

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06445

研究課題名(和文) 自然免疫による神経変性の増悪化メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of exacerbation of neurodegeneration by innate immunity

研究代表者

後藤 聡 (Goto, Satoshi)

立教大学・理学部・教授

研究者番号：60280575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生物には様々な病原体から身を守るため自然免疫という生体防御反応が備わっている。近年、自然免疫は感染時以外にも神経変性疾患においても活性化することがわかってきたが、自然免疫の活性化が神経変性の進行に関与しているかはよくわかっていない。私達は、神経変性疾患モデルハエを用いて、自然免疫活性化時に誘導される分子が神経変性に促進的に働くことを明らかにし、その分子をD-knifと名付けた。本研究では哺乳動物でも同様の現象がみられるか、ヒトの神経細胞にヒトのD-knif familyが与える影響について検討を行い、ヒトでもD-knif familyの分子が神経変性を促進する働きがあることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

すべての多細胞生物に備わる自然免疫システムは生体防御を実行する。しかし、神経変性の過程においても自然免疫が活性化する。私達はショウジョウバエを用い、その自然免疫の活性化は神経変性を増悪化することを見出した。さらに、それがショウジョウバエに留まらず哺乳動物でも保存されているかを検討し、培養細胞レベルで保存されていることを見出した。本研究の成果は、ヒトにおける神経変性疾患の理解に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Living organisms have an innate defense response called innate immunity to protect themselves from various pathogens. Recently, it has been shown that innate immunity is activated not only during infection but also in neurodegenerative diseases, but it is not well understood whether the activation of innate immunity is involved in the progression of neurodegeneration. Using a fly model of neurodegenerative disease, we have shown that a molecule induced during innate immune activation acts in a pro-neurodegenerative manner, and we have named this molecule D-knif. In this study, we investigated whether the same phenomenon is observed in mammals and the effect of the human D-knif family on human neurons, and were able to show that the D-knif family molecules also act to promote neurodegeneration in humans.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経変性

1. 研究開始当初の背景

生物には様々な病原体から身を守るため自然免疫という生体防御反応が備わっている。通常自然免疫は感染時にのみ素早く活性化するが、最近では感染時以外にも活性化することが知られている。例えば神経変性疾患においても活性化することがわかってきた。神経変性疾患とは、中枢神経系の特定の細胞群の神経死や機能不全が起こる病気である。代表的なものとしてアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、ALSなどが知られている。現在神経変性疾患の研究として主にタンパク質の凝集体形成、酸化ストレス、興奮毒性、炎症性メディエーターの関与などが調べられている。しかし実際に自然免疫がどのように神経変性に関与しているのか、自然免疫の活性化が神経変性の進行に関与しているのかについてはまだよくわかっていない。私達は神経変性疾患モデルハエを用いて自然免疫が神経変性に与える影響について調べた。ショウジョウバエの眼は複数の単眼からできていて、一つの眼には8コの視神経がある。各視神経にはラブドメアと呼ばれる光受容構造がある。ハンチントン病モデルハエではラブドメアの数が増加する異常すなわち、視神経の変性がみられた。このハンチントン病モデルハエで自然免疫活性化時に誘導される分子Aを抑制したところ、ラブドメアの数が増加することが明らかになり、分子Aが神経変性に促進的に働くことが示唆された。分子AはD-knif (Degeneration Risk Neuro Immune Factor)と名付けた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳動物細胞において、ショウジョウバエと同様に自然免疫が神経変性を増悪化させるかを明らかにする。さらにそのメカニズムに迫る。

3. 研究の方法

本研究では哺乳動物でも同様の現象がみられるか、ヒトの神経芽細胞 SH-SY5Y にヒトの D-knif family が与える影響について検討を行った。ヒトにはショウジョウバエの D-knif のオースログは存在しないが、D-knif family として少なくとも 11 種類の分子が知られている。まず初めに D-knif family 存在下で SH-SY5Y を培養し CCK-8 assay を行い、D-knif family が神経細胞の生存数に与える影響について調べた。次に D-knif family の中でも D-knif#10 の細胞傷害性を調べるため、Cytotoxicity LDH assay と PI staining FACS 測定を行った。その後、D-knif#10 がどのように細胞傷害を引き起こすのか、メカニズムについて調べた。考えられるメカニズムとして DNA の断片化、Caspase-3 の活性化、P2X7 レセプター(P2X7R)の活性化、膜障害による細胞死、ROS 産生の活性化、JNK pathway の活性化、炎症性サイトカイン IL-6, TNF α の発現などを調べたが、紙面の都合上、DNA の断片化のデータのみを記載する。

4. 研究成果

D-knif#10 は SH-SY5Y の生存数を減少させる

始めに SH-SY5Y に D-family 11 種を加え CCK-8 assay を行い D-knif family が生存数に与える影響について調べた。450nm 吸光度測定の結果は以下の図 1 の通りになった。図 1 より D-knif#10 によって吸光度が大きく減少し、生存数を減少させることが明らかになった。そこで次に D-knif#10 の濃度を振り再び CCK-8 assay を行い、D-knif#10 による生存数減少濃度依存性を調べることにした。その結果が図 2 である。また、図 2 の実験で CCK-8 試薬を入れる前に SH-SY5Yg(4.0 \times 10⁴cells/well)D-knif#10 付加各濃度の細胞サンプルの顕微鏡写真を撮影した。写真は図 3。

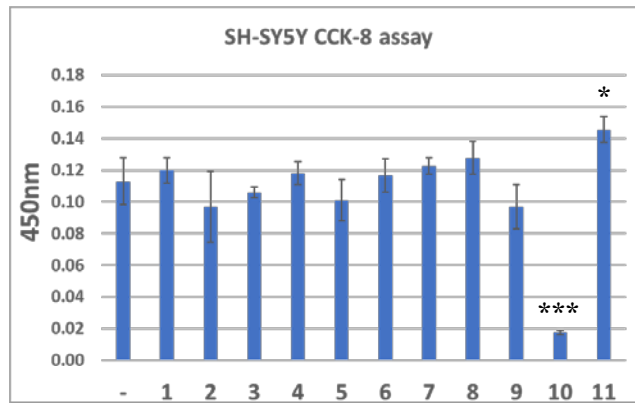


図 1. SH-SY5Y に D-knif family#1~11(7.5 μ M, 48 時間)加えたときの CCK-8 assay 結果。

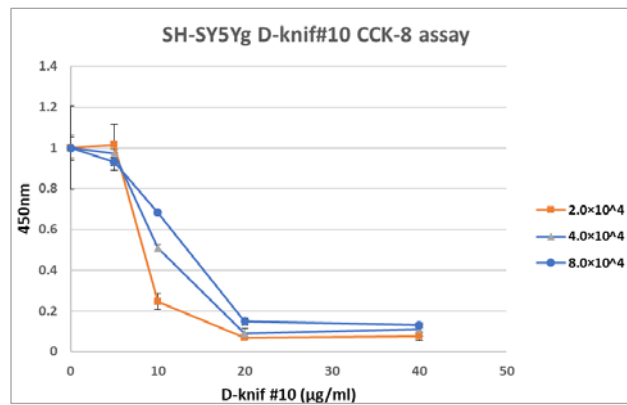


図 2. D-knif#10(5, 10, 20, 40 μ g/ml, 24 時間)のときの SH-SY5Yg CCK-8 assay 結果

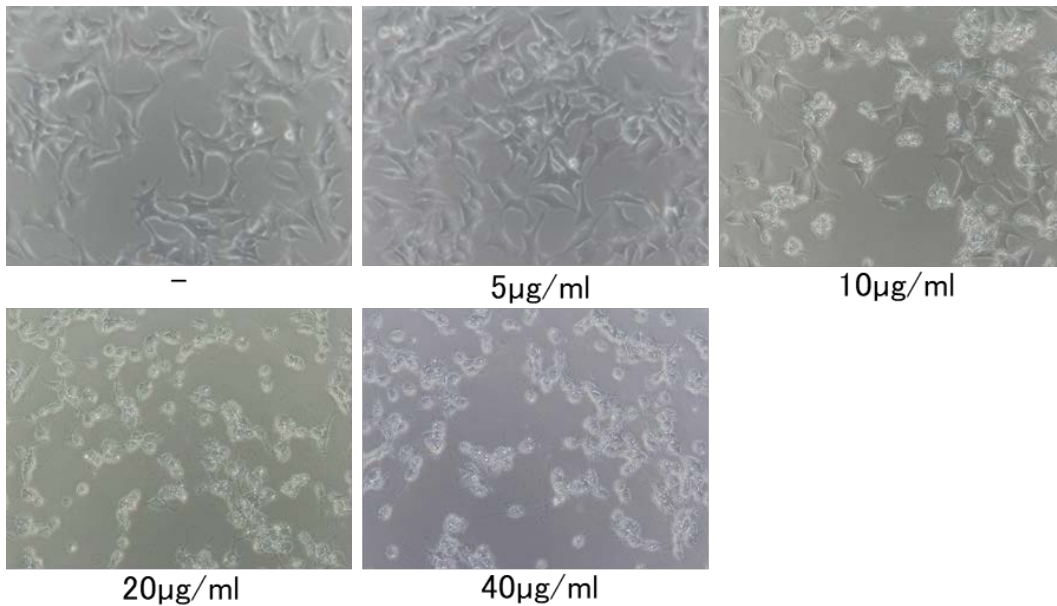


図 3. D-knif#10(5,10,20,40 μ g/ml, 24 時間)ときの SH-SY5Yg 顕微鏡写真

図 2 の通りに D-knif#10 による生存数の減少は D-knif#10 濃度依存的であることがわかった。また、図 3 のように D-knif#10 を加えた細胞では凝集したような形が見られた。また、やはり高濃度での D-knif#10 を加えた細胞でのほうが凝集した細胞は増え、D-knif#10 の効果は濃度依存的であることがわかった。

D-knif#10はSH-SY5Ygの細胞傷害を引き起こす

CCK-8 assayでは生細胞数の測定のみできるので、細胞数の減少は増殖活性抑制によるものか、細胞死(細胞傷害)によるものかはわからない。そこで次にD-knif#10によってSH-SY5Yで細胞傷害が引き起こされているのかLDH assayとPI stainingにより調べた。LDH assayの測定結果は図4の通り。

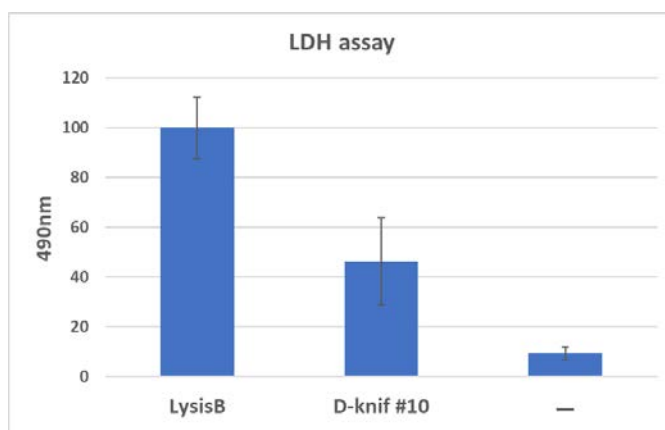


図4. D-knif#10(20 μ g/ml, 24時間)SH-SY5Yg LDH assay 測定結果

LDH assay 測定結果より、Lysis Bufferを加えすべての細胞を死滅させたサンプルのLDH漏出を100%としたときD-knif#10を加えた細胞では40.9%のLDH漏出が見られた。これは自然に培養した細胞の約4倍のLDH漏出量であり、これによりD-knif#10がSH-SY5Yで膜破壊を伴う細胞傷害を引き起こすことが明らかになった。次にPI stainingでもD-knif#10の傷害性を調べた。PIで染色しFACS測定した結果が図5である。

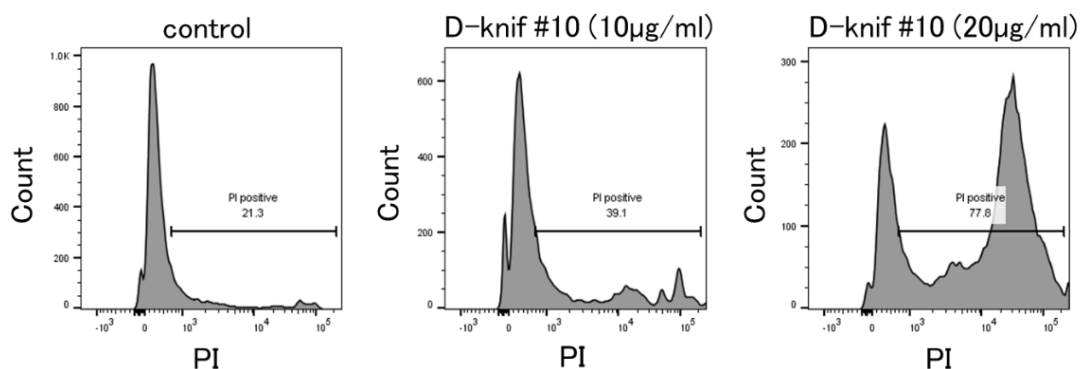


図5. D-knif#10(10, 20 μ g/ml, 24時間) SH-SY5Yg PI staining FACS

PI stainingを行ったところ、図5のようにD-knif#10を加えたSH-SY5YではPI positiveな細胞が増加し、D-knif#10によってやはり細胞傷害が起こっていることが示された。また、D-knif#10の濃度は高濃度のほうがPI positiveな細胞が多く、やはりD-knif#10の効果は濃度依存的であると言える。

D-knif#10 は DNA の断片化を引き起こす

上記のように D-knif#10 は SH-SY5Y の細胞傷害を引き起こすことが明らかになった。次にそのメカニズムについて調べることにした。始めに DNA の断片化が起こっているのかゲノム DNA のアガロースゲル電気泳動を行った。泳動結果は図 6 のようになった。

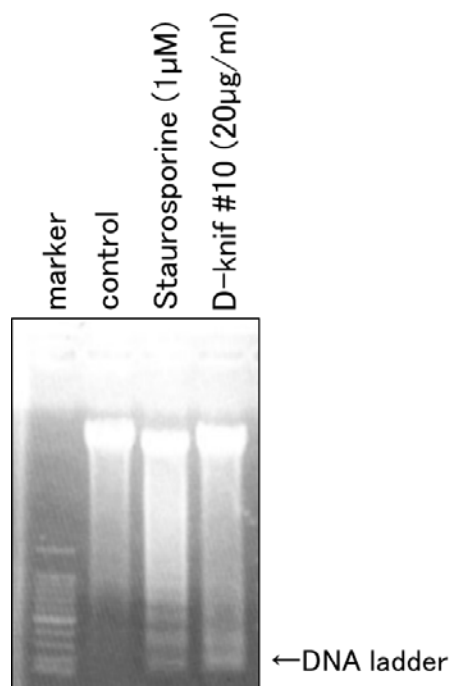


図 6. SH-SY5Yg のゲノム DNA のアガロースゲル電気泳動写真。レーンは左から 100bp マーカー、コントロール、スタウロスポリン(1µM, 24 時間)、D-knif#10(20µg/ml, 24 時間)。

泳動結果図 6 をみると、ポジティブコントロールとしてスタウロスポリンを加えたサンプルでは DNA ladder が観察できた。D-knif#10 を加えたサンプルでも同様の DNA ladder が見られ、D-knif#10 が DNA の断片化(DNA fragmentation)を引き起こすことが明らかになった。

以上の結果より、ショウジョウバエでしめされた D-knif family 分子による神経細胞死の誘導活性は、ヒトの D-knif#10 においても保存されていることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamamoto-Hino Miki、Kawaguchi Kohei、Ono Masaya、Furukawa Kazuhiro、Goto Satoshi	4. 巻 133
2. 論文標題 Lamin is essential for nuclear localization of the GPI synthesis enzyme PIG-B and GPI-anchored protein production in Drosophila	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs238527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.238527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawaguchi Kohei、Yamamoto Hino Miki、Matsuyama Nina、Suzuki Emiko、Goto Satoshi	4. 巻 595
2. 論文標題 Subunits of the GPI transamidase complex localize to the endoplasmic reticulum and nuclear envelope in Drosophila	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 960～968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawaguchi Kohei、Yamamoto-Hino Miki、Goto Satoshi	4. 巻 571
2. 論文標題 SPPL3-dependent downregulation of the synthesis of (neo)lacto-series glycosphingolipid is required for the staining of cell surface CD59	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 81～87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.06.093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawaguchi Kohei、Yamamoto-Hino Miki、Murakami Yoshiko、Kinoshita Taroh、Goto Satoshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Hrd1-dependent Degradation of the Unassembled PIGK Subunit of the GPI Transamidase Complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 65～71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.21019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi Kohei, Sato Tatsuro, Kondo Shu, Yamamoto-Hino Miki, Goto Satoshi	4. 巻 512
2. 論文標題 Stability of the transamidase complex catalyzing GPI anchoring of proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 584 ~ 590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.03.103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Satoshi Goto, Miki Yamamoto-Hino, Kohei Kawaguchi, Masaya Ono
2. 発表標題 An organelle zone executing a posttranslational modification of proteins
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of the 71th JSCB and 19th PSSJ Workshop
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤 聡
2. 発表標題 GPI修飾ゾーンの解析
3. 学会等名 第38回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohei Kawaguchi, Miki Yamamoto-Hino, Masaya Ono, Yoshiko Murakami, Taroh Kinoshita, Satoshi Goto
2. 発表標題 Coupling of translation and GPI modification
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤聡、山本（日野）美紀、川口紘平、尾野雅哉、木下タロウ、古川和弘
2. 発表標題 GPI修飾を司る翻訳後修飾ゾーン
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤聡，山本（日野）美紀
2. 発表標題 核ラミンの均一なメッシュワークの形成とその機能
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山本 美紀(日野美紀) (Yamamoto-Hino Miki) (40301783)	立教大学・理学部・助教 (32686)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------