

3-アセチルピリジン投与によるヒトニューロブラス トーマのアポトーシス

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/2297/9166

3-アセチルピリジン投与によるヒトニューロblastomaの アポトーシス

金沢大学医学部附属神経情報研究施設 情報伝達研究部門 (主任: 加藤 聖教授)

村 瀬 真 一

3-アセチルピリジン (3-acetylpyridine, 3-AP) は、ナイアシンアミドのアナログであり、神経毒性を有することが知られている。我々は、培養ヒトニューロblastoma IMR-32 細胞に 0.3-1mM の 3-AP を投与したところ細胞死を誘導できたが、同濃度の 3-AP 投与は、線維芽細胞や褐色細胞腫やグリオーマなどの培養非神経細胞、培養マウスニューロblastoma には効果がなかった。3-AP によるヒトニューロblastoma細胞死は、アクチノマイシンD (RNA 合成阻害剤)、シクロヘキシミド (蛋白質合成阻害剤) あるいはアウリントリカルボン酸 (エンドヌクレアーゼおよび蛋白質合成阻害剤) により阻止された。また、この細胞死はナイアシンアミド投与によっても阻止された。さらに細胞死の電子顕微鏡観察により核の凝縮・断片化、染色質の濃縮、細胞膜や核膜の保存が認められた。しかし、DNA の断片化は電気泳動上は明確でなかった。これらの結果から、3-AP により誘導されるヒトニューロblastoma細胞死は、アポトーシスの特徴を有することが明らかになった。

Key words apoptosis, electron microscopy, neuroblastoma, 3-acetylpyridine, programmed cell death

細胞死に見られる形態学的特徴として、壊死における細胞体積の増加、細胞質蛋白質の変性、細胞内小器官の崩壊がある。壊死では、ATP 欠乏によるカルシウムの細胞内流入が、カルシウム依存性フォスホリパーゼを活性化することにより非可逆的な膜の破壊と細胞溶解、DNA のランダムな断片化が起ると考えられている。

細胞死には、壊死以外にアポトーシスとして知られるタイプがある^{1)~5)}。アポトーシスの特徴としては、細胞体積の減少および染色質濃縮と膜のブレブ形成、ヌクレオゾーム単位の DNA 断片化 (電気泳動上“DNA ラダー”という)、RNA と蛋白質の新規合成が必要であるという3点が強調されている。

脊椎動物や無脊椎動物の神経系形成において、アポトーシスが重要な役割を果たすと考えられているが、神経細胞のアポトーシスにおける分子機構には不明な点が多い^{6)~9)}。現在、bcl-2 ファミリー (bcl-2, bcl-x および bax), c-Myc, p53, TRPM-2/SGP, IL-1 β 変換酵素, Fas/APO-1 などがアポトーシスに関与している分子として報告されている^{10)~20)}。さらに、線虫のアポトーシスには、ced-3, ced-4 および ced-9 の関与が判明している²¹⁾²⁸⁾。

実験動物に3-アセチルピリジン (3-acetylpyridine, 3-AP) を投与すると、運動障害を誘発し、この3-APの作用は、下オリブ核、海馬皮質、疑核、舌下神経核、脚間核、視床下部視交叉上核、黒質線状体投射系、迷走神経背側運動核、脊髄神経節、交感神経節に選択的に細胞死を誘導することが知られている^{29)~35)}。そこで、神経細胞の細胞死における分子機構のさらな

る解明のために、我々は種々の培養細胞に3-APを投与し、細胞の3-AP感受性を検討した。その結果、ヒトニューロblastoma IMR-32細胞が、3-AP投与により、アポトーシスに特徴的な細胞死に至ることが明らかになった。

対象および方法

I. 試薬

ナイアシンアミド、シクロヘキシミド、アクチノマイシンD、アウリントリカルボン酸 (aurintricarboxylic acid, ATA)、エトポシド (トポイソメラーゼII阻害剤) は、いずれもシグマ社 (St. Louis, USA) の商品を使用した。3-AP (和光純薬, 東京)、ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、Ham's F12, L-15 および馬および牛胎仔血清 (GIBCO, Grand Island, USA)、エポキシレジン (日新 EM, 東京)、アラマブルー溶液 (Biosource International, Camarillo, USA) は、各社の商品を使用した。

II. 細胞培養

ヒトニューロblastoma IMR32細胞、マウスニューロblastoma NS20Y細胞およびN18TG細胞、ラットグリオーマ Bu-17細胞、ラット褐色細胞腫 PC12細胞、マウス NIH3T3細胞は、林要喜知博士 (森永乳業生物科学研究所) より供与された。ラット胎児大脳皮質細胞は、胎齢14日のフィッシャーラット (日本クレア, 東京) より調整した。これら細胞は、5%牛胎仔血清加 DMEM にて37℃、5% CO₂ 存在下で 35mm 培養皿に 5×10⁴/ml 密度で培養した。培養細胞に種々の

平成7年9月6日受付, 平成7年10月13日受理

Abbreviations: ATA, aurintricarboxylic acid; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; 3-AP, 3-acetylpyridine

濃度の 3-AP (0, 30, 100, 300, 1000 μ M) を添加し、その後アラマブルー溶液に対する染色性を指標にして、生存細胞数を経時的に計数した。3-AP 添加によるヒトニューロblastoma 細胞死に対する種々の薬剤の影響を調査するために、ナイアシンアミド (0, 10, 50, 100, 150, 300 μ M), アクチノマイシン D (0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 μ g/ml), シクロヘキシミド (0, 0.1, 0.3, 1, 3 μ g/ml), ATA (0, 30, 100, 300, 1000 μ M) を 3-AP と同時に添加し24時間後に生存細胞数を計数した。

Ⅲ. 生存細胞の計数

培養細胞に種々の薬剤を添加して20時間後に、アラマブルー溶液を添加しさらに4時間培養した。生存細胞数は、スペクトロフォトメーター (Model 3550 microplate reader, BioRad, Melville, USA) を用いて計数した。全細胞数に対する生存細胞数の占める比を計算し、統計処理を行った。

Ⅳ. DNA の電気泳動

3-AP 処置した細胞を、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) で洗浄後に 1ml の融解溶液 (5mM Tris [pH 7.4], 20mM EDTA, 0.5% Triton X-100) を加えて回収した。回収した細胞を、4℃にて2分間遠心し、その上清から、トリス緩衝フェノール (pH

8.0) とクロロフォルム-イソアミルアルコール (24:1 [v/v]) を用いて DNA を抽出した。DNA はエタノール沈殿後にトリス-EDTA 液に回収し RNase A (50mg/ml, 37℃, 30分) 処理後、再びトリス緩衝フェノール (pH 8.0) とクロロフォルム-イソアミルアルコールを用いて抽出された。DNA は1.5%アガロースゲルにより、電気泳動にかけられエチジウムブロマイドにより可視化された。エトポシド処理した IMR-32 細胞の DNA も同様に抽出し、その電気泳動パターンを解析した。

Ⅴ. 電子顕微鏡観察

正常 IMR-32 細胞および 3-AP 処理24時間後の IMR-32 細胞を、2.5%グルタルアルデヒド、2%パラフォルムアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝生理食塩水で2時間固定した後、1%オスミウム酸水溶液で処理した。細胞は、1%酢酸ウラン水溶液処理後、エタノールで脱水しエポキシレジンに包埋され60℃で48時間重合した。重合した標本から、ウルトラマイクロームにより超薄切片を作成し、酢酸ウランと鉛による二重染色後に透過型電子顕微鏡 (日立、東京) で観察撮影した。

Ⅵ. 統計処理

各実験後の生存細胞数の検定には、一元配置分散分析

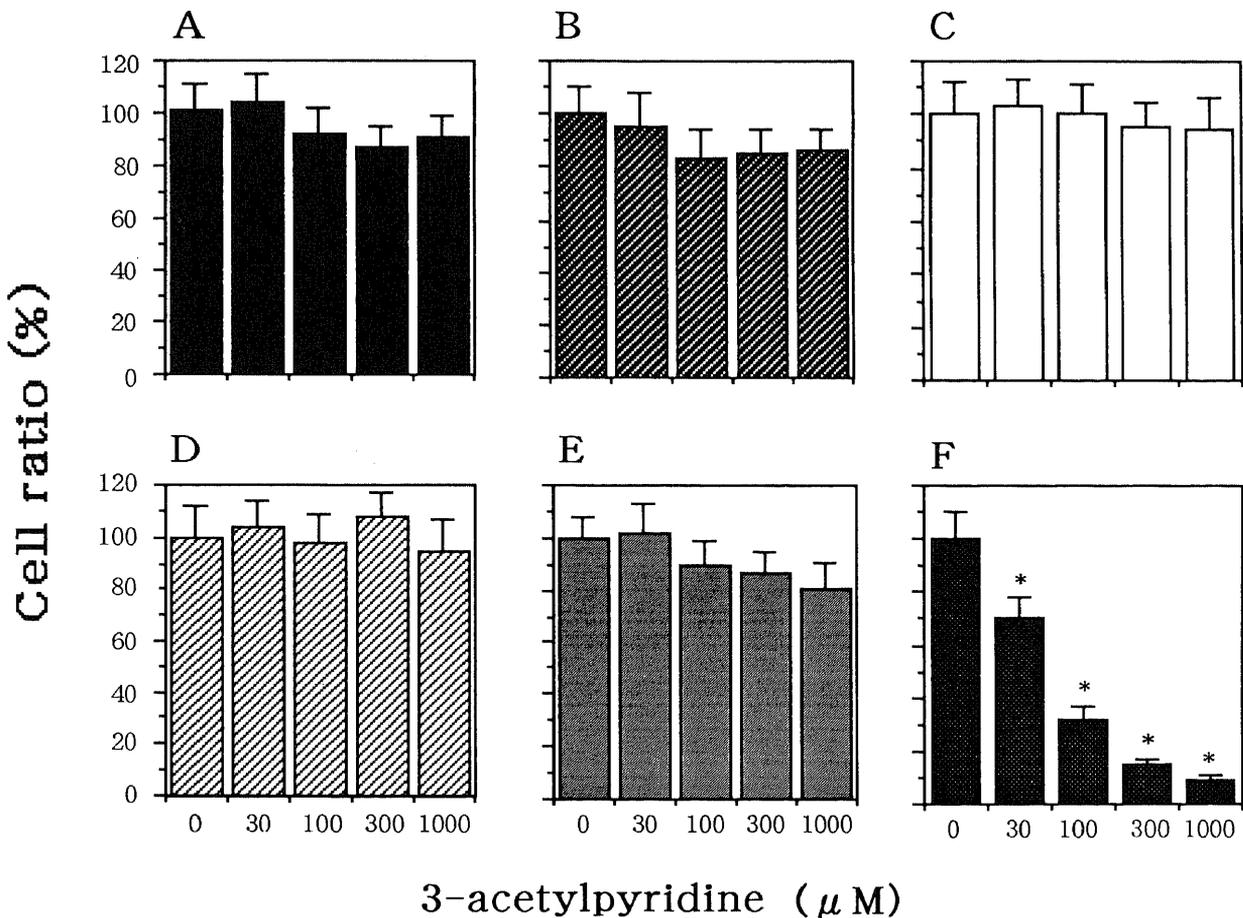


Fig. 1. The cytotoxic effects of 3-AP upon various types of cultured cells. Cells were cultured in the presence of 3-AP for 20 hr. Thereafter, a one-tenth volume of alamaBlue was directly added to each dish and the cells were cultured for another 4 hr. The cell ratio in each dish was estimated spectrophotometrically. Each value represents $\bar{x} \pm \text{SEM}$ of triplicate or quadruplicate dishes. Cells in panels A, B, C, D, E and F are N18TG8, NS20Y, NIH3T3, Bu-17, PC12 cells and rat embryonal cortical neurons, respectively. Mouse neuroblastoma NS20Y cells (B) was slightly sensitive to 3-AP. The cortical neurons of rat embryos (F) were highly sensitive to 3-AP, but another cell lines are resistant. *Mean values that are statistically different from the control value obtained in the absence of 3-AP (Scheffé's F-test with a significance level of $p < 0.001$).

(ANOVA) を行っただけ、Scheffé's F検定を用いた。危険率 (p) が0.001以下をもって有意差と判定した。

成 績

1. 培養細胞に対する 3-AP の毒性

3-AP は、実験動物に運動障害を引き起こす神経毒であり特定のニューロンが 3-AP に対する感受性を有していると考えられる。この点を、種々の培養細胞を用いて検討した。図1および図2に示されるように、多くの非神経細胞は 3-AP の毒性に対して抵抗性を示した。しかし、IMR-32 細胞と胎生ラット大脳皮質ニューロンは、3-AP に対して極めて強い感受性を示し細胞死に至った。そこで、3-AP により誘導される IMR-32 細胞の細胞死の特徴を解析した。

IMR-32 細胞に対する 3-AP の致死効果を検討するために、生存細胞数の計数を行った (図2 A)。100 μ M 以下の 3-AP 投与は、細胞に致死効果を与えなかったが、300 μ M 以上の濃度で

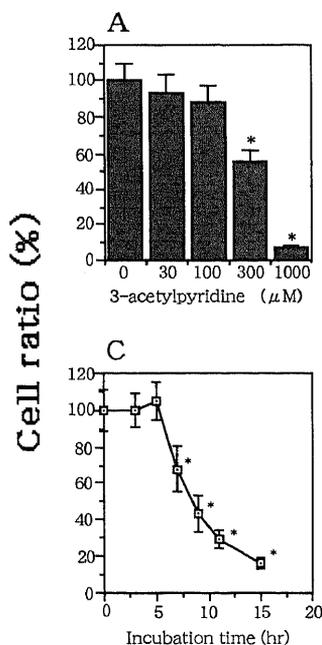


Fig. 2. The 3-AP-induced neuronal cell death of IMR-32 and its inhibition by niacinamide. IMR-32 cells were cultured for 24 hr with various amounts of 3-AP in the absence (A) and presence (B) of niacinamide (0-300 μ M). The cell ratio was estimated as described in Fig. 1. The concentrations of 3-AP over 300 μ M significantly lowered the survival rate (A). The cell death was completely inhibited when niacinamide over 150 μ M was added. A concentration of 3-AP used in (B) is 1 mM. *Mean values that are statistically different from the control value obtained in the absence of 3-AP (A) or niacinamide (B) (Scheffé's F-test with a significance level of $p < 0.001$). C: Time lapse analysis of 3-AP-induced cell death of IMR-32 cells. Cells were cultured for up to 15 hr in the presence of 3-AP (1 mM), and at indicated times, a one-tenth volume of alamaBlue solution was added to each well. One hour thereafter, the surviving cells were counted and estimated as described in Fig. 1. More than 90% of the cells were killed within 15 hr. *Mean values that are statistically different from the control value obtained in the 0 hr (Scheffé's F-test with a significance level of $p < 0.001$).

は、用量依存的な細胞致死効果が認められた。100 μ M の 3-AP 投与により、10%の細胞減少を認め、1mM では90%の減少を認めた。

II. 3-AP 誘導細胞死の特徴

3-AP 誘導細胞死の特徴を解析するために、アクチノマイシンD、シクロヘキシミド、ATA、ナイアシンアミドを培養細胞に 3-AP と同時添加して生存細胞数を計数した。その結果、ナイアシンアミド 150 μ M 以上の添加により細胞死は、完全に阻止された (図2B)。3-AP (1mM) の効果は、投与後7時間以降から有意差を持って現われたため (図2C)、生存細胞数の計数は、薬剤投与後24時間で行った。アクチノマイシンD、シクロヘキシミド、ATA の投与は、3-AP 誘導細胞死を部分的に阻止した (図3)。これらの結果は、3-AP 誘導細胞死の進行には RNA お

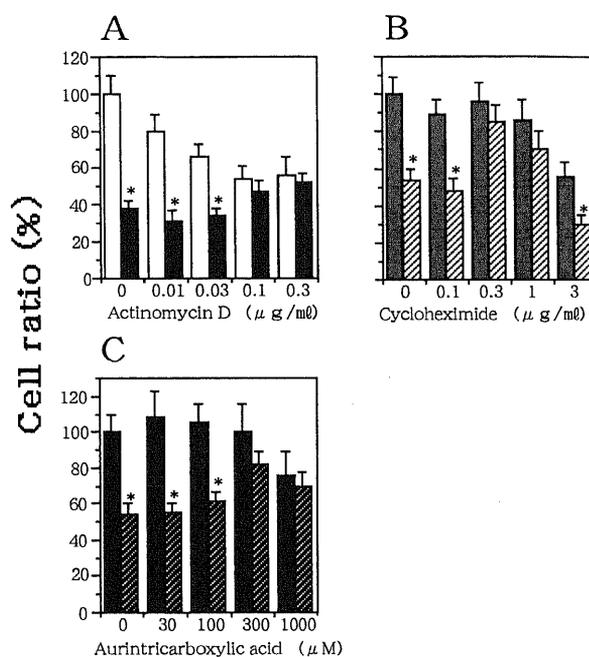


Fig. 3. The inhibitory effects of actinomycin D (AcD), cycloheximide (CHX) and aurintricarboxylic acid (ATA) on 3-AP-induced cell death. Cells were cultured for 24 hr with the indicated amounts of each reagent in the presence or absence of 3-AP (400 mM). Thereafter, the ratio of surviving neurons was estimated as described in Fig. 1. A: The surviving cell ratio was compared between "AcD (white bars)" and "AcD+3-AP (black bars)" under the conditions of each concentration of AcD. There were no significant differences under the conditions of 0.1 and 0.3 μ g/ml of AcD. The 3-AP-induced death is inhibited under these concentrations of AcD. B: The cell ratio was compared between "CHX (gray bars)" and "CHX+3-AP (stripe bars)" under the conditions of each concentration of CHX. There were no significant differences under the conditions of 0.3 and 1 μ g/ml of CHX. The 3-AP-induced death is inhibited under these concentrations of CHX. C: The cell ratio was compared between "ATA (black bars)" and "ATA+3-AP (dotted bars)" under the conditions of each concentration of ATA. There were no significant differences under the conditions of 300 and 1000 μ M of ATA. The 3-AP-induced death is inhibited under these concentrations of ATA. * Statistically significant difference between absence of 3-AP and presence of 3-AP (Scheffé's F-test with a significance level of $p < 0.001$).

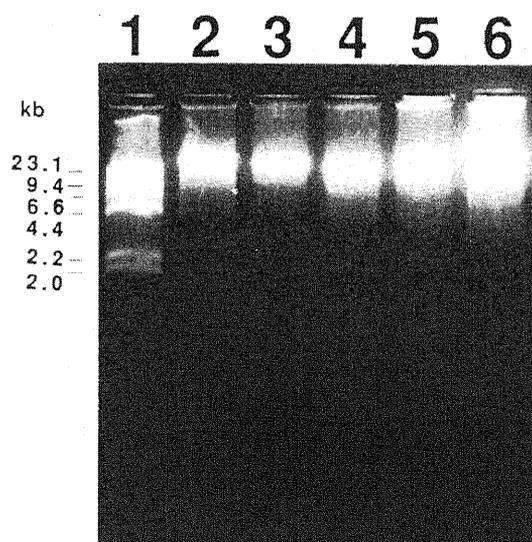


Fig. 4. Analysis of nucleosome laddering in 3-AP-treated IMR-32 cells. To analyze laddering, DNA was also extracted at each point and resolved on a 1.5% agarose gel. The DNA was stained with ethidium bromide. Lane 1, DNA size marker; lanes 2 to 5 are DNAs from cells incubated with 3-AP for 0, 3, 12 or 24 hr, respectively. Lane 6 is DNA from cells incubated with etoposide (10 mg/ml), an inhibitor of topoisomerase II, which is known to induce apoptosis in many types of cells. DNA laddering was undetectable in the presence of 3-AP, but only a faint smear was detected in each lane.

および蛋白質の新規合成が必要であることを示している。

次に、3-AP 誘導細胞死における DNA の切断様式を電気泳動法により調査した。図4に示したように、DNA ラダー形成は認められなかった。エトポシドは、多くの細胞死において DNA ラダー形成を誘導することが知られているが、IMR-32 細胞に投与した結果 DNA ラダー形成は認められなかった。このように 3-AP 誘導細胞死は生化学的には、アポトーシスの特徴を備えているが、ヌクレオゾーム単位の DNA 断片化は認められなかった。

Ⅲ. 3-AP 投与による IMR-32 細胞の形態学的変化

正常 IMR-32 細胞は、微小管を含んだ細胞質突起と円形の核を有し、核の染色質は均質であった。隣接する細胞間には、突起による接触が見られたが、デスモゾームなどの膜の分化はなかった。また、細胞質内には、ミトコンドリアと空胞がみられた(図5A, B)。3-AP 投与後24時間の細胞形態を、透過型電子顕微鏡で観察したところ、大部分の細胞は突起が消失し、隣接細胞との接触は見られなかった(図5C, D)。一部の細胞では、細胞質および核の電子密度が増大し、核が凝縮・断片化しアポトーシスの特徴を呈していた。さらに、細胞質内小器官には、腫大は見られなかった。細胞膜からは、アポトーシス小体が、細胞間隙に突出していたが、隣接細胞によるアポトーシス小体の貪食像は見られなかった。

考 察

アポトーシスは、中枢神経系の発生過程に関与することが知られている。神経系におけるアポトーシスの分子機構を解明するためには、神経細胞アポトーシスのモデルを樹立し解析する

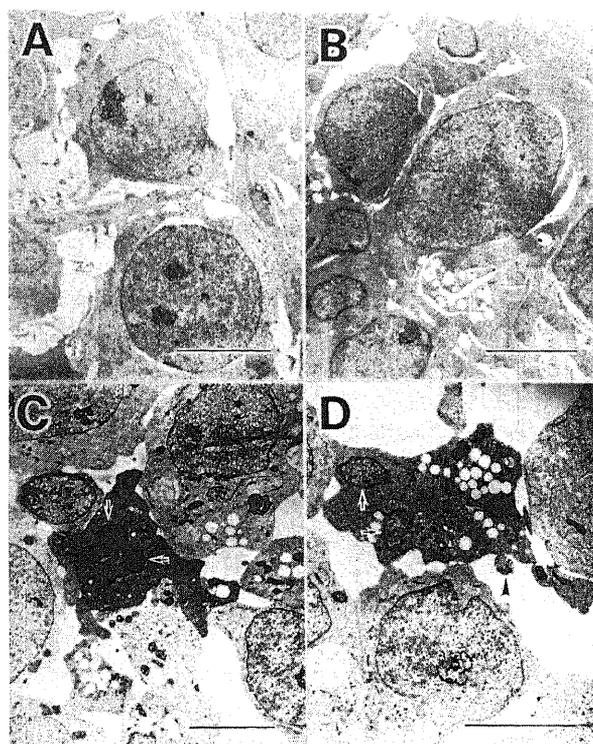


Fig. 5. Electron micrographs of IMR-32 cells cultured with or without 3-AP. A and B, IMR-32 cells with no 3-AP. IMR-32 cells have homogeneous nuclei and cytoplasm. Many cytoplasmic processes protrude from the somata. C and D, cells incubated with 3-AP for 24 hr. The somata are convoluted or losing their cytoplasmic processes. Nuclei (arrows) are condensed and fragmented. A membrane-bound apoptotic body is indicated (arrowhead). The cytoplasm is highly electron dense. Scale bars=5 μ m.

ことが有用である。ナイアシンアミドのアナログである 3-AP は、鶏胎児に対して催奇形作用を有し³⁰⁾、ラット中枢神経系においては選択的な神経細胞死を起こす³¹⁾。本研究で、我々は 3-AP をヒトニューロblastoma に投与するとアポトーシスを起こすことを示した。3-AP はナイアシンアミドに類似の構造を有し、ナイアシンアミドの競合剤であるため、3-AP に誘導されるアポトーシスは、NAD および NADP の欠乏によると考えられる^{37)~40)}。また本実験における 3-AP による細胞死は、ナイアシンアミドの同時投与により完全に阻止された。しかし、実験に用いた細胞株により 3-AP 感受性は、著しく異なった。ヒトニューロblastoma IMR-32 細胞およびラット胎生期ニューロンは、3-AP に著しい感受性を有し細胞死に至るが、ラット褐色細胞腫 PC12 細胞、マウスニューロblastoma NS20Y 細胞および N18TG 細胞、ラットグリオーマ Bu-17 細胞およびマウス NIH3T3 細胞は、3-AP に対して非感受性であった。種差による 3-AP 感受性の有無は、3-AP の生体内投与によっても確認されている。すなわち、ラットの腹腔内に 3-AP を投与すると下オリーブ核に顕著な細胞死がみられるが³⁰⁾³¹⁾³⁴⁾³⁵⁾、マウスにおいては細胞死誘導は見られない(村瀬、未発表データ)。このような細胞種あるいは動物種による 3-AP 感受性の有無は、細胞がナイアシンアミド欠乏に対応する際の代謝経路の差に依るものであろう。

3-AP 処理による IMR-32 細胞の形態変化は、アポトーシスの特徴を備えていたが、アポトーシス小体が近接する細胞に貪食されている像は見られなかった。本実験における培養条件下では、細胞膜から離れたアポトーシス小体は培養液中に浮遊してしまうため、その貪食像が認められなかった可能性がある。IMR-32 細胞自身の貪食能については、同細胞が 3-AP 感受性であるために貪食能が発揮されていない可能性もあり、不明である。

アクチノマイシン D やシクロヘキシミド投与による 3-AP 誘導細胞死の阻止は、この細胞死の進行に RNA および蛋白質の新規合成が必要であることを示している。またこれら薬剤による細胞死阻止効果は、大部分のアポトーシスの特徴である⁴³⁾⁴⁴⁾。従来の神経系細胞死の報告では、グルタミン酸により誘導される C6 細胞死⁴⁵⁾、サイトカインにより誘導される交感神経節細胞死⁴⁶⁾、栄養因子除去による PC12 細胞死⁴⁷⁾ や運動神経細胞死⁴⁸⁾ においては DNA ラダーが形成されることが証明されている。しかし、3-AP を投与した IMR-32 細胞に DNA ラダー形成は見られなかった。DNA ラダーが出現しないアポトーシスの例としては、交感神経節ニューロンおよび PC12 細胞におけるプログラム細胞死⁴⁹⁾、スタウロスポリンにより誘導される MOLT-4 細胞の死⁵⁰⁾ やグルタミン酸による培養小脳顆粒細胞死⁵¹⁾ が報告されている。また、明らかなアポトーシスであってもスクレオソーム単位の DNA 分解が見られないという報告もある⁵²⁾。エトポシドは、種々の細胞において DNA 断片化を起こすことが知られているが^{53)~56)}、IMR-32 細胞に投与した場合細胞死にも関わらず、DNA 断片化は観察されなかった。これらの報告も併せて考えると、持続的な DNA 断片化は IMR-32 細胞アポトーシスの進行に必ずしも必須ではない可能性も考えられた^{57)~59)}。しかし、DNA 断片化開始がアポトーシス進行の原因の一つである可能性は残されている。このように本実験では DNA 断片化が観察されなかったが、ATA 投与による IMR-32 細胞死の部分的な抑制は、エンドヌクレアーゼの阻害によるものではなく、むしろ蛋白質合成の阻害によるものと考えられる。

結 論

ナイアシンアミド拮抗剤である 3-AP は、培養下のヒトニューロblastoma IMR-32 細胞に選択的に細胞死を誘導した。この細胞死は、形態学的にはアポトーシスの特徴を有し、また蛋白質や RNA 阻害剤により細胞死の進行が阻止された。ヌクレオソーム単位の DNA 断片化は見られなかったが、この細胞死はアポトーシスに属すると考えられた。この 3-AP 誘導 IMR-32 細胞死は、神経細胞死の分子機序の解析に有用なモデルとなると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました加藤聖教授に深甚なる謝意を表します。また培養細胞株を御提供下さいました林要喜知博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Kerr, J. F. R.: Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.*, **105**, 13-20 (1970).
- 2) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R.:

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257 (1972).

- 3) Wyllie, A. H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-556 (1980).
- 4) Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. & Currie, A. R.: Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, **68**, 251-306 (1980).
- 5) Arends, M. J. & Wyllie, A. H.: Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **32**, 223-254 (1991).
- 6) Clarke, P. G. H.: Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.*, **181**, 195-213 (1990).
- 7) Oppenheim, R. W.: Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, **14**, 453-501 (1991).
- 8) Johnson, E. J. & Deckwerth, T. L.: Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.*, **16**, 31-46 (1993).
- 9) Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y. & Jacobson, M. D.: Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*, **262**, 695-700 (1993).
- 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) Kyprianou, N., Alexander, R. B. & Isaacs, J. T.: Activation of programmed cell death by recombinant human tumor necrosis factor plus topoisomerase II-targeted drugs in L929 tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **83**, 346-350 (1991).
- 12) Bissonnette, R. P., Echeverri, F., Mahboubi, A. & Green, D. R.: Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*, **359**, 552-554 (1992).
- 13) Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z. & Hancock, D. C.: Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, **69**, 119-128 (1992).
- 14) Fanidi, A., Harrington, E. A. & Evan, G. I.: Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature*, **359**, 554-556 (1992).
- 15) Korsmeyer, S. J.: Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv.*, **15**, 105-118 (1992).
- 16) Sen, S.: Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **67**, 287-319 (1992).
- 17) Shi, Y., Glynn, J. M., Guilbert, L. J., Cotter, T. G., Bissonnette, R. P. & Green, D. R.: Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science*, **257**, 212-214 (1992).
- 18) Boise, L. H., Gonzalez, G. M., Postema, C. E.,

- Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G. & Thompson, C. B.: bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, **74**, 597-608 (1993).
- 19) Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L. & Wyllie, A. H.: Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, **362**, 849-852 (1993).
- 20) Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E. A. & 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).
- 21) Oltvai, Z. N., Millman, C. L. & Korsmeyer, S. J.: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, **74**, 609-619 (1993).
- 22) Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. & Nagata, S.: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, **75**, 1169-1178 (1993).
- 23) Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R. & Korsmeyer, S. J.: Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*, **75**, 229-240 (1993).
- 24) Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. & Horwitz, H. R.: The *C. elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*, **75**, 641-652 (1993).
- 25) Zhong, L. T., Sarafian, T., Kane, D. J., Charles, A. C., Mah, S. P., Edwards, R. H. & Bredesen, D. E.: bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4533-4537 (1993).
- 26) Gagliardini, V., Fernandez, P. A., Lee, R. K., Drexler, H. C. A., Rotello, R. J., Fishman, M. C. & Yuan, J.: Prevention of vertebrate neuronal death by the crmA gene. *Science*, **263**, 826-828 (1994).
- 27) Ellis, R. E. & Horvitz, H. R.: Two *C. elegans* genes control the programmed deaths of specific cells in the pharynx. *Development*, **112**, 591-603 (1991).
- 28) Hengartner, M. O., Ellis, R. E. & Horvitz, H. R.: *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature*, **356**, 494-499 (1992).
- 29) Hicks, S. P.: Pathologic effects of antimetabolites. I. Acute lesions in the hypothalamus, peripheral ganglia, and adrenal medulla caused by 3-acetylpyridine and prevented by nicotinamide. *Am. J. Pathol.*, **31**, 189-199 (1955).
- 30) Desclin, J. C. & Escubi, J.: Effects of 3-acetylpyridine on the central nervous system of the rat, as demonstrated by silver methods. *Brain Res.*, **77**, 349-364 (1974).
- 31) Balaban, C. D.: Central neurotoxic effects of intraperitoneally administered 3-acetylpyridine, harmaline and niacinamide in Sprague-Dawley and Long-Evans rats: a critical review of central 3-acetylpyridine neurotoxicity. *Brain Res. Rev.*, **9**, 21-42 (1985).
- 32) Deutch, A. Y., Rosin, D. L., Goldstein, M. & Roth, R. H.: 3-acetylpyridine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system: an animal model of olivopontocerebellar atrophy-associated parkinsonism. *Exp. Neurol.*, **105**, 1-9 (1989).
- 33) Deutch, A. Y., Elsworth, J. D., Roth, R. H. & Goldstein, M.: 3-acetylpyridine results in degeneration of the extrapyramidal and cerebellar motor systems: loss of the dorsolateral striatal dopamine innervation. *Brain Res.*, **527**, 96-102 (1990).
- 34) Murase, S.: Climbing fibre destruction triggers mossy fibre sprouting in adult rat cerebellum. *Neuroreport*, **6**, 777-781 (1995).
- 35) Murase, S.: Axonal elongation of grafted, embryonic inferior olivary neurons in the adult rat cerebellum and their synaptic formation on host Purkinje cells. *Acta Anat. Nippon.*, **70**, 116-129 (1995).
- 36) Caplan, A. I., Zwilling, E. & Kaplan, N. O.: 3-acetylpyridine: effects in vitro related to teratogenic activity in chicken embryos. *Science*, **160**, 1009-1010 (1968).
- 37) Herken, H.: Functional disorders of the brain induced by synthesis of nucleotides containing 3-acetylpyridine. *Zeitschr. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **6**, 357-367 (1968).
- 38) Rosenberg, M. J. & Caplan, A. I.: Nicotinamide adenine dinucleotide levels in chick limb mesodermal cells in vitro: effects of 3-acetylpyridine and nicotinamide. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **33**, 947-956 (1975).
- 39) Anderson, W. A. & Flumerfelt, B. A.: A light and electron microscopic study of the effects of 3-acetylpyridine intoxication on the inferior olivary complex and cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.*, **190**, 157-174 (1980).
- 40) Anderson, W. A. & Flumerfelt, B. A.: Sensitivity of rat inferior olivary neurons to 3-acetylpyridine. *Dev. Brain Res.*, **314**, 285-291 (1984).
- 41) Weller, M., Marini, A. M. & Paul, S. M.: Niacinamide blocks 3-acetylpyridine toxicity of cerebellar granule cells in vitro. *Brain Res.*, **594**, 160-164 (1992).
- 42) Sanchez, P. A., Perez, P., Villa, A., Pascual, A. & Aranda, A.: Nicotinamide analogs and DNA-damaging agents deplete thyroid hormone receptor and c-erbA mRNA levels in pituitary GH1 cells. *Mol. Cell Endocrinol.*, **91**, 127-134 (1993).
- 43) Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobe, G. C. & Kerr, J. F.: Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.*, **13**, 18-54 (1988).
- 44) Martin, S. J.: Apoptosis: suicide, execution or murder? *Trends Cell Biol.*, **3**, 141-144 (1993).
- 45) Kato, S., Negishi, K., Mawatari, K. & Kuo, C. H.: A mechanism for glutamate toxicity in the C6 glioma cells involving inhibition of cystine uptake leading to glutathione depletion. *Neuroscience*, **48**, 903-914 (1992).
- 46) Kessler, J. A., Ludlam, W. H., Freidin, M. M., Hall, D. H., Michaelson, M. D., Spray, D. C., Dougherty, M. & Batter, D. K.: Cytokine-induced programmed death of

- cultured sympathetic neurons. *Neuron*, 11, 1123-1132 (1993).
- 47) Pittman, R. N., Wang, S., DiBenedetto, A. J. & Mills, J. C.: A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *J. Neurosci.*, 13, 3669-3680 (1993).
- 48) Comella, J. X., Sanz-Rodriguez, C., Aldea, M. & Esquerda, J. E.: Skeletal muscle-derived trophic factors prevent motoneurons from entering an active cell death program in vitro. *J. Neurosci.*, 14, 2674-2686 (1994).
- 49) Mesner, P. W., Winters, T. R. & Green, S. H.: Nerve growth factor withdrawal-induced cell death in neuronal PC12 cells resembles that in sympathetic neurons. *J. Cell Biol.*, 119, 1669-1680 (1992).
- 50) Falcieri, E., Martelli, A. M., Bareggi, R., Cataldi, A. & Cocco, L.: The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 193, 19-25 (1993).
- 51) Montpied, P., Weller, M. & Paul, S. M.: N-methyl-D-aspartate receptor agonists decrease protooncogene bcl-2 mRNA expression in cultured rat cerebellar granule neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195, 623-629 (1993).
- 52) Cohen, G. M., Sun, X. M., Snowden, R. T., Dinsdale, D. & Skilleter, D. N.: Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem. J.*, 286, 331-334 (1992).
- 53) Shimizu, T., Kubota, M., Tanizawa, A., Sano, H., Kasai, Y., Hashimoto, H., Akiyama, Y. & Mikawa, H.: Inhibition of both etoposide-induced DNA fragmentation and activation of poly (ADP-ribose) synthesis by zinc ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 169, 1172-1177 (1990).
- 54) Walker, P. R., Smith, C., Youdale, T., Leblanc, J., Whitfield, J. F. & Sikorska, M.: Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res.*, 51, 1078-1085 (1991).
- 55) Barry, M. A., Reynolds, J. E. & Eastman, A.: Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res.*, 53, 2349-2357 (1993).
- 56) Onishi, Y., Azuma, Y., Sato, Y., Mizuno, Y., Tadakuma, T. & Kizaki, H.: Topoisomerase inhibitors induce apoptosis in thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1175, 147-154 (1993).
- 57) Oberhammer, F., Wilson, J. W., Dive, C., Morris, I. D., Hickman, J. A., Wakeling, A. E., Walker, P. R. & Sikorska, M.: Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.*, 12, 3679-3684 (1993).
- 58) Tomei, L. D., Shapiro, J. P. & Cope, F. O.: Apoptosis in C3H/10T1/2 mouse embryonic cells: evidence for internucleosomal DNA modification in the absence of double-strand cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, 853-857 (1993).
- 59) Sun, D. Y., Jiang, S., Zheng, L-M., Ojcius, D. M. & Young, J. D-E.: Separate metabolic pathways leading to DNA fragmentation and apoptotic chromatin condensation. *J. Exp. Med.*, 179, 559-568 (1994).

Apoptosis of Human Neuroblastoma Induced by 3-acetylpyridine Shin-ichi Murase, Department of Neurophysiology, Neuroinformation Research Institute (NIRI), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 104, 648—654 (1995)

Key words apoptosis, electron microscopy, neuroblastoma, 3-acetylpyridine, programmed cell death

Abstract

3-acetylpyridine (3-AP) expresses neurotoxic activity upon in vivo administration to animals. We found that this neurotoxin also killed cultured human neuroblastoma cells (IMR-32) at concentrations of 0.3-1 mM, whereas it did not show cytotoxic effects on non-neuronal cells and mouse neuroblastoma under the same conditions. This 3-AP-induced cell death was partially blocked by actinomycin D, an RNA synthesis inhibitor, as well as by cycloheximide, a protein synthesis inhibitor and aurintricarboxylic acid, an inhibitor of both endonuclease and protein synthesis. Niacinamide, which is a competitor of 3-AP for processes that synthesize NAD or NADP, also blocked cell death. There was no obvious nucleosomal degradation of DNA during cell death. When analyzed with an electron microscope, however, nuclei were convoluted and broken into discrete fragments, which eventually led to chromatin condensation. These results indicate that 3-AP induced-neuronal death is one variation of apoptosis, and that this system provides a useful model for understanding molecular events and for identifying genes involved in the programmed cell death.