

平成 23年 4月 8日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790831

研究課題名 (和文)：培養細胞モデルを用いたシヌクレイノパチー病態機序の解明

研究課題名 (英文)：Investigation of pathophysiological mechanisms of synucleinopathy using cultured cellular model

研究代表者：小林 理子 (KOBAYASHI MICHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：40422109

研究成果の概要 (和文)：GCI形成およびこれに続くオリゴデンドログリア変性機序を明らかにする目的で、HEK293T細胞およびKG1C細胞に α SYNとTPPPを共発現したモデルを作成した。TPPPは α SYNを特異的に凝集化させ、免疫沈降法でも相互に結合することが確認された。 α SYNのセリン129リン酸化はTPPPによる α SYN凝集を促進させた。TPPP発現により両方の細胞体内にGCI類似の α syn陽性細胞内封入体が形成されたが、うちKG1C細胞にのみアポトーシスが確認された。TPPP・ α SYN共発現KG1C細胞にみられたアポトーシスはsirtuin2の選択的阻害剤で抑制された。

研究成果の概要 (英文)：To clarify the molecular mechanisms of GCI formation and subsequent oligodendroglial degeneration, we ectopically expressed α -SYN and TPPP in HEK293T and oligodendroglial KG1C cell lines. Here we showed that TPPP specifically accelerated α -SYN oligomer formation and co-immunoprecipitation analysis revealed the specific interaction of TPPP and α -SYN. Moreover, phosphorylation of α -SYN at Ser-129 facilitated the TPPP-mediated α -SYN oligomerization. TPPP facilitated α -SYN-positive cytoplasmic perinuclear inclusions mimicking GCI in both cell lines; however, apoptotic cell death was only observed in KG1C cells. This apoptotic cell death was partly rescued by sirtuin 2 inhibition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：シヌクレイノパチー

1. 研究開始当初の背景

多系統萎縮症 (Multiple System Atrophy, MSA) はパーキンソニズム、小脳失調、皮質脊髄路および自律神経症状を中核症状とする成人発症、難治性・進行性の神経変性疾患である。1998-1999年にかけて MSA の診断に関する合意表明(診断基準)が発表され、MSA は何れの症例においても多少の差異はあるものの自律神経障害(起立性低血圧または排尿障害)と運動障害(レボドーパ不応性パーキンソン症候群または小脳障害)の両者は有するものであると定義され、運動障害の内容により小脳型 (MSA-Cerebellum, MSA-C)、パーキンソン型 (MSA-Parkinson, MSA-C) と分類されるようになった。過半数は 40~50 歳代に発症し、進行はパーキンソン病よりも急速で、平均経過は 5~7 年である。進行を抑える有効な治療法は知られておらず、L-dopa への反応も限定的であり、対症療法やリハビリテーションが主となっている。1989 年から 1990 年に Papp ら、Nakazato らは MSA 患者剖検脳のオリゴデンドログリア中にみられる胞体内に嗜銀性封入体を同定し、以後グリア細胞内封入体 (Glial Cytoplasmic Inclusion, GCI) として広く認知されるようになり、現在 MSA の病理診断学的指標となっている。さらにパーキンソン病の Lewy 小体、GCI を含め、 α SYN 陽性の神経・(オリゴデンドロ) グリア細胞内封入体を認める疾患群は広く「シヌクレイノパチー」と総称されるに至っている。オリゴデンドログリアの胞体内に形成される GCI は神経細胞の変性を中心課題としてきたそれまでの考え方に大きな転換を与えた。MSA の病態を考えるうえで GCI 形成の機序解明は極めて重要な鍵であり、MSA の神経細胞変性は GCI の形成によって神経細胞が 2 次的に障害された結果であるという “primary oligodendroglialopathy” という Wenning らの提唱する作業仮説は極めて魅力的で説得力に富むものである。しかしながら、GCI 形成とオリゴデンドログリア機能不全・脱落、さらにこれに続発する神経変性の詳細な分子機序は未だ解明されていない。

一方、近年オリゴデンドログリア内に豊富に存在する分子量 25kDa のリン酸化タンパク Tubulin Polymerization Promoting Protein(TPPP)が *in vitro* で α SYN の凝集促進作用を有することが見いだされた。TPPP は MSA の GCI の他、パーキンソン病の Lewy 小体にも共存することが示されている。さらに MSA 患者脳では、通常ミエリン鞘に存在

する TPPP が細胞質に異所性に存在するという興味深い結果も報告され、GCI 形成、オリゴデンドログリア変性における同タンパクの役割に注目が集まる様になった。以上の所見は TPPP が GCI の形成およびこれに続発するオリゴデンドログリア変性過程において重要な機能的役割を担っている可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では MSA の病理学的指標である GCI 形成の分子機序を解析することを目的とする。具体的には HEK293T 細胞およびヒトオリゴデンドロサイト系細胞 KG1C を用いヒト α SYN およびヒト TPPP を過剰発現し、MSA における GCI 類似の凝集体を作成する。これらの細胞モデルを用い、オリゴデンドログリア変性・細胞死に関わる分子カスケードを明らかにするとともに、MSA をはじめとするシヌクレイノパチーの発現予防、進行抑制に有効な薬剤のスクリーニングを行うことを目的とする。

3. 研究の方法

<発現コンストラクト作成>

正常ヒト脳 cDNA をテンプレートとして、PCR を用いた epitope tagging 法にて N 末端に Myc タグを配置したヒト α 、 β 、 γ SYN の cDNA ならびに N 末端に HA タグを配したヒト TPPP cDNA を作成し、それぞれ真核細胞用高発現ベクター-pCMV および pcDNA3.1+

(Invitrogen) にサブクローニングした。得られた発現コンストラクトのインサート方向ならびに配列は制限酵素切断と DNA sequence により確認し、GenoPure Plasmid Maxi Kit (Roche) を用いて plasmid DNA を精製・調製した。

<細胞培養法・トランスフェクション>

FuGene6 transfection reagent (Roche) を用い、10%FBS 含有 DMEM 培地で培養し 6 well plate 若しくは rat tail collagen でコートした滅菌カバーグラス上に蒔いた HEK293T 細胞およびヒトオリゴデンドログリア系の KG1C 細胞をトランスフェクトした。使用した FuGene6 (μ l) :DNA (μ g) の比率は、HEK293 では 3:1、KG1C では 6:1 とした。遺伝子導入 48 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロット法あるいは免疫染色に供した。

<ウェスタンブロット、免疫染色>

Myc- α SYN と HA-TPPP を共発現させた細胞における α SYN オリゴマー化・凝集を評価するため、プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche) と脱リン酸阻害剤 (1mM sodium orthovanadate, 50mM NaF) を添加した RIPA buffer で細胞を可溶化し、加熱変性処理後 12.5%ポリアクリルアミドゲルで泳動し、ウェスタンブロット法に供した。免疫染色には 4%パラホルムアルデヒド/PBS で固定、0.5% Triton X100/PBS で permeabilize した細胞を用い、3%山羊血清 (和光純薬) でブロッキング後、一次抗体次いで Alexa488/Alexa568 標識二次抗体 (Molecular Probes) と反応させた。核染色には TO-PRO3 iodide (Molecular Probes) を使用した。染色後の細胞は退色防止剤を含んだ mounting media でマウンティングし、共焦点レーザー顕微鏡を用い観察した。画像処理には FluoView image analyzing software (Version 4.3, オリンパス) を使用した。

<免疫沈降法 (IP) >

Myc- α SYN・HA-TPPP の相互作用は、細胞を 0.5% NP-40 とプロテアーゼインヒビターを含む TNE buffer で可溶化した後、4°C条件下でプロトコールに従い EZ-View Red アフィニティビーズ (Sigma) を用いた免疫沈降法にて確認した。相互作用については bait, prey を入れ替えた reverse IP において再確認した。

<細胞死、細胞生存率評価>

細胞死、細胞生存率の評価については顕微鏡下での形態変化観察に加え、cleaved caspase-3 特異的抗体 (Cell Signaling Technology) を用いたイムノブロット、免疫染色および 96well マイクロプレートリーダーを使用した MTT

(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) アッセイ法により定量的に評価した。

4. 研究成果

HEK293T 細胞において TPPP は α SYN を特異的に凝集化させ、免疫沈降法でも両者が会合することが確認された。一方、同じシヌクレインファミリーに属する β SYN、 γ SYN に関しては TPPP 共発現による凝集促進効果は確認出来ず、TPPP によるオリゴマー化促進現象は α SYN に特異的であると考えられた。過去の *in vitro* の実験結果から、TPPP と α SYN の会合には α SYN の C 末端に位置する酸性部位が重要であるとされるが、C 末の合成ペプチドは TPPP への結合能を持たず、この部位以外、例えば α SYN 中央部に位置する NAC (non-amyloid beta component) ドメインに

存在する疎水性配列の関与も両者の会合に重要な役割をもつと推定される。

ヒト脳 GCI にはパーキンソン病脳内の Lewy 小体と同様、セリン 129 リン酸化 α SYN が高率に見いだされることが知られている。我々の細胞モデルにおいても G-protein coupled receptor kinase の一つである GRK5 を共発現させ α SYN のセリン 129 リン酸化を人工的に誘導すると、TPPP による α SYN オリゴマー化・凝集化が有意に促進されることが示された。

TPPP 発現により HEK293T および KG1C 何れの細胞体内においても GCI 類似の α SYN 陽性細胞内封入体が形成されたが、うち KG1C 細胞においてのみ、細胞突起退縮を伴う形態変化と同時にアポトーシスが誘導されることが確認された。この理由の詳細は不明であるが、(i)KG1C 細胞において、ライソゾーム/オートファジー系やユビキチン・プロテアソーム系といった細胞毒性を有する異常凝集タンパクの解毒機構が不十分である可能性、あるいは(ii)オリゴデンドログリアに豊富に存在する ceramide などの proapoptotic factor が細胞傷害、アポトーシスの誘導に積極的に関与している可能性などが考えられる。

TPPP・ α SYN 共発現 KG1C 細胞にみられたアポトーシスは、チューブリン脱アセチル化酵素阻害剤である Sirtuin2 の選択的阻害剤である AGK2 (Sigma) の培地への添加で抑制され、この時同時にオリゴデンドログリアの核近傍において大型の α SYN 陽性封入体が形成されることが確認された。この理由として、Sirtuin2 阻害による過アセチル化により微小管が構造的に安定化し、細胞質内に存在する細胞毒性の高いプロトフィブリルなどの小型の中間凝集物が微小管を介した逆行性能動輸送系 (=いわゆるアグレスーム機構) を介し速やかに回収され、核近傍のアグレスームに集積、周辺から隔離され弱毒・無毒化されている可能性が推察された。現在この実験結果を確認するため、siRNA 法による Sirtuin2 のノックダウン実験も計画している。

本研究により得られた結果は MSA における GCI 形成およびオリゴデンドログリア変性の分子病態プロセスに新たな知見をもたらすと同時に、同疾患の治療法開発への道筋を示すものであるといえる。現在タイムラプス顕微鏡システムを利用し神経・オリゴデンドログリアの共培養系モデルにおけるオリゴデンドログリアへの経時的な α SYN 伝搬、凝集体形成を観察中である。今後は動物モデルを用いた検証実験も計画中である。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Hasegawa T, Baba T, Kobayashi M, Konno M, Sugeno N, Kikuchi A, Itoyama Y, Takeda A, Role of TPPP/p25 on alpha-synuclein-mediated oligodendroglial degeneration and the protective effect of SIRT2 inhibition in a cellular model of multiple system atrophy. *Neurochem Int* 2010, 57, 857-66. (査読有)
2. Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, Furumoto S, Kobayashi M, Sugeno N, Baba T, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Funaki Y, Iwata R, Takahashi S, Fukuda H, Arai H, Kudo Y, Yanai K, Itoyama Y. *In vivo* visualization of alpha-synuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy]benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy. *Brain* 2010, 133, 1772-8. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. 2010 年 10 月 7 日 日本パーキンソン病・運動障害疾患学会 (Movement Disorder Society Japan; MDSJ) 2010 (京都) 長谷川 隆文、馬場 徹、小林理子、菅野 直人、菊池 昭夫、武田 篤、糸山 泰人 α シヌクレイン分泌・ライソゾーム移行を制御する細胞内膜動輸送系の探索
2. 2010 年 5 月 22 日 第 51 回神経学会学術大会(東京) 長谷川 隆文、馬場 徹、小林理子、菅野 直人、菊池 昭夫、武田 篤、糸山 泰人 細胞内への α -synuclein 取り込み機構の解析
3. 2009 年 5 月 20 日-22 日 第 50 回日本神経学会総会(仙台) 長谷川 隆文、馬場 徹、小林理子、菅野 直人、菊池 昭夫、武田篤、糸山泰人 GCI 形成過程における Tubulin polymerization promoting protein の機能的役割

[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]

以下の東北大学神経内科教室のホームページにおいても、本研究結果の概要を提示している。

<http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
小林 理子 (KOBAYASHI MICHIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：40422109

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：