ヒト神経膠腫におけるカスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3の発現

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: 新井, 政幸 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9281

ヒト神経膠腫におけるカスパーゼ1，カスパーゼ2，カスパーゼ3の発現

金沢大学医学部医学科脳神経外科学講座（主任：山下純宏）
新　井　政　幸

システインプロテアーゼの1種であるカスパーゼファミリー (caspase family) [インターロイキン1β変換酵素 (interleukin-1 β-converting enzyme, ICE)/セド-3 (cell death abnormal-3, CED-3) ファミリー] は細胞死誘導機構における主要な構成要素であり，抗Fas/APO-1 (CD 95) 抗体，抗癌剤，および放射線などの種々の刺激によるアポトーシスの誘導において重要な経路をなすことが報告されている．本研究では神経膠芽腫での壊死巣の発生機構を明らかにするために，神経膠腫におけるカスパーゼ1 (ICE)，カスパーゼ2 [ICE/CED-3 ホモログ-1L (ICE/CED-3 homologue-1L, ICH-1L)]，カスパーゼ3 [システインプロテアーゼp32 (cystein protease p32, CPP32)/ヤマ (Yama)/アポパイン (apopain)] の発現を，逆転写 (reverse transcription, RT) -PCR法，イムノブロット法，免疫組織化学法を用いて検討した．さらに神経膠芽腫においては，DNAニック末端標識法を用いてアポトーシス細胞を同定し，壊死巣とアポトーシス細胞，およびカスパーゼ発現細胞の局在関係を評価した．手術標本より得られた13例の神経膠腫 (星細胞腫2例，退形成星細胞腫5例，神経膠芽腫6例)，および対照脳 (てんかん脳) 3例を対象とした．RT-PCR法ではカスパーゼ1 mRNAの発現を退形成星細胞腫5例中2例，神経膠芽腫6例中6例に検出した．カスパーゼ2 mRNA，カスパーゼ3 mRNAは対照脳3例と神経膠腫13例のすべてに認められた．イムノブロット法では，カスパーゼ1蛋白とカスパーゼ3蛋白は，退形成星細胞腫から神経膠芽腫において発現量が増加していた．一方，カスパーゼ2蛋白は対照脳にも認められたが，神経膠腫の中では神経膠芽腫において最も発現量が増加していた．免疫組織化学法ではカスパーゼ1蛋白が5例中3例の退形成星細胞腫と6例中6例の神経膠芽腫において，腫瘍細胞に発現が認められた．カスパーゼ3蛋白は6例中6例の神経膠芽腫の壊死巣の周囲を含めた大部分の腫瘍細胞に発現がみられた．カスパーゼ2蛋白は神経膠芽腫の壊死巣の周囲の腫瘍細胞のみに発現が認められた．神経膠芽腫においてDNAニック末端標識法での陽性細胞は壊死巣の周囲に多く認められた．以上の結果より，神経膠腫においては，腫瘍の悪性化に伴いカスパーゼ1，カスパーゼ2，及びカスパーゼ3の過剰発現が認められた．また，神経膠芽腫の組織学的特徴である壊死巣の形成には，カスパーゼ2を中心としたカスパーゼ2及びカスパーゼ3の過剰発現によるアポトーシス誘導が関与していると推察された．

Key words　caspase, glioma, apoptosis, necrosis

神経膠芽腫 [glioblastoma，世界保健機構 (World Health Organization, WHO) 脳腫瘍悪性度分類Ⅳ度] は，外科的治療のみでは完全治癒が期待できない悪性腫瘍である．この腫瘍に対しては手術に加えて放射線療法，化学療法，免疫療法を含む集学的治療が行われているが，その長期治療成績は極めて不良である[1)2)]．神経膠芽腫の組織学的特徴としては，核の異形成，細胞退形成，細胞分裂像の増加，血管内皮細胞の増殖，及び壊死巣の存在であるが[1)]，特に後者の2つは退形成星細胞腫 (anaplastic astrocytoma, WHO 脳腫瘍悪性度分類Ⅲ度) と神経膠芽腫とを区別する特徴的なものである．神経膠芽腫における血管新生の機構については，血管上皮性増殖因子 (vascular endothelial growth factor) などの増殖因子が低酸素状態で過剰発現するためと説明されているが[3)~5)]，壊死巣の発現機構についてはほとんど解明されていない．Tachibana ら[6)7)]は，壊死巣周囲の腫瘍細胞に，アポトーシス (自爆死，apoptosis)[8)9)] のシグナルを誘導する膜受容体の一つであるFas/APO-1 (CD 95)[10)] の発現がみられること，また形態学的にアポトーシスに陥った細胞もFas陽性細胞の周囲に認めることを報告し，神経膠芽腫の壊死巣の発生におけるFas/Fas Ligand系の関与を示唆した．

近年の様々な研究より，アポトーシスはある共通の機構により制御されていると考えられている．線虫 *Caenorhabditis elegans* の発生過程においてアポトーシス実行遺伝子として発見されたセド-3 (cell death abnormal-3, CED-3) は，哺乳類ではインターロイキン1β変換酵素 (interleukin-1 β-converting

平成9年11月28日受付，平成10年2月3日受理

Abbreviations：bp, base pairs；CED-3, cell death abnormal-3；GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase；ICE, interleukin-1 β-converting enzyme；ICH-1L, ICE/CED-3 homologue-1L；PBS, phosphate-buffered saline；RT, reverse transcription

enzyme, ICE) と相同性を有し，その過剰発現により細胞にアポトーシスを誘導する[11)~13)]．現在までにICE と構造的相同性を有した遺伝子は，少なくとも10種類同定されており，カスパーゼファミリー (caspase family) と命名されている[14)15)]．おのおのの蛋白は，前駆体として合成され，蛋白分解を受けることで活性化される[16)]．本研究では，種々の病態におけるアポトーシスの共通経路であるカスパーゼファミリーのなかでも特に神経系において重要と考えられる，カスパーゼ1 (ICE)，カスパーゼ2 [ICE/CED-3 ホモログ-1L (ICE/CED-3 homologue-1L, ICH-1L)][17)]，カスパーゼ3 [システインプロテアーゼp32 (cystein protease p32, CPP32)/ヤマ (Yama)/アポパイン (apopain)][18)~20)] の発現を逆転写 (reverse transcription, RT) -PCR法，イムノブロット法，免疫組織化学法を用いて検討した．また，カスパーゼの発現部位と腫瘍組織におけるアポトーシス細胞の関係を評価するため，DNA ニック末端標識法を用いて腫瘍細胞中のアポトーシス細胞を同定した．

材料および方法

Ⅰ．組織標本

金沢大学医学部附属病院脳神経外科および関連施設にて外科的切除された13例の星細胞系神経膠腫を対象とした．病理組織学的分類は，WHOの脳腫瘍分類 (1993)[1)] に従った．内訳は星細胞腫 (low grade astrocytoma, WHO 脳腫瘍悪性度分類II度) 2例，退形成星細胞腫5例，神経膠芽腫6例である．対照脳としては，てんかん3例における側頭葉を用いた．いずれの材料も標本採取後すみやかに液体窒素にて凍結し，－130℃にて保存して，RNAと蛋白の抽出に供した．免疫組織化学用には，4％パラホルムアルデヒドにて標本を固定後，パラフィンに包埋した．

Ⅱ．総RNAの分離とRT-PCR

組織標本からの総RNA の抽出精製は，Chomczynski ら[21)] の方法に基づいて，イソゲン (ISOGEN) (ニッポンジーン，東京) を用いて行った．RT-PCR 反応は，RNA PCR キット (Perkin Elmer, Branchburg, USA) を用いた．すなわち，0.6 μg の総RNA を鋳型とし，ランダムヘキサマーをプライマーとして逆転写酵素にてcDNA を合成した．次に各mRNA に特異的なプライマーを用い，Taq ポリメラーゼにてcDNA 断片の増幅を行った．ヒトカスパーゼ1の塩基配列より，センスプライマーとして5'-GCACACGTCTTGCTCTCATTATCTG-3' (482-506)，アンチセンスプライマーとして5'-GGCTGCTCAAATGAAAATCGAACC-3' (1016-1039)[22)]を使用した．ヒトカスパーゼ2のセンスプライマーとして5'-GTTACCTGCACACCGAGTCACG-3' (742-763)，アンチセンスプライマーとして5'-GCGTGGTTCTTTCCATCTTGTTGGTCA-3' (949-975)[17)] を用いた．ヒトカスパーゼ3のセンスプライマーとして5'-CAGAGGGGATCGTTGTAGAAG-3' (653-673)，アンチセンスプライマーとして5'-GTTGCCACCTTTCGGTTAACC-3' (938-958)[18)] を使用した．それぞれのプライマー合成はグライナージャパン (東京) に依託した．また，内部コントロールにはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) を用いた．プライマーは既成品 (Stratagene, La Jolla, USA) を使用し，その塩基配列はセンスプライマーが5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3' (212-236)，アンチセンスプライマーが5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3' (787-811)[23)] であった．PCR 反応には核酸増幅装置タカラサーマルサイクラー (Takara Thermal cycler) 480 (宝酒造，大津) を使用した．反応は，94℃で3分間の熱変成後，94℃で1分間，60℃を1分間，72℃で1分間の3ステップを1サイクルとし，35回増幅した．増幅後のPCR 産物は2％アガロースゲルにて電気泳動し，エチジウムブロマイドにて染色後，紫外線照射装置FAS-Ⅱ (東洋紡績，大阪) を用いて検出した．

Ⅲ．PCR 産物の塩基配列の解析

得られたカスパーゼ1およびカスパーゼ3のPCR 産物は，PCR ダイレクトシークエンス法[24)] を用いて塩基配列の解析を行った．すなわち，RT-PCRにて増幅したDNA 断片を直接鋳型とし，蛍光色素を用いたダイターミネーター法により塩基配列を決定した．ウイザドPCR プレプス DNA精製システム (Wizard PCR Preps DNA Purification System) (Promega, Madison, USA) を用いて精製した1 μg のPCR産物を鋳型としてオートサイクルシークエンシングキット (AutoCycle Sequencing Kit) (Pharmacia Biotech, Milwaukee, USA) を用いてシークエンス反応を行い，オートシークエンサー (ALF red DNA Sequencer, Pharmacia Biotech) にて解析した．カスパーゼ1のPCR 産物に対するシークエンスプライマーを5'-TGAGGTTGACATCACAGGCATG-3' (666-687)[22)]，カスパーゼ3のPCR 産物に対するシークエンスプライマーを5'-CAAGCTTGTCGGCATACTG-3' (897-915)[18)] と設計した．反応には核酸増幅装置タカラサーマルサイクラー480 (宝酒造) を使用し，95℃で2分間の変性の後，変性95℃ 36秒，アニーリング50℃ 36秒，伸長反応72℃ 84秒のプログラムで17サイクル行った後，変性95℃ 36秒，伸長反応72℃ 84秒のプログラムで13サイクル，最後に72℃ 10分間の伸長反応を加えた反応を行った．

Ⅳ．イムノブロット

Towbin ら[25)] の方法に従いイムノブロット解析を行った．標本を0.1 Mリン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.4) 中で超音波破砕器にて破砕し，上清のみを採取後，蛋白定量キット (Bio-Rad, California, USA) を使用しBradford 法[26)] により蛋白定量を行った．電気泳動はLaemmli [27)] のSDS-PAGE 法により行った．14％のSDSを含んだゲルを作成し，7.5 μg の蛋白を泳動後，アクリルアミド上に分離された蛋白をホライズブロットAE-6675 (アトー，東京) を用いて，30 mA で一晩ニトロセルロース膜 (アトー) に転写した．ニトロセルロース膜を20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)，500 mM 塩化ナトリウム，0.1％ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート (和光純薬工業，東京) で洗浄し，さらに1％子ウシ血清アルブミンを含む20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に室温で8時間浸し，非特異的反応を阻止した．ニトロセルロース膜を1次抗体であるヤギ抗ヒトカスパーゼ1ポリクローナル抗体 (3 μg/ml) (Santa Cruz Inc., California, USA)，マウス抗ヒトカスパーゼ2モノクローナル抗体 (1 μg/ml) (Transduction Laboratories, Lexington, USA)，およびマウス抗ヒトカスパーゼ3モノクローナル抗体 (1 μg/ml) (Transduction Laboratories) と2時間反応させた．その後，アルカリフォスファターゼ標識マウス抗ヤギIgG 抗体，あるいはヤギ抗マウスIgG 抗体と30分反応させ，アルカリフォスファターゼ基質キット (Vector Laboratories, Burlingame, USA) を使用して発色させた．

Ⅴ．免疫組織化学

スライドガラス（シランコーテイング）(DAKO, Glostrup, Denmark) 上に貼付した標本を，キシレンを用いて脱パラフィンした．PBS (pH 7.4) にて洗浄後，0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で500 W, 3分間のマイクロウエーブ処理を7回繰り返し，抗原性の賦活化を行った．0.3％過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを失活させ，PBS で洗浄した後，非特異的反応阻止のため，5％スキムミルクを2時間作用させた．抗ヒトカスパーゼ1抗体を抗体希釈用緩衝液 (DAKO) で300倍に希釈し，室温で1時間反応させた．ビオチン標識抗ヤギIgG と反応させた後，アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (Vecstain ABC kit, Vector Laboratories) を用い，最後に0.02％過酸化水素加ジアミノベンチジン (3-3'-diaminobenzidine, DAB) にて発色を行った．同様の方法にて，抗ヒトカスパーゼ3抗体を抗体希釈用緩衝液にて500倍に希釈した後，室温で1時間反応させた．また，カスパーゼ2の免疫染色については，0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 2.4) を用いて抗原の賦活化を行った後，抗体希釈用緩衝液にて500倍に希釈した抗ヒトカスパーゼ2抗体を室温で1時間反応させた．カスパーゼ1とカスパーゼ3の陽性コントロールとしてはリンパ節を用い，カスパーゼ2の陽性コントロールとしては口蓋扁桃を用いた．また，陰性コントロールとしては1次抗体を抜いたものとした．

Ⅵ．DNA ニック末端標識法

6例の神経膠芽腫において，組織内細胞死検出キット (*In situ* cell death detection kit) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を使用しDNA ニック末端標識法[28)29)] を行った．キシレンにて脱パラフィンした標本を，蒸留水で洗浄後，10 mM トリスクロル緩衝液 (pH 7.4) に溶解した20 μg/ml プロテイナーゼK (和光純薬工業) 溶液で37℃で20分反応させた．次に蒸留水で洗浄後，2％過酸化水素水で20分間処理し，さらに蒸留水で洗浄後，ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ (terminal deoxynucleotidyl transferase) とフルオレセイン標識dUTP を含む反応液を37℃ で1時間反応させた．PBS で洗浄後，ペルオキシターゼ標識ヒツジ抗フルオレセイン抗体と37℃で20分反応させ，最後にDABにて発色させた．

成　　績

Ⅰ．RT-PCR および塩基配列の解析

カスパーゼ1のcDNA は658塩基対のバンドとして5例中2例の退形成星細胞腫と6例中6例の神経膠芽腫に検出された．対照脳3例，星細胞腫2例，退形成星細胞腫5例中3例には検出されなかった．PCR ダイレクトシークエンス法による解析では，得られたPCR 産物は正常のカスパーゼ1 cDNA であり，変異や欠損は見られなかった．カスパーゼ2のcDNA は234塩基対のバンドとして対照脳と神経膠腫の全例に検出された．カスパーゼ3のcDNA は306塩基対のバンドとして対照脳と神経膠腫の全例に検出された (図 1)．PCR ダイレクトシークエンス法による解析では，得られたPCR 産物は正常のカスパーゼ3 cDNA であり，変異や欠損は見られなかった．

Ⅱ．イムノブロット

カスパーゼ1蛋白は，前駆体に相当する45 kDa のバンドとして検出され，腫瘍の悪性度と相関して発現量が増加していた．同様に，カスパーゼ3蛋白は前駆体に相当する32 kDa のバンドとして検出され，腫瘍の悪性度と相関して発現量が増加した．カスパーゼ2蛋白は前駆体に相当する48 kDa のバンドとして全例に発現を認めたが，特に対照脳と神経膠芽腫において発現量が増加していた (図 2)．

Ⅲ．免疫組織化学

正常コントロールとしてカスパーゼ1蛋白とカスパーゼ3蛋白は，主にリンパ節胚中心のリンパ球の細胞質に，カスパーゼ2蛋白は口蓋扁桃の重層扁平上皮基底層細胞の細胞質に，それぞれ陽性反応を認めた．対照脳においてはカスパーゼ1蛋白とカスパーゼ3蛋白の発現は認められなかったが，カスパーゼ2蛋白は多数の神経細胞の細胞質に陽性反応が認められた (図 3A)．神経膠腫においては，カスパーゼ1蛋白は星細胞腫では認められず，退形成星細胞腫5例中3例，神経膠芽腫6例中6例に陽性反応がみられた (図 3B)．カスパーゼ3蛋白の発現も，星細胞腫では認められず，退形成星細胞腫5例中5例では多数の血管内皮細胞と少数の腫瘍細胞が (図 3C)，神経膠芽腫6例中6例では，大部分の腫瘍細胞と血管内皮細胞に陽性反応がみられた (図 3D)．腫瘍細胞における発現部位は細胞質，および核であった．カスパーゼ2蛋白は星細胞腫と退形成星細胞腫の腫瘍浸潤域の一部の神経細胞に陽性所見みられた．さらに，神経膠芽腫においては，大部分の壊死巣周囲の腫瘍細胞がカスパーゼ2蛋白を過剰発現しており，細胞質および核に陽性所見がみられた (図 3E)．

Ⅳ．DNA ニック末端標識法をもちいたアポトーシス細胞の同定

DNA ニック末端標識法における陽性細胞は神経膠芽腫の壊

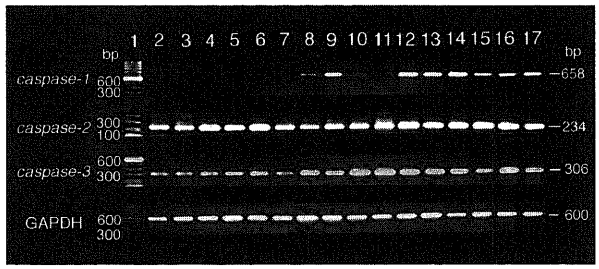


Fig. 1. RT-PCR analysis of caspase-1, -2, and -3 mRNA in control brains and astrocytic brain tumors. Lane 1, molecular weight markers; lanes 2-4, control brains; lanes 5-6, low grade astrocytomas; lanes 7-11, anaplastic astrocytomas; lanes 12-17, glioblastomas. The human GAPDH mRNA (600 bp) was also studied as an internal control.

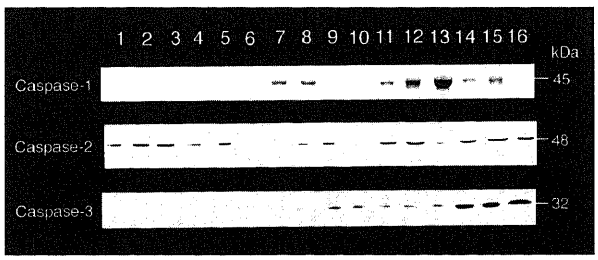
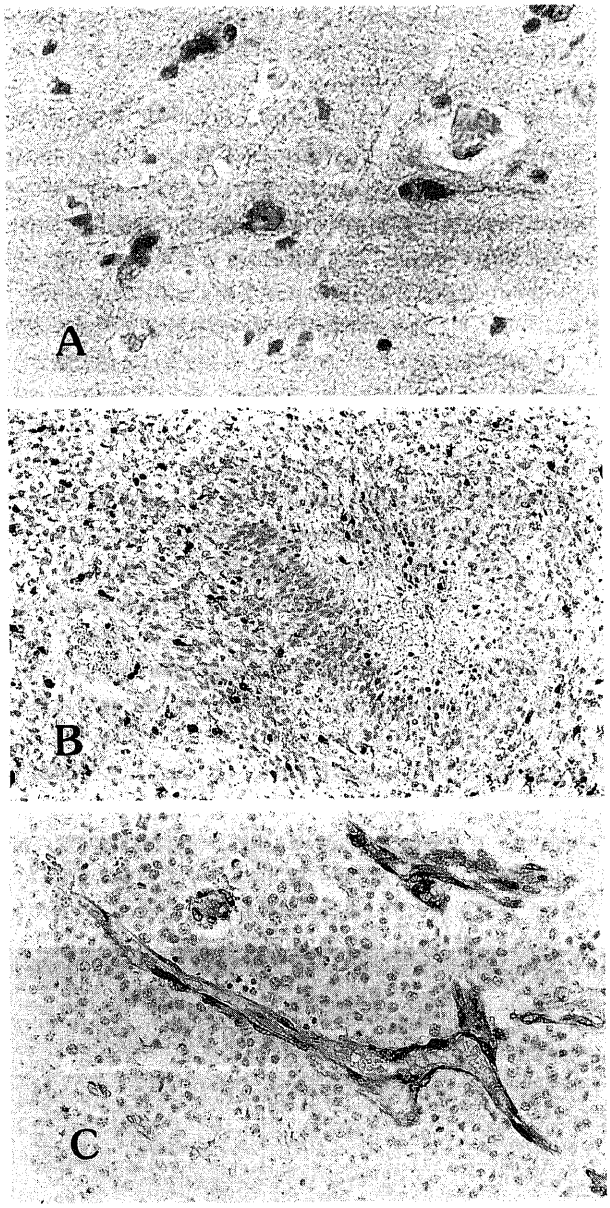


Fig. 2. Western blot analysis of caspase-1, -2, and -3. Proteins from tissue extracts (7.5 μg) were subjected to SDS-PAGE. The proteins were transferred to a nitrocellulose membrane, and reacted with each anti-caspase antibody. Lanes 1-3, control brains; lanes 4-5, low grade astrocytomas; lanes 6-10, anaplastic astrocytomas; lanes 11-16, glioblastomas.



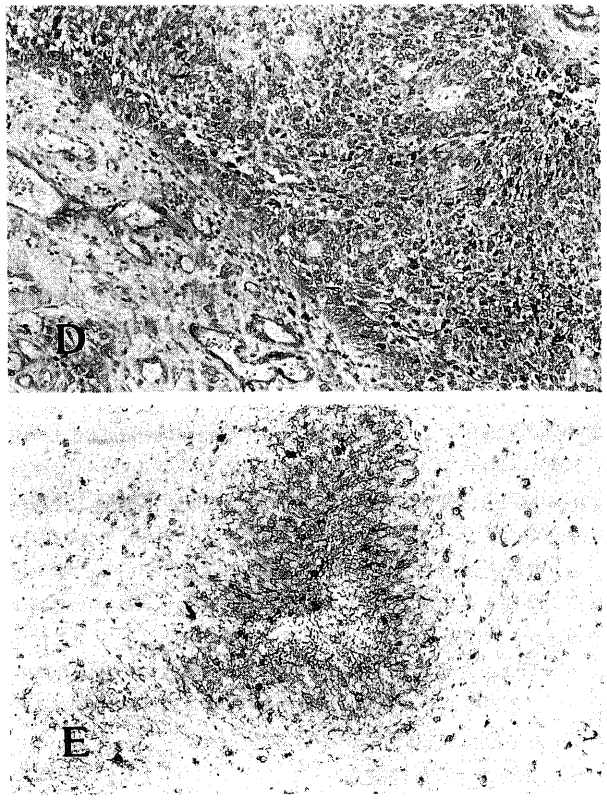


Fig. 3. Immunohistochemical staining of caspase-1, -2, and -3 in control brains and human astrocytic tumors. (A) In control brain, caspase-2 immunoreactivity is seen in the cytoplasm of neurons. (B) Scattered glioblastoma cells are immunoreactive for caspase-1. (C) In anaplastic astrocytoma, endothelial cells are immunoreactive for caspase-3. (D) A large number of glioblastoma cells and endothelial cells are diffusely immunoreactive to caspase-3. (E) Marked immunoreactivity to caspase-2 in glioblastoma cells surrounding perinecrotic area. Immunoreactivity is seen in cytosol and nuclei of tumor cells. (A) × 100, (B) × 25, (C) × 80, (D) × 25, (E) × 25.

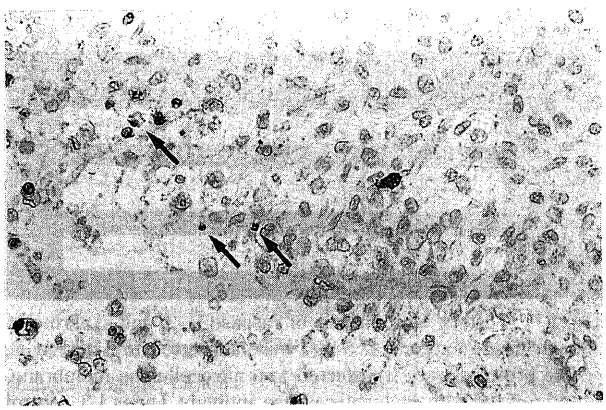


Fig. 4. Apoptotic cells (arrows) identified by DNA nick-end labeling method in perinecrotic area of glioblastoma. × 100.

死巣周囲に主に認められ，その形態は核の偏在，縮小といったアポトーシスに特徴的な変化を伴っていた (図 4).

考　　察

線虫 *Caenorhabditis elegans* の発生過程の異常における研究より，アポトーシスの実行遺伝子であるシステインプロテアーゼ CED-3 が同定された．この CED-3 と哺乳類での ICE がホモロジーを有し[11)12)]，また，ICE を線維芽細胞に強制発現させることでアポトーシスを誘導させることに成功し[13)]，細胞のアポトーシスのメカニズムは種を超えて保存されていることが示唆された．その後，ICE/CED-3 とホモロジーを有する遺伝子が次々に同定され，現在までに少なくとも 10 種類がカスパーゼファミリーに属している[15)]．血球系培養細胞や上皮系腫瘍培養細胞などにおいてアポトーシスを誘導した際，カスパーゼ蛋白の活性化が起き，カスパーゼ蛋白の抑制剤によりアポトーシスが回避されることより，現在カスパーゼファミリーは細胞死の

中心的役割を成すと考えられている[14)30)~32)]．一方，神経膠腫培養細胞におけるシスプラチン誘導でのアポトーシスの際，カスパーゼ 1 mRNAの過剰発現が起こることが報告されている[33)]．このことは，細胞においてアポトーシスが誘導される状況下では，いくつかのカスパーゼの発現が調整されていると考えられる．しかしながら，その研究の大部分が培養細胞を用いたものであり，正常および病的状態での生体内での発現についての検討は，ほとんど為されていないのが現状である[34)35)]．

ヒト正常組織では，カスパーゼ1 mRNA は胸腺，心臓，肺，腎臓，膵臓，腸管，胎盤などの組織に発現しているが，脳においては発現していないと報告されている[36)]．一方，カスパーゼ2 mRNAはヒト正常脳に発現することをWang ら[17)] が報告している．さらに，マウスカスパーゼファミリーのカスパーゼ2ホモログであるネッド・ツー (neural precursor cell-expressed, developmentally down-regulated gene2, Nedd2) mRNA は成体マウス大脳皮質の神経細胞に発現すると報告されている[37)]．カスパーゼ3 蛋白についてはKrajewska ら[34)] が，免疫組織化学法にて発現を検討した結果，皮膚，心臓，肝臓，胸腺，子宮，胃，腸管に発現をみとめたが，腎臓，肺，脳においては陽性所見は認められなかったと報告している．今回，3例の対照脳における検討では，カスパーゼ1蛋白とカスパーゼ3蛋白は認められず，カスパーゼ2蛋白のみが神経細胞に発現を認め，従来の報告とほぼ一致するものであった．

神経膠腫においては，カスパーゼ1 mRNA とカスパーゼ1蛋白の発現はよく相関し，悪性度と共に発現が増加した．一方，カスパーゼ3 mRNA は神経膠腫全例に認められたが，カスパーゼ3蛋白は悪性度と共に発現量が増加していた．この原因としては，イムノブロット法で検出不能な微量の蛋白に対するmRNA に対して，増幅を繰り返したためと考えられた．他の可能性として，転写から翻訳への過程での調節機構が存在するのかもしれない．免疫組織化学的検討では，カスパーゼ1蛋白は，神経膠芽腫において散在的に腫瘍細胞が陽性反応を認めたのに対し，カスパーゼ3蛋白は壊死巣を含む殆どの腫瘍細胞に陽性反応を呈した．ヒト正常組織での免疫染色での結果，カスパーゼ3蛋白は短命な細胞，即ち細胞周期に入る細胞が多いほど過剰発現がみられると報告されている．神経膠芽腫は手術摘出時には50％以上の腫瘍細胞が細胞死を起こしており，また，10％以上の細胞が細胞周期に入っている事より，神経膠芽腫の腫瘍細胞は比較的短命な細胞群であるためカスパーゼ3蛋白の過剰発現が起きていると考えられた[34)38)~40)]．

カスパーゼ1蛋白およびカスパーゼ3蛋白は，正常ヒト脳にはわずかしか発現せず，神経膠腫においては殆どが前駆体として存在し，また，悪性度と共にその発現量が増加している．このことは神経膠芽腫の治療において，このカスパーゼ1蛋白およびカスパーゼ3蛋白を活性化させることは，有用なアプローチと考えられる．Kondo ら[33)] やYu ら[41)] は，カスパーゼ1を用いた神経膠腫の治療法の可能性を報告した．一方，カスパーゼ3は現在同定されているカスパーゼファミリーの中でも，最もアポトーシスに影響し，最下流に位置する蛋白であると考えられている[14)]．抗癌剤や抗Fas 抗体といったアポトーシス誘導因子によりカスパーゼ3の活性化が誘導され，ポリADPリボースポリメラーゼやDNA依存性プロテインキナーゼ，アクチンなどの細胞維持に働く蛋白質が分解されることが報告されている[19)42)43)]．本研究において，RT-PCR法にて得られた産物は，いわゆる活性部位と呼ばれるグルタミン-アラニン-システイン-アルギニン-グリシンというアミノ酸配列が保たれ，変異などが認められなっかったこと，また，カスパーゼ1蛋白と異なり免疫組織化学法において神経膠芽腫の大部分の腫瘍細胞にカスパーゼ3蛋白の発現が認められたことから，今後の治療の標的として，カスパーゼ3蛋白を活性化させ，腫瘍細胞にアポトーシスを誘導する方法が有力であると考えられた．

カスパーゼ2蛋白は，特に対照脳と神経膠芽腫において発現量が増加していたものの，全例に発現を認めた．免疫組織化学においては，星細胞腫と退形成星細胞腫の残存神経細胞が陽性所見を呈した．RT-PCR 法およびイムノブロット法にてカスパーゼ2が全例に認められたのは主として残存神経細胞がカスパーゼ2を発現していたことに起因すると考えられた．神経膠芽腫におけるカスパーゼ2蛋白の発現は，壊死巣周囲の，いわゆる偽性柵状構造 (pseudopalisade) を形成している腫瘍細胞においてのみ認められた．また，同部位にDNA ニック末端標識法による陽性細胞を多数認めたことは，カスパーゼ2蛋白の過剰発現とアポトーシス，さらに壊死巣形成に極めて密接な関係があることを示唆していると考えられた．同時に，カスパーゼ3蛋白も，すべての壊死巣周囲の腫瘍細胞に認められたことより，壊死巣形成の機構としてカスパーゼ2蛋白およびカスパーゼ3蛋白の過剰発現が何らかの役割を果たしているのではないかと考えられた．カスパーゼ2蛋白およびカスパーゼ3蛋白が構成するアポトーシス誘導の経路として，カスパーゼ2蛋白の過剰発現そのものが腫瘍細胞にアポトーシスを引き起こす[17)]，カスパーゼ2蛋白の過剰発現および活性化によりカスパーゼ3蛋白の活性化が起こり，アポトーシスが誘導される[44)]，カスパーゼ2蛋白の過剰発現がカスパーゼ3蛋白の活性化の域値を下げている，という3つの可能性が考えられる．いずれの機構が腫瘍細胞にアポトーシスを引き起こしているのかは不明であるが，本研究における免疫組織化学法の結果では，アポトーシスに陥った細胞においてカスパーゼ3蛋白に対する陽性反応が認められず，カスパーゼ2蛋白の過剰発現は壊死巣周囲の腫瘍細胞においてのみみられ，さらに一部のアポトーシスに陥った細胞にも陽性所見が観察された．これらの所見より壊死巣周囲においてのみ見られたカスパーゼ2蛋白の過剰発現と，カスパーゼ2蛋白の過剰発現に関与したカスパーゼ3蛋白の活性化が壊死巣形成の主要な因子となっているものと考えられた．

本研究では，カスパーゼ1，カスパーゼ2，およびカスパーゼ3の発現を中心に神経膠腫における組織学的悪性度，ならびに壊死巣周囲にみられたアポトーシス発生機構との関係を検討した．しかしながら，この3類のカスパーゼのみがアポトーシスの経路を構成する訳ではなく，他のカスパーゼファミリーおよびアポトーシス抑制因子についても，さらに検討が必要である．同時に，神経膠芽腫における壊死巣形成の機構を解明するためには，いかなる因子がカスパーゼの発現を増加させ，活性化させるのか，さらなる研究が望まれる．

結　　論

神経膠腫13例 (星細胞腫2例，退形成星細胞腫5例，神経膠芽腫6例) におけるカスパーゼ1，カスパーゼ2，カスパーゼ3の発現をRT-PCR 法，イムノブロット法，免疫組織化学法にて検討し，以下の結論を得た．

1. カスパーゼ1蛋白，カスパーゼ2蛋白，およびカスパーゼ3

蛋白の発現は神経膠腫の悪性度と共に増加した.

2. 神経膠芽腫における大部分の腫瘍細胞は，カスパーゼ3蛋白を過剰発現していた.

3. 神経膠芽腫における壊死巣周囲の腫瘍細胞にカスパーゼ2蛋白の過剰発現が認められ，また，同部位にDNA ニック末端標識法陽性細胞を多数認めた.

以上の結果より，神経膠芽腫の組織学的特徴である壊死巣の形成には，カスパーゼ2蛋白およびカスパーゼ3蛋白の過剰発現が関与するアポトーシス誘導の経路の存在が示唆された.

謝　　辞

稿を終えるに臨み，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の山下純宏教授に深甚なる謝意を表します．また，終始直接の御指導を賜りました同講座の立花修講師に心から感謝いたします．さらに，御支援とご協力を頂きました金沢大学脳神経外科学教室の皆様に深く御礼申し上げます.

なお，本研究は平成8，9年度文部省科学研究補助金基盤研究B (課題09470292号) および基盤研究C (課題08671571号) によるものであります.

本研究の要旨は第15回日本脳腫瘍病理研究会 (1997，佐賀)，第56回日本脳神経外科学会総会 (1997，大阪)，第6回日本脳腫瘍カンファレンス (1997，熊本) において発表した.

文　　献

1) Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization International Histological Classification of Tumours, 2nd ed, p11-30, Springer Verlag, Berlin, 1993

2) Deen DF, Chiarodo A, Grimm EA, Fike JR, Israel MA, Kun LE, Levin VA, Marton LJ, Packer RJ, Pegg AE, Rosenblum ML, Suit HD, Walker MD, Wikstrand CJ, Wilson CJ, Wong AJ, Yang WKA. Brain tumor working group report on the 9th international conference on brain tumor research and therapy. J Neuro Oncol 16: 243-272, 1993

3) Plate KH, Risau W. Angiogenesis in malignant gliomas. Glia 15: 339-347, 1995

4) Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. Nature 359: 845-848, 1992

5) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 359: 843-845, 1992

6) Tachibana O, Nakazawa H, Lampe J, Watanabe K, Kleihues P, Ohgaki H. Expression of Fas/APO-1 during the progression of astrocytomas. Cancer Res 55: 5528-5530, 1995

7) Tachibana O, Lampe J, Kleihues P, Ohgaki H. Preferential expression of Fas/APO1 (CD95) and apoptotic cell death in perinecrotic cells of glioblastoma multiforme. Acta Neuropathol (Berl) 92: 431-434, 1996

8) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26: 239-257, 1972

9) Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 73: 2013-2026, 1994

10) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell 66: 233-243, 1991

11) Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Ness KV, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, Heubner K, Black RA. Molecular cloning of the interleukin-1 β converting enzyme. Science 256: 97-100, 1992

12) Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C.elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β-converting enzyme. Cell 75: 641-652, 1993

13) Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwieg EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. Cell 75: 653-660, 1993

14) Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 88: 355-365, 1997

15) Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell 87: 171, 1996

16) Gu Y, Wu J, Faucheu C, Lalanne J-L, Diu A, Livingston DJ, Su MS-S. Interleukin-1 β converting enzyme requires oligomerization for activity of processed forms in vivo. EMBO J 14: 1923-1931, 1995

17) Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, Yuan J. Ich-1, an ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. Cell 78: 739-750, 1994

18) Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 β-converting enzyme. J Biol Chem 269: 30761-30764, 1994

19) Tewari M, Quan LT, O' Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/CPP32 β, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-Ribose) polymerase. Cell 81: 801-809, 1995

20) Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miller DK. Indentification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature 376: 37-43, 1995

21) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-159, 1987

22) Alnemri ES, Fernandes-Alnemri T, Litwack G. Cloning and expression of four novel isoforms of human interleukin-1 β converting enzyme with different apoptotic activities. J Biol Chem 270: 4312-4317, 1995

23) Maier JAM, Voulalas P, Roeder D, Maciag T. Extension of life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 α antisense oligomer. Science 249: 1570-1574, 1990

24) Kelley JM. Automated dye-terminator DNA sequencing. In MD Adams, C Field, C Venter (eds), Automated DNA Sequencing and Analysis, 1st ed, p175-181, Academic Press,

London, 1994

25) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76: 4350-4354, 1979

26) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254, 1976

27) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970

28) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493-501, 1992

29) Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Rrcheis H, Wick G. Stimultaneous determination of cell surface and apoptosis. Trends Genet 10: 41-42, 1994

30) Wolf CM, Reynolds JE, Morana SJ, Eastman A. The temporal relationship between protein phosphatase, ICE/CED-3 protease, intracellular acidification, and DNA fragmentation in apoptosis. Exp Cell Res 230: 22-27, 1997

31) Dubrez L, Savoy I, Hamman A, Solary E. Pivotal role of a DEVD-sensitive step in etoposide-induced and Fas-mediated apoptotic pathways. EMBO J 15: 5504-5512, 1996

32) Hasegawa J, Kamada S, Kamiike W, Shimizu S, Imazu T, Matsuda H, Tsujimoto Y. Involvement of CPP32/Yama(-like) protease in Fas-mediated apoptosis. Cancer Res 56: 1713-1718, 1996

33) Kondo S, Barna BP, Morimura T, Takeuchi J, Yuan J, Akbasak A, Barnett GH. Interleukin-1 β-converting enzyme mediates Cisplatin-induced apoptosis in malignant glioma cells. Cancer Res 55: 6166-6171, 1995

34) Krajewska M, Wang H-G, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC. Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. Cancer Res 57: 1605-1613, 1997

35) Van de Craen M, Vandenabeele P, Declercq W, Van den Brande I, Von Loo G, Molemans F, Schotte P, Van Criekinge W, Beyaert R, Fiers W. Characterization of seven murine caspase family members. FEBS Lett 403: 61-69, 1997

36) Kamens J, Paskind M, Hugunin M, Talanian RV, Allen H, Banach D, Bump N, Hackett M, Johnston CG, Li P, Mankovich JA, Terranova M, Ghayur T. Identification and characterization of ICH-2, a novel member of the interleukin-1 β-converting enzyme family of cysteine proteases. J Biol Chem 270: 15250-15256, 1995

37) Kumar S, Kinoshita M, Nada M, Copeland NG, Jenkins NA. Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and the mammalian IL-1 β-converting enzyme. Genes Dev 8: 1613-1626, 1994

38) Kuida K, Zheng TS, Na S-S, Kuan C-Y, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. Nature 384: 368-372, 1996

39) Migheli A, Cavalla P, Marino S, Schiffer D. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks. J Neuropathol Exp Neurol 53: 606-616, 1994

40) Schiffer D, Cavalla P, Migheli A, Chio A, Giordana MT, Marino S, Attanasio A. Apoptosis and cell proliferation in human neuroepithelial tumors. Neurosci Lett 195: 81-84,1995

41) Yu JS, Sena-Esteves M, Paulus W, Breakefield XO, Reeves SA. Retroviral delivery and tetracycline-dependent expression of IL-1 β-converting enzyme (ICE) in a rat glioma model provides controlled induction of apoptotic death in tumor cells. Cancer Res 56: 5423-5427, 1996

42) Song Q, Lees-Miller SP, Kumar S, Zhang N, Chan DW, Smith GCM, Jackson SP, Alnemri ES, Litwack G, Khanna KK, Lavin MF. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a target for an ICE-like protease in apoptosis. EMBO J 15: 3238-3246, 1996

43) Chen Z, Naito M, Mashima T, Tsuruo T. Activation of Actin-cleavable interleukin 1 β-converting enzyme (ICE) family protease CPP-32 during chemotherapeutic agent-induced apoptosis in ovarian cartinoma cells. Cancer Res 56: 5224-5229, 1996

44) Harvey NL, Butt AJ, Kumar S. Functional activation of Nedd2/ICH-1(caspase-2) is an early process in apoptosis. J Biol Chem 272: 13134-13139, 1997

Expression of Caspase-1, -2, and -3 in Human Astrocytic Tumors Masayuki Arai, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **107,** 87 — 94 (1998).

key words caspase, glioma, apoptosis, necrosis

Abstract

Cysteine proteases of the caspase family [interleukin-1 β-converting enzyme (ICE)/cell death abnormal-3 (CED-3) family] have been implicated as components of cell death pathway and have been reported to be involved in Fas/APO-1 (CD95), chemotherapeutic agents, and radiation-induced apoptosis. In this study, we assessed the expression of caspase-1 (ICE), caspase-2 (ICE/CED-3 homologue-1L, ICH-1L), and caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in 13 cases of primary astrocytic brain tumors (two cases of low grade astrocytomas, five cases of anaplastic astrocytomas, and six cases of glioblastomas) by reverse transcription-PCR, Western blot analysis, and immunohistochemistry. In addition, we assessed apoptosis by DNA nick-end labeling method to show the geographic relationship between necrosis and caspase expression in human glioblastomas. Expression of caspase-1 mRNA was found in 6 of 6 human glioblastomas and 2 of 5 anaplastic astrocytomas. Caspase-2 and -3 mRNA expression was found in 3 of 3 human control brains (epileptic brains) and in 13 of 13 primary astrocytic brain tumors. In Western blot analysis, caspase-1 and -3 were overexpressed in anaplastic astrocytomas and glioblastomas, correlating with the malignancy grade, while caspase-2 expression was markedly increased in glioblastomas. Immunohistochemical examinations showed that immunoreactivity to caspase-1 was detected in scattered tumor cells in 3 of 5 anaplastic astrocytomas and 6 of 6 glioblastomas. Immunoreactivity to caspase-3 was detected in a large number of tumor cells in 6 of 6 glioblastomas, including perinecrotic areas. Furthermore, caspase-2 immunoreactivity was detected in glioblastoma tumor cells surrounding foci of necrosis in which an accumulation of glioma cells undergoing apoptosis detected by DNA nick-end labeling method. Thus, the frequency of caspase-1, -2, and -3 overexpression appears to correlate with the malignancy grade of astrocytic brain tumors. Furthermore, caspase-2 and caspase-3 overexpression may play an important role in the pathogenesis of necrosis, which is one of the histological hallmarks of glioblastoma.