

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 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～2012

課題番号：23890130

研究課題名（和文） ESCRT 経路を介した蛋白分解系におけるアルツハイマー病の病変形成機序の解明

研究課題名（英文） The molecular mechanism of Granulovacuolar degeneration in Alzheimer disease via ESCRT pathway

研究代表者 永野 義人 (NAGANO YOSHITO)

広島大学大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：50397973

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病(AD)患者の脳に認める Granulovacuolar degeneration(GVD)には ESCRT family である CHMP2B 以外に蛋白凝集体形成に関わる HDAC6 が局在することを病理学的に見出した。また CHMP2B を培養細胞に遺伝子導入させた AD モデル細胞を確立した。HDAC6 は CHMP2B と結合し脱アセチル化することでその機能を調節する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

HDAC6 which is involved in protein aggregation and autophagy located in Granulovacuolar degeneration(GVD) in the brain of Alzheimer disease(AD). We found that the culture cells transfected with CHMP2B constructs would be the AD-model cell line. HDAC6 bound to CHMP2B and could regulate the acetylation level and function of CHMP2B.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：神経内科

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：ESCRT pathway、HDAC6、アルツハイマー病、顆粒空胞変性

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病や前頭側頭葉型認知症の病理学的特徴のひとつである顆粒空胞変性 (Granulovacuolar degeneration; GVD) はもうひとつの病理学的特徴である神経原線維変化と並行して出現し、臨床的には短期

記憶の低下とともに海馬における出現頻度が増加することが報告されている。しかし GVD の形成機序と認知機能低下の関連はいまだわかっていない。最近、申請者らのグループはエンドソーム形成に関わる ESCRT ファミリーのひとつである CHMP2B がアルツハイマ

一病患者の海馬に認められる GVD に存在することを報告した (Yamazaki et al. Neurosci Lett. 2010)。また CHMP2B の遺伝子変異が前頭側頭葉型認知症の原因となることが報告されており、CHMP2B が late endosome である multivesicular body (MVB) と lysosome との融合に関わることが示唆されている。MVB は内部に複数の小胞を内包する膜様構造物で、トポロジカルに GVD に類似する。ESCRT pathway はエンドソームから MVB の形成に至る pathway であり、MVB は autophagosome と同じく lysosome と融合することから、蛋白分解系の一部を構成していると考えられている。申請者らは Duke 大学の Dr. Tso-Pang Yao 研究室においてヒストン脱アセチル化酵素のひとつである HDAC6 が選択的な蛋白分解に関わる autophagosome と lysosome の融合を調節していることを報告し (Lee J. Y. et al. EMBO J. 2010)、さらにダメージを受けたミトコンドリアを分解する機構である mitophagy における lysosome との融合にも関わることを報告している (Lee J. Y., Nagano Y. et al. J Cell Biol. 2010)。予備的な研究で、我々は HDAC6 が GVD に存在することを病理学的に観察しており、HDAC6 が GVD 形成に関与している可能性がある。

Lysosome との融合不全をおこした MVB は肥大化することがわかっているが、どのような機序で融合が調整され、どのように肥大化された MVB が形成されるかはわかっていない。我々の研究室は肥大化した MVB がアルツハイマー病で見られる GVD と酷似することに注目しており、今後 GVD 形成機構に HDAC6 や CHMP2B などの蛋白がどのように関わるかを解明し、アルツハイマー病の病態解明や治療戦略に足がかりをつかみたい。

2. 研究の目的

顆粒空胞変性 (Granulovacuolar

degeneration; GVD) はアルツハイマー病患者の剖検脳に顕著に認められる病理学的特徴であり、神経原線維変化ならびに神経細胞死に密接に関連した所見と考えられている。申請者らは GVD が、ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) pathway を介して形成される multivesicular body (MVB) に関連した細胞内構造物であり、肥大化した MVB であることを明らかにしている。MVB は分子細胞生物学的に詳細に解析されており、lysosome との融合が障害されることで肥大化することが知られている。これらの知見は、ESCRT pathway を介した蛋白分解系の異常がアルツハイマー病における異常な蛋白の蓄積ならびに神経細胞死に関与していることを示唆するものである。本研究では MVB の形態を指標としてアルツハイマー病モデル細胞を解析し、神経細胞死の細胞内過程を詳細に検討することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画では

(1) MVB を形成するアルツハイマー病モデル細胞の確立

(2) アルツハイマー病モデル細胞における MVB 肥大化に関わる新規分子の検索とその相互作用の解析

の2つの研究に主眼を置く。

(1) MVB を形成するアルツハイマー病モデル細胞の確立

下記の3つの系での MVB 形成を共焦点レーザー顕微鏡 (広島大学現有設備) を用い評価する。

① Amyloid β precursor protein (APP) 発現 N2a 細胞 を用いた MVB 形成の観察

② Amyloid β 処理細胞における MVB 形成の観察

③ タウ遺伝子導入細胞における MVB 形成の観察

(2) アルツハイマー病モデル細胞における

MVB 肥大化に関わる新規分子の検索

- ① lysosome 阻害薬による MVB 肥大化の確認
- ② CHMP2B および Rab7 の MVB 肥大化における機能解析
- ③ HDAC6 の MVB-lysosome 融合機構における機能解析
 - a) HDAC 阻害剤を用いた MVB 肥大化の検討
 - b) HDAC6 ノックアウト細胞を用いた MVB 肥大化の解析
 - c) レスキュー実験による HDAC6 の MVB 肥大化における機能解析
- ④ 計画通り進まないときには下記実験も行う。
 - a) APP 発現細胞や SH-SY5Y 細胞を HDAC6 の siRNA でノックダウンし、上記で得られた結果を検証する。
 - b) アルツハイマー病モデル細胞に野生型、変異型 HDAC6 を過剰発現させ、MVB 肥大化への影響をみる。

(3) HDAC6 による CHMP2B・Rab7 の脱アセチル化についての生化学的解析

上記の結果を踏まえ、CHMP2B、Rab7、HDAC6 の相互関係を生化学的手法を用いて解析する。これにより HDAC6 による脱アセチル化が CHMP2B、Rab7 の機能を調節しているかを明らかにする。

① 免疫沈降法による結合実験

SH-SY5Y 細胞や HEK293T 細胞に HDAC6 や CHMP2B の遺伝子を導入し免疫沈降法にて結合をみる。Rab7 については内在性の蛋白の結合について検討する。アルツハイマー病モデル細胞での結合も検討する。

② アセチル化実験

野生型、変異型 HDAC6 を遺伝子導入した細胞を用い、CHMP2B や Rab7 の抗体で免疫沈降した後、抗アセチル化抗体にてウェスタンブ

ロットティングを行う。さらに HDAC6 ノックアウト細胞を用いて同様の実験を行う。

(4) アルツハイマー病脳における病理学的検討 (HDAC6 および Rab7 その他新規蛋白)

上述した MVB 肥大化関連蛋白について、アルツハイマー病剖検脳の海馬切片を用い、GVD との局在を明らかにする。また既知の GVD マーカー (GSK3- β 、CK1、p-Smad など) で肥大化 MVB との同一性を確かめる。

4. 研究成果

アルツハイマー病患者の脳に認める Granulovacuolar degeneration(GVD)には、蛋白凝集体形成や autophagy に深く関わる HDAC6 が病理学的に陽性であることを見出した。我々の研究室では ESCRT ファミリーの一つである CHMP2B が GVD で強く染色されることを報告しており (Yamazaki et al. PLoS One 2011)、HDAC6 が CHMP2B とともに GVD 形成に関わっている可能性が示唆された。

また前頭側頭葉型認知症の原因遺伝子である CHMP2B はその疾患関連変異が報告されており、野生型、変異型 CHMP2B を培養細胞に遺伝子導入すると、それぞれ特徴的な凝集体を形成し、GVD のマーカーの一つである CD63 が陽性となる。これが GVD 形成のモデル細胞となる可能性がある。また培養細胞を用いた免疫沈降法にて CHMP2B は HDAC6 と結合した。HDAC6 は脱アセチル化酵素の一つで、CHMP2B を脱アセチル化しその機能を調節する可能性があり、さらに解析を進めている。

今後、HDAC6 と ESCRT family の関連を生化学的、細胞生物学的に解析を進めていき、GVD 形成にどのような役割をそれぞれしているのか、またアルツハイマー病の治療ターゲットとなりうるのかをさらに解析する予

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永野 義人 (NAGANO YOSHITO)

広島大学大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：50397973

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：