

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790845

研究課題名（和文） ポリグルタミン病モデルマウスの分子病態解明と新規標的分子に対する検討

研究課題名（英文） The study of the molecular mechanism of polyglutamine disease model mice and search for new therapeutic molecule

研究代表者

栄 信孝（さかえ のぶたか）

九州大学・医学研究院・神経内科

研究者番号：80423523

研究成果の概要（和文）：

発症早期における病態機序を分子レベルで検討するために、新規に作成した Machado-Joseph 病（MJD）のポリグルタミン鎖 155 を過剰発現する脊髄小脳変性症モデルマウス（MJD 155Q Tg）を用い、継時的に病理学的、生化学的研究を行った。運動障害早期の段階においてゴルジ体が脊髄前角細胞において断片化していることを見だし、さらに発症早期から発現量および局在変化を生じているゴルジ体関連分子を同定した。

研究成果の概要（英文）：

Using the expanded 155 polyglutamine overexpression transgenic mice, we analyzed the molecular mechanism of the mice from the early to end stage of the clinical course by sequential western blot analysis and immunofluorescence study. We revealed that the fragmentation of Golgi apparatus were occurred in early stage of the Tg mice. Further, we identified one of the Golgi related molecule was increased in protein expression level and the localization was different compared to the littermate NT mice at early stage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2100000 円	630000 円	2730000 円
2010年度	1200000 円	360000 円	1560000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3300000 円	990000 円	4290000 円

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：

神経分子病態学、脊髄小脳変性症、ポリグルタミン病、モデルマウス、細胞内輸送機能、ゴルジ体

1. 研究開始当初の背景

近年、神経変性疾患のモデルマウスを用いた詳細な病理学的変化の検討により、神経症状が明らかな時期においても神経細胞死が起こっているわけではなく、むしろ神経細胞体および神経軸索や樹状突起の委縮が病態に関与していることが指摘されている。したがって、ポリグルタミン病を含む神経変性疾患の病態の本質は神経細胞死ではなく、神経機能障害が重要と考えられるようになってきている。神経機能障害の分子機構は未だ解明されていないが、このような神経細胞の委縮が細胞内の栄養因子や細胞内ホメオスタシスに重要な信号伝達などの分子の運搬に関わる細胞内輸送障害に起因する可能性が推定される。神経機能障害の分子基盤には細胞内輸送機能障害が関与する可能性がある。

2. 研究の目的

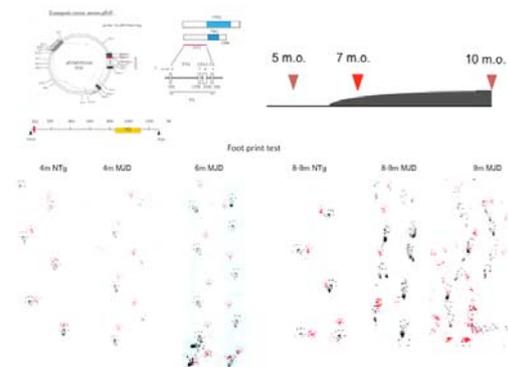
ポリグルタミン病のひとつである Machado-Joseph 病 (MJD) のポリグルタミン鎖 155 を過剰発現する脊髄小脳変性症モデルマウス (MJD 155Q Tg) を用いて、神経変性過程の特に早期における病理学的、生化学的変化を明らかにする。また、細胞内輸送に関わる分子に注目し、早期に変動する分子の同定を試みることおよび、新規標的分子の探索により新たな治療法の開発につなげる

3. 研究の方法

新規に作成した脊髄小脳変性症モデルの臨床経過において、その発症前、早期、中期、晩期にわたって、病理学的、生化学的解析を行った。病理学的には神経軸索や樹状突起の形態を抗 2F11 抗体や、抗カルビンジン抗体により検討し、ミクログリアやアストロサイトの活性化については抗 Iba1 抗体や抗 GFAP 抗体を用いて検討した。シナプスの検討については抗 PSD95 抗体や抗シナプトフィシン抗体について検討し、抗ユビキチン抗体

により核内封入体の形成の経時的変化を確認した。TUNEL 法を用いて神経細胞死の有無について検討した。また、特に細胞内輸送機能に関わる分子に着目して、細胞内輸送に関わる代表的な分子として、Rab family について免疫染色やウェスタンブロット解析を行い、細胞内輸送に中心的な役割をもつゴルジ体に着目してその形態については主に抗 GM1 抗体により検討した。ゴルジ体関連分子については免疫染色およびウェスタンブロット解析により検討を加えた。この中から得られた変化をもとにして、発症早期より変化する分子の同定を目的として、さらに詳細な生化学的、病理学的解析により検討を行った

4. 研究成果



マウスの作成方法および臨床経過の同定
約 6-7 ヶ月齢頃から進行性の運動障害を来とし、約 10 ヶ月齢頃に死亡する

図1 左上 MJD 155Q Tg マウスの作成
右上 MJD 155Q Tg マウスの臨床経過
下 foot print test による歩行障害の経過

(2) 病理所見：歩行異常がみられる 7-8 ヶ月齢頃において、Non transgenic マウス (NT) と比較して、Tg マウスにおいて神経形態異常や、炎症細胞の活性化、アポトーシスなどの所見は認めなかった

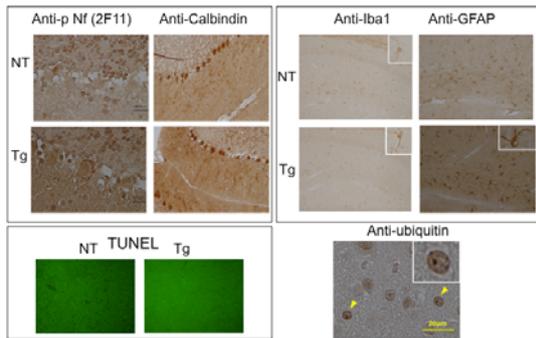


図2 左上 左抗2F11抗体による軸索障害の検討および抗 calbindin 抗体による樹上突起形態の検討
 右上 抗 Iba I 抗体によるミクログリアの検討および抗 GFAP 抗体によるアストロサイトの検討
 左下 TUNEL 染色によるアポトーシスの検討
 右下 抗ユビキチン抗体による核内封入体の検討

(3) 核内封入体の形成は、発症前の約5か月齢には認めず、少なくとも7ヶ月齢頃から大脳皮質や脳幹部、脊髄などにおいて広範に確認され、以後増加する

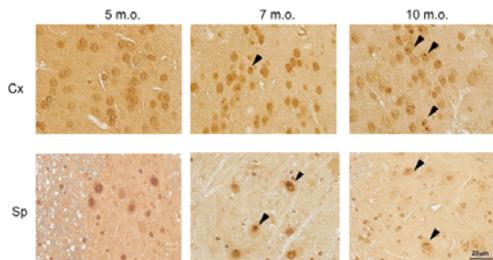


図3 核内封入体形成の経時的変化 (Cx : 大脳皮質、Sp : 脊髄)

(4) ウェスタンブロット解析による Rab family, synapse 関連タンパクの検討。Non transgenic マウス (NT) と比較して、Tg マウスにおいて明らかなタンパク発現量の変化は、認めなかった

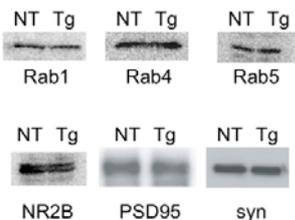


図4 Western blot による NT と Tg マウス脳での発現検討 (上 Rab 1, 4, 5 の検討 下 シナプス関連タンパク NR2B, PSD 95 synaptophysin)

(5) Tg マウスでは、脊髄前角細胞においてゴルジ体の断片化が認められ、この変化は約6-7ヶ月齢の発症早期から確認された

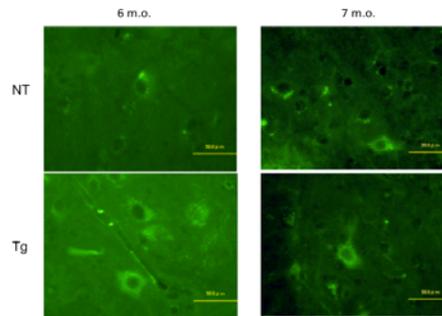


図5 脊髄前角細胞におけるゴルジ体断片化(上 NT 下 Tg 脊髄)

(6) ゴルジ体関連分子の生化学的、病理学的検討

Tg マウスでは、NT と比較して、VCIP135 は脊髄において発現量が7ヶ月齢で上昇し、細胞内の局在も変化した

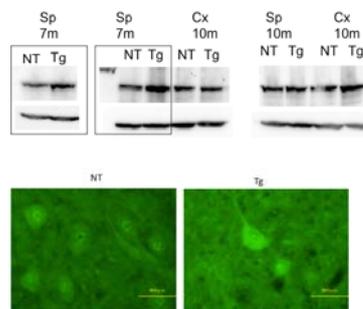


図6 抗 VCIP135 抗体による脊髄 western blot および蛍光免疫染色

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]
 投稿準備中

1. Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid- β degradation. Himeno E, Ohyagi Y, Ma L, Nakamura N, Miyoshi K, Sakae N, Motomura K, Soejima N, Yamasaki R, Hashimoto T, Tabira T, LaFerla

FM, Kira J. Ann Neurol. 2011 Feb;69(2):248-56.

2. Alcohol drinking and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. Fukushima W, Miyake Y, Tanaka K, Sasaki S, Kiyohara C, Tsuboi Y, Yamada T, Oeda T, Miki T, Kawamura N, Sakae N, Fukuyama H, Hirota Y, Nagai M; Fukuoka Kinki Parkinson's Disease Study Group.

BMC Neurol. 2010 Nov 5;10:111.

3. Phenotypic spectrum of hereditary neuralgic amyotrophy caused by the SEPT9 R88W mutation.

Ueda M, Kawamura N, Tateishi T, Sakae N, Motomura K, Ohyagi Y, Kira JI.

J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2010 Jan;81(1):94-6

[学会発表] (計 3 件)

栄信孝、他. Machado-Joseph 病(MJD)における細胞内輸送機能の検討,第 50 回日本神経学会総会,2009.05.21.仙台

Sakae N, et al. A study of the mechanism of spinocerebellar ataxia from the view of neuronal dysfunction,39th Annual Meetings of Society for Neurosciences,2009.10.13. Chicago, USA

栄信孝、他. 運動失調症の病態機序における細胞内輸送機能の検討,第 51 回日本神経学会総会,2010.05.20.東京

[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 栄信孝

(Nobutaka Sakae)

研究者番号 : 80423523

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし