

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号:14301

研究種目:基盤研究 (C)

研究期間:2009~2011

課題番号:21500336

研究課題名(和文)

HtrA2 ノックアウトマウスにおける HtrA2 基質蛋白蓄積と基底核回路断裂の解析

研究課題名(英文)

Biochemical and neuropathological analysis of HtrA2 knockout mouse

研究代表者

伊東 秀文 (ITO HIDEFUMI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号:20250061

研究成果の概要(和文):われわれは当該研究にて、HtrA2ノックアウト(KO)マウスが生後30日で死亡すること、線条体ニューロンが脱落し、ユビキチン陽性蛋白が蓄積すること、COX IおよびCOXIV、parkinタンパク量が低下し、LC3-IIが増加すること、骨格筋・心筋が萎縮すること、を見出した。さらにHtrA2 KOマウスをParkin KO マウスと掛け合わせたdouble KOマウスはHtrA2 KOマウスよりも寿命が短縮することを示した。さらにわれわれは、アルツハイマー病の老人斑と神経原線維変化・ALSの脊髄前角細胞の細胞質に出現する封入体にHtrA2免疫反応が見られることを明らかにした。

研究成果の概要(英文): We generated HtrA2 knockout (KO) mice, and analyzed them biochemically and neuropathologically. We found that the mean survival of the homozygous HtrA2 KO mice was 30 days. In the mice, the striatum was degenerated and ubiquitinated proteins were accumulated. In addition, we found reduction of COX I, COX IV, and parkin proteins, and increase of LC3-II. Their skeletal and cardiac muscles showed atrophy. The mean survival of HtrA2/parkin double KO mice was shorter than that of HtrA2 KO mice. Moreover, we identified HtrA2 immunoreactivity in the senile plaques and the neurofibrillary tangles of Alzheimer's and in the intracytoplasmic inclusions of ALS patients.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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:パーキンソン病, HtrA2, knockout mouse

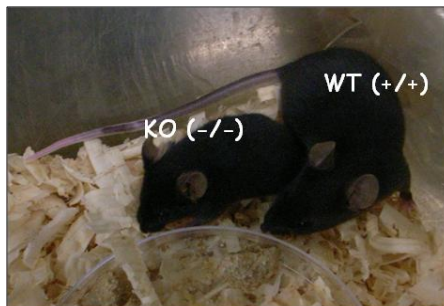
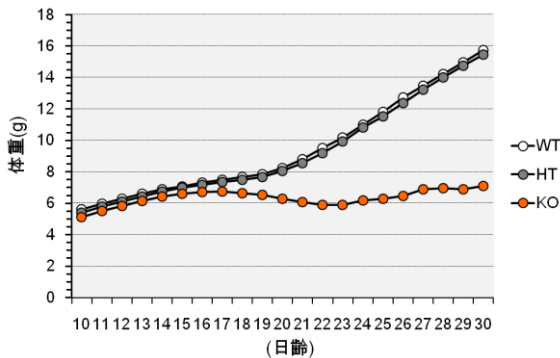
の感受性遺伝子座と考えられる HtrA2 は、ミトコンドリア膜間腔に存在するセリンプロテアーゼである。したがって PARK13 では、HtrA2 の変異により機能低下が生じ、その基質蛋白が蓄積して細胞死を惹起している可能性が想定される。われわれは POLG が HtrA2 の基質候補蛋白であることを同定している。

2. 研究の目的・方法

本研究では、HtrA2 ノックアウト(KO)マウスを製作し、このマウスを臨床的に観察するとともに、生化学的・神経病理学的に解析することを主たる目的とする。さらにわれわれはこのマウスと Parkin KO マウスを掛け合わせ、HtrA2 と parkin の関連を明らかにするとともに、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、アルツハイマー病の剖検脳において HtrA2 の局在を検討し、それぞれの病態における HtrA2 の関与を検討する。また、HtrA2 KO マウスに生じるパーキンソン症候の病理学的基盤を、これらの基質蛋白の蓄積と大脳基底核神経回路の断裂の観点から解析する。

3. 研究成果

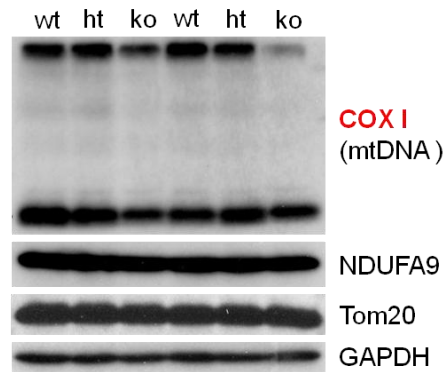
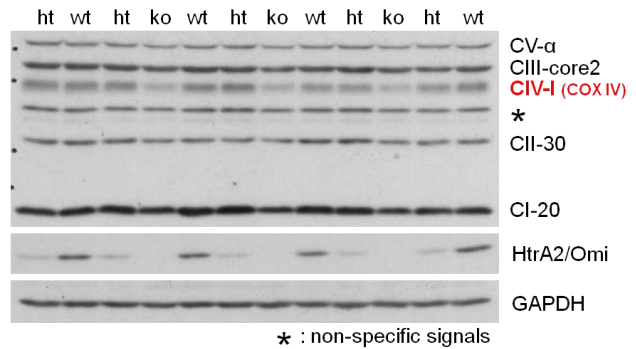
ホモ接合 HtrA2 KO マウスでは、生後 14 日目から体重増加が見られず、生後 18 日あたりから体重が減少し始め、30 日で、体重平均 7.5g くらいで死亡した。



生後 25 日の HtrA2 wild(WT)マウスと KO マウス。KO マウスは WT マウスに比して明らかに小型であった。

神経病理学的には、HtrA2 KO マウスでは線条体ニューロンが脱落し、残存ニューロンの細胞質にユビキチン陽性蛋白が蓄積し、autophagy が亢進していた。

一方、生化学的には、ミトコンドリア呼吸鎖複合体IVのサブユニット COX I および COX IVの低下の低下が認められた。

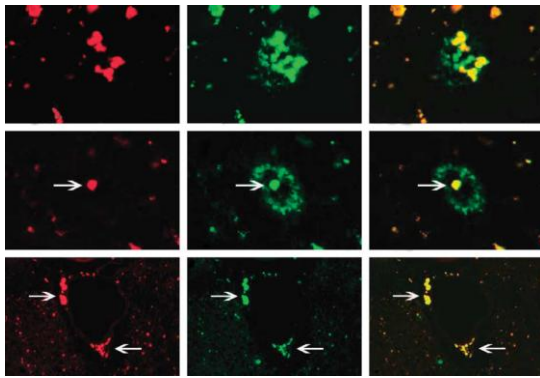


さらにこの KO マウスでは Parkin タンパク量が低下しており、LC3-II が増加していた。中枢神経では線条体以外の部位に変性はなかったが、骨格筋・心筋は萎縮していた。

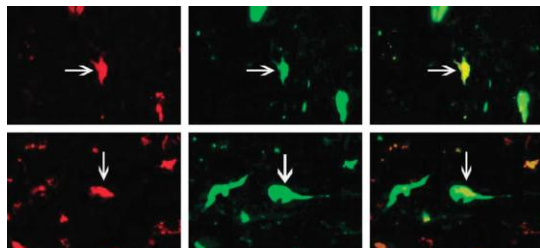
これらの結果から、HtrA2 KO マウスでは HtrA2 の基質である POLG の機能が障害され、ミトコンドリア DNA の発現が障害されることにより COX I・COXIV が低下してミトコンドリア機能が障害され、線条体や心筋・骨格筋障害が生じると考えられた。

さらにわれわれは、HtrA2 KO マウスを Parkin KO マウスと掛け合わせた double KO マウスは HtrA2 KO マウスよりも寿命が短縮することを明らかにした。これは、double KO マウスでは HtrA2 KO マウスで蓄積した異常ミトコンドリアを、parkin 欠損のために除去できず、細胞死が促進されたと考えられる。すなわちこの結果は、parkin が異常ミトコンドリアの mitophagy に関与していることを in vivo 実験系で明らかにした初めての成果である。

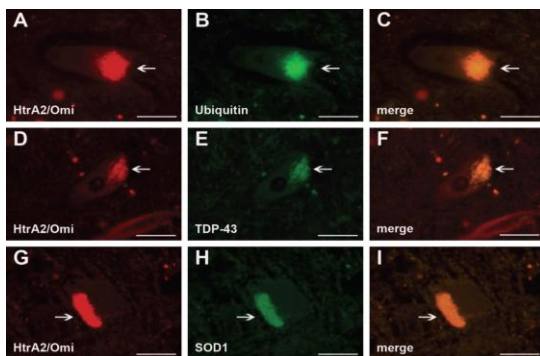
さらにわれわれは、アルツハイマー病の特徴的病理所見である老人斑と神経原線維変化に HtrA2 免疫反応が見られること、ALS の脊髄前角細胞の細胞質に出現する封入体に HtrA2 が TDP-43 と共存していることを明らかにし、アルツハイマー病、ALS の病因に HtrA2 が関与している可能性を指摘した。



老人斑における HtrA2 と A β の共存
(Kawamoto Y, Ito H, et al. *Neuroreport* 21: 1121-1125, 2010)



神経原線維変化における HtrA2 と tau の共存
(Kawamoto Y, Ito H, et al. *Neuroreport* 21: 1121-1125, 2010)



ALS の封入体における HtrA2 免疫反応
(Kawamoto Y, Ito H, et al. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 36: 331-344, 2010)

4. 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 26 件)

- Hase Y, Okamoto Y, Fujita Y, Kitamura A, Ito H, Maki T, Washida K, Takahashi R, Ihara M: Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, prevents no-reflow and hemorrhage in mice with focal cerebral ischemia. *Experimental Neurology* 査読有 233:523-533, 2012
DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.11.038

- Kitamura A, Fujita Y, Oishi N, Kalaria RN, Washida K, Maki T, Okamoto Y, Hase Y, Yamada M, Takahashi J, Ito H, Tomimoto H, Fukuyama H, Takahashi R, Ihara M: Selective white matter abnormalities in a novel rat model of vascular dementia. *Neurobiology of Aging* 査読有 33:1012.e25-1012.e35, 2012
DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.033
- Maesako M, Uemura K, Kubota M, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Watanabe K, Hayashida N, Ihara M, Ito H, Shimohama S, Kihara T, Kinoshita A: Environmental enrichment ameliorated high fat diet-induced A β deposition and memory deficit in APP transgenic mice. *Neurobiology of Aging* 査読有 33:1011.e11-1011.e23, 2012.
DOI:10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.028
- Honjo Y, Kaneko S, Ito H, Horibe T, Takahashi R, Kawakami K: Protein disulfide isomerase immunopositive inclusions in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis* 査読有 12: 444-450, 2011
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174512>
- Ito H, Nakamura M, Komure O, Ayaki T, Wate R, Maruyama H, Nakamura Y, Fujita K, Kaneko S, Okamoto Y, Ihara M, Konishi T, Ogasawara K, Hirano A, Kusaka H, Kaji R, Takahashi R, Kawakami H: Clinicopathologic study on an ALS family with a heterozygous E478G optineurin mutation. *Acta Neuropathologica* 査読有 122: 223-229, 2011
DOI: 10.1007/s00401-011-0842-y
- Maki T, Wakita H, Mase M, Itagaki I, Saito N, Ono F, Adachi K, Ito H, Takahashi R, Ihara M, Tomimoto H: Watershed Infarcts in a multiple microembolic model of monkey. *Neuroscience Letters* 査読有 499: 80-83, 2011
DOI: 10.1016/j.neulet.2011.05.036
- Honjo Y, Ito H, Horibe T, Takahashi R, Kawakami K: Protein disulfide isomerase immunopositive glial cytoplasmic inclusions in patients with multiple system atrophy. *International Journal of Neuroscience* 査読有 2011

- DOI: 10.3109/00207454.2011.585440
8. Okamoto Y, Shirakashi Y, Ihara M, Urushitani M, Oono M, Kawamoto Y, Yamashita H, Shimohama S, Kato S, Hirano A, Tomimoto H, Ito H, Takahashi R: Colocalization of 14-3-3 proteins with SOD1 in Lewy Body-like hyaline inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis cases and the animal model. *PLoS One* 査読有 6: e20427, 2011 DOI: 10.1371/journal.pone.0020427
 9. Maki T, Ihara M, Fujita Y, Nambu T, Harada H, Ito H, Nakao K, Tomimoto H, Takahashi R: Angiogenic roles of adrenomedullin through VEGF induction. *Neuroreport* 査読有 22: 442-447, 2011 DOI: 10.1097/WNR.0b013e32834757e4
 10. Ito H, Fujita K, Nakamura M, Wate R, Kaneko S, Sasaki S, Yamane K, Suzuki N, Aoki M, Shibata N, Togashi S, Kawata A, Mochizuki Y, Mizutani T, Maruyama H, Hirano A, Takahashi R, Kawakami H, Kusaka H: Optineurin is co-localized with FUS in basophilic inclusions of ALS with FUS mutation and in basophilic inclusion body disease. *Acta Neuropathologica* 査読有 121: 555-557, 2011 DOI:10.1007/s00401-011-0809-z
 11. Yamada M, Ihara M, Okamoto Y, Maki T, Washida K, Kitamura A, Hase Y, Ito H, Takao K, Miyakawa T, Kalaria RN, Tomimoto H, Takahashi R: The influence of chronic cerebral hypoperfusion on cognitive function and amyloid β metabolism in APP overexpressing mice. *PLoS One* 査読有 6: e16567, 2011 DOI: 10.1371/journal.pone.0016567
 12. Maki T, Ihara M, Fujita Y, Nambu T, Miyashita K, Yamada M, Washida K, Nishio K, Ito H, Harada H, Yokoi H, Arai H, Itoh H, Nakao K, Takahashi R, Tomimoto H: Angiogenic and vasoprotective effects of adrenomedullin on prevention of cognitive decline after chronic cerebral hypoperfusion in mice. *Stroke* 査読有 42: 1122-1128, 2011 DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.603399
 13. Matsui H, Ito H, Taniguchi Y, Takeda S, Takahashi R: Ammonium chloride and tunicamycin are novel toxins for dopaminergic neurons and induce Parkinson's disease-like phenotypes in medaka fish. *Journal of Neurochemistry* 査読有 115: 1150-1160, 2010 DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.07012.x
 14. Kawamoto Y, Ito H, Ihara M, Kobayashi Y, Suzuki Y, Takahashi R: Localization of Htra2/Omi immunoreactivity in brains with Alzheimer's disease. *Neuroreport* 査読有 21: 1121-1125, 2010 DOI: 10.1097/WNR.0b013e328340a731
 15. Nakamura M, Ito H, Nakamura Y, Wate R, Kaneko S, Nakano S, Matsumoto S, Kusaka H: Smad ubiquitination regulatory factor-2 in progressive supranuclear palsy. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 査読有 37: 307-314, 2010 DOI: 10.1111/j.1365-2990.2010.01120.x
 16. Fujita Y, Ihara M, Ushiki T, Hirai H, Kizaka-kondoh S, Hiraoka M, Ito H, Takahashi R: Early protective effect of bone marrow mononuclear cells against ischemic white matter damage through augmentation of cerebral blood flow. *Stroke* 査読有 41: 2938-2943, 2010 DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.596379
 17. Matsui H, Ito H, Taniguchi Y, Inoue H, Takeda S, Takahashi R: Proteasome inhibition in medaka brain induces the features of Parkinson disease. *Journal of Neurochemistry* 査読有 115: 178-187, 2010 DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.06918.x
 18. Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, Takahashi R: Nonhypotensive dose of telmisartan attenuates cognitive impairment partially due to PPAR- γ activation in mice with chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* 査読有 41: 1798-1806, 2010 DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.583948
 19. Honjo Y, Ito H, Horibe T, Takahashi R, Kawakami K: Protein disulfide isomerase-immunopositive inclusions in patients with Alzheimer disease. *Brain Research* 査読有 1349: 90-96, 2010 DOI: 10.1016/j.brainres.2010.06.016
 20. Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, Kinoshita Y, Kamada M, Nodera H, Suzuki H, Komure O, Matsuura S, Kobatake K, Morimoto N, Abe K, Suzuki N, Aoki M, Kawata A, Hirai T, Kato T, Ogasawara K, Hirano A, Takumi T, Kusaka H, Hagiwara K, Kaji R, Kawakami H: Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 査読有 465: 223-226, 2010 DOI: 10.1038/nature08971
 21. Nishio K, Ihara M, Yamasaki N, Kalaria

- RN, Maki T, Fujita Y, Ito H, Oishi N, Fukuyama H, Miyakawa T, Takahashi R, Tomimoto H: A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* 査読有 41: 1278-1284, 2010
DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.581686
22. Kawamoto Y, Ito H, Kobayashi Y, Suzuki Y, Akiguchi I, Fujimura H, Sakoda S, Kusaka H, Hirano A, Takahashi R: HtrA2/Omi-immunoreactive intraneuronal inclusions in the anterior horn of patients with sporadic and SOD1 mutant amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 査読有 36: 331-344, 2010
DOI: 10.1111/j.1365-2990.2010.01075.x
 23. Kinoshita Y, Ito H, Hirano A, Fujita K, Wate R, Nakamura M, Kaneko S, Nakano S, Kusaka H: Nuclear Contour Irregularity and Abnormal Transporter Protein Distribution in Anterior Horn Cells in ALS. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 査読有 68: 1184-1192, 2009
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19816199>
 24. Ohnishi S, Ito H, Suzuki Y, Adachi Y, Wate R, Zhang JH, Nakano S, Kusaka H, Ikehara S: Intra-bone marrow-bone marrow transplantation slows disease progression and prolongs survival in G93A mutant SOD1 transgenic mice, an animal model mouse for amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research* 査読有 1296: 216-224, 2009
DOI: 10.1016/j.brainres.2009.08.012
 25. Okamoto Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, Takahashi R, Tomimoto H: Cortical microinfarcts in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. *Neuroreport* 査読有 20: 990-996, 2009
DOI: 10.1097/WNR.0b013e32832d2e6a
 26. Kamada M, Maruyama H, Tanaka E, Morino H, Wate R, Ito H, Kusaka H, Kawano Y, Miki T, Nodera H, Izumi Y, Kaji R, Kawakami H: Screening for TARDBP mutations in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of The Neurological Sciences* 査読有 284: 69-71, 2009
DOI: 10.1016/j.jns.2009.04.017
- [学会発表] (計 19 件)
1. Kawakami H, Maruyama H, Ito H: OPTN and Motor neuron disease. International Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome. Tokyo, Japan, 2011年2月22日
 2. Kawakami H, Maruyama H, Ito H: Optineurin in ALS. AAN-JSN Joint Symposium. Tokyo, Japan, 2011年5月18日
 3. 伊東秀文: ガイドラインに基づいたパーキンソン病の非運動症状の治療. 第51回日本神経学会総会 スポンサーセミナー. 東京, 2010年5月20日
 4. 伊東秀文: OPTN 遺伝子変異例の臨床病理学的検討. 厚生労働省 障害者対策総合研究事業 (神経・筋疾患分野) ALS/ALSD/FTLDD Consortium 2010 サマールークショップ 特別講演. 東京, 2010年8月28日
 5. Fujita Y, Ihara M, Ito H, Takahashi R: Effect of treatment with bone marrow mononuclear cells in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. The 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience. Chicago, USA, 2009.11.17-21.
 6. Washida K, Takahashi R, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Tomimoto H, Ihara M, Ito H: The protective effect of telmisartan against chronic cerebral hypoperfusion in mice. The 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience. Chicago, USA, 2009.11.17-21.
 7. Maki T, Fujita Y, Ihara M, Ito H, Tomimoto H, Takahashi R: Adrenomedullin promotes angiogenesis and arteriogenesis and preserves white matter integrity after chronic cerebral hypoperfusion in mice. The 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience. Chicago, USA, 2009.11.17-21.
 8. Hase Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, Takahashi R: Protective effect of Cilostazol against the no-reflow phenomenon in transient cerebral ischemia. The 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience. Chicago, USA, 2009.11.17-21.
 9. Okamoto Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, Tomimoto H, Takahashi R: Cortical microinfarcts in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. The 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience. Chicago, USA, 2009.11.17-21.
 10. Ito H, Nakamura M, Komure O, Maruyama M, Wate R, Nakamura Y, Fujita K, Kaneko

- S, Ogasawara O, Nakabayashi H, Ayaki T, Okamoto Y, Ihara M, Kaji R, Kusaka H, Hirano A, Takahashi R, Kawakami H: Clinical and Neuropathologic Investigation of a Family with ALS Associated with Mutated Optineurin. XVIIth International Congress of Neuropathology. Salzburg, Austria, 2010. 9. 12-15.
11. Nakamura M, Ito H, Kaneko S, Asayama S, Nakamura S, Nishii M, Fujita K, Matsumoto S, Kusaka H: Smad ubiquitination regulatory factor-2 in progressive supranuclear palsy. XVIIth International Congress of Neuropathology. Salzburg, Austria, 2010. 9. 12-15.
12. Fujita K, Kaneko S, Ito H, Nishii M, Wate R, Nakano S, Kusaka H: An immunohistochemical study on basophilic inclusions of adult-onset atypical motor neuron disease. XVIIth International Congress of Neuropathology. Salzburg, Austria, 2010. 9. 12-15.
13. Okamoto Y, Ihara M, Ito H, Yamamoto T, Tomimoto H, Takahashi R: Cortical microinfarcts are related to cerebral amyloid angiopathy rather than to senile plaques or neurofibrillary tangles. XVIIth International Congress of Neuropathology. Salzburg, Austria, 2010. 9. 12-15.
14. Ihara M, Nishio K, Kakaria RN, Maki T, Fujita Y, Ito H, Oishi N, Fukuyama H, Takahashi R, Tomimoto H: A Mouse Model Characterizing Features of Vascular Dementia with Hippocampal Atrophy. XVIIth International Congress of Neuropathology. Salzburg, Austria, 2010. 9. 12-15.
15. Okamoto Y, Ihara M, Ito H, Yamamoto T, Tomimoto H, Takahashi R: Cortical microinfarcts are related to cerebral amyloid angiopathy rather than to senile plaques or neurofibrillary tangles. The 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience. San Diego, USA, 2010. 11. 13-17.
16. 河本恭裕、伊東秀文他. 筋萎縮性側索硬化症患者の脊髄前角細胞における Omi/HtrA2 の集積. 第 50 回日本神経病理学会. 高松. 2009 年 6 月 5 日
17. 河本恭裕、伊東秀文他. Alzheimer 病患者脳内における Omi/HtrA2 の免疫組織化学的検討. 第 51 回日本神経学会. 東京. 2010 年 5 月 22 日

18. 河本恭裕、伊東秀文他. 脳幹型および皮質型 Lewy 小体における XIAP と HtrA2/Omi の共存. 第 52 回日本神経学会. 名古屋. 2011 年 5 月 18 日
19. 河本恭裕、伊東秀文他. Alzheimer 病患者脳内における HtrA2/Omi の免疫組織化学的検討. 第 52 回日本神経病理学会. 京都. 2011 年 6 月 4 日

〔図書〕(計 3 件)

1. 伊東秀文、高橋良輔: パーキンソン症候群 (SND, PSP, CBD) 「研修医のための神経内科診療」阿部康二編、196-201、新興医学出版社、東京、2010
2. 伊東秀文: これからのパーキンソン病治療 「ガイドラインサポートハンドブック パーキンソン病」武田篤編、207-218、医薬ジャーナル社、大阪、2011
3. 伊東秀文、高橋良輔: パーキンソン病 「ガイドライン外来診療 2011」泉孝英編、486-488、日経メディカル開発、東京、2011

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: TDP-43 の凝集体が蓄積する疾患の発症リスクを予測する方法、診断薬及び治療薬
 発明者: 漆谷真、藤原範子、伊東秀文
 権利者: 滋賀医科大学、兵庫医科大学、京都大学
 種類: 特願
 番号: 2012-028737
 出願年月日: 2012. 2. 13.
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~neurology/>

5. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 秀文 (ITO HIDEFUMI)
 京都大学・医学研究科・講師
 研究者番号: 20250061

(2) 研究分担者

高橋 良輔 (TAKAHASHI RYOSUKE)
 京都大学・医学研究科・教授
 研究者番号: 90216771

(3) 研究分担者

河本恭裕 (KAWAMOTO YASUHIRO)
 京都大学・医学研究科・非常勤講師
 研究者番号: 40335253