

「脳を守る」
平成11年度採択研究代表者

垣塚 彰

(財)大阪バイオサイエンス研究所 部長)

「神経変性の分子機構解析に基づく新しい治療戦略の開発」

1. 研究実施の概要

本研究では、独自に開発した培養神経細胞及びトランスジェニックマウス・トランスジェニックショウジョウバエによる神経変性疾患（特にポリグルタミン病）のモデルシステムを用いて、現在治療法の全く無い神経変性疾患の治療及び発症予防のための新しい方法論を開発することを目指している。神経変性疾患は、その症状の多様性から疾患ごとに特有な分子機構に基づいて発症すると考えられてきたが、近年の分子解析の結果、多くの疾患に共通の分子機構が存在することが想定されはじめた。とすれば、一つの疾患モデルを徹底的に解析することにより、一見異なる複数の神経変性疾患に共通する神経細胞変性の分子機構を解明すること、さらに、その共通な部分を治療のターゲットとすることによって、複数の疾患を総括的に治療しうる画期的な治療法開発に繋がることを期待できる。そのために、神経細胞死における細胞死シグナル、生のシグナルを順次解明し、その知見をポリグルタミン病の疾患モデルの解析に応用する。そして、ポリグルタミン病のモデルシステムから見いだされた分子機構を別の疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症等）モデルで検討することによって、疾患間での分子機構の詳細な比較が可能となり、多くの神経変性疾患の総合的な理解・治療に向けて多大な貢献がもたらされると考えている。

2. 研究実施内容

<ポリグルタミン病解析グループ>

(1) 培養神経細胞PC12を用いた神経細胞死の生化学的解析

培養神経細胞PC12に同調してハンチントン舞踏病、Machado-Joseph病などの原因となる伸長したCAGリピートから翻訳されるポリグルタミンを発現誘導させると、ポリグルタミンは核内のPML bodyに凝集体を形成し、それに続いて細胞死が引き起こされた。そして、その核内凝集体に一致して活性化されたSEK1が見出され、さらに、ドミナントネガティブSEK1は細胞死を抑制した。PML bodyは、以前に垣塚らが急性前骨髄球性白血病(APL)の原因となるPML-RARの細胞内標的部位として同定した核内のサブドメインであり、また、近年

報告されたPml遺伝子のノックアウトの解析から、PMLもしくはPML bodyは、UV、インターフェロン、TNF、Fas、セラミド等が引き起こす細胞死に極めて重要な役割を果たすことが示されている。以上の結果から、核内PMLbodyで凝集したポリグルタミンによりSEK1を介する細胞死シグナルが活性化・伝達され神経細胞死が誘導されること、そして、PML bodyは細胞死シグナルを伝達する重要な場となっている可能性が考えられた。

(2) ドロソフィラの遺伝学的解析手法を用いた神経細胞死に関与する遺伝子群の同定・解析

ポリグルタミンが引き起こす細胞死のシグナル伝達に関わる遺伝子を同定する目的で、ドロソフィラの複眼原基特異的プロモーターを使用し、ポリグルタミンを発現させたトランスジェニックショウジョウバエを作製した。このトランスジェニックショウジョウバエでは光受容体細胞と色素細胞の欠失、個眼の融合及び複眼の陥凹を伴う複眼の変性が観察された。続いて、染色体上の種々の欠失した領域をもつ変異体約200系統を用いてこのトランスジェニックショウジョウバエの遺伝的交差の解析を行い、複眼の変性を増強する系統と変性を抑制する系統を複数得、現在、これらの責任遺伝子の同定・解析を行っている。

<死のシグナル伝達解析グループ>

多様なアポトーシス誘導刺激のシグナル伝達機構として働くことが明らかになりつつあるASK1-MAPキナーゼ系の分子制御機構の解析を通じて、神経細胞におけるASK1を介した死と分化のシグナル伝達経路の機構解析を行い以下の結果を得た。

(1) 神経細胞死におけるASK1-MAPキナーゼ系の検討。

神経細胞死のin vitroモデル系として、まずNGF依存性神経細胞（上頰交感神経細胞（SCGs）ならびにNGFによって交感神経様に分化誘導したPC12細胞）からのNGF枯渇によって誘導される細胞死におけるASK1-MAPキナーゼ系の役割を検討した。その結果、1)PC12細胞においてNGF除去によりASK1-MAPキナーゼ系が速やかに活性化され、2)SCGsならびにNGFによって分化したPC12細胞にASK1のドミナントネガティブ変異体を導入し、その細胞死への阻害効果によってNGF除去による神経細胞死におけるASK1-MAPキナーゼ系の必要性を検討したところ、予想通りこれらの細胞死が部分的に抑制され、3)構成的活性化型ASK1をSCGsならびにNGFによって分化したPC12細胞に過剰発現させると顕著なアポトーシス誘導が観察された。以上のことから少なくとも神経細胞において神経栄養因子枯渇による細胞死にASK1-MAPキナーゼ系が深く関わっていることが示唆された。

(2) 神経細胞分化におけるASK1-MAPキナーゼ系の検討。

NGFによって分化したPC12細胞とは異なり、未分化PC12細胞においては構成的活性化型ASK1を発現させると顕著な神経突起の伸張が誘導されるとともに、ニューロフィラメントのリン酸化、Tauならびにtubulin IIIの発現上昇が認められ、神経細胞への分化が誘導されることが明かとなった。さらにASK1による未分化PC12細胞の分化誘導はp38阻害剤であるSB203580によって阻害されることから、ASK1の下流で分化誘導に働く分子としてp38が必要であることが示唆された。さらにASK1によって分化したPC12細胞は、血清非存在下でも長期に生存が維持されることが判明し、ASK1が分化のみならず、このような条件下では生存シグナルも仲介しうることが示唆された。一方、アデノウイルスベクターを用いて構成的活性化型ASK1を未分化PC12細胞に過剰に発現させた場合には、NGFによって分化したPC12細胞と同様にJNKの活性化とともに細胞死が誘導された。これらの結果は、ASK1の作用が細胞の種類や分化状態によって異なりうることを示唆するとともに、ASK1の活性化の程度によって同一の細胞でも全く異なる反応性をもつことが示唆された。

< 生のシグナル伝達解析グループ >

(1) 小脳顆粒細胞の生存促進シグナル伝達の解析

小脳顆粒細胞は、IGF-I (insulin-like growth factor-I)、BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)、細胞内cAMPを上昇させる薬剤 (forskolin)、脱分極刺激 (高濃度KCl処理) などにより、その生存が促進される。脱分極刺激は、神経の電気的興奮を模倣していると考えられ、またIGF-I、BDNFは小脳顆粒細胞のターゲットであるプルキンエ細胞が生産する。従って、これらの生存促進因子は生体内で「機能的な」小脳顆粒細胞 (脱分極するか、あるいはターゲットに接続している神経) を選択するのに役立っていると考えられる。IGF-Iによる生存促進効果は、PI3キナーゼ- Akt経路を介していることが既に明らかになっている。我々は、BDNFによる生存促進が、MAP kinase 経路とPI3 kinase-Akt経路の両方に依存していることを見いだした。cAMPはこれまでに直接のターゲットとしてPKA (protein kinase A)、cAMP-GEF、cAMP-gated channelが報告されている。cAMP-GEFはRap1-RafBを介してMAP kinase 経路を活性化するので、cAMPによる生存促進効果がMAP kinase経路を介している可能性がある。

しかしcAMPによる生存促進効果はPKAを介しており、MAP kinase経路とPI3 kinase 経路は必要ないことが明らかになった。一方、IGF-I-PI3 kinase経路による生存促進効果にはMAP kinase 経路もPKA経路も必要ない。従って、PI3 kinase-Akt経路、cAMP-PKA経路は独立に生存を促進していることが示された。

次に、AktとPKAの生存促進におけるターゲットを検索した。bcl-2 familyのひ

とつBadがPKAで直接リン酸化されることが示されていたが、我々は、アポトーシス誘導の中心的な役者であるcaspase-9が、AktとPKAによってin vitroでリン酸化されること、リン酸化によってcaspase-9のプロテアーゼ活性が低下することが明らかになった。caspase-9過剰発現によるアポトーシスは、AktまたはPKAの共発現によって抑制された。以上のことは、caspase-9がAktとPKAの生存促進におけるターゲットの一つであることを示唆していると考えられた。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

< ポリグルタミン病解析グループ >

Sanchez, I., Xu, C.-J., Juo, P., Kakizuka, A., Blenis, J., & Yuan, J. Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron* 22: 623-633, 1999

Ogasawara, Y., Hanazono, Y., Kodaira, H., Urabe, M., Mano, H., Kakizuka, A., Kume, A., Ozawa, K. Potential application of dominant negative retinoic acid receptor genes for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Gene Therapy Molec. Biol.* 3: 293-300, 1999

Yasuda, S., Inoue, K., Hirabayashi, M., Higashiyama, H., Yamamoto, Y., Fuyuhira, H., Komure, O., Tanaka, F., Sobue, G., Tsuchiya, K., Hamada, K., Sasaki, H., Takeda, K., Ichijo, H., & Kakizuka, A. Triggering of neuronal cell death by accumulation of activated SEK1 on nuclear polyglutamine aggregations in PML bodies. *Genes to Cells* 4: 743-756, 1999

垣塚 彰

伸長したCAG リピート：遺伝性神経変性疾患と精神疾患に共通する遺伝子変異？

実験医学 17: 779-787, 1999.

垣塚 彰 遺伝性神経変性疾患の発症における共通分子機構と治療への展望
細胞工学 18: 782-788, 1999

垣塚 彰 保田真吾 ポリグルタミン病：CAGリピートが引き起こす細胞死
細胞工学 18: 790-795, 1999

< 死のシグナル伝達解析グループ >

Fujii, M., Takeda, K., Imamura, T., Aoki, H., Sampath, T.K., Enomoto, S., Kawabata M., Kato, M., Ichijo, H. and Miyazono, K. Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol. Biol. Cell*, 10: 3801-3813, 1999

Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K. and Mizutani, S.

Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21Cip1/WAF1 in monocytic differentiation. *EMBO J.* 18: 1223-1234, 1999

Wang, T.H., Popp, D.M., Wang, H.S., Saitoh, M., Mural, J.G., Henley, D.C., Ichijo, H. and Wimalasena, J. Microtubule dysfunction induced by paclitaxel initiates apoptosis through both c-jun N-terminal kinase (JNK)-dependent and -independent pathways in ovarian cancer cells.

J. Biol. Chem. 274; 8208-8216, 1999

Chen, Z., Seimiya, H., Naito, M., Mashima, T., Kizaki, A., Dan, S., Imaizumi, M., Ichijo, H., Miyazono, K. and Tsuruo, T. ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress.

Oncogene 18: 173-180, 1999

Nakahara, S., Yone, K., Sakou, T., Wada, S., Nagamine, T., Niiyama, T. and Ichijo, H. Induction of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) after spinal cord injury in rats: possible involvement of ASK1-JNK and -p38 pathways in neuronal apoptosis.

J. Neuropathol. Exp. Neurol. 58: 442-450, 1999

Yamamoto, K., Ichijo, H. and Korsmeyer, S.J. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/JNK pathway normally activated at G2/M.

Mol. Cell Biol. 19: 8469-8478, 1999

Ichijo, H. From receptors to stress-activated MAP kinases.

Oncogene 18: 6087-6093, 1999

Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H. and Kyriakis, J.M.

Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor Thioredoxin.

Mol. Cell Biol. 20: 2198-2208, 2000

Kanamoto, T., Mota, M., Takeda, K., Rubin, L.L., Miyazono, K., Ichijo, H. and Bazenet, C.E. Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal Kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons.

Mol. Cell Biol. 20: 196-204, 2000

Takeda, K., Hatai, T., Hamazaki, S., Nishitoh, H., and Saitoh, M. and Ichijo H.

Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1) Induces Neuronal Differentiation and Survival of PC12 Cells.

J. Biol. Chem. 275: 9805-9813, 2000

西頭英起、一條秀憲

MAPキナーゼキナーゼの活性化機構 - ASK1を制御する分子とメカニ

- ズム -
- 実験医学 17: 105-112, 1999
- 澤田泰宏、一條秀憲 TGF- β 、アクチビン
- 「最新骨粗鬆症」折茂 肇、須田立雄、井上哲郎 他編
- ライフサイエンス出版 209-212頁 1999
- 西頭英起、一條秀憲
- TNFおよびFasシグナルにおけるASK1の活性化を制御する分子と機構
- 臨床免疫 31: 584-592, 1999
- 一條秀憲 細胞はいかにして死を迎えるか？
- 日本歯科医師会雑誌 52: 131-137, 1999
- 一條秀憲 アポトーシスのメカニズム THE BONE 13: 39-45, 1999
- 西頭英起、一條秀憲 MAPK, JNK, p38, PKCのキナーゼアッセイ
- 「新アポトーシス実験法」辻本賀英, 刀弥重信, 山田武 編 羊土社 180-184
- 1999
- 一條秀憲
- アポトーシスの細胞内分子メカニズムの解明が疾患の診断・治療に役立つ
- 日経サイエンス 29: 60, 1999
- 澤田泰宏、一條秀憲 TGF- と骨代謝 Osteoporosis Japan 7: 378-379, 1999
- 井下聖司、一條秀憲 アポトーシスにおけるキナーゼASK-1の役割
- 「臨床遺伝子学'99 - 免疫研究の最前線 - 」最新医学 54: 2321-2329, 1999
- 一條秀憲 アポトーシスの制御機構 循環 20, 14-20, 1999
- 山本一仁、一條秀憲 アポトーシスを制御するシグナル伝達
- 「細胞内シグナル伝達がわかる」山本雅, 秋山徹 編 羊土社 97-103頁 1999
- <生のシグナル伝達解析グループ>
- H. Kawasaki, H. Fujii, Y. Gotoh, T. Morooka, S. Shimohama, E. Nishida and T. Hirano. Requirement for mitogen-activated protein kinase in cerebellar long term depression.
- J. Biol. Chem. 274: 13498-13502, 1999
- 後藤由季子 細胞の生存シグナル伝達 実験医学 17: 1919-1924, 1999
- 増山典久、後藤由季子 神経細胞のアポトーシス制御 細胞工学 8: 1024-1025, 1999