

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461304

研究課題名(和文) 神経変性疾患における顆粒空胞変性の役割

研究課題名(英文) seeking the role of granulovacuolar degeneration in neurodegeneration

研究代表者

山崎 恒夫 (Yamazaki, Tsuneo)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：80200658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病などの神経変性疾患における蛋白分解系の異常を検討した。その結果、ユビキチンE3リガーゼであるSmurf1、Tom1がアルツハイマー病にみられる異常構造物に存在していること、アルツハイマー病では顆粒空胞変性、変性神経突起、神経原線維変化に異常なシアル化蛋白がみられること、異常なシアル化と異常リン酸化タウとの密接な関連がみられること、を明らかとした。これらの結果はアルツハイマー病の発症に蛋白分解、修飾の異常が関与している可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to seek the roles of abnormal protein degradation in neurodegeneration, especially Alzheimer disease. In results, we found that ubiquitin E3 ligases, Smurf1 and Tom1 are over-expressed in the disease related structures, Hirano body, dystrophic neurites and neurofibrillary tangles. We also found that over sialic acid reaction in granulovacuolar degeneration, dystrophic neurites and neurofibrillary tangles, and this reaction is strongly related to hyper-phosphorylated tau accumulation.

研究分野：神経内科学

キーワード：顆粒空胞変性 オートファジー タウ 神経原線維変化 シアル化

### 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病を始めとした神経変性疾患では疾患特異的蛋白の脳内沈着がみとめられことから、これら疾患を異常蛋白沈着症と捉える概念が定着しつつある。我々は長年にわたりアルツハイマー病で認められるアミロイド (A $\beta$ ) 蛋白の産生メカニズムを研究するなかで、後期エンドソームが A $\beta$  の産生に関与していることを突き止めた。さらに、後期エンドソームがオートファゴソームの性質を有し、少なくとも培養細胞レベルではオートファジーと A $\beta$  の産生が密接に関係していることを明らかにしてきた。このことは、A $\beta$  を始めたとした異常蛋白の沈着背景に、蛋白の分解障害が存在することを示唆している。以上の結果をヒトの脳で証明すべく、我々は脳内でオートファゴソームの性質をもつ細胞内小器官として顆粒空胞変性に着目し、アルツハイマー病の脳には極めて多くの顆粒空胞変性が出現していることを明らかにした。また、こうした変化はアルツハイマー病にとどまらず、多系統萎縮症でも顆粒空胞様の構造物が増加していることを報告してきた。

### 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では神経変性疾患における顆粒空胞変性の役割を明らかにすることを目的とした。具体的には

(1) プロテアソーム系など他の蛋白分解系と顆粒空胞変性の関連性を明らかにすること。

(2) 顆粒空胞変性のもつオートファジーとしての性質を蛋白修飾の視点から明らかにすること。

の2点を研究目的とした。

### 3. 研究の方法

研究(1): 従来、ユビキチン・プロテアソーム系の蛋白分解は標的蛋白の選択的分解系であるのに対して、オートファジー・リソソームシステムは莫大な量の細胞質蛋白やオルガネラをオートファゴソームによって取り込み、ライソソームと融合することによりオートファゴソーム内の物質を大量にかつ非選択的に分解する系と考えられてきた。しかし、オートファゴソームに結合するユビキチン結合蛋白が発見され、プロテアソームの障害によりオートファジーが誘導されることが判明し、2つの分解系にクロストークがあることが明らかになっている。そこで、アルツハイマー病脳におけるユビキチン・プロテアソームの活性状態を調べる目的で、

E3 ユビキチンリガーゼである Smurf1 (Smad ubiquitination regulatory factor 1) の発現を、免疫組織化学的に検索した。

同様に E3 ユビキチンリガーゼであり、かつエンドソームにも発現してオートファゴ

ソームの成熟にも関与する Tom1 (target of Myb1) の発現を、免疫組織化学的に検索した。

研究(2): 顆粒空胞変性にはリン酸化タウが存在している。一方、リン酸化タウは過剰な糖化修飾を受けていることも知られている。このことは顆粒空胞変性中のリン酸化タウがシアル化を受けている可能性を示唆している。この点を明らかにするために、抗シアル酸抗体を用いてアルツハイマー病の脳切片を免疫組織化学的に検索した。

### 4. 研究成果

#### 研究(1):

アルツハイマー病における Smurf1 の発現

予想外ではあったが、Smurf1 の反応性は顆粒空胞変性にはみられなかった。一方興味深いことに右図の如く、一部の海馬神経細胞内にロッド状の反応がみられた。この構造物を他の染色と比較すると平野小体であることが判明した。平野小体はアルツハイマー病以外にも正常加齢老人脳でもみられる構造物で、F-actin との関連が指摘されている。この点を実験的に確認するために培養細胞を actin-stabilizing toxin jpk で処理をすると、既報の文献どおり細胞内に平野小体様の F-actin の凝集が形成され、やはり Smurf1 の反応が見られた。(図は下記発表論文 から改変引用)



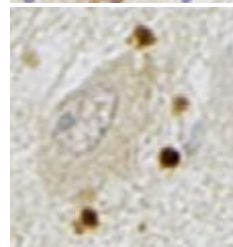
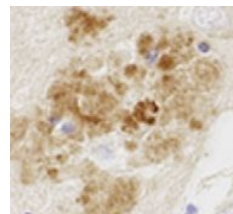
アルツハイマー病における Tom1 の発現

この結果も予想外であったが、顆粒空胞変性には反応性が認められず、変性神経突起(右図上)、perisomatic granules (右図中)、神経原線維変化(右図下)に反応が見られた。

Tom1 の反応は Tom1 の共役蛋白である Tollip や myosin VI と一致していたことから、これらの部位で確かに蛋白分解系の障害が生じていることが示唆された。

また、二重蛍光染色の結果、Tom1 の反応はリン酸化タウとライソソーム蛋白 LAMP2 と共局在していた。

(図は下記発表論文 から改変引用)

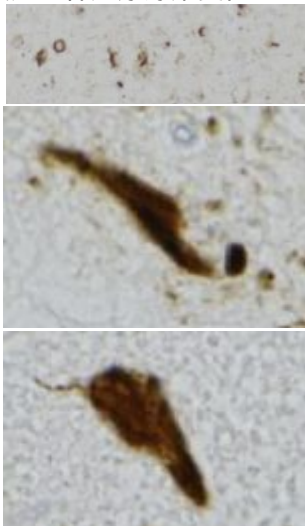


研究(2): アルツハイマー病脳のシアル化

抗シアル酸抗体による免疫染色を行ったところ、確かに顆粒空胞変性に免疫反応を認めた。(右図)



一方、非常に強い反応が神経原線維変化にも認められ、この反応は大脳(右図、上・中)のみならず、脳幹部(右図下)の神経原線維変化にも認められた。



リン酸化タウ抗体と蛍光重染色を行うと、シアル酸抗体と反応性は完全に一致した。

つぎに、他の変性疾患でも同様の実験を行ったところ、Pick 小体、ballooned neuron、進行性核上性麻痺の神経原線維変化とは反応するものの、Lewy 小体、Bunina 小体、skein-like inclusion などのタウ以外の蛋白凝集体とは無反応だった。

以上の結果は、シアル化と過剰リン酸化タウの強い関連性を示唆していると思われる。(図は下記発表論文 から改変引用)

#### 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)

Makioka K, Yamazaki T, Takatama M, Ikeda M, Murayama S, Okamoto K, Ikeda Y. Immunolocalization of Tom1 in relation to protein degradation systems in Alzheimer's disease. J Neurol Sci 査読有 365:101-107, 2016 DOI:10.1016/j.jns.2016.03.035  
Nagamine S, Yamazaki T, Makioka K, Fujita Y, Ikeda M, Takatama M, Okamoto K, Yokoo H, Ikeda Y. Hypersialylation is a common feature of neurofibrillary tangles and granulovacuolar degenerations in Alzheimer's disease and tauopathy brains. Neuropathology 査読有 36 :333-345, 2016 DOI:10.1111/neup.12277.

Makioka K, Yamazaki T, Takatama M, Ikeda M, Okamoto K. Immunolocalization of Smurf1 in Hirano bodies. J Neurol Sci 査読有 336:24-28, 2014 DOI:10.1016/j.jns.2013.09.028

〔学会発表〕(計 8 件)

長嶺俊、山崎恒夫、牧岡幸樹、藤田行雄、池田将樹、高玉真光、岡本幸市、横尾英明、池田佳生 シアル酸化はAlzheimer病や他のtauopathyの 病理学的構造物に共通する特徴である 第34回日本認知症学会学術大会 2015.10.3 リンクステーション青森(青森県・青森市)  
牧岡幸樹、山崎恒夫、高玉真光、岡本幸市、池田佳生 Alzheimer病におけるTom1とTom1関連蛋白の発現に関する免疫組織学的検討 第34回日本認知症学会学術大会 2015.10.3 リンクステーション青森(青森県・青森市)

Kouki Makioka, Tsuneo Yamazaki, Masamitsu Takatama, Koichi Okamoto, Yoshio Ikeda. Immunolocalization of Tom1 and Tom1-Relating Proteins in Alzheimer's disease. VAS-COG World 2015.9.7 Tokyo(JAPAN)

Kouki Makioka, Tsuneo Yamazaki, Masamitsu Takatama, Koichi Okamoto, Yoshio Ikeda. Immunolocalization of Tom1 and Tom1-Relating Proteins in Alzheimer's disease. AAIC 2015: Alzheimer's Association International Conference 2015

2015.7.20. Washington D.C (USA)

牧岡幸樹、山崎恒夫、高玉真光、岡本幸市、池田佳生 Alzheimer病におけるTom1の発現に関する免疫組織学的検討第33回日本認知症学会学術集会

2014.11.30 パシフィコ横浜 (横浜市・神奈川県)

Kouki Makioka, Tsuneo Yamazaki, Masamitsu Takatama, Koichi Okamoto, Yoshio Ikeda. Immunolocalization of Tom1 in Alzheimer's disease. AAIC2014: Alzheimer's Association International Conference 2014.

2014.7.15 Copenhagen (Denmark)

牧岡幸樹、山崎恒夫、高玉真光、岡本幸市、池田佳生 Alzheimer病におけるTOM1の発現に関する免疫組織学的検討 第55回日本神経学会学術大会 2014.5.22

福岡国際会議場 (福岡市・福岡県)

牧岡幸樹、山崎恒夫、高玉真光、岡本幸市、池田佳生 Hirano小体におけるSmurf1の発現について 第5回日本血管性認知障害研究会 2014.4.5 メルパルク京都 (京都市・京都府)

〔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

山崎 恒夫 (YAMAZAKI, Tsuneo)  
群馬大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：80200658

##### (2) 研究分担者

牧岡 幸樹 (MAKIOKA, Kouki)  
群馬大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10420176

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )