

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790602

研究課題名 (和文) ポリグルタミン鎖ダイマー形成が及ぼす神経変性機序の解明

研究課題名 (英文) Study on the toxicity initiated by polyglutamine oligomers

研究代表者

高橋 俊昭 (TAKAHASHI TOSHIAKI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：70377191

研究成果の概要：ポリグルタミン病において、近年、封入体形成は細胞死に対し抑制的に働くと唱えられ、細胞傷害性のある構造の同定が望まれている。本研究では FRET (fluorescence resonance energy transfer) 技術を応用して封入体形成に先行するポリグルタミン鎖オリゴマーを可視化し、ポリグルタミン鎖が、長さ依存性に方向性をもってオリゴマー形成することを明らかとした。

ポリグルタミン鎖を安定発現する SH-SY5Y 細胞株を神経分化誘導後に FRET 陽性細胞群、FRET 陰性細胞群、封入体形成群間の細胞生存期間解析をおこない、FRET 陽性細胞群において強い神経細胞死を認めた。これにより、ポリグルタミン鎖は、自己重合したオリゴマー状態で強い細胞毒性を獲得することを証明した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 2,000,000 | 0 | 2,000,000 |
| 2008 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 360,000 | 3,560,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学，神経内科学

キーワード：ポリグルタミン病、ダイマー、オリゴマー、封入体、FRET、神経変性

1. 研究開始当初の背景

ポリグルタミン病は、現在まで常染色体優性遺伝性疾患である Huntington 病(HD)、歯状核赤核ルイ体萎縮症 (DRPLA)、spinocerebellar ataxia type 1(SCA1)、SCA2、Machado-Joseph 病(MJD/SCA3)、SCA6、SCA7、SCA17、球脊髄性筋萎縮症(SBMA) の9疾患が知られている。共通した病態として、病因遺伝子翻訳領域のグルタミン配列の異常伸長により翻訳された伸長ポリグルタミン鎖が神経変性を引き起こすことが示さ

れてきた。ポリグルタミン鎖の伸長は疾病と密接に関係し、発病の閾値を規定し、細胞傷害性を獲得すると考えられるが、この異常伸長がどのような機序を経て傷害性を獲得し神経変性を惹起するかについては未解明である。グルタミン反復領域以外の翻訳領域には相同性を認めないことから、伸長ポリグルタミン自体が、病態の中心と考えられる。近年では、病理学的な特徴である封入体形成は細胞死に対し抑制的に働く検証が蓄積されつつある。このため、封入体形成前の細胞傷

害性のある構造の同定が望まれている。ポリグルタミン鎖の伸長に伴って傷害性を獲得する構造の同定とその改善を目的とする研究は、獲得された傷害性により生じる種々の細胞機能異常の改善を同時にもたらずのではないかと考えられる。同時に9つの疾患に共通する治療効果が期待される。

2. 研究の目的

本研究は、肉眼的封入体形成前の微小重合(ダイマー、オリゴマー)段階のポリグルタミン鎖が細胞傷害を引き起こすという仮説を挙げ、生細胞モデルを用いて微小重合ポリグルタミン鎖が及ぼす神経細胞傷害の解明を目指すものである。

(1)微小凝集ポリグルタミン鎖(オリゴマー)の形成とポリグルタミン伸長との関連性を示し、オリゴマー形成が細胞傷害性に影響を及ぼすか否かを明らかにする。

(2)オリゴマー形成を制御する薬剤を選定することで、本研究成果を今後の治療開発へつなげる成果を目指す。

上記の2点を主要な課題とした。

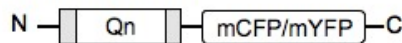
3. 研究の方法

(2007年度)

ポリグルタミン鎖(部分 DRPLA 蛋白およびハンチンチン exon1)に mCFP(donor), mYFP(acceptor)を付加したプラスミドを作成し培養細胞(COS7)に一過性導入した。

図1 プラスミド作成

trD-Qn-mCFP/mYFP



mCFP/mYFP-trD-Qn



Htt^{ex1}-Qn-mCFP/mYFP



共焦点レーザー顕微鏡(CSU10)を用い、FRET(fluorescence resonance energy transfer)解析を行った。部分 DRPLA 蛋白内のポリグルタミン鎖長と FRET 陽性となる頻度、細胞内の FRET ratio 値との関連性を検討した。

さらにポリグルタミン鎖を安定発現する SH-SY5Y 細胞株を確立した。この安定発現細胞株をレチノイン酸、BDNF 添加により神経細胞に分化誘導後、FRET 観察により FRET 陽性細胞群(オリゴマー形成)、FRET 陰性細胞群(オリゴマー非形成)、封入体形成群の3群に区別し、個々の細胞に座標を割り振り、7日間の細胞生存解析を行った。

(2008年度)

(1)細胞内 Ca²⁺濃度変調に及ぼす影響; ポリ

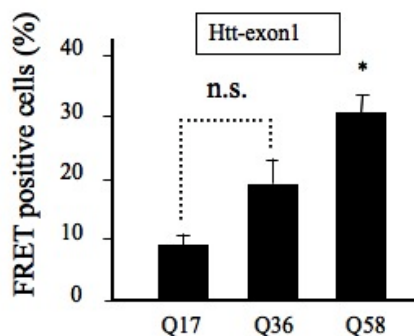
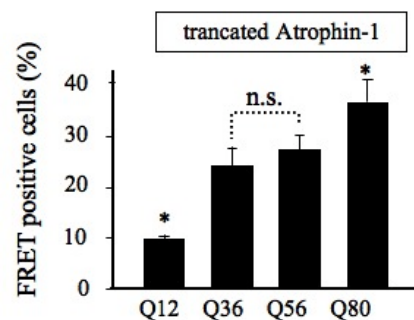
グルタミン鎖発現細胞(COS7)を FRET microscopy によりオリゴマー形成細胞と非形成細胞を判別し、細胞膜透過型蛍光指示薬: fluo-4 AM(Molecular Probes)を細胞外添加(終濃度 5 μM)し、30 分間 37°C 下で incubation した。添加前後の蛍光強度比 ΔF/F (excitation 488nm, emission 515~555nm)を測定し、オリゴマー形成細胞、オリゴマー非形成細胞、ポリグルタミン鎖非発現細胞とで細胞内 Ca²⁺level を比較検討した。

(2)ポリグルタミン鎖オリゴマー形成を抑制する化合物の評価・選定: FRET microscopy により生細胞下でオリゴマー形成を可視化しつつ、既報化合物や新規候補化合物を細胞外添加し、オリゴマー形成の阻害効果を評価した。

4. 研究成果

(2007年度) (1)ポリグルタミン鎖は、一定の方向性をもって蛋白間相互作用を示し、グルタミン伸長数依存性に FRET 陽性細胞の出現頻度が増加した(trD-Q12; 9.5±0.9%, trD-Q36; 23.4±3.3%, trD-Q56; 27.5±2.2%, trD-Q80; 36.9±4.9%, Htt-Q17; 10.5±1.2%, Htt-Q36; 19.1±4.3%, Htt-Q58; 29.6±3.3%, mean +SEM)。また細胞内の FRET ratio 値もグルタミン伸長数依存性に増加する傾向を認めた(trD-Q12; 0.27±0.02, trD-Q36; 0.32±0.03, trD-Q58; 0.36±0.02, trD-Q80; 0.37±0.02, Httex1-Q17; 0.28±0.02, Httex1-Q36; 0.31±0.01, Httex1-Q56; 0.32±0.02, mean +SEM)。

図3 FRET 陽性率とポリグルタミン伸長

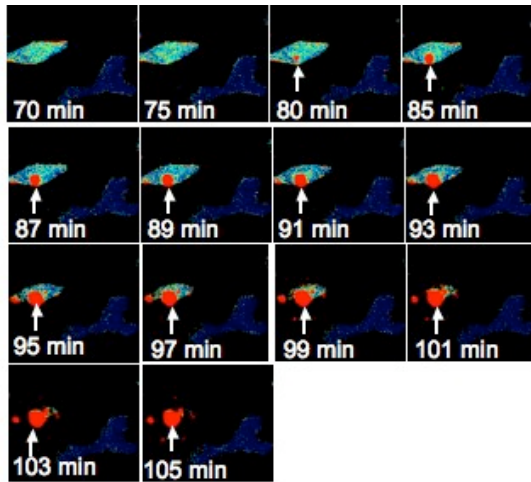


すなわちグルタミン伸長数が増大するほど

オリゴマー形成をきたしやすい傾向が示された。

(2) FRET 陽性細胞の経時的観察では、封入体が形成されると、封入体の FRET 値が急速に増大するとともに、細胞質の FRET 値およびポリグルタミン鎖 C 末に付加した蛍光蛋白の蛍光値は急速に低下した。

図 4 FRET 陽性細胞の経時観察 (Htt-Q58, COS7)

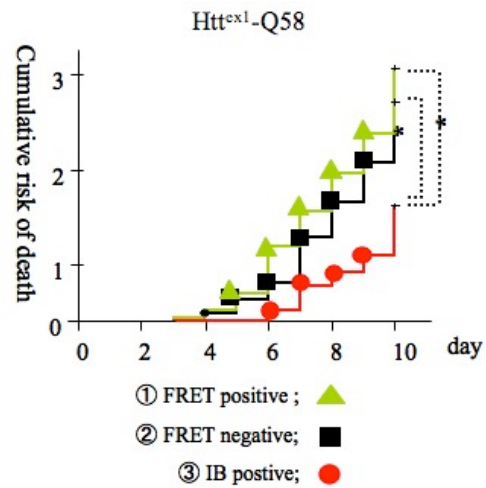
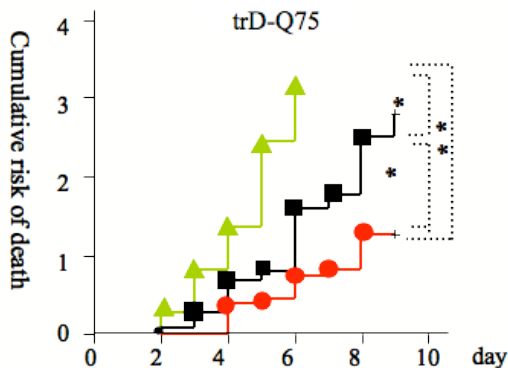


これらから、封入体には細胞質の可溶性状態のポリグルタミンオリゴマーを取り込む機能が示唆された。

(3) ポリグルタミン鎖安定発現 SH-SY5Y 細胞での生存期間解析; FRET 陽性細胞、FRET 陰性細胞、封入体形成細胞の 3 群で平均生存日数は 3.0 日、4.0 日、6.0 日であった。ポリグルタミンオリゴマーが形成されている FRET 陽性細胞群では生存期間が有意に短縮し、すでに封入体を形成した細胞群では生存期間が延長していた ($p < 0.0001$)。

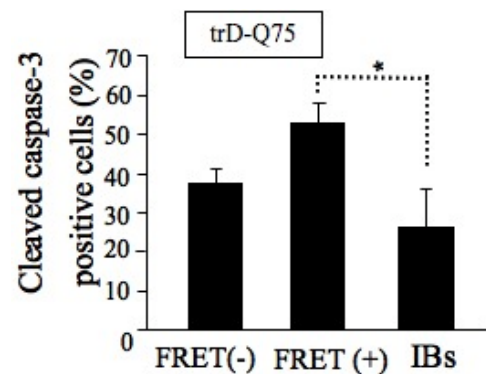
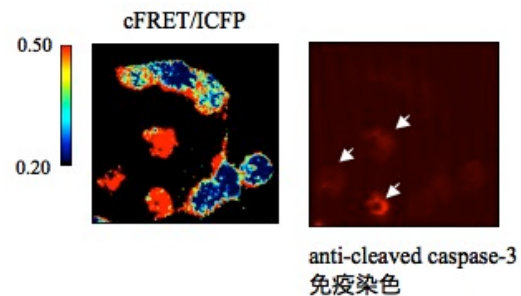
図 5 生存期間解析

(trD75, Htt-Q58; 細胞死に関する累積危険度)



免疫染色による活性化 Caspase-3 の陽性率も、FRET 陽性細胞群では封入体形成群に比べ有意に増加していた。

図 6 FRET 陽性細胞と活性化 Caspase-3 の関連性



これらの事実から、ポリグルタミン鎖は発現後、自己重合によるオリゴマー形成を経て、強い細胞傷害性を獲得するといえた。

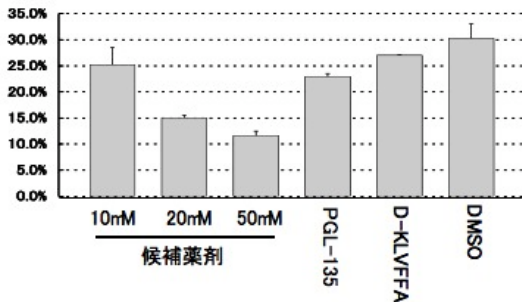
(2008 年度)

(1) ポリグルタミン鎖 (Q80) のオリゴマー形成細胞群、非形成細胞群、ポリグルタミン鎖非発現細胞群間において、細胞内 Ca^{2+} 濃度には有意な変化を認めなかった。

(2) アミロイド β 形成阻害効果が報告されている化合物 D-KLVFFA や ibuprofen はポリグルタミン鎖のオリゴマー形成には影響を及ぼさず、PGL-135 では若干の FRET 抑制効果を認めた (FRET 陽性率: PGL-135 23%, 対照 30%)。これらに対し、FRET system を用いた新規選

定により、新たなオリゴマー形成を有効に阻害する薬剤を同定し得た(未発表)。この薬剤は濃度依存性に FRET 陽性細胞率の減少(10nM;25%, 20nM;15%, 50nM;12%, 対照 30%)が確認され、オリゴマー形成に対する強い抑制効果が確認された。

図7 各薬剤と FRET 陽性率の関連



【考察】

ポリグルタミンオリゴマーを含有する細胞(FRET 陽性細胞)は、細胞死のリスクが高いことを示した。また封入体形成は毒性の高いオリゴマー構造物を取り込み、細胞傷害性に対し防御的に働くことが示唆された。オリゴマー形成はグルタミン伸長数依存性に増加する性質を有し、ポリグルタミン病の病態機序の基盤となる重要な細胞傷害因子と考えられた。

さらに研究後期では、新たなオリゴマー形成を抑制する薬剤を選定しえた。今後は、この薬剤の効果について、細胞死抑制、動物モデル(DRPLA transgenic mice)への投与による表現型や生存期間、中枢神経病理所見の改善などの検討に発展させていく予定である。

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1件)

1) Takahashi T, Kikuchi S, Katada S, Nagai Y, Nishizawa M, Onodera O.; Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. Hum Mol Genet. 査読有り 17(3), 2008. p345-356

[学会発表] (計2件)

1) 高橋俊昭: Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. The American Society for Cell Biology 48th meeting, 2008年12月14日 アメリカ合衆国サンフランシスコ

2) 高橋俊昭: 可溶性ポリグルタミンオリゴマーは細胞毒性を惹起する。Neuro2007 (合同学会; 日本神経科学大会、日本神経化学会

大会、日本神経回路学会大会) 2007年9月11日、横浜市

[図書] (計1件)

1) T Takahashi, S Kikuchi, O Onodera: 出版社 RESEARCH SIGNPOST, 書名 Research Advances in Spinocerebellar Degeneration and Spastic Paraplegia 2008 [Polyglutamine disease: Therapeutic strategy depends on cytotoxic structure and dysfunction.] 2008年発行, 18ページ (p155-172)

[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

http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~neuroweb/laboratory/research_basic_001.html

にて研究内容の一部を紹介。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 俊昭 (TAKAHASHI TOSHIKI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 70377191

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: