

多発性硬化症脱髄巢反応性アストロサイトに発現する 14-3-3 蛋白質の アストログリオーシスにおける役割

佐藤 準一¹⁾、山村 隆¹⁾、有馬 邦正²⁾

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部¹⁾、武蔵病院臨床検査部²⁾

【研究背景・目的】多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は中枢神経系白質に炎症性脱髄巢が多発し、様々な神経症状が再発と寛解を繰り返して進行する難病である。病理学的には急性期に CD4⁺ T 細胞やマクロファージを主体とするリンパ球浸潤を認める。回復期には髄鞘再生も見られるが、炎症が遷延化すると axonal injury を来して不可逆的な後遺症を残す。またリンパ球の放出する炎症性サイトカインはアストロサイト(astrocytes; AS)の増殖を促進し、陳旧性脱髄巢は肥大化 AS による glial scar でおおわれる。Glial scar はコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを豊富に含み、再生途上の軸索の伸長に対しては障壁となる。従ってアストログリオーシス(astrogliosis)を人為的に制御出来れば、軸索再生を促進し神経学的後遺症を軽減出来る可能性があるが、現在までその分子細胞学的メカニズムは十分解明されていない。14-3-3 蛋白質は脳に豊富に含まれている 30-kDa 酸性蛋白質で 7 種類の isoform (β , γ , ϵ , η , ζ , θ , σ)に分離される。2 種類の isoform は homodimer, heterodimer を形成し、セリンリン酸化 RSXpSXP エピトープを有する 2 つの蛋白質と同時に結合し、Ras/Raf-1/MAPK 系や Akt-BAD 系におけるシグナル伝達因子アダプター分子として働き、細胞分化・増殖・死を制御している。昨年我々は急性期重症例 MS の髄液で 14-3-3 が検出されることを報告した(Satoh et al. J Neurol Sci 212: 11-20, 2003)。本研究では MS における 14-3-3 の役割を調べるため、MS 病巣を免疫組織化学的に検索した。その結果 MS 脱髄巢に出現する反応性 AS が 14-3-3 蛋白質を高発現することを見出し、培養ヒト AS における 14-3-3 結合蛋白質を同定した。

【方法】MS 4 症例と脳梗塞 4 症例の脳組織切片を 8 種類の anti-14-3-3 protein isoform-specific antibody で染色した。またヒト胎児脳由来神経前駆細胞を 10% FBS 添加 DMEM で培養して AS 純培養(GFAP⁺ >95%)を樹立し、一部は AS 誘導後に無血清で培養を継続した。AS 全蛋白質を 2D-PAGE で分離・転写し、recombinant human 14-3-3 ϵ protein with Xpress tag を probe として Far Western 解析を行い、特異的 spot をゲルから切り出し trypsin 処理後、質量分析で peptide fragments を同定した。

【結果】脱髄巢反応性 AS は β , γ , ϵ , ζ , η , θ , σ で染色されたが、 ϵ は AS 特異的に発現しており、 σ は 2 核の AS に発現していた。脳梗塞症例の反応性 AS も ϵ , σ で染色された。培養ヒト AS は σ を除く全ての isoform を発現しており、発現量は無血清培養に比較して 10%FBS 添加培養で 1.6-18.7 倍増加した。培養ヒト AS の 14-3-3 結合蛋白質として Ser-39, 72, 83 phosphorylated vimentin と GFAP を同定し、免疫沈降で両者と 14-3-3 ϵ , ζ , β との結合を確認した。また vimentin は MS 脱髄巢反応性 AS においても発現を認めた。

【考察・結論】MS 脱髄巢では 14-3-3 は反応性 AS で高発現し、培養ヒト AS では増殖依存性に発現量が増加し、vimentin および GFAP と結合している。特に ϵ はほとんどの反応性 AS で高発現し、特異的マーカーと成り得る。Type III intermediate filaments (IF)である vimentin, GFAP の発現量は resting AS に比較して、反応性 AS で顕著に増加することが知られている。すなわち AS の増殖・肥大化の過程では細胞骨格蛋白質 IF の再構築が起こるが、この過程で 14-3-3 は vimentin と GFAP を束ねる分子シャペロンとして働き、IF network を制御している可能性がある(Satoh et al. Am J Pathol 165:577-592, 2004)。