

学位論文題名

Role of p53 in neurotoxicity induced by the
endoplasmic reticulum stress agent tunicamycin
in organotypic slice cultures of rat spinal cord

(ラット脊髄器官培養系における小胞体ストレス誘導薬剤
ツニカマイシンによる神経毒性における p53の役割)

学位論文内容の要旨

小胞体は様々な種類のタンパク質の折りたたみと成熟に重要な働きをしている細胞内小器官である。小胞体は正しく折りたたまれたタンパク質のみをゴルジ装置に送ること、タンパク質の厳密な品質管理を担っている。種々の生化学的、生理学的刺激により小胞体の定常状態が崩れると、折りたたまれる前のタンパク質、または異常に折りたたまれたタンパク質が小胞体内腔に蓄積することになり、この状態を小胞体ストレスと呼ぶ。小胞体ストレス下では、細胞は生き延びるために種々の経路を活性化するが、そのような反応によって状態を改善できない場合、アポトーシスに至る。

近年、アルツハイマー病やパーキンソン病およびポリグルタミン病などの神経変性疾患や脳虚血、プリオン病など様々な神経疾患において、小胞体ストレスがその病態に重要な役割を果たしていることが報告されている。しかし、これまで脊髄神経細胞を用いて、小胞体ストレスの脊髄疾患への関与を検討した報告は少ない。

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) は上位及び下位運動ニューロンを選択的に障害する神経変性疾患である。ALS 例の大部分は孤発性であるが、約 10% は家族性であり、さらにその 20% は Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子変異によることがわかっている。SOD1 遺伝子変異とそれに伴う細胞死の機序については、ミトコンドリア機能異常、ゴルジ装置の断片化およびカスパーゼの活性化などが議論されているが、小胞体ストレスの関与については未だ明らかにされていない。

われわれはこれまで脊髄神経細胞に関して、ユビキチン-プロテアソーム系の機能異常、小胞体ストレスおよびそれらに関連する細胞死にいたる経路について検討してきた。また、われわれは最近、ラット脊髄器官培養法を確立した。この方法は、水平面内では脊髄の構造が保たれていることから、in vivo と in vitro の中間的な実験系と考えられ、

この方法を用いることにより、従来の免疫反応性に加えて解剖学的な位置情報が得られるため、より正確な細胞種の同定が可能となる。

以上のような背景を踏まえて、今回われわれは小胞体ストレス誘導薬剤としてツニカマイシンを用いて、ラット脊髄器官培養系において脊髄神経細胞に対する小胞体ストレスの影響を検討した。さらに、小胞体ストレスによって惹起される細胞死の経路に p53 が関与しているかどうかについても検討を行った。

ラット脊髄器官培養については、生後 7 日目の Sprague-Dawley ラットを深麻酔下に断頭後、脊髄を摘出して約 400 μ m 厚のスライスを作成し、培地に接する膜上に置いて、37°C、5%CO₂ の条件で培養を行った。培養 10 日目にツニカマイシン単独またはツニカマイシンと p53 阻害剤のピフィスリン α を同時に添加した。薬剤添加 24 時間および 72 時間後にウエスタンブロット用に検体作成をしたほか、同 72 時間後に固定、染色を行い、光学顕微鏡または共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察した。脊髄前角に位置する細胞体の大きさが 30 μ m 以上の SMI-32（抗ニューロフィラメント抗体）陽性細胞を前角運動神経細胞とし、脊髄後角にある抗カルレチニン抗体陽性細胞を後角介在神経細胞として、それぞれ対照群に対する薬剤添加群の細胞生存率を算出し、統計処理を行った。

ウエスタンブロット法にて小胞体ストレスマーカーである GRP78 の発現亢進を認め、ツニカマイシン添加により小胞体ストレスが誘導されたことを確認した。ツニカマイシン添加により用量依存性に神経細胞生存率は減少したが、前角の運動神経細胞に比べ後角の介在神経細胞の方が、より低濃度から障害を受けており、ツニカマイシン誘導性の小胞体ストレスに対してより脆弱であると考えられた。この点は、以前われわれが小胞体ストレス誘導薬剤としてブレフェルディン A を用いて検討した結果と異なっていた。

また、免疫蛍光染色にてツニカマイシン単独添加群の後角に p53 の核への集積を認めたこと、およびさらに p53 阻害剤を添加したことにより後角介在神経細胞の生存率が有意に改善したこととあわせて、ツニカマイシンによって誘導される後角神経細胞死の経路に p53 の核内移行が関与している可能性が示唆された。

一方、脊髄前角の運動神経細胞については、ツニカマイシン単独添加群の前角に p53 の集積は認められず、また p53 阻害剤添加による保護効果は明らかでなかったことから、p53 の核内移行がその細胞死の主要な経路には含まれていない可能性が考えられた。

このような誘導薬剤や細胞種による反応の相違は、小胞体ストレスから細胞死に至る経路の解明の手がかりになる可能性があり、興味深いと思われた。今後はさらに、p53 の核内移行より下流の経路について、カスパーゼの関与の有無や細胞死の機序も含めて検討をすすめたいと考えている。小胞体ストレス誘導性の細胞死への p53 の関与については、その詳細が明らかになることにより、ALS も含めた脊髄疾患に対する治療薬としての p53 阻害剤の臨床応用につながる可能性があり、今後の発展が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次

副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

副 査 教 授 佐々木 秀 直

学 位 論 文 題 名

Role of p53 in neurotoxicity induced by the endoplasmic reticulum stress agent tunicamycin in organotypic slice cultures of rat spinal cord

(ラット脊髄器官培養系における小胞体ストレス誘導薬剤
ツニカマイシンによる神経毒性における p53の役割)

小胞体 (ER) は、タンパク質の折りたたみと成熟に関与する細胞内小器官であり、タンパク質の厳密な品質管理を担っている。小胞体に異常タンパク質が蓄積した状態を ER ストレスといい、細胞は ER ストレス状態を脱するために種々の経路を活性化するが、そのような反応によって状態を改善できない場合、細胞はアポトーシスに至る。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や脳虚血、プリオン病など様々な神経疾患において、ER ストレスがその病態に重要な役割を果たしていることが報告されている。しかし、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や脊髄疾患への ER ストレスの関与は未だ明らかではなく、脊髄神経細胞に対する ER ストレスの影響を検討した報告は少ない。また、p53 はよく知られた癌抑制遺伝子産物であるが、その種々の作用のうちアポトーシス誘導作用が重要と考えられており、近年、神経細胞障害への関与についても注目されている。

このような背景を踏まえて、ER ストレス誘導薬剤としてツニカマイシン (Tm) を用いて、ラット脊髄器官培養系において脊髄神経細胞に対する ER ストレスの影響を検討し、さらには、ER ストレスによって惹起される細胞死の経路に p53 が関与しているかについても検討を行った。

ラット脊髄器官培養については、生後 7 日目の Sprague-Dawley ラットを深麻酔下に断頭し、脊髄を摘出して約 400 μm 厚のスライスを作製した。培地に接する膜上にスライスを置いて、37°C、5% CO₂ の条件で 10 日間培養を行い、Tm 単独、または Tm と p53 阻害剤のピフィスリン α (PFT) を同時に添加した。薬剤添加 24 時間及び 72 時間後にウエスタンブロット用に検体作製をしたほか、固定、染色を行い、光学顕微鏡または共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察した。生存細胞の判定基準としては、脊髄前角に位置する細胞体の大きさが 30 μm 以上の SMI-32 (抗ニューロフィラ

メント抗体)陽性細胞を前角運動神経細胞、脊髄後角に位置する抗カルレチニン抗体陽性細胞を後角介在神経細胞と定義し、それぞれ対照群に対する薬剤添加後の細胞生存率を算出し、統計処理を行った。

ウエスタンブロット法にて、Tm 添加群で ER ストレスマーカーである GRP78 の発現亢進を認め、Tm 添加により ER ストレスが誘導されたと考えられた。Tm 添加にて用量依存性に神経細胞生存率は減少したが、低濃度では前角運動神経細胞の生存率に変化がなかったのに対し、後角介在神経細胞の生存率が有意に低下しており、Tm 誘導性の ER ストレスに対して後角介在神経細胞はより脆弱である可能性が考えられた。この点は、ER ストレス誘導薬剤としてブレフェルディン A (BFA) を用いた場合と異なっていた。また、蛍光二重染色にて Tm 添加後の後角に p53 の核内移行と思われる集積を認めたこと、および Tm に加えて PFT を添加することで後角介在神経細胞の生存率が有意に改善したこととあわせて、Tm によって誘導される後角介在神経細胞障害の経路に p53 の核内移行が中心的役割を果たしている可能性が示唆された。一方、脊髄前角の運動神経細胞については、Tm 添加群の前角に p53 の集積は認められず、PFT による保護効果も明らかでなかったことから、p53 の核内移行がその細胞死の主要な経路には含まれていない可能性が考えられた。

このような誘導薬剤や細胞種による反応の相違は、ER ストレスから細胞障害に至る経路の解明の手がかりになる可能性があり、興味深いと思われた。また、ER ストレス誘導性の細胞死への p53 の関与については、その詳細が明らかになることにより、ALS も含めた脊髄疾患に対する治療薬としての p53 阻害剤に臨床応用につながる可能性があり、今後の発展が期待される。

公開発表にあたっては、副査の渡辺教授から、「投与薬剤の濃度設定について」のコメントがあり、その後「ER ストレス誘導薬剤でも BFA と Tm で異なる結果が出た理由について」、「脊髄後角で抗カルレチニン抗体陽性の細胞と抗 p53 抗体の染色が重なっていないことについて」の質問があった。ついで副査の佐々木教授から「p53 および p53 阻害剤の細胞障害あるいは細胞保護作用について」の質問があった。主査の畠山教授からは、「ER ストレスから p53 の活性化に至る経路について」、「p53 はリン酸化部位によって作用の違いがあるが、リン酸化 p53 についての検討について」、「中枢神経あるいは全身性に Tm と同様の機序で起こる疾患について」の質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は実験結果や文献およびスライドの図を引用して説明し、おおむね適切に回答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(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。