

論文の内容の要旨

論文題目 家族性筋萎縮性側索硬化症における ASK1 の関与
氏名 丸山芳子

[背景]

筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis; ALS)は、大脳、脳幹、脊髄の運動ニューロンが選択的かつ系統的に侵される神経変性疾患である。ALS のうち、遺伝性の家族性 ALS の一部は SOD1 遺伝子の変異が原因で発症することが知られており、その発症機構は、変異型 SOD1 が細胞内に蓄積することによって細胞毒性を発揮し、運動神経が変性を来すことによるものと考えられている。しかし、細胞内に変異型 SOD1 が蓄積した結果、実際にどのような分子機構によって細胞が傷害され、変性していくのかという一連のメカニズムについては、様々な角度から断片的に数多くの研究がなされているものの、未だ明らかになっていない。

一方で、当研究室では、Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1)が MAP kinase (MAPK)ファミリーの一員である c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)経路ならびに p38 経路を活性化する MAPK kinase kinase (MAPKKK)であり、ASK1 が種々のストレス刺激による細胞死に関与していることを報告してきた。また、神経変性疾患の一つであるポリグルタミン病のモデル実験において、ポリグルタミン鎖凝集体の細胞内蓄積がユビキチン・プロテアソーム系の破綻を引き起こして小胞体ストレスをもたらし、ASK1 の活性化に引き続く JNK 活性化を介して神経細胞を死に至らしめるという、疾患における神経細胞死の一連のシグナル伝達経路をも明らかにしている。これらのことから、ASK1-MAPK 系は、異常タンパク質の発現が引き起こす神経細胞死において、共

通常の細胞内シグナル伝達系として重要な働きをしている可能性が考えられる。

そこで本研究では、家族性 ALS の原因である変異型 SOD1 が運動神経において細胞死を惹起する際のシグナル伝達における ASK1-MAPK 経路の役割について検討し、家族性 ALS 発症の分子機構を解明することを目的として実験を行った。

[方法と結果]

1. 変異型 SOD1 の過剰発現によって惹起される細胞死

ALS についての研究の多くはモデル動物を用いた個体での表現型の解析が主であり、変異型 SOD1 の過剰発現によって細胞レベルで実際に細胞死が起こるか否かについては、多くの報告があるものの一定の結論には至っていない。そこでまず、より個体レベルに近い実験系としてマウス胎児由来の運動神経初代培養細胞を用い、実際に細胞レベルで変異型 SOD1 の過剰発現によって細胞死が惹起されるかどうかを調べた。細胞はマウス C57BL/6 の妊娠 12.5 日後の胎児より摘出した脊髄を酵素的に単離して

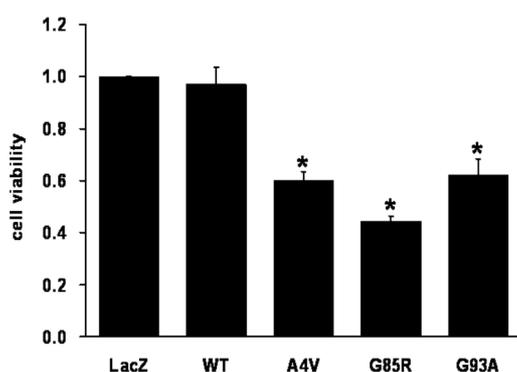


Fig.1 運動神経細胞初代培養系における変異型SOD1(A4V,G85R,G93A)の過剰発現による細胞死 (*;p<0.05 vs WT)

得られた運動神経細胞を用い、これにアデノウイルス法により野生型(WT)およびヒト ALS 患者で発見された 3 種類の変異型 SOD1(A4V, G85R, G93A) を過剰発現させ、アデノウイルス感染後 7 日目に MTT 法により細胞の生存率を測定した。野生型 SOD1 では細胞死が惹起されないのに対し、変異型 SOD1 ではいずれも野生型 SOD1 に比べ有意に生存率が低下しており、細胞死が引き起こされていることが確認された (Fig.1)。

2. 変異型 SOD1 の過剰発現による ASK1 の活性化

ASK1 は様々なストレス刺激による細胞死に関与することが知られていることから、変異型 SOD1 によって惹起される細胞死における ASK1 関与の可能性について検討するため、運動神経細胞において変異型 SOD1 が ASK1 を活性化するか否かを調べた (Fig.2)。運動神経初代培養細胞にアデノウイルス法により野生型および変異型 SOD1 と ASK1 を共発現させ、アデノウイルス

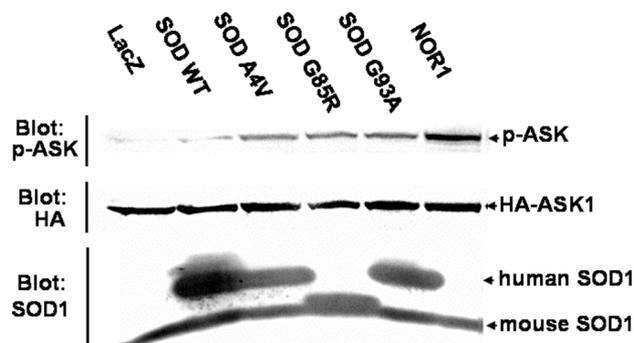


Fig.2 変異型SOD1(A4V,G85R,G93A)の過剰発現によるASK1の活性化

感染から 48 時間後に抗リン酸化 ASK(p-ASK)抗体を用いたウエスタンブロットにより ASK1 の活性を測定した。NO によって ASK1 が活性化されることから NO donor として知られる NOR1(1mM 5分)刺激による ASK1 活性化を positive control として示した。野生型 SOD1 によっては ASK1 の活性化はほとんどみられなかったが、いずれの変異型 SOD1 によっても ASK1 の活性化が観察された(Fig.2)。したがって、変異型 SOD1 によって惹起される細胞内シグナル伝達において ASK1 の活性化が関与していることが示唆された。

3. 変異型 SOD1 の過剰発現によって惹起される細胞死における ASK1 の必要性

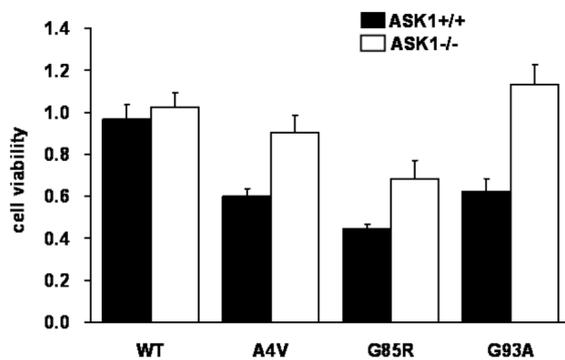


Fig.3 変異型SOD1(A4V,G85R,G93A)による運動神経細胞死におけるASK1の必要性

変異型 SOD1 によって ASK1 が活性化されることが明らかになったことから、変異型 SOD1 による細胞死における ASK1 の必要性について、野生型(ASK1+/+)マウス由来の運動神経細胞と ASK1 ノックアウト(ASK1-/-)マウス由来の運動神経細胞との比較によりアデノウイルス感染から 7 日後に MTT 法を用いて調べた。ASK1-/-マウス由来の細胞においては、ASK1+/+マウス由来の細胞で観察されるいずれの変異型 SOD1

による細胞死も抑制されていた(Fig.3)。したがって、いずれの変異型 SOD1 によって引き起こされる細胞死においても ASK1 が必要な分子として関与していることが明らかとなった。

4. 変異型 SOD1 の過剰発現による ASK1 活性化における小胞体ストレス非依存性

ASK1 は酸化ストレスや TNF などの細胞死誘導刺激に加え、異常タンパク質の細胞内蓄積に基づくプロテアソーム分解系の破綻を介した小胞体ストレスによっても活性化することが知られている。一方、変異型 SOD1 は野生型に比べ立体構造の異常により凝集体を形成し細胞内に蓄積されやすいという報告があることから、変異型 SOD1 による ASK1 の活性化メカニズムにプロテアソーム活性の抑制および小胞体ストレスが関与している可能性について検討した。しかし、少なくとも本実験系においては、プロテアソーム活性は変異型 SOD1 の過剰発現によって抑制されず、また、小胞体ストレスも変異型 SOD1 によって惹起されなかったことから、変異型 SOD1 による ASK1 活性化は、プロテアソーム分解系の破綻や小胞体ストレスなどを介したものではなく、全く別のメカニズムによるものであると考えられる。

5. 変異型 SOD1(G93A)を過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスと ASK1-/-マウスの交配実験

変異型 SOD1(G93A)を過剰発現する Tg マウスは、モデル動物の一つとして ALS の解析に広く用いられている。細胞レベルでの変異型 SOD1 による細胞死における ASK1 の関与が、個体レベルでの ALS 病態進行にどのように反映されるかを検討し、ALS における ASK1 の役割を解明するため、

SOD1(G93A)Tg マウスと *ASK1*^{-/-}マウスの交配実験を行い、病態発症時期(onset)と個体の寿命(survival)について観察を行った。運動失調の発症時期については *SOD1(G93A)・ASK1*^{-/-}マウスと *SOD1(G93A)・ASK1*^{+/+}マウスとの間で差がみられなかった(Fig.4)。一方、寿命については *SOD1(G93A)・ASK1*^{-/-}マウスは *SOD1(G93A)・ASK1*^{+/+}マウスと比較して延長効果がみられ、個体生存率が上昇することが明らかになった(Fig.4)。この結果から、変異型 SOD1 によって惹起される ALS の病態進行において、個体レベルでも ASK1 が大きな役割を果たしていることが示された。

また、ALS 発症と病態進行は運動神経細胞の変性・脱落が原因であることが報告されていることから、さらに個体レベルで実際に病態進行中の脊髄組織内で起こっている神経細胞死に対する ASK1 の役割についても検討した。病態発症時期である生後 30 週と発症後個体が死亡し始める時期である 34 週において、*SOD1(G93A)・ASK1*^{+/+}マウスおよび *SOD1(G93A)・ASK1*^{-/-}マウスの腰部脊髄切片を作製しニッスル染色を行い、脊髄前角部の運動神経細胞数を計測した。34 週齢の脊髄切片においては、*SOD1(G93A)・ASK1*^{+/+}マウスでは、前角部全体における野生型(WT)マウスでみられる矢頭で示すような、ニッスル染色陽性の突起を有する細胞体の大きな運動神経細胞の数が野生型(WT)マウスに比べて約 85%減少していたのに対し、*SOD1(G93A)・ASK1*^{-/-}マウスでは *SOD1(G93A)・ASK1*^{+/+}マウスでみられた運動神経細胞の減少が有意に抑制されていた(Fig.5AB)。し

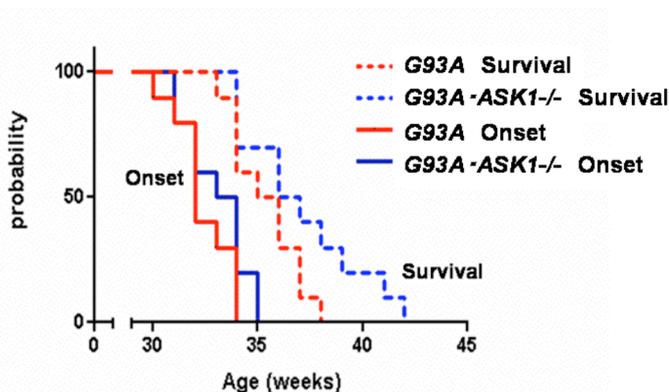


Fig.4 *SOD1(G93A)Tg*マウスの個体発症率および生存率におけるASK1の効果 (n=10)

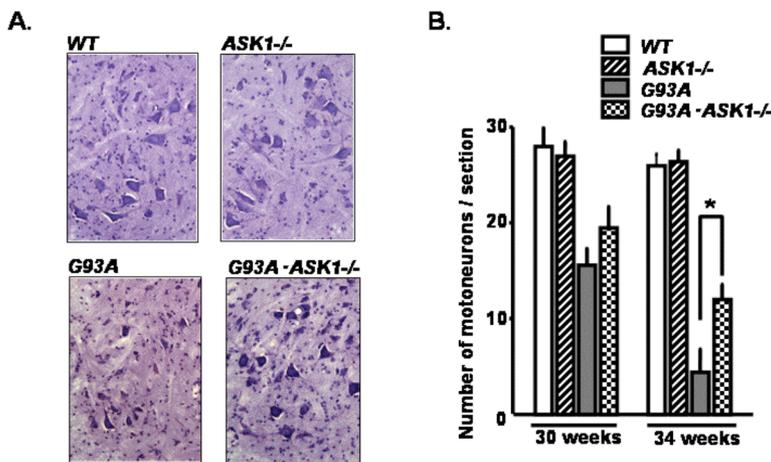


Fig.5 *SOD1(G93A)Tg*マウスの脊髄組織内の運動神経細胞死におけるASK1の必要性 **A.**各遺伝子型マウス(34週齢)の脊髄切片のニッスル染色像 **B.**ニッスル染色により観察した脊髄前角部の運動神経細胞数(n=5) (*; p<0.05)

たがって、*SOD1(G93A)Tg* マウスの病態進行時にみられる脊髄組織内の運動神経細胞死において、ASK1 が重要な分子として機能していることが明らかになった。

[まとめ]

本研究において、一部の家族性 ALS の原因である変異型 SOD1 の過剰発現が運動神経初代培養細胞において細胞死を惹起すること、また、この細胞死に至る分子機構においてASK1 活性化を介するシグナル伝達機構が深く関与していることが明らかになった。また、この ASK1 活性化はプロテアソーム分解系の抑制や小胞体ストレスを介したものでなく、未同定の ASK1 活性化機序による可能性が示唆された。さらに、個体レベルにおいても、病態進行時に見られる脊髄組織内での運動神経細胞死およびそれに伴う個体死という点で、ASK1 が必要な分子であることが明らかとなった。

本研究は、運動神経初代培養系を用いた *in vitro* の系と ALS のモデルマウスを用いた *in vivo* の系の両面からの検討により、SOD1 の遺伝子変異によって生じる ALS の病態進行の際の細胞内シグナル伝達において、ASK1 が必須な分子として中心的な役割を果たしていることを初めて明らかにしたものであり、ALS の病態分子機構解明に新たな知見をもたらすものである。今後は、変異型 SOD1 の発現から ASK1 活性化に至るまでの詳細な分子機構や、ASK1 の下流においてどのような分子が運動神経細胞死に関与しているかなどについて検討することにより、孤発性 ALS および SOD1 以外の他の遺伝子変異によって生じる家族性 ALS の病態発症機構の解明にもつなげることができると期待される。