

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23700427

研究課題名(和文) アミロイド前駆蛋白を介したトランスサイレチンの発現調節と網膜変性の関係

研究課題名(英文) Pathological relation between retinal degeneration and modulation of transthyretin expression by amyloid precursor protein

研究代表者

藤ヶ崎 純子 (Fujigasaki, Junko)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60312021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄小脳失調症7型(spino cerebellar ataxia type 7: SCA7)は、中枢神経系の変性に加え、網膜変性の合併を特徴とする遺伝性神経変性疾患である。SCA7のモデルマウスを用いた研究を行い、網膜視細胞でのRNA代謝の変動が網膜視細胞の変性に関与している可能性があることを見いだした。また、アルツハイマー病モデルマウスの網膜ではアミロイド関連蛋白の凝集がおきることを新たに見いだした。これまでの神経変性疾患での網膜解析の知見は乏しく、今後の網膜変性疾患の病態解析に繋がる成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder characterized by cerebellar ataxia and retinal degeneration. SCA7, Alzheimer's disease model and normal control mice were examined to elucidate mechanisms of retinal degeneration. In the photoreceptor and ganglion cells of SCA7, nuclear spliceosome altered its structure; these indicated that alteration of RNA metabolism might relate to retinal pathology of SCA7. Aggregation of amyloid precursor related proteins was observed in Alzheimer's disease model mice. These novel findings will contribute to analyze pathogenesis of retinal degeneration in neurodegenerative disorders.

研究分野：神経病理学

キーワード：脊髄小脳失調症 アルツハイマー病 網膜変性

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳失調症7型 (spinocerebellar ataxia type 7: SCA7) は、中枢神経系の変性に加え、網膜変性の合併を特徴とする遺伝性神経変性疾患である。SCA7 は異常に伸張したポリグルタミン配列をもつ原因遺伝子産物の発現により病態が引き起こされるポリグルタミン病と総称される疾患群に属する。ポリグルタミン病ではユビキチン依存性蛋白分解の障害や、転写調節の異常が病態機序として提唱されている。加えて、軸索輸送障害や、シナプス伝達障害、小胞体ストレスに加え、最近ではDNA 損傷修復異常が病態に関わることも報告されている。

SCA7 は稀な神経変性疾患であるが、網膜視細胞の機能が障害される機序を知るための重要な研究対象となりうる。SCA7 の原因遺伝子産物 ataxin-7 は機能不明の蛋白として同定されたが、ataxin-7 の機能の一部はその後明らかになり、転写調節ドメインの構成因子として転写調節に関わることが報告されている。SCA7 では、ataxin-7 の変異に伴って転写調節が障害され、視細胞特異的に発現する蛋白の発現調節に異常が起こることが、視細胞変性の機序として注目されているが、SCA7 における網膜変性のメカニズムの詳細は依然として不明であり、更なる研究による原因の解明が望まれている。

2. 研究の目的

研究代表者らは網膜から得られたcDNA を検索することにより、ataxin-7 がアミロイド前駆蛋白 (Amyloid Precursor Protein: APP) のファミリー蛋白の一つである、Amyloid Precursor Like Protein 2 (APLP2) と結合することを見いだした。この結合は ataxin-7 の変異に伴い強くなり、SCA7 では APLP2 の細胞内動態に異常があることを見いだした⁽¹⁾。APP はアルツハイマー病の病態に関連する重要な蛋白である。アルツハイマー病で脳内に蓄積し老人斑に蓄積するアミロイド (Amyloid :A) は一回膜貫通型蛋白である APP が種々の切断酵素によるプロセッシングを受けることによって切り出される。APLP2 は APP と異なり、配列内に A を持たないが、APP 同様に数種の切断酵素によって切断される。APP と APLP2 のノックアウトマウスの解析により、APP と APLP2 は相補的に機能することが解っている。APP/APLP 蛋白から切り出された細胞内の C 末端ドメイン、細胞であるレチナールが結合したロドプシンなどの視物質が感光色素として存在する。TTR は主に肝臓で産生されるが、網膜色素上皮細胞でも産生され、網膜内での視物質の代謝を調節していると考えられる。そこで、SCA7 の網膜における APP/APLP のプロセッシングの異常が、網膜色

素上皮細胞の TTR 発現を低下させ、網膜視細胞の変性に関与する可能性を考え、SCA7 のノックインマウスを用いた解析を行う研究を計画した。APP とアルツハイマー病発症との関連から、アルツハイマー病モデルマウスも合わせて検討した。

3. 研究の方法

研究対象として、正常対照マウス (Wild type: WT)、SCA7 のノックインマウス (SCA7 5Q/266Q)、変異 APP 遺伝子が導入されたアルツハイマー病モデルマウス (APP:Tg Thy1-APPswDut IowaBWev/J) を用いた。

各群の週齢 15 週~18 週のマウスをパラフォルムアルデヒドで還流固定後、眼球、脳組織を取り出し、パラフィン包埋ブロック、凍結ブロックを作製した。それぞれの標本にて病理組織像を評価し、各種免疫染色を行った。染色に用いた代表的な抗体を表に示す。陽性所見の得られた抗体について、蛍光二次抗体を用い、多重免疫染色を行った。

表 1 検索に用いた主な抗体

SCA7 疾患関連	ataxin-7	核内機能ドメイン	PML
	1C2		collin
網膜組織関連	Rhodopsin		sm
	transthyretin		Fibrillarin
	arrestin	神経変性疾患関連	p-TDP43
APP 関連	APP-Nter		p- α synuclein
	APP-Cter		p-tau
	APLP1-Cter		ataxin-3
	APLP2-Cter	各配列調整	SUN-1
オートファジー関連	LC3	ユビキチン関連	Ubiquitin
	p62		SUMO

4. 研究成果

1) 網膜組織の評価、網膜色素上皮細胞での封入体形成とトランスサイレチンの発現変動

正常対照 (WT) と SCA7 ノックインマウス (SCA7) の網膜組織像を図 1 に示す。WT に比し SCA7 の網膜は高度に萎縮し、外顆粒層に萎縮と核の配列の乱れがあった。外節と内節にも萎縮があり、特に外節が強く萎縮する傾向があった。

SCA7 モデルマウスの網膜では、神経節細胞、内、外顆粒細胞層に加え網膜色素上皮細胞に核内封入体が観察された (図 2)。SCA7 の網膜色素上皮細胞ではオートファジーの亢進が示唆されたが定量的な観察では、正常対照との有意差はなかった。また、SCA7 でのトランスサイレチンの発現変動も明らかではなかった。

正常対照に比べて、アルツハイマー病モデルマウスの網膜では明らかな萎縮、変性像は

認められなかった。

図 1 正常対照と SCA7 モデルマウスの網膜

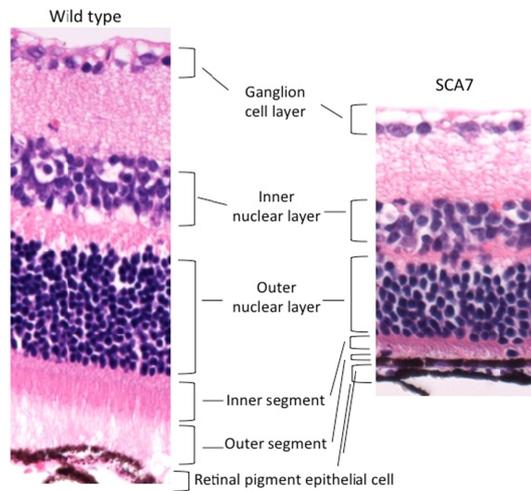
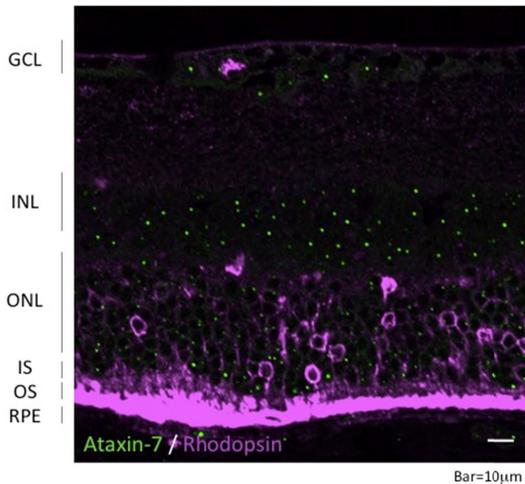


図 2 SCA7 の網膜に形成される核内封入体



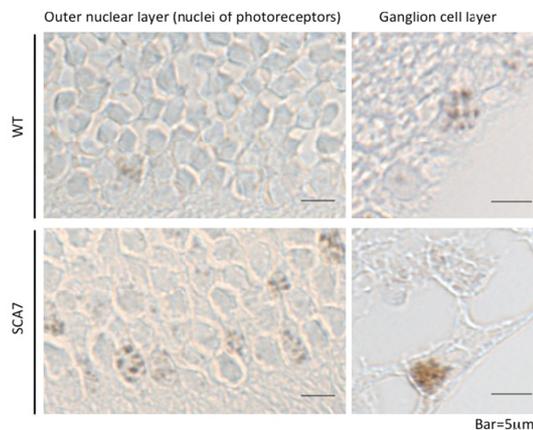
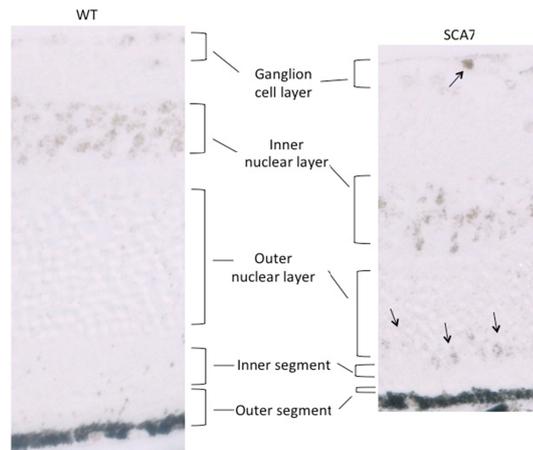
2) 網膜組織における核内機能ドメインの変動

検討の結果、SCA7 網膜組織での網膜色素上皮細胞の機能異常は明らかでないと判断した。そこで、研究代表者らが SCA7 脳の神経細胞で病理学的な重要性を見いだしてきた核内ドメインの変動に着目して、神経節細胞、視神経細胞を評価する実験を行った。その結果、網膜視神経節細胞、視細胞でのスプライセオソームの構造が変化していることを明らかにした。

正常マウスではスプライセオソームのマーカーとなる Sm 抗体の染色では、神経節細胞層、内顆粒層の細胞の核には明瞭な陽性像を認めるが、外顆粒層では明らかな陽性像は認められない。一方で、SCA7 では、sm

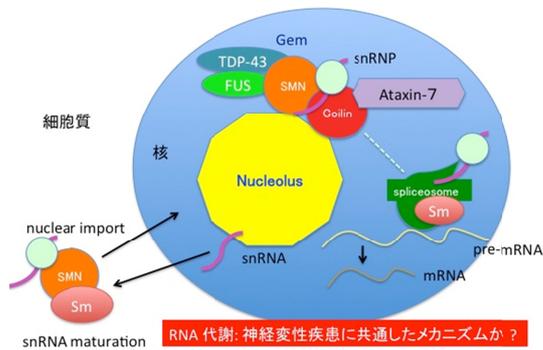
陽性像が外顆粒層の外層の核に陽性となった。また、神経節細胞の一部で核の濃染が観察された(図 3)。

図 3 正常対照と SCA7 モデルマウス網膜での sm 抗体染色像



以上の結果より、SCA7 網膜の神経細胞では RNA 代謝が変化している可能性が示唆された。Ataxin-7 は RNA 代謝を調整する Cajal 小体に関与する蛋白である。Cajal 小体はスプライセオソームと連動して RNA の代謝を調整する。最近、運動ニューロン疾患である筋萎縮性側索硬化症や脊髄性筋萎縮症で、RNA 代謝の変動が神経変性に関与することを示す報告が相次いでおり、ALS の神経細胞の核内に sm 蛋白が蓄積することが報告されている⁽²⁾⁽³⁾。変性を起こす細胞の種類は異なっているが、神経変性に至るメカニズムには共通して RNA 代謝に関わる核内ドメインの機能変化が関連している可能性がある(図 5)。

図 5 神経変性疾患と核内 RNA 代謝の関係



3) SCA7 網膜視細胞の核配列の変動

SCA7 の網膜では高度の萎縮と共に、視細胞の核が存在する外顆粒層で、特徴的な核の配列異常が観察される(図 1)。そこで、網膜視細胞の核配列を調整する SUN-1 蛋白の発現を調べた。結果、対象群の中で SCA7 のみで網膜視細胞での SUN-1 の凝集が確認されたが、これらの凝集は核辺縁にみられ、ataxin-7 の凝集とは関連は明らかではなかった。

4) アルツハイマー病モデルマウスの網膜での APP 関連蛋白の検討

アルツハイマー病モデルマウスでは網膜の萎縮は明らかではなかったが、検索した APP 関連蛋白の中では APLP2 が視細胞の内節で凝集する像がみられた。このような変化は正常対照および SCA7 では観察されなかった。検索したアルツハイマー病モデルマウスは APP 変異を有している。当該モデルでの視機能変化の詳細は未検索であるが、APLP2 の異常凝集がなんらかの視機能変化を惹起している可能性はあり、今後の検索課題である。

5) 網膜での既知の神経変性疾患関連蛋白の検索

神経変性疾患の発症に関連して凝集するとされるりん酸化タウ、りん酸化 シヌクレイン、りん酸化 TDP43 の分布を対象群の網膜組織で検討したが、いずれの蛋白においても異常凝集所見は得られなかった。

(引用文献)

(1) Takahashi-Fujigasaki J et al. Amyloid precursor-like protein 2 cleavage contributes to neuronal intranuclear inclusions and cytotoxicity in spinocerebellar ataxia-7 (SCA7). Neurobiol Dis. 2011;41(1):33-42.

(2) Tsuiji et al. Spliceosome integrity is defective in the motor neuron disease ALS and SMA. EMBO molecular medicine. 2013;5(2):221-34.

(3) Ishihara et al. Decreased number of Gemini of coiled bodies and U12 snRNA level in amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet. 2013;22(20):4136-47.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

藤ヶ崎純子、Annie Sittler. 脊髄小脳失調症 7 型の核内封入体と Cajal 小体の関係 第 54 会日本神経病理学会学術集会 2013 年 4 月 26 日(東京)

藤ヶ崎純子、Annie Sittle. 脊髄小脳失調症 7 型の網膜視細胞での核内ドメインの変化 第 54 会日本神経病理学会学術集会 2014 年 6 月 6 日(東京)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

藤ヶ崎純子 (FUJIGASAKI, Junko)
東京慈恵会医科大学・神経病理学研究室・講師
研究者番号 : 60312021