虚血性神経細胞死におけるCAD(caspase-activated DNase)とDNaseIIの関与

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9501

虚血性神経細胞死における CAD (caspase-activated DNase)と DNase Ⅱの関与

金沢大学医学部医学科脳神経外科学講座(主任:山下純宏教授) 坂田利 幸

げっ歯類からヒトに至るまで、海馬アンモン角 (Cornu ammonis, CA) 1領域の神経細胞が虚血に対して脆弱性を示すこ とはよく知られている.虚血性神経細胞死のメカニズムに関しては、最近、主としてげっ歯類や培養細胞を用いた研究に基づ きアポトーシス説が多数報告されている、しかし、ヒトにおいて、どのような分子が細胞死を決定もしくは実行しているのか は現在なお不明である.本研究は、霊長類の海馬CA1に生ずる虚血性神経細胞死がアポトーシス、ネクローシスのいずれに よるものか、また、その最終実行因子は何であるかを明らかにすることである、本研究においては、ニホンザルを用いて18 分間の全脳虚血を行い、CA1の神経細胞において、アポトーシス経路の最終実行因子であるキャッド(caspase-activated DNase, CAD),およびネクローシスにも関与し得るライソゾーム酵素であるDNase IIと神経細胞死の関与について検討した. ニホンザルのCADをクローニングした後、シークエンスディテクターを用いて虚血前後のCA1におけるCADのmRNA発現量 を検索した.また、イムノブロット法と免疫組織化学的手法を用いて、CA1における CADと DNase Ⅱの蛋白発現および細胞 内局在を検索した. さらに、電子顕微鏡ならびにDNA断片化の解析を行い、虚血性神経細胞死の細胞死パターンがアポトー シス,ネクローシスのいずれであるかを検索した.その結果、CADのmRNA発現量は、コントロール(虚血負荷なし)に比し 虚血後1日で約8.09倍に増加していた. CAD 蛋白の発現量は虚血後1日で約7.28倍に増加し, CAD 蛋白は, 虚血後, 細胞質か ら核内へと移行していた.一方,DNase II活性型蛋白の発現量は、コントロールに比し虚血後2日で約2.47倍、虚血後3日で 約2.54倍に増加していた. DNase II 蛋白は虚血後2日で, CADと同様に細胞質から核内への移行を来した. 虚血後3日および 5日にて, CA1の神経細胞はTUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling)染色陽性を 示した、しかし、これらの細胞は、光学顕微鏡にて好酸性の凝固壊死を示し、電子顕微鏡にてもアポトーシスの形態学的変化 は示さなかった. さらに、DNA断片化の解析にてもアポトーシスに特徴的なラダー像はみられず、ネクローシスに特徴的な スメアー像がみられた、以上より、ニホンザルの海馬の虚血性神経細胞死はネクローシスによるもので、アポトーシス経路が 最終経路まで働いてはいるものの、直接的には細胞死を誘発していないことが示唆された、虚血後発現量の増加をきたした DNase Ⅱは、ライソゾーム酵素のカテプシンと共にライソゾーム外へ放出され、両者がDNAを不規則に切断することにより ネクローシスが生ずるものと推定された.

Key words neuronal death, apoptosis, necrosis, lysosome

海馬アンモン角 (Cornu ammonis, CA) 1領域の神経細胞が一 過性脳虚血後の4~5日に遅発性に細胞死をきたすことは、げ っ歯類から霊長類に至るまでよく知られている^{1)~4)}. 近年,主 としてげっ歯類を対象とした研究で、この虚血性神経細胞死に アポトーシスが関与しているという報告が増えている⁵⁾⁶⁾.す なわち、CA1神経細胞が虚血刺激を受けると、ミトコンドリア からチトクロームCが細胞質に放出され⁷⁾⁸⁾,このチトクローム Cがカスパーゼ-9⁹⁾およびATPと複合体を形成し、2次的にカス パーゼ-3が活性化される¹⁰⁾¹¹⁾.この活性型カスパーゼ-3がアポ トーシスを引き起こす様々な標的を分解し、最終的に細胞死を 誘発するいうものである. 試験管内の実験系において、カスパーゼ-3の基質がいくつか同 定されているが、近年、最終の実行因子としてキャッド/アイ キャッド (caspase-activated DNase / inhibitor of CAD, CAD/ICAD) が同定された¹²⁾⁻¹⁴⁾. これは別名DNA断片化因子 (DNA fragmentation factor)¹⁵⁾と呼ばれ、40kDaのDNaseであ る CAD とそのインヒビターである 45kDaのICADの二量体か ら成る. 活性型カスパーゼ-3がICADを分解すると、CAD は胞 体より核へと移動し、クロマチン凝縮とDNA断片化を起こす ことが明らかになった¹³⁾¹⁶⁾. しかし、生体内の実験系において は、アポトーシスによる細胞死における CADの関与は証明さ れておらず、まして虚血性神経細胞死において CADの関与を

平成12年11月24日受付,平成12年12月20日受理

Abbreviations : CA, Cornu ammonis; CAD, caspase-activated DNase; CPAN, caspase-activated endonuclease; FITC, fluorescein isothiocyanate; ICAD, inhibitor of CAD; PFA, paraformaldehyde; TBS-T, Tris-buffered saline-Tween20; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling

Ħ

検索した報告は皆無である.

げっ歯類で虚血負荷を受けたCA1神経細胞の電子顕微鏡観察 では、アポトーシス小体やクロマチン凝縮といったアポトーシ スに特徴的な形態学的特徴がみられないことより、虚血性神経 細胞死の本態はネクローシスであるという報告もみられる ¹⁷⁾¹⁸⁾. しかし, どの様なメカニズムでCA1神経細胞がネクロー シスをきたすかは、現在なお、明らかにされていない、 Yamashima ら^{19)~21)}は、ニホンザルの CA1 神経細胞において、 虚血負荷によりμ-カルパインが活性化され,活性型μ-カルパ インがライソゾーム膜を損傷する結果、ライソゾームからカテ プシンB, Lが放出され、これらがネクローシスを誘発するの ではないかという"カルパイン-カテプシン説"を提唱してい る. ライソゾームにはシステインプロテアーゼであるカテプシ ンB, Lやアスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシンD, およびDNAエンドヌクレアーゼであるDNase Ⅱなどが含まれ ている.これらは、細胞内での異物貪食のみならず自己貪食の 役割をも担っており、同時に、アポトーシスの制御機構に関与 することも示唆されているが^{22)~26)},その詳細なメカニズムは 明らかではない.虚血性神経細胞死における、これらのプロテ アーゼの関与を示唆する報告は若干みられるが⁶⁾²⁰⁾²¹⁾²⁷⁾²⁸⁾, DNase Ⅱに関しては全く報告されていない.

本研究においては、霊長類の海馬CA1に生ずる虚血性神経細 胞死が、アポトーシス、ネクローシスのいずれのカスケードに よるものかを知るためにニホンザルを用いた検索を行った. す なわち、すでに同様のモデルにおいて、カスパーゼ-3の活性化 を確認し得たこと200より、今回アポトーシス経路の最下流に位 置する実行因子である CAD に注目し,アポトーシスの関与を 調べた. 同時に、Yamashimaらが提唱した"カルパイン-カテ プシン仮説"²⁰⁾²¹⁾に基づき、カテプシンと同様にライソゾーム 酵素であるDNase IIの関与を検索した. 具体的には, ニホン ザルの一過性脳虚血モデルを作成し、海馬CA1領域の神経細胞 における CAD の mRNA と CAD, DNase Ⅱ の蛋白の発現を生化 学的手法を用いて経時的に検索した.また,免疫組織化学的手 法を用いて両者の細胞内局在変化を経時的に検索し、細胞死に おける役割を検討した. さらに, 電子顕微鏡を用いた神経細胞 の形態学的変化と電気泳動によるDNA断片化も解析し、霊長 類の虚血性神経細胞死がアポトーシス,ネクローシスのいずれ であるかを検討した.

対象および方法

I. 全脳虚血モデル

実験には体重5.09.9 kg のニホンザルを用いた. 1.5%のフロ ーセン (武田薬品,大阪) ガスにて麻酔を導入後気管内挿管し, 全身麻酔を行った. 0.5%のフローセン,60%の笑気,40%の 酸素にて全身麻酔を維持し,実験中は乳酸リンゲル液の持続点 滴を行った.動脈圧と脈拍,および直腸温の持続的モニターを 行った.

ー過性全脳完全虚血は、鎖骨部より第二胸骨下縁まで、胸部 を約5cm正中切開し、胸膜を損傷しないように慎重に剥離しな がら縦隔内を進入し、大動脈弓から分岐直後の無名動脈と左鎖 骨下動脈を直視下に剥離し、血管クリップを用いて18分間血 流を完全遮断することにより作成した.血流を遮断する前に、 脳を損傷しないように前頭骨に小さな穴を穿ち、脳血流モニタ ー (Laserflo, Vasamedics Inc., California, USA)を脳表より5mm 挿入し,虚血前・中・後の局所脳血流の測定を行った.血流を 再開通させた後に閉創し,サルを全身麻酔から覚醒させた後, 元気な状態で一旦飼育ゲージに戻した.開胸のみを行って血流 遮断を行わなかったサルをコントロールとして組織学的検討用 に3頭、蛋白定量およびmRNA定量用に5頭用いた.

組織学的検討には、虚血負荷1,2,3,5日後 (各群n=3) に 再び全身麻酔下にて開胸し、左心室に18ゲージ注射針を入れ 生理食塩水500ℓにて潅流したのち、PBSで溶解した4%パラ ホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) 溶液2ℓにて潅流 固定を行った後、海馬標本を摘出した.免疫組織化学用の標本 は4% PFAにて1週間固定し、電子顕微鏡用の標本は2.5%グル タールアルデヒドとオスミウム酸で二重固定した.蛋白と mRNA定量用の試料は、虚血負荷後6時間、1,2,3日 (各群 n=5) に再び全身麻酔下で全脳を摘出後、直ちに4℃のPBSに5 分間冷却し、実体顕微鏡下で海馬CA1領域を摘出し、液体窒素 にて瞬間凍結後、-130℃に保存した.

実験中はサーモスタット (Geymar, New York, USA) を使用 し, 直腸温を37.0-38.0℃に保つように調整した. 以上の実験に 際しては, 不必要な痛みを可及的与えず, 十分な飼料と野菜や 果物等を与えることで愛護的に飼育するように, 実験動物の扱 いには特に留意した.

Ⅱ. cDNA クローニング

摘出したCA1組織よりアイソゲン (ISOGEN, ニッポンジー ン, 東京)を用いて総RNAを抽出し, cDNA 合成キット (firststrand cDNA synthesis kit, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) を用いて逆転写反応を行い. cDNA ラ イブラリーを作製した.ニホンザルのCADとアクチンの塩基 配列を調べるために、CAD およびアクチンの保存された部位 がヒト、ラットおよびネズミ間で最も一致する部位でPCRプ ライマーを設定した. サーマルサイクラー (Gene Amp^R PCR System 9700, PE Applied Biosystems, Foster City, California, USA) にてPCRを行い、そのPCR産物をクローニングベクター (pPCR-Script Amp SK (+) cloning vector, Strategene, La Jolla, California, USA)に挿入し、大腸菌 (XL10-Gold[™] ultracompetent cells, Strategene)に導入してサブクローニングした. この大腸 菌からプラスミドDNAを回収し、セントリスピン (CENTRI・ SPIN_{TM}^{-10, 20}, PRINCETON SEPARATIONS, California, USA) & 行い低分子量複合物質を除去し精製度の高いDNAを作製し, そのDNAの塩基配列をDNAシーケンサー (377 Genetic analyser, PE Applied Biosystems)を用いて調べた.

Ⅲ. 定量的PCR

コントロール, 虚血後6時間, 虚血後1, 2, 3日 (各群 n=5) に摘出したCA1 組織より上記と同様な方法により cDNA を作製 し, -80℃に保存して検索に供した.

虚血後のCA1領域におけるCADのmRNAの発現量を調べる ために,HollandらのTaqmanTMケミストリーの理論に基づく 定量的PCRをABI PRISM 7700 シークエンスディテクター(PE Applied Biosystems)を用いて行った.CADのセンスプライマー として5'-CCGACCTCCTGCACAATGT-3',アンチセンスプライ マーとして5'-TCCAAGCCTTCAAACCACG-3'を設計した.また, 両者間に特異的にハイブリダイゼーションするTaqManプロー ブとして5'-AGCCAGAACATTGCAGCCGAGACC-3'を設計し,リ ポーター蛍光色素としてその5'端をファム (FAM),クエンチャ ー蛍光色素としてその3'端をタムラ(TAMURA)で標識したもの を依託合成した (PE Applied Biosystems). 内部コントロールと してはアクチンを用い,同様に,アクチンのセンスプライマーと して5⁻TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA3',アンチセンスプ ライマーとして5⁻CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG3',さら に,プローブとして5⁻ATGCCCTCCCCCATGCCATCCTGCGT3' を設計し,リポーター蛍光色素としてその5⁻端をヴィク (VIC) で標識したものを依託合成した.PCRにはTaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems)を使用し,95℃で10 分間の熱変性を行った後,95℃で15秒,60℃で1分の2段階を 1サイクルとし計40サイクル行った.以上の手法では,既知量 サンプルの検量線に基づき初期量のmRNAが定量されるが,実 際にはCADのmRNAの初期量をアクチンに対する比として計 算した.また,最終的には,虚血後6時間,1日,2日,3日に おけるCAD mRNAの発現量を,コントロールに対する比とし て評価した.

Ⅳ. イムノブロット

コントロール, 虚血後6時間, 虚血後1, 2, 3日 (各群 n=5) に摘出した CA1 組織を4 °C の RIPA 溶液 (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl,1% NP-40,0.5%デオキシコール酸ナトリウム,0.1% SDS) 中にて超音波粉砕して可溶化し、4℃、10,000×gにて10 分間遠心し、上清のみ回収した. Bradford法 (Bio-Rad, Hercules, USA) にて蛋白定量後, 直ちに98℃で10分間保温し, 電気泳動をLaemmliのSDS-PAGE法にて行った。16%のSDS ポリアクリルアミドゲル (岩城硝子,千葉)を用いて,各レー ンに40 µgの蛋白をのせ、24 mAで90分間泳動後、イモブリン PVDFメンブレン(Millipore, Bedford, USA)に160 mA, 2時間の 条件で転写させた、メンブレンを1%のゼラチン (Bio-Rad) を 含んだ0.5% Tween20を含むトリス塩酸緩衝液(Tris-buffered saline-Tween20, TBS-T)で2時間ブロッキングした. 一次抗体と しては、ブロッキング溶液にて2,000倍希釈した抗CAD抗体 [CPAN (caspase-activated endonuclease) (c-19), Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA], ないし, 1,000 倍希釈し た抗DNase II 抗体[Rabbit Anti-DNase II (C-Terminal) Polyclonal Antibody, Chemicon International, Inc., Temecula, California, USA]を4℃で一晩反応、あるいは室温で4時間反応させた. TBS-Tで5回洗浄後、0.5%のゼラチンを含んだTBS-T溶液にて それぞれ 6,000 倍希釈, 3,000 倍希釈した HRP (Horseradish peroxidase) 標識二次抗体 (Amersham Pharmacia Biotech) を45 分間反応させた.TBS-Tで6回洗浄後,ECLキット(Amersham Pharmacia Biotech)にて発色させ、ハイパーフィルム (Amersham Pharmacia Biotech) に転写した. なお, 内部コン トロールとして α -チュブリン (Santa Cruz Biotechnology) を用 いて同様に反応させた.

イムノブロットによる蛋白の半定量計測はNIH イメージ V1.61 ソフトウェア (Apple Inc., Cupertino, USA)を使用して計 測し, CAD およびDNase II の α -チュブリンに対する比として 計算した. 最終的には, 虚血負荷におけるそれぞれの蛋白の発 現量をコントロールに対する比として評価した.

♥. 蛍光免疫組織化学

コントロール, 虚血後1, 2, 3, 5日 (各群 n=3) に摘出し PFA にて固定した海馬組織をパラフィンに包埋後, 5μmの組 織切片を作成した. 組織切片をキシレンにて脱パラフィン後, 100% (2回), 90%, 80%のエタノールにて5分ずつ浸透させ 親水化しPBSで洗浄後, 0.3%過酸化水素加メタノールにて内

因性ペルオキシダーゼを失活させた. 抗原賦活処理のため 0.1Mクエン酸緩衝液中で10分間のマイクロウェーブ処理を行 った. PBSで洗浄後,非特異的反応抑制のため, PBSで溶解し た5%正常血清を1時間反応させた。一次抗体として抗CAD抗 体[CPAN (c-19), Santa Cruz Biotechnology], あるいは抗DNase II抗体[Rabbit Anti-DNase II (C-Terminal) Polyclonal Antibody, Chemicon International, Inc.]をそれぞれ200倍に希釈し、4℃で 一晩反応させた.対応するフルオレッセン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) で標識された二次抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を1時間反応させた. なお,二次抗体以降 の操作はすべて遮光しながら行った. PBSで3回洗浄した後, PBSで0.2 µg/mlに希釈したプロピヂウム・イオダイド (propidium iodide) (Molecular Probes, Eugene, USA) を5分間 反応させ、再度PBSで3回洗浄後、退色封入剤(Vectashield Mounting Medium for Fluorescence, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, California, USA)で封入し、共焦点レーザースキャ ン顕微鏡 (LSM510, Ver.2.3, Carl Zeiss Co., Ltd, 東京) にて観察し た.

N. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferasemediated dUTP-biotin nick end labeling) 染色

海馬の組織切片について、組織内細胞死検出キット(Roche Molecular Biochemicals,東京)を用いてTUNEL染色法を行った.すなわち、組織切片をキシレンにて脱パラフィンし、連続希釈したエタノールにて親水化した後、PBSで洗浄した.メタノールに溶解した0.3%過酸化水素水溶液で30分間浸透し、再度PBSで洗浄後、10 mMトリスクロル緩衝液 (pH 7.4) に溶解した20 μ g/mlのプロテイナーゼK溶液で15分間室温で反応させた.PBSで洗浄後、末端デオキシリボスクレオチド転移酵素(terminal deoxyribonucleotidyl transferase)とFITC標識dUTPを含む反応液を37℃で1時間反応させた.PBSで洗浄後、ベルオキシダーゼ標識ヒツジ抗フルオレッセン抗体と37℃で20分間反応させた後、ジアミノベンチジン (diaminobenzidine) (Sigma, St.Louis, USA) にて発色させ、最終的にヘマトキシレン 染色を行いキシレンで封入した.

Ⅶ. 電子顕微鏡

PFA にて潅流固定した脳組織のCA1領域を細切し,2.5% グ ルタールアルデヒド溶液で数日間固定し,続いてカコジル酸溶 液で溶解した10%シュクロース溶液に置換し,1週間固定した. 10%シュクロース溶液で洗浄した組織をオスミウム酸で後固定 し,最終的にエポンに包埋した.この組織より超薄切片を作成 し,ウラニル酢酸とクエン酸鉛で二重染色後,電子顕微鏡(H 立 H600型,東京)で観察した.

WI. DNA断片化の解析

コントロール (n=5), 虚血後1, 2, 3日 (各群 n=5) に摘出し た CA1 組織 100 mg を溶解溶液 (20 mM EDTA, 0.5%Triton X-100, 5 mM Tris-HCl) 中で超音波粉砕して可溶化し, 10,000×gにて 10分間遠心後, 上清のみ抽出し, フェノールを加えた後, 再度 12,000×gにて10分間遠心後, 上清のみ抽出した. クロロホル ム・イソアミルアルコールを加え12,000×gにて5分間遠心後, 上清のみ抽出し, 3M 酢酸ナトリウム溶液と100%エタノール を加え, -20℃で一晩保存した. その溶解液を15,000×gにて 10分間遠心後, 上清を取り除き乾燥させた. TE溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) に溶解し, RNaseを加え37℃で1時間 保温し, DNAの抽出を終了した. 抽出されたDNAを2%アガ

Ħ

ロースゲル (Agarose L 03, Takara Biomedicals, 東京) で電気泳 動し解析を行った.

Ⅳ. 統計学的検討

ABI PRISM 7700 シークエンスディテクターによる mRNAの 定量とイムノブロット法による蛋白定量のデータは,バートレ ット検定を用いて分散が均一であることを検定した後,一元配 置分散分析法を用いて検定し,1%未満の危険率をもって有意 差ありと判定した.有意差が認められたものに対しては, FisherのPLSD法にて多重比較検定(ポストホックテスト)を行 った、また、数値はX±SDで表記した.

績

成

I. 検査結果

実験中の直腸温は37.0から38.0℃で、虚血負荷前の収縮期血 圧は88±16 mmHgであった. 無名動脈と左鎖骨下動脈の血流 を遮断すると、サルの瞳孔は直ちに散大し、血圧は急激に上昇 し、収縮期血圧は198±18 mmHgとなった. 虚血前の局所脳 血流は40±5 ml/分/100g脳であるのに対し、虚血負荷中のそ れは1.0±0.5 ml/分/100g脳であり、血流遮断により脳への血 流がほぼ完全に遮断されていることが確認された. 18分間の虚 血負荷終了後には、ニホンザルのバイタル・サインは虚血負荷 前とほぼ同様であった.

Ⅱ. CAD, アクチンの cDNA クローニング

ニホンザルの CAD の塩基配列はヒトの CAD (DFF40, DNA fragmentation factor-40ともいう)の塩基配列と94.0%の相同性 を示し (図1), アクチンの塩基配列では100%の相同性を示し た. 一方, ニホンザルの CAD のアミノ酸配列はヒトの CAD の それと95.3%の相同性を示した.

Ⅲ. CADのmRNA 発現量の変化

シークエンスディテクターによる定量的検索では、CA1領域 のCADのmRNAの発現量は、コントロールに比し虚血後1日 では8.09±0.80倍と有意に増加していた(p < 0.001). しかし、 虚血後6時間、虚血後2日、3日においては、それぞれ1.52± 0.40倍、1.04±0.92倍、0.95±0.69倍と、コントロールに比し 有意な増加は認められなかった(図2).

Ⅳ.蛋白発現量の経時的変化

CAD はヒトの脳において発現量が少なく、リンパ節や心臓、 膵臓などにおいて発現量が多いとされているため¹⁴⁾、ポジィテ ィブコントロールとして心臓とリンパ節を使用した. CAD 蛋 白は、分子量40kDaのバンドとして検出されるが、コントロー ルCA1においてはきわめて少量しか検出されなかった(図3A). コントロールの発現量を基準とすると、虚血後6時間では 4.58±0.96倍と有意な増加を示し(p < 0.01)、さらに、虚血後1 日では7.28±1.07倍と有意な増加を示し(p < 0.001)、虚血後1 日では5.62± 1.18倍、虚血後3日では4.14±1.60倍とコントロールに比し有 意に高値を示すものの(p < 0.01)、虚血後1日以降は経時的に減 少傾向を示した(図3 B).

DNase II は、前駆体が40kDaの分子量で、 α 鎖32kDaと β 鎖 12kDaの二つのサブユニットから構成されている。本研究で用 いた抗体は、前駆体の40kDaと活性型の α 鎖32kDaの両者を認 識するものである(図3C). 図3Dで示すように、前駆体はコン トロールに比し虚血後6時間で1.44±0.07倍と有意な増加を認 めた(p < 0.001). それ以外は、虚血後1日では1.16±0.17倍、2 日では 0.95 ± 0.05 倍,3日では 1.03 ± 0.09 倍と有意な増加は認 められなかった.一方,活性型の α 鎖32kDaはコントロールで も存在しており,その発現量と比較して虚血後6時間では 1.18 ± 0.22 倍,虚血後1日では 1.14 ± 0.22 倍と有意な増加は認 められなかった.しかし,虚血後2日では 2.47 ± 0.24 倍,3日 では 2.54 ± 0.26 倍と有意な増加を示した(p < 0.001)(図3 E).

Monkey: 1	
Human : 209	
Monkey: 61	
Human : 269	GTGCCTGTACGAGGATGGCACGGAGGTGACGGAAGATTACTTCCCCAGTGTTCCCGACAA 328
Monkey: 121	CGCCGAGCTGGTGCTGCTCACTTCGGGCCAGGCCTGGCAGGGCTATGTAAGTGACATCGG 180
Human : 329	CGCCGAGCTGGTGCTGCTCACCTTGGGCCAGGCCTGGCAGGGCTATGTGAGCGACATCAG 388
Monkey: 181	6CGCTTCCTCAGTGCATTTCACGAGCCGCACGCGGGGCTCGTCCAGGCCGCCCAGCAGCT 240
Human : 389	GCGCTTCCTCAGTGCATTTCACGAGCCACAGGTGGGGCTCATCCAGGCCGCCCCAGCAGCT 448
	>
Monkey: 241	CCTGTGTGAGCAGGCCCCGCAGAGGCAGAGGCTGCTGC <u>CCGACCTCCTGCACAA1G1</u> 300
Human : 449	GCTGTGTGATGAGCAGGCCCCACAGAGGCAGAGGCTGCTGGCTG
	<u> </u>
Monkey: 301	CAGCCAGAACATTGCAGCCGAGACCCGGGCTGAGGACCCGC <u>CGTGGTTTGAAGGCTTGGA</u> 360
Human : 509	CAGCCAGAACATCGCGGCCGAGACCCGGGCTGAGGACCCGCCGTGGTTTGAAGGCTTGGA 568
Monkey: 361	GTCCCGATTTCAGA 374
Human : 569	GTCCCGATTTCAGA 582

Fig. 1. Deduced sequence of monkey brain CAD from the cDNA clone. This sequence shared 94.0 % identity with the human CAD / DFF40 (GI = "4758149" [GenBank]). Under line are sense PCR primer (→), anti-sense PCR primer (←) and PCR probe (↔).







Fig. 3. Western blot analyses of CAD and DNase II protein in the monkey hippocampal CA1 sector, (A) CAD protein was shown by a single band of 40-kDa, and (C) DNase II protein was shown by two bands of the precursor (40-kDa) and α -chain of activated protein (32-kDa). Heart (lane Heart) and lymph node tissues (lane Lym.), served for positive controls of CAD protein. α -tubulin was used as an internal control (bottom panel). (B, D, E) Graphs, semiquantitative analyses of expressions of CAD (B), DNase II precursor protein (D), and DNase II α -chain subunit (E), determined by optical density (OD) measurements on NIH image soft. Expression of CAD was increased at 6 hr, days 1, 2, and 3 after ischemia, being compared to the non-ischemic control. The level was most increased on day 1 and decreased on days 2 and 3. DNase II precursor protein expression (40-kDa) was significantly (p < 0.001) increased at 6 hr after ischemia, but not increased on days 1, 2, and 3. Expression of the activated form, α -chain (32-kDa), was significantly (p < 0.001) increased on days 2 and 3. Data were shown by X \pm SD (n=5 per group), representing fold changes in ischemic brains, being compared to the non-ischemic controls. *p < 0.01, and ** p < 0.001 versus non-ischemic controls (ANOVA and post hoc Fisher's PLSD tests).

V. 蛍光免疫組織化学

コントロール CA1 の神経細胞においては, CAD の免疫染色 性はほとんどみられなかった (図4 A). しかし, 虚血後の神経 細胞においては CAD の免疫染色性は明らかに増加していた (図 4 B-D). すなわち, 虚血後1日で, ほとんどすべての神経細胞 が細胞質で陽性所見を呈し, 一部の神経細胞は核でも陽性であ った. 虚血後2日, 3日では, 神経細胞は細胞質のみならず核 でも陽性所見を呈した. 以上より, CA1 領域の神経細胞の CAD は虚血負荷後, 有意に増加しており, その局在は細胞質 から核へ移行していた.

一方, DNase Ⅱの免疫染色性は, コントロールのCA1神経細胞においては, 細胞質で強い陽性反応がみられたが, 核は陰性であった (図5A). しかし, 虚血後2日では, ほとんどすべての神経細胞が細胞質のみならず核でも強い陽性所見を示した (図5B-D). すなわち, 虚血後のCA1神経細胞においては, DNase ⅡもCADと同様に細胞質から核へ移行していた.

N. TUNEL 染色

TUNEL染色は、コントロール、および虚血後1日、2日においては陰性であったが、虚血後3日、5日で陽性所見を呈した. 虚血後3日、5日においては、虚血耐性を示すCA2-4神経細胞 は陰性でCA1神経細胞の核のみが陽性であった(図6).また、 これらの神経細胞は光学顕微鏡観察で好酸性に染まる凝固壊死 像を呈していた(結果は示していない).

Ⅰ. 電子顕微鏡による神経細胞の超微細構造

コントロールの神経細胞では、核のクロマチン分布は水泡状 を呈し、核膜と細胞質膜は二重構造を保っていた(図7 A). 虚 血後1日では、ゴルジ装置、粗面小胞体などの空胞化とミトコ ンドリアの膨化、ライソゾーム膜の断裂像等の細胞質の強い変 性がみられた.コントロールと比較すると、核は全体的に暗く、 散在性にクロマチンの小凝縮像を示した.細胞全体も縮小して おり、核膜と細胞質膜は陥凹を示すものの、この時点では、核 膜、細胞質膜ともに二重構造をほぼ保っていた(図7 B).しか し、虚血後3日では、細胞質の空胞化が一層顕著になり、核小 体の変性も認め、核膜も一部断裂していた(図7 C).さらに、 虚血後5日では核膜と細胞質膜は、著明な断裂像を示し、神経 細胞の変性はさらに進行していた(図7 D).クロマチンの凝縮 は虚血後1日に比しやや強度となっている(図7 D)ものの、典 型的なアポトーシス小体の形成はみられなかった.

すなわち,電子顕微鏡による観察では,虚血後のいずれの時 間帯においてもアポトーシスに特徴的な形態はみられなかっ た.また,虚血後初期(1日)では典型的なネクローシスの形態 (負荷直後の核膜や細胞膜の断裂像)を示さなかったが,虚血後 後期(3~5日)においては典型的なネクローシスの形態を示し た.

M. DNA断片化の解析

電気泳動されたDNAは、コントロール、虚血後1日ともに

田



Fig. 4. Immunofluorescent images of CAD protein. CAD immunostaining with FITC (green) counterstaing of the monkey hippocampal CA1 sector. (A) Control. (B) Day 1 after ischemia. (C) Day 2. (D) Day 3. Compared to the non-ischemic control (A), CAD immunofluorescence was increased in the cytoplasm of CA1 neuron on day 1 after ischemia (B). On days 2 and 3, CAD immunofluorescence was seen not only in the cytoplasm but also in the nucleus of CA1 neuron (C, D). Scale bar, 20 μ m.



Fig. 5. Immunofluorescent images of DNase II protein. DNase II immunostaining with FITC (green) and propidium iodide with rhodamine (red) counterstaing of the monkey hippocampal CA1. (A) Control. (B) Day 1 after ischemia. (C) Day 2. (D) Day 3. DNase II immunoreactivity at the non-ischemic normal hippocampus (control) was positive in the cytoplasm. But, on days 2 and 3 after ischemia, DNase II immunoreactivity was seen not only in the cytoplasm but also in the nucleus. Similar to CAD, DNase II protein transferred from the cytoplasm to the nucleus after ischemia. Scale bar, 20 μm.



Fig. 6. TUNEL staining of the postischemic neurons on day 5 after ischemia. The postischemic CA1 neurons on days 3-5 showed positive TUNEL staining. Specific staining was seen in the CA1 sector, but the remaining sectors were negative. Scale bar, 20 μ m.



Fig. 8. Genomic DNA agarose gel electrophoresis. No DNA laddering was observed in the monkey hippocampal CA1 sector of non-ischemic normal control brain (lane 1), day 1 (lane 2), day 2 (lane 3), and day 3 (lane 4) after ischemia. In contrast, on days 2 and 3 after ischemia, DNA smear was detected. MW, Molecular weight.



Fig. 7. Ultrastructural features of the neuronal degeneration after the 18 min whole brain complete ischemia. (A) Control. (B) Day 1 after ischemia. (C) Day 3. (D) Day 5. Compared to the control neuron (A), the CA1 neuron on day 1 (B) showed swollen and vacuolated organelles. But the nuclear and plasmic membranes in the neuron remained intact. On day 3 (C), the CA1 neuron showed the progressive cytoplasmic degeneration, and aliquot of nuclear and plasma membranes broken. The nucleus showed heterogeneous chromatin condensation into numerous, irregular clumps, while the nucleolus showed mild degeneration. On day 5 (D), the membranes of the nucleus and cytoplasm were severely broken, and the nucleus showed many heterogeneous chromatin condensation, being compared to day 1 after ischemia. The postischemic CA1 neuron never showed typical apoptotic features such as apoptotic body or sharp chromatin condensation. Scale bar, 2 μm.

Æ

アポトーシスでみられるラダー像,ネクローシスでみられるス メア像を示さなかった.しかし,虚血後2日ではスメア像を呈 し始め,虚血後3日では明らかなスメア像を示した(図8).い ずれの時期においてもアポトーシスに典型的なDNAラダー像 はみられなかった.

痃

一過性脳虚血後に海馬CA1領域に生ずる遅発性神経細胞死に 関しては、主としてげっ歯類や培養細胞を用いて多角的な解析 がなされてきたが、現在なおそのメカニズムに関しては不明な 点が多い. 最近では、虚血性神経細胞死はミトコンドリア由来 のカスパーゼ経路を介したアポトーシスにより誘発されるとす る報告が多い. すなわち, CA1領域で細胞死が起こる際に、ミ トコンドリア膜上に存在するバックス蛋白 (Bax) の増加²⁹⁾やミ トコンドリア内の間隙からのチトクロームCの放出⁷⁸⁹にひき続 き、カスパーゼ-9の活性化⁹やカスパーゼ-3の活性化¹¹⁾が生ず ることが証明されている. また、マウスを用いた一過性脳虚血 モデルでは、カスパーゼ (特にカスパーゼ-3) 阻害剤である 2-DEVD-FMKを虚血後直ちに投与することによって海馬 CA1領 域の神経細胞死が減少すること¹¹⁾や梗塞巣が有意に減少するこ と³⁰⁾が報告されている. さらに, ICE (interleukin-1β converting enzyme) 遺伝子ノックアウトマウスを用いた実験で は、脳浮腫や梗塞巣が有意に抑制されること31)が報告されてい る.しかし、ごく最近の報告では、アポトーシスによって虚血 性神経細胞死が誘発されるという概念が疑問視され始めてい る. すなわち、カスパーゼ阻害剤のz-DEVD-FMKの投与後, 急性期においては神経細胞死は抑制されるが、長期間の経過で 最終的には細胞傷害をきたしていることが報告された³²⁾.また, Liら³³⁾は、カスパーゼ阻害剤は実は脳の温度を下げることによ って細胞障害を抑制しているのであり、脳の温度を一定にすれ ばカスパーゼ阻害剤を投与しても細胞死が起こることを証明 し、アポトーシス経路が働くのは、細胞死を誘発するためでな く炎症反応を惹起するためではないかと推定した. さらに, 種々の動物を対象とした虚血性神経細胞死の電子顕微鏡観察で は、神経細胞はネクローシスの形態を示しているとする報告が 増えている1718). すなわち, 生化学的手法ではアポトーシスの 所見が得られるのに対し、形態学的手法ではネクローシスの所 見が得られるといった矛盾する現象がみられているのが現状で ある.この様な現状を打破するためには、アポトーシス経路の 最終実行因子である CAD に着目して,虚血性神経細胞死にお けるアポトーシス経路の関与を調べることが得策であると思わ れる.

げっ歯類を用いた一過性脳虚血モデルでは、カスパーゼ-3の 活性化とTUNEL染色陽性という二つの結果より、虚血性神経 細胞死のメカニズムはアポトーシスであるとされている¹¹¹.同 様に、ニホンザルを用いた虚血性神経細胞死においても、虚血 後1日でミトコンドリアを介したカスパーゼ-3の活性化が証明 されている²⁰⁰.本研究においても、TUNEL染色は陽性反応を 呈し、アポトーシスの最終実行因子であるCADのmRNAの発 現量が、虚血後1日で約7倍に増加していた.また、これと一 致して、免疫組織化学的検索では、虚血負荷前の神経細胞には ほとんど認められなかったCADが虚血負荷後には著明に発現 していた.この様に、虚血負荷によりCADの明らかな動態変 化がみられたことから、虚血負荷によってアポトーシス経路が 最下流まで機能していることが示唆された. アポトーシス経路 には、ミトコンドリアからチトクロームCの放出をブロックす るBcl-2³⁴⁾³⁵⁾,カスパーゼ (特にカスパーゼ-3)の活性を抑制する IAP (inhibitor of apoptosis protein)ファミリー[神経細胞では NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein)]³⁶⁾³⁷⁾など,その経 路を抑制する様々な蛋白が存在しており、アポトーシスのシグ ナルが途中でブロックされ、アポトーシスが抑制されることも 十分あり得る.しかし、ニホンザルの一過性脳虚血モデルにお いては、CADは時間の経過とともに明らかに細胞質から核へ 移行していた.すなわち、ニホンザルの虚血性神経細胞死にお いてもアポトーシスの経路が何らかの役割を果たしていること は疑う余地がない.

しかし、電子顕微鏡による観察では、虚血後のCAI神経細胞 はアポトーシス小体や均一で滑らかなクロマチン凝縮などアポ トーシスに特徴的な形態を示さなかったこと、また、DNA解 析においてもアポトーシスに特徴的なラダーパターンはみられ なかったことより、結果としてアポトーシスではなくネクロー シスが生じていることは明らかである。最近ではTUNEL染色 はネクローシスにおいてもDNAの不規則な切断によるDNAの 3'-OH末端が存在するため陽性を呈することがあり、TUNEL 染色陽性、即ちアポトーシスとは言えないことが判明した.以 上の結果より、ニホンザルにおいてはアポトーシス経路が最後 まで伝達されているが、その虚血性神経細胞死はアポトーシス によるものではなく、ネクローシスによるものであることが示 唆された.したがって、必然的にネクローシスの経路を明らか にせねばならないことになる.

そこで、本研究においては、電子顕微鏡観察にてCA1神経細 胞のライソゾーム膜の断裂を認めたことから、カテプシンと同 様に²⁰⁾, ライソゾーム内に存在する重要なエンドヌクレアーゼ であるDNase Ⅱに注目した. DNase Ⅱは虚血後、活性型蛋白 が有意に増加し、その局在もライソゾームから核へ移行してい ることが証明された.ニホンザルのCA1神経細胞における DNase Ⅱ 蛋白の発現は、CAD に比し多いため、DNase Ⅱの酵 素活性はCADより強いと推定される.もしCADがより強力に 働き細胞死を誘発しているのであれば、神経細胞の核は均一で 滑らかなクロマチン凝縮を示し、DNA はラダーパターンを呈 するはずである. さらに, CAD 蛋白発現のピークは虚血後1日 であるため、虚血後1日で細胞死が生じると思われる.しかし、 実際に細胞死が生じるのは、早くとも虚血後3日であり、CAD 発現のピークとは2日間のずれがあった.この点、DNaseⅡは、 虚血後2日から活性型蛋白が増加し、3日においてもその活性 が持続しており (図3 C),時間的に細胞死が発生する時期とよ く一致した.活性型蛋白の増加と共にDNase Ⅱの細胞質から 核への移行もみられており,核内に移行したDNase ⅡがDNA を断片化している可能性もある. DNase Ⅱの至適 pH は 4.1と非 常に低いため生体内,特に脳内ではDNase Ⅱの活性は緩徐に 作用し、そのため、虚血性神経細胞死は虚血後3~5日に緩徐 に進行するのではないかと推定される.

DNase II は最近になってクローニングされ,生体内のどの組 織においても多量に存在していることが判明した³⁸⁾.また, DNase II はカスパーゼの活性化によっても活性化され³⁹⁾,アポ トーシスによる細胞死に関与することも報告されている^{23) 24)}. 虚血負荷によるカスパーゼ-3の活性化によってDNase II が放出 される可能性もあるが,Yamashima ら²⁰⁾が観察したのと同様, 本研究においても、虚血直後からライソゾーム膜の断裂像が電 子顕微鏡にて観察された(結果は示していない).カスパーゼ-3 の活性化がみられるのは、げっ歯類モデルでは虚血後4時間以 降であり、ニホンザルでも虚血後6時間以降であることから (結果は示していない)、時間的経過からは、ライソゾーム膜の 断裂はカスパーゼ-3の活性化によるものとは考えにくい.むし ろ、カルシウム依存性⁴⁰⁾⁻⁴²⁾に膜の変形や変性をきたすことが 知られているカルパイン⁴³⁾が関与している可能性が高い. Yamashimaら¹⁹⁾⁻²¹⁾は本研究と同様のニホンザルを用いてμ-カ ルパインの動態に注目し、活性型μ-カルパインが虚血後の CA1神経細胞のライソゾーム膜に局在し、ライソゾーム膜の断 裂が生じていることを報告している.すなわち、一過性脳虚血 中に生ずるカルシウムイオンの上昇が惹起するμ-カルパイン の活性化によってライソゾーム膜が断裂し、ライソゾームから DNase II が放出されるものと推定される.

近年、主としてげっ歯類や培養細胞を用いた研究から、虚血 性神経細胞死のメカニズムはアポトーシスであるとする報告が 多い. 今回の実験結果においても, CAD の動態変化があるこ とからアポトーシス経路が最終段階まで働いていることが証明 された、しかも、アポトーシス経路が最終段階まで働いている にもかかわらず、細胞死の形態学的特徴はアポトーシスではな くネクローシスの像を呈していた. アポトーシスの経路はネク ローシスの発生にどのように関与しているのであろうか. Liら 33)が推定するように、アポトーシス経路は直接細胞死に関わる のではなく、むしろ虚血に伴う炎症反応などに関与しているの かもしれない. あるいは、CADの脳内における発現量が DNase Ⅱと比べてきわめて少ないために、神経細胞はアポトー シスの実行ができないのかもしれない. したがって, CADは, 虚血性神経細胞死の主因ではなく副因である可能性が高い. 霊 長類における虚血性神経細胞死は、虚血負荷によって発現が増 加したDNase Ⅱのライソゾーム外への放出と、ひき続きおこ る核内への移行がDNAを分解し、同時にライソゾーム外へ放 出されたカテプシンが細胞内構成蛋白およびDNAを分解し, この両者が相補的にCA1神経細胞のネクローシスを惹起してい るものと思われた.

今後, ライソゾーム膜断裂の機序を解明した上で, ライソゾ ーム膜からのDNase Ⅱ およびカテプシンの放出, およびその 活性を抑制することにより, 神経細胞を保護するストラテジー が開発されるものと思われる.

論

結

虚血性神経細胞死のメカニズムを解明するために、ニホンザ ルを用いて一過性全脳虚血モデルを作成し、海馬CA1領域での アポトーシス経路の最下流の実行因子であるCAD、およびラ イソゾーム酵素のDNase Ⅱの発現と細胞内局在を検索すると 共に、虚血性神経細胞死の細胞死パターンを検索し、以下のよ うな結果を得た。

1. ニホンザルの一過性脳虚血モデルにおいて, CADの mRNAおよび蛋白の発現が虚血後1日で増加していた. さらに, 免疫組織化学的に, 増加した CAD が神経細胞の細胞質から核 へ移行している所見が得られた.

2. DNase IIの活性型蛋白は、虚血後2日および3日で増加 していた.さらに、免疫組織化学的に、虚血後2日および3日 で、DNase II が神経細胞の細胞質から核へ移行している所見が 得られた.

3. 虚血後3日および5日において,海馬CA1神経細胞は TUNEL染色は陽性を示したが,それらの神経細胞は光学顕微 鏡観察では好酸性の凝固壊死像を示した.

4. 電子顕微鏡観察において,虚血後の神経細胞はいずれの 時期においてもアポトーシスの形態像を示さなかった.虚血後 初期においては,虚血神経細胞は典型的なネクローシスの形態 像は示さなかったが,ライソゾーム膜の断裂を認めた.虚血後 後期では,虚血神経細胞は典型的なネクローシスの形態を示し た.しかも,海馬CA1領域のDNA断片化解析では,ネクロー シスに典型的なスメア像がみられた.

以上より,一過性全脳虚血後に生じるニホンザル海馬 CA1領 域の遅発性神経細胞死は,ネクローシスによって神経細胞死が 生じていることが示唆された.ネクローシスを誘発する因子と して,ライソゾームから放出される DNase Ⅱが関与している ことが示唆された.ニホンザルの虚血性神経細胞死においても, アポトーシス経路が最下流まで働いていることが確認された が,その役割については今後の検索が期待される.

辞

謝

文

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部脳 神経外科学講座山下純宏教授に深甚なる謝辞を表します.また、直接の 御指導を賜りました同教室の山嶋哲盛助教授と北海道大学生体機能構造 学講座渡辺雅彦教授に心から感謝いたします.また、本研究の遂行に際 し、御指導を賜りました同教室の東馬康郎助手、ならびに内山尚之助手、 電子顕微鏡技術員横田輝一氏、今村明子文部技官に心から感謝の意を捧 げます.さらに、御支援と御協力を頂きました金沢大学脳神経外科学講 座の皆様、ならびに留学生の趙亮先生に深く感謝致します.なお、本研 究は、科学技術振興調整費により助成された.

献

1) Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. Brain Res 239(1):57-69, 1982

2) Pulsinelli WA, Brierly JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of trnsient forebrain ischemia. Ann. Neurol. 11: 491-498, 1982

3) Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. Neurology 37(8):1281-1286, 1987

4) Tabuchi E, Endo S, Ono T, Nishijo H, Kuze S, Kogure K. Hippocampal neuronal damage after transient forebrain ischemia in monkeys. Brain Res Bull 29(5):685-690, 1992

5) MacManus JP, Buchan AM, Hill IE, Rasquinha I, Preston E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. Neurosci Lett 164(1-2):89-92, 1993

6) Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibanai K, Kominami E, Uchiyama Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. J Neurosci 15(2):1001-1011, 1995

7) Sugawara T, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, Chan PH. Mitochondrial release of cytochrome c corresponds to the selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia. J Neurosci (Online) 19(22):RC39, 1999

8) Antonawich FJ. Translocation of cytochrome c following transient global ischemia in the gerbil. Neurosci Lett 274(2):123-

Ħ

126, 1999

9) Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, Salvesen GS, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci USA 96(10):5752-5757, 1999

10) Pettmann B, Henderson CE. Neuronal cell death. Neuron 20: 633-647, 1998

11) Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. J Neurosci 18(13):4914-4928, 1998

12) Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature 391(6662):43-50, 1998

 Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature 391(6662):96-99, 1998

14) Mukae N, Enari M, Sakahira H, Fukuda Y, Inazawa J, Toh H, Nagata S. Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. Proc Natl Acad Sci USA 95(16):9123-9128, 1998

15) Liu X, Zou H, Widlak P, Garrard W, Wang X. Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. J Biol Chem 274(20):13836-13840, 1999

16) McIlroy D, Sakahira H, Talanian RV, Nagata S. Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli. Oncogene 18(31):4401-4408, 1999

17) Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE,Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. Brain Res Bull 46(4):281-309, 1998

18) Colbourne F, Sutherland GR, Auer RN. Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. J Neurosci 19(11):4200-4210, 1999

19) Yamashima T, Saido TC, Takita M, Miyazawa A, Yamano J, Miyakawa A, Nishijyo H, Yamashita J, Kawashima S, Ono T, Yoshioka T. Transient brain ischaemia provokes Ca2+, PIP2 and calpain responsesprior to delayed neuronal death in monkeys. Eur J Neurosci 8(9):1932-1944, 1996

20) Yamashima T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. Prog Neurobiol 62(3):273-295, 2000

21) Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka T, Kominami E. Inhibition of ischemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. Eur J Neurosci 10(5):1723-1733, 1998

22) Barry MA, Eastman A. Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic Ca2+ and pH. Biochem Biophys

Res Commun 186(2):782-789, 1992

Barry MA, Eastman A. Identification of deoxyribonuclease
 II as an endonuclease involved in apoptosis. Arch Biochem
 Biophys 300(1):440-450, 1993

24) Odaka C, Mizuochi T. Role of macrophage lysosomal enzymes in the degradation of nucleosomes of apoptotic cells.J Immunol 163(10):5346-5352, 1999

25) Shibata M, Kanamori S, Isahara K, Ohsawa Y, Konishi A, Kametaka S, Watanabe T, Ebisu S, Ishido K, Kominami E, Uchiyama Y. Participation of cathepsins B and D in apoptosis of PC12 cells following serum deprivation. Biochem Biophys Res Commun 251(1):199-203, 1998

26) Ohsawa Y, Isahara K, Kanamori S, Shibata M, Kametaka S, Gotow T, Watanabe T, Kominami E, Uchiyama Y. An ultrastructural and immunohistochemical study of PC12 cells during apoptosis induced by serum deprivation with special reference to autophagy and lysosomal cathepsins. Arch Histol Cytol 61(5):395-403, 1998

27) Seyfried D, Han Y, Zheng Z, Day N, Moin K, Rempel S, Sloane B, Chopp M. Cathepsin B and middle cerebral artery occlusion in the rat. J Neurosurg 87(5):716-723, 1997

28) Kohda Y, Yamashima T, Sakuda K, Yamashita J, Ueno T, Kominami E, Yoshioka T. Dynamic changes of cathepsins B and L expression in the monkey hippocampus after transient ischemia. Biochem Biophys Res Commun 228(2):616-622, 1996

29) MacManus JP, Linnik MD. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. J Cereb Blood Flow Metab 17(8):815-832, 1997

30) Fink K, Zhu J, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Endres M, Ma J, Dalkara T, Yuan J, Moskowitz MA. Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. J Cereb Blood Flow Metab 18(10):1071-1076, 1998

31) Schielke GP, Yang GY, Shivers BD, Betz AL. Reduced ischemic brain injury in interleukin-1 beta converting enzyme-deficient mice. J Cereb Blood Flow Metab 18(2):180-185, 1998

32) Gillardon F, Kiprianova I, Sandkuhler J, Hossmann KA, Spranger M. Inhibition of caspases prevents cell death of hippocampal CA1 neurons, but not impairment of hippocampal long-term potentiation following global ischemia. Neuroscience 93(4):1219-1222, 1999

33) Li H, Colbourne F, Sun P, Zhao Z, Buchan AM, Iadecola C. Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats. Stroke 31(1):176-182, 2000

34) Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science 275(5303):1132-1136, 1997

35) Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. Science 275(5303):1129-1132, 1997

36) Xu DG, Crocker SJ, Doucet JP, St-Jean M, Tamai K, Hakim AM, Ikeda JE, Liston P, Thompson CS, Korneluk RG, MacKenzie A, Robertson GS. Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus. Nat Med

37) Xu D, Bureau Y, McIntyre DC, Nicholson DW, Liston P, Zhu Y, Fong WG, Crocker SJ, Korneluk RG, Robertson GS. Attenuation of ischemia-induced cellular and behavioral deficits by X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein overexpression in the rat hippocampus. J Neurosci 19(12):5026-5033, 1999

38) Yasuda T, Takeshita H, Iida R, Nakajima T, Hosomi O, Nakashima Y, Kishi K. Molecular cloning of the cDNA encoding human deoxyribonuclease II. J Biol Chem 273(5):2610-2616, 1998
39) Krieser RJ, Eastman A. The cloning and expression of human deoxyribonuclease II. A possible role in apoptosis. J Biol Chem 273(47):30909-30914, 1998

40) Siesjo BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. J Cereb Blood Flow Metab 9(2):127-140, 1989

41) Lee KS, Frank S, Vanderklish P, Arai A, Lynch G.

Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A 88(16):7233-7237, 1991

42) Arai A, Vanderklish P, Kessler M, Lee K, Lynch G. A brief period of hypoxia causes proteolysis of cytoskeletal proteins in hippocampal slices. Brain Res 555(2):276-280, 1991

43) Saido TC, Yokota M, Nagao S, Yamaura I, Tani E, Tsuchiya T, Suzuki K, Kawashima S. Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain. J Biol Chem 25;268(33):25239-25243, 1993

Implications of CAD (caspase-activated DNase) and DNase II in Ischemic Neuronal Death Toshiyuki Tsukada, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., 109, 437 - 447 (2000)

Key words neuronal death, apoptosis, necrosis, lysosome

Abstract

Although cornu ammonis (CA)1 neurons of the hippocampus are well known to be vulnerable to transient ischemia from rodents to humans, the mechanism of ischemic neuronal death still remains obscure. A number of studies using lower species animals have suggested that apoptotic cascade may be implicated. However, it still remains unknown what determines cell death fate in primates. This paper is to clarify the role of apoptotic and/or necrotic cascade, in CA1 neuronal death in primates. Here, we focused at the implications of terminal apoptotic effector, caspase-activated DNase (CAD), and a necrotic effector, DNase II, using the monkey CA1 sector undergoing 18 min whole brain complete ischemia. After cloning cDNA encoding the monkey brain CAD, expression of CAD mRNA was studied by Sequence Detection System. Expression level and subcellular localization of CAD or DNase II protein were studied using Western blot and immunohistochemical analyses. Furthermore, the cell death pattern of the postischemic CA1 neurons was studied with particular attention to the morphology and the DNA laddering. On day 1 after ischemia, CAD mRNA was significantly increased 8.09 fold, compared to the non-ishemic CA1 sector (control). CAD protein was significantly increased 7.28 fold on day 1, but decreased on days 2 and 3 after ischemia, when CAD protein was transferred from the cytosol to the nucleus. Activated DNase II protein was significantly increased 2.47 fold on day 2, and 2.54 fold on day 3 after ischemia, compared to the control. DNase II protein was also transferred from the cytosol to the nucleus on day 2 after ischemia. Although the postischemic CA1 neurons on days 3-5 showed positive TUNEL staining, they also showed eosinophilic coagulation necrosis under light microscopy, and showed neither apoptotic bodies nor membrane disruptions under electron microscopy. Furthermore, the DNA smear patterns specific for necrosis was observed instead of DNA laddering. This data suggests that the postischemic neuronal death of monkey CA1 neurons occurs not by apoptosis but by necrosis. It is likely that extralysosomal release of up-regulated DNase II might degrade DNA with the aid of not only CAD but also cathepsin enzymes, which are similarly released after ischemia.