

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18680031

研究課題名（和文）

ユビキチン化封入体を形成する神経変性疾患におけるヒストンジアセチラーゼ 4 の役割

研究課題名（英文）

Role of Histone deacetylase 4 in neurodegenerative disorders with ubiquitinated intracellular aggregates

研究代表者

藤ヶ崎 純子 (FUJIGASAKI JUNKO)

東京慈恵会医科大学 医学部 講師

研究者番号：60312021

研究成果の概要：

ヒストンジアセチラーゼ 4 がユビキチン化封入体を形成とそれに関連する神経変性過程に直接関与することを示す成果は得られなかったが、ユビキチン化核内封入体を形成する難治性遺伝性神経変性疾患、脊髄小脳失調症 7 型 (SCA7) の新たな治療戦略開発の標的となる新規分子として、small ubiquitin modifier (SUMO) と、アミロイド前駆蛋白ファミリー蛋白 amyloid precursor like protein 2 (APLP2) を同定した。加えて SCA7 の発症に関連する可能性のある分子を網羅的に検索し、病態解明に向けて今後の研究対象となる分子群を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	6,200,000	1,860,000	8,060,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学 神経病理学

キーワード：神経変性疾患・ユビキチン・脊髄小脳失調症 7 型・small ubiquitin modifier・amyloid precursor like protein 2

1. 研究開始当初の背景

神経細胞変性疾患では細胞質内あるいは核内に特徴的な細胞内封入体が形成される事が知られている。これらの封入体の多くはユビキチン化されていることから、神経細胞内において不要な蛋白がユビキチン-プロテアソーム依存性に分解される過程で形成され、蛋白分解系に過剰な負荷がかかる事が神経細胞死に関係すると考えられている。細胞内での蛋白分解を効率的に行うために、細胞質内、核内それぞれに存在する機能ドメインがユビキチン依存性蛋白分解に関与していることが近年明らかになり、細胞質内では aggresome が、核内で nuclear body が重要

な機能ドメインとして認識されている。これらの機能ドメインで異常蛋白が分解される過程を明らかにすることは、異常蛋白の蓄積の結果、神経細胞がやがて変性に陥るメカニズムを明らかにすることにつながる。研究代表者はこれまでに核内の nuclear body の機能に注目し核内封入体形成過程の解析に関わる一方、神経変性疾患の剖検脳を用いた形態学的研究において転写抑制因子であるヒストンジアセチラーゼ 4 (Histone deacetylase4:HDAC4) が核内、細胞質内の両方のユビキチン化封入体形成に関与していることを明らかにしてきた。HDAC4 はユビキチンモチーフ蛋白である small ubiquitin modifier (SUMO) 蛋白の修

飾やリン酸化に伴って核と細胞質間を移行し、細胞骨格蛋白の発現を調整することが知られている。この調節機構の異常が神経変性に与える可能性があるとして仮定し、HDAC4の核-細胞質間移行が、神経変性疾患で観察される、核内および細胞質内のユビキチン化封入体にどのように関与し、神経変性過程に影響を与えるかを検討する研究計画を立てるに至った。

2. 研究の目的

本研究はHDAC4の細胞骨格蛋白の発現調節機能に注目し、HDAC4が細胞質内、核内双方のユビキチン化封入体形成に関与する過程を機能的に解析することで、神経変性過程に関与する機構を新たに見いだすことを目的とする。研究にはユビキチン化封入体を形成する神経変性疾患の細胞モデルとして、プロテアソーム阻害による神経変性細胞モデル、および脊髄小脳失調症7型 (spinocerebellar ataxia type7: SCA7) のテトラサイクリン制御システムを利用した細胞モデルを用いる。

HDAC4がユビキチン化封入体形成と神経変性過程に関連している有意な所見が得られない場合には、研究対象として採用したSCA7の細胞モデルを用いて、SCA7の発症に関与する新規分子の検索を行う。

SCA7は難治性の遺伝性神経変性疾患、ポリグルタミン病の一つであり、原因遺伝子産物 ataxin-7 内のポリグルタミン鎖の異常伸長を原因とする。ポリグルタミン病では核内に異常ポリグルタミン鎖を含む変異蛋白が核内に蓄積、凝集し、変異蛋白を含有するユビキチン化封入体が形成されることが、病理学的な特徴である。臨床的には小脳失調、網膜変性に加え多彩な神経脱落症状が進行する。近年の研究により SCA7 を含むポリグルタミン病の病態解析が進んでいるが、未だ有効な治療法はなく、その開発が待たれている。疾患の病態機構を解明し、治療法開発の端緒となる成果を得ることを研究の副次的な目的とする。

3. 研究の方法

(1) HDAC4の核内、細胞質内ユビキチン化封入体への関与

細胞モデルにおけるユビキチン化封入体の形態学的観察を行い、核内、細胞質内の機能ドメインとの関係を調べた。更にユビキチン化封入体とHDAC蛋白との関係を検索した。

① ユビキチン化封入体を含有する細胞モデルの形態学的観察

プロテアソーム阻害によるユビキチン化封入体形成細胞モデル、および脊髄小脳失調

症7型(SCA7)モデル細胞を用いた。

神経芽細胞腫由来の細胞 (SH-SY5Y) をプロテアソーム阻害剤にて処理し、核内、細胞質内に形成されるユビキチン化封入体を免疫染色法にて検索した。SCA7の細胞モデルとして、テトラサイクリン制御システムを利用したラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞を用いた。細胞モデルに形成される細胞質内、核内封入体形成過程を経時的に観察、神経細胞死との関係を検索した。

② 上記モデル細胞における核内、細胞質内ユビキチン化封入体とHDAC蛋白の関与

二種の細胞モデルにおいて核内、細胞質内封入体を免疫染色法にて検索し、封入体に含まれるHDAC蛋白およびその関連蛋白に関して評価した。

③ HDAC4強制発現によるユビキチン化封入体形成過程への影響

HDAC4の発現ベクターを上記細胞モデルに遺伝子導入し、強制発現したHDAC4の細胞内、核内封入体内への移行と、同蛋白の強制発現による封入体形成過程への影響を評価した。

(2) SCA7の病態に関与する新規因子の検索

① 変異 ataxin-7 の SUMO 化と SCA7 の病態との関連:

研究の過程で、HDAC4の細胞内動態を修飾するSUMO蛋白が、HDAC4の封入体への取り込みとは無関係にSCA7のユビキチン化核内封入体の構成成分として同定されたことから、ataxin-7が直接SUMO化されていると仮定し、ataxin-7のSUMO化がSCA7の病態に与える影響について検討した。

(i) ataxin-7 の SUMO 化の評価

ataxin-7蛋白のSUMO化について、*in vitro* SUMOylation assay, 免疫沈降法にて評価した。

(ii) SCA7の核内封入体のSUMO化の評価

SCA7剖検脳、SCA7モデルマウス、およびモデル細胞において核内封入体のSUMO化について免疫組織学的に評価した。

(iii) SUMO化による ataxin-7 の凝集性の変化

ataxin-7のSUMO化部位を同定、変異を導入したSUMO化変異 ataxin-7の導入によって、ataxin-7の凝集性の変化を検討した。

② APLP2のC末端側切断過程とSCA7の病態との関連:

Yeast two hybrid法によるスクリーニングによって同定されたSCA7の原因遺伝子蛋白である ataxin-7 に結合する蛋白群よりア

ミロイド前駆蛋白ファミリー蛋白、Amyloid precursor like protein 2 (APLP2) を選択し、APLP2 が SCA7 の病態に関与するメカニズムについて検討した。特に APLP2 が SCA7 の病態下で、神経細胞内で切断され、その結果生じた切断産物の核内移行が神経変性過程に与える影響について検討した。

(i) ataxin-7 と APLP2 の結合性の評価

β -galactosidase assay, GST-pull down assay, 免疫沈降法により ataxin-7 と APLP2 の結合性を評価した。

(ii) SCA7 の核内封入体と APLP2 の関連性の評価

SCA7 剖検脳、モデルマウス、およびモデル細胞を検索対象とした。アミロイド前駆蛋白ファミリー蛋白 (APP, APLP1, APLP2) の N 末端側、C 末端側、caspase-3 による N 末端側切断産物を特異的に認識する抗体を用いた免疫組織化学染色により、これらの蛋白の細胞内分布を、正常コントロールと SCA7 病態間で比較した。

(iii) APLP2 の細胞内切断が SCA7 の病態に与える影響の評価

APLP2 の C 末端側切断産物 (APLP2-ICD) を SCA7 モデル細胞内に強制発現し、誘導される細胞毒性について評価した。

③ 発現アレイ解析による SCA7 の病態に関連する因子の網羅的検索

SCA7 のテトラサイクリン制御システムを利用した細胞モデルを用いた。本細胞モデルでは、テトラサイクリン存在下では導入された変異 ataxin-7 の発現は抑制されているが、テトラサイクリン非存在下では発現が誘導される。細胞を NGF 存在下に分化誘導後、変異 ataxin-7 発現の誘導を開始した。発現誘導後、7 日経過した細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて遺伝子の発現変動を比較し、変異 ataxin-7 の発現誘導に伴って発現が変動する遺伝子を網羅的に検索した。

4. 研究成果

(1) HDAC4 の核内、細胞質内の封入体への関与

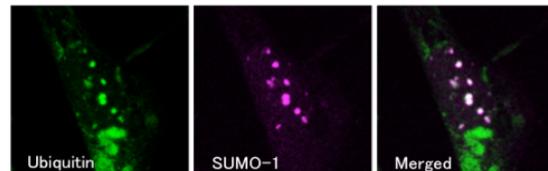
① プロテアソーム阻害により形成される核内、細胞内ユビキチン化封入体

神経芽細胞腫由来の細胞 (SH-SY5Y) をプロテアソーム阻害剤にて処理することで、核内、細胞質内にユビキチン化封入体が形成された。プロテアソーム阻害により誘導される細胞障害性を評価するために、細胞周期につい

て検索したところ、プロテアソーム阻害により細胞周期の停止が観察された。

核内のユビキチン化封入体は SUMO1 陽性で、SUMO 化されていることが判明した (図) が、細胞質内封入体は SUMO 化されていない。これらの核内および細胞質内封入体に内在性 HDAC4 の陽性所見は得られなかった。そこで、HDAC4 の細胞内強制発現を行ったところ、核内に HDAC4 陽性の粗大な顆粒状構造物が形成されたが、これらの構造物は、プロテアソーム阻害によってもユビキチン化封入体と共存しなかった。

図 プロテアソーム阻害により形成される核内、細胞質内ユビキチン化封入体



② SCA7 細胞モデルに形成される核内、細胞質内ユビキチン化封入体

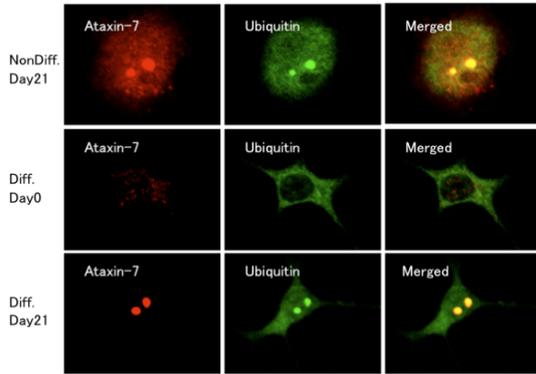
SCA7 の細胞モデルとして、テトラサイクリン制御システムを利用した PC12 細胞系を用いた。

この細胞モデルでは、導入された変異 ataxin-7 の発現はテトラサイクリン存在下では抑制されているが、テトラサイクリン非存在下では発現が誘導される。

発現誘導を開始すると変異 ataxin-7 の発現レベルは経時的に上昇した。変異 ataxin-7 は主に核内に分布し、凝集してユビキチン化核内封入体を形成した。これらの核内封入体は、細胞を NGF により分化誘導した場合、ならびに分化誘導をしない場合のいずれの条件下でも変異 ataxin-7 発現を誘導した場合にも観察された。分化誘導した細胞では経時的に核内封入体の頻度は増加した。これらの核内封入体に内在性の HDAC4 陽性所見は認められなかった。

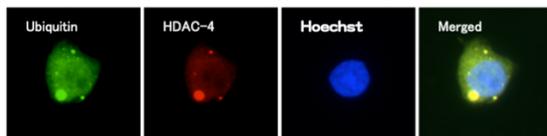
HDAC4 はユビキチンモチーフ蛋白である small ubiquitin modifier (SUMO) 蛋白の結合 (SUMO 化) に伴って核内に輸送される。SUMO の二種類のアイソフォーム、SUMO1, SUMO2 について、核内封入体への関与を調べたところ、いずれも変異 ataxin-7 を含有するユビキチン化核内封入体に陽性であった。Ataxin-7 は SUMO 化を受ける可能性のある部位を複数、配列内に有していることから、ataxin-7 そのものが SUMO 化されている可能性を想定し、SCA7 の病態に関連する新規因子として、本研究の副次的な目的である SCA7 の病態解明のための研究対象とした。

図 SCA7細胞モデルで形成される核内封入体



加えて、SCA7 細胞モデルでは非分化誘導下で、細胞質内にユビキチン化封入体が形成されたが、これらは分化誘導に伴い形成されなくなった。細胞質内封入体はコントロール細胞にも少数ながら観察され、かつ変異 ataxin-7 との共存率は低く、変異 ataxin-7 の凝集過程に特異的に関連するかは疑問が持たれた。細胞質内ユビキチン化封入体の少数は HDAC4 を含んでいたが(図)、陽性率は低く (<1%)、HDAC4 の強制発現を行っても HDAC4 陽性封入体の数は増加せず、HDAC4 がユビキチン化封入体の形成過程に強く関連する所見は得られなかった。

図 SCA7細胞モデルの細胞質内HDAC4陽性ユビキチン化封入体



(2) SCA7 の病態に関与する新規因子の検索

① 変異 ataxin-7 の SUMO 化と SCA7 の病態との関連

SCA7 の細胞モデルにて、ataxin-7 が SUMO 化される可能性が示唆される所見を得たことから、ataxin-7 の SUMO 化について検討したところ、ataxin-7 は SUMO1 および SUMO2 によって直接 SUMO 化されることがわかった。SUMO1 が分子一個で標的蛋白に結合するのに対し、SUMO2 は分子が連なった poly-SUMO2 として結合する。Ataxin-7 も poly-SUMO2 によって修飾されていた。

SCA7 で観察される核内封入体について、SCA7 剖検脳、SCA7 モデルマウスおよびモデル細胞のすべてにおいて、核内封入体は SUMO 化されており、変異 ataxin-7 と共存していた。

SUMO1、SUMO2 の主要結合部位はいずれもリ

ジン残基 K257 で、同部に変異を導入することで、ataxin-7 の SUMO 化は抑制された。

Ataxin-7 の SUMO 化により、ataxin-7 の核内輸送や、核内機能ドメインへの局在が変動することが予想されたが、SUMO 化を阻害しても、これらの細胞内分布に有意な変動はみられなかった。そこで、変異 ataxin-7 の凝集性を評価したところ、SUMO1、SUMO2 の強制発現により、変異 ataxin-7 の凝集性は低減し、SUMO 化部位の変異導入により、この現象は阻害された。

以上の結果より、ataxin-7 は SUMO1 および SUMO2 の結合を受け、変異 ataxin-7 の SUMO 化は変異蛋白の異常凝集を低減することが新たにわかった。SUMO 化によって変異ポリグルタミン蛋白の凝集性が変化することはについては、これまでに報告がない。ポリグルタミン病においては、異常な凝集性をもつ難溶性の変異蛋白が細胞内に蓄積することが病態に関連すると考えられている。SUMO 化の促進によって、変異蛋白の凝集性を低減できることを示したこれらの成果は、SCA7 を含めたポリグルタミン病の新たな治療戦略の開発につながる可能性のある成果として重要である。

② APLP2 の C 末端部切断と SCA7 の病態との関連

SCA7 の原因蛋白である ataxin-7 に結合し、病態に関連する蛋白として新規に Amyloid precursor like protein 2 (APLP2) を同定した。APLP2 はアルツハイマー病の発症に関与する Amyloid precursor protein (APP) のファミリー蛋白である。アルツハイマー病では APP から蛋白切断酵素である一群の secretase によって β amyloid が切り出され、老人斑に沈着する。最近の研究により、APP および APLP1、APLP2 は C 末端側で caspase-3 による切断を受け、切断された C 末端フラグメント (Intracellular C terminal domain: ICD) が核内に輸送され神経障害を惹起することが報告されている。

検討の結果、APLP2 は、正常 ataxin-7 に比して、疾患の発症に関連するポリグルタミン鎖の伸長を伴う変異 ataxin-7 とより強く結合した。このことから APLP2 と変異 ataxin-7 の結合が SCA7 の病態に関連する可能性が示唆された。SCA7 の剖検脳、モデルマウス、モデル細胞を検索したところ、APLP2 由来の ICD が核内に輸送され、caspase-3 によって切断された APLP2 の N 末端側が SCA7 で観察される核内封入体に取り込まれていた。更に、SCA7 モデル細胞を用いて、APLP2 由来 ICD を細胞内に強制発現したところ、細胞障害が惹起されることを見いだした。

以上の結果より、SCA7 では変異 ataxin-7

が APLP2 と結合、APLP2 の caspase-3 による切断が生じ、切り出された ICD が核内移行することが、病態に関連している可能性が示された。APLP2 の caspase-3 による切断はアルツハイマー病で亢進、それに伴う遺伝子発現の異常が神経変性に関連することが報告されていることから、SCA7 とアルツハイマー病の発症、進行に関わる機序が部分的に共通している可能性がある。

今回の研究の成果により、SCA7 の病態発症に APLP2 を介した機序が関連していることを初めて見いだした。アルツハイマー病の病態と SCA7 の病態に関連性があること示したこれらの成果は、ポリグルタミン病とアルツハイマー病の両疾患の病態機序ならびに治療法を考えていく上で意義のある成果である。

(3) 発現アレイ解析による SCA7 の病態に関連する因子の網羅的検索

SCA7 の細胞モデルとして、テトラサイクリン制御システムを利用した PC12 細胞系を用いた。細胞を NGF 存在下に分化誘導し、その後導入された変異 ataxin-7 の発現を開始した。変異 ataxin-7 の発現を誘導した細胞と、誘導しない細胞とを比較した発現アレイ解析を行った。

用いた方法では、変異 ataxin-7 の発現誘導に伴う遺伝子発現の変化を同一クローンで比較できる。検索した約 45,000 の遺伝子において複数のハウスキーピング遺伝子の発現の変動は殆どなかった。変異 ataxin-7 の発現誘導に伴って、約 600 の遺伝子の発現が亢進し、約 300 の遺伝子の発現が抑制された。発現が抑制された遺伝子の中には、網膜視細胞に特異的に発現、視細胞の機能に関与する遺伝子が含まれており、SCA7 の網膜変性の病態に関与している可能性が示唆された。

SCA7 では網膜変性を合併することが特徴で、網膜変性の進行を抑止することは、患者の機能予後を考える上で重要である。これらの成果は、SCA7 の網膜変性過程に着目し、その発症、進行を抑えることを目的とする今後

の発展的な研究に寄与するものである。

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)

[学会発表] (計 5 件)

1) 藤ヶ崎純子、高田耕司. プロテアソーム阻害により神経系細胞に形成される Ubiquitin-SUMO 陽性構造物と核内ドメインとの関連. 第 49 回日本神経病理学会総会 2008 年 5 月 東京

2) 藤ヶ崎純子、藤ヶ崎浩人、Anne-Sophie Lebre、Tilo Breidert、Alexis Brice、Jaques H Camonis、Charles Duyckaerts. 脊髄小脳失調症 7 型におけるアミロイド前駆体ファミリー蛋白の細胞内分布.

第 48 回日本神経病理学会総会 2007 年 5 月 東京

3) 藤ヶ崎純子. 脊髄小脳失調症 7 型細胞モデルに形成される細胞質内封入体. 第 96 回日本病理学会総会 2007 年 3 月 大阪

4) 藤ヶ崎純子、藤ヶ崎浩人、Alexis Brice、Charles Duyckaerts. 脊髄小脳変性症 7 型の核内封入体と SUMO、PML との関係. 第 95 回日本病理学会総会 2006 年 5 月 東京

5) 藤ヶ崎純子、柳下三郎、岩淵潔、藤ヶ崎浩人、高田耕司. プロテアソーム阻害により神経系細胞に形成されるユビキチンおよび SUMO 陽性核内封入体の解析. 第 47 回日本神経病理学会総会 2006 年 5 月 岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤ヶ崎 純子 (FUJIGASAKI JUNKO)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：60312021