

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：83902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830045

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイト由来の神経変性因子が関与するシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文)Oligodendrocytic protein contribute to neuronal accumulation of alpha-synuclein in multiple system atrophy

研究代表者

鈴木 康予 (Suzuki, Yasuyo)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・遺伝学部・研究員

研究者番号：60416188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：多系統萎縮症(MSA)は中枢神経系に発症する非遺伝性の神経変性疾患である。MSAの発症機序は十分に解明されておらず、神経変性に対する根本的な治療法がない。これまでの研究で、MSAモデルマウスにおいて、変性したオリゴデンドロサイトの放出する因子が神経細胞内の α -synucleinの発現を促進し、神経細胞の変性の原因となる α -synucleinの不溶化を誘導することが示唆されていた。本研究ではオリゴデンドロサイトから放出され神経変性を引き起こす因子の一つとしてシスタチンCを同定した。オリゴデンドロサイトから放出されるシスタチンCが神経細胞の α -synucleinに及ぼす影響を解析した。

研究成果の概要(英文)：Multiple system atrophy (MSA) is a neurodegenerative disease in which oligodendrocytes and neurons in the central nervous system are affected. To clarify how oligodendrocytic α -synuclein inclusions cause neuronal degeneration, we generated a transgenic mouse for an MSA model in which human wild-type α -synuclein was overexpressed selectively in oligodendrocytes. We established primary culture cells derived from the brain of transgenic mice, and revealed that insoluble mouse α -synuclein was progressively accumulated in neurons, leading to neuronal dysfunction and degeneration. In this study, we identified cystatin C as a neurodegeneration-inducing factor released from oligodendrocytes. Cystatin C triggers insoluble α -synuclein accumulation in neurons of the mouse central nervous system.

研究分野：生化学

キーワード： α -synuclein 神経変性疾患 多系統萎縮症

1. 研究開始当初の背景

(1) 多系統萎縮症 (MSA) について

MSA は難治性の神経変性疾患で、主な症状は自律神経障害、運動失調及びパーキンソン症候群であり、様々な中枢神経部位に神経変性が起こるため「多系統萎縮症」と呼ばれる。MSA の神経変性に対する根本的な治療法はなく、一日も早い治療法の開発が待たれている。MSA の神経病理学的所見の特徴は、オリゴドンドロサイトに α -synuclein が蓄積する封入体 (GCI: Glial Cytoplasmic Inclusion) の形成と神経細胞内における α -synuclein の蓄積である。MSA でみられる神経細胞での α -synuclein の蓄積は、主に軸索と終末に認められ、パーキンソン病に認められる神経細胞内の封入体であるレビー小体の出現は稀である。以上の病理学的観察から、MSA ではパーキンソン病とは異なる神経変性の機序により発病し、オリゴドンドロサイトと神経細胞の両方に α -synuclein が蓄積する特徴的な病態を有することが明らかになっている。

(2) 本研究開始までの研究

我々は、オリゴドンドロサイトでの α -synuclein の蓄積が、神経細胞の変性を引き起こすかどうかを検討してきた。MSA のモデルマウスとしてオリゴドンドロサイト特異的にヒト α -synuclein を強制発現させるトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、Tg マウスの脳に起こる神経変性を観察した。Tg マウス脳のオリゴドンドロサイトではヒト α -synuclein が蓄積した GCI 類似の封入体が形成され、神経細胞では加齢とともにマウス α -synuclein の蓄積と神経細胞数の減少、及び脳萎縮や進行性の運動機能障害が生じた (文献 1)。この結果から、MSA ではオリゴドンドロサイトでの α -synuclein 蓄積による GCI 形成、変性オリゴドンドロサイトから神経細胞に対する神経変性誘導、神経細

胞内の α -synuclein の蓄積による神経細胞の機能障害・細胞脱落の3つのプロセスにより発病すると考えられた。

次に、我々の Tg マウスの脳から初代神経系細胞培養系を構築し、オリゴドンドロサイトが引き起こす神経細胞変性のメカニズムについて検討した。初代培養系でも、ヒト α -synuclein を発現する Tg マウスのオリゴドンドロサイトとの共培養により、内因性マウス α -synuclein が神経細胞に蓄積し、MSA 患者脳と同様に α -synuclein が不溶化していた。そして、神経細胞内では、マウス α -synuclein は微小管タンパクの β -III tubulin と結合して蓄積することも示した (文献 2、3)。

さらに、初代培養実験では神経細胞の変性にオリゴドンドロサイトが関与していることを示す重要な知見が得られた。神経細胞の変性を起こした Tg マウス脳初代神経系培養細胞の培養上清を non-Tg マウス脳の初代培養細胞の培地に加えて培養すると、non-Tg マウス由来の神経細胞内に不溶化した α -synuclein の蓄積が観察された。この結果から、Tg マウス脳において α -synuclein を発現するオリゴドンドロサイトから神経細胞変性を誘導する液性因子が放出されていると考えられた。そこで、Tg マウス脳と non-Tg マウス脳由来の神経系細胞培養の培養上清を分画し、Tg マウス細胞で特異的に分泌されている7つのタンパク質を因子候補とした。因子候補タンパク質は質量分析法により同定した。

2. 研究の目的

MSA は中枢神経系に発症する神経変性疾患である。その発症機序は解明されておらず、明確な診断方法や治療法がない。これまでの研究で、MSA モデルマウスにおいて、変性したオリゴドンドロサイトの放出する液性因子が神経細胞の変性の原因となる α -synuclein の蓄積と不溶化を誘導する可能

性が示唆された。オリゴデンドロサイトから放出される因子は治療戦略を立てる場合の直接的なターゲットになり得る。そこで本研究では、MSA モデルマウスの解析により、変性したオリゴデンドロサイトが放出する因子の候補タンパク質のひとつであるシスタチン C が、神経細胞内の α -synuclein 発現と不溶化に及ぼす影響を解析することにより、神経細胞死を引き起こすシグナル伝達機構の一端を明らかにすることによって、MSA の診断法・治療法の開発に役立てることを目指した。

3. 研究の方法

(1) MSA モデルマウス

MSA モデルマウスとして、wild type のヒト α -synuclein をマウス CNP プロモーターの制御下でオリゴデンドロサイトに特異的に発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを用いた (文献 1)。

(2) マウス脳由来ニューロン・グリア細胞の共培養

マウス脳由来のニューロン・グリア細胞は、P0-P1 の non-Tg および Tg マウスの大脳皮質から調製し、ポリエチレンイミンでコートしたカバーガラスおよび 75 cm² フラスコに調製した細胞を撒いた。細胞は 5% FBS を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + B27/neurobasal medium (1:1) で培養した。培養後 36 日目の細胞の割合は、non-Tg マウス由来細胞培養では、Tuj1 陽性ニューロン 10.4 ± 4.2%、O4 陽性オリゴデンドロサイト 23.5 ± 7.6%、GFAP 陽性アストロサイト 42.0 ± 6.5%、Iba1 陽性ミクログリア 4.3 ± 2.0% であり、Tg マウス由来細胞培養では、Tuj1 陽性ニューロン 10.3 ± 6.3%、O4 陽性オリゴデンドロサイト 23.4 ± 5.3%、GFAP 陽性アストロサイト 44.0 ± 8.1%、Iba1 陽性ミクログリア 4.7 ± 0.9%であった。

(3) シスタチン C の発現系構築と精製

シスタチン C の遺伝子クローニングのため、Tg マウス脳から RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて RT-PCR 法によって、シスタチン C の遺伝子クローニングを行った。得られた cDNA には 3'側に FLAG-tag 配列を連結させ、哺乳動物細胞発現用ベクターである pcDNA3.1 に組み込んだ。発現ベクターは FuGene6 によって、アフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞にトランスフェクションし、シスタチン C を発現させた。細胞外に分泌されたシスタチン C を得るため、シスタチン C を発現させた COS-7 細胞のコンディションド培地を調製した。コンディションド培地は凍結乾燥と限外ろ過により濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィーによって分画し、精製されたりコンビナントタンパク質を得た。

(4) シスタチン C の α -synuclein 発現誘導能の解析

シスタチン C が及ぼすニューロンへの影響を調べるため、精製したシスタチン C を終濃度が 1 μ g/ml となるように培地に添加し、non-Tg マウス脳の初代神経系培養細胞に培養 8 日目から 28 日間投与した。免疫細胞染色のために、細胞は 4%パラホルムアルデヒドで固定し、染色に用いた。また、シスタチン C 投与による神経細胞での α -synuclein 発現の変化を解析するため、mRNA 量は real-time PCR 法で、タンパク質はイムノブロットング法で 定量化を行った。

4. 研究成果

本研究開始までの研究で、Tg マウス脳と non-Tg マウス脳の初代神経系細胞培養の培養上清を分画したフラクションを比較し、質量分析法により Tg マウス脳由来細胞の培養上清で特異的に存在していた 7 種のタンパク

質を同定した。このうち4種が分泌性タンパク質であることがわかった。そこで、同定された4種の分泌性タンパク質について哺乳動物細胞で発現系を構築し、細胞外に分泌されたタンパク質をマウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞に投与して解析を行った。その結果、解析した4種の分泌性タンパク質のうち、神経細胞の α -synuclein 発現を誘導し、神経細胞の変性の原因となる α -synuclein の不溶化を引き起こす分子のひとつの候補として、シスタチン C を同定した。

本研究では、まず、Tg マウスの経時的な解析を行った。3 ヶ月齢マウス脳で外来性ヒト α -synuclein の発現が確認され、6 ヶ月齢の脳ではオリゴドンドロサイトに GCI 様 inclusion が認められるとともに、シスタチン C の発現上昇が確認されたが、内在性マウス α -synuclein の発現に変化はなかった。12 ヶ月齢の脳では外来性ヒト α -synuclein の発現に加え、シスタチン C および 内在性 α -synuclein の両方で発現上昇が認められた。以上のことから、MSA モデルマウス脳において、シスタチン C の発現上昇は神経細胞内の α -synuclein 発現上昇に先だって起こり、オリゴドンドロサイト内の α -synuclein 凝集体形成によって誘導されていることが示唆された。Tg マウス脳において、シスタチン C を発現している細胞を特定するために、マウス脳由来のオリゴドンドロサイト単離培養を行ったところ、Tg マウス由来のオリゴドンドロサイトのみでシスタチン C の発現が確認され、オリゴドンドロサイトで α -synuclein の凝集体が形成されることにより、シスタチン C の発現が誘導されていると考えられた。

次に、精製したシスタチン C を non-Tg マウス脳初代培養細胞に投与し、 α -synuclein 発現量と溶解度の変化を調べた。 α -synuclein の mRNA 量は投与したシスタチン C の濃度依存的に増加が認められた。また、終濃度 1 μ g/ml のシスタチン C 投与によって、神経細

胞内の α -synuclein タンパク質の量が約 3 倍に増加することがわかった。さらに、シスタチン C を投与した non-Tg マウス由来のニューロンでは、Tg マウス由来のニューロンと同様に、 α -synuclein の不溶化が確認された。また、免疫蛍光染色による解析によって、シスタチン C の投与によって神経細胞の主に軸索で α -synuclein の蓄積が引き起こされることが明らかになった (図 1)。

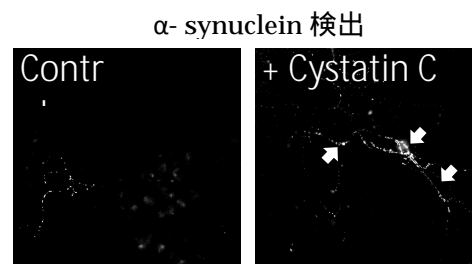


図 1. マウス初代神経系細胞へのシスタチン C 投与

Non-Tg マウス脳から神経系細胞を培養し、その培養液にシスタチン C を投与した。神経細胞の免疫蛍光染色により、シスタチン C 投与によって、 α -synuclein の蓄積が認められた (矢印)。

以上より、オリゴドンドロサイトから放出されるシスタチン C の増加は、神経細胞の α -synuclein 量を増加させ、そして α -synuclein の不溶化と蓄積を引き起こすことにより、神経変性疾患の発症に関与している可能性が明らかになった。

引用文献

- 1 . I. Yazawa et al. (2005) Neuron 45: 847-859.
- 2 . K. Nakayama, Y. Suzuki, I. Yazawa (2009) Am J Pathol 174: 1471-1480.
- 3 . K. Nakayama, Y. Suzuki, I. Yazawa (2012) Biochem Biophys Res Commun 417: 1170-1175.

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 3 件)

Yasuyo Suzuki, Chenghua Jin, Ikuru Yazawa. Cystatin C triggers neuronal degeneration in a model of multiple system atrophy. The American Journal of Pathology, 査読有, 2014, 184: 790–799.

DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.11.018

Yasuyo Suzuki, Chenghua Jin, Tamaki Iwase, Ikuru Yazawa. β -III Tubulin fragments inhibit α -synuclein accumulation in models of multiple system atrophy. The Journal of Biological Chemistry, 査読有, 2014, 289: 24374–24382.

DOI: 10.1074/jbc.M114.557215

Yasuyo Suzuki, Chenghua Jin, Ikuru Yazawa. Increased aggregation of polyleucine compared with that of polyglutamine in dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein. Neuroscience Letters, 査読有, 2013, 552: 156–161.

DOI: 10.1016/j.neulet.2013.07.043

[学会発表](計 2 件)

鈴木康予, 金成花, 矢澤生. 多系統萎縮症におけるオリゴドンドロサイト由来シスタチン C が神経細胞の α -synuclein 蓄積を誘導する. 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11 日, パシフィコ横浜(神奈川県).

鈴木康予, 都竹佳子, 矢澤生. 多系統萎縮症におけるオリゴドンドロサイト封入体形成の神経細胞への影響. Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会, 第 56 回日本神経化学会大会, 第 23 回日本神経回路学会大会 合同大会) 2013 年 6 月 20 日, 国立京都国際会館(京都).

[図書](計 1 件)

Ikuru Yazawa, Yasuyo Suzuki. Nova Science Publishers, Inc. Alpha-Synuclein: Functional Mechanisms, Structure and Role in Parkinson's Disease. 2014, pp. 1–28.

[その他]

ホームページ等

<http://www.inst-hsc.jp/d-genetics/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 康予 (SUZUKI, Yasuyo)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・遺伝学部・研究員

研究者番号: 60416188