

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19503

研究課題名(和文)新規細胞内分解システム調節分子AMBRA1を用いたMSAの病態解析と治療戦略

研究課題名(英文)Clarification of the pathogenesis of multiple system atrophy and its treatment strategy using AMBRA1

研究代表者

三木 康生(MIKI, YASUO)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：30709142

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)：AMBRA1はオートファゴソームの形成に関わる。AMBRA1が多系統萎縮症(MSA)の病態に関わるかどうかを検討した。

免疫組織化学的検討では、MSAでグリア細胞質内封入体ならびに神経細胞質内封入体がAMBRA1強陽性であった。ウエスタンブロット解析では、AMBRA1が有意に増加していた。免疫沈降法では、AMBRA1がシヌクレインと結合していた。一方、mammalianの細胞を用いた検討では、AMBRA1はシヌクレイン量に影響することを見出した。MSAにおいてオートファジーに何らかの異常が生じており、AMBRA1を介したオートファジーの活性化はMSAの治療法となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The accumulation of abnormal α -synuclein is the histopathological feature of multiple system atrophy (MSA). Autophagy is regulated by various proteins including autophagy/beclin1 regulator 1 (AMBRA1). We conducted the present study to elucidate the role of AMBRA1 in the pathogenesis of MSA.

Pathological and biochemical analyses using human brain samples revealed that AMBRA1 is a component of the pathological hallmarks of MSA. A 9-fold stronger affinity was found in AMBRA1 with abnormal α -synuclein compared with non-phosphorylated α -synuclein. Significant correlation between AMBRA1 overexpression and reduction of abnormal α -synuclein was observed. AMBRA1 overexpression or knockdown significantly changed α -synuclein in the mammalian cells.

Our results demonstrated that molecular modulation targeting AMBRA1 can be a promising candidate for the treatment of MSA.

研究分野：神経病理学

キーワード：AMBRA1 オートファジー 多系統萎縮症 シヌクレイノパチー シヌクレイン

1. 研究開始当初の背景

正常脳では、 α シヌクレイン (α -syn) は前シナプスに局在する可溶性タンパク質である。一方、シヌクレイノパチー (パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症 (MSA)) 脳では α -syn は不溶化し、細胞質内に封入体 (レビー小体や glial cytoplasmic inclusion (GCI)) を形成する。

オートファジーは細胞内の主要分解システムの1つである。これまで我々は、細胞内分解システムを活性化し異常タンパク質 (不溶化 α -syn) を除去することを目標に検討を行い、以下の知見を得た。1) 培養細胞実験において、異常 α -syn の蓄積とともにオートファジー上流分子 (ULK1、ULK2、Beclin1、VPS34、AMBRA1) が増加する。2) オートファジーを誘導するトレハロースを経口投与したマウスの脳では、不溶化 α -syn が減少する。これらの知見は『細胞内分解システムの活性化はシヌクレイノパチーの有効な治療法となりうる』ことを意味する。しかし、MSA におけるオートファジーの異常ならびにオートファジー活性化による治療の可能性については十分に検討されていない。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、MSA 脳において、ULK1、ULK2、Beclin1、VPS34、AMBRA1 の局在とその発現量を明らかにする。また、AMBRA1 はオートファジーの上流を調節する新規ハブ分子であることから、AMBRA1 が MSA 脳における α -syn の分解や凝集に果たす分子機構を培養細胞を用い明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MSA (6 例) および正常対照 (6 例) の剖検脳組織を用いた免疫組織化学染色ならびにウエスタンブロット (WB) 解析を行った。

(2) HEK293 細胞に、AMBRA1、正常型 シヌクレインと変異型 シヌクレインを遺伝子導入し、免疫沈降法ならびに proximity ligation assay (PLA) で評価した。さらに、多系統萎縮症 (5 例) および正常対照 (5 例) の凍結脳組織を用い、免疫沈降法を行った。

(3) Mammalian の培養細胞 (HEK293 細胞ならびにマウス初代培養神経細胞) を用い、AMBRA1 の発現調節における α -syn の変化について検討した。

(4) パーキンソン病患者 (35 例) および正常対照 (23 例) の末梢血単核球を用いた WB 解析を行った。

(5) 本研究における動物実験計画は、弘前

大学動物実験委員会により承認され、弘前大学実験動物に関する指針に遵って行った。本研究に使用するヒト剖検脳は本研究室に保管、または新潟大学脳研究所から入手しており、いずれも書類による倫理上の審査を経て、使用しており問題はない。

4. 研究成果

(1) 剖検脳組織を用いた免疫染色では、正常対照において神経細胞の胞体が ULK1、ULK2、VPS34 で淡く陽性。AMBRA1 では神経細胞に加え、オリゴデンドログリアの胞体も淡く陽性。MSA では、AMBRA1 でグリア細胞質内封入体、神経細胞質内封入体が強陽性。さらに、凍結脳の WB 解析では、MSA で ULK1、ULK2、AMBRA1 が有意に増加していた。

(2) HEK293 細胞を用いた IP では、AMBRA1 に正常 α -syn が結合し、PLA で可視化さらに、凍結脳組織を用いた IP でも、AMBRA1 と正常および α -syn が結合した。

(3) HEK293 細胞を用いた WB では、AMBRA1 過剰発現群において α -syn が有意に減少 (図 1)。一方、マウス初代培養神経細胞を用いた蛍光免疫染色では、AMBRA1 機能抑制群において正常 α -syn 陽性構造物が有意に増加した。

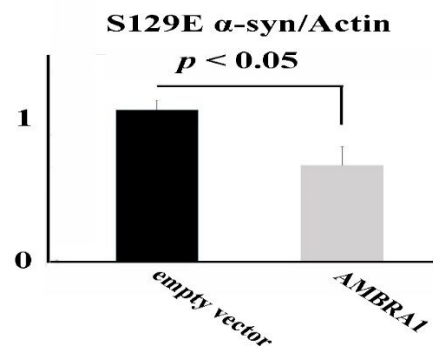
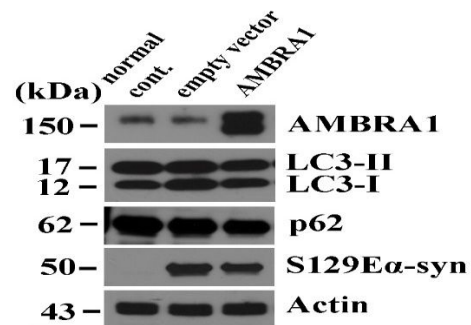


図 1 AMBRA1 の過剰発現は異常 α -syn を減少させる 異常 α -syn (S129E α -syn) を遺伝子導入した HEK293 細胞群と正常対照群で AMBRA1 を過剰発現した。AMBRA1 過剰発現群において、異常 α -syn が有意に減少した。

(4) オートファジーの異常は病早期より生じており、末梢血単核球中の α -syn は重症度分類である Hoehn-Yahr 分類ならびに UPDRS-part と関連していた。

(5) MSA においてオートファジー上流に何らかの異常が生じていることが示唆され、AMBRA1 は α -syn の分解にも関わることが示唆された。さらに、パーキンソン病患者の末梢血単核球を用いた検討では、オートファジーの異常は病早期より生じていることを見出した。これは、AMBRA1 を含むオートファジーの活性化は MSA を含むシヌクレイノパチーの治療法となり得ることを示唆するものである。現在 MSA 患者の末梢血単核球に焦点を絞った WB 解析を進めている。これにより、MSA の病早期におけるオートファジーの異常を明らかにすることができ、オートファジーの活性化を軸とした MSA の治療法の開発に貢献できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Tanji K, Mori F, [Miki Y](#), Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. YOD1 attenuates neurogenic proteotoxicity through its deubiquitinating activity. *Neurobiol Dis* 2018, 112, 14-23, 査読有
DOI: 10.1016/j.nbd.2018.01.006

[Miki Y](#), Tanji K, Kon T, Shimoyama S, Ueno T, Hayakari R, Matsumiya T, Tsushima E, Mori F, Wakabayashi K, Tomiyama M. Alteration of autophagy-related proteins in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2018, 63, 33-43, 査読有
DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.11.006

[Miki Y](#), Tanji K, Mori F, Tatara Y, Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Fimia GM, Wakabayashi K. AMBRA1, a novel α -synuclein-binding protein, is implicated in the pathogenesis of multiple system atrophy. *Brain Pathol* 2018, 28, 28-42, 査読有
DOI: 10.1111/bpa.12461

Mori F, Tanji K, [Miki Y](#), Toyoshima Y, Sasaki H, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Immunohistochemical localization of exoribonucleases (DIS3L2 and XRN1) in intranuclear inclusion body disease. *Neurosci Lett* 2018, 662, 389-394, 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2017.10.061

[Miki Y](#), Tanji K, Kimura K, Yajima N, Mori F, Wakabayashi K. Status epilepticus causing extensive microvacuolar change with astrogliosis and diffusion MRI abnormalities in the subcortical white matter. *J Neurol Sci* 2017, 382, 55-57, 査読有
DOI: 10.1016/j.jns.2017.09.029

[Miki Y](#), Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Alteration of mitochondrial protein PDHA1 in Lewy body disease and PARK14. *Biochem Biophys Res Com* 2017, 489, 439-444, 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.162

[Miki Y](#), Yoshizawa T, Morohashi S, Seino Y, Kijima H, Shoji M, Mori A, Yamashita C, Hatano T, Hattori N, Wakabayashi K. Neuropathology of PARK14 is identical to idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2017, 32, 799-800, 査読有
DOI: 10.1002/mds.26952

[Miki Y](#), Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. PLA2G6 accumulates in Lewy bodies in PARK14 and idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2017, 645, 40-45, 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2017.02.027

〔学会発表〕(計 4 件)

三木康生、シヌクレイノパチーにおけるオートファジーの異常とその活性化による治療の可能性、第 36 回日本認知症学会学術集会、2017 年 11 月 24~26 日、ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川県・金沢市)

三木康生ほか、PLA2G6 は PARK14 と特発性パーキンソン病のレヴィ小体に蓄積する、第 58 回日本神経病理学会総会学術研究会、2017 年 6 月 1~3 日、学術総合センター(東京都・千代田区)

三木康生ほか、PARK14 の 1 剖検例、第 58 回日本神経病理学会総会学術研究会、2017 年 6 月 1~3 日、学術総合センター (東京都・千代田区)

三木康生ほか、多系統萎縮症におけるオートファジー上流分子の異常、第 57 回日本神経病理学会総会学術研究会、2016 年 6 月 1~3 日、キャッスルホテル (青森県・弘前市)

〔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

三木 康生 (MIKI, Yasuo)
弘前大学大学院医学研究科・助教
研究者番号：30709142