

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700332

研究課題名 (和文) β シヌクレインによる幹細胞の神経分化誘導機構の解析

研究課題名 (英文) Neuronal differentiation of stem cells by beta-synuclein

研究代表者

藤田 雅代 (FUJITA MASAYO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・主任研究員

研究者番号：90415539

研究成果の概要: シヌクレイン(syn)は神経組織に多く発現する生理機能未知のタンパクで、 α 、 β 、 γ の3種が存在する。本研究では、 β syn に着目し、生理機能および病態発症への関与を検討した。 β syn 過剰発現細胞は、cAMP の活性化を通し、神経分化誘導作用を持つ可能性が推察された。また β syn の変異型をマウスに過剰発現させると、神経軸索末端の異常および記憶や運動の障害を引き起こし、新しい神経変性疾患のモデルとなると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	390,000	2,890,000

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

1. 研究開始当初の背景

シヌクレイン (syn) タンパクは神経組織に豊富に存在するリン酸化タンパクで、 α 、 β 、 γ の3種が存在する。syn の生理機能は不明であるが、 α syn は、凝集しやすい性質をもち、パーキンソン病 (PD) やレビー小体型認知症 (DLB) など、シヌクレイノパチーと呼ばれる神経変性疾患において脳内に蓄積することが示され、病態発症に対する重要性が認識されるようになってきている。

これに対し、 β syn は、 α syn の凝集を抑え、神経保護的にはたらくことが示唆されているが、 α syn にくらべ知見は少ない。

(1) β syn と神経細胞分化に関して

研究代表者らは、本研究に先行し、syn の生理的機能について細胞増殖・分化の観点から検討してきた。増殖・分化を評価しやすい培養細胞モデルとして骨芽細胞様細胞株の一種である MG63 細胞を用い、 α syn を過剰発現させたところ、骨芽細胞への分化促進がみられたことから、 α syn は細胞の増殖抑制・分化誘導促進的にはたらくことを示唆した。一方、 β syn は、骨芽細胞への分化は認められなかったが、神経細胞のマーカー遺伝子の発現が、 α syn 過剰発現細胞やベクター発現細胞に比べ高い傾向が認められた。MG63 は、幹細胞から骨芽細胞前駆細胞へ分化するごく初期の分化段階の細胞と考えられており、適

切な刺激により他の細胞系譜へ分化しうる能力を保持していると考えられる。したがって、 β syn は未分化な状態の細胞を神経に分化誘導促進的にはたらくのではないかと推察された。

(2) 変異型 β syn の報告

β syn に関して、2004年に家族性および孤発性 DLB より2種類の変異(V70M, P123H)が報告された。これらの変異が直接 DLB 発症の要因となるかは明らかではないが、in vitro の検討から、変異型 β syn のリコンビナントタンパクは野生型 β syn にくらべ凝集能が亢進することおよび、細胞に過剰発現させると封入体が形成されることが先行研究から見出された。したがって、変異によって β syn は野生型と異なった病的な性質を獲得すると推察された。

2. 研究の目的

本研究では、 β syn に焦点を当て、生理機能や病態への関与を解明することを目的として研究を行うこととした。具体的には、以下の2点である。

(1) β syn による神経分化誘導機構の解析

β syn の生理的役割の一端の解明を目指し、神経分化促進作用に着目して検討を行う。

(2) 変異型 β syn 過剰発現マウスの解析

野生型 β syn の神経保護作用と対比して病的な場合の β syn 作用を解析する。本研究では、生体内での作用に着目して解析を行う。 β syn の変異がどのようにして病態発症に関与するか、検討し、新しいモデルマウスとして確立する。さらに、このマウスの神経分化の異常の有無を解析する。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞様細胞株 MG63 に β syn を恒常的に発現させた細胞株に dbcAMP を添加し、 α syn 発現細胞株およびベクター発現細胞株にくらべ神経細胞マーカーの発現量の差異および形態変化より神経細胞への分化を解析した。

(2) 神経系に広範に遺伝子発現を誘導する Thy1 プロモーターを用い変異型 β syn(P123H)を過剰発現させたトランスジェニック(Tg)マウスを作製し、経時的に脳を採取、半球ずつに分け、片方を組織学的解析、もう一方を生化学的解析に用いた。マウスの行動解析は、ロタロッドテスト、ホームケージテスト、モリス水迷路によって行った。

4. 研究成果

(1) β syn による神経細胞分化の解析

①分化に対する cAMP の関与

cAMP 添加により、 β syn 過剰発現 MG63 は神経細胞類似の形態変化を引き起こし、神経細胞マーカーの発現 (MAP2、ニューロフ

イラメント、ニューロン特異的エノラーゼ) が認められた。また、cAMP 添加により CREB のリン酸化の亢進が認められ、CRE を介した転写の亢進が神経への分化に関与することが示唆された。また、 β syn 過剰発現 MG63 は、定常状態において細胞内の cAMP 濃度が高い傾向があることが見出された。

②まとめと今後の展望

上記の結果より、 β syn の発現によりアデニル酸シクラーゼによる cAMP の合成が促進されているか、あるいはホスホジエステラーゼによる cAMP の分解が抑制されている可能性が示唆される。 β syn は、これらの酵素活性に影響し、細胞に作用を及ぼしている機序が考えられ、今後検討を行う予定である。

(2) 変異型 β syn(P123H)Tg マウスの解析

①軸索病変の出現

Tg マウスの線条体・淡蒼球において β syn(P123H)および α syn ともに陽性を示す封入体が認められた。電顕観察により、この封入体は、小胞状のものや ER 様構造物が蓄積した軸索末端のスフェロイド (globule) であると考えられた。スフェロイドは、半年齢を超えたあたりから表れ始め、加齢にともないその数は増加した。

このスフェロイドは、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) および、GABA 陽性で、スフェロイドの出現部位から線条体から淡蒼球へ投射する (もしくは淡蒼球から線条体へ投射する) GABA 神経であると推察された。

②グリオシスの出現

脳組織の GFAP 染色を行ったところ、6ヶ月齢以降より、海馬や皮質、線条体において活性化アストロサイトが検出され、アストログリオシスの状態を呈していることがしめされた。活性化アストロサイトは加齢に伴い増加し、GFAP タンパクの発現量も多くなる傾向が認められた。

③運動能力および記憶力の低下

高齢の Tg マウスでは平衡運動能力に障害をきたすことが見出された。6ヶ月齢の若齢では、平衡運動能力は正常であったが、著しい自発運動量の低下および、記憶力の低下が認められた。

④まとめと今後の展望

今回の変異型 β syn(P123H) 過剰発現 Tg マウスでは、淡蒼球や線条体での病態が認められた。PD や DLB では、黒質から線条体へ投射するドーパミン神経が変性・脱落することでドーパミンが減少し、線条体機能が影響をうけるが、PD 患者の線条体に神経軸索肥大の所見が報告されるなど、線条体自体の病変も存在することが示されている。したがって、変異型 β syn(P123H) 過剰発現によって、PD や DLB で影響を受ける第二の部位において軸索主体の病変に関与することが示唆された。現在、脳のその他の部位での病変の有無について

も検討を行い、ヒトでの神経変性疾患との類似点、相違点を解析している。また、神経分化に対する影響があるか、野生型 β syn 過剰発現 Tg マウスと比較して発生の時期や成体における神経新生に関して検討中である。

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)

[雑誌論文] (計 14 件)

①Wei J, Fujita M, Nakai M, Waragai M, Sekigawa A, Sugama S, Takenouchi T, Masliah E, Hashimoto M. Protective role of endogenous gangliosides for lysosomal pathology in a cellular model of synucleinopathies. *Am. J. Pathol.* (査読有) 175, 1891-1909, 2009

②Sugama S Takenouchi T, Kitani H, Fujita, M, Hashimoto M, Microglial activation is inhibited by corticosterone in dopaminergic neurodegeneration *J Neuroimmunol.* (査読有) 208, 104-114, 2009

③Takenouchi T, Nakai M, Iwamaru Y, Sugama S, Tsukimoto, M, Fujita M, Wei J, Sekigawa A, Sato M, Kojima, S, Kitani H, Hashimoto M. The Activation of P2X7 Receptor Impairs Lysosomal Functions and Stimulates the Release of Autophagolysosomes in Microglial Cells *J Immunol.* (査読有) 182, 2051-2062, 2009

④Sugama, S Takenouchi T, Fujita M, Conti, B Hashimoto M. Differential microglia and neuronal activation between acute stress and lipopolysaccharide treatment *J Neuroimmunol.* (査読有) 207, 24-31, 2009

⑤Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P. Mitochondrial association of alpha-synuclein causes oxidative stress. *Cell Mol Life Sci.* (査読有) 2008, 65, 1272-84.

⑥藤田雅代、橋本款、シヌクレイノパチー、モダンフィジシャン 28 1808-1811, 2008 (査読無)

⑦藤田雅代、橋本款、 β シヌクレインの変異による神経変性促進の可能性、医学のあゆみ 224 303-304, 2008 (査読無)

⑧Sugama, S., Takenouchi, T., Kitani, H., Fujita, M., Hashimoto, M., Activin as an anti-inflammatory cytokine produced by microglia., *J Neuroimmunol*, (査読有)192(1-2), (2007), 31-39

⑨Waragai, M., Nakai, M., Wei, J., Fujita, M., Mizuno, H., Ho, G., Masliah, E., Akatsu, H., Yokochi, F., Hashimoto, M., Plasma levels of DJ-1 as a possible marker for progression of sporadic Parkinson's

disease., *Neurosci Lett*, (査読有)425(1), (2007), 18-22

⑩Wei, J., Fujita, M., Nakai, M., Waragai, M., Watabe, K., Akatsu, H., Rockenstein, E., Masliah, E., Hashimoto, M., Enhanced lysosomal pathology caused by beta-synuclein mutants linked to dementia with lewy bodies., *J Biol Chem.*, (査読有) 282, 28904-28914, 2007

⑪Sugama, S., Fujita, M., Hashimoto, M., Conti, B., Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: Involvement of interleukin-18., *Neuroscience.*, (査読有) 146, 1388-1399, 2007

⑫Nakai, M., Fujita, M., Waragai, M., Sugama, S., Wei, J., Akatsu, H., Ohtaka-Maruyama, C., Okado, H., Hashimoto, M., Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage., *Biochem Biophys Res Commun.*, (査読有) 358, 104-110, 2007

⑬Takenouchi, T., Iwamaru, Y., Imamura, M., Kato, N., Sugama, S., Fujita, M., Hashimoto, M., Sato, M., Okada, H., Yokoyama, T., Mohri, S., Kitani, H., Prion infection correlates with hypersensitivity of P2X7 nucleotide receptor in a mouse microglial cell line., *FEBS Lett.*, (査読有) 581, 3019-3026, 2007

⑭ Fujita, M., Sugama, S., Nakai, M., Takenouchi, T., Wei, J., Urano, T., Inoue, S., Hashimoto, M., alpha-Synuclein Stimulates Differentiation of Osteosarcoma Cells: RELEVANCE TO DOWN-REGULATION OF PROTEASOME ACTIVITY., *J Biol Chem*, (査読有) 282, 5736-5748, 2007

[学会発表] (計 11 件)

①藤田雅代、関川明生、魏建設、藁谷正明、津久井通、井上聡、橋本款、 β シヌクレイン (P123H)過剰発現型新規トランスジェニックマウスの解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会合同大会、神戸、2008-12-10

②Hashimoto M, Fujita M, Nakai, M, Sekigawa A, A novel mouse model of Lewy body disease, 第 17 回パーキンソン病治療学会、東京 (ノバルティスファーマ主催). 2008-9-27

③Wei J, Nakai M, Fujita M, Hashimoto M, Protective role of glycosingolipids for lysosomal pathology in synucleinopathies, Neuro2008(第 31 回日本神経科学大会), 東京, 2008-07-10

④藤田雅代、中井雅晶、魏建設、藁谷正明、津久井通、井上聡、橋本款、 β シヌクレイン (P123H)過剰発現型トランスジェニックマウ

スの解析、第 49 回日本神経病理学会、東京
2008-5-20

⑤中井雅晶、藤田雅代、魏建設、藁谷正明、
井上聡、津久井通、橋本款、ヒト変異型 β シ
ヌクレイン (P123H β -syn) 発現トランスジェ
ニックマウスにおける phenotype の解析、第
144 回日本獣医学会、麻布大学、神奈川、
2007-3-30

⑥Wei, J., Fujita, M., Nakai, M., Waragai, M.,
Hashimoto, M. Enhanced lysosomal pathology
caused by beta-synuclein mutants linked to
dementia with Lewy bodies、第 30 回日本分子
生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合
同大会、横浜、2007-12-14

⑦藤田雅代、魏建設、中井雅晶、藁谷正明、
橋本款、シヌクレインパチーと癌に対する
シヌクレイン蛋白の多彩な病理的作用、第 30
回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生
化学会合同大会、横浜、2007-12-11

⑧Hashimoto, M., Wei, J., Fujita, M., Nakai, M.,
Ho, G., Rockenstein, E., Masliah, E. Enhanced
lysosomal pathology caused by beta-synuclein
mutants linked to dementia with Lewy body.
Annual meeting of Society for Neuroscience, San
Diego 2007-11-5

⑨橋本款、魏建設、中井雅晶、藤田雅代、変
異型 β シヌクレインによる神経変性機序の
解析、Neuro2007(第 30 回日本神経科学大会
第 50 回日本神経化学大会第 17 回日本神経回
路学会大会合同大会)、横浜、2007-09-11

⑩藤田雅代、中井雅晶、魏建設、藁谷正明、
津久井通、井上聡、橋本款、 β シヌクレイン
(P123H) 過剰発現型トランスジェニックマウ
スの解析、第 48 回日本神経病理学会、東京
2007-5-30

⑪中井雅晶、藁谷正明、藤田雅代、魏建設、
洲鎌秀永、赤津裕康、丸山千秋、岡戸晴生、
橋本款、赤芽球および赤血球における α シ
ヌクレインの発現、第 143 回日本獣医学会、茨
城県つくば市、2007-4-3

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田雅代 (FUJITA MASAYO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科
学総合研究所・主任研究員

研究者番号：90415539