

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300131

研究課題名(和文) レビー小体病の前シナプスを焦点とする異常シヌクレインの分子病態解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of alpha-synuclein aggregation in Lewy body disease

研究代表者

若林 孝一 (Wakabayashi, Koichi)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50240768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：レビー小体病ではシヌクレインの異常蓄積が神経細胞の胞体、突起および前シナプスに認められ、神経細胞の機能不全を誘発する。そこで、細胞内分解系であるオートファジーに着目し、異常シヌクレインの蓄積を防止または軽減する方法について検討した。天然二糖であるトレハロースまたはマルトースを給水投与したマウス脳を比較し、トレハロース短期投与(1週間)によって脳内オートファジーが効率的に活性化されることを見出した。さらに、ヒト培養細胞において小胞体関連分解を活性化すると細胞内凝集物の形成が有意に抑制された。以上より、トレハロースは脳内において効率的にオートファジーを誘導することが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：In Lewy body disease (LBD), insoluble alpha-synuclein (AS) is widely deposited in the presynaptic terminals as well as in the neuronal cytoplasm. To test the possibility that activated autophagy can degrade abnormal molecules, we investigated the effect of trehalose on abnormal aggregation of AS in a model of LBD. Trehalose is a natural disaccharide composed of two glucose units. Trehalose increased level of the autophagosomal protein LC3, especially a lipidated form LC3-II in cultured cells and mice brain. Also, trehalose increased levels of several chaperon molecules, such as HSP90 and SigmaR1, in the brains of LBD model mice. Further studies revealed that level of detergent insoluble AS was suppressed in mice following oral administration of trehalose, despite an apparent alteration was not observed regarding abnormal aggregation of AS. These results suggest that oral intake of trehalose modulates propensity of molecules prior to aggregation formation.

研究分野：神経病理学

キーワード：パーキンソン病 レビー小体 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は細胞内においてプロテアソームやオートファジー・ライソソームにより分解された後、再度アミノ酸としてリサイクルされる。神経変性疾患では、疾患特異的に特定のタンパク質が異常に蓄積することから「タンパク質蓄積病」としての側面を有する。特にレビー小体病では、タンパク質分解酵素に不溶性の異常 α シヌクレインが前シナプスに多量に蓄積しており、シナプスの機能低下ならびに症状発現に関与している可能性がある。さらに、レビー小体病では、オートファジーシステムの初期に構成されるオートファゴソーム膜の機能障害が示唆されている。そこで本研究では、「タンパク質分解機能の活性化」がレビー小体病の治療戦略として有用か否かを検証する。

2. 研究の目的

(1)レビー小体病を含む神経変性疾患ではオートファジーが障害されており、p62 や NBR1 などオートファジー基質の細胞内凝集が認められる。そこで、ストレスセンサータンパク質である Keap1 に着目し、種々の神経変性疾患剖検脳における Keap1 の局在を明らかにする。

(2)細胞内タンパク質分解系の異常は種々の神経変性疾患に共通する病的機序の一つである。そこでユビキチン依存性蛋白分解に関与している Valosin-containing protein (VCP) ならびにエンドソーム・リソソーム系において細胞内小胞の移動に関与する脱リン酸化酵素である Factor-induced-gene 4 (FIG4) に着目し、レビー小体病を含む種々の神経変性疾患剖検脳における両分子の局在を明らかにする。

(3)レビー小体病ではオートファジー基質 (p62、Keap1、NBR1 など) の細胞内蓄積が認められ、オートファジーが障害されている。また、p62 の機能不全や変異などがレビー小体病の病態に影響している可能性が考えられる。そこで、p62 の欠損がレビー小体病の病態に及ぼす影響を検証する。

(4)レビー小体病に認められる前シナプスに蓄積した異常 α シヌクレインは疾患重症度と相関しており、病態と密接に関連することが知られている。本研究ではタンパク質分解機能を活性化するために、特に飢餓状態などで活性化されるオートファジーシステムに着目し、異常 α シヌクレインを除去することによってシナプス機能を回復するという新たな治療戦略を提起することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)パーキンソン病 (PD)、レビー小体型認知症 (DLB)、アルツハイマー病 (AD)、多系統萎縮症 (MSA)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、正

常対照から前頭葉、海馬、基底核、中脳、橋、延髄、小脳および脊髄のホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成。Keap1 に対する抗体を用い、免疫組織化学的検討を行った。また、DLB、AD および正常対照の凍結脳組織 (側頭葉皮質) を用い、ウェスタンブロット解析を行った。

(2)PD、DLB、MSA、AD、ピック病、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、嗜銀顆粒性認知症、ALS、前頭側頭葉変性症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、ハンチントン病、SCA1、SCA2、SCA3、核内封入体病 (INIBD)、正常対照から病変部位を含むホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成。VCP および FIG4 に対する抗体を用い免疫組織化学的検討を行った。

(3)レビー小体病モデルとしてシヌクレイントランスジェニックマウス (Syn-TG) を用いた。p62 ノックアウトマウス (p62-KO) と交配を行い、p62 の欠損した Syn-TG (Syn-TG/p62-KO) を作製した。病理学的および生化学的検討には HE 染色、各種免疫染色に加え、ウェスタンブロット解析を行った。空間認知記憶を調べるためにモリス水迷路テストを、ストレス下での行動評価は強制水泳テストで行った。

(4)正常マウスに加え、レビー小体病のモデルとして α シヌクレイン TG マウスを用いた。正常および TG マウスおよびコントロールマウスにオートファジー活性化剤 (2%トレハロース) または 2%マルトース、水を 1 週間、1 か月、4 か月給水投与した。その後、脳からタンパク質を抽出し、異常 α シヌクレインおよび各種オートファジー関連分子をウェスタンブロット法およびフィルタートラップ法により定量した。

4. 研究成果

(1)免疫組織化学的に、正常対照脳では神経細胞の胞体が Keap1 抗体で淡く、びまん性に染色された。PD および DLB では脳幹型および皮質型レビー小体のほとんどが、さらに、MSA でも神経細胞内封入体の多くが Keap1 強陽性を示した。一方、MSA のグリア封入体は弱陽性であった。AD に認められる神経原線維変化、ALS のスケイン様封入体は一部が Keap1 陽性であった。凍結脳組織を用いたウェスタンブロット解析の結果、DLB および AD の Keap1 量は正常対照と比較して有意な変化は認められなかった。一方、AD の p62 量は正常対照と比較して約 2 倍と有意に増加しており、いくつかの Nrf2 関連遺伝子の発現亢進も認められた。DLB にはこのような変化は認められなかった。

AD では p62 量およびいくつかのストレス防御関連遺伝子の発現亢進が認められたことから、Keap1-Nrf2 経路が機能していることが

示唆される。一方、DLB では病理学的に p62 および Keap1 の凝集は確認されたが、Keap1-Nrf2 経路を活性化するためには不十分、もしくは機能不全の可能性も考えられる。

(2)正常対照では神経細胞の細胞質が VCP および FIG4 陽性であった。神経変性疾患では、PD および DLB のレビー小体、DRPLA、ハンチントン病、SCA1、SCA2、SCA3、IN1BD の神経細胞核内封入体、正常対照のマリネスコ小体が VCP 陽性であった。さらに、PD および DLB のレビー小体、ピック小体、DRPLA、SCA3、IN1BD の神経細胞核内封入体が FIG4 陽性であった。

VCP は種々の神経変性疾患において神経細胞の細胞質内および核内封入体の形成・分解に関与しているが、グリア封入体には関与していない。さらに、FIG4 が神経変性疾患に認められる種々の封入体に局在することを初めて示した。このことは、FIG4 が複数の神経変性疾患の封入体形成に共通の役割を担っていることを示唆するものである。

(3) p62-KO および Syn-TG/p62-KO ではコントロールマウスに比べ加齢とともに体重が有意に増加した。病理組織学的に Syn-TG および Syn-TG/p62-KO ではリン酸化シヌクレインの異常蓄積が認められたが、封入体の数は Syn-TG に比べ Syn-TG/p62-KO で有意に多かった。生化学的に Syn-TG に比べ Syn-TG/p62-KO では Triton X-100 に不溶性のリン酸化シヌクレインが増加していた。行動学的に p62-KO および Syn-TG/p62-KO ではモリス水迷路テストでも強制水泳テストでも無動状態が長く続き、空間認知記憶の評価は困難であった。

今回の病理学および生化学的解析から、p62 が欠損するとレビー小体病モデルマウスにおける異常シヌクレイン蓄積の病態が増悪することが明らかにされた。さらに行動学的解析から、p62 欠損では強制水泳テストにて無動状態を示し、ストレス下での意欲の低下など運動異常以外の要因が作用していると推測された。p62 の機能不全や変異などがレビー小体病の病態に影響している可能性が考えられる。

(4)天然二糖であるトレハロースまたはマルトースを給水投与したマウス脳を比較し、以下の結果を得た。トレハロース短期投与(1週間)によって脳内オートファジーが効率的に活性化される。複数のシャペロン分子(HSP90、SIGMAR1)の発現が亢進する。

α シヌクレイントランスジェニックマウスでは脳内シヌクレインの全体量に変化はみられないが、Triton X-100 に不溶性のシヌクレインが減少する。さらに、ヒト培養細胞およびレビー小体病剖検脳組織を用いて、以下の結果を得た。細胞内の小胞体関連分解を活性化すると細胞内凝集物の形成

が有意に抑制される。レビー小体病の患者脳内ではオートファゴソーム形成を調節する分子群の異常が認められる。

今回、トレハロースは培養細胞およびマウス脳内において効率的にオートファジーを誘導することが明らかにされた。

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30件)

Miki Y, Tanji K, Mori F, Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, Alteration of upstream autophagy-related proteins (ULK1, ULK2, Beclin1, VPS34, and AMBRA1) in Lewy body disease, Brain Pathol, 査読有, 2016 (in press)

DOI: 10.1111/bpa.12297

Nakamura K, Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Yamada M, Wakabayashi K, α -Synuclein pathology in the cranial and spinal nerves in Lewy body disease, Neuropathology, 査読有, 2016 (in press)

DOI: 10.1111/neup.12269

Tanji K, Miki Y, Maruyama A, Mori F, Mimura J, Itoh K, Kamitani T, Wakabayashi K, The role of NUB1 in α -synuclein degradation in Lewy body disease model mice. Biochem Biophys Res Com, 査読有, 470(3), 2016, 635-642

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.093

Nakamura K, Mori F, Kon T, Tanji K, Miki Y, Tomiyama M, Kurotaki H, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Yamada M, Wakabayashi K. Accumulation of phosphorylated α -synuclein in subpial and periventricular astrocytes in multiple system atrophy of long duration. Neuropathology, 査読有, 36(2), 2016, 157-167

DOI: 10.1111/neup.12243

Tanji K, Miki Y, Maruyama A, Mimura J, Matsumiya T, Mori F, Imaizumi T, Itoh K, Wakabayashi K, Trehalose intake induces chaperone molecules along with autophagy in a mouse model of Lewy body disease, Biochem Biophys Res Com, 査読有, 465(4), 2015, 746-752

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.08.076

Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Maruyama A, Nikaido Y, Mimura J, Mori F, Warabi E, Yanagawa T, Ueno S, Itoh K, Wakabayashi K, p62 deficiency enhances α -synuclein pathology in mice, Brain Pathol, 査読有, 25(5), 2015, 552-564

DOI: 10.1111/bpa.12214

Nakamura K, Mori F, Tanji K, Miki Y, Yamada M, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H, Wakabayashi K, Isopentenyl diphosphate isomerase, a cholesterol synthesizing enzyme, is localized in Lewy bodies, *Neuropathology*, 査読有, 35(5), 2015, 432-440

DOI: 10.1111/neup.12204

Kon T, Miki Y, Tanji K, Mori F, Tomiyama M, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H, Wakabayashi K, Localization of nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (NR4A3) in Lewy body disease and multiple system atrophy, *Neuropathology*, 査読有, 35(6), 2015, 503-509

DOI: 10.1111/neup.12210

Nakamura K, Mori F, Kon T, Tanji K, Miki Y, Tomiyama M, Kurotaki H, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Yamada M, Wakabayashi K, Filamentous aggregations of phosphorylated α -synuclein in Schwann cells (Schwann cell cytoplasmic inclusions) in multiple system atrophy, *Acta Neuropathol Comm*, 査読有, 3, 2015, 29

DOI: 10.1186/s40478-015-0208-0

Mori F, Watanabe Y, Miki Y, Tanji K, Odagiri S, Eto K, Wakabayashi K, Ubiquitin-negative, eosinophilic neuronal cytoplasmic inclusions associated with stress granules and autophagy: an immunohistochemical investigation of two cases, *Neuropathology*, 査読有, 34(2), 2014, 140-147

DOI: 10.1111/neup.12075

Tanji K, Miki Y, Ozaki T, Maruyama A, Yoshida H, Mimura J, Matsumiya T, Mori F, Imaizumi T, Itoh K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, Phosphorylation of serine 349 of p62 in Alzheimer's disease brain, *Acta Neuropathol Comm*, 査読有, 2, 2014, 50

DOI: 10.1186/2051-5960-2-50

Miki Y, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K, Sigma-1 receptor is involved in degradation of intranuclear inclusions in a cellular model of Huntington's disease, *Neurobiol Dis*, 査読有, 74, 2014, 25-31

DOI: 10.1016/j.nbd.2014.11.005

Wakabayashi K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H, Analysis of microRNA from archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens of amyotrophic lateral sclerosis, *Acta Neuropathol Comm*, 査読有, 2(1), 2014, 173

DOI: 10.1186/s40478-014-0173-z

Kon T, Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Yoshida M, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, ALS-associated protein FIG4 is localized in Pick and Lewy bodies, and also neuronal nuclear inclusions, in polyglutamine and intranuclear inclusion body diseases, *Neuropathology*, 査読有, 34(1), 2014, 19-26

DOI: 10.1111/neup.12056

Mori F, Tanji K, Toyoshima Y, Sasaki H, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, Valosin-containing protein immunoreactivity in tauopathies, synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease, *Neuropathology*, 査読有, 33(6), 2013, 637-644

DOI: 10.1111/neup.12050

Odagiri S, Tanji K, Mori F, Miki Y, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, Brain expression level and activity of HDAC6 protein in neurodegenerative dementia, *Biochem Biophys Res Comm*, 査読有, 430(1), 2013, 394-399

DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.034

Tanji K, Maruyama A, Odagiri S, Mori F, Itoh K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, Keap1 is localized in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in various neurodegenerative diseases, *J Neuropathol Exp Neurol*, 査読有, 72(1), 2013, 18-28

DOI: 10.1097/NEN.0b013e31827b5713

Mori F, Tanji K, Odagiri S, Toyoshima Y, Yoshida M, Ikeda T, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, Ubiquilin immunoreactivity in cytoplasmic and nuclear inclusions in synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease, *Acta Neuropathol*, 査読有, 124(1), 2012, 149-151

DOI: 10.1007/s00401-012-0999-z

Tanikawa S, Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, Endosomal sorting related protein CHMP2B is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions in alpha-synucleinopathy, *Neurosci Lett*, 査読有, 527(1), 2012, 16-21

DOI: 10.1016/j.neulet.2012.08.035

Tanji K, Odagiri S, Maruyama A, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K, Alteration of autophagosomal proteins in multiple system atrophy,

Neurobiol Dis, 査読有, 49, 2012,
190-198
DOI: 10.1016/j.nbd.2012.08.017

〔学会発表〕(計16件)

三木康生ほか、オートファジー関連タンパク質(ULK1、ULK2、VPS34、AMBRA1)はレビー小体の形成過程に参与している、第56回日本神経病理学会総会学術研究会、2015年6月3~5日、九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市)
若林孝一、MSAとオートファジー、第55回日本神経学会、2014年5月21~24日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
丹治邦和ほか、神経変性疾患脳におけるユビキチンリガーゼKeap1の解析、第54回日本神経病理学会、2013年4月24~26日、タワーホール船橋(東京都江戸川区)
丹治邦和ほか、レビー小体病におけるオートファゴソーム関連タンパク質の変化、第53回日本神経病理学会、2012年6月28~30日、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

〔図書〕(計1件)

Tanji K, Mori F, Wakabayashi K. The Role of Atg8 Homologue in Lewy Body Disease. In: Hayat MA, ed. Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging. Volume 2, Amsterdam, Elsevier; 2014, p. 383-389

〔産業財産権〕

出願状況(計4件)

名称: 神経変性疾患の検査と治療に対するmiRNA又はその標的遺伝子の利用
発明者: 佐々木秀直、内海潤、若林孝一、上田哲也
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 2012-289082
出願年月日: 平成24年12月28日
国内外の別: 国内

名称: 神経変性疾患の制御因子
発明者: 佐々木秀直、内海潤、若林孝一、森文秋、上田哲也
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 2012-289083
出願年月日: 平成24年12月28日
国内外の別: 国内

取得状況(計2件)

名称: 新規パーキンソン病診断マーカー
発明者: 佐々木秀直、矢部一郎、内海潤、若林孝一
権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2012-045698
出願年月日: 平成24年3月1日
取得年月日: 平成25年9月12日
国内外の別: 国内

名称: オートファジーを調節するマイクロRNA

発明者: 若林孝一、佐々木秀直、内海潤
権利者: 同上
種類: 特許
番号: WO 2015/037656 A1
出願年月日: 平成26年9月11日
取得年月日: 平成27年3月19日
国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 孝一(WAKABAYASHI, Koichi)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 50240768

(2) 研究分担者

丹治 邦和(TANJI, Kunikazu)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 10271800

三木 康生(MIKI, Yasuo)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 30709142

森 文秋(MORI, Fumiaki)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 60200383