

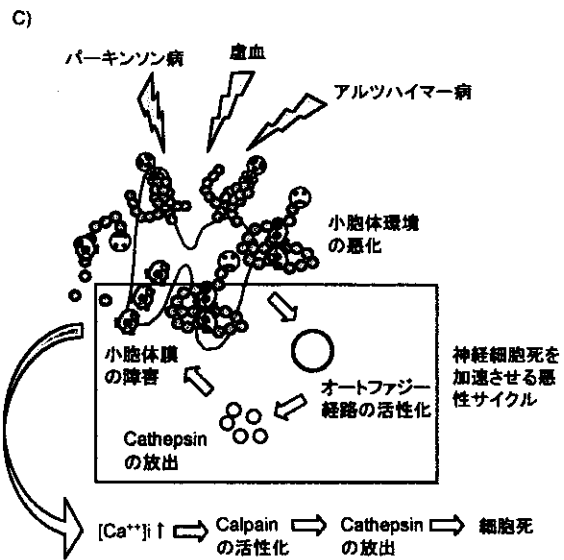
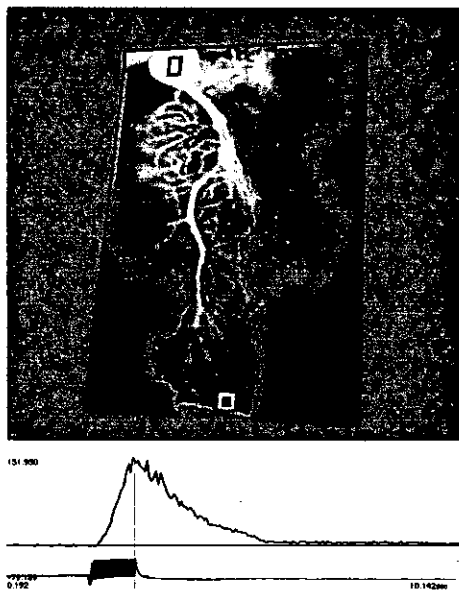
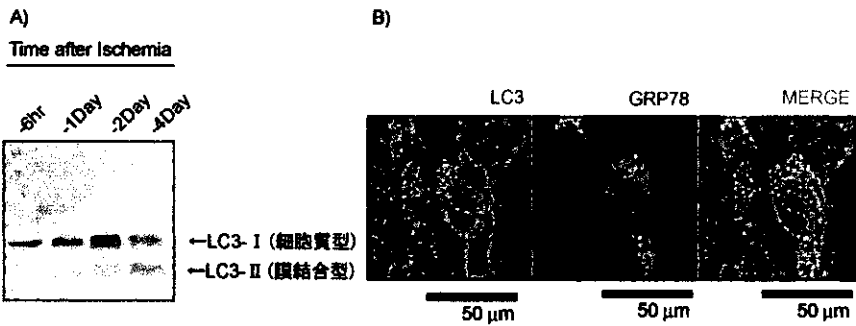
厚生労働省科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

小胞体制御による神経細胞死抑制・神経変性治療 に関する研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究員 小川智



厚生労働省科学研究研究費補助金

こころの健康科学研究事業

小胞体制御による神経細胞死抑制・神経変性治療に関する研究

平成15年度 総括研究報告書

主任研究員 小川智

平成16(2004)年 4月

目 次

I. 総括研究報告書

小胞体制御による神経細胞死抑制・神経変性治療に関する研究 小川智	2
-------------------------------------	---

II. 分担研究報告

1. 神経発生における小胞体ストレスに関する研究 小川智	6
---------------------------------	---

2. 小胞体環境改善薬スクリーニング系の開発 小川 智、堀 修	9
------------------------------------	---

3. 酸化ストレス、ERストレス細胞死経路とMLK活性化。 小川 智、桃井 隆	11
--	----

4. 霊長類における神経細胞死機構の解明 山嶋哲盛	13
------------------------------	----

5. 神経細胞樹状突起における小胞体からのカルシウム放出機構の解析 井上 貴文	16
--	----

6. 小胞体環境とオートファジー 経路の解明 内山安男	20
--------------------------------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷り	24
------------------	----

厚生労働省科学研究補助金(こころの健康科学研究事業)
総括研究報告書

小胞体制御による神経細胞死抑制・神経変性治療に関する研究

主任研究者 小川 智 金沢大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

本研究では、1)パーキンソン病、虚血、アルツハイマー病などが小胞体に負荷を与えること、2)これが小胞体環境の悪化をきたし、3)小胞体近傍でのオートファジー経路の活性化により、4)さらなる小胞体障害を引き起こす、ことを示した。一方、小胞体負荷は、けっして病的な環境下で発生するものではなく、発生段階でも見いだされるほど普遍的なものでもある。本研究ではさらに、小胞体環境改善剤とERからのCa⁺⁺放出制御剤を見いだすことによつて、脳虚血だけでなく神経変性疾患にも共通する神経細胞死機構の制御を目指す。

分担研究者

内山安男

大阪大学大学院医学系研究科・教授

山嶋哲盛

金沢大学大学院医学系研究科・助教授、

井上貴文

東京大学医科学研究所・助教授

んだ。しかし、これらの研究成果に基づき開発された新規薬剤でヒトでの効果が確認され、臨床応用にまで至ったものはきわめて少ない。本研究は、小胞体ストレスに着目して、我が国のトップレベルの研究者が、脳硬塞や脳血管性痴呆等の根本原因である虚血性神経細胞死だけでなく変性疾患による神経細胞死のメカニズム解明と新規治療法の開発を行うものである。

A. 研究目的

脳血管障害は今日日本人の死因の第3位を占めるが、その総罹患者数は200万人にも及ぶ勢いの圧倒的な多数であり、脳血管障害にかかわる医療費は依然として第1位となっている。また、高齢者人口が激増し医療環境が充実している中で、いわゆる卒中死を免れたものの片麻痺や痴呆、失語症等の後遺症に苦しむ要介護患者は今日着実に増加している。

脳血管障害の根本原因とも言える神経細胞死について、病態の解明が進み予防法や治療法が確立すれば、その成果は単に脳血管障害に留まらず、幅広く「国民の脳を守る」ことに寄与する。従来の研究で、虚血性神経細胞死と密接な関係を持つグルタミン酸レセプターやアポトーシス・カスケードの解明は相当進

B. 研究方法

神経発生における小胞体ストレスに関する研究

野生型マウス(WT)、ORP150トランスジェニックマウス(TG)、ORP150ノックアウトマウスヘテロ接合体(KO)より生後1-10日にかけて小脳を分離しNP-40(1%)にて蛋白を抽出後、SDS-PAGEで分離し、ORP150、GRP78、HSP70、GAD133、による抗体を用いてWestern blotを行った。また、各のマウスを灌流固定し上記抗体による免疫組織染色を行った。小脳プルキンエ細胞のマーカーはCalbindinD28kを用いた。神経細胞死は活性化Caspase-3抗体による免疫染色およびTUNEL法によって行った。

マウスの行動テストはRotor

Rodにて評価した。また、小脳プルキンエ細胞の神経回路形成の評価は電気生理学的に行

った。

小胞体環境改善剤スクリーニング系の開発
小胞体ストレス（小胞体内にunfoldな蛋白が蓄積するようなストレス）により発現が誘導される蛋白Herpは、小胞体膜上に存在するユビキチン様蛋白である。相同組み換え法により、Herp欠損F9細胞を作製したところ、ツニカマイシンなどの小胞体ストレス誘導剤処理に対し、きわめて是弱になった。Herp欠損F9細胞は、ツニカマイシン処理後、小胞体ストレス由来シグナル伝達の変化、小胞体の形態変化、カスパーゼ上昇を示し、最終的にアポトーシスと考えられる細胞死を呈した。このような変化は野生型のF9細胞では認められなかった。全長型のHerp

cDNAを細胞内に導入することにより、Herp欠損細胞のストレス脆弱性は改善した。この実験系はきわめて再現性に優れ、かつ、既存の細胞死抑制剤の効果も認められた。今後、より毒性が少なく、有効性の高い薬剤をスクリーニングする事により、虚血性神経疾患のみならずパーキンソン病などの神経変性疾患に対する、新たな治療薬の開発を試みる。

酸化ストレスおよびERストレス細胞死経路とMLK活性化

遺伝性パーキンソン病とERストレス細胞死との関係が注目される一方、酸化ストレスを原因とする非遺伝性パーキンソン病とERストレス細胞死との関係は不明である。解析した結果、1)ミトコンドリア脳筋症では異常ミトコンドリアの数に比例して、ERストレスへの感受性が高いこと、2)酸化ストレスはミトコンドリア異常を介して、ERストレスを誘導し、カスパーゼ1/2以外にカスパーゼ8を活性化し、カスパーゼ9/3を活性化するミトコンドリア細胞死の経路が存在すること、3)またミトコンドリア経路の活性化はJNKの上流に位置するMLKの阻害剤で抑制されることが明らかとなった。

霊長類における神経細胞死機構の解明

CA1錐体細胞においては虚血後5日目まで μ カルパインの活性化が持続した。活性型 μ カルパインは2日目まではリソソームに局在し、3日目以降は胞体全体に見られた。リソソーム膜蛋白であるLAMP-1の免疫染色性も虚血後2、3日目

に最も強く、それ以降は胞体全体に散逸し、虚血後にリソソーム膜が損傷されたことを示唆した。実際、免疫組織化学的にカテプシンのリソソーム外への放出が確認された。CA1錐体細胞においては103日目をピークとしてカスパー

ゼ3の活性化とCADの胞体から核内への局在変化が見られた。しかし、虚血後のCA1錐体細胞は光顕的に好酸性の凝固壊死を電顕的に膜の断裂像を呈し、DNAの電気泳動像はスメアーパターンを呈した。

神経樹状突起におけるERからのカルシウム放出機構の解明

1)小脳プルキンエ細胞樹状突起でのシナプス刺激によるカルシウム放出活性の測定は、マウス小脳より脳切片を作成し、プルキンエ細胞を正立顕微鏡により直視化にてパッチクランプ法を用いて、電気生理学的記録を行い、同時に細胞内にカルシウム色素を注入し、CCDカメラを用いたカルシウムイメージング法にてカルシウム濃度の変化を測定した。2)神経細胞樹状突起中に存在する高速に移動するERの観察には、初代培養マウス海馬神経細胞に、蛍光タンパク質と融合させたERタンパク質の遺伝子を導入し、蛍光顕微鏡でERを観察する方法を用いた。1)により、より神経構築の保存された神経細胞の機能を生理学的に測定することが可能であり、また、2)により遺伝子を神経細胞に導入しての研究が可能となった。これらの技術を利用して次年度以降、病的神経細胞のERの機能測定を行うことが可能になった。

虚血性神経細胞死におけるオートファジー
生後1週齢の野生型、カテプシンBおよびD欠損マウスを用いて低酸素負荷を行い海馬CA1錐体細胞の生存を調べた。マウスの一側総頸動脈を結紮、麻酔が覚めるまでの約1時間、母マウスのケージに戻す。その後、35分から40分間、8%酸素-92%窒素の容器（温度37度）に放置した後、ケージに戻す。経時的に形態学的、生化学的標本を作製し、解析を行った。

C. 結果と考察

神経発生における小胞体ストレスに関する研究

発生段階におけるORP150の発現は、発生というより慢性的な変化における小胞体ストレスの存在を示している。急性虚血だけでなくヒトに見られるような慢性虚血、さらには慢性的に進行する神経変性疾患においても小胞体ストレスの重要性が示唆される。

小胞体環境改善剤スクリーニング系の開発Herp/SUPは小胞体におけるユビキチン様ドメインを持つ新規遺伝子で、小胞体内に蓄積した不要蛋白の除去に関連していると考えられる。我々は、このHerp欠損F9細胞を用いて、小胞体（ストレス）由来神経細胞死のメカニズム解明、及びそれを阻害する薬剤の開発を目指している。これまでに、数種類の既存の薬剤が、この細胞で樹立されたHerp欠損細胞において、小胞体ストレス由来細胞死を抑制する事が判明した。我々の開発したスクリーニング系は、安定性、再現性に優れ、大量の薬剤のスクリーニングが可能である。

霊長類における神経細胞死機構の解明
一過性脳虚血の後に海馬CA1の錐体細胞が細胞死をきたすことはげっ歯類から霊長類に至るまで良く知られているが、その機序は不明である。本研究では、ニホンザルを用いて20分間の全脳完全虚血の後5日目にCA1に生じる神経細胞死が、アポトーシス、ネクローシスのいずれによるかを検索した。その結果、カルパイン・カスケードがカスパーゼ3-CAD・カスケードよりも重要な働きをなすことが明らかになった。

酸化ストレスおよびERストレス細胞死経路とMLK活性化
パーキンソン病のモデルでは遺伝的、非遺伝的（環境）原因により、線条体黒質神経細胞が小胞体（ER）ストレス細胞死や酸化ストレスによりミトコンドリア経路を介した細胞死をする。この二つのストレス細胞死は相互作用しており、1) ERストレスはカスパーゼ12の活性化以外にミトコンドリア経路の細胞死を活性化すること、2) 酸化ストレスはERストレスを介してミトコンドリア経路の細胞死を活性化することが明らかになった。

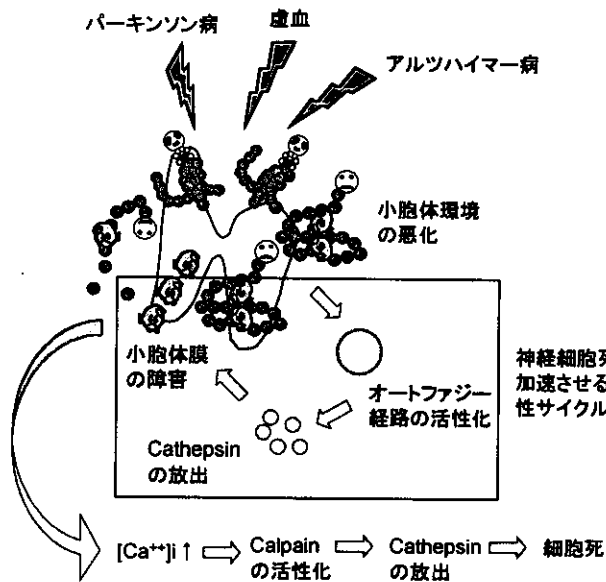
神経樹状突起におけるERからのカルシウム放出機構の解明
今年度は神経細胞樹状突起に存在するERにつ

いて基礎的な知見を得ることを目的とした。1) シナプス刺激によるERからのカルシウム放出活性はシナプス可塑性に重要であるので、小脳プルキンエ細胞の、シナプス形成期の生後2週令とほぼ終了した4週令の平行線維刺激によるカルシウム放出活性を比較したところ、前者にのみカルシウム放出活性の大きな一群を見いだした。2) 培養海馬神経細胞の樹状突起中のERを特異的マーカーを用いてラベルし、その動態を観察した。網状の比較的静的なERとは別に、小胞状で高速に樹状突起中を動き回るERを見いだした。

虚血性神経細胞死におけるオートファジー
低酸素・脳虚血負荷後の海馬CA1領域における遅延型神経細胞死とオートファジーとの関係について検討した。その結果、死に行く細胞の細胞質にはLC3陽性のオートファゴソームが多数形成され、TUNEL陽性の細胞の多くは、オートファジーが誘導されていることがわかった。また、電顕的にもオートファゴソームを多数持つCA1錐体細胞が認められることがわかった。さらに、これらの細胞ではリソソームカテプシンDの免疫反応性が上昇することも明らかになった。すなわち、低酸素負荷によって、海馬CA1錐体細胞にオートファジーが誘導され、その下流でリソソームカテプシンDが活性化される。カテプシンD欠損マウスでは、ほとんどこの変化が見られなかった。これによって、何らかの細胞死につながる分子が活性化され、海馬CA1錐体細胞の死が誘導されるものと推測された。

E. 結論

本研究では、1)パーキンソン病、虚血、アルツハイマー病などが小胞体に負荷を与えること、2)これが小胞体環境の悪化をきたし、3)小胞体近傍でのオートファジー経路の活性化により、4)さらなる小胞体障害を引き起こす、ことを示している。一方、小胞体負荷は、けっして病的な環境下で発生するものではなく、発生段階でも見いだされるほど普遍的なものもある。報告書に示された知見をもとに、本研究ではさらに、小胞体環境改善剤とERからのCa⁺⁺放出制御剤を見いだすことによって、脳虚血だけでなく神経変性疾患にも共通する神経細胞死機構の制御を目指す(図)。



図：本研究チームの基本戦略

本研究では、従来の報告にあるライソソーム経路の活性化以前にオートファジー経路の活性化が、小胞体の近傍で起こっていることを示した。1)パーキンソン病、虚血、アルツハイマー病などが小胞体に負荷を与えること、2)これが小胞体環境の悪化をきたし、3)小胞体近傍でのオートファジー経路の活性化により、4)さらなる小胞体障害を引き起こす、ことを示している(悪性サイクル：青で囲んでしめす)。本研究ではさらに、小胞体環境改善剤とERからのCa²⁺放出制御剤を見出すことによって、脳虚血だけでなく神経変性疾患にも共通する神経細胞死機構の制御を目指す。

F. 健康危惧情報
なし

G. 研究発表(抜粋)

1. 論文発表

1. 小川智、北尾康子、堀修 小胞体ストレスによる神経細胞死(特集：タンパク質の品質管理と神経疾患) 神経進歩. 2004; 48: 37-42
2. Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Taniguchi M, Koyama Y, Tohyama M, Stern D, Ozawa K, Kitao Y, Ogawa S. Role of Herp in the endoplasmic reticulum (ER) stress response. *Genes to Cells*, 2004, in press.
3. Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, Stern DM, Kano M, Ozawa K, and Ogawa S. ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: a role for endoplasmic reticulum stress in cerebellar development. *J Neurosci*. 2004; 24: 1486-96
4. Miyazaki M, Ozawa K, Hori O, Kitao Y, Matsushita K, Ogawa S, and Matsuyama T. Expression of ORP150 (150 kDa oxygen regulated protein) in the hippocampus suppresses delayed neuronal cell death. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2002; 22, 979-987
5. Tetsumori Yamashima Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death. - A conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates *Cell Calcium* 2004 (in press)
6. Tetsumori Yamashima et al., Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus* 2004 (in press)
7. Popivanova BK, Koike K, Tonchev AB, Ishida Y, Kondo T, Ogawa S, Mukaida N, Inoue M, Yamashima T. Accumulation of microglial cells expressing ELR motif-positive CXC

chemokines and their receptors CXCR2 in monkey hippocampus after ischemia-reperfusion *Brain Res* 970: 195-204, 2003

8. Nishimoto, S., Kawane, K., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Hashida, N., Ohguro, N., Tano, Y., Morimoto, T., Fukuda, Y., Nagata, S. (2003) Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens. *Nature* 424: 1071-1074.
9. Kametaka S, Shibata M, Moroe K, Kanamori S, Ohsawa Y, Waguri S, Sims PJ, Emoto K, Umeda M, Uchiyama Y. (2003) Identification of phospholipid scramblase 1 as a novel interacting molecule with γ -secretase (γ -site amyloid precursor protein (APP) processing enzyme (BACE)). *J Biol Chem*. 278:15239-15245
10. Mitsuharu Hattori, Akinobu Z. Suzuki, Takayasu Higo, Hiroshi Miyauchi, Takayuki Michikawa, Takeshi Nakamura, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba. Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca²⁺ signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279:11967-11975.
11. Kiyoko Fukami, Manabu Yoshida, Takafumi Inoue, Manabu Kurokawa, Rafael A. Fissore, Nobuaki Yoshida, Katsuhiko Mikoshiba, Tadaomi Takenawa. Phospholipase C γ 4 is required for Ca²⁺-mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *The Journal of Cell Biology*, 2003; 161:79-88.

2. 学会発表

各分担研究者の項を参照のこと。

G. 知的財産権の出願・登録状況

件名：Herp欠損細胞を利用した評価系

出願番号：特願2004-57717

出願日：2004年3月2日

厚生労働省科学研究補助金(こころの健康科学研究事業)
分担研究報告書

神経発生における小胞体ストレスに関する研究

主任研究者 小川 智

研究要旨

ORP150は、生後4-8日にかけて小脳、特にプルキンエ細胞に強い発現パターンを示した。ORP150を過剰発現させたトランスジェニックマウス(TG)では、プルキンエ細胞に強いORP150の発現を認めるとともに、ORP150ノックアウトヘテロ接合体(KO)では、その発現は明らかに減弱していた。ORP150の強制発現によってこの時期における細胞死が抑制され、逆にORP150ノックアウトマウスでは、神経細胞死が加速された。ORP150は海馬神経においてグルタミン酸による細胞内Ca⁺⁺上昇を抑え、細胞死を抑制することから小脳発生過程における神経細胞死にも小胞体を介する神経細胞死の関与が示唆される。

A. 研究目的

脳はグリア細胞やオリゴデンドロサイト、血管内皮細胞など異なった種類の細胞によって構成されるが、中心的存在である神経細胞は虚血に対してとりわけ脆弱である。したがって、長時間に及ぶ虚血では脳を構成するすべての細胞が壊死に陥るが、虚血が短時間である場合、神経細胞だけが死に到る。これに反してアストログリアや血管内皮細胞は虚血に対して強い抵抗性を示すことが知られている。さらに、アストログリアは虚血などの自らの生存すら危うくしかねないような環境下でも神経細胞に対する保護機作を発揮することが知られている。

本研究では、アストログリアが虚血環境で生き抜くためのいくつかの戦略を解析し、その戦略を利用して、虚血環境にあっても神経細胞死を抑制しうるかをテーマとして研究を進めてきた。また、虚血性神経細胞死だけでなくアルツハイマー病による神経細胞死も小胞体のストレス応答異常による可能性が示されてきた。本研究では、小胞体の機能異常が脳虚血とアルツハイマー病に共通する神経細胞死の経路であるとの認識に立ち、小胞体の機能制御による神経細胞死の抑制に関して研究してきた。

B. 研究方法

野生型マウス(WT)、ORP150トランスジェニックマウス(TG)、ORP150ノックアウトマ

ウスヘテロ接合体(KO)より生後1-10日にかけて小脳を分離しNP-40(1%)にて蛋白を抽出後、SDS-PAGEで分離し、ORP150、GRP78、HSP70、GAD133、による抗体を用いてWestern blotを行った。また、各のマウスを灌流固定し上記抗体による免疫組織染色を行った。小脳プルキンエ細胞のマーカーはCalbindin_{D28k}を用いた。神経細胞死は活性化Caspase-3抗体による免疫染色およびTUNEL法によって行った。マウスの行動テストはRotor Rodにて評価した。また、小脳プルキンエ細胞の神経回路形成の評価は電気生理学的に行った。

C. 研究結果

マウスにおける小脳発生では神経細胞死がおこることが知られているが、新規小胞体ストレス蛋白であるORP150は、生後4-8日にかけて小脳、特にプルキンエ細胞に強く発現、GRP78、GRP94、HSP70などとは異なった発現パターンを示した。ORP150を過剰発現させたトランスジェニックマウス(TG)では、プルキンエ細胞に強いORP150の発現を認めるとともに、ORP150ノックアウトヘテロ接合体(KO)では、その発現は明らかに減弱していた。野生型マウスでは生後4日をピークにプルキンエ細胞層で活性化型Caspase-3の免疫陽性細胞が見られたが、TGでは陽性細胞数が有意に減少していた。Calbindin染色で評価したプルキンエ細胞数も生後4-20日にか

けてTGで多く、KOで減少していた。また、グルタミン酸拮抗薬であるMK-801の投与により、TGと同様の傾向が再現された(23)。ORP150ノックアウトマウスの発生初期の小脳プルキンエ細胞を観察すると、出生後4-6日にかけて、TUNEL法および活性化caspase-3による免疫染色で胞死が検出される。この細胞死は、野生型、ORP150トランスジェニックマウ(TG)の順に、すなわち、ORP150の発現が強くなるほど抑制される傾向にあった。さらに、TGでは、プルキンエ細胞の密度も、明らかに増加していた。ところが、行動テストで評価された小脳の機能は、逆にTGで傷害されていた。

D. 考察

グルタミン酸塩受容器とグルタミン酸の結合によって開始される一連の生体反応は、細胞内のカルシウム上昇、さらには、細胞内環境の変化を来し、最終的には神経細胞死に至

らしめる。ORP150は興奮性アミノ酸投与によりマウス海馬に誘導され、また、培養海馬培養神経細胞においてもグルタミン酸負荷に応答して発現上昇する。発生段階の小脳プルキンエ細胞においても、グルタミン酸入力回路の増加が生後4-8日におけると報告されており、ORP150の発現のピークと一致する。砂ネズミの一過性総頸動脈結紮によって海馬CA1領域に遅発性神経細胞死(DND)が起こり、この細胞死は虚血耐性を獲得させた個体では起こらない。ORP150は虚血耐性を獲得した砂ネズミCA1領域に極めて強く発現し、また、あらかじめCA1領域にアデノウイルスベクターを用いてORP150を遺伝子導入することにより、神経細胞死を救済することができる。DNDでは1-2週間で神経細胞死が完成する「慢性虚血性神経細胞死モデル」である。このパラダイムにおいてもORP150は神経細胞死を抑制することが示されている。

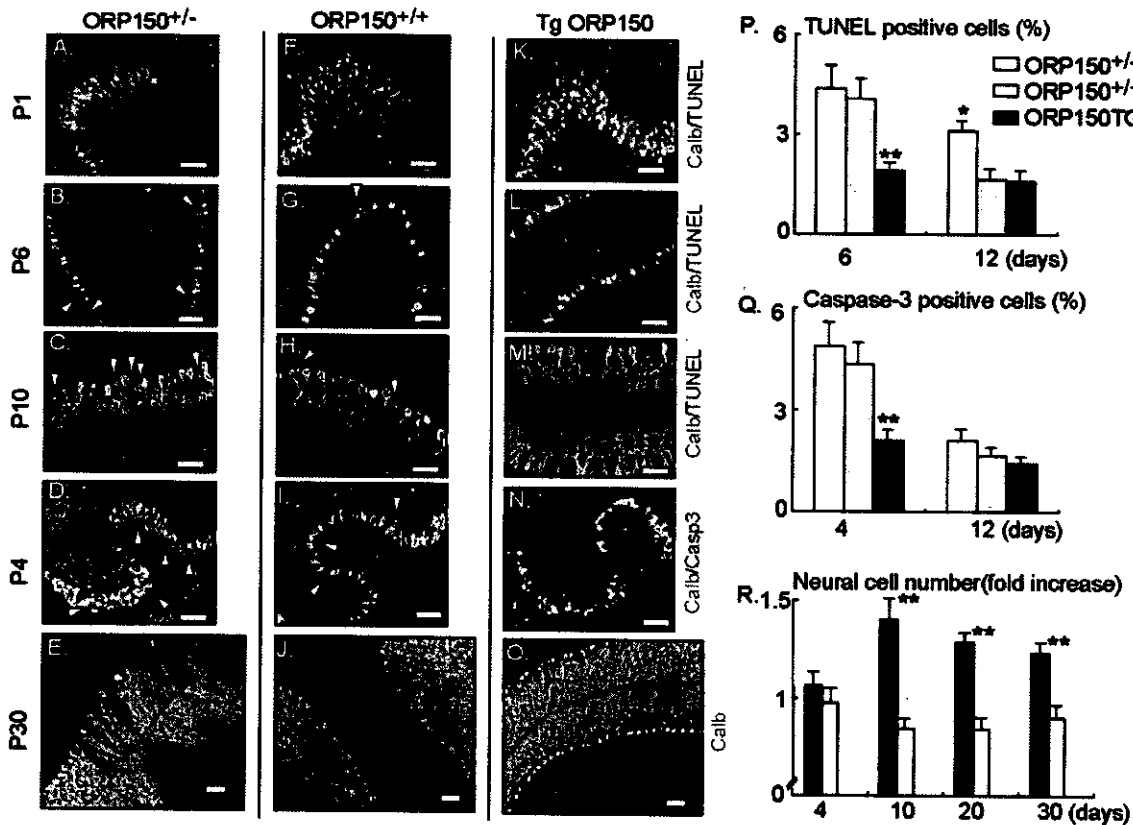


図: 発生初期の小胞体ストレスが小脳プルキンエ細胞の至適密度を決める。

ORP150ノックアウトマウスの発生初期の小脳プルキンエ細胞を観察すると、出生後4-6日にかけて、TUNEL法および活性化caspase-3による免疫染色で胞死が検出される。この細胞死は、野生型、ORP150トランスジェニックマウ(Tg ORP150)の順に、すなわち、ORP150の発現が強くなるほど抑制される傾向にあった。さらに、Tg ORP150では、プルキンエ細胞の密度も、明らかに増加していた。ところが、行動テストで評価された小脳の機能は、逆にTg ORP150で傷害されており、発生段階における小胞体ストレスが、ホストのプルキンエ細胞の至適密度を決めると考えられる。

E. 結論

発生段階におけるORP150の発現は、発生というより慢性的な変化における小胞体ストレスの存在を示している。急性虚血だけでなくヒトに見られるような慢性虚血、さらには慢性的に進行する神経変性疾患においても小胞体ストレスの重要性が示唆される。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ikematsu K, Tsuda R, Kondo T, Kondo H, Ozawa K, Ogawa S, and Nakasono I. The expression of a novel stress protein '150-kDa oxygen regulated protein' in sudden infant death. *Leg Med (Tokyo)*. 2003 ;5: 15-9
- Miyagi T, Koshida K, Hori O, Konaka H, Kato H, Kitagawa Y, Mizokami A, Egawa M, Ogawa S, Hamada H, Namiki M. Gene therapy for prostate cancer using the cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide system. *J Gene Med*. 2003; 5: 30-37
- Kitao Y, Hashimoto K, Matsuyama T, Iso H, Tamatani T, Hori O, Stern DM, Kano M, Ozawa K, and Ogawa S. ORP150/HSP12A regulates Purkinje cell survival: a role for endoplasmic reticulum stress in cerebellar development. *J Neurosci*. 2004; 24: 1486-96
- Yatabe N, Kyo S, Maida Y, Nishi H, Nakamura M, Kanaya T, Tanaka M, Isaka K, Ogawa S, Inoue M. HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene*. 2004, in press.
- Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Taniguchi M, Koyama Y, Tohyama M, Stern D, Ozawa K, Kitao Y, Ogawa S. Role of Herp in the endoplasmic reticulum (ER) stress response. *Genes to Cells*, 2004, in press.
- Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Hirota A, Yutani A, Ozawa K, Ogawa S, Tomoike H, Hori M, and Kitakaze M. Prolonged ER Stress in Hypertrophic and Failing Heart Following Aortic Constriction: Possible Contribution of ER Stress to Cardiac Myocyte Apoptosis. *Circulation*, 2004, in press.
- Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, Stern D, Yamauchi A, and Ogawa S. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *FASEB J.*, 2004, in press.

2. 学会発表

Kitao Y, Tamatani T, Hori O, Ozawa K, and Ogawa S. ORP150は発生段階における小脳プルキンエ細胞死を抑制する。神経科学学会、2003 名古屋

Kitao Y, Ozawa K, Hori O, and Ogawa S. 脳虚血における小胞体ストレスの役割。神経科学学会、2003 名古屋

Hori O, Ichinoda F, Kitao Y, Ozawa K, and Ogawa S. 小胞体ストレスにおけるユビキチン様蛋白Herp/SUPの役割。日本分子生物学会、2003 神戸。

ORP150/HSP12A suppresses Purkinje cell death in cerebellar development. 米国細胞生物学会、2003 サンフランシスコ

Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, Taniguchi M, Koyama Y, Tohyama M, Stern D, Ozawa K, Kitao Y, Ogawa S. Role of a ubiquitin-like protein in the endoplasmic reticulum (ER) stress response. 米国細胞生物学会、2003 サンフランシスコ

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

- 特許取得
- 実用新案登録
- その他

厚生労働省科学研究補助金(こころの健康科学研究事業)
分担研究報告書
小胞体環境改善薬スクリーニング系の開発

主任研究者 小川 智
共同研究者 堀 修 (金沢大・院・医学系研究科)

小胞体ストレス感受性でアルツハイマー病との関連が示唆されているHerp遺伝子を欠損させたマウスF9細胞を用いたスクリーニング系を開発した。この細胞は、安定且つ取扱いが容易であり、虚血、アルツハイマー病やパーキンソン病治療薬等の小胞体ストレスによる細胞死を抑制する薬剤のスクリーニング系に利用できる。

A. 研究目的

近年、小胞体ストレス由来細胞死は、虚血性神経疾患やアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患に深く関わっていることが明らかにされてきた。従って、小胞体ストレス由来細胞死を克服することは、上記疾患に対し、新たな治療法を提供することになると考えられる。我々が作製した、Herp遺伝子欠損F9細胞は、小胞体ストレスに極めて脆弱になる。我々は、この細胞株を用いる事により、小胞体ストレス由来細胞死を抑制する薬剤のスクリーニング系の開発を試みた。

B. 研究方法

ここでは、Herp遺伝子欠損F9細胞の作製、及び同細胞の小胞体ストレス下に於ける脆弱性については省略し(Genes to Cells, 2004, in press参照)、同細胞を用いた、化合物スクリーニング系に関する方法のみ記述する。

- ① 96穴、或いは24穴カルチャープレートにゼラチンコートした後、Herp欠損F9細胞、及びコントロールとして野生型F9細胞を播種する。
- ② 2日間、或いは細胞が培養面積の50-60%を占めるまで培養を行う。
- ③ 上記細胞に、小胞体ストレス付加条件下(例えばツニカマイシン1mg/mlで細胞処理)で、被験物質を加えて24-48時間培養する。
- ④ 細胞生存、及び細胞死をMTT assay及びLIVE/DEAD assayにより測定し、さらにはcaspaseの活性を検討することにより、被験物質の小胞体ストレス由来細胞死抑制効果を判定する。

- ⑤ にて効果を認めた化合物については、それがどのようなメカニズムで働いているか検討する(Herp機能に直接関わるのか、小胞体ストレス全体に関わるのか等)。
- ⑥ また、④にて効果を認めた化合物については、⑤の結果をふまえた上で、より疾患に関連するモデル(神経細胞初代培養系やin vivoモデル)での効果を検討する。

(倫理面への配慮)

動物、又は、動物から単離した培養細胞を用いる実験にあたっては、金沢大学宝町地区動物実験指針を遵守し、行う。

C. 研究結果

グラフ1は、実際の測定例(MTT assay)を示す。小胞体からのCaイオン流出を阻害するDantroleneにより、Herp(SUP)欠損F9細胞における小胞体ストレス由来細胞死が抑制されていることが分かる。このほか、cycloheximide(図1)、caspase inhibitors、JNK inhibitor等にもHerp遺伝子欠損F9細胞における小胞体ストレス由来細胞死を抑制する効果を認めている。

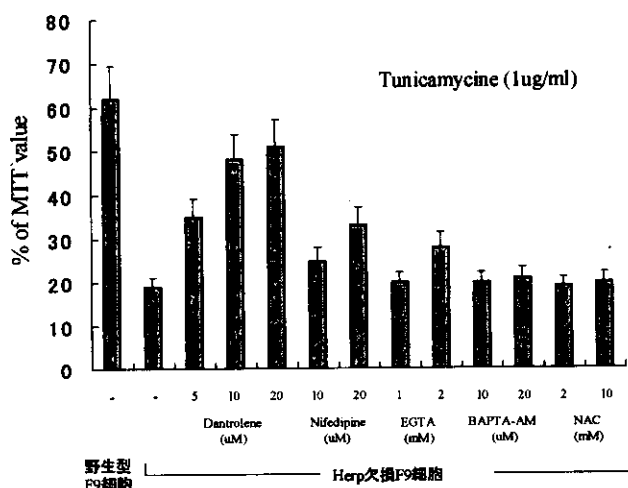
D. 考察

小胞体ストレス由来細胞死を抑制するような薬剤の開発については、スクリーニングに用いる細胞に技術的な問題点が多く(神経細胞初代培養や変異蛋白を過剰発現させた細胞株を用いた場合、増殖能が低く、長期間の維持が困難である)、一度に多くの化合物をスク

リーニングすることが難しかった。一方、我々は、低酸素暴露したアストログリアより、小胞体ストレス関連遺伝子Herp (J.Biol.Chem. 2000, 275; 32846-53)をクローニングし、さらに、マウス胎児性癌細胞であるF9細胞を用いて、相同組み替え法によりHerp遺伝子欠損細胞を作製した。Herpは若年性アルツハイマー病の責任遺伝子の一つであるプレセニリンと結合し、アミロイドの産生を増加させるとも報告されている(J.Biol.Chem. 2002, 277; 12915-20)。これまでの検討から、Herp欠損F9細胞は、ツニカマイシン等による小胞体ストレスに対し、再現性よくアポトーシスを引き起こすことが認められた。また、この細胞株は、神経系の細胞や変異タンパク質を過剰発現させた様な細胞株とは異なり、安定的に長期維持され、増殖効率も高く、取り扱いも簡便であることが確認された。今回、我々はこのHerp欠損F9細胞を用いた、小胞体ストレス由来細胞死抑制物質のスクリーニング系を開発した。

これまで、既存の薬剤約10種類を用いて検討した所、N-アセチルシステイン(NAC)等の抗酸化剤にはあまり細胞死抑制効果を認めず、小胞体からのCaイオン流出を阻害するDantroleneに細胞死抑制効果を認めた。さらに、このDantroleneの効果は、小胞体ストレス負荷後、中期(8-20時間)に起こる細胞内変化に関連していることが明らかになっている。

今後、この評価系を用いて、実際に未知の化合物のスクリーニングに着手したいと考えている。



グラフ1 MTT assay

E. 結論

Herp遺伝子を欠損させたマウスF9細胞を用いた小胞体ストレス由来細胞死抑制物質のスクリーニング系を開発した。

F. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

論文発表

Osamu Hori, Fusae Ichinoda, Atsushi Yamaguchi, Takashi Tamatani, Manabu Taniguchi, Yoshihisa Koyama, Taiichi Katayama, Masaya Tohyama, David M Stern, Kentaro Ozawa, Yasuko Kitao, and Satoshi Ogawa. Role of Herp in the endoplasmic reticulum (ER) stress response 2004 Genes to Cells. In press.

G. 知的財産権の出願・登録状況

件名：Herp欠損細胞を利用した評価系

出願番号：特願2004-57717

出願日：2004年3月2日

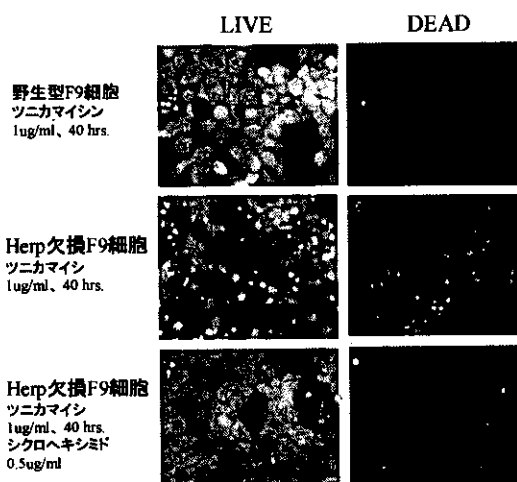


図1 LIVE / DEAD assay

厚生労働省科学研究補助金(こころの健康科学研究事業)
分担研究報告書

酸化ストレス、ERストレス細胞死経路とMLK活性化。

主任研究者 小川 智

共同研究者 桃井 隆(国立精神神経センター)

研究要旨

遺伝性、非遺伝性神経変性疾患にみられる細胞死の共通の機構を解析した。遺伝性パーキンソンモデルであるGPR37の蓄積ではERストレスによりカスパーゼ12が活性化されるが、6ヒドロオキシドーパミン(6OHDA)による非遺伝性パーキンソン病モデルでも酸化ストレス、ERストレスが誘導されカスパーゼ9、12活性化による神経細胞死が誘導された。この神経細胞死はMLKの阻害剤であるCEP11004により細胞死が抑制された。MLKは酸化ストレス、ERストレス細胞死に関与していることが明らかになった。

A. 研究目的

システインプロテアーゼであるカスパーゼは14種類が知られており、細胞死の実行に関与する。様々な刺激により1)ミトコンドリア経路を介してのカスパーゼ9、3の活性化と2)小胞体(ER)に局在するカスパーゼ12の活性化の経路が知られている。カスパーゼ12はERでの蛋白の折り畳み異常がもたらすERストレスによる細胞死に関与する。最近、パーキンソン病、ポリグルタミン病をはじめとする神経変性疾患とコンフォメーション異常がもたらすERストレス細胞死との関係が注目されている。一方、弧発例のパーキンソン病では酸化ストレスによるミトコンドリア細胞死経路の活性化が示唆されている。本研究では遺伝性、非遺伝性神経変性疾患にみられる神経細胞死におけるカスパーゼ活性化機構の解明を目的とした。

B. 研究方法

酸化ストレス、ERストレス細胞死阻害剤のスクリーニング
酸化ストレス、ERストレス細胞死の実行に関与するカスパーゼ9、12の活性化を指標として、作成したカスパーゼ9、12の活性型に特異的な抗体による免疫染色法を用いて、酸化ストレス、ERストレス細胞死を抑制する化合物をスクリーニングし、カスパーゼ9、12の上流で細胞死を抑制する阻害剤を見出した。

C. 研究結果

1) ERストレス細胞死におけるカスパーゼの活性化

ERストレスを誘導するツニカマイシンによる細胞死の過程で活性化するカスパーゼの活性化を様々なマウス細胞株をもちいて検討したところ、C2C12(筋芽細胞)やC2C5(分化型P19EC細胞)に代表される細胞ではカスパーゼ12が活性化されるが、P19EC細胞(未分化型)に代表される細胞ではカスパーゼ8/9/3が活性化されることが明らかになった。カスパーゼ12の発現量は細胞株によりかなり異なっており、C2C12やC2C5細胞と異なり、P19EC細胞ではほとんど発現がみられず、ERストレスによりカスパーゼ8がER上にリクルートし活性化し、Bidを介してミトコンドリア経路活性化し、カスパーゼ9/3が活性化することが明らかになった。

2) 6ヒドロオキシドーパミン(6OHDA)が誘導する神経細胞死とリン酸化阻害剤CEP11004による抑制。

酸化ストレス、ERストレス細胞死の実行に関与するカスパーゼ9、12の活性化を指標として、作成したカスパーゼ9、12の活性型に特異的な抗体による免疫染色法を用いて、約10万種の化合物をスクリーニングし、カスパーゼ9、12の上流で細胞死を抑制する阻害剤を見出した。

6OHDAを投与したマウスではTH陽性神経細胞が選択的なアポトーティックな細胞死をしめすことから、パーキンソン病のモデル動物として用いることが可能である。JNKの活性

化、カスパーゼの活性化を指標として解析したところ6OHDA投与により、TH陽性の黒質神経細胞でJNKの活性化とカスパーゼ9の活性化を伴う細胞死が観察された。こうした6OHDAで誘導された細胞死とカスパーゼ9の活性化はJNKの上流に位置するMLKの阻害剤であるCEP11004により抑制された。興味深いことにCEP11004は遺伝的パーキンソン病の原因であるERストレスが誘導するカスパーゼ12の活性化をも抑制することが明らかとなり、MLKはミトコンドリア経路の細胞死のみならず、ERストレス細胞死の経路をも関与していることが明らかになった（未発表）。

D. 考察

酸化ストレスを誘導する6OHDAによる非遺伝性パーキンソン病モデルでは、JNK、カスパーゼ9/3が活性化することから、ミトコンドリア経路の関与が示唆された。しかし、ERストレス細胞死の経路にはカスパーゼ12の活性化経路とカスパーゼ9/3の活性化経路の二つが存在することが明らかになり、6OHDAが酸化ストレス以外にERストレスを誘導し、結果としてミトコンドリア経路を活性化している可能性も考えられる。パーキンソン病の遺伝子欠損、すなわちGPR37の蓄積を原因とする遺伝性パーキンソン病では、ERストレスによりカスパーゼ12が活性化するが、6OHDAによってもカスパーゼ12が活性化することが明らかとなり、遺伝性だけでなく非

遺伝性パーキンソン病でもERストレス細胞死が関与している可能性は十分考えられる。また、MLKの阻害剤であるCEP11004はミトコンドリア、ERストレス経路におけるカスパーゼの活性化を抑制することから、1) MLKは酸化ストレスによるJNKの活性化、ミトコンドリア経路であるカスパーゼ9を活性化を調節する以外に、2) ERストレスによるカスパーゼ12の活性化をも制御している可能性が考えられた。

E. 結論

1) ERストレスの細胞死経路として、カスパーゼ12の活性化以外に、ミトコンドリア経路を介してカスパーゼ9/3が活性化する経路が存在する。2) 非遺伝性パーキンソン病のモデルとして、6OHDAによる酸化ストレス、ERストレスを介してのカスパーゼ9/3、カスパーゼ12の活性化が考えられる。3) MLKの阻害剤であるCEP11004は6OHDAによるカスパーゼ9/3、カスパーゼ12の活性化以外に、遺伝性パーキンソン病のモデルであるGPR37蓄積が誘導するERストレスによるカスパーゼ12の活性化を阻害することから、MLKは酸化ストレス以外にERストレスが誘導する細胞死の経路にも関与している可能性が明らかになった。

F. 健康危機情報 なし。

G. 研究発表

2. 学会発表

Kitao Y, Tamatani T, Hori O, Ozawa K, Momoi T, and Ogawa S. ORP150はMTTによる黒質線条体神経細胞死を抑制する。神経科学学会、2003 名古屋



図1 6OHDA投与による黒質神経細胞のカスパーゼ9活性化と細胞死

カスパーゼ9の活性化型抗体と細胞死の形態を指標として解析したところ、6OHDA投与により、黒質神経細胞でカスパーゼ9の活性化をともなう細胞死が観察された(A)。6OHDAで誘導された細胞死(B)とカスパーゼ9の活性化(C)はJNKの上流に位置するMLKの阻害剤であるCEP11004により抑制された。

厚生労働省科学研究補助金(こころの健康科学研究事業)
分担研究報告書

霊長類における神経細胞死機構の解明

分担研究者 山嶋哲盛

研究要旨

一過性脳虚血の後5日目に海馬CA1領域の錐体細胞が神経細胞死をきたすことはげっ歯類から霊長類に至るまで良く知られているが、その機序は現在なお不明である。本研究では、ニホンザルを用いて20分間の全脳完全虚血の後5日目にCA1錐体細胞に生じる神経細胞死が、アポトーシス、ネクローシスのいずれによって生じるかを明らかにした。

結果：虚血後のCA1錐体細胞においては虚血直後から5日目まで μ -カルパインの活性化が持続しており、虚血後3日目に最大の活性化が見られた。活性型 μ -カルパインは虚血後2日目まではリソソームに局在しており、3日目以降は胞体全体にびまん性に見られた。リソソーム膜蛋白であるLAMP-1の免疫染色性も虚血後2、3日目がリソソームに最も強く、それ以降は胞体全体に散逸しており、虚血後に活性型 μ -カルパインによってリソソーム膜が損傷されたことを示唆した。虚血後にはカテプシンのリソソーム外への放出が確認された。カスパーゼ3の活性化は虚血後3時間後にピークであったが、前駆体であるプロカスパーゼ3の蛋白の発現は増加するにもかかわらず、その後は活性型カスパーゼ3のバンドは見られなくなった。しかし、CA1錐体細胞においては虚血後3日目をピークとしてCADの胞体から核内への局在変化が見られた。虚血後のCA1錐体細胞は光顕的に好酸性の凝固壊死を呈し、電顕的には膜の断裂像が見られた。また、アポトーシス小体は見られず、核クロマチンの点状の凝集像が見られた。さらに、DNAの電気泳動像はラダーではなくスメアパターンを呈した。

結論：霊長類の虚血性神経細胞死においては、カルパイン-カテプシン・カスケードがカスパーゼ3-CAD・カスケードよりも重要な働きをなすことが明らかになった。

A. 研究目的

一過性脳虚血を負荷すると、海馬のCA1ニューロンが数日かかって死んでゆくことは、砂ネズミからヒトに至るまでよく知られている。しかし、この神経細胞死の分子メカニズムに関しては依然として不明な点が多い。すなわち、同一の虚血刺激を受けているにもかかわらずなぜ特定部位のニューロンのみが脆弱性を示すのかという疑問に対する完璧な解答は誰もできないのが現状である。一過性脳虚血の後5日目頃に海馬CA1領域の錐体細胞が神経細胞死をきたすことは、げっ歯類から霊長類に至るまで良く知られているが、そのメカニズムは現在なお明らかにされていない。げっ歯類を対象とした従来の研究

成果では、このような虚血性神経細胞死はアポトーシスによって生じるとされてきた。しかし、霊長類における虚血性神経細胞死の分子メカニズムに関しては研究がきわめて少ないため、現在なお不明な点が多い。本研究においては、ニホンザルを用いて20分間の全脳完全脳虚血の後5日目にCA1錐体細胞に生じる神経細胞死が、アポトーシスないしネクローシスのいずれによって生じるかを明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

体重5kg~9kgのニホンザル(*Macaca fuscata*)15頭を用いた。具体的には、開胸後縦隔内に入し直視下に大動脈弓より分岐直後の左鎖骨

下動脈と無名動脈を剥離後、血管クリップにより20分間血流を完全に遮断した。血実験後のサルは3群に分け、5頭は治療なしのコントロールとし、5頭はCA-074、5頭はE64c、それぞれ4mg/kgのカテプシン阻害剤の静脈内注射を虚血解除後に行った。また、術中は直腸温をモニターし、体温を一定に保った。

μ -カルパインをはじめリソソーム膜蛋白のLAMP-1 (lysosome-associated membrane protein-1)、カテプシン、カスパーゼ3、およびカスパーゼ3によって誘導されるDNaseであるCAD (caspase-activated DNase) の発現変化と活性化および局在変化を検索した。同時に、虚血後のCA1錐体細胞の形態学的変化とDNAゲル電気泳動像とを検索した。

倫理面への配慮：ヒトに対して行う方法に準じて、ハロセンにより緩徐に麻酔導入し、全身麻酔（1%ハロセン、60%笑気、40%酸素）下で無痛的に手術を行った。

C. 研究結果

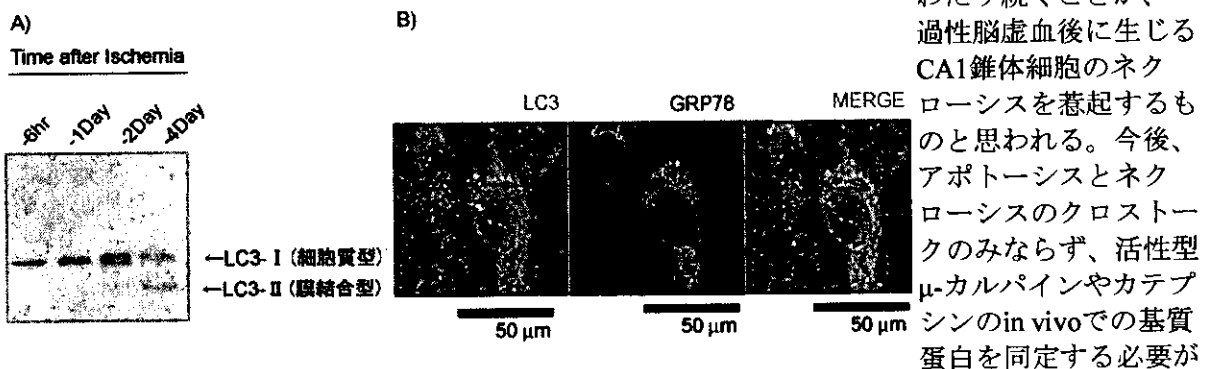
その結果、ウェスタンブロットでは、虚血後のCA1錐体細胞においては虚血直後から5日目まで μ -カルパインの活性化が持続しており、虚血後2、3日目に最大の活性化が見られた。活性化型 μ -カルパインは免疫組織化学的検索では、虚血後2日目まではリソソームに一致して局在しており、虚血後3日目以降は胞体全体にびまん性に見られた。LAMP-1の免疫染色性も虚血後2、3日目においてリソソームで最も強く、それ以降は胞体全体に散逸しており、虚血後に活性化型 μ -カルパインによってリソソーム膜が損傷されたことを示唆した。以前に報告したごとく、虚血後にはカテプシ

NとカテプシンLのリソソーム外への放出が免疫組織化学により確認された。ウェスタンブロットでは、カスパーゼ3の活性化は虚血後3時間後にピークであったが、前駆体であるプロカスパーゼ3の蛋白の発現は増加しているにもかかわらず、その後は活性化型カスパーゼ3のバンドはほとんど見られなくなった。リンパ節や小腸などと比較すると、正常脳のCADの発現量は著しく少なかった。

しかし、CA1錐体細胞においては虚血後2、3日目をピークとして胞体から核内への局在変化が見られた。虚血後のCA1錐体細胞は光顕的に好酸性の凝固壊死を呈し、電顕的には膜の断裂像が見られた。また、典型的なアポトーシス小体は見られず、核クロマチンの点状の凝集像が見られるだけであった。DNAの電気泳動像は、アポトーシスに特徴的なラダーパターンではなく、ネクローシスに特徴的なスメアパターンを呈した。

D. 考察

最近、線虫の神経変性モデルにおいてもCa²⁺依存性のプロテアーゼであるカルパインとリソソーム酵素であるカテプシンが神経細胞の変性に重要な役割を果たすことが分子遺伝学的に確認された。本研究からは、霊長類においてはカルパイン-カテプシン・カスケードがカスパーゼ3-CAD・カスケードよりも重要な働きをなすこと、したがって、虚血性神経細胞死はアポトーシスではなくネクローシスによって生じることが明らかになった。活性化型 μ -カルパインによってリソソーム膜の損傷が持続的に起きるために、リソソームからのカテプシンの放出が虚血後5日間に



図：霊長類海馬におけるオートファジー経路の活性化

ニホンザル脳虚血後の海馬において虚血後2-4日にかけて、膜結合型LC-3がWestern blotにて検出された(A)。また、4日後の免疫染色では、LC3の染色パターンはGRP78のそれと一致し、膜結合型LC3抗原の分布が小胞体(ER)に類似することが示された。これは、従来の報告にあるライソソーム経路(図C最下段)の活性化以前にオートファジー経路の活性化が、小胞体の近傍で起こっていることを示唆する。

ある。以上、線虫から霊長類に至るまで、「カルパイン-カテプシン仮説」は種を越えて虚血性神経細胞死のメカニズムを説明し得るものと思われる。

E. 結論

霊長類の虚血性神経細胞死においては、カルパイン-カテプシン・カスケードがカスパーゼ3-CAD・カスケードよりも重要な働きをなすことが明らかになった。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Anton B. Tonchev, et al.,
Differential proliferative response in the postischemic hippocampus, temporal cortex and olfactory bulb of young adult macaque monkeys. *Glia* 42(3):209-224, 2003.

2) Anton B. Tonchev, et al.,
Proliferation of neural and neuronal progenitors after global brain ischemia in young adult macaque monkeys. *Mol Cell Neurosci* 23(2):292-301, 2003

3) Boryana K. Papivanova, et al.,
Accumulation of microglial cells expressing ELR motif-positive CXC chemokines and their receptors CXCR2 in monkey hippocampus after ischemia-reperfusion *Brain Res* 970(1-2):195-204, 2003

4) Tetsumori Yamashima, et al., Sustained calpain activation and lysosomal rupture prevailing apoptosis cascade, execute necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. *Hippocampus* 13(7): 791-800-11, 2003.

5) Tetsumori Yamashima et al., Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia
Hippocampus 2004 (in press)

6) Tetsumori Yamashima Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death
- A conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates -
Cell Calcium 2004 (in press)

2. 学会発表

1) 山嶋哲盛

Mechanism of ischemic neuronal death:
Calpain-cathepsin hypothesis
第26回日本神経科学会
平成13年7月15日 (名古屋)

2) 山嶋哲盛

霊長類の虚血脳における神経幹細胞の由来
第8回金沢神経科学会
平成13年10月12日 (金沢)

3) 山嶋哲盛、Anton Tonchev、Boryana

Popivanova、Ivan Vachkov、向田直史
虚血後海馬に生じるneuronal progenitorの由来
第12回海馬と高次脳機能学会
平成13年11月24日 (府中)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生労働省科学研究補助金(こころの健康科学研究事業)
分担研究報告書

神経細胞樹状突起における小胞体からのカルシウム放出機構の解析
分担研究者 井上 貴文

研究要旨

今年度は神経細胞樹状突起に存在するERについて基礎的な知見を得ることを目的とした。1)シナプス刺激によるERからのカルシウム放出活性はシナプス可塑性に重要であるので、小脳プルキンエ細胞のシナプス形成期の生後2週令と、ほぼ終了した4週令の平行線維刺激によるカルシウム放出活性を比較したところ、前者にのみカルシウム放出活性の大きな一群を見いだした。2)培養海馬神経細胞の樹状突起中のERを特異的マーカーを用いてラベルし、その動態を観察した。網状の比較的静的なERとは別に、小胞状で高速に樹状突起中を動き回るERを見いだした。

A.研究目的

細胞内Ca²⁺放出チャンネルである1型イノシトール3リン酸受容体(IP3R1)は小脳プルキンエ細胞に非常に豊富に発現しており、ERからのCa²⁺放出の主要な機能を担っている。細胞内Ca²⁺濃度の増加は、プルキンエ細胞におけるシナプス可塑性のモデルである長期抑圧現象(LTD)に必須であることが知られていたが、豊富に発現しているIP3RのCa²⁺放出活性もLTDに重要であることを明らかにしてきた。また、1型小脳脊髄変性症(SCA1)のモデルマウスではプルキンエ細胞は生後2ヶ月以降変性、脱落していく。SCA1モデルマウス・プルキンエ細胞においてIP3R1の発現量は著しく減少していたが、シナプス刺激によるCa²⁺放出はむしろ活性化していることを見いだした。すなわち、平行線維刺激によるCa²⁺放出が野生型プルキンエ細胞よりもより起こりやすくなっているのみならず、野生型では見られない、登上線維刺激によるCa²⁺放出も観察された。これらの知見は、プルキンエ細胞樹状突起でのCa²⁺動態はきわめて複雑な時間・空間的特性をもっており、細胞内メカニズムを厳密かつ精妙に制御していることを示唆している。本研究は、このシナプス入力により駆動されるCa²⁺動員機構を詳細に解明することを目的とする。さらにCa²⁺放出機構の基盤である小胞体そのもののダイナミクスの解明もあわせて行う。

B.研究方法

1)小脳プルキンエ細胞樹状突起でのシナプス刺激によるCa²⁺放出活性の測定は、マウス小脳より脳切片を作成し、プルキンエ細胞を正立顕微鏡により直視化にてパッチクランプ法を用いて、電気生理学的記録を行い、同時に細胞内にCa²⁺色素を注入し、CCDカメラを用いたCa²⁺イメージング法にてCa²⁺濃度の変化を測定した。
2)神経細胞樹状突起中に存在する高速に移動するERの観察には、初代培養マウス海馬神経細胞に、蛍光タンパク質GFPと融合させたERタンパク質の遺伝子をリン酸カルシウム法を用いて導入し、蛍光顕微鏡を用い細胞が生きた状態でERを観察した。

C.研究結果

1)平行線維入力時のプルキンエ細胞樹状突起のCa²⁺動態における、細胞外からの流入・細胞内放出機構それぞれの関与の度合いを詳細に検討した。50Hz、3-8発の刺激で見られるCa²⁺の流入と細胞内からの放出による二相性のCa²⁺上昇は、刺激回数を増加すると一相性となり、持続時間は刺激回数に比例し、50発刺激ではCa²⁺上昇は6-8秒程度持続し、Ca²⁺濃度は200μMにまで上昇していると推定された。この大きなCa²⁺上昇はほとんどがCa²⁺流入によるものであり、更にNa⁺濃度とCa²⁺濃度変化を比較した結果、P型Caチャンネル

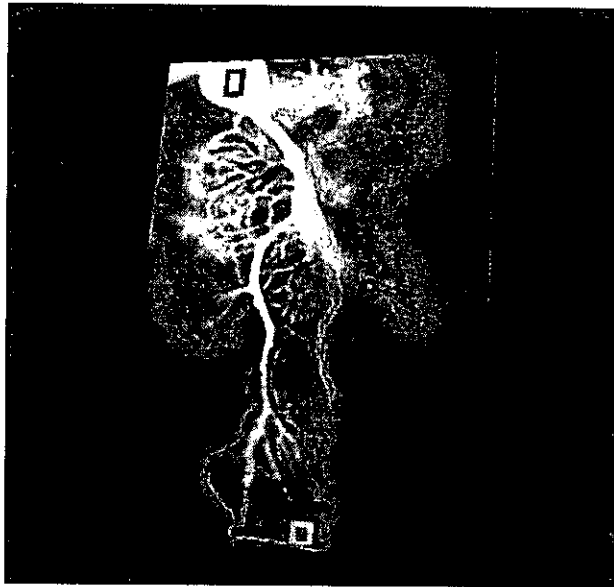


図1: マウス小脳プルキンエ細胞樹状突起中での平行線維刺激による局所的なCa²⁺上昇。(図) 白黒のプルキンエ細胞の蛍光像の上に重ねてCa²⁺濃度を3次元的に表示してある。(グラフ) Ca²⁺濃度及び膜電位の時間的变化。樹状突起(赤: 図中の赤枠に対応)でのみCa²⁺上昇(200mM程度)が見られ、細胞体(紫)では見られなかった。50回の刺激(50Hz)によって脱分極が見られる(黒プロット)。縦線の時点での画像を図に示している。

を通ったCa²⁺がその本態であることを明らかにした(Kuruma et al, 2003)。

さらに、小脳皮質の生後発達に伴うCa²⁺放出活性の変化を検討した。50Hz・数回の平行線維刺激により見られるCa²⁺放出活性の生後発達に伴う変化を調べるため、異なる日齢のマウスを用いて二相性Ca²⁺上昇を観察した。細胞外からのCa²⁺流入による1番目のCa²⁺上昇とCa²⁺放出による2番目のCa²⁺上昇の大きさを比較すると、2〜3週齢のマウスのプルキンエ細胞ではCa²⁺放出が相対的に大きく、4週齢以降では逆にCa²⁺流入の方が大きかった。すなわち平行線維刺激で誘起されるプルキンエ細胞樹状突起のCa²⁺動態は2週前後の幼弱なマウスにおいてはCa²⁺放出がCa²⁺流入よりも支配的であり、成長に伴ってそれが逆転することが示された。

2) 神経細胞樹状突起内での局所的なCa²⁺放

出の基盤であるERそのものも動的に形態を変化させていることが知られている。樹状突起中のERの動態を精密に観察するために、ER局在シグナルKDEL配列をGFPと融合したGFP-KDEL及び、ER膜タンパクSERCAとIP3受容体にそれぞれGFPを融合したGFP-SERCAとGFP-IP3Rは、海馬初代培養細胞樹状突起において網状の局在を示すとともに、径0.5 μm程度の小胞状の分布パターンも示した。様々なオルガネラマーカによる染色やCa²⁺放出能の測定からERであることが証明された後者の小胞状ERは比較的高速(0.2-0.3 μm/sec)に樹状突起状を両方向に移動しており、薬理学的およびオリゴDNAによる阻害実験から、その動きは微小管とモータータンパクキネシンに依存していることを見いだした(Bannai et al, 2004)。

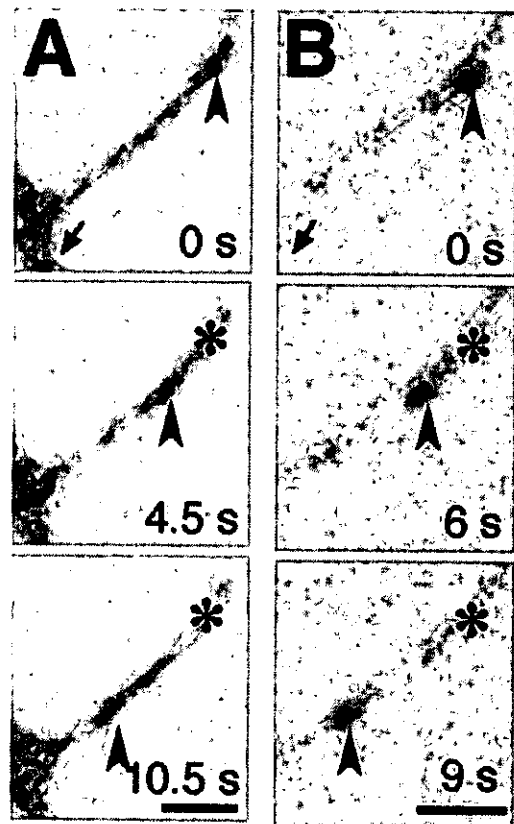


図2: 培養海馬細胞樹状突起中を移動するER小胞。A: GFP-KDEL, B: GFP-SERCA scale: 2 μm

D. 考察

1) 2週齢から4週齢は小脳皮質が発達・成熟を遂げる時期であり、その時期にCa²⁺放出活性が大きく変化をすることは、シナプス結合

の可塑的変化や成熟化にシナプス後部のCa²⁺放出能が関与している可能性を示唆する。

2) よく知られた網状ERとは異なる、神経細胞樹状突起で今回見いだされた移動する小胞状ERは、ERそのものの樹状突起末端部までの急速な供給システムの存在を示唆している。神経細胞樹状突起で必要な局所的Ca²⁺放出能の微妙な調節に一役買っている可能性がある。

E. 結論

神経細胞樹状突起はそれ自体が複雑な構造を持ち、小区画ごとに独立の情報処理をした上で、細胞体に加工した情報を送っている。この局所的な情報処理には、シナプス入力活動に応じてシナプス強度を変化させてゆく可塑性、樹状突起そのものの形態の変化などが含まれるが、こうした現象にERはCa²⁺放出を通じて大きな役割を果たしている。本研究ではCa²⁺放出能そのものが発生過程を通じて制御されていることを明らかにし、また、ERそのものの動的な移動という現象を提唱した。今後ERのCa²⁺放出能及びERの動態を更に詳細に明らかにしてゆくことは、生理的あるいは病理的状态でのER機能を理解・制御するための重要な基盤になると考えている。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kristi A. Kohlmeier, Takafumi Inoue, Christopher S. Leonard. Hypocretin/Orexin peptide signaling in the ascending arousal system: Regulation of intracellular calcium in the dorsal raphe and laterodorsal tegmentum. *Journal of Neurophysiology*, in press.
2. Weihua Cai, Chihiro Hisatsune, Kyoko Nakamura, Takeshi Nakamura, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba. Activity-dependent expression of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 in hippocampal neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, in press.
3. Chihiro Hisatsune, Yukiko Kuroda, Kyoko Nakamura, Takafumi Inoue, Takeshi Nakamura, Takayuki Michikawa, Akihiro Mizutani, Katsuhiko Mikoshiba. Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, in press.
4. Mitsuharu Hattori, Akinobu Z. Suzuki, Takayasu Higo, Hiroshi Miyauchi, Takayuki Michi-

kawa, Takeshi Nakamura, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba. Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca²⁺ signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279:11967-11975.

5. Tomohiro Nakayama, Mitsuharu Hattori, Keiko Uchida, Takeshi Nakamura, Yoko Tateishi, Hiroko Bannai, Miwako Iwai, Takayuki Michikawa, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba. The regulatory domain of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is necessary to keep the channel domain closed: Possible physiological significance of specific cleavage by caspase 3. *Biochemical Journal*, 2004; 377:299-307.
6. Hiroko Bannai, Takafumi Inoue, Tomohiro Nakayama, Mitsuharu Hattori, Katsuhiko Mikoshiba. Kinesin dependent, rapid, bidirectional transport of inositol-1,4,5-trisphosphate receptor containing particles in the dendrite of hippocampal neurons. *Journal of Cell Science*, 2004; 117:163-175.
7. Akinori Kuruma, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba. Dynamics of Ca²⁺ and Na⁺ in the dendrite of mouse cerebellar Purkinje cells evoked by parallel fiber stimulation. *European Journal of Neuroscience*, 2003; 18:2677-2689.
8. Kiyoko Fukami, Manabu Yoshida, Takafumi Inoue, Manabu Kurokawa, Rafael A. Fissore, Nobuaki Yoshida, Katsuhiko Mikoshiba, Tadaomi Takenawa. Phospholipase Cd4 is required for Ca²⁺-mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *The Journal of Cell Biology*, 2003; 161:79-88.
9. Yukinori Minoshima, Toshiyuki Kawashima, Koichi Hirose, Yukio Tonzuka, Aie Kawajiri, Ying Chun Bao, Xingming Deng, Masaaki Tatsuka, Shuh Narumiya, W. Stratford May Jr., Tetsuya Nosaka, Kentaro Semba, Takafumi Inoue, Takaya Satoh, Masaki Inagaki, Toshio Kitamura. Phosphorylation by Aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Developmental Cell*, 2003; 4:549-560.
10. T. Nagase, K-I. Ito, K. Kato, K. Kaneko, K. Kohda, M. Matsumoto, A. Hoshino, T. Inoue, S. Fujii, H. Kato, K. Mikoshiba. Long-term potentiation and long-term depression in hippocampal CA1 neurons of mice lacking the IP3 type 1 receptor. *Neuroscience*, 2003; 117:821-830.
11. Hiroki Yasuda, Hideyoshi Higashi, Yoshihisa Kudo, Takafumi Inoue, Yoshio Hata, Katsuhiko Mikoshiba, Tadaharu Tsumoto. Imaging of calcineurin activated by long-term depression-inducing synaptic inputs in living neurons of rat visual cortex. *European Journal of Neuroscience*, 2003; 17:287-297.

2. 学会発表

P.E. Pomata, T. Inoue, D.J. Calvo, L.D. Pozzo-Miller. Ih blockade increases dendritic calcium transients evoked by backpropagating action potentials. 神経科学学会（米国） 2003

ニューオーリンズ

Katsuhiko Mikoshiba, Kozo Hamada, Hiroko Bannai, Kazumi Fukatsu, Hideaki Ando, Toru Matsu-ura, Keiko Uchida, Takayuki Michikawa, Tomohiro Nakayama, Yoko Tateishi, Songbai Zhang, Akihiro Mizutani, Mitsuharu Hattori, Takafumi Inoue. Molecular imaging of the intracellular signal transduction.

日本神経化学会・日本生物物理学会合同年会, 2003 新潟

坂内博子, 井上貴文, 中山智博, 服部光治, 御子柴克彦.

神経細胞樹状突起におけるvesicle状小胞体の輸送メカニズムと機能の解析.

日本神経化学会・日本生物物理学会合同年会, 2003 新潟

深津和美, 坂内博子, 張松柏, 井上貴文, 御子柴克彦.

細胞骨格によるIP₃受容体の動態の制御機構の解明.

日本神経化学会・日本生物物理学会合同年会, 2003 新潟

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

なし