

「脳を守る」
平成10年度採択研究代表者

遠山 正彌

(大阪大学大学院医学系研究科 教授)

「脳虚血により引き起こされる神経細胞死防御法の開発」

1. 研究実施の概要

1) 脳血管障害後の痴呆の救済

脳梗塞等で起きる病的状態の代表は低酸素である。神経細胞は低酸素負荷によりすぐに細胞死を起こすがグリア細胞であるアストロサイトは低酸素負荷に対し耐性を示す。我々はアストロサイトは低酸素負荷を加えられると低酸素負荷下を生き抜く新たな遺伝子・蛋白発現を引き起こすと想定し、ORP150,RA301,RA410, SERP1の4種の新規遺伝子・蛋白の単離に成功した。これらの内、ORP150蛋白は小胞体に局在するストレス蛋白であり、また、ヒトの動脈硬化巣など遷延した虚血環境が存在すると考えられる部位でも多量に発現していることが確認されている。我々は、脳血管性痴呆などの病態においてORP150が神経細胞死を抑制する因子として働きうることを示すため、アデノウイルス及び遺伝子改変動物を用い神経細胞にORP150を強制発現させ、虚血による神経細胞死に対する抑制効果について検討し、この小胞体のストレス蛋白が虚血による神経細胞死を軽減しうることを明らかにした。また、SERP1に関しては68アミノ酸からなり、小胞体に局在する蛋白であることがわかった。SERP1は動物脳梗塞モデルにおいて梗塞巣周囲に誘導を認め、また、培養細胞を用いた実験により、ストレス時に小胞体に蓄積するアンフォールドな蛋白の分解を調節する可能性が示唆された。今後、1) ORP150が低酸素或いは虚血による細胞死を抑制するメカニズムを解明する、2) SERP1が虚血性神経細胞死を防ぎうるかを明らかにする予定である。

2) アルツハイマー病による痴呆の救済

アルツハイマー病(AD)は、神経細胞死を伴う進行性の神経変性疾患で、老年期痴呆症の大半を占める。家族性AD(FAD)の大多数は第14番染色体に位置するプレセニリン-1(PS-1)遺伝子にリンクしている。PS-1の変異は、細胞内カルシウム濃度の攪乱や酸化ストレスに対して脆弱性を増大させることがわかってきたが、詳細なメカニズムについては明らかにされていなかった。我々は、PS-1が小胞体(ER)に局在していることに着目し、ERストレスとPS-1変異体との関わりを検討した。その結果、PS-1変異体は小胞体の膜上に存在するストレスセンサー

Ire1の機能を低下させ、分子シャペロン群の発現誘導システム（Unfolded Protein Response）に障害を与えるために、各種細胞ストレスに対し感受性を増大させることが明らかとなった。

プレセニン2（PS2）遺伝子のエキソン5が欠失するスプライシング変種（PS2V）を孤発性アルツハイマー病（AD）患者脳から見出した。PS2Vは野生型PS2とは構造上異なった蛋白質をコードし、AD患者の海馬および大脳皮質の神経細胞に発現していた。PS2Vは、変異プレセニン1と同様にストレスセンサーIre1の機能障害を引き起こすこともわかった。

これら結果は、AD患者脳でみられる神経細胞死がERストレスが引き金となって生ずる可能性があることを示唆する。今後、ADの新しい治療法を確立させるためIre1の機能制御や分子シャペロン群の発現調節機構についてさらに詳細に解析していく予定である。

2. 研究実施内容

1) 脳血管障害後の痴呆の救済

I. ORP150

(1) アデノウイルスを用いた強制発現型で神経細胞にORP150を強制発現させその神経細胞死に対する抑制効果を評価した。初代培養神経細胞を低酸素暴露するとcaspase-3の活性化を介した細胞死が起こるが、アデノウイルスベクターを用いORP150を強制発現しておくこと、細胞死及びcaspase-3の活性化が抑制された。また、ORP150のcDNAをアンチセンス方向に組み込んだアデノウイルスを培養アストロサイトに感染させると低酸素環境下における耐性が失われた。以上より神経細胞、アストロサイトいずれの細胞においてもORP150の発現誘導が低酸素による細胞保護に重要な役割を果たしていることが示された。

(2) in vivoにおけるORP150の役割を検討するためORP150を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、中大脳動脈閉塞モデルを作成したところ、トランスジェニックマウスにおいて梗塞サイズの減少が認められ、この蛋白の虚血脳での役割が示された。

II. SERP1

(1) SERP1は68アミノ酸からなり、C末端付近に1回膜貫通領域を持つ小胞体に局在する蛋白であることがわかった。培養細胞においてSERP1の誘導を調べたところ、低酸素ストレス以外にも、種々の小胞体ストレスにて誘導された。更に、ラットの脳梗塞モデルにおいて梗塞巣周囲のペナンプラ領域に誘導を認め、虚血ストレスにおいて何らかの役割を果たす可能性が考えられた。

(2) ストレス時のマーカ蛋白分解をメタボリックラベリングで調べたところ、

SERP 1 を細胞に強制発現させると、A23187や TM等のストレス時に、マーカ蛋白の分解が防がれることがわかり、また、免疫共沈の結果、SERP1と小胞体の蛋白輸送チャネルSec61complexは免疫共沈された。よって、SERP 1 は、小胞体の蛋白輸送チャネルSec61complexとの相互作用し、ストレス時に小胞体に蓄積するアンフォールドな蛋白の分解を調節している可能性が示唆された。

2) アルツハイマー病による痴呆の救済

(1) 変異PS1による神経細胞死のメカニズム

変異PS1と小胞体ストレスとの関連性に着目し、小胞体に特異的にストレスを負荷する薬剤で細胞を処理したときの細胞死の程度を野生型PS1と変異PS1を発現する細胞で比較してみた。変異PS1を発現する細胞は野生型PS1を発現する細胞よりも明らかに小胞体ストレス感受性が増大し、すみやかに細胞死を起こした(図1 - A)。

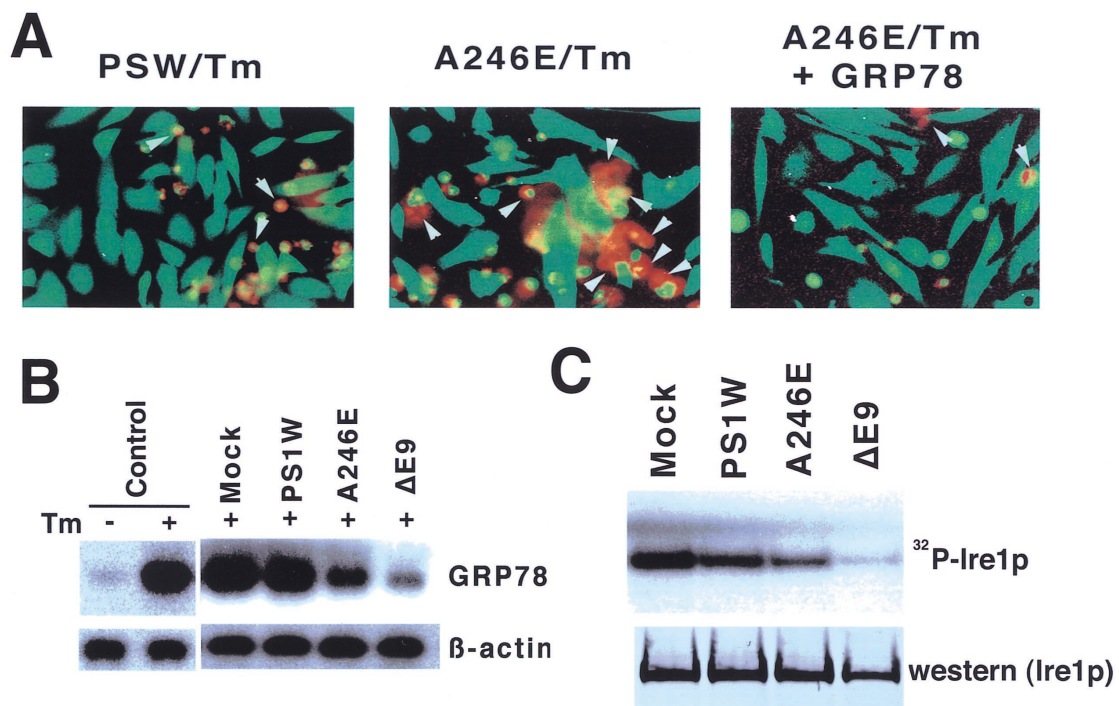


図 1

正常細胞あるいは野生型PS1を発現する細胞では、小胞体ストレスにตอบสนองしてGRP78 遺伝子の強い発現誘導がみられる。それに対し、変異PS1を発現する細胞では明らかにその誘導が減弱していた(図1 - B)。つまり、変異PS1はGRP78 遺伝子の発現に対し、負に制御している可能性がある。

変異PS1を発現する細胞にあらかじめGRP78遺伝子を導入しておき、その後

に小胞体ストレスを負荷し、細胞死から救済できるか否かをみてみた。するとGRP78の遺伝子導入により変異PS1発現細胞では明らかに小胞体ストレスに対して抵抗性を示すようになり、野生型PS1を発現する細胞と同等の抵抗性にまで回復した(図1 - A)。以上から、変異PS1によって起こる細胞死は小胞体分子シャペロンの発現誘導の減弱が原因であると考えられた。

GRP78遺伝子発現は小胞体のストレスセンサーであるIre1の自己リン酸化が引き金になる。変異PS1を発現する細胞のIre1リン酸化レベルを測定したところ、明らかに正常細胞よりもそのレベルが低下していた(図1 - C)。

以上から、PS1のミスセンス変異は分子シャペロン群の発現誘導システム(Unfolded Protein Response)に障害を与え、各種細胞ストレスに対し感受性を増大させることが明らかとなった。

(2) 孤発性AD患者脳に発現するPS2スプライシング変種

PS2Vがコードする蛋白質は、エキソン5を欠失することによって野生型PS2のN末端119個のアミノ酸に5つのアミノ酸(SSMAG)を付加した124個のアミノ酸からなる。PS2Vに対する特異的な抗体を作成し、免疫組織化学的にその発現を解析した。アルツハイマー病で特に変性が強く起こる海馬および大脳皮質で、PS2Vは神経細胞に発現していた。興味深いことにPS2V免疫陽性細胞の多くは細胞体の萎縮や神経突起の変性像を示した。中には変性した神経細胞の細胞質に形成された封入体に強いPS2Vの免疫陽性反応がみられるものもあった。

これまで検査したアルツハイマー病患者10例の脳で、100%の頻度でこの蛋白質の発現が確認できている(表1)。一方、コントロール例では6例中1例で極めて弱い免疫反応陽性の神経細胞を認めたが、他のコントロール例では全く発現が認められていない。今後さらに例数を増やして、その発現がアルツハイマー病に特異的に起こる現象なのか否かを確認していく必要がある。

PS2V由来の蛋白質の機能を調べる目的で、PS2Vを構成的に発現する細胞を作製した。PS2Vは、PS1と同じように主に小胞体に局在していることから、小胞体ストレスに対する感受性にどう影響を与えるかを検討した。その結果、予想されたようにやはりストレス感受性が増大し、正常細胞より明らかに早く死滅していくことがわかった。そして、このときのIre1のリン酸化レベルは低下し、分子シャペロンの発現が著しく減少していた。従って、PS2Vは変異PS1と同様な機能を有し、小胞体ストレスを増悪させることが明らかとなった。

表 1 . The expression of PS2V in AD brains

Patient No.	Diagnosis	Gender	Age	PS2V
1	C	M	83	-
2	C	F	81	-
3	C	F	90	+
4	C	F	74	-
5	C	M	78	-
6	C	M	79	-
7	AD	M	81	+++
8	AD	F	78	++
9	AD	F	82	+++
10	AD	M	82	+++
11	AD	M	64	+++
12	AD	F	75	+++
13	AD	F	78	+++
14	AD	F	74	+++
15	AD	F	76	+++
16	AD	F	65	+++

The PS2V was significantly more expressed in sporadic AD patients than controls.

AD; sporadic AD patient, C; age-matched control. Age shown is that at death.

+: ~30 positive cells / a specimen ++; 30~100 positive 100~ positive +++;

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Che YH, Tamatani M, Yamashita T, Gomi F, Ogawa S, Tohyama M. Changes in protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase mRNA following facial nerve transection. *J. Chem. Neuroanat.* 2000; 17:199-206.

Yamaguchi A, Hori O, Stern DM, Hartmann E, Ogawa S, Tohyama M. Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation. *J Cell Biol* 1999; 147:1195-1204.

Niitsu Y, Hori O, Yamaguchi A, Bando Y, Tamatani M, Ozawa K, Ogawa S, Tohyama M. Exposure of cultured primary rat astrocytes to hypoxia results in intracellular glucose depletion and induction of glycolytic enzymes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1999; 74:26-34.

Matsuzaki H, Tamatani M, Mitsuda N, Namikawa K, Kiyama H, Miyake S, Tohyama M. Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J. Neurochem.*

1999; 73:2037-2046.

Katayama,T., Imaizumi,K., Sato N., Miyoshi,K, Kudo,T., Hitomi,J., Morihara,T., Yoneda,T., Gomi,F., Mori,Y., Nakano, Y., Takeda,J., Tsuda,T., Itoyama, Y., Murayama,O.,Takashima,A., G.-Hyslop,P.S., Takeda,M. & Tohyama,M. Presenilin-1 mutation downregulates the signalling pathway of unfolded protein response. *Nature Cell Biology*, 1, 479-485 (1999).