

平成 22 年 3 月 3 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790162

研究課題名 (和文) 神経細胞へのリソソームカテプシン D 再取り込み機構の解析

研究課題名 (英文) Reincorporation of cathepsin D in neurons of mouse brain.

研究代表者

柴田 昌宏 (SHIBATA MASAHIRO)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：10343253

研究成果の概要 (和文)：

中枢神経特異的カテプシン D 欠損マウスを作成し解析したところ、生後約 40 日前後で神経性セロイドリポフスチノーシス同様の症状を呈して死亡することが明らかとなった。同マウスの神経細胞ではカテプシン D の遺伝子発現がないにもかかわらず、カテプシン D タンパクが発現していることが分かった。さらに、リソソーム酵素の輸送経路を観察しやすい鶏胚モデルの構築を行い、長期間安定的に遺伝子を発現させることに成功した。

研究成果の概要 (英文)：

Central nervous system specific cathepsin D (CD) deficient mice (CD:NesCre) died around P40 by seizures and their phenotype was similar to neuronal ceroid lipofuscinosis. We noticed that CD protein was detected in neurons of CD:NesCre mice by immunohistochemistry, although CD mRNA was not expressed in the neurons. These results indicate that CD:NesCre neurons receive CD from other type of cells. We have also developed the chick experimental model to examine the transport system of lysosomal enzymes and established the stable expression system of transgenes into chick genome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000 円	510,000 円	2,210,000 円
2009 年度	1,600,000 円	480,000 円	2,080,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000 円	990,000 円	4,290,000 円

研究分野：解剖学

科研費の分科・細目：解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：リソソーム、カテプシン、ライソゾーム病、セロイドリポフスチノーシス

## 1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病 (lysosome disease) は、リソソーム酵素の欠損または機能不全により起こる先天性代謝異常疾患群である。ムコ多糖症、ポンベ病、バッテン病、I-cell 病など、現在約 30 種類の疾患が報告されており、欠損する酵素によってその症状は異なるが、本来リソソームで分解されるべき基質 (糖、脂質、タンパク質など) が蓄積するということが共通している。ライソゾーム病の治療には主に酵素補充療法と骨髄移植があり、良好な効果が得られている。しかし、血液脳関門の存在により中枢神経系に対しては有意義な効果を得るに至っていないのが現状である (Urayama 2004)。言い換えると、リソソーム酵素が血液脳関門を越えて神経細胞へ到達すれば、ライソゾーム病の治療が大きく前進することになる。

リソソームには代表的なプロテアーゼとしてカテプシン B, D, L (CB, CD, CL) が存在する。CB と CL はシステインプロテアーゼ、CD はアスパラギン酸プロテアーゼとして分類されており、CD の至適 pH が CB, CL のそれよりも低いことから、最終的なタンパク分解は CD が担っていると考えられる。事実、申請者らが CB, CD, CL 欠損マウスをそれぞれ解析し、CD 欠損マウスのみライソゾーム病様の症状を呈して死に至ることを明らかにした (Koike 2000, Koike 2005)。CD がヒトのセロイドリポフスチノーシスの原因遺伝子の 1 つであることが後に明らかとなり、CLN10 と命名された。

しかし、カテプシン D 欠損マウスや他のライソゾーム病では免疫系にも異常が認められることから、同疾患の発現が、神経系由来なのか、免疫系の異常による 2 次的な要因によるものなのかははっきりしなかった。そこで中枢神経特異的カテプシン D 欠損マウスを作成し解析することとした。

## 2. 研究の目的

細胞内で古くなったオルガネラや構造タンパク質、あるいは不溶性のタンパクなどの「長寿命タンパク質」はリソソーム・オートファジー系によって非特異的に分解され、その分解産物は細胞によって再利用される。この過程ではタンパク質加水分解酵素であるカテプ

シン B, D, L が主要な役割を果たし、以下のことが明らかとなっている。

1) カテプシン B あるいは L 欠損マウスは野生型とよく似た表現型を呈す。

2) カテプシン D 欠損マウスはネクロシスを伴う消化管の萎縮や、神経細胞内に封入体が形成され神経性セロイドリポフスチン蓄積症 (NCL) と同様の症状を呈して生後 26 日で死に至る。

さらに、老化に伴いカテプシン D のタンパク質発現量と酵素活性が上昇することや、脳虚血、アルツハイマー病、パーキンソン病など、種々の神経変性疾患においてカテプシン D が関与していることが報告されており、神経細胞においてカテプシン D は非特異的分解酵素という役割以外に、非常に重要な機能を有していることが考えられる。

以上のことから、本研究では神経細胞、特に成体脳におけるカテプシン D の役割を明らかにし、さらに、リソソーム酵素の神経細胞への再取り込みの可能性を検証し、その機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経特異的 CD 欠損マウス

マウスカテプシン D ゲノムの exon2 を標的とした flox マウスと、Nestin プロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現する nestin-Cre マウスを交配させ、神経特異的カテプシン D 欠損マウスを作成した。

同マウスを経時的に体重測定した。

### (2) 免疫組織化学

神経特異的カテプシン D 欠損マウスを 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定し、凍結切片を作成した。同切片をカテプシン D 抗体とミトコンドリア ATP synthase subunit C 抗体で染色した。

### (3) 実験モデル生物の構築

メダカ由来のトランスポゾンである To12 を利用した。レポーター遺伝子として GFAP を用い、同遺伝子を To12 配列で挟んだプラスミドベクターを構築した。E3 鶏胚の神経管にベクターをマイクロインジェクターで注入し、生体エレクトロポレーション法により遺伝子導入した。その後発育を継続し孵卵開始から 15 日目以降に鶏胚を取り出して

4%パラホルムアルデヒドで固定し、共焦点顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

神経特異的カテプシンD欠損マウスの体重変化を図1に示す。全身性のカテプシンD欠損マウスは生後約15日ごろから体重の増加が止まり、その後減少するが、神経特異的カテプシンD欠損マウスは、生後約20日頃から40日頃までほぼ体重の増減が認められなかった。

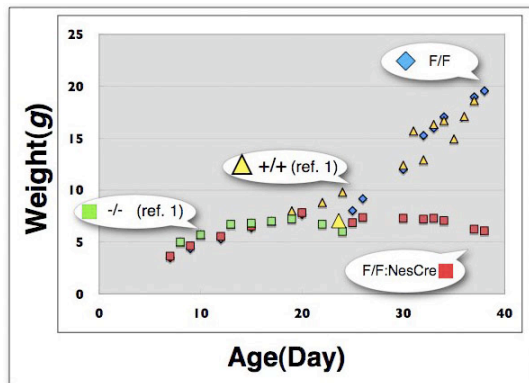


図1

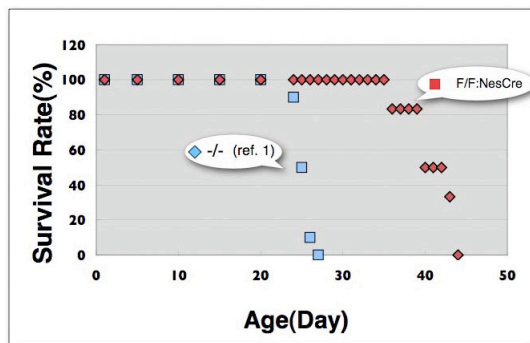


図2

また、神経特異的カテプシンD欠損マウスの生存率を調べた。全身性カテプシンD欠損マウスは生後約26日でほとんどの個体が死亡するが、神経特異的カテプシンD欠損マウスは個体差が大きく、生後約30日頃から死に始め、長寿命の個体では42日まで生存した。図2参照。

神経特異的カテプシンD欠損マウスの脳凍結切片を作成し、神経性セロイドリポフスチノーシスの診断に用いられる、ミトコンドリア ATP synthase subunit C の抗体で染色した。subunit C はミトコンドリア内膜内に局在するため、通常は抗原性が低く免疫染色されない。しかし、神経性セロイドリポフスチ

ノーシスの神経細胞では代謝されずにリソソーム内に蓄積するため、リソソームに蓄積した subunit C が染色される。図3を参照。

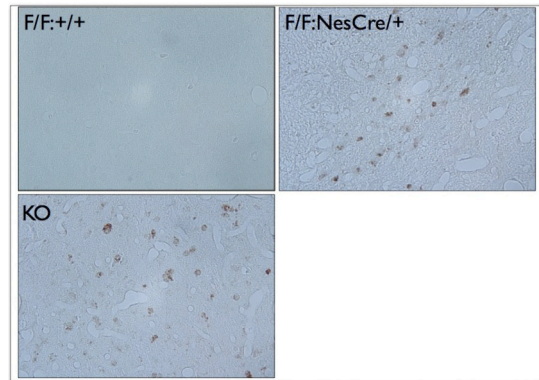


図3

この結果は、神経特異的カテプシンD欠損マウスが神経性セロイドリポフスチノーシスのモデルとなることを示すと同時に、同疾患は免疫系の異常とは独立して発症し、同疾患の主因であることを示している。

神経特異的カテプシンD欠損マウスの脳凍結切片をカテプシンD抗体で染色すると、同遺伝子が欠損しているにもかかわらず、カテプシンDタンパクが神経細胞に局在していることが分かった。図4参照。

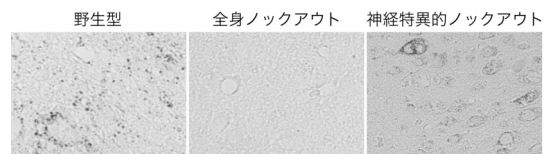


図4

この結果は、神経細胞がリソソーム酵素を再取り込みしていることを示している。

この再取り込み機構を明らかにするため、リソソーム酵素を発現させるモデル生物の構築を行った。鶏胚は遺伝子導入が容易であるが、遺伝子発現の持続性に問題があった。そこで、メダカ由来のトランスポゾンであるTo12を利用し、鶏胚で長期間安定的に遺伝子発現が認められるか調べた。レポーター遺伝子にはGFPを用いた。図5参照。

神経細胞へリソソーム酵素を運ぶ細胞の候補として、アストロサイトを第一の候補とした。そこで、アストロサイト特異的に遺伝子発現をさせるため、GFAPプロモーターを利用し、その下流にレポーター遺伝子としてGFPを組み込んだ遺伝子カセットを作成し、同カセットをTo12配列で挟んだコンストラクトを構築した。孵卵3日目の鶏胚の神経管

に遺伝子を注入し、生体エレクトロポレーション法によって遺伝子導入を行った。その後、15日から20日目（孵化直前）まで孵卵器で保育し、4%パラホルムアルデヒドで固定し観察した。図6参照。

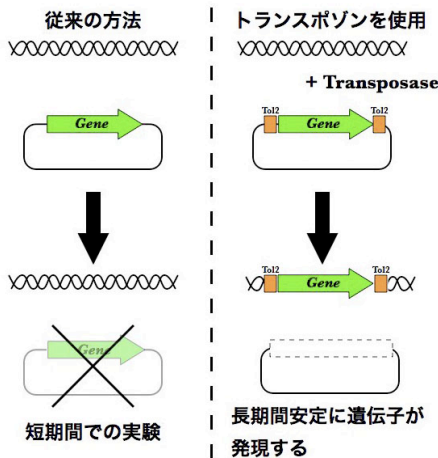


図5

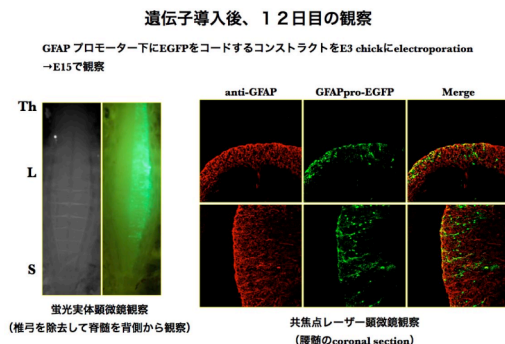


図6

GFP が長期間安定に発現していることが明らかとなった。

本システムを利用することで、任意の細胞にリソソーム酵素を発現させることが出来、リソソーム酵素の輸送経路の解明が期待出来るとともに、ライソゾーム病の治療にも貢献出来るものと思われる。

## 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3件)

Autophagic neuron death.  
Uchiyama Y, Koike M, Shibata M, Sasaki M.

Methods Enzymol. 2009;453:33-51. (査読無)

Participation of autophagy in the initiation of graft dysfunction after rat liver transplantation.

Gotoh K, Lu Z, Morita M, Shibata M, Koike M, Waguri S, Dono K, Doki Y, Kominami E, Sugioka A, Monden M, Uchiyama Y.

Autophagy. 2009 Apr;5(3):351-60 (査読有)

Autophagic neuron death in neonatal brain ischemia/hypoxia.

Uchiyama Y, Koike M, Shibata M.

Autophagy. 2008 May 16;4(4):404-8. (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

「鶏胚での条件的遺伝子発現抑制法」  
柴田昌宏、佐藤昇、第115回日本解剖学会、2010年3月28日、岩手県民会館

「Efficient gene transfer to developing chick astrocytes by Tol2 transposition」  
M. Shibata, R. Inoue, N. Sato  
第35回日本神経科学会、2009年9月16日、名古屋国際会議場

「Lysosomal cathepsin D in neurons is in part delivered from glial cells.」  
M. Shibata, M. Koike, and Y. Uchiyama  
第38回米国神経科学会、2008年11月17日、ワシントンDC、米国

「Reincorporation of cathepsin D in neurons of mouse brain.」  
M. Shibata, M. Koike, and Y. Uchiyama  
第34回日本神経科学会、2008年7月9日、東京国際フォーラム

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴田 昌宏 (SHIBATA MASAHIRO)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号：10343253

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし