

Rescue of neuronal cells by activating unfolded protein response (UPR)

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/25863

【総説】

小胞体ストレス応答活性化による神経細胞の救済

Rescue of neuronal cells by activating unfolded protein response (UPR)

金沢大学医学系研究科神経分子標的学
(解剖学第三)

北尾 康子

はじめに

小胞体は、カルシウム恒常性の維持、脂質の代謝、そして分泌系蛋白質の生合成を行う小器官であると共に、重要な細胞内ストレス応答の場でもある。細胞内環境の悪化により、エネルギー枯渇(低酸素・虚血)、カルシウム恒常性の破綻、蛋白質の修飾異常等が発生すると、小胞体内に構造の乱れた蛋白質が蓄積し、小胞体ストレスと呼ばれる状態に陥る。しかしこの時、unfolded protein response (UPR) と呼ばれる細胞内シグナルが活性化され、小胞体救済反応が誘発される。すなわち、①小胞体における負担を軽減するために蛋白合成は抑制される、②蓄積した蛋白質の構造を改善するために小胞体局在型の分子シャペロンが増加する、③質の悪い蛋白質がユビキチン・プロテアソーム系ubiquitin proteasome system (UPS) により分解される。通常、UPRの活性化は細胞機能の正常化を導くが、小胞体ストレスの程度がUPRの許容を遙かに越えて、小胞体の機能が著しく損なわれると、UPRを起点とした細胞死シグナルが働くことになる(図1)。そして、小胞体ストレスが、癌、糖尿病などを含む様々な疾患の発症や増悪に関与していることが知られてきており、特に異常蛋白の凝集蓄積を特色とするアルツハイマー病、パーキンソン病に代表される神経変性疾患においては、小胞体ストレスを病因とする報告が多く見られ、最近の知見からは、UPRの強化が治療につながる可能性

も示唆されている¹⁾。

I. 虚血性細胞死と興奮性アミノ酸による神経細胞死

150kDa Oxygen Regulated Protein (ORP150) は、アストログリアの初代培養系により精製、クローニングされた新規ストレス蛋白であるが、GRP78やGRP94と同様に小胞体に局在する分子シャペロンである²⁾。げっ歯類の中大脳動脈閉塞後の虚血側で強い誘導が見られ³⁾、また、興奮性アミノ酸投与により、マウス海馬、培養海馬神経細胞においても発現の上昇が見られている。ORP150を強制発現させたトランジエニックマウス (TG)、およびORP150ノックアウトマウスヘテロ接合体 (KO) において興奮性アミノ酸による神経細胞死を評価すると、KOではカイニン酸によって海馬CA1細胞の脆弱性が亢進し、これに対してTGでは抵抗性が見られた(図2)⁴⁾。また、興奮性アミノ酸によって引き起こされる細胞内カルシウム負荷⁵⁾が、小胞体に強制発現させたORP150によって緩衝され、致死的な細胞内カルシウムの上昇を抑え、神経細胞を細胞死から救済しており、興奮性アミノ酸に対して小胞体ストレスが重要であることと、ORP150を介した神経細胞死抑制の可能性が示唆された⁴⁾。

II. 小脳プルキンエ細胞発生における小胞体の関与

小脳プルキンエ細胞は虚血や興奮性アミノ酸に脆弱であること⁶⁾、また過剰に生成された神経細胞は生後発達過程でアポトーシスにより減少する(naturally occurring cell death)こと⁷⁾が知られている。野生型マウス小脳では生後4-8日にかけてORP150の明らかな発現の上昇がみられ(図3)、それと同時期をピークにプルキンエ細胞層でアポトーシスの指標であるTUNEL反応や活性型 Caspase3の免疫陽性細胞が見られたが、ORP150TGでは陽性細胞数が有意に減少していた。Calbindin染色で評価したプルキンエ細胞数も生後4-20日にかけてTGで多く、KOで減少していた。行動テスト(rotor rod test)の結果はORP150TGで小脳機能の劣化を示し、過剰に生き残った神経細胞が障害となることが推察された。ORP150TGの培養プルキンエ細胞でも低酸素やAMPA誘導ストレスに抵抗性であることが明らかとなり、小脳発達過程における神経細胞死にも小胞体の関与が示唆された⁸⁾。

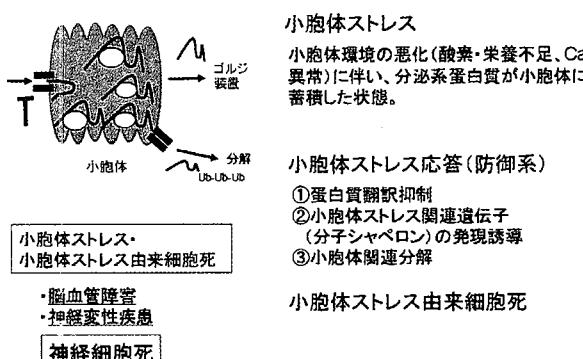


図1. 小胞体ストレスとストレス応答

III. 黒質ドーパミン細胞死における小胞体ストレス

パーキンソン病はアルツハイマーについて多い神経変性疾患で、特徴的な運動障害の進行は黒質緻密層のドーパミン神経細胞の喪失と密に関連している。散発例が大部分を占めているが、家族性に発症する例では、いくつ

かの遺伝子に変異があることが発見されている。その中のParkinは、若年性遺伝性パーキンソン病 (AR-JP) 原因遺伝子の一つ⁹⁾であり、ユビキチン架橋酵素として細胞内タンパク分解に関与している。膜貫通型のParkin受容体であるPael-R (Parkin-associated endothelin receptor-

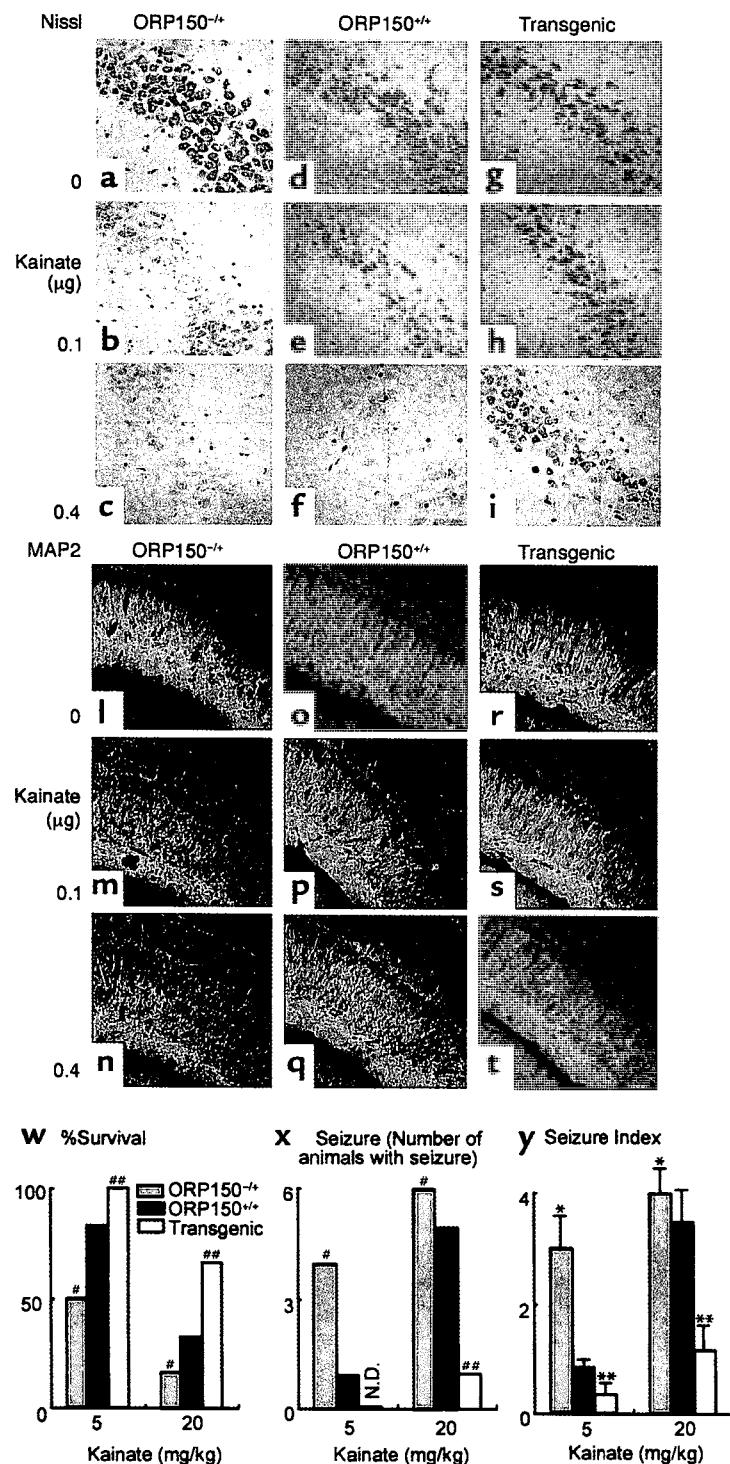


図2. カイニン酸の海馬神経細胞毒性に対する分子シャペロンORP150の効果。ORP150トランスジェニックマウス (Transgenic), ノックアウトヘテロマウス (ORP150^{-/-}), 野生型マウス (ORP150^{+/+}) にカイニン酸 (0-0.4 μg) を投与し, 12時間後にニッスル染色 (a-i) より MAP2の免疫染色 (l-t) を行った。CA1-CA3の生存神経細胞数 (j, k) とMAP2陽性ニューライト (u, v; n=8) の密度, カイニン酸投与24時間後の生存率 (w) と痙攣発作 (x, y) (n=6) を棒グラフで示した。

like receptor) は、小胞体内でタンパク修飾を受け細胞膜に輸送されるが、その構造が極めて複雑であるため、発現によって強い小胞体ストレスが惹起されることが分っている¹⁰⁾。神経特異的なアデノウイルスベクター¹¹⁾を用いてPael-Rを線条体に注入し、逆行性に黒質に導入したところ、Parkinノックアウトマウスでは、Pael-R発現によって黒質に顕著な細胞死が見られた(図4)。またこの黒質緻密層に引き起こされる神經細胞死が小胞体機能の脆弱なORP150KOマウスでも強く観察された。更に、この脆弱性が、ORP150やParkin遺伝子など、小胞体関連タンパクの強制発現で改善され、小胞体依存性神經細胞死の重要性が明らかとなった。一方、ドーパミン合成阻害剤であるAMPT(α -methyl-DL-Tyrosine)をマウスに投与すると、Pael-R発現による神經細胞死が軽減された。

以上により、Pael-Rの発現が小胞体ストレスを引き起こし、黒質に選択的な細胞死を誘発すること、さらに、ドーパミンの酸化毒性が小胞体ストレスを更に増悪することが明らかとなった。潜在的なパーキンソン病では黒質線条体神經のドーパミン代謝の亢進で代償しており、このような時期に神經細胞死がドーパミン毒性により加速される可能性が示唆された¹²⁾。またパーキンソン病の実験動物モデルであるMPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)投与マウスの黒質においても、ORP150の有意な発現上昇と、ORP150によるドーパミン細胞に対する保護効果が認められ、黒質線条体投射細胞の維持に小胞体機能が重要であることが示唆された¹³⁾。

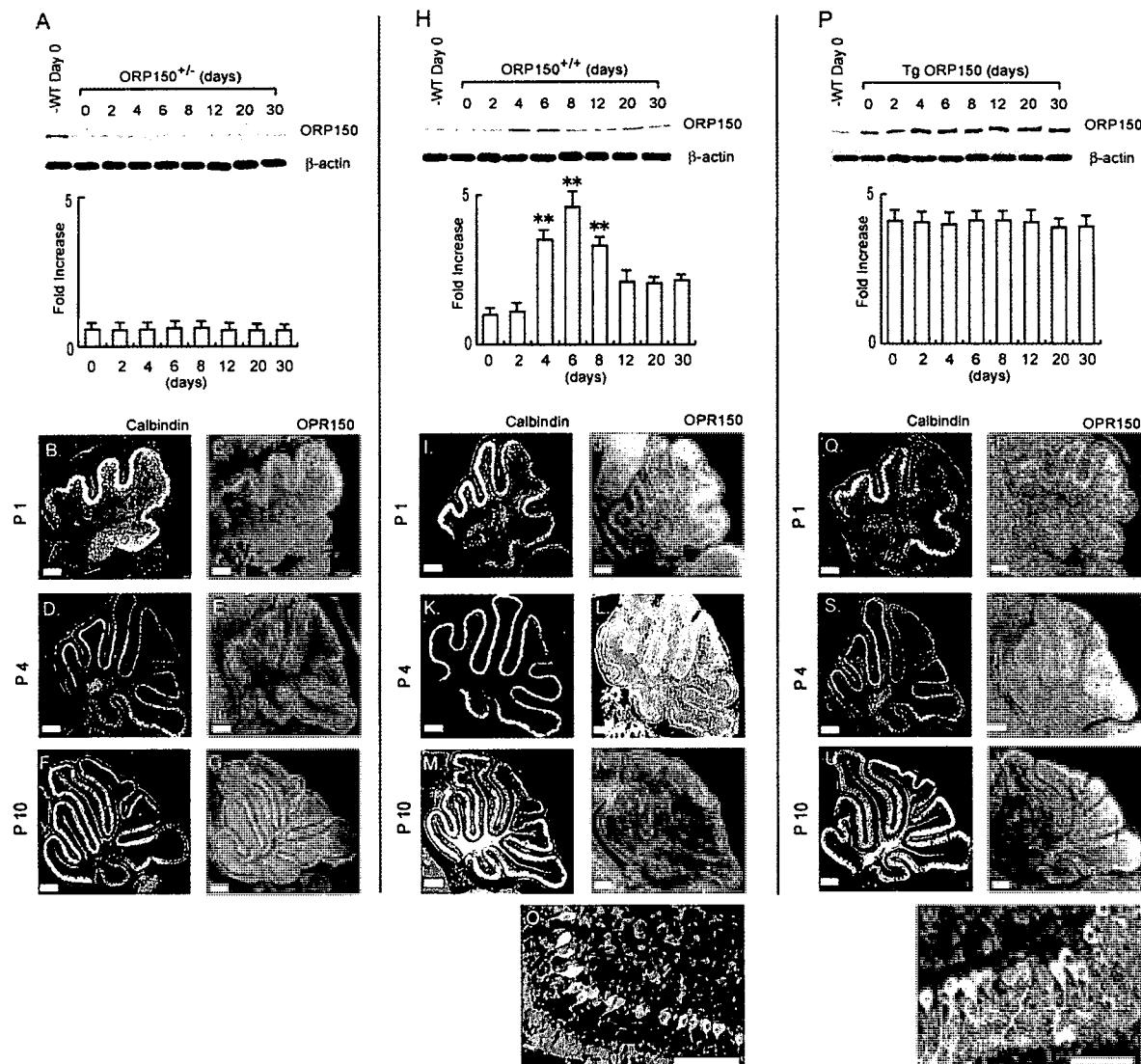


図3. 小脳におけるORP150の発現。(A) ORP150ノックアウトヘテロ接合体(ORP150^{+/-}; A), 同腹野生型(ORP150^{+/+}; H), トランスジェニックマウス(TgORP150; P)で生後0–30日(P0-30)の小脳抽出タンパクのORP150(上)と β アクチン(下)の免疫プロット法を行った。免疫強度は吸光度で分析し野生型マウスP0の値と比較して表した(n=6)。ORP150^{+/-}(B-G), ORP150^{+/+}(I-O), TgORP150(Q-W)マウスをP1, P4, P10で灌流固定し, Calbindin D(B,D,F,I,K,M,Q,S,U)とORP150(C,E,G,J,L,N,O,R,T,V,W)で免疫染色を行った。O,WはそれぞれN,Vの拡大。

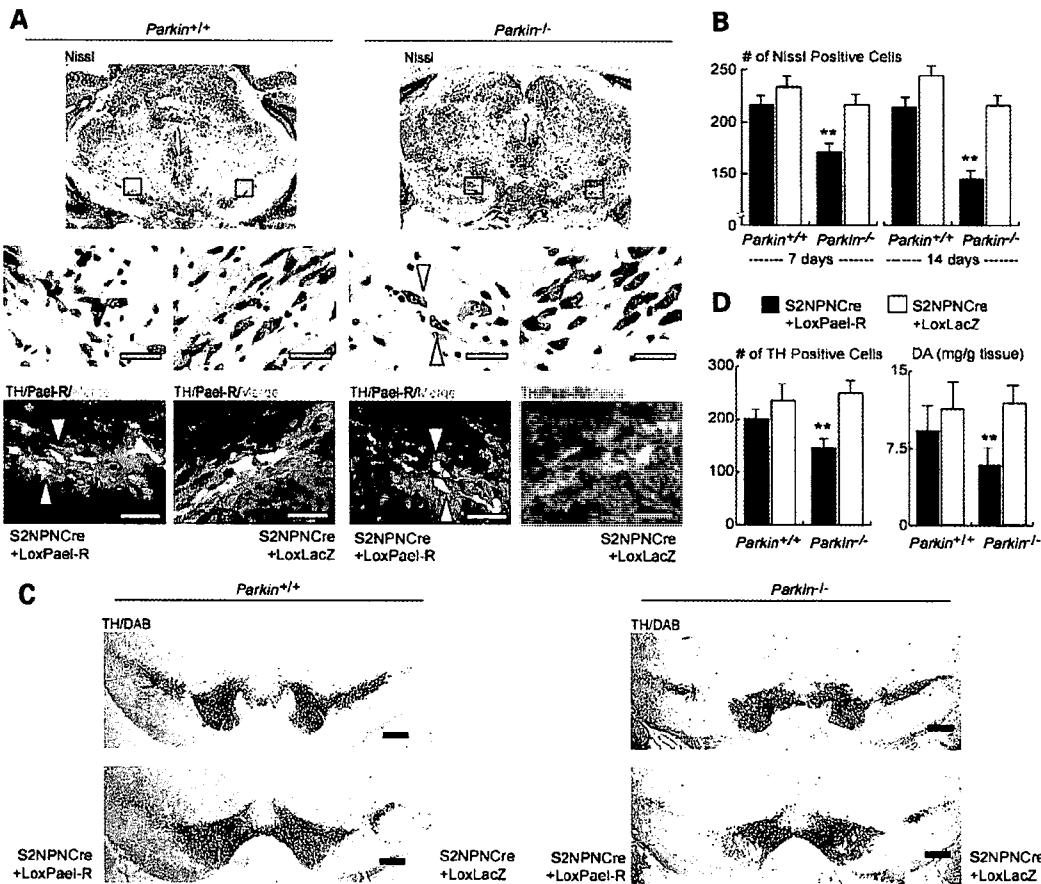


図4. アデノウイルスにより強制発現させたPael-RによるParkinノックアウトマウス(Parkin^{-/-})における黒質緻密部神経細胞死の増加。(A) LoxEGFP (5x10⁸p.f.u.), S2NPNCre (x10⁹p.f.u.), LoxPael-R (x10⁹p.f.u.)を含むアデノウイルスベクター(2μl)をParkin^{+/+}およびParkin^{-/-}マウスの左側線条体に、対照としてLoxPael-Rの代わりのLoxLacZ(x10⁹p.f.u.)とLoxEGFP (5x10⁸p.f.u.), S2NPNCre (x10⁹p.f.u.)を対側に注入した。7日後に灌流固定し中脳切片のニッスル染色(上2段)と、その隣接切片のTH, Pael-Rによる2重免疫染色(下段)を行った。中段は上段の矩形部の拡大、典型的な変性細胞を透明矢頭で、THかつPael-R陽性細胞を白色矢頭で示した。(B) 投与7日、14日後のニッスル陽性細胞数を棒グラフで表した(検側、黒; 対照側、白; n=6)。(C) 投与10日後のTH陽性細胞像(上段、ブレグマより-3.28mm; 下段、-3.52mm)。(D) 投与7日後のTH陽性細胞数(左側)とHPLC-EC法によるドーバミン量(右側)を棒グラフで表した(検側、黒; 対照側、白; n=6)。

おわりに

以上、急性脳虚血、慢性神経変性疾患において小胞体機能の強化が神経細胞死の防御に重要であることを示した、また、発生過程で神経組織形成にみられるプログラムされた神経細胞死における小胞体の関与についても示した。小胞体ストレス応答関連の分子機構も急速に解明されてきており、今後、これら小胞体関連の知見が神経疾患の臨床治療開発に応用されることを期待している。

謝辞

本研究を遂行するにあたり御指導を賜りました、小川 智先生、堀修教授、ならびに実験を補助していただきました金沢大学神経分子標的学講座の皆様に感謝いたします。また、今回執筆の機会を与えてくださいました金沢大学十全医学会雑誌編集委員長、井関尚一教授ならびに関係者の方々に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell death differentiation* 13: 385-392, 2006
- 2) Kuwabara K, Matsumoto M, Ikeda J, Hori O, Ogawa S, Maeda Y, Kitagawa K, Imuta N, Kinoshita T, Stern DM, Yanagi H, Kamada T. Purification and characterization of a novel stress protein, the 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150), from cultured rat astrocytes and its expression in ischemic mouse brain. *J. Biol. Chem* 271: 5025-5032, 1996
- 3) Miyazaki M, Ozawa K, Hori O, Kitao Y, Matsushita K, Ogawa O, Matsuyama T. Expression of 150-KDa oxygen regulated protein in the hippocampus suppresses delayed neuronal cell death. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22: 979-987, 2002
- 4) Kitao Y, Ozawa K, Miyazaki M, Tamatani M, Kobayashi T,

- Yanagi H, Okabe M, Ikawa M, Yamashima T, Stern DM, Hori O, Ogawa S. Expression of the endoplasmic reticulum molecular chaperone (ORP150) rescues hippocampal neurons from glutamate toxicity. *J. Clin. Invest.* 108: 1439-1450, 2001
- 5) Coyle JT, Puttfarchen P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695, 1993
- 6) Welsh JP, Yuen G, Placantonakis DG, Vu TQ, Haiss F, O'Hearn E, Molliver ME, Aicher SA. Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4 and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Adv. Neurol.* 89: 331-359, 2002
- 7) Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Giuffrida Stella AM, Butterfield DA. Molecular chaperones and their roles in neural cell differentiation. *Dev. Neurosci.* 24: 1-13, 2002.
- 8) Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, Stern DM, Kano M, Ozawa K, Ogawa S. ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: a role for endoplasmic reticulum stress in cerebellar development. *J. Neurosci.* 24: 1486-1496, 2004
- 9) Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the Parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392: 605-608, 1998
- 10) Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105: 891-902, 2001
- 11) Kanegae Y, Lee G, Sato Y, Tanaka M, Nakai M, Sakaki T, Sugano S, Saito I. Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res.* 23: 3816-3821, 1995
- 12) Kitao Y, Imai Y, Ozawa K, Kataoka A, Ikeda T, Soda M, Nakimawa K, Kiyama H, Stern DM, Hori O, Wakamatsu K, Ito S, Itohara S, Takahashi R, Ogawa S. Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of parkin inactivation. *Hum. Mol. Genet.* 16: 50-60, 2007
- 13) Kitao Y, Mastuyama T, Takano K, Tabata Y, Yoshimoto T, Momoi T, Yamatodani A, Ogawa S, Hori O. Does ORP150/HSP12A protect dopaminergic neurons against MPTP/MPP(+) -induced neurotoxicity? *Antioxid. Redox Signal.* 9: 589-595, 2007