

小胞体ストレス誘導型アポトーシスとその細胞内防御機構 —脳神経細胞の死による疾患とその治療戦略立案の可能性—

下 家 浩 二* 池 内 俊 彦**

Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and its preventive mechanism: Possible therapeutic strategy against neurodegenerative disorders

Koji SHIMOKE, Toshihiko IKEUCHI

1. はじめに

高等生物は、多種・多様な細胞群から出来上がった生物であり、個体としては、極めて複雑な構成体である。それら個々の細胞は、様々な細胞内小器官や高分子などを内包することによって、機能的にも形態的にも異なるものであることが多い。そして、それらは、それぞれが“分化”した細胞であり、細胞内外から、特殊な機構によって制御されている。脳内の神経細胞を例に挙げると、外胚葉由来の神経細胞は、同じく外胚葉由来の皮膚の細胞などとは、形態的にも機能的にも明らかに異なった分化した細胞となる。また、脳内では、同じ神経細胞でも形態が異なっている細胞が存在している。さらに、神経細胞で特筆すべきは、他の細胞と、シナプスと呼ばれる狭い隙間を持った接触部分を形成することによって、膜電位の変化を発生させ、伝達し、運動（随意や不随意）や記憶・学習などの生命活動を制御している。従って、脳は、神経突起の数や細胞体の大きさなど、異なった細胞の集団によって形成されていると言える。そして、脳は、グリア細胞と呼ばれる神経細胞以外の細胞の集団も有している。

上記の通り、ごく僅かの形態的・機能的な例を見ても、脳には、高度に複雑さを含有させる要素が存在していると言えるであろう。そのため、簡単な記憶や学

習などでさえも、それらの分子機構に関しては、未だ不明な点を数多く残している。創造性や情緒を表すメカニズムなども不明であり、脳の研究は、脳を有する生命体研究における“最後のフロンティア”とも言われている。

平時における脳内の神経細胞の機能以外に、病理に関する分子機構の解析も進められてきたが、困難を伴ってきた。上記の通り、複雑な要素を含んでいることが大きな理由の一つであるが、特に、神経細胞が死ぬことによって引き起こされる弧発性の脳疾患では、高齢の患者が多いため、発症原因の特定が困難である。また、神経細胞は、外からの物理的・化学的刺激に対して脆弱であることも解析を困難にしている理由の一つである。そこで、まずは、脳における特定の病気に対する原因遺伝子の探索が行われるようになり、これまでに数多くの原因遺伝子が同定されている。

本稿では、患者が痴呆を呈するアルツハイマー病や運動障害を呈するパーキンソン病など、神経細胞自身が自己を死に至らしめることによって引き起こされる疾患（神経変性疾患）の原因遺伝子の解析や、弧発性疾患の発症機構を明らかにしていった結果、“小胞体ストレス”と呼ばれる小胞体内腔に異常構造タンパク質が蓄積する現象が見出されたことを詳説する。また、小胞体ストレスによって、神経細胞の死が誘導される細胞内の分子機構についても述べ、上記の知見と神経細胞を保護することが知られる神経栄養因子の作用機構の発見に基づいた治療戦略の可能性について論じる。

原稿受付 平成19年10月19日

*化学生命工学部 生命・生物工学科 准教授

**化学生命工学部 生命・生物工学科 教授

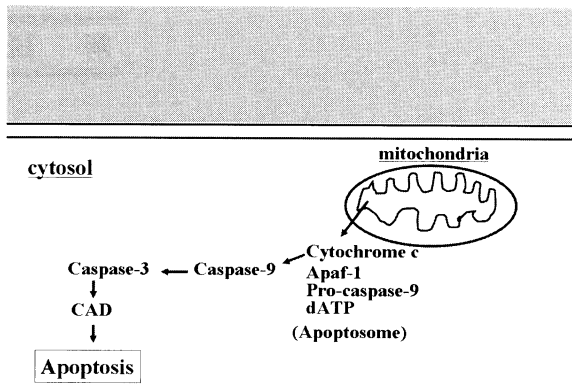


図1 これまで知られていたアポトーシス実行の分子機構

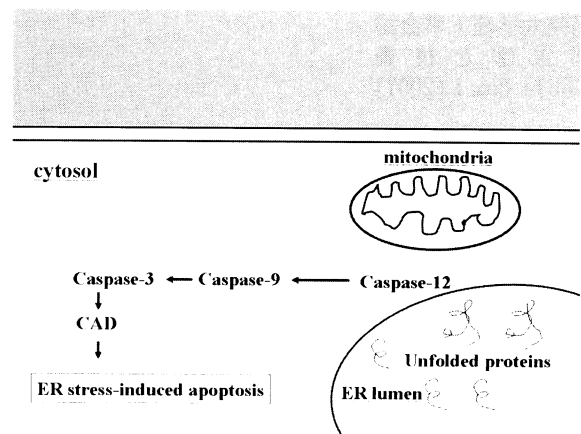


図2 小胞体ストレス誘導型アポトーシス実行の分子機構

2. 小胞体ストレス (ER stress) と細胞の自殺機構

我々人間は、発生時期には、脳内で約2倍の神経細胞が作られることが知られている¹⁾。しかし、生後に見られる正常胎児の脳内の神経細胞数は、当然に思われることであって気にかけることもないが、その半数の1倍である。この現象は、なぜ起こるのか？また、どのような生物学的意味を持つのか？この現象を目や耳にしたとき、はじめて誰もが感じることはないかと思う。

実は、我々を含めた多くの生物では、細胞内に自らを死に至らしめる“自殺機構”が存在する。人間以外の例を挙げると、幼生期に存在していたオタマジャクシの尾が、成体では消滅しているのは、尾を形成している細胞が“自殺機構”によって死滅したためである。この“自殺機構”を、“アポトーシス”と呼んでいる。我々人間の脳神経細胞の半数が出生時まで失われている理由は、脳神経細胞がアポトーシスによって死滅したからである。では、生物学的意味であるが、数多くの神経細胞を発生時期にあらかじめ準備しておくことによって、正しく神経突起のネットワークを形成し、正常な脳神経活動を行う神経細胞を選別していると考えられている¹⁾。先入観から、単純に、細胞が死ぬことは、“悪いこと”のように思われる。しかし、アポトーシスは、我々を含めた生命体にとって必要不可欠な現象である。

発生時期と同様に、加齢によって老化が進行した時期の人間の脳内で、健常者の神経細胞が、減少していくことも知られている。以下に述べる神経変性疾患患者の脳内の神経細胞は、さらに（病的に）多くの神経細胞が死滅していることが分かっている。勿論、個人差があり、病的な数についても様々である。この病的な死滅の原因として、“小胞体ストレス (ER stress)”

とよばれる細胞内でのストレス負荷が注目されている²⁾。小胞体ストレスとは、細胞内小器官である小胞体の内腔に、異常な構造のタンパク質（本来築かれるべき、機能しうる構造を形成していないタンパク質：unfolded protein）が蓄積することによって起こる細胞のストレスを指す。過剰に小胞体ストレスが負荷されると、異常構造タンパク質が蓄積し続け、その結果、アポトーシスが起こる。この時に起こるアポトーシスを小胞体ストレス誘導型アポトーシスと呼び、上記に述べたアポトーシスと区別している。なぜなら、この場合のアポトーシスは、小胞体ストレスに特異的な細胞内分子機構によって死滅するからである²⁾。

3. 小胞体ストレス誘導型アポトーシスによる細胞死の分子機構

これまで知られていたアポトーシスと小胞体ストレス誘導型アポトーシスとの間で、細胞を死滅させる細胞内分子機構に大きな違いがあることが分かった（図1と図2参照）。これまで知られていたアポトーシス実行の分子機構は、アポトーシス実行の刺激を受けた後、細胞内小器官であるミトコンドリアの機能不全が起こり、ミトコンドリア内から cytochrome c というタンパク質が細胞質内に放出される。その後、cytochrome c、Apaf-1、pro-caspase-9（不活性化型）、dATP による複合体（apoptosome）が形成され、プロテアーゼ活性を有する caspase-9（活性化型）を産生する。次に、この caspase-9は、pro-caspase-3（不活性化型）を切断し、caspase-3（活性化型）を産生する。最後に、caspase-3は、ICAD と CAD の複合体の ICAD を切断し、DNA 切断活性を有する CAD を活性化することによって、核内 DNA の断片化を引き起こさせる³⁾。以上が、これまで知られていたアポトーシス実行の分子機構である（図1参照）。

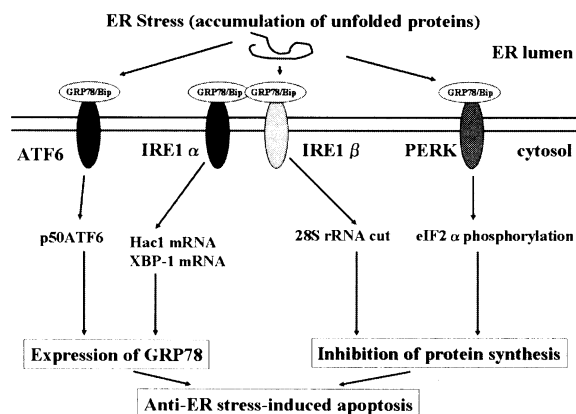


図3 センサータンパク質を介した小胞体ストレス誘導型アポトーシスの抑制機構

一方、小胞体ストレス誘導型アポトーシスの場合、その防御と実行の相反する分子機構が同時に働くことが分かった²⁾。まず、小胞体ストレスが負荷されると、細胞内では、小胞体膜に存在している3種のセンサータンパク質(ATF6、Ire1、PERK)によって異常構造タンパク質の産生が感知され、異常構造タンパク質の構造正常化(refolding)や新規タンパク質合成の停止を行うことによって小胞体ストレスの進行が防御される。Refoldingのためには、シャペロンが動員されることになる。小胞体ストレスが惹起した時には、ATF6とIre1の下流の分子(転写因子)によって、主としてGRP78というシャペロンタンパク質が、発現誘導され、小胞体ストレスを緩和していると考えられている。また、PERKが、翻訳に関わるeIF2 α をリン酸化することによって、eIF2 α の機能を阻害し、翻訳抑制によって小胞体ストレスがさらに高まることを防いでいると考えられている(図3参照)。しかし、小胞体ストレス誘導型アポトーシスが起るような状況では、ATF6、Ire1、PERKを介する防御の能力を超えている。興味深いことに、むしろ、ATF6、Ire1、PERKは、小胞体ストレス誘導型アポトーシスを惹起し、実行する方向に働いている。これが、小胞体ストレスに特異的なアポトーシス実行の細胞内分子機構であり、小胞体ストレス誘導型アポトーシスの進行に関する細胞内分子機構である^{2, 4)}。図4に見られる通り、caspase-12の活性化とCHOP/GADD153の発現上昇が、小胞体ストレス誘導型アポトーシスの進行に重要であることがわかる。この事実は、それぞれの遺伝子のノックアウトマウスにおける小胞体ストレス誘導型アポトーシス刺激への抵抗性が増大する報告からも明らかとなった⁵⁾。

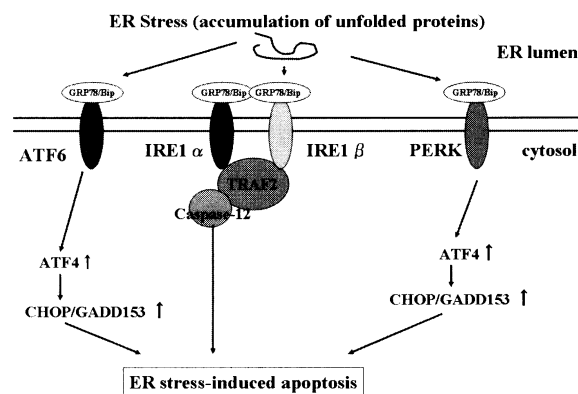


図4 センサータンパク質を介した小胞体ストレス誘導型アポトーシスの実行機構

4. 神経変性疾患と小胞体ストレス

神経変性疾患と言って、具体的に何を指しているのかが分かる人は少ないと思う。そこで、まずは、神経変性疾患について解説する。神経変性疾患とは、中枢神経細胞が、経時的には、徐々に死滅して起る疾患を指す。この神経変性疾患には、特定の遺伝子が原因となる遺伝性と周囲の環境や毎日の食事などに依存する弧発性に分けることが出来る。例えば、アルツハイマー病では、原因遺伝子群として、amyloid precursor protein (APP)、presenilin 1 (PS1)、presenilin 2 (PS2)、危険因子として、apolipoprotein E (ApoE)が知られている^{6, 7)}。病理所見として、海馬神経細胞が小胞体ストレス誘導型アポトーシスによって死滅した後、そこに投射している大脳皮質コリン作動性神経細胞も小胞体ストレス誘導型アポトーシスによって死滅する。その結果、アルツハイマー病患者は、学習・記憶・行動などの障害を呈し、最終的には死に至る。また、パーキンソン病では、parkinが、若年性の原因遺伝子として同定されている⁸⁾。病理所見として、黒質ドーパミン作動性神経細胞が小胞体ストレス誘導型アポトーシスによって死滅することが知られている。黒質ドーパミン作動性神経細胞は、運動を調節する線条体に投射していることから、その神経細胞の死滅によって、患者は、無動・固縮・震戦などの随意運動障害を呈する。いずれにしても、神経細胞が小胞体ストレスを受け、その結果、アポトーシスが起ることによって神経細胞が死滅する。細胞内の分子機構としては、ヒトには、caspase-12が発現していないために、caspase-4がその代わりの役割を果たすことによって、既述のように小胞体ストレス誘導型アポトーシスが実行されていると考えられている⁹⁾。

5. 小胞体ストレス誘導型アポトーシスと神経栄養因子による抑制作用

この小胞体ストレス誘導型アポトーシスを抑制することが出来るならば、神経変性疾患の治療につながる可能性がある。著者らは、神経栄養因子と呼ばれるタンパク質群が、これまで知られているアポトーシスのみならず、小胞体ストレス誘導型アポトーシスをも抑制することを見出した¹⁰⁻¹²⁾。

図5に示した通り、神経栄養因子は、NGF、BDNF、NT-4/5、NT-3などとファミリータンパク質を形成している¹³⁾。神経細胞膜上には、膜一回貫通型の受容体(TrkA、TrkB、TrkC)が存在する。これらの受容体もファミリーを形成しており、リガンドである神経栄養因子と特異的に結合する。これらの受容体は、神経栄養因子の結合によって、細胞内側に配置する数個から数十個のチロシン残基が自己リン酸化する。上記の神経栄養因子の作用は、TrkA、TrkB、TrkC内のリン酸化チロシン残基近傍に特定のシグナル伝達タンパク質が、特定のリン酸化チロシン残基に結合することによって実現される。次に、特定のリン酸化チロシン残基に結合したシグナル伝達タンパク質もリン酸化を受け、さらに下流の特定のタンパク質群が結合とリン酸化を繰り返し、リン酸化シグナル伝達のカスケード(経路)を形成している。図5に示した通り、これまでに、Ras/MAPK経路、PI3-K/Akt経路、PLC- γ 経路の少なくとも3つのシグナル伝達経路が見出されている¹³⁾。著者らは、小脳顆粒細胞を用いた低カリウム刺激によるこれまで知られているアポトーシスや、PC12細胞を用いたMPTP(細胞死誘導剤の一つ)による酸化刺激によるこれまで知られているアポトーシスでは、神経栄養因子添加によって活性化されたPI3-K/Akt経路を介して、神経細胞が、死滅から防

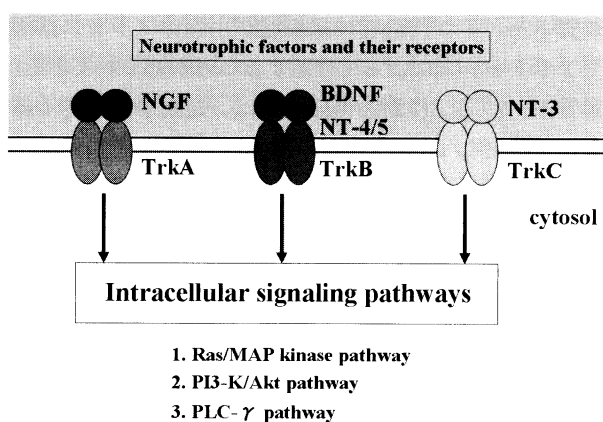


図5 神経栄養因子とその受容体から生ずる3種の異なるシグナル伝達経路

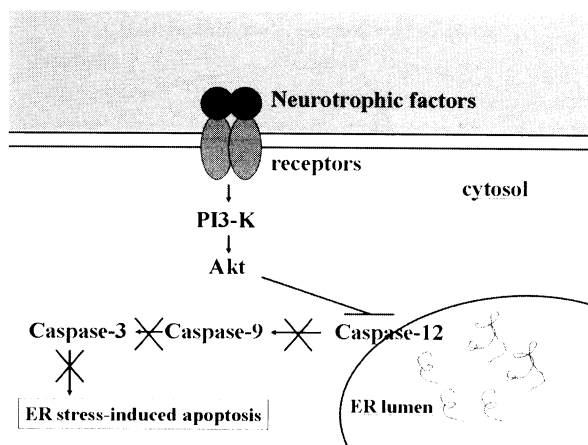


図6 神経栄養因子によって活性化されたPI3-K/Aktシグナル伝達経路による小胞体ストレス誘導型アポトーシスの抑制機構

御されることを見出してきた^{14,15)}。

さらに、著者らは、研究室内で実験可能な培養細胞を用いて、小胞体ストレス誘導型アポトーシスの実行と神経栄養因子による抑制機構を解析するために、糖鎖修飾阻害剤である tunicamycin (Tm) や小胞体膜上の Ca^{2+} -ATPase 阻害剤である thapsigargin (Tg) を添加する実験系を用いてきた。両薬剤は、小胞体での正常な構造を有するタンパク質の生合成を阻害することが知られている。既述の通り、小胞体ストレスでは、アポトーシス進行過程で caspase-12 が特異的に活性化される。そこで著者らは、Tm や Tg 添加後に活性化される caspase-12 が、神経栄養因子(NGF や BDNF) を存在させることによって活性化する PI3-K/Akt 経路を介して抑制され、その結果、小胞体ストレス誘導型アポトーシスが抑制されるのではないかと考えた(図6参照)。そこで、培養大脳皮質神経細胞と PC12 細胞に Tm を添加し、小胞体ストレスを惹起すると同時に、BDNF や NGF をもそれぞれ培養大脳皮質神経細胞や PC12 細胞に添加することによって caspase-12 活性の変動を見る実験を行った。その結果、BDNF と NGF は、有意に caspase-12 の活性化を抑制した^{10,11)}。また、PI3-K の特異的阻害剤である LY294002 を BDNF や NGF と共存させると、caspase-12 の活性化が抑制できないことを見出した。また、BDNF や NGF によって活性化された PI3-K/Akt 経路は、caspase-9 や caspase-3 の活性化も抑制していた^{10,11)}。caspase-12 は、caspase-9 を直接活性化し、さらに下流の caspase-3 を活性化するとする報告がある⁴⁾。以上から、培養大脳皮質神経細胞と PC12 細胞では、caspase-12 から開始される小胞体ストレスによるアポトーシス進行は、caspase-9 を活性化した後、caspase-3 を活性化し、細胞を死滅させる

ことが明らかになった。そして、神経栄養因子は、caspase-12 の活性化を抑制することによって小胞体ストレス誘導型アポトーシスを抑制していることが見いだされた（図 6 参照）。同様の結果は、Tg を添加した後、更に NGF を添加する実験においても同様であった¹²⁾。

以上の実験から、神経栄養因子によって活性化される PI3-K/Akt 経路をうまく制御することによって神経変性疾患治療への可能性があると考えている。

6. おわりに

神経変性疾患の多くは、厚生労働省から難病に指定されている疾患であり、これから多くの研究者が基礎的研究を積み重ねることによって治療法を確立していかなければならないと考えている。本稿では、神経変性疾患の例として、アルツハイマー病とパーキンソン病に関して解説した。世界中で、華々しく原因遺伝子の解析に関する研究が実施され、それらの成果論文を目にする傍ら、遺伝性の患者は、約 1 から 2 割である現状を考えると、弧発性を含めた一般的な小胞体ストレス誘導型アポトーシスの進行過程の研究と小胞体ストレス自体の根源を絶つ治療方法を地道に研究していく必要性も感じている。著者らは、caspase-12 の一次構造上、PI3-K/Akt 経路が、直接、その活性化を抑制することが出来ないことが分かっているため、その上流に未知の活性化タンパク質“X”が存在すると考え、タンパク質“X”の探索を行っている（図 7 参照）。また、著者らは、小胞体ストレス誘導型アポトーシスにおいても、ミトコンドリアの機能不全を惹起すると考えられる Bcl-2 ファミリータンパク質群の解析を行い、特定のファミリータンパク質が小胞体ストレス誘導型アポトーシスを惹起することも見出している。今後の研究の展開を楽しみにしている。

A proposed model for signaling pathway of the survival-promoting effect of BDNF and NGF on ER stress-induced apoptosis

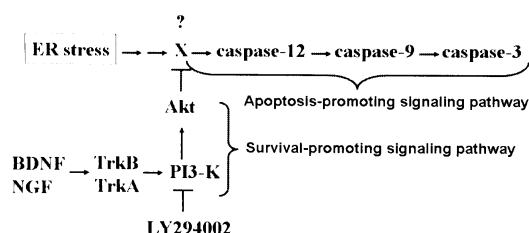


図 7 神経栄養因子によって活性化された PI3-K/Akt シグナル伝達経路と caspase-12 の活性化を引き起こす未同定タンパク質“X”の関連性

最後に、本稿の研究内容の一部は、著者の一人である下家浩二が支援を受けた平成19年度関西大学学術助成基金（奨励研究）による成果である。ここに記して、関係者の皆様方に深く謝意を表します。

参考文献

- 1) R. W. Oppenheim, Annu. Rev. Neurosci., 14, 453-501 (1991)
- 2) R. J. Kaufman, Genes. Dev., 13, 1211-1233 (1999)
- 3) M. Enari, H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, S. Nagata, Nature 391, 43-50 (1998)
- 4) N. Morishima, K. Nakanishi, H. Takenouchi, T. Shibata, Y. Yasuhiko, J. Biol. Chem., 277, 34287-34294 (2002)
- 5) T. Nakagawa, H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B.A. Yankner, et al., Nature 403, 98-103 (2000)
- 6) M. C. Chartier-Harlin, F. Crawford, H. Houlden, A. Warren, D. Hughes, L. Fidani, et al., Nature 353, 844-846 (1991)
- 7) T. Katayama, K. Imaizumi, N. Sato, K. Miyoshi, T. Kudo, J. Hitomi, et al., Nature Cell Biol., 1, 479-485 (1999)
- 8) T. Kitada, S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, et al., Nature 392, 605-608 (1998)
- 9) J. Hitomi, T. Katayama, Y. Eguchi, T. Kudo, M. Taniguchi, Y. Koyama, et al., J. Cell. Biol., 165, 347-56 (2004)
- 10) K. Shimoke, H. Amano, S. Kishi, H. Uchida, M. Kudo, T. Ikeuchi, J. Biochem., 135, 439-446 (2004)
- 11) K. Shimoke, T. Utsumi, S. Kishi, M. Nishimura, H. Sasaya, M. Kudo, T. Ikeuchi, Brain Res., 1028, 105-111 (2004)
- 12) K. Shimoke, S. Kishi, T. Utsumi, Y. Shimamura, H. Sasaya, T. Oikawa, S. Uesato, T. Ikeuchi, Neurosci. Lett., 389, 124-128 (2005)
- 13) N. Takei, H. Nawa, Seikagaku, 76, 111-123 (2004)
- 14) K. Shimoke, K. Kubo, T. Numakawa, Y. Abiru, Y. Enokido, N. Takei, T. Ikeuchi, H. Hatanaka, Dev. Brain. Res., 101, 197-206 (1997)
- 15) K. Shimoke, M. Kudo, T. Ikeuchi, Life Sci., 73, 581-593 (2003)