

## 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：83903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700386

研究課題名（和文）オリゴデンドロサイトが放出する神経変性因子の同定と受容体の解析

研究課題名（英文）Identification of neurodegeneration-inducing factor released from oligodendrocytes

研究代表者

鈴木 康予（SUZUKI YASUYO）

独立行政法人 国立長寿医療研究センター・バイオリソース研究室・特任研究員

研究者番号：60416188

研究成果の概要（和文）：

多系統萎縮症（MSA）は中枢神経系に発症する神経変性疾患である。MSA の発症機序は十分に解明されておらず、神経変性に対する根本的な治療法がない。これまでの研究で、MSA モデルマウスにおいて、変性したオリゴデンドロサイトの放出する因子が神経細胞内の  $\alpha$ -synuclein の発現を促進し、神経細胞の変性の原因となる  $\alpha$ -synuclein の不溶化を誘導することが示唆された。本研究ではオリゴデンドロサイトから放出され神経変性を誘導する因子の同定とその機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Multiple system atrophy (MSA) is a neurodegenerative disease in which oligodendrocytes and neurons in the central nervous system are affected. To clarify how oligodendrocytic  $\alpha$ -synuclein inclusions cause neuronal degeneration, we generated a transgenic mouse for an MSA model in which human wild-type  $\alpha$ -synuclein was overexpressed selectively in oligodendrocytes. We established primary culture cells derived from the brain of transgenic mice, and revealed that insoluble mouse  $\alpha$ -synuclein was progressively accumulated in neurons, leading to neuronal dysfunction and degeneration. In this study, we identified neurodegeneration-inducing factor released from oligodendrocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：脳神経科学，神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経変性疾患，多系統萎縮症， $\alpha$ -synuclein

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 多系統萎縮症 (MSA) について

MSA は中枢神経系に発症する難治性神経変性疾患で、主な症状は自律神経障害、運動失調及びパーキンソン症候群である。神経変性に対する根本的な治療法はなく、一日も早い治療法の開発が待たれている。MSA の神経病理学的所見の特徴は、オリゴデンドロサイトに $\alpha$ -synuclein が蓄積する封入体 (GCI; Glial Cytoplasmic Inclusion) 形成と神経細胞内における $\alpha$ -synuclein の蓄積である。神経細胞での $\alpha$ -synuclein の蓄積は主に軸索と終末に認められ、パーキンソン病に認められる神経細胞体中出现するレビー小体は稀である。以上の神経病理学的観察より、MSA ではパーキンソン病とは異なる神経変性の機序により発病し、オリゴデンドロサイトと神経細胞の両方に $\alpha$ -synuclein が蓄積する特徴的な病態を有することが明らかになっている。

### (2) 本研究開始までの研究

我々はまず、オリゴデンドロサイトの $\alpha$ -synuclein 蓄積が神経細胞の変性を引き起こすと仮説を立て検討した。MSA モデルマウスとしてオリゴデンドロサイトにヒト $\alpha$ -synuclein を特異的に強制発現させるトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、マウスの脳に起こる神経変性を観察した。Tg マウス脳のオリゴデンドロサイトでは GCI 類似の封入体が形成され、神経細胞では加齢とともにマウス $\alpha$ -synuclein の蓄積と神経細胞数の減少、および脳萎縮や進行性の運動機能障害が生じた (Yazawa et al., 2005)。この結果から、MSA では①オリゴデンドロサイトでの $\alpha$ -synuclein 蓄積による GCI 形成、②変性オリゴデンドロサイトから神経細胞に対する神経変性の誘導、③ $\alpha$ -synuclein の神経細胞内の蓄積による神経細胞の機能障害および細胞脱落の3つのプロセスにより発病すると考えられた。

次に、MSA モデルの Tg マウスの脳から初代神経系細胞培養系を構築し、オリゴデンドロサイトが引き起こす神経細胞変性について検討した。初代培養系でもヒト $\alpha$ -synuclein を発現する Tg マウスのオリゴデンドロサイトとの共培養により、内因性マウス $\alpha$ -synuclein が神経細胞に蓄積し、MSA 患者脳と同様に $\alpha$ -synuclein が不溶化を起こすことが観察された。さらに、神経細胞内でマウ

ス $\alpha$ -synuclein は微小管タンパクの $\beta$ -III tubulin と結合して蓄積しており、この蓄積は微小管重合阻害剤により抑制できることを示した (Nakayama et al., 2009, 2012)。また、初代培養実験では神経細胞の $\alpha$ -synuclein 蓄積メカニズム以外にも、神経細胞変性に関するオリゴデンドロサイトの重要な知見が得られた。神経細胞の変性を起こした Tg マウス脳初代培養細胞の培養液を non-Tg マウスの初代培養細胞に加えて培養すると、神経細胞変性が引き起こされた。以上の結果から、Tg マウス脳において $\alpha$ -synuclein を発現するオリゴデンドロサイトから神経細胞変性を誘導する液性因子が放出されている可能性が示された。

## 2. 研究の目的

多系統萎縮症 (MSA) は中枢神経系に発症する神経変性疾患である。その発症機序は解明されておらず、明確な診断方法や治療法がない。これまでの研究で、MSA モデルマウスにおいて、変性したオリゴデンドロサイトの放出する液性因子が神経細胞内での $\alpha$ -synuclein の発現を促進させ、神経細胞の変性の原因となる $\alpha$ -synuclein の不溶化を誘導する可能性が示唆された。オリゴデンドロサイトから放出される液性因子は治療戦略を立てる場合の直接的なターゲットになり得る。そこで本研究では、MSA の診断法・治療法の開発を目指し、オリゴデンドロサイトから放出され神経細胞での $\alpha$ -synuclein の蓄積を引き起こす因子を同定し、その $\alpha$ -synuclein 誘導能の解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) オリゴデンドロサイトの変性に伴い放出されるタンパク質の精製

オリゴデンドロサイトの変性に伴い放出される因子の精製のため、MSA モデルマウス (Tg マウス) および non-Tg マウス脳の初代培養細胞を用いてコンディションド培地 (conditioned medium) を調製した。Tg マウス、non-Tg マウスのコンディションド培地はそれぞれ分子量分画およびイオン交換クロマトグラフィーによりいくつかの画分に分けた。各画分は SDS-PAGE によって比較分析し、Tg マウス由来培地に特異的なタンパク質の含まれる画分を得た。

### (2) ペプチドマスフィンガープリンティン

グ解析

Tg マウス培地に特異的なタンパク質を含む精製画分は SDS-PAGE によって分離した後、銀染色を行った。Tg マウス培地に特異的に出現するバンドをゲルから切り出し、トリプシンによってゲル内消化を行った。得られたトリプシン消化産物は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) によって質量分析を行った。この質量分析データは MASCOT によりデータベース解析を行い、タンパク質を同定した。

(3) Tg マウス培地由来タンパク質の発現系構築

Tg マウス脳で発現しているタンパク質の遺伝子クローニングのため、Tg マウス脳から RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて RT-PCR 法によって、同定したタンパク質の遺伝子クローニングを行った。得られた cDNA には FLAG-tag 配列を融合させた後、発現用ベクター pcDNA3.1 に組み込んだ。発現ベクターは FuGene6 によって、アフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞にトランスフェクションし、 $\alpha$ -synuclein 発現誘導因子の候補となるタンパク質を発現させた。

(4) 因子候補タンパク質の  $\alpha$ -synuclein 発現誘導能の解析

因子の候補タンパク質の発現細胞からコンディションド培地を調製した。コンディションド培地は凍結乾燥と限外ろ過により濃縮した後、ゲルろ過クロマトグラフィーによって分画し、精製されたリコンビナントタンパク質を得た。

精製された因子の候補タンパク質は分化誘導した神経芽細胞および Non-Tg マウス脳の初代培養細胞に投与し、免疫細胞染色、定量 PCR により詳細に解析を行った。

#### 4. 研究成果

オリゴドンドロサイトに  $\alpha$ -synuclein を強制発現させた MSA モデルマウス (Tg マウス) の中枢神経では、神経細胞に不溶化  $\alpha$ -synuclein の蓄積が経時的に起こり、 $\alpha$ -synuclein の蓄積が神経細胞の減少や脳萎縮を引き起こすことを我々は証明した。さらに、変性したオリゴドンドロサイトから放出され神経細胞の変性を引き起こす因子が存在する可能性を示した。Tg マウス脳において神経細胞での不溶化  $\alpha$ -synuclein の蓄積を引

き起こす因子を探索するため、Tg マウス脳および non-Tg マウス脳の初代培養細胞を用いてコンディションド培地を調製した。Tg マウス、non-Tg マウスのコンディションド培地は分子量分画を用いて粗分画を行った。この画分を SDS-PAGE によって比較検討したところ、20k~100k のサイズに Tg マウス培地に特異的なバンドがいくつか認められた。質量分析に向け各タンパクの精製度をさらに高めるため、ゲルろ過クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーを用いて精製を行い、神経細胞での  $\alpha$ -synuclein の蓄積を誘導する因子の候補となるいくつかの単一のバンドを得た。得られたバンドはゲルから切り取り、ゲル内消化によりフラグメント化し、MALDI-TOF MS を用いてペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 分析を行い、7 種の因子候補タンパク質を同定した。これらはいずれも機能未知のタンパク質であった。

因子の候補となるタンパク質は COS-7 により発現系を構築した。7 種の発現系のうち、発現タンパク質が細胞外に分泌された 4 種類について、細胞培養液から発現タンパク質を精製し、その精製標品を得た。精製した 4 種類の分泌タンパク質は、分化誘導した神経芽細胞と Non-Tg マウス脳の初代培養細胞に投与し、免疫細胞染色、定量 PCR などにより神経細胞の変性の原因となる  $\alpha$ -synuclein 発現誘導能を調べた。その結果、4 種の分泌タンパク質のうち 3 種は投与することによって  $\alpha$ -synuclein の mRNA レベルが上昇することがわかった。そのうちの 2 種では neurite において  $\alpha$ -synuclein が蓄積することが免疫細胞化学的解析により明らかになった。

以上の結果から、本研究で解析を行った分泌タンパク質は神経細胞での  $\alpha$ -synuclein の発現を誘導し、蓄積させることが確認できた。このことから、オリゴドンドロサイトの変性に伴い放出される因子が神経細胞の変性を引き起こすと考えられる。この成果は MSA の発症メカニズムの本質に迫るものであり、MSA の診断法・治療法の開発に向けた第一歩として意義あるものである。今後はオリゴドンドロサイトから放出される因子がどのような機構で神経細胞に影響を及ぼすのかを解明するとともに、その因子の影響を阻害する方法の開発を目指す。

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 3 件)

① Kimiko Nakayama, Yasuyo Suzuki, Ikuru Yazawa. Binding of neuronal  $\alpha$ -synuclein to  $\beta$ -III tubulin and accumulation in a model of multiple system atrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (査読有), 2012, 417: 1170–1175.

[DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.092](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.092)

② Yasuyo Suzuki, Ikuru Yazawa. Pathological accumulation of atrophin-1 in dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* (査読有), 2011, 4: 378–384.

<http://www.ijcep.com/files/IJCEP1103009.pdf>

③ Yasuyo Suzuki, Kimiko Nakayama, Naohiro Hashimoto, Ikuru Yazawa. Proteolytic processing regulates pathological accumulation in dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *FEBS Journal* (査読有), 2010, 277: 4873–4887.

[DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07893.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07893.x)

[学会発表] (計 5 件)

① Yasuyo Suzuki, Kimiko Nakayama, Ikuru Yazawa. Neuronal  $\alpha$ -synuclein binds to  $\beta$ -III tubulin to accumulate in an MSA model. 4th International Congress on Multiple System Atrophy. 2012年3月19日, Toulouse (France).

② 鈴木 康予, 中山貴美子, 矢澤 生. 多系統萎縮症における $\alpha$ -synucleinと $\beta$ -III tubulinの相互作用の分子機構. 第34回日本神経科学大会, 2011年9月15日, パシフィコ横浜 (神奈川県).

③ 伊藤 浩志, 金 成花, 鈴木 康予, 矢澤 生. 多系統萎縮症モデルマウスではオリゴドンドロサイト $\alpha$ -synuclein の蓄積によりシナプス機能の低下が起こる. 第34回日本神経科学大会, 2011年9月16日, パシフィコ横浜 (神奈川県).

④ 鈴木 康予, 矢澤 生. 細胞質におけるDRPLA 蛋白 C 末ペプチドの凝集第 33 回日本神経科学大会, 2010 年 9 月 2 日, 神戸コ

ンベンションセンター (兵庫県)

⑤ 中山貴美子, 鈴木 康予, 矢澤 生. 多系統萎縮症の神経細胞 $\alpha$ -synuclein 蓄積における $\beta$ III-tubulin の役割. 第 33 回日本神経科学大会, 2010 年 9 月 2 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncgg.go.jp/department/lrr/LoRRe.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 康予 (SUZUKI YASUYO)

独立行政法人 国立長寿医療研究センター・バイオリソース研究室・特任研究員

研究者番号: 60416188

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし