

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 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 α -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 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 シヌクレインのエンドソームへのターゲ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 ユビキチンリガゼ Nedd4 は 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 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 ユビキチンライガース Nedd4 は細胞外 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

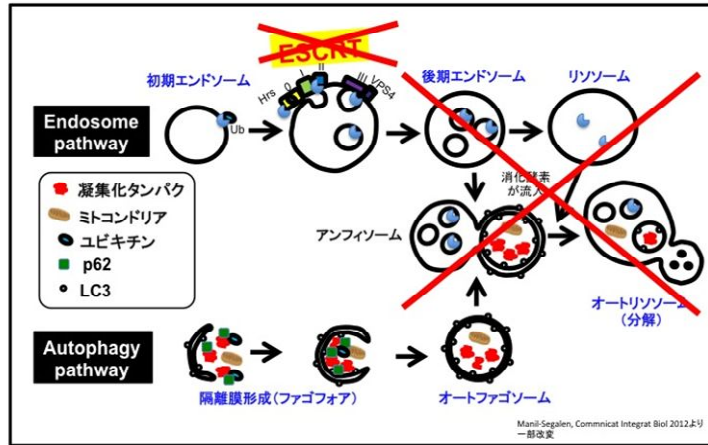


図2

ESCRT異常による毒性タンパク分解障害→神経変性を惹起

