

## マウス内耳発生におけるプログラム細胞死の検討

柴田 大

川崎医科大学 耳鼻咽喉科学, 〒701-0192 倉敷市松島577

**抄録** プログラム細胞死の研究は以前から行われているが, その制御メカニズムは未だ不明な点が多い。これに対し我々は apoptosis 検出法である TUNEL 染色で, 胎生12日マウス内耳において TUNEL 陽性死細胞には apoptosis だけでなく, autophagic cell death も存在することを報告した。また我々は内耳毒性を有する CDDP を妊娠マウスに投与し, 胎仔内耳の総死細胞数は不変であるのに対して, 死細胞における apoptosis 比率減少と autophagic cell death 比率増加を発見し, これらが胎生期内耳の防御機構と考えた。本研究ではこの機構解明を目的に, CDDP 投与胎生12日マウスの内耳を用いて, 関連遺伝子の Real time-PCR 法, Western Blot 法, 免疫染色法による検討を行った。

Real time-PCR では, CDDP 投与で autophagy 関連遺伝子 beclin1 と, apoptosis 関連遺伝子 cspase3 の発現が増加した。免疫染色では apoptosis 細胞のみ cleaved caspase3 蛋白発現を認め, Western Blot では CDDP 投与で beclin1 と cspase3 の蛋白発現が増加し, cleaved caspase3 は逆に減少した。

この beclin1 遺伝子発現増加は, 以前に我々が報告した CDDP での autophagic cell death 比率増加に矛盾しないものであった。これに対し, apoptosis 関連遺伝子の caspase3 発現増加は, apoptosis 比率減少と矛盾するが, 免疫染色, Western blot の結果からは蛋白レベルでの抑制が示唆される。特に caspase3 蛋白増加に対し, 切断後の活性型蛋白である cleaved caspase3 が逆に減少していることから, caspase3 切断による活性化プロセスでの抑制が示唆された。

(平成21年10月8日受理)

キーワード: プログラム細胞死, アポトーシス, 胎仔, 内耳, マウス

## 緒言

プログラム細胞死の研究においては, 以前から「apoptosis」の研究が進められてきたが, 昨今「apoptosis」とは別個の細胞自殺メカニズムとして「autophagic cell death」にも注目が集まっている。「autophagic cell death」は, Schweichel<sup>1)</sup>らや Clarke<sup>2)</sup>が電子顕微鏡下に分類した細胞死の中で type 2 細胞死に相当するものであり, 様々な生体内状況で確認されている。しかし,

いずれも形態学的な観察に基づくものであり, その制御メカニズムはもとより, これら個々の細胞死が実際に遺伝子レベルで制御されるプログラム細胞死か否かも明らかになっていない<sup>3)</sup>。一方 in vitro の実験系ではさまざまな「autophagic cell death」のモデルが作成され, 少なくともその一部については遺伝子レベルでの制御が明らかにされているが, これらのモデルのほとんどがノックアウト等あらかじめ人為

的に「apoptosis」が起きない状態にしておくなど、artificialな状況下で観察される細胞死であり、生体の生理的ないし病的状態で自然に起きているプログラム細胞死との関係は、未だ不明な部分が多く残っている<sup>3,4)</sup>。

このようななか、「apoptosis」の検出方法として TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法が知られているが、TUNEL 陽性死細胞には apoptosis 以外の細胞も含まれる可能性が報告されている<sup>5)</sup>。我々はこの報告を参考に、内耳形態変化が最も多く、プログラム細胞死が高頻度に発現する胎生マウス12日目の内耳を対象に、TUNEL 光顕観察を行った。その結果、TUNEL 陽性死細胞が形態的に「apoptosis」の定義を満たす apoptotic dying cell (ADC) と、形態的に定義を満たさない non-apoptotic dying cell (NADC) の2種類に分類できることを報告した。さらにこの分類を基に、エポキシ樹脂再包埋法を用いた透過電子顕微鏡観察でその微細構造を観察し、ADC を示す細胞が全て type 1 細胞死、つまりは apoptosis であり、NADC を示す細胞は全て type 2 細胞死、つまりは autophagic cell death であることを報告した<sup>6)</sup>。

また我々は内耳毒性を有する CDDP (cis-diammine-dichloroplatinum) を妊娠マウスに投与し、胎仔内耳の TUNEL 陽性細胞への影響を解析した。その結果、総死細胞数は不変であるのに対して、死細胞における ADC 比率が90%から70%へ減少し、NADC 比率が10%から30%への増加することを発見した。この比率変化および総死細胞数の維持は、流産や奇形が見られないことから、胎生期における内耳毒性に対する防御機構ではないかと考え<sup>7)</sup>、この機構が内耳再生や内耳障害の予防につながると考えた。

本研究では、CDDP 投与胎生12日マウスの内耳について、プログラム細胞死関連因子である beclin1 と caspase3 の mRNA レベル、蛋白レベルで発現量の解析を行った。さらに TUNEL 染色と免疫染色の比較から各死細胞における発現蛋白の同定を行うことで、細胞死比率の変化に

関わる因子の同定を試みた。

## 材料と方法

### 実験動物

胎生12日目の ICR マウスを対象とするため、妊娠8週齢の ICR マウス (日本チャールズ・リバー株式会社から購入) を母体として使用した。マウスは実験期間を通して室温 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度30~90%、照明時間7~21時のコンベンショナルエリア飼育室で飼育し、固形飼料(MF, オリエンタル酵母工業)と水を自由摂取させた。本実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No.07-084)、川崎医科大学動物実験指針に基づき行った。

### CDDP 投与胎生マウス作製

作製は以前の平井の報告<sup>7)</sup>を参考とした。妊娠8週齢の母体に対し CDDP 投与群は妊娠4~7日目に CDDP 2.0 mg/kg/day を腹腔内投与し、コントロール群は同量の生理食塩水を腹腔内に投与した (コントロール群母体4例, CDDP 投与群母体4例)。妊娠12日目に母体をセボフルラン深麻酔下に開腹して胎仔を摘出し、母体は安楽死処置を行い、摘出した胎仔を実験材料として以下の実験を行った。

### total-RNA 抽出と cDNA 合成

摘出した胎仔から、 $4^{\circ}\text{C}$  phosphate buffer saline (PBS) 中・実体顕微鏡下に耳包を含む側頭骨片を採取した (コントロール群8例, CDDP 投与群8例)。検体からの total-RNA 抽出には ISOGEN (株式会社ニッポンジーン) を使用した。検体に ISOGEN 0.6 ml を添加後ホモジナイズし、クロロホルム 0.2 ml を加え3分間室温で静置。その後  $4^{\circ}\text{C}$ 、12,000 rpm、15分間遠心分離し、水層を新しいチューブに移し、3  $\mu\text{l}$  の Ethachinmate と、水層と同量のイソプロパノールを加え  $4^{\circ}\text{C}$  で一晩静置した。静置後に  $4^{\circ}\text{C}$ 、12,000 rpm、15分間で遠心し、上清を破棄した後に70%エタノールを添加。  $4^{\circ}\text{C}$ 、7,500 rpm、5分間遠心洗浄してペレットを作

製。遠心後に上清を破棄して乾燥させた後、diethyl pirocarbonate (DPEC) 処理水で溶解した。RNA 濃度は分光光度計で測定し、濃度調整した。次に cDNA 合成には TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) を使用した。total-RNA 溶液 20  $\mu$ l, 10 $\times$ TaqMan RT Buffer 4  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 4.4  $\mu$ l, dNTP mix 4  $\mu$ l, Random Hexamers 1  $\mu$ l, RNase inhibitor 0.4  $\mu$ l, 逆転写酵素 0.5  $\mu$ l, DEPC 処理水 5.7  $\mu$ l を混合し、25 $^{\circ}$ C 10分間、48 $^{\circ}$ C 30分間、95 $^{\circ}$ C 5分間の条件で反応させ、cDNA を得た。

#### Real time-PCR による胎生内耳の遺伝子発現解析

遺伝子発現解析には SYBR Green による Real-time PCR 法を用いた。プライマーは GenBank の nucleotides からダウンロードした mRNA sequence に基づき Primer Express で設計し、blast を用いてプライマーの相同性について確認した。PCR は、Real-time PCR 機器である ABI PRISM 7700 (Applied Biosystem) により、反応検出試薬 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) を指定の方法で用いて行った (DNA 含有試料 0.5  $\mu$ l, primer 溶液 1  $\mu$ l, 反応溶液総量 10  $\mu$ l)。PCR 条件は、50 $^{\circ}$ C 2分間、95 $^{\circ}$ C 10分間で反応させ、95 $^{\circ}$ C 15秒間、60 $^{\circ}$ C 1分間を50サイクル行った。すべての実験において Dissociation curve 分析で解離温度を確認し、PCR products をアガロースゲル電気泳動し目的産物の増幅を確認した。遺伝子発現の定量化のため、18S ribosomal RNA を内部標準遺伝子とし、比較 Ct 法 ( $\Delta\Delta$  Ct 法) を用いた相対的定量化で解析した。

#### 胎仔頭部パラフィン連続切片作製

摘出した胎仔を断頭し、頭部を4%パラホルムアルデヒドで4 $^{\circ}$ C、4時間浸漬固定した (コントロール群2例、CDDP投与群2例)。通常のアアルコール系列で脱水後、パラフィン包埋し、TUNEL法と免疫染色で比較を行うため、交互に2群に分けて5 $\mu$ m連続切片を作製した。一方

は TUNEL 染色に、他方は免疫染色に使用した。

#### TUNEL 染色

TUNEL 染色は、まず作製した切片 (コントロール群2例、CDDP投与群2例) をキシレンで脱パラフィンし、エタノール系列中で親水化後、前処理としてプロテイナーゼ K (10  $\mu$ g/ml, Tris/HCl 10 mM, QBioGene) で37 $^{\circ}$ C、15分間インキュベートした。PBSで2回洗浄後、TUNEL 偽陽性発色する内因性ペルオキシダーゼの不活化のため、室温で5分間3%過酸化水素水/メタノールに浸漬した。その後 PBS で2回洗浄し、TUNEL 反応液 (In Situ Cell Death Detection Kit POD, Roshe Diagnostics) 中で37 $^{\circ}$ C、60分間反応させ、さらに PBS で4回洗浄後にコンバーター POD 液 (ペルオキシダーゼ標識羊由来抗フルオレセイン抗体, Fab フラグメント, Roshe Diagnostics) 中で37 $^{\circ}$ C、30分間反応させた。続いて PBS で4回洗浄し、3,3-ジアミノベンチジン溶液 (シンプルシステム DAB 溶液, ニチレイ) で室温5分間反応させ、顕微鏡的に観察した。TUNEL 陽性細胞における ADC, NADC の判定は、平井の報告<sup>7)</sup>に従って行った。

#### 免疫染色

免疫染色は TUNEL 染色同様に、作製した切片 (コントロール群2例、CDDP投与群2例) を脱パラフィン、親水化処理後に、0.03% 過酸化水素水で室温、10分間反応させ内因性ペルオキシダーゼ不活化を行った。その後、一次抗体として抗 cleaved caspase 3 抗体 ( $\times 200$ , Cell Signaling TECHNOLOGY) を4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。以後、ENVISION+HRP kit (Dako) を用いて染色し、対比染色はヘマトキシリンにて行った。コントロール群と CDDP 投与群の染色性について比較し、また連続切片を用いて各群それぞれで TUNEL 染色と免疫染色で比較を行い、ADC と NADC における cleaved caspase3 の発現について検討した。

### Western Blot 法による発現蛋白の解析

摘出した胎仔を PCR 材料と同様に冷 PBS 中・実態顕微鏡下に処理し、耳包を含む側頭骨片を Western Blot 材料として採取した（コントロール群 8 例、CDDP 投与群 8 例）。蛋白抽出には PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology) を使用した。検体に試薬 0.6 ml を添加後ホモジナイズし、30 分間  $-20^{\circ}\text{C}$  で静置。その後  $4^{\circ}\text{C}$ 、13,000 rpm、5 分間遠心分離し、上清を蛋白抽出液として回収し、BCA 法 (BCA Protein Assay Kit, Pierce) で蛋白濃度を測定し、濃度を揃えた。次に蛋白抽出液を SDS、DTT を含む等量のアプライバッファー (EzApply, ATTO) と混和し、5 分間煮沸処理後に SDS を含むポリアクリルアミドゲル (7.5% ゲル、10% ゲルを使用) で 20 mA、90 分間電気泳動した。蛋白分離後、セミドライ方式で polyvinylidene fluoride (PVDF) メンブレンに転写した。一次抗体は抗 beclin1 抗体 ( $\times 100$ , SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY)、抗 caspase 3 抗体 ( $\times 1000$ , Cell Signaling TECHNOLOGY)、抗 cleaved caspase 3 抗体 ( $\times 1000$ , Cell Signaling TECHNOLOGY)、抗  $\beta$ -actin 抗体 ( $\times 1000$ , BioLegend) を使用し、二次抗体は抗 rabbit IgG-HRP 抗体 ( $\times 1000$ , R & D SYSTEMS) を使用した。検出には化学発光基質 (ECL plus, Amersham Biosciences) を用い、ルミノ・イメーリアナライザー (LAS-1000UVmini, 富士フィルム) で検出し、検出されたバンドは ImageJ Ver.1.41o を用いて定量的に解析した。

### 解析

全ての値は平均値  $\pm$  標準偏差で示した。有意差比較検討は welch の t 検定を用いて解析した。  $p < 0.01$  を有意差ありと判定した。

### 結果

#### CDDP 投与胎生マウスの確認

妊娠 12 日目の胎仔摘出時に、コントロール群 (母体数 4 例) と CDDP 投与群 (母体数 4 例) でそれぞれの胎仔の比較を行った。CDDP 投与

群で明らかな流産や奇形は認めず、採取できた胎仔数はコントロール群  $13.5 \pm 1.00$ 、CDDP 投与群  $12.0 \pm 0.82$  で、両群に有意差は認めなかった ( $p = 0.059$ )。また胎仔の大きさについても、両群で明らかな差は認めなかった。

#### Real time-PCR による胎生内耳の遺伝子発現解析

コントロール群 ( $n = 8$ )、CDDP 投与群 ( $n = 8$ ) とともに beclin1 と caspase3 の mRNA 発現を認めた。また、18S ribosomal RNA を内部標準遺伝子として、両群の mRNA 発現量を比較すると、CDDP 投与群がコントロール群に比べ beclin1 と caspase3 の両方で、約 5 倍の有意な増加 (beclin1  $p = 0.0054$ , caspase3  $p = 0.0095$ ) を認めた (図 1)。

#### 胎生内耳 TUNEL 染色

胎生内耳の各レベルで、コントロール群 ( $n = 2$ )、CDDP 投与群 ( $n = 2$ ) とともに TUNEL 陽性細胞を認めた。その総数については両群で明らかな差は認めず、平井の報告<sup>7)</sup>に一致した。陽性細胞の分布については、両群とも蝸牛部 (図 2a, b)、卵球形嚢部 (図 2c, d, e) に多く陽性細胞が認められ、半規管部 (図 2f, g, h) には陽性細胞は少なく、両群で明らかな分布の差は認められなかった。

#### 胎生内耳 cleaved caspase3 免疫染色

抗 cleaved caspase 3 抗体による免疫染色では、

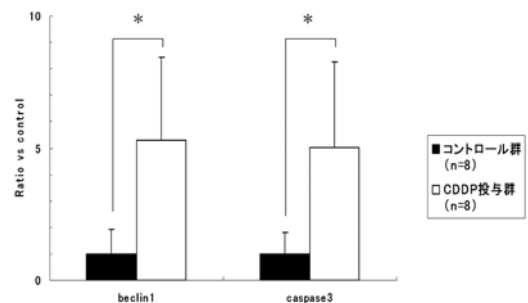


図1 胎生期内耳 Real-time PCR 結果  
データはコントロール群を 1 として相対量を示している。  
Mean  $\pm$  S.D. ( $n = 8$ ) \* :  $p < 0.01$   
CDDP 群において beclin1 と caspase3 の有意な増加を認める。

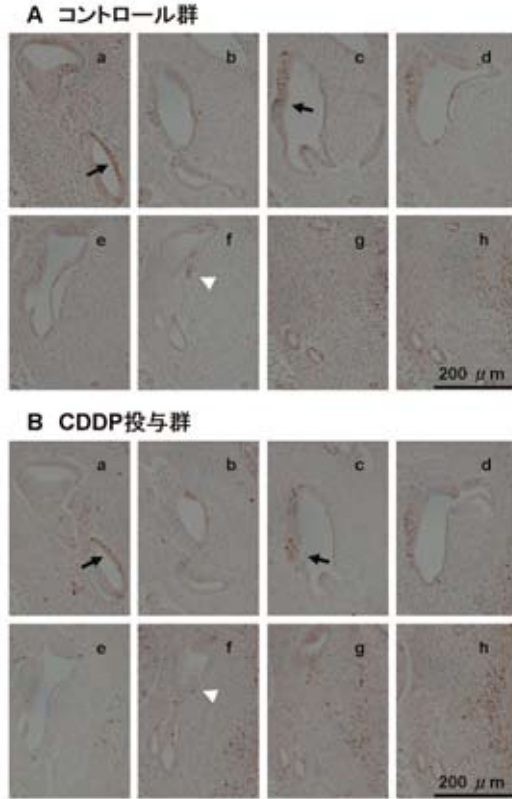


図2 TUNEL 染色 (40倍)

A: コントロール群, B: CDDP 群

a, b: 蝸牛部, c, d, e: 卵球形嚢部, f, g, h: 半規管部  
両群で TUNEL 陽性細胞を認め、蝸牛部と卵球形嚢部に多く (黒矢印)、半規管部では少ない (白矢頭)。両群で陽性細胞数、陽性細胞の分布に明らかな差は認めない。

コントロール群 (n=2), CDDP 投与群 (n=2) ともに内耳における染色を認めた。染色陽性となった部分は TUNEL 染色同様に蝸牛部 (図 3a, b) と卵球形嚢部 (図 3c, d, e) に多く、半規管部 (図 3f, g, h) では少なかった。また両群で明らかな染色範囲、分布の差は認めなかった (図 4)。

#### TUNEL 染色, 免疫染色比較

コントロール群 (n=2), CDDP 投与群 (n=2) の TUNEL 陽性細胞について、以前の平井の報告<sup>7)</sup>を基に ADC と NADC の 2 種類に分類した。TUNEL 染色と免疫染色の連続対応する切片で染色結果を比較すると、両群ともに ADC と考えられる細胞 (図 5 白矢頭) では cleaved

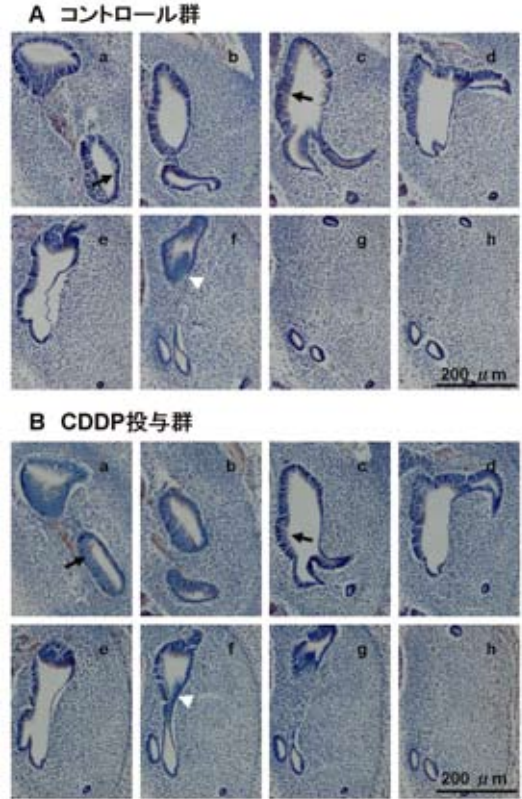


図3 cleaved caspase 3 免疫染色 (40倍)

A: コントロール群, B: CDDP 群

a, b: 蝸牛部, c, d, e: 卵球形嚢部, f, g, h: 半規管部  
両群とも蝸牛部, 卵球形嚢部で cleaved caspase 3 の染色を多く認め (黒矢印)、半規管部ではわずかしき染色を認めない (白矢頭)。

caspase3 陽性所見が認められ、NADC と考えられる細胞 (図 5 黒矢印) では認められなかった (図 5: CDDP 投与群 卵球形嚢部)。コントロール群, CDDP 投与群ともに、蝸牛部, 卵球形嚢部, 半規管部のいずれの部位でも、同様の染色結果が認められた。

#### Western Blot による胎生内耳蛋白発現の定量比較

コントロール群 (n=8), CDDP 投与群 (n=8) ともに beclin1, caspase3, cleaved caspase3 全ての蛋白発現を認めた (図 6)。β-actin を内部標準とした相対的定量で、両群における各蛋白の発現量を比較すると、CDDP 群で beclin1 と caspase3 は有意な増加 (beclin1 p=0.0042, caspase3 p=0.00037) を認めるも、cleaved caspase3 につい

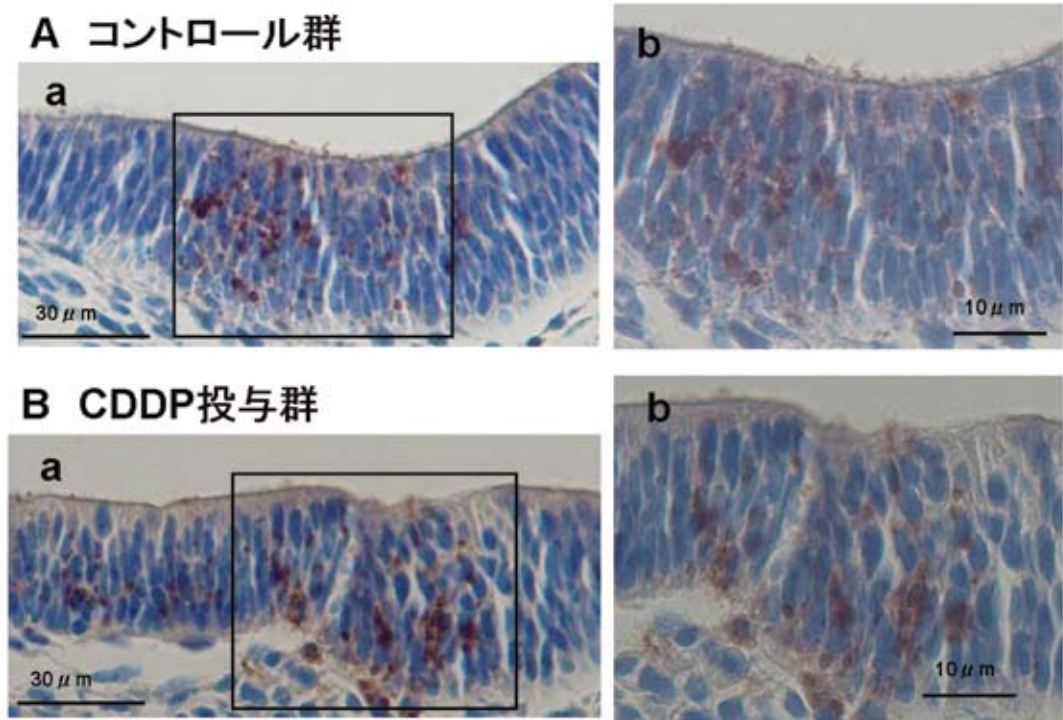


図4 cleaved caspase 3 免疫染色 卵球形嚢部拡大 (a : 200倍, b : 400倍)

A : コントロール群, B : CDDP 群

両群とも cleaved caspase3 の染色を認めるも, 両群で明らかな染色の差は認めない。

ては逆に有意な減少( $p=0.0025$ )を認めた(図7)。

## 考察

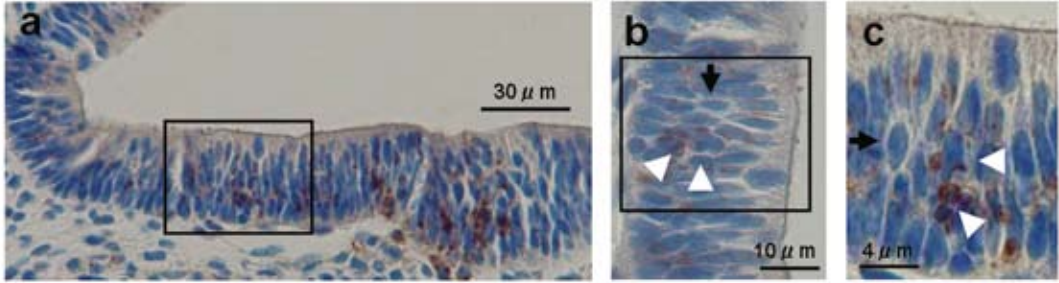
beclin1は autophagy 関連 ATG 遺伝子のひとつ (ATG6) であり, autophagic cell death の中心である autophagosome 形成に必須な因子として知られている<sup>8)</sup>。元々は apoptosis 関連蛋白である Bcl-2 に結合する蛋白として発見されたが<sup>9)</sup>、昨今発生・分化における関与が示唆されている。今回 CDDP 群で認められた beclin1 mRNA 発現増加は、以前に我々が報告した CDDP 投与による NADC 比率増加、つまりは autophagic cell death の増加に矛盾しないものであった。これに対して caspase3 は、apoptosis で中心的な役割を果たすカスパーゼファミリーのひとつであり、カスパーゼカスケードの中でも最下流に位置するエフェクターカスパーゼとして知られている<sup>10)</sup>。発生における apoptosis

の関与はこれまでも多数報告されており、その典型例として肢芽や二次口蓋の形成が挙げられる<sup>11)</sup>。この発生における apoptosis でもカスパーゼが不可欠と考えられ、実際 caspase3 遺伝子のノックアウトマウスが水頭症を含む神経系の異常をもつことが報告されている<sup>12)</sup>。このように apoptosis に強く関与する caspase3 も、beclin1 同様に mRNA 発現増加を示したのは、CDDP 投与群における ADC 比率の減少、つまりは apoptosis の減少とは矛盾する。

しかし他臓器での CDDP 投与による apoptosis 誘導は、腎を中心にもこれまでも多数報告があり<sup>13,14)</sup>、成体内耳を対象にした検討ではあるが<sup>15-18)</sup>、CDDP 投与による内耳の apoptosis 出現の報告もある。さらに apoptosis と autophagic cell death は形態学的に異なるものではあるが、その両方の特徴を持つ移行型の存在が以前から指摘されている<sup>19,20)</sup>。なかにはカスパーゼ依存



## A Cleaved Caspase3 免疫染色



## B TUNEL 染色

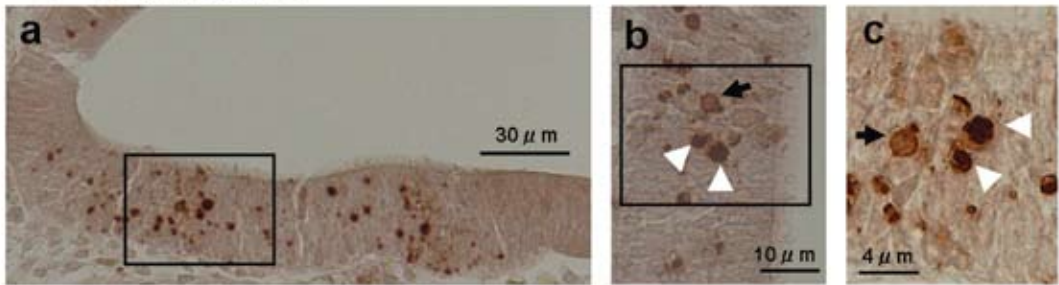


図5 CDDP 投与群連続切片法での cleaved caspase 3 免疫染色と TUNEL 染色の比較 (a:200倍, b:400倍, c:1000倍)  
 A：卵球形囊部 cleaved caspase 3 免疫染色 (黒矢印：TUNEL 染色との比較で NADC と考えられる細胞, 白矢頭：TUNEL 染色との比較で ADC と考えられる細胞)  
 B：卵球形囊部 TUNEL 染色 (黒矢印：NADC, 白矢頭：ADC)  
 ADC と考えられる細胞では cleaved caspase3 が陽性となり, NADC と考えられる細胞では陰性であった。

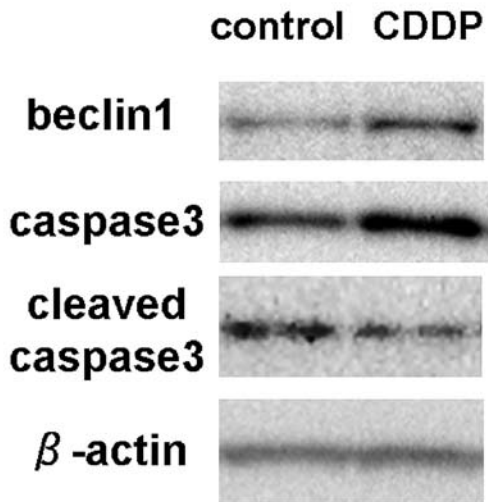


図6 Western Blot 結果  
 コントロール群, CDDP 投与群ともに, 程度の差はあるが beclin1, caspase3, cleaved caspase3, β-actin の蛋白発現が認められる。

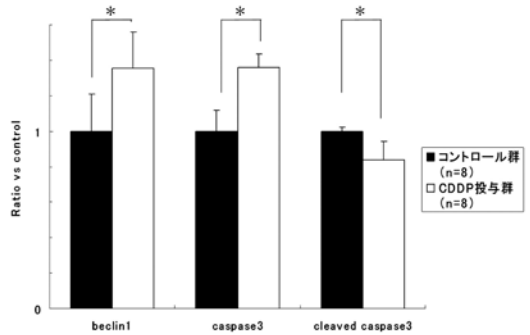


図7 蛋白発現量の相対的定量比較  
 データはコントロール群を1として相対量を示している。  
 Mean ± S.D. (n=8) \* : p<0.01  
 CDDP 群において beclin1 と caspase3 の有意な増加と, cleaved caspase3 の有意な減少を認める。

的な autophagic cell death の報告もあるが<sup>21)</sup>、これについては1つの細胞死刺激が apoptosis と同時に autophagic cell death を誘導しているとの否定的な意見もある<sup>3)</sup>。実際、今回の実験で行った TUNEL 染色と cleaved caspase3 免疫染色の比較で、NADC、つまりは autophagic cell death に cleaved caspase3 の陽性所見は認めなかったことも、autophagic cell death が caspase 非依存であることを支持する結果といえる。しかしこの両者が完全に独立しておらず、互いに密接にかかわっている可能性は高いと考えられ、このことから CDDP 投与による caspase3 増加が誘導する apoptosis を、さらに抑制する別の制御機構の存在が示唆された。

免疫染色では、CDDP 群で明らかな cleaved caspase3 陽性細胞の増加は認めず、この結果も TUNEL 染色における ADC 減少、つまりは apoptosis 減少と同様 PCR の結果とは矛盾した。しかし、Western Blot で蛋白発現量を解析したところ、beclin1 と caspase3 は mRNA 同様に増加を認め、caspase3 の切断後活性型である cleaved caspase3 は逆に減少を認めた。元々カスパーゼはそのままでは活性をもたないプロカスパーゼの状態で存在し、上流からのシグナルにより切断され、2量体を形成することで初めて活性を持つことが知られている<sup>10)</sup>。mRNA とその翻訳蛋白、つまりは caspase3 のレベルでは増加を示すものの、その先の活性を持つ段階、つまりは cleaved caspase3 では減少を示している。このことから、活性型になるための切断を阻害する機構が示唆され、この caspase 切断による活性化阻害が前述の apoptosis 抑制機構に関わっていると考えた。

では、この apoptosis 抑制機構を調節している因子とは何であろうか。元々この apoptosis の抑制はそれ単独で生じたのではなく、平井の報告にあるように autophagic cell death の増加と総死細胞数の維持とともに起こっている<sup>7)</sup>。このことから、CDDP による薬剤刺激で、まず autophagic cell death となる細胞が出現し、そのために総死細胞数が増加し正常な器官形成が保

てなくなることに對して、apoptosis を抑制して総死細胞数を維持し、正常な器官形成につながるものと考えられる。つまりは apoptosis の減少は autophagic cell death の増加にリンクしたものであり、この二者をリンクさせる因子こそ、この抑制機構において最も重要な因子と考えられる。このような autophagic cell death と apoptosis の両方にかかわる因子として、まず細胞内での調節には Bcl-2 ファミリーの関与が考えられる。

Bcl-2 はヒト濾胞性リンパ腫における転座箇所として単離され、apoptosis を抑制して細胞生存の促進に働く癌遺伝子として知られている。また Bcl-2 には相同性をもつ Bcl-2 ファミリー蛋白が存在し、ファミリー蛋白には Bax や Bak など過剰発現することで apoptosis 促進に作用する蛋白が多数存在する<sup>22-24)</sup>。Bcl-2 を含めこれらの蛋白は、ヘテロダイマー形成を通して apoptosis を調節し、それぞれの蛋白発現量によって促進か抑制に傾くかが調節される。また、前述のように beclin1 は元々 Bcl-2 に結合する蛋白として発見され、Bcl-2 は autophagy に対して抑制的に作用するとの報告もある<sup>25,26)</sup>。このように apoptosis の抑制、促進の両方に作用し、また beclin1 にも作用する Bcl-2 及びそのファミリー蛋白が、細胞内における apoptosis と autophagic cell death の調節にかかわるものと考えられる。

しかし、このような細胞内における調節のみでは、内耳全体での死細胞数の維持は困難であり、内耳という器官全体での、つまりは細胞間におけるシグナル伝達が不可欠と考えられる。ではそのシグナルには、どのようなものが考えられるであろうか。これまでのプログラム細胞死研究の報告から、2つの仮説が考えられる。

まず1つ目の仮説としては、栄養因子の関与である。Bcl-2 はミトコンドリアに存在し、Bcl-2 ファミリー蛋白の多くも、ミトコンドリアを介する apoptosis シグナル伝達系 (intrinsic pathway) に関わっている<sup>22-24,27,28)</sup>。この経路の最初のシグナルとして、多種多様のストレスが報告されているが、その中に「栄養因子の枯



渴」も含まれている。発生の過程では、供給される種々の栄養因子が限られていることで、その栄養因子を細胞同士で奪い合い、多くの細胞が「栄養因子の枯渇」から apoptosis をきたし、各々の臓器でちょうど良い数の細胞が生き残ると考えられている。実際、発生過程におけるニューロンや胎生期マウスの卵母細胞において<sup>29, 30)</sup>、apoptosis に対する栄養因子の関与が報告されている。このことから、本実験では CDDP 投与で新たに死亡した細胞 (autophagic cell death の増加分) の数だけ栄養因子が余り、その余剰分が本来 apoptosis を来たす細胞に使われ、死亡した細胞と同程度の細胞が apoptotic を回避したと考えられる。

2つ目の仮説としては、デスリガンドによるシグナル伝達である。Fas や TNF などのデスリガンドによる刺激は、そのレセプターから caspase8 を介して caspase3 を活性化することで apoptosis を起こす (extrinsic pathway)<sup>27, 28, 31)</sup>。しかしこの経路でも、肝細胞など特定の細胞においては、caspase8 の活性化が少量しか起きず、caspase8 から Bcl-2 ファミリーのひとつである Bid を介して、ミトコンドリア経路につながることを報告されている。このようなデスリガンドが関与するのであれば、autophagic cell death をきたした細胞から何らかの物質が放出されたと考えられるが、これについてはまだ不明である。どちらの仮説もまだシグナル伝達系に不明な点が多く、今後更なる研究が必要ではあるが、この Bcl-2 のさらに上流に存在するシグナルが、細胞間での細胞死の調節、つまり内耳における防御機構の最重要因子であると考えた。

今後は Bcl-2 ファミリーを中心として遺伝子レベル、蛋白レベルでの発現の解析を行うとともに、Bcl-2 のさらに上流に存在し、内耳全体のレベルで細胞死の調節を行うシグナルについて解析を進める予定である。

## 結 語

1. 胎生期内耳における細胞死の調節について検討した。

2. Real time-PCR の結果、コントロール群と比較して CDDP 群では caspase3 と beclin1 の発現量が約 5 倍に増加した。
3. 免疫染色では ADC のみ cleaved caspase3 陽性となり、コントロール群と CDDP 群で明らかな染色の差は認めなかった。
4. Western Blot で caspase3 は増加を認めたが、その活性型である cleaved caspase3 の増加は認めなかった。
5. caspase3 増加が誘導する apoptosis をさらに抑制する機構の存在が示唆され、その調節が caspase3 切断のレベルで行われていることが示唆された。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました川崎医科大学耳鼻咽喉科学教室原田保教授に深甚なる謝意を表します。また、リアルタイム PCR 法のご指導をいただきました川崎医科大学内科学 (糖尿病・内分泌) 教室中島弘二先生、高木史子女史に感謝申し上げます。

なお本研究は、川崎医科大学プロジェクト研究費 (20-114H) の援助により行われた。

## 引用文献

- 1) Schweichel JU, Merker HJ : The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7 : 253-266, 1973
- 2) Clarke PGH : Developmental cell death : morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 181 : 195-213, 1990
- 3) 立花 研, 北中千史 : オートファジーと細胞死. *蛋白質核酸酵素* 51 : 1519-1524, 2005
- 4) 水島 昇 : タイプ 2 細胞死 : オートファジーを伴う細胞死の検証. *臨床免疫* 41 : 167-174, 2004
- 5) Orita Y, Nishizaki K, Sasaki J, *et al.* : Does TUNEL staining during peri- and post-natal development of the mouse inner ear indicate apoptosis? *Acta Otolaryngol Suppl* 540 : 22-26, 1999
- 6) Hirai S, Harada T : Morphological comparison of apoptotic with non-apoptotic dying cells in the developing inner ear of mouse embryos. *Hear Res* 198 : 41-47, 2004
- 7) 平井滋夫 : マウス内耳発生における TUNEL 陽性死細胞の形態学的観察 (第二報) - 微細構造による細

- 胞死分類について. 川崎医学会誌 29 : 17-29, 2003
- 8) 谷田以誠 : 哺乳動物のオートファジーと ATG コンジュゲーション. 医学のあゆみ 216 : 505-508, 2006
  - 9) Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B : Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. J Virol 72 : 8586-8596, 1998
  - 10) 田沼靖一 : 細胞死大観 - 新展開する細胞死研究. 医学のあゆみ 225 : 469-473, 2008
  - 11) 刀祢重信 : 発生過程におけるアポトーシス. 臨床免疫 38 : 264-270, 2002
  - 12) 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
  - 13) Yang C, Kaushal V, Shah SV, Kaushal GP : Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol 294 : 777-787, 2008
  - 14) Kaushal GP, Kaushal V, Herzog C, Yang C : Autophagy delays apoptosis in renal tubular epithelial cells in cisplatin cytotoxicity. Autophagy 4 : 710-712, 2008
  - 15) Lee JE, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F, Endo T, Shiga A, Lee SH, Ito J : Mechanisms of apoptosis induced by cisplatin in marginal cells in mouse stria vascularis. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 66 : 111-118, 2004
  - 16) Alam SA, Ikeda K, Oshima T, *et al.* : Cisplatin-induced apoptotic cell death in Mongolian gerbil cochlea. Hear Res 141 : 28-38, 2000
  - 17) Watanabe K, Hess A, Michel O, Yagi T : Nitric oxide synthase inhibitor reduces the apoptotic change in the cisplatin-treated cochlea of guinea pigs. Anticancer Drugs 11 : 731-735, 2000
  - 18) Watanabe KI, Hess A, Bloch W, Michel O : Nitric oxide synthase inhibitor suppresses the ototoxic side effect of cisplatin in guinea pigs. Anticancer Drugs 11 : 401-406, 2000
  - 19) Lockshin RA, Zakeri Z : Apoptosis, autophagy, and more. Int J Biochem Cell Biol 36 : 2405-2419, 2004
  - 20) Bursch W : Multiple cell death programs:Charon's lifts to Hades. FEMS Yeast Res 5 : 101-110, 2004
  - 21) Martin DN, Baehrecke EH : Caspases function in autophagic programmed cell death in Drosophila. Development 131 : 275-84, 2004
  - 22) 辻本賀英 : アポトーシス制御分子 :Bcl-2ファミリー蛋白. 医学のあゆみ 215 : 779-783, 2005
  - 23) Tsujimoto Y : Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. J Cell Physiol 195 : 158-167, 2003
  - 24) 清水重臣, 辻本賀英 : Bcl-2ファミリー概論. 実験医学 22 : 1523-1528, 2004
  - 25) 近藤精二, 近藤靖子 : 癌におけるオートファジー. 医学のあゆみ 216 : 525-529, 2006
  - 26) Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B : Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. Cell 122 : 927-939, 2005
  - 27) Wang X : The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev 15 : 2922-2933, 2001
  - 28) Thorburn A : Death receptor-induced cell killing. Cell Signal 16 : 139-44, 2004
  - 29) Lobascio AM, Klinger FG, Scaldaferrri ML, Farini D, De Felici M : Analysis of programmed cell death in mouse fetal oocytes. Reproduction 134 : 241-252, 2007
  - 30) De Felici M, Lobascio AM, Klinger FG : Cell death in fetal oocytes: many players for multiple pathways. Autophagy 16 : 240-242, 2008
  - 31) 岡本一男, 米原 伸 : デスレセプターと DISC 関連分子. 実験医学 22 : 1475-1480, 2004

## Investigation of programmed cell death in the developing inner ear of mouse embryos

Dai SHIBATA

*Department of Otolaryngology, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan*

**ABSTRACT** The study of programmed cell death has flourished for some time, but there are many unknown matters regarding its control mechanism. Although the TUNEL method has been previously used in the detection of apoptosis, we reported that there was autophagic cell death, in addition to apoptosis, in the TUNEL positive cells in the 12-day-old mouse embryo inner ear. We administered CDDP to pregnant mice to create inner ear toxicity and analyzed the change. As a result, we found that the total cell death in the fetal inner ear was unchanged and that there was a decrease in the apoptosis fraction and an increase in the autophagic cell death fraction. We hypothesized that this change was a defense mechanism of fetal mouse inner ear. Therefore, we analyzed the 12-day-old mouse embryo inner ear by administering CDDP to mother mice to elucidate this defense mechanism by using the real-time PCR method, the western blotting, and immunohistochemistry.

Real-time PCR showed the increase in the autophagy-related gene beclin1 and the apoptosis-related gene caspase3 in the CDDP group. Immunohistochemistry revealed cleaved caspase3 protein only in apoptotic cells. In addition, the western blotting revealed the increase in beclin1 and caspase3 but the decrease in cleaved caspase3 in the CDDP group.

The increase in beclin1 gene expression was compatible with the increase in the autophagic cell death ratio in the CDDP group as reported previously. Although the increase in mRNA level of caspase3 was inconsistent with the decrease in the ratio of apoptosis, there was no increase in protein levels. The decrease in cleaved caspase3, which is a cleaved-activity type protein, suggests the suppression of activation process of cleaving caspase3.

*(Accepted on October 8, 2009)*

**Key words : Program cell death, Apoptosis, Embryo, Inner ear, Mice**

---

Corresponding author

Dai Shibata

Department of Otolaryngology, Kawasaki Medical  
School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111

Fax : 81 86 462 1199

E-mail : zan75517@med.kawasaki-m.ac.jp