

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659475

研究課題名(和文)疾患モデル動物における小胞体ストレスから細胞死に至るプロセスの解析

研究課題名(英文)Analysis of process from ER stress to cell death in an animal model for disease

研究代表者

大磯 ユタカ(Oiso, Yutaka)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40203707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：表現型を加速させる目的で家族性中枢性尿崩症(FNDI)モデルマウスに間歇的脱水負荷を与えた。電子顕微鏡を用いた検討により、自由飲水のFNDIマウスでは凝集体がバゾプレシンニューロンの小胞体内の一部に限局していたが、脱水開始4週後には凝集体が小胞体内内腔全体に広がるとともに内腔も拡大していた。また、凝集体を含有する小胞体をオートファゴゾームの前駆体であるファゴフォアが取り囲んでいた。脱水開始12週後には30-40%のバゾプレシンニューロンが脱落し、残存するバゾプレシンニューロンの細胞質は空胞で占拠されており、オートファジーが誘導されたことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Familial neurohypophysial diabetes insipidus (FNDI) model mice were subjected to intermittent water deprivation in order to promote the phenotypes. Electron microscopic analyses demonstrated that, while aggregates are confined to a certain compartment of the ER in the AVP neurons of FNDI mice with water access ad libitum, they were scattered throughout the dilated ER lumen in the FNDI mice subjected to water deprivation for 4 weeks. It is also demonstrated that phagophores, the autophagosome precursors, emerged in the vicinity of aggregates and engulfed the ER containing scattered aggregates. The cytoplasm of AVP neurons in FNDI mice was occupied with vacuoles in the mice subjected to water deprivation for 12 weeks, when 30-40% of AVP neurons are lost. Our data thus demonstrated that autophagy was induced in the AVP neurons subjected to ER stress in FNDI mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：バゾプレシン 小胞体ストレス オートファジー

1. 研究開始当初の背景

細胞がタンパク質分泌機能を正常に保つためには分泌されるタンパク質を正常に折りたたむことと異常な折りたたみ構造となったタンパク質を除去する必要がある。小胞体ストレスとは異常な折りたたみ構造となったタンパク質が小胞体に蓄積された状態を指し、この状態で活性化される種々の反応 (unfolded protein response:UPR) はタンパク質の恒常性を維持する細胞の生理的応答である。一方 UPR が十分に機能しなければ細胞は障害を受けてやがて死に至ることが提唱されているが、UPR の機能不全の結果生じる細胞死が本当にアポトーシスなのかそれとも他のタイプの細胞死なのかに関しては未だ十分に検証されていない。

家族性中枢性尿崩症 (FNDI) は生後数ヶ月から数年で緩徐進行性に多飲多尿を呈する常染色体優性遺伝性疾患である。我々がバゾプレシンの輸送蛋白であるニューロフィジン領域のナンセンス変異の一つである Cys98Stop を導入し作成したノックインマウスは、バゾプレシン産生核である視床下部視索上核において変異ニューロフィジンが特異的に発現し、ヘテロ変異体において経時的な尿崩症の進行を認めるという FNDI 患者に近い表現型を示す疾患モデルである (Hayashi et al., 2009 *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 296:R1641)。さらに本マウスは視床下部視索上核におけるバゾプレシンニューロンの小胞体に凝集体が蓄積すること、バゾプレシン分泌刺激の繰り返しにより細胞死が誘導されること、さらにはバゾプレシン mRNA の発現が低下しているなどの特徴を有している。

2. 研究の目的

本課題では FNDI マウスを小胞体ストレスの動物モデルとし、小胞体ストレスからどのように細胞死に至るかを電子顕微鏡を用いて

形態学的に検討する。

3. 研究の方法

変異タンパク質の合成を促進させることで表現型を加速させる目的で FNDI マウスに間歇的脱水負荷 (一週間に48時間の絶水・その後5日間の自由飲水) を加え、脱水負荷開始4週後および12週後の視床下部視索上核におけるバゾプレシンニューロンの形態変化を電子顕微鏡にて観察した。また、脱水負荷開始12週後の時点でバゾプレシンニューロンの細胞死が生じているか否かを評価する目的での視床下部視索上核におけるバゾプレシンニューロンの数を免疫染色法および in situ hybridization法にてカウントした。さらにオートファジーを評価する目的で、オートファゴソームが GFP で標識される GFP-LC3 マウスと FNDI マウスとを交配させ、バゾプレシンニューロンにおける GFP-LC3 の発現を観察した。さらに選択的オートファジーを評価する目的でバゾプレシンニューロンにおける p62 の発現を評価した。また、ユビキチン化された GFP を発現する Ub^{G76V}-GFP マウスと FNDI マウスを交配させ、バゾプレシンニューロンにおけるユビキチン化タンパク質の蓄積の有無を確認した。さらに、マウス視床下部器官培養を用いて、視床下部において小胞体ストレスがオートファジーを惹起しうるか検討した。

4. 研究成果

自由飲水下の3ヶ月齢の FNDI マウスのバゾプレシンニューロンでは、凝集体が小胞体の一区画に限局して存在し (ERAC: ER-associated compartment の形成) していた。また、ERAC の近傍には、正常な内腔が保たれた小胞体も電子顕微鏡にて同時に観察されたことから、FNDI マウスのバゾプレシンニューロンでは小胞体の機能を維持するために ERAC が形成される可能性が示唆された (図1)。

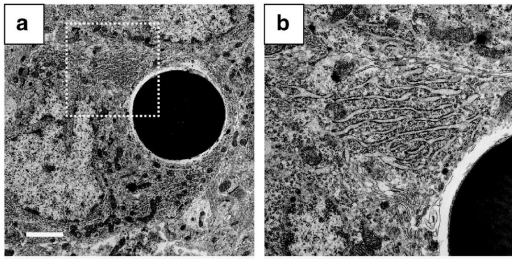


図 1. FNDI マウスのバゾプレシンニューロンにおける ERAC の形成

一方、脱水負荷開始 4 週後には ERAC の形成は破綻し、拡張した小胞体全域に散らばった凝集体を認めた。こうした所見は自由飲水下の 12 ヶ月齢の FNDI マウスでも認められることから、脱水負荷により FNDI マウスの表現型が進行することが示された。さらに、脱水負荷開始 4 週後の FNDI マウスのバゾプレシンニューロンでは凝集体で満たされた小胞体を取り囲む二重膜が観察され、小胞体を対象としたオートファジー (ER ファジー) が惹起されることが確認された (図 2)。

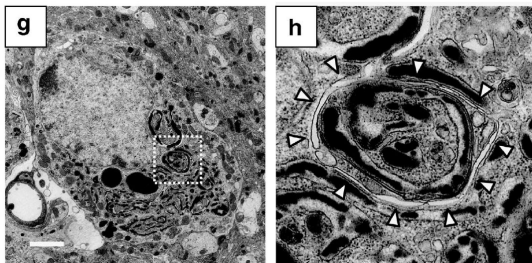


図 2. FNDI マウスのバゾプレシンニューロンにおける ERAC の形成破綻およびオートファジーの誘導

また、視床下部視索上核における BiP mRNA の発現は自由飲水下では FNDI マウスと野生型マウスとの間で差を認めなかったが、脱水負荷を 4 週間加えることで ERAC の形成が破たんした FNDI マウスでは同じく脱水負荷を与えた野生型マウスよりも BiP mRNA の発現が有意に上昇していた。これは FNDI マウスのバゾプレシンニューロンでは変異タンパクを ERAC に封じ込めることで小胞体ストレスを軽減していることを示唆している

と考えられた。

FNDI/GFP-LC3 マウスのバゾプレシンニューロンでは脱水負荷により GFP-LC3 が集積し、オートファジーが誘導されることが示唆された。さらに、脱水負荷群では FNDI マウスのバゾプレシンニューロンに p62 の発現を認め、またその発現は GFP-LC3 とも共局在していたことから、FNDI マウスのバゾプレシンニューロンでは選択的オートファジーも誘導されていることが示唆された。FNDI/Ub^{G76V}-GFP マウスではバゾプレシンニューロンに GFP の発現を認めず、脱水負荷にて FNDI マウスのバゾプレシンニューロンにユビキチン化タンパク質の蓄積は生じていないことが確認された。すなわち、選択的オートファジーはユビキチン化タンパク蓄積による二次的なものではなく、小胞体ストレスそのものによって誘導されることが示唆された。

実際に野生型マウスの視床下部器官培養においてタプシガルギンで小胞体ストレスを惹起すると、p62 の mRNA およびタンパクの発現が増加することが確認された。また、GFP-LC3 マウスを用いた視床下部器官培養ではタプシガルギンにて GFP-LC3 のドット数の増加も確認された。

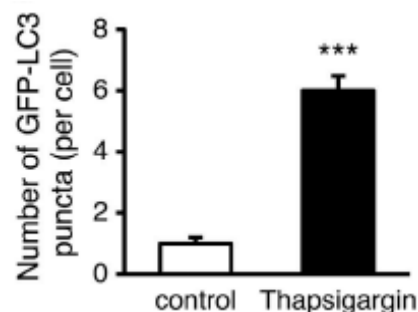
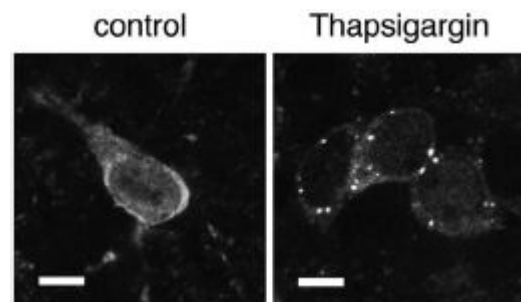


図 3. 小胞体ストレスによるオートファジーの誘導

以上のデータは視床下部において小胞体ストレスが p62 を転写レベルから誘導し、選択的オートファジーを惹起することを示唆している。

FNDI マウスでは脱水負荷 12 週間にはバゾプレシンニューロンの細胞数は野生型マウスと比較して 30-40%減少することが免疫染色法および in situ hybridization 法のいずれにおいても確認された。

さらに電子顕微鏡を用いた検討にて脱水負荷開始 12 週後の FNDI マウスでは、残存するバゾプレシンニューロンの細胞質が空胞で占拠されていた。また、一部の空胞の内部には凝集体が含有されていた (図 4)。

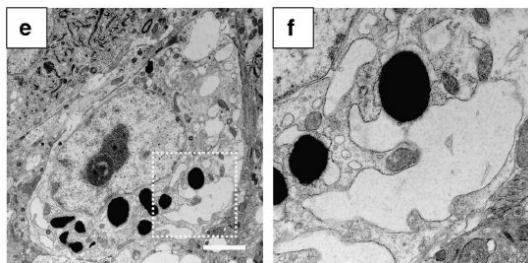


図 4. 細胞質が空胞で占拠された FNDI マウスのバゾプレシンニューロン

以上より、FNDI マウスのバゾプレシンニューロンでは ERAC 形成の破綻が誘因となって ER ファジーや選択的オートファジーが誘導されること、また p62 の誘導はユビキチン化タンパク質の蓄積による二次的なものではなく、小胞体ストレスに対する応答 (unfolded protein response) であることが示された。

さらに、本来は細胞保護的なオートファジーが過剰に誘導され続けた結果として、細胞の生存に必要なオルガネラまでもが失われて細胞質が空胞化し、バゾプレシンニューロンが細胞死 (オートファジー関連細胞死) に至ることが示唆された (図 5)

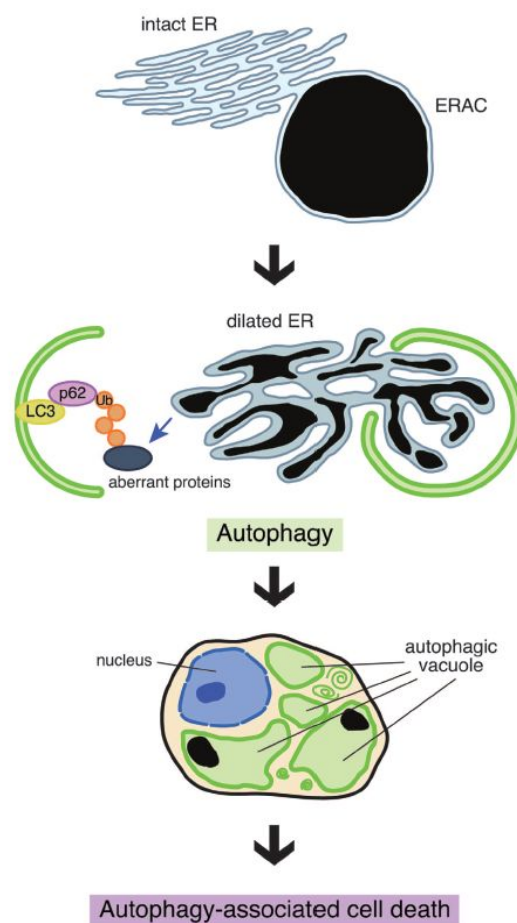


図 5. ER ストレスからオートファジー関連細胞死に至る機序

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 1 件)

1. Arginine vasopressin neuronal loss results from autophagy-associated cell death in a mouse model for familial neurohypophysial diabetes insipidus. Hagiwara D, Arima H, Morishita Y, Wenjun L, Azuma Y, Ito Y, Suga H, Goto M, Banno R, Sugimura Y, Shiota A, Asai N, Takahashi M, Oiso Y. **Cell Death Dis.** 2014 Mar 27;5:e1148. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014 年 4 月 24-26 日、福岡国際会議場・福岡サンパレス (福岡市) バゾプレシンニュー

ーロンは ER ファジーと選択的オートファジーにより細胞死に至る 家族性中枢性尿崩症モデルマウスを用いた検討 萩原大輔、有馬寛、盧文君、東慶成、大磯ユタカ

2. 第87回日本内分泌学会学術総会、2014年4月24-26日、福岡国際会議場・福岡サンパレス(福岡市)バゾプレシンニューロンと小胞体ストレス 有馬寛

3. 10th World Congress on Neurohypophysial Hormones (Bristol, UK, June 15-19, 2013) Aggregate formation in endoplasmic reticulum of vasopressin neurons in familial diabetes insipidus model mice. Arima H

4. 第 86 回日本内分泌学会学術総会、2013年4月25-27日、仙台国際センター(仙台市)ER-associated complex の形成はオートファジー細胞死からバゾプレシンニューロンを保護する 萩原大輔、有馬寛、盧文君、東慶成、森下啓明、大磯ユタカ

6. 研究組織

(1)研究代表者

大磯 ユタカ (OISO YUTAKA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40203707

(2)研究分担者

有馬 寛 (ARIMA HIROSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50422770

(3)連携研究者

なし