

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659260

研究課題名（和文） オートファジーの分子イメージングと再生

研究課題名（英文） Molecular imaging and regeneration of autophagy

## 研究代表者

阿部 康二 (ABE KOJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20212540

## 研究成果の概要（和文）：

脳梗塞や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) など予後不良な機能障害を生じうる神経疾患における神経細胞障害とオートファジー機構の関連については不明な点が多い。本研究では、オートファジーマーカーである LC3 とそれを標識する GFP との融合タンパクを発現するトランスジェニックマウスを利用して、中大脳動脈を選択的に閉塞させた脳梗塞モデルマウスおよび ALS モデルマウスにおけるオートファジー発現部位を *in vivo* で画像化することに成功した。本成果は、両疾患に対する再生療法などの新規治療法開発においても大変有用なツールとなり得ると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

To visualize the temporal and spatial changes of autophagy occurred in the pathogenesis of cerebral infarction and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a transgenic mouse expressing a fused protein of an autophagy marker, LC3 and GFP was used for analysis. The changes of autophagy can be successfully visualized in the model mice of cerebral infarction and ALS. This novel research technique is a useful tool for investigating therapies for both diseases.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,800,000	300,000	3,100,000

研究分野：神経変性疾患の臨床と研究（筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、脊髄小脳変性症など）、脳卒中の遺伝子治療と再生医療、生活習慣病と脳卒中・認知症  
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：オートファジー、分子イメージング、筋萎縮性側索硬化症、ALS、SOD1、脳梗塞、LC3、GFP

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において脳血管疾患は死因の第3位であり、虚血性脳血管障害である脳梗塞の治療に関しては組織プラスミノゲンアクチベーターなどによる治療の進歩も著しい現在でも大きな後遺症に苦しむ患者も多い。また、筋萎縮性側索硬化症（ALS）は1次および2次運動ニューロンの選択的細胞死により、全身の骨格筋の筋萎縮・筋力低下をもたらす予後が極めて不良な進行性難治性神経変性疾患であり、有効な治療法は未だ確立していない。オートファジーは細胞質内に生じた異常または不要なタンパクの処理機構で、「タンパクの品質管理」を行い、細胞の恒常性維持のために重要であると考えられている。最近になり、適切なオートファジー機構の破綻は重大な神経細胞障害を生じることが明らかにされている。

## 2. 研究の目的

脳虚血状態（急性脳障害）およびALS（慢性進行性疾患）におけるオートファジーの神経細胞死への関与につき、それぞれのモデルマウスを対象として、*in vivo*イメージングや他の解析手法を駆使して明らかにすると共に、オートファジー発現部位を可視化・画像化する手法を確立し、再生療法などの新規治療法開発へ資することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳梗塞（脳虚血状態）発生オートファジーマウスの作成と解析

①オートファジーマウス（GFP-LC3 Tg）に中大脳動脈閉塞（MCAO）を生じ脳梗塞マウスモデルを作成する。

②*in vivo*イメージングによる経時的、空間的なオートファジーの観察。

### ③オートファジー関連タンパクの解析

#### (2) オートファジー/ALSダブルトランスジェニックマウスの作成と解析

①オートファジーマウス（GFP-LC3 Tg）とALSモデルマウス（SOD1-G93A Tg）を交配しダブルトランスジェニックマウスを作成する。

②ALSの各病期における*in vivo*イメージングによるオートファジーの観察。

③オートファジー関連タンパクの解析。

## 4. 研究成果

### (1) 脳梗塞（脳虚血状態）発生オートファジーマウスの作成と解析

オートファジーマウス（GFP-LC3 Tg）の中大脳動脈を選択的に閉塞させた脳梗塞モデルを作成し、マウス個体の外表面から蛍光を検出できる実体蛍光顕微鏡を用いて脳梗塞発生後の状態を経時的に観察した。脳虚血後に生じたGFPシグナルはautophagosome形成時にLC3-Iがリン酸化されることにより生じるLC3-IIの集合を反映したものと考えられ、脳梗塞により急性に生じたオートファジーの様態をGFP-LC3発現部位の変化として画像化した。結果的に、脳虚血部位に一致して生じたGFP蛍光シグナルは*in vivo*では虚血後1日をピークとして観察され、その後時間と共にシグナルは減衰した。摘出した脳虚血部位のウェスタンブロット解析では、オートファジーマーカーであるLC3-IIの量的変化は*in vivo*での観察と一致して虚血後1日にピークを示し、組織学的検討では、グリア細胞でなく神経細胞においてGFP-LC3陽性所見を認めた。また、GFP-LC3とTUNELの両者の陽性細胞は虚血中心部よりもペナンプラ領域に多く認めた。

### (2) オートファジー/ALSダブルトランスジェニックマウスの作成と解析

in vivoイメージングの結果ではダブルトランスジェニックマウス脊髄のGFP発光シグナルは10週から19週まで週齢にしたがって増加した。ex vivoイメージングでは脊髄腹側により強い発光が認められ、組織標本を用いた二重染色ではGFPシグナルはLC3、p62など autophagosomeのマーカーとよく一致していた。ダブルトランスジェニックマウス脊髄前角では10週から19週まで週齢にしたがって本来は速やかに消化されるべき autophagosome の構成成分が増加していた。また19週齢にかけてTUNEL陽性細胞は増加し、運動ニューロン数は減少していた。以上よりALSモデルマウスにおけるオートファジー in vivoイメージングに成功し、また、ALSモデルマウスにおいて、オートファジー機構の進行が何らかの原因で遅延し、さらにALSにおける運動ニューロン死の過程とも関連している可能性が示唆された。

## 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 17 件)

1. Tian F, Morimoto N, Liu W, Ohta Y, Deguchi K, Miyazaki K, Abe K. In vivo optical imaging of motor neuron autophagy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy* 7, 985-992, 2011, 査読有
2. Liu N, Shang J, Tian FF, Nishi H, Abe K. In vivo optical imaging for evaluating the efficacy of edaravone after transient cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 1397, 66-75, 2011, 査読有
3. Shang J, Deguchi K, Ohta Y, Liu N, Zhang X, Tian F, Yamashita T, Ikeda Y, Matsuura T, Funakoshi H, Nakamura T, Abe K. Strong neurogenesis, angiogenesis, synaptogenesis, and antifibrosis of hepatocyte growth factor in rats brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Res* 89, 86-95, 2011, 査読有
4. Tanaka N, Ikeda Y, Ohta Y, Deguchi K, Tian F, Shang J, Matsuura T, Abe K. Expression of Keap1-Nrf2 system and antioxidative proteins in mouse brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 1370, 246-253, 2011, 査読有
5. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Yang LW, Okuda H, Koizumi A. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes a type of spinocerebellar ataxia (SCA36) accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet* 89, 121-130, 2011, 査読有
6. Kozuki M, Kurata T, Miyazaki K, Morimoto N, Ohta Y, Ikeda Y, Abe K. Atorvastatin and pitavastatin protect cerebellar Purkinje cells in AD model mice and preserve the cytokines MCP-1 and TNF- $\alpha$ . *Brain Res* 1388, 32-38, 2011, 査読有
7. Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Morimoto N, Ohta Y, Ikeda Y, Abe K. Progressive neurovascular disturbances in the cerebral cortex of Alzheimer's disease-model mice: protection by atorvastatin and pitavastatin. *Neuroscience* 197, 358-368, 2011, 査読有
8. Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Panin

- VL, Morimoto N, Ohta Y, Nagai M, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Atorvastatin and pitavastatin improve cognitive function and reduce senile plaque and phosphorylated tau in aged APP mice. *Brain Res* 1371, 161-170, 2011, 査読有
9. Miyazaki K, Masamoto K, Morimoto N, Kurata T, Mimoto T, Obata T, Kanno I, Abe K. Early and progressive impairment of spinal blood flow-glucose metabolism coupling in motor neuron degeneration of ALS model mice autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 456-467, 2011, 査読有
10. Miyazaki K, Ohta Y, Nagai M, Morimoto N, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res* 89, 718-728, 2011, 査読有
11. Tian F, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Morimoto N, Shang J, Zhang X, Liu N, Ikeda Y, Matsuura T, and Abe K. In Vivo Imaging of Autophagy in a Mouse Stroke Model. *Autophagy* 6, 1107-1114, 2010, 査読有
12. Kawai H, Yamashita T, Ohta Y, Deguchi K, Nagotani S, Zhang X, Ikeda Y, Matsuura T, and Abe K. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *J Cerebral Blood Flow & Metabolism* 30, 1487-1493, 2010, 査読有
13. Liu N, Deguchi K, Shang J, Zhang X, Tian F, Yamashita T, Ohta Y, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. In vivo optical imaging of early-stage apoptosis in mouse brain after transient cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 88, 3488-3497, 2010, 査読有
14. Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Kawakami H, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 465, 223-226, 2010, 査読有
15. Morimoto N, Nagai M, Miyazaki K, Ohta Y, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Asanuma M and Abe K. Induction of parkinsonism-related proteins in the spinal motor neurons of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. *J Neurosci Res* 88, 1804-1811, 2010, 査読有
16. Shang J, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Zhang H, Morimoto N, Liu N, Zhang X, Tian F, Matsuura T, Funakoshi H, Nakamura T and Abe K. Antiapoptotic and autophagic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Res* 88, 2197-2206, 2010, 査読有
17. Zhang X, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Shang J, Tian F, Liu N, Panin VL, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Temporal and spatial differences of multiple protein expression in the ischemic penumbra after transient MCAO in rats. *Brain Res* 1343, 143-152, 2010, 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. Liu N, Shang J, Tian FF, Nishi H, Abe K. In Vivo Optical Imaging for Evaluating the Efficacy of Edaravone after Transient Cerebral Ischemia in Mice. 第 23 回日本脳循環代謝学会総会. 2011.11.4-5, Tokyo, Japan
2. Kono S, Tian F, Deguchi K, Yamashita T, and Abe K. In vivo imaging of autophagy after cerebral ischemia in mice. The 5th Japanese-Korean Joint Stroke Conference. 2011.10.28-30, Gyeongju, Korea
3. Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Morimoto N, Ohta Y, Abe K. Atorvastatin and pitavastatin reduce senile plaques and inflammatory responses in model mice with Alzheimer's disease. VASCOg 2011, 2011.9.11-14, Lille, France
4. Miyazaki K, Ohta Y, Morimoto N, Kurata T, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Disruption of neurovascular unit relating to oxidative stress and mitochondrial deficit prior to motor neuron degeneration in ALS. The 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia. 2011.8.31-9.4, Kagoshima, Japan
5. Morimoto N, Miyazaki K, Kurata T, Ide T, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. PROTECTIVE EFFECT OF MITOCHONDRIAL TRANSCRIPTION FACTOR A OVEREXPRESSION IN ALS MODEL MICE. The 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia. 2011.8.31-9.4, Kagoshima, Japan
6. Liu N, Deguchi K, Shang J, Zhang X, Tian FF, Yamashita T, Ohta Y, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. In vivo optical imaging of early stage apoptosis in mice brain after transient cerebral ischemia. 第 36 回日本脳卒中学会総会. 2011.7.30-8.1, Kyoto, Japan
7. Morimoto N, Miyazaki K, Kurata T, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Induction of alpha-synuclein, PINK1, DJ-1 in the spinal motor neurons of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. 7th Annual Meeting of ASMRM and 10th J-mit. 2010.12.16-18, Fukuoka, Japan
8. Kawai H, Yamashita T, Ohta Y, Deguchi K, Nagotani S, Zhang X, Ikeda Y, Matsuura T, and Abe K. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. The 1st World Forum on Cerebral Blood Flow Metabolism & Function. 2010.10.18-20, Kyoto, Japan
9. Zhang X, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Shang J, Tian F, Liu N, Panin VL, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Temporal and spatial differences of multiple protein expression in the ischemic penumbra after transient MCAO in rats. The 1st World Forum on Cerebral Blood Flow Metabolism & Function. 2010.10.18-20, Kyoto, Japan
10. Omote Y, Ohta Y, Fukushima T, Takamatsu K, Ota T, Goto K, and Abe K. Effect of a free radical scavenger, edaravone, on motor palsy of acute lacunar infarction. 6th International Symposium on NEUROPROTECTION AND NEUROREPAIR 2010. 2010.10.1-4, Rostock, Germany

11. Ohta Y, Tian F, Nagai M, Morimoto N, Miyazaki K, Kurata T, Ikeda Y, Matsuura T and Abe K. Intrathecal Injection of EGF and FGF2 Promotes Proliferation of Neural Precursor Cells in the Spinal Cords of ALS Model Mice. The 3rd Pan Pacific Symposium on Stem Cells Research. 2010. 4. 16-19, Taichung, Taiwan

[その他]

岡山大学神経内科ホームページ

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/shinkeinaika>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部 康二 (ABE KOJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20212540

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者