

「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

#### ストレス蛋白グループ

脳虚血により引き起こされる病的状態の代表は低酸素である。脳血管障害における神経細胞死は当然低酸素により誘導されるが、それに加え我々はアルツハイマー病における神経細胞死も低酸素により誘導される事を明らかとした。さらによりヒトの病態に近いと考えられる慢性の虚血環境でも神経保護作用を持つことを示してきた。我々は低酸素をキーワードとする両疾患の神経細胞死の分子機序を明らかとすることに成功しつつある、現在、その機序の制御を通じた神経細胞防御をめざしている。

#### アルツハイマーグループ

##### アルツハイマー病の神経細胞死防御機構の開発

我々は、家族性アルツハイマー病ではプレセニリン1変異体が、孤発性アルツハイマー病(SAD)ではプレセニリン2のスプライシング変種(PS2V)がそれぞれ細胞内小器官である小胞体の機能不全を引き起こすことを明らかとした。すなわち小胞体特異的なストレス(小胞体ストレス)時、小胞体に蓄積する不良タンパク質の処理機構である小胞体ストレスセンサー群(IRE1、ATF6、PERK)の活性化機構を障害することによって、ストレスに対し感受性が増大することが病態発症につながることを明らかにした。SADにおいてはPS2Vを産生する異常なスプライシングを引き起こす因子の同定を試みたところ、既知の蛋白質HMG-Iが同定された。HMG-IはDNA結合蛋白質として知られ種々のストレス時に各種転写因子の増強因子として働くことが知られているが、PS2のpre-mRNAに結合してスプライシング異常を引き起こすことを本研究によって世界で初めて見つけ出した。詳細な解析からHMG-IがPS2エクソン5に結合すると異常スプライシングが引き起こされる機構が明らかとなりその結合を阻害することによって細胞死が救えるか否かについて検討し、AD治療への可能性を示した。

#### 再生・機能修復グループ

哺乳類では大人の中枢神経は再生しないといわれてきた。その理由のひとつとして、一旦損傷された軸索が再び伸展しないことが古くから知られているが、このメカニズムについては明らかでは

ない。本研究では、神経回路を再形成することにより、中枢神経損傷による機能障害を修復させる戦略を開発することを目標とし、神経再生阻害因子ならびに軸索誘導因子の単離、機能解析を行った。myelin associated glycoprotein (MAG)は再生阻害因子であるが、我々はニューロトロフィン受容体 p75 が MAG 受容体であることを見出し、MAG による Rho の活性化により神経突起の伸展を抑制していることを示した。さらにこのシグナルを阻害するペプチドを開発した。また軸索誘導に関与する新規の遺伝子 FIR を単離した。その機能解析をおこなった結果、FIR は Rac に対する guanine nucleotide exchange factor であり、海馬の神経細胞の突起伸展を抑制することが明らかになった。一方、幼若ニューロンは阻害因子に対して不応性であることが知られている。この分子レベルでのメカニズムがわかれば、成熟ニューロンにも応用することができると考えられるが、本研究により細胞質に存在する p21(WAF1/Cip1)が Rho kinase を不活性化し、阻害物質による Rho の活性化刺激をその下流で止めるためであることを示した。これら一連の研究により、神経細胞の軸索誘導を司る共通の細胞内シグナルとして small GTPase が重要な役割を果たしていることが明らかになり、軸索再生治療のターゲットとして注目される。

## 2. 研究実施内容(研究目的、方法、結論などを記述)

### ストレス蛋白グループ

#### 1) 脳血管障害後の痴呆の救済

我々は ORP150 に関してトランスジェニックマウス(TG)およびノックアウトマウス(KO)を作成、虚血と興奮性アミノ酸の 2 つのパラダイムを用いた検討を行ってきた。しかしながらこれらはすべて急性ストレスモデルであり、ORP150 が、実際にヒトの病態で神経保護機作を發揮していることを証明するためには慢性ストレスモデルによる検討が不可欠である。ORP150 に関して、本年度は「慢性負荷」をキーワードに研究を進めた。我々は ORP150 以外に低酸素により特異的にアストロサイトで発現が上昇する新規因子 SERP1(特許申請済み)、Lon、SUP2 等を取得している。SERP1 については細胞生物学的検討を終了し、個体レベルでの実験を開始すべくノックアウトマウスの作成を完了した。また、アストログリア細胞より新規に同定されたミトコンドリアに局在する Lon についても細胞生物学的検討を完了した(図1)。

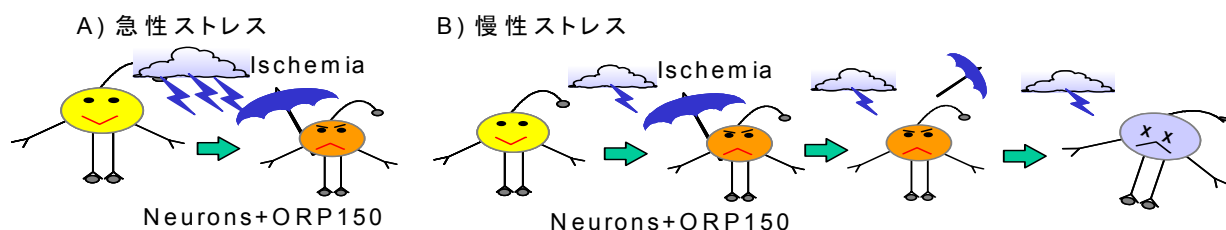


図1 アストログリア由来のストレス蛋白は慢性虚血から神経細胞を救えるか？

ORP150 に見られたようにグリア細胞由来のストレス蛋白は急性虚血から神経細胞を救うことができる。しかし、よりヒトの病態に近いと考えられる慢性ストレスにおいても、同様の考えで神経細胞に

耐性を賦与することができるのだろうか？

1) 小胞体分子シャペロン ORP150 は遅発性神経細胞死を抑制する。

砂ネズミの一過性総頸動脈結紮によって海馬 CA1 領域に遅発性神経細胞死 (DND) が起こり、この細胞死は虚血耐性を獲得させた個体では起こらない。ORP150 は虚血耐性を獲得した砂ネズミ CA1 領域に極めて強く発現し、また、あらかじめ CA1 領域にアデノウイルスベクターを用いて ORP150 を遺伝子導入することにより、神経細胞死を救済することができることを示した。DND では 1-2 週間で神経細胞死が完成する「慢性虚血性神経細胞死モデル」である。このパラダイムにおいても ORP150 は神経細胞死を抑制することが示された(図2)。

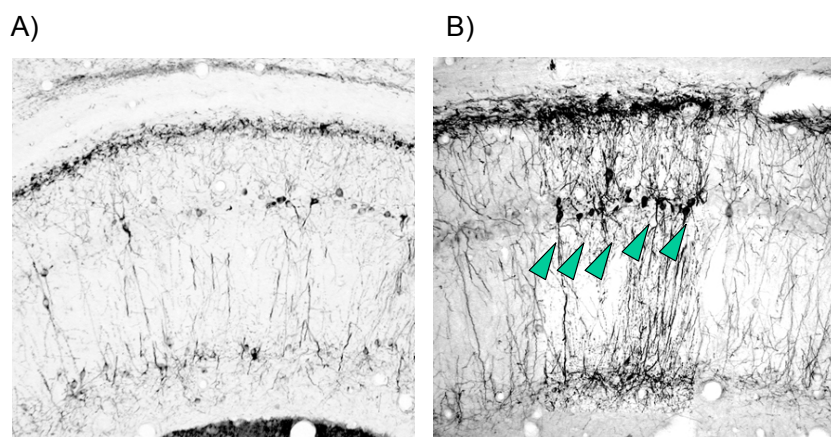


図2 ORP150 遺伝子治療による遅発性神経細胞死の抑制。

砂ネズミ海馬 CA1 領域に ORP150 をアデノウイルスベクターによって強制発現させたのち、総頸動脈結紮により遅発性神経細胞死を引き起こした。アデノウイルスを投与しない場合、海馬の神経細胞はほとんど死滅しているが(A)、ORP150 による遺伝子治療を行った場合、海馬領域の神経細胞が生き残っている(B、△で示した)。

砂ネズミ海馬 CA1 領域に ORP150 をアデノウイルスベクターによって強制発現させたのち、総頸動脈結紮により遅発性神経細胞死を引き起こした。アデノウイルスを投与しない場合、海馬の神経細胞はほとんど死滅しているが(A)、ORP150 による遺伝子治療を行った場合、海馬領域の神経細胞が生き残っている(B、△で示した)。

2) ORP150 は発生段階における神経細胞死を抑制する。

小胞体における小胞体ストレス応答は虚血や変性に伴う神経細胞死に関わることが明らかになっている。マウスにおける小脳発生では神経細胞死がおこることが知られているが、新規小胞体ストレス蛋白である ORP150 は、生後 4-8 日にかけて小脳、特にプルキンエ細胞に強く発現、GRP78、GRP94、HSP70 などとは異なった発現パターンを示した。ORP150 を過剰発現させたトランスジェニックマウス(TG)では、プルキンエ細胞に強い ORP150 の発現を認めるとともに、ORP150 ノックアウトヘテロ接合体(KO)では、その発現は明らかに減弱していた。野生型マウスでは生後4日をピークにプルキンエ細胞層で活性化型 Caspase-3 の免疫陽性細胞が見られた

が、TG では陽性細胞数が有意に減少していた。

Calbindin染色で評価したプルキンエ細胞数も生後4-20日にかけてTGで多く、KOで減少していた。また、グルタミン酸拮抗薬であるMK-801の投与により、TGと同様の傾向が再現された。ORP150は海馬神経において、グルタミン酸による細胞内Ca<sup>++</sup>上昇を抑え、細胞死を抑制することから小脳発生過程における神経細胞死にも小胞体を介する神経細胞死の関与が示唆される(図3)。

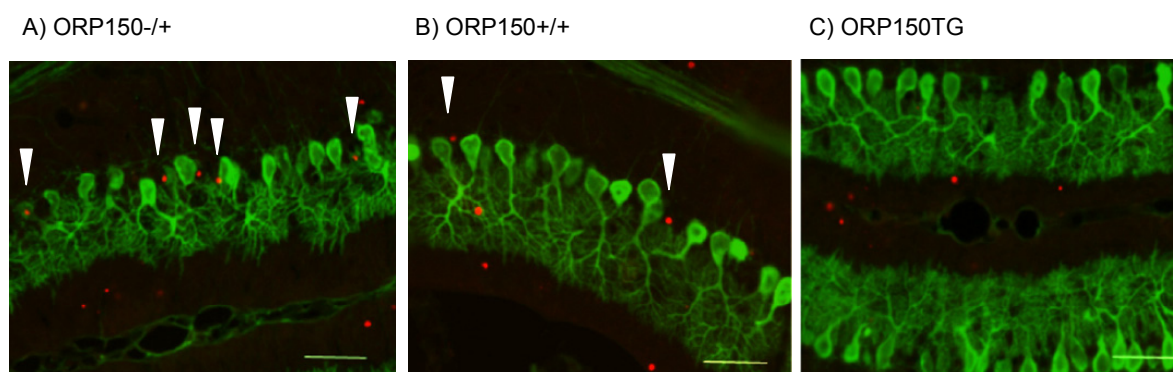


図3 ORP150 は発生段階での小脳神経細胞死を抑制する。

ORP150 ノックアウトマウスヘテロ接合体(ORP150-/+), 野生型(ORP150+/+), および ORP150 強制発現マウス(ORP150TG)における生後 6 日目の Calbindin(緑)、TUNEL(赤)二重染色像。

ORP150 発現量の少ないノックアウトマウスでは、小脳プルキンエ細胞に多くの TUNEL 陽性細胞が出現し、神経細胞死が加速していることを示している。これに対して、ORP150 発現量の多い ORP150TG では TUNEL 陽性細胞が観察されず、神経細胞死がほとんどおこっていない。以上の事実は発生のような慢性的なストレス環境でも ORP150 が神経細胞を救えることを示している。

### 3) SERP1 のノックアウトマウスの作成

SERP1 も低酸素暴露された培養アストログリアよりクローニングされた新規ストレス蛋白である。すでに SERP1 の細胞生物学的機能に関しては報告済みであるが、SERP1 の機能を実際の脳虚血の場において検討するため、SERP1 ノックアウトマウスを作成、すでに遺伝子変異体のホモ接合体を得ている。現時点では、慢性的に小胞体ストレスが存在すると考えられる膵臓β細胞でのインスリン産生低下が明らかとなっている(特許出願準備中)。

### 4) 新規ストレス蛋白 Lon (小胞体ストレスのミトコンドリアへのクロストーク)

低酸素暴露した培養ラットアストロサイトより、ミトコンドリア ATP 依存性プロテアーゼ Lon のラットホモログをクローニングした。Lon の発現は、虚血・低酸素、或いはいわゆる小胞体ストレスによって約 4 倍程度上昇した。ミトコンドリア蛋白に対する小胞体ストレスの影響を Cytochrome c oxidase (COX)の発現をモデルにして検討した所、小胞体ストレス下において、核 DNA 由来の COX IV 及び COX V の発現は抗原量で約 30%に低下し、ミトコンドリア DNA 由来の COX II は、発現量自身

に変化は認めず、その分解が亢進していた。細胞を蛋白合成阻害剤 cycloheximide(Cx)で処理することによっても COX サブユニットの発現に同様のアンバランスが生じ、Lon 或いは他のミトコンドリア ATP 依存性プロテアーゼである Yme1 の発現は上昇した。小胞体ストレスによる Lon の誘導は、蛋白合成抑制のシグナルを伝達する小胞体蛋白 PERK の KO 細胞では認められなかった。さらに、野生型或いはプロテアーゼ中心を変異させた Lon を過剰発現させると、小胞体ストレス下において COX II の、COX I を含む複合体への assembly は亢進し、brefeldin A 或いは低酸素によるミトコンドリアの障害は部分的にはあるが改善された。以上のことより、蛋白合成の抑制により小胞体ストレスはミトコンドリアに伝播されるが、同時にミトコンドリア ATP 依存性プロテアーゼが誘導され、少なくともその一部は分子シャペロンとして働き、ストレス下でのミトコンドリアの機能維持に役立っていると考えられた。

#### アルツハイマーグループ

1) 孤発性アルツハイマー病患者脳にみられる PS2 遺伝子スプライシング変種の制御に関する研究  
① 孤発性アルツハイマー病患者脳では PS2 遺伝子のエクソン 5 が欠損したスプライシング変種 (PS2V) が発現しており、このバリエーション由来の蛋白質を特異的に検出するポリクローナル抗体を作成し、免疫組織学的に孤発性アルツハイマー病脳での発現を検討したところ PS2V 蛋白質は 17 例中 17 例 (100%) に検出された。この成果については既に Journal of Biological Chemistry に掲載された。そこで、PS2 遺伝子の異常なスプライシングを引き起こす因子の同定を独自の pre-mRNA 結合実験法を構築し、試みたところ、低酸素刺激下の神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞の核抽出液中に PS2 pre-mRNA に結合する約 20 kDa 蛋白質が存在することを発見した。さらに、この結合蛋白質は PS2 pre-mRNA 中に存在する特徴的な配列に特異的に結合していることも明らかとした。

そこでこの結合蛋白質をその結合活性を指標に単離精製を行い、ペプチドシーケンスを行ったところ既知の蛋白質 HMG-I であることが分かった。HMG-I 蛋白質は DNA 結合蛋白質で、ある種の転写因子の一つとして知られていたが今回同定されたように pre-mRNA に結合してスプライシングに影響を与えていることを示した例は初めてである。この HMG-I 蛋白質について詳細な解析を行ったところ、低酸素刺激により核内で発現上昇 (speckle への蓄積) し、PS2 pre-mRNA エクソン 5 の 3' 末端にある特異的な配列に直接結合し、正常なスプライシングに必須のスプライシング調節因子 U1snRNP 構成蛋白質である U1-70K と結合して PS2pre-mRNA への結合を阻害して PS2V を産生させることを明らかにした。実際、HMG-I 蛋白質を SK-N-SH 細胞に強制発現させると PS2V の出現が確認された。そこで HMG-I が孤発性アルツハイマー病患者の脳に発現しているか否かを確認する目的で HMG-I 蛋白質を特異的抗体を用いて検出したところ HMG-I 蛋白質はコントロール脳に比べ孤発性 AD 脳内で有意に発現していることが確認できた。これら結果は、この蛋白質のまったく新しい機能を証明するものであると共に、孤発性 AD 発症メカニズム解明の大きな足がかりとなる可能性が示唆される。

## ② 孤発性アルツハイマー病治療薬開発標的としての可能性

上記のように PS2 pre-mRNA 上の特異的な領域に HMG-I が結合することによって小胞体機能障害を引き起こす原因蛋白質としての PS2V が産生されることから、HMG-I の PS2 エクソン 5 への結合阻害によって PS2V の産生抑制さらには小胞体ストレスによる細胞死を抑制する可能性を探索した。実際、HMG-I が PS2 の pre-mRNA に結合する特異的配列と同一の配列の RNA を合成して「おとり」として細胞内に導入しておくことで低酸素刺激によっても PS2V は産生されなかった。また、低酸素刺激あるいは HMG-I を予め細胞に導入しておいた細胞では単独では細胞死を引き起こさないツニカマイシン(小胞体ストレス)添加後、6 時間の時点でそれぞれ 20%、50% の細胞死が観察されるが、この細胞死に対して上記「おとり」RNA は導入量依存的に効果を示した。

この「おとり」が PS2V による神経細胞死を抑制することは AD 治療に結びつく結果であるが、HMG-I の RNA 結合部位を遮断することが HMG-I 本来の DNA 結合能力に影響を与えないかどうかを検討することは不可欠である。そこで HMG-I の DNA 結合能力に対して RNA 結合阻害剤である「おとり」の影響について検討を行っている。

以上の結果を 2 件の特許として出願し、論文も投稿済みである。

以上のことから我々は、PS2V の産生を抑制し、孤発性アルツハイマー病の根本的治療法開発に向け大きく前進したと考えている。今後は、HMG-I が低酸素刺激によって神経系の細胞でのみ発現上昇することを鑑み、神経系の細胞とそれ以外の細胞での HMG-I 発現メカニズムの違いを明らかにして、AD において神経細胞のみが何故選択的に脱落するのかを解き明かすヒントをつかみ、AD 以外の血管性痴呆症、その他の神経変性疾患における HMG-I の関わりについても明らかにしていく予定である。

## 2) ストレスセンサー群の活性制御に関する研究

これまでに家族性アルツハイマー病に関連したプレセニン1 (PS1) の変異体は小胞体 (ER) ストレス時、ストレスセンサー蛋白質 Ire1 の活性化を阻害し、下流へのシグナル伝達を減弱させ、GRP78 をはじめとする分子シャペロン群の誘導を抑制することによって神経細胞死を引き起こしやすくしていることを明らかにしてきた。そこで PS1 変異体が Ire1 の活性化を阻害するメカニズムは PS1 自身の働きが失われた結果であるのか、新たに獲得された異常な機能によるものかを見極めるために PS1 のノックアウトマウス由来細胞、PS1/PS2 ダブルノックアウト細胞、更には PS1 の  $\gamma$  セクレターゼ活性を失わせた変異体発現細胞を用いて ER ストレス後の GRP78 発現誘導と細胞死の程度を指標に検討した。いずれの細胞においても各々に設けた対照群、正常群に対する有意な差は認められなかった。一方、家族性アルツハイマー病に関連した変異体を発現する神経芽細胞種、ノックインマウス由来細胞においては ER ストレス後、対照群に比べ有意に GRP78 の発現誘導の減弱と脆弱性が認められた。更にこの現象は、Ire1 のみならず、ATF6、PERK といった他の ER ストレストランスデューサーの場合にも観察された。この結果は、変異 PS1 は Ire1  $\alpha$  を介する unfolded protein response (UPR) のシグナル伝達を障害させているだけでなく、ATF6 による分子シャペロンの誘導、PERK を介するタンパク質翻訳抑制のシグナル伝達にも影響を与えている可能性を示唆する。これ

らの結果はJournal of Biological Chemistry誌に掲載された。また、このようなUPR全体の減弱にPS1変異体がどのようなメカニズムによって寄与しているのかについて検討中であるが、手がかりとして、ERストレス特異的に活性化するカスパー12の活性化様式を調べており、Ire1からのシグナルがカスパー12の活性化につながることも明らかにし、Journal of Biological Chemistryに掲載された。

カスパー12はマウスでしか知られておらず、ヒトカスパー12の同定が世界中で進められているが2002年4月現在、完全長が得られたと言う報告は無い。我々もカスパー12を特異的に認識する抗体を作成し、ヒト神経芽細胞腫に小胞体ストレス特異的に活性化される断片を取得している。現在、この断片のペプチドシーケンスを行いヒトに於いてカスパー12と同様に働いている分子の同定を、マウスカスパー12の配列をプローブにしたヒトcDNAライブラリースクリーニングと併行して進めている。

## 再生・機能修復グループ

### 1. MAG受容体の同定

MAGの受容体はbinding partnerと機能的なシグナルを伝達する因子からなる。この機能的なシグナルを伝達する因子がニューロトロフィン受容体p75であることを見出した。MAGは大人のDRG neuronあるいは生後の小脳顆粒細胞の突起伸展を阻害するが、この効果はP75ノックアウトマウスから得た神経細胞では見られなかった。またp75を発現する細胞ではMAGはRhoを活性化したが、p75を発現しない細胞ではRhoの活性化は見られなかった。これらよりMAGはp75を介して、Rhoを活性化することにより、神経突起の伸展を阻害していること示された。またMAG bindingとp75の細胞膜表面での局在が一致しており、binding partnerとp75が関連していることが示唆された。さらにこのbinding partnerがガングリオシドGT1bであることを見出し、GT1bとp75が受容体複合として機能していることを証明した。

MAGの効果を阻害する方法として、p75の細胞内ドメインに付着するペプチドを開発し、これがRhoのp75への付着を防ぐことによりサイレンサーとして働いていることを見出した。このペプチドは中枢神経再生を促進する薬剤として使える可能性がある。

### 2. ニューロトロフィン受容体p75のシグナル伝達

突起伸展を促進するニューロトロフィンと逆の作用を持つMAGが同一の受容体p75に結合するにもかかわらず、作用発現は逆であるという現象は、p75の幅広いシグナルを反映している。この現象を解明するために、p75のシグナル伝達の質に関する決定機構の解明を試みた。その結果ニューロトロフィンで活性化されたp75はcAMP-PKAを活性化し、更に自身をリン酸化することによって、シグナル伝達の間であるラフトに移動し、シグナル伝達の質を変えていることを見出した。

### 3. 軸索伸展阻害に関与する新規因子FIR

末梢神経の再生時、シュワン細胞で発現上昇してくる新規の遺伝子を単離した。これは新規のRacに特異的なRho guanine nucleotide exchange factor (GEF)であり、ERMドメインを有していた。受容体からのシグナルによりその機能が制御されていることが示唆された。FIRと名付けたこのRac GEFを胎生期の海馬ニューロンに発現させると、神経軸索の伸長が抑制され、神経軸索の誘導因

子として機能していることを示した。

#### 4. 軸索伸展阻害物質に対する耐性機構

幼弱神経細胞の軸索は容易に再生し、軸索伸展阻害因子に不応性である。このメカニズムの解明を試みた。幼弱神経細胞に特異的に発現している遺伝子の探索を行い、cyclin dependent kinase inhibitor である p21(Cip1/WAF1)を捉えた。この因子は通常は核に発現し細胞分化に関わっているが、分化後は細胞質に移動し、Rho kinaseを直接不活性化し突起伸展作用をもたらすことが明らかになった。Rho の下流でその経路を阻害することにより、Rho を活性化する刺激に対して不応性になることがわかった。

### 3. 研究実施体制

#### ストレス蛋白グループ

① 研究分担グループ長名:小川 智(金沢大学医学系研究科、教授)

② 研究項目:

虚血耐性を示すアストロサイト由来の三種の新規ストレス蛋白を虚血負荷により神経細胞死に陥りつつある神経細胞に導入し神経細胞を救うプロジェクト

#### アルツハイマーグループ

① 研究分担グループ長名:片山 泰一(大阪大学大学院医学系研究科、助手)

② 研究項目:

孤発性アルツハイマー病「長期にわたる低酸素ストレスによって生じた PS2 スプライシング変性によって引き起こされる」ことを解明する

#### 再生・機能修復グループ

① 研究分担グループ長名:山下 俊英(大阪大学大学院医学系研究科、助教授)

② 研究項目:

中枢神経系の再生が極めて困難である分子機序を解明し、その機序の制御により中枢神経系の再生をめざす

### 4. 主な研究成果の発表

#### (1) 論文発表

##### ストレス蛋白グループ

- Kitao Y., Ozawa K., Miyazaki M., Tamatani M., Kobayashi T., Yanagi H., Okabe M., Ikawa M., Yamashita T., Tohyama M., Stern D., Hori O., and Ogawa S. Expression of 150 kDa Oxygen Regulated Protein (ORP150), a Molecular Chaperone in the Endoplasmic Reticulum, Rescues Hippocampal Neurons from Glutamate Toxicity. *J. Clin. Invest.* 2001; 108, 1439-1450
- Miyazaki M, Ozawa K, Hori O, Kitao Y, Matsushita K, Ogawa S, and Matsuyama T. Expression of ORP150 (150 kDa oxygen regulated protein) in the hippocampus suppresses delayed neuronal cell death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002, in revision.



#### アルツハイマーグループ

- Katayama T, Imaizumi K, Honda A, Yoneda T, Kudo T, Takeda M, Mori K, Rozmahel R, Fraser P, St. George-Hyslop P, Tohyama T., Disturbed activation of ER stress transducers by FAD-linked PS1 mutations., *J Biol Chem* 2001, 276(46): 43446-43454
- Imaizumi K, Katayama T, Tohyama M., Presenilin and the UPR., *Nat. Cell Biol.* 2001, 3(5): E104
- Imaizumi K, Miyoshi K, Katayama T, Yoneda T, Taniguchi M, Kudo T, Tohyama M., The unfolded protein response and Alzheimer's disease., *Biophys. Biochem. Acta* 2001, 1536: 85-96
- Yui D, Yoneda T, Oono K, Katayama T, Yasuda Y, Imaizumi K, Tohyama M., Interchangeable binding of Bcl-10 to TRAF2 and cIAPs regulates apoptosis signaling., *Oncogene* 2001, 20: 4317-4323
- Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M., Activation of Caspase-12, an Endoplasmic Reticulum (ER) Resident Caspase, through Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 2-dependent Mechanism in Response to the ER stress., *J Biol Chem* 2001, 276(17): 13935-13940

#### 再生・機能修復グループ

- Neumann, H., Schweigreiter, R., Yamashita, T., Rosenkrantz, K., Wekerle, H., and Barde, Y.A.: Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a Rho dependent mechanism. *J. Neurosci.* 22: 854-862, 2002
- Yamaguchi, A., Taniguchi, M., Hori, O., Ogawa, S., Tojo, N., Matsuoka, N., Miyake, S., Kasai, K., Sugimoto, H., Tamatani, M., Yamashita, T. and Tohyama, M.: Peg3/Pw1 is involved in p53-mediated cell death pathway in brain ischemia/hypoxia. *J. Biol. Chem.* 277: 623-629, 2002

#### (2) 特許出願

国内 3 件、海外 2 件