

## 神経栄養因子による脳神経系のアポトーシスの抑制機構

### — 神経変性疾患の治療方法の確立を目指して —

下家 浩二\* 福永 健治\* 松村 吉信\* 工藤 玄恵\*\* 池内 俊彦\*\*\*

#### Prevention of apoptosis by neurotrophic factors

#### —Contribution of pathophysiological analysis to therapy of neurodegenerative diseases—

Koji SHIMOKE, Kenji FUKUNAGA, Yoshinobu MATSUMURA,  
Motoshige KUDO, Toshihiko IKEUCHI

#### 1. はじめに

脳や神経を想像する時、多くの人は、頭蓋中（頭）の広い隙間のある空間に複雑なネットワークを形成している神経細胞の様子が思い浮かぶのではないだろうか。また、神経細胞同士が、電子を使って電気信号を伝えている様子も頭の中に思い描かれるのではないだろうか。実は、この様に思い浮かべている神経細胞であるが、脳内の神経細胞（中枢神経細胞）だけでも数千種類に及ぶ雑多な集団であり、その周囲には、神経細胞の約十倍量のグリア細胞（非神経細胞）によって脳内は殆ど隙間のない状態にある。さらに、様々なメディアからのイメージから、かなり誤認している人も多いと思うが、神経活動として神経細胞同士が電子を伝達すると思っている人も多いのではないだろうか。脳内の神経細胞は、イオンを細胞内外へ移動させ、膜電位を変化させ、その変化が伝播されているのであり、電子が流れているわけではない。さらに、脳は、グリア細胞の一種であるアストロサイトによって形成される血液脳関門によって完全に外部から遮断された臓器であり、血液中の特定の物質のみ出入りする事が出来る事実も知られていないかもしれない。

周知の事実ではあるが、神経細胞は、運動（随意や

不随意）や記憶・学習などの我々の社会生活にとって重要な生命活動を制御している。しかも、他の臓器に比べて高度に制御されている。そして、非常に脆弱であることも古くから知られている特徴である。上述からも分かる通り、脆弱な神経細胞の障害や死滅は、生命体の制御機構を損ない、生命体の維持にも大きな影響を及ぼす。非常に厄介な臓器とも言える。

脳は、高度に複雑さを含有させる要素が存在している。従って、単純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ことも想像出来るであろう。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まさに“最後のフロンティア”である。近年、社会的問題にもなっている認知症は、アルツハイマー病などの疾患によるものである。アルツハイマー病に限定すれば、記憶に重要な神経細胞群が、アポトーシスと呼ばれる細胞の自殺機構によって死滅した結果、発症に至る。患者の介護を考えると、患者のみならず周囲の人たちまでが、本疾患で苦難を強いられる。完治させる治療が必要だが、未だ、治療方法すら確立されていないのが現状である。

本稿では、高度に制御された脳神経の活動が特定の理由によって破綻し、疾病化するメカニズムを論じると同時に、それを回避する細胞内在性のメカニズムや細胞外因性のメカニズムについて概説する。

原稿受付 平成21年10月14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 東京医科大学 病理学講座 教授

\*\*\*化学生命工学部 生命・生物工学科 教授

## 2. 神経細胞へのストレス

我々の周囲には、細胞に働き掛ける多くのストレス原因因子（ストレッサー）が存在する。しかも、ストレスと特定しがたい物質以外のストレッサー（X線や衝撃などの物理的刺激）も含まれている。いずれにしても、脳内の神経細胞に対してストレッサーが働きかけた時、神経細胞の小胞体と呼ばれる細胞内小器官内に、構造異常たんぱく質が蓄積する事が知られるようになった。この病理学的な現象を“小胞体ストレス（ER stress）”と呼ぶ。病理学的に見れば、この分子・細胞レベルでの発見は、非常にインパクトの大きいものであった。

小胞体ストレスが引き起こされると、神経細胞内では、様々な現象が誘導される。unfolded protein response（UPR）と呼ばれるものもその中の一つである。このUPRを介して、細胞内在性の自殺シグナルによる細胞死（アポトーシス）が引き起こされる場合がある。後述するが、小胞体ストレス特異的な分子機構によってアポトーシスが引き起こされることが明らかとなり、既知のアポトーシスと区別し、小胞体ストレス誘導型アポトーシスと分類されるようになった。

一方で、小胞体ストレスを軽減するためにもUPRが働く。そもそも小胞体に構造異常たんぱく質が蓄積することが小胞体ストレス誘導型アポトーシスを惹起するため、小胞体内での構造異常たんぱく質の構造正常化、小胞体内に蓄積している構造異常たんぱく質の小胞体外への排出と分解、小胞体自体の分解処理が小胞体ストレス軽減の機構として挙げられる。当然のことながら、神経変性疾患患者の脳神経細胞でもUPR

が見られるが、アポトーシスを引き起こす前者のUPRが優位になっている。

## 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古典的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前述の通り分かった（図1参照）。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り、ミトコンドリア内からcytochrome cというたんぱく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<sup>1)</sup>。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。

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<sup>2)</sup>。先ず、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種のセンサーたんぱく質（ATF6、Ire1、PERK）によって異常構造たんぱく質の産生が感知され、異常構造たんぱく質の構造正常化（refolding）や新規たんぱく質生合成

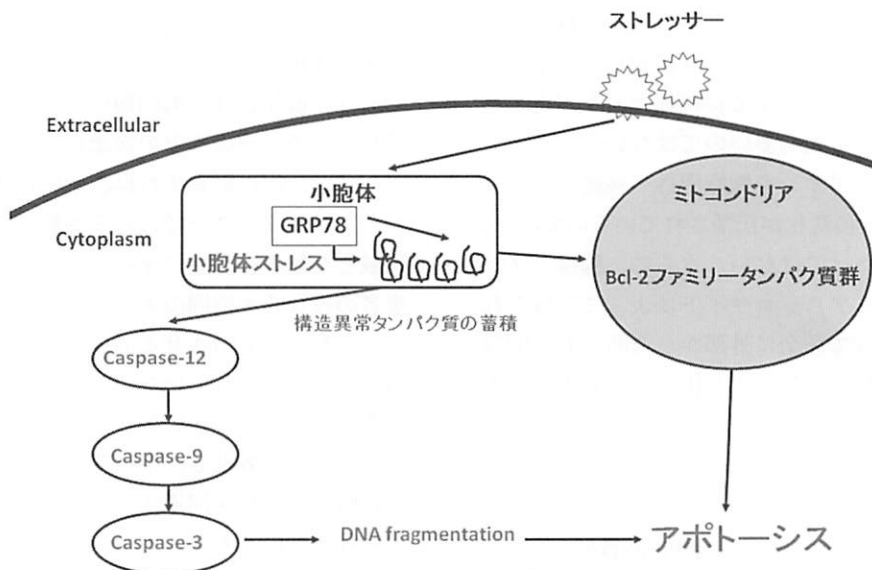


図1：小胞体ストレス誘導型アポトーシスの進行過程

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(図2参照)。我々の研究室からも他大学との共同研究の結果として同様の結果を得ている<sup>3)</sup>。また、PERKが、翻訳に関わるeIF2 $\alpha$ をリン酸化することによって、eIF2 $\alpha$ 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。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を介する能力では防御することが出来ない。記述の通り、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初期段階における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初期段階の細胞内分子機構である<sup>2,4)</sup>。caspase-12の活性化、CHOP/GADD153やBcl-2ファミリータンパク質の発現上昇も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っている。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<sup>5)</sup>。ただ、caspase-12を活性化する機能タンパク質やcaspase-12の機能的基質も未同定であることや、Bcl-2ファミリータンパク質の機能発現機構も不明であり、更なる解析の余地を残している(図1参照)。

#### 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、徐々に死滅して起こる疾患を指す。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孤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<sup>6,7)</sup>。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<sup>8)</sup>。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。この小胞体ストレス誘導型アポトーシスの細胞内の分子機構としては、上述の通りである。

では、原因となるストレスは、何であろうか? 治療法を確立する上で非常に重要な事項である。しかし、神経細胞が死ぬことによって引き起こされる孤発性の脳疾患では、高齢の患者が多いため、ストレスの特定は困難である。そこで、孤発性の研究は避けられ、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た。そこから治療方法を見出そうと世界中の研究者たちが考えたが、現在までに確立された治療方法は存在しない。

#### 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<sup>3,6,8)</sup>。

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<sup>9)</sup>。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(図2内の一部を参照)。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 cascade (経路) を形成している。これまでに、Ras/MAPK 経路、PI3-K/Akt 経路、PLC- $\gamma$  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<sup>9)</sup>。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、PC-12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、死滅から防御されることを見出してきた<sup>3,10,11)</sup>。

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  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 阻害剤である thapsigargin (Tg) を添加する実験系を用いた。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。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。

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<sup>6,7)</sup>。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見られている<sup>4)</sup>。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確認された (図 1 参照)。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明らかになった。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<sup>8)</sup>。

さらに、古典的アポトーシスの進行過程でも見られていた Bcl-2 ファミリータンパク質の寄与についても検討を行った。その結果、PUMA や Bim と呼ばれるアポトーシス誘導型の Bcl-2 ファミリータンパク質の発現上昇が重要であることが明らかになった。また、Bax のホモダイマー化も重要であることが明らかになった。これらの進行過程は、神経栄養因子によって活性化型から不活性化型となり、結果として小胞体ストレス誘導型アポトーシスを抑制することも分かった (図 1 の経路を遮断)。

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を示唆することが出来たと考えている。さらに限局的に述べるならば、GRP78

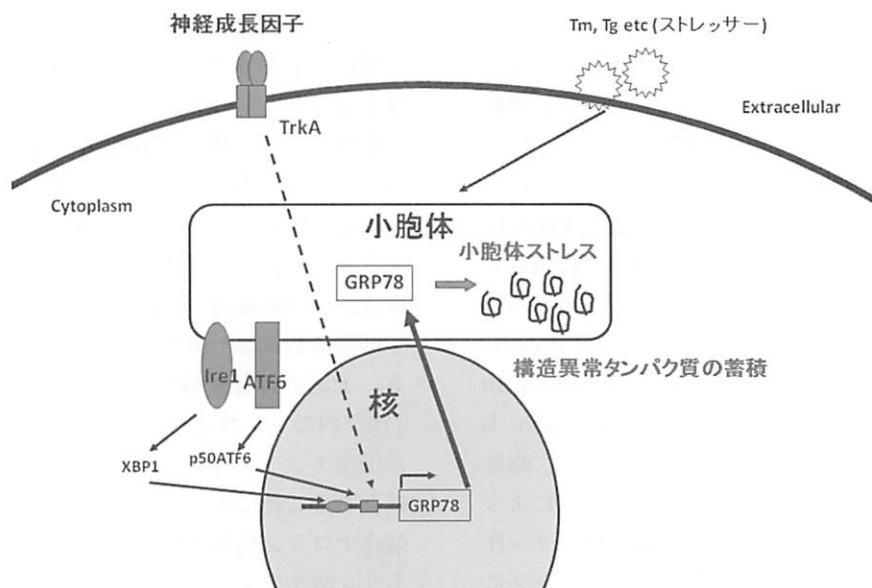


図 2 : GRP78 の発現誘導機構と小胞体ストレスの抑制

の発現上昇による治療戦略が、細胞の抗アポトーシス作用の分子機能をも動員した良い方法になるのではないかと考えられる(図2参照)。

## 6. 共同研究の重要性

我々の神経生命工学研究室では、学内外で多くの科学者と共同研究を行っている。駆け出しの研究者の頃の体験から、共同研究による迅速な研究体制の構築こそ、他者を制する大きな手段であると感じたからである。上述の研究の一部も学内の共同研究者と東京医科大学病理学講座の工藤教授らによるものである(図3参照)。今回、我々が所属する学部内では行えないことが、人という存在を深く理解し、治療に対する真に必要な物や事柄を、東京医科大学において学び、そして、成果として形ある物を得ることが出来た。治療方法を探索・開発するのであれば、言うまでもなく、対等な立場で医学部と共同研究を行うことが重要である。20代から30代の非常に若い研究者には、是非、今の段階からでも国内外での共同研究を遂行することを進言したいと思う。勿論、研究室の責任者を介さねばならないのは言うまでもないことではあるが。

## 7. おわりに

神経変性疾患の多くは、難病に属する疾患であり、研究者が早急に基礎的研究を積み重ねることによって治療方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、孤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



図3：東京医科大学における工藤教授との研究打ち合わせ風景

道に研究していく必要性も感じている。著者らは、孤発性の疾患進行分子機構とその抑制分子機構を解析することによって、実現可能な治療方法を提言していきたいと考えている。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。今後の研究の発展を楽しみにしている。

最後に、本稿の研究内容の一部は、著者らが支援を受けた平成21年度関西大学重点領域研究助成による成果である。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) M. Enari, H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, S. Nagata, *Nature* 391, 43-50 (1998)
- 2) R. J. Kaufman, *Genes. Dev.*, 13, 1211-1233 (1999)
- 3) S. Kishi, K. Shimoke, Y. Nakatani, T. Shimada, N. Okumura, K. Nagai, K. Shin-Ya, T. Ikeuchi, *Neurosci. Res.*, in press.
- 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) K. Shimoke, H. Amano, S. Kishi, H. Uchida, M. Kudo, T. Ikeuchi, *J. Biochem.*, 135, 439-446 (2004)
- 7) K. Shimoke, T. Utsumi, S. Kishi, M. Nishimura, H. Sasaya, M. Kudo, T. Ikeuchi, *Brain Res.*, 1028, 105-111 (2004)
- 8) K. Shimoke, S. Kishi, T. Utsumi, Y. Shimamura, H. Sasaya, T. Oikawa, S. Uesato, T. Ikeuchi, *Neurosci. Lett.*, 389, 124-128 (2005)
- 9) N. Takei, H. Nawa, *Seikagaku*, 76, 111-123 (2004)
- 10) K. Shimoke, K. Kubo, T. Numakawa, Y. Abiru, Y. Enokido, N. Takei, T. Ikeuchi, H. Hatanaka, *Dev. Brain. Res.*, 101, 197-206 (1997)
- 11) K. Shimoke, M. Kudo, T. Ikeuchi, *Life Sci.*, 73, 581-593 (2003)