

論 文 要 旨

Expression of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 in Mouse Spinal Cord Under Chronic Mechanical Compression: Possible Involvement of the Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinase pathways in Spinal Cord Cell Apoptosis

〔慢性脊髄圧迫モデルマウスにおけるアポトーシスシグナル伝達機能の解明〕

竹之内 剛

【序論】

圧迫性頸髄症の原因は、椎間板ヘルニア、加齢性変化に伴う頸椎症のほかに、後縦靭帯骨化症、関節リウマチ、透析性脊椎症など多岐にわたるが、長期の脊髄圧迫は、不可逆性変化に陥り、たとえ、十分な除圧術が、行われても、症状の軽快が得られにくい症例が存在するため、現在、本症に対する治療は、不可逆性変化に陥る前に早期除圧術を行うべきであるとする意見が一般的である。

しかし、これらの不可逆性変化を生じた症例の剖検脊髄における変化は、神経細胞の減少及び神経線維の脱髄や変性であるという証明はあったが、その機序についての研究は、ほとんどなされていない。

【目的】

慢性脊髄における脊髄細胞のアポトーシスに、ストレス応答性アポトーシス経路が関与することを、脊柱靭帯骨化症の自然発症モデル（以下 TWY mouse）を用いて、免疫組織化学的手法によりその細胞内局在を明らかにし、外科的治療にても症状の改善を得られない慢性脊髄圧迫状態での脊髄障害の病態を解明する。

【材料】

慢性脊髄圧迫モデルとして、6ヶ月齢の TWY マウスを用いた。TWY マウスは、脊柱靭帯骨化症の自然発症モデルで、加齢と共に、後環軸石灰沈着により、第2, 3 頸髄に後方より著明な圧迫を認める遺伝性骨軟骨異常増殖マウス (twy/twy) であり、本実験には、BBB score (Basso, Beattie, and Bresnahan Locomotor Rating Scale) で、1 以下でしかも頸髄摘出後の肉眼所見上も圧迫の明らかなマウスを脊髄障害群とした。コントロールとして、同月齢の Institute of Cancer Research (以下 ICR) マウスと生後1ヶ月齢の摘出頸髄にも肉眼的圧迫を認めず、麻痺の見られないマウスをコントロール群として用いた。

【方法】

慢性圧迫による脊髄の変性での、ASK1-JNK/-p38 といった MAP キナーゼ分子機構解明のため、細胞マーカーとおのおのリン酸化蛋白の同定を、免疫組織学的検討にて行った。実際に、抗リン酸化 ASK1 抗体、抗リン酸化 JNK 抗体、抗リン酸化 p38 抗体と言ったアポトー

シス関連蛋白の同定を、Neuron Marker、oligodendrocyte Marker との二重染色で細胞内局在と apoptotic cell の計測を行い検討した。

【結果】

ASK1 の出現は、脊髄圧迫群において、その局在は、neuron 及び oligodendrocyte とともに細胞質に局在し、非脊髄圧迫群と比較して、脊髄圧迫群のみ、白質、灰白質共に多くの細胞出現を認めた。JNK および p38 といったストレス応答 MAP キナーゼの活性化分子は、脊髄圧迫群の neuron 及び oligodendrocyte の核内に局在していた。実行型 caspase3 は、活性化されることにより、細胞質、ミトコンドリア、核へと移行することが知られているが、今回、非脊髄圧迫群では、出現を認めなかったが、脊髄圧迫群において、有意にその出現を認め、oligodendrocyte においては、核に移行しているものも見られた。

【考察】

神経細胞のアポトーシスは、JNK、p38 といったストレス応答 MAP キナーゼ経路を介したアポトーシスであり、また、ASK1 は、様々なストレス応答を担うシグナル伝達経路の JNK 経路ならびに p38 MAP キナーゼ経路制御の 1 分子で、アポトーシスの制御に関わる多機能なストレス応答性キナーゼとして働いていることが証明されている。

今回、ASK1 をはじめとする JNK、p38 のリン酸化蛋白を慢性圧迫モデルで有意に発現を確認したことにより、TUNEL 染色の結果と共に考察すると圧迫部位における変性脊髄細胞の一部には、ASK1 を介したアポトーシスによる細胞死が考えられる。脊髄圧迫における細胞死の一部に ASK1 を介したアポトーシスが関与するものと考えられた。

(spine Vol. 33 (18), 1943-50, 2008年 掲載)

論 文 審 査 の 要 旨

報告番号	医研第 682 号	氏名	竹之内 剛
審査委員	主査	中河 志朗	
	副査	亀山 正樹	有田 和徳

Expression of apoptosis signal-regulating kinase 1 in mouse spinal cord under chronic mechanical compression; possible involvement of the stress-activated mitogen-activated protein kinase pathways in spinal cord cell apoptosis.

(慢性脊髄圧迫モデルマウスにおけるアポトーシスシグナル伝達機構の解明)

【目的】慢性脊髄圧迫時のアポトーシスに、ストレス応答性アポトーシス経路が関与することを、脊柱靭帯骨化症の自然発症モデル Tiptoe-Walking Yoshimura (以下 TWY) マウスを用いて、免疫組織化学的手法によりその細胞内局在を明らかにし、脊髄障害の病態を解明する。

【材料】慢性脊髄圧迫モデルとして、6ヶ月齢の TWY マウスを用いた。TWY マウスは、脊柱靭帯骨化症の自然発症モデルであり、生後6カ月頃には、ヒトと同様に頸髄性痙性麻痺を認めるようになる。しかし、生後1カ月齢では通常のマウスと同様に健常であり、痙性麻痺を認めない。そこで、コントロールとして、生後1ヶ月齢の TWY マウスと6ヶ月齢の Institute of Cancer Research (以下 ICR) マウスを用いた。

【方法】慢性脊髄圧迫によるアポトーシスシグナル解明のため、細胞のマーカーとそれぞれのリン酸化蛋白の同定を免疫組織化学的手法で行った。実際には、抗リン酸化 apoptosis signal-regulating kinase 1(ASK1)抗体、抗リン酸化 c-Jun N-terminal kinase (JNK)抗体、抗リン酸化 p38 mitogen-activated protein kinase (p38)抗体などのアポトーシス関連蛋白と、neuron marker あるいは oligodendrocyte marker との二重染色を行い、アポトーシス関連蛋白の細胞内局在とアポトーシス関連蛋白陽性細胞数を調べた。

【結果】ASK1 の出現は、脊髄圧迫群において、neuron 及び oligodendrocyte とともに細胞質に局在していた。非脊髄圧迫群と比較して、脊髄圧迫群のみ白質、灰白質共に陽性細胞出現を認めた。JNK および p38 といったストレス応答 mitogen-activated protein kinase(MAP) キナーゼの活性化分子は、脊髄圧迫群の neuron 及び oligodendrocyte の核内にも局在していた。caspase3 は、活性化されることにより、細胞質、ミトコンドリア、核へと移行することが知られているが、今回、非脊髄圧迫群では、出現を認めなかったが、脊髄圧迫群において、有意にその出現を認め、oligodendrocyte においては核に移行しているものも見られた。

【考察】神経細胞のアポトーシスが、JNK、p38 といったストレス応答 MAP キナーゼ経路を介する報告と、ASK1 が JNK ならびに p38 MAP キナーゼ経路制御の一分子で、アポトーシスの制御に関わる多機能なストレス応答性キナーゼとして働いているとする報告から、ASK1 を介した神経細胞のアポトーシスが推察される。今回、ASK1 をはじめとする JNK、p38 のリン酸化蛋白が慢性圧迫モデルで有意に高発現をしていたことより、慢性脊髄圧迫によるアポトーシスに、ASK1 を介した MAPK 経路の関与が示唆された。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 682 号	氏名	竹之内 剛
審査委員	主査	中河 志朗	
	副査	亀山 正樹	有田 和徳
<p>主査および副査の3名は、平成21年8月20日、学位請求者 竹之内 剛君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) CHEMICON 社製の oligodendrocytes monoclonal antibody をなぜ今回の実験に使用したか。 (回答) Magavi, Sら (Nature; 2000, 405: 951-955) にあるよう成熟した oligodendrocyte の marker として、適切な抗体と判断し使用した。</p> <p>質問2) TUNEL 染色は神経細胞の圧迫部遠位でも変化がでるのか。 (回答) 今回は検討していない。しかし、教室の Yamaura, Iら (Spine; 2002, 27: 21-26) の報告で、TWY マウスの脊髄圧迫期では TUNEL 陽性細胞を白質、灰白質ともに認め、また TUNEL 陽性細胞は最大圧迫部位より頭側では確認されないが、尾側では最大圧迫部より 2mm まで確認できているため圧迫部より遠位でも変化がでていると考える。</p> <p>質問3) MAPK pathway が ASK1 の活性化によりスタートしているが、その ASK1 の活性化は脊髄圧迫で起こっているか。 (回答) ASK1 の活性化自身が石灰沈着による圧迫で開始されているかは検討していない。しかし、非対照群 1ヶ月齢の TWY マウスコントロール群ではリン酸化 ASK1 の出現が確認できないことより、機械的ストレスによる可能性があるものと考ええる。</p> <p>質問4) リン酸化 JNK, リン酸化 p38 が核内で発現しているが細胞質での発現はみられたか。 (回答) すべて核内で確認したわけではなく、細胞質にも存在した。</p> <p>質問5) 今回行った2重免疫染色について簡単に説明せよ。 (回答) 今回各種リン酸化抗体と細胞マーカーで染色後、蛍光染色で励起しコンピュータ上で merge させた。具体的には rabbit polyclonal 抗リン酸化抗体と mouse monoclonal 抗細胞マーカーを混合して同時に incubation した後に、rhodamin-conjugated 抗 rabbit polyclonal 抗体と FITC-conjugated 抗 mouse monoclonal 抗体を混合して同時に発色を行った。</p> <p>質問6) Apoptosis を組織学的に検討するにはどうすればよいか。 (回答) Apoptosis の際に必ず生じる核の断片化を証明すればよい。今回は TUNEL 染色と caspase3 の活性化を検討した。</p> <p>質問7) 脊髄圧迫による脱髄や変性に apoptosis が関与するか。 (回答) 今回の検討では神経系細胞の apoptosis が脱髄に直接関与しているかを検討していない。脱髄や変性に apoptosis が関与するかの検討は時間的経過を追う必要があると考える。今回1ヶ月と6ヶ月のマウスを比較したが、その2点では組織学的に6ヶ月齢のみ脱髄と変性所見を認め caspase3 陽性細胞が認められたことより、6ヶ月齢では apoptosis が関与している推測した。</p> <p>質問8) Oligodendrocyte が apoptosis を起こしている可能性は脱髄と関係するか。 (回答) 今回検討していない。しかし髄鞘形成を担う oligodendrocyte の apoptosis は証明されたので、脱髄と関与するものと考ええる。</p> <p>質問9) Oligodendrocyte が apoptosis を起こし脱髄や変性をきたしているのではないか。 (回答) Neuron でも ASK1-MAPK pathway の活性化を認めたため、oligodendrocyte のみが apoptosis を起こしているのではないと考える。</p> <p>質問10) ASK1 経路の apoptosis のブロックがある疾患では有効とのことだが、今回確認された apoptosis はス</p>			

トレスに対する生体反応として生命保持に重要な役割をはたしている可能性はないのか。

(回答) 今回有用性の検討は行っていない。生存困難となった細胞が、apoptosis を起こし速やかに死に至り除去されることで再生を促進する可能性があれば、推測でしかないが apoptosis は脊髄機能に対し正の作用と負の作用すなわち両方の作用を持つと考える。

質問 11) 変性や脱髄はどこで起こっているか。

(回答) 前索と後索で認めた。

質問 12) マウスの皮質脊髄路はどこを通るか。

(回答) 後索と思う。

質問 13) アポトーシス関連細胞はどの部位でたくさん見られたか。

(回答) 側索で認めた。

質問 14) マウスの皮質脊髄路は正確には後角と後正中溝との間の深層である。そうするとアポトーシス関連細胞が染色された側索と脱髄が認められる前索と後索では神経解剖学的に解離が生じ、アポトーシスと脱髄は関係ないのではないか。

(回答) Ogino H ら (Spine;1983,8: 1-15) は脊髄圧迫患者の組織学検討で、圧迫程度が軽度なら圧迫部位での側索の脱髄と長軸方向では頭側と尾側後索での変性を認め前索は比較的保たれ、圧迫が高度になれば、前角細胞数減少が出現し、比較的末期まで前索は保たれると報告している。今回は前索や後索で変性、脱髄を認めたため、脊髄の全領域で変性と脱髄をきたしていると判断した。また、白質と灰白質の機械的特性に着目した Ichihara K ら (J Neurosurg ;2003,99:278-285) は、灰白質は白質よりも応力に対し脆弱であり、脊髄圧迫が後方からの圧迫である場合、後索と後角での障害後、側索での障害が見られ、次いで前角での障害が出現するが、脊髄は循環血行動態より中心部と側索の一部での障害が遅れると報告している。今回の実験結果にも、脊髄に対する障害が時間的・空間的多様性により皮質脊髄路で apoptosis を見出せなかった可能性やアポトーシス関連細胞が側索領域で認められた事実は損傷を免れ残存した細胞群での変化を捉えた可能性があると考えた。しかし詳細な時間的変化と部位の検討が今後必要だと考える。

質問 15) 脱髄や変性所見から考えると、実験マウスの運動障害は脊髄圧迫が原因でないのではないか。

(回答) 実際に運動麻痺は認められるので、皮質脊髄路に障害はあると考える。慢性脊髄圧迫実験モデルとして TWY マウスを使ったが、このマウスは Baba H ら (J Neurol;1997,244: 222-229) が実験モデルとして有用性を報告している。しかし独自に実験マウスの信憑性を再検討していない。慢性脊髄圧迫実験モデルの運動障害を、急性脊髄損傷例のモデルと同様に筋力低下の定量化と変性・脱髄の割合と残存神経細胞の比率を均一化し、運動障害と変性、脱髄、残存細胞数が一致したモデルの確立は困難と考える。

質問 16) Neuron は後角を見ていると思うが、前角と中間部においてはどうかであったか。

(回答) 今回の検討時期や部位では細胞数が少なく評価不能だった。

質問 17) JNK と p38 の 2 重染色は行ったのか。

(回答) 行っていない。当時は、リン酸化抗体が rabbit polyclonal 抗体しか入手できず、2 重染色で検討しなかった。連続切片での検討も含め今後の課題としたい。

質問 18) リン酸化された JNK、p38 とリン酸化されていない JNK、p38 の比較染色を行ったか。

(回答) 行っていない。リン酸化により活性化されている細胞の割合が重要と考えられるので今後の課題としたい。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。