

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohmae S, Uematsu A & Tanaka M : Temporally specific sensory signals for the detection of stimulus omission in the primate deep cerebellar nuclei . Journal of Neuroscience 2013; 33:15432-15441
- 2) 田中真樹、國松 淳、大前彰吾: 時間の測り方 一脳による時間の符号化. 脳と神経(Brain and Nerve) 2013; 65: 941-948

2. 学会発表

- 1) 田中真樹: 小脳の時間表現. 東京医科歯科大学 2013年9月27日, 東京
- 2) Tanaka M: Role of the cerebellum in temporal prediction. CiNet seminar, 2013年10月15日, 吹田
- 3) Tanaka M: Neural basis of temporal processing: a role of the cerebellum. 第91回日本生理学会シンポジウム, 2014年3月17日, 鹿児島
- 4) 吉田篤司, 田中真樹: 即時的な行動選択に関わる淡蒼球外節の神経活動. 第36回日本神経科学大会, 2013年6月20日, 京都
- 5) 松嶋藻乃, 伊藤さやか, 吉田篤司, Kurkin Sergey, 矢部一郎, 佐々木秀直, 田中真樹: 知覚的予測における小脳の役割. 第36回日本神経科学大会, 2013年6月20日, 京都
- 6) 國松 淳, 大前彰吾, 田中真樹: 基底

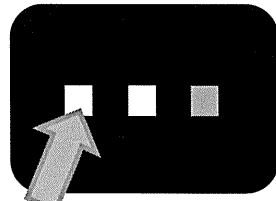
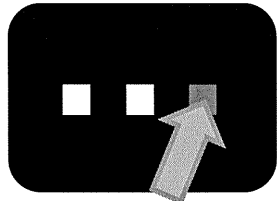
核および小脳における時間情報の神経表現. 2013年6月22日, 京都

- 7) 鈴木智貴, 國松 淳, 田中真樹: 一定の時間経過を報告する際の線条体ニューロンの活動. 平成25年度包括脳ネットワーク夏のワークショップポスター発表, 2013年8月31日, 名古屋
- 8) 國松 淳、大前彰吾、鈴木智貴、田中真樹: 時間再現における基底核と小脳の役割の比較. 第7回 Motor control 研究会, 2013年9月6日, 東京
- 9) 松嶋藻乃, 田中真樹: 複数の物体に対する注意の配分—サル前頭前野の神経活動による検討. 日本生理学会北海道地方会, 2013年9月7日, 旭川
- 10) Matsuyama K, Kunimatsu J & Tanaka M : Predictive activity in the primate motor thalamus during the missing oddball task. International Symposium on Prediction and Decision Making, 2013年10月14日, 京都
- 11) Matsushima A & Tanaka M : Distinct neuronal mechanisms for remembering multiple locations within vs. across visual hemifields. SfN2013, 2013年11月10日, San Diego
- 12) Kunimatsu J & Tanaka M : The basal ganglia indirect pathway plays a role in temporal processing. SfN2013, 2013年11月11日, San Diego
- 13) Yoshida A & Tanaka M : Differential roles of two type neurons in the primate globus pallidus external segment. SfN2013, 2013年11月11

日, San Diego

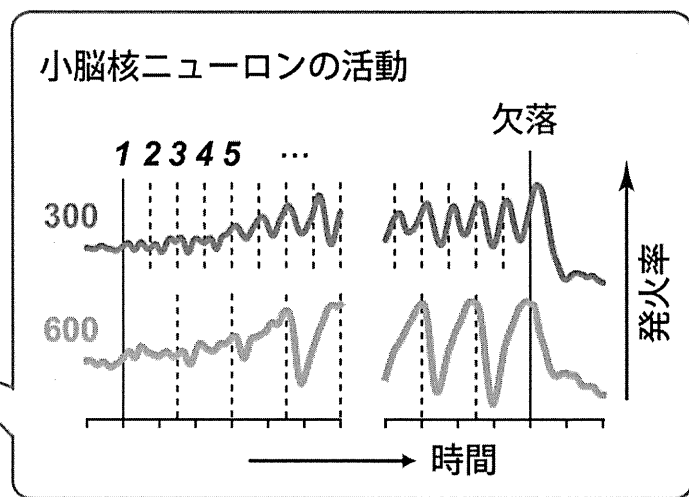
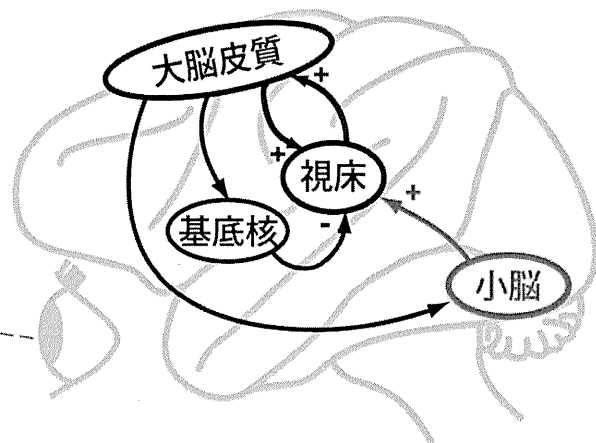
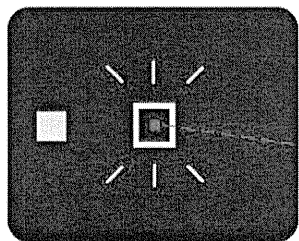
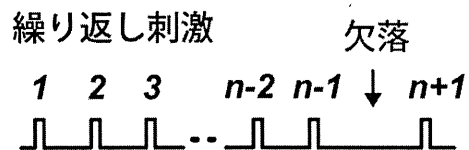
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし



Congruent条件

Incongruent条件



厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究班 分担研究報告

多系統萎縮症における tubulin polymerization promoting protein (TPPP/p25 α)の細胞内局在変化

研究分担者 水澤英洋（東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)）
共同研究者 石川欽也（東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)）
太田浄文（東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)）
尾崎 心（東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)）
他田真理（新潟大学脳研究所病態神経科学部門病理学）
柿田明美（新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学）
高橋 均（新潟大学脳研究所病態神経科学部門病理学）

研究要旨

多系統萎縮症(MSA)でのオリゴデンドログリア変性過程において、tubulin polymerization promoting protein (TPPP)は α シヌクレインに先行して細胞質へ集積し、 α シヌクレイン凝集を誘導する可能性のある重要なタンパク質として注目されている。本研究においてTPPPは正常では細胞質のみならず核とミトコンドリアに豊富に存在していることを示した。一方、MSA患者脳ではTPPPは α シヌクレイン沈着に先行して核から細胞質へ移行・集積しており、TPPPの核から細胞質への移行はオリゴデンドログリア変性の最早期現象の一つであると考えた。TPPPが核から細胞質へ移行する時期に一致して、ミトコンドリア蛋白およびミトコンドリア分裂を促進するDRP1は細胞質に集積、発現亢進することを見出した。本研究で、MSAでの細胞変性の比較的早期にTPPPの細胞内局在変化とミトコンドリア機能異常が起きる可能性を見出した。

A. 研究目的

多系統萎縮症(MSA)の分子病態には不明な点が多い。P25 α / tubulin polymerization promoting protein (TPPP)は、oligodendroglia (ODG)に特異的に発現する蛋白で、正常ODGの細胞体とミエリンに局在し、ODG突起末端部でミエリン合成やチュブリンの重合に関わるとされている。少数の報告ではあるが核内にもTPPPが存在する可能性も述べられ

ている。近年、MSAにおいてTPPPは病理学的に α シヌクレインの沈着に先行して細胞体へ集積するとの報告や、ODG系培養細胞のTPPP過剰発現が α シヌクレインの培養細胞へ取り込みを促進するとの報告があり、TPPPはMSAの病態において重要なタンパクであると認識されている。本研究の目的は、正常脳ODGでのTPPP細胞内局在を確認し、MSAにおけるODGのTPPP局在変化を明らかにすることである。本

研究では TPHP の局在変化とミトコンドリア異常についても検討した。

B. 研究方法

独自に TPHP の異なるエピトープを認識する抗体 2 種類を作製した。免疫組織化学、蛍光 2 重免疫染色に加えて免疫電顕、オルガネラ分画を使用した western blotting 法にて正常脳白質での TPHP の細胞内局在を検討した。さらに MSA 患者とコントロール患者脳を用いてリン酸化 α シヌクレイン抗体と TPHP 抗体との蛍光 2 重染色にて TPHP の局在変化について検討した。MSA におけるミトコンドリア異常について検討するために TOM20、DRP1 抗体を用いて蛍光染色を行った。

(倫理面への配慮)

公表された患者剖検脳を用いた染色結果には本人を特定できる情報はない。

C. 研究結果

コントロール患者脳では、免疫組織化学と蛍光 2 重免疫染色にて中枢神経系の白質がび漫性に強く染色され、ミエリンの染色パターンと一致した。TPHP は細胞質のみならず、核質および核膜周囲にも免疫反応が強く認められた。免疫電顕では細胞質、核質に加えてミトコンドリア外膜への金コロイドの沈着を確認した。細胞分画を用いた western blotting でも細胞質、核、ミトコンドリアでの TPHP 局在を確認した。MSA では白質変性に合致してミエリンの TPHP の染色性が極端に低下していた。MSA 患者脳を用いた蛍光 2 重染色では α シヌクレイン陽性の GCI を形成する ODG と、GCI が明確でない ODG を計測

し比較したところ、GCI 陽性 ODG では、統計的に有意に核内 TPHP が消失していた (19.6 ± 10.9 vs 48.63 ± 10.37 %, $p < 0.05$)。MSA で α -synuclein 陽性の GCI を持たない ODG とコントロール患者脳の ODG の核内 TPHP 陽性率を比較すると MSA 患者で有意に核内 TPHP の減少を認めた (48.63 ± 10.37 % vs 62.4 ± 13.5 %, $p < 0.05$)。MSA では α シヌクレインの沈着よりも早期に核内 TPHP が減少していることが推測された。ミトコンドリア関連蛋白 (TOM20、DRP1)、TPHP 抗体、リン酸化 α シヌクレインを用いた蛍光 3 重免疫染色では TPHP の GCI 内凝集に一致してミトコンドリア蛋白とミトコンドリア fission に機能する DRP1 の発現亢進を認め、それらの異常は α シヌクレイン沈着前より始まり、ODG 細胞死終末像まで継続して観察された。

D. 考察

ODG は本来、 α シヌクレインを発現しておらず、なぜ MSA の ODG に α シヌクレインが凝集するかは不明であったが、TPHP の細胞体への集積が α シヌクレインの神経細胞から ODG への移行を誘導するという仮説が提唱されている。

本研究の結果からは TPHP の核内から細胞体への移行は α シヌクレイン沈着に先行する現象であり仮説を支持するものであった。本邦より孤発性、家族性 MSA でユビキノン合成酵素の一つである COQ2 の変異が報告され、MSA におけるミトコンドリア機能異常が示された。本研究で認めた、ミトコンドリア膜蛋白と DRP1 の発現亢進は、TPHP 局在変化と共に早期の現象

の一つであり、MSAにおけるミトコンドリア機能異常の病理学的な特徴であると思われた。

E. 結論

TPPP は ODG 特異的蛋白であり細胞質だけではなく核とミトコンドリアにも豊富に存在する。MSA 脳では変性早期から核内 TPPP は減少し、細胞体へ移行しミトコンドリア機能異常にも関わる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Niimi Y, Takahashi M, Sugawara E, Umeda S, Obayashi M, Sato N, Ishiguro T, Higashi M, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K: Abnormal RNA structures (RNA foci) containing a penta-nucleotide repeat (UGGAA)_n in the Purkinje cell nucleus is associated with spinocerebellar ataxia type 31 pathogenesis. *Neuropathology* 2013; 33: 600-611
- 2) Takahashi M, Obayashi M, Ishiguro T, Sato N, Niimi Y, Ozaki K, Mogushi K, Mahmut Y, Tanaka H, Tsuruta F, Dolmetsch R, Yamada M, Takahashi H, Kato T, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H, Ishikawa K: Cytoplasmic location of α 1A voltage-gated calcium channel C-terminal fragment (Ca_v2.1-CTF) aggregate is sufficient to cause cell death. *PLoS ONE* 2013; 8(3):

e50121

2. 学会発表

- 1) 太田浄文、石川欽也、大林正人、尾崎心、柿田明美、高橋均、水澤英洋: Glial cytoplasmic inclusion を形成する多系統萎縮症の oligodendroglia では、チュブリン重合促進蛋白 TPPP が核から消失する。第 54 回日本神経学会学術大会, 2013 年 5 月 30 日, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

平成 25 年 8 月 30 日 出願（拡大申請）

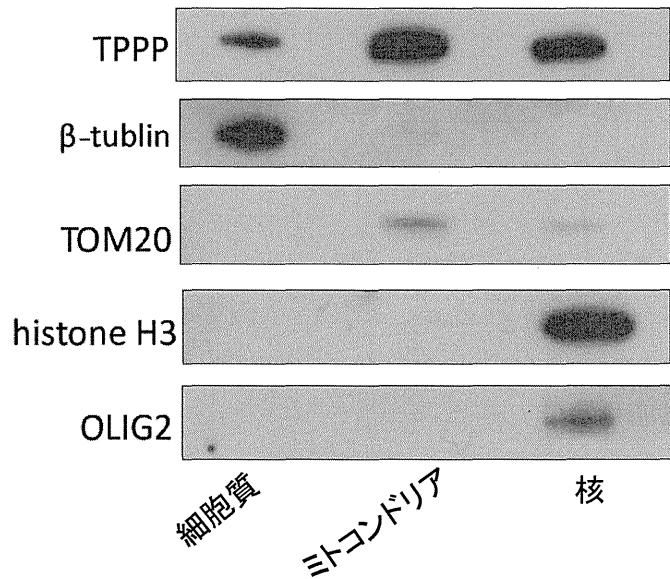
2. 実用新案登録

なし

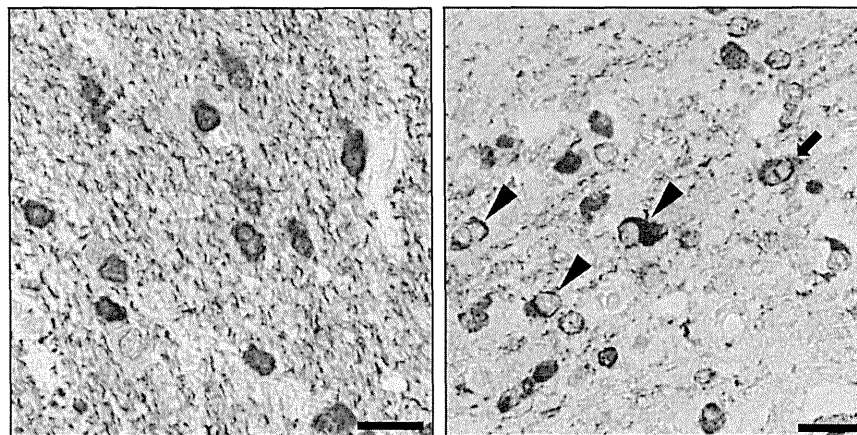
3. その他

なし

TPPPは細胞質、核、ミトコンドリアに局在する

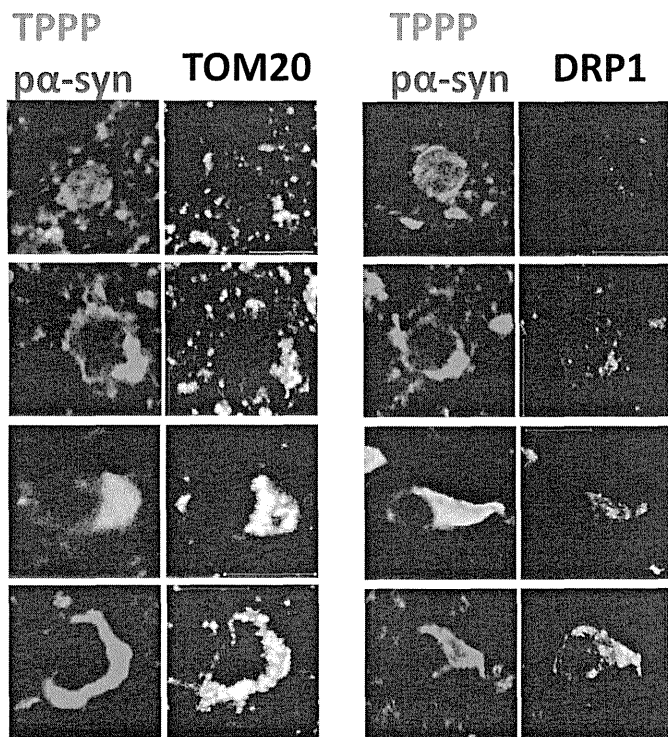


MSAでGCI、GNIを形成するODGでは核内からTPPPが抜ける



control

MSA



オリゴデンドログリア変性過程

<細胞変性前> 核内にTPPPあり

<細胞変性早期> αシヌクレイン沈着前、核から細胞質へTPPP移行、ミトコンドリア蛋白集積

<細胞変性中期> αシヌクレイン沈着、GCI形成

<細胞変性後期> GCIからTPPP消失

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究班 分担研究報告

小胞輸送系 ESCRT 障害と脳内異常蛋白蓄積・神経変性の関連

研究分担者 武田 篤

（東北大学大学院医学系研究科 神経・感覚器病態学講座神経内科学分野／
国立病院機構 仙台西多賀病院神経内科）

共同研究者 長谷川 隆文、大嶋 龍司、菅野 直人、今野 昌俊、三浦 永美子、
菊池 昭夫、青木 正志

（東北大学大学院医学系研究科 神経・感覚器病態学講座神経内科学分野）
田中 伸幸（宮城県立がんセンター研究所 がん先進治療開発研究部）
小林 和人（福島県立医科大学 生体機能研究部門）

研究要旨

神経変性疾患において、細胞内外に蓄積する異常蛋白質蓄積には蛋白分解・除去過程の異常が深く関与している。一方、細胞内にはユビキチン化蛋白を識別し輸送する小胞輸送システムがあり、そのマスターレギュレーターとして ESCRT 複合体（Endosomal Sorting Complex Required for Transport）が知られている。ESCRT はエンドソームの成熟に重要な役割を持っていることが知られていたが、近年我々を含めた複数グループの研究により、ESCRT がリソソーム-オートファジー系の制御を介し異常凝集蛋白の分解処理に積極的に関与していることが明らかとなってきた。本研究では、ESCRT 障害による脳内オートファジー・蛋白質分解系の破綻が、神経変性疾患異常蛋白蓄積および神経変性疾患を誘導するかについて、前脳特異的 ESCRT コンディショナルノックアウトモデルマウスを用い検証した。

A. 研究目的

本研究では ESCRT 複合体が制御している脳内オートファジー・蛋白質分解系の破綻が、如何なる機序により異常タンパク蓄積と神経細胞死を惹起するかについて、新たに作成した神経組織特異的 ESCRT-0/Hrs 欠損モデルマウスおよび培養細胞モデルを用い、行動解析、病理組織学的・生化学的手法による多角的検討を行った。

B. 研究方法

CaMKII-Cre マウス（御子柴克彦博士より供与）を用い前脳特異的に ESCRT 複合体の最上流分子（ESCRT-0/Hrs）を欠損させたマウス（Hrsflox/flox; CaMKII-Cre）を作製した。同マウスを用い、経時的に運動機能障害を観察すると共に、神経細胞脱落の有無・凝集蛋白蓄積の確認、酸化ストレスマーカー・ストレスキナーゼなどの細胞障害因子の発現変化、マイト

ファジー異常の有無などについて病理組織学的・生化学的手法による解析を行った。なお遺伝子組み換え実験および動物実験については「東北大学組換えDNA安全委員会」および「東北大学における動物実験等に関する規定委員会」の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

前脳特異的 ESCRT-0/Hrs コンディショナルノックアウトマウスでは加齢に伴う体重減少と運動障害が誘発され、全例が生後 8 週間以内に死亡した。ノックアウトマウス脳内において海馬 CA3・CA1 および大脳皮質を中心に、著明な神経細胞脱落と残存神経細胞内の K48-・K63-ユビキチン化タンパク、選択的マクロオートファジーの基質である p62/SQSTM1、 α -synuclein 陽性の凝集蛋白蓄積が確認され、リソソーム-オートファジー系の障害が示唆された。脳組織を用いたウェスタンブロット解析ではノックアウトマウス群において Triton X-100 不溶性・urea 可溶性画分を中心に α -synuclein オリゴマー、PHF-Tau、Huntingtin、および TDP-43 蛋白の蓄積・増加、ならびに VDAC、TIMM44、Tom20 といったミトコンドリア構成蛋白の増加が認められた。さらに ESCRT-0/Hrs ノックアウトマウス脳組織では酸化ストレスマーカー (8-OHdG) 蓄積とストレスキナーゼ活性化が生じていた。

D. 考察

これまでの研究の積み重ねにより、神経変性疾患において細胞内外に蓄積する異常凝集蛋白は酸化ストレス、ER ストレ

ス、ミトコンドリア障害などを惹起し神経細胞の変性・脱落を引き起こす重要な因子となることが明らかとなっている。これらの異常蛋白の多くはユビキチン化修飾を受けており、その蓄積には蛋白分解・除去過程の異常が深く関与している。真核細胞の蛋白分解経路には大別してユビキチン-プロテアソーム系と (マクロ) オートファジー-リソソーム系の 2 つの経路が存在するが、凝集した大型の蛋白の分解は主に後者であるオートファジー-リソソーム系が担うと考えられている。細胞内では ESCRT 系が正常に機能することで初期エンドソームから後期エンドソーム・リソソームへの成熟が進み、エンドソーム内腔の pH 低下と各種プロテアーゼの活性化がおこることが知られている。従って ESCRT 機能が障害された場合、オートファゴソームと後期エンドソーム・リソソームの癒合過程が停滞し、オートファジー系を介した凝集蛋白のクリアランスが著しく障害を受けることが予想される。実際、FTD-ALS 原因遺伝子である ESCRT-III/CHMP2B ノックアウト細胞では、オートファゴソームからオートリソソームへの成熟阻害が生じることが判明している。また我々を含めた複数の研究により、異常伸長 polyQ をもつ Huntingtin 分子、TDP-43、 α -synuclein などの変性疾患関連蛋白の分解に ESCRT 複合体が関与していること、 α -synuclein を主要構成成分とするパーキンソン病脳内 Lewy 小体中に ESCRT 分子 (VPS4、CHMP2B) が存在することも明らかになっている。

今回作製した ESCRT-0/Hrs の前脳特異

的ノックダウンマウスにおいて、神経細胞内の K48-・K63-ユビキチン化タンパク、選択的マクロオートファジー基質である p62/SQSTM1、 α -synuclein 陽性の凝集蛋白蓄積が生じると共に顕著な神経細胞脱落が観察されたことから、ESCRT 系が制御するオートファジー・蛋白質分解系の破綻が、異常タンパク蓄積性神経変性疾患の病態に深く関与している可能性を示唆する証拠といえる。同マウス脳内では酸化ストレス増加や p38 ストレスキナーゼ活性化、ミトファジー異常などが確認されているが、今後さらなる詳細な解析により細胞死発現に至る分子機構を明らかにしたいと考えている。併せて、ストレス応答・防御系として近年注目を集めている Keap1-Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2)系に着目し、Hrsflox/flox; CaMKII-Cre マウスあるいは Hrs flox/flox; DAT-Cre マウスと Nrf2 の恒常的活性化により各種ストレスに耐性を示す Keap1 ノックアウトマウスを交配し、表現型レスキューを試みる実験や、新規パーキンソン病 (PD) モデルマウスとしてドパミントランスポーター (DAT) -Cre マウスを用い、ドパミン神経特異的に ESCRT-0/Hrs を欠損するマウス (Hrs flox/flox; DAT-Cre マウス) を用いた病理・生化学的解析を予定している。

E. 結論

ESCRT 系は神経細胞において α SYN を含めた異常凝集蛋白のオートファジー-リソソーム分解を制御しており、その機能破綻は細胞毒性を有する凝集蛋白蓄積・神経変性過程と密接に関与する可能性が

示された。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hasegawa T, et al: Pathogenesis of Multiple system atrophy. *Neurol Clin Neurosci* 2013;1(6):189-194
- 2) Kikuchi A, et al: Hypometabolism in the supplementary and anterior cingulate cortices is related to dysphagia in Parkinson's disease: a cross-sectional and 3-year longitudinal cohort study. *BMJ Open* 2013;3:e002249
- 3) 菊池昭夫, 武田 篤: MSA の臨床症候パーキンソニズム、特集: 多系統萎縮症 (MSA) のすべて. *クリニカルニューロサイエンス* 2013;31:301-4
- 4) Konno M, et al: Suppression of dynamin GTPase decreases alpha-synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy. *Mol Neurodegener* 2012;7(1):38

2. 学会発表

- 1) Hasegawa T: Regulation of α -synuclein internalization and secretion: what do we know, and where are we headed? 7th International Conference on alpha-Synuclein in Parkinson's

- Disease and Related Neurodegenerative Diseases: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. (March 2, 2013, Dubai, UAE ; 招待講演)
- 2) Hasegawa T: Molecular mechanisms of cell-to-cell transmission of protein misfolding in synucleinopathy. Hertie-Institute for Clinical Brain Research, Research Seminar, (March 5, 2013, Tübingen, Germany ; 招待講演)
 - 3) Hasegawa T, et al: RNAi-mediated knockdown of *VPS35* impairs α -synuclein degradation by inhibiting the maturation of cathepsin D. The 11th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Disease. (March 6-10, Florence, Italy)
 - 4) Hasegawa T: Recent progress in multiple system atrophy- "Pathogenesis of multiple system atrophy." 54th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, (May 29, 2013, Tokyo, Japan ; 招待講演)
 - 5) Hasegawa T, et al: RNAi-mediated silencing of *VPS35* exacerbates phenotypic and locomotor abnormalities in α -synuclein transgenic *Drosophila*. The 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. (Jun 17, Sydney, Australia)
 - 6) Miura E, et al: Retromer disruption induces α -synuclein accumulation via improper maturation of cathepsin D. The 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. (June 17, Sydney, Australia)
 - 7) Sugeno N, et al: The E3 ligase Nedd4 facilitates the endosomal targeting of extracellular alpha-synuclein. Neuroscience 2013 Annual Meeting (Nov 13, San Diego, USA)
 - 8) Hasegawa T, et al: RNAi-mediated knockdown of *VPS35* impairs α -synuclein degradation by inhibiting the maturation of cathepsin D. XX World Congress on Parkinson's Disease and related Disorders. (Dec 8-11, Geneva, Switzerland)
 - 9) 三浦永美子ほか: レトロマー障害はカテプシンD成熟障害を介し α シヌクレイン蓄積を誘導する 第54回日本神経学会学術大会 (2013年5月29日東京)
 - 10) 今野昌俊ほか: ショウジョウバエモデルを用いたVPS35遺伝子異常によるパーキンソン病発症機構の解析 第54回日本神経学会学術大会 (2013年5月29日東京)
 - 11) 菅野直人ほか: Nedd4は α シヌクレインのエンドソームへのターゲッティングに重要である. 第54回日本神経学会学術大会 (2013年5月29日東京)
 - 12) 長谷川隆文ほか: DNAJC6 遺伝子異常によるパーキンソン病発症機序解析.

第 54 回日本神経学会学術大会 (2013 年 5 月 30 日東京)

- 13) Hasegawa T, et al: RNAi-mediated knockdown of *VPS35* impairs α -synuclein degradation by inhibiting the maturation of cathepsin D. 第 86 回日本生化学会大会 (9 月 11 日横浜)
- 14) Sugeno N, et al: E3 ユビキチンリガーゼ Nedd4 は α シヌクレインの endosome への targeting に重要である. 第 86 回日本生化学会大会 (9 月 11 日横浜)
- 15) 大嶋龍司ほか: α -synuclein 蓄積・神経変性における ESCRT 機能異常の関与. 第 7 回パーキンソン病・運動障害疾患カンファレンス (2013 年 10 月 11 日東京)
- 16) 今野昌俊ほか: ショウジョウバエモデルを用いた *VPS35* 遺伝子異常によるパーキンソン病発症機構の解析. 第 7 回パーキンソン病・運動障害疾患カンファレンス (2013 年 10 月 11 日東京)
- 17) 三浦永美子ほか: レトロマー障害はカテプシン D 成熟障害を介し α シヌクレイン蓄積を誘導する. 第 7 回パーキンソン病・運動障害疾患カンファレンス (2013 年 10 月 11 日東京)
- 18) 菅野直人ほか: E3 ユビキチンライゲース Nedd4 は細胞外 α シヌクレインのエンドソームへのターゲティングを制御する. 第 7 回パーキンソン病・運動障害疾患カンファレンス (2013 年 10 月 11 日東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当事項なし

図1

ESCRT破綻はオートファジー障害を誘導する

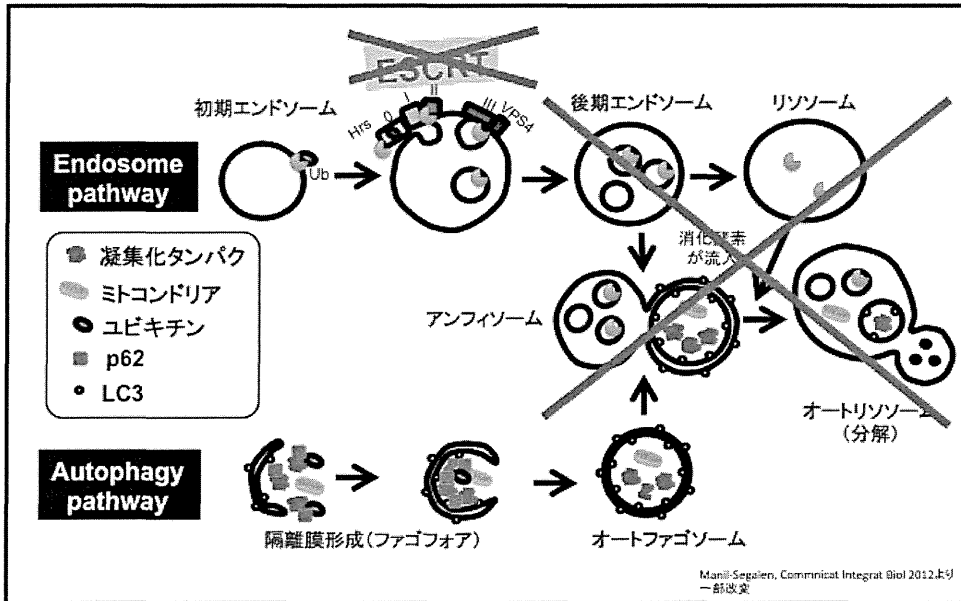
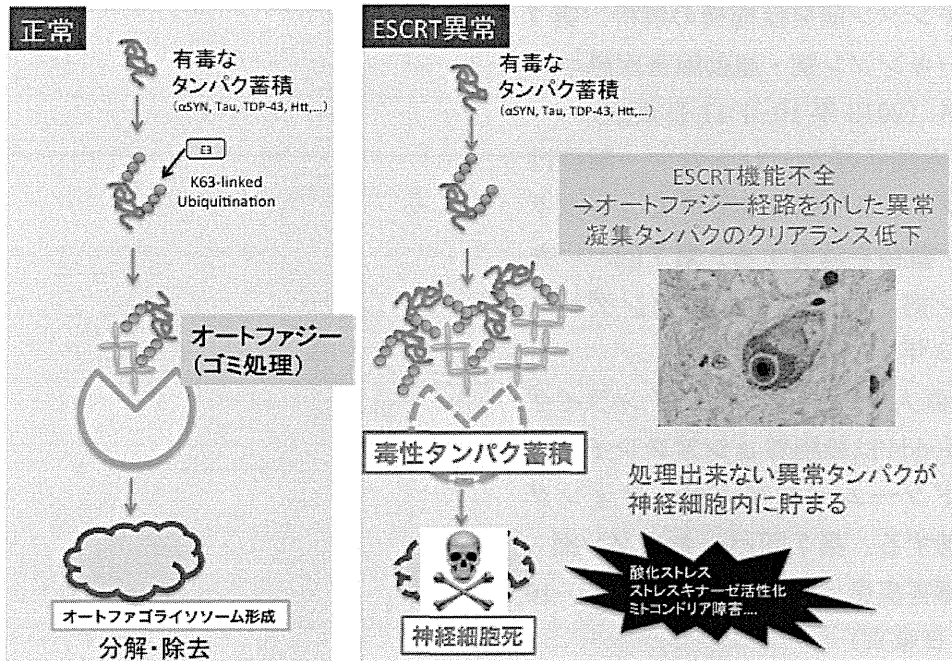


図2

ESCRT異常による毒性タンパク分解障害→神経変性を惹起



厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究班 分担研究報告

Sigma-1 receptor の蓄積は種々の神経変性疾患の核内封入体に共通する

研究分担者 若林孝一（弘前大学大学院医学研究科脳神経病理学講座）
共同研究者 三木康生、森 文秋、今 智矢、丹治邦和
（弘前大学大学院医学研究科脳神経病理学講座）
豊島靖子、高橋 均（新潟大学脳研究所病理学分野）
柿田明美（同 生命科学リソース研究センター）
吉田眞理（愛知医科大学加齢医科学研究所）
佐々木秀直（北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野）

研究要旨

Sigma-1 receptor (SIGMAR1) は小胞体 (ER) 分子シャペロンの一つで、異常蛋白を ER 関連分解に運ぶことに関わっている。近年、SIGMAR1 の遺伝子変異が frontotemporal lobar degeneration-motor neuron disease の発症に関与することが報告された。今回、種々の神経変性疾患における SIGMAR1 の局在と機能について検討した。SIGMAR1 の蓄積は種々の神経変性疾患における核内封入体に共通してみられ、SIGMAR1 は核と細胞質間を行き来している可能性が示唆された。SIGMAR1 は ER 関連分解を介して核内異常蛋白の分解に関与している可能性がある。

A. 研究目的

SIGMAR1 は ER 分子シャペロンの一つで、新生された蛋白の折り畳みだけでなく、異常蛋白を ER 関連分解へ運ぶことにも関与している。最近、SIGMAR1 の遺伝子変異が frontotemporal lobar degeneration-motor neuron disease の発症に関与することが報告された。しかし、神経変性疾患に出現する封入体における SIGMAR1 の関わりは明らかではない。そこで、種々の神経変性疾患における SIGMAR1 の局在と機能について検討した。

B. 研究方法

免疫組織化学的検討には、TDP-43 proteinopathy（孤発性 ALS、FTLD-TDP）、タウオパチー（Alzheimer 病、Pick 病、PSP、CBD、嗜銀顆粒性認知症、海馬硬化）、シヌクレイノパチー（Parkinson 病、Lewy 小体型認知症、多系統萎縮症）、ポリグルタミン病（Huntington 病、DRPLA、SCA1-3）、核内封入体病、正常対照の剖検脳組織を用いた。培養細胞（Hela cell）に exportin 1（核から細胞質への移行に関与）阻害剤である leptomycin B と ER ストレッサーの thapsigargin を投与し、SIGMAR1 の局在を蛍光染色で、蛋白量をウェスタンブ

ロットで解析した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した剖検脳組織は研究に用いることに関し文書により家族の同意が得られたものである。また、他施設からの脳組織は、書類による審査を経て譲渡されたものであり、倫理上問題はない。

C. 研究結果

免疫組織化学的に正常対照では神経細胞の胞体が淡く SIGMAR1 陽性を呈した。神経変性疾患ではポリグルタミン病と核内封入体病の核内封入体が SIGMAR1 陽性であった。さらに、TDP-43 陽性核内封入体 (SCA2 と海馬硬化)、黒質のメラニン含有神経細胞の核内に認められるマリネスコ小体も SIGMAR1 陽性であった。その他の疾患に出現する封入体は SIGMAR1 陰性。培養細胞では、無処理群で細胞質に微細顆粒状の SIGMAR1 陽性構造物を認めた。Leptomycin B 投与により SIGMAR1 は核内に移行し、p62 と共局在した。Thapsigargin 投与でも SIGMAR1 は核内に移行した。ウェスタンブロット解析では、leptomycin B および thapsigargin 投与ともに核内の SIGMAR1 量は同程度に増加した。ER ストレスマーカーである Bip は thapsigargin 投与群に比べ leptomycin B 投与群で発現量が少なかった。

D. 考察

SIGMAR1 の免疫原性は神経変性疾患に認められる核内封入体に共通して認められた。また、核から細胞質への移行を抑制することにより SIGMAR1 が核内に蓄積すること、ER ストレスによって核内に

SIGMAR1 が蓄積することが示された。これより、SIGMAR1 は細胞質と核を行き来しており、ER 関連分解を介して核内異常蛋白の分解に関与している可能性がある。

E. 結論

SIGMAR1 は細胞質と核の間を移動し、ER 関連分解を介して神経変性疾患に認められる核内封入体の分解に関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F, Takahashi H: The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol* 2013; 47: 495-508
- 2) Odagiri S, Tanji K, Mori F, Miki Y, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: Brain expression level and activity of HDAC6 protein in neurodegenerative dementia. *Biochem Biophys Res Comm* 2013; 430: 394-399
- 3) Tanji K, Maruyama A, Odagiri S, Mori F, Itoh K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: Keap1 is localized in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in various neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013; 72:

18-28

- 4) Sasaki H, Matsushima M, Hama Y, Nakamura M, Sakushima K, Yabe I, Oba K, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J: Plasma matrix metalloproteinase-3 correlates with the clinical severity in men with multiple system atrophy. *Neurol Clin Neurosci* 2013; 1(2): 69-77
- 5) Mori F, Tanji K, Toyoshima Y, Sasaki H, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: Valosin-containing protein immunoreactivity in tauopathies, synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease. *Neuropathology* 2013; 33: 637-644
- 6) Kon T, Mori F, Tanji K, Miki Y, Wakabayashi K: An autopsy case of preclinical multiple system atrophy (MSA-C). *Neuropathology* 2013; 33: 667-672
- 7) Kon T, Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: ALS-associated protein FIG4 is localized in Pick and Lewy bodies, and also neuronal nuclear inclusions, in polyglutamine and intranuclear inclusion body diseases. *Neuropathology* 2014; 34: 19-26
- 8) Mori F, Toyoshima Y, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: FUS co-localizes with polyglutamine,

but not with TDP-43 in neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2. *Neuropathol Appl Neurobiol*, in press

- 9) Mori F, Watanabe Y, Miki Y, Tanji K, Odagiri S, Eto K, Wakabayashi K: Ubiquitin-negative, eosinophilic neuronal cytoplasmic inclusions associated with stress granules and autophagy: an immunohistochemical investigation of two cases. *Neuropathology*, in press
- 10) Miki Y, Mori F, Kon T, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi H: Accumulation of the sigma-1 receptor is common to neuronal nuclear inclusions in various neurodegenerative diseases. *Neuropathology*, in press

2. 学会発表

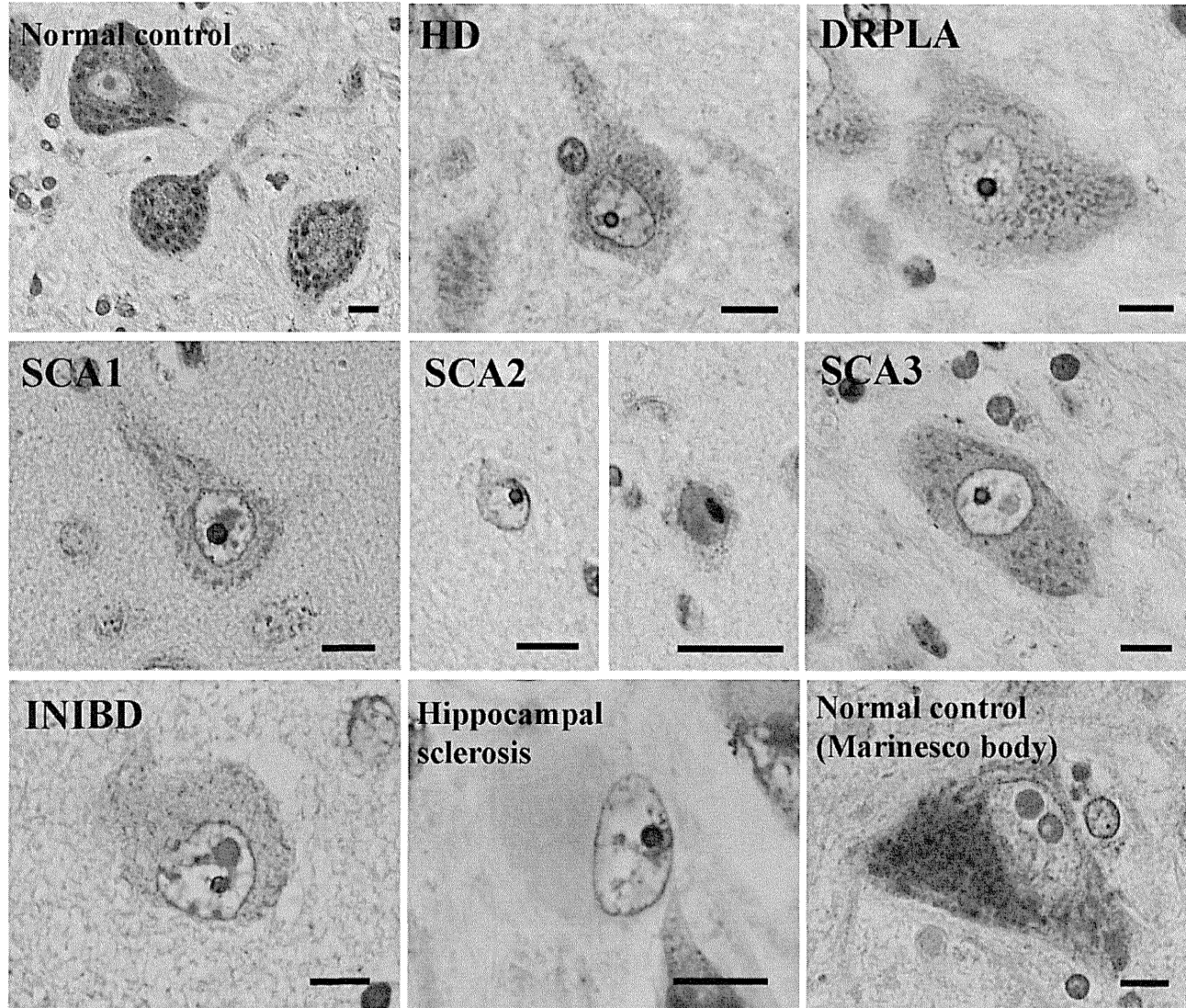
- 1) 丹治邦和, 丸山敦史, 小田桐紗織, 森文秋, 伊東 健, 柿田明美, 高橋 均, 若林孝一: 神経変性疾患脳におけるユビキチンリガーゼ Keap1 の解析. 第53回日本神経病理学会, 2013年4月24-26日, 東京
- 2) 森 文秋, 丹治邦和, 豊島靖子, 佐々木秀直, 吉田眞理, 柿田明美, 高橋 均, 若林孝一: 神経変性疾患における valosin-containing protein の免疫組織化学的検討. 第53回日本神経病理学会, 2013年4月24-26日, 東京
- 3) 丹治邦和, 丸山敦史, 小田桐紗織, 森

文秋, 伊東 健, 柿田明美, 高橋 均,
若林孝一: アルツハイマー病とシヌク
レイノパチーにおけるストレス防御
システム関連タンパク質の検討. 第
36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月
20-23 日, 京都市

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む。）

該当なし。

Sigma-1 receptorの蓄積は種々の神経変性疾患の核内封入体に共通する



Sigma-1 receptor 免疫染色

異常タンパク質蓄積をオートファジーによって制御するための標的探索

研究分担者 貫名信行

(順天堂大学大学院医学研究科、理化学研究所視床発生研究チーム)

共同研究者 黒澤 大、松本 弦 (理化学研究所視床発生研究チーム)

研究要旨

ポリグルタミン病の病態制御には異常伸長ポリグルタミン産物の量を減少させることが必要である。そのために我々は分解系に注目し、選択的オートファジーを亢進することにより、異常ポリグルタミンの分解を促進できないかと考えている。我々は一昨年度選択的オートファジーの制御因子として p62 の S403 のリン酸化を報告した。本年度は p62 の欠損および Atg5 の欠損がポリグルタミン病マウスの寿命、病理に及ぼす影響を検討した。ポリグルタミン病モデルマウスの寿命においては p62 欠損によってポリグルタミン伸長依存性に寿命の延長を認めた。その原因として細胞質における選択的オートファジーの障害が凝集を促進し、核移行を阻害し、核内での毒性が減少したためと考えられた。Atg5 の欠損によっては同様に細胞質凝集増加を認めたが、寿命は短縮した。これはオートファジー全般の障害による病態悪化のためと考えられた。

A. 研究目的

我々がすでにポリグルタミン封入体と結合していることを報告している p62 (Nagaoka et al J Neurochem 2004) について、最近この分子が選択的オートファジーの制御分子と考えられていることから、p62 による選択的オートファジー制御メカニズムの解析を行い、一昨年度 p62 S403 のリン酸化が選択的オートファジーを促進することを報告した (Matsumoto et al. Mol Cell 2011)。本年度は p62 のノックアウトの影響をポリグルタミン病モデルマウスを用いて検討した。その結果モデルマウスの寿命に paradoxical に良い影響を認めたため、そのメカニズムを

Atg5 のノックアウトの影響や、細胞レベルでの p62 欠損の影響を検討することで明らかにした。

B. 研究方法

1) p62 ノックアウトマウス (Komatsu et al Cell 2007) とハンチントン病モデルマウス R6/2, HD190QG (Kotliarova J Neurochem 2005), また HD190QG からリピートの縮小を起こしたものを選択して確立した HD120QG を掛け合わせ、それぞれのモデルマウスで p62 ノックアウトの影響を寿命、病理学的に検討した。
2) これらの遺伝子改変マウスのトランスクリプトーム解析を行った。

3) オートファジー全般を阻害したときの影響を見るため、Atg5 のノックアウトマウスと R6/2 の掛け合わせを行い、その寿命、病理への影響を検討した。

4) p62KO の MEF 細胞に対し、核外移行シグナル、核内移行シグナルをつけた HD106-NES-RFP, HD106-NLS-RFP を発現し、さらに P62 を発現したときの影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子組み換えに該当する。独立行政法人理化学研究所の遺伝子組み換え実験計画の承認を受けた。

C. 研究結果

1) R6/2 は 120-133 CAG repeats であるが、p62 のノックアウトによって寿命は 26%延長した。また HD190QG (190 repeats) とこれからリピートの縮小したラインである HD120QG における p62 のノックアウトの影響は前者が 44%、後者が 27%の寿命延長の影響が認められ、これらのマウスでも p62 のノックアウトは寿命の延長を認め、その効果はリピートの長い方で強い傾向が認められた。これらの p62 をノックアウトしたマウスでは細胞質の封入体の増加を認め、核内封入体の減少を認めた。

2) この「改善」傾向の影響が遺伝子発現においても認められるかどうかを検討するため、R6/2 マウスの p62 ノックアウトの影響をトランスクリプトーム解析を行って検討した。遺伝子発現への p62 自体の影響は極めて少なかった。一方伸長ポリグルタミンの発現による遺伝子発現への影響は大きく、p62 ノックアウトによ

って、その数はあまり変わりなかった。よく知られている伸長ポリグルタミン発現によって変化する遺伝子について定量 PCR によって発現を検討したが、これらの遺伝子発現にはあまりはっきりした改善を認めなかった。

3) 選択的オートファジー阻害によって細胞質封入体の増加、核内封入体の減少が認められる原因が細胞質のオートファジー阻害によることを確認するため、R6/2 において Atg5 をノックアウトした。このマウスにおいても細胞質封入体が増加し、核内封入体が減少した。しかしながら寿命においては Atg5 ノックアウトによって短縮傾向を認めた。

4) p62 ノックアウトの MEF 細胞に対し、HD106-NES-RFP, HD106-NLS-RFP を発現すると、それぞれ細胞質封入体、核内封入体を形成したが、これに p62 を発現すると、HD106-NES-RFP においてのみ、封入体形成に差を認めた。

D. 考察

ポリグルタミン病モデルマウスにおいてオートファジー分解系を阻害した影響を p62 ノックアウト、Atg5 ノックアウトによって検討した。どちらの条件においても核内封入体は減少し、細胞質封入体が増加したことは、オートファジー分解系が細胞質で機能するため、これらのマウスでは細胞質での異常タンパク質の分解が阻害され、細胞質での凝集を促進し、核内移行が減少したと考えられる。このことは p62 ノックアウト MEF 細胞を用いた実験結果によっても支持され、核外移行シグナルを持ったポリグルタミン発現