

分解系関連分子における多系統萎縮症や遺伝性脊髄小脳失調症に対する治療標的の探索

業務担当責任者：貫名信行 順天堂大学大学院医学研究科神経変性疾患病態治療探索講座
研究協力者：奥住文美 順天堂大学大学院医学研究科脳神経内科
黒澤 大 理化学研究所視床発生研究チーム
波田野琢 順天堂大学大学院医学研究科脳神経内科
服部信孝 順天堂大学大学院医学研究科脳神経内科
古川良明 慶応義塾大学理工学部

研究要旨

運動失調症の治療標的である病態制御因子を探索するため、ポリグルタミン病マウスにおいて掛け合わせによってそのオートファジー関連分子 p62, Atg5 をノックアウトすると細胞質凝集体が増加し、核内封入体が減少することを見出した。特に前者では寿命の延長も見られ、核内封入体減少に基づくものと考えられた。この現象はオートファジーが細胞質で作用しているためと考えられたため、細胞質封入体が主であるシヌクレイノパチーについて伝播現象を用いてタンパク質分解系の病態への影響を明らかにするため、伝播現象の基礎的検討を行った。

A. 研究目的

神経変性疾患の病態において封入体(タンパク質凝集)形成が重要な役割を果たしていることが知られている。本研究班の目的である、運動失調症の治療開発のために、タンパク質凝集を制御することを目指し、我々は運動失調症の多くを占めるポリグルタミン病における凝集体形成制御因子を探索し、オートファジーシステム、特に p62 のリン酸化が選択的オートファジーを制御し、凝集体形成に影響を及ぼすことを報告した(1)。さらに、p62, Atg5 のノックアウトにより細胞質封入体が増加し、核内封入体が減少し、p62 ノックアウトの条件下ではポリグルタミン病モデルマウスの寿命が延長するという現象を報告した(2)。このことはオートファジー系が細胞質において凝集体形成を制御していること

を示唆しているが、他の神経変性疾患において凝集体形成の制御に影響を与えるかどうかは未だ明らかではない。そこで運動失調を示す多系統萎縮症を含むシヌクレイノパチーにおいてこれらのシステムが制御因子かどうかを検討する系を確立することを本研究の目的とした。これまでの方法であれば p62 や Atg5 のノックアウトマウスとシヌクレイノパチーのマウスを掛け合わせ、凝集体の形成が増加するかどうかを検討するのが定法であるが、シヌクレイノパチーは伝播実験が成立することから、伝播実験によってアッセイが可能かどうかを検討することとした。本年度はシヌクレイノパチーによる伝播実験によってどのような系に広がるかどうかといった基礎実験を行った。

B. 研究方法

全長マウスシヌクレインを *in vitro* で合成し、線維性凝集体を形成したことを確認した上、マウスの線条体に注入した。これを6ヶ月例において剖検しリン酸化シヌクレイン抗体によって凝集体形成を検討した。

(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

片側線条体にシヌクレイン凝集体を注入したところ、同側の線条体および大脳皮質神経細胞に凝集体を認めた。また同側黒質神経細胞にも凝集体を認めた。さらにこれらの凝集体含有細胞の細胞種を同定するため、線条体中型有棘神経細胞の細胞体マーカーとして DARRP32, 軸索のマーカーとして sodium channel beta4 subunit あるいは Nav1.2 の抗体(3)を用いて局在を検討したところ、凝集体は中型有棘神経細胞の細胞体、及び軸索に存在することが確認された。また黒質神経細胞のマーカーとして TH 抗体を用いて染色し、神経細胞及び軸索においてシヌクレイン凝集体が存在することが確認された。これらの結果から注入されたシヌクレインはシードとして働き、順行性、逆行性に伝播されることが強く示唆された。

D. 考察

ポリグルタミン病モデルマウスにおいて p62, Atg5 をノックアウトすることにより、細胞質封入体が増加し、核内封入体が減少することは、異常伸長ポリグルタミンが細胞質においてこれらの分子がノックアウトされることにより、オートファジーによる分解が阻害され、凝集性が増すためだと推察された。そのため、核移行が阻害され、核内封入体が減

少、病態の改善が認められたものと考察した。それでは多系統萎縮症などのシヌクレイン凝集においてはこのようなタンパク質分解系はどう影響するであろうか。多系統萎縮症においては主なシヌクレイン凝集体はオリゴデンドログリアに認められるが、神経細胞の細胞質にもシヌクレインの集積は認められる。そこでシヌクレイン凝集に対するこれらオートファジー系の分子の影響をみるには従来であれば、シヌクレイン過剰発現マウスとの掛け合わせを検討するのが通常であるが、最近注目されている凝集体の伝播現象を考慮すると外来性のシードを注入してその伝播現象に対する影響をアッセイできれば、より簡便になる可能性がある。今年度の検討により、確かに細胞体に対して順行性、逆行性にシヌクレインのシードが取り込まれていることが示唆された。ヌクレイノパチーに対する病態制御因子の検定に伝播現象を用いられるかどうかは、これが時間経過によって増大するかどうか、またそれを定量できるかの検討が必要であり、今後の課題である。

E. 結論

シヌクレイン凝集の伝播現象を検討し、順行性、逆行性にシヌクレイン凝集のシードが取り込まれ、伝播していくことが示唆された。

[参考文献]

1. Matsumoto G, Wada K, Okuno M, et al. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol Cell*. 2011;44(2):279-89.
2. Kurosawa M, Matsumoto G, Kino Y, et al. Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice. *Hum Mol Genet*. 2014.

3. 3)Miyazaki H, Oyama F, Inoue R, et al. Singular localization of sodium channel beta4 subunit in unmyelinated fibres and its role in the striatum. Nat Commun. 2014;5:5525.

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

1. 論文発表

- 1) Yamanaka T, Wong HK, Tosaki A, Bauer PO, Wada K, Kurosawa M, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. Large-scale RNA interference screening in mammalian cells identifies novel regulators of mutant huntingtin aggregation. PLoS One.2014;9(4); e93891
- 2) Miyazaki H, Oyama F, Inoue R, Aosaki T, Abe T, Kiyonari H, Kino Y, Kurosawa M, Shimizu J, Ogiwara I, Yamakawa K, Koshimizu Y, Fujiyama F, Kaneko T, Shimizu H, Nagatomo K, Yamada K, Shimogori T, Hattori N, Miura M, Nukina N. Singular localization of sodium channel β 4 subunit in unmyelinated fibres and its role in the striatum. Nat Commun.2014;5:5525
- 3) Kino Y, Washizu C, Kurosawa M, Oma Y, Hattori N, Ishiura S, Nukina N. Nuclear localization of MBNL1: splicing-mediated autoregulation and

repression of repeat-derived aberrant proteins. Hum Mol Genet.2015;24(3); 740-56

- 4) Kurosawa M, Matsumoto G, Kino Y, Okuno M, Kurosawa-Yamada M, Washizu C, Taniguchi H, Nakaso K, Yanagawa T, Warabi E, Shimogori T, Sakurai T, Hattori N, Nukina N. Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice. Hum Mol Genet.2015;24(4); 1092-105

2. 学会発表

- 1) 山中智行, 戸崎麻子, 黒澤大, 松本弦, 小池正人, 内山安男, MAITY SN, 下郡智美, 服部信孝, 貫名信行. 転写因子 NF-Y の機能破壊はユビキチン・p62 の蓄積、小胞体異常を伴う神経変性を誘導する. 第66回日本細胞生物学会大会. 奈良(奈良県新公会堂、東大寺総合文化センター) 2014/06/11-13.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し