

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390030

研究課題名 (和文) カルシウム依存性細胞内プロテアーゼ・カルパインの神経細胞死における役割の解明

研究課題名 (英文) Clarification of roles of calcium-dependent cytosolic protease calpain on neuronal cell death

研究代表者

岩田 修永 (NOBUHISA IWATA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70246213

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、カルシウム依存性細胞内プロテアーゼ・カルパインの神経細胞死における役割の解明を目指した。遺伝子改変技術を用いて作成したカルパイン活性増強および抑制モデルを用いて、カルパイン活性化により細胞外アミロイドの蓄積の促進、細胞内リン酸化タウの蓄積および樹状突起の変性が現われることを明らかにした。さらに、急性神経細胞死 *in vivo* モデルを用いて、新規内在性カルパイン基質として新たに小胞 GABA トランスポーター (VGAT) を見出した。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, I investigated possible involvement of calpain. Using gene-engineering techniques, I generated calpain activity-augmented and suppressed model mice, and clarified that calpain activation caused exacerbation of A β amyloidosis, tau phosphorylation, microgliosis, somato-dendritic dystrophy and mortality. In addition, I found that vesicular GABA transporter (VGAT) is cleaved by calpain after excitotoxic stimulation or a cerebral ischemia model. These observations indicate that calpain activation may underlie A β -triggered pathological cascade and thus shall become a relevant pharmacological target in the treatment of AD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究代表者の専門分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：神経細胞死、カルシウム依存性プロテアーゼ、カルパイン、カルパスタチン、プロテオミクス、アルツハイマー病、アミロイド β ペプチド、タウ、小胞膜 GABA トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患や脳虚血など様々な脳の疾患で引き起こされる神経細胞死に、細胞内へ

のカルシウムイオン (Ca^{2+}) の過剰な流入が深く関与している。適度な Ca^{2+} は生体機能の維持のために必須であり、細胞内にはプロテ

インキナーゼ C、フォスホリパーゼ C、Ca²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼ、カルシニューリンなど Ca²⁺により調節を受ける酵素が数多く存在する。しかし、病的な状態で起こる過剰な Ca²⁺の流入は Ca²⁺依存性酵素による生体調節に異常をもたらし、その結果、神経細胞死を引き起こすと考えられる。カルパインは、Ca²⁺により調節を受けるプロテアーゼであり、これまでの研究で神経細胞死へ関与することが示唆されてきた。例えば、アルツハイマー病では Ca²⁺の流入バランスが慢性的に亢進し、カルパインの活性化が長期間に渡って持続していることや、p25 蛋白質はカルパインの作用により p35 蛋白質よりプロセッシングを受けて産生する蛋白質であるが、サイクリン依存性プロテインキナーゼ cdk5 を活性化して、下流のシグナルカスケードを起動させるばかりでなく、細胞内タウのリン酸化を通して神経原線維変化の形成に部分的にも寄与すると考えられている。アルツハイマー病における進行的な神経細胞の機能障害と脱落（神経細胞死）にはアミロイドβペプチド(Aβ)の蓄積が中核的役割を果たすことから、本症の根本的な克服のためには脳内 Aβ レベルを低下させることが重要で、世界的な競争研究の標的となっている。しかし、進行的な神経細胞死を阻止する目的で、細胞死を引き出す直接的な実行因子の作用を停止させることも、上述の治療戦略に加えてより効果的な治療法になると言って良い。後者の研究に焦点を当てる研究を推進することは急務であり、カルパイン活性化と神経細胞死の因果関係が明確になり阻害剤の開発が進めば、アルツハイマー病の治療ばかりでなく他の神経変性疾患や脳虚血などの疾患の治療へ応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

カルシウム依存性の細胞内プロテアーゼ・カルパインに注目し、カイニン酸誘発神経細胞死モデルや脳虚血モデル、カルパスタチン（内因性カルパイン阻害蛋白質）欠損マウスまたはカルパスタチントランスジェニックマウスとアルツハイマー病モデルマウスを交配したマウスモデルを用いて解析し、アルツハイマー病患者剖検脳との比較によって in vivo における脳内カルパイン活性化と特定の基質蛋白質の分解と神経細胞死や神経の機能・形態変化との因果関係を樹立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物：野生型マウスおよびカルパスタチンノックアウトマウス (CAST-KO, Takano J, et al. *J Biol Chem* 2005)、カルパスタチントランスジェニックマウス (CAST tg, Higuchi M, et al. *J Biol Chem* 2005)

および APP23 (APP トランスジェニックマウス, APP tg) (Sturchler-Pierrat C, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997) を繁殖し、適宜交配および加齢させ、実験に用いた。

(2) 外科的処置：カイニン酸誘発細胞死モデルは、ネンブタール麻酔下、脳定位固定装置を用いて 0.1 nmol のカイニン酸を海馬内へ注入することにより作製した。脳虚血モデルは、Nygren & Wieloch (*J Cereb Blood Flow Metab* 2005) の方法により右中大脳動脈を結紮することにより作製した。

(3) 細胞培養：培養細胞では、PC12 細胞、マウス胎児線条体および海馬から調製した初代培養神経細胞を使用した。細胞への遺伝子導入は、哺乳類細胞遺伝子発現用の pcDNA ベクターを用い、脂質性試薬 Genepotor2 またはリン酸カルシウム法により行った。

(4) 組織化学的解析：麻酔下、動物から脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド固定を行い、常法に従ってパラフィン切片、凍結切片またはビブラトーム切片を適宜作製した。これらの切片をクリセルバイオレット (CV) 染色、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色および TUNEL 染色し、神経細胞死の評価を行うと共に、従来からカルパイン活性化の指標として用いられてきたスペクトリン分解物の断片を認識する抗体と今回新たに同定されたカルパイン基質の断片認識抗体等を用いて免疫組織染色を行った。染色像はパーソナルコンピューターに連結した明視野・蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡にて撮像し、画像解析ソフトウェアを用いて変化の度合いを数値化し定量した。培養細胞に対する組織化学的解析は、上述の組織切片を用いた染色法に準じて行った。

(5) ウェスタンブロット解析：摘出脳から可溶性膜画分、不溶性画分および膜画分を調製し、BCA 法にて総タンパク質量を決定した。標的タンパク質の発現変化または切断・分解産物の解析のために一定量のサンプルを用いてウェスタンブロット解析を行った。

(6) ネプリライシン活性の測定：摘出脳から膜画分を調製し、既報 (Iwata N, et al, *J Neurosci* 2004) に従い、蛍光基質 (Succinyl-Ala-Ala-Phe-MCA) を用いて測定した。

(7) Aβ の定量：Aβ の内部配列に対する capture 抗体と C 末端に対する検出抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) カルパインとアミロイド (Aβ) 病理との関係：APP tg×CAST-KO (カルパイン活性増強モデル) と APP tg×CAST tg (カルパイン活性抑制モデル) を作成し、アミロイドの蓄積を APP tg マウスと比較したところ、カルパイン活性増強モデルではアミロイド蓄積速度が促進し、逆にカルパイン活性抑制モデ

ルでは低下した (図 1A, B)。そこで、 $A\beta$ 代謝過程に注目して、このメカニズムを検討したところ、カルパイン活性増強モデルでは $A\beta$ 分解酵素ネプリライシン活性が有意に低下していることが明らかになった。このネプリライシン活性の低下は、CAST-KO 単独では起きないことから、 $A\beta$ の蓄積が引き金となって起きると考えられる。

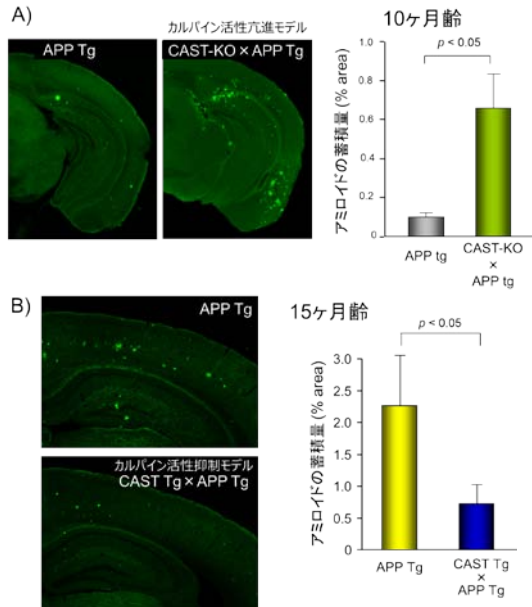


図 1 カルパインとアミロイド ($A\beta$) 病理との関係

(2) 形態変化：上述のようにカルパインの活性を人為的に増減させたモデルマウスを利用して、脳の形態的变化を HE 染色および樹状突起のマーカータンパク質である MAP2 に対する免疫染色を行うと、カルパインの活性化により、神経細胞の細胞体や樹状突起の変性が起きることが明らかになった。

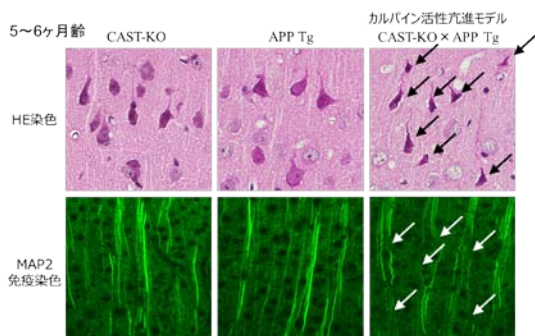


図 2 カルパイン活性化による形態変化

(3) カルパインとタウの神経病理との関係：上記 (1) で記述したカルパイン活性化によるアミロイド蓄積の促進同様、タウのリン酸化もカルパイン活性の増減により変化し、カルパイン活性の増強に伴い、タウのリン酸化が亢進することが明らかになった。

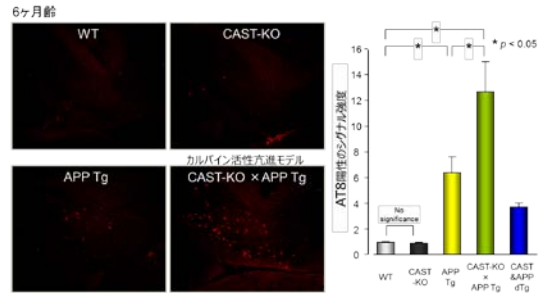


図 3 カルパイン活性化によるタウのリン酸化

(4) カルパイン活性化と病理変化との空間的関連づけ：カルパイン活性化の指標としてスペクトリンの分解を用いて、組織化学的に解析すると、主として神経細胞の細胞体で巢ペクトリンの分解が観察される。このことは細胞体の形態的变化や MAP-2 の分解、引き続き樹状突起の変性を良く説明するものである。一方、タウのリン酸化も細胞内に存在する p35 の p25 への限定分解を活性化カルパインが関わり、p25 がタウリン酸化酵素 cdk5 を活性化したために引き起こされたと解釈される。一方、今回の研究で新たにカルパインアイソザイムのうちカルパイン 10 (図 4A) の発現と活性化がプレシナプス (図 4B) で起こることが明らかになった。これによりプレシナプスにおけるネプリライシン活性の低下とそれによるアミロイドの蓄積が増強されるものと考えられた。事実、カルパイン 10 の近傍に FSB 染色によるアミロイド蓄積が観察される (図 4C, D)。

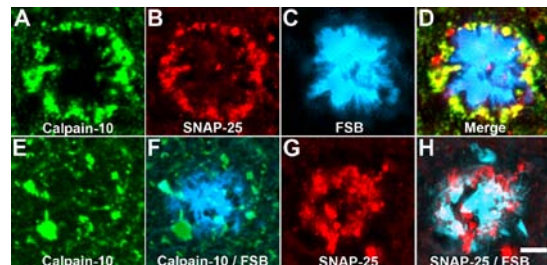


図 4 プレシナプス部位におけるカルパイン活性化

(5) 新規カルパイン基質の同定：カイニン酸誘発神経細胞死モデル (図 5) と脳虚血モデルを用いて、新規内在性カルパイン基質として新たに小胞膜 GABA トランスポーター (VGAT) を見出した。野生型マウスに上述の刺激や手術を施すとカルパインが活性化し、プレシナプス部位における VGAT の限定分解が起きることを見出した。CAST tg ではこのような VGAT の限定分解は起こらず、神経細胞死も起きないため、この VGAT の限定分解はカルパイン依存的に起きると考えてよい。VGAT の切断は、Asp51-Phe52 間および Met49-Asp51 間で起きることを確認した。

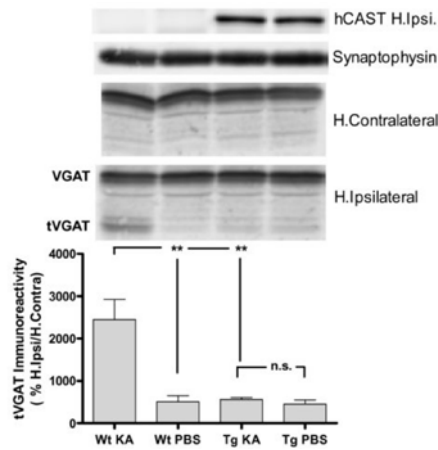


図5 カルパイン依存的 VGAT の限定分解 (*in vivo*)
H. Ipsilateral: カイニン酸 (KA) 注入側の海馬
H. Contralateral: カイニン酸 (KA) 注入の対側海馬
tVGAT: VGAT の切断フラグメント

(6) カルパイン依存的 VGAT の限定分解による細胞内局在性の変化: VGAT の限定分解による細胞内局在性の変化を明らかにする目的で、GFP-VGAT, GFP-VGAT Δ (1-52), GFP-VGAT Δ (1-60), GFP-VGAT Δ (40-90) をコードする哺乳類細胞発現ベクターを作成し、初代培養神経細胞に遺伝子導入後、局在性の変化について解析した。野生型の VGAT はプレシナプスマーカータンパク質シナプトフィジンと良い共在性を示し、軸索上に点在した (図 6A)。GFP-VGAT Δ (1-52) (図 6B), GFP-VGAT Δ (1-60) (図 6C) では、シナプトフィジンとの共在性を失い、軸索上に点在することなく均一な局在性を示した。一方、GFP-VGAT Δ (40-90) (図 6D) は野生型と同様な局在性を示すことから、シナプス小胞 (およびプレシナプス) 顕在化シグナルが 40-52 残基内に存在すると考えられる。このように、VGAT はカルパインによる限定分解を受けることで、プレシナプス表面への移行が障害されることになる (図 6E)。

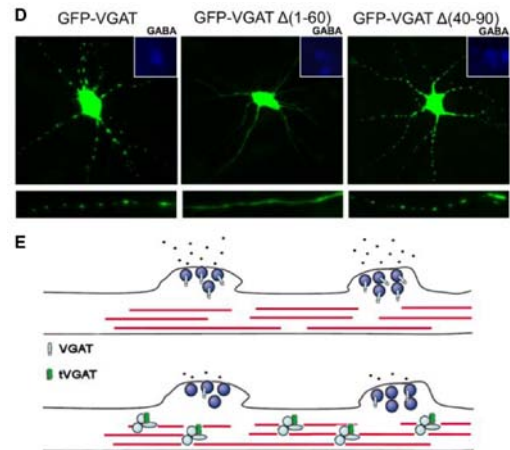
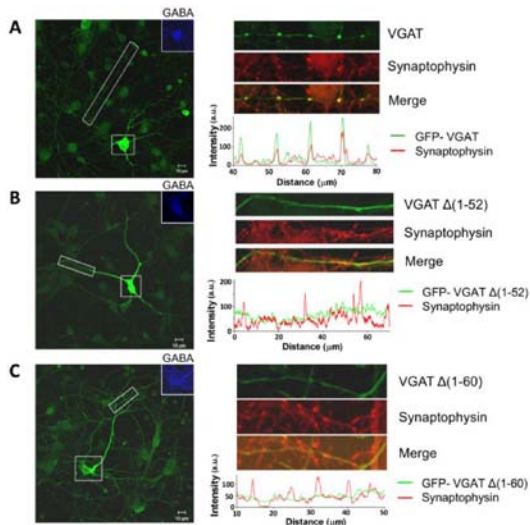
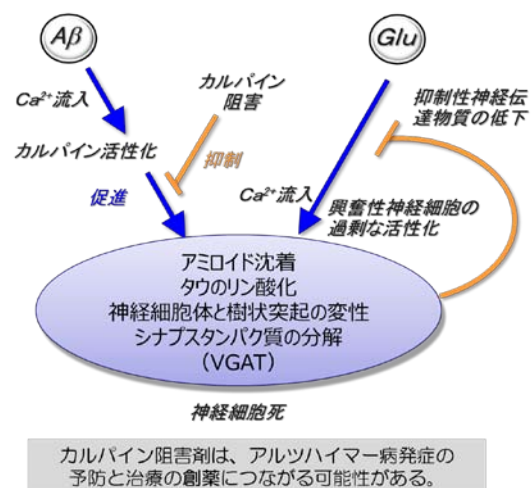


図6 カルパイン依存的 VGAT の限定分解 (*in vivo*)
H. Ipsilateral: カイニン酸 (KA) 注入側の海馬
H. Contralateral: カイニン酸 (KA) 注入の対側海馬
tVGAT: VGAT の切断フラグメント

(7) まとめ: Aβ 蓄積は神経細胞内への Ca²⁺ の流入を促進し、カルパイン活性化を通してアミロイド沈着、タウのリン酸化さらにシナプスタンパク質の切断を行い、神経機能の低下や神経変性をもたらす。特、今回の研究で明らかにしたようにシナプスタンパク質 VGAT の限定分解は、プレシナプスからの抑制性伝達物質 GABA の放出を低下させるため、結果的に興奮性シナプスが異常に活性化することになる。これは、Ca²⁺流入を通してカルパインをさらに活性化する負のスパイラルが形成される。このようなメカニズムを通して神経細胞死が引き起こされるものと結論した。



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 2 件)

- ① João R. Gomes, Andrea C. Lobo, Carlos V. Melo, Ana R. Inácio, Jiro Takano, **Nobuhisa Iwata**, Takaomi C. Saïdo, Luís P. de Almeida, Tadeusz Wieloch, Carlos B. Duarte. Cleavage of the vesicular GABA transporter under excitotoxic conditions is followed by accumulation of a truncated VGAT in non-synaptic sites. *J. Neurosci.* 査読有 31 巻、2011、4622-4635
- ② Ko Sato, Seiji Minegishi, Jiro Takano, Florian Plattner, Taro Saito, Akiko Asada, Hiroyuki Kawahara, **Nobuhisa Iwata**, Takaomi C. Saïdo, Shin-ichi Hisanaga. Calpastatin, an endogenous calpain-inhibitor protein, regulates the cleavage of the Cdk5 activator p35 to p25. *J. Neurochem.* 査読有 117 巻、2011、504-515.

[学会発表] (計 5 件)

- ① **岩田修永**, 西道隆臣: アルツハイマー病のアミロイド病理と治療戦略. 生体機能と創薬シンポジウム 2009. 2009 年 8 月 26-27 日, 東京.
- ② 佐藤亘, **岩田修永**, 高野二郎, 斎藤太郎, 浅田明子, 西道隆臣, 久永眞市: カルパスタチン遺伝子改変マウスを用いた cdk5 活性化サブユニット p35 の分解機構の解析. 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月, 神戸.
- ③ **岩田修永**: アルツハイマー病脳に蓄積するアミロイドβペプチドを標的とした認知症治療戦略. 第 2 回ちばバイオ交流フォーラム 2010 年 2 月, 千葉.
- ④ 佐藤亘, 嶺岸正治, 高野二郎, 斎藤太郎, 浅田明子, **岩田修永**, 西道隆臣, 久永眞市: カルパスタチンによる Cdk5 活性化サブユニット p35 の限定分解の制御」BMB2010(第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会. 2010 年 12 月, 神戸.
- ⑤ **岩田修永**: アミロイドβペプチド(Aβ)代謝を標的としたアルツハイマー病の治療戦略. 国立医薬品食品衛生研究所特別講演会 2010 年 6 月, 東京.

[図書] (計 1 件)

- ① 岩田修永、西道隆臣. アルツハイマー病の謎を解く. 中外医学社, 東京, 総ページ数 305 ページ, (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 修永 (IWATA NOBUHISA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科
研究者番号: 70246213