

脳神経系における小胞体ストレス応答機構の解析と精神疾患治療基盤の創生

宮崎大学大学院 医学部 解剖学講座 分子細胞生物学分野
齋藤 敦

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

小胞体で行われるタンパク質の折り畳みが、細胞内外からの各種ストレスにより攪乱された状態を小胞体ストレスという。細胞にとって小胞体機能異常は極めて重篤な事態で、直ちに小胞体膜上に存在する小胞体ストレスセンサー (PERK, IRE1, ATF6) を介して、防御機構である小胞体ストレス応答が活性化し、小胞体内腔に蓄積した異常タンパク質を排除することで細胞死から防御する。各種神経変性疾患ではこの防御機構が破綻して、異常タンパク質の蓄積を招き、神経細胞死につながる事が明らかにされており、さらに近年、躁鬱病等の精神疾患にも小胞体ストレスが関与する可能性が示唆されている。躁鬱病や自閉症などの精神疾患の根本治療法確立には小胞体ストレス応答を人為的に制御する技術の開発・応用が必要である。

我々はこれまで小胞体機能障害から起こる細胞死のメカニズムや各種の疾患発症と小胞体ストレスとの関連性について研究を進めてきた (Saito, et al., *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, Chihara and Saito, et al., *J. Neurochemistry*, 2009)。小胞体ストレスから細胞を防御する因子の同定を試み、アストロサイトと骨芽細胞に特異的に発現する小胞体ストレスセンサー OASIS (Saito, et al., *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007) 及び神経細胞と軟骨細胞に発現する BBF2H7 (Kondo, Saito, et al., *Molecular and Cellular Biology*, 2007) の同定に成功した。各センサーの生体内での役割を明らかにするためノックアウトマウスを作成すると、OASIS 欠損マウスでは骨芽細胞機能障害による骨形成不全 (Murakami, Saito, et al., *Nature Cell Biology*, 2009) が、BBF2H7 欠損マウスでは軟骨細胞機能障害による軟骨形成不全 (Saito, et al., *Nature Cell Biology*, 2009) が観察された。このように助成金交付者が発見した新規小胞体ストレスセンサー OASIS 及び BBF2H7 は、従来から知られていた小胞体内の不良タンパク質を排除し細胞を危機的状态から回避させるためのシステムではなく、特定の細胞の分化・成熟に重要な役割を果たしていることが明らかになった。OASIS 及び BBF2H7 は骨・軟骨細胞だけでなく、中枢神経系ではアストロサイト及び神経細胞に発現していることを明らかにしている。最近、幼若期における神経ネットワーク形成異常が各種の精神疾患発症に関与する可能性が数多く報告されている。しかし、その分子機構については解明されていない部分が多い。本研究では、OASIS 欠損マウスを用いて中枢神経系における細胞の分化・成熟制御機構を解析することで、精神疾患発症メカニズム解明の糸口を探り、精神疾患の根本治療法の確立に向けて小胞体ストレス応答を人為的に制御する技術の開発・応用を目指す。小胞体機能を起点とする精神疾患研究は独創性に富み、本研究領域を飛躍的に発展させる可能性を秘めた内容である。

2. 方法

本プロジェクトで解明するポイントは大きく3つである。1) 小胞体ストレス応答による細胞分化制御の分子機構解明、2) 小胞体ストレス応答による神経ネットワーク形成の分子機構解明、3) 小胞体機能改善を標的とした精神疾患治療薬の開発である。

1) 小胞体ストレス応答による細胞分化制御の分子機構解明：

小胞体ストレスが起こると、小胞体ストレスセンサーがこれを感じ、シグナル伝達分子を介して情報が伝達され、最終的に小胞体機能の改善につながる。本研究では OASIS から発信される小胞体ストレス応答シグナルによる細胞分化制御機構を、初代培養神経前駆細胞を用いて解析した。

2) 小胞体ストレス応答による神経ネットワーク形成の分子機構解明：

1) で発見したキーとなる分子がアストロサイトや神経細胞の分化・成熟及びアストロサイトー神経細胞相互作用に果たす役割について明らかにするため、免疫組織染色によって神経細胞軸索の伸長や形態を観察した。

3) 小胞体機能改善を標的とした精神疾患治療薬の開発 :

我々はすでに分子シャペロン誘導剤である BIX (BiP Inducer X) の開発に成功している。我々が開発した BIX 及びケミカルシャペロン 4-PBA の投与によって小胞体から発信されるシグナルを制御し、中枢神経系細胞の生存や分化にどのような影響がみられるかを RT-PCR、リアルタイム PCR 及びアポトーシス細胞のカウントによって検討した。

3. 結果 研究成果

1) 小胞体ストレス応答による細胞分化制御の分子機構解明 :

胎生期 14.5 日目の野生型及び OASIS 欠損マウスの大脳より神経前駆細胞を採取し、BMP2 及び LIF を添加することで神経前駆細胞からアストロサイトへの分化を誘導し、神経前駆細胞及びアストロサイトのマーカーの発現レベルを RT-PCR によって解析した。その結果、OASIS 欠損細胞では神経前駆細胞からアストロサイトへの分化が野生型と比較して遅延していることが明らかになった。さらに転写因子 OASIS の中枢神経系における標的遺伝子を同定することを試みた結果、ショウジョウバエにおいてアストロサイトへの分化を決定する因子である Gcm1 の発現レベルが OASIS 欠損細胞で低下していた。OASIS 欠損細胞に Gcm1 を発現させることで、OASIS 欠損細胞で観察されたアストロサイトへの分化遅延は改善された。さらに DNA メチル化解析によって、Gcm1 がアストロサイトのマーカー遺伝子である GFAP のプロモーター領域における脱メチル化を促進させることで、アストロサイトへの分化を誘導することを明らかにした。

2) 小胞体ストレス応答による神経ネットワーク形成の分子機構解明 :

神経細胞の軸索進展及び形態を組織染色によって確認した結果、OASIS 欠損マウスでは野生型マウスと比較して軸索が短く、周辺に存在するアストロサイトも減少していた。これより、OASIS 欠損マウスでみられるアストロサイトの減少が、神経細胞の機能異常をもたらす、神経ネットワークの形成異常を引き起こしている可能性が強く示唆された。

3) 小胞体機能改善を標的とした精神疾患治療薬の開発 :

ヒト神経芽細胞 SK-N-SH 細胞に BIX を添加し、小胞体ストレス負荷剤タプシガルギンもしくはツニカマイシンで処理後、ヘキスト染色を行ってアポトーシスを起こしている細胞の数を測定した。その結果、BIX を添加した細胞はコントロール群と比較して、アポトーシスが抑制されていた。さらに小胞体から発信されるシグナルと細胞分化の関連性を明らかにするため、初代培養神経前駆細胞にケミカルシャペロンの一種である 4-PBA を添加し、小胞体ストレス応答シグナルを抑制すると、神経前駆細胞からアストロサイトへの分化の遅延が見られた。

4. 考察 まとめ

小胞体ストレスセンサー OASIS から発信されるシグナル経路の解析によって、神経前駆細胞からアストロサイトへの分化過程で転写因子 OASIS が Gcm1 の発現を介して、アストロサイトマーカー遺伝子である GFAP プロモーター領域における脱メチル化を促進することで神経前駆細胞からアストロサイトへの分化を誘導することが明らかになった。小胞体ストレス応答シグナルが各種細胞の分化制御に関わることが現在明らかになりつつある。しかしながら中枢神経系の細胞における、小胞体から発信されるシグナルによる細胞分化制御機構に言及した報告は皆無であった。また、小胞体ストレス応答シグナルが細胞分化だけでなく、細胞の系譜を決定するポイントで重要な役割を担っていることを本研究で初めて証明した。これは小胞体機能と中枢神経系における細胞の分化・成熟と、神経ネットワーク構築の関連性の全貌を明らかにする上で、大きな進展であるといえる。

さらに神経細胞の形態観察により、OASIS 欠損マウスでは神経細胞を支持するアストロサイトが減少したために神経細胞の軸索伸長が悪く、正常なアストロサイト-神経細胞の細胞間相互作用に異常をきたしていることを明らかにした。また、シャペロン誘導剤 BIX 及びケミカルシャペロン 4-PBA による *in vitro* 実験から、小胞体ストレス応答シグナルが神経細胞の生存や神経前駆細胞からアストロサイトへの分化促進に重要な役割を果たしていることを見出した。今後は小胞体機能の破綻による神経ネットワークの異常がヒト精神疾患の発症をもたらすか否かを、シナプス形成やマウス行動実験の観点から明らかにする必要がある。また、遺伝子多型解析や遺伝子変異解析を行うことで、OASIS と精神疾患発症の関連性をより深く追求する必要がある。

小胞体ストレス応答シグナルとヒト精神疾患発症の関連性を明らかにした上で、小胞体機能制御薬剤の臨床薬としての応用を模索することも重要である。現在、培養細胞レベルでは BIX による小胞体機能改善効果を明らかにすることができたが、マウスを用いた急性毒性試験では痙攣や呼吸不全など、いくつかの重要な毒性症状が確認されている。これより、BIX をそのままヒトに対する臨床薬として使用するには毒性が強過ぎる。今後は BIX を元にしたリード化合物を開発することで、

より安全域が広く、BIX よりも薬効が期待できる化合物を作成し、精神疾患治療に向けた現実的な戦略を構築することが望まれる。

5. 発表論文、参考文献

現在、研究成果をまとめ、学術雑誌に投稿中である。