

平成 21年 5月 14日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590989
 研究課題名（和文） 神経系における”エンドカイン”の役割と炎症性・変性疾患の解析
 研究課題名（英文） Possible role of “Endokine” in inflammatory and degenerative disease in nervous system

研究代表者
 山本 洋一（YAMAMOTO YOICHI）
 大阪大学・医学部附属病院・特任准教授（常勤）
 研究者番号：20335342

研究成果の概要：神経変性疾患における核の役割は、最近注目を集めている。本研究では、“エンドカイン”としての肝癌由来増殖因子(HDGF)の発現について、マウスにおける細胞内局在を検討し、さらに筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを利用して、神経変性疾患における役割について検討した。その結果、細胞核における HDGF 発現能力の個体差・細胞間差、そして細胞種による反応性の違いが、変性疾患の進展と関連する可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経変性疾患、核、細胞死、肝癌由来増殖因子

1. 研究開始当初の背景

2006年2月、European Molecular Biology Organization (EMBO) 主催の Workshop on Innate Danger Signals and HMGB1 と題した“Endokine”の初めての国際会議が企画された。主催者である Marco E. Bianchi 博士らは、1) ネクロシスをきたした細胞から放出されること、2) ある生細胞においては、通常分泌以外のルートで細胞外へ放出されること、3) アプトーシスにおいては分泌が抑制されることを満たす分子を新たな概念として“Endokine”と呼ぶことを提唱した。その主要分子には、HMGB1

(High Mobility Group Box chromosomal protein 1) があり、HMGB1 とアミノ酸レベルで32%ホモロジーのある分子として肝癌由来増殖因子 HDGF (Hepatoma-derived Growth Factor) がある。HMGB1 レセプターについては、RAGE (Receptor for advanced glycation end products) が同定されている。Binding 実験から HDGF receptor の存在が報告されているが、同定されていない。

HMGB1 (別名 HMG1, amphoterin) の機能については多くの論文があり、核内での役割と細胞外での役割が報告されている。核内での役割としては、核に局在し、DNA の立体構造

に関与しているというものである。一方、細胞外では、マクロファージ系培養細胞に添加すると、TNF-alpha を分泌することから急性炎症の媒介分子である、エンドトキシンによる死亡率を anti-HMGB1 は改善する、RAGE-HMGB1 の結合を阻害すると、腫瘍の浸潤転移が抑制される、神経突起の伸長因子であるなどが報告されている。HMGB1 は、元来 danger signals としての役割が解析されてきたが、“Endokine” に定義される分子は、神経突起伸長作用のように常に danger とは限らないことが分かってきた。

HDGF は、肝癌由来の細胞を使い、中村らが、増殖因子として同定した分子である (Nakamura et al., J. Biol. Chem. 269:25143-9, 1994)。我々は、HDGF が神経細胞の核に多く発現し、培養下では培養液に HDGF の発現がみられること、細胞外から添加した HDGF は神経栄養因子として働くことなど神経系における HDGF に関して世界に先駆けて発表し、前述の“Endokine” の定義を満たすことを示している。

2. 研究の目的

近年、神経変性疾患と炎症との関連が注目を浴びている。当研究は、神経変性疾患を、“Endokine” という新たな切り口での解明を目指すものである。主たる目的は以下に要約される。

(1) HDGF の作用機序の解明

HDGF は、tumorigenesis に関連した蛋白にみられる PWWP domain を持ち、主に核内に局在することから、転写因子としての作用機序が考えられている。HDGF の過剰発現および siRNA を用いた発現抑制神経細胞系を作成し、各々から、mRNA、蛋白を抽出し、誘導される分子について解析する。

(2) 神経変性疾患における HDGF の関与
アルツハイマー病やクロイツ・フェルト・ヤコブ病では、すでに HMGB1-RAGE の関与が示唆されている (Lue et al., Exp. Neurol. 171:29-45, 2001; Sasaki et al., Neurosci Lett. 326: 117-20, 2002)。最も興味ある点は、これら神経変性疾患において、HDGF が関与しているかどうかである。今回、筋萎縮性側索硬化症においては、ヒト家族性筋萎縮性側索硬化症において変異が同定されているスーパーオキシドディスムターゼ 1 (SOD1) を過剰発現させた SOD マウスがあることから研究対象とした。

3. 研究の方法

(1) HDGF の誘導過剰発現系および誘導発現抑制系の作成

肝癌由来増殖因子の発現を調節する因子の同定には、肝癌由来増殖因子を過剰発現した細胞の系と発現抑制した細胞の系を確立し、

正常細胞との間で発現している分子の違いを検討する。これは、通常のトランスフェクションによる一時的な発現系では、トランスフェクション自体によって発現が増減する分子、特にサイトカインがあることや細胞毒性の問題があるからである。また、神経系由来の細胞であり、NGF を添加することで、分化した細胞になり、増殖系と分化した系とで解析することを狙って、PC12(ラット副腎髄質由来褐色細胞腫)を選択した。

誘導過剰発現系として、pTet-Off Vector (BD Biosciences) にヒト HDGF を組み込んだベクターを作成し、PC12 Tet-Off cell line (同社) にトランスフェクションし、ハイグロマイシンで選択する方法で作成する。

発現抑制系については、pRS siRNA vector (Origene) 等に、現在まで報告されている siRNA のシーケンスを元に改変した DNA を組み込み作成する。

培養方法については、Cell line の user manual に従った。

(2) ウェスタンブロット法、ベクター作成については、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 等の手法を改良して施行した。

4. 研究成果

過剰発現した系については、株化した後、誘導前後で蛋白を抽出し、ウェスタンブロット法を施行したところ、200%以上の発現をみた株を2つ確認した。しかし、発現抑制の系については、誘導抑制する系を含めて15種類のベクターを構築し、3種類の細胞株で試みた。誘導抑制する系では、siRNA の誘導産生が弱く、HDGF の抑制がみられなかった。そこで、通常の HDGF 発現抑制株の樹立を試みたが、免疫染色では個々の細胞において、80%以上抑制されていることが観察される細胞がみられたが、ウェスタンブロット法では、全体として70%以上の発現抑制を再現よく示すものは、試みた中で皆無であった。このことは、2006年2月に開かれたEMBO主催のWorkshopでも討論されたことであるが、HDGF の発現がみられないCell line の報告はなく、HDGF は、細胞の生存(少なくともCell line の生存)に不可欠であり、細胞の生存と深く関与していると考えられることから、発現を抑制することは細胞死に直結するために、HDGF 抑制系の細胞株を樹立することは困難との考えを支持するものと考えた。この見地に立って、マウスの成体において、HDGF を条件付きでノックアウトする計画があることなどが、論じられていた。

ところが、当研究の期間内に、条件付きで

ない古典的な HDGF のノックアウトマウスの作成が報告され、発生には不可欠ではないという論文が発表された(Gallitzendoerfer et al., *Developmental Dynamics* 237:1875-85, 2008)。少なくとも発生には、問題なかったとする第1報であるが、詳細な検討を欠いていたため、その論文の Discussion にも記載されているが、いくつかの未解明の問題を提唱することとなった。中でも、我々の当研究にも関連してくる点は、HDGF には、HDGF-related proteins と総称される蛋白が5つ同定されており、これらにより HDGF の機能が代償されているのではないかということ、また、HDGF をノックアウトされたマウスの細胞の培養系においても、外部から添加した HDGF に反応して増殖反応を示すことから、成体においては、当該研究を開始する時点での仮説である、神経変性疾患の病態に HDGF が関与している可能性があるのではないかと考えた。

そこで、HDGF ノックアウトマウスで、発生上異常がみられないということは、抑制系の樹立に時間をかけても、HDGF ノックアウトマウスの解析が進めば、明らかになることから、成体における神経変性疾患の病態への HDGF の関与についての検討を優先させた。まず、HDGF の発現についての発生学的検討を行い、胎生 13 日脊髄においては、核だけでなく細胞質全体にも HDGF の発現がみられること、しかし、成体においては、核に局在していることを確認した。

次に、神経変性疾患モデルである SOD マウス(G93A low copy マウス)と正常マウスにおける抗 HDGF 抗体を用いた免疫組織学的検討を詳細に行った。コントロールとしてのノントランスジェニックマウス腰髄(n=10, 約 41 週令)における HDGF の免疫反応性は、その程度に個体差があるものの、共通して、主に後角や中心管付近の小型神経細胞の核を中心に強陽性の細胞を多数認めた。一方、体性運動神経細胞群よりなるとされる(Carpenter's Human Neuroanatomy, 9th ed.)Rexed 第 IX 層における神経細胞核の免疫反応性は比較的弱いことが明らかになった。SOD マウス end stage (n=9, 約 38 週令)腰髄においても、正常マウスと同様に、全体的な HDGF の免疫反応性の程度に個体差をみとめた。また、運動神経細胞数が高度に減少しているにもかかわらず、ほとんどのマウスにおいて Rexed 第 IX 層における HDGF 陽性の運動神経細胞核が目立った。その免疫反応性は後角や中心管付近の小型神経細胞と同等か、あるいはより強い細胞も散在していた。また、HDGF 強陽性のグリア細胞も認められた。運動神経細胞核に関する点は、未発症の SOD マウスにおいてコントロールに比べて強く染色されるとする同様の報告がある(Marubuchi et al. *J. of*

Neurochemistry, 99:70-83, 2006)。

我々の研究結果において、興味ある結果は、まず、HDGF の細胞内発現部位が発生とともに変化することである。胎生期には、核だけでなく、細胞質にも発現が見られるのに対して、成体においては、核に限局する傾向がある。この点は、HDGF は、核移行シグナルを保有するが、DNA に結合する”HMG Box”は持たないことと関連しているのかもしれない。この点は、HMGB1 との相違点であり、主たる発現部位は核であるが、ある条件下では、細胞質、あるいは細胞外へと比較的自由に移動することで、その機能を調整している可能性があることを示唆している。Gallitzendoerfer らの HDGF ノックアウトマウス(前出)においては、おきかえられた eGFP(enhanced green fluorescent protein)の発現を追うことで、目のある細胞群においては成体においても、核外での発現が確認されている。この観察結果は、免疫染色においては、バックグラウンドの染色状況に左右されてしまうので、細胞質のわずかな染色については、判定が困難であるが、背景で述べた”Endokine”として、胎生期にはもちろんのこと、成体においても、HDGF が、核から細胞質へ移動する、そしてさらに分泌(あるいは放出)される経路があり、何かの刺激とともに、その分泌が促進される可能性を意味している。この点については、HDGF および HDGF-related proteins について、代償作用を考慮した上での検討が必要である。

興味深い点は、SOD マウスにおいても、正常マウスにおいても、全体的な HDGF の免疫反応性の程度に個体差を観察したことである。すなわち、少なくとも神経細胞には HDGF の発現量に、個体差があるということである。また、SOD マウスにおいて、Rexed 第 IX 層における HDGF 陽性の運動神経細胞核の免疫反応性は他の細胞と比較し、様々であった。そして、変性とともに強く発現する細胞の種類に変化があることを示した。HDGF 強陽性のグリア細胞が発現してくることである。つまり、HDGF の発現量は、正常および疾患においても、個体差があること、疾患において誘導発現してくるがその反応性に個体差だけでなく細胞間差があること、さらに疾患の進行とともに HDGF を強発現する細胞種類が増える(グリア細胞)ことが観察された。どのような分子もある程度の個体差は、純系動物においても、ありえることであるが、VEGF(vascular endothelial growth factor)や BDNF(brain derived nerve growth factor)の発現量が、変性疾患における神経細胞死と関連していることは多くの報告(Review; Mattson MP. *Ann N Y Acad Sci.* 1144:97-112, 2008; Sathasivam. *Neurosci. Res.* 71-7, 2008)があり、HDGF が、神経細胞内、そして、神経細胞—グリア細胞間で、作用する

可能性を考えると、その意味づけが今後の課題として重要となる。

こうした結果から、現在神経系における我々の仮説は、以下の通りである。生理的状态においては、HDGFのグリア細胞での発現は、最小限の発現である（正確には、免疫組織染色では、核での発現がわずかにみられるものも少数ある程度である）。多くは、HDGFは神経細胞の核に局在し、一部は分泌され、主にautocrineに神経栄養因子として働き、神経細胞の生存に関与している。一方病的状態に陥ると、神経細胞死を避けるための生体反応として、HDGFは神経細胞の核での発現を増加させる。増加したHDGFは、細胞外へ分泌あるいは放出され、周辺のグリア細胞に作用するのではないかと考えている。そして、グリア細胞の核に強く発現を誘導し、グリア細胞の増殖活性化に関与する。その結果、サイトカインを放出し、その中には神経細胞保護的に働くものもあるが、炎症や神経細胞死を惹起する可能性があるのではないかとするものである。この反応は、連鎖的に拡大していくことから、病態が進展していくこととなる。ここにおいて、本研究において示したHDGF発現能力の個体差・細胞間差、そして細胞種による反応性が、病態の発生、進展と関係していると考えている。この仮説は、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病、クロイツ・フェルト・ヤコブ病など、広く神経変性疾患、炎症性疾患に適応できる可能性を考えている。HDGFノックアウトマウスの結果が示すことから、核におけるHDGFの役割は、もし他の蛋白による代償作用がないのであれば、核における直接の作用はなく、“Endokine”として細胞核内に貯蓄していると考えられる。

GallitendoerferらのHDGFノックアウトマウスの結果は、HDGFの発生における直接の役割は否定されたが、我々の結果は、後天的な神経変性疾患においては、HDGFは、細胞の生死に深く関与していることを支持していると考えている。ノックアウトマウスの樹立によって、当研究と関連して今後期待されるのは、SODマウスとの交配によるHDGF発現のないSODマウスの発症時期および罹病期間であろう。しかし、我々の研究結果から、核の反応性（HDGFの発現増加）と変性疾患の進展の関連が示唆されることから、HDGFノックアウトマウスよりも、HDGFを強制発現した系、特に成体において強制発現する系の方が、神経変性疾患の解明に繋がる知見が得られる可能性があるのではないかと考えている。

神経変性疾患の発症時期は、通常40歳以上であり、多くは孤発性である。孤発性の中で、発症する患者と発症しない健常者の差は何かという疑問が常にある。遺伝性神経変性疾患に比べて、多くを占める孤発性の場合、

研究の手がかりが乏しいのが現状である。最近、孤発性筋萎縮性側索硬化症においては、TDP-43(TAR DNA-binding protein of 43 kDa)が、関連分子として同定されたこと等から、核に関連する分子が着目されている(Neumann et al., Science 314:130-3, 2006)。TDP-43とHDGFやHMGB1の関連については、今後解明されるべき興味ある課題である。ミトコンドリアがエネルギー産生のある場であると同時に細胞死に関連した役割をもつのと同時に、核は、ゲノムが存在する場であるが、同時に細胞の生死に関与している。そして、加齢とともに、核に様々な変化がみられることが知られている。今回、我々は、神経変性疾患モデル動物におけるHDGF発現能力の個体差・細胞間差、そして細胞種による反応性を示した。今後は、HDGFだけでなく、HMGB1を含めた“Endokine”さらには、核内分子の局在や反応性という観点から、孤発性神経変性疾患の病態の研究を続けていくことが重要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/neurol/myweb6/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 洋一 (YAMAMOTO YOICHI)

大阪大学・医学部附属病院・特任准教授（常勤）

研究者番号：20335342

(2) 研究分担者

須貝 文宣 (SUGAI FUMINOBU)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：70403061

(3) 連携研究者

なし。