

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と 小胞体ストレス

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Endoplasmic Reticulum Stress

片山 泰一^a
Taichi Katayama

^a大阪大学大学院・大阪大学, 金沢大学, 浜松医科大学 連
合小児発達学研究所の発達神経科学講座・分子細胞
遺伝学研究領域

要旨 家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の早期発症型変異 SOD1 (L84V) を発現する細胞を作製し小胞体 (ER) ストレス誘導剤ツニカマイシンを負荷した。その結果, 同細胞に SOD1 陽性凝集体が多数観察され, この凝集体は ER に局在することが示された。更に Lewy 小体様硝子様封入体 (LBHI) 等 FALS 患者様病理像が観察されたことから FALS 発症機構に ER ストレスが関与し L84V 発現細胞は LBHI 形成モデルとなり得る。

キーワード: 筋萎縮性側索硬化症, SOD1, 小胞体, Lewy 小体様硝子様封入体

1. はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は, 重篤な四肢, 下肢筋肉の萎縮と筋力低下をきたす遅発性, 進行性かつ特定の細胞 (運動神経) が変性を受ける神経変性疾患で, 発症すると患者の半数ほどが発症後 3 年から 5 年で呼吸筋麻痺により死に到ることが知られている¹⁾。しかしながら, 現在のところ根本的に有効な治療法はない。その原因は ALS における運動神経細胞死の分子メカニズムが解明されていないことに寄るところが大きい。ALS 患者の一部は家族性であるが大部分が孤発性である点は, アルツハイマー病 (AD) やパーキンソン病 (PD) など他の神経変性疾患と類似性を有する。家族性 ALS (FALS) の 20% 以上が Super Oxide Dismutase 1 (SOD1) の変異によって起きることが解っている²⁾。これまでの研究から, SOD1 変異による FALS 発症の原因は SOD1 変異による “Toxic gain of function” である可能性が高いが, 変異 SOD1 患者で見られる特徴的な Lewy 小体様硝子様封入体

(LBHI) 形成³⁾ が神経細胞に対して毒性をもつのか, 逆に, 凝集体形成は神経細胞保護のためなのかは不明であり, また, 凝集体形成のメカニズムも依然として不明である。従って, この凝集体の形成されるメカニズムの解明は, ALS の発症機構解明に非常に重要であると考えられる。ヒト変異 SOD1 を発現するマウス (SOD1 マウス) は筋力低下と筋萎縮を示して死亡することから, ALS のモデル動物として研究されているが, これに対して *in vitro* でのモデルが無いことが問題であった。そこで, 我々は, この LBHI 様凝集体を形成する *in vitro* のモデル系の確立をめざし, 近年, AD や PD に見られる神経細胞死が小胞体 (ER) を起源とする細胞死であることが報告されている^{4~6)} 点に着目し, 研究を開始した。

2. L84V 変異 SOD1 発現細胞は ER ストレスによってユビキチン化された凝集体を形成する

まず我々は FALS の中でも早期発症の原因として知られている L84V 変異 SOD1 を恒常的に発現するヒト由来神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞と野生型 SOD1 を高発現する細胞を作製し, これら細胞に ER ストレスとして糖鎖修飾阻害剤ツニカマイシン (TM) を 24 時間負荷し, 両細胞の形態学的変化を比較した⁷⁾。すると, L84V 変異 SOD1 発現細胞の一部に凝集体が観察された。なお, この凝集体は野生型 SOD1 を発現する細胞ではほとんど観察されなかった。更にこの細胞にプロテアソーム—ユビキチン経路阻害剤である Ac-LLNle-aldehyde (ALLN) を負荷するとこの凝集体を持つ細胞が多く観察された (図 1)。この凝集体は, エオジン好性で SOD1 抗体, ユビキチン抗体による免疫反応陽性であることから, ALS 患者に見られる病理像に近いとの期待から, この凝集体は本当に SOD1 がユビキチン化されて形成されているか否かについて検討した。すなわち, ユビキチンを強制発現させ, 抗 SOD1 抗体で免疫沈降し, ユビキチン抗体でプロットすることにより, ユビキチンアッセイを試みた。その結果, L84VSOD1 を発現する細胞のみでポリユビキチンによるラダーを検出した。このことは, 凝集した SOD1 がユビキチン化されていることを示唆している。

3. L84V 細胞/ER ストレスは LBHI 様封入体が観察される

さて, 上記 ER ストレス負荷した L84VSOD1 発現細胞を詳細に観察すると, ALS 患者に見られるような LBHI 様封入体が見つかった。この封入体は, L84VSOD1 発現トランスジェニックマウス脊髄前角に見られるアストロサイト内硝子様封入体 (Ast-HI) と形態学的に酷似していた。すなわち, この封入体は, エオジン好性であること, 電子顕微鏡観察によって, この封入体内に約 15 ~ 25 nm 径の granule-coated fibril が存在することが明らかとなった (図 2)。

^a 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2
TEL: 06-6879-3313; FAX: 06-6879-3229
2009 年 5 月 25 日受付

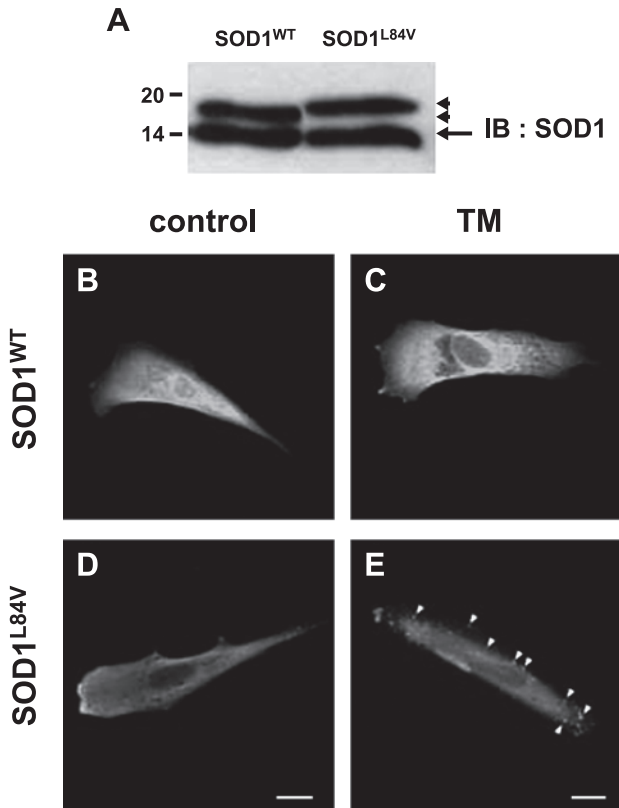


図1 Flag タグ付き野生型 SOD1 ならびに L84VSOD1 変異体細胞のウェスタンブロットと L84VSOD1/ER ストレス細胞に見られる凝集体

(A) Flag タグ付き野生型 SOD1 ならびに L84VSOD1 変異体を定常的に発現する神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞のウェスタンブロット。矢頭は Flag タグした SOD1, 矢印は内因性の SOD1 の位置を示す。(B-D) 蛍光免疫染色による SOD1 抗体陽性凝集体。SOD1 発現細胞 (B, C), L84V SOD1 発現細胞 (D, E)。細胞は溶媒刺激のみ (B, D), 1 μg/ml tunicamycinTM 刺激 (C, E)。TM 刺激した L84VSOD1 発現細胞では SOD1 陽性凝集体が観察される (矢頭), しかし同凝集体は野生型 SOD 発現細胞には見られない。Scale bar = 20 μm。

4. L84V 細胞/ER ストレスに見られる封入体は ER 由来である

それでは L84VSOD1 発現細胞を ER ストレス刺激して観察されるこのユビキチン化された SOD1 陽性凝集体はどのオルガネラで形成されているのだろうか?そこで, Mito-tracker (ミトコンドリアマーカー), Lyso-tracker (リソソームマーカー), GM130 (ゴルジ体マーカー), ER 保持シグナル KDEL (ER マーカー) など各種オルガネラマーカーを用いて免疫染色を行うと, この凝集体上で SOD1 と ER マーカーの KDEL のシグナルが共局在することが解った。また, 免疫電顕による観察では TM 刺激した L84VSOD1 発現細胞の細胞質の辺縁部に SOD1 シグナル陽性の粗面小胞体が多く観察された。そこで, この *in vitro* での現象が *in vivo* モデルでも見られるかどうかを確かめた。すなわち L84VSOD1 発現 Tg マウス脊髄前角細胞で見られる凝集体が ER 由来である

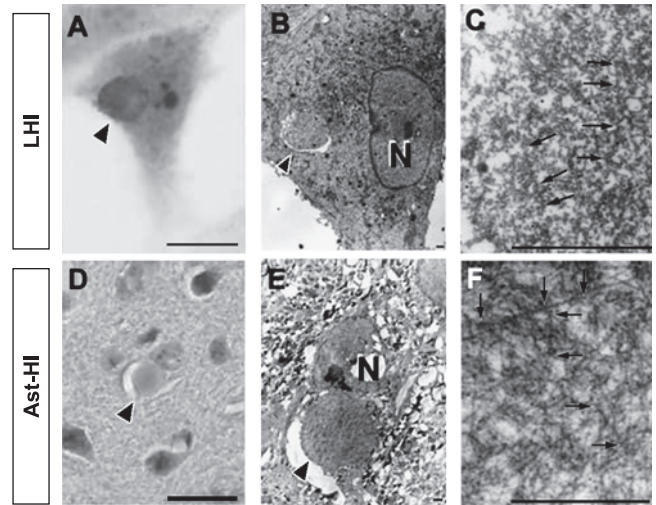


図2 granule-coated fibrils を含む硝子様封入体

(A-C) : 小胞体ストレス刺激後の L84V SOD1 発現 SK-N-SH 細胞における Lewy 小体様硝子様封入体 (LBHI) と (D-F) : L84V SOD1 トランスジェニックマウスの脊髄前角細胞におけるアストロサイト内硝子様封入体 (Ast-HI). (A) : TM 刺激後の細胞におけるエオジン好性 LHI (scale bar = 20 μm). (B) : (A) を拡大した電子顕微鏡による硝子様封入体 (矢印, N, 核; scale bar = 1 μm). (C) : さらに強拡大した電子顕微鏡像 granule-coated fibrils (矢印) 直径約 15-25 nm (scale bar = 1 μm). (D) : エオジン好性 Ast-HI. (E) : (D) を拡大した電子顕微鏡による Ast-HI. N, 核; scale bar = 1 μm. (F) : (E) の強拡大像. (scale bar = 1 μm). (C) と (F) に見られる fibrils は超微構造的に一致する。

かどうかについて検討した。その結果, 四肢麻痺などの症状が見られる前の Presymptomatic stage の L84VSOD1 発現 Tg マウスでは粗面小胞体に多数の遊離リボソームの異常な凝集が観察される事が解った (図3)。

5. 今後の展開

それではこの L84VSOD1 発現細胞は野生型 SOD1 発現細胞に比べて ER ストレスに対して脆弱になっているのだろうか? 実際, 予備検討ながら, L84VSOD1 発現細胞は, 野生型 SOD1 発現細胞に比べて, TM, サブシガルギンといった ER ストレス誘導剤に対して脆弱になっていることを確認している。また, この時, L84VSOD1 発現細胞は, ER ストレス特異的に活性化される細胞死実行分子カスパーゼ 4⁸⁾ の cleavage 断片が野生型 SOD1 発現細胞に比べて刺激後早期に出現することが解っている。今後, どのようにして細胞質に存在している SOD1 変異体が ER 機能に影響を及ぼすのかについて明らかにするとともに, この現象が L84VSOD1 変異体みの現象ではないことを確認する必要がある。すなわち, FALS 患者で見られる他の変異, 例えば G93A, H46R 等の代表的な SOD1 変異体でも確認する予定である。以上のことから変異 SOD1 を原因とする FALS の発症機構に小胞体ストレスが関与する可能性が示され, 今回作製した L84V SOD1 発現細胞は LBHI 様封入体形成のモデルとなりうる事が示された。

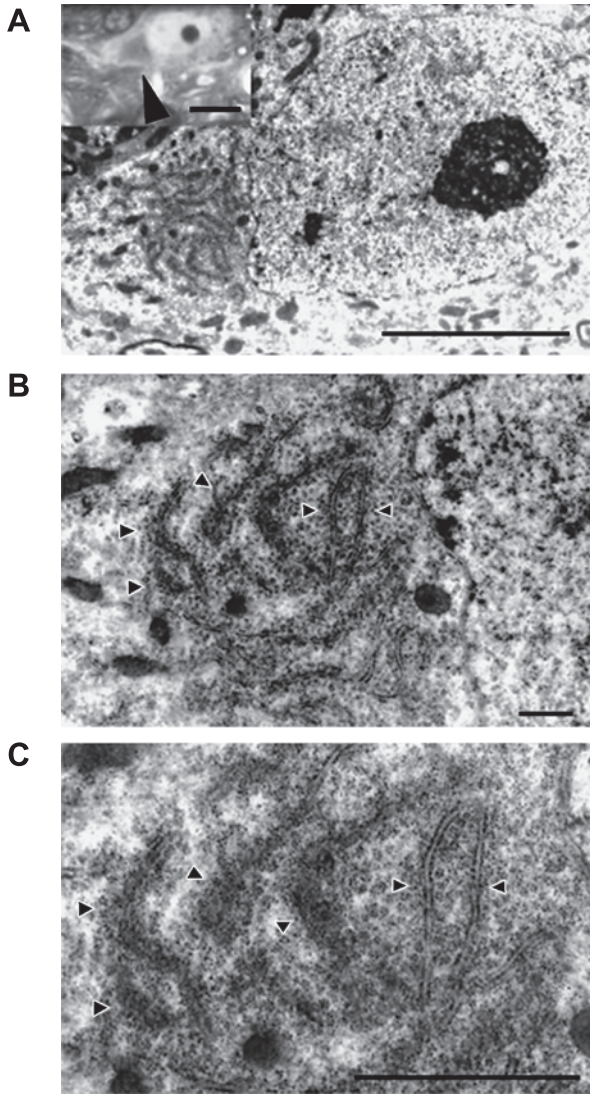


図3 Presymptomatic stage の L84VSOD1-Tg マウスに見られる粗面小胞体における多数の遊離リボソームの異常な凝集 (A-C)

(A) のインセットはトルイジンブルー染色による細胞質内封入体様構造物(矢頭)を示す。(A) : $\times 3500$ (scale bars = 20 μm). (B) $\times 8000$ (scale bar = 1 μm). (C) $\times 15000$ (scale bar = 1 μm). 矢頭は異常な遊離リボソームの凝集物を示す。

謝 辞

本研究は、現在ミュンヘン MaxPlanck 研究所に所属する山岸覚先生、大阪大学、小山佳久先生、遠山正彌先生、鳥取大学加藤信介先生、東北大学糸山泰人先生ら多くの共同研究者によってなされたものであり、ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) Bruijn, L.I., Miller, T.M. and Cleveland, D.W.: *Annu. Rev. Neurosci.*, **27**, 723–749 (2004)
- 2) Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P. *et al.*: *Nature*, **362**, 59–62 (1993)
- 3) Kato, S., Takikawa, M., Nakashima, K., Hirano, A., Cleveland, D.W. *et al.*: *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.*, **1**, 163–184 (2000)
- 4) Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T. *et al.*: *Nat. Cell Biol.*, **1**, 479–485 (1999)
- 5) Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K. *et al.*: *Genes Dev.*, **16**, 1345–1355 (2002)
- 6) Takahashi, R. and Imai, Y.: *J. Neurol.*, **250** Suppl 3, III25–29 (2003)
- 7) Yamagishi, S. *et al.*: *PLoS One*, **2**(10), e1030 (2007)
- 8) Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M. *et al.*: *J. Cell Biol.*, **165**, 347–356 (2004)