

博士(薬学) 板野泰弘

学位論文題名

ヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y細胞における
Bcl-2 の発現調節機構とアポトーシアに関する研究

学位論文内容の要旨

[序論]

生体の恒常性は細胞の増殖、分化とともにその死によっても調節されているが、この死は外的要因による細胞死(ネクローシス)とは異なりアポトーシスという過程を経る。アポトーシスでは形態的に細胞の縮小や核の濃縮が見られ、また生化学的にはDNAのヌクレオソーム単位の断片化が認められる。神経系でのアポトーシスに関する研究は、免疫系に比べると遅れているのが現状である。そこで、著者は神経細胞におけるアポトーシスの機序を解明する目的でヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用い、血清除去によりアポトーシスが生じるか否か、さらにその機序は何かについて検討した。SH-SY5Y細胞はアポトーシス抑制活性を有するBcl-2を内在的に強く発現している。Bcl-2は239個のアミノ酸残基からなる分子量26 kDaの膜蛋白質(核、ミトコンドリアおよび小胞体に局在)で神経系(ニューロン)と免疫系(胸腺、脾臓およびリンパ節)において顕著な発現が認められる。Bcl-2の作用機序に関する限り徐々に解明されつつあるが、Bcl-2の発現調節機構に関してはその遺伝子上流の解析を含めほとんど明らかにされていない。そこで、SH-SY5Y細胞におけるBcl-2の発現調節機構を生化学的に検討した。また、アポトーシスは生理的な現象だけに限らず、ある種の神経疾患においても認められる現象であることが示されている。神経毒の1種1-メチル-4-フェニルピリジニウムイオン(MPP⁺)はパーキンソン病の症状を引き起こす1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロビリジン(MPTP)の活性本体で、MPP⁺自身もin vitroでドバミン(DA)神経細胞やSH-SY5Y細胞に対して致死効果を示すが、その細胞死がアポトーシスなのかネクローシスなのかに關し結論は得られていない。そこで、このMPP⁺の細胞死惹起機序に関して検討した。

[実験結果および考察]

1) 血清除去によるアポトーシス

SH-SY5Y細胞を血清存在下から無血清状態に移すと、24時間後にはアポトーシスの特徴であるヌクレオソーム(180～200 bp)単位のDNAの断片化が認められた。この時、ほとんど全ての細胞はディッシュに付着しており、死細胞に特異的なトリパンブルーによる細胞染色も認められなかつたが、その後の時間経過とともに細胞サイズの縮小が認められ、これらの細胞はトリパンブルーによって染色された。また、培地中への乳酸脱水素酵素(LDH)の漏出(LDH leakage)を測定したところ、除去後1日の時点では対照群に比べて有意な増加は認められず、その後の時間経過とともに増加した。以上の結果より、細胞死に先立ってDNAの断片化が認められることから血清除去による細胞死はアポトーシスによることが分かった。そこで、このアポトーシスの機序を知る目的で種々の薬物を用いて抑制効果を検討した結果、エンドヌクレアーゼ阻害薬であるアウリントリカルボキシリックアシド(ATA)で前処置すると、DNAの断片化は完全に抑制された。以上の結果から、血清除去によるアポトーシス

にATA感受性のエンドヌクレアーゼが関与していることが示唆された。

2) Bcl-2の発現調節機構

SH-SY5Y細胞におけるBcl-2の発現調節機構をウエスタンプロットおよびノーザンプロット法を用いて検討した。Bcl-2発現に及ぼす種々の薬物の効果を検討した結果、PKC活性化薬であるTPAおよびレチノイン酸(RA)処置によってBcl-2の発現量はいずれも対照群に比べて増加した。この両薬物の作用はPKC阻害薬のスタウロスボリンおよびカルフォスチンC前処置によって抑制された。この結果よりBcl-2の発現量増加におけるPKCの関与が示唆されたので、つぎに受容体を介してPKCを活性化する薬物の効果について検討した。ムスカリン性アセチルコリン(mACh)受容体は本細胞においてホスファチジルイノシトール(PI)代謝回転の促進を介してPKCを活性化させる唯一の受容体であるが、そのアゴニストであるカルバコール(CCh)で3日間処置したときにBcl-2の発現量は対照群よりも増加した。また、この作用もスタウロスボリンおよびカルフォスチンC前処置によって抑制された。さらに、このCChの作用がmACh受容体サブタイプのうちm₃受容体を介していることが分かった。一方、膜透過性のcAMP誘導体であるジブチリルcAMP(diBu-cAMP)処置によってBcl-2の発現量は対照群よりも減少した。この作用はPKA阻害薬のH-89前処置によって抑制されたことから、Bcl-2の発現量減少におけるPKAの関与が示唆された。同様に、他のPKA活性化薬としてアデニル酸シクラーゼを直接活性化するフルスコリンおよびGTP結合蛋白質の一種のGsを活性化するコレラ毒素(1 μg/ml)で処置した場合にもBcl-2発現量が減少した。以上の結果から、SH-SY5Y細胞におけるBcl-2発現に対して、PKCとPKAはそれぞれ正と負の調節因子であることが明らかとなった。

3) MPP⁺によるアポトーシス

各濃度(1 μM ~ 1 mM)のMPP⁺で4日間処置したとき、1 mMにおいてのみDNAのヌクレオソーム単位の断片化が認められた。1 mM MPP⁺処置による断片化の経時変化を調べると、処置後2日目で弱いながらも認められ、断片化の程度は処置時間とともに増大した。また、断片化を起こしている細胞はいずれもトリパンブルーによって染色されなかった。したがってMPP⁺による細胞死もアポトーシスによることが推定された。ミトコンドリア呼吸鎖(complex I)の阻害がMPP⁺の作用の一つであるが、呼吸鎖を阻害する他の薬物(アンチマイシンAおよびオリゴマイシン)で処置した場合にもDNAの断片化(アポトーシス)が生じた。つぎに、Bcl-2の発現に対するMPP⁺の効果を検討したところ、DNAの断片化が起きる濃度および処置時間において発現量の増加が認められ、この作用はスタウロスボリン前処置で抑制されたがアポトーシスの方は抑制されなかった。以上の結果から、MPP⁺はアポトーシスを引き起こすと同時にBcl-2発現量を増加させるというユニークな性質を持つこと、両者は異なる作用機序によることが分かった。このうちBcl-2発現量の増加に関しては、PKCを介していることが分かった。また、ミトコンドリア呼吸鎖の阻害薬でアポトーシスが生じたことから、ミトコンドリア呼吸鎖の阻害がMPP⁺によるアポトーシスの機序である可能性が示唆された。

[まとめ]

- 1) SH-SY5Y細胞の血清除去による細胞死はアポトーシスによることが分かった。また、その機序にATA感受性のエンドヌクレアーゼが関与していることが示唆された。
- 2) SH-SY5Y細胞はBcl-2を内在的に発現しているが、PKCとPKAがそれぞれ正と負にBcl-2の発現を調節していることを明らかにした。
- 3) 神経毒MPP⁺による細胞死もアポトーシスによることが分かった。その機序としてミトコンドリア呼吸鎖の阻害が示唆された。また、MPP⁺はBcl-2発現を増加させること、その機序にPKCが関与していることを示した。

学位論文審査の要旨

主査 教授 野村 靖幸
副査 教授 長沢 滋治
副査 助教授 徳光 幸子
副査 助教授 高橋 和彦

学位論文題名

ヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y細胞における Bcl-2 の発現調節機構とアポトーシアに関する研究

申請者板野泰弘は、神経細胞における薬物の作用機序に関する生化学的、分子生物学的研究を進めてきたが、今回、「ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞におけるBcl-2の発現調節機構とアポトーシスに関する研究」という題目の学位論文を提出してきた。

細胞死はネクローシス（壊死）とアポトーシス（枯死、遺伝子の関与する細胞死）に大別される。最近、B細胞リンパ腫より発見されたがん遺伝子 *bcl-2* のコードする蛋白質Bcl-2が神経系組織にも発現し、神経細胞のアポトーシス抑制に関与することも見い出されたが、その詳細な機構は明確にされていない。本論文はヒト神経芽細胞腫であるSH-SY5Y細胞を用いて、血清除去および神経細胞毒1-メチル-4-フェニルピリジニウムイオン (MPP^+) のアポトーシス惹起機序、ならびにBcl-2の発現調節機構とアポトーシス抑制機構への関与について解析した研究であり、以下の新知見を得ている。

まず、SH-SY5Y細胞の培養メディウムより血清を除去すると1日後にアポトーシスの指標であるDNAの断片化を認めたが、この時点で、細胞死の指標としての乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase, LDH) 漏出およびトリパンブルーによる細胞染色が認められなかったことより、血清除去による細

胞死はアポトーシスであることを示した。

血清除去により誘起されるSH-SY5Y細胞のアポトーシスに対する各種薬物処理の作用を検討することにより、以下の点を示した。すなわち、1) アポトーシスはコルジセピンやシクロヘキシミドにより抑制されなかつことより、このアポトーシスには致死蛋白質の*de novo*合成系は関与せず、また2) ピロロリジンジチオカルバメートによっても抑制されなかつことより、活性酸素種の関与もないと推定した。一方、3) エンドヌクレアーゼ阻害薬のアウリントリカルボン酸がこのアポトーシスを抑制したことより、内因性のエンドヌクレアーゼの関与することを示唆した。

次に、SH-SY5Y細胞におけるBcl-2発現調節に関し細胞内情報伝達機構の点より検討し、1) プロテインキナーゼC (PKC) が促進的に、プロテインキナーゼA (PKA) が抑制的に関与すること、2) 神経分化誘導薬であるレチノイン酸 (RA) もBcl-2発現を促進するが、これにPKCが関与することを示した。また、本細胞には m_3 型ムスカリン受容体が存在し、これを刺激すると、イノシトールリン脂質代謝の促進と細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇によるPKC活性化を介し、Bcl-2発現を促進することを明らかにした。

中枢神経系ドバミン神経細胞の変性疾患の1つで運動失調を主症状とするパーキンソン病の発症機構は不明であるが、その原因神経毒として1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン (MPTP) の代謝産物MPP⁺が考えられている。しかし、MPP⁺の神経細胞変性作用機構は明らかにされていない。申請者は本SH-SY5Y細胞に対しMPP⁺が細胞死を惹起すること、さらにこれに先行してDNA断片化の生ずることを見い出し、MPP⁺のドバミン神経細胞死誘起効果にアポトーシスの関与すること、さらにその機構はミトコンドリア呼吸鎖の阻害効果である可能性を示唆した。また、MPP⁺のアポトーシス惹起効果はアウリントリカルボン酸により抑制されなかつことより、血清除去によるアポトーシスと異なることを見い出した。

また、MPP⁺はアポトーシスを引き起こす一方で、Bcl-2発現量を増加させ

るという興味ある結果を得た。また、MPP⁺のこのBcl-2発現増加作用はPKCを介すること、MPP⁺はアポトーシス惹起作用とは異なる機構でBcl-2発現作用を示すことを見い出した。

以上のように、本論文はヒト神経芽細胞腫におけるアポトーシスとその機序についての解析を行い、さらに、Bcl-2発現の細胞内調節機構とそのアポトーシスとの関連性について新知見を提示しており博士（薬学）の学位を受けるに十分値すると認めた。