

ニワトリ肢芽のプログラム細胞死におけるプロテアーゼの解析

福島 直美

高等動物の肢芽の形態形成過程において、プログラムされた細胞死 (Programmed Cell Death 以下 PCD) が起きることが知られているが、その分子機構については不明な点が多い。我々は器官培養法を用いて、指間組織の PCD に対する種々のプロテアーゼ阻害剤の影響を調べた。死細胞を染色するナイルブルー生体染色法により、カテプシン L の阻害剤が ナイルブルー陽性顆粒の集積を抑制することを認めた。そこで、カテプシン L が PCD に関与しているか否かの確認のため、DNA 断片化の検出を行った。カテプシン L 阻害剤によってナイルブルー陽性顆粒は減少したが、DNA ラダーの形成や TUNEL 陽性細胞の出現には影響がなかった。このことはカテプシン L の阻害剤は PCD を抑えているのではなく、マクロファージ様細胞への死細胞の取り込みを抑制していることを示唆している。次に、指間組織中の種々のプロテアーゼの活性を測定したところ、培養前と比べて確かにカテプシン L の活性は上昇していた。さらに活性化したカテプシン L の局在を調べたところ、貪食される前の死細胞とマクロファージ様細胞が貪食した死細胞に一致していた。このことから、活性化したカテプシン L は死細胞中に局在していることがわかった。このカテプシン L が死細胞内のタンパク質を分解し、その分解された物質が細胞表面に何らかのシグナルを送り、マクロファージ様細胞に認識され、貪食されたと考えられる。また、カスパーゼに関しては、個々の阻害剤によるナイルブルー陽性細胞抑制の効果が見られなかったが、カスパーゼ3/7の活性のみ10倍に上昇していた。このことから、細胞死のシグナル伝達経路の中にカテプシン L からカスパーゼ3/7にシグナルが送られている可能性があると考えられた。

(平成15年5月8日受理)

Protease Activity in Programmed Cell Death during Chick Limb Development

Naomi FUKUSHIMA

Programmed cell death (PCD) is an important process for eliminating unnecessary cells during embryonic development for proper morphogenesis at genetically determined stages. During embryonic limb development, mesenchymal cells in the interdigital regions, as well as in posterior or anterior necrotic zones, are known to die.

In this study, we examined the effects of protease inhibitors on PCD in the interdigital regions of chick limb buds to clarify the roles of proteases. Our data using the organ culture system and biochemical assays showed that inhibitors for cathepsin, especially cathepsin L, suppressed the

emergence of Nile blue-positive granules, while specific inhibitors for each caspase did not. Extensive studies using the TUNEL assay, conventional histological staining and nucleosomal ladder analysis revealed that inhibitors for cathepsin L did not suppress cell death of the interdigital tissue, but did attenuate phagocytosis of dead cells by macrophages. (Accepted on May 8, 2003)

Kawasaki Igakkaishi 29 (2) : 87-97, 2003

Key Words ① Programmed cell death ② Cathepsin L ③ Protease
④ Chick limb ⑤ Macrophage-like cell

はじめに

プログラム細胞死とは、1962年に Saunders¹⁾らによって提唱されたもので、彼らはニワトリ胚の移植実験から、肢芽の posterior necrotic zone (PNZ) の細胞集団は、細胞死を起こす1日以上前にすでに細胞死のプログラムを始動させていることを報告した。このプログラム細胞死は、いわゆるアポトーシスによる細胞死が惹起されている。形態学的には、細胞自体は縮小し、核内ではクロマチンが凝縮し、核が断片化する。そして細胞自体も断片化してアポトーシス小体が形成され、マクロファージ様細胞などの食細胞や隣接する細胞によって貪食され、除去される²⁾。

指の間の間充織細胞は決まったタイミングで選択的に死滅するため、水掻き部分が消失し、指が分離する。ニワトリ肢芽の指間プログラム細胞死は孵卵7日から始まり、7 $\frac{2}{3}$ 日にピークを迎え、その後減少していく³⁾。ニワトリはマウスに比べ指間のプログラム細胞死の同調性が高く、かつ肢芽そのものが大きいので、今回の研究に適している。

肢芽のプログラム細胞死におけるプロテアーゼ、とりわけカテプシンの関与について報告されたものは今までになく、高等動物であるニワトリを用い検討を行った。

実験方法

実験材料は白色レグホンの受精卵を用い、38℃で孵卵した。ニワトリの肢芽発生のステージ

の決定は、刀裨らの方法³⁾に従い、第3指の先端から蹠骨・趾骨関節までの距離を測定し求めた。

1) 器官培養法

6 $\frac{2}{3}$ 日目に受精卵から無菌的に胚を取り出し、実体顕微鏡下で後肢の4, 3指間組織を切除した。35 mm のプラスチックシャーレに MEM 培養液と器官培養用ステンレス製グリッド (池田理化製) を入れ、ニトロセルロース・フィルター (東洋濾紙, A 045, pore size 0.45 μ m, 厚さ145 μ m) を敷き、その上に指間組織を置いた。これを37℃, 5% CO₂の条件下で24時間培養した⁴⁾。プロテアーゼ阻害剤は、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、それぞれ100 μ M の濃度にて、培養液中に加えた。阻害剤は、Ac-YVAD-CHO (caspase 1 inhibitor), Ac-VDVAD-CHO (caspase 2 inhibitor), Ac-DEVD-CHO (caspase 3/7 inhibitor), Ac-IETD-CHO (caspase 8/6 inhibitor), Ac-ILTD-CHO (caspase 9 inhibitor), Z-VAD-FMK (pancaspase inhibitor), E-64-d (cathepsin B/L inhibitor, and calpain inhibitor), CA-074 (cathepsin B inhibitor)*, CLIK 148 (cathepsin L inhibitor)*, CLIK 60 (cathepsin S inhibitor)*, Pepstatin A (cathepsin D inhibitor), CHX (cycloheximide; 蛋白合成阻害剤), TLCK (N α -tosyl-L-lysine chloromethylketone; トリプシン阻害剤), TPCK (L-1-p-tosylamino-2-phenylethyl; キモトリプシン阻害剤) を使用し、ペプチド研究所から購入した。*を付した阻害剤は、徳島文理大学、勝沼信彦教授から恵与された。

2) 生体染色法

生体染色剤であるナイルブルーをリン酸緩衝

塩類溶液 (PBS) で0.01%に調製し、器官培養後の指間組織を浸して、37°Cで20分間インキュベートした³⁾⁴⁾。これをPBSで洗浄した後、実体顕微鏡 (×50倍) 下で観察し、ナイルブルー陽性顆粒をカウントした。

3) DNA抽出とアガロースゲル電気泳動法

DNAは核酸抽出キット (Sepa Gene[®], 三光純薬株式会社) を用いて、器官培養後の指間組織から抽出した。抽出したDNAはTillyら⁵⁾の方法で deoxynucleotidyl transferase 酵素を用い、3'末端を [α -³²P] dideoxy ATP (Amersham Pharmacia Biotech 社, 英国) で37°Cで1時間ラベルし、2%アガロースゲルで電気泳動を行い、オートラジオグラフィーを行った。

4) H-E (Hematoxyline-eosin) 染色法

器官培養後の指間組織をマイルドホルム10N (和光純薬工業株式会社) で固定後、パラフィン切片を作製し、H-E染色を行った。マクロファージ様細胞に取り込まれた死細胞の数を光学顕微鏡下でカウントした。死細胞は核が濃縮しており、正常細胞と区別することができた。

5) TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling) 法

刀祢らの方法^{6),7)}に従い、器官培養後の指間組織をマイルドホルム10Nで固定後、パラフィン切片を作製した。脱パラフィン後、PBSで洗浄し、proteinase K (20 μ g/ml) 処理を室温で15分間行った。これを蒸留水で洗浄後、アポトーシス検出キット (Apop Tag[®], INTERGEN 社, 米国) を使用してDNA断端に terminal deoxynucleotidyl transferase を用いて、ジゴキジゲニン標識のヌクレオチドを付加し、さらに抗ジゴキジゲニン抗体-Rhodamine 複合体を結合させ、赤色に蛍光発色させた。また、核はDNAをSYTO 13[®] (Molecular Probe 社, 米国) で染色し、緑色に蛍光発色させた。

6) 合成蛍光基質の切断によるカスパーゼ活性の測定

6 $\frac{2}{3}$ 日と7 $\frac{2}{3}$ 日の指間組織を用い、lysis buffer (50 mM KCl, 50 mM PIPES, pH 7.0, 10 mM EGTA, pH 7.0, 2 mM MgCl₂, 20 μ M cy-

tochalsin B, 1 \times CLAP, 1 mM PMSF, 10 mM DTT) 中で、ホモジナイズし、細胞抽出液を作った。カスパーゼの人工基質として、種々の caspase 基質タンパク質の caspase による切断端から上流の4アミノ酸からなるペプチドのC末端に、アミノメチルルクマリニン (AMC) を結合させた合成蛍光基質を用いる方法で測定した^{8),9)}。使用した合成基質は、Ac-YVAD-MCA (for caspase 1), Ac-VDVAD-MCA (for caspase 2), Ac-DEVD-MCA (for caspase 3/7), Ac-IETD-MCA (for caspase 8/6), Ac-ILTD-MCA (for caspase 9)であり、ペプチド研究所から購入した。基質溶液 (100 μ M の基質, 100 mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 1 \times CLAP, 1 mM PMSF) 198 μ l と細胞抽出液2 μ l を混合し、37°Cで30分間反応させた。反応停止溶液 (175 mM 酢酸, 1% 酢酸ナトリウム三水和物) 100 μ l で反応を停止後、遊離した AMC の蛍光強度 (励起波長400 nm, 蛍光波長505 nm)⁹⁾を蛍光分光光度計 (日立 F-3010) を用いて測定した。

7) 合成蛍光基質の切断によるカテプシン活性の測定

カスパーゼ活性と同様に AMC による蛍光強度で測定した。基質溶液 (50 μ M の基質, 5 mM システイン, 2.5 mM 2-メルカプトエタノール, 5 mM CaCl₂, 4% DMSO を含む60 mM イミダゾール-塩酸 buffer, pH 7.3) 180 μ l を37°Cで3分間プレインキュベーションし、細胞抽出液20 μ l を混合した後、37°Cで6分間反応させた。500 mM EDTA を含む100 mM モノクロロ酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.3) 100 μ l で反応を停止後、遊離した AMC の蛍光強度 (励起波長370 nm, 蛍光波長460 nm)¹⁰⁾を蛍光分光光度計 (日立 F-4000) を用いて測定した。使用した合成基質は、Z-Phe-Arg-MCA (for cathepsin B/L), Z-Arg-Arg-MCA (for cathepsin B), Z-Leu-Arg-MCA (for cathepsin S) であり、ペプチド研究所から購入した。

8) 活性化したカテプシンLの局在

Magic Red- (FR) 2 Cathepsin L Assay Kit[®]

(B-Bridge International 社, 英国) を用いて, 7 $\frac{2}{3}$ 日の指間組織における活性化したカテプシンLの局在を赤色蛍光発色にて検出した. 指間組織は染色後スライドガラスとカバーガラスにはさみ, 拇指で圧閉し検鏡した.

9) 統計学的検討

得られた値は平均と標準偏差で示し, 統計的有意差の検討はt検定により行った.

実験結果

1) 指間組織器官培養法におけるプロテアーゼ阻害剤の効果

7 $\frac{2}{3}$ 日のニワトリ胚後肢のナイルブルー染色を **Figure 1** に示す. 指間組織のナイルブルー陽性顆粒は死細胞の存在を示している. 6 $\frac{2}{3}$ 日

目の指間組織を24時間器官培養したところ, カテプシンL阻害剤 (CLIK 148) の添加でナイルブルー陽性顆粒は減少した (**Fig. 2**). E-64-d (カテプシン B/L 阻害剤) と CLIK 148 はナイルブルー陽性顆粒数を60-70%抑制した (**Fig. 3A**). 一方, カスパーゼ阻害剤の Z-VAD-FMK ではナイルブルー陽性顆粒数は30%抑制されたが, その他のカスパーゼ阻害剤では抑制されなかった (**Fig. 3B**). また CLIK 148 と CLIK 60 (カテプシン S/L 阻害剤) は濃度依存的に阻害効果を示した (**Fig. 4**). CLIK 148 は10 μ M でカテプシンLを抑制し, 一方 CLIK 60は10 μ M では主としてカテプシンSを抑制するが高濃度ではSとLの両方を阻害すると報告されている¹⁰⁾.

2) DNA 解析

指間組織器官培養法におけるプロテアーゼ阻害剤の効果の高かったカテプシンLの阻害剤を作用させた後に, DNAを抽出し, アガロースゲル電気泳動を行い, ラダー形成があるかどうかを確認した. CLIK 148存在下で器官培養するとナイルブルー陽性顆粒が減るにもかかわらず, DNAのラダー形成はコントロールと同程度に

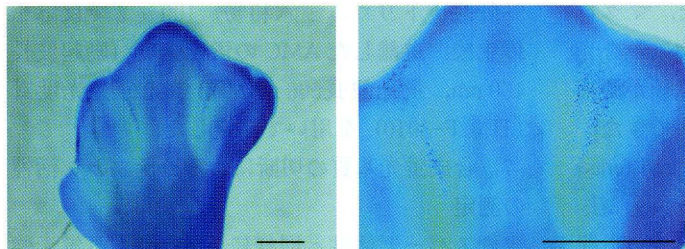


Fig. 1. Vital staining of chick leg buds with Nile blue with no protease inhibitor. Interdigital granules stained with Nile blue dye represent macrophage-like cells ingesting dead mesenchymal cells. Bars represent 1 mm.

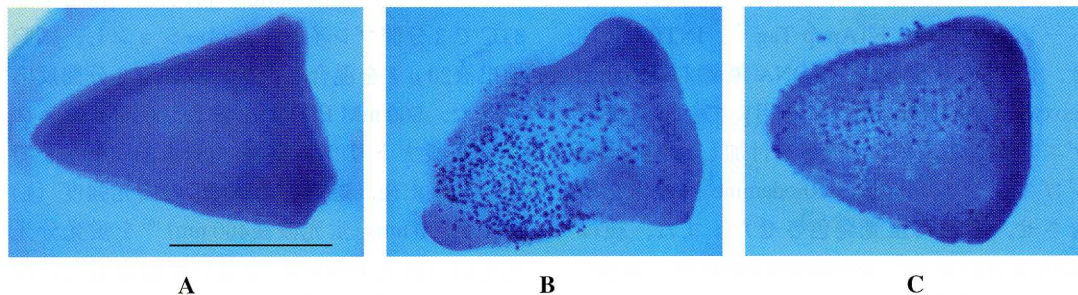


Fig. 2. Organ culture of interdigital tissues

Methods were described in the text.

A: Nile blue stained interdigital tissue before culture dissected at day 6 $\frac{2}{3}$. Bar represents 1 mm. No granules were detected.

B: Cultured for 24 hr in basal medium. Granules stained with Nile blue represent macrophage-like cells ingested dead interdigital cells.

C: Cultured in medium containing 100 μ M cathepsin L inhibitor (CLIK 148). Cathepsin L inhibitor decreased the number of granules.

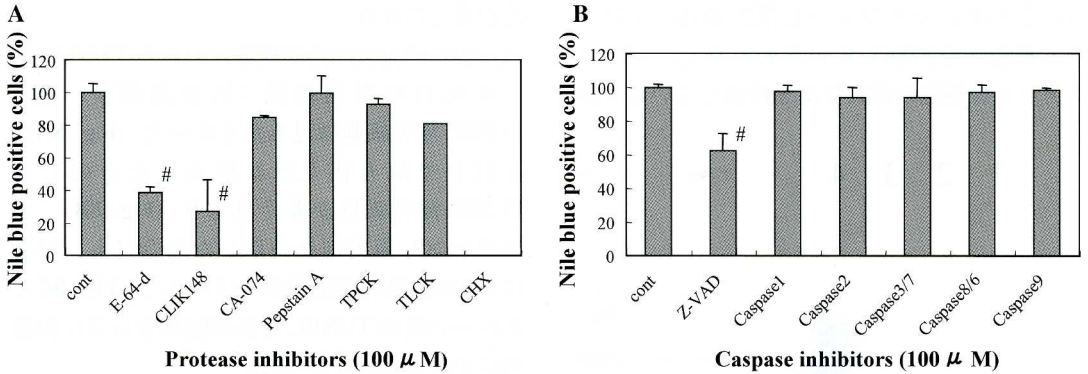


Fig. 3. Effects of protease inhibitors for Nile blue positive granule formation in the cultured interdigital tissue

A : Effects of protease inhibitors on interdigital cell death

100% represents the number of Nile blue positive granules detected in control culture.

E-64-d (cathepsin B/L inhibitor) and CLIK 148 (cathepsin L inhibitor) decreased the number of Nile blue positive granules. CHX completely inhibited the emergence of Nile blue positive granules. The other inhibitors showed no significant effect.

Bar and error bars represent mean ± SD from five independent experiments.

; Significantly different from the control values (P<0.001) Cont ; control (Interdigital tissue was dissected at 6 2/3 days and cultured for 24 hr without protease inhibitor.)

B : Effects of caspase inhibitors on interdigital cell death

100% represents the number of Nile blue positive granules detected in control culture. Methods were described in the text.

Only Z-VAD (pan-caspases inhibitor) decreased the number of Nile blue positive granules. The other caspase inhibitors showed no effect.

Bar and error bars represent mean ± SD from five independent experiments.

; Significantly different from the control values (P<0.001) Cont ; control (Interdigital tissue was dissected at 6 2/3 days and cultured for 24 hr without protease inhibitor.), Casp ; caspase

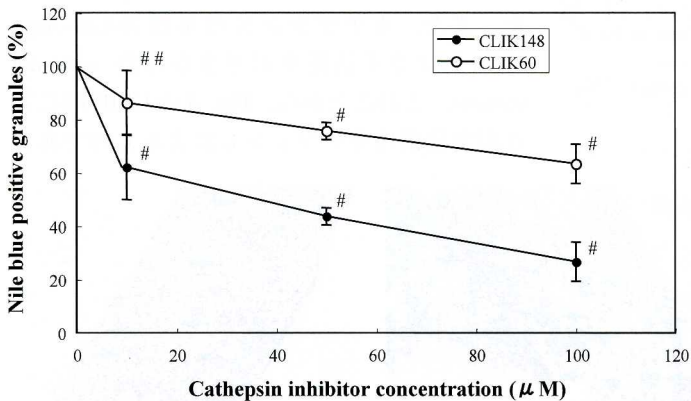


Fig. 4. Effects of CLIK 148 and CLIK 60 for Nile blue positive granules at various concentration

Interdigital tissues were cultured in the presence of CLIK 148 or CLIK 60 for 24 hr and stained with Nile blue as described in the legend of Fig. 3.

100% represents the number of Nile blue positive granules detected in control culture without inhibitors.

Bar and error bars represent mean ± SD from five independent experiments.

; Significantly different from the control values (P<0.001)

; Significantly different from the control values (P<0.01)

おこっていた。このことから CLIK 148存在下でも指間細胞のアポトーシスは起こっているものと考えられた (Fig. 5)。

3) 器官培養後の指間組織における H-E (Hematoxyline-eosin) 染色法による組織像

6 2/3日は、まだ死細胞は見られなかった (Fig. 6A)。7 2/3日では、死細胞が多く見られ、プログラム細胞死が起こっていることを示している (Fig. 6B)。また、一つのマクロファージ様細胞に取り込まれた死細胞は平均16個であった (Fig. 7)。しかし、カテプシンLの阻害剤を作用させた場合は、一つのマクロファージ様細胞に取り込まれた死細胞の数は平均12個と減少していた (Fig. 6C, 7)。こ

のことから、カテプシンL阻害剤は、プログラム細胞死を抑制しているのではなく、マクロファージ様細胞の貪食作用を抑制している可能

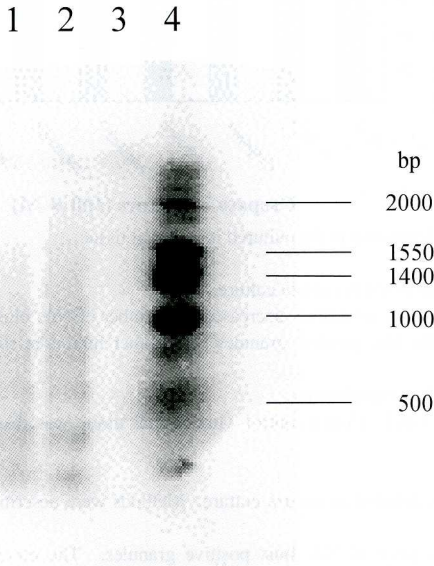


Fig. 5. DNA ladder analysis

Interdigital tissue was dissected at 6 2/3 days and cultured for 24 hr in the presence or absence of cathepsin L inhibitor.

lane 1; Interdigital tissue after organ culture in the medium containing 100 μ M cathepsin L inhibitor (CLIK 148). DNA ladders were detected.

lane 2; Interdigital tissue after organ culture in basal medium. DNA ladders were detected.

lane 3; interdigital tissues before organ culture. No DNA ladders were detected.

lane 4; molecular marker

性が考えられる。

4) 器官培養後の指間組織における TUNEL 法 6 2/3 日の指間組織 (培養開始前) は、TUNEL 陽性細胞は見られなかった (Fig. 8A)。6 2/3 日に取り出し 24 h 培養したものでは TUNEL 陽性細胞が多く見られ (Fig. 8B)、カテプシン L 阻害剤を使用した場合にも、同様に TUNEL 陽性細胞が多く見られた (Fig. 8C)。これらの間の TUNEL 陽性細胞数ならびに形態的に差は見られなかった。

5) 6 2/3 日目と 7 2/3 日目の指間組織でのプロテアーゼ活性測定

指間組織におけるカテプシン活性の測定

カテプシン B と L の両方の基質となる Z-Phe-Arg-MCA を用いると、7 2/3 日目にはカテプシン B/L 活性は培養前と比べて 4.5 倍上昇していた。一方カテプシン B に特異的な基質 Z-Arg-Arg-MCA を用いるとカテプシン B の活性の上昇は全く認められなかった (Fig. 9A)。従って、カテプシン B/L 活性の活性上昇はカテプシン L によるものであることが判明した。カテプシン L は 6 2/3 日から 7 2/3 日の間に急激に活性化されることを示し、この活性化と指間細胞死との間に強い関連性があることが示唆された。また、カテプシン S の基質 Z-Leu-Arg-MCA には全く活性を示さなかった (data not shown)。このことから、Fig. 4 の CLIK 60 による阻害効果はカテプシン L によるものである

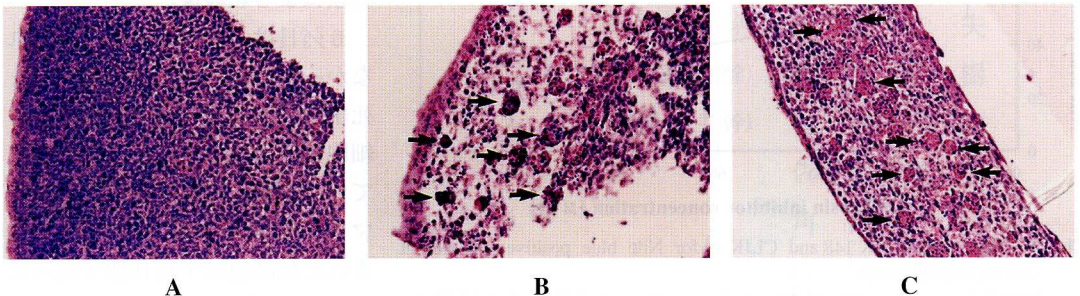


Fig. 6. Histological examination (Hematoxylin-Eosin staining)

Interdigital tissue preparation was same as Fig. 5.

A: Interdigital tissue before organ culture. ($\times 400$)

B: Interdigital tissue after organ culture in basal medium. ($\times 400$)

C: Interdigital tissue after organ culture in the medium containing 100 μ M cathepsin L inhibitor (CLIK 148). ($\times 400$)
Macrophage-like cells (arrows) ingested several dead cells (B and C).

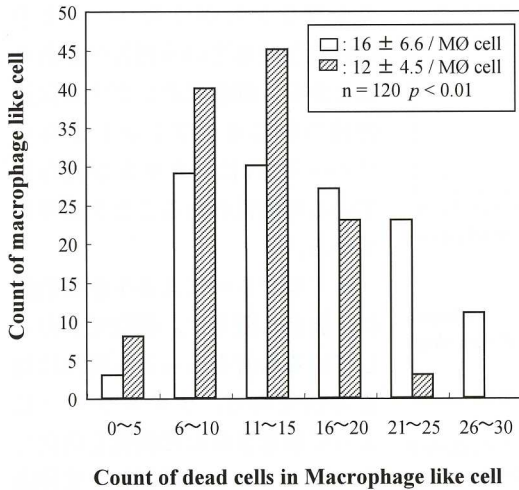


Fig. 7. Count of dead cells in Macrophage-like cells
Number of dead cells per macrophage-like cell was counted under H-E staining at 24 hr culture tissue in the presence (hatch column) or absence (open column) of $100 \mu\text{M}$ CLIK 148. The horizontal axis represents the number of dead cells numbers per macrophage-like cell. The vertical axis represents the count of the macrophage-like cells. The average \pm SD of the number of ingested cells per macrophage-like cell was inserted. MØcell; macrophage-like cell

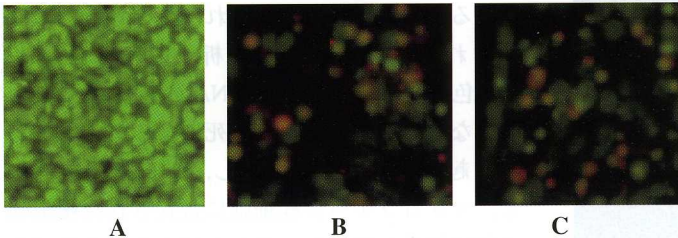


Fig. 8. TUNEL and SYTO 13 staining of interdigital culture with or without CLIK 148 ($100 \mu\text{M}$)
Red fluorescence (TUNEL) and green fluorescence (DNA) were merged. The culture conditions were same as **Fig. 5**.
A: Interdigital tissue before organ culture. TUNEL was negative. DNA was stained by green fluorescence. (SYTO 13). ($\times 400$)
B: Interdigital tissue (day 6 $\frac{3}{4}$) after organ culture for 24 hr in basal medium. Red cells were TUNEL positive cells (Rhodamine). ($\times 400$)
C: Cultured in medium containing $100 \mu\text{M}$ cathepsin L inhibitor (CLIK 148). The number of TUNEL positive cells were not significantly reduced, comparing to **Fig. 8B**. ($\times 400$)

と考えられる。

指間組織におけるカスパーゼの活性測定

カスパーゼ3/7の基質である Ac-DEVD-MCA を用いた時だけ、カスパーゼ3/7は10倍上昇していたが他のカスパーゼ基質では全く活

性を示さなかった (**Fig. 9B**)。このことはカスパーゼ3あるいは7が指間細胞死に関与していることを強く示唆する。

6) 活性化したカテプシン L の局在

カテプシン L がマクロファージ様細胞と死細胞のどちらで活性化されているのか調べるために Magic Red- (FR) 2 Cathepsin L Assay Kit [®] を用いて生体活性染色を行った (**Fig. 10**)。7 $\frac{3}{4}$ 日目の指間生細胞における活性化したカテプシン L は単独の死細胞とマクロファージ様細胞に貪食された死細胞の両方に認められた。このことからカテプシン L は死細胞内で活性化されている事が考えられる。

考 察

ナイルブルー陽性顆粒数は、汎カスパーゼ阻害剤の Z-VAD-FMK では30%に抑制されたが、個々のカスパーゼ阻害剤では全く抑制されなかった。このことは今回検討した以外のカスパーゼに対する阻害を見ているのか、それともカスパーゼ以外のプロテアーゼ阻害による効果を見ているのかのいずれかと考えられる。また、カテプシン L の阻害剤である、E-64-d と CLIK 148 はナイルブルー陽性顆粒出現を60~70%に抑制した。ここで、Z-VAD-FMK はカスパーゼのみならず、カテプシンをも阻害すると報告¹²⁾されていることを考えあわせると、今回の結果は、Z-VAD-FMK がカスパーゼではなく、カテプシン L を阻害したのではないかと考えられる。また、カスパーゼの活性に関しては、カスパーゼ3/7

のみ10倍に上昇していたが、その阻害剤によるナイルブルー陽性顆粒減少効果は見られなかった。これと同じような報告を Yazawa ら¹³⁾も行っている。一見矛盾しているようだが、これはカテプシン L がナイルブルー陽性顆粒形成には

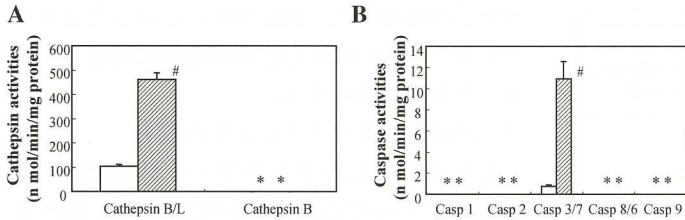


Fig. 9. Protease activities at day 6 $\frac{2}{3}$ (open column) and 7 $\frac{2}{3}$ (hatched column) interdigital tissue

Reaction conditions were described in the text.

A: Cathepsin L activity increased by 4.5-fold at day 7 $\frac{2}{3}$. Cathepsin substrates were Z-Phe-Arg-MCA, Z-Arg-Arg-MCA, and Z-Leu-Arg-MCA for cathepsin B/L, B and S, respectively.

Bar and error bars represent mean \pm SD from five independent experiments.

; Significantly different from the control values of 6 $\frac{2}{3}$ days ($P < 0.001$). An asterisk means that there was no detectable activity.

B: Caspase activities.

Only Caspase 3/7 activity increased by 10-fold at 7 $\frac{2}{3}$ days. Other caspase activities were not detected. Caspase substrates were Ac-YVAD-MCA, Ac-VDVAD-MCA, Ac-DEVD-MCA, Ac-IETD-MCA, and Ac-ILTD-MCA for caspase 1, 2, 3/7, 8/6, 9, respectively.

Bar and error bars represent mean \pm SD from five independent experiments.

; Significantly different from the control values of 6 $\frac{2}{3}$ days ($P < 0.001$). An asterisk means that there was no detectable activity present.

Casp ; caspase

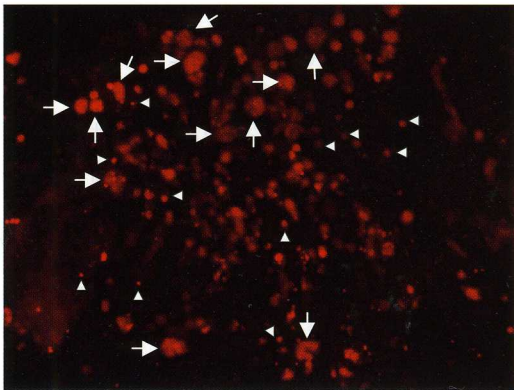


Fig. 10. Cathepsin L activity was detected using Magic Red - (FR) 2 Cathepsin L Assay Kit[®]

Interdigital tissue (day 7 $\frac{2}{3}$) was stained for cathepsin L. Cathepsin L activity was detected in the dead cells (arrowheads) and dead cells within phagocytotic macrophage-like cell (arrows). ($\times 400$)

Gathered red granules represent dead cells ingested by macrophage-like cell. Isolated red granules represent dead cells not ingested by macrophage-like cell.

関与するが、カスパーゼ3/7の関与する細胞死のイベントとは別の局面を担っている事を強く示唆している。また、in vitroの実験であるが、

カテプシンLがカスパーゼ3を活性化させるという報告¹⁴⁾があることから、細胞死のシグナル伝達経路の中にカテプシンLからカスパーゼ3/7にシグナルが送られている可能性のあることを示唆している。

ナイルブルーによる生体染色法は、肢芽に限らず、細胞死をおこしている場所をもっとも簡便に知る方法である。ナイルブルーによって染色された死細胞を貪食したマクロファージ様細胞を実体顕微鏡下で青い顆粒として観察できる。さらに刀襴らは、その生体染色したものを連続切片にし、H-E染色法を用いて実際の死細胞数を数えて生体染色での青い顆粒数と比較しており、両者は極めて高い相関性を示したと報告⁷⁾している。

しかしながら今回の実験では、ナイルブルーによる生体染色法で染色される青い顆粒数は抑えられていても、DNA解析、TUNEL法、H-E染色で確認を行うと、DNAの断片化や核の凝縮などのプログラム細胞死によるアポトーシスは起こっていた。ただし、H-E染色を見ると、マクロファージ様細胞に貪食された死細胞の数は減少していた。これらにより、カテプシンL阻害剤はプログラム細胞死を抑制しているのではなく、マクロファージ様細胞の貪食作用を抑制している可能性が示唆された。

カテプシンLは、リソソーム内のタンパク分解酵素であり、細胞分布は広く、分解活性が強い¹⁵⁾。今までにカテプシンLに関する報告は、喫煙ラットの肺胞マクロファージでカテプシンLが増加する^{16), 17)}、骨粗鬆症における骨吸収を行う酵素が破骨細胞由来のカテプシンLである¹⁸⁾、イモリのプロラクチンによる精巢のアポトーシスにはカテプシンLが関与している¹⁹⁾、などがある。また最近、カテプシンL欠損マウスの解析により、マクロファージ様

細胞内のカテプシン L は、分解した蛋白を抗原ペプチドとし、主要組織適合抗原 II 型 (MHC クラス II) 分子の溝にはいり、細胞表面に抗原提示することが報告^{20), 21), 22)}された。本研究でのプログラム細胞死における指間の細胞中の活性化したカテプシン L の局在については、死細胞に一致して、またマクロファージ様細胞内の貪食された死細胞に一致して認められた (Fig. 10)。更に、細胞死が起こった時期と期を同じくして、指間のカテプシン L 酵素活性の上昇が検出された (Fig. 9)。死細胞中のカテプシン L の局在は死細胞内のタンパク質を分解するためであり、その分解された物質が細胞表面に何らかのシグナルを送り、マクロファージ様細胞に貪食されたと考えられる。そのため、マクロファージ様細胞の中の死細胞に一致してカテプシン L の局在が認められたと思われる。貪食細胞がアポトーシスを起こした細胞の細胞表面層の変化を認識するマーカーの一つとして、フォスファチジルセリンが報告^{23)~25)}されている。これは、アポトーシスにより脂質二重層の内側に配向しているフォスファチジルセリンが外側に露出する現象であり、これをマクロファージが認識して貪食すると考えられている。現在のところ、カテプシン L とフォスファチジルセリンの関係は不明であり、今後検討する必要があると思われる。

カテプシンに関するその他の報告として、Schotte ら²⁶⁾はカテプシン B はカスパーゼ 11 によって活性化されることを見出し、Salvesen ら²⁷⁾はカテプシン B が TNF (tumor necrosis factor) によるアポトーシスに必要であり、カテプシン B のファミリー分子が Bid を切断することにより活性化することを明らかにした。また Moallem ら²⁸⁾は、サイクロフォスマイ

ドによるマウス肢芽のアポトーシスにはカテプシン D が関与していると報告している。さらに、Shibata ら²⁹⁾は PC-12 細胞で血清除去によりアポトーシスを起こさせた場合、カテプシン D の過剰発現で促進され、カテプシン B の過剰発現で抑制されることを見出した。このように最近ではアポトーシスにはカスパーゼのみならず、カテプシンも注目されている。しかし、リソソームがどのようにアポトーシスシグナルを感知しているのか、その分子機構は現在のところほとんど不明であり、今回の研究がその手がかりの一つになるのではないかと考えている。

結 語

本研究では、ニワトリの肢芽のプログラム細胞死における、カテプシンやカスパーゼ等のプロテアーゼの関与について検討した。結果として、カテプシン L が死細胞において活性化され、その細胞表面にシグナルを出し、マクロファージ様細胞に貪食させることが強く示唆された。また、カスパーゼに関しては、カスパーゼ 3/7 のみの活性が認められ、細胞死のシグナル伝達にカテプシン L からカスパーゼ 3/7 へシグナルが送られている可能性を示唆した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇切なご指導とご校閲を賜りました川崎医科大学生化学教室 湊川洋介教授、刀祢重信助教授に深く感謝致します。

なお、本研究の一部は日本私学振興財団私立大学等経常費補助金特別補助 (大学院重点特別経費・学生分、2000年度) の補助によって行われた。

本論文の要旨は、第25回日本分子生物学会 (2002年12月横浜) で発表した。

文 献

- 1) Saunders JW, Gasseling MT: Cellular death in morphogenesis of the avian wing. *Dev Biol* 5: 147-178, 1962
- 2) Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME: Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254: 439-459, 1998

- 3) Tone S, Tanaka S, Kato Y : The inhibitory effect of 5-bromodeoxyuridine on the programmed cell death in the chick limb. *Dev Growth Differ* 25 : 381 - 391, 1983
- 4) 辻本賀英, 刀祢重信, 山田 武 : 「アポトーシス実験法」. 第1版. 東京, 羊土社. 1995, pp 124 - 129
- 5) Tilly JL, Hsueh AJ : Microscale autoradiographic method for the qualitative and quantitative analysis of apoptotic DNA fragmentation. *J Cell Physiol* 154 : 519 - 526, 1993
- 6) Tone S, Tanaka S, Minatogawa Y, Kido R : DNA fragmentation during the programmed cell death in the chick limb buds. *Exp Cell Res* 215 : 234 - 236, 1994
- 7) Tone S, Tanaka S : Analysis of relationship between programmed cell death and cell cycle in limb-bud. *Horm Res (Suppl)* 3 : 5 - 10, 1997
- 8) Yamashita K, Takahashi A, Kobayashi S, Hirata H, Mesner PW Jr, Kaufmann SH, Yonehara S, Yamamoto K, Uchiyama T, Sasada M : Caspases mediate tumor necrosis factor- α -induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood* 93 : 674 - 685, 1999
- 9) Machida K, Tsukiyama-Kohara K, Seike E, Tone S, Shibasaki F, Shimizu M, Takahashi H, Hayashi Y, Funata N, Taya C, Yonekawa H, Kohara M : Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins. *J Biol Chem* 276 : 12140 - 12146, 2001
- 10) Barrett AJ, Kirschke H : Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* 80 : 535 - 561, 1981
- 11) Katunuma N, Murata E, Kakegawa H, Matsui A, Tsuzuki H, Tsuge H, Turk D, Turk V, Fukushima M, Tada Y, Asao T : Structure based development of novel specific inhibitors for cathepsin L and cathepsin S in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 458 : 6 - 10, 1999
- 12) Schotte P, Declercq W, Van Huffel S, Vandenabeele P, Beyaert R : Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett* 442 : 117 - 121, 1999
- 13) Yazawa T, Fujimoto K, Yamamoto T, Abe SI : Caspase activity in newt spermatogonial apoptosis induced by prolactin and cycloheximide. *Mol Reprod Dev* 59 : 209 - 214, 2001
- 14) Ishisaka R, Utsumi T, Kanno T, Arita K, Katunuma N, Akiyama J, Utsumi K : Participation of a cathepsin L-type protease in the activation of caspase-3. *Cell Struct Funct* 24 : 465 - 470, 1999
- 15) 勝沼信彦 : 「細胞内タンパク質分解」. 第1版. 東京, 東京化学同人. 1992, pp 35 - 66
- 16) Lesser M, Galicki N, Cardozo C, Gariola CG : Cathepsin L activity in alveolar macrophages of rats : response to cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1 : 371 - 376, 1989
- 17) Takahashi H, Ishidoh K, Muno D, Ohwada A, Nukiwa T, Kominami E, Kira S : Cathepsin L activity is increased in alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid of smokers. *Am Rev Respir Dis* 147 : 1562 - 1568, 1993
- 18) Kakegawa H, Nikawa T, Tagami K, Kamioka H, Sumitani K, Kawata T, Drobnic-Kosorok M, Lenarcic B, Turk V, Katunuma N : Participation of cathepsin L on bone resorption. *FEBS Lett* 321 : 247 - 250, 1993
- 19) Fujimoto K, Yamamoto T, Kitano T, Abe S : Promotion of cathepsin L activity in newt spermatogonial apoptosis induced by prolactin. *FEBS Lett* 521 : 43 - 46, 2002
- 20) Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, Villadangos JA, Ploegh H, Peters C, Rudensky AY : Cathepsin L : critical role in Ii degradation and CD 4 T cell selection in the thymus. *Science* 280 : 450 - 453, 1998
- 21) Nakagawa TY, Rudensky AY : The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 172 : 121 - 129, 1999
- 22) Hsieh CS, deRoos P, Honey K, Beers C, Rudensky AY : A role for cathepsin L and cathepsin S in peptide generation for MHC class II presentation. *J Immunol* 168 : 2618 - 2625, 2002
- 23) Savill J : Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* 53 : 491 - 508, 1997
- 24) Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM : A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405 : 85 - 90, 2000
- 25) Green DR, Beere HM : Apoptosis. Gone but not forgotten. *Nature* 405 : 28 - 29, 2000
- 26) Schotte P, Van Crielinge W, Van de Craen M, Van Loo G, Desmedt M, Grooten J, Cornelissen M, De Ridder L,

- Vandekerckhove J, Fiers W, Vandenabeele P, Beyaert R : Cathepsin B-mediated activation of the proinflammatory caspase-11. *Biochem Biophys Res Commun* 251 : 379-387, 1998
- 27) Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V, Salvesen GS : Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* 276 : 3149-3157, 2001
- 28) Moallem SA, Hales BF : Induction of apoptosis and cathepsin D in limbs exposed in vitro to an activated analog of cyclophosphamide. *Teratology* 52 : 3-14, 1995
- 29) 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 PC 12 cells following serum deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 251 : 199-203, 1998