

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461322

研究課題名(和文)軸索ジストロフィーモデルマウスを用いた神経軸索障害の成因に関する研究

研究課題名(英文)A morphological approach to the etiology of axonal degeneration in a neuroaxonal dystrophy mouse

研究代表者

芳川 浩男 (yoshikawa, hiroo)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90273680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経軸索ジストロフィーの成因を検討するため、gad (gracile axonal dystrophy) mouse(ポリユビキチン化に関連したUCHL-1遺伝子の異常)の後根神経節細胞を用いた培養実験を行った。免疫学的、化学的、分析学的手法を用いて検討したが、病理像の再現には至らなかった。しかし、タンパク質分解機構を再検討したところ、既報のポリユビキチン化異常に加えて、オートファジーによるタンパク質分解異常が新たに確認された。ユビキチン・プロテオソーム障害がオートファジーのタンパク質分解機構にも影響している事象であり、これらの破綻による未消化物質の蓄積が軸索障害の原因であることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate an etiology of neuroaxonal dystrophy, dorsal ganglion neurons of the gracile axonal dystrophy (gad) mice which are caused by an in-frame deletion including exons 7 and 8 of Uch-L1, encoding the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase (UCH) isozyme (L1), were studied in vitro. Administration of antibodies against axonal flow motor molecules, or chemicals such as taxol or colchicine could not reproduce the similar pathology to axonal dystrophy. Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1), microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3), and the ubiquitin-binding protein p62 were, however, expressed intensively at the gracile nucleus on immunohistological study. The present data suggest elevated function of autophagy in gad mice. Especially, p62 which is an autophagosome cargo protein may compensate for impaired proteolysis through the ubiquitin-proteasome pathway which causes accumulation of undigested organelles.

研究分野：遺伝性末梢神経障害、末梢神経病理

キーワード：軸索ジストロフィー 質量顕微鏡 軸索輸送 ユビキチン・プロテオソーム オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

(1)Seitelberger 病、Hallervorden-Spatz 病に代表される神経軸索ジストロフィー (neuroaxonal dystrophy:NAD) は、下肢麻痺や運動機能の低下を呈する予後不良な疾患であるが、臨床報告は稀であるため、現在に至るまで病気のメカニズムは不明である。しかし最近 NAD と同様の症状を示すモデルマウスが複数報告され、我々はその一つである gad (gracile axonal dystrophy)mouse を用い、NAD の成因を検討した。

(2)gad mouse は Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) 遺伝子が欠損しており、これによってユビキチン・プロテオソームシステム (ユビキチンを介したタンパク質分解システム:UPS) の過程のポリユビキチン化が阻害されることが報告されている。しかし UCH-L1 は神経全般に発現しているにもかかわらず病理像は後根神経節感覚神経の中枢枝末端が投射している延髄薄束核内に限局している。同部位を電子顕微鏡で観察すると、軸索内に異常に集積したスフェロイドが見られ (図 1)、これが病因であると考えられる。

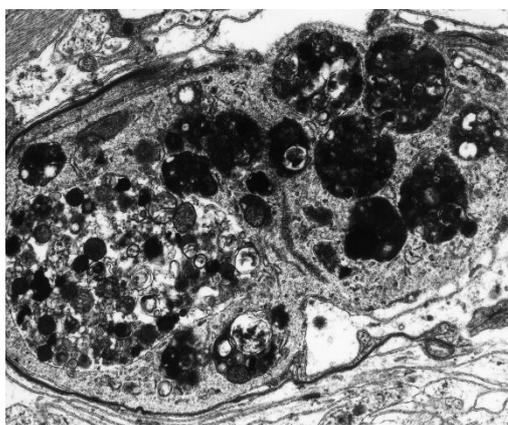


図 1 延髄薄束核の神経軸索内の蓄積物

この蓄積が軸索流障害によるものか、UPS の

障害によるものか、或いは他の要因によるものかはわかっていない。

(3)本基礎研究を始める前に我々は gad mouse の病巣部 (延髄薄束核) に対して質量顕微鏡による解析を行い、sulfatide(ST)C18 が増加していることを確認した<sup>1)</sup>。薄束核には前述した通り、下肢感覚を司る後根神経節細胞 (DRG) より伸びた神経終末が投射しており、ST が増加した病理的意義、さらに異常な集積物の原因を短時間に簡便に検討するため DRG を培養し、病理像の再現或いは治療の可能性を検討した。

## 2. 研究の目的

gad mouse が NAD 様症状を示す期間はおよそ生後 10 週齢ほどからであり、下肢麻痺による運動障害及び摂食障害等で死亡するのは 30-40 週齢である。これらの育成期間の長さ、ホモ体を作る手間、生体に対する NAD を抑制するための薬品投与の困難さから、期間が短く、直接的な種々のアプローチが比較的容易な DRG 培養による NAD の再現を目的とした。しかしながら、上述したように生体で症状が現れるまでの期間が比較的長い為、およそ一か月が限度である培養では再現できない可能性もある。そのため生体に対しても NAD の成因に関する検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1)DRG 培養

#### 単独培養

胎生期 14 日前後の control 又は homo の仔マウスより DRG を採取、ガラス或いはプラスチックディッシュで 1~4 週間培養した。

## 共培養

の培養に加えて Neuro2a、小脳、大脳皮質及び海馬組織を用い、DRG 培養群に加えて共培養を行った。

### (2)軸索流阻害剤投与

#### 免疫学的阻害剤

軸索流に関係したモータータンパクであるキネシンやダイニン抗体を DRG 培養細胞へ添加した。

#### 化学的阻害剤投与

コルヒチン、パクリタキセル、DMSO、EHNA (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine)、monastrol、Ubiquitin aldehyde を DRG 培養細胞へ添加した。

### (3)質量顕微鏡

約 4 週間培養した control 及び homo の DRG を MALDI-TOF 型質量顕微鏡分析機を用いて解析した。

### (4)免疫学的解析

#### シナプス分析

synapsin I 抗体を用いて生後 30 週前後の control 及び homo mouse の延髄薄束核を染色した。

#### オートファジー分析

ユビキチン、LC3、p62 及び LAMP1 抗体を用いて生後 30 週前後の control 及び homo mouse の延髄薄束核を免疫染色した。

## 4. 研究成果

### (1)DRG 培養における NAD の再現

homo DRG 細胞の培養

homo より取り出した DRG の培養はもっとも直接的な NAD の観察となるはずであったが、光学顕微鏡及び質量顕微鏡による分析では control と比べて差が見られなかった。これは培養期間が 1 か月という短期間だったからか、あるいは DRG 単独培養では再現できない等の原因があると考えられた。

## 共培養

神経の末端で障害が起こる点と、電子顕微鏡で集積した異常物質に膜構造が見られることから、他の神経細胞組織と共培養を行い、何らかの膜利用（シナプス形成等）を起こすことで再現できるかを試みたが、技術的な要因で検討することはできなかった。

## 軸索流障害

homo mouse の培養では再現できなかったが、正常マウスより取り出した DRG 培養細胞に対して軸索阻害剤投与等の負荷を行い NAD 様の病理像が見られるかを検討した。軸索の変性像は確認できたが NAD に見られた物質の貯留像は再現できなかった。

これらの培養実験の結果、in vitro の環境下では NAD が再現できない或いは軸索流又は膜利用障害が原因ではない可能性が示唆された。

### (2)生体へのアプローチ

#### シナプスの検討

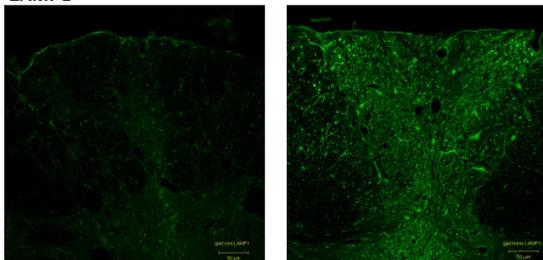
培養において見られなかったが、生体においては観察される可能性があることから、シナプス関連膜抗体を用いて薄束核を免疫染色したが、control と homo で差は見られなかった。

#### オートファジーの検討

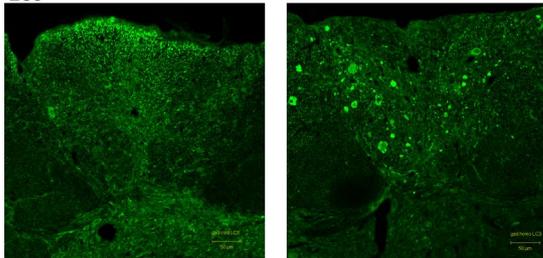
本研究を立案した段階では検討していなかったが、UCH-L1 遺伝子が UPS に関連していることから、タンパク質分解に関連したもう一つのシステムであるオートファジーとの関連を検討した。

LAMP1(タンパク質分解酵素であるリソソームの膜タンパク質)、LC3(オートファジー関連タンパク質)、p62(オートファジーにより分解されるタンパク質)、ユビキチン抗体を用いて薄束核を免疫染色したところ、control に比べて homo で LAMP1、LC3、p62 は増加が見られ、ユビキチンでは減少した(図2)。

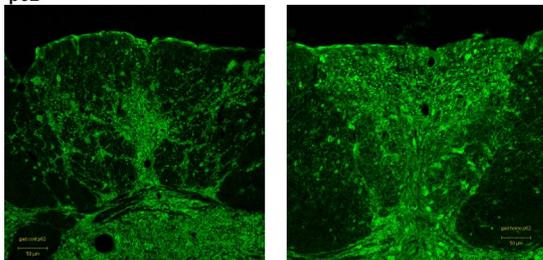
LAMP1



LC3



p62



ubiquitin

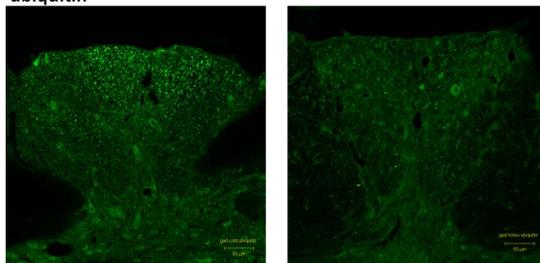


図2 上から1段目(LAMP1)、2段目(LC3)、3段目(p62)、4段目(ユビキチン)左像(control)、右像(homo)。延髄薄束核の免疫染色像。

これにより homo ではオートファジーによるタンパク質分解過程に障害がある可能性が示唆された。

#### UPS とオートファジー

選択的分解といわれる UPS とバルク分解といわれるオートファジーは独立して語られることが多いが、近年では相互に左右するタンパク質(p62等)の存在が明らかとなり UPS とオートファジーはクロストークすることが報告されている<sup>2)</sup>。UPS の障害がオートファジーを誘導することは報告されており<sup>2,3)</sup>、本マウスでも免疫染色の結果からオートファジーが亢進されていると思われる。しかしながらオートファジーにより代謝されるはずの p62 が増加している点ではその機構に何らかの障害が示唆される。例えば p62 はユビキチン化タンパク質をオートファゴソームへ輸送するレセプターとして働き<sup>2,4)</sup>、リソソームで分解する流れになるが、そのユビキチン化に障害のある本マウスではオートファジーによる分解過程が正常に働かない可能性がある。

一方オートファジー欠損組織では p62-ユビキチン陽性の凝集体が形成され<sup>2,5)</sup>、本マウスの電顕像でも凝集体は見られるが、ユビキチン

は減少傾向にあり、報告されている凝集体とは違う性質のものと思われる。

本マウスの遺伝的特徴から単純に紐解くと、UPS 異常による未分解タンパク質をオートファジーが代替しきれなくなった結果生じた病態とも言えるが、近年多く報告されている UPS とオートファジーの関係を考えると、UPS の異常がオートファジーの分解過程そのものに影響を与える相補的な関係の破綻が病態に表れている可能性が示唆される。

#### 今後の展開

本マウスの病態が UPS の異常と関連したオートファジーの機能不全であることが主な原因であることが確認された。膜利用や軸索輸送に関しては本実験では陰性の結果となったが、dynactin I の低下がオートファゴソーム輸送を低下させるという報告もあり<sup>6)</sup>、オートファジーとの関連を考えると無関係であると断定はできない。

異常タンパク質の蓄積という意味ではパーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症などと共通した所見ではあるものの、軸索ジストロフィーの成因のすべてを説明するには臨床像、病理像において違う所見も多くみられる。特に神経細胞体内のオートファジーの、それに伴う異常蓄積は本マウスでほとんど見られず、それら未消化タンパクが軸索輸送によって末端に運ばれたと考えるには少々無理があるかもしれない。あるいは異常タンパク質の蓄積とオートファジー機能不全は二次的な結果であり、軸索内で不要となったミトコンドリアや細胞骨格などのタンパク質が、UPS 異常により選択的に分解されず、末端へ輸送された末に引き起こされた可能性もある。

近年、神経系オートファジーは多く報告されているが、本マウスと形態的な特徴の似たマウスはほとんど報告されていない。本研究は軸索ジストロフィーを引き起こす新規の神経特異的オートファジー異常の一種である可能性が考えられる。

今後、本マウスを用いた実験では生体及び培養を用いてオートファジー関連物質の局在と機能を検討し、UCH-L1、UPS 及びオートファジーにどのようなクロストークがあるのかを検討する。

#### <引用文献>

- 1) Onishi, S., Tatsumi, Y., Wada, K., Yang, H.J., Sugiura, Y., Setou, M., Yoshikawa, H. Sulfatide accumulation in the dystrophic terminals of gracile axonal dystrophy mice: lipid analysis using matrix-assisted laser desorption /ionization imaging mass spectrometry. *Med.Mol.Morphol.*, 46(3),160-165. (2013)
- 2) 小松雅明、一村義信、動物細胞におけるユビキチンシステムとオートファジーの機能関連、生化学、第 84 巻、2012、472-478
- 3) Iwata, A., Riley, B.E., Johnston, J.A., & Kopito, R.R. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J. Biol. Chem.*,280,40282-40292. (2005)
- 4) Johansen, T. & Lamark, T. Autophagy, Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy.*, 7,279-296. (2011)
- 5) Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y.S., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K., &

Komatsu, M. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. J. Biol. Chem., 283, 22847-2857. (2008)

6) Katsuno, M., Ikenaka, K., Kawai, K., Sobue, G. Dysfunction of dynactin 1 in motor neuron degeneration. Rinsho Shinkeigaku. 53(11), 1084-1086. (2013)

## 5. 主な発表論文等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

芳川 浩男 (YOSHIKAWA, Hiroo)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90273680

#### (2) 研究分担者

渡邊 将平 (WATANABE, Syouhei)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00529018

#### (4) 研究協力者

右近 紳一郎 (UKON, Shinichirou)

兵庫医科大学・内科学(神経・脳卒中科)・大学院生

辰巳 由記 (TATSUMI, Yoshiki)

兵庫医科大学・内科学(神経・脳卒中科)・実験補助