

タンパク質分解システムを標的とするシヌクレイノパチーの分子病態解明 と治療法の確立

研究代表者 森 文秋¹⁾

研究分担者 丹治 邦和¹⁾、三木 康生¹⁾、柿田 明美²⁾、高橋 均³⁾、若林 孝一¹⁾

¹⁾弘前大学大学院医学研究科 脳神経病理学講座 ²⁾新潟大学脳研究所 脳疾患リソース解析部門

³⁾新潟大学脳研究所 病理学分野

研究要旨

シヌクレイノパチー（パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症）を含む神経変性疾患では、疾患特異的な異常分子の蓄積が認められる。その蓄積機序として細胞内分解システムの機能低下や障害が示唆されており、実際にオートファジーの基質（p62、Keap1、NBR1 など）やプロテアソーム関連タンパク質（NUB1、TRIM9）が正常対照例と比較し質的および量的に異なることを報告してきた。これらの知見を踏まえ、細胞内分解システムを活性化し、異常分子を分解する可能性について検討した。培養細胞および動物レベルで種々のオートファジー誘導剤をスクリーニングした結果、二糖のトレハロースが安全かつ効率よく脳内オートファジーを誘導することを見出した。今後、*in vivo* において、より効率的に脳内オートファジーを誘導する投与方法を確立し、治療法へとつなげていきたい。

A. 研究目的

シヌクレイノパチーの脳内では、 α シヌクレインが神経細胞の胞体や突起（軸索および樹状突起）に異常蓄積している。さらにレビー小体病では、 α シヌクレインが前シナプスにも広範に蓄積している¹⁾。異常蓄積の原因として、近年、細胞内分解システムの活性低下や障害が明らかになってきた。特に、レビー小体病はゴーシェ病やサンフィリップシンドロームなどのリソソーム蓄積症との関連が示唆されている。またゲノムワイドの一塩基多型解析では、LRRK2、ATP13A2 や RAB7L1 といった細胞内分解・ソートシステムに関与する分子の異常が見出されている。

細胞内分解システムは、主にオートファジー・リソソーム系とユビキチン・プロテアソーム系が担っている。神経変性疾患では、この両系が障害されており、実際に p62 や NBR1 などのオートファジー基質ならびに NUB1 などのユビキチン関連

タンパク質の細胞内凝集が認められる。以上の知見を踏まえ、我々は細胞内分解システムに着目し、オートファジー基質である p62 の結合分子を同定することで分子レベルの病態メカニズム解明を試みた。さらに治療へと結びつけるトランスレーショナルリサーチを目指すために、逆にオートファジーを活性化し、異常分子を分解する可能性について検討した。

B. 研究方法（倫理面への配慮を含む）

1. p62 結合分子群の単離・同定

p62 は選択的オートファジーに必須の分子であり、種々の神経変性疾患に認められるユビキチン陽性封入体に認められる。我々は p62 特異抗体を用いて p62 結合分子群を脳内よりすでに単離・同定する技術を確認している。この技術を用いて、シヌクレイノパチーおよび正常対照の凍結脳組織から p62 結合分子を単離・同定し、同定された

分子に対する抗体を購入または作製し、病理学的、生化学的解析を進めた。

2. 『オートファジー活性化』の検証

細胞レベルの検討には培養 HeLa 細胞を用いた。動物レベルの検討には正常マウス (C57B16J) およびレビー小体病モデルマウス (家族性の点突然変異 (A53T) を導入した α シヌクレイントランスジェニックマウス) (SNCA Tg, Jackson Laboratory) (20–50 週齢) を用いた。正常マウスにトレハロース (2%, 5.5 mM 相当) を 1、3 または 24 週間給水投与した後、免疫組織化学的・生化学的検討を行った。コントロールとしては同じ二糖のマルトース (麦芽糖) とショ糖、および水を用いた。

本研究における動物実験計画は、弘前大学動物実験委員会により承認され、弘前大学実験動物に関する指針に遵って行った。遺伝子組み換え動物使用に当たっての拡散防止処理を踏まえ、組み換え DNA 実験に関し弘前大学動物倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. p62 結合分子群の単離・同定

質量分析により p62 の結合分子として、Keap1 および EAAT2 が同定された。Keap1 については既に報告があり、レビー小体病のレビー小体や MSA の神経細胞内封入体が Keap1 陽性であった。さらに我々は Keap1 と p62 の結合部位に着目し研究を進めた。特にリン酸化 p62 抗体を作製し、Keap1 との関連を検討した。EAAT2 に関しては、グルタミン酸トランスポーターとして知られており、特にグリア細胞での発現が報告されている。実際に、免疫染色では大脳皮質のアストロサイトが陽性であったが、さらに今後の検討を必要とする。

2. 『オートファジー活性化』の検証

オートファジーでは、最初にオートファゴソーム膜が形成され、膜内に分解する分子を取り囲んだ後にリソソームと融合し、内部の分子を分解・リサイクルする。本研究ではオートファゴソームの膜構成タンパク質である LC3 を蛍光標識することでオートファゴソームを培養細胞レベルで可視化した。培養 HeLa 細胞を飢餓状態 (アミノ酸、

血清飢餓にするために培養液を Earle's balanced salt solution に交換した) にすることで、オートファジーが活性化されることを 24 時間のタイムラプスおよび生化学的解析により確認した (図 1)。

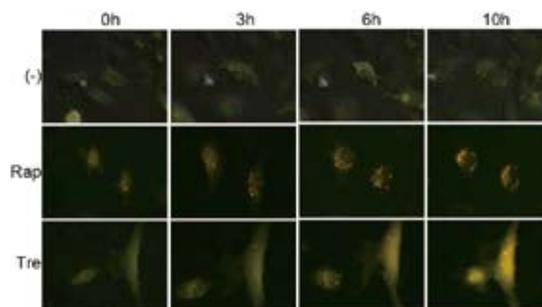


図 1 培養細胞 (HeLa) におけるオートファジー活性化
オートファジー活性化剤 (ラパマイシン、Rap) およびトレハロース (Tre) を培養細胞に添加し、経時的に細胞を観察した。オートファゴソーム膜構成タンパク質 LC3 (黄色もしくは赤の蛍光強度は Rap および Tre とともに経時的に増強した。また、細胞内で LC3 の凝集体が観察される。

次に、このシステムを用いて、種々のオートファジー誘導剤をスクリーニングした結果、二糖のトレハロースが効率よくオートファジーを誘導すること、さらに異常分子の蓄積を抑制することを見出した。

次に、正常マウスにトレハロースを給水投与したところ、1 週間の給水投与で脳内オートファジーの活性化が認められた。しかし、3 週間および 24 週間の長期投与例ではこの効果は認められなかった。そこで、トレハロースの短期給水投与 (3 日間) によるレビー小体病モデルマウスへの効果について検討した。結果として、トレハロース投与群では、マルトースおよびショ糖投与群と比較して、脳内オートファジーの活性化が認められたが、ヒト α シヌクレインの発現量および発現部位に差は認められなかった。

D. 考察

今回、オートファジー基質 p62 の結合分子を複数同定した。p62 はシヌクレインパチーの細胞内封入体に局在すると同時に、in vivo レベルの研

究から封入体の形成に深くかかわっている。Keap1 は酸化ストレスセンサー分子として、EAT2 はグルタミン酸を介したニューロン・グリア細胞のネットワークに深く関与することが知られている。今後、これらの分子に着目することで新たなシヌクレイノパチーの病態が明らかになると思われる。

一方、二糖のトレハロースにより脳内の細胞内分解システムが活性化されることが細胞および動物レベルで示された。また、レビー小体病モデルマウスでも同様に脳内オートファジーの活性化が認められたことから、シヌクレインの過剰発現状態でも細胞内分解システムは機能不全ではなく、活性化されることが示唆された。トレハロースの脳内への移行は不明であるが、同じ二糖のマルトースではオートファジーの活性化は認められなかったことから消化管からの吸収だけでは説明がつかず、今後の検討を必要とする。

E. 結論

シヌクレイノパチーを含む神経変性疾患の治療法を視野に入れ、細胞内分解システムを活性化する手法を試みた。In vivo で脳内オートファジーを活性化する物質を見出した。病理学および生化学的解析に加え、行動学的解析を考慮することで、より有効な活性化剤をスクリーニングする必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 33: 637-644, 2013.
- 2) 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* 34: 19-26, 2014.
- 3) Miki Y, Mori F, Kon T, Tanji K, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H,

Wakabayashi K. Accumulation of the sigma-1 receptor is common to neuronal nuclear inclusions in various neurodegenerative diseases.

Neuropathology 34: 148-158, 2014.

- 4) Miki Y, Mori F, Tanji K, Kurotaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. An autopsy case of incipient Pick's disease: Immunohistochemical profile of early-stage Pick body formation. *Neuropathology* (in press).

2. 学会発表

第54回 日本神経病理学会 (2013年4月24-26日、東京)

- 1) 丹治邦和、丸山敦史、森 文秋、小田桐紗織、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
- 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ユビキリンの免疫組織化学的検討

第55回 日本神経病理学会 (2014年6月5-6日、東京)

- 1) 丹治邦和、三木康生、尾崎拓、丸山敦史、吉田秀見、三村純正、松宮朋穂、森 文秋、伊東 健、今泉忠淳、柿田明美、高橋 均、若林孝一. アルツハイマー病脳におけるリン酸化p62の検討
- 2) 森 文秋、豊島靖子、丹治邦和、柿田明美、高橋 均、若林孝一. 脊髄小脳失調症2型脳に認められた2種類の核内封入体

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし