

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500426

研究課題名(和文) 神経変性疾患と顆粒空胞変性との関わりに関する研究

研究課題名(英文) Roles of granulovacuolar degeneration in neurodegenerative diseases

研究代表者

山崎 恒夫 (Yamazaki, Tsuneo)

群馬大学・保健学研究科・教授

研究者番号：80200658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患のなかには異常な蛋白質の沈着が神経細胞死の原因とされているものがある。この異常蛋白沈着のメカニズムに小胞体ストレス・オートファジーの異常が関与し、その中心的構造物が顆粒空胞変性である可能性を検討した。

多系統萎縮症において、免疫組織化学法によって、各種小胞体ストレス関連蛋白の発現を顆粒空胞変性に認めた。また同様の方法によって、多系統萎縮症ではミクログリアにおけるライソソーム系蛋白の活性化が生じていることも見いだした。一方、アルツハイマー病では、ユビキチン分解系に関連するSmurf1蛋白が平野小体に局在していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Abnormal protein accumulation is thought to be the cause of neuronal cell death at least in some neurodegenerative diseases. We hypothesized that ER stress-autophagy systems might be included in this disease mechanisms and the pivotal pathological structure is granulovacuolar degeneration. To study this hypothesis we carried out immunohistological examinations using postmortem brains.

In brains of multiple system atrophy, we observed increased expression of ER stress related proteins in granulovacuolar degeneration and also increased activation of lysosomal systems in microglia. In Alzheimer's brains, increased expression of a ubiquitin degradation system protein, called Smurf1 was detected in Hirano bodies.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：顆粒空胞変性 神経変性疾患 平野小体

## 1. 研究開始当初の背景

近年、多くの神経変性疾患を異常蛋白沈着症として包括的に捉える概念が定着しつつある。例えば、Alzheimer病 (AD) をアミロイド蛋白 (A $\beta$ ) 沈着症 (あるいはタウ蛋白沈着症: tauopathy)、ALS (amyotrophic lateral sclerosis) や FTLD-U (frontotemporal lobar degeneration with ubiquitinated inclusions) を TDP-43 (TAR-DNA-binding protein 43) 沈着症 (TDP-43 proteinopathy) とする立場である。確かにADの原因がA $\beta$  の脳内沈着であることは、研究者間のコンセンサスを得ている事実であるが、細胞内でのA $\beta$  産生部位や、なぜA $\beta$  が沈着を開始するのかといった基本的な課題は依然として謎として残されている。

我々はA $\beta$  の細胞内産生部位を検索する目的で、A $\beta$  の前駆体蛋白 (APP: amyloid precursor protein) の細胞内輸送過程を長年にわたって研究し (J Cell Biol, 129:431-, J Cell Sci 109:999-, J Neurosci, 17:1004-, J Biol Chem, 272:16085-, ), その結果A $\beta$  の細胞内産生・凝集部位の一つとして後期エンドソームを同定した (J Biol Chem, 276, 4454-)。後期エンドソームは細胞内膜輸送の仕分けを行う重要な細胞内小器官で、細胞内を移動する膜小胞が集合し、さらに適切な膜器官と融合するための道筋をつける、いわばハブ空港のような役割を担っている。ここにはまた、フリーコレステロールをはじめ様々な物質が集合することも知られていることから、後期エンドソームは多種多様な物質の集合点であるとともに、多様な細胞内小器官の特徴を併せもっている可能性が示唆される。

そこで、我々は後期エンドソームの細胞内小器官としての特性を明らかにするために、さらなる検討を重ね、後期エンドソームがオートファゴソームの性質を兼ね備えていることを見いだした (J Clin Neurosci, 16:954-)。このことは、オートファジー活性の多寡が、後期エンドソーム内でのA $\beta$  産生や、A $\beta$  凝集に影響を与える可能性を示唆している。この仮定を検証するため、我々はA $\beta$  産生能を示す培養細胞を用いて、オートファジーを数種類の方法で誘導し、分泌型ならびに細胞内A $\beta$  の産生を解析した (Neurological Res, 31, 959-)。その結果、ある種の条件下ではオートファジー活性の上昇・障害に伴って、細胞内のオートファゴソーム数が増減し、平行して細胞内外のA $\beta$  量が増加・減少することが確認された。以上の結果より、我々はADの発症には、オートファジー活性の多寡、特にオートファジー小胞の数が、A $\beta$  の産生の鍵を握っていると考えるに至った。

以上の結果は、ADの脳ではオートファジー小胞の数が増加している可能性を示唆するものであり、実際近年これを裏打ちするような報告もみられる (J Cell Biol, 171:87-) が、未だ広くコンセンサスを得ているわけではない。我々はこの理由として、通常の病理学

的検索方法では、効率良く鋭敏にオートファゴソームの検出ができないために、その存在に気づかれていないのではないかと考えた。以前研究分担者の岡本は、AD脳に見られる顆粒空胞変性 (GVD) の電子顕微鏡による詳細な検討を行い、GVDがオートファゴソームであることを報告し、(Acta Neuropathol. 82:340-) 現在でも広く認められている。そこで、我々はAD脳において鋭敏にGVDを検出できる方法を見いだせば、AD脳におけるGVD (= オートファゴソーム) の増加を証明できるのではないかと考え、GVDのマーカーの検索を行った。その結果、我々の作成したリン酸化依存性抗 TDP-43 抗体が極めて特異的にGVDを鋭敏に染色することを見いだした (Neurosci Lett, 463:87-)。この抗体による免疫組織染色を行うと、従来GVDの好発部位とされてきた海馬・海馬傍回以外に、広く大脳新皮質の神経細胞に多数のGVDが存在することが判明した。こうした変化は、正常コントロール脳ではほとんど認められないことから、我々の仮定通り、ADの病理にGVD・オートファジーが密接に関連している可能性が示唆される。さらにこの結果は、本年になってオートファジーに關与する multivesicular body の細胞内輸送に重要な CHMP-2B 蛋白が、ADのGVD中に多数見いだされたことから裏付けられた (Neurosci Lett 477:86-)。

一方、AD脳のGVDに小胞体ストレスのマーカー蛋白が存在していることも明らかにされ (Am J Pathol 174:1241-) ADの発症早期に小胞体ストレスが關与している可能性が示唆された。小胞体ストレスの発症要因はいくつか知られるが、代表的なものは正常な折りたたみが行われなかったタンパク質 (unfolded protein:UP) に対する反応で (unfolded protein response:UPR) 小胞体内で処理しきれなかったUPは細胞質へと運搬されプロテアソームの分解を受ける (ER-associated degradation:ERAD)。しかし、こうしたUPに対する処理が十分に行われなかったり、UPR活性上昇が長期間に及ぶと、細胞はアポトーシスによって死に至ると考えられている。近年、UPの処理はERADだけではなく、オートファジーも關与していることが報告され、実際小胞体ストレスの誘導によって、オートファジー活性の上昇と、オートファゴソームの出現がみられることが証明されている (Mol Cell Biol 26:9220-)。さらに興味深いことに、小胞体ストレスの誘導によってタウがリン酸化されること、そのキナーゼがGSK-3であることも、報告された (J Neurochem 104:409-)。

以上の我々自身の研究と報告された結果から、我々はADにおけるA $\beta$ の産生とタウのリン酸化に小胞体ストレスが關与し、その鍵になる小器官はオートファゴソーム (= GVD) ではないかと考えた。一方、前述のように我々は本来ADでは沈着しないリン酸化

TDP-43 も GVD に局在することを見いだした (Neurosci Lett 463:87- )。

## 2. 研究の目的

我々は以上を踏まえ、少なくとも一部の異常蛋白沈着症は小胞体ストレス・オートファジーと密接な関連をもち、その中心的な異常構造物は GVD 様構造物ではないかと仮定し、これを検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

異常蛋白蓄積症と考えられる各種神経変性疾患(アルツハイマー病,パーキンソン病,多系統萎縮症)のホルマリン固定脳切片を、免疫組織化学的に検索した。

## 4. 研究成果

(1)多系統萎縮症と小胞体ストレス関連蛋白  
多系統萎縮症 12 例, 遺伝性脊髄小脳変性症 2 例の小脳, 橋, 線状体を含む切片を, pPERK, PeIF2, pIRE1 の 3 種の UPR 関連蛋白で免疫染色をした。その結果, UPR 関連蛋白がシヌクレインの沈着した乏突起膠細胞に認められた。免疫反応に陽性の構造物は GVD のメーカー蛋白と共局在することが判明し, このことは電子顕微鏡にて確認された。GCI(glial cytoplasmic inclusion)を欠く, 遺伝性脊髄小脳変性症では, UPR 関連蛋白に陽性の構造物は認められなかった。

以上より, 多系統萎縮症の発症には小胞体ストレスと GVD の存在が関与していることが示された。

### (2)多系統萎縮症とライソゾーム

(1)の結果より, GVD を含めた蛋白分解過程の障害が多系統萎縮症において生じている可能性を考えて, 多系統萎縮症とライソゾームマーカーとの関連を検索した。その結果, LAMP1, LAMP2, カテプシン D, HEXA などのライソゾーム関連蛋白陽性構造物が, コントロール脳に比べて著しく増加していることが判明した。しかしながら, これらの陽性構造物は シヌクレインの沈着する GCI ではなく, むしろミクログリア内に認められた。

以上の結果, 多系統萎縮症ではライソゾーム系蛋白の活性が上昇しており, その中心はミクログリアにおけるライソゾームと考えられた。

### (3)ユビキチンリガーゼと平野小体

次に GVD (オートファジー) と関連するユビキチンによる分解系と神経変性疾患の関連性を検索した。ユビキチン分解系に関連する蛋白として Smurf1(Smad ubiquitination regulatory factor 1) に注目して免疫組織化学的検索を行った。残念ながら, 多系統萎縮症においてはコントロールと比して変化は認められなかった。しかし, 意外なことにアルツハイマー病の脳において抗 Smurf1 抗体が平野小体を強く認識した。また, 培養細胞

に実験的に平野小体様の構造物を形成させると, やはり Smurf1 に陽性であることが確認された。

従来平野小体の存在意義は不明であったが, 今回の結果からユビキチン分解系と平野小体の関連性が示唆された。

## 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 5 件)

Makioka K, Yamazaki T, Takatama M, Ikeda M, Okamoto K, Immunolocalization of Smurf1 in Hirano bodies, J Neurol Sci, 査読有, 2014, pp24-28, DOI: 10.1016/j.jns.2013.09.028.  
Ikeda M, Yonemura K, Kakuda S, Tashiro Y, Fujita Y, Takai E, Hashimoto Y, Makioka K, Furuta N, Ishiguro K, Maruki R, Yoshida J, Miyaguchi O, Tsukie T, Kuwano R, Yamazaki T, Yamaguchi H, Amari M, Takatama M, Harigaya Y, Okamoto K, Cerebrospinal fluid levels of phosphorylated tau and A 1-38/A 1-40/A 1-42 in Alzheimer's disease with PS1 mutations, Amyloid, 査読有, Vol. 20, 2013, pp107-112, DOI: 10.3109/13506129.2013.790810.  
Makioka K, Yamazaki T, Takatama M, Nakazato Y, Okamoto K, Activation and alteration of lysosomes in multiple system atrophy, Neuroreport, 査読有, Vol.23, 2012, pp 270-276, DOI: 10.1097/WNR.0b013e3283503e4f.  
Yamaguchi H, Takahashi S, Kosaka K, Okamoto K, Yamazaki T, Ikeda M, Osawa M, Amari M, Harigaya Y, Awata S, Maki Y, Yamaguchi fox-pigeon imitation test (YFPIT) for dementia in clinical practice, Psychogeriatrics, 査読有, Vol. 11, 2011, pp.221-226 DOI:10.1111/j.1479-8301.2011.00373.x.  
山崎恒夫, 老人斑の形成と分布, 日本臨床, 査読なし, 69 巻 (増刊 8), 2011, pp.136-139, <http://www.nippon-rinsho.co.jp/>

[学会発表](計 12 件)

牧岡幸樹、山崎恒夫、高玉真光、岡本幸市、池田佳生, 各種の神経変性疾患に特異的な封入体・構造物における NBR1 の発現 第 32 認知症学会学術集会, 2013 年 11 月 8 日, 松本

長嶺 俊、山崎恒夫、高玉真光、岡本幸市、Alzheimer 病の脳幹における顆粒空胞変性の広がり,第54回日本神経学会学術大会,2013年5月30日,東京  
牧岡幸樹,山崎恒夫、高玉真光、岡本幸市、Hirano小体におけるSmurf1の発現について,第54回日本神経学会学術大会,2013年5月30日,東京

Kouki Makioka, Tsuneo Yamazaki, Masamitsu Takatama, Yoshio Ikeda, Koichi Okamoto, Immunolocalization of Smurf1 in Hirano bodies, Alzheimer 's Association International Conference, 2013年7月15日, Boston(USA)

長嶺 俊、山崎恒夫、高玉真光、岡本幸市、Alzheimer病の脳幹における顆粒空胞変性の広がり,第53回日本臨床神経学会学術大会,2012年5月24日,東京  
牧岡幸樹,山崎恒夫、高玉真光、岡本幸市、多系統萎縮症の病理におけるオートファジー・ライソゾーム系の関与,第53回日本神経学会総会,2012年5月23日,東京

牧岡幸樹,山崎恒夫、高玉真光、岡本幸市、Hirano小体におけるSMURF1の発現について,第31回日本認知症学会学術集会,2012年10月27日,筑波

Makioka K, Yamazaki T, Takatama M, Okamoto K, Activation and alteration of lysosomes in multiple system atrophy, Alzheimer 's Association International Conference, 2012年7月16日, Vancouver(Canada)

長嶺 俊,山崎 恒夫、角田 聡子、高玉真光、岡本 幸市、顆粒空胞変性に対するマーカーの検討,第52回日本神経学会学術大会,2011年5月19日,名古屋  
牧岡幸樹,山崎恒夫、岡本幸市、OligodendroglialにみられるGVD様構造物と加齢の関係についての免疫組織学的検討,第52回日本神経学会総会,2011年5月19日,名古屋

牧岡幸樹,山崎恒夫、高玉真光、岡本幸市、多系統萎縮症の病理におけるライソゾームの関与,第30回日本認知症学会学術集会,2011年11月12日,東京

長嶺 俊,山崎 恒夫、角田 聡子、高玉真光、岡本 幸市、アルツハイマー病の顆粒空胞変性に対する各種マーカーの比較,第30回日本認知症学会学術集会,2011年11月12日,東京

〔図書〕(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山崎 恒夫 (YAMAZAKI, Tsuneo)  
群馬大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号: 80200658

### (2)研究分担者

岡本 幸市 (OKAMOTO, Kouichi)  
群馬大学・その他部局等・名誉教授  
研究者番号: 00124652