

令和元年6月8日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09686

研究課題名(和文) 異型トランスサイレチンでのシュワン細胞異常による神経変性機序の研究

研究課題名(英文) Schwann cell abnormality due to variant TTR and neurodegeneration

研究代表者

村上 龍文 (Tatsufumi, Murakami)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30330591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： FAP疾患モデルマウス由来のTgS1シュワン細胞をプロテオソーム阻害剤で処理すると、TTRは細胞質全体に顆粒状にアグリソームとして認められた。さらに熱ショック因子1(Hsf1)を siRNAで低下させると、細胞質や細胞突起にTTRが充満、腫大し、TTR凝集が著しく促進された。正常TTRと異型TTR (V30M TTR)組み替え蛋白をDRG 培養感覚神経細胞に添加すると、V30M TTRでは神経突起成長抑制が見られた。FAP TTR E61K 腓腹神経の免疫組織化学染色でシュワン細胞の一部はTTR陽性であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)は末梢神経へのアミロイド沈着を特徴とする。本研究では疾患モデルTgS1シュワン培養細胞を用い、TTR凝集機序を調べた。その結果TgS1細胞の熱ストレス応答を低下させると、細胞内TTR凝集が著しく増加することを見出した。この事はシュワン細胞の蛋白品質管理の低下が、細胞内でTTR凝集を生じさせ、末梢神経でのアミロイド沈着の契機となっているかも知れないことを示唆した。シュワン細胞がFAP治療の標的となるかも知れない。

研究成果の概要(英文)： TgS1 Schwann cells, which are derived from a FAP transgenic mouse expressing V30M TTR gene. were treated with a proteasome inhibitor, resulting in granular vesicle formation as an aggresome. TgS1 were also treated with Hsf1 siRNA, and the swelling and filling with TTR were recognized in the cytoplasm and the dendrites of the cells.

Neurite-growth assay was performed using rat DRG neurons with wild-type TTR and V30M TTR. V30M TTR inhibited the neurite outgrowth, but wild-type TTR did not. Immunohistochemistry of the sural nerve specimen of a FAP TTR E61K patient demonstrated several TTR positive Schwann cells in the peripheral nerve.

研究分野：神経内科学

キーワード：異型トランスサイレチン シュワン細胞 感覚神経細胞 神経変性 アミロイド アグリソーム アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)はアミロイド沈着と末梢神経障害を特徴とする遺伝性全身性アミロイドーシスで、中年期以降に発症し、典型例では感覚性多発神経炎と自律神経障害を初発症状とする。FAP はトランスサイレチン (TTR) 遺伝子の変異が原因である。

TTR 遺伝子は主に肝臓や脳の脈絡叢で産生されるが、FAP でなぜ末梢神経障害を主症状とするかは長い間原因が不明であった。申請者は後根神経節(DRG)と末梢神経のシュワン細胞でTTR 遺伝子が発現しているのを見出した (Murakami et al. Neurosci Lett 2008; Murakami et al. Brain Res 2010)。さらに異型TTR 遺伝子を発現するシュワン細胞由来の培養上清が感覚神経細胞の神経突起成長を抑制すること、高齢FAP マウスのDRG でシュワン細胞やサテライト細胞内に非線維性TTR 凝集物が観察されることを報告した(Murakami et al. J Neurochem 2015)。

FAP は基本的には軸索型ニューロパチーであり、シュワン細胞の異常は古くから指摘されていたが (Coimbra and Andrade Brain 1971; Carvalho et al. Brain 1976)、TTR 遺伝子が原因遺伝子として同定されてから二次的な変化だと思われる。しかし、我々のこれまでの研究結果からはシュワン細胞はむしろ積極的に病態に関与しており、末梢神経障害の発症のトリガーになっているのではないかと示唆されていた。

2. 研究の目的

家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)はトランスサイレチン (TTR) 遺伝子の変異が原因で、細胞外アミロイド沈着と末梢神経障害を特徴とするが、なぜ末梢神経障害を生ずるかは不明である。申請者は末梢神経系のシュワン細胞でTTR 遺伝子が発現しているのを発見し、高齢FAPトランスジェニックマウスで後根神経節のシュワン細胞内に非線維性TTR 凝集物を見出した。これらの事はシュワン細胞での異型TTR 発現が末梢神経障害の発症に関与している可能性を示唆している。そこで本研究では シュワン細胞内TTR 凝集の形成機序、 グリア-神経細胞連関による感覚神経細胞への影響、 FAP 腓腹神経のシュワン細胞内TTR凝集を解明することにした。

3. 研究の方法

(1) シュワン細胞内TTR 凝集の形成機序の研究

我々はこれまでFAP マウス(マウス*ttr* ノックアウト-ヒト異型TTR ノックイン)のDRG 由来のシュワン細胞を長期培養し、自発不死化シュワン細胞株TgS1 を確立した。TgS1 細胞はシュワン細胞の性質を保持し、ヒト異型TTR を産生していることを確認しており、FAPシュワン細胞モデルとして実験が可能である(Murakami et al. J Neurochem 2015)。

老化ではプロテオソーム系が低下する事が知られており、TgS1 細胞をプロテオソーム阻害剤で処理するとアグリソームとしてTTR 凝集物が生ずる(Murakami et al. J Neurochem 2015)。そこでまずそこから引き続いてオートファジー-リソソーム系がTTR 凝集処理に利用されるか、共焦点顕微鏡で抗TTR 抗体とオートファジーやリソソームのマーカー抗体を用いた二重免疫蛍光染色で調べる。また透過型電子顕微鏡を用いプロテオソーム阻害剤で処理したTgS1細胞を観察する。

FAP疾患モデルマウスと熱ショック因子1 (HSF1) ノックアウトマウスを掛け合わせた *mTTR+/Hsf-* のマウスでは、末梢神経やDRGにTTRが沈着することが報告されているが、シュワン細胞のTTR遺伝子発現によるTTR沈着機序の検証はなされていない。そこでTgS1細胞を Hsf1の siRNAで処理して熱ショック応答の中心的な分子であるHsf1 を低下させ、細胞内外にTTR凝集が観察されるか、細胞内の分布や程度はどうかを、各種細胞内小器官のマーカーとともに蛍光二重免疫染色で調べる。

(2) グリア-神経細胞連関による感覚神経細胞への影響の検討

TgS1シュワン培養細胞培養上清はDRG 感覚神経細胞の神経突起成長に抑制的に働くがその機序を探る。まず正常TTR (W-TTR) と異型TTR (V30M TTR, E61K TTR) 組み替え蛋白をDRG 培養感覚神経細胞に添加し、Neurite-growth assay で異型TTR 自身が抑制的に作用するかを観察する。V30M TTRはFAPのcommon variantで、E61K TTRはlate-onset FAP を起こすrare variantである。

(3) FAP 腓腹神経のシュワン細胞内TTR凝集

最近に当大学で診断された FAP TTR E61K 孤発例の腓腹神経標本パラフィン切片で、抗 TTR 抗体による免疫組織化学染色を施行し、腓腹神経内の TTR 沈着やシュワン細胞内 TTR 凝集の有無を調べる。さらに腓腹神経エポン切片を透過型電子顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

(1) シュワン細胞内の TTR 凝集の研究

FAP 疾患モデルマウス由来の TgS1 シュワン細胞を用いて、ヒト異型 TTR の局在を蛍光 2 重免疫染色で調べると、ゴルジ体マーカーと共局在していた。次に TgS1 細胞をプロテオソーム阻害剤 MG132 で処理すると、TTR はゴルジ体マーカーとは一致せず、細胞質全体に顆粒状に認められた。この TTR 凝集物を各種抗体で同様な方法で観察すると、P62 やリソソームマーカーと共局在せず、一部がオートファゴソームマーカーと一致したが、大部分はアグリソーム dye と共局在しアグリソームとして認められた。これらの事からシュワン細胞での蛋白管理システムの低下は、細胞内での TTR 凝集のトリガーとなり、アグリソームが形成され、オートファジー系の処理が不十分なため TTR 凝集物として観察されていると考察された。

さらに上記細胞を透過型電子顕微鏡で観察すると種々の異常凝集物が認め、オートファジック・リソソーム様のもも観察された。アミロイド線維は認められず、細胞質にはビメンチンがフィラメントとして目立った。

次に TgS1 細胞を用いて、熱ショック因子 1 (Hsf1) siRNA で処理して、Hsf1 を低下させ、2 日後に抗 TTR 抗体で蛍光免疫細胞染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。そうすると TgS1 細胞質に TTR が充満し腫大している細胞が観察された。これらは二重免疫染色ではゴルジ体には局在していなかった。また細胞末端が TTR 凝集で腫大し、細胞突起の中間部にも腫大が観察された。さらに TTR が充満している細胞片も観察された。このように TgS1 では Hsf1 の低下で TTR 凝集が著しく促進された。プロテオソーム阻害剤 MG132 処理での TTR 凝集よりその程度は著しかった。変異 TTR (+)-Hsf1 ノックアウトマウスでは末梢神経や DRG に TTR が沈着するので、この結果はその病態機序を細胞レベルで証明している推察された。

(2) グリア-神経細胞連関による感覚神経細胞への影響の検討

TgS1 細胞の培養上清は感覚神経細胞の突起成長を抑制するが、分泌された V30M TTR そのものが抑制するのかを検証することにした。また late-onset FAP の原因である E61K TTR の影響を同時に調べることにした。

無血清培地に、WT TTR, V30M TTR, E61K TTR を 3 μ /ml 濃度になるよう添加し (髄液 TTR 濃度 5~20 μ /ml)、各々の培養液でラット初代 DRG 感覚神経細胞を 48 時間培養して、抗 beta III-tubulin 抗体で免疫細胞染色し、神経突起成長を測定した。その結果 V30M TTR 添加では神経突起成長抑制が見られたが、E61K TTR 添加では神経突起成長抑制は観察されなかった。以上から V30M TTR は E61K TTR の感覚神経細胞への影響は異なっていた。

(3) FAP 腓腹神経のシュワン細胞内 TTR 凝集

次に最近に当大学で発見された FAP TTR E61K 患者の腓腹神経標本で、抗 TTR 抗体による免疫組織化学染色を施行した。この抗体で神経内膜は染色されず、シュワン細胞の一部は TTR 陽性であった。さらに透過型電子顕微鏡で腓腹神経のシュワン細胞を観察するとその約 12% に核の凝集が見られ、アポトーシス様の細胞死が生じている。またこの腓腹神経組織の縦断面、横断面を詳細に検討したが、細胞外アミロイド沈着は光学顕微鏡でも電子顕微鏡でも観察されなかった。以上からシュワン細胞内の TTR 凝集が細胞死に関与している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Tatsufumi Murakami, Yoshihide Sunada. Transthyretin amyloid neuropathy: the Schwann cell hypothesis. *Myelin - Basic and Clinical Advances* (in press)

Tatsufumi Murakami, Hirotake Nishimura, Taiji Nagai, Shoji Hemmi, Yumiko Kutoku, Yutaka Ohsawa, Yoshihide Sunada. Clinical and pathological findings in familial amyloid polyneuropathy caused by a transthyretin E61K mutation. *Journal of the Neurological Sciences*. 381, 55-58, 2017

村上龍文、三五一憲、渡部和彦、新見直子、李正花、山村研一、砂田芳秀. TTR 型アミロイドドーシスでも末梢神経障害機序の研究：シュワン細胞の関与について. *Peripheral Nerve*, 27(1), 62-67, 2016.

〔学会発表〕(計 8 件)

村上龍文、刀祢重信、三五一憲、新見直子、水口峰之、砂田芳秀. 家族性アミロイドポリニューロパチーTTR E61K の神経変性機序の研究：神経細胞障害の検討. 第 30 回日本末梢神経学会、2019. 8. 23-24, 金沢

Tatsufumi Murakami, Mineyuki Mizuguchi, Kazunori Sango, Shigenobu Tone, Yoshihide Sunada. Amyloidogenicity of E61K TTR associated with TTR amyloid neuropathy. 60th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, 2019 5. 25, Osaka

村上龍文、刀祢重信、三五一憲、渡部和彦、水口峰之、砂田芳秀. 家族性アミロイドポリニューロパチー TTR E61K の神経変性機序の研究：アミロイド凝集能の検討. 第 29 回日本末梢神経学会、2018. 9. 8, 下関

村上龍文、西村広健、永井太士、逸見祥司、久徳弓子、大澤 裕、砂田芳秀. TTR E61K による家族性アミロイドポリニューロパチーの神経病理学的検討：初期病変はどこか？ 第 28 回日本末梢神経学会 (2017, 8.25-26, 名古屋)

Tatsufumi Murakami, Hirotake Nishimura, Taiji Nagai, Shoji Hemmi, Yumiko Kutoku, Yutaka Ohsawa, Yoshihide Sunada. Neuropathological features in familial amyloid polyneuropathy caused by transthyretin E61K variant. XXIII World Congress of Neurology (Sep 16-21, 2017, Kyoto) (国際学会)

Tatsufumi Murakami, Hirotake Nishimura, Taiji Nagai, Shoji Hemmi, Yumiko Kutoku, Yutaka Ohsawa, Yoshihide Sunada. Clinical and pathological findings in familial amyloid polyneuropathy due to transthyretin E61K. 2017 PNS Annual meeting (July 8-12, in Sitges near Barcelona) (国際学会)

村上龍文、三五一憲、渡部和彦、新見直子、李正花、山村研一、砂田芳秀. TTR アミロイドニューロパチーの神経障害発症機序の研究. 第 27 回 日本末梢神経学会学術集会 (2016.8.26, 27, 大阪)

村上龍文、三五一憲、渡部和彦、新見直子、山下倫太郎、李正花、山村研一、砂田芳秀. TTR 型アミロイドドーシスの神経障害発生機序の研究：シュワン細胞の関与について. 第57回日本神経学会 (2016, 5.18-21, 神戸)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：
川崎医科大学神経内科学教室 研究のご紹介
<http://www.kawasaki-m.ac/neurology/study/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：砂田 芳秀
ローマ字氏名：Yoshihde Sunada
所属研究機関名：川崎医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：00240713

研究分担者氏名：大澤 裕
ローマ字氏名：Yutaka Ohsawa
所属研究機関名：川崎医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号(8桁)：80246511

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。