

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461282

研究課題名(和文) 神経細胞死制御標的-14-3-3蛋白/HMGB1/Beclin1-解析

研究課題名(英文) Analysis of neuronal death control target 14-3-3 protein / HMGB1 / Beclin1

研究代表者

馬原 孝彦 (Umahara, Takahiko)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70266477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症脊髄前角細胞での14-3-3蛋白eta isoform発現を確認し、リン酸化TDP43との共局在も確認した。リン酸化TDP-43の細胞質移行と前角神経細胞死関与にeta isoformの関連を指摘。脳梗塞急性期虚血コア周辺神経細胞でのHMGB1の細胞質での局在を確認。新規脳梗塞治療法に寄与できる。対照例29例、アルツハイマー病84例、パキンソン病8例、DLB例25例の血液中HMGB1濃度をELISA法で測定。順に、5.4, 6.6, 10.7, 8.1ng/mlで有意に増加。オートファジ-関連物質Beclin1の頸動脈病変での発現を確認しオートファジ-の関与を指摘した。

研究成果の概要(英文)：14-3-3 eta isoform was located in the anterior horn cells of spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis. Co-localization with phosphorylated TDP43 was also confirmed. We pointed out the involvement of 14-3-3 protein eta isoform in the process involving phosphorylated TDP - 43 from the nucleus to the cytoplasm and involved in anterior horn cell death. We confirmed the cytoplasmic localization of HMGB1 in neurons around the ischemic core in the acute phase of cerebral infarction. It can contribute as a translational Research of a novel cerebral infarction therapy. Blood HMGB1 concentrations in blood of 29 control subjects, 84 cases of Alzheimer's disease, 8 cases of Parkinson's disease and 25 cases of dementia of Lewy bodies were measured by ELISA method(5.4, 6.6, 10.7, 8.1 ng / ml). We confirmed localization of autophagy - related protein Beclin 1 in carotid arteriosclerotic lesions and pointed out the involvement of autophagy in arteriosclerosis.

研究分野：老年神経科学

キーワード：14-3-3蛋白 HMGB1 Beclin1 神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

神経細胞死を制御しうる標的物質として 14-3-3 蛋白、High Mobility Group Box (HMGB)1 蛋白、Beclin1 蛋白に着目した。14-3-3 蛋白は分子シャペロンとして、転写因子活性、アポトーシス、細胞周期調節などに重要である。HMGB1 は、DNA 安定化、転写の制御を行うが、「炎症の転移」作用も有する。それぞれに、アルツハイマー病(AD)・パーキンソン病(PD)・レビー小体型認知症(DLB)・孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)・脊髄小脳変性症・脳梗塞・動脈硬化・神経シナプス新生・脳腫瘍に対する治療応用が模索されている。Beclin 1 はオートファジー-必須の蛋白質で、14-3-3 蛋白が結合するとオートファジーは抑制され、HMGB1 との結合で活性化する。この2物質利用でオートファジー-制御可能と仮説を立てた。神経細胞死を制御しうる標的物質において、欠落している課題が各病態での血中 HMGB1 濃度測定と、3 蛋白(14-3-3、HMGB1、Beclin1)の共局在についての解析である。

2. 研究の目的

(1) 健常対照例およびアルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、レビー小体型認知症(DLB)例の血中の HMGB1 濃度を ELISA 法にて測定し、健常者との差異、疾患間での差異、を明らかにする。そして、これらの病態における炎症の関与と神経細胞死の関連を追及する。

(2) ALS の神経細胞に蓄積し封入体を形成するリン酸化 TDP43 を標的とした治療法開発の基礎的検討として、14-3-3 蛋白の関与を確認するために、免疫組織化学的検討を行う

(3) 脳血管障害への HMGB1 の関与が多数報告されているが、脳梗塞例、脳出血例、くも膜下出血例の病理組織標本での HMGB1 の詳細な局在を示した報告はない。治療法開発の為に必須の研究と考え行った。

(4) Beclin 1 に 14-3-3 蛋白が結合するとオートファジーは抑制され、HMGB1 と結合すると活性化するが、それらの共局在を示した報告はない。治療法開発の為に必須の研究と考え、頸動脈硬化病変を用いて行った。

(5) 脳梗塞超急性期の脳血管内治療としての血栓回収による再開通療法時に回収した新鮮血栓の組織標本を作製し、その血栓が心原性血栓かアテロ-ム硬化由来の血栓かを鑑別する。さらにその血栓での 14-3-3 蛋白各 isoform・HMGB・Beclin-1 の分布を免疫組織化学を用い明らかにする。さらに、その共局在を蛍光免疫多重染色を用い検討する。

(6) 最終的に 14-3-3 蛋白各 isoform、HMGB1、Becrin1 の多岐にわたる作用機構(アポトーシス、オートファジー、神経新生への関与)の全体像を反映する局在を確認し、各病態ごとの治療応用への指針(AD でのアポトーシス・炎症抑制・シナプス新生促進、脳梗塞急性期治療での抗 HMGB1 抗体療法の適応濃度、頸動脈硬化でのオートファジー-制御至適濃度など)につながる研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 健常対照例 29 例、AD 例 84 例、PD 例 8 例、DLB 例 25 例の血液中 HMGB1 濃度を ELISA 法で測定する。

(2) 抗 14-3-3 蛋白各 isoform 抗体(合計 8 抗体)・抗 HMGB1 抗体・抗 Beclin-1 抗体を一次抗体とし、ALS 例、脳梗塞例、頸動脈内膜剥離組織、脳血管などの病理組織標本を用い免疫組織化学的検討を行う。蛍光 2 重染色にて共局在の詳細な検討を行う。

4. 研究成果

(1) 健常対照例 29 例、AD 例 84 例、PD 例 8 例、DLB 例 25 例の血液中 HMGB1 濃度を ELISA 法で測定した結果は、健常対照例 5.4 ng/ml, AD 例 6.6 ng/ml, PD 例 10.7 ng/ml, DLB 例 8.1ng/ml であった。PD 例が最も高値で、次いで DLB 例、AD 例、健常対照例の順であった。AD 例でも健常対症例よりは HMGB1 血中濃度が高値であり AD 脳内での炎症反応を反映している可能性がある。PD と DLB は両者を併せてレビー小体病と分類される。AD 例よりこの PD 例と DLB 例(レビー小体病例)が HMGB1 血中濃度がより高値である事は、今回我々が初めて指摘した。血中 HMGB1 濃度はレビー小体病と最も関連する可能性がある。レビー小体はシヌクレインが主要構成成分である。レビー小体病では脳内だけでなく全身の末梢神経終末にもシヌクレインが蓄積する。炎症や酸化ストレスが関与していると報告されており、大脳以外の広範囲は障害分布が血中 HMGB1 濃度高値に関与している可能性がある。現在論文作成中。

(2) 神経細胞死と 14-3-3 蛋白の関連で、正常対照例と 10 例の ALS の脊髄前角細胞での 14-3-3 蛋白 eta isoform 発現をヒト剖検脳で確認した。正常対照例の脊髄前角細胞では微細顆粒状のわずかな局在のみを認めた。ALS の前角細胞の細胞質では斑状に局在していた。孤発性 ALS の脊髄前角細胞死に重要と考えられているリン酸化 TDP43 と、eta isoform の共局在も確認した。その共局在の特徴としては、細胞質の斑状構造物では共局在していたが、孤発性 ALS の病理的特長であるリン酸化 TDP-43 陽性封入体では 14-3-3eta isoform は共局在していなかった。つまり凝集したリン酸化 TDP43 とは eta isoform は共局在しないことになる。凝集する前段階のリン酸化

TDP-43 が核より細胞質に移行し前角神経細胞死に關する課程に 14-3-3 蛋白 eta isoform の關与する可能性を指摘した。Brain Research に掲載。

(3)脳梗塞急性期の虚血コア周辺の神経細胞で、10 例中 3 例に HMGB1 の細胞質での局在を確認した。この 3 例の発症より剖検までの期間は、4,11,29 日であった。陳旧性脳梗塞例では空洞化周囲の脳実質内 CD68 陽性細胞の一部に HMGB1 の局在を認めた。脳出血急性期例の血腫周辺で HMGB1 陽性細胞を多く認めた。くも膜下出血例では血腫周囲の脳実質に HMGB1 の局在は認めなかった。血腫に埋没している脳血管壁内の細胞での HMGB1 の局在を確認した。抗 HMGB1 中和抗体による脳梗塞治療の可能性が指摘されている。今回の結果により、その投与時期を慎重に考慮する必要性を指摘した。新規脳梗塞治療法の橋渡し研究として寄与できる。脳梗塞慢性期でも HMGB1 の局在を認めることより炎症が継続している可能性があり、血管性認知症との関連が示唆された。くも膜下出血後の血管攣縮に HMGB1 の關与が指摘されているがそれを支持する所見を認めた。Histology and Histopathology に掲載。

(4)オートファジ - 關連物質である Beclin1 の頸動脈硬化病変での発現を確認し、マクローファ - ジと形質転化した血管平滑筋細胞に局在していることを確認した。Beclin1 と 14-3-3 蛋白、Beclin1 と HMGB1 の共局在を確認した。現在論文作成中。

(5)血管内治療にて回収した血栓の組織固定が困難であったため、ろ紙を用いた組織固定手技を確立した。脂肪組織含有アテロ - ム血栓性動脈硬化巣血栓と、含まれていない心原性塞栓とを判定した。14-3-3 蛋白、HMGB1、Beclin-1 で免疫組織化学分析し少数例で HMGB1 陽性所見を認めた。血栓形成に HMGB1 の關与が示唆された。現在論文作成中。

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 2 件)

Umahara T, Uchihara T, Hirokawa K, Hirao K, Shimizu S, Hashimoto T, Terasi H, Hanyu H. Time-dependent and lesion-dependent HMGB1-selective localization in brains of patients with cerebrovascular diseases. Histol Histopathol. 査読有 2018 33:215-222. doi: 10.14670/HH-11-914.

Umahara T, Uchihara T, Shibata N, Nakamura A, Hanyu H. 14-3-3 eta isoform colocalizes TDP-43 on the coarse granules in the anterior horn cells of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res. 査読あり 2016 1;1646:132-138. doi: 10.1016/j.brainres.2016.05.051.

[学会発表] (計 13 件)

馬原 孝彦、免疫組織化学から認知症治療開発へ向けての情報提示、第 59 回日本老年医学会学術集会 2017

Umahara T, Wakabayashi K, Hirokawa K, Hanyu H, Uchihara T, 14-3-3 sigma isoform co-localizes with phosphorylated α -synuclein in Lewy bodies and Lewy neurites of the patients with Lewy body disease, XXIII World Congress of Neurology (国際学会) 2017

馬原孝彦、畑中啓邦、波岡那由太、廣瀬大輔、高田祐輔、平尾健太郎、清水聰一郎、羽生春夫、脳血管障害と頸動脈プラ

- クでの HMGB1 の発現 - 「認知機能障害と炎症の転移」の基礎的検討として - 第 2 報、第 9 回日本脳血管・認知症学会 2017

馬原孝彦、山川仁子、櫻井博文、羽生春夫、脳梗塞剖検脳における急性期および慢性期での HMGB1 局在の差異、第 51 回日本成人病 (生活習慣病) 学会 2017

Umahara T, Hanyu H, Uchihara T, Immunohistochemical examination of human mural thrombus associated with carotid plaques. 9th Congress Asian-Pacific Society on Thrombosis Hemostasis 2016

馬原 孝彦、廣瀬 大輔、清水 聰一郎、山川 仁子、平尾 健太郎、金高 秀和、櫻井 博文、羽生 春夫、高齢者脳動脈および脳実質病変での HMGB1 の発現様式、第 58 回日本老年医学会 2016

馬原孝彦、内原俊記、橋本孝郎、秋元治朗、河野道宏、中村綾子、小山俊一、羽生春夫、急性期脳梗塞剖検脳での HMGB1 の発現様式 - 抗体治療の基礎的研究として第 41 回日本脳卒中学会 - 2016

Umahara T, Uchihara T, Shimizu S, Hirao H, Hanyu H, Localization of Beclin 1 in human main cerebral and carotid arteries 第 57 回日本神経学会 2016

馬原孝彦, 山川仁子, 沖田美佐, 櫻井博文, 羽生春夫, 脳細動脈におけるマクロファージと HMGB 1 蛋白の局在 第 51 回日本成人病 (生活習慣病) 学会 2015
Umahara T, Uchihara T, Hashimoto T, Akimoto J, Hanyu H, Immunolocalization of 14-3-3 proteins in atherosclerotic lesions of human carotid and main cerebral arteries. IAGG Asia / Oceania Congress 2015
馬原孝彦, 山川仁子, 高田祐輔, 羽生春夫, オートファージ - 関連物質 Beclin-1 の頸動脈硬化病変での発現 - 第二報 - 第 57 回日本老年医学会 2015
馬原孝彦, 広瀬大輔, 深沢雷太, 平尾健太郎, 清水聡一郎, 羽生春夫, 主幹脳動脈および頸動脈病変での HMGB1 蛋白の局在意義 - 続報 - 第 56 回日本神経学会 2015
馬原孝彦, 羽生春夫, 秋元治朗, 中村綾子, 内原俊記, ダメ - ジ関連分子パターン HMGB 1 蛋白の局在様式 - 脳卒中治療応用への基礎的検討 - 第 40 回日本脳卒中学会 2015

〔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

馬原 孝彦 (UMAHARA, Takahiko)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 70266477

(2) 研究分担者

秋元 治朗 (AKIMOTO, Jiro)

東京医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 10212440

羽生 春夫 (HANYU Haruo)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号 : 10228520

清水 聡一郎 (SIMIZU, Soichiro)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 10385031

宮澤 啓介 (MIYAZAWA, Keisuke)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号 : 50209897

橋本 孝朗 (HASHIMOTO, Takao)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 60266517

赫 寛雄 (TERASHI, Hiroo)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 70307338

織田 順 (ODA, Jun)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号 : 60459500