

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860371

研究課題名(和文) 大脳白質脳症疾患モデルマウスの病態解析と病因関連代謝物の探索

研究課題名(英文) pathophysiological analysis of a mouse model of cerebral leukoencephalopathy and search for pathogenesis-related metabolites

研究代表者

八木 美佳子 (yagi, mikako)

九州大学・ARO次世代医療センター・学術研究員

研究者番号：70536135

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)：p32 / C1qbpは、ミトコンドリア翻訳において必須のRNAおよびタンパク質シャペロンとして機能し、胚発生に不可欠である。神経特異的p32欠損マウス(p32cK0)は、大脳白質脳症モデルマウスとして有用であった。p32cK0から作製した初代培養細胞よりオリゴデンドロサイト細胞の分化異常および軸索変性が確認できた。代謝物解析により、p32cK0脳組織における解糖系の増加、GABAシグナル伝達の減少、脂質合成およびアミノ酸代謝の障害を示した。したがって、p32cK0は髄鞘形成および軸索維持に異常をきたし、白血脳症を示したと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial dysfunction represents a critical step during the pathogenesis of neurodegenerative disease. The p32/C1qbp gene functions as an essential RNA and protein chaperone in mitochondrial translation, and is indispensable for embryonic development. However, how p32 lead to neurodegeneration remains unclear. Neural-specific p32 deletion resulted in white matter degeneration accompanied by progressive oligodendrocyte loss, axon degeneration and vacuolation in the mid brain and brain stem regions, similar to mitochondrial leukoencephalopathy. Metabolomics analysis showed increased glycolysis, decreased GABA signaling, lipid synthesis and impaired amino acid metabolism in p32cK0 tissue. Mitochondrial function in oligodendrocytes and neurons is therefore essential for myelination and axonal maintenance, suggesting that mitochondrial dysfunction contributes to leukoencephalopathy.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア p32/C1qbp 白質脳症

1. 研究開始当初の背景

先天性大脳白質形成不全症は、脳の白質の発達不全が原因で起こる神経変性疾患である。特徴として生後早期の発達遅滞と眼振、および痙性麻痺が言われている。診断には、MRIなどの画像検査や遺伝子解析が重要であるが、検査をしても原因がはっきり分からず、確定診断に至らない患者も多くいる。発症の病因としては神経細胞伝導路のアクソンの周囲の髄鞘化が正常に起こらないことが原因であると考えられている。つまり、髄鞘に必要なミエリンの構成成分の異常や、髄鞘化に必要な因子の障害が考えられている。代表的な疾患であるミトコンドリア白質脳症病は、ミトコンドリア HSP60 の異常で起こるといわれている。しかし、その殆どについて神経変性の原因遺伝子、発症機序、診断マーカーは不明である。従って、大脳白質形成不全症の発症機構の解明、確定診断に至る検査異常の検出には、よりヒトの病態に近いと考えられる体細胞遺伝子変異マウスによる先天性大脳白質形成不全症疾患モデルマウスでの解析が強く求められている。

一方、ミトコンドリアの機能不全による神経変性疾患がパーキンソン病などで提唱されている。C1qbp はミトコンドリアに存在し、ミトコンドリア内翻訳に関与すること、アポトーシス、癌化に関与することが報告されているが、我々は C1qbp が RNA に結合するシャペロンとしてミトコンドリア内翻訳に働くことを世界に先駆けて報告した。さらに C1qbp はミトコンドリアマトリックス内で種々の蛋白と会合していることを見出し RNA 及び蛋白のシャペロンとしても機能することを提唱している。研究代表者は C1qbp を神経系組織で特異的に欠損した C1qbp 神経 KO マウスを独自に作製したところ、振戦・発達遅滞および痙性麻痺という白質脳症の典型症状を示した。

2. 研究の目的

本研究は、C1qbp 神経 KO マウスを用いて C1qbp の機能解析を通じて大脳白質脳症発症機構の分子基盤の解明、およびメタボローム解析による新規診断マーカーの探索を目的とした。

3. 研究の方法

本研究は大脳白質脳症におけるミトコンドリア蛋白質 p32/C1qBP の役割を分子レベルで、

関連性、相互作用、機能連携について解明する。さらに、メタボローム解析による神経変性疾患の診断マーカーを探索する。実験方法は以下の通りである。

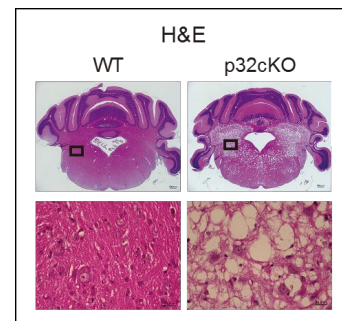
- (1) C1qbp 神経 KO マウスの形態、行動解析、病態解析を行う。
- (2) C1qbp 神経特異的マウスのミエリン形成能の低下の分子基盤を明らかにする。
- (3) KO 細胞、脳初代培養細胞を用いて、C1qbp の機能解析、病態解析を行う。
- (4) 診断ツールとしてのメタボローム解析を行う。C1qbp ノックアウト細胞と C1qbp 神経 KO マウス大脳、血液における代謝物の変化を明らかにする。

4. 研究成果

ミトコンドリア局在タンパク質である p32 を神経系組織のみで特異的に欠損したマウスはヒトにおける大脳白質脳症を呈した。その発症のメカニズムの一部を解明した。新規診断マーカーとしてメタボローム解析より新たな因子を同定した。

(1) 作製し

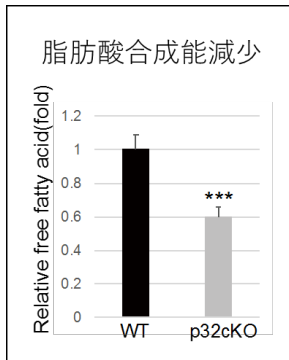
た C1qbp 神経 KO マウスは、振戦・発達遅滞および痙性麻痺という白質脳症の典



型症状を示した。C1qbp 神経 KO マウスの脳組織を病理解析すると、HE 染色より大脳白質部位に典型的な空胞形成、KB 染色より脱髄を示した。さらに病変部を特定するために様々な特異的マーカーで脳組織の免疫染色を行うと、空胞の周囲にオリゴデンドロサイトや髄鞘の発現が確認できた。よって、この空胞はオリゴデンドロサイトの発現異常、髄鞘形成不全によるものだと考えられる。また、アストロサイト、神経細胞や軸索にはあまり変化が認められなかった。電子顕微鏡解析より髄鞘形成を確認すると、C1qbp 神経 KO マウスで

は髄鞘形成に異常をきたし、数も激減した。また、電顕でも空胞形成が多く観察された。大脳白質脳症の原因はオリゴデンドロサイトや髄鞘の形成不全によるものだと考えられる。

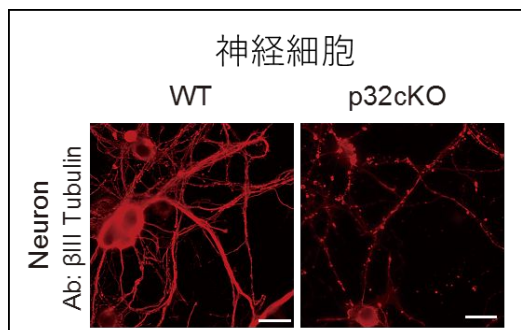
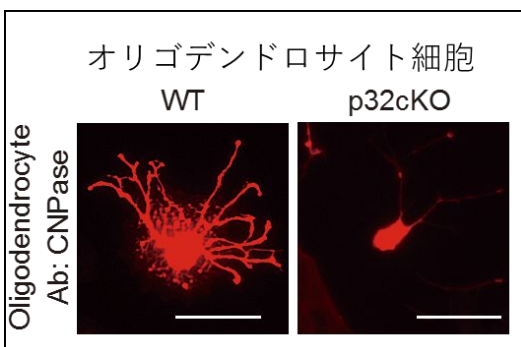
(2) C1qbp 神経 KO マウスの脳組織より RNA を



抽出し、発現量をリアルタイム PCR で確認すると、ER ストレス応答を惹起した。オリゴデンドロサイト構成主要成分である脂肪酸量を測定する

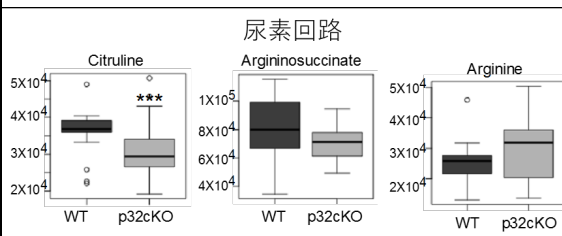
とノックアウトマウスでは減少した。また C1qbp 神経 KO マウスの脳組織タンパク質発現より mTOR 系のシグナル伝達阻害も確認できた。これらの機構により大脳白質脳症を呈することを明らかにした。

(3) 産まれて 2 日目のマウス脳から脳初代培養細胞を作製、オリゴデンドロサイト細胞と神経細胞を単離した。ノックアウトオリゴデンドロサイト細胞は、細胞数は減少し分化も未成熟であった。ノックアウト神経細胞は伸張するが軸索維持ができなかった。よって大脳白質脳症の原因はオリゴデンドロサイト



分化異常、神経細胞維持異常によるものであった。

(4) 野生型マウスおよび p32 神経 KO マウスの中枢神経系大脳白質から抽出した代謝物を質量分析器による代謝物の網羅的解析を行い、クラスター解析を行って p32 を介した代謝物シグナリング経路を解析した。結果、ノックアウトで、乳酸、ケトン体である 3-hydroxybutyrate の上昇、尿素回路の低下 (Citrullin 低下) を明らかにした。このことはモデルノックアウトマウスからの解析が疾病診断マーカー探索として有意義であることを示唆している。



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)

(1) Sasaki K, Gotoh K, Miake S, Setoyama D, Yagi M, Igami K, Uchiumi T, Kang D. p32 is Required for Appropriate Interleukin-6 Production Upon LPS Stimulation and Protects Mice from Endotoxin Shock. *EBioMedicine*. 2017; S2352-3964(17)30216-5. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.05.018.

(2) Saito T, Uchiumi T, Yagi M, Amamoto R, Setoyama D, Matsushima Y, Kang D. Cardiomyocyte-specific loss of mitochondrial p32/C1qbp causes cardiomyopathy and activates stress responses. *Cardiovasc Res*. 2017 in press. doi: 10.1093/cvr/cvr095.

(3) Monji K, Uchiumi T, Hoshizawa S, Yagi M, Matsumoto T, Setoyama D, Matsushima

Serum depletion induced cancer stem cell-like phenotype due to nitric oxide synthesis in oncogenic HRas transformed cells. *Oncotarget*.

2016 ;7(46):75221-75234. doi: 10.18632/oncotarget.12117.

(4) Ando H, Ohagi Y, Yoshida M, Yoshimoto S, Higashi Y, Yagi M, Monji K, Yagi M, Uchiumi T, Kang D, Ichihashi M.

Melanin pigment interrupts the fluorescence staining of mitochondria in melanocytes. *J Dermatol Sci*.

2016;84 :349-351. doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.08.533.

(5) Amamoto R, Uchiumi T, Yagi M, Monji K, Song Y, Oda Y, Shiota M, Yokomizo A, Naito S, Kang D.

The Expression of Ubiquitous Mitochondrial Creatine Kinase Is Downregulated as Prostate Cancer Progression. *J Cancer*. 2016 ;7 :50-59. doi: 10.7150/jca.13207.

(6) Baba T, Otake H, Sato T, Miyabayashi K, Shishido Y, Wang CY, Shima Y, Kimura H, Yagi M, Ishihara Y, Hino S, Ogawa H, Nakao M, Yamazaki T, Kang D, Ohkawa Y, Suyama M, Chung BC, Morohashi K.

Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1.

Nat Commun. (2014) Apr 14;5:3634. doi:10.1038/ncomms4634

〔学会発表〕(計 9 件)

(1) 第 39 回分子生物学会 2016 .11.30-12.2 横浜

ミトコンドリアタンパク p32 の心筋特異的ノックアウトマウスは拡張型心筋症を呈する
八木美佳子 内海健 康東天

(2) 第 13 回アジアミトコンドリア学会 2016.10.30-11.1 東京

Cardiomyocyte-specific loss of mitochondrial p32/C1qbp causes cardiomyopathy and activates stress responses

Takeshi Uchiumi, Mikako Yagi, Dongchon Kang

(3) 第 55 回 日本臨床化学会 2015.10.30-11.1 大阪

ミトコンドリアタンパク p32 の脳特異的ノックアウトマウスの分子基盤と新規診断マーカーの探索

内海健、八木美佳子、康東天

(4) 第 38 回分子生物学会 2015. 12.1-12.4 神戸

白質脳症を示す神経特異的 C1qbp/p32 ノックアウトマウスの遺伝子発現、メタボローム解析

内海健、八木美佳子、康東天

(5) The 9th European Meeting on Mitochondrial Pathology 2014.6.14-6.19 Tampere, Finland

Cardiomyocyte Specific Deletion of p32/C1qbp Causes Mitochondrial Cardiomyopathy and induced the mitochondrial UPR response and autophagy
Uchiumi T, Saito T, Yagi M, Kang D

(6) The 9th European Meeting on Mitochondrial Pathology 2014.6.14-6.19 Tampere, Finland

Neuron-specific disruption of p32 gene in mouse causes selective loss of oligodendroglia cells leading to vacuolar degeneration in mid-brain

Yagi M, Uchiumi T and Dongchon Kang

(7) 第 14 回 日本ミトコンドリア学会 2014. 12.3-5 福岡

心筋特異的 p32 ノックアウトマウスは拡張型心筋症を発症するが mtUPR, autophagy を誘導し生存する

内海健、八木美佳子、康東天

(8) 第 14 回 日本ミトコンドリア学会 2014. 12.3-5 福岡

神経特異的 p32 ノックアウトマウスはオリゴ
デンドロサイト分化異常によって白質脳症
になる

八木美佳子、内海健、康東天

(9) 第 6 1 回 日本臨検査医学会
2014.11.22-25 福岡

神経特異的 p32 ノックアウトマウスはオリゴ
デンドロサイト分化異常によって白質脳症
になる

八木美佳子、内海健、康東天

〔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

八木 美佳子 (YAGI Mikako)
九州大学・ARO 次世代医療センター・学術研
究員

研究者番号：70536135

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()