

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590297

研究課題名（和文） $\alpha$ シヌクレインやタウの細胞内凝集体形成モデルの構築とその応用

研究課題名（英文）

A cellular model for intracellular aggregates of alpha-synuclein and tau

研究代表者

野中 隆 (NONAKA TAKASHI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・主席研究員

研究者番号：30356258

研究成果の概要：

実験室レベルで使用可能な培養細胞を用いて、実際の患者脳に存在するレビー小体の性質とほぼ同じで、かつ再現性のよい細胞内 $\alpha$ シヌクレイン蓄積モデル細胞を確立した。この細胞モデルで出現する異常構造物は、リン酸化およびユビキチン化 $\alpha$ シヌクレインから成り、細胞内において高度に不溶化しており、レビー小体とほぼ同様な性質を有していた。この $\alpha$ シヌクレイン蓄積細胞は、顕著な細胞死を引き起こした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子細胞生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード： $\alpha$ シヌクレイン，細胞内蓄積，パーキンソン病，ユビキチン，リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患では、病理学的特徴として様々なタンパク質性の細胞内凝集体が特定の神経細胞に沈着することが知られている。またユビキチン-プロテアソームシステムに代表される細胞内タンパク質分解と凝集体形成は密接に関連していることが明らかにされつつある。この細胞内凝集体が神経細胞死を引き起こし、最終的に発症に至ると考えられているが、どのように特定のタンパク質の蓄積が開始され、それがどのようなメカニズムで細胞死を誘導するのかについては明らかにされていない。 $\alpha$ シヌクレインを細胞内で凝集させる系についての報告はいくつか存

在するが、それらは再現性に乏しく、また非生理的条件を必要とするため、患者脳の凝集体とは全く異なったものである場合が多い。

## 2. 研究の目的

患者脳に蓄積した $\alpha$ シヌクレイン封入体と同じ性質の凝集体を培養細胞に再現し、その機構を解明すると共に、この生成を抑制する化合物などのスクリーニングを行い、治療に結びつける。本研究で得られる細胞内凝集体の構成成分をプロテオミクス解析により詳細にかつ網羅的に解析することにより、凝集体形成に必須な新たな構成タンパク質の同定およびその形成過程やメカニズムの解明が期待できる。さらに、そのようなタンパク

質と結合する分子の同定やそれら複合体の発現調節などにより、細胞内凝集体の形成を抑制することが可能となれば、これらのタンパク質が創薬のターゲットとなりうる事が予想される。またこの細胞内凝集体による細胞毒性の有無についても詳細に検討し、凝集体による細胞毒性のメカニズムを明らかにしていく。細胞内凝集体に細胞毒性があるかどうかについては様々な報告が存在しており、細胞内に形成された凝集体自身が細胞死の原因になりうるという報告もあれば、凝集体は単なる結果でありその前段階のオリゴマーやプロトフィブリルが毒性を發揮しているという報告もあり、統一的な見解が得られていないのが現状である。この細胞内タンパク質蓄積モデルを利用し、これらの細胞が細胞死を引き起こすかどうか、もし細胞死が起きるのならそのメカニズムの解明や細胞死を抑制する薬剤のスクリーニングなどを行い、新たな作用機序の神経変性疾患治療薬の開発を目指したい。

### 3. 研究の方法

$\alpha$ シヌクレイン線維あるいはタウ線維を直接導入できることを見出した(特願2005-352486)。しかし反応条件などはまだ至適ではないのでさらに条件検討を行う。また予め $\alpha$ シヌクレイン発現プラスミドを一過性に発現させた細胞に $\alpha$ シヌクレイン線維を導入すると、レビー小体様の構造物が細胞内に形成されることも予備的ではあるが見出している。この細胞内凝集体形成の過程を、 $\beta$ シート構造を認識する蛍光試薬(チオフラビンなど)による染色や各種抗体を用いた蛍光免疫組織化学的手法により観察する。共焦点レーザー顕微鏡だけでなく、電子顕微鏡なども用いて培養細胞内の凝集体の構造を微細に観察し、患者脳で認められるレビー小体の構造と比較検討する。応募者は、免疫電子顕微鏡的手法についてはあまり詳しくないが、応募者が所属する研究所の基盤技術研究センターの方々にご協力いただき進めていきたいと考えている。

またこのような凝集体を形成する細胞を生化学的およびタンパク質化学的に解析し、その形成機構の解明に迫る。すなわち、発現プラスミドおよび線維を導入した細胞のライセートを調製し、種々の界面活性剤で順次可溶化を行い、可溶性画分および最終的に得られる界面活性剤不溶性画分を調製する。得られた各画分は、各種抗体によるイムノプロット解析を行い、その構成成分などについて調べる。また各画分をトリプシンやリジエンドペプチダーゼなどのプロテアーゼを用いてタンパク質を断片化したのち、マトリックス支援レーザー脱離イオン化・飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)あるいはキ

ャピラリーカラムを装備した高感度微量質量分析装置で解析し、各画分に含まれるタンパク質を網羅的に同定する。すなわち、細胞内凝集体(界面活性剤不溶性画分)のプロテオミクス解析を行い、凝集体を構成するタンパク質のリストを作成する。これまでに知られていない、凝集体形成に必須な新たなタンパク質などが発見できる可能性もあり、 $\alpha$ シヌクレインのみならず他の細胞内凝集体にまで応用できるような形成機構が解明できることが期待される。またこの解析で明らかにされると期待できるタンパク質群は、凝集体形成を阻害する上でターゲットとなることが考えられ、これらのタンパク質の発現を調節すること、すなわちRNA干渉による発現制御が凝集体形成の抑制、ひいては予防薬あるいは治療薬の開発につながる事が期待できる。

### 4. 研究成果

$\alpha$ シヌクレインの細胞内蓄積モデルについてはいくつか報告があるが、そのほとんどは実際の患者脳に見られるレビー小体とは性質が異なっており、またその作製に非生理条件を必要とするため再現性に乏しい。パーキンソン病などの発症メカニズムを明らかにする上で、いかにして細胞内で $\alpha$ シヌクレインが蓄積するのかを解明することは非常に重要であり、その知見は治療薬の開発にも有用である。今年度は、これまでの研究結果(特願2005-352486, PCT/JP2006/324786)をより改良し、実際の患者脳に存在するレビー小体の性質とほぼ同じで、かつ再現性のよい細胞内 $\alpha$ シヌクレイン蓄積モデル細胞を確立した。この細胞モデルで出現する異常構造物は、1) 抗リン酸化 $\alpha$ シヌクレイン抗体に陽性、2) 抗ユビキチン抗体に陽性、3) チオフラビンSに陽性、4) 電子顕微鏡観察により構造物中に $\alpha$ シヌクレインの線維が認められる、5) 構造物を生化学的に分画すると、界面活性剤不溶性画分にリン酸化 $\alpha$ シヌクレインが存在する、などレビー小体とほぼ同様な性質を有していた。また $\alpha$ シヌクレイン蓄積細胞は、蓄積開始後48~72時間経過すると顕著な細胞死を引き起こすことが判明した。カスパーゼ3活性測定、TUNEL染色、ポリADP-リボースポリメラーゼの切断アッセイなどの解析により、この細胞死はアポトーシスではないと示唆された。試験管内においてリコンビナント $\alpha$ シヌクレインの蓄積を阻害した低分子化合物を培地中に添加することにより、この細胞死は抑制された。これらの薬剤が新たな治療薬につながる可能性がある。

### 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)

〔雑誌論文〕 (計9件)

全て査読有り

1. Nonaka et al (他4名), Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. Hum. Mol. Genet. 2009, in press
2. kametani et al (他6名, 2番目), Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009, 382, 405-409
3. Masuda et al (他8名, 3番目) Inhibition of alpha-synuclein fibril assembly by small molecules: Analysis using epitope-specific antibodies. FEBS Lett. 2009, 583, 787-791
4. Yonetani et al (他6名, 2番目), Conversion of wild-type alpha-synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. J. Biol. Chem. 2009, 284, 7940-7950
5. Arai et al (他8名, 4番目), Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. Acta Neuropathol. 2009, 117, 125-136
6. Nonaka et al (他5名), Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTL-D-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. FEBS Lett. 2009, 583, 394-400
7. Inukai et al (他10名, 2番目) Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTL-D-U and ALS. FEBS Lett. 2008, 582, 2899-2904
8. Hasegawa et al (他13名, 3番目), Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. 2008, 64, 60-70
9. Nonaka et al (他9名), Casein kinase 2 is the major enzyme in brain that phosphorylates Ser129 of human alpha-synuclein: Implication for alpha-synucleinopathies. FEBS Lett, 2007, 581, 4711-4717.

〔学会発表〕 (計13件)

1. Nonaka et al (他5名), Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 inclusions are

recapitulated in SH-SY5Y cells. Society for Neuroscience Annual Meeting. 2008/11/17. Washington DC, USA

2. 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人 (2008) TDP-43 断片の発現による細胞内凝集体の形成. 第27回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/10]
3. 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, Beach T, 森田光哉, 中野今治, 織田辰郎, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2008) FTL-D、ALS に蓄積する異常 TDP-43 の解析. 第27回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/11]
4. 野中隆, 新井哲明, 秋山治彦, 長谷川成人 (2008) TDP-43 の細胞内封入体モデルの作製. 第27回日本認知症学会シンポジウム, 前橋 [2008/10/11]
5. 犬飼有紀, 野中隆, 新井哲明, 吉田眞理, 橋詰良夫, 秋山治彦, 久永眞市, 長谷川成人 (2008) TDP-43 における Ser409/410 の異常リン酸化. 第27回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/10]
6. 米谷元邦, 犬飼有紀, 野中隆, 久永眞市, 長谷川成人 (2008)  $\alpha$  シヌクレインの線維形成における A30P 凝集核の効果. 第27回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/10]
7. 新井哲明, 長谷川成人, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, Beach T, 森田光哉, 中野今治, 織田辰郎, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2008) TDP-43 の蓄積を中心とした神経病理. 第27回日本認知症学会, 前橋 [2008/10/11]
8. 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆, 亀谷富由樹, 吉田眞理, 橋詰良夫, Thomas Beach, 森田光哉, 中野今治, 織田辰郎, 土谷邦秋, 秋山治彦 (2008) FTL-D、ALS に蓄積する異常 TDP-43 の解析. 平成20年度特定領域研究「統合脳」夏のワークショップ, 合同班会議, 統合シンポジウム, 札幌 [2008/08/09]
9. 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 野中隆, 亀谷富由樹, 池田研二, 近藤ひろみ, 下村洋子, 羽賀千恵, 土谷邦秋, 吉田眞理, 橋詰良夫, 新里和弘, 大島健一, 森田光哉, 中野今治 (2008) 神経変性疾患におけるリン酸化 TDP-43 の蓄積. 第49回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京 [2008/05/20]
10. 新井哲明, 長谷川成人, 秋山治彦, 野中

隆, 亀谷富由樹, 池田研二, 近藤ひろみ, 下村洋子, 羽賀千恵, 土谷邦秋, 吉田眞理, 橋詰良夫, 新里和弘, 大島健一, 森田光哉, 中野今治 (2008) 患者脳に蓄積した TDP-43 のリン酸化部位に関する検討. 第 49 回日本神経病理学会総会学術研究会, 東京 [2008/05/20]

11. 新井哲明, 長谷川成人, 西原真杉, 野中隆 等 (2008) 遺伝子変異と FTD:Progranulin 遺伝子を含めて. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜 [2008/05/17]
12. 長谷川成人, 新井哲明, 野中隆 等 (2008) FTD における TDP-43 蓄積の意義. 第 49 回日本神経学会総会, 横浜 [2008/05/17]
13. Nonaka et al (他 3 名) ,Phosphorylated and ubiquitinated alpha-synuclein forms fibrillar inclusions in SH-SY5Y cells. Society for Neuroscience Annual Meeting. 2007. 11. 7, San Diego, USA

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

1. 特願 2008-101899. 野中 隆ら (他 4 名), TDP-43 蓄積細胞モデル. 権利者: 東京都医学研究機構, 出願日 2008 年 4 月 9 日, 国内
2. 特願 2008-095035, 糸川昌成ら (他 5 名, 4 番目), 遺伝子変異を用いた筋萎縮性側索硬化症の予測法. 権利者: 東京都医学研究機構, 出願日 2008 年 4 月 1 日, 国内
3. 特願 2007-178583. PCT/JP2008/062650, 長谷川成人ら (他 4 名, 3 番目) TDP-43 凝集物に特異的に結合する抗体. 権利者: 東京都医学研究機構, 出願日 2007 年 7 月 6 日, 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野中 隆 (NONAKA TAKASHI)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・主席研究員  
研究者番号: 30356258

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし