

「脳を守る」

平成9年度採択研究代表者

辻本 賀英

(大阪大学大学院医学系研究科 教授)

「脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解析」

1. 研究実施の概要

遺伝性の運動神経変性疾患の一つである脊髄性筋萎縮症の疾患原因遺伝子産物Smnが、神経細胞死を防ぐBcl-2たんぱくに結合し、その活性を促進する機能を有することの発見を契機に、Bcl-2の持つ細胞死抑制機能の生化学的なメカニズムとSmnによるその機能の増強の分子メカニズムの解明を通し、疾患の発症メカニズムの解明と治療のストラテジの構築を目指した研究を行ってきた。特に、Bcl-2はミトコンドリア膜上に存在するチャネルVDAC (voltage-dependent anion channel)を閉孔することによりアポトーシス誘導因子シトクロムcなどの遊離を抑制するモデルを提唱し、特にVDACに対する特異的な中和抗体を利用することによりこのモデルの確証を得た。さらにVDAC抑制を指標にBcl-2機能の最小ドメインをBH4領域に同定し、このドメインのみで細胞死を抑制しうることを示すことにより、我々のモデルをより強くサポートした。また、膜透過性を有したtat-BH4ペプチドはマウスやラットにおいて細胞死抑制機能を発揮することを示し、疾患治療のための薬剤の開発に対する重要な方向性を示した。

2. 研究実施内容

アポトーシス抑制因子Bcl-2 (Bcl-xL)は主にミトコンドリアで機能し、細胞死(神経細胞死も含む)を誘導するファクターであるシトクロムcなどの細胞質への遊離を制御することで細胞死を阻止している。Bcl-2 (Bcl-xL)たんぱくはミトコンドリア外膜上に存在するVDAC (アポトーシス時にシトクロムcなどを通過させるチャネルを形成することを我々が示している)を閉孔することで細胞死を阻止することを示してきた。特に重要な証拠の一つは、種々のアポトーシス誘導剤(Bcl-2ファミリーに属するBaxや種々の抗がん剤、エトポシド、パクリタキセル、スタウロスポリンなど)により誘導されるアポトーシスが抗VDAC中和抗体の細胞へのマイクロインジェクションにより極めて効率良く抑制されることである。

このモデルプルーフを目指し、以下のような幾つかの解析を行った。

- (1) VDAC抑制を指標にBcl-2 (Bcl-xL)機能の最小単位の同定を行い、BH4ドメイン(SMNの結合領域とオーバーラップする領域)が必要かつ十分であることを示した。さらにこのドメインが細胞死抑制に必須であること、また、以下に述べるように、このドメインのみで細胞死を抑制しうることを明らかにした。

(2) Bcl-2アンタゴニスト(細胞レベルでBcl-2やBcl-xLの細胞死抑制機能を抑制する)として知られていたtetrocarcin Aの解析を行い、この分子は、VDACリポソーム系においてもBcl-2 (Bcl-xL) のアンタゴニストとして機能すること、さらにVDAC阻害剤であるポリアニオンや上記の抗VDAC中和抗体によるVDAC抑制をも解除しうることから、tetrocarcin AはVDACをターゲットとすることによりBcl-2 (Bcl-xL)の機能を阻害する分子であることが明らかになった。

これら(1) (2)結果は、我々が提唱しているVDACモデルを更に強固にするものである。

(3) BH4ドメインの機能解析および神経変性疾患の治療のためのドラッグ開発を目標に、BH4オリゴペプチドのN末にHIV Tatたんぱく質のprotein transduction domainを付加することにより細胞膜透過能を有したBH4ペプチド(tat-BH4)の作成を行った。このペプチドは、細胞培養液に添加するだけでアポトーシス抑制機能を発揮することができ、さらに動物(マウスやラット)レベルでも有効であることが明らかになった。用いた動物モデルは、マウスにおけるX線照射による小腸のアポトーシス、抗Fas抗体の投与による激症肝炎、およびラットの単離心筋梗塞モデルである。これらの結果は、tat-BH4ペプチドが個体レベルにおいて細胞死(ミトコンドリア脱機能)抑制剤として使用可能であることを示しており、薬剤開発に向け重要な情報を提供しているものと考えている。

(4) Bcl-2 (Bcl-xL)結合能を有した小胞体たんぱく質として新規因子RTN-xSを同定し、アポトーシスにおける機能解析を行ってきたが、RTN-xSは小胞体ストレス(アルツハイマー病の重要な原因の一つと考えられている)に反応し、複数種類のカスパーゼ(カスパーゼ8,9,12など)の前駆体をリクルートすること、同時にRTN-xSが会合することによりカスパーゼの活性化を誘起することを示し、小胞体ストレスによる細胞死のシグナル伝達経路の解明の一助とした。

3. 研究実施体制

辻本グループ

① 研究分担グループ長名

辻本 賀英(大阪大学大学院医学系研究科未来医療開発専攻ポストゲノム疾患解析学講座細胞死制御分野、教授)

② 研究項目 脊髄性筋萎縮症発症メカニズムの解析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Hata, S., Fukuo, K., Morimoto, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y. and Ogihara, T. Vascular smooth muscle maintains the levels of Bcl-2 in endothelial cells. *Atherosclerosis*. 152: 309-316, 2001
- Shimizu, S., Matsuoka, Y., Shinohara, Y., Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 152: 237-250 (2001)

(2) 特許出願

なし