Mechanism of Cell and Neurological Disorder

細胞のメカニズムと神経疾患

ALS における ERK シグナル

嶋澤 雅光　原 英彰

ALS の発症とその病態

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis：ALS）は，「上位運動ニューロン（upper motor neuron：UMN）と下位運動ニューロン（lower motor neuron：LMN）の両者の細胞体（soma）〔あるいは核周部（perikaryon）〕が散発性・進行性に変性脱落する神経変性疾患である」と定義されている（筋萎縮性側索硬化症診療ガイドライン 2013）．ALS は原因不明で治療法が確立されていない「指定難病」の一つに指定されている．現在，ALS の治療薬として本邦で承認されている薬剤はグルタミン酸拮抗薬のリルゾールとフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンの 2 剤のみであるが，その効果は限定的であり新たな治療薬の開発が望まれている．

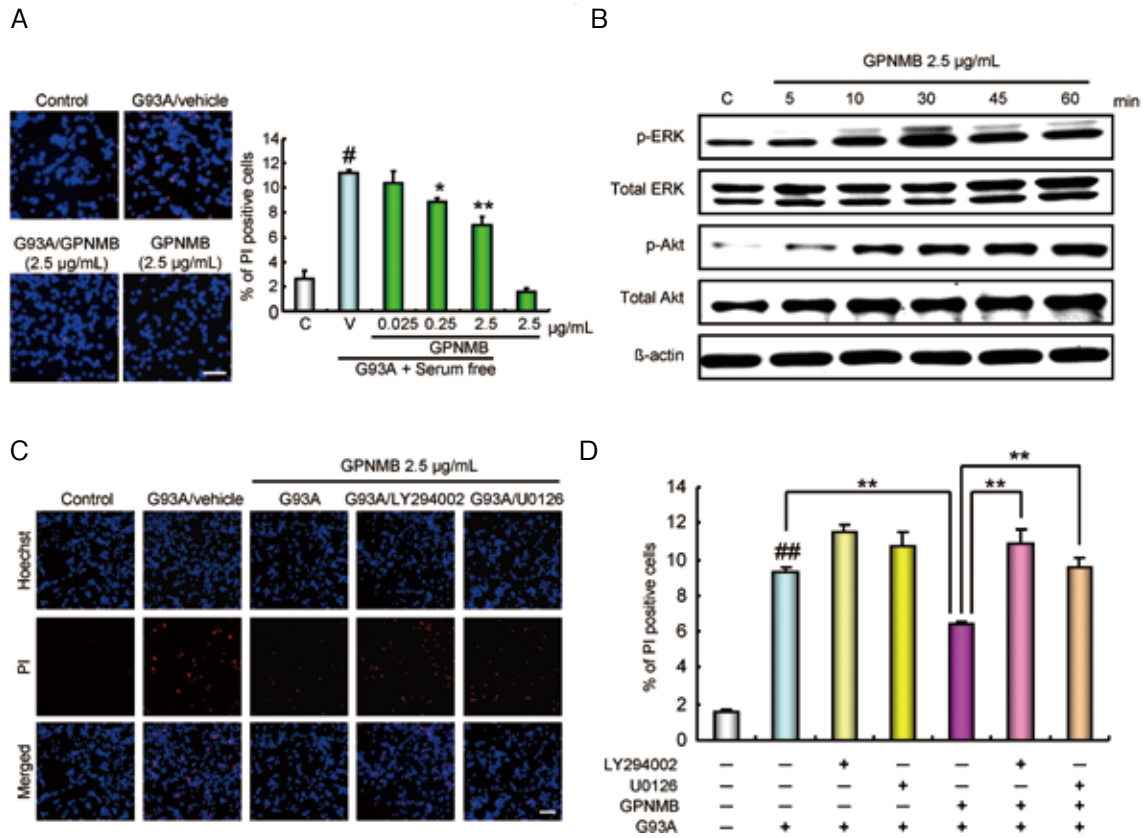
ALS の病理学的特徴として，患者の約 97%に TAR–DNA 結合タンパク質（TAR DNA binding protein 43：TDP–43）を主成分とするユビキチン陽性細胞質内封入体が認められる．TDP–43 の病理像は，前頭側頭型認知症（frontotemporal dementia：FTD）患者の 50%にも認められ，ほぼすべての ALS–FTD スペクトラム症例に認められる．TDP–43 は通常核内に存在し，転写，翻訳，スプライシングを広く司り，トランスクリプトームの約 30%に関与している．したがって，TDP–43 の細胞質への局在異常は，① 細胞質凝集体による毒性，② 正常な核内における機能の喪失という 2 点において有害であると考えられる．ALS 患者の約 90%は家族歴のない孤発例である孤発性 ALS（sporadic ALS）であるが，5〜10%に家族歴を有する家族性 ALS（familial ALS）が存在する．家族性 ALS の発症原因となる原因遺伝子の一つとして，1993 年に *Cu/Zn superoxide dismutase*（*SOD1*）遺伝子の変異が同定されて以来，現在までに 30 種類以上の遺伝子変異が報告されている[1]．さらに 2008 年になって，遺伝性 ALS の第 2 の原因である TDP–43 をコードする *TARDBP*（*TAR DNA binding protein*）が発見された．*TARDBP* の変異は家族性 ALS の 4%，孤発性 ALS の 1%を占めており，この直接的な遺伝子変異による原因の発見と運動ニューロン封入体中の TDP–43 の同定により，新たなモデルマウスが生み出された．このように，ALS の病態研究は TDP–43 の発見以降急速に進展し，様々な治療アプローチが進められている．その治療アプローチのなかで，MAPK（mitogen–activated protein kinase）をはじめとしたタンパク質リン酸化酵素の阻害薬の臨床開発が進められている[2]．

ALS における ERK シグナル

MAPK は，酵母から植物・ほ乳類に至るまで広く真核生物に保存された細胞内シグナル伝達に関与するセリン・スレオニンキナーゼである．ほ乳類における主要な MAPK サブファミリーとして，古典的 MAPK とも呼ばれる ERK1/2（extracellular signal regulated kinase–1/2）とその近縁の ERK5，さらに ERK3/4/6/7/8 を含めた ERK サブファミリー，ストレス活性化キナーゼ（stress–activated protein kinase，SAPK）である JNK（c–Jun N–terminal kinase）サブファミリー（JNK1/JNK2/JNK3）ならびに p38MAPK サブファミリー（p38α/p38β/p38γ/p38δ）が知られている．ERK は，主に成長因子によって活性化され，成長因子は受容体型チロシンキナーゼ，G タンパク質共役受容体などの細胞表面受容体に結合して活性化される．活性化された受容体は，足場タンパク質やエフェクタータンパク質（Ras など）をリクルートし，さらに MAP3K である Raf を活性化する．活性化された Raf は，MAP2K のメンバーである MEK1/2 をリン酸化し，これらのキナーゼはさらに ERK をリン酸化することにより活性化する．ERK は，上述したように ERK1/2/3/4/5/6/7/8 の 8 種類が報告されているが，古典的 MAPK である ERK1/2 以外の ERK の生理機能ならびに ALS 病態における関与についてはほとんど明らかにされていない．ERK1/2 は，生存促進因子の活性化に関与し，細胞増殖，遊走，分化を制御している．

ALS における ERK1/2 の関与は，ALS 症状を発症した $SOD1^{G93A}$ マウスの脊髄組織標本を用いた免疫染色により報告された[3]．すなわち，$SOD1^{G93A}$ マウスの脊髄の GFAP 陽性の活性化アストロサイトにおいてリン酸化 ERK1/2（p–ERK1/2）が上昇した．一方，同じ週齢の正常な SOD1 を過剰発現させた（wtSOD1）マウスや発症前の $SOD1^{G93A}$ マウスの脊髄において p–ERK1/2 の上昇は認められなかった．また，ミクログリアにおいて TDP–43 をノックダウンさせると，MEK1/2–ERK1/2 経路の活性化を介してシクロオキシゲナーゼ 2（COX–2）の発現とプロスタグランジン E2 を産生させ，それにより運動ニュー

しまざわ まさみつ　岐阜薬科大学薬効解析学研究室教授／はら ひであき　岐阜薬科大学学長



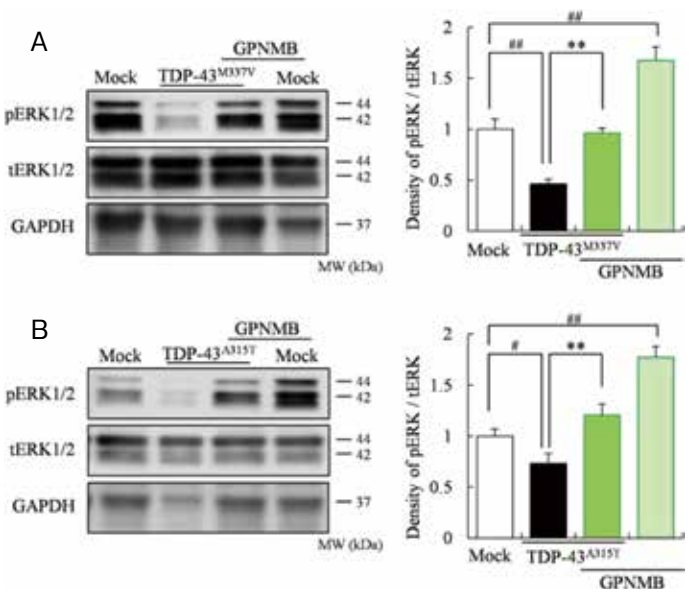
［図 1］SOD1^{G93A}による運動ニューロン死に対する GPNMB の作用（Tanaka ら[9]より）

A）リコンビナント GPNMB 細胞外フラグメント（0.25～2.5 μg/mL）の SOD1^{G93A}を強制発現させた運動ニューロン（NSC34 細胞株）死に対する保護作用．死細胞率は，ヨウ化プロピジウム（PI）陽性細胞数（赤色：死細胞）を Hoechst 33342 陽性細胞数（青色：すべての細胞）で除すことにより算出した．結果は，平均値±標準誤差で示す（n＝3–6）．$^{\#}P$＜0.05 vs. control（C），$^{*}P$＜0.05，$^{**}P$＜0.01 vs. vehicle（V）．Scale bar＝100 μm．
B）リコンビナント GPNMB 処置後のリン酸化 ERK1/2（p–ERK1/2）および Akt（p–Akt）の経時変化．
C，D）SOD1^{G93A}を強制発現させた運動ニューロン死に対するリコンビナント GPNMB の保護作用は，PI3K 阻害剤（LY294002；20 μM）および MEK1/2 阻害剤（U0126；5 μM）により抑制された．死細胞率は，ヨウ化プロピジウム（PI）陽性細胞数（赤色：死細胞）を Hoechst 33342 陽性細胞数（青色：すべての細胞）で除すことにより算出した．結果は，平均値±標準誤差で示す（n＝6）．$^{\#\#}P$＜0.01 vs. control，$^{**}P$＜0.01 vs. SOD1^{G93A}単独または SOD1^{G93A}＋GPNMB．Scale bar＝100 μm．

ロン死を誘導することを明らかにした[4]．一方，このような作用はアストロサイトには認められなかった．さらに，COX–2 阻害薬であるセレコキシブ処置により，ミクログリアを介した神経毒性が抑制された．また，セレコキシブは経口投与により SOD1^{G93A}マウスの運動機能の低下を抑制し，生存期間を延長することが明らかにされている[5]．SOD1^{G93A}マウスを用いた別の研究では，SOD1^{G93A}マウス由来ミクログリアにおいて細胞外 ATP は，P2X7 受容体を介して ERK 1/2 が活性化し，活性酸素を発生させる NADPH oxidase2（NOX2）を活性化することにより酸化ストレスを誘導することも報告されている[6]．TDP–43 病理像を有する孤発性 ALS 患者の死後脊髄標本において，p–ERK1/2 および ERK1/2 の下流エフェクタータンパクである p–p90RSK の増加が報告されている[7]．さらに，孤発性 ALS 患者において p–ERK1/2 凝集体がリン酸化 TDP–43 陽性封入体中に存在することが報告された[8]．このように，ERK1/2 の活性化は，ALS の病態に深く関わっていること，とくにグリア細胞の活性化を介して運動ニューロン死を誘導することが示唆された．現在，ERK1/2 の上流キナーゼである MEK1/2 阻害薬であるトラメチニブ（SNR1611）の ALS 患者に対する臨床試験（Phase Ⅰ/Ⅱ；NCT04326283）が進められておりその結果が期待される．

上記のように ERK1/2 の恒常的かつ過剰な活性化は，主にグリア細胞において ALS 病態に対して促進的に作用していることが示唆される．一方，ERK1/2 は NGF，BDNF などの神経栄養因子などにおいて活性化される細胞生存促進因子としても知られている．筆者らは，トランスクリプトーム解析により SOD1^{G93A}マウスの運動ニューロンおよび活性化アストロサイトにおいて膜貫通糖タンパク質 nmb（glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B：GPNMB）の発現が ALS 発症の早期から亢進していることを見出した[9]．GPNMB の発現は，孤

発性 ALS 患者脊髄前角においても亢進しており，脳脊髄液および血清においても増加していた[9,10]．興味深いことに，このGPNMB は孤発性 ALS 患者運動ニューロンの細胞質内において凝集体を形成し，それは TDP-43 と共局在を示した[10]．このGPNMB は，SOD1^{G93A}を強制発現させることによる運動ニューロン死を ERK1/2 の活性化を介して抑制し，MEK1/2 阻害剤によりその保護効果は消失した（**図 1**）[9]．さらに，家族性 ALS 患者で報告されている変異 TDP-43（TDP-43^{M337V}および TDP-43^{A315T}）を運動ニューロンに強制発現させると p-ERK1/2 の減少および細胞死が誘導され，GPNMB は p-ERK1/2 の減少および細胞死を抑制した（**図 2**）[10]．このように，ERK1/2 は細胞種または病態期の違いによって細胞生存・細胞死を制御している可能性が示唆される．これらの機序を解明することは，ALS 病態の理解と有効な治療法を確立する上で非常に重要である．



［図 2］変異 TDP-43（TDP-43^{M337V}および TDP-43^{A315T}）発現に対する運動ニューロンにおけるリン酸化 ERK1/2 変化と GPNMB の作用（Nagahara ら[10]より）

A）TDP-43^{M337V}を運動ニューロン（NSC34 細胞株）に強制発現（48 時間）させた後，血清除去および GPNMB 処置 24 時間後のリン酸化 ERK1/2（p-ERK1/2）の発現変化．結果は，平均値±標準誤差で示す（n＝8）．$^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ vs. Mock, $^{**}P<0.01$ vs. TDP-43^{M337V}.
B）TDP-43^{A315T}を運動ニューロン（NSC34 細胞株）に強制発現（48 時間）させた後，血清除去および GPNMB 処置 24 時間後のリン酸化 ERK1/2（p-ERK1/2）の発現変化．結果は，平均値±標準誤差で示す（n＝8）．$^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ vs. Mock, $^{**}P<0.01$ vs. TDP-43^{A315T}.

文献

1. Pecoraro V, Mandrioli J, Carone C, et al. The NGS technology for the identification of genes associated with the ALS. A systematic review. Eur J Clin Invest. 2020；50：e13228.
2. Palomo V, Nozal V, Rojas-Prats E, et al. Protein kinase inhibitors for amyotrophic lateral sclerosis therapy. Br J Pharmacol. 2021；178：1316-35.
3. Chung YH, Joo KM, Lim HC, et al. Immunohistochemical study on the distribution of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the central nervous system of SOD1G93A transgenic mice. Brain Res. 2005；1050：203-9.
4. Xia Q, Hu Q, Wang H, et al. Induction of COX-2-PGE2 synthesis by activation of the MAPK/ERK pathway contributes to neuronal death triggered by TDP-43-depleted microglia. Cell Death Dis. 2015；6：e1702.
5. Klivenyi P, Kiaei M, Gardian G, et al. Additive neuroprotective effects of creatine and cyclooxygenase 2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem. 2004；88：576-82.
6. Apolloni S, Parisi C, Pesaresi MG, et al. The NADPH oxidase pathway is dysregulated by the P2X7 receptor in the SOD1-G93A microglia model of amyotrophic lateral sclerosis. J Immunol. 2013；190：5187-95.
7. Mitra J, Hegde PM, Hegde ML. Loss of endosomal recycling factor RAB11 coupled with complex regulation of MAPK/ERK/AKT signaling in postmortem spinal cord specimens of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. Mol Brain. 2019；12：55.
8. Ayala V, Granado-Serrano AB, Cacabelos D, et al. Cell stress induces TDP-43 pathological changes associated with ERK1/2 dysfunction：implications in ALS. Acta Neuropathol. 2011；122：259-70.
9. Tanaka H, Shimazawa M, Kimura M, et al. The potential of GPNMB as novel neuroprotective factor in amyotrophic lateral sclerosis. Sci Rep. 2012；2：573.
10. Nagahara Y, Shimazawa M, Ohuchi K, et al. GPNMB ameliorates mutant TDP-43-induced motor neuron cell death. J Neurosci Res. 2017；95：1647-65.