

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)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)はシヌクレインに先行して細胞質へ集積し、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 / 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プ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 TPPP 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 TPPP 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 TPPP 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シヌクレイン抗体と TPPP 抗体との蛍光 2 重染色にて TPPP 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。TPPP 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 TPPP 局在を確認した。MSA では白質変性に合致してミエリンの TPPP 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 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 TPPP が消失していた (19.6 ± 10.9 vs 48.63 ± 10.37 %, $p < 0.05$)。MSA で -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 TPPP 陽性率を比較すると MSA 患者で有意に核内 TPPP の減少を認めた (48.63 ± 10.37 % vs 62.4 ± 13.5 %, $p < 0.05$)。MSA では シヌクレインの沈着よりも早期に核内 TPPP 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)、TPPP 抗体、リン酸化シヌクレインを用いた蛍光 3 重免疫染色では TPPP 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 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、シヌクレインを発現しておらず、なぜ MSA の ODG に シヌクレインが凝集するかは不明であったが、TPPP の細胞体への集積が 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 TPPP の核内から細胞体への移行は 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、TPPP 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 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）

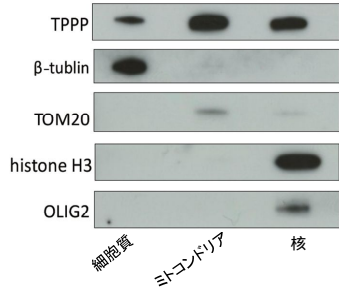
2. 実用新案登録

なし

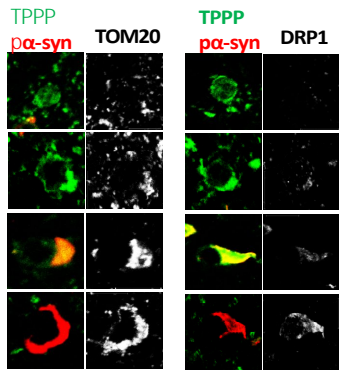
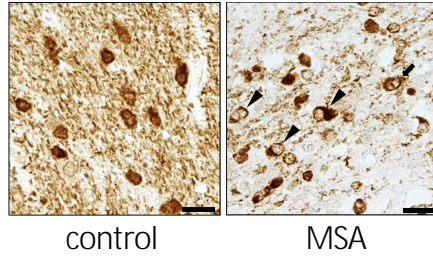
3. その他

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



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