

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640005

研究課題名(和文)概日時計システムの神経保護機構における役割解析

研究課題名(英文)Analysis of roles of circadian clock-related proteins in neuroprotection

研究代表者

眞田 佳門 (Sanada, Kamon)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：50431896

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)：神経変性疾患の一つであるALSは、運動ニューロンが選択的に変性して脱落する疾患であり、根治療法の確立には至っていない病気である。従来から、神経細胞に内在する神経保護機構を活性化することにより、ALS等の神経変性疾患の症状を緩和できることが知られている。そのため、神経保護作用を示す新規分子の発見は、症状を緩和する方策の開発の礎になる。

私共は本研究において、概日時計の分子であるPeriod2が、ALSのin vitroおよびin vivoモデルにおける神経変性の緩和に寄与することを見出した。この成果により、概日時計と神経保護が密接に関連しているという極めてユニークなモデルを提示することができた。

研究成果の概要(英文)：ALS is a fatal and untreatable neurodegenerative disease characterized by the loss of upper and lower motor neurons. As enhancement of defense mechanisms intrinsic to neurons remains a potential strategy to counteract neuron degeneration in ALS, uncovering novel neuroprotective molecules within neurons could lead to the development of therapeutic approaches for ALS and related neurodegenerative diseases. We have previously found that NFIL3 (nuclear factor interleukin 3-regulated; also known as E4BP4) plays neuroprotective roles in neurons in vitro and in vivo. As NFIL3 is known to play important roles in the circadian clock system, particularly in the transcriptional control of clock gene periods, this raises potential roles of clock genes in neuroprotection. In the present study, we have found that Period2 protein levels control neuroprotective potential of neurons. The present study sheds light on a potential linkage between circadian clock proteins and neuroprotection.

研究分野：神経科学

キーワード：神経保護 概日時計

### 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の一つである ALS (筋萎縮性側索硬化症) は、一次運動ニューロンおよび二次運動ニューロンが選択的に変性して脱落する疾患であり、根治療法の確立には至っていない病気である。従来から、神経細胞に内在する神経保護機構を活性化することにより、ALS 等の神経変性疾患の症状を緩和できることが知られている。そのため、神経保護作用を示す新規分子の発見は、症状を緩和する方策の開発の礎になる。本研究では、概日時計に着目し、その中枢分子の神経保護における役割を明らかにすることにより、神経保護機構のさらなる理解を目指した。

### 2. 研究の目的

私共は従来、NFIL3 (別名 E4BP4) と呼ばれる転写因子が神経保護作用を示し、ALS 細胞モデルおよび ALS マウスモデルにおいて過剰発現すると、神経変性を抑制することを見出した (Tamai *et al.*, 2014)。重要なことに、NFIL3 は概日時計の中枢分子である *Period2* 遺伝子の発現を抑制し、概日時計機構に関与することが知られる。この知見から、「概日時計の中枢分子が神経保護に寄与するのではないか」という仮説が導き出された。そこで本研究では、概日時計の中枢分子である *PERIOD2* に着目し、その神経保護作用を検証した。

### 3. 研究の方法

マウス大脳由来の神経細胞を初代培養し、各種の神経毒に暴露することによって神経変性を誘導した。この細胞を神経変性の細胞モデルとして利用した。また、ヒト SOD1 タンパク質の 93 番目の Gly が Ala に置換した変異は家族性 ALS に認められる変異の一つである。この SOD1 G93A 遺伝子を培養神経細胞に発現させると、培養神経細胞は変性することから、この細胞を ALS 細胞モデルとして用いた。さらに、ALS モデルマウスとして、上述の変異 SOD1 を過剰発現するマウスを用いた。本マウスは、運動ニューロンの変性が観察できると共に、筋萎縮に伴う体重減少を示すことが知られる。

### 4. 研究成果

(1) 神経細胞における *Period2* (以後、*PER2* と呼ぶ) の役割を調べる目的で、神経毒に曝された神経細胞における *PER2* 量の変化を調べた。本実験では、神経毒として高濃度グルタミン酸および過酸化水素を用いた。グルタミン酸は興奮性神経伝達物質としてよく知られているが、過剰なグルタミン酸は神経細胞内への  $Ca^{2+}$  の過剰流入を惹起し、神経細胞死を引き起こすことが知られる (興奮毒性と呼ぶ)。一方、過酸化水素は活性酸素の一種であり、神経細胞に酸化ストレスを与えることにより、神経細胞死を誘発する。ALS をはじめとする神経変性疾患において、細胞外グ

ルタミン酸濃度の上昇や酸化ストレスの亢進が認められる。本解析の結果、いずれの神経毒においても、神経毒への暴露に伴って *PER2* 量の低下が観察された (図 1)。これらの結果から、神経細胞が種々の神経毒に曝された場合に、*PER2* 量が低下することが明らかになった。

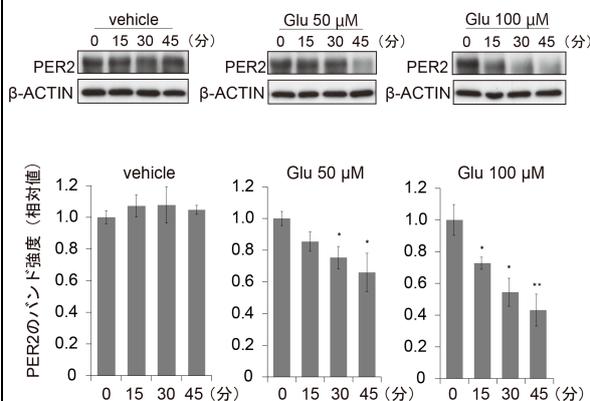


図 1 : 高濃度グルタミン酸の曝露による *PER2* 量の低下

マウス大脳由来の培養神経細胞を、培養 8 日目において高濃度グルタミン酸 (50 μM または 100 μM) に曝露し、各時間において神経細胞を回収した。その後、細胞懸濁液を抗 *PER2* 抗体および抗  $\beta$ -ACTIN 抗体を用いたウェスタンブロット解析に供した。Vehicle はグルタミン酸の代わりに水で処理した場合、Glu は高濃度グルタミン酸で処理した場合を表す。(上) ウェスタンブロット像の典型的な例。(下) *PER2* のバンド強度を定量し、平均値  $\pm$  標準誤差 (各グルタミン酸濃度における時間 0 の平均値を 1 とした相対値) で示した。n = 4, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (時間 0 の値に対するスチューデントの t 検定)。

(2) *PER2* 量の低下が神経変性に及ぼす影響を調べるため、大脳由来の培養神経細胞で *PER2* 量を低下させた。さらに、これら神経細胞を高濃度グルタミン酸 (50 μM) に 30 分間曝露した。その後、神経細胞の変性を神経突起の退縮・断片化、および核の萎縮・断片化により判断した。

*PER2* の発現を抑制しなかった場合、高濃度グルタミン酸への曝露に伴って、変性した神経細胞の割合が約 38% にまで上昇した。一方、*PER2* を抑制した場合、その割合が約 27% にまで低下した。このことから、*PER2* 量の低下は、高濃度グルタミン酸の興奮毒性に起因する神経変性を抑制することが明らかになった。

次に、*PER2* の過剰発現が興奮毒性に起因する神経変性に与える影響を調べた。そこで、大脳由来の培養神経細胞において *PER2* 量を増加させて、高濃度グルタミン酸に曝露した。その結果、*PER2* の発現を増加しなかった場合、高濃度グルタミン酸への曝露に伴って、変性した神経細胞の割合は約 37% にまで上昇す

るが、PER2 過剰発現細胞では 54%にまでその割合が顕著に増加した(図 2)。以上の結果から、PER2 量の増加に伴って神経細胞は興奮毒性に対して脆弱になること、さらに PER2 量の低下に伴って神経細胞は興奮毒性に対して抵抗性を示すことが判明した。

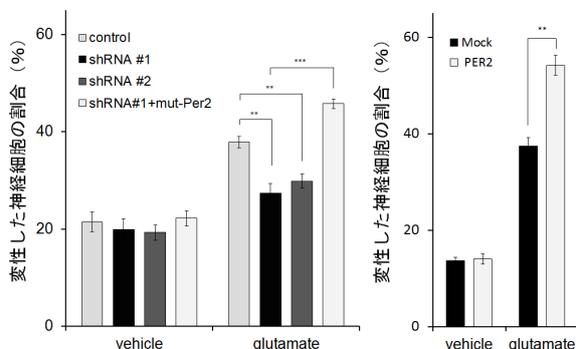


図 2：高濃度グルタミン酸曝露に起因する神経変性に及ぼす PER2 の影響

神経細胞中で、神経変性している細胞（神経突起の退縮・断片化、および核の萎縮・断片化が認められる細胞）の割合を定量し、平均値±標準誤差で示した。データは独立した3回もしくは4回の実験の平均値。Vehicle はグルタミン酸の代わりに水で処理した場合、Glutamate は高濃度グルタミン酸で処理した場合を表す。各実験において、それぞれの条件について100個以上のGFP陽性細胞を調べた。 $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$  (ステューデントのt検定)。

(3) ALS モデル細胞の神経変性に対して PER2 量の変化がどのような影響を及ぼすかを次に調べた。具体的には、大脳由来の培養神経細胞において、PER2 量を変化させた場合に、変異 SOD1 に伴う神経変性に及ぼす影響を調べた。その結果、PER2 量を減少させると、神経変性する細胞の割合が低下した。逆に、PER2 を増加させると、神経変性する細胞の割合が顕著に増加した。これらの結果から ALS モデル細胞の神経変性においても、PER2 量の低下が神経保護作用を示すことが示唆された。

(4) PER2 量の低下が生体内においても神経保護作用を示すか否か検証するため、ALS モデルマウスにおける PER2 の役割を調べた。この目的のため、PER2 を過剰に発現する ALS モデルマウスと PER2 の発現が減少している ALS モデルマウスを作製した。ALS モデルマウスでは、運動神経の脱落によって、投射先の筋萎縮が引き起こされ、疾患の進行に伴い体重が減少することが知られている。そのため、野生型マウスは老齢化が進むまで体重が増加傾向にあるが、ALS モデルマウスでは、ある時期を境に体重が減少傾向に転じる。従来の多くの研究において、体重がピークに至

る時期を測定して、病態の指標とする方法が広く利用されている。そこで PER2 量の変化が、この病態に及ぼす影響を調べた。その結果、PER2 量の低下に伴って、病態が緩和される傾向が観察できた。一方、PER2 量の増加によって、病態が進行する傾向が見出された。さらに、脊髄における運動ニューロンの変性の度合いを調べたところ、PER2 量の低下によって、運動ニューロンの変性が緩和される傾向が観察できた。一方、PER2 量の増加によって、神経変性が進行する傾向が見出された。このことから、PER2 量は *in vitro* および *in vivo* において、神経保護に大きく関与することが示唆された。これらの知見から、概日時計に関与する分子が神経保護機構に大きく寄与しているという、極めてユニークな現象が明らかになった。また、概日時計を調節することによって、神経変性を緩和できる可能性が示唆された。

## 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 7 件)

- ① Ji-Ho Hong, Yongdo Kwak, Youngsik Woo, Cana Park, Seol-Ae Lee, Haeryun Lee, Sung Jin Park, Yeongjun Suh, Bo Kyoung Suh, Bon Seong Goo, Dong Jin Mun, Kamon Sanada, Minh Dang Nguyen & Sang Ki Park. (2016) Regulation of the actin cytoskeleton by the Ndel1-Tara complex is critical for cell migration *Scientific Reports* 査読有, 6, Article number: 31827  
DOI:10.1038/srep31827
- ② Yutaka Takeo, Nobuhiro Kurabayashi, Minh Dang Nguyen & Kamon Sanada (2016) The G protein-coupled receptor GPR157 regulates neuronal differentiation of radial glial progenitors through the Gq-IP3 pathway *Scientific Reports*, 査読有, 6, Article number: 25180  
DOI:10.1038/srep25180
- ③ Kurabayashi N, Nguyen MD, Sanada K (2015) DYRK1A overexpression enhances STAT activity and astroglialogenesis in a Down syndrome mouse model. *EMBO Reports*, 査読有, 16: 548-562.  
DOI: 10.15252/embr.201540374
- ④ Shim SY, Perez de Castro I, Neumayer G, Wang J, Park SK, Sanada K, Nguyen MD (2015) Phosphorylation of targeting protein for *Xenopus* kinesin-like protein 2 (TPX2) at threonine 72 in spindle assembly. *J Biol Chem*. 査読有 9: 122-134.  
DOI: 10.1074/jbc.M114.591545
- ⑤ Tamai S, Imaizumi K, Kurabayashi N, Nguyen

MD, Abe T, Inoue M, Fukada Y, Sanada K. (2014) Neuroprotective role of the basic leucine zipper transcription factor NFIL3 in models of amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem*, 査読有, **289**, 1629-1638.  
DOI: 10.1074/jbc.M113.524389

⑥ Belzil C, Asada N, Ishiguro K, Nakaya T, Parsons K, Pendolino V, Neumayer G, Mapelli M, Nakatani Y, Sanada K., Nguyen MD. (2014) p600 regulates spindle orientation in apical neural progenitors and contributes to neurogenesis in the developing neocortex. *Biol Open*, 査読有, **3**, 475-485.  
DOI: 10.1242/bio.20147807.

⑦ Belzil C, Ramos T, Sanada K., Colicos MA, Nguyen MD. p600 stabilizes microtubules to prevent the aggregation of CaMKII $\alpha$  during photoconductive stimulation. *Cell Mol Biol Lett*, 査読有, **19**, 381-392, 2014.  
DOI: 10.2478/s11658-014-0201-9

[学会発表] (計 5 件)

① Sanada K. Circadian clock-related protein NFIL3 protects neurons against neurotoxic stress and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis models. 第 89 回生化学会大会 (2016 年 9 月 27 日)、仙台国際センター (宮城県仙台市)

② Kurabayashi N, Sanada K Increased dosage of DYRK1A enhances STAT activity and astrocytic differentiation of neocortical progenitors in a mouse model of Down's syndrome. Neuroscience 2015, Chicago, USA (October 17-21, 2015)

③ 倉林 伸博、眞田 佳門 ダウン症関連因子 DYRK1A と DSCR1 の過剰発現による神経幹細胞の神経分化抑制。第 37 回日本分子生物学会年会(2014 年 11 月 25 日)、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

④ 武尾 優、倉林 伸博、眞田 佳門 大脳新皮質神経前駆細胞の運命決定における 7TM の役割。第 37 回日本分子生物学会年会(2014 年 11 月 25 日)、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

⑤ 今泉 景介、玉井 総一、倉林 伸博、眞田 佳門 bZIP 型転写因子 Nfil3 による筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの神経変性の抑止。第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 27 日)、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

[その他]  
ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/mgrl/>

アウトリーチ活動・新聞テレビ報道など  
「ダウン症で脳発生異常が起こる仕組み  
マウスで発見」科学新聞 (2015 年 10 月  
2 日掲載)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

眞田 佳門 (SANADA, Kamon)  
東京大学・大学院理学系研究科・准教授  
研究者番号：50431896

### (2) 研究協力者

倉林 信博 (KURABAYASHI, Nobuhiro)  
今泉 景介 (IMAIZUMI, Keisuke)  
玉井 総一 (TAMAI, So-ichi)