

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

小胞体環境とオートファジー 経路の解明
分担研究者 内山安男

研究要旨

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。

A. 研究目的

私達は、砂ネズミ一過性前脳虚血モデルにみられる海馬CA1錐体細胞の遅発型神経細胞死の過程で、オートファジー小体が形成されると共にリソソームカテプシン群の発現も上昇することを報告した。オートファジーは、細胞が自らの構成成分を小胞体様構造で囲い込みリソソーム酵素により分解する現象であり、正常の細胞では代謝の恒常性維持に必須の現象である。そして細胞死の過程で見られるオートファジーの亢進に基づくリソソームの活性化は、細胞の生存を維持するために必要なアミノ酸の供給源として機能することが推測されている。実際、神経細胞の分化モデルとして広く用いられているラット副腎褐色細胞腫由来のPC12細胞を血清非存在下で培養すると、細胞死に至るごく初期の過程からオートファジーが誘導され、このオートファジーを3-メチルアデニンで抑制すると細胞死も抑制される。この過程を詳細に検討すると、時間経過に伴いカテプシンBは減少しカテプシンDは次第に増加することに加え、これらの酵素が細胞死の抑制因子および惹起因子として働くことも明らかにされてきた。

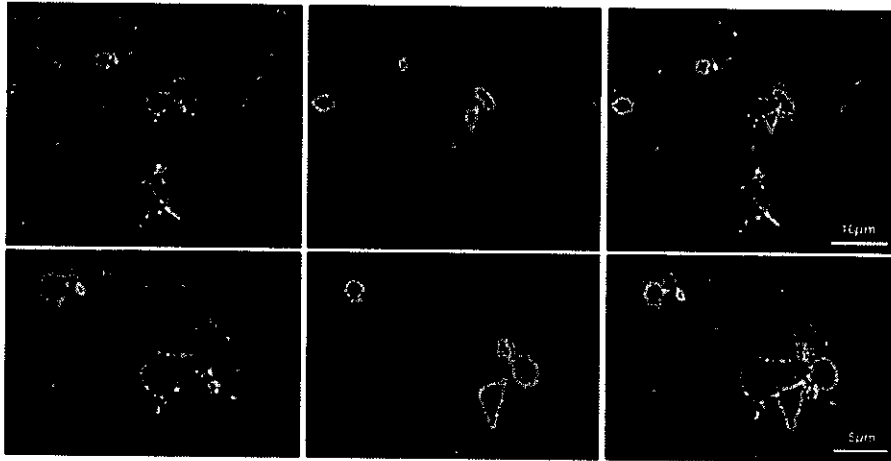
私達は、カテプシンDを欠損するマウスを解析して、同マウスは失明とけいれん発作を伴い、病理学的には、神経細胞にリソソームが蓄積することを見いだした。さらに、同リ

ソソームにはミトコンドリアのATP synthaseのサブユニットcが蓄積し、自家蛍光を発することが分かり、神経性セロイドリポフスチン蓄積症(NCL)に類似することを明らかにした。同マウスは、生後26日位で消化管(小腸)の壊死あるいはけいれん発作に伴う呼吸停止により死に至る。しかし、生後2週までは全く症状もなく、同腹の野生型あるいはヘテロマウスと同様に正常である。

本研究では、一過性脳虚血後の海馬CA1錐体細胞の遅延型神経細胞にオートファジーやリソソームカテプシン群がいかに関与するかを、同カテプシンD欠損マウスを用いて解析した。

B. 研究方法

生後1週齢のカテプシンD欠損マウス(CD^{-/-})、同腹のヘテロ(CD^{+/-})および野生型マウス(CD^{+/+})を用いて、低酸素-脳虚血(H-I)負荷をかけ、その後の海馬CA1領域の錐体細胞の変化を観察した。これらマウスの片側総頸動脈を結紮し、1時間放置後37度Cに保温した容器(酸素濃度8%、窒素濃度92%に調節)に同マウスを35分から40分放置し、経時的にこれらマウスを灌流固定した後、海馬領域を含む脳を取り出し、パラフィンに包埋し、連続切片を作製した。同切片を用いて、TUNEL染色とLC3(オートファジー



図：海馬CA1錐体細胞でTUNEL陽性の細胞は、LC3陽性の顆粒を有することが分かった。さらに、カテプシンDを欠損するマウスでは、多くの場合（80%）CA1領域の錐体細胞は全く細胞死に陥らないことも明らかになった。

のマーカートンパク質)抗体による2重染色を行った。

C. 研究結果

野生型マウスを用いて、海馬CA1領域における錐体細胞の生死をTUNEL染色で検討した。その結果、同領域の錐体細胞が細胞死に陥る場合、虚血負荷後3日以内にTUNEL陽性になることが分かった。そこで生後3日の時点で、同領域の錐体細胞でTUNEL陽性となる細胞における、LC3の染色性を検討した。図に示す如く、海馬CA1錐体細胞でTUNEL陽性の細胞は、LC3陽性の顆粒を有することが分かった。さらに、カテプシンDを欠損するマウスでは、多くの場合（80%）CA1領域の錐体細胞は全く細胞死に陥らないことも明らかになった。

D. 考察

脳虚血による神経細胞死の発生機構については、これまでの研究からカスパーゼ依存性のアポトーシスであるとする説が大半を占めてきた。その中には、単に虚血負荷後のカスパーゼの活性化を示すのみでなく、カスパーゼの阻害剤を用いた実験や、カスパーゼの下流に存在するCAD (caspase-activated deoxyribonuclease)の関与を示す報告もある。一方、最近では電子顕微鏡等の形態観察から、アポトーシスでもネクローシスでもない、新しいタイプの細胞死を提唱する報告もなされている。

本研究においてCD-/-マウスを用いたH-I負荷実験では、CA1錐体細胞の死が野生型に比べて有意に抑制された。また、死に行く細胞の細胞質にはLC3陽性の顆粒が出現することも明らかとなった。結果には記載しなかった

が、H-I負荷後のカスパーゼ3の活性を調べたところ、負荷後6時間でピークとなり、24時間後には対照群と差がなくなることが分かった。また、活性型カスパーゼ3の染色を施行しても、その陽性反応はTUNEL陽性の錐体細胞とはほとんど一致しないことが分かった。

本研究の結果は、H-I脳障害後の海馬CA1錐体細胞に起こる遅延型神経細胞死はカスパーゼ非依存性で、オートファジーとその下流で働くリソソームカテプシンDに深く関与することを示している。

E. 結論

一過性脳虚血後の海馬CA1錐体領域に見られる遅延型神経細胞死において、オートファジーとリソソームカテプシン群の役割を検討した。その結果、同遅延型神経細胞死には、オートファジーとその下流でリソソームカテプシンDが関与することが明らかとなった。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Nagata, S. (in press) Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in germinal centers of MGM-E8-deficient mice. *Science*
2. Yoshizaki, T., Inaji, M., Kouike, H., Shimazaki, T., Sawamoto, K., Ando, K., Date, I., Kobayashi, K., Suhara, T., Uchiyama, Y., Okano, H. (in press) Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells. *Neurosci. Lett.*
3. Shiba, T., Shiba, Kametaka, S., Kawasaki, M.,

- Shibata, M., Waguri, S., Uchiyama, Y., Wakatsuki, S. (in press) Insights into the phosphoregulation of γ -secretase sorting signal by the VHS domain of GGA1. *Traffic*
4. Ezaki J, Takeda-Ezaki M, Koike M, Ohsawa Y, Taka H, Mineki R, Murayama K, Uchiyama Y, Ueno T, Kominami E (2003) Characterization of Cln3p, the gene product responsible for juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, as a lysosomal integral membrane glycoprotein. *J Neurochem.* 87:1296-1308
 5. Mala V. Rao, Jabbar Campbell, Aidong Yuan, Asok Kumar, Takahiro Gotow, Yasuo Uchiyama, Ralph A. Nixon (2003) The Neurofilament middle molecular weight subunit carboxyl terminal tail domains are essential for the radial growth and cytoskeletal architecture of the axon but not for the regulation of rate of neurofilament transport. *J. Cell Biol.* 163: 1021-1031
 6. Garcia, M.L., C. S. Lobsiger, S. B. Shah, T. J. Deerinck, J. Crum, D. Young, C. M. Ward, T. O. Crawford, T. Gotow, Y. Uchiyama, M. H. Ellisman, N. A. Calcutt, D. W. Cleveland (2003) NF-M is an essential target for the myelin-directed "outside in" signaling cascade that mediates radial axonal growth. *J Cell Biol.* 163: 1011-1020
 7. 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.
 8. Wakasugi M., Waguri S., Kametaka S., Tomiyama, Y., Kanamori, S., Shiba, Y., Nakayama, K., Uchiyama, Y. (2003) Predominant expression of the short form of GGA3 in human cell lines and tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 687-692
 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. Koike, M., Shibata, M., Ohsawa, Y., Nakanishi, H., Koga, T., Kametaka, S., Waguri, S., Momoi, T., Kominami, E., Peters, C., Figura, K. von, Saftig, S., Uchiyama, Y. (2003) Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. *Mol. Cell. Neurosci.* 14:142-155
 11. Zhang, G., Ohsawa, Y., Kametaka, S., Shibata, M., Waguri, S., Uchiyama, Y. (2003) Regulation of FLRG expression in rat primary astroglial cells and injured brain tissue by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). *J. Neurosci. Res.* 72: 33-45
 12. Kawane, K., Fukuyama, H., Yoshida, H., Nagase H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Nagaya, S. (2003) Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nat Immunol* 4:138-144
 13. Sakakibara, S., Nakamura, Y., Yoshida, T., Shibata, S., Koike, M., Takano, H., Ueda, S., Uchiyama, Y., Noda, T., Okano, H. (2003) RNA-binding protein Musashi family: Roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:15194-15199
 14. Waguri, S., Dewitte, F., Borgne, R., Rouille, Y., Uchiyama, Y., Dubremetz, J.F., Hoflack, B. (2003) Visualization of TGN to endosomes trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. *Mol. Biol. Cell* 14: 142-155
2. 学会発表
1. Koike, M., Shibata, M., Waguri, S., Peters, C., von Figura, K., Saftig, P., Uchiyama, Y. Cathepsin D Deficiency Induces Autophagy in Neurons of Mouse Brain. Program No. 529.17. Society for Neuroscience, 2003
 2. Shibata, M., Koike, M., Waguri, S., Gotow, T., Uchiyama, Y. Involvement of Autophagy in PC12 Cell Death Following Serum Deprivation. Program No. 304.2. Society for Neuroscience, 2003
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
該当なし

研究成果の刊行

発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
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	48	37-42	2004
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	印刷中	印刷中	2004
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.	24	1486-1496	2004
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.	22	979-987	2002
Tetsumori Yamashima	Ca ²⁺ -dependent proteases in ischemic neuronal death- A conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates -	Cell Calcium	印刷中	印刷中	2004
Tetsumori Yamashima et al.,	Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia.	Hippocampus	印刷中	印刷中	2004
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
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.	Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens.	Nature	424	1071-1074	2003
Kametaka S, Shibata M, Moroe K, Kanamori S, Ohsawa Y, Waguri S, Sims PJ, Emoto K, Umeda M, Uchiyama Y.	Identification of phospholipid scramblase 1 as a novel interacting molecule with beta -secretase (beta-site amyloid precursor protein (APP) processing enzyme (BACE)).	J Biol Chem.	278	15239-15245	2003
Mitsuharu Hattori, Akinobu Z. Suzuki, Takayasu Higo, Hiroshi Miyachi, Takayuki Michikawa, Takeshi Nakamura, Takafumi Inoue, Katsuhiko Mikoshiba.	Distinct roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor types 1 and 3 in Ca ²⁺ signaling.	The Journal of Biological Chemistry	279	11967-11975	2004
Kiyoko Fukami, Manabu Yoshida, Takafumi Inoue, Manabu Kurokawa, Rafael A. Fissore, Nobuaki Yoshida, Katsuhiko Mikoshiba, Tadaomi Takenawa.	Phospholipase C-4 is required for Ca ²⁺ -mobilization essential for acrosome reaction in sperm.	The Journal of Cell Biology	161	79-88	2004

20030717

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。