

平成30年6月6日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15473

研究課題名(和文) 樹状突起スパインを可視化する生体システムの開発と認知症への応用

研究課題名(英文) Visualization of dendritic spine: Implication for neurodegenerative dementia

研究代表者

若林 孝一 (Wakabayashi, Koichi)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：50240768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー上流分子であるAMBRA1は多系統萎縮症の封入体に発現しており、正常および異常シヌクレインと結合し、その分解に関わることを明らかにした。AMBRA1はレビー小体病および多系統萎縮症の治療法開発における標的分子となる可能性がある。さらに、パーキンソン病の末梢血単核球におけるオートファジーの変化はパーキンソン病剖検脳におけるオートファジーの変化を反映していることを示唆した。パーキンソン病におけるオートファジーの異常は病早期より生じていると考えられ、末梢血のリキッドバイオプシーを行うことで、病態の進行度を簡易にモニターできる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have shown that autophagy was dysregulated in patients with alpha-synucleinopathy [Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy (MSA)]. Therefore, we elucidated the role of upstream proteins of autophagy in the pathogenesis of MSA. Our results demonstrated that AMBRA1 is a novel hub binding protein of alpha-synuclein and plays a central role in the pathogenesis of MSA through the degradative dynamics of alpha-synuclein. These results raise the possibility that molecular modulation targeting AMBRA1 can be a promising candidate for the treatment of alpha-synucleinopathy. We further performed whole transcriptome assay by microarray, quantitative RT-PCR and Western blot analysis using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with PD and age-matched controls. We provided evidence that autophagy in PBMCs could detect a feature confirmed by neuropathology of PD and this alteration of autophagy is a fundamental aspect of PD.

研究分野：脳神経病理学

キーワード：シナプス蛋白 神経変性 レビー小体病 パーキンソン病 多系統萎縮症 シヌクレイン オートファジー

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患では各疾患に特徴的な分子が異常に蓄積しており、病態と密接に関連している。実際に、我々は異常なシヌクレインを簡易に検出する方法を開発し、この手法によりレビー小体病(パーキンソン病およびレビー小体型認知症)患者脳内において、異常なシヌクレインが病期と相関して前シナプスに多量に蓄積していることを見出した。これら前シナプスでの異常蓄積は早期から起こるため、この蓄積を防ぐことができれば、レビー小体病を含むシヌクレイノパチーの病態および症状の改善につながると予想される。一方、我々を含む複数のグループは、オートファジーなどの細胞内分解システムを活性化させることにより、異常分子の蓄積を防ぐことを報告している。我々は自然糖のトレハロースを利用して、安全かつ効率的にマウス脳内の分解システムとシャペロン群を活性化できることを最近報告した。そこで自然糖トレハロースによる細胞内分解システムの活性化の機序を明らかにするため、マイクロアレイ解析を行った。その結果、約25,000遺伝子のうち、特定の遺伝子群がトレハロース投与後早期(1日目)に増加していることを見出した。さらに興味深いことに、これらトレハロースにより誘導される遺伝子群はいずれも神経細胞の樹状突起スパイン形成に関連する遺伝子であった。オートファジー可視化マウスを用いた結果からも、トレハロース投与でのみ神経細胞の樹状突起に活性化シグナルが検出された。さらに、水迷路試験により、トレハロースを投与したレビー小体病モデルマウスでは認知記憶が改善した。つまり、トレハロースは神経細胞の樹状突起やスパインに作用し、空間認知機能に参与している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

(1) オートファジーは細胞内分解機構の一つであり、ULK1、ULK2、VPS34、AMBRA1はオートファゴソームの形成を開始する上流タンパク質である。特にAMBRA1はオートファジーの上流を調節する新規ハブ分子である。これまで、シヌクレイノパチー(パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症)の病態にオートファジー下流分子が関与することを報告してきた。さらに、複数のオートファジー上流分子(ULK1、ULK2、VPS34、AMBRA1)がレビー小体に発現していることを明らかにした。そこで、レビー小体病と多系統萎縮症の剖検脳組織を用い、オートファジー上流分子の局在と発現量を検討するとともに、AMBRA1とシヌクレインの関連について検討した。

(2) これまでレビー小体病および多系統萎縮症の病態にオートファジーの異常が関与していることを報告してきた。しかし、これら細胞内分解システムの異常が、長い神経変

性の結果起こったのか、病早期より生じているのかは明らかでない。そこで、パーキンソン病患者および正常対照の末梢血単核球を用い、オートファジーの異常と臨床検査項目との関連について検討した。

(3) トレハロースはこれまでにオートファジー誘導剤として報告されており、実際に、オートファゴソーム膜の構成分子の量的増加を確認している。特に、LC3と蛍光分子を結合した遺伝子改変マウスを用いた検討により、通常はLC3が神経細胞の細胞質や核に局在しているが、トレハロースを投与すると、LC3は細胞質から樹状突起にかけて広く分布することを確認している。そこで、LC3の局在を、より立体的に検討するために、脳の透明化を目的とする検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 多系統萎縮症(6例)および正常対照(6例)の剖検脳組織を用い、免疫染色とウェスタンブロット解析を行った。HEK293細胞に、AMBRA1、正常型シヌクレインと変異型シヌクレインを遺伝子導入し、免疫沈降法ならびにproximity ligation assay(PLA)で評価した。さらに、多系統萎縮症(5例)および正常対照(5例)の凍結脳組織を用い、免疫沈降法を行った。

(2) パーキンソン病患者(35例)および正常対照(23例)を対象とした。パーキンソン病患者および正常対照例から末梢血単核球を採取し、トランスクリプトームアッセイおよびウェスタンブロット解析を行った。さらにこれらの結果と臨床検査項目との関連について検討した。

(3) マウス脳を用い、可溶化剤の含有量が異なる複数の透明化試薬(CUBIC、SCALE)で脳の透明化を試みた。

4. 研究成果

(1) 剖検脳組織を用いた免疫染色では、正常対照において神経細胞の胞体がULK1、ULK2、VPS34で淡く陽性を呈した。AMBRA1では神経細胞に加え、オリゴデンドログリアの胞体も弱陽性であった。多系統萎縮症では、AMBRA1でグリア細胞質内封入体、神経細胞質内封入体が強陽性に染色された。凍結脳のWB解析では、MSAでULK1、ULK2、AMBRA1が有意に増加していた。一方、オートファジーの抑制を示唆するリン酸化AMBRA1も多系統萎縮症において有意に増加していた。HEK293細胞を用いた免疫沈降法では、AMBRA1に正常シヌクレインが結合しており、PLAで可視化された。さらに、凍結脳組織を用いた免疫沈降法でも、AMBRA1と正常およびシヌクレインが結合していた。これより、多系統萎縮症の病態においてオートファジー上流に何らかの異常が示唆された。HEK293細胞および凍結脳組織

を用いた免疫沈降法から AMBRA1 は正常型シヌクレインと結合していることが確認された。

AMBRA1 は多系統萎縮症のグリア細胞および神経細胞内封入体にも発現していることを明らかにした。さらに、AMBRA1 は正常および異常シヌクレインと結合し、その分解に関わることを明らかにした。AMBRA1 はレビー小体病と多系統萎縮症の治療法開発における標的分子となる可能性がある。

(2) トランスクリプトーム解析では、パーキンソン病においてオートファジーの主要蛋白である ULK3, Atg2A, Atg4B, Atg5, Atg16L1, histone deacetylase 6 の mRNA が有意に減少していた。ウェスタンブロット解析ならびに逆転写ポリメラーゼ連鎖反応では、オートファジーの開始に関わる ULK1, VPS34, Beclin1, AMBRA1 のうち ULK1, Beclin1, AMBRA1 が有意に上昇する一方で、VPS34, Beclin1, AMBRA1 の mRNA は有意に減少していた。VPS34, Beclin1, AMBRA1 はシヌクレインのモノマーと正の相関を、ULK1, VPS34, Beclin1, AMBRA1 はシヌクレインのオリゴマーと正の相関を示した。さらに、シヌクレインのオリゴマーはパーキンソン病の重症度ならびに心臓交感神経の脱神経に相関した。

パーキンソン病の末梢血単核球におけるオートファジーの変化はパーキンソン病剖検脳におけるオートファジーの変化を反映している可能性が示唆された。パーキンソン病におけるオートファジーの異常は病早期より生じていると考えられる。シヌクレインパッチにおいて末梢血のリキッドバイオプシーを行うことで、病態の進行度を簡易にモニターできる可能性がある。

(3) 最初に用いた透明化試薬 (CUBIC) では脳の透明化は順調に行えたが、予想外に LC3 の膜構造物が消失することが判明した。そこで、より可溶化剤の含有量が少ない透明化試薬 (SCALE) に替え、再度、透明化を行ったが、今度は透明度が不完全であった。最終的には、より週齢の若いマウスを用いることにより、この課題を解決し、技術面でもライトシート顕微鏡を用いることで、LC3 の三次元構築像を可視化できるようになった。今回、最適化した条件を踏まえ、脳におけるオートファゴソーム膜構成分子 LC3 の三次元構築像を可視化し、今後、トレハロースの投与による効果を検討したい。

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8件)

Tanji K, Mori F, Miki Y, Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. YOD1 attenuates

neurogenic proteotoxicity through its deubiquitinating activity. *Neurobiol Dis* 2018, 112, 14-23, 査読有
DOI: 10.1016/j.nbd.2018.01.006

Miki Y, Tanji K, Kon T, Shimoyama S, Ueno T, Hayakari R, Matsumiya T, Tsushima E, Mori F, Wakabayashi K, Tomiyama M. Alteration of autophagy-related proteins in peripheral blood mononuclear cells of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2018, 63, 33-43, 査読有
DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.11.006

Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y, Sasaki H, Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Immunohistochemical localization of exoribonucleases (DIS3L2 and XRN1) in intranuclear inclusion body disease. *Neurosci Lett* 2018, 662, 389-394, 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2017.10.061

Miki Y, Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Alteration of mitochondrial protein PDHA1 in Lewy body disease and PARK14. *Biochem Biophys Res Com* 2017, 489, 439-444, 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.05.162

Miki Y, Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. PLA2G6 accumulates in Lewy bodies in PARK14 and idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2017, 645, 40-45, 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2017.02.027

Miki Y, Yoshizawa T, Morohashi S, Seino Y, Kijima H, Shoji M, Mori A, Yamashita C, Hatano T, Hattori N, Wakabayashi K. Neuropathology of PARK14 is identical to idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2017, 32, 799-800, 査読有
DOI: 10.1002/mds.26952

Miki Y, Tanji K, Mori F, Tatara Y, Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Fimia GM, Wakabayashi K. AMBRA1, a novel α -synuclein-binding protein, is implicated in the pathogenesis of multiple system atrophy. *Brain Pathol* 2018, 28, 28-42, 査読有
DOI: 10.1111/bpa.12461

Wakabayashi K, Mori F, Kakita A,

Takahashi H, Tanaka S, Utsumi J, Sasaki H. MicroRNA expression profiles of multiple system atrophy from formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Neurosci Lett* 2016, 635, 117-122, 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2016.10.034

〔学会発表〕(計7件)

森 文秋、三木康生、丹治邦和、豊島靖子、吉田眞理、佐々木秀直、柿田明美、高橋 均、若林孝一、ポリグルタミン病および核内封入体病におけるRNA分解酵素の免疫組織化学的検討、第58回日本神経病理学会総会学術研究会、2017年6月1~3日、学術総合センター(東京都・千代田区)

三木康生、丹治邦和、森 文秋、柿田明美、高橋 均、若林孝一、PLA2G6はPARK14と特発性パーキンソン病のレヴィ小体に蓄積する、第58回日本神経病理学会総会学術研究会、2017年6月1~3日、学術総合センター(東京都・千代田区)

若林孝一、Dementia with Lewy bodiesの臨床病理の基礎、第35回日本認知症学会学術集会、2016年12月1~3日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

三木康生、丹治邦和、森 文秋、内海 潤、佐々木秀直、柿田明美、高橋 均、若林孝一、多系統萎縮症におけるオートファジー上流分子の異常、第57回日本神経病理学会総会学術研究会、2016年6月1~3日、キャッスルホテル(青森県・弘前市)

中村桂子、森 文秋、今 智矢、丹治邦和、三木康生、富山誠彦、黒滝日出一、豊島靖子、柿田明美、高橋 均、山田正仁、若林孝一、多系統萎縮症の軟膜下および脳室周囲アストロサイトにおけるリン酸化 シヌクレインの蓄積、第57回日本神経病理学会総会学術研究会、2016年6月1~3日、キャッスルホテル(青森県・弘前市)

若林孝一、3大変性認知症疾患(AD、DLB、FTD)の病態解明に対する学際的アプローチ: 神経病理の立場から、第57回日本神経学会学術大会、2016年5月18~21日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

若林孝一、パーキンソン病とレビー小体型認知症、第105回日本病理学会総会、2016年5月12~14日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

〔図書〕(計1件)

若林孝一 他、中外医学社、Annual Review 神経 2017、2017、281(22-29)

〔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

若林 孝一(WAKABAYASHI, Koichi)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 50240768

(2) 研究分担者

丹治 邦和(TANJI, Kunikazu)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 10271800

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

三木 康生(MIKI, Yasuo)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 30709142

森 文秋(MORI, Fumiaki)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 60200383