

氏 名	山 下 博 史
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3147 号
学位授与の日付	平 成 19 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Heat-shock protein 105 interacts with and suppresses aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase: clues to a possible strategy for treating ALS (熱ショック蛋白 105 は変異 Cu/Zn スーパーオキシドディスムターゼと相互作用し、凝集を抑制する－ALS を治療する戦略への手がかり)
論文調査委員	(主 査) 教 授 金 子 武 嗣 教 授 永 田 和 宏 教 授 福 山 秀 直

論 文 内 容 の 要 旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、選択的運動ニューロン死をもたらす神経変性疾患であり、進行性の骨格筋萎縮及び麻痺により通常 1～5 年で致命的な呼吸筋麻痺を来す。ALS の多くは孤発性であるが、ALS の約 10% を占める遺伝性 ALS の中では Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) の優性変異が最も頻度の高く、孤発性 ALS とほぼ同様の臨床症状がみられる。変異 SOD1 を発現するマウスでは進行性の運動ニューロン変性がみられるが、SOD1 を欠失したマウスでは神経変性がみられないことから、変異 SOD1 が、機能喪失ではなく新たに毒性を獲得することにより運動ニューロン死を惹起すると考えられている。変異 SOD1 による毒性の機序については、(1) 構造的不安定性に由来する蛋白質の凝集、(2) ミトコンドリア障害、(3) グルタミン酸興奮毒性、(4) 軸索輸送の異常、(5) 酸化ストレス等の仮説が提唱されているが、依然として不明な点が多い。したがって変異 SOD1 の結合蛋白を同定することは、変異 SOD1 毒性を解明し ALS の治療方法を開発する上で重要である。これまでに Heat shock protein (Hsp/Hsc70、Hsp40、 α -B-crystallin、Hsp27) や、E3 ユビキチンリガーゼ等が変異 SOD1 結合蛋白として報告され、病態との関連で研究されているが、変異 SOD1 毒性発現の機序は未解明である。そこで変異 SOD1 結合蛋白を免疫沈降法にて検索し、新たに同定した蛋白について解析を行った。

まずマウス神経芽細胞腫由来の培養細胞である Neuro2A に一過性に野生型または変異型 SOD1 を発現し、免疫沈降法と質量分析法を用いることにより変異 SOD1 特異的に結合する蛋白として heat shock cognate protein 70 と heat shock protein (Hsp) 105 を特定した。Hsp105 と変異 SOD1 との結合はこれまでに報告されておらず、また変異 SOD1 のようにミスフォールドした蛋白質の品質管理を行う heat shock protein は重要と考えられるため、引き続いて Hsp105 と変異 SOD1 との関連について検討した。培養細胞 (Neuro2A) 及び ALS のモデルマウスである変異 SOD1 トランスジェニックマウスの脊髄において変異 SOD1 と内在性 Hsp105 の結合を確認した。またマウス脊髄の免疫染色では、Hsp105 の発現は、ALS の障害部位である脊髄運動ニューロンを含む脊髄ニューロンに認めた。

次に変異 SOD1 マウス脊髄を用いて、経時的に Hsp105 の蛋白量を検討したところ、疾患の進行につれて増加する Hsp70 や Hsp27 とは対照的に、運動麻痺発症前より Hsp105 が減少しはじめ、発症中期から終末期にかけて有意な減少を示した。サンプルの溶解に強力な界面活性剤である SDS を使用しても同じ結果であったことより、Hsp105 の大部分は難溶性分画へ移行したわけではなく、変異 SOD1 により消費されたと考えられた。

さらに培養細胞を用いた検討では、Hsp105 は変異 SOD1 の凝集を著明に抑制した。変異 SOD1 の凝集と疾患の進行には正の相関があることは既に報告されており、Hsp105 は変異 SOD1 の凝集を抑制することにより毒性を軽減していると考えられた。

以上のことから、Hsp105 を増加させることにより変異 SOD1 毒性を軽減できる可能性が示された。また主要なシャペロンである Hsp70 の過剰発現では変異 SOD1 マウスの治療効果を認めなかったという報告と、Hsp105 が Hsp70 のヌクレオ

チド交換因子として機能するという報告を考慮すると、ミスフォールドしたタンパクの毒性を軽減するのには Hsp70 と Hsp105 を同時に増加させることが必要である可能性がある。

論文審査の結果の要旨

選択的運動ニューロン死をもたらす筋萎縮性側索硬化症（ALS）の多くは孤発性であるが、遺伝性 ALS の中では Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）の優性変異が最も頻度が高い。変異 SOD1 の結合蛋白を同定することは、未知の部分が多い変異 SOD1 の毒性の機序を解明し ALS の治療方法を開発する上で重要であるため、変異 SOD1 結合蛋白を検索した。

免疫沈降法と質量分析法を用いることにより変異 SOD1 特異的に結合する蛋白としてこれまでに報告のある heat shock cognate protein 70 と、新規に heat shpck protein（Hsh）105 を特定した。培養細胞及び変異 SOD1 トランスジェニックマウスの脊髄において変異 SOD1 と内在性 Hsp105 の結合を確認した。またマウス脊髄の免疫染色では、Hsp105 の発現は、ALS の障害部位である脊髄運動ニューロンを含む脊髄ニューロンに認めた。次に変異 SOD1 マウス脊髄を用いて、経時的に Hsp105 の蛋白量を検討したところ、運動麻痺発症前より Hsp105 が減少しはじめ、発症中期から終末期にかけて有意な減少を示した。このことは変異 SOD1 による Hsp105 の消費を反映していると考えられた。さらに培養細胞を用いた検討では、Hsp105 は変異 SOD1 の凝集を抑制した。変異 SOD1 の凝集と疾患の進行には正の相関があることは既に報告されており、Hsp105 は変異 SOD1 の凝集を抑制することにより毒性を軽減していると考えられた。最後に、Hsp105 はプロテアソーム阻害薬によるカスパーゼ 3 の活性化を抑制した。

これらの結果より Hsp105 を増加させることにより変異 SOD1 毒性を軽減できる可能性が示された。

以上の研究は蛋白質の品質管理機構の破綻が病態の一因と考えられている ALS の原因の解明に貢献し、その治療・予防法の開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 19 年 6 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。