

審査の結果の要旨

氏名 丸山芳子

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) のうち、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、どのようなシグナル伝達を介して細胞が傷害され、変性していくかについての一連のメカニズムについては、様々な角度から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。本研究は、SOD1 遺伝子変異を原因とする家族性 ALS の病態分子メカニズムにおいて、ASK1 (ストレス応答性 MAP キナーゼキナーゼキナーゼ) が変異型 SOD1 (A4V, G85R, G93A) 依存的神経細胞死、および ALS 病態進行に重要な役割を果たしていることを *in vitro*、*in vivo* の両実験系により示したものである。

以下、研究結果の要旨を記す。

1. 変異型 SOD1 (A4V, G85R, G93A) 依存的運動神経細胞死に関する検討

個体レベルでは変異型 SOD1 の発現によって惹起される運動神経細胞死において、運動神経細胞の周囲の環境が何らかの不可欠な役割を果たしていると考えられている。従って、運動神経細胞とグリア細胞との相互作用が反映される実験系が必要であったため、マウス胎児脊髄より得られた細胞全てを培養することによって、運動神経細胞の他にグリア細胞およびマイクログリアといった細胞も混在する共培養系において、アデノウイルス法を用いて変異型 SOD1 を発現させる実験系を確立した。MTT 法、TUNEL 法を用いて検討を行った結果、全ての変異型 SOD1 の発現によって神経細胞死が惹起されることが示された。

2. 変異型 SOD1 の過剰発現による ASK1 の活性化

様々なストレスシグナル伝達経路に関与する ASK1 は、ポリグルタミン病において、異常タンパク質 (ポリグルタミン鎖タンパク質) の蓄積によって活性化され、神経細胞死に関与することが知られている。変異型 SOD1 は野生型に比べ細胞内に蓄積されやすいことから、変異型 SOD1 によって惹起される細胞死に ASK1 が関与する可能性を検討するため ASK1 活性を測定した結果、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。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経路において 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 依存的神経細胞死における ASK1 の必要性

変異型 SOD1 によって ASK1 が活性化されたことから、変異型 SOD1 依存的神経細胞死において ASK1 が必要な分子として機能しているか否かを、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を用い、その比較により検討した。その結果、ASK1-/- マウス由来細胞においては、ASK1+/+ マウス由来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。したがって、変異型 SOD1 によって引き起こされる細胞死において、ASK1 が必要な分子として機能していることが示された。

4. 変異型 SOD1 (G93A) トランスジェニック (Tg) マウスと ASK1-/- マウスの交配実験

細胞レベルにおいて、変異型 SOD1 依存的神経細胞死に ASK1 が重要な分子として機能することが明らかとなったことから、個体レベルでの ASK1 の役割を調べるため、SOD1 (G93A) Tg マウスと ASK1-/- マウスの交配実験により、病態発症時期と個体生存率、および脊髄運動神経細胞死について検討を行った。その結果、SOD1 (G93A) Tg・ASK1-/- マウスと SOD1 (G93A) Tg・ASK1+/+ マウスとの間では運動失調の出現時期には差がみられなかったが、個体生存率については SOD1 (G93A) Tg・ASK1-/- マウスでは SOD1 (G93A) Tg・ASK1+/+ マウスと比較して個体生存率が上昇することが明らかになった。また、これらのマウスの脊髄組織染色により、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も、ASK1 が重要な分子として機能していることが示された。

以上、運動神経初代培養系および SOD1 (G93A) Tg マウスを用いた実験により、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 が中心的な役割を果たしていることが示唆された。

本研究は、ストレス応答性 MAP キナーゼキナーゼキナーゼファミリーの一つである ASK1 に焦点を当て、ALS における運動神経細胞死の分子機構について細胞レベルと個体レベルとの両面から検討することにより、家族性 ALS の原因である変異型 SOD1 によって惹起される運動神経細胞死に ASK1 が必要であることを初めて示したものである。これらの知見は、ALS の病態分子機構解明に新たな情報をもたらすものであり、今後の ALS の治療法開発につながる可能性を有しており、博士 (薬学) の学位に値するものと判断した。