1985)。これらのカイニン酸誘発性障害は、カイニン酸受容体活性化による細胞内 Ca^{2+} の上昇に起因すると考えられる。すなわち、カイニン酸受容体の活性化は、膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルを開放して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、上記の Ca^{2+} 依存性の反応を起こして神経細胞死を誘発すると考えられる。

本研究では、NMDA 受容体の新規生理的

役割を追究する一貫として、カイニン酸誘発性海馬内神経細胞死におけるNMDA受容体の役割についてインヒボ実験による解析を行った。その結果、NMDA受容体の活性化はカイニン酸による神経細胞死を選択的に抑制することが明らかとなった。このように、NMDA受容体の活性化は神経細胞死を誘発するばかりでなく、神経細胞障害の防御機構にも関与する可能性が示唆される。

B 研究方法

1 動物飼育

実験動物は、すべて日本薬理学会動物実験指針にのっとり、摂南大学薬学部動物委員会規約に基づいて行った。5週齢のStd-ddY系雄性マウス(20-35 g)を、自由摂食および摂水下、気温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ および湿度 $55 \pm 2\%$ で、7時から19時までの明期および19時から翌朝7時までの暗期をもつ明暗サイクル下で飼育した。

2 薬物投与

投与薬物は、使用当日に phosphate buffered saline (PBS) に溶解したのち、体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で腹腔内投与した。NMDA およびカイニン酸は、それぞれ 100 mg/kg および 30 mg/kg の用量で投与した。薬物動態には概日リズムが存在するので、いずれの場合も9時から16時の間に投与した。

3 組織の固定と包埋

マウスをペントバルビタール (250 mg/kg, i.p.) による全身麻酔下で開胸し、右心耳を切開後に左心室に注射針を挿入した。ペリスタポンプを用いて 8 mL/min の流速で生理食塩水を灌流させ脱血後、0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) で溶解した 4% paraformaldehyde (PFA) を体重 10 g あたり 15 mL の割合で灌流した。摘出した脳は、PFA で 4°C 、一晩の後固定が行われた。後固定後の標本を細切し、流水洗浄を1時間行った。次いで、エタノール脱

水系列(70~100%)を通し、キシレンで透徹後にパラフィンを浸透させた。パラフィン包埋組織から海馬冠状切片を 3 μm の厚さで薄切した。切片は、伸展後に親水性シランコーティングスライトクラスに貼り付けられ、 37°C で一晩乾燥された。

4 ニッスル染色法

キシレンに侵すことより標本切片からパラフィンを溶解後、エタノール (100~50%) 系列に順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、96%エタノールに 4°C で一晩浸して脱ミエリン処理を行った。次いで、0.05% 炭酸リチウム水溶液に5分間浸したのち、0.1% cresyl violet acetate 中で15分間の振盪染色を行った。70%エタノールにより洗浄したのち、酢酸(3滴/100 mL)を含む95%エタノールおよび95%エタノールでそれぞれ分別および脱色を行った。染色切片を100%エタノールおよびキシレンでそれぞれ脱水および透徹したのち、ENTELLAN new (MERCK社製)で封入した。

5 ホティアン染色法

キシレンによる脱パラフィン処理およびエタノール(100~50%)系列による親水化が行われた標本切片を蒸留水で洗浄したのち、遮光下で銅粒(3 g/50 mL)を含む0.25%プロテイン銀水溶液と 37°C 、72時間の鍍銀反応を行った。蒸留水で90秒の洗浄後、還元液(1%ハイトロキノンおよび5%無水亜硫酸ナトリウム)を 37°C で10分間反応させた。蒸留水で1分間洗浄後、0.2%塩化金酸水溶液を遮光下に 37°C で24時間の反応で置換したのち、蒸留水での1分間洗浄と室温下での2%シュウ酸水溶液の30分間反応を行った。次いで蒸留水での5分間洗浄後に、室温で5%チオ硫酸ナトリウム水溶液と5分間反応させて定着を行った。染色切片を蒸留水で洗浄後、エタノール脱水系列(70~100%)による脱水とキシレンによる透徹を行い、ENTELLAN newで封入した。

6 免疫染色法

キシレンによる脱パラフィン処理およびエタノール(100~50%)系列による親水化が行われた標本切片を蒸留水で洗浄したのち、0.03% Tween20 を含む Tris-buffered saline (TBST)で洗浄し、0.03%過酸化水素水を含む 100%メタノールで内在性ペルオキシターゼに対するブロックングを行った。TBSTで洗浄後、TBSTで希釈した5%ヤギ正常血清でブロックングを室温で1時間行ない、Antibody Diluent(DAKO)で希釈したウサギ抗 single stranded DNA(ssDNA)ポリクロナル抗体(1 μ g/mL)、ウサギ抗 Glial fibrillary acidic protein(GFAP)ポリクロナル抗体(12.8 μ g/mL)、ウサギ抗 c-Fos ポリクロナル抗体(2 μ g/mL)、ウサギ抗リン酸化 c-Jun ポリクロナル抗体、またはウサギ抗 ATF-2 ポリクロナル抗体(2 μ g/mL)をそれぞれ 4°Cで一晩反応させた。TBSTで洗浄後、TBSTで希釈したヒオチン化ヤギ抗ウサギ IgG (H+L)(7.5 μ g/mL)を室温で30分間反応させ、次いで、Avidin-biotinylated peroxidase complex kit(Vector社製)を室温で1時間反応させた。次いで、TBSTで洗浄してから Simple stain DAB solution(ニチレイ社製)を用いて発色させた。染色切片を蒸留水で洗浄し、エタノール脱水系列(70~100%)による脱水およびキシレンによる透徹を行ったのち、ENTELLAN new を用いて封入した。

7 TUNEL 法

TUNEL 染色は ApopTag[®] Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (Intergen社製)により行った。キシレンによる脱パラフィン処理およびエタノール(100~50%)系列による親水化が行われた標本切片を蒸留水で洗浄したのち、protease K(20 μ g/mL)を室温で15分間反応させた。PBSで洗浄後、equilibration bufferを室温で10秒以上反応させたのち、reaction buffer(TdT enzyme and digoxigenin-dNTP)を37°Cで1時間反応させた。stop/wash bufferによる10分間の洗浄およびPBSによる洗浄ののち、fluorescein 標識 digoxigenin 抗体を室温・

遮光下で30分間反応させた。PBSで洗浄後、mounting medium(propidium iodideを含む)(Vector社製)で封入した。

8 細胞核抽出液の調整

マウスより全脳を摘出後、homogenizing buffer [10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、0.32 M sucrose、1 mM EDTA、1 mM EGTA、5 mM dithiothreitol (DTT)、10 mM phosphatase inhibitors (NaF and sodium β -glycerophosphate)、1 μ g/mL protease inhibitors [(p-aminophenyl)methanesulfonyl fluoride (APMSF)、benzamide、leupeptin および antipain]]で洗浄した。海馬と大脳皮質を分画したのち、homogenizing bufferを1 mLずつ加えて、Dounce homogenizer (B-type pestle)でホモジナイスした。ホモシネイトに10% Nonidet P-40を終濃度0.5%になるように加えたのち、1000 gで10分間遠心分離して得られた沈査に extraction buffer [10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、10% glycerol、400 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、5 mM DTT、0.5% Nonidet P-40、10 mM phosphatase inhibitors (NaFおよびsodium β -glycerophosphate)、1 μ g/mL protease inhibitors (APMSF、benzamide、leupeptin および antipain)]を0.4 mL加えて懸濁した。氷中にて30分間放置後、20000 gで5分間遠心分離し、上清を細胞核抽出液として、-80°Cに保存した。細胞核抽出液の蛋白質定量は、Protein Assay Rapid kit(Wako社製)を用いたWatanabe法(Watanabe et al, 1986)により行われた。試薬溶液は、すべて孔径220 nmのニトロセルロース膜を用いた限外濾過により除菌された。

9 ゲル移動度シフト法

転写制御因子のDNA結合能を検出するためのプローブとしてAP-1に対するコンセンサス配列(TGACTCA)を含む22塩基対の2本鎖オリゴヌクレオチドを作製した(5'-CTAGTGATGAGTCAGCCGGATC-3')。

DNA polymerase I [10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT] より得られた Klenow fragment を deoxy-GTP、deoxy-CTP および deoxy-TTP をそれぞれ 50 μM 含む 1 mM [α-³²P] deoxy-ATP と 25°C で 30 分間反応させることにより放射標識プローブを作製した。EDTA を加えて反応を停止させたのち、スピンカラムを用いてプローブを精製した。細胞核抽出液 5 μg を、20 μL の反応液 [20 fmol probe (0.5-5 × 10⁶ cpm/pmol)、50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)、1 μg poly(dI-dC)、10% glycerol、10 mM MgCl₂、160 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、5 mM phosphatase inhibitors (NaF および sodium β-glycerophosphate)、1 μg/mL protease inhibitors (APMSF、benzamidine、leupeptin、antipain)] 中で氷冷下に 30 分間反応させた。色素(bromophenol blue) を添加後、5%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動用緩衝液(pH 8.5) (50 mM Tris、0.38 M glycine、2 mM EDTA) 中で電気泳動(11 V/cm、2°C)を行ない、プローブ/蛋白質複合体と遊離プローブを分離した。泳動後ゲルを乾燥したのち、放射能を X 線フィルムで検出した。

1.0 ウェスタンブロッティング法

細胞核抽出液に蛋白変性用試薬[10 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8)、10% glycerol、1% sodium dodecyl sulfate、0.01% bromophenol blue、2% 2-mercaptoethanol] を加えて 100°C で 5 分間煮沸したのち -80°C に保存した。標品を使用前に室温で解凍したのち、電気泳動用緩衝液 (pH 8.5) (50 mM Tris、0.38 M glycine、2 mM EDTA) を満たした泳動槽中で、10% あるいは 7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動(15 mA/Plate)を行った。泳動後のゲル中の蛋白質を、100%メタノールで活性化処理し polyvinylidene fluoride(PVDF)膜に、Mini trans blot(ハイオラット社製)を用いて 100 V の一定電圧

で 60 分間転写した。転写後の PVDF 膜を 0.05% Tween 20 を含む Tris-buffered saline(0.05% TBST) で洗浄したのち、0.05% TBST に溶解した 5% スキムミルクで 4°C、一晩のフロッキング操作を行った。PVDF 膜を 0.05% TBST で洗浄後、0.05% TBST に溶解した 1% スキムミルクで希釈したウサギ抗 c-Fos ポリクロナール抗体(67 ng/mL) を室温で 2 時間反応させた。0.05% TBST で洗浄(5 分間 × 3 回) ののち、0.05% TBST に溶解した 1% スキムミルクで希釈した西洋わさびペルオキシターゼ標識ブタ抗ウサギ IgG(0.08 ng/mL) を室温で 1 時間反応させた。0.05% TBST で洗浄 (10 分間 × 3 回) したのち、Western Blot Chemoluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences 社製) による発光反応を X 線フィルムで検出した。

1.1 テータ解析

結果はすべて平均値 ± 標準誤差で表示し、統計学的有意差は Students' t test で判定した。

C 研究結果

1 海馬内領域の識別

海馬錐体細胞層における CA1、CA2 および CA3 の各領域を識別するため、海馬冠状切片のニッスル染色およびボティアン染色を行った。Cajal (1911) は、海馬の錐体細胞層を regio superior と regio inferio に大別した。さらに、Lorent (1934) は regio superior を CA1 とし、regio inferio を CA2 および CA3 に分類した。すなわち、CA1 錐体細胞層では小型の錐体細胞が整然と並んでいるのに対して、CA2 では大型の錐体細胞の並びが乱れて幅が広がっている。また、CA3 と CA2 の境界は苔状線維束が走行する透明層が確認できなくなる部分とした。本稿では、この識別基準に基づき各領域の細胞数の定量化を行った。

2 NMDA およびカイニン酸投与による行動変化

NMDA またはカイニン酸投与後 30 分間の行動変化の観察を行った。NMDA 投与後は用量により次のような行動変化が認められる。すなわち、arrest of motion (運動の停止)、tail tremor (尾を振る)、tail bite (尾を噛む)、wild running and bite (正常な姿勢の消失を伴う尾・全身の噛みおよび走行) および tonic /clonic convulsion or die (全身性強直間代性痙れんまたは死亡) である。カイニン酸では、arrest of motion (運動の停止)、myoclonic seizures (ぴくぴくする頭と首のミオクローヌス様痙れん)、fore limbs tonic / clonic convulsion (wet dog shakes) (両前肢の強直間代性痙れん) および tonic /clonic convulsion or die (全身性強直間代性痙れんまたは死亡) などが観察される。100 mg/kg の NMDA 投与では、20 匹中 3 匹が tail tremor をおこし、20 匹中 16 匹が tail bite をおこした。また、カイニン酸投与 (30 mg/kg) では 20 匹中 6 匹が myoclonic seizures をおこし、20 匹中 12 匹が wet dog shakes をおこした。

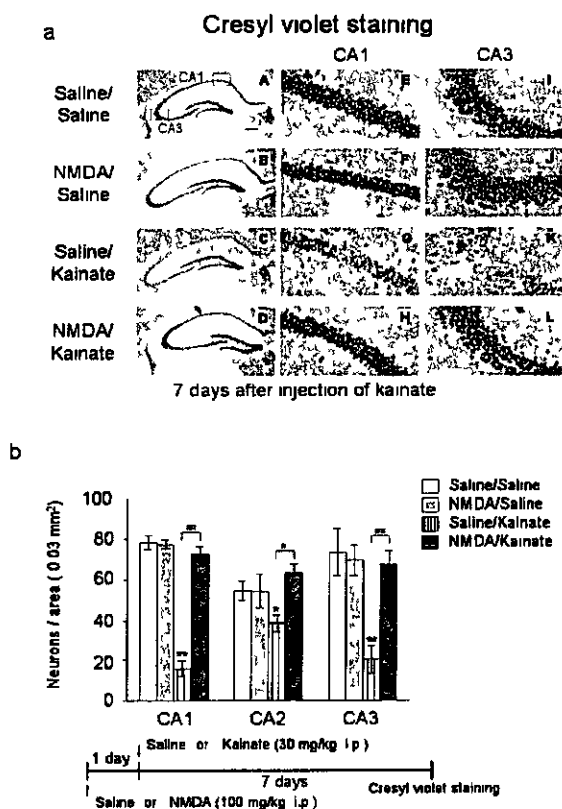


Figure 1 Effect of pretreatment with NMDA on kainate-induced neuronal

losses in the pyramidal cell layers of the hippocampal subfields. Animals were given saline or kainate (30 mg/kg, i.p.) at 1 day after the administration of either saline or NMDA (100 mg/kg, i.p.) Brains were fixed 7 days after injection of kainate, followed by preparation of coronal sections from paraffin-embedded brains and subsequent staining with cresyl violet to determine surviving cells in neuronal layers of the hippocampus (a) Typical light micrographs of the sections stained with cresyl violet The areas of CA1 and CA3 subfields are shown with higher magnification in the middle and right panels Scale bar = 200 μ m Kainate induced severe damage in pyramidal cells of the hippocampal CA1 and CA3 subfields, but not in dentate granular cells (Saline/Kainate) By contrast, NMDA did not induce marked neuronal losses in neuronal layers of the hippocampus (NMDA/Saline) Note that kainate-induced neuronal losses in those subfields were completely blocked by pretreatment with NMDA (NMDA/Kainate) (b) Surviving cells were counted in an area of 0.03 mm² within each subfield Values are the mean \pm SE obtained from 8-12 separate animals *P<0.05, **P<0.01, significantly different from each control value obtained in untreated animals (Saline/Saline, the first left open column) #P<0.05, ##P<0.01, significantly different from the value obtained in each subfield of animals injected with kainate alone (Saline/Kainate, the third left hatched column)

3 神経細胞死に対する NMDA の効果

カイニン酸誘発性神経細胞死に対する NMDA 前投与の影響を検討する目的で、海馬冠状切片のニッスル染色を行った (Fig 1a)。生理食塩水または NMDA を投与 1 日後に生理食塩水またはカイニン酸を投与した。ニッスル染色は、カイニン酸投与 7 日

後に行った。NMDA 投与群では、少なくとも 1 ヶ月まで海馬のいずれの部位においても見かけ上著明な変化は観察されなかった (NMDA/Saline)。カイニン酸投与群では、CA1 および CA3 に神経細胞死が観察されたが、歯状回顆粒細胞層には神経細胞死は観察されなかった (Saline/Kainate)。NMDA をカイニン酸投与の 1 日前に投与すると、カイニン酸による神経細胞死は完全に阻止されることが判明した (NMDA/Kainate)。Figure 1b は、CA1、CA2 および CA3 におけるそれぞれの一定範囲内 (0.03 mm²) のニッスル染色細胞数を示している。カイニン酸投与動物 (Saline/Kainate) の神経細胞数は、対照群 (Saline/Saline) と比べて CA1 から CA3 のいずれの領域でも有意に減少した。(CA1 20.4 ± 4.9%、CA2 70.8 ± 7.4%、CA3 27.9 ± 9.3%)。一方、NMDA 投与群 (NMDA/Saline) ではいずれの領域において対照群と比べて有意な変化は観察されなかった。しかしながら、NMDA をカイニン酸投与 1 日前に前投与した場合には、カイニン酸による神経細胞死は有意に抑制された (NMDA/Kainate)。

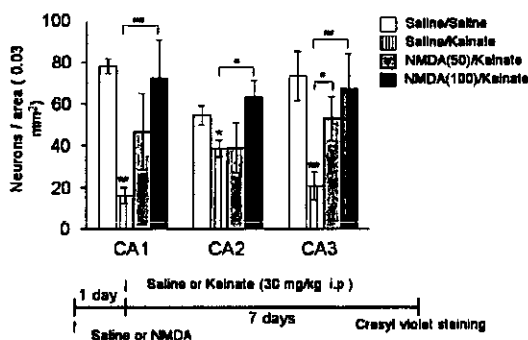


Figure 2 Effects of pretreatment with NMDA at different doses on kainate-induced neuronal losses in the pyramidal cell layers of the hippocampal subfields. Animals were given saline or kainate (30 mg/kg, i.p.) at 1 day after the administration of either saline or NMDA at dose of 50 and 100 mg/kg. Brains were fixed 7 days after

injection of kainate, followed by preparation of coronal sections from paraffin-embedded brains and subsequent staining with cresyl violet to determine surviving cells in neuronal layers of the hippocampus. Surviving cells were counted in an area of 0.03 mm² within CA1 and CA3 subfields. Values are the mean ± S.E. obtained from 8-12 separate animals. *P<0.05, **P<0.01, significantly different from each control value obtained in untreated animals (Saline/Saline, the first left open column) #P<0.05, ##P<0.01 significantly different from the value obtained in each subfield of animals injected with kainate alone (Saline/Kainate, the second left hatched column)

Figure 2 は、NMDA 神経保護効果における用量依存性を示している。50 あるいは 100 mg/kg の NMDA をカイニン酸投与 1 日前に投与したのち、海馬冠状切片をニッスル染色した。100 mg/kg の NMDA ではいずれの領域においてもカイニン酸による神経細胞死を完全に抑制したか、50 mg/kg の用量では CA3 では有意な保護効果は見られたが、CA1 および CA2 において有意な保護効果は観察されなかった。

NMDA の保護効果の経時変化を検討する目的で、カイニン酸誘発性神経細胞死に対する NMDA の効果を前処置時間を変化させて解析した (Fig 3)。すなわち、NMDA 投与 1 時間、2 時間、5 時間、1 日、2 日および 4 日後にカイニン酸を投与した。カイニン酸投与後 7 日目にニッスル染色を行い、染色細胞数を計測した。NMDA の神経保護効果は 1 時間前投与で認められ、効果は少なくとも 1 日までは持続した。しかしながら、NMDA の 4 日前投与では有意な保護効果は認められなかった。

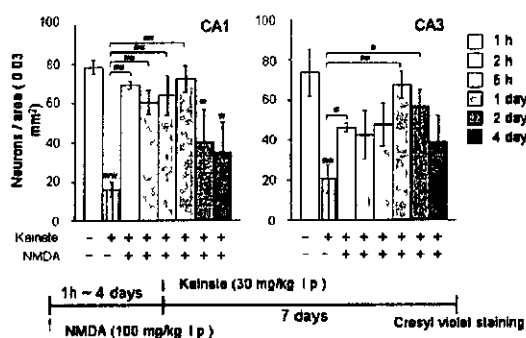


Figure 3 Effects of pretreatment with NMDA at different times on kainate-induced neuronal losses in the pyramidal cell layers of the hippocampal subfields. Animals were given kainate (30 mg/kg, 1 p) at various times indicated after the administration of NMDA (100 mg/kg, 1 p). Brains were fixed 7 days after injection of kainate, followed by preparation of coronal sections from paraffin-embedded brains and subsequent staining with cresyl violet to determine surviving cells in neuronal layers of the hippocampus. Surviving cells were counted in an area of 0.03 mm² within CA1 and CA3 subfields. Values are the mean \pm SE obtained from 8-12 separate animals. *P<0.05, **P<0.01, significantly different from each control value obtained in untreated animals (the first left open column). #P<0.05, ##P<0.01, significantly different from the value obtained in each subfield of animals injected with kainate alone (the second left hatched column).

次に、カイニン酸投与後に NMDA を投与して、神経細胞死をニッスル染色法で解析した (Fig 4)。NMDA はカイニン酸投与 1 時間、1 日および 3 日後に投与され、カイニン酸投与 7 日後にニッスル染色が行われた。しかしながら、いずれの場合においても NMDA はカイニン酸誘発性神経細胞死に対して神経保護効果を示さなかった。

Cresyl violet staining

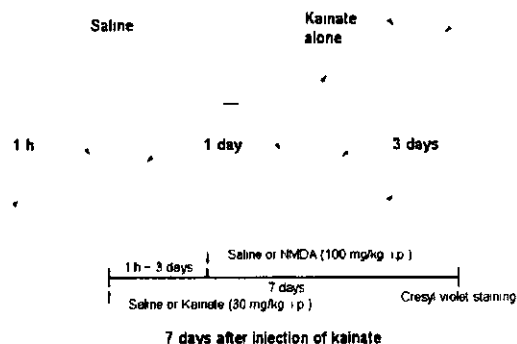


Figure 4. Effect of post-treatment with NMDA on kainate-induced neuronal losses in the pyramidal cell layers of the hippocampal subfields. Animals were given NMDA (100 mg/kg, 1 p) at various times indicated after the administration of kainate (30 mg/kg, 1 p). Brains were fixed 7 days after injection of kainate, followed by preparation of coronal sections from paraffin-embedded brains and subsequent staining with cresyl violet to determine surviving cells in neuronal layers of the hippocampus. Typical light micrographs of the sections stained with cresyl violet. Scale bar = 200 μ m. These experiments were invariably repeated at least four times with similar results. Note that post-treatment with NMDA at any time was ineffective in inhibiting kainate-induced neuronal losses in the hippocampus.

4 DNA断片化の組織化学的解析

カイニン酸およびNMDAによるDNAの断片化を、抗 ssDNA 抗体を用いた免疫染色法により解析した (Fig 5a)。生理食塩水投与群 (左上図) および NMDA 投与群 (左下図) では、海馬のいずれの領域においても ssDNA 陽性細胞は観察されなかった。カイニン酸投与 3 日後では (右 3 図)、海馬の CA1 および CA3 で ssDNA 陽性細胞が見られた。しかしながら、歯状回には陽性細胞はまったく観察されなかった。次に、アポトーシスによる DNA 断片化の検出に繁用される TUNEL 法についても行った