脳神経系のプログラム細胞死と新生期脳由来抗癌因子 NBCF： キラー蛋白質による細胞死の機序と生理的役割

広島県立大学生物資源学部 三 羽 信比古

Substantial proportions of neuronal cells composing many loci in the nervous system are destined to die at the terminal stage of the ontogeny. Molecular mechanisms of the programmed cell death have been analyzed principally in view of accessibility to neurotrophic factors. I propose here a possible mechanism that killer proteins such as NBCF induced upon shortage of neurotrophic factors at the cell death period counteract direct cytoprotective effects of anti-killer factors associated with neurodifferentiation and bring about programmed cell death of neurons whose nerve endings are insufficiently multibranched.

Programmed cell death/killer protein/neuron/ontogeny/antitumor factor/neurotrophic factor

毒素・障害・飢餓など外来要因で起こる受動的細胞死と対照的に、death gene に組込まれた細胞自殺の遺伝情報が体内要因で trigger されて発現し、能動的に起こる細胞死は programmed cell death (プログラム死と略称) と定義される¹⁻⁵⁾。

I 脳神経系のプログラム死は普遍的で劇的

脳神経系の発生で大規模のプログラム死が起こる：

①ニワトリ胚で三叉神経中脳核は孵卵9-13日で4300個の神経細胞のうち75%が死んで1100個に減り、視峡核は孵卵12-16日で22000個の神経細胞が55%死んで10000個に減り、外側運動柱は5.5-9日で40%、滑車神経核で50%が死ぬ⁶⁾。②ネコでも大脳皮質視覚野から脳幹の上丘へ軸索を送る神経細胞は出生時は1600個(mm^{-1})だが生後12日には500個に激減し生後8週までに200個に徐減し、これに並行して細胞体断面積は3倍まで増大⁷⁾。出生直後は皮質視覚野の深層で、生後2-3週は浅層で細胞数が減る。③サルでも網膜節細胞の数に相応する視神経繊維の数は、胎生95日には260万あるが110日までに180万に激減し、その後出生前後にも継続的に徐減し120万となる⁸⁾。④線虫 C. E

レガンス成体の細胞総数は雌雄同体が959、雄が1031で、うち神経細胞302個はすべて同定された。雌雄同体は胚発生で113個、後胚発生で18個の細胞が死ぬが、

A. プログラム死の経過：

B. 線虫 C. エレガンスのプログラム死の開始と進行に関する遺伝子

図1. 神経系のプログラム死に関連する death gene
プログラム死は時間経過順に、(1)予定死細胞の微細環境が整備され death gene に作用、(2)death gene が転写翻訳され遺伝子産物が産生される遺伝子発現段階、(3)遺伝子産物が予定死細胞やその保護組織に働きかける標的作用段階、(4)予定死細胞が崩壊除去、(5)遺伝子発現停止段階に分けられる⁵⁾。

線虫では神経系プログラム死は他細胞によって引き起こされるのではなく自殺であり、近接する sister cell が nonprofessional phagocyte として働いて死細胞を貪食する。哺乳類では ameboid microglia も貪食に関与すると考えられる。この細胞死に関与する ced gene の突然変異体が数系統分離された⁴⁾：① ced-3, ced-4 変異体は本来死ぬべき未分化な神経細胞が生き残って余分な神経細胞に分化する。② ced-1, ced-2 変異体は細胞死は起こすが、細胞死プロセスに異常が起こり表皮細胞による貪食が抑制。③ nuc-1 変異体は死細胞の核が崩壊せず凝集したまま残存。

Programmed cell death in the nervous system and neonatal brain-derived carcinostatic factor (NBCF) : mechanism and physiological role of cell death induced by killer proteins

Nobuhiko MIWA

Department of Biotechnology, Hiroshima Prefectural University School of BioScience

うち105個が神経細胞である⁹⁾。

脳神経系プログラム死の機序が解析されつつある(図1-2): ①死の規模は標的組織サイズと逆相関^{6),10)}。②シナプス形成不全が死を起こす¹¹⁾。③シナプス形成部位の獲得競争で軸索側枝が退行。④間引きとしての役割が考えられる¹²⁾。⑤death geneが存在⁴⁾。

II 神経栄養因子と神経細胞殺傷因子の関与

プログラム死期で神経細胞の生存は、標的組織から供給された神経栄養因子が神経繊維末端から細胞体へ逆行輸送される必要があり、多数の神経細胞が一定量の栄養因子を奪い合うため、充分量の栄養因子を受け取れなかった神経細胞が死ぬと考えられる(図2A-D)。

図2. 神経細胞のプログラム死を規定する要因

孵化4.5-9日ニワトリ胚に curare 投与し神経-筋伝達を阻害すると、運動神経細胞死が阻止され運動神経終末の分枝数や acetylcholine 受容体の数と cluster も増す(A)⁶⁾。この原因として curare 処理筋は正常活動筋より栄養因子を多量生産貯溜する(D)と考えられたが、否定された: ①curare と同程度に筋活動阻害する nicotine や decamethonium 処理では細胞死は免れず acetylcholine 受容体も誘導されず(B)。栄養因子への運動神経細胞の accessibility は神経-筋シナプス形成の程度やその反映たる神経終末端分枝数で決定される(C) (access 仮説)⁶⁾。②ニワトリ胚の筋由来運動神経生存促進因子の活性が curare 処理で増えず、視神経の神経細胞死は網膜に cycloheximide を細胞内注入しても影響されない(B)。③プログラム死期に筋での接着因子の分布が curare 処理で攪乱されるので、神経終末端数の差異に接着因子の分布が関与すると示唆(A)。

神経発芽形成因子と神経発芽抑制因子(E)⁴⁾: ①骨格筋支配神経を部分切断すると無傷部分の神経が発芽し、除神経された筋繊維が次第に神経支配を受ける。②ボツリヌス菌由来末梢神経毒素による神経伝達阻害は発芽を促す。③tetrodotoxin で神経活動を阻害し筋不働化しても発芽。通常は筋からの放出が抑制されている発芽形成因子が①-③で放出され発芽されると解釈される。他方、神経終末分枝は筋由来発芽形成因子と神経細胞から軸索流で運搬されて神経末端より放出される発芽形成因子との均衡で決定され、正常では発芽抑制因子が発芽形成因子の作用を打消していると示唆された(F): ①サンショウウオ脊髄第16神経を切断すると、第15,17感覚・運動神経が発芽し共に第16神経支配領域をも支配¹³⁾。②第16神経に colchicine 投与して軸索流を抑えると、第16神経の活動は正常だが、第15,17神経が発芽して第16神経支配領域を支配。

fibroblast growth factor は培養した中枢神経細胞の生存率を顕著に向上させるが、高濃度では逆に生存を阻む場合があり両面作用がある¹⁴⁾ので、脳神経細胞数を調節している可能性がある。NGF を利用する交感神経節細胞は NGF 除去した培養条件では死ぬが、蛋白質/RNA 合成阻害剤で死滅が阻止される¹⁵⁾ので、新規合成キラー蛋白質が神経細胞を死滅させ、NGF がキラー蛋白質合成を阻止して神経細胞を生存維持させると示唆される。

Ⅲ プログラム死での神経細胞殺傷因子の分子の実体

神経細胞分枝数は、出生後は発芽形成因子と発芽抑制因子で決定されると想定された(図2E, F)。発芽抑制因子として出生後の運動神経細胞に存在する calcitonin gene-related peptide (CGRP) が示され¹⁶⁾、プログラム死でもその効果を発揮し神経細胞分枝数を決定していると示唆された: ①CGRP が正常のニワトリ胚の脊髄運動神経細胞ではプログラム死期に一致する孵卵6-9日に発現。②curare 処理ニワトリ胚は細胞死が阻止され神経分枝数が増大すると共に運動神経細胞体の CGRP 抗原性が検出されなくなる。③ラットのオリブ橋小脳皮質の系で、プルキンエ細胞の標的多重結合期に CGRP は一過的発現しシナプス結合完了後に発現停止。

線虫の変異体で神経細胞死を誘導する deg-1 遺伝子の産物が単一膜通過ドメインを持つ膜通過性蛋白なので、ion channel や ligand で作動される受容蛋白と示唆された¹⁷⁾。この遺伝子が発現した神経細胞はプログラム死類似の apoptosis を起こすので、同様な遺伝子が神経細胞の受容蛋白を介した外的因子の作用によって発現し細胞死を起こすと考えられる。

胎生21日ラット胎仔上頸交感神経節由来細胞は NGF 存在下培養すると1週間生存しこの後 NGF 除去で死ぬ¹⁵⁾。この過程でパルス標識して合成蛋白を2D 電気泳動すると1300個スポットが得られ、うち①NGF 除去で10倍以上誘導された数種の蛋白は細胞死関連物質の候補。②NGF 除去後に減った数種の蛋白が NGF で誘導され death gene 転写を直接抑える可能性がある¹⁸⁾。

Ⅳ 新生期脳で産生される細胞殺傷性蛋白質 NBCF¹⁹⁾⁻²²⁾

神経死誘発蛋白は欧米など6研究グループが研究しているが分子の実体は未同定である。三羽らは発生各

過程でマウス脳はプログラム死が顕著に起こる新生期と胎生末期にのみ細胞増殖抑制蛋白を産生することを見出した²³⁾。増殖抑制蛋白は4種あり、これら抑制活性を相殺する160kDaの増殖促進因子も産生される。そこで正常細胞よりも癌細胞選択的な抑制活性²⁴⁾⁻²⁶⁾を指標に分画と精製を進めた。その結果、癌細胞選択的な DNA 合成/増殖抑制活性を示す62kDa, pI9.1の蛋白が、新生期マウス脳から産生され、成体期や胎生中期の脳や新生期の肝、腎、皮膚などで産生されないの、新生期脳由来抗癌因子 NBCF (neonatal brain-derived carcinostatic factor) と命名した。マウス胎仔脳由来物質による増殖抑制活性は出生前後で一過性に亢進し、NBCF 産生時期と合致した²⁷⁾。NBCF は出生前後の脳しか産生せず、摘出脳からの産生も培養24-29時間に限定される。さらに下垂体と嗅球を除いた新生期ブタ大脳から神経芽腫細胞を選択抑制する NBCF 様増殖阻害物質(12kDa, 酸性)を得た。NBCF のN端アミノ酸14残基を決定した。このペプチド部分を合成して担体蛋白 KLH に結合させて得た抗血清は NBCF による神経芽腫細胞への増殖抑制活性と mitochondrial dehydrogenase 活性抑制を部分阻害した。

NBCF の癌選択的抑制はクロン増殖でも DNA 合成でも見られ、正常ラット胎仔の繊維芽細胞3Y1とそのSV40転換細胞W3Yの組み合わせでも、他の正常細胞や癌細胞でも認められた²⁸⁾。NBCF はヒトを含め各動物種の脳、肺、腎、口腔、子宮など各種癌由来細胞を増殖抑制する。特にヒトやマウスの神経芽腫細胞に強い抑制を示すが、高濃度 NBCF は細胞致死作用も示し投与後24時間で細胞凝集、細胞質狭小化、pynosis と karyorrhexis など核変性を生じ、apoptosis と似る。神経芽腫細胞当り NBCF 1.3×10^7 分子で50%増殖抑制を示す。粗製 NBCF を Ehrlich 腹水癌移植マウスに投与すると1.7-2.7倍延命した。ラット胎仔大脳皮質の培養神経細胞は、極微量の NBCF 添加で数時間で不可逆的な変性死を起こす。NBCF の活性発現に必要な構造要件と産生様式を調べた(図3)。

分化した神経芽腫 NB1細胞は NBCF 感受性が低下する(図4)¹⁹⁾: ①未分化 NB1細胞を細胞内 Ca^{2+} 特異的 chelator BAPTA-AM 処理すると NBCF 感受性が亢進したが、NBCF 感受性が著減した分化 NB1細胞も、BAPTA-AM 処理で NBCF 感受性が復元して増大。② Ca^{2+} channel blocker の nifedipine と verapamil はともに未分化細胞の NBCF 感受性を幾分亢進させたが、分化細胞は不変。③ Ca^{2+} channel agonist の Bay K 8644では未分化細胞も分化細胞も感受性が低下。これ

NBCF の活性発現に必要な構造要因と NBCF 産生における L-グルタミンの役割

DON: 6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン

MSI: L-メチオニンサルフォキシミン

=: 阻害 NBCF 産生への影響: 大きい順に $\rightarrow$, $\rightarrow$, $\rightarrow$ 酵素活性: $\uparrow$ 大, $\downarrow$ 小

図 3. 神経系細胞殺傷性蛋白質 NBCF の性質と産生

NBCF の活性本体は蛋白質でその立体構造と分子内埋没 SS 結合が活性発現に必要²⁸⁾: ①固定化 trypsin や pronase 処理で完全失活. ②dithiothreitol や guanidine 単独処理で部分失活し, 両者併用処理で活性著減. NBCF の糖鎖部分が活性発現・安定性維持に果たす: ①boronate カラムで保持されて sorbitol で溶出. ②neuraminidase や β -glucosidase 処理で N 端増加なく部分失活. ③細胞毒性を示さない低濃度 tunicamycin の培養脳への添加で減産.

新生期マウス培養脳の NBCF 産性は glutamine アミド基転移反応に依存すると示された²⁷⁾: ①Gln 添加量が 24mM まで NBCF 産生は増え通常培地の 2-3 倍に増産. ②glutamic acid では増産されない. ③Gln 欠如では産生しない. ④Gln analog DON はマウス脳由来 Gln-PRPP-amidotransferase や GMP synthetase を阻害し, NBCF 産生が激減. ⑤Gln synthetase 阻害剤 MSI で NBCF 減産.

成体期に比した新生期脳 Gln 代謝酵素活性から, 培養した新生期脳は Gln が不足しやすいと示唆³⁰⁾: ①細胞質 Gln synthetase は顕著に低い, ②ミトコンドリア Pi-dependent glutaminase は幾分低いが, ③細胞質の Gln-PRPP-amidotransferase も GMP synthetase も高活性. 培養脳の NBCF 産生は DNA 複製には直接関係せず転写とこれ以後の段階に依存し, Gln は転写段階での purine 塩基供給の律速因子として関与すると示唆.

図 4. 神経系細胞の分化に伴う NBCF 感受性低下: NBCF 拮抗因子の分泌と細胞内 Ca^{2+} の関与

ヒト神経芽腫 NB1細胞は diBu-cAMP やヒト肺癌腫 A172細胞由来グリア因子 (36 kDa, pI 5.5) で前処理すると神経突起を多数伸展して分化するに伴い, NBCF 感受性が低下する. ①各数の神経突起をもつ NB1細胞を用意してから新鮮培地で NBCF 処理すると, 神経突起数が多いほど NBCF 感受性が小さい. ②分化 NB1細胞は予め cycloheximide 処理すると NBCF 感受性が顕著に還元. tunicamycin 処理で感受性が幾分戻り, DNA・RNA 合成は感受性復元に直接関与しない. ③分化 NB1細胞の分泌物質 (> 5 kDa) を未分化 NB1細胞に加えて NBCF と同時に 6 時間作用させると NBCF の mitochondrial dehydrogenase 活性抑制効果が著減. したがって分化細胞から NBCF 拮抗因子が分泌されると示唆. NBCF 拮抗因子は固定化 trypsin 処理で失効. ④未分化 NB1細胞の分泌物質は高濃度投与しても NBCF 拮抗効果を示さない. ④グリア因子はかかる 24 時間以内の急性な NBCF 拮抗効果は見られず, 1-3 日以上作用させ神経突起が細胞当たり 2-5 個伸展した後に初めて見られた.

図 5. NBCF の生理的役割と脳のプログラム細胞死への関与

NBCF の生理的役割はプログラム死誘発にあると示唆: ①脳のプログラム死期にだけ産生. ②プログラム死期の大脳皮質培養神経細胞を顕著に殺傷. ③非神経系正常細胞よりも神経系癌細胞の DNA 合成や増殖を顕著に抑える. 胎仔細胞と癌細胞の共通点として① α -fetoprotein や carcinoembryonic antigen で代表される carcinoembryonic protein, ②正常成体の胃・胎仔膵・脾臓から分泌される gastrin, 正常成体の胃・胎仔膵・甲状腺様癌から分泌される bombesin-like peptide (GRP) などの異所産生ホルモンが挙げられるので, NBCF はプログラム死を起こす胎仔細胞と類似性のある癌細胞を増殖阻害し, 類似性の少ない正常細胞への阻害は軽微と考えられる.

ら薬剤は単独で増殖に影響しない濃度を用いた. したがって細胞内 Ca^{2+} 濃度変化は glial factor による分化よりも短時間に NBCF 感受性に影響を及ぼし, 細胞への Ca^{2+} 流入や細胞内貯溜体からの Ca^{2+} 放出が, 急性に作動して NBCF 拮抗因子を合成分泌させると考えられる.

脳神経系プログラム死は, 従来解析されてきた神経終末端分枝数や神経栄養因子の他に, Johnson, 三羽らの見出した細胞殺傷因子の関与 (図 5), さらにその拮抗因子 (anti-killer factor) との均衡, 細胞内 Ca^{2+} 動態を含めその分子機構が総括的に解析されようとしている.

文 献

- Hurle, J. M., (1988) *Meth Achiev Exp Pathol.*, 13, 55-86.
- Golstein, P. et al. (1991) *Immunological Reviews* (Munksgaard, Copenhagen), 121
- Tomei, L. D., Cope F. O., (edited by), *Apoptosis*. (1991) Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 三羽信比古 (1992) プログラムされた死—生命現象のパラドックス. pp. 91-119, 岩波書店
- 三羽信比古 (1990) 逆説! 細胞死が生命を形造る, pp. 80-133. NTT 出版
- Oppenheim, R. W. (1989) *Trends Neurosci.*, 12, 252-255.
- Tsumoto, T., Suda, K., Sato, H. (1983) *J. Comp. Neurol.*, 219, 88-99.
- Rakic, P., Riley, K. P. (1983) *Science.*, 219, 1441-1444.
- Ellis, H. M., Horvitz, H. R. (1986) *C.elegans. Cell.*, 44, 817-829.
- Holliday, M., Hamburger, V. (1978) *J. Comp. Neur.*, 170, 311-320.
- O, Leary, D. D. M., Stanfield, B. B. (1984) *Science.*, 225, 1258-1264.
- Cragg, B. G. (1975) *J. Comp. Neurol.*, 160, 147-166.
- Diamond, J., Cooper, E., Turner, C., MacIntyre, L. (1976) *Science.*, 193, 371-377.
- Morrison, R. S. et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 7537-75.
- Mortin, O. P. et al. (1988) *J. Cell. Biol.*, 106, 829-844.
- Sakaguchi, M. et al. (1991) *J. Physiol. (Lond.)*, 434, 257-270.
- Chalfie, M., Wolinsky, E. (1990) *Nature.*, 345, 410-416.
- Martin, D. P., Leimgruber, R. M., Johnson, e. m. (1990) *Soc. Neurosci. Abst.*, 16, 171
- 三羽信比古 (1992) 神経研究の進歩, 36(2), 12-27.
- Miwa, N. (1988) *Biotherapy.*, 2, 311-317.
- Miwa, N. (1990) *Human. Cell.*, 3, 137-145.
- 三羽信比古 (1990) 今西二郎編「新しいサイトカイン: 非免疫系抗腫瘍因子」111-128
- Miwa, N., Mizuno, S. (1985) *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, 110, 196-202
- Miwa, N., Mizuno, S., Okamoto, S. (1983) *J. Antibiotics.*, 36, 715-720.
- Miwa, N., Mizuno, S., Okamoto, S. (1983) *J. Antibiotics.*, 36, 721-727.
- Ishida, A., Miwa, N., Mizuno, S. (1983) *Cancer. Res.*, 43, 4216-4220.

- 27) Miwa, N., Matsuno, T., Mizuno, S. (1987) *J. Cell. Physiol.*, **132**, 538-544.
- 28) Miwa, N., Mizuno, S., Suitani, Y. (1990) *Biochim. Biophys. Acta.*, **972**, 144-151.
- 29) Miwa, N., Nakamura, T., Itoh, S. (1991) *Neurochem. Res.*, **16**, 170-171.
- 30) Matsuno, T., Miwa, N. (1989) *Med. Sci. Res.*, **17**, 425-426.

みわ のぶひこ

1949年生。1971年大阪大学理学部卒業，同大学院生物化学専攻修士課程修了，薬学博士。国立予防衛生研究所抗生物質部主任研究官を経て，1989年広島県立大学生物資源学部助教授。研究目標は，死の視点から生命を解析する立場をとり，細胞殺傷性・細胞増殖制御性の体内物質が癌・老化にどう関与するかを解明すること。学生時代は生物物理化学講座に属していたので生物物理学会は馴染み深い，現在のテーマでもまた接点を持ちたい。

☎08247-4-1000 内線3601,3605

次 号 予 定 内 容

(Vol.32 No. 4 / 通巻 182号)

総 説	神経伝達物質放出の調節機構	木島 博正 田辺 憲子
	視細胞における順応調節蛋白質	河村 悟
	二重層状柔構造体による有機分子の情報表現	宮田 幹二
	プロテアソーム：分子構造と生理機能	田中 啓二
	針の穴からみる生き物と環境	水谷 広
	自発放電ニューロンの時間パターンとカオス	石塚 智 林 初男
	生物のかたちづくりの理論 - 1992年初めの私感 -	土居 洋文
	二次性能動輸送機構の統一的モデル	山登 一郎
解 説	細胞外基質の三次元構造と細胞応答性	林 利彦
談 話 室	「生物物理」アンケート集計報告	生物物理編集委員会
実験技術	Fura-2 による細胞内カルシウムイオン濃度の測定：プローブの緩衝作用	辰巳 仁史 片山 芳文
研究室紹介	Glasgow 大学遺伝学教室 Howard T. Jacobs 研究室	小澤 智生