

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460500

研究課題名(和文) ライソゾーム蓄積病における α -シヌクレインの機能と病態への関与

研究課題名(英文) Involvement in alpha-synuclein function and pathology in lysosomal storage diseases

研究代表者

山口 章 (YAMAGUCHI, Akira)

横浜市立大学・医学研究科・客員講師

研究者番号：20381585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多くのライソゾーム蓄積病において、中枢神経系での α -シヌクレインの蓄積が確認されているが、その病態への影響は未だ解明されていない。

本研究では、Hexb^{-/-} ASyn^{+/+} mice、Hexb^{-/-} ASyn^{-/-} miceを用いて研究を行った結果、ライソゾーム病での中枢神経系における α -シヌクレイン蓄積は、オートファジー・ユビキチンプロテソーム系が機能不全を起こすことにより、ミトコンドリア代謝が上手くいかず、影響を及ぼす事が示唆されたがASynを欠損させることによりそれらが改善した。しかしながら、Hexb^{-/-} ASyn^{+/+} miceにおける病態の改善はわずかであった。

研究成果の概要(英文)：The accumulation of α -synuclein (ASyn) has been observed in several lysosomal storage diseases (LSDs) but it remains unclear if ASyn accumulation contributes to LSD pathology. ASyn also accumulates in the neurons of Sandhoff disease (SD) patients and SD model mice (Hexb^{-/-} ASyn^{+/+} mice).

In this study, we explored the potential role of ASyn accumulation in the neurodegenerative process of LSDs, we generated Hexb^{-/-} ASyn^{-/-} mice. Here, we present evidence that autophagic and ubiquitin proteasome pathway are impaired, and mitochondrial function are damaged in Hexb^{-/-} ASyn^{+/+} mice, but this improves in the absence of ASyn. However, this reducing ASyn accumulation is associated with little improvement in any clinical features of Hexb^{-/-} ASyn^{+/+} mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：サンドホフ病 ライソゾーム蓄積病 GM2ガングリオシドーシス α -シヌクレイン オートファジー

1. 研究開始当初の背景

ライソゾーム病のひとつであるガングリオシドーシスは特定疾患に指定された難病のひとつであり、ライソゾーム酵素やその活性化因子および安定化タンパク質等の遺伝的異常、欠損により基質が分解されずにライソゾーム内に蓄積する疾患群である。ガングリオシドーシスのひとつであるサンドホフ病(以下、SD)はライソゾーム酵素である α -ヘキソサミニダーゼ A, B の欠損により、その基質であるガングリオシド GM2, 糖脂質 GA2 などが分解されずにライソゾーム内に蓄積し、重篤な神経症状を含むさまざまな症状を呈して死亡する病気である。

SD のモデルマウスである *Hexb*^{-/-}マウス(以下 SD マウス)は *HEXB* 遺伝子を破壊することによって作製されたモデルマウス (Sango K, Yamanaka S, et al. *Nat Genet*.1995) で、ヒト SD と同様に神経細胞主体にガングリオシドが蓄積する。SD マウスは 11 週齢頃より震え、驚愕反応、運動能の低下などの重度の神経症状を示し、15 週齢頃に死亡する。SD の病態は、これまで神経細胞への糖脂質の蓄積のみが原因と考えられていたが、近年、その病態の進行には、蓄積以外に自己抗体や中枢神経系における炎症反応が関与していることが報告された (Yamaguchi A, Yamanaka S et al. *J. Clin. Invest.* 2004)。

近年、Gaucher 病モデルマウスを用いた研究では、オートファジー及びプロテアソームメカニズムの異常により、ユビキチン化タンパク、ASyn が神経細胞に蓄積し、また、マイトファジーによるミトコンドリアの品質管理が機能不全を引き起こされて

いることが報告されているが病態への影響について詳細は解っていない (You-hai Xu et al. *Hum Mol Genet*.2013, Osellame LD. *Cell Metab* 2013)。

NPC1 タンパクの異常により引き起こされる Niemann-Pick Type C1 病におけるオートファジーのメカニズムを研究した報告では、Gaucher 病は Akt-mTOR-p70 S6K 経路で活性化されるのに対して、Niemann-Pick Type C1 は Beclin-1 経路で活性化されており、同じリポドーシスでもオートファジーの活性化経路が違うことが報告されている (Pacheco CD et al. *Hum Mol Genet*.2013)。更に Niemann-Pick Type C1 病のオートファジーの異常の原因は変異型 NPC-1 タンパクが直接オートファゴソームの形成を抑制することで Niemann-Pick Type C1 特有の事象であることが報告されている (Sarkar S et al. *Cell Rep*.2013)。

現在までに我々は、SD マウスの神経細胞において、神経症状が進行するに従い、 α -シヌクレイン(以下、aSyn)が変性・蓄積することを報告した (Suzuki K, Yamanaka S et al. *NeuroReport* 2003)。aSyn の蓄積はマウスだけにとどまらずヒトライソゾーム蓄積症 (SD, Tay-Sachs 病, Metachromatic leukodystrophy, α -galactosialidosis など) の脳にも aSyn 蓄積を認めたとその役割は解明されていない (Suzuki K, Yamanaka S et al. *Acta Neuropathol* 2007, *NeuroReport* 2003)。山口らとの SD マウスに aSyn 遺伝子を欠損させたマウス(以下 aSynDKO マウス)を用いた共同研究の中で、aSynDKO マウスは SD マウスと比較して運動能・寿命の改善が確認されたが、大変興味深いことにユビキチン化タンパク質の減少、マイトファジーシステムの改善が確認された。

本研究では、SD マウス、aSynDKO マウス、SD マウスに aSyn 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウス(以下 SD-aSynTg マウス)及び培養細胞を用いて、aSyn が蓄積することによるオートファジー機能不全のメカニズムと病態への関与と aSyn 促進剤を用いた治療効果を検証することを目的としている。

2. 研究の目的

我々は、様々なリポドーシスにおいて、中枢神経系に aSyn が蓄積していることを発見し、パーキンソン病など他の神経変性疾患同様に病態の進行に関与していることを見出した。更に研究を進めて行く中で、aSyn の蓄積がオートファジーの機能不全を引き起こし、中枢神経細胞内での異常タンパク質の蓄積を促していることを確認した。

本研究では、サンドホフ病モデルマウスの aSyn 遺伝子を欠損、または過剰発現させたマウスを用いて、aSyn が蓄積することによるオートファジー機能不全のメカニズムと病態への関与、そして、オートファジー促進剤を用いた治療効果を検証することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) SD マウス、aSynDKO マウス、を用い、寿命をカップランマイヤーの生存曲線で、運動能をロタロッドで、その他の神経症状はクリニカルスコア、フットプリント等で解析し、aSyn の病態との関連性を評価する。

(2) SD マウスの病態が顕著に確認される 10 週齢時より経時的に HE 染色等により組織学的解析を行う。

(3) aSyn は変性等の構造変化により神経毒性を示し神経細胞の脱落、もしくはアポト

ーシスなどを引き起こすことが報告されている。一方、SD マウスの aSyn の変性は認められていないが、中枢神経系でアポトーシスに陥った細胞の増加が認められる。そこで、SD マウスの神経変性と aSyn の関係を解明するため、神経細胞、グリア細胞等のマーカーを用いた免疫染色法を用いた解析、TUNEL 法を用いたアポトーシス細胞のカウント等を行う。

(4) SD マウス及び aSynDKO マウスの中枢神経の遺伝子の発現動態を網羅的に解析するため、マイクロアレーで遺伝子発現を網羅的に解析し、酸化ストレス関連遺伝子を見出す。

(5) (4)で変動が見られた遺伝子発現が確認された遺伝子について、病態が顕著に確認される 14 週齢の SD マウスの脳を用いて、免疫染色などによる組織学的解析、定量的 PCR、ウエスタンブロット法による分子生物学的解析を行う。尚、必要に応じて糖脂質蓄積量と酸化ストレスの関係を評価するため、上記解析を経時的に行う。

4. 研究成果

多くのライソソーム蓄積病において、中枢神経系での α -シヌクレインの蓄積が確認されているが、その病態への影響は未だ解明されていない。また、ライソソーム蓄積病の一つ、サンドホフ病、及びそのモデルマウス *Hexb*^{-/-} *ASyn*^{+/+} mice の中枢神経系においても α -シヌクレインの蓄積が確認されている。

本研究では、*Hexb*^{-/-} *ASyn*^{+/+} mice、*Hexb*^{-/-} *ASyn*^{-/-} mice を用いて研究を行った結果、ライソソーム病での中枢神経系における α -シヌクレイン蓄積は、オートファジー・ユビキチンプロテソーム系が機能不全を起こすことにより、ミトコンドリア代謝が上手くいかず、影響を及ぼす事が示唆されたが *ASyn* を欠損させることによりそれらが改善した。しかしながら、*Hexb*^{-/-}

ASyn-/- mice における病態の改善はわずかであった。

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1件)

Suzuki K, Yamaguchi A, Yamanaka S, Kanzaki S, Kawashima M, Togo T, Katsuse O, Koumitsu N, Aoki N, Iseki E, Kosaka K, Yamaguchi K, Hashimoto M, Aoki I, Hirayasu Y. Accumulated α -synuclein affects the progression of GM2 gangliosidosis. *Exp Neurol.* 2016 Oct;284(Pt A):38-49.
DOI:10.1016/j.expneurol.2016.07.011.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山口 章 (YAMAGUCHI, Akira)
横浜市立大学・医学研究科・客員講師
研究者番号：20381585

(2)研究分担者

山中 正二 (YAMANAKA, Shoji)
横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号：80264604

(3)研究分担者

鈴木 京子 (SUZUKI, Kyoko)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：90420679