

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月22日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500326

 研究課題名（和文） 変性オリゴデンドロサイトによる神経細胞 α -synuclein 蓄積の抑制の検討

研究課題名（英文） Inhibiting neuronal alpha-synuclein accumulation caused by oligodendrocytic inclusions

研究代表者

矢澤 生 (YAZAWA IKURU)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・バイオリソース研究室・室長

研究者番号：20312217

研究成果の概要（和文）：

多系統萎縮症は難治性の神経変性疾患である。多系統萎縮症の患者脳ではグリア細胞と神経細胞にタンパク質 (α -synuclein) が蓄積して神経変性を起こす。本研究では多系統萎縮症のモデルマウスと初代培養細胞の解析により、神経細胞に起こるタンパク質蓄積の阻害による神経変性に対する治療効果を検討した。神経シナプスの電気生理学的な解析により、タンパク質蓄積の抑制により障害されたシナプス機能が回復した。

研究成果の概要（英文）：

Multiple system atrophy is a neurodegenerative disease caused by α -synuclein accumulation in oligodendrocytes and neurons. We generated a transgenic mouse model in which human α -synuclein was overexpressed in oligodendrocytes. Our previous studies have revealed that oligodendrocytic α -synuclein inclusions induced neuronal α -synuclein accumulation, resulting in progressive neuronal degeneration in mice. We also demonstrated that an insoluble complex of α -synuclein and β -III tubulin in microtubules progressively accumulated in neurons. α -Synuclein accumulation is increased in the presynaptic terminals of transgenic mice neurons and may reduce neurotransmitter release. In the present study, we investigated the effects of neuronal α -synuclein accumulation on synaptic function in transgenic mice. Using whole-cell patch-clamp recording, we demonstrated synaptic dysfunction in transgenic mice, and a microtubule depolymerizing agent restored the normal function in transgenic mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳神経疾患、病理学、神経科学、オリゴデンドロサイト、神経変性

1. 研究開始当初の背景

多系統萎縮症(MSA)は遺伝性が明らかでない、難治性の神経変性疾患である。今日、MSAの神経変性の発病機構は解明されておらず根本的な治療法の開発は遅れている。本研究ではMSAのモデル動物や初代培養細胞の解析により根本的な治療法開発をめざした。2005年、我々はMSA患者脳組織を解析し α -synucleinが不溶化してグリア細胞や神経細胞に蓄積することを示した(Yazawa et al, Neuron 2005)。病理学的には蓄積蛋白を持つグリア細胞の封入体はglial cytoplasmic inclusion(GCI)と呼ばれ、主としてオリゴデンドロサイトに局在する。そこでオリゴデンドロサイトにヒト野生型 α -synucleinを強制発現するトランスジェニック(TG)マウスを作製し、GCI形成などのMSAの病理学的特徴を有する疾患モデルとして報告した。TGマウスではGCI形成が神経細胞の変性を誘導し、進行性の運動機能の低下や脳萎縮などの神経変性が観察された(Yazawa et al, Neuron 2005)。TGマウス脳由来の初代培養細胞により、TGマウス脳神経細胞に蓄積するマウス α -synucleinはMSA患者脳のヒト α -synucleinと同様に不溶化を起こす。そして、 α -synucleinと同じように不溶化を起こす蛋白として微小管の構成蛋白である β IIIチューブリンを同定した(Nakayama et al, Am J Pathol 2009)。マウス脳神経細胞ではマウス α -synucleinと β IIIチューブリンが結合して α -synuclein蓄積を起こすことを示し、微小管の重合阻害剤(ノコダゾール)は α -synucleinの不溶化と蓄積を抑制することを明らかにした。

2. 研究の目的

多系統萎縮症(MSA)ではオリゴデンドロサイトや神経細胞に α -synucleinが蓄積して神経変性を起こす機序は明らかではない。昨年までに、我々はTGマウスを使ってGCIを形成したオリゴデンドロサイトが神経細胞の変性誘導することを明らかにした。本研究では神経細胞変性の原因となる α -synuclein蓄積を治療標的として、神経細胞の変性を抑制する方法を検討した。TGマウス由来の初代培養細胞等の*in vitro*研究で解明した α -synuclein蓄積の抑制結果から、MSAモデルマウス個体での抑制効果を検証した。さらに、選択的に α -synuclein蓄積の抑制効果を発揮する薬剤や分子を明らかにし臨床応用可能な治療法の実現に取り組む。

3. 研究の方法

1) 疾患モデルマウスの作製：

多系統萎縮症(MSA)におけるGCIの病的な役割を解明するために、マウス脳のオリゴデ

ンドロサイトにヒト野生型 α -synucleinを選択的に強制発現させるトランスジェニック(TG)マウスを作製した。TGマウス脳では、ヒト α -synucleinのGCI形成により神経細胞内にマウス内因性 α -synucleinの蓄積が誘導され、進行性の神経細胞の変性が起こることを示した。TGマウス脳から神経細胞を含む初代培養細胞を樹立し、マウス神経細胞に起こる α -synuclein蓄積のメカニズムを解析した。

2) TGマウス脳由来初代培養の樹立：

初代培養細胞を組織学的に観察した。蓄積するタンパク質の不溶化や細胞死について、生化学的な解析や免疫組織染色などにより観察した。

3) 薬剤による α -synuclein蓄積の抑制の検討：

α -synuclein凝集体形成について抑制効果があることが知られるリファンピシンと微小管重合阻害剤のノコダゾールについて検討した。次にノコダゾール α -synuclein蓄積の抑制効果をマウス初代培養細胞及び個体で検討した。免疫組織学的な検討及び生化学的な定量によりマウス α -synucleinの蓄積を検討した。

4) 神経シナプスの機能解析：

TGマウスではGCI形成により異常な α -synuclein凝集体は神経細胞の神経終末に存在したことより、 α -synucleinの蓄積はシナプス機能に関与する可能性が考えられた。TGマウス脳組織をパッチクランプ法により電気生理学的に神経細胞シナプスの機能について解析した。 α -synuclein蓄積による機能障害を明らかにし、ノコダゾールを4~12週間投与しノコダゾールによる不溶化したマウス α -synuclein蓄積への影響を観察した。

4. 研究成果

1) 微小管脱重合による α -synuclein蓄積の抑制

α -synucleinと同じように不溶化を起こす蛋白として微小管の構成蛋白である β IIIチューブリンを同定し、2蛋白間の結合が α -synuclein蓄積に関与することを示した(Nakayama et al, Am J Pathol 2009)。そこで、微小管の脱重合による α -synuclein蓄積への効果を検討した。最初に大腸菌で α -synucleinとチューブリンを各々発現させて混合して不溶化した凝集体を形成させる。 α -synucleinの凝集を阻害することが知られるリファンピシンと同様に、ノコダゾールでも α -synuclein凝集体形成は阻害できることを確認した。一方、TGマウスの初代培養ではリファンピシンによる不溶化した α -synucleinの蓄積抑制はできず、ノコダゾー

ルによる蓄積抑制だけが可能であった。以上の結果より、GCIにより2次的に誘導される神経細胞のマウス α -synuclein蓄積は、 α -synuclein間の凝集体形成を抑制しても阻害効果がなく、微小管の脱重合による α -synuclein蓄積に対する効果があることを示した。さらに、TGマウスに対してノコダゾールを長期間投与すると α -synuclein蓄積の抑制効果があることを検証した。

2) シナプス機能低下と α -synuclein蓄積抑制による回復

TGマウス脳組織をパッチクランプ法により電気生理学的に解析すると、EPSC(興奮性シナプス後電流)が正常に保たれる一方で、IPSC(抑制性シナプス後電流)がTGマウス脳では特異的に低下することを示した。この結果は抑制性ニューロンのシナプス機能障害が神経変性に先立ち起こることを示した。さらに、TGマウスにおいてノコダゾールを投与した群は同週齢の非投与群に比べて、IPSCの低下は軽減することが分かった。ノコダゾールによる α -synuclein蓄積の阻害が神経細胞の機能障害を回復させることを示し、神経変性に先立つシナプスの機能障害は可逆性の変化であることを明らかにした。

3) 総括と今後の展望

MSAモデルマウスでは神経細胞の α -synuclein蓄積は微小管脱重合剤により抑制効果があることが分かった。今後、微小管と α -synucleinの結合がどのように神経細胞変性を起こすのかを検討する。さらに、選択的な α -synuclein蓄積の抑制方法を検討しヒトへの臨床応用をめざす。

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5件)

① Ito H, Nakayama K, Jin C, Suzuki Y, Yazawa I. α -Synuclein accumulation reduces GABAergic inhibitory transmission in a model of multiple system atrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (査読有) 2012, 428, 348-353.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.057.

② Nakayama K, Suzuki Y, Yazawa I. Binding of neuronal α -synuclein to β -III tubulin and accumulation in a model of multiple system atrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (査

読有), 2012, 417, 1170-1175.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.092

③ Yazawa, I. Perspectives on therapeutic target for multiple system atrophy. *Recent Patents on Regenerative Medicine* (査読有) 2012, 2, 30-36

www.benthamscience.com/rpgm

④ Suzuki Y, and Yazawa I. Pathological accumulation of atrophin-1 in dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* (査読有), 2011, 4, 378-384.

http://www.ijcep.com/files/IJCEP1103009.pdf

⑤ Suzuki Y, Nakayama K, Hashimoto N, and Yazawa I. Proteolytic processing regulates pathological accumulation in dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *FEBS Journal* (査読有), 2010, 277, 4873-4887.

DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07893.x

[学会発表] (計8件)

① Yazawa I. Effect of microtubule depolymerization on alpha-synuclein accumulation. 4th International Congress on multiple system atrophy. 2012年3月20日, Toulouse, France (招待講演).

② Suzuki Y, Nakayama K, Yazawa I. Neuronal α -synuclein binds to β -III tubulin to accumulate in an MSA model. 4th International Congress on Multiple System Atrophy. 2012年3月20日, Toulouse, France.

③ 金成花, 矢澤生, 鷺見幸彦, 橋詰良夫. 遺伝性白質ジストロフィーの2家系の報告. 第53回日本神経病理学会総会, 2012年6月30日, 朱鷺メッセ (新潟市)

④ 鈴木康予, 都竹佳子, 矢澤生. 多系統萎縮症に關与する beta-III tubulin 上の alpha-synuclein結合部位の同定. 第35回日本神経科学大会, 2012年9月20日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

⑤ 鈴木康予, 中山貴美子, 矢澤生. 多系統萎縮症における α -synucleinと β -III tubulinの相互作用の分子機構. 第34回日本神経科学大会, 2011年9月15日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑥ 伊藤浩志, 金成花, 鈴木康予, 矢澤

生. 多系統萎縮症モデルマウスではオリゴデンドロサイト α -synuclein の蓄積によりシナプス機能の低下が起こる. 第34回日本神経科学大会, 2011年9月16日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑦ 鈴木 康予, 矢澤 生. 細胞質における DRPLA 蛋白 C 末ペプチドの凝集第 33 回日本神経科学大会, 2010 年 9 月 2 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)

⑧ 中山貴美子, 鈴木 康予, 矢澤 生. 多系統萎縮症の神経細胞 α -synuclein 蓄積における β III-tubulin の役割. 第 33 回日本神経科学大会, 2010 年 9 月 2 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)

[図書] (計 1 件)

① Yazawa I. Tubulin: Structure, Function, and Role in Disease. (Yamauchi W and Sobic A, eds.) Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA, 2012, pp.85-100.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncgg.go.jp/department/lrr/LoRRe.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢澤 生 (YAZAWA IKURU)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・バイオリソース研究室・室長

研究者番号: 20312217

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし