

神経変性疾患でみられる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その防御機構

下家浩二、池内俊彦

関西大学 HRC、工学部

概要：近年、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の発症に関わる原因遺伝子の同定が急速に進行し、病態発症の詳細な分子機構の解析が行われている。そのような遺伝的要因の解析の他に、環境的要因における細胞恒常性コントロール機能の破綻機構の解析も分子レベルで行われている。それらの解析の結果、神経細胞内の小胞体内腔に、異常構造タンパク質が蓄積し、小胞体ストレスが負荷されていることによって神経変性疾患が発症することが明らかになった。また、神経変性疾患において、神経細胞は、アポトーシスによって死滅していることも分かった。しかし、小胞体ストレス負荷からアポトーシスに至るまでの分子機構については、不明な点が多く残されている。我々は、モデル神経細胞である PC12 細胞と大脳皮質神経細胞を用いて、神経栄養因子 (NGF や BDNF) が、小胞体ストレス誘導型アポトーシスを抑制することを見出した。今回、NGF や BDNF がどのように小胞体ストレス誘導型アポトーシスを抑制するのかを、細胞内分子機構を基盤として述べる。

1.はじめに

高等動物を恒常維持・制御する臓器として、脳は、多様な働きをしている。それらの働きは、脳内に存在する神経細胞やグリア細胞などが有する緻密な機構によってコントロールされている。脳は、高等生命体の中でも最も脆弱性の高い臓器の一つであり、コントロール機能が破綻すれば、高等動物の恒常性維持・制御が出来なくなり、重篤な症状が現れてくる。特に、ヒトは、他の高等動物と比較して、学習、記憶、思考の能力が発達している。そして、ヒトは、その脳の機能を活用し、他の高等動物に見られない高度な社会を構築している。高度な脳の発達が、ヒトをヒトとしての衣食住の環境を向上せしめ、様々な恩恵を享

受できるようになったと言っても過言ではない。その一方で、ヒトの平均寿命が延び、特に近年の日本においては、高齢化社会への医学的な対応が急務となっている。脳における神経変性疾患 (アルツハイマー病やパーキンソン病など) のような不可逆的で、治療戦略が確立されていない難病に対する対応は、急務である。なぜなら、神経変性疾患患者は、脳の高度なコントロール機能を破綻させていることが多く、ヒトとしての社会性を著しく欠如させうることになるため、介護が必要となってくる。患者や介護者の QOL の改善のためにも、早急な治療法の確立が望まれている。

神経変性疾患患者の脳内神経細胞では、

小胞体ストレスと呼ばれる細胞内ストレスにさらされることにより、神経細胞がアポトーシス（プログラム細胞死）によって死滅することが知られている。そのストレスが負荷される原因として、遺伝的要因と環境的要因の両者が考えられている。いずれにしても、アポトーシスという細胞内分子機構を介して神経細胞は死滅するが、これまで知られていたアポトーシス誘導分子機構とは異なり、小胞体ストレス特異的なアポトーシス誘導分子機構の存在が明らかになっている^{1,3}。一方、神経細胞における既存のアポトーシスを抑制する因子として、神経栄養因子（NGF や BDNF など）が知られており、小胞体ストレス特異的なアポトーシスの抑制との関連が注目される。本稿では、モデル神経細胞である PC12 細胞と培養大脳皮質神経細胞を用いた解析結果を基に、小胞体ストレス特異的なアポトーシス進行過程と神経栄養因子によるそのアポトーシス抑制過程についての細胞内分子機構（シグナル伝達機構）を詳述する。

2. 神経変性疾患とアポトーシス

アポトーシスは、個体の発生段階で生理的に意味のある働きをしている。神経系では、中枢神経細胞数が、約倍数産生されるが、誕生時点までに半数は、アポトーシスによって速やかに除去されることが知られている。これは、不良な神経細胞が産生された場合の代償機構の一つとして説明されている。その一方で、病的要因にも関与している。神経変性疾患の患者脳内では、特異的な神経細胞がアポトーシスによって死滅していることが知られている。その

要因として、遺伝的要因と環境的要因が提唱され、特異的な神経細胞がアポトーシスによって死滅する機構が少しずつ明らかになってきている。その中で、原因遺伝子の検索も行われ、特定の神経変性疾患における原因遺伝子（群）が同定されている。アルツハイマー病では、海馬神経細胞が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。原因遺伝子群として、*amyloid precursor protein (APP)*⁴、*presenilin 1 (PS1)*⁵、*presenilin 2 (PS2)*⁶、危険因子として、*apolipoprotein E (ApoE)*^{7,8}が知られている。パーキンソン病では、黒質ドーパミン作動性神経細胞がアポトーシスによって死滅する。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。また、パーキンソン病では、*parkin* が、原因遺伝子として同定されている⁹。ハンチントン舞踏病では、大脳基底核の尾状核と被殻での神経細胞が、著しく死滅する。ハンチントン舞踏病患者は、運動障害・行動異常が見られた後、痴呆を呈する。原因遺伝子として、*huntingtin* が知られている¹⁰。これまで知られていたアポトーシスにおいては、ミトコンドリアの機能低下、酸化ストレスの負荷などを経て、最終的には、システインプロテアーゼである *caspase* 群の活性化を介して、*caspase-3-activated DNase (CAD)* を活性化させることによって、核内 DNA を断片化させる¹¹。その結

果、神経細胞が、アポトーシス様に死滅すると考えられている。従って、神経変性疾患患者の神経細胞においても、アポトーシスの初期段階では、ミトコンドリアの機能低下の後、ミトコンドリアから cytochrome c が、放出され、dATP や Apaf-1 と共に apoptosome を形成することによって活性化した caspase-9 が、さらに下流の caspase-3 を活性化させた後、CAD によって DNA の断片化を生じさせるというのが通説であった。

3. 小胞体ストレス誘導型アポトーシス

近年になって、遺伝的要因であれ環境的要因であれ、神経変性疾患におけるアポトーシスは、これまでに知られていたアポトーシスとは、細胞を死滅させる機構が異なっていることが分かってきた。これまでは、上述の通り、アポトーシスの初期段階では、ミトコンドリアを介して活性化した caspase-9 が、さらに下流の caspase-3 を活性化させると考えられてきた。しかし、最近になり、神経変性疾患患者の神経細胞では、小胞体内腔に異常構造タンパク質 (unfolded protein) が蓄積していることが明らかになった¹。これを、小胞体ストレスと呼ぶ。小胞体ストレスによって、やはり神経細胞は、アポトーシスによって死滅する。小胞体ストレスは、実験レベルで、小胞体内での糖鎖修飾阻害剤、小胞体内からのカルシウム放出促進剤、小胞体からのタンパク質輸送阻害剤などを細胞に添加することによって容易に惹起することが出来る。そして、ラットやマウスの神経細胞を解析した結果、小胞体ストレスでは、小胞体に局在している caspase-12 が、小胞

体ストレス特異的に活性化していることが報告されている³。また、ヒトでは、caspase-4 が、同様の働きをしていることも最近になり、報告された¹²。その後、ミトコンドリアからの cytochrome c の放出を介さずに caspase-9 が活性化され、これまで知られていたアポトーシス実行のシグナルが伝わることで、細胞が死滅することが分かった²。我々も、培養大脳皮質神経細胞や PC12 細胞を用いて、ミトコンドリアからの cytochrome c の放出を介さず、caspase-12 が活性化した後、caspase-9 や caspase-3 を活性化させることによって小胞体ストレス誘導型アポトーシスによって細胞が死滅することを確認している¹³。つまり、ミトコンドリアの機能低下を基点としてアポトーシスが誘導されることに加え、他に、小胞体の機能異常を基点としてアポトーシスが誘導される機構が明らかとなった。そこで我々は、ミトコンドリアの機能低下と小胞体ストレス誘導型アポトーシスとの関連を解析するためにさらに以下の実験を行った。パーキンソン病を誘発する薬剤 MPTP は、MAO-B によって、活性化型の MPP⁺ に変化する。この MPP⁺ は、黒質ドーパミン作動性神経細胞をアポトーシスによって死滅させることから、パーキンソン病の基礎研究のために汎用されている。我々は、この MPP⁺ を PC12 細胞に添加し、小胞体ストレスマーカーである GRP78 の発現誘導を観察することを試みたが、アポトーシスによって細胞は死滅するものの、小胞体ストレスマーカー GRP78 の発現誘導は見られなかった¹⁴ (Fig.1)。ところが、興味深いことに、ミトコンドリアの機能低下によって、酸化物 (過酸化脂

質)は、産生され (Fig.2)、caspase-3 も経時的に活性化されることを観察することが出来た¹⁴。以上の結果は、これまでに知られているアポトーシスと小胞体ストレスによるアポトーシス誘導では、ミトコンドリアの機能低下の依存性は異なっており、ミトコンドリアの機能低下に依存しない小胞体を基点とするアポトーシスの存在を示唆している。

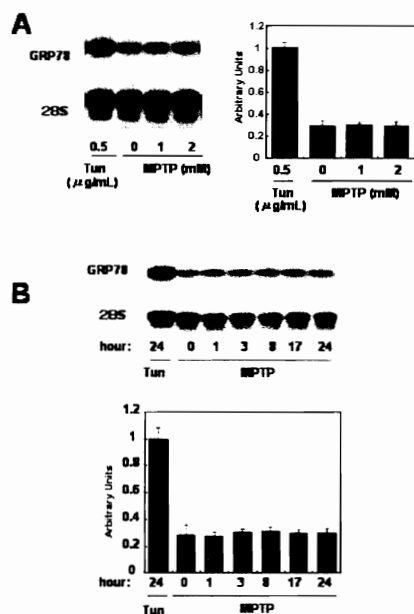


Fig.1. Expression of GRP78 after addition of MPTP in naive PC12 cells.

4. 神経栄養因子とその作用

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¹⁵。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。神経栄養因子は、神経突起の伸長、細胞生存維持、細胞分裂、シナプス可塑性に関与することがこれまでに知られている¹⁵。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、

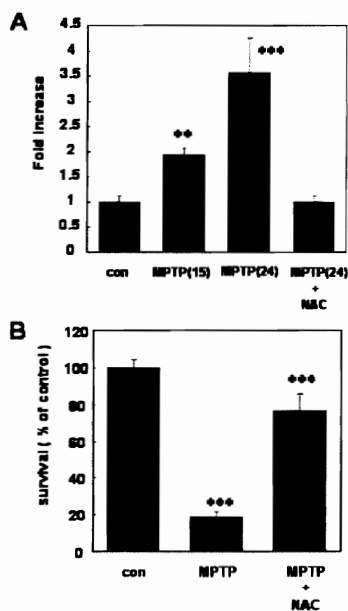


Fig.2. Quantification of lipid peroxide production in naive PC12 cells.

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。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。我々は、

小脳顆粒細胞を用いた低カリウム刺激によるアポトーシスや、PC12 細胞を用いた MPTP による酸化刺激によ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、アポトーシスから防御されることを見出している¹⁶⁻¹⁹。また、その他の神経細胞においても PI3-K/Akt 経路を介してアポトーシスが防御されている報告が数多く見られ、本経路によるアポトーシス抑制機構は広く認知されている。PI3K/Akt 経路は、アポトーシスを誘導するタンパク質として知られる BAD、pro-caspase-9、forkhead transcription factor (FKHR)、inhibitor NF- κ B kinase (IKK) をリン酸化することによって、それぞれの機能を抑制する。その結果として、アポトーシスが抑制されることになる。

5. 神経栄養因子による小胞体ストレス誘導型アポトーシスの抑制

我々は、糖鎖修飾阻害剤である tunicamycin を添加することによって惹起される小胞体ストレス誘導型アポトーシスが神経栄養因子によって抑制される現象を見出した^{13,20} (Fig.3)。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。そこで我々は、この caspase-12 活性が PI3-K/Akt 経路によって抑制され、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 tunicamycin を添加することによって、小胞体ストレスを惹起し、BDNF や NGF をそれぞれ培養大脳皮質神経細胞や PC12 細

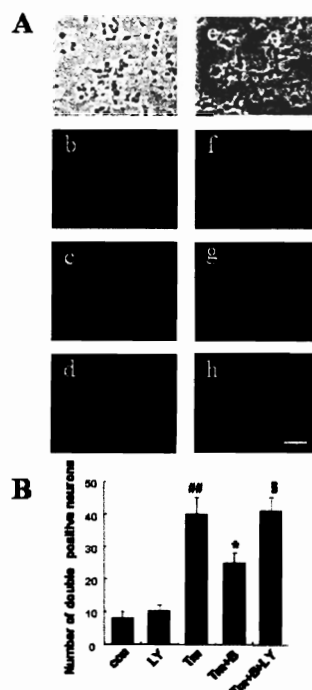


Fig.3. Suppression of fragmentation of nuclear DNA by BDNF via the PI3-K signaling pathway.

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^{13,20}。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 (Fig.4)。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。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²。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 (Fig.4)。

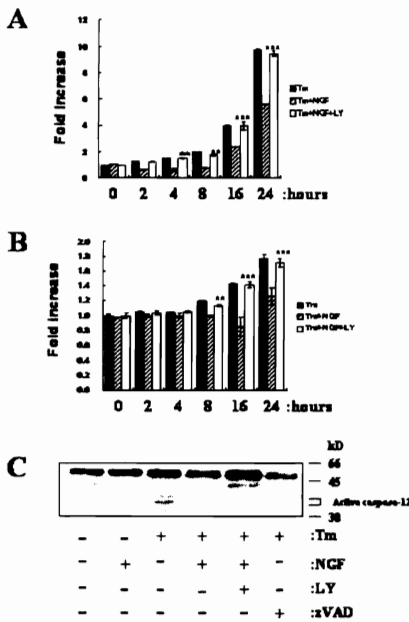


Fig. 4. Suppression of caspase-3/-9/-12 activity by PI3-K.

培養大脳皮質神経細胞と PC12 細胞の両細胞で、同様の結果が得られたことは、非常に興味深いことである。一方、BDNF や NGF による小胞体ストレス誘導型アポトーシスの抑制は、それら caspase 群によるカスケードの上流に存在する caspase-12 の活性化因子を抑制することが重要であることが分かった。caspase-12 には、Akt の基質認識アミノ酸配列が存在しないことから、caspase-12 の活性化因子およびその抑制に関わる分子の検索が、今後の課題であると考えている (Fig.5)。

6. 内在性小胞体ストレス抑制機構

細胞が小胞体ストレスにさらされると、細胞内在性の小胞体ストレス防御機構が働くことが知られている。例えば、小胞体内腔での異常構造タンパク質の蓄積を感知

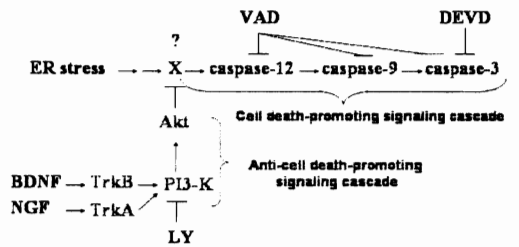


Fig.5. A proposed model for signaling pathway of the survival-promoting effect of BDNF and NGF on ER stress-induced cell death.

するセンサータンパク質である Ire1 α 、PERK、ATF6 を介して、分子シャペロンである GRP78 が発現誘導される。この応答を unfolded protein response (UPR) と呼んでいる²¹⁻²³。また、小胞体内腔に蓄積した異常構造タンパク質を小胞体内腔から排出し、ubiquitin-proteasome 経路によって分解する機構も知られている。この分解機構を endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) と呼んでいる。我々は、NGF が、caspase-12 の活性化を抑制するだけでなく、異常構造タンパク質の分解を促進することによって、小胞体ストレスを抑制している可能性について、proteasome 活性を測定することによって検証した。その結果、PC12 細胞に NGF を添加しても、NGF 無添加群の活性との有意な差は検出されなかった。従って、NGF は、小胞体ストレスそのものを抑制するのではなく、小胞体ストレスによって活性化されるアポトーシスのカスケードを不活性化することによって、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

示唆された。

7. 内分泌攪乱物質による小胞体ストレス誘導

近年、内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）による生殖細胞への影響について、多くの報告が見られ、次世代への影響が懸念されている。しかし、内分泌攪乱物質による神経細胞への影響については、あまり報告が見られていない。我々は、PC12細胞を用いて、各種内分泌攪乱物質による影響を評価している。現在までに、特定の内分泌攪乱物質によって、caspase-12の活性化が起こることを見出し、神経変性疾患との関連性について検討を深めたいと考えている。

8. 今後の神経栄養因子を介したシグナル伝達機構研究の課題

現在までのところ、神経変性疾患に対する決定的な治療策は未だ開発されておらず、神経細胞をアポトーシスから防御するための基礎研究の進展が期待されている。その様な研究環境下で、神経栄養因子自体の蛋白製剤化や遺伝子治療を目的として研究開発が進められている。しかし、現在までに神経変性疾患に対して、現実的な方策が確立されていない上に、一部の神経栄養因子の有効性までも否定される結果も出ている。今後、神経変性疾患の治療を目的に、基礎研究を行うのであれば、小胞体ストレス誘導型アポトーシスを抑制する細胞内シグナル伝達機構に含まれる分子をターゲットとした創薬やそれに基づく遺伝子治療も治療戦略立案の上で必要であると思われる。また、いずれの疾患にお

いても、現在行われている研究の殆どは、解析上の問題から、遺伝的要因を中心に行われている。神経変性疾患患者の殆どは、遺伝的背景を有さず、発症は、弧発性であることを認識することも、今後の研究推進上、重要であると考えられる。本稿で述べたPI3-K/Aktシグナル伝達経路は、遺伝的疾患も弧発性疾患においても有効に作用することが示唆されている。今後、治療法の確立を目指して、更なる基礎知見の集積を行う予定である。

謝辞

本研究は、ハイテク・リサーチ・センター一整備事業、平成14年度関西大学重点領域研究助成金、文部科学省・日本学術振興会科学研究費補助金、日本科学協会・笹川科学研究助成金、喫煙財団研究助成金の支援を受けた。ここに記して、深く謝意を表します。

文献

1. Katayama, T, Imaizumi, K, Sato, N, Miyoshi, K, Kudo, T, Hitomi, J et al., (1999) Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 1: 479-85.
2. Morishima, N, Nakanishi, K, Takenouchi, H, Shibata, T and Yasuhiko, Y, (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277: 34287-94.

3. Nakagawa, T, Zhu, H, Morishima, N, Li, E, Xu, J, Yankner, BA et al., (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403: 98-103.
4. Chartier-Harlin, MC, Crawford, F, Houlden, H, Warren, A, Hughes, D, Fidani, L et al., (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353: 844-6.
5. Sherrington, R, Rogaev, EI, Liang, Y, Rogaeva, EA, Levesque, G, Ikeda, M et al., (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-60.
6. Levy-Lahad, E, Wasco, W, Poorkaj, P, Romano, DM, Oshima, J, Pettingell, WH et al., (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269: 973-7.
7. Lilius, L, Froelich Fabre, S, Basun, H, Forsell, C, Axelman, K, Mattila, K et al., (1999) Tau gene polymorphisms and apolipoprotein E epsilon4 may interact to increase risk for Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 277: 29-32.
8. Cruts, M and Van Broeckhoven, C, (1998) Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Ann Med* 30: 560-5.
9. Kitada, T, Asakawa, S, Hattori, N, Matsumine, H, Yamamura, Y, Minoshima, S et al., (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605-8.
10. Rubinsztein, DC, Barton, DE, Davison, BC and Ferguson-Smith, MA, (1993) Analysis of the huntingtin gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region of the gene that contains two CCG-rich stretches and a correlation between decreased age of onset of Huntington's disease and CAG repeat number. *Hum Mol Genet* 2: 1713-5.
11. Enari, M, Sakahira, H, Yokoyama, H, Okawa, K, Iwamatsu, A and Nagata, S, (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50.
12. Hitomi, J, Katayama, T, Eguchi, Y, Kudo, T, Taniguchi, M, Koyama, Y et al., (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 165: 347-56.
13. Shimoke, K, Amano, H, Kishi, S, Uchida, H, Kudo, M and Ikeuchi, T, (2004) Nerve growth factor attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via suppression of caspase-12 activity. *J Biochem (Tokyo)* 135: 439-46.

14. Shimoke, K, Kudo, M and Ikeuchi, T, (2003) MPTP-induced reactive oxygen species promote cell death through a gradual activation of caspase-3 without expression of GRP78/Bip as a preventive measure against ER stress in PC12 cells. *Life Sci* 73: 581-93.
15. Takei, N and Nawa, H, (2004) [Modulation of brain function by neurotrophins]. *Seikagaku* 76: 111-23.
16. Shimoke, K and Chiba, H, (2001) Nerve growth factor prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced cell death via the Akt pathway by suppressing caspase-3-like activity using PC12 cells: relevance to therapeutical application for Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 63: 402-9.
17. Ikeuchi, T, Shimoke, K, Kubo, T, Yamada, M and Hatanaka, H, (1998) [Apoptosis-inducing and -preventing signal transduction pathways in cultured cerebellar granule neurons]. *Hum Cell* 11: 125-40.
18. Shimoke, K, Yamagishi, S, Yamada, M, Ikeuchi, T and Hatanaka, H, (1999) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 112: 245-53.
19. Shimoke, K, Kubo, T, Numakawa, T, Abiru, Y, Enokido, Y, Takei, N et al., (1997) Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase in prevention of low K(+)-induced apoptosis of cerebellar granule neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 101: 197-206.
20. Shimoke, K, Utsumi, T, Kishi, S, Nishimura, M, Sasaya, H, Kudo, M et al., (2004) Prevention of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *Brain Res* 1028: 105-11.
21. Mori, K, (2000) Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 101: 451-4.
22. Kaufman, RJ, (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13: 1211-33.
23. Urano, F, Bertolotti, A and Ron, D, (2000) IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 113 Pt 21: 3697-702.