

## 神経変性におけるタンパク質凝集の制御機構の解明

|          |                                           |
|----------|-------------------------------------------|
| 研究代表者    | 教授 貫名 信行                                  |
| 日本所属機関   | 同志社大学大学院脳科学研究科                            |
| 共同研究者    | 奥住文美, 黒澤大, 山中智行, 宮崎晴子<br>波田野琢, 服部信孝, 古川良明 |
| 中国側共同研究者 | 教授 王 光輝                                   |
| 中国所属機関   | 蘇州大学薬理学講座                                 |

### 要旨

神経変性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ている。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。

シヌクレイン凝集のシードを線条体に注入すると、凝集体が形成され、その分布からシードは順行性、逆行性に移動し、神経回路を介して伝播していることが示唆された。このシステムを用いることで異常凝集体のシード形成以降の病態制御因子を同定するアッセイ系が可能であることが示唆された。

**Key Words** 凝集体、伝播、シヌクレイン、パーキンソン病、多系統萎縮症

### 緒言

我々は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かではない。そこで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であるかどうかを検討することとした。

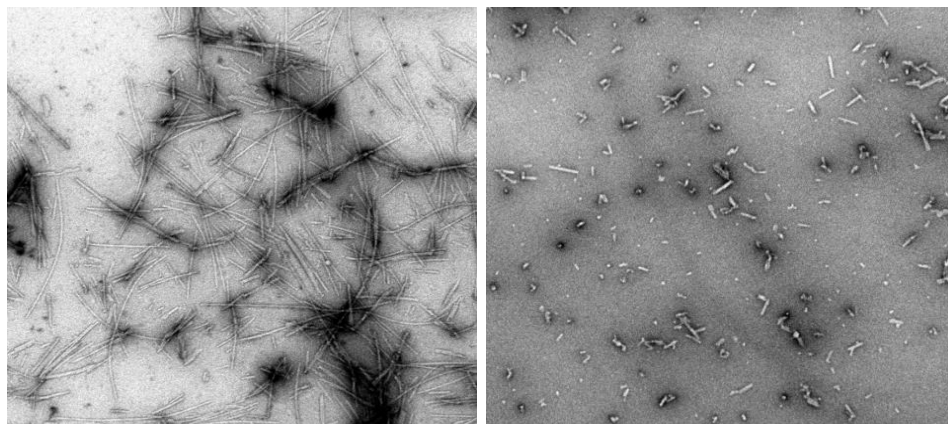
まずシヌクレイン凝集による伝播実験によってどのような系に広がるかどうかといった基礎実験を行った。パーキンソン病の病因タンパク質であるシヌクレイン凝集はプリオンタンパク質様に伝播するとの報告がなされている。プリオン様伝播とはシード(種)となる凝集タンパク質が取り込まれ、細胞内で増幅され、細胞間を伝搬すると考えられる。この現象は実際の疾患における正常タンパク質からのミスフォールドの過程を省略して、異常タンパク質の増殖、伝播過程を見ていると考えられる。本研究ではパーキンソン病、多系統萎縮症などシヌクレイノパチーの病態制御因子を明らかにするため、この伝播現象を利用し、シード発生以後の変化の制御因子を同定することを目的とする。

## 対象と方法

全長マウスシヌクレインを *in vitro* で合成し、3 日間振盪し、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。さらにマウス脳の脳梁離断を先行して行い、その後線条体に線維性凝集体を注入した。さらに外因性のシードがどれくらいの速さで移動しているのかを調べるために脳梁離断を、線維性凝集体注入前、注入後 1 日後、注入後 1 週間後と時間を振り分けながら施行し、リン酸化シヌクレイン抗体により伝播の状態を検討した。

## 結果

電子顕微鏡で線維形成されたことを確認し、さらに注入前の超音波処理した電顕像も確認した（図 1）。



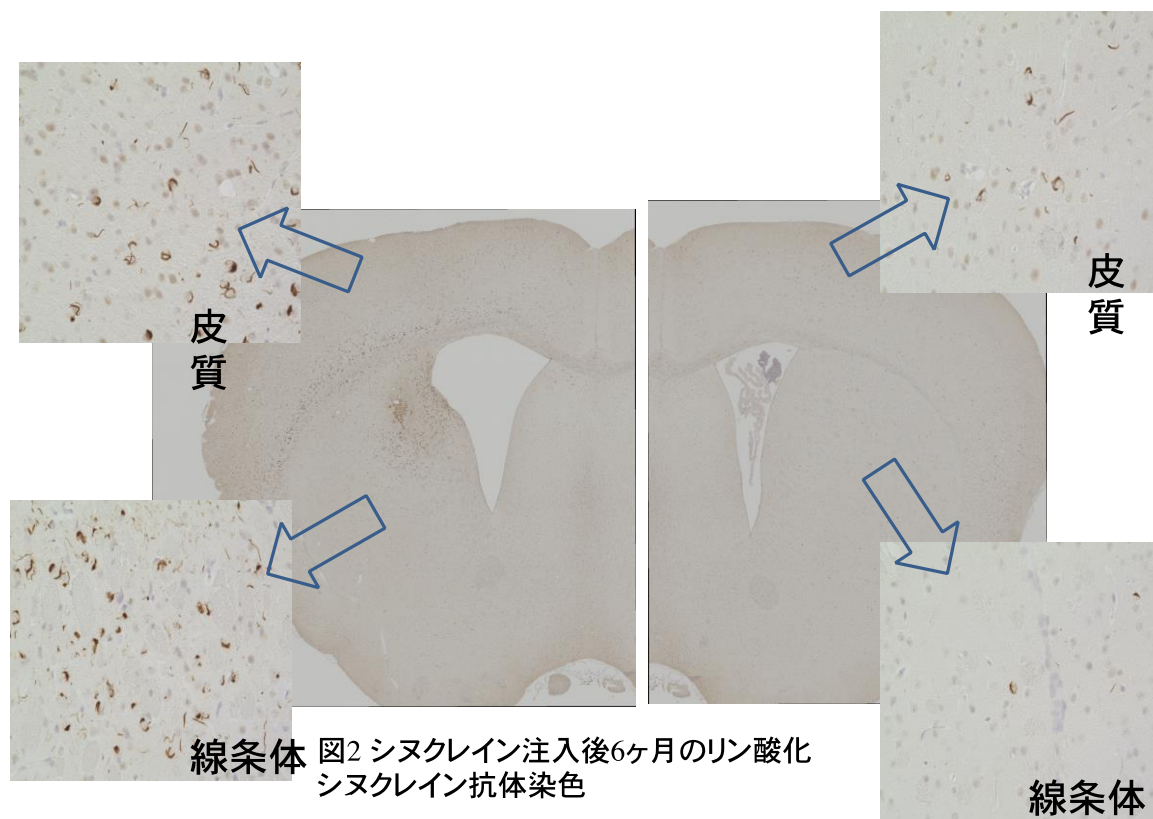
α-シヌクレイン線維◆

α-シヌクレイン線維  
(超音波処理)◆

## 図1 注入したシヌクレイン線維の電顕像

片側線条体にシヌクレイン凝集体を注入したところ、6 ヶ月後のリン酸化シヌクレイン抗体による検討では、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。さらに対側の脳皮質、線条体にも数は少ないもののシヌクレイン凝集を神経細胞の細胞質に認めた（図 2）。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 DARPP32, 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。

脳梁離断を行うと、離断していないマウスと比較して明らかに対側新皮質へ伝播するリン酸化シヌクレイン病変の減少を認めた。シヌクレインの伝播は単純な拡散というよりは神経を介した経シナプス輸送で行われていることが示唆された。さらに時間を振り分けて脳梁離断を行った場合、線維性凝集体注入に先行して脳梁離断を行ったマウスでは、対側皮質へ伝播するリン酸化シヌクレインの病変の減少を認めたが、注入を先に行い 1 日後に脳梁離断を行ったマウスでは反対側皮質や反対側線条体への伝播を認めた。この結果より注入したシードの移動や伝播はかなり早い段階で起こっている可能性が示唆された。



#### 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。

それではパーキンソン病、多系統萎縮症などの細胞質に形成される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。パーキンソン病においてはシヌクレイン凝集体が主に黒質神経細胞に、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ことにした。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（図 3）。今回の検討により、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、この凝集体のサイズの時間経過を定量できるかの検討が必要であり、今後の課題である。また脳梁離断によって極めて早期に凝集が移動していたことが示唆されたが、この系では細胞間移動を制御する因子と凝集の増大速度を制御する因子を同定できる可能性があると考えられる。マウスの掛け合わせによる凝集体制御因子のアッセイはいくつかの因子が絡み合っているため、結果からどこに働いているかが判定しにくいですが、本研究で示した伝播実験を用いたアッセイ法は制御因子の働いている標的を明らかにしやすいので、今後詳細な検討により、神経変性疾患の病態制御因子の同定に大きな役割を果たしうると考えられる。

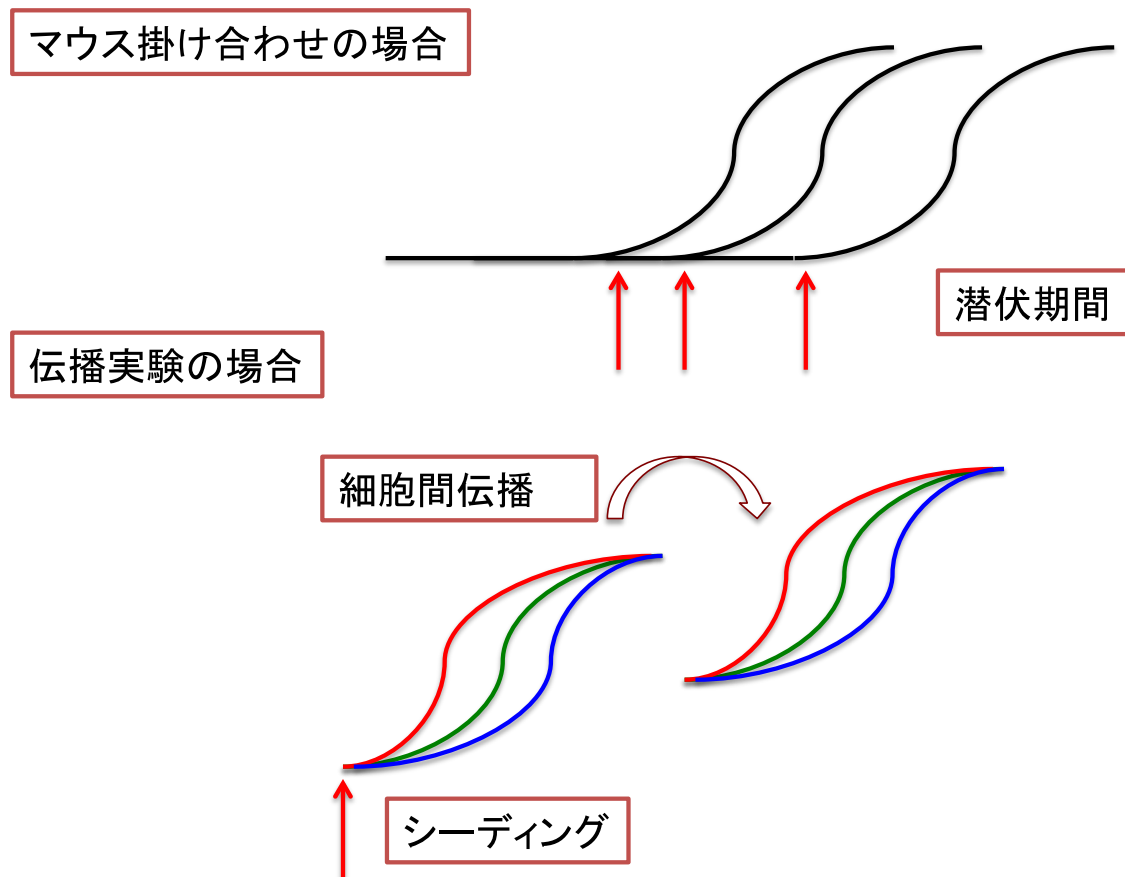


図3 伝播実験による凝集制御因子のアッセイ系

#### 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) 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.

注) 本研究は2016年1月7日「運動失調症の分子病態解明・治療法の開発に関する研究班」研究報告会にて口頭発表

作成日：2016年3月9日