

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19530

研究課題名(和文)異常タンパク封じ込め機構における小胞体シャペロンBiPの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of endoplasmic reticulum chaperone BiP in the mechanism of aberrant protein containment

研究代表者

萩原 大輔(Hagiwara, Daisuke)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：70710086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：AVPプロモーター下Venus発現rAAVベクターをマウス視索上核へ投与しAVPニューロン特異的なVenusの発現を認めた。BiP, BiP shRNAを導入したrAAVベクターにてFNDIマウスAVPニューロンに特異的なBiPの過剰発現, ノックダウンを施行したが, その解析は現在進行中である。また, BiPと同様の作用を持つケミカルシャペロン4-PBAがFNDIマウスの尿量やERAC形成に及ぼす影響を検討した。4-PBA投与により尿量とERACは減少した。以上より, BiPと同様の作用を持つ4-PBAは変異タンパクの処理を促進することでERACを減少させ多尿の進行を抑制したものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The injection of rAAV incorporated Venus under the AVP promoter into the mouse supraoptic nucleus resulted in the specific expression of Venus in AVP neurons. We performed specific overexpression and knockdown of BiP in AVP neurons of FNDI mouse with rAAV incorporated BiP and BiP shRNA, but the analysis is ongoing. We also examined the effect of chemical chaperone 4-PBA, which has the same effect as BiP, on urine volume and ERAC formation in FNDI mouse. Urine volume and ERAC was decreased with 4-PBA administration. From the above, it was considered that 4-PBA, which has the same effect of BiP, decreased ERAC and suppressed progression of polyuria in FNDI mouse by promoting the management of mutant proteins

研究分野：内分泌内科

キーワード：家族性中枢性尿崩症 バソプレシン 小胞体ストレス BiP

1. 研究開始当初の背景

家族性中枢性尿崩症 (FNDI) は、生後数ヶ月から数年で発症し緩徐に進行する多尿を呈する常染色体優性遺伝疾患で、原因となる遺伝子変異の大部分はバソプレシン (AVP) の担体タンパクであるニューロフィジン II 領域に認められる。当研究室では、FNDI の原因となるニューロフィジン II の変異遺伝子を導入した FNDI モデルマウスを作出し、変異タンパクが凝集体として小胞体に蓄積することで AVP ニューロンの機能障害、さらには細胞死が生じることを明らかにしてきた (Hayashi M et al. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009, Morishita Y, Hagiwara D et al. *Endocrinology* 2011, Arima H, Hagiwara D et al. *Exp Physiol* 2014)。

さらに我々は、若年 FNDI マウスの AVP ニューロンにおいて、小胞体の一部に凝集体が隔離された区画 (ERAC: Endoplasmic reticulum-associated compartment) が形成され凝集体が小胞体の一部に封じ込められることで ERAC 以外の部位では小胞体の内腔が健全に維持されていることを見出した。一方で、脱水負荷後や老齢の FNDI マウスにおける AVP ニューロンでは、凝集体が小胞体全域にわたって散在し小胞体の内腔は拡張していたことから、ERAC の形成が破綻したものと考えられた。ERAC の形成と小胞体ストレスとの関係解析すると、ERAC が形成された状況では小胞体に凝集体が蓄積しているにも関わらず小胞体ストレスは野生型マウスと同程度であった一方で、ERAC の形成が破綻すると小胞体ストレスが増加し、AVP ニューロンの細胞死が加速された (Hagiwara D et al. *Cell Death Dis* 2014)。以上より、ERAC 形成の意義は、小胞体に蓄積する異常タンパクを隔離して封じ込めることにより、小胞体の形態および機能を維持し小胞体ストレスを軽減することにあると考えられる。

ERAC 形成の機序については未だ明らかでない。我々は、小胞体シャペロン BiP が基礎状態においても AVP ニューロンに発現し、脱水負荷によりその発現がさらに増加することを報告した (Hagiwara D et al. *Peptides* 2012)。また、BiP の主要な調節因子である小胞体ストレスセンサー ATF6 のノックアウトマウスと FNDI マウスとを交配して得られたマウスの解析を通じて、FNDI/ATF6 ノックアウトマウスでは脱水負荷による BiP の発現増加を認めず、ERAC は早期に破綻し多尿の進行が加速することを明らかにした (Azuma Y, Hagiwara D et al. *Endocrinology* 2014)。この結果は BiP が ERAC の形成に関与している可能性を示唆している。しかしながら、ATF6 ノックアウトマウスでは、基礎状態の BiP の発現は野生型マウスと差を認めないことから、ERAC 形成における BiP の役割を十分

に解明するには至らなかった。

2. 研究の目的

本研究では、FNDI マウスの AVP ニューロンにおいて小胞体シャペロン BiP の ERAC 形成に及ぼす影響を解析し、小胞体における異常タンパク処理機構の解明、さらには小胞体ストレスが関与する様々な疾患の治療戦略の開発につなげることを目的とする。

小胞体ストレスは、糖尿病や神経変性疾患、悪性腫瘍などの様々な疾患の発症および進展に関与していることが報告されているが、小胞体に蓄積した異常タンパクを実際に観察し得る疾患モデル動物は比較的限られている。当研究室で作出された FNDI モデルマウスでは、AVP ニューロンの小胞体に蓄積した変異タンパクを光学顕微鏡もしくは電子顕微鏡を用いて観察することが可能であり、同マウスは小胞体への凝集体の蓄積 (小胞体ストレス) が惹起する細胞機能障害を *in vivo* で継時的に観察し得る貴重な疾患モデル動物と言える。

FNDI マウスで認められる ERAC の形成については、FNDI のみならず 1 アンチトリプシン欠損症や嚢胞性線維症などの変異タンパクが小胞体に蓄積する他の疾患モデルでも報告されている。すなわち、ERAC の形成による異常タンパクの封じ込めは、蓄積する異常タンパクの種類、あるいは細胞種に依存しない普遍的な機構であると考えられる。また、ERAC 形成の意義としては、小胞体ストレスの軽減や細胞生存性の上昇といった細胞保護的な影響についての報告がこれまでになされているが、いずれも培養細胞レベルでの検討によるものであった。FNDI マウスにおいて、ERAC 形成の破綻が AVP ニューロンにおける小胞体ストレスの増強、さらには細胞死につながることを我々が明らかにしたことにより (Hagiwara D et al. *Cell Death Dis* 2014)、小胞体ストレス下における ERAC 形成の意義が *in vivo* で初めて示され、その形成機序を解明することの重要性が明確となった。

本研究により、小胞体シャペロン BiP の ERAC 形成における役割が明らかとなり、ERAC 形成の機序が解明されれば、ERAC の形成を促す創薬が可能となり、小胞体ストレスが発症および進展に関与する様々な疾患に対する新たな治療戦略の開発につながることも期待される。

3. 研究の方法

(1) AVP ニューロン特異的 BiP ノックダウンおよび過剰発現

FNDI マウスの AVP ニューロンにおいて、小胞体シャペロン BiP が ERAC の形成に及ぼす影響を解析するためには、AVP ニューロンに特異的な BiP のノックダウンおよび過剰発現

を行う必要がある。組換えアデノ随伴ウイルス (rAAV) ベクターを用いて AVP プロモーター制御下に目的遺伝子を発現させることで、AVP ニューロンに特異的な遺伝子導入が可能となる。この手法により rAAV ベクターを AVP ニューロンの細胞体が存在する視索上核にマイクロインジェクションすることで、視索上核における AVP ニューロン特異的に BiP をノックダウンおよび過剰発現させる。

rAAV ベクターの作製

AVP プロモーターを搭載したベクタープラスミドを含めた rAAV ベクター作製に必要な3種類のプラスミドは、ドイツがん研究センターの Dr. Grinevich から譲渡して頂く。AVP プロモーターの下流に BiP shRNA, BiP, または Venus をそれぞれ導入したベクタープラスミド, AAV2 型ヘルパープラスミドおよびアデノウイルスヘルパープラスミドを HEK293 細胞に導入して rAAV を作製した後、分離および精製を行い qRT-PCR にて力価を測定する。

FNDI マウス視索上核への rAAV ベクターの投与

3ヶ月齢の雄性 FNDI マウスの視索上核に、脳定位固定装置を用いて rAAV ベクターをマイクロインジェクションする。AVP プロモーターを用いた rAAV ベクターによる AVP ニューロン特異的な遺伝子導入はすでに確立された手法ではあるが (PLoS One 7(11):e48860, 2012), 実験系の有効性を確認するために、AVP プロモーター制御下 Venus 発現 rAAV ベクターを視索上核に投与し免疫組織化学にて AVP ニューロン特異的な Venus の発現を確認する。

視索上核の AVP ニューロンにおける BiP ノックダウンおよび過剰発現の確認

rAAV ベクターの投与1ヶ月後に脳を摘出し、視索上核の免疫組織化学にて AVP ニューロンに特異的な BiP の発現低下もしくは発現増加が生じているかを検証する。また、BiP の発現を変化させたことによる代償性変化を検討するために、視索上核において BiP と共に他の小胞体シャペロンや小胞体ストレスマーカーなどの mRNA およびタンパク発現を解析する。

(2) AVP ニューロンにおける小胞体や凝集体の形態変化の観察および表現型に及ぼす影響の解析

FNDI マウス視索上核の AVP ニューロンにおいて BiP をノックダウンもしくは過剰発現させて、AVP ニューロンの小胞体や凝集体の形態変化を観察すると共に表現型に及ぼす影響を解析することにより、BiP が ERAC の形成に与える影響ならびに ERAC 形成の意義を解明する。

小胞体および凝集体の形態変化の観察

FNDI マウスの ERAC は光学顕微鏡では正円の封入体として観察されるため、ERAC の数や大きさの変化を評価できる。電子顕微鏡では小胞体や凝集体の形態を細部にわたり詳細に観察可能であり、ERAC の形成やその破綻を含めて小胞体や凝集体にどのような形態変化が生じるのかを検証する。また BiP が ERAC の形成に関与しているのであれば、ERAC とそれ以外の小胞体との間で BiP の分布が異なっている可能性がある。金コロイド免疫電子顕微鏡法を用いて、BiP の小胞体内の分布や凝集体との局在関係について調べる。

表現型に及ぼす影響の解析

FNDI マウスの AVP ニューロンにおいて BiP をノックダウンもしくは過剰発現させることで、FNDI マウスの尿量、AVP 産生および分泌、AVP ニューロンの細胞死に及ぼす影響を解析する。

視床下部器官培養にて継時的な ERAC の形態変化を観察

FNDI マウスの AVP ニューロンにて ERAC を継時的に観察するためには、生きたまま AVP ニューロンを同定する必要がある。申請者が作出した AVP-Venus BAC トランスジェニックマウスと FNDI マウスとを交配して得られた FNDI/AVP-Venus マウスで視床下部器官培養を行うことで、Venus により AVP ニューロンを可視化できる。FNDI/AVP-Venus マウスから作製した視索上核を含む視床下部切片において rAAV ベクターを用いて AVP ニューロン特異的に BiP をノックダウンもしくは過剰発現させて、継時的な ERAC の形態変化をタイムラプスで観察する。BiP が ERAC の形成に関与しているのであれば、固定された切片では観察し得ない ERAC のダイナミックな形態変化を捉えることができると期待される。

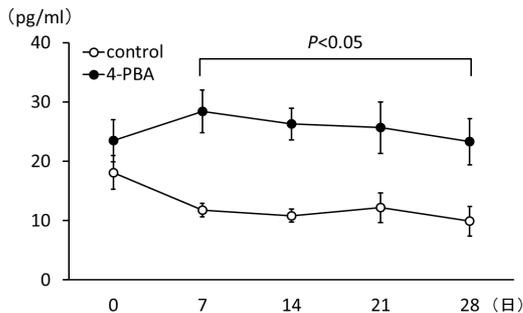
4. 研究成果

(1) rAAV ベクターの作製と FNDI マウス視索上核への投与

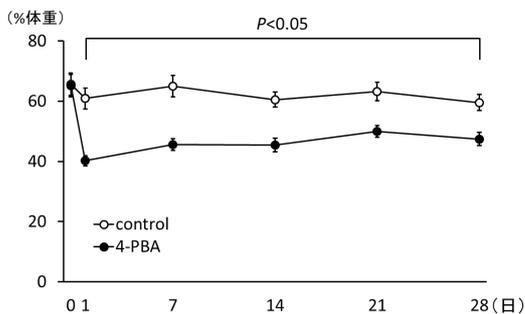
AVP プロモーターの下流に BiP shRNA, BiP, または Venus をそれぞれ導入した rAAV ベクターを作製した。3ヶ月齢の雄性 FNDI マウスの視索上核に、脳定位固定装置を用いて AVP プロモーター制御下 Venus 発現 rAAV ベクターをマイクロインジェクションしたところ、免疫組織化学にて AVP ニューロン特異的な Venus の発現を認め、この実験系の有効性を確認した。次に BiP shRNA および BiP を導入した rAAV ベクターを FNDI マウスの視索上核にマイクロインジェクションすることによる FNDI マウスの AVP ニューロン特異的な BiP のノックダウンおよび過剰発現を施行した。この実験は現在進行中であり、実験の完遂には当初の想定以上に時間を要する可能性が考えられたため、上記と並行して下記の実験を行った。

(2) ケミカルシャペロン 4-PBA が FNDI マウスの表現型や AVP ニューロンにおける ERAC の形成に及ぼす影響の検討

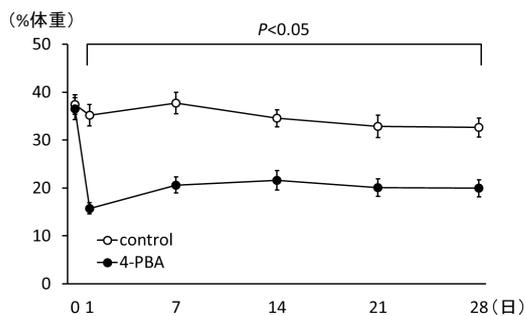
BiP と同様の作用により小胞体内のタンパクの折りたたみを促進するケミカルシャペロンである 4-PBA を FNDI マウスに投与しその効果を評価することにより、FNDI マウスの AVP ニューロンにおける BiP の役割を検討することができると考えた。3 ヶ月齢の雄性 FNDI マウスに 1 ヶ月間 4-PBA を投与すると、尿中 AVP (図 1) および尿浸透圧は増加し飲水量が減少する (図 2) と共に多尿は改善した (図 3)。



(図1) FNDIマウスにおける4-PBAの尿中AVPに与える影響



(図2) FNDIマウスにおける4-PBAの飲水量に与える影響



(図3) FNDIマウスにおける4-PBAの尿量に与える影響

次に 3 ヶ月齢の雄性 FNDI マウスに、1 週間 2% 食塩水と共に 4-PBA を投与し同様の検討を行った。2% 食塩水の投与により塩分負荷と高度の脱水が誘導され、AVP の産生が強力に刺激される。2% 食塩水の投与により尿中 AVP は増加するものの尿量および飲水量は増加して体重は減少し、AVP ニューロンの細胞死を認めた。一方で 4-PBA を同時投与することにより尿中 AVP はさらに増加し、それに伴い尿量および飲水量の増加と体重減少は軽減し、AVP ニューロンの細胞死は抑制された。また、2% 食塩水の投与により FNDI マウスの

40%が高度の脱水により死亡したが、4-PBA の同時投与では全例が生きていた。以上より、4-PBA の投与によって FNDI マウスの表現型の進行が抑制されることが明らかとなった。ERAC の形成に関しては、4-PBA の投与により AVP ニューロンの ERAC は減少した。4-PBA が FNDI マウスの表現型の進行を抑制したことを考慮すると、4-PBA は変異タンパクの処理を促進することで ERAC を減少させたものと考えられた。

ERAC の形成における BiP の直接的な役割を検討する目的に、今後も引き続き rAAV ベクターを用いた FNDI マウスの AVP ニューロン特異的な BiP のノックダウンおよび過剰発現による検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 4 件)

椽谷 昌佳, 萩原 大輔, 宮田 崇, 森下 啓明, 有馬 寛, 4-PBA は家族性中枢性尿崩症モデルマウスにおいて多尿の進行およびバソプレシンニューロンの細胞死を抑制する, 第 90 回日本内分泌学会学術総会, 2017 年 4 月 20 日~22 日, ロームシアター京都, 京都市勧業館みやこめっせ (京都府・京都市)

椽谷 昌佳, 萩原 大輔, 宮田 崇, 森下 啓明, 光本 一樹, 須賀 英隆, 有馬 寛, 4-PBA は家族性中枢性尿崩症の小胞体ストレスを軽減するモデルマウスを用いた検討, 第 27 回バソプレシン研究会, 2017 年 1 月 7 日, TKP 有楽町会議室 (東京都・千代田区)

萩原 大輔, 宮田 崇, 椽谷 昌佳, 東 慶成, 森下 啓明, 有馬 寛, バソプレシンニューロンと小胞体ストレス, 第 43 回日本神経内分泌学会学術集会, 2016 年 10 月 14 日~15 日, アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)

椽谷 昌佳, 萩原 大輔, 宮田 崇, 東 慶成, 森下 啓明, 有馬 寛, 家族性中枢性尿崩症モデルマウスに対するケミカルシャペロン 4-Phenylbutyric acid の治療効果の検討, 第 43 回日本神経内分泌学会学術集会, 2016 年 10 月 14 日~15 日, アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 大輔 (HAGIWARA, Daisuke)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号: 70710086

(2) 研究分担者 なし