

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18590955
 研究課題名（和文） 小胞体ストレス誘導遺伝子，スタニオカルチン 2 の細胞死抑制作用と神経疾患での役割
 研究課題名（英文） Characterization of ER stress induced gene, stannicalcin 2 in apoptosis and neurological diseases.
 研究代表者
 伊東 大介（ITO DAISUKE）
 慶應義塾大学・医学部・講師
 研究者番号：80286450

研究成果の概要（和文）：小胞体ストレス誘導遺伝子、スタニオカルチン 2(STC2)作用を個体レベルで検討し、病態、特に老化での役割を明らかにする STC2 遺伝子改変マウスを作成し解析した。老化モデル *Klotho* マウスとの交配したところ、STC2 ノックアウトにより *Klotho* マウスの重要な表現型の一つである骨軟化症を軽減していた。STC2 の重要な機能として骨代謝への作用が *in vivo* のレベルで示唆された。

研究成果の概要（英文）：The role of a novel ER stress related gene, Stanicalcin2 (STC2) remain clear. To clarify the function of STC2 *in vivo*, we generated STC2 knock out mice. Deletion of STC2 rescuers osteomalasia in *Klotho* insufficiency, suggesting STC2 associated with bone metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,700,000	750,000	4,450,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：小胞体ストレス，スタニオカルチン 2，アポトーシス，ノックアウトマウス，老化

1. 研究開始当初の背景

近年、小胞体ストレスが疾患の病態に直接関連しているとする報告が多数あり、コンフォメーション病、あるいはフォールディング病として新しい疾患概念として定着してきた⁽¹⁾。特に、アルツハイマー病、パーキンソン病をはじめとする多くの神経変性疾患では、脳内で異常蛋白質の蓄積が観

察され、小胞体ストレスが神経変性疾患の共通の病態メカニズムではないかと注目されている。さらに、脳虚血においても PERK、IRE の活性化が観察され、小胞体ストレスは神経変性の病態に広く関わっていることが示唆されている。しかし、その詳細な分子機構は依然不明である。我々は、マイクロアレイを用いて新規 UPR 誘導遺伝子

stanniocalcin2 (STC2) の同定に成功した⁽²⁾。さらに、このSTC2は、小胞体ストレスの細胞死を抑制する可能性を見出した。これらの検討より、STC2は脳梗塞の神経細胞死に関与し、STC2の細胞保護作用は神経疾患の新しい治療ターゲットとして注目されている。さらに、老化促進マウス、klothoマウスの腎臓においてSTC2の発現が上昇し、老化にも関与している可能性が示唆されている⁽³⁾。本研究では、STC2遺伝子改変マウスを作成し、STC2作用を個体レベルで検討し、病態、特に虚血性脳血管障害、老化での役割を明らかにするとともに、新規の創薬への可能性を見出すことを目的とする。

文献: 1. C. Soto, Nat Rev Neurosci 4, 49 (2003). 2. D. Ito et al., Mol Cell Biol 24, 9456 (2004). 3. K. Yahata, Biochem Biophys Res Commun 310, 128 (2003)

2. 研究の目的

Aim1: STC2 の神経細胞保護作用の分子機構の解明 小胞体ストレスでのアポトーシスは、Ca²⁺、ミトコンドリア/チトクローム C、caspase-4/12、ER oxidase など幾つかの細胞死の経路が存在することが報告されている^(1,2)。一方、STC の作用機序は、受容体を含め細胞外、細胞内ともにその分子機構はまったく不明である。本研究の目標として STC2 の細胞保護作用がどの経路に関与するのか、また、その細胞内シグナル伝達機構を上述の培養細胞系を用いて詳細な分子機構を明らかにする。

Aim2: STC2 ノックアウトマウスの作成と STC2 機能の In vivo 解析 現在までに、STC2 の個体レベルの機能はほとんど検討されていない。また、我々の検討では脳虚血、アルツハイマー病モデルマウスで STC2 の発現が神経細胞で亢進が観察されているが、疾患モデルでの意義に関してはこれまでほとんど検討されていない。第二の目標として STC2 ノックアウトマウスを作成し In vivo での STC2 の生理作用、役割を検討するとともに疾患モデル(脳虚血、老化)を適用することによりその病態での意義を明らかにする。

Aim3: 老化と STC2 の関連

老化における小胞体機能異常にはいくつかの報告が見られる。加齢に伴い、小胞体での Ca²⁺ uptake の異常、小胞体カルシウムチャネルの活性低下が指摘されている⁽³⁾。また、前述のごとく加齢に伴う common disease の病態(糖尿病、アルツハイマー病、パーキンソン病、動脈硬化、II 型糖尿病)に小胞体ストレスは強く関与していることが示唆されている。しかし、個体レベルでの小胞体ストレスと老化の関連には明確なエビデンスは得られていない。最近、老化促進マウスとして確立している klotho マウス⁽⁴⁾は、加齢に伴い

腎組織で STC2 の発現が亢進しており老化のメカニズムに STC の関与を示唆する報告がなされた⁽⁵⁾。我々の検討でも加齢に伴い大脳皮質で STC2 が発現亢進することを観察している。Aim3 の目標として、STC2 ノックアウトマウスの老化現象を生化学的、組織学的検索を行いその生理作用を検討する。さらに、klotho マウスと交配し、寿命(生存曲線)加齢に伴う神経細胞の減少、動脈硬化、骨密度、肺気腫、皮膚の萎縮などの老化現象は詳細に検討する。

文献: 1. Xu C, et al. J Clin Invest 115, 2656 (2005). 2. C. Y. Liu, R. J. Kaufman, J Cell Sci 116, 1861 (2003). 3. W.J. Pottorf et al. J Auton Pharmacol 20, 281 (2000). 4. M. Kuro-o, et al. Nature 390, 45 (1997). 5. K. Yahata et al., Biochem Biophys Res Commun 310, 128 (2003).

3. 研究の方法

Aim1: これまでに、我々は siRNA、強制発現培養細胞にて STC2 が小胞体ストレス細胞保護作用を示すことを確認しているが、現段階ではその分子機構は不明である。STC2 はその構造によりカルシウムのホメオスタシスに関与することが示唆されているが、そのエビデンスは得られていない。さらに、STC の生理活性が、細胞外からか、もしくは細胞内で直接作用するのかも不明である。本研究では、まず、ER-retention signal (KDEL) を C 末端に付加することにより分泌されず細胞内(特に小胞体内)に停留する STC2 の作用も比較する。細胞死の評価は、すでに我々が発表しているごとく、ストレス付加後 Hoechst、Annexin V にて染色し蛍光顕微鏡にてアポトーシス細胞数を測定する。

Aim2: STC2 の個体レベルでの生理作用、そして疾患への関与、役割を解明する目的に、STC2 ノックアウトマウスを作成しその表現型、そして疾患モデルの適用により病態での意義を検討する。ターゲティングストラタジーは、マウス STC2 遺伝子の exon 1 と 2 を nLacZ と neo に置換する (Fig.2A)。Targeting vector は、129 系 ES 細胞への導入、G418 と ganciclovir の 2 剤による薬剤セクションを行い、定法に従いノックアウトマウスを作成する。STC2 ノックアウトマウスは、生化学的、組織学的(H&E、alcian blue 染色)検査を行いその生理作用、発生過程での STC2 の関与を検討する。神経疾患へのアプローチとして、STC2^{-/-}マウスで当研究室ですでに多くの経験がある中大脳動脈一過性閉塞モデル (intraluminal filament 法にて 90 分間閉塞後再灌流)を作成し TUNEL 染色、MAP2 染色、クリスタルバイオレット染色し、Computerized digital image analysis system

(Inquiry, Loats Associates)を用いて梗塞巣を定量する。

Aim3: STC2 の加齢や疾患への関与、役割を In vivo レベルで解明することにある。老化促進マウス *klotho* マウスで STC2 の発現と老化のメカニズムの関与が示唆されている。我々も、加齢大脳皮質に STC2 の発現が亢進していることを確認している。そこで、STC2^{-/-}、STC2^{+/-}、STC2^{+/+}マウスの生存曲線を比較するとともに、寿命、加齢に伴う神経細胞の減少、動脈硬化、骨密度、肺気腫、皮膚の萎縮などの老化現象は、各臓器パラフィン切片を作成し組織学的に詳細に検討する。さらには、*klotho* マウスとの交配によりその表現型の変化を評価し、老化との関連を明らかにする。

4. 研究成果

Aim1: Stanniocalcin2 の神経細胞保護作用の分子機構の解明:

過度もしくは持続する小胞体ストレス下では細胞にアポトーシスが誘導されることが知られている。この細胞死のプロセスは、近年大きく注目され、数多くの報告が見られる。我々は siRNA、強制発現培養細胞にて STC2 が小胞体ストレス細胞保護作用を示すことを確認しているが、現段階ではその分子機構は不明である。まず、STC2 の生理活性が、細胞外からか、もしくは細胞内で直接作用するかを解明するため、小胞体の retention signal (KDEL) を導入し非分泌型 STC2 を作成した。非分泌型 STC2 は、細胞死に対する効果の評価をするため、Hela cells に遺伝子導入そして thapsigargin 投与後、Hoechst にて染色、蛍光顕微鏡にてアポトーシスを同定しその細胞数をカウントした。アポトーシスを示した細胞の割合は、empty vector 20.3±2.6%、野生型 STC2 14.5±1.25%、STC2-KDEL 16.58±2.91% と分泌型 STC2 (野生型) にのみ細胞保護作用を認めたと (p=0.008)、非分泌型 STC2 (STC2-KDEL) には、小胞体ストレス細胞保護作用は認めなかった (Fig.1)。したが

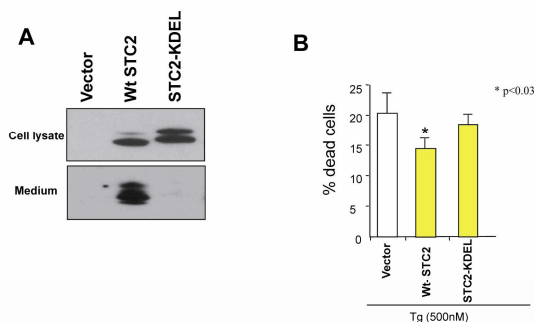


Figure 1. Functional analysis of STC2-ER retention signal
(A) Hela cells were transfected with STC2 or STC2-KDEL plasmids. Cell lysates or medium were immunoprecipitated by anti-STC2. (B) STC2-KDEL dose does not have Cytoprotective property.

って、STC2 の細胞保護作用は、細胞外から

作用していると考えられた。一方、Stanniocalcin 2 は、脳虚血、アルツハイマー病でその発現が亢進することが知られているが、他の変性疾患での作用は不明である。今回、神経変性過程で、小胞体ストレスが関与していることが報告されている遺伝性運動ニューロン疾患、seipinopathy における関与を検討した。変異型 seipin を Neuro2a 細胞に強制発現し、STC2 の発現を検討した。野生型と比して、変異型発現細胞では、小胞体ストレスのマーカーである Bip/GRP78、CHOP の発現が有意にみられた。また、ウェスタンブロットにおいて、STC2 においてもその発現が亢進していた。したがって、STC2 は運動ニューロン疾患、seipinopathy の病態にも関与している可能性が示唆された (5. 主な発表論文等 英文論文 (3) 参照)。

Aim2: Stanniocalcin2 ノックアウトマウスの作成と Stanniocalcin2 機能の In vivo 解析: 本研究の目標は STC2 の個体レベルでの生理作用、そして疾患への関与、役割を解明することにある。そのために STC2 ノックアウトマウスを作成しその表現型を解析した (Fig. 2, 3)。

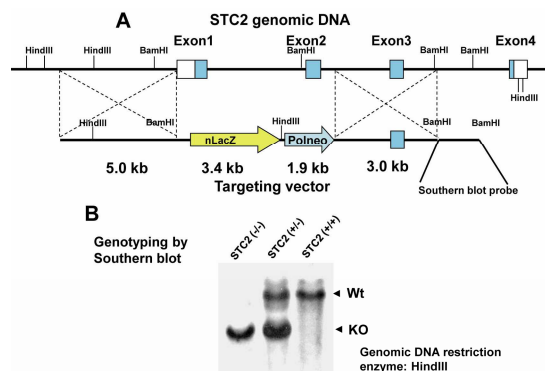


Figure 2 Gene Targeting Strategy

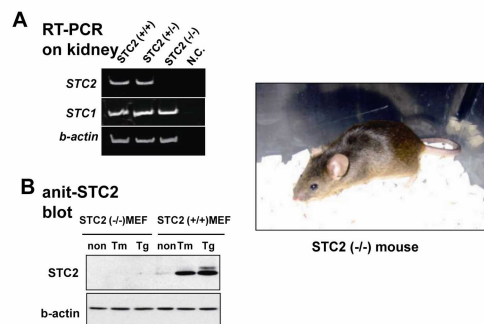


Figure 3 Abolished expression of STC2 gene in STC2(-/-) mice.

形態学的、組織学的な検討を行ったが、有意な異常は見いだせなかった。繁殖力に問題はなく、生後 1 年たったマウスにも大きな異常は見られていない。さらに、ロータロッドによる運動機能の評価でも有意な変化は認められなかった。

神経疾患へのアプローチとして、当研究室ですでに多くの経験がある中大脳動脈一過性閉塞モデル (intraluminal filament 法にて90分間閉塞後再灌流) を施し、脳虚血後72hでNeuN染色にて梗塞巣を定量した(wild type n=4, KO n=4)。しかし、統計学的な有意差は認められなかった(梗塞巣の面積、wild type 35.6±6.8%, KO 37.1±12%)。

Aim3: 老化とSTC2の関連:

一方、STC2と老化との関連を検討するため、老化促進マウス Klotho マウスと STC2 ノックアウトマウスを交配し、Klotho、STC2 のダブルノックアウトマウスを作成した。Klotho マウスの重要な表現型である低血糖、カルシウムホメオスタシスについて検討した。空腹時血糖、血清カルシウム、リン濃度を、kl/kl,STC2(-/-)と kl/kl,STC2(+/-)を比較した限り、いずれにおいても有意差を見出せなかった。しかし、Klotho マウスの重要な表現型の一つである骨軟化症については、kl/kl,STC2(-/-)では骨代謝が改善していることを見出した。すなわち、kl/kl,STC2(-/-) : 31.3±2.4 (mg/cm²) (オス)、29.1±2.4 (メス)、kl/kl,STC2(+/-) : 28.4±2.1 (オス)、26.8±1.4 (メス)と STC2(-/-)ではいずれも有意に骨密度(DEXA)が改善していた((p=0.03 (オス), p=0.04 (メス)) (Figure 4)。さらに、類骨量、石灰化速度も有意に改善していた。したがって、STC2 の新規の機能として骨の石灰化抑制に作用することを見出した(Figure 5)。今後は、STC2 を利用したによる骨粗鬆症への新たな治療戦略を確立したい。

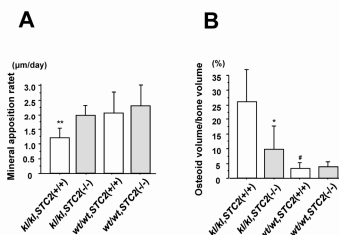


Figure 5 Bone mineral density (A) and osteoid volume (B) of the femur in 6-week old kl/kl and/or STC2^(+/-) mice.
*p<0.01, kl/kl,STC2(+/-) vs kl/kl,STC2(-/-), #p<0.0005, kl/kl,STC2(+/-) vs wt/wt,STC2(+/-), **p<0.04, kl/kl,STC2(+/-) vs kl/kl,STC2(-/-)

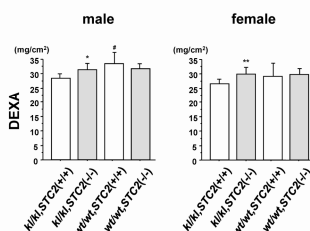


Figure 4 Dualenergy x-ray absorptiometry (DEXA) in 6-week old kl/kl and/or STC2^(+/-) mice. *p<0.05, kl/kl,STC2(+/-) vs kl/kl,STC2(-/-), #p<0.02, kl/kl,STC2(+/-) vs wt/wt,STC2(+/-), **p<0.04, kl/kl,STC2(+/-) vs kl/kl,STC2(-/-)

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14件)

Nishimoto Y, Ito D, Yagi T, Nihei Y, Tsunoda Y, Suzuki N. Characterization of alternative isoforms and inclusion body of the TAR DNA binding protein-43. J Biol Chem. 2010 Jan 1;285(1):608-619. 査読有

Yagi T, Hattori H, Ohira M, Nakamichi K, Takayama-Ito M, Saijo M, Shimizu T, Ito D, Takahashi K, Suzuki N. Progressive multifocal leukoencephalopathy developed in incomplete Heerfordt syndrome, a rare manifestation of sarcoidosis, without steroid therapy responding to cidofovir. Clin Neurol Neurosurg. 2010 Feb;112(2):153-156. 査読有

Ohira M, Ito D, Shimizu T, Shibata M, Ohde H, Suzuki N. Retinopathy: an overlooked adverse effect of interferon-beta treatment of multiple sclerosis. Keio J Med. 2009; 58(1): 54-56. 査読有

Ito D, Fujisawa T, Iida H, Suzuki N. Characterization of seipin/BSCL2, a protein associated with spastic paraplegia 17. Neurobiol Dis. 2008 Aug;31(2):266-277. 査読有

Hattori H, Nagata E, Oya Y, Takahashi T, Aoki M, Ito D, Suzuki N. A novel compound heterozygous dysferlin mutation in Miyoshi myopathy siblings responding to dantrolene. Eur J Neurol. 2007 Nov;14(11):1288-1291. 査読有

Ito D, Suzuki N. Molecular pathogenesis of seipin/BSCL2-related motor neuron diseases. Ann Neurol. 2007 Mar;61(3):237-250. 査読有

Hattori H, Sonoda A, Sato H, Ito D, Tanahashi N, Murata M, Saito I, Watanabe K, Suzuki N. G501C polymorphism of oxidized LDL receptor gene (OLR1) and ischemic stroke. Brain Res. 2006 Nov 22;1121(1):246-249. 査読有

Hattori H, Sato H, Ito D, Tanahashi N, Murata M, Saito I, Watanabe K, Suzuki N. A561C polymorphism of E-selectin is associated with ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population without diabetes mellitus and hypercholesterolemia. Brain Res. 2006 Sep 7;1108(1):221-223. 査読有

[学会発表](計28件)

二瓶義廣, 八木拓也, 伊東大介, 小塚有史, 吉崎崇仁, 赤松和土, 岡田洋平, 川村雅文, 高橋慎一, 岡野栄之, 鈴木則宏 TDP-43 プロテノパチーの病態解明へ

のアプローチ 孤発性筋萎縮性側索硬化症患者からの iPS 細胞樹立 - 第 28 回日本認知症学会, 仙台, 2009. 10.21
小堺有史, 伊東大介, 山下修二, 高橋一司, 岡田保典, 鈴木則宏. Klotho マウスにおける線条体黒質ドパミン系の解析. 第 28 回日本認知症学会, 仙台, 2009. 10.20

Y. Nishimoto, D. Ito, T. Yagi, Y. Nihei, Y. Tsunoda, N. Suzuki. Characterization of proteolytic cleavage and inclusions of the TDP-43 protein. Neuroscience 2009, Chicago, 2009. 10.19

伊東大介. TDP-43 プロテノパチー : 分子病態解明へのアプローチ 第 23 回老年期認知症研究会, 東京, 2009. 07.13

八木 拓也, 伊東大介, 二瓶 義廣, 吉崎 崇仁, 高橋 一司, 赤松 和土, 岡田 洋平, 大山 学, 天谷 雅行, 岡野 栄之, 鈴木 則宏. 孤発性パーキンソン病患者からの iPS 細胞の樹立. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 2009. 05.22
伊東大介, 角田桂子, 鈴木則宏. セイピン封入体は新規の小胞体蛋白質品質管理機構である. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 2009. 05.21

Kosakai A, Ito D, Takahashi K, Yamashita S, Okada Y, and Suzuki N. Evaluation of the dopaminergic system in the substantia nigra in aging-accelerated klotho mice. 第 26 回日本認知症学会, 大阪, 2008.10.18

小堺有史, 伊東大介, 山下修二, 高橋一司, 岡田保典, 鈴木則宏. Klotho マウスにおける線条体黒質ドパミン系の解析. 第 27 回日本認知症学会, 前橋, 2008.10.14

西本祥仁, 伊東大介, 鈴木則宏. ヒト脳組織における TDP-43 の選択的スプライシングバリエーションの同定と生化学的解析. 第 27 回日本認知症学会, 前橋, 2008.10.11

伊東大介, 藤澤大志, 鈴木則宏. SPG17、dHMN-V 原因遺伝子 Seipin の細胞内封入体と機能ドメインの解析 第 49 回日本神経学会総会, 横浜, 2008.05.16

Zeiger W, Ito D, Keat M, Pei S, Villereal M, and Thinakaran G. Stanniocalcin 2 Modulates Calcium Homeostasis and Cellular Viability. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Keystone, Co, U.S.A. 2008.03.05

伊東大介, 鈴木則宏. SPG17、dHMN-V 原因遺伝子 Seipin の発現部位と細胞内局在の検討. 第 48 回日本神経学会総会, 名古屋, 2007.05.17

伊東大介, 鈴木則宏. SPG17、dHMN-V 原因遺伝子 Seipin 変異による神経変性

分子機構. 第 47 回日本神経学会総会, 東京, 2006.05.12

〔図書〕(計 0 件)
〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 大介 (ITOH DAISUKE)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号 : 80286450

(2) 研究分担者

鈴木 重明 (SUZUKI SHIGEAKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号 : 50276242

(3) 連携研究者

なし