

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500426

研究課題名(和文)核ラミナ構築タンパク質の変異で誘導される神経変性疾患の発症機序

研究課題名(英文)The onset mechanism of neurodegenerative diseases caused by mutation in the genes encoding lamins and nuclear lamina associated proteins.

研究代表者

高森 康晴 (Takamori, Yasuharu)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：50309233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラミン、またラミンと結合する核ラミナ構築タンパク質の遺伝子変異によって、種々の先天性疾患がおきることが知られており、その中には神経変性疾患も報告されている。本研究は「核ラミナ構築タンパク質の変異で誘導される神経変性疾患の発症機序」を明らかにすることを目指し、中枢神経系におけるラミンおよび核ラミナ構築タンパク質の分布パターンを免疫組織学的手法で網羅的に解析した。具体的には、成獣フェレット脳のニューロン分化に伴うラミン・サブタイプの変動パターン、成獣ラット脳の各種グリア細胞におけるラミン・サブタイプの構成パターン、また各種神経系細胞におけるラミン結合タンパク質の構成パターンを解析した。

研究成果の概要(英文)：Mutations in genes encoding lamins and nuclear lamina associated proteins cause diverse human congenital diseases including neurodegenerative disorders. In this study, we investigated the distribution of lamin and nuclear lamina associated proteins in the central nervous system using immunohistochemical method to reveal the onset mechanism of these neurodegenerative diseases. We have revealed the expression patterns for lamin subtypes during neurogenesis in the adult ferret brain, and the composition of lamin subtypes in glial cell types as well as the composition of nuclear lamina associated proteins in neural cell types in the adult rat brain.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経科学 細胞・組織 蛋白質 脳・神経 発生・分化 核膜 核ラミナ ラミン

1. 研究開始当初の背景

ラミンは核膜の裏打ち構造である核ラミナの主要構成タンパク質であり、哺乳類のゲノム上には A/C、B1、B2 の 3 種類のサブタイプが存在する。ラミン遺伝子、またラミンと相互作用する核ラミナ構築タンパク質の変異によって、種々の先天性疾患がおきることが知られており、ラミン病 (laminopathies) また核膜病 (nuclear envelopathies) と総称される。ラミン病や核膜病には Charcot-Marie-Tooth 病 (type2B1) 成人発症型白質ジストロフィーなどの種々の神経変性疾患も報告されている。非神経系のラミン病や核膜病の一部では発症機序の解明や治療法の開発が進んでいるものの、神経変性疾患に関しては、発症機序は明らかになっておらず有効な治療法はない。

哺乳類の成個体 (アダルト) の脳の広範囲には未分化なグリア系前駆細胞 (NG2 陽性細胞) が存在することが知られている。申請者らは、ラット終脳皮質において抗ラミン B1 抗体を用いて核膜を可視化することにより、ニューロン近傍に存在する増殖性の NG2 陽性細胞の核とニューロンの核を識別し、核どうしの距離の測定をおこなった (引用文献)。また NG2 陽性細胞がオリゴデンドロサイトへ分化する過程で、グルタチオン S 転移酵素 pi (GSTpi) の局在が核から細胞質へ変化することを、同様の方法で核膜を可視化することで明らかにした (引用文献)。また哺乳類の成体には側脳室壁の脳室下層および海馬歯状回の 2 ヶ所のニューロン新生領域が存在することが明らかになっている。申請者らはラットのこの領域において、神経幹細胞、神経前駆細胞、成熟ニューロンにおけるラミン・サブタイプの発現を解析し、ニューロンの分化にともなってラミン・サブタイプの成パターンが変動することを明らかにした (引用文献)。また成獣ラットの網膜ではニューロンの細胞種によってラミン A/C のスプライシング・バリエーションの発現に違いがあることを見出している (引用文献)。

2. 研究の目的

当初は以下の研究を予定していた。成体脳のグリア細胞におけるラミン・サブタイプの構成パターンの解析、発生過程の脳におけるラミン・サブタイプの発現パターンの解析、NG2 陽性前駆細胞の分化過程におけるラミン・サブタイプの発現パターンの解析、NG2 陽性前駆細胞に対するラミン遺伝子変異導入の影響の解析。

しかし、ラミン A と C のサブタイプを識別する必要性、フェレットのニューロン新生領域の構築およびラミン発現の解析の追加実験の必要性、ラミン結合タンパク質の解析を優先する必要性、などが生じたため、実験計画を一部変更して以下の研究を目的に設定

した。

- (1) 成獣フェレットのニューロン新生領域の構築およびラミン・サブタイプの発現パターンの解析
- (2) 抗ラミン抗体の最適固定条件の検討
- (3) 脳における A タイプ・ラミン・サブタイプ (A と C) の発現の解析
- (4) 成獣ラットの各種グリア細胞におけるラミン・サブタイプの構成パターンの解析
- (5) 成獣ラットの神経系細胞におけるラミン結合タンパク質の構成パターンの解析

3. 研究の方法

- (1) 成獣フェレットの脳の免疫組織化学的解析

成獣フェレット (オス、約 1 歳半から 2 歳半) の脳のサンプルは以前に調製し、4%ホルムアルデヒドで固定していたものを用いた。クライオスタットで 30 μ m の浮遊切片を作成し、免疫染色を行なった。一次抗体は市販されているものを用いた。ニューロンの各分化段階の細胞に特異的なマーカータンパク質、各種グリア細胞に特異的なタンパク質、ラミンなどに対する抗体を用いて多重染色を行なった。二次抗体は蛍光色素で標識されたものを用いた。切片は共焦点レーザー顕微鏡で観察し、画像を取り込んで解析した。一部の抗体は、抗原特異性をイムノプロット法で確認した。

- (2) 成獣ラットの脳の免疫組織化学的解析

成獣ラット (オス、8 週齢) の脳を調製した。固定法は 4 通り行ない、各抗体の免疫染色性を調べて最適条件を割り出す作業を行なった (メタノールアセトン固定、4%ホルムアルデヒド固定、1%ホルムアルデヒド弱固定、4%ホルムアルデヒド固定後、熱処理で抗原賦活化)。メタノールアセトン固定では、生の試料を切片にし、スライドグラスに貼り付けた後で固定した。ホルムアルデヒド固定では、動物を灌流固定した後で脳を 30 μ m にスライスし、浮遊切片として保存した。

一次抗体は市販のものを用いた。使用抗体は研究対象に応じて変え、多重染色の場合は複数を組み合わせて使用した。各ラミン・サブタイプに特異的な抗体、各ラミン結合タンパク質に対する抗体、細胞種に特異的なマーカータンパク質に対する抗体、などを用いた。二次抗体は蛍光色素で標識されたものを用いた。切片は共焦点レーザー顕微鏡で観察し、画像を取り込んで解析した。

一部の抗体は、アビジン・ビオチン系のシステムを用いて DAB で発色し、抗体の染色性を確認した。切片は明視野顕微鏡で観察した。また一部の抗体は、抗原特異性をイムノプロット法で確認した。

4. 研究成果

- (1) 成獣フェレットのニューロン新生領域の

構築およびラミン・サブタイプの発現パターンの解析

他の哺乳類で確認されている2カ所のニューロン新生領域を解析した。側脳室壁から嗅球にかけての領域では、神経前駆細胞の集団が見られ、これは吻側細胞移動経路(RMS)に相当する構造であり、周囲にはGFAPおよびビメンチン陽性のアストロサイトの集積が見られた。げっ歯類とは異なり側脳室が前方(頭方)に伸びており、上衣細胞に囲まれた構造が嗅球内部にまで見られた。海馬歯状回は「飼葉桶(トラフ)状」の角張った形状であり、げっ歯類とは異なっていた。側脳室壁から嗅球、および海馬歯状回における神経幹細胞や神経前駆細胞の分布、形状、免疫組織学的な性質はげっ歯類にもものと類似していた。

ダブルコルチン陽性の神経前駆細胞におけるラミンA/CおよびB1の存在について解析した。前駆細胞ではラミンA/Cは陰性であり、ラミンB1は成熟ニューロンに比べて強陽性であった。この存在パターンは成獣ラットで報告したものと類似していた。

この成果は食肉目イタチ目における2カ所のニューロン新生領域を初めて解析したものである。またニューロン分化におけるラミンの変動パターンが哺乳類の種(目)を超えて保存されていることを示した初めての報告である。結果は学会で発表し、また論文を投稿しアクセプトされた。

(2) 抗ラミン抗体の最適固定条件の検討

AタイプのラミンにはラミンAとラミンCの2種類がある。これらは単一のLAMA遺伝子から生じるスプライシング・バリエーションであり、C末のアミノ酸配列が異なる。従来はラミンAとCに共通なアミノ酸配列に対する抗体を用いた解析が主流であったが、近年ラミンAおよびCに特異的な抗体が市販され始めた。当研究室でもラミンAおよびCに特異的な抗体を購入し、すでに網膜における解析を行っている。

今回は、成獣ラットの脳切片において他の抗体と組み合わせて免疫多重染色を行える最適固定条件の検討を行なった。2種類の抗体とも、4%ホルムアルデヒド固定後に熱処理で抗原賦活化をする条件が良好であることを確認した。

ラミンB1、ラミンB2に対する抗体についても同様の検討を行なった。抗ラミンB1抗体では1%ホルムアルデヒドによる弱固件、抗ラミンB2抗体では4%ホルムアルデヒド固定後に熱処理で抗原賦活化する条件で染色が良好であることを確認した。

(3) 脳におけるAタイプ・ラミン(AとC)の発現の解析

多くの組織においてはAタイプのラミン(AとC)はともに存在するが、近年、中枢神経系においてはラミンCが優位でありラ

ミンAは量的に少ないという報告がある。そこでラミンA特異的抗体、ラミンC特異的抗体、ラミンAとCの両方を認識する抗体を用いて、成獣ラットの脳におけるラミンAとCの存在について免疫組織学的に解析した。

ラミンA/Cの両方を認識する抗体とラミンC特異的抗体の染色パターンは類似しており、脳におけるラミンA/C陽性細胞の多くは、ラミンC陽性であった。一方ラミンA特異的抗体で認識される細胞は脳では少量であった。グリア細胞については(4)でさらなる解析をおこなった。しかしニューロンに関しては、ラミンCが弱陽性のものも一部見られ、さらなる解析が必要と考えられた。

(4) 成獣ラットの各種グリア細胞におけるラミン・サブタイプの構成パターンの解析

成体ラットの終脳皮質に存在する各種グリア細胞における、ラミン・サブタイプ(A、C、B1、B2)の構成パターンについての解析を行なった。この解析は3種類のラミン・サブタイプ(A/C、B1、B2)として以前から行なっていたが、今回はラミンAとCを識別する上記の抗体を導入し、4種類のサブタイプで改めて解析した。

グリア細胞におけるラミン・サブタイプの構成パターンは、ニューロンのパターンと異なっており、またグリア細胞間でも一部異なっていた。アストロサイトと成熟オリゴデンドロサイトはよく似たパターンを示したが、オリゴデンドロサイト前駆細胞では成熟オリゴデンドロサイトと比べて、ラミンCおよびラミンB1の存在パターンが異なっていた。ミクログリアと髄膜内のマクロファージは、共にIBA1陽性でよく似た細胞種であるが、ラミンの構成パターンに違いがあった。脳内の血管内皮細胞におけるパターンは、ニューロンおよびグリア系の細胞とも異なっていた。

この成果はグリア細胞におけるラミンの構成パターンを網羅的に解析した初めてのものである。ラミン遺伝子の変異による神経変性疾患の解明に大きく貢献するものと考えられる。現在これらのデータをまとめ、論文を執筆中である。

(5) 成獣ラットの神経系細胞におけるラミン結合タンパク質の構成パターンの解析

成体の脳における各種の神経系細胞における3種類のラミン結合タンパク質(LAP1、LAP2-beta、LBR)の存在パターンについて成獣ラットを用いて解析した。3種類のラミン結合タンパク質はニューロンおよび各種グリア細胞において異なるパターンを示した。このパターンはラミン・サブタイプの構成パターンと一部において関連性を示した。

なおラミン結合タンパク質であるエメリンに関しても、抗体を購入して解析を行なったが、ラットの脳切片においては良好な染色が見られず、新たな市販抗体の探索および染

色条件の検討が必要であることがわかった。
この成果は神経系細胞におけるラミン結合タンパク質の構成パターンを網羅的に解析した初めてのものである。ラミン遺伝子、また核膜タンパク質の遺伝子変異による神経変性疾患の解明に大きく貢献するものと考えられる。結果の一部は学会で発表した。

<引用文献>

Perineuronal germinal cells in the rat cerebral cortex.
Kataoka Y, Tamura Y, Takamori Y, Cui Y, Yamada H.
Med Mol Morphol. 39 (1): 28-32, 2006

Tamura Y, Kataoka Y, Cui Y, Takamori Y, Watanabe Y, Yamada H.
Intracellular translocation of glutathione S-transferase pi during oligodendrocyte differentiation in adult rat cerebral cortex in vivo.
Neuroscience. 148 (2): 535-540, 2007

Differential expression of nuclear lamin, the major component of nuclear lamina, during neurogenesis in two germinal regions of adult rat brain.
Takamori Y, Tamura Y, Kataoka Y, Cui Y, Seo S, Kanazawa T, Kurokawa K, Yamada H.
Eur J Neurosci. 25 (6): 1653-1662, 2007

Nuclear lamins are differentially expressed in retinal neurons of the adult rat retina.
Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Koike T, Kubota Y, Takamori Y, Yamada H.
Histochem Cell Biol. 136 (4): 427-436, 2011

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 3件)

Takamori Y, Wakabayashi T, Mori T, Kosaka J, Yamada H.
Organization and cellular arrangement of two neurogenic regions in the adult ferret (*Mustela putorius furo*) brain.
The Journal of comparative neurology 522(8): 1818-1838, 2014
査読有
DOI: 10.1002/cne.23503.

Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Takamori Y, Hirahara Y, Yamada H.
Sox2 in the adult rat sensory nervous system.
Histochemistry and cell biology 141 (3): 301-309, Erratum in: 141 (4): 455, 2014

査読有
DOI: 10.1007/s00418-013-1158-x.

Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Kurokawa K, Yamada H.
Differential responses of endogenous adult mouse neural precursors to excess neuronal excitation.
The European journal of neuroscience 36 (9): 3184-3193, 2012
査読有
DOI: 10.1111/j.1460-9568.2012.08244.x.

〔学会発表〕(計 21件)

Hirahara Y, Wakabayashi T, Konke K, Mori T, Koike T, Takamori Y, Ono K.
Role of pro-oligodendroblast antigen in oligodendrocyte differentiation
第120回日本解剖学会総会・全国学術集会
第92回日本生理学会大会 合同大会(神戸国際会議場・展示場、兵庫県神戸市)
平成27年3月23日

Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Takamori Y, Yamada H.
Immunohistochemical study of axonic satellite glial cells in rat DRG
第120回日本解剖学会総会・全国学術集会
第92回日本生理学会大会 合同大会(神戸国際会議場・展示場、兵庫県神戸市)
平成27年3月23日

Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Kurokawa K, Yamada H.
Cell cycle analysis of endogenous neural precursors in the adult mouse brain after brief seizures
第120回日本解剖学会総会・全国学術集会
第92回日本生理学会大会 合同大会(神戸国際会議場・展示場、兵庫県神戸市)
平成27年3月22日

平原幸恵, 若林毅俊, 小池太郎, 高森康晴, 矢尾育子, 後藤仁志, 小野勝彦, 山田久夫
オリゴデンドロサイト発生初期におけるスルファチド脂肪酸の変化
第55回日本組織細胞化学会総会・学術集(松本市中央公民館、長野県松本市)
平成26年9月27日

Wada-Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Takamori Y, Yao I, Gotoh H, Honke K, Ono K, Yamada H.
The sulfatide with short chain fatty acids is dominant in the oligodendrogenesis region of the embryonic spinal cord.
第37回日本神経科学大会

(Neuroscience2014)(パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)
平成 26 年 9 月 12 日

Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Takamori Y, Yamada H
Proliferating glial cells in the normal young adult rat DRG.
第 37 回日本神経科学大会 (Neuroscience2014)(パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)
平成 26 年 9 月 12 日

平原幸恵, 若林毅俊, 森徹自, 小池太郎, 高森康晴, 矢尾育子, 伊藤誠二, 後藤仁志, 本家孝一, 小野勝彦, 山田久夫
鶏胚脊髄オリゴデンドロサイト O4 抗原の実態解析
第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (自治医科大学キャンパス、栃木県県下野市)
平成 26 年 3 月 27 日

高森康晴, 若林毅俊, 森徹自, 平原幸恵, 小池太郎, 小坂淳, 山田久夫
食肉目フェレットの側脳室壁・嗅球系および海馬歯状回の組織学的解析
第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (自治医科大学キャンパス、栃木県県下野市)
平成 26 年 3 月 27 日

Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Takamori Y, Yamada H
Identification of Sox2-positive cells in somato-sensory nervous system.
Society Neuroscience 43rd Annual Meeting (San Diego, California)
平成 25 年 11 月 12 日

Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Yamada H
Chromatin remodeling in neurons in the caudate-putamen after excessive neuronal excitation.
Society Neuroscience 43rd Annual Meeting (San Diego, California)
平成 25 年 11 月 10 日

平原幸恵, 若林毅俊, 森徹自, 小池太郎, 高森康晴, 矢尾育子, 伊藤誠二, 後藤仁志, 小野勝彦, 山田久夫
質量分析イメージングを用いたオリゴデンドロサイト分化マーカー O4 抗原実態解析
第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (航空会館、東京都港区)
平成 25 年 9 月 28 日

小池太郎, 若林毅俊, 森徹自, 平原幸恵, 高森康晴, 山田久夫

脊髄神経節のサテライト細胞における Sox2 の分布とその意義
第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (航空会館、東京都港区)
平成 25 年 9 月 28 日

Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Takamori Y, Yamada H
Localization and role of Sox2 in the adult rat DRG.
Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会)(国立京都国際会館、京都府京都市)
平成 25 年 6 月 22 日

Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Yamada H
Effects of dopaminergic system on chromatin remodeling in neurons after status epilepticus.
Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会)(国立京都国際会館、京都府京都市)
平成 25 年 6 月 20 日

森徹自, 若林毅俊, 平原幸恵, 高森康晴, 小池太郎, 山田久夫
線条体ニューロンにおけるヒストンのリン酸化上昇
第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (サンポートホール高松・かがわ国際会議場、香川県高松市)
平成 25 年 3 月 28 日

平原幸恵, 若林毅俊, 森徹自, 松田賢一, 小池太郎, 高森康晴, 河田光博, 山田久夫
オリゴデンドロサイトにおける膜型エストロゲン受容体 GPER1 の生理機能
第 35 回日本神経科学大会 (名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)
平成 24 年 9 月 20 日

高森康晴, 若林毅俊, 森徹自, 平原幸恵, 小池太郎, 山田久夫
成獣ラット脳のニューロンおよびグリア細胞におけるラミン結合タンパク質の構成パターン
第 35 回日本神経科学大会 (名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)
平成 24 年 9 月 19 日

森徹自, 若林毅俊, 高森康晴, 平原幸恵, 小池太郎, 山田久夫
重積てんかん発作後の脳内におけるクロマチン再構築と遺伝子発現変化
第 35 回日本神経科学大会 (名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)
平成 24 年 9 月 18 日

Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Takamori Y, Yamada H
Histochemical demonstration of Sox2

and cell-markers in sensory nervous system

14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (国立京都国際会館、京都府京都市)
平成 24 年 8 月 29 日

Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Matsuda K, Koike T, Takamori Y, Kawata M, Yamada H

Expression and function of the G protein-coupled receptor 30 in Oligodendrocyte.

14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (国立京都国際会館、京都府京都市)

平成 24 年 8 月 29 日

21. Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Kurokawa K, Yamada H

Cell cycle analysis of neural precursors in the adult mouse subventricular zone

14th International.

Congress of Histochemistry and Cytochemistry (国立京都国際会館、京都府京都市)

平成 24 年 8 月 27 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kmu.ac.jp/medical/2671t80000037o2.html>

<http://www3.kmu.ac.jp/anat1/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高森 康晴 (TAKAMORI Yasuharu)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：50309233

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

山田 久夫 (YAMADA Hisao)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：00142373

若林 毅俊 (WAKABAYASHI Taketoshi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90302421

森 徹自 (MORI Tetsuji)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30285043

和田(平原) 幸恵

(WADA-HIRAHARA Yukie)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：70457969

黒川 清 (KUROKAWA Kiyoshi)

大阪国際大学・人間科学部・教授

研究者番号：40215083

小阪 淳 (KOSAKA Jun)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：40243216

小池 太郎 (KOIKE Taro)

関西医科大学・医学部・大学院生