

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590249

研究課題名(和文) リソソーム酵素細胞間輸送の生体観察

研究課題名(英文) in vivo imaging of transcytosis of lysosomal enzymes

研究代表者

柴田 昌宏 (Shibata, Masahiro)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10343253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ライソソーム病はライソソーム酵素の欠損または機能不全により生じる先天性の代謝異常疾患である。神経系には血液脳関門が存在するため、酵素補充療法には効果がない。本研究では、ライソソーム酵素の細胞間輸送経路を解明することを目的とし、ニワトリ胚を用いてライソソーム酵素の1つであるカテプシンDの生体観察を行う手法の確立を行った。変異体カテプシンDをニワトリ胚に発現させ、卵白を固定することにより、二光子顕微鏡で生体観察することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Lysosomal Storage Diseases (LSDs) are a group of congenital metabolic disorders caused by lysosomal dysfunction. Enzyme replacement therapy which has been adopted to several LSDs has no effect on neurons due to the existence of blood-brain barrier. To elucidate the mechanism of the transcytosis of lysosomal enzymes in nervous system, we developed a chick model to monitor lysosomal enzymes in vivo using a two-photon laser scanning microscopy.

研究分野：解剖学

キーワード：ライソソーム カテプシン

1. 研究開始当初の背景

リソソーム酵素は小胞体で合成された後、ゴルジ体で糖鎖修飾(マンノース6リン酸(M6P))を受け、構成性分泌経路により細胞外へ運ばれるか、(大部分は)M6Pレセプター(MPR)によってリソソームへと運ばれる。細胞外へと分泌されたリソソーム酵素の中には、細胞表面に局在するMPRによって再取り込み(エンドサイトーシス)され、リソソームへと運ばれるものもある。これらの機構はほぼ全ての細胞に普遍的に備わっており、細胞内分解機構の主演となっている。

リソソーム酵素が先天的に欠損または機能不全に陥ると、ライソゾーム病とよばれる先天性代謝異常疾患(特定疾患に指定)になる。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。代表的なリソソームタンパク分解酵素であるカテプシンD(CTSD)は、申請者らの研究によりライソゾーム病の1種である神経性セロイドリポフスチノーシスの原因遺伝子であることが明らかとなった(Koike et al, 2000 & 2005)。

ライソゾーム病の治療には骨髄移植と酵素補充療法があり、これらの方法ではリソソーム酵素が細胞内に取り込まれることである程度の効果が得られている。しかし、リソソーム酵素が血液脳関門を越えることが出来ないため、中枢神経系に対しては有意な効果を得るに至っていない(Urayama et al, 2004)。つまり、リソソーム酵素が血液脳関門を越えて神経細胞へ到達出来さえすれば、ライソゾーム病が克服されるものと予想される。

2. 研究の目的

申請者は、中枢神経系における神経性セロイドリポフスチノーシスの病態解析を行うため、CTSD遺伝子を神経特異的に欠損したマウスを作成し、その解析を行った。その結果、同マウス神経細胞は、CTSD遺伝子が欠損しているにもかかわらず、有意にCTSDタンパクを発現していることが明らかとなった。この結果は、神経細胞が他の細胞(おそらくグリア細胞)からCTSDを受け取っていることを示唆しているが、その分子機構については何も分かっていない。今までの一連の研究から得た着想をもとに、本申請課題では、神経系におけるCTSDの細胞間輸送機構を明らかにすることを目的とし、ニワトリ胚を用いて、CTSDの細胞間輸送を生体観察する手法を確立することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 孵卵開始3日目のニワトリ初期胚の神経管にCTSDのC末端側にEGFPを融合させた遺伝子を注入し、エレクトロポレーション法

により遺伝子を導入する。

(2) CTSDの発現により細胞死が起こる可能性を想定し、CTSDの活性中心のアスパラギン酸残基をアラニンに置換した変異体CTSDを作成、上記(1)の方法でニワトリ胚に遺伝子を導入した。細胞死の判定はTUNEL法で行った。酵素活性が細胞死に与える影響を検討するため、CTSDの阻害剤であるpepstatin Aを、また対照として生理食塩水を投与した。

(3) ニワトリ胚の生体観察を行うため、二光子顕微鏡を使用した。胚は白身の中に浮遊するため、観察が困難であったので、白身を寒天で固定して観察を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子導入

種々の条件を検討した結果、Poration pulseを50V(on time: 0.05 msec, off time: 0.1 msec)、Driving pulseを15V(on time: 25 msec, off time: 75 msec、5回)で行うと効率良く遺伝子が導入出来た。図1参照。

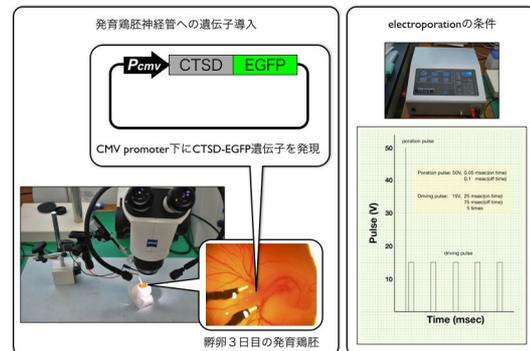


図1. ニワトリ初期胚への遺伝子導入

孵卵3日目のニワトリ胚神経管へ遺伝子を注入し(左図)エレクトロポレーション法(右図の条件)により遺伝子を導入した。

(2) CTSD遺伝子を導入すると、CTSDの阻害剤であるpepstatin Aの有無にかかわらずcaspase-3依存的な細胞死が誘導された。図2参照。

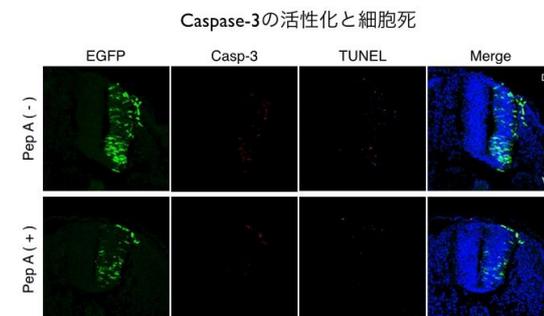


図2. CTSDに発現による細胞死の誘導

CTSD(緑色)を発現させると、caspase-3(赤色)依存的なTUNEL陽性細胞(マゼンダ)が観察された。

変異体 CTSD を発現させても、細胞死が有意に誘導されることが分かった (図 3)。

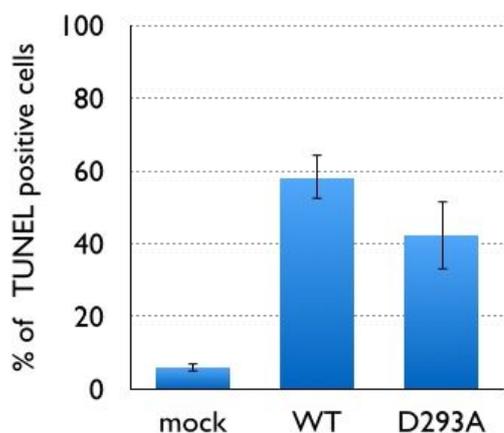


図 3 . 変異体 CTSD 発現による細胞死
活性中心を置換した変異体 CTSD (D293A)
を発現させても、有意に細胞死が誘導された。

(3) 鶏胚を生体観察するには、浮遊する胚を固定することが必須である。そこで、白身を半分除去し、代わりに 1 % アガロースを注入することで卵黄を安定させ、生体観察することが可能となった (図 4)。

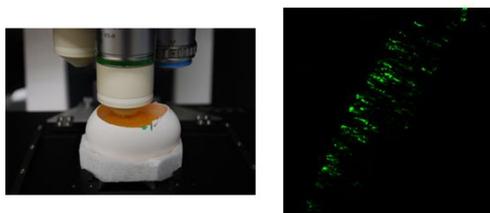


図 4 . ニワトリ胚の生体観察
白身をアガロースで固定し、二光子顕微鏡で生体観察を行った (左図) と、安定して観察を行うことが出来た (右図)。

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 4 件)

(1) Nagashima H, Shibata M, Taniguchi M, Ueno S, Kamezaki N, Sato N. Comparative study of the shell development of hard- and soft-shelled turtles. *J Anat.* 2014, Jul;225(1):60-70. doi: 10.1111/joa.12189. Epub 2014 Apr 23. PubMed PMID: 24754673. 査読有り

(2) Ohkouchi S, Shibata M, Sasaki M, Koike M, Saftig P, Peters C, Nagata S,

Uchiyama Y. Biogenesis and proteolytic processing of lysosomal DNase II. *PLoS One.* 2013;8(3):e59148. doi: 10.1371/journal.pone.0059148. Epub 2013 Mar 13. PubMed PMID: 23516607; PubMed Central PMCID: PMC3596287. 査読有り

(3) Koike M, Shibata M, Ezaki J, Peters C, Saftig P, Kominami E, Uchiyama Y. Differences in expression patterns of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I in normal, pathological and aged mouse central nervous system. *Eur J Neurosci.* 2013 Mar;37(5):816-30. doi: 10.1111/ejn.12096. Epub 2012 Dec 20. PubMed PMID:23279039. 査読有り

(4) Hayakawa N, Shiozaki M, Shibata M, Koike M, Uchiyama Y, Matsuura N, Gotow T. Resveratrol affects undifferentiated and differentiated PC12 cells differently, particularly with respect to possible differences in mitochondrial and autophagic functions. *Eur J Cell Biol.* 2013 Jan;92(1):30-43. doi: 10.1016/j.ejcb.2012.10.002. Epub 2012 Nov 9. PubMed PMID: 23141968. 査読有り

[学会発表] (計 14 件)

(1) J. YAMAGUCHI, T. SUNABORI, M. KOIKE, T. NANA O, M. SHIBATA, A. FURUTA, Y. UCHIYAMA、Hippocampal pyramidal neurons lacking LC3A and LC3B are resistant to hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice、Society for Neuroscience、2014年11月15日～19日、「Walter E. Washington Convention Center (Washington, DC, USA)」

(2) T. NANA O, M. KOIKE, J. YAMAGUCHI, C. WHITEHOUSE, T. ISHII, M. SHIBATA, Y. UCHIYAMA、Selective autophagy of lysosomes with ceroid-lipofuscin in neurons deficient in cathepsin D、Society for Neuroscience、2014年11月15日～19日、「Walter E. Washington Convention Center (Washington, DC, USA)」

(3) 本間俊作, 島田孝子, 柴田昌宏, 佐藤昇, 八木沼洋行、発生初期の前脳領域における神経縦束の新たなマーカー、日本神経科学学会、2014年9月11日～13日、「パ

シフィコ横浜（横浜市）」

(4) 七尾友久, 小池正人, 山口隼司, 柴田昌宏, 内山安男、カテプシンD欠損ニューロンにおける神経性セロイドリポフスチン蓄積症と選択的オートファジーについて、日本神経科学学会、2014年9月11日～13日、「パシフィコ横浜（横浜市）」

(5) 山口隼司, 砂堀毅彦, 小池正人, 七尾友久, 柴田昌宏, 内山安男、低酸素脳虚血傷害とLC3A/B欠損マウス、日本神経科学学会、2014年9月11日～13日、「パシフィコ横浜（横浜市）」

(6) 柴田昌宏, 相馬健一, 佐藤昇, 変異体カテプシンDによる鶏胚の神経細胞死、日本解剖学会、2014年3月27日～29日、「自治医科大学（栃木県下野市）」

(7) N. SATO, H. NAKAYAMA, M. SHIBATA, A novel model for polyglutamine pathogenesis using the avian embryo, Society for Neuroscience, 2013年11月9日～13日、「San Diego Convention Center (San Diego, USA)」

(8) M. MORIMOTO, N. HAYAKAWA, M. SHIBATA, M. KOIKE, Y. UCHIYAMA, T. GOTOW Influence of resveratrol on LC3-knockdown undifferentiated and differentiated PC12 cells, Society for Neuroscience, 2013年11月9日～13日、「San Diego Convention Center (San Diego, USA)」

(9) Masahiro Shibata, Ken-ichi Soma, and Noboru Sato, Lysosomal cathepsin D induces apoptosis in the chicken embryo neural tube, International Symposium on Morphological Sciences, 2013年9月10日～13日、「朱鷺メッセ（新潟市）」

(10) 柴田昌宏, 中山瞳, 安戸方邦, 伊藤健二郎, 植村修, 岡本仁, 佐藤昇, 発育鶏胚を用いたポリグルタミン病モデルの構築、日本神経科学学会、2013年6月20日～23日、「京都国際会館（京都市）」

(11) 小池正人, 柴田昌宏, 砂堀毅彦, 小松雅明, 崎村建司, 内山安男, ブルキンE細胞特異的カテプシンD欠損およびAtg7欠損マウスの比較解析、日本神経科学学会、2013年6月20日～23日、「京都国際会館（京都市）」

(12) 柴田昌宏, 伊藤健二郎, 佐藤昇, 鶏胚を用いたリソソームカテプシンによる細胞死誘導モデルの構築、日本解剖学会、2013年3月28日～30日、「サンポートホール高松（香川県高松市）」

(13) N. HAYAKAWA, M. SHIOZAKI, M. SHIBATA, M. KOIKE, Y. UCHIYAMA, T. GOTOW, PC12 cells are influenced differently by resveratrol depending on their differentiation, Society for Neuroscience, 2012年10月13日～17日、「Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, USA)」

(14) 早川直哉, 塩崎元子, 柴田昌宏, 小池正人, 内山安男, 後藤隆洋, レスベラトロールは未分化PC12細胞では障害的に分化PC12細胞では保護的に作用する、日本神経科学学会、2012年9月18日～21日、「名古屋国際会議場（名古屋市）」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 昌宏 (SHIBATA MASAHIRO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：10343253

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし