

学位論文題名

Proteasome Inhibition Induces Selective Motor Neuron
Death in Organotypic Slice Cultures

(脊髄スライス培養を用いた運動ニューロンの
プロテアソーム障害に対する特異的脆弱性に関する検討)

学位論文内容の要旨

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は全身の進行性筋萎縮、筋力低下を来し、呼吸筋麻痺や肺炎のため平均 3 年で死に至る神経変性疾患の一種である。上位・下位運動ニューロンが系統的に変性脱落するがその原因は不明である。現在対症療法が主であり、進行を抑制する治療は内服薬が種類のみでその効果も約 3 ヶ月の延命に過ぎないことから、病態解明と根治療法の開発が急務である。約 10% が家族性でそのうち 20% 以上がスーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) の変異によることが解っており、変異 SOD1 を導入した腫瘍系細胞やトランスジェニックマウス・ラットを用いた研究が盛んに行われている。これらのモデルは大部分を占める孤発性 ALS と共通点は多いが、病態の一面しか見ていない危険がある。

神経変性疾患を分子細胞学的に研究する際に、系統的に侵されやすいニューロン (例えばパーキンソン病の中脳黒質ドパミン細胞) とその他の種類のニューロンの動態を比較しその特殊性を検討する手法がよく用いられる。ALS では脊髄運動ニューロンがその対象となるが、運動ニューロンの選択的培養や、雑多な脊髄ニューロンの分散培養後に運動ニューロンを正確に同定するのは難しい。このため、我々はまず運動ニューロンの同定が正確かつ容易に行えるスライス培養法を確立することを第一の課題とした。スライス培養では脊髄水平方向の構造が保たれるため前角という位置情報があり免疫染色と組み合わせると前角運動ニューロンを正確に同定できる。

パーキンソン病や ALS などの神経変性疾患では、その病理像において、特定の細胞群が特異的に脱落すると同時に残存細胞内に疾患特異性の高い封入体が見られることが特徴である。近年の免疫染色法などの発達により封入体はユビキチン陽性でプロテアソームサブユニットも巻きこまれていることが報告されており、ユビキチン・プロテアソーム系 (UPS) を介した蛋白分解障害が病態形成において重要な役割を果たしている可能性が指摘されている。そこで、ALS の病態解明を目的とし、確立したスライス培養系を用いてプロテアソーム障害が運動ニューロンにもたらす影響について検討することを第二の課題とした。

B. 研究方法

生後 6 日目の SD ラットをケタミンで深麻酔後、脊髄腰膨大を採取し 400 μ m にスライスした。培養液を満した六穴プレート内に物質交換が可能な多数の小孔が空いた膜を置き、スライスを膜上に載せて半気相下で 2 週間培養、培地交換は週 2 回行った。培養 10~11 日目にプロテアソーム阻害剤であるラクタシスチンまたはエポキシオミシンに曝露し、36~72 時間後に免疫組織染色法などを用いて生存細胞数を評価した。生存運動ニューロンは脊髄前角に存在する抗非リン酸化ニューロフィラメント抗体である SMI 32 陽性の大型細胞で胞体の 5 倍以上の長さの突起を持つものと定義した。後角ニューロンのマーカーとして抗カルレチニン抗体を用いた。

本研究は北海道大学医学部動物実験に関する指針に基づいて行った。

C. 研究結果

ラクタシスチン 5 μ M に曝露するとスライス全体のプロテアソーム活性はコントロールの 30~40%に低下した。SMI-32 で免疫染色すると曝露後約 36 時間から前角運動ニューロンで突起の断片化が見られるようになり、72 時間後では運動ニューロンの変性・脱落が見られたが、後角ニューロンではこのような変化は見られなかった。ALS ではリン酸化ニューロフィラメント陽性運動ニューロンが出現することから、SMI-32 と抗リン酸化ニューロフィラメント抗体 (SMI 31 または SMI 34) との二重染色を行ったところ、リン酸化ニューロフィラメント陽性運動ニューロンは曝露後 48 時間で有意に増加した。

ALS で傷害されやすい運動ニューロンは Ca^{2+} 結合蛋白の発現が少なく Ca^{2+} 緩衝能が低いことが報告されている。我々の系でも緩衝能の高い Ca^{2+} 結合蛋白であるカルピンディン、カルレチニンの免疫染色は運動ニューロンでは陰性だった。カルレチニン陽性後角細胞はラクタシスチン 5 μ M に曝露しても有意な変化はなかった ($p>0.05$)。更に、細胞透過性の細胞内 Ca^{2+} キレーターである BAPTA-AM をラクタシスチンと同時に添加すると運動ニューロンは有意に保護された ($p<0.01$) ことから、細胞内 Ca^{2+} が運動ニューロンの特異的脆弱性に関与している可能性が示唆された。

D. 考察

運動ニューロンは特にプロテアソーム障害に脆弱であること、変性初期には神経突起の変性とニューロフィラメントのリン酸化を伴うこと、 Ca^{2+} 動態が重要であることを示した。神経変性疾患の進行には様々なカスケードがクロストークしていると考えられているが、中でも UPS 障害は神経変性疾患全般において関与が想定されている。特にパーキンソン病で研究が進んでいるが、当教室では過去の論文で中脳ドパミンニューロンはプロテアソームが障害されても比較的脱落しにくいことを示している。今回の結果から、プロテアソーム活性低下は ALS において脊髄運動ニューロンの特異的脆弱性を決める重要な要素となりうることを示された。

実際の ALS 患者では cytosolic protease 活性の変化はないという報告が一件ある他に患者脊髄のプロテアソーム活性について詳細に検討した報告はなく、今後の検討が待たれる。今後、プロテアソーム障害の下流の経路について詳細を明らかにできれば ALS の病態解明と進行抑制に有用であろうと考えている。

E. 結論

脊髄スライス培養法を確立し、運動ニューロンはプロテアソーム障害に特に脆弱であることを示した。運動ニューロンの特異性には細胞内 Ca^{2+} の増加が重要な役割を果たしていると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 藤 田 博 美

副 査 教 授 佐々木 秀 直

学 位 論 文 題 名

Proteasome Inhibition Induces Selective Motor Neuron Death in Organotypic Slice Cultures

(脊髄スライス培養を用いた運動ニューロンの
プロテアソーム障害に対する特異的脆弱性に関する検討)

申請者の学位論文は、近年神経変性疾患全般において重要な病態とみなされているユビキチンプロテアソーム系障害に着目し、培養脊髄細胞において運動ニューロンが特にプロテアソーム障害に対して特異的脆弱性を示すことを明らかにしたものである。本研究で用いられた培養方法に関しては本邦では殆ど行われていない脊髄スライス培養法を取り入れた点に工夫が見られる。スライス培養法は筋萎縮性側索硬化症(ALS)における運動ニューロンの特異性脆弱性を解析する際に海外の研究者ではよく取り入れられている手法であるが、従来の分散培養法に比べ正確に運動ニューロンを同定することができることをまず示した。この培養を2種のプロテアソーム阻害剤(ラクタシスチンとエポキシソミン)に曝露し、免疫染色法で運動ニューロンと後角ニューロンの比較を試み、運動ニューロンの特異的脆弱性を証明した。さらに、他のALS病因仮説との関連について論じ、カルシウム緩衝能低下仮説に着目した。免疫蛍光染色法を用いてカルシウム結合蛋白の発現を検討し、運動ニューロンで発現低下が見られることを示した。また、細胞内カルシウムキレーターで運動ニューロン死が回避できることから、プロテアソーム障害による運動ニューロン死にはカルシウム動態の破綻が関与していると結論した。副査の藤田教授より神経細胞密度が不均一でプロテアソーム阻害剤一様に作用しているか、カルシウム緩衝能の実態に関する質問があった。次に主査の畠山教授より細胞死の形態に即した客観的細胞死定量法に関する質問と神経変性疾患全体におけるユビキチンプロテアソーム系障害の関与に関する質問、さらに試薬の濃度設定に関する示唆があ

った。最後に副査の佐々木教授が培養法に関する質問と細胞内凝集体形成の関与についての質問をした。申請者はいずれの質問や示唆に対しても過去の文献報告や未発表データを引用して概ね妥当な解答をした。

申請者の研究は ALS の病理学的特徴である脊髄前角運動ニューロンの選択的脱落変性のメカニズムを検討する上で価値のある実験モデルと言える。申請者の目標は ALS の病態機序の解明にある。この実験系をもとに運動ニューロン死の分子機構を検討し、発症機序に関する研究に展開することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。