

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659117

研究課題名(和文) ハイコンテンツ顕微鏡イメージングを用いた新規神経変性疾患治療薬の自動検索法の開発

研究課題名(英文) Development of screening methods to find novel therapeutic drugs for neurodegenerative disease using fluorescence-based probe and high-content microscope.

研究代表者

酒井 規雄 (SAKAI, NORIO)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：70263407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：シャペロン介在性オートファジー(CMA)の活性を細胞レベルで評価可能な蛍光プローブを開発した。このプローブを用いて、神経変性疾患の脊髄小脳失調症14型(SCA14)のモデル細胞ではCMA活性が低下していることを明らかにした。CMAは神経変性疾患の治療ターゲットであることを示した。  
SCA14の原因となる変異 PKCの細胞毒性の代償に分子シャペロンのHSP70が関与していることを、変異 PKC-GFPのイメージングを用いて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：1. We developed novel fluorescence-based probe that can access the activity of chaperone-mediated autophagy (CMA) in a single cell level. Using this probe, we identified the decreased level of CMA in a cellular model of spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14), indicating that CMA is a novel therapeutic target for neurodegenerative disease.  
2. Imaging analysis using SCA14 mutant gamma PKC<sub>γ</sub>-GFP elucidated that HSP70, a member of molecular chaperone, is involved in the compensation of cytotoxicity induced by SCA14 mutant gamma PKC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 薬理学一般

キーワード：神経変性疾患 タンパク質分解 イメージング タンパク質リン酸化酵素

### 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の治療戦略の構築は喫緊の医療課題であるが、病因に基づいた根治的薬物療法は、いまだ存在しない。申請者らは、遺伝性脊髄小脳失調症 14 型 (SCA14) の原因となる変異  $\gamma$ PKC の性質に着目し、変異  $\gamma$ PKC は細胞内で凝集体を作り、細胞死を誘導する。変異  $\gamma$ PKC 凝集体形成を抑制する薬物は神経細胞死を抑制する。変異  $\gamma$ PKC の発現は、シャペロン介在性オートファジー (CMA) を抑制する。ことを明らかにしてきた。

これらのことから、SCA14 の原因には凝集体形成が関わっており、他の神経変性疾患との共通性が見られる。すなわち、SCA14 に対し治療効果がある薬物は、神経変性疾患全般に効果を持つことが期待できる。変異  $\gamma$ PKC-GFP を使って神経変性疾患治療薬のスクリーニングが可能である。神経変性疾患では変異不良タンパク質の蓄積により CMA が抑制され、神経細胞死が誘導されることが予想される。すなわち、CMA 活性化薬は、神経変性疾患治療薬としての可能性があることが示唆される。ことが解った。

そこで、SCA14 の原因となる変異 PKC と GFP の融合タンパク質 (PKC-GFP) と CMA 基質である Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と HaloTag との融合タンパク質 (GAPDH-HT) を用いた神経変性疾患モデルの評価と治療法の検索を考えるに至った。

### 2. 研究の目的

遺伝性脊髄小脳失調症 14 型 (SCA14) の原因となる変異 PKC に関する研究成果から、変異 PKC - GFP と GAPDH-HT を用いた神経変性疾患の原因の解明と神経変性疾患治療薬の開発に繋げることを研究目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) SCA14 変異 PKC-GFP を用いた細胞毒性に対する影響

変異 PKC-GFP 発現アデノウイルスベクターを作製し、各種細胞に発現させ、変異 PKC の凝集体形成を蛍光顕微鏡で解析した。

(2) 蛍光標識プローブを用いた 1 細胞レベルでの CMA 活性の評価方法の開発。

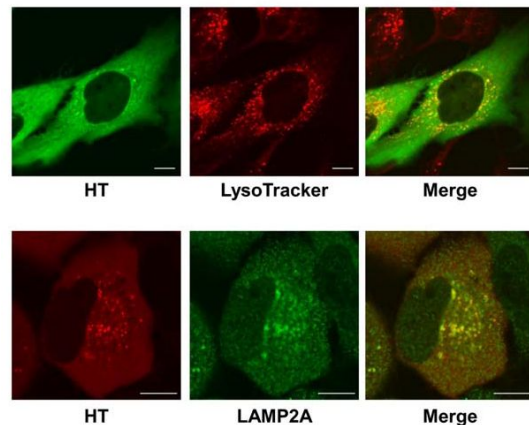
CMA の基質である GAPDH に HaloTag を融合したタンパク質 (GAPDH-HT) を発現するアデノウイルスベクターを作製し、各種細胞に発現させた。CMA の活性の評価は、GAPDH-HT を蛍光標識 HT リガンドで可視化させ、リソソームに集積する GAPDH-HT のドット数、集積細胞数を蛍光顕微鏡で計測することで評価した。

### 4. 研究成果

(1) 蛍光標識プローブを用いた 1 細胞レベルでの CMA 活性の評価方法の開発と神経変性疾患モデル細胞での評価

HaloTag を融合した CMA 基質 GAPDH-HT を HeLa 細胞に発現させ、これら GAPDH-HT を蛍光物質で標識した HT リガンドで蛍光ラベルし、その動態を経時観察した。発現 21 時間後に GAPDH-HT はドット状に集積しそれらはリソソームのマーカーであるリソトラッカーや CMA に必須のタンパクである LAMP2A と共局在した (図 1)。このことから、GAPDH-HT は、CMA の活性を評価可能な蛍光プローブであると考えられた。

図 1



次に、SCA14 のモデル細胞である変異 PKC-GFP 発現プルキンエ細胞において、GAPDH-HT を発現させ、細胞レベルで CMA 活性を評価した。変異 PKC-GFP を発現した細胞 (S119P、G128D) では GAPDH-HT のリソソームへの集積が野生型を発現させた細胞 (WT) より明らかに抑制されていた。その定量解析をしたところ、変異 PKC-GFP を発現した細胞では有意にドット数が減少しており、過酸化水素処置によるドット数の増加も見られなかった。このことは、SCA14 のモデル細胞では CMA 活性が低下していることを示している。

図 2

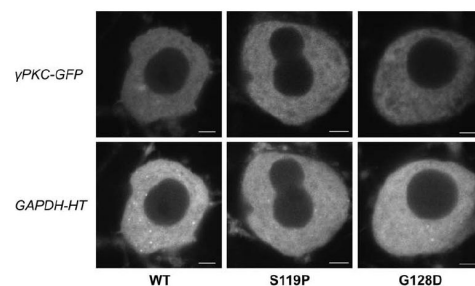
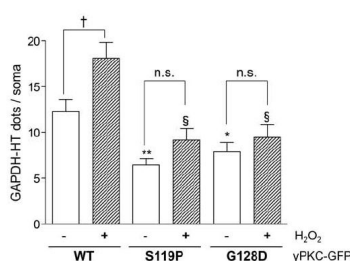


図 3

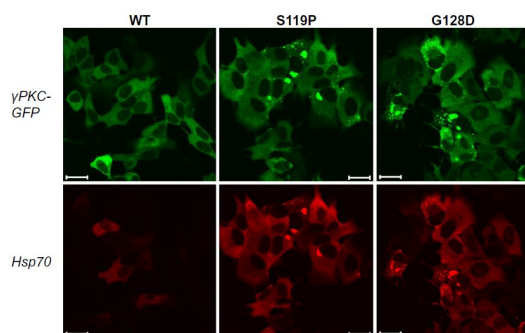


これらの結果から、GAPDH-HT の CMA 評価系の妥当性が明らかとなり、さらに CMA の活性化剤は神経変性疾患の新たな治療薬となる可能性が示された。このように本研究では、CMA の神経疾患の新たな関わりを明らかにした点で意義深いと考えられる。

## (2) SCA14 変異 PKC の細胞毒性に対する分子シャペロン HSP70 の関与

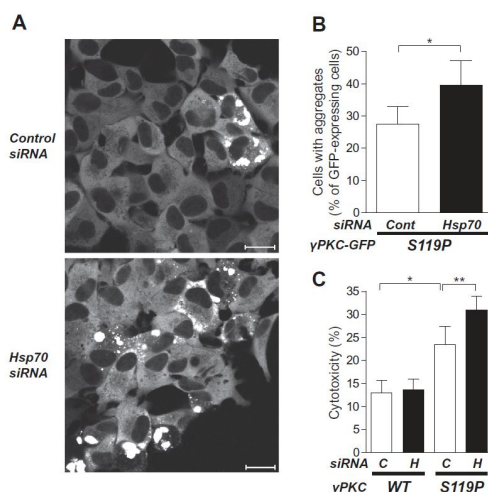
分子シャペロンは、様々な細胞ストレスにより発現が増加し、細胞ストレスの原因となるミスフォールドタンパクを減少させる働きがある。SCA14 の発症原因、治療標的を探ることを目的に、変異 PKC を発現させた神経細胞株 SHSY-5Y 細胞において、代表的な分子シャペロンである、HSP40、HSP70、HSP90 の発現量を解析した。変異 PKC - GFP 発現細胞では、HSP70 の発現量が増加していた。HSP70 の免疫染色を施すと、HSP70 の免疫反応は、変異 PKC-GFP を発現した細胞 (S119P、G128D) で野生型 (WT) に比較して増加していた (図 4)。

図 4



次に、siRNA で HSP70 を減少させた際の、変異 PKC-GFP の凝集体形成と細胞毒性について検討した。siRNA で HSP70 を減少させた細胞では、変異 PKC-GFP の凝集体形成は促進した (図 5 A B)。その際の細胞毒性を LDH アッセイで評価したところ、HSP70 を減少させた細胞では、細胞毒性が上昇していた (図 5 C)。

図 5



これらの結果から、HSP70 は変異 PKC により引き起こされる細胞ストレスを補償するために発現上昇するものと考えられる。本研究結果から変異 PKC-GFP のイメージングによる細胞毒性評価の妥当性と神経変性疾患の治療ターゲットとしての HSP70 の重要性が明らかとなったことは意義深いと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

(1) Shirafuji, T., Ueyama, T., Yoshino, K., Takahashi, H., Adachi, N., Ago, Y., Koda, K., Nashida, T., Hiramatsu, N., Matsuda, T., Toda, T., Sakai, N. and Saito, N. The role of Pak-Interacting Exchange Factor- $\beta$  phosphorylation at Serine 340 and 583 by PKC $\gamma$  in the dopamine release. *J. Neuroscience.* (2014) in press (査読有)

(2) Kikuchi, N., Irifune, M., Shimizu, Y., Yoshida, K., Morita, K., Kanematsu, T., Morioka, N., Nakata, Y., Sakai, N. Selective blockade of N-methyl-D-aspartate channels in combination with dopamine receptor antagonism induces loss of the righting reflex in mice, but not immobility. *Psychopharmacology* (2014) in press (査読有)

(3) Sakai, N. Principles for the use of in vivo transgene techniques: overview and an introductory practical guide for the selection of tetracycline-controlled transgenic mice. *Methods Mol Biol.* 1142 (2014) 33-40 (査読有)  
doi: 10.1007/978-1-4939-0404-4\_4.

(4) Tanaka, S., Miyagi, T., Dohi, E., Seki, T., Hide, I., Sotomaru, Y., Saeki, Y., Chiocca, A., Matsumoto, M. and Sakai, N. Developmental expression of GPR3 in rodent cerebellar granule neurons is associated with cell survival and protects neurons from various apoptotic stimuli. *Neurobiol. Dis.* 68 (2014) 215-227 (査読有)

doi: 10.1016/j.nbd.2014.04.007

(5) Yamamoto, K., Seki, T., Adachi, N., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N. and Sakai, N. Deregulation of the actin cytoskeleton and macropinocytosis in response to phorbol ester by the mutant protein kinase C gamma that causes spinocerebellar ataxia type 14. *Frontiers in Physiology* 5 (2014) 126 (査読有)

doi: 10.3389/fphys.2014.00126.

(6) Taniguchi, T., Tanaka, S., Ishii, A., Watanabe, M., Fujitani, N., Sugeo, A., Gotoh, S., Ohta, T., Hiyoshi, M., Matsuzaki, H., Sakai, N. and Konishi, H. A brain-specific Grb2-associated regulator of Erk/MAPK(GAREM) subtype, GAREM2, contributes to neurite outgrowth of neuroblastoma cell by regulating Erk signaling. *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 29934-29942 (査読有)

doi: 10.1074/jbc.M113.492520.

(7) Ogawa, K., Seki, T., Onji, T., Adachi, N., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N. and Sakai, N.

Mutant  $\gamma$ PKC that causes spinocerebellar ataxia type 14 upregulates Hsp70, which protects cells from the mutant's cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440 (2013) 25-30 (査読有)

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.013.

(8) Seki, T., Gong, J., Williams, A. J., Sakai, N., Todi, S. V. and Paulson, H. L. JosD1, a membrane-targeted deubiquitinating enzyme, is activated by ubiquitination and regulates membrane dynamics, cell motility and endocytosis. *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 17145-17155 (査読有)

doi: 10.1074/jbc.M113.463406

(9) Fujiwara, M., Yamamoto, H., Miyagi, T., Seki, T., Tanaka, S., Hide, I. and Sakai, N. Effects of the chemical chaperone 4-phenylbutylate on the function of the serotonin transporter (SERT) expressed in COS-7 cells. *J. Pharmacol. Sci.* 122 (2013) 71-83 (査読有)

doi: 10.1254/jphs.12194FP

(10) Yamamoto, H., Tanaka, S., Tanaka, A., Hide, I., Seki, T. and Sakai, N. Long-term exposure of RN46A cells expressing serotonin transporter (SERT) to a cAMP analog up-regulates SERT activity and is accompanied by neural differentiation of the cells. *J. Pharmacol. Sci.* 121 (2013) 25 -38 (査読有)

doi: 10.1254/jphs.12229FP

(11) Dohi, E., Tanaka, S., Seki, T., Miyagi, T., Hide, I., Takahashi, T., Matsumoto, M. and Sakai, N. Hypoxic stress activates chaperone-mediated autophagy and modulates neuronal cell survival. *Neurochem. Int.* 60 (2012) 431-442 (査読有)

doi: 10.1016/j.neuint.2012.01.020

(12) Seki, T., Yoshino, K., Tanaka, S., Dohi, E., Onji, T., Yamamoto, K., Hide, I., Paulson, H.L., Saito, N. and Sakai, N. Establishment of a novel fluorescence-based method to evaluate chaperone-mediated autophagy in a single neuron *PLoS ONE* 7 (2012) e31232 (査読有)

doi: 10.1371/journal.pone.0031232

〔学会発表〕(計 27 件)

(1) 田中茂, 宮城 達博, 秀和泉, 白藤俊彦, E. Antonio Chiocca, 酒井規雄 GPR3 は様々なアポトーシス誘導刺激に対し神経保護的に作用する。第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 20 日 仙台

(2) 宮城達博, 田中茂, 秀和泉, 白藤俊彦, 酒井規雄 神経細胞における恒常的 Gs 活性化受容体 GPR3 の細胞内局在と機能 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19 日 仙台

(3) 関貴弘, Sokol V. Todi, 酒井規雄, Henry L. Paulson, 香月博志 脱コピキチン化酵素 JosD1 は細胞形態、細胞移動及びエンドサイトーシスを調節する。第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19 日 仙台

(4) 白藤俊彦, 上山健彦, 吉野健一, 足立直子, 高橋英之, 平松直樹, 吾郷由希夫, 松田

敏夫, 酒井規雄, 齋藤尚亮 PKC ノックアウトパーキンソン症候群モデル: Pak-interacting Exchange Factor の役割 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 21 日 仙台

(5) 神垣真由美, 秀和泉, 柳瀬雄輝, 関貴弘, 白藤俊彦, 秀道広, 酒井規雄 TLR4 活性化によるミクログリアの生存維持に GM-CSF 自己産生と GM-CSF 受容体の上方制御が関与する。第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 21 日 仙台

(6) 秀和泉, 神垣真由美, 柳瀬雄輝, 関貴弘, 白藤俊彦, 秀道広, 酒井規雄 TLR4 を介したアデノシン 2a 受容体活性化によるミクログリア機能の調節 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 21 日 仙台

(7) 白藤俊彦, 上山健彦, 吉野健一, 足立直子, 高橋英之, 香田健, 平松直樹, 吾郷由希夫, 松田敏夫, 酒井規雄, 齋藤尚亮 黒質線条体における PKC 基質の解析: PIX リン酸化のドパミン遊離での役割 第 124 回日本薬理学会近畿部会 2013 年 11 月 1 日 京都

(8) Tanaka, S., Miyagi, T., Hide, I., Seki, T., Sakai, N. GPR3 protects neurons from apoptosis via Phosphatidylinositol 3-Kinase and mitogen-activated protein-kinase signaling pathway. Neuroscience meeting 2013, 11 Nov 2013, San Diego, USA.

(9) Dohi, E., Tanaka, S., Seki, T., Miyagi, T., Hide, I., Sakai, N. Possible relationship between decreased expression of lysosomal-associated membrane protein type 2A and delayed neuronal death after brain ischemia. Neuroscience meeting 2013, 12 Nov 2013, San Diego, USA.

(10) 宮城達博, 田中茂, 秀和泉, 関貴弘, 酒井規雄 中枢神経系における恒常的 Gs 活性化受容体 GPR3 の局在と機能, 第 43 回神経精神薬理学会総会, 25 Oct 2013, 沖縄

(11) 関貴弘, 吉野健一, 田中茂 土肥栄祐, 隠地智也, 山本和央, 秀和泉, PAULSON Henry L., 齋藤尚亮, 酒井規雄 蛍光イメージングを用いた神経細胞でのシャペロン介在性オートファジー活性の解析, 第 43 回神経精神薬理学会総会, 25 Oct 2013, 沖縄

(12) 酒井規雄, 藤原雅幸, 山本光, 田中茂, 関貴弘, 秀和泉 セロトニントランスポーター機能調節に対するケミカルシャペロン 4-phenylbutylate(4-PBA)の効果, 第 43 回神経精神薬理学会総会, 26 Oct 2013, 沖縄

(13) 酒井規雄, 藤原雅幸, 山本光, 浅野昌也, 田中茂, 関貴弘, 秀和泉 膜輸送によるセロトニントランスポーター調節機構, 第 17 回活性アミンに関するワークショップ, 24 Aug 2013, 福井

(14) 神垣真由美, 秀和泉, 柳瀬雄輝, 田中芳樹, 原田佳奈, 関貴弘, 田中茂, 秀道広, 酒井規雄 TLR4 活性化によるミクログリアの生存維持に GM-CSF 自己産生と TNF/TNFR2 シグナルが関与する, Neuro2013, 21 June, 京都

(15) 宮城達博、田中茂、秀和泉、関貴弘、酒井規雄 神経細胞における恒常的 Gs 活性化受容体 GPR3 の局在と機能, Neuro2013, 21 June, 京都

(16) 土肥栄祐、田中茂、関貴弘、宮城達博、秀和泉、高橋哲也、松本昌泰、酒井規雄、齧歯類脳虚血モデルにおける CMA 関連蛋白 LAMP-2A の経時的発現変化, 第 54 回神経学会総会, 29 May-1 June 2013, 東京

(17) 酒井規雄、吉野健一、田中茂、土肥栄祐、隠地智也、山本和央、秀和泉、PAULSON Henly L、齋藤尚亮、関貴弘 イメージングを活用した新たなシャペロン介在性オートファジーの解析方法の確立, 第 54 回神経学会総会, 31 May 2013, 東京

(18) 田中茂 宮城達博 酒井規雄 他 GPR3 を介した突起伸長に Gbetaganmma を介する経路が部分的に関与する。第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 22 日 福岡

(19) 神垣真由美 秀和泉 酒井規雄 他 Toll 様受容体 4 活性化により生存するミクログリアは顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を自己誘導する。第 86 回日本薬理学会年会 2013 年 3 月 23 日 福岡

(20) 秀和泉 神垣真由美 酒井規雄 他 ミクログリアの死細胞貪食における P2Y<sub>2</sub> 受容体の役割 第 122 回薬理学会近畿部会 2012 年 11 月 16 日 大阪

(21) Yamamoto, H. Tanaka, S. Sakai, N. et al Long-term exposure of cAMP analogue up-regulates the function of serotonin transporter (SERT) in RN46A cells. Neuroscience 2012 (Annual meeting of society for neuroscience) 2012 年 10 月 14 日 New Orleans USA

(22) Tanaka, S. Miyagi, T. Sakai, N. et al Phosphatidylinositol 3-Kinase and mitogen-activated protein-kinase signaling pathway play a role in the GPR3-mediated neurite outgrowth. Neuroscience 2012 (Annual meeting of society for neuroscience) 2012 年 10 月 15 日 New Orleans USA

(23) Tanaka, S., Miyagi, M. Sakai, N. et al GPR3 protects neurons from apoptosis under the hypoxic condition. 第 55 回日本神経化学会 2012 年 9 月 30 日 神戸

(24) Hide, I. Yanase, Y. Sakai, N. et al Enhanced survival and phagocytic activity by Toll-like receptor 4 activation in rat microglia. 第 55 回日本神経化学会 2012 年 10 月 1 日 神戸

(25) 田中茂 宮城達博 酒井規雄 他 GPR3 依存的な神経突起伸長に PI3 キナーゼ、MAP キナーゼの活性化が寄与する。第 35 回日本神経科学大会 2012 年 9 月 18 日 名古屋

(26) 酒井規雄 宮原岳史 田中茂 他 神経細胞株 SH-SY 5Y 細胞におけるニコチン誘発性 PKC トランスロケーションの観察 第 16 回活性アミンに関するワークショップ 2012 年 8 月 24 日 札幌

(27) 土肥栄祐 田中茂 酒井規雄 他 低

酸素ストレスにより活性化されるシャペロン介在性オートファジーの細胞保護効果 第 121 回薬理学会近畿部会 2012 年 6 月 29 日 徳島

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

酒井 規雄 (SAKAI NORIO)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号：70263407

##### (2) 研究分担者

関 貴弘 (SEKI TAKAHIRO)  
熊本大学・生命科学部・准教授  
研究者番号：50335650

##### (3) 研究分担者

秀 和泉 (HIDE IZUMI)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号：20253073

##### (4) 研究分担者

田中 茂 (TANAKA SHIGERU)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号：20512651