

筋萎縮性側索硬化症の病態分子メカニズムの解明

宮崎大学 医学部 機能生化学分野
西頭 英起

1. はじめに

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、現在までに家族性 ALS における SOD1 遺伝子の変異は 100 種類以上が報告されている。変異型 SOD1 による ALS 発症の原因は変異型 SOD1 が新たに獲得した細胞障害機能によるが、その具体的な内容については未だ不明である。我々は、MAPK kinase の一つである Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1)の役割について様々な側面から解析を進めてきた。そのなかで、いくつかの神経変性疾患において、ASK1 が神経細胞死において重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。例えば、アルツハイマー病においては、アミロイド β によって細胞内で活性酸素種が産生され、これによって活性化した ASK1 を介して細胞死が起こることが明らかになった。ハンチントン舞踏病や脊髄小脳失調症に代表されるポリグルタミン病のモデル実験においても、その神経細胞死における ASK1 の役割を明らかにしている。これらのことから、ASK1 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、比較的共通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。現在までのところ、家族性 ALS の原因である変異型 SOD1 の発現によって生じるアポトーシスおよび細胞内シグナル伝達系の変化における MAPK ファミリーの役割については、変異型 SOD1 トランスジェニックマウスの脳および脊髄や ALS 患者の脊髄において ERK1/2 や p38 の発現量の増加およびそのリン酸化の亢進が観察されたという報告があるが、ALS における MAPK ファミリーの必要性を示す報告は皆無であり、そのシグナル伝達経路における役割については全く解明されていない。以上をふまえ、本研究では、家族性 ALS の原因である変異型 SOD1 が運動神経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を行った。

2. 方法および結果

1) 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って活性化され、その活性化が細胞死に関与することが知られており、また、ポリグルタミン鎖やアミロイド β のような異常タンパク質の蓄積によっても活性化されることが報告されている。一方変異型 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 が関与している可能性について検討するため、変異型 SOD1 が ASK1 を活性化しうるかどうかを調べた。NSC34 運動神経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 HA-ASK1 とを共発現させ、アデノウイルス感染から 2 日後に抗リン酸化 ASK(p-ASK)抗体を用いたウエスタンブロッティングにより ASK1 の活性を測定した。このとき同時に、抗 HA 抗体および抗 SOD 抗体によるウエスタンブロッティングから各条件における HA-ASK1 および各種 SOD1 の発現量に差がないことを確認した。NO によって ASK1 が活性化されることから NO ドナーとして知られる NOR1(1mM 5分)刺激による ASK1 活性化を陽性コントロールとして示した。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 の強い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において ASK1 の活性化が関与していることが示唆された。

2) 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

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、その比較により調べた。このとき、ASK1+/+マウス由来の細胞と ASK1-/-マウス由来の細胞とで各種 SOD1 の発現量に差がないことをウエスタンブロッティングにより確認した。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アデノウイルス感染より 5 日後、7 日後にみら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、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示された。

3. 考察

本研究は、ストレス MAPKKK ファミリーの一つである ASK1 に焦点を当て、家族性 ALS の原因である変異型 SOD1 の発現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。しかしながら、それがいかなる機序によるか、ASK1 の活性化がどのようにして運動神経細胞死を引き起こすか、という点は今後の課題である。ASK1 は、その下流の MAPK 経路である MKK4/7-JNK 経路および MKK3/6-p38 経路の選択的な強い活性化を惹起するとともに、cytochrome c の放出や caspase-3 および caspase-9 の活性化を介してアポトーシスを引き起こすことが示されている。変異型 SOD1 を過剰発現するトランスジェニックマウスの脊髄においても caspase-3 および caspase-9 の活性化ならびに cytochrome c の放出が観察されており、ASK1 依存性経路との共通性も認められている。また、変異型 SOD1 を過剰発現するトランスジェニックマウスの脊髄において、p38 のリン酸化の亢進が認められるとの報告があり、これが ASK1 を介したものである可能性も考えられる。しかし一方で、ASK1 を介したアポトーシスにおいて JNK または p38 の活性化が必須か否かについては不明であることから、ASK1 が MKK4/7 または MKK3/6 以外の未知の分子を基質とし、JNK と p38 以外の経路を介してアポトーシスを引き起こしている可能性も考えられる。本研究で、ASK1 という一遺伝子のノックアウトにより変異型 SOD1 を原因とする家族性 ALS の病態の一つである運動神経細胞死を遅らせうるという示唆を得たことは、すなわち、ASK1 が家族性

ALS の治療のターゲットとなりうるということの意味するものであり、ASK1 の阻害薬により変異型 SOD1 を原因とする家族性 ALS を治療し、あるいは病態進展を抑制するという可能性を初めて示したことになる。今後 ASK1 の阻害薬が作製されれば、さらにこの点について研究を進めていくことができると期待される。

4. 発表論文

- [1] Y. Shimizu, I. Naguro, H. Nishitoh, H. Ichijo, Endoplasmic Reticulum Stress and Human Disease, (in press).
- [2] H. Kikuchi, M. Nakayama, F. Kuribayashi, S. Imajoh-Ohmi, H. Nishitoh, Y. Takami, T. Nakayama, J. Leukoc. Biol. (in press)
- [3] K. Yamaguchi, K. Takeda, H. Kadowaki, I. Ueda, Y. Namba, Y. Ouchi, H. Nishitoh, H. Ichijo, Biochim. Biophys. Acta. 1830 (2013) 3656-3663.
- [4] H. Kadowaki, H. Nishitoh, Genes, 4 (2013) 306-333.
- [5] K. Homma, T. Fujisawa, N. Tsuburaya, N. Yamaguchi, H. Kadowaki, K. Takeda, H. Nishitoh, A. Matsuzawa, I. Naguro, H. Ichijo. Mol. Cell 52 (2013) 75-86.
- [6] I. Naguro, T. Umeda, Y. Kobayashi, J. Maruyama, K. Hattori, Y. Shimizu, K. Kataoka, S. Kim-Mitsuyama, S. Uchida, A. Vandewalle, T. Noguchi, H. Nishitoh, A. Matsuzawa, K. Takeda, H. Ichijo, Nat. Commun. 3 (2012) 1285.
- [7] T. Fujisawa, K. Homma, N. Yamaguchi, H. Kadowaki, N. Tsuburaya, I. Naguro, A. Matsuzawa, K. Takeda, Y. Takahashi, J. Goto, S. Tsuji, H. Nishitoh, H. Ichijo, Ann. Neurol. 72 (2012) 739-749.
- [8] T. Sato, Y. Sako, M. Sho, M. Momohara, M.A. Suico, T. Shuto, H. Nishitoh, T. Okiyoneda, K. Kokame, M. Kaneko, M. Taura, M. Miyata, K. Chosa, T. Koga, S. Morino-Koga, I. Wada, H. Kai, Mol. Cell, 47 (2012) 99-110.
- [9] H. Nishitoh. J. Biochem. 151 (2012) 217-219.
- [10] H. Kikuchi, F. Kuribayashi, S. Imajoh-Ohmi, H. Nishitoh, Y. Takami, T. Nakayama, J. Biol. Chem. 287 (2012) 39842-39849.