

平成22年 3月30日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790633
 研究課題名（和文） プロテアソーム・オートファジー不全による神経細胞変性のリアルタイムイメージング
 研究課題名（英文） Real-time imaging of neurodegeneration induced by proteasome/autophagy insufficiency
 研究代表者
 千葉 陽一（CHIBA YOICHI）
 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・主任研究員
 研究者番号：30372113

研究成果の概要（和文）：加齢性神経変性への細胞内蛋白分解系の機能不全の関与を明らかにするために、加齢性神経変性モデルマウス（SAMP10）由来の初代培養神経細胞を用いた実験を行った。プロテアソーム阻害により細胞質内にユビキチン化封入体が形成され、その形成頻度はコントロールマウス由来の神経細胞より SAMP10 マウス由来細胞で高かった。これらの封入体は細胞保護的とされるアグリゾームとしての性格を有していたが、封入体を有する細胞の神経突起は時間とともに退縮し、アグリゾーム形成が神経細胞においては必ずしも保護的ではなかった。

研究成果の概要（英文）：To investigate the role of the functional impairment of the intracellular quality control system in age-associated neurodegeneration, we performed experiments using primary cultured neurons from spontaneous age-associated neurodegeneration model mouse (SAMP10). Inhibition of proteasome activity resulted in the formation of ubiquitin-positive intracytoplasmic inclusions. Neurons from SAMP10 mice formed inclusions more frequently than those from control mice. The formed inclusions had several characteristics of aggresomes, which are known to be cytoprotective structures; however, inclusion-bearing neurons had shorter neurites, which resulted from the retraction of the neurites. These results suggest that aggresome-related inclusions may have few, if any, protective effects on the maintenance of neuronal dendritic arbors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：神経変性疾患、病理学、老化、封入体、プロテアソーム、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

(1) Alzheimer 病や Parkinson 病等の加齢性神経変性疾患の分子機構は、家族性症例で同定された遺伝子変異を手がかりにその説明が進展した。しかし、症例の大半を占める孤発例の最大の危険因子である加齢が、どのようにこれらの疾患の発症に関与するのかについては十分解明されていない。

(2) 我々は、加齢に伴い神経変性を自然発症する SAMP10 マウスを用いて、脳組織中のプロテアソーム活性低下が加齢性神経変性の発症に重要であることを見出した。ヒトの正常加齢および Alzheimer 病や Parkinson 病患者の脳においてもプロテアソーム活性の低下が報告されており、老化に伴う細胞内品質管理機能の低下が加齢性神経変性の基盤にあることが想定される。

(3) また近年、オートファジーがプロテアソーム機能障害の際にバックアップ系として働き、ユビキチン陽性封入体がオートファジーによって分解されることが明らかにされた。このことから、プロテアソーム活性低下に対するオートファジーによる代償不全がユビキチン陽性封入体形成を伴う神経変性の要因になっている可能性がある。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、加齢に伴う神経細胞内のプロテアソーム系及びオートファジー系の機能不全が神経変性の重要な原因の一つであるという考えに基づき、SAMP10 マウス由来初代培養神経細胞をモデルとして用い、プロテアソーム機能低下からユビキチン陽性封入体形成を経て神経細胞変性に至る過程の中で、細胞内小器官の動態、オートファジーの活性化、細胞内防御系分子の発現を観察することによって、加齢性神経変性疾患の新たな治療法開発につながる知見を得たいと考え、本研究計画を立案した。

3. 研究の方法

- (1) SAMP10マウス及びコントロール系統の SAMR1マウスのE17胎仔大脳皮質より単離した神経細胞を培養し、10日目にプロテアソーム阻害剤を投与する。24時間後に固定し、ユビキチンに対する抗体で免疫染色を行い、封入体形成率を両系統間で比較する。また、ユビキチン抗体とアグリゾームのマーカー (γ -tubulin、HDAC6等) に対する抗体で蛍光二重染色を行い、この実験系で形成される封入体とアグリゾームとの異同を明らかにする。
- (2) ガラスボトムディッシュ上で培養した神経細胞にプロテアソーム阻害剤を投与し、ビデオ強化微分干渉顕微鏡によるタイムラプスイメージングを行い、神経突起の形態変化や封入体形成過程を経時的に観察する。

同時に細胞内小器官の神経突起内の輸送状態についてもモニターする。

(3) プロテアソーム阻害剤に対するライソゾーム系の代償性亢進の程度を評価するため、プロテアソーム阻害剤投与時のcathepsin L活性を、蛍光ラベルされた特異的な基質を使って、生細胞を用いて測定する。

(4) プロテアソーム阻害時のオートファジー活性を、ライソゾームの蛍光イメージングやLC3の修飾を検出するウェスタンブロットティングにより評価し、両系統間でオートファジーの誘導に差がみられないかどうか検討する。

4. 研究成果

(1) プロテアソーム阻害剤の投与 24 時間後に、培養神経細胞内にユビキチン陽性封入体が形成され、その形成頻度は神経変性モデルの SAMP10 マウス由来の細胞の方がコントロール系由来の細胞に比べて高かった (図 1)。また、これらの封入体は γ -tubulin、HDAC6 等のアグリゾームマーカーが陽性で、アグリゾームとしての性格を有することが明らかになった (図 2)。また、このような封入体の周囲の一部が、中間径フィラメントの一種である α -internexin で囲まれている像もみられ (図 3)、神経細胞以外のアグリゾームにみられるビメンチンケージに相当する構造と考えられた。

図 1

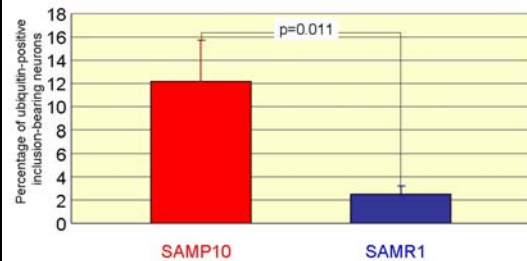


図 2

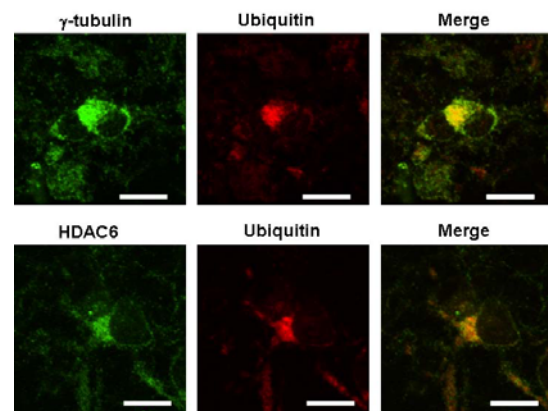
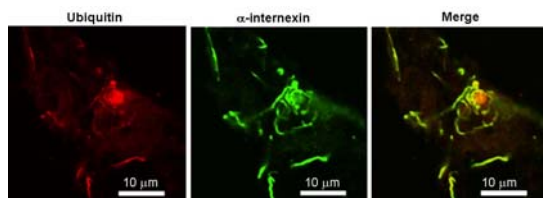
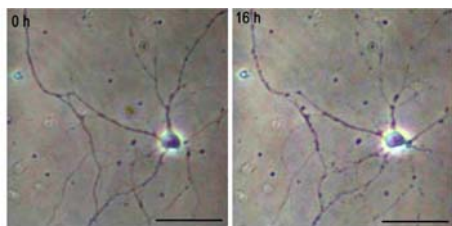


図 3



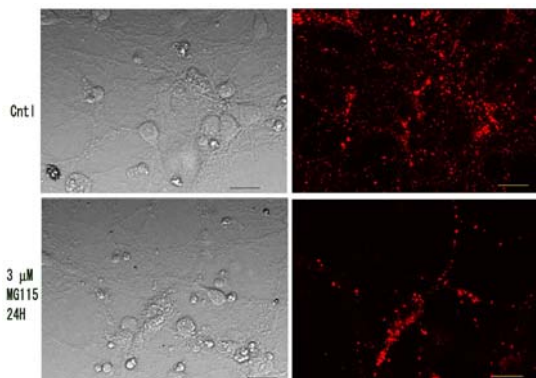
(2) 位相差顕微鏡下で経時的に同一の細胞をプロテアソーム阻害剤負荷後 24 時間まで観察し、その後固定してユビキチン陽性封入体形成の有無を確認する実験を行ったところ、封入体を形成した神経細胞では、もともとあった長い神経突起がプロテアソーム阻害開始後 10 時間から 16 時間の間に退縮をはじめることが分かった (図 4)。これは封入体形成が形態学的に明らかになる前のイベントであった。さらに詳細な検討を行うため、突起退縮が始まる時間帯に合わせて阻害剤負荷後 12 時間から 16 時間にかけてビデオ強化微分干渉顕微鏡によるタイムラプスイメージングを行い、突起退縮がこの時間帯に始まることを確認したが、細胞内小器官の輸送動態の変化については有意な知見は得られなかった。

図 4



(3) プロテアソーム阻害後のライソゾーム活性を評価するため、cathepsin L で分解されると蛍光を発する基質を使って、cathepsin 活性を測定した (図 5)。SAMP10、SAMR1 いずれの神経細胞でもプロテアソーム阻害により cathepsin 活性の上昇が確認され、その程度に明らかな差は認められなかった。

図 5



(4) プロテアソーム阻害後のオートファジーの活性化につき、LC3 のウェスタンブロットと LysoTracker によるライソゾームの蛍光イメージングで検討したが、SAMP10 ニューロンとコントロールニューロンとの間にオートファジー誘導能に有意な差は見出せなかった。

(5) 以上の結果から、SAMP10 マウス由来の培養神経細胞がプロテアソーム阻害に対してユビキチン陽性封入体を形成しやすいこと、その封入体がアグリゾームとしての性格を持つこと、しかし、一般的に細胞保護的とされるアグリゾームが神経細胞に形成されると、神経突起保護には働かず、必ずしも細胞保護的といえないことが明らかとなった。しかし、SAMP10 ニューロンがなぜプロテアソーム阻害に対して封入体を形成しやすいのか、そのメカニズムは未だ不明である。その原因の一つとして、プロテアソーム阻害によるオートファジーの誘導が SAMP10 マウスの神経細胞では弱いのではないかと、この仮説のもと実験を行ったが、これまでのところこの仮説を支持する結果は得られていない。その理由として、オートファゴソームを検出する手法の感度が不十分であった可能性が考えられ、今後オートファゴソームを蛍光ラベルする baculovirus を利用したトランスフェクションの系を導入し、更なる検討を進める予定である。

(6) 一方、ヒトの神経変性疾患である多系統萎縮症において観察されるグリア細胞内封入体の性質に関する研究も行い、その結果、これらの封入体もアグリゾームと同様の性質を持つことを見出した。プロテアソーム活性低下等に起因する蛋白分解ストレスが、多くの加齢性神経変性疾患に共通する病態形成メカニズムであることが示唆された。これらの病態におけるオートファジーの関わりについても、今後グリア細胞の培養系でモデルを構築して検討を進める予定である。

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 2 件)

① Chiba Y, Shimada A, Yoshida F, Keino H, Hasegawa M, Ikari H, Miyake S, Hosokawa M. Risk of fall for individuals with intellectual disability. *Am J Intellect Dev Disabil* 114:225-236, 2009. 査読有

② Chiba Y, Shimada A, Kumagai N, Yoshikawa K, Ishii S, Furukawa A, Takei S, Sakura M, Kawamura N, Hosokawa M. The senescence-accelerated mouse (SAM): A higher oxidative stress and age-dependent degenerative diseases model. *Neurochem Res* 34:679-687, 2009. 査読有

〔学会発表〕（計7件）

- ① Chiba Y, et al. Aggresomal property of glial cytoplasmic inclusions. 第32回日本神経科学大会（2009年9月18日 名古屋）
- ② 千葉陽一 他：加齢性神経変性疾患における封入体形成へのaggresomeの関与。第32回日本基礎老化学会（2009年6月20日 横浜）
- ③ 千葉陽一 他：Glial cytoplasmic inclusionsはaggresomeとしての側面を有する。第50回日本神経病理学会（2009年6月6日 高松）
- ④ 千葉陽一 他：SAMP10マウス由来培養神経細胞に誘導したaggresome関連ubiquitin陽性封入体形成と神経突起退縮。第23回老化促進モデルマウス（SAM）研究協議会（2008年7月18日 京都）
- ⑤ Chiba Y, et al. Neurite retraction in cultured cortical neurons from SAMP10 mice induced by the formation of aggresome-related ubiquitin-positive inclusions. 第31回日本神経科学大会（2008年7月9日 東京）
- ⑥ 千葉陽一 他：SAMP10マウス由来培養神経細胞に誘導したユビキチン化封入体形成による神経突起退縮。第31回日本基礎老化学会（2008年6月12日 松本）
- ⑦ 千葉陽一 他：SAMP10マウス由来培養神経細胞に誘導したaggresome関連ubiquitin陽性封入体形成による神経突起退縮。第49回日本神経病理学会（2008年5月20日 東京）

〔図書〕（計1件）

- ① 細川昌則、千葉陽一、塚口（藤澤）裕美：新老年学。東京大学出版会 237-240, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 陽一 (CHIBA YOICHI)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・病理学部・主任研究員

研究者番号：30372113

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：