

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15198

研究課題名（和文）神経性セロイドリポフスチン症の原因遺伝子欠損に基づくオートファジー新規役割の解析

研究課題名（英文）Investigation of the role of autophagy in Neuronal Ceroid Lipofuscinoses

研究代表者

山口 隼司（Junji, Yamaguchi）

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30875282

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：神経性セロイドリポフスチン症（NCL）の病態の中ではオートファジーが深く関与することが報告されてきたが、その詳細は未だ明らかとなっていない。本研究課題では、NCLモデルマウスの一種であるカテプシンD（CTSD）欠損マウスを用いて、膜が変性した異常なリソソームが選択的オートファジーによって処理される可能性を示した。また、オートファジー機能不全CTSD欠損マウスを作成したところ、処理できない異常なリソソームは細胞内に形成されるp62 Bodyの中に集積されることを明らかにした。これらは、生体内でのリソソームの変性過程/処理機構を理解する上で重要な結果であり、より詳細なNCLの病態理解につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リソソームは細胞内の不要物質を分解する重要なオルガネラであり、リソソーム蓄積症をはじめ多くの疾患に関与する。近年、リソソーム自身も損傷を受けた際に選択的オートファジーの標的になることが示されているが、生体内における詳細な機構は未だ多くはわかっていない。CTSD欠損マウス神経細胞内では上記の現象が散見され、生体内におけるリソソームの損傷や修復を理解する上で重要なモデルとなることが分かった。また、NCL病態内で見られる異常リソソームは膜の変性が生じた後にp62やNBR1を介した選択的オートファジーによって処理される可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that autophagy is closely involved in pathogenesis of neuronal ceroid lipofuscin (NCL), however, its details remain unknown. In this research, using cathepsin D (CTSD)-deficient mice, one type of NCL model mice, we showed that abnormal lysosomes with degenerated membranes were degraded by selective autophagy. Furthermore, to investigate the role of autophagy in CTSD-deficient mice, we generated the central nerve tissue specific CTSD/Atg7-double deficient mice, NCL model mice impaired autophagy. In these mice, there were few abnormal lysosomes surrounded by autophagic vacuoles. However, we found that some of lysosomes were captured into p62 bodies formed by the impaired autophagic machinery. These results are important for investigating the degeneration and degraded mechanism of lysosomes in vivo, and useful for understanding of detailed NCL pathogenesis.

研究分野：神経科学

キーワード：カテプシンD オートファジー p62

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経性セロイドリポフスチン症 (NCL) はリソソーム蓄積症の一種に分類される神経変性疾患である。神経細胞内には消耗性色素 (セロイドリポフスチン) を有する異常なリソソームが蓄積し、視覚障害、運動失調、てんかん様けいれん等の症状を示すことが知られている。リソソーム内タンパク質分解酵素であるカテプシン D (CTSD) は NCL の原因遺伝子の一つ (CLN10) に同定されており、CTSD 欠損マウスの神経細胞内でも異常なリソソームが蓄積する。先行研究の結果から、CTSD 欠損マウス神経細胞内には選択的オートファジーに関わるユビキチン、p62、NBR1 が蓄積することが明らかとなり、多数のオートファゴソームが認められるが、NCL とオートファジーとの関係は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

予備実験の結果から、p62 や NBR1 は異常リソソームの表面近傍に集積することが分かった。さらに、異常リソソームの一部はオートファゴソーム様の二重膜により取り囲まれている事が明らかとなった。これらの結果は、CTSD 欠損マウスに蓄積する異常リソソームが選択的オートファジーによって処理される可能性を示唆している。そこで、本研究課題では CTSD 欠損マウス神経細胞内で起こるオートファジーの役割について解析し、NCL の病態解明を目指す。

3. 研究の方法

CTSD 欠損マウスにおける p62 と異常リソソーム関係を明らかにするため、リソソーム膜タンパク質の一種である LAMP1 との免疫染色を行った。また、所属研究室で開発した樹脂包埋切片にて蛍光像と電子顕微鏡像を撮影する In resin CLEM 法を用いて LAMP1 陽性構造と p62 陽性構造の微細形態を解析した。さらに、Western blot 法を用いて CTSD 欠損マウスの脳以外の組織における p62 や NBR1 の蓄積について検討を加えた。

CTSD 欠損マウスにおけるオートファジーの役割を検討するため、オートファジー機能不全モデルである Atg7;Nestin-Cre マウスを掛け合わせて、中枢神経系特異的オートファジー機能不全 NCL モデルマウス (CTSD/Atg7;Nestin-Cre マウス) を作成し、神経細胞内にある異常リソソームの数、サイズについて解析した。また、電子顕微鏡を用いてオートファジー機能不全条件下での異常リソソームの変化について検討を加えた。

4. 研究成果

(1) CTSD 欠損マウス神経細胞内で起こるリソソームの変性

まず、CTSD 欠損マウスの神経細胞内で起こる異常リソソームの変化について確認した。上記の通り、脳内ではユビキチン、p62、NBR1 が蓄積するが、併せて LAMP1 やカテプシン B (CTSB) などのリソソーム関連タンパク質も増加することが分かった。興味深いことに、これら選択的オートファジーに参与する分子 (p62 や NBR1) とリソソーム関連の分子 (LAMP1 やカテプシン B) は、ほとんど共局在しなかった。そこで、p62 陽性構造と LAMP1 陽性構造を電子顕微鏡で解

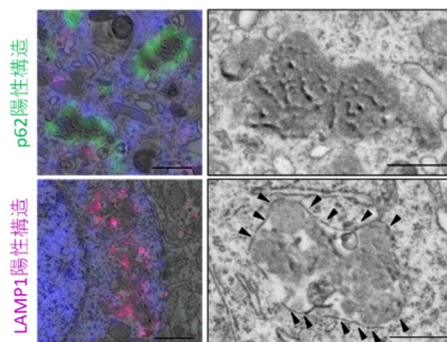


図1 p62/LAMP1陽性構造の電子顕微鏡像

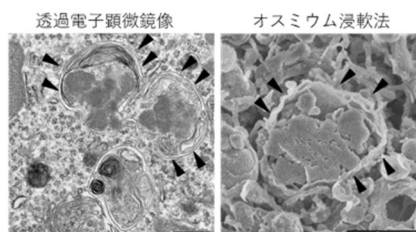


図2 オートファゴソームに取り込まれた異常リソソーム

析したところ、p62 陽性構造の方は電子密度が高く、リソソーム膜が変性していることがわかった。(図1)

CTSD 欠損マウス神経細胞内に蓄積する一部の異常リソソームはオートファゴソーム様脂質二重膜により取り囲まれる。今回、新たに習得したオスミウム浸軟法を用いた解析により、CTSD 欠損マウス神経細胞内に蓄積するリソソームの内部構造は密に凝集していることが分かった。(図2) これらの結果から、p62 や NBR1 の蓄積はリソソームの分解不良によって起こる訳ではなく、内部構造が凝集したリソソームの膜が変性し、p62 や NBR1 を介した選択的オートファジーが誘導されている可能性が示唆される。

(2) CTSD 欠損マウス脳以外の組織における p62、NBR1 の蓄積

生後23日齢のCTSD欠損マウス脊髄、心臓、肝臓、腎臓でのp62、NBR1の蓄積について確認した。興味深いことに、脳同様に脊髄ではp62やNBR1の蓄積が認められるのに対し、心臓、肝臓、腎臓では増加しなかった。(図3)つまり、少なくとも生後23日齢の段階では、異常リソソームへのp62、NBR1の集積は中枢神経系に特異的であり、神経細胞と他の細胞ではリソソームの変性過程が異なる可能性が示唆される。p62やNBR1が蓄積しない他の組織における異常リソソームの内部構造や、選択的オートファジーの誘導については以降で解析を進めていく予定である。

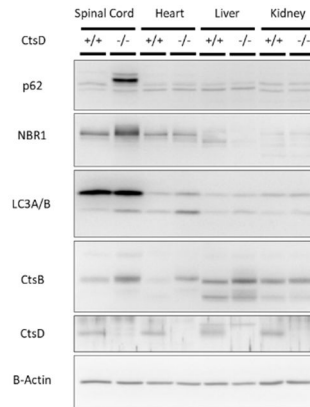


図3 脊髄、心臓、肝臓、腎臓におけるp62、NBR1の蓄積

(3) オートファジー機能不全 NCL モデルマウスにおける異常リソソームの変化

CTSD 欠損マウス神経細胞内におけるオートファジーの役割を検討するため、中枢神経系特異的オートファジー不全モデルマウスを掛け合わせて CtsD^{F/F}/Atg7^{F/F};Nestin-Cre マウスを作成した。CtsD^{F/F};Nestin-Cre マウスと CtsD^{F/F}/Atg7^{F/F};Nestin-Cre マウスの神経細胞内に蓄積する異常リソソームの数やサイズについて比較したところ両者の間で有意な差は認められなかった。(図4)

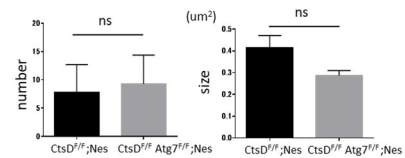


図4 異常リソソーム数、サイズの比較

また、CtsD^{F/F}/Atg7^{F/F};Nestin-Cre マウスではオートファゴソーム様脂質二重膜で取り囲まれた異常リソソームはほとんど見られなかったが、一方で、一部の異常リソソームはオートファジー機能不全で細胞内に形成されるp62 Bodyの内部に集積することを見出した。(図4)

リソソームは内部に多くの分解酵素を持つオルガネラであり、リソソーム膜の変性は細胞死を誘導することが報告されている。本研究課題では、CTSD 欠損マウスの神経細胞内でリソソーム膜が変性してp62などが集積すること

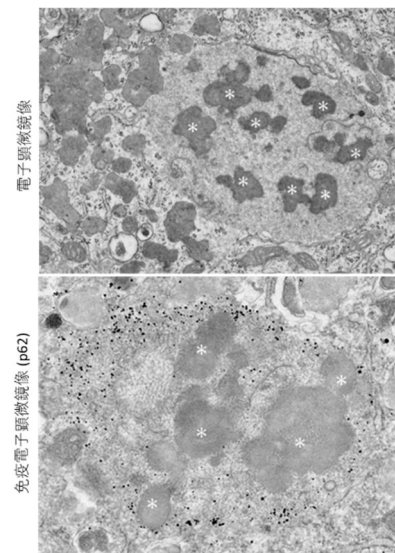


図5 CtsD^{F/F}/Atg7^{F/F};Nesマウスに蓄積する異常リソソーム *はp62 Body内に取り込まれる異常リソソームを示す

ことを示したが、NCLの発症や進行にリソソーム膜の変性が関与する可能性が示唆される。また、オートファジー機能不全条件下でもリソソームの数やサイズに変化はなかったが、異常リソソームはp62 Bodyの中に取り込まれるという新たな現象を見出した。さらに、本研究を通じて、電子顕微鏡解析の中で新たにIn resin CLEM法やオスミウム浸軟法を習得できた。本研究結果については、追加での解析と並行して論文投稿の準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanida Isei, Yamaguchi Junji, Suzuki Chigure, Kakuta Soichiro, Uchiyama Yasuo	4. 巻 72
2. 論文標題 Recent advances in in-resin correlative light and electron microscopy of Epon-embedded cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 383 ~ 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfad028	査読の有無 無
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 Tanida Isei, Yamaguchi Junji, Suzuki Chigure, Kakuta Soichiro, Uchiyama Yasuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Application of immuno- and affinity labeling with fluorescent dyes to in-resin CLEM of Epon-embedded cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e17394 ~ e17394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2023.e17394	査読の有無 無
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 Mitsui Shun, Yamaguchi Junji, Suzuki Chigure, Uchiyama Yasuo, Tanida Isei	4. 巻 71
2. 論文標題 TUNEL-positive structures in activated microglia and SQSTM1/p62-positive structures in activated astrocytes in the neurodegenerative brain of a CLN10 mouse model.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2753 ~ 2769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.24449	査読の有無 無
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 Sanada Takahito, Yamaguchi Junji, Furuta Yoko, Kakuta Soichiro, Tanida Isei, Uchiyama Yasuo	4. 巻 12
2. 論文標題 In-resin CLEM of Epon-embedded cells using proximity labeling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-15438-6	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 Suzuki Chigure, Yamaguchi Junji, Sanada Takahito, Oliva Trejo Juan Alejandro, Kakuta Souichirou, Shibata Masahiro, Tanida Isei, Uchiyama Yasuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Lack of Cathepsin D in the central nervous system results in microglia and astrocyte activation and the accumulation of proteinopathy-related proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-15805-3	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山口隼司
2. 発表標題 カテプシンD欠損マウス神経細胞内に蓄積する異常リソソームを標的とした選択的オートファジーの解析
3. 学会等名 第128回 日本解剖学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口 隼司
2. 発表標題 中枢神経系特異的CTSD / Atg7両欠損マウスを用いた神経細胞内不良リソソームの品質管理機構の解明
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022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

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
---------	---------