

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590119

研究課題名(和文)アルツハイマー病および神経分化異常・発達障害発症へのユビキチンリガーゼの関与機構

研究課題名(英文)MECHANISMS OF UBIQUITIN LIGASE IN PATHOGENESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE AND ABNORMAL NEURODIFFERENTIATION/DEVELOPMENTAL DISORDERS

研究代表者

大熊 康修 (Okuma, Yasunobu)

千葉科学大学・薬学部・教授

研究者番号：20127939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)発症原因としての検討を行い、AD患者死後大脳皮質を用いた解析の結果、細胞内小器官の小胞体に蓄積した異常タンパク質を分解する過程に関与するユビキチンリガーゼHRD1がAD患者の大脳皮質では、特異的に減少していた。その原因は酸化ストレスによるHRD1タンパク質の不溶化により特異的に減少することが発症の原因の一つであることを明らかにした。

また、小胞体にストレスを負荷すると神経幹細胞からの神経分化の過程や神経突起形成に異常をきたすこと。また、この過程に増加したHRD1が関与することの可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The E3 ubiquitin ligase HRD1 is found in the endoplasmic reticulum membrane of brain neurons and is involved in endoplasmic reticulum-associated degradation. HRD1 levels are significantly decreased in the cerebral cortex of Alzheimer's disease patients because of its insolubility. The mechanisms were shown that HRD1 protein was insolubilized by oxidative stress. Thus, oxidative stress-induced HRD1 insolubilization might be involved in Alzheimer's disease pathogenesis. Neural stem cells (NSCs) play an essential role in development of the central nervous system. Endoplasmic reticulum (ER) stress induces neuronal death. However, it is unclear whether ER stress directly affects neurogenesis-related processes such as neuronal differentiation and dendrite outgrowth. In the present study, ER stress caused aberrant neuronal differentiation from NSCs followed by the inhibition of neurite outgrowth. These events may be mediated by increased HRD1 expression.

研究分野：神経薬理学

キーワード：小胞体ストレス アルツハイマー病 神経分化 発達障害

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病やアルツハイマー病および脳梗塞などの脳・神経変性疾患においては小胞体に異常蛋白質の蓄積・凝集が認められ、これが脳・神経変性疾患の病態に重要な役割を演じていることが推定されるようになった。このような背景から変性蛋白質の凝集・蓄積を防止する薬物、特に小胞体ストレスを抑制する医薬の開発が望まれている。私たちの研究室では、(1)修復不能な変性蛋白質を小胞体より排出し、分解を促進する小胞体関連分解 (ER-associated degradation; ERAD) に関与するユビキチンリガーゼの一種である新規遺伝子 HRD1 のクローニングに成功し (論文 1) HRD1 が小胞体ストレスによる細胞死を抑制することを見出した (論文 1)、(2) 最近、HRD1 が AD 発症に関わるアミロイド (A $\beta$ ) の前駆体タンパク質 (APP) の分解を促進することで、A $\beta$  の産生を減少させることを明らかにするとともに、AD 患者の死後大脳皮質において、HRD1 タンパク質量が低下しているという興味深い事実も見いだした (論文 2)。さらに、(3) この AD 患者死後脳での HRD1 の発現低下は A $\beta$  の産生と逆相関すること (論文 3) この減少は不溶性画分での HRD1 の増加が原因であること (論文 4) を証明した。これらの新知見に基づき、申請者らは、AD 発症機構に HRD1 発現減少による ERAD の破綻と小胞体ストレスが関与する可能性を初めて提唱した。また予備実験において、過酸化水素処理が不溶化を増強させる結果を得た。そこで本研究課題では、AD 患者での HRD1 発現減少の原因は、HRD1 タンパク質が凝集ないし不溶化すること、および酸化ストレスがその原因の一つではないかとの着想に至った。

また抗 HRD1 抗体を用いて HRD1 のマウス脳内組織局在を詳細に検討した結果、グリア細胞には発現せず、黒質、海馬、大脳皮質、小脳プルキンエ細胞の神経細胞に特異的な局在を明らかにした (論文 5)。さらにごく最近、側脳室周囲および海馬歯状回に存在する神経幹細胞に HRD1 が発現していることを見いだした。神経幹細胞は自己増殖能、神経・グリア細胞への分化能を有しているが、脳虚血

などによる神経細胞障害後に神経新生が惹起されることが報告されている。

さらに予備実験において、胎生期から発達期までの神経幹細胞モデルとして P19 細胞 (マウス胚性腫瘍細胞) を用いて、小胞体ストレス誘導試薬暴露の影響を検討したところ、神経・グリア細胞への分化能に異なる影響が認められる知見を得たこと。分化が促進された神経細胞においては成熟が不十分である兆候が認められたこと。さらにこの小胞体ストレス誘導時に HRD1 が発現誘導されること、とともに HRD1 を発現抑制すると、神経・グリア細胞への分化能異常が回復する成績を得つつある。このような知見から、小胞体ストレスならびに HRD1 は神経細胞の発生・成長・分化に重要な役割を演じているのではないかとの着想に至った。

また、近年注目を集めている発達障害 (自閉症、注意欠陥多動性障害、学習障害、アスペルガー症候群など) とくに自閉症は近年、後天的よりも出産までの遺伝子異常や妊娠中の各種ストレスがその発症に関連していること、接着分子である neurexin や neuroligin が発症に関与することが報告された。自閉症の発症に neurexin の異常分解による凝集・蓄積が記憶障害を惹起することなどから、発達障害発症に、小胞体ストレスならびに、異常タンパク質分解に関与する HRD1 が何らかの寄与をしているのではないかとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

申請者らは、変性タンパク質分解に関与するユビキチンリガーゼ HRD1 が、アルツハイマー病 (AD) の原因タンパク質アミロイド (A $\beta$ ) の前駆体タンパク質 (APP) の分解を行うこと、さらに HRD1 が AD 患者死後大脳皮質において減少していることを見いだした。その原因として HRD1 タンパク質の不溶化が関与する可能性が示唆された。また、抗 HRD1 抗体を用いて HRD1 のマウス脳内組織局在を詳細に検討した結果、脳における神経細胞特異的な局在を明らかにした。さらにごく最近、側脳室周囲および海馬歯状回に存在する神経幹細胞に HRD1 が発現していることを見い

でした。

本研究では、HRD1 タンパク質の不溶化機構を解明するとともに、HRD1 ノックアウトマウスが AD 様症状を呈するかを検討することで HRD1 と AD 発症との関係を探る。さらに小胞体ストレスならびにユビキチンリガーゼ HRD1 が、神経新生・神経細胞分化にいかに関与するかを検討するとともに、発達期における神経分化やシナプス形成・発達障害にどのような役割を演じているかを、培養神経幹細胞を用いた *in vitro* および胎生マウス *in vivo* の系で解明することが目的である。

### 3. 研究の方法

AD 患者脳における HRD1 の減少機構とその AD 発症への関与を解明するため、酸化ストレス・小胞体ストレス・A $\beta$ ・Tau による HRD1 不溶化について、培養神経細胞およびマウスを用いて検討する。また、加齢に伴う HRD1 タンパク質の減少・不溶化について、抗酸化薬による HRD1 保護効果をマウスを用いて検討する。さらに、HRD1 の不溶化機構について、アグリソーム形成とその機構を解析する。HRD1 の AD 発症への関与を解明するため、HRD1 のノックアウトマウスが AD 症状を呈するかを検討する。神経細胞分化モデル細胞としてマウス胚性腫瘍細胞 P19 細胞を用い、弱い小胞体ストレス負荷による神経系細胞・グリア細胞分化への影響と、それに伴う小胞体ストレスセンサーと HRD1 の発現およびノックダウンによる細胞分化、*proneural gene* の発現量への影響を検討する。さらに、発達障害との関連で、妊娠マウスを用いて小胞体ストレス・HRD1 がシナプス形成能を含めた胎児の神経発達にどのような影響を及ぼすかを、組織化学的・行動科学的に解析する。

### 4. 研究成果

1) 酸化ストレス・小胞体ストレス・A $\beta$  による HRD1 の不溶化  
プレセニリンを安定発現する培養神経細胞に対し、一過性にアミロイド前駆体タンパク質の過剰発現を行うことでアルツハイマー病の発症の原因の一つである、アミロイド (A $\beta$ ) の産生を増加させ、内因性 A $\beta$  による

HRD1 タンパク質の不溶化を検討した結果、HRD1 を含む小胞体ストレスマーカータンパク質が誘導される傾向にあることが明らかとなった。しかしながら、A $\beta$  負荷による HRD1 タンパク質の不溶化は認められなかった。つぎに、小胞体ストレス誘導試薬であるツニカマイシンおよびタブシガルギンにより、小胞体ストレスによる HRD1 の不溶化を検討した結果、小胞体ストレス応答による HRD1 の誘導は認められたが、同ストレスによる HRD1 の不溶化は認められなかった。一方、過酸化水素による酸化ストレスの惹起により、HRD1 が不溶化することが明らかとなった。

さらに、16-20 ヶ月齢におけるヒト変異型アミロイド前駆体タンパク質遺伝子導入 A $\beta$  負荷マウスの大脳皮質においても、HRD1 タンパク質の不溶化は認められなかった。また、タウ負荷によっても HRD1 タンパク質の不溶化は認められなかった。一方、酸化ストレスでは、過酸化水素以外の酸化ストレス試薬であるロテノンおよび 4-ヒドロキシノネナルにより HRD1 タンパク質が不溶化することが明らかとなった。そこで、蛍光免疫二重染色法を用いて、酸化ストレス誘導試薬による HRD1 凝集体形成の可能性について検討を行った。SH-SY5Y 細胞を用いて、 $\alpha$ -tubulin および HRD1 タンパク質に対する蛍光二重染色を行ない、HRD1 タンパク質の細胞内局在の変化について解析を行った。その結果、通常小胞体膜上に局在する HRD1 タンパク質が、酸化ストレス誘導試薬である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ロテノンおよび 4-ヒドロキシノネナルの曝露により、小胞体外に凝集し、微小管形成中心付近に位置することも明らかになり、凝集体であるアグリソーム形成に基づく可能性が示唆された。

したがって、本研究の成果としてアルツハイマー病発症原因としての検討を行い、アルツハイマー病患者死後大脳皮質を用いた解析の結果、細胞内小器官の小胞体に蓄積した異常タンパク質を分解する過程に関与するユビキチンリガーゼ HRD1 がアルツハイマー病患者の大脳皮質では、特異的に減少していた。その原因は酸化ストレスによる HRD1 タンパク質の不溶化により特異的に減少す

ることが発症の原因の一つであることが明らかとなった。

## 2) 神経分化異常・発達障害へのユビキチンリガーゼ HRD1 の関与

神経分化における小胞体ストレスの役割を解明する目的で P19 細胞を用いて胚細胞から神経細胞へ分化させる過程に低濃度のツニカマイシンによる小胞体ストレスを与えた。その結果、10 ng/ml のツニカマイシンは細胞生存率および細胞増殖に影響しなかった。この条件下で、対照群に比べ、ツニカマイシン暴露群でグリア分化が抑制されると同時に神経分化が促進された。さらに、小胞体ストレス負荷は、神経の樹状突起の長さを著明に抑制させた。

さらに、神経幹細胞および神経細胞に特異的に存在するユビキチンリガーゼ HRD1 は、ツニカマイシンにより神経幹細胞内で増加した。一方、この増加した HRD1 を発現抑制することでツニカマイシンによって誘導された神経分化の異常ならびに、神経の樹状突起の長さの抑制を対照群と同程度に回復することを見出した。したがって、小胞体にストレスを負荷すると神経幹細胞からの神経分化の過程や神経突起形成に異常をきたすこと。また、この過程に増加した HRD1 が関与することの可能性が示唆された。

また、小胞体ストレスは、シナプス形成因子かつ自閉症原因因子である Neuroligin3、Neurexin-1 および Shank3 の発現量を著明に抑制させた。以上の結果より、小胞体ストレスはユビキチンリガーゼ HRD1 の発現増加を介して樹状突起の伸張およびシナプス形成を抑制している可能性が示唆された。

一方、バルプロ酸誘発性自閉症モデルマウス脳内において、小胞体ストレスが負荷状態にあること、および神経分化系譜が亢進状態にあることが認められた。また、自閉症モデルマウス脳内においても神経突起の伸長が抑制されていた。さらに、小胞体ストレスによる突起伸長の抑制は P19 細胞だけではなく、マウス大脳皮質由来初代神経細胞においても確認された。したがって、自閉症発症のメカニズムに小胞体ストレスが関与することが示唆された。さらに、小胞体ストレスによ

る自閉症発症にユビキチンリガーゼ HRD1 が関与する可能性が推察された。

## 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 8 件)

Mimori, S, Okuma Y., Kaneko M, Kawada, K Hosoi, T, Ozawa, K, Nomura Y Hamada, H, "Protective effects of 4-PBA derivatives on the neuronal cell death and endoplasmic reticulum stress." *Biol. Pharm. Bull.* 35(1):84-90. (2012)

Kaneko, M, Saito, R, Okuma Y., Nomura, Y.: "Possible involvement of ubiquitin ligase HRD1 insolubilization in amyloid generation," *Biol. Pharm. Bull.* 35(2):269-72. (2012)

Kaneko, M, Okuma Y., Nomura, Y.: "Possible involvement of HRD1, a novel molecule related to endoplasmic reticulum stress, in Alzheimer's disease." *J. Pharmacol. Sci.*; 118(3):325-30 (2012)

Kaneko, M, Okuma Y., Nomura Y.: "Molecular approaches to the treatment, prophylaxis, and diagnosis of Alzheimer's disease: possible involvement of HRD1, a novel molecule related to endoplasmic reticulum stress, in Alzheimer's disease.", *J Pharmacol Sci.*;118(3):325-30 (2012).

Mimori S, Ohtaka H, Koshikawa Y, Kawada K, Kaneko M, Okuma Y., Nomura Y, Murakami Y, Hamana H.: "4-Phenylbutyric acid protects against neuronal cell death by primarily acting as a chemical chaperone rather than histone deacetylase inhibitor." *Bioorg Med Chem Lett.*; 23(21):6015-8. (2013)

Kawada K, Iekumo T, Saito R, Kaneko M, Mimori S, Nomura Y, Okuma Y.: "Aberrant neuronal differentiation and inhibition of dendrite outgrowth resulting from endoplasmic reticulum stress." J Neurosci Res. 92(9):1122-33 (2014)

Saito R, Kaneko M, Kitamura Y, Takata K, Kawada K, Okuma Y., Nomura Y.: "Effects of Oxidative Stress on the Solubility of HRD1, a Ubiquitin Ligase Implicated in Alzheimer's Disease." PLoS One. ;9(5):e94576 (2014)

Mimori S, Koshikawa Y, Mashima Y, Mitsunaga K, Kawada K, Kaneko M, Okuma Y., **Nomura Y**, Murakami Y, Kanzaki T, Hamana H.: "Evaluation of synthetic naphthalene derivatives as novel chemical chaperones that mimic 4-phenylbutyric acid." Bioorg Med Chem Lett.;25(4):811-814 (2015)

〔学会発表〕(計 22件)

川田浩一, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修: 小胞体ストレスによる突起伸張抑制に対するユビキチンリガーゼ HRD1 の関与: 第 35 回日本神経科学大会 名古屋 (2012 年 9 月 18-21 日)

齋藤僚, 川田浩一, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修: 「酸化ストレスによるユビキチンリガーゼ HRD1 の不溶化がアルツハイマー病の病態形成に關与する可能性」, 第 86 回日本薬理学会, 福岡 (2013 年 3 月)

川田浩一, 金子雅幸, 齋藤僚, 野村靖幸, 大熊康修: 「小胞体ストレスはユビキチンリガーゼ HRD1 を介して神経成熟を制御する」, 第 86 回日本薬理学会, 福岡 (2013 年 3 月)

齋藤僚, 川田浩一, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修: 「小胞体ストレス応答分子 SEL1L の発現抑制による神経分化およびシナプス形成への影響」, 日本薬学会第 133 年会, 横浜 (2013 年 3 月)

Kawada, K., Kaneko, M., Saito, R., Nomura, Y., Okuma, Y.: "ER stress might be

involved in the inhibition of neuronal differentiation and maturation via ubiquitin ligase HRD1", ISN-ASN 2013 Cancun Meeting, Cancun (April 2013).

Saito, R., Kawada, K., Kaneko, M., Nomura, Y., Okuma, Y.: "Oxidative stress-induced insolubilization of an ubiquitin ligase HRD1 may be involved in amyloid  $\square$  generation", ISN-ASN 2013 Cancun Meeting, Cancun (April 2013).

佐藤亜紗美, 豊田貴大, 齋藤僚, 川田浩一, 大熊康修: 「神経分化におけるユビキチンリガーゼ Dofin の関与」, 第 128 回日本薬理学会関東部会, 東京 (2013 年 7 月)

齋藤僚, 川田浩一, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修: 「小胞体関連分解構成因子 SEL1L の発現抑制による神経分化の抑制」, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013, 熊本 (2013 年 8 月)

川田浩一, 家雲高哲, 齋藤僚, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修: 「小胞体ストレスによる神経突起の伸長抑制」, 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013, 熊本 (2013 年 8 月)

川田浩一, 齋藤僚, 金子雅幸, 野村靖幸, 大熊康修: 「小胞体ストレスによる樹状突起伸長への影響」, 第 43 回日本神経精神薬理学会, 沖縄 (2013 年 10 月)

Omura, Y., Kaneko, M., Saito, R., Okuma, Y., Kitamura, Y., Takata, K., Nishi, A.: "A novel therapeutic target against Alzheimer's disease: HRD1 as endoplasmic reticulum stress-related ubiquitin ligase", 13<sup>th</sup> International Geneva/Springfield symposium on Advances in Alzheimer Therapy, Geneva (March 2014).

Mimori, S., Murakami, Y., Hamana, H., Ohtaka, H., Kawada, K., Kaneko, M., Okuma, Y., Nishi, A., Nomura, Y.: Neuroprotective effects of 4-phenylbutyric acid and its derivatives: possible therapeutics for neurodegenerative diseases. 13th International Geneva/Springfield Symposium on Advances in Alzheimer Therapy, Geneva, Switzerland, 2014. 3/26-3/29

川田浩一，家雲高哲，齋藤僚，金子雅幸，野村靖幸，大熊康修：「自閉症における小胞体ストレスの関与」，第 87 回日本薬理学会，仙台（2014 年 3 月）

金子雅幸，山森正嗣，野口尚樹，齋藤僚，保住功，大熊康修，野村靖幸：「ユビキチンリガーゼ Dofin と RNF19B がアミロイド前駆体タンパク質輸送を介したアミロイド 産生に關与する可能性」，第 87 回日本薬理学会，仙台（2014 年 3 月）

家雲高哲，川田浩一，齋藤僚，野村靖幸，大熊康修：自閉症における小胞体ストレスによる神経分化異常の関与．日本薬学会第 134 年会，熊本，2014-03/27～3/30

齋藤僚，金子雅幸，川田浩一，野村靖幸，大熊康修：ユビキチンリガーゼ HRD1 の不溶化機構における酸化ストレスの影響．第 87 回日本薬理学会年会，仙台，2014-03/19～3/21

川田浩一，家雲高哲，齋藤僚，金子雅幸，野村靖幸，大熊康修：自閉症における小胞体ストレスの関与 第 87 回日本薬理学会年会，仙台，2014-03/19～3/21

Kawada, K., Iekumo, T., Saito, R., Mimori, S., Nomura, Y., Okuma, Y.,: The endoplasmic reticulum stress may contribute to the pathogenesis of the autism spectrum disorders. CINP2014, Vancouver, 2014-06/22～6/26.

Mimori, S., Ohtaka, H., Kawada, K., Kaneko, M., Nomura, Y., Okuma, Y., Murakami, Y., Hamana, H.: Studies of the mechanism of action in protective effect against neuronal cell death of 4-phenylbutyrate and its derivatives for therapeutic agents of neurodegenerative disease. CINP2014, Vancouver, 2014-06/22～6/26.

三森盛亮，大高泰靖，村上泰興，浜名洋，川田浩一，金子雅幸，大熊康修，野村靖幸：ツニカマイシンを用いた神経細胞死に対する 4-フェニル酪酸の作用機作の解明．次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014，大阪，2014-08/30

② 家雲高哲，川田浩一，三森盛亮，大熊康

修，大熊康修：自閉スペクトラム症における小胞体ストレスによる神経成熟異常、第 88 回日本薬理学会年会，名古屋，2015-03/18～3/20

② 川田浩一，家雲高哲，金子雅幸，野村靖幸，大熊康修：小胞体ストレスによる神経成熟異常と神経発達障害、日本薬学会第 135 年会，神戸，2015-03/25～3/28

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
大熊 康修 (YASUNOBU OKUMA)  
千葉科学大学・薬学部・教授  
研究者番号：20127939

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし