

Title	カスパーゼ活性化が腎形態形成に及ぼす影響の検討
Sub Title	
Author	荒木, 崇志(Araki, Takashi) 猿田, 享男(Saruta, Takao)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2006
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.83, No.1 (2006. 3) ,p.T1- T12
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20060301-0001

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

カスパーゼ活性化が腎形態形成に及ぼす影響の検討

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導：猿田教授)

あらい き たかし
荒木 崇志

(平成 15 年 1 月 24 日受付)

Key Words : caspase, apoptosis, ureteric bud branching, organ culture

近年、難治性疾患の治療として臓器や細胞の再生治療が注目されており、神経細胞や皮膚細胞、骨細胞などは *in vitro* での分化誘導が報告され^{1) 4)}、今後の治療応用が期待されている。腎臓病においては、末期腎不全に陥った患者に対し、人工血液透析という機械的に腎臓の代用を行う治療を行っているが、患者に対し時間的制約も多く、また金銭的にも医療財政の圧迫の一要因となっている。しかしながら腎臓の細胞の再生、分化誘導ははまだ報告されておらず、末期腎不全患者が透析から離脱するためには、腎移植を行うこととなるが、その広がりには不十分であり、約 20 万人の患者が人工血液透析を受けているのが現状である。腎臓の細胞の再生、分化誘導が実行できないことは、発達段階における腎臓の分化メカニズムの解明が不十分であることが一要因として考えられる。細胞死とは、低浸透圧や種々のサイトカインなどのストレスによって障害を受けた細胞を除去するためのメカニズムである⁵⁾。その一方、発生段階の器官形成においても、必要以上の細胞が一過性に生まれ、不要になった細胞が細胞死によって除去されて、正しい形態を形作ることも知られており^{6) 7)}、腎臓の発生においても約 50% の細胞が細胞死で除去されていると考えられている⁸⁾。線虫に関しては、成体となるまでの間のすべての細胞系譜が解明されており、細胞死によって除去されるべき運命を持つ細胞も同定されている⁹⁾。細胞死の実行においてシステインプロテアーゼであるカスパーゼという酵素が活性化されることが知られており、そのメカニズムは

線虫のような下等動物から、哺乳類まで保存されている¹⁰⁾。そして、哺乳類においても器官形態形成において細胞死の実行が重要であることが、神経堤の閉鎖や眼のレンズ形成において報告されている^{11) 12)}。

本研究では、腎臓の細胞の再生、分化誘導の前段階として、腎臓の形態形成のメカニズムを明らかにすることを目的とし、細胞死という現象が、腎臓の形態形成に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

1 動物

妊娠 12 日目、15 日目、16 日目、妊娠後期、成体マウスをチャールズリバーより購入し使用した。

2 RNA の抽出および RT-PCR

妊娠 12 日目、15 日目マウス胎児および新生マウスの腎臓からトータル RNA を acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 法 (AGPC 法) を用いて抽出した。1 mg の RNA を 1 unit の RNase-free DNase I (Gibco BRL) と室温で 15 分反応させた後、1 ml の 25m M EDTA を加えて反応を停止し、65 °C で 15 分加熱したのち氷冷し、1X reverse transcriptional buffer, 6.7 mM DTT, 0.625m M dNTP, 0.8 unit RNase inhibitor, 4 unit MoMLV reverse transcriptase (以上 Gibco BRL) を使用して 37

本論分は、Araki T, Saruta T, Okano H, Miura M : Caspase activity is required for nephrogenesis in the developing mouse metanephros. *Exp Cell Res* 1999 May 1 ; 248 (2) : 423-9 の一部を含む。

℃で90分反応させてcDNAを作成した。PCRに用いたプライマーはそれぞれ

caspase-1 forward 5'-TCCAGGAGGGAATATGTG
G-3'

reverse 5'-CTTGTTTCTCTCCACGGCA-
3'

caspase-2 forward 5'-ACCCTCTTCAAGCTTTTGG
GC-3'

reverse 5'-GAAAAACCTCTTGGAGCTG-
3'

caspase-3 forward 5'-GATCACAGCAAAGGAGC
AGT-3'

reverse 5'-CTCCACTGTCTGTCTCAAT-
3'

caspase-11 forward 5'-TGGGAACTCTGGAGAAAT
G-3'

reverse 5'-AATGAAGTCCTTCTCCACG-
3'

である^{13) 14)}。PCRは1X ExTaq PCR buffer (Takara), 0.2 mM dNTPs, 0.5 mM primer, と1 unit Ex Taq DNA polymerase (Takara)を最終的に20 mlの量で行った。条件は94℃5分の後、95℃1分、55℃1分、72℃1分を35サイクル (actinのみ20サイクル)で行った。PCR産物は2%アガロースゲルに泳動して検出した。

3 たんぱく質の抽出およびウエスタンブロッティング法

妊娠12日目、16日目マウス胎児および新生マウスの腎臓を1X SDS サンプルバッファー (0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 1.25 ml, グリセロール 1.0 ml, 10% SDS 2.0 ml, 2-メルカプトエタノール 0.5 ml, 0.1% BPB 0.25 ml を蒸留水で10 mlにしたもの) でホモジネートして5分間煮たものをサンプルとして使用した。12.5% SDS ポリアクリルアミドゲルに泳動した後、メンブレン (Hi Bond; アマシャム) に転写した。メンブレンを4%スキムミルクでブロッキングした後、一次抗体 (1:200 anti-caspase-9 抗体, 1:200 anti-Apaf-1 抗体; MBL, 1:200 anti-caspase-8 抗体; サンタクルーズ, 1:500 anti-tubulin 抗体; カルビオケム) と4℃で一晩反応させ、PBST (1X PBS, 0.2% Triton X-100) で3回洗浄した後、HRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ)-conjugated 二次抗体 (1:1000; アマシャム) と室温で60分反応させ、再びPBSTで3回洗浄し、ECL キット (アマシャム) を用いて検出した。

4 TUNEL 法

72時間培養後の後腎をOCTコンパウンドを用いて包埋し、クライオスタットを用いて8mMの切片を作成した。Apop Tag in situ apoptosis detection kit (Oncor) を用い、プロテイナーゼK処理を省略した以外の反応は添付プロトコールに従った。切片はequilibration bufferと45分室温で反応させた後、TdT reaction bufferと37℃で60分反応させた。Stop/wash bufferと反応させTdT reactionを停止させ、PBSで3回洗浄した後、fluorescein-conjugated anti-digoxigenin Fab fragmentと30分反応させ、Phosphate buffer saline (PBS) で再び3回洗浄したのち、Hoechst 33342で核染色を行い、鏡検した。

5 後腎器官培養

胎生12日マウスの後腎を摘出し、ポリカーボネイトフィルター (pore size; 1.0 μm; Nuclepore) 上で培養した。使用した培地は過去の報告に基づき、Ham's F12: DMEM 1:1 にトランスフェリン, PGE1, ソディウムセレネート, ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した^{15) 16)}。培地にカスパーゼの阻害剤として、100 mg/ml Z-D-CH2DCB, 100 mM および 200 mM の Ac-DEVE-CHO, Ac-IETD-CHO, Ac-LETD-CHO, Ac-YVAD-CHO (以上 Peptide Institute) を添加した。培地は24時間ごとに交換し、72時間培養後に解析に用いた。

6 尿管芽の分岐、進展、およびネフロン様構造物の生成の評価

尿管芽の分岐、進展を評価するために、培養した後腎を氷メタノールにて固定した後、PBSTで3回洗浄し、一次抗体 (1:50 anti-pancytokeratin 抗体; シグマ) と4℃で一晩反応させた。PBSTで3回洗浄した後二次抗体 (1:50 Cy-3-labeled anti-mouse IgG; Jackson Immuno Research) と反応させ、PBSTで3回洗浄した後、蛍光顕微鏡にて鏡検した。

ネフロン様構造物の形成を評価するために、同様にメタノールで固定した培養後腎をFITC-conjugated LT (Lotus tetragonolobus) レクチン (1:50 フナコシ) と室温で2時間ないし3時間反応させた後、PBSTで3回洗浄し、蛍光顕微鏡にて鏡検した。

7 カスパーゼ活性の測定

培養後腎をトリプシン EDTA を用いて消化した後1500 rpm で5分間遠心し、ジギトニンバッファー (50

mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 10mM EGTA) に浮遊し、凍結、融解を3回繰り返した。終濃度 15 mM となるようにジギトニンを加え、37度で30分反応させた。15000 rpm で3分間遠心し、上清をサンプルとした。1 mg のサンプルを切断バッファー (20mM HEPES-NaOH, 100mM NaCl, 0.05% NP-40, 5mM MgCl₂) と 37 °C で 45 分前処理し、終濃度が 10 mM となるように Ac-DEVD-AMC を基質として添加して、37 °C で 30 分反応した。7-amino-4-methylcoumarin (AMC) の放出を spectrofluorometer を用いて検出した。1 unit のカスパーゼ活性は、0.22 nmol の AMC の放出を1分間の反応で行う活性とした。

8 免疫染色および活性型カスパーゼ9の同一切片上での検出

胎生 16 日マウスの後腎を OCT コンパウンドを用いて包埋し、クライオスタットを用いて 8mM の切片を作成した。切片は一次抗体 (1 : 100 anti-Apaf-1 抗体; サンタクルーズ) と 4 °C で一晩反応させた後、PBS で 3 回洗浄し、二次抗体 (1 : 200 Rhodamine-conjugated donkey anti-goat antibody; サンタクルーズ) と室温で 2 時間反応し、さらに活性型カスパーゼ 9 を検出するために V1 抗体 (1 : 500; 理化学研究所森島先生より寄贈) と 4 °C で一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、二次抗体 (1 : 200 FITC-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody; サンタクルーズ) と室温で 2 時間反応させ、PBS で 3 回洗浄した後、蛍光顕微鏡を用いて鏡検した。

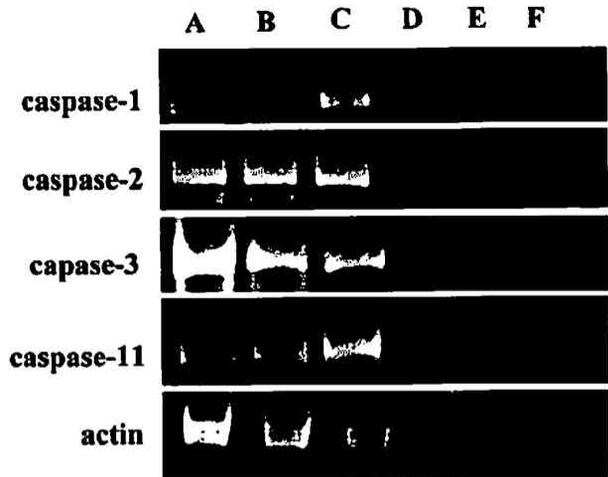
9 統計学的処理

データは平均値±標準偏差で表記し、群間の差を評価するにあたり unpaired t test を用いた。危険率が 0.05 未満のものを統計学的に有意とした。

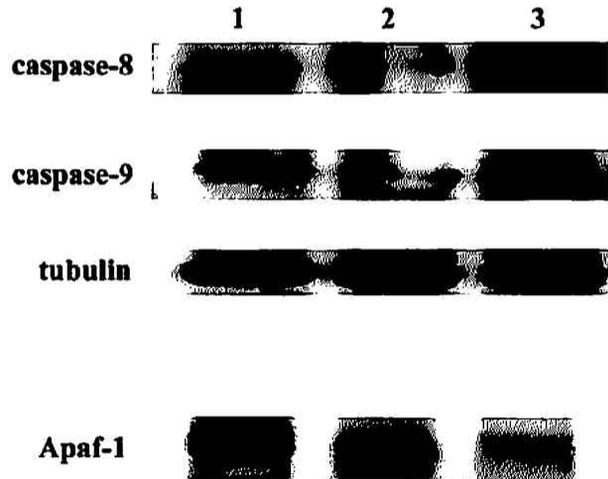
結 果

1 発生期腎臓におけるカスパーゼの発現

RT-PCR 法による検討により、カスパーゼ 1, 2, 3, 11 のいずれもが胎児期の腎臓において発現していることが確認された (第 1 図 A)。また、ウェスタンブロッティング法による検討により、カスパーゼ 8, 9 のいずれもが胎児期の腎臓において発現していることが確認された (第 1 図 B)。カスパーゼ 9 と複合体を作成し、細胞死の実行にかかわる Apaf-1 タンパクも胎児期の腎臓において発現しており、さらにその発現は成体の腎臓



第 1 図 A 胎児の腎臓におけるカスパーゼの発現を RT-PCR で確認した。カスパーゼ-1, カスパーゼ-2, カスパーゼ-3, カスパーゼ-11 のいずれもが、胎児期の腎臓における発現が認められた。A 胎生 12 日目, B 胎生 15 日目, C 新生児の腎臓からそれぞれ RNA を抽出したもの。D, E, F はそれぞれについて RT を行わず PCR を行ったもので、genomic DNA の混入の可能性を除外するために行った。



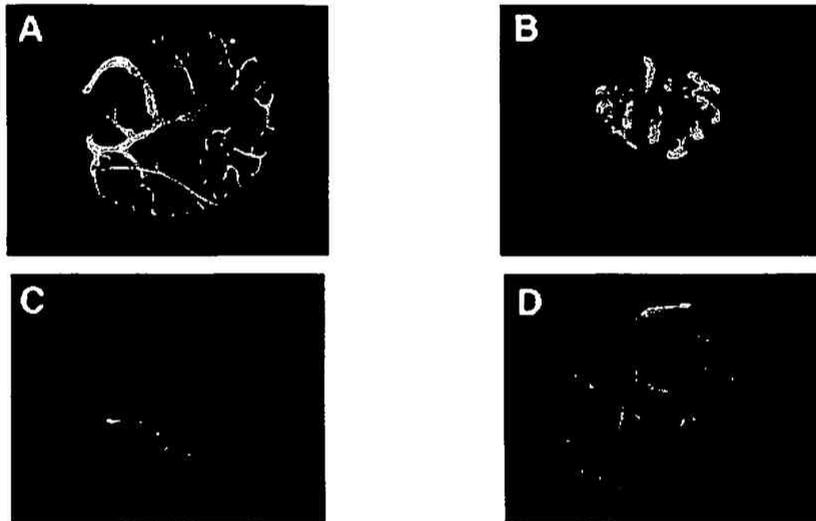
第 1 図 B 胎児の腎臓におけるカスパーゼ、およびカスパーゼの活性化に関与する Apaf-1 の発現をウェスタンブロッティングで確認した。カスパーゼ-8, カスパーゼ-9 のいずれもが胎児期の腎臓における発現が認められた。Apaf-1 も発現が確認されたが、胎児期の腎臓における発現量の法が多いことが認められた。1, 胎生 12 日目, 2, 胎生 16 日目, 3, 新生児の腎臓からそれぞれタンパクを抽出したもの。(Araki T et al: Nephron Experimental Nephrology 93: e117-124, 2003 の第 1 図を許可を得て転載)

よりも胎児期の腎臓において多いことが確認された (第1図B)。複数回の実験で同様な結果が得られ、代表例を図1A, Bに示した。

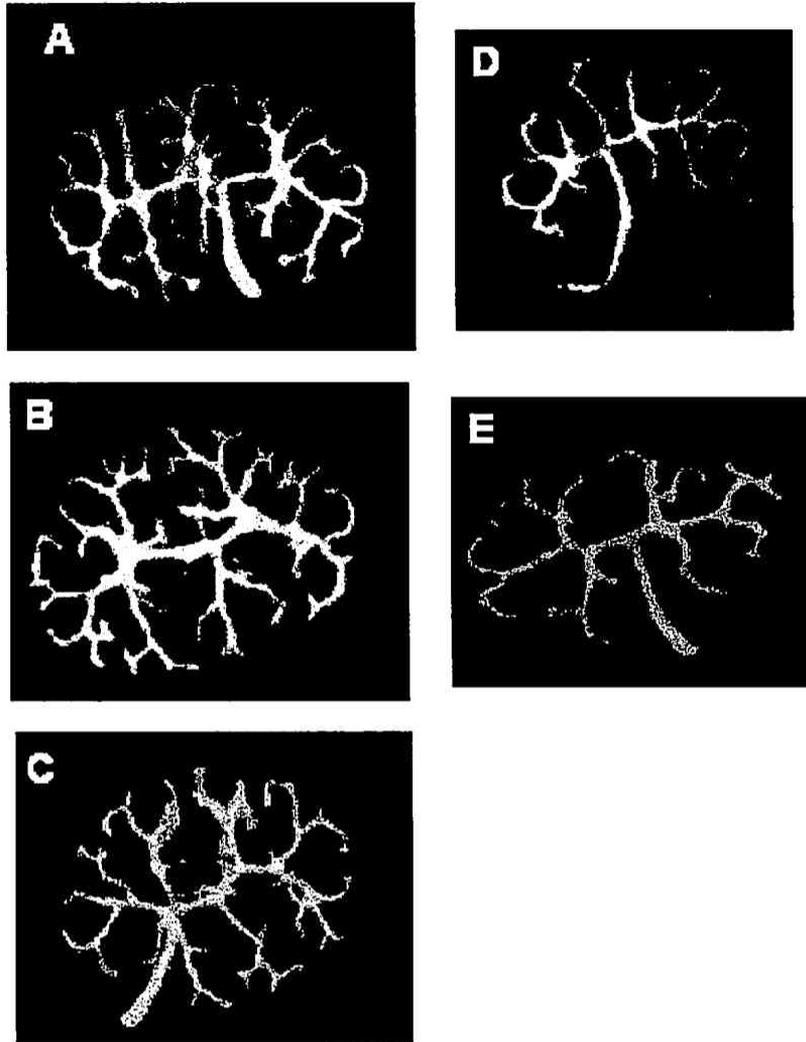
2 尿管芽の分岐、進展に対するカスパーゼ阻害剤の影響

種々のカスパーゼの阻害剤である Z-D-CH2DCB およびカスパーゼ3の阻害剤である Ac-DEVD-CHO を添加し、培養した後腎は尿管芽の分岐、進展が抑制されていることが確認された。この効果は72時間の培養中の初

期の24時間においてのみ添加した培養後腎においても同様に認められた (第2図A)。カスパーゼ8の阻害剤である Ac-LETD-CHO の添加およびカスパーゼ1の阻害剤である Ac-YVAD-CHO の添加は尿管芽の分岐、進展におよぼす影響は認められなかったが、カスパーゼ9の阻害剤である Ac-IETD-CHO の添加は、カスパーゼ3の阻害剤と同様に尿管芽の分岐、進展を抑制した (第2図B)。複数回の実験で同様な結果が得られ、代表例を図2A, Bに示した。



第2図A カスパーゼの阻害による尿管芽の分岐、進展への影響をケラチンの抗体を用いた免疫染色で確認した。カスパーゼの阻害剤である、Z-D-CH2DCBおよびカスパーゼ3の特異的阻害剤である Ac-DEVD-CHO はともに尿管芽の分岐、進展を抑制した。培養開始24時間のみに Z-D-CH2DCB を添加した後腎についても、同様の分岐、進展抑制効果が認められた。A, コントロール, B, Z-D-CH2DCB, C, Ac-DEVD-CHO, D, 培養開始24時間のみに Z-D-CH2DCB を添加したもの。(Araki T et al : Experimental Cell Research 248 : 423-429, 1999 の第4図を許可を得て転載)



第2図 B カスパーゼの阻害による尿管芽の分岐，進展への影響をケラチンの抗体を用いた免疫染色で確認した。カスパーゼ1の特異的阻害剤である，Ac-YVAD-CHOおよびカスパーゼ8の特異的阻害剤であるAc-IETD-CHOは尿管芽の分岐，進展を抑制しなかった。カスパーゼ3の特異的阻害剤であるAc-DEVD-CHO同様カスパーゼ9の特異的阻害剤であるAc-LETD-CHOも尿管芽の分岐，進展抑制効果が認められた。A, コントロール, B, Ac-YVAD-CHO, C, Ac-IETD-CHO, D, Ac-DEVD-CHO, E, Ac-LETD-CHO (Araki T et al : Nephron Experimental Nephrology 93 : e117-124, 2003 の第4図を許可を得て転載)

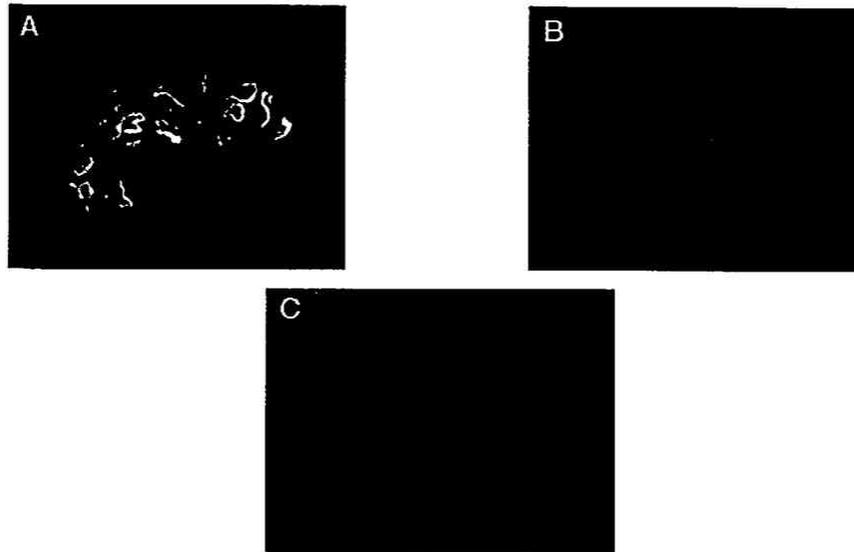
3 ネフロン様構造物の生成に対するカスパーゼ阻害剤の影響

種々のカスパーゼの阻害剤である Z-D-CH2DCB を添加し，培養した後腎は LTレクチンで検出されるネフロン様の構造物の生成が抑制されていることが確認された。この効果は 72 時間の培養中の初期の 24 時間においてのみ添加した培養後腎においても同様に認められた (第3図 A)。カスパーゼ8の阻害剤である Ac-LETD-CHO の添加およびカスパーゼ1の阻害剤である Ac-YVAD-CHO の添加はネフロン様の構造物の生成におよぼす影

響は認められなかったが，カスパーゼ9の阻害剤である Ac-IETD-CHO の添加は，カスパーゼ3の阻害剤と同様にネフロン様の構造物の生成を抑制した (第3図 B)。

4 培養後後腎の表面積に対するカスパーゼ阻害剤の影響

72 時間培養後，後腎の表面積の成長は，カスパーゼ3の阻害剤の添加により約 60% に有意に抑制されることが認められた。カスパーゼ9の阻害剤によっても抑制効果は認められた。この抑制効果はカスパーゼ1および



第3図 A カスパーゼの阻害によるネフロン様構造物の生成をレクチン染色で確認した。カスパーゼの阻害剤である、Z-D-CH2DCB はネフロン様構造物の生成を抑制した。培養開始 24 時間のみに Z-D-CH2DCB を添加した後腎についても、同様のネフロン様構造物の生成の抑制効果が認められた。A、コントロール、B、Z-D-CH2DCB、C、培養開始 24 時間のみに Z-D-CH2DCB を添加したもの。(Araki T et al: Experimental Cell Research 248: 423-429, 1999 の第 4 図を許可を得て転載)

カスパーゼ 8 の阻害剤の添加および、カスパーゼを阻害しないシステインプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチン (200mM) によっては認められなかった (第 4 図)。

5 カスパーゼ阻害剤を添加した培養後腎の細胞死及びカスパーゼ活性の抑制効果

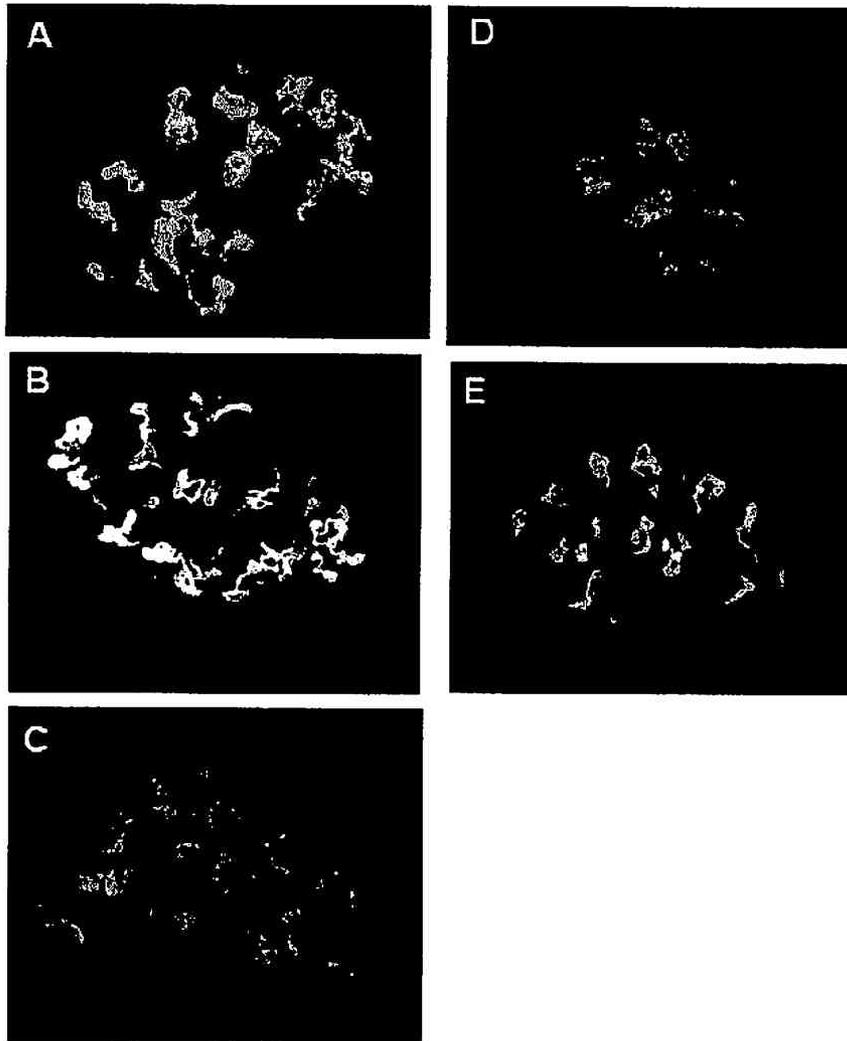
培養後腎における細胞死を TUNEL 法を用いて検討したところ、コントロールでは約 13% の細胞が TUNEL 陽性であったのに対し、Z-D-CH2DCB を添加した培養後腎では TUNEL 陽性細胞が約 3.3% と、細胞死が抑制されていることが確認された (第 5 図 A)。細胞死抑制効果はカスパーゼ 9 の阻害剤である Ac-IETD-CHO の添加によっても同様に認められた (第 5 図 B)。培養後腎のカスパーゼ活性を測定したところ、Z-D-CH2DCB を添加した培養後腎ではカスパーゼ活性が抑制されていることが確認された (第 5 図 C)。

6 カスパーゼ 9 の活性化細胞と Apaf-1 の発現

胎児腎の切片において、カスパーゼ 9 の活性化がおこっている細胞と、Apaf-1 の発現している細胞が同一細胞であることを、免疫染色法を用いて確認した (第 6 図)。

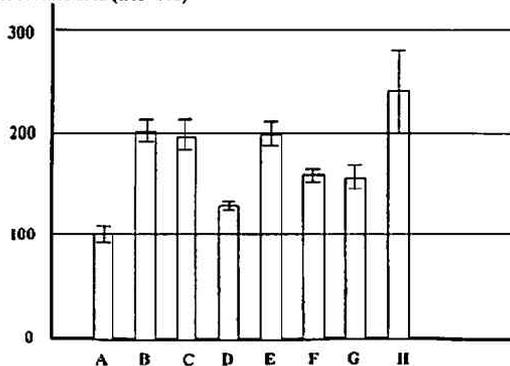
考 察

細胞死は、形態形成において、不要に作られすぎた細胞の除去に働いていることが推測されており、胎生期の種々の器官において、細胞死に陥っている細胞が検出されている⁶⁾。腎臓においても、胎児期の後腎において細胞死に陥っている細胞は認められており¹⁷⁾、細胞死がなんらかの作用を腎形態形成に対して行っていることは推測されていたが、その詳細は不明であった。本研究では、細胞死の実行に重要である細胞死実行遺伝子カスパーゼに注目し、その発現の確認、及び阻害剤の利用により、腎形態形成における細胞死の役割を考察した。カスパーゼはシステインプロテアーゼであり、現在までにカスパーゼ 1 からカスパーゼ 14 までが同定され、ファミリーを形成している (表 1)。また、線虫、ハエなどの下等生物においても、そのホモログが同定されている^{18) 21)}。カスパーゼはファミリー間でカスケードを作ることにより、上流のシグナルを下流に伝え、最終的にカスパーゼ 3 が活性化されることが種々の基質を切断することにより、細胞死の実行につながると考えられている (第 7 図)。カスパーゼ 3 の活性化を誘導する上流のカスパーゼとして、カスパーゼ 8 とカスパーゼ 9 が広く知られており、カスパーゼ 8 は TNF や Fas などの death receptor を



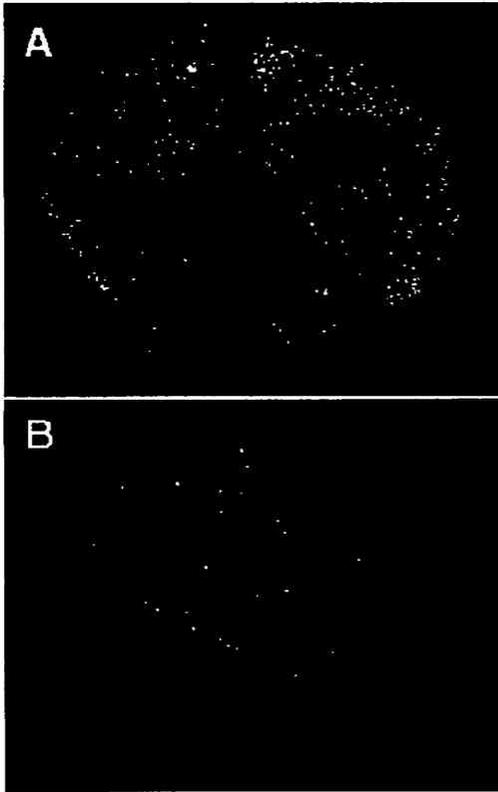
第3図 B カスパーゼの阻害によるネフロン様構造物の生成をレクチン染色で確認した。カスパーゼ1の特異的阻害剤である、Ac-YVAD-CHO およびカスパーゼ8の特異的阻害剤である Ac-IETD-CHO はネフロン様構造物の生成を抑制しなかった。カスパーゼ3の特異的阻害剤である Ac-DEVD-CHO 同様カスパーゼ9の特異的阻害剤である Ac-LETD-CHO もネフロン様構造物の生成抑制効果が認められた。A, コントロール, B, Ac-YVAD-CHO, C, Ac-IETD-CHO, D, Ac-DEVD-CHO, E, Ac-LETD-CHO (Araki T et al : Nephron Experimental Nephrology 93 : e117-124, 2003 の第2図を許可を得て転載)

metanephros surface area (E.12=100)

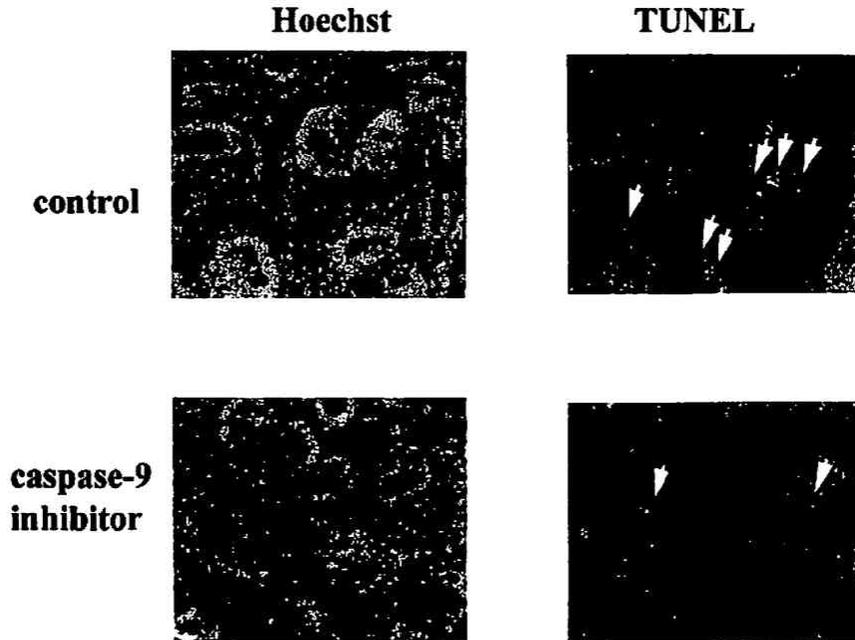


第4図

第4図 72時間培養後の後腎の表面積を比較した。培養開始時点である胎生12日目の後腎の面積を100として、比較した。カスパーゼ1の特異的阻害剤である、Ac-YVAD-CHO およびカスパーゼ8の特異的阻害剤である Ac-IETD-CHO はコントロールと同等の表面積を示した。カスパーゼ3の特異的阻害剤である Ac-DEVD-CHO およびカスパーゼ9の特異的阻害剤である Ac-LETD-CHO については、培養後腎の表面積はコントロールと比べ、その増大は抑えられていた。この効果はカスパーゼ阻害剤 Z-D-CH2DCB によっても認められた。カスパーゼを阻害しないプロテアーゼ阻害剤であるロイペプチンでは、増大抑制は認められなかった。A, 胎生12日目, B, コントロール, C, Ac-YVAD-CHO, D, Ac-DEVD-CHO, E, Ac-IETD-CHO, F, Ac-LETD-CHO, G, Z-D-CH2DCB, H, ロイペプチン

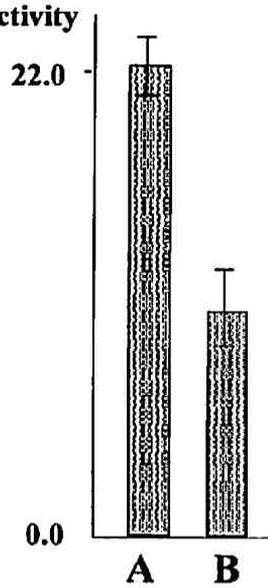


第5図A TUNEL法を用いて、カスパーゼ阻害剤を添加したときの培養後腎において細胞死が抑制されていることを確認した。カスパーゼ阻害剤Z-D-CH2DCBを添加した培養後腎ではTUNEL陽性細胞はコントロールに比べて少なく、細胞死が抑制されていると考えることができる。A, コントロール, B, Z-D-CH2DCB



第5図B TUNEL法を用いて、カスパーゼ-9特異的阻害剤を添加したときの培養後腎において細胞死が抑制されていることを確認した。カスパーゼ-9特異的阻害剤Ac-LETD-CHOを添加した培養後腎ではTUNEL陽性細胞(矢印で示す)はコントロールに比べて少なく、細胞死が抑制されていると考えることができる。(Araki T et al: Nephron Experimental Nephrology 93: e117-124, 2003の第6図を許可を得て転載)

caspase-3 like protease activity
(unit/mg protein)



第5図C カスパーゼ活性を測定し、培養後腎において、カスパーゼ阻害剤がカスパーゼ活性を抑制していることを確認した。カスパーゼ阻害剤Z-D-CH2DCBを添加して培養を行った後腎では、カスパーゼ活性がコントロールに比べて優位に抑制されていた。A、コントロール、B、Z-D-CH2DCB (Araki T et al: Experimental Cell Research 248: 423-429, 1999の第2図を許可を得て転載)

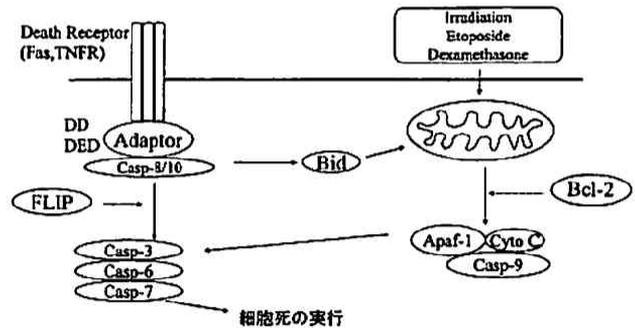


第6図 カスパーゼ9の活性化がおこなっている細胞を組織学的に検討した。活性化型カスパーゼ9をカスパーゼ9によって認識、切断されるペプチドを利用して作成した抗体を用いて検出し、同一切片において、Apaf-1の発現も確認した。活性化カスパーゼ9およびApaf-1は同一細胞に染色性を示し(矢頭で示す)。さらにこの細胞は未分化な間質の細胞であることが確認された。(Araki T et al: Nephron Experimental Nephrology 93: e117-124, 2003の第7図を許可を得て転載)

第1表

カスパーゼ名称	認識配列	主な役割
グループ1		
カスパーゼ-1	WEHD	サイトカインの成熟化
カスパーゼ-4	(W/L) EHD	強制発現による細胞死の誘導
カスパーゼ-5	(W/L) EHD	
カスパーゼ-11		
グループ2		
カスパーゼ-2	DEHD	細胞死の実行
カスパーゼ-3	DEVD	
カスパーゼ-7	DEVD	
カスパーゼ-14	DEVD	
グループ3		
カスパーゼ-6	VEHD	グループ2のカスパーゼの活性化
カスパーゼ-8	LETD	
カスパーゼ-9	LEHD	

現在までに報告されているカスパーゼの認識配列をまとめたものである。カスパーゼはその働きによって大きく3つのグループに分類される。一つ目は細胞死よりもサイトカインの成熟に関与するグループであり、二つ目は細胞死の実行を行う下流に位置すると考えられるグループであり、もう一つは細胞外の刺激を2番目のグループを活性化する中間に介在するグループである。それぞれ特異的な認識配列をもっており、この認識アミノ酸配列中のシステインの前で切断する酵素活性をカスパーゼは有している。



第7図 細胞死実行のメジャーカスケードを示す。カスパーゼ-3が細胞死を引き起こす最下流のカスパーゼと考えられており、細胞死刺激により、主にカスパーゼ-8が活性化される系と、主にカスパーゼ-9が活性化される系が存在する。カスパーゼ-9の活性化には、ミトコンドリアから放出されるチトクロームcと、細胞質中のタンパク質 Apaf-1 がカスパーゼ-9と複合体を形成することが重要であると考えられている。

介する細胞死において、それらの細胞膜レセプターと結合するタンパクにより活性化されることが知られており^{22) 24)}、カスパーゼ9は細胞外からの刺激によりミトコンドリアから放出されるシトクロームcとApaf-1というタンパクとの結合がその活性化に重要であることが知られている^{25) 27)}。Apaf-1とは、細胞死が不完全である線虫の変異体から発見されたCED-4の哺乳類ホモログであり、CED-4同様細胞死誘導能を有しており、哺乳類においても発生期の細胞死に関与している可能性が示唆されている^{28) 29)}。我々はカスパーゼ3、カスパーゼ8、カスパーゼ9をはじめとした、種々のカスパーゼが胎児期の後腎において発現していることを確認した。また、カスパーゼ3の免疫染色とTUNEL法による細胞死の検出を同一胎児腎切片に行うと、カスパーゼ3陽性細胞が細胞死に陥っていることが確認され、胎児腎の細胞死においても、カスパーゼがその実行を担っていることが推測された。

カスパーゼの阻害による形態形成の影響を、*in vitro*での腎形態形成の研究において有用性の高い器官培養という系を用いて検討したところ、種々のカスパーゼの阻害剤であるZ-D-CH2DCBは、カスパーゼの活性化を抑制し、細胞死を抑制した上で、尿管芽の分岐および進展を抑制し、その結果LTレクチンで認識される将来ネフロンへと分化していくと考えられる構造物の生成を抑制した。この現象は、種々の刺激、状況でおこる細胞死実行の最下流で働くと考えられているカスパーゼ3の特異的阻害剤であるAc-DEVD-CHOの器官培養への添加でも認められた。カスパーゼ3のアンチセンスオリゴヌクレオチドを器官培養に添加した実験においても、同様の尿管芽分岐、進展抑制効果は認められており、この効果はカスパーゼの阻害によるものであり、薬剤による副作用ではないと考えられた。さらに我々は、胎児期の後腎においてカスパーゼ3の上流で働いているカスパーゼを検討するためにカスパーゼ1、カスパーゼ8、カスパーゼ9の特異的阻害剤を同様に器官培養に添加して検討したところ、カスパーゼ1、カスパーゼ8の阻害剤では尿管芽分岐、進展抑制効果は見られず、カスパーゼ9の阻害剤によってのみ認められた。

培養後腎の表面積は、*in vitro*において分化が進むにつれ大きくなるが、尿管芽の分岐、進展抑制効果が見られるカスパーゼ3、カスパーゼ9の阻害剤の添加は、それぞれ培養後腎の表面積が、無添加群、ロイペプチン添加群などにくらべてその増大も抑制されることが確認された。

カスパーゼ9の活性化にはApaf-1と複合体を形成す

第2表

カスパーゼ	発生異常	細胞死との関連
カスパーゼ1	正常	
カスパーゼ2	正常	卵母細胞が薬剤誘導細胞死耐性
カスパーゼ3	生後死亡 (神経発生異常)	神経前駆細胞の細胞死不全
カスパーゼ6	正常	クロマチン凝集異常
カスパーゼ8	胎児期死亡 (心筋、血球系異常)	TNFR, Fasによる細胞死耐性
カスパーゼ9	生後死亡 (神経発生異常)	神経前駆細胞の細胞死不全
カスパーゼ11	正常	チュニカマイシン誘導細胞死耐性
カスパーゼ12	正常	アミロイドβタンパクに耐性

現在までに報告されているカスパーゼ変異体マウスの発生異常をまとめたものである。すべてのカスパーゼの変異マウスが胎生致死になるわけではないが、このことは、カスパーゼがファミリーを形成し、他のカスパーゼが補う形で働くために表現形が得られないと考えられている。また、腎臓の発生異常を示す変異マウスが報告されていないのは、神経系や血管、血球系に異常が生じるために、腎臓に影響が出る前に、非常に大きなダメージが胎児に与えられるためと考えられる。

ことが重要であることが知られていると前述したが、ウェスタンブロッティング法による検討で、Apaf-1の発現が成体の腎臓よりも胎児期の腎臓において多く認められることも、カスパーゼ9の系が、胎児期後腎において重要であることを推測させた。

そこで我々はカスパーゼ9の活性化を、その活性対象となるペプチドを利用して作成された抗体を利用して³⁰⁾、胎児の腎臓における活性部位を検討した。過去の報告により、胎児腎において細胞死は未分化の間質細胞において認められることが知られていたが、カスパーゼ9活性化細胞はやはり間質に認められ、さらにApaf-1との二重染色によって、カスパーゼ9活性化は、Apaf-1発現細胞において認められることが確認された。

現在までにカスパーゼファミリーの一部に関してはノックアウトマウスが作成され、表2に記した通り、発生期における臓器形成不全により胎生致死となるものも報告されている^{31) 39)}。腎臓の形成不全は報告されていないが、神経系の異常による死亡は胎生期の早い時期に見られることが多いために、腎臓の異常が認められる前に死亡している可能性が考えられる。

以上より、後腎の形態形成において、カスパーゼの活性化を通じた細胞死の実行は、おそらく間質の未分化な細胞を除去することにより、正常な尿管芽の分岐、進展

を制御しており、複数存在するカスパーゼの活性化機構の中、カスパーゼ9を上流カスパーゼとする系が重要であることが推測された。

本研究により、腎形態形成のメカニズムにおける、正常細胞数維持の機構が一部解明されたが、今後さらなる検討が進むことにより最終的に *in vitro* での腎再生が可能となれば、末期腎不全治療の選択肢が大きく広がることが期待される。

総 括

腎形態形成における細胞死の役割を、細胞死実行遺伝子産物カスパーゼを介して、後腎の器官培養を用いて検討し、以下の結果を得た。

- 1 細胞死実行遺伝子産物カスパーゼは胎児期後腎において発現している
- 2 カスパーゼの阻害剤の添加により、尿管芽の分岐、進展およびネフロン様構造物の生成が抑制された
- 3 形態形成に及ぼす影響はカスパーゼ3、カスパーゼ9の特異的阻害剤では認められたが、カスパーゼ1、カスパーゼ8の特異的阻害剤では認められなかった
- 4 カスパーゼ9の活性化は Apaf-1 陽性細胞において認められた

以上、腎形態形成において細胞死は、Apaf-1 の発現により、カスパーゼ9、カスパーゼ3の活性化を通じて、不要に生成されすぎた細胞を除去することにより働いていることと推測した。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室猿田享男教授に深甚なる謝意を表します。また、直接研究の御指導をいただきました慶應義塾大学医学部内科学教室林松彦助教授に深謝いたします。さらに、研究の御助言をいただきました慶應義塾大学生理学教室岡野栄之教授、東京大学大学院遺伝学教室三浦正幸教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, Haruta M, Takahashi M, Yoshikawa K, Nishikawa S, Nakatsuji N, Sasai Y : Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (3) : 1580-5, 2002
- 2) Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD : Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18 (6) : 675-9, 2000
- 3) Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, Episkopou V, Polak JM : Differentiation of osteoblasts and *in vitro* bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* 7 (1) : 89-99, 2001
- 4) Bagutti C, Wobus AM, Fassler R, Watt FM : Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes : comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells. *Dev Biol* 179 (1) : 184-96, 1996
- 5) Shi Y : Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9 (3) : 459-70, 2002
- 6) Jacobson MD, Weil M, Raff MC : Programmed cell death in animal development. *Cell* 88 (3) : 347-354, 1997
- 7) Meier P, Finch A, Evan G : Apoptosis in development. *Nature* 407 (6805) : 796-801, 2000
- 8) Coles HS, Burne JF, Raff MC : Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development* 118 (3) : 777-784, 1993
- 9) J. E. Sulston and H. R. Horvitz : Post-embryonic cell lineages of the nematode. *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56 : 110-156, 1977
- 10) Miura M, Yuan J : Mechanisms of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* and vertebrates. *Curr Top Dev Biol* 32 : 139-74, 1996
- 11) Weil M, Jacobson MD, Raff MC : Is programmed cell death required for neural tube closure? *Curr Biol* 7 (4) : 281-284, 1997
- 12) Ishizaki Y, Jacobson MD, Raff MC : A role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biol* 140 (1) : 153-8, 1998
- 13) J. A. Flaws, K. Kugu, A. M. Trbovich, A. DeSanti, K. I. Tilly, A. N. Hirshfield and J. L. Tilly : Interleukin-1b-converting enzyme-related proteases (IRPs) and mammalian cell death : Dissociation of IRP-induced oligonucleosomal endonuclease activity from morphological apoptosis in granulosa cells of the ovarian follicle. *Endocrinology* 136 : 5042-5053, 1995
- 14) S. Wang, M. Miura, Y. K. Jung, H. Zhu, V. Gagliardini, L. Shi, A. H. Greenberg and J. Yuan : Identification and characterization of Ich-3, a member of the interleukin-1b converting enzyme (ICE)/Ced-3 family and an upstream regulator of ICE. *J. Biol. Chem.* 271 : 20580-0587, 1996
- 15) Saxen L, Lehtonen E : Embryonic kidney in organ culture. *Differentiation* 36 (1) : 2-1, 1987
- 16) Perantoni AO, Dove LF, Williams CL : Induction of tubules in rat metanephrogenic mesenchyme in the absence of an inductive tissue. *Differentiation* 48 (1) : 25-31, 1991
- 17) Koseki C, Herzlinger D, al-Awqati Q : Apoptosis in metanephric development. *J Cell Biol* 119 (5) : 1327-33, 1992

- 18) Hengartner MO, Horvitz HR : Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 4 (4) : 581-586, 1994
- 19) Fraser AG, McCarthy NJ, Evan GI : drICE is an essential caspase required for apoptotic activity in *Drosophila* cells. *EMBO J* 16 (20) : 6192-6199, 1997
- 20) Hawkins CJ, Yoo SJ, Peterson EP, Wang SL, Vernoooy SY, Hay BA : The *Drosophila* caspase DRONC cleaves following glutamate or aspartate and is regulated by DIAP1, HID, and GRIM. *J Biol Chem* 275 (35) : 27084-27093, 2000
- 21) Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S : Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 380 : 723-726, 1996
- 22) Ashkenazi A, Dixit VM : Death receptors : signaling and modulation. *Science* 281 : 1305-1308, 1998
- 23) Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann J, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME : Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14(22) : 5579-5588, 1995
- 24) Weber CH, Vincenz C : A docking model of key components of the DISC complex : death domain superfamily interactions redefined. *FEBS Lett* 492 (3) : 171-176, 2001
- 25) Costantini P, Bruey JM, Castedo M, Metivier D, Loeffler M, Susin SA, Ravagnan L, Zamzami N, Garrido C, Kroemer G : Pre-processed caspase-9 contained in mitochondria participates in apoptosis. *Cell Death Differ* 9 (1) : 82-88, 2002
- 26) Tetz T, Wei T, Liu D, Valentine V, Valentine M, Grenet J, Lahti JM, Kidd VJ : Caspase-9 and Apaf-1 are expressed and functionally active in human neuroblastoma tumor cell lines with 1p36 LOH and amplified MYCN. *Oncogene* 21 (12) : 1848-1858, 2002
- 27) Zou H, Li Y, Liu X, Wang X : An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274 (17) : 11549-56, 1999
- 28) Cecconi F, Alvarez BG, Meyer BI, Roth KA, Gruss P : Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94 : 727-737, 1998
- 29) Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X : Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90 (3) : 405-13, 1997
- 30) Nakanishi K, Maruyama M, Shibata T, Morishima N : Identification of a caspase-9 substrate and detection of its cleavage in programmed cell death during mouse development. *J Biol Chem* 276 (44) : 41237-41244, 2001
- 31) Sadowski-Debbing K, Coy JF, Mier W, Hug H, Los M : Caspases-their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 50 (1) : 19-34, 2002
- 32) Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA : Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94 (3) : 325-37, 1998
- 33) Wang J, Lenardo MJ : Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Sci* 113 : 753-757, 2000
- 34) Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer B, Roth KA, Gruss P : Apaf-1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94 : 727-737, 1998
- 35) Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun L, Jurisicova A, Varmuz S, Latham KE, Flaws JA, Salter JCM, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tily JL, Yuan J : Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes & Dev* 12 : 1304-1314, 1998
- 36) Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, 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
- 37) Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtman H, Lonai P, Wallach D : Targeted disruption of the mouse caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9 : 267-276, 1998
- 38) Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW : Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways *in vivo*. *Cell* 94 : 339-352, 1998
- 39) Ruchaud S, Korfali N, Villa P, Kottke TJ, Dingwall C, Kaufmann SH, Earnshaw WC : Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *EMBO J* 21 (8) : 1967-77, 2002