

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430049

研究課題名(和文)多系統萎縮症においてストレス顆粒形成機構が果たす役割

研究課題名(英文)Roles of stress granules in the disease process of multiple system atrophy

研究代表者

森 文秋(MORI, FUMIAKI)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60200383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス顆粒は、ストレス状況下で、RNAとRNA結合タンパク質によって細胞質に形成される。神経変性疾患においてRNAからタンパク質への翻訳過程を制御することで、異常たんぱくの産生ならびにタンパク質の異常凝集を防ぐとされる。本研究では、多系統萎縮症患者ならびに正常対照の剖検脳組織、シヌクレイノパチーの細胞モデル、さらに、シヌクレイントランスジェニックマウスを用いて、ストレス顆粒ならびに細胞内分解系に関連するタンパク質の動態を検討した。多系統萎縮症のシヌクレイン封入体の形成過程、神経細胞死との関連を明らかにすることで、多系統萎縮症の予防治療戦略の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Stress granules are cytoplasmic messenger ribonucleoprotein particles that form dense aggregations in the cytosol composed of RNAs and RNA binding proteins that appear when translation is impaired under stress conditions. Stress granules are thought to play an important role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases by acting as seeds for pathological inclusions. To elucidate the significance of formation of stress granule and protein aggregates in the disease process of multiple system atrophy, we examined dynamic changes of stress granule-related proteins and protein degradation systems using tissue samples from multiple system atrophy patients and normal controls and cell and animal models for alpha-synucleinopathy. These results suggested that stress granules marker proteins and protein degradation systems may be therapeutic targets to prevent multiple system atrophy.

研究分野：神経病理学

キーワード：多系統萎縮症 MSA シヌクレイノパチー 封入体 ストレス顆粒 RNA RNA結合タンパク質 HuR

## 1. 研究開始当初の背景

多系統萎縮症 (multiple system atrophy, MSA) ではオリゴデンドログリアの細胞質内封入体 (GCI) に加え、グリア核内 (GNI)、神経細胞質内 (NCI)、神経細胞核内 (NNI)、神経突起内 (swollen neurites) にリン酸化シヌクレインの蓄積が認められる [Neuropathol Appl Neurobiol 30:546, 2004]。MSA の早期例では神経細胞におけるシヌクレインの蓄積は、核内では核膜内側面 (NNI) に、細胞質では核膜外側面 (NCI) に局在している [Neuropathology 33:667, 2013]。シヌクレインは生理的に細胞質と核内に存在し、核膜孔を通過できることを考えると、核膜内外におけるシヌクレインの蓄積は、封入体形成の初期において、核と細胞質の間で RNA 並びに RNA 結合タンパク質の輸送障害、シヌクレインの翻訳や修飾の異常が生じていることを示唆している。

ストレス顆粒 (stress granule, SG) は、ある一定のストレス環境下で RNA と RNA 結合タンパク質によって細胞質内に形成され、膜に囲まれることなく小胞体に随伴する構造体であり、RNA を酸化ストレスなどの異常状態から防御する役割を有する。SG の持続的な出現はタンパク質の翻訳ならびに修飾の異常を意味する。神経変性疾患に出現する TDP-43、FUS、タウなどから成る神経細胞内封入体は、酸化ストレスに応答し SG 関連経路を介して形成されると考えられている。実際、酸化ストレスに応答して細胞防御因子の放出を制御する Nrf2-Keap1 経路の Keap1 が、MSA の GCI と NCI に発現している [J Neuropathol Exp Neurol 72:18, 2013]。さらに最近、家族性 MSA の原因遺伝子として、抗酸化作用に関わるコエンザイム Q10 合成酵素の遺伝子 COQ2 が同定された [BBRC 452: 221, 2014]。これらの所見は MSA の封入体形成に酸化ストレスが関与していることを示唆する。また、GCI および NCI の形成には微小管システムが関与しており、GCI には微小管構成タンパク質である  $\alpha$ -III tubulin も認められる。最近、 $\alpha$ -III tubulin を含有する神経細胞内封入体 (MSA の NCI に類似) が SG マーカー陽性となることを見出した。さらに、MSA 剖検脳を用い、SG マーカーで免疫染色を行ったところ、GCI、NCI、swollen neurites が陽性を示す知見を得た。これらの所見は MSA の封入体形成に SG が関与していることを示唆する。以上の知見から、MSA に出現する封入体も酸化ストレスに反応した SG 関連経路を介して形成されると考えるに至った。そこで本研究では、酸化ストレスが MSA の病態に果たす役割を明らかにし、抗酸化剤などの化合物による治療戦略を検討することとした。

## 2. 研究の目的

(1) ヒト剖検脳組織における SG の組織分布および細胞内局在を明らかにする。MSA

における GCI、GNI、NCI、NNI、swollen neurites と SG の関連について検討する。

(2) シヌクレイノパチー並びに MSA モデルにおける SG 形成の動態を明らかにする。これらのモデルへの酸化ストレスの負荷が封入体形成や細胞死に及ぼす影響を検討する。

(3) モデルマウスに抗酸化剤などの化合物を投与し、その効果の有無を明らかにする。モデルマウスへの化合物投与が及ぼす効果を病理学的、行動学的に検討する。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト剖検脳組織における SG の組織分布および細胞内局在を明らかにするために、MSA の病変部位 (橋および基底核) から薄切したパラフィン切片を用い HE 染色を行った。まず、バーチャルスライドシステム (VS110-L100, オリンパス) で各標本を取り込んだ。脱色後、リン酸化シヌクレイン並びに SG マーカー (eIF3, eIF4G, G3BP1, HuR, PABP-1, Staufen, TIA-1, TIAR, XRN1) 免疫染色 (DAB 発色) を行った。再度、バーチャルスライドシステムで各標本を取り込み、同期化し、これにより、グリア細胞と神経細胞ごとの封入体形成、SG マーカーの免疫染色性を検討した。さらに、MSA の封入体形成に関与するストレス顆粒のマーカーである Hu-antigen R、eukaryotic translation initiation factor 3 および poly(A)-binding protein 1 を正常対照の剖検脳組織を用いて検討した。

(2) MSA 患者ならびに正常対照の剖検脳組織を対象に、細胞内のタンパク質分解系、特にオートファジーを調節している分子群に対する抗体を用い検討した。MSA 患者ならびに正常対照の剖検脳組織を用い、免疫染色とウェスタンブロット (WB) 解析を行った。HEK293 細胞に、AMBRA1、正常型シヌクレインと変異型シヌクレインを遺伝子導入し、免疫沈降法 (IP) ならびに proximity ligation assay (PLA) で評価した。MSA、正常対照の凍結脳組織を用い、IP を行った。

(3) レビー小体病モデルとして開発したシヌクレイントランスジェニックマウス (TG) を用いた。2%トレハロースまたは対照として 2%マルトースを 1 週間自由摂取させた。病理組織学的 (HE 染色、免疫染色)、生化学的 (ウェスタンブロット解析) および行動学的 (モリス水迷路テスト) に検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) ヒト剖検脳におけるシヌクレインならびにストレス顆粒の組織分布および細胞内局在を明らかにするために、MSA 患者ならびに正常対照の剖検脳組織を検討した。その結果、GCI、NCI、swollen neurites は、SG

マーカーのうち、eIF3 は陽性を示したが、他の SG マーカー、eIF4G, G3BP1, HuR, PABP-1, Staufen, TIA-1, TIAR, XRN1 は陰性であった。

MSA の軟膜下アストロサイトにリン酸化シヌクレインの蓄積を認めた。これらは p62、ユビキチンまたは Galias-Braak 染色に陰性であり、線維性凝集を形成していないという点で、MSA における既知の封入体（グリア細胞および神経細胞）とは組織学的に異なっていることを見出した。

（2）剖検脳組織を用いた免疫染色では、正常対照において神経細胞の細胞体が ULK1、ULK2、VPS34 で淡く陽性を示した。AMBRA1 では神経細胞に加え、オリゴデンドログリアの胞体も淡く陽性に染まった。MSA では、AMBRA1 でグリア細胞質内封入体、神経細胞質内封入体が強陽性を示した。凍結脳の WB 解析では、MSA で ULK1、ULK2、AMBRA1 が有意に増加していた。一方、オートファジーの抑制を示唆するリン酸化 AMBRA1 も MSA において有意に増加していた。HEK293 細胞を用いた IP では、AMBRA1 に正常シヌクレインが結合しており、PLA で可視化された。さらに、凍結脳組織を用いた IP でも、AMBRA1 と正常シヌクレインが結合していた。以上の結果は、MSA の病態においてオートファジー上流に何らかの異常が生じていることが示唆された。HEK293 細胞および凍結脳組織を用いた IP から AMBRA1 は正常型シヌクレインと結合していることが確認された。

（3）トレハロース投与により脳内オートファジーの活性化が認められた。トレハロース群とマルトース群で、TG に認められるリン酸化シヌクレイン陽性封入体の数に有意な差は認められなかった。また、タンパク質分解酵素耐性のシヌクレイン蓄積も差は認められなかった。生化学的に不溶性シヌクレインの量はトレハロース群で有意に減少していた。モリス水迷路テストにおいて、トレハロース群では空間認知記憶の改善が認められた。以上の解析から、トレハロースによる脳内オートファジーの活性化はすでに凝集した異常分子を除去するには不十分であった。一方、TritonX-100 に不溶性を示すシヌクレイン量が約 50%にまで減少していたことや複数のシャペロン分子が亢進していたことからトレハロース投与は脳内の代謝系に影響を及ぼしている可能性が示唆され、シヌクレイノパチーの予防治療戦略の重要な候補である。

#### 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 16 件)

1. Miki Y, Tanji K, Mori F, Kakita A,

Takahashi H, Wakabayashi K.

PLA2G6 accumulates in Lewy bodies in PARK14 and idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 645: 40-45, 2017. 査読有 10.1016/j.neulet.2017.02.027

2. Ito M, Nakamura K, Mori F, Miki Y,

Tanji K, Wakabayashi K. Novel eosinophilic neuronal cytoplasmic inclusions in the external cuneate nucleus of humans. *Neuropathology* 36: 441-447, 2016. 査読有 10.1111/neup.12292

3. Miki Y, Tanji K, Mori F, Tataru Y,

Utsumi J, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Fimia GM, Wakabayashi K. AMBRA1, a novel alpha-synuclein-binding protein, is implicated in the pathogenesis of multiple system atrophy. *Brain Pathol*: 2016. 査読有 10.1111/bpa.12461

4. Miki Y, Tanji K, Mori F, Utsumi J,

Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Alteration of Upstream Autophagy-Related Proteins (ULK1, ULK2, Beclin1, VPS34 and AMBRA1) in Lewy Body Disease. *Brain Pathol* 26: 359-370, 2016. 査読有 10.1111/bpa.12297

5. Mori F, Tanji K, Miki Y, Toyoshima Y,

Yoshida M, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H, Wakabayashi K. G protein-coupled receptor 26 immunoreactivity in intranuclear inclusions associated with polyglutamine and intranuclear inclusion body diseases. *Neuropathology* 36: 50-55, 2016. 査読有 10.1111/neup.12237

6. Nakamura K, [Mori F](#), Kon T, [Tanji K](#), [Miki Y](#), Tomiyama M, Kurotaki H, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Yamada M, [Wakabayashi K](#). Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in subpial and periventricular astrocytes in multiple system atrophy of long duration. *Neuropathology* 36: 157-167, 2016. 査読有 10.1111/neup.12243
7. Nakamura K, [Mori F](#), [Tanji K](#), [Miki Y](#), Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Yamada M, [Wakabayashi K](#). alpha-Synuclein pathology in the cranial and spinal nerves in Lewy body disease. *Neuropathology* 36: 262-269, 2016. 査読有 10.1111/neup.12269
8. [Tanji K](#), [Miki Y](#), Maruyama A, [Mori F](#), Mimura J, Itoh K, Kamitani T, [Wakabayashi K](#). The role of NUB1 in alpha-synuclein degradation in Lewy body disease model mice. *Biochem Biophys Res Commun* 470: 635-642, 2016. 査読有 10.1016/j.bbrc.2016.01.093
9. [Wakabayashi K](#), [Mori F](#), Kakita A, Takahashi H, Tanaka S, Utsumi J, Sasaki H. MicroRNA expression profiles of multiple system atrophy from formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Neurosci Lett* 635: 117-122, 2016. 査読有 10.1016/j.neulet.2016.10.034
10. Kon T, [Miki Y](#), [Tanji K](#), [Mori F](#), Tomiyama M, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H, [Wakabayashi K](#). Localization of nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (NR4A3) in Lewy body disease and multiple system atrophy. *Neuropathology* 35: 503-509, 2015. 査読有 10.1111/neup.12210
11. [Miki Y](#), [Tanji K](#), [Mori F](#), Sakamoto N, [Wakabayashi K](#). An autopsy case of refractory epilepsy due to unilateral polymicrogyria in a 65-year-old man: Histogenesis of four-layered polymicrogyric cortex. *Neuropathology* 35: 569-574, 2015. 査読有 10.1111/neup.12219
12. [Mori F](#), [Miki Y](#), [Tanji K](#), Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H, [Wakabayashi K](#). Sortilin-related receptor CNS expressed 2 (SorCS2) is localized to Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* 608: 6-11, 2015. 査読有 10.1016/j.neulet.2015.09.030
13. Nakamura K, [Mori F](#), Kon T, [Tanji K](#), [Miki Y](#), Tomiyama M, Kurotaki H, Toyoshima Y, Kakita A, Takahashi H, Yamada M, [Wakabayashi K](#). Filamentous aggregations of phosphorylated alpha-synuclein in Schwann cells (Schwann cell cytoplasmic inclusions) in multiple system atrophy. *Acta neuropathologica communications* 3: 29, 2015. 査読有 10.1186/s40478-015-0208-0
14. Nakamura K, [Mori F](#), [Tanji K](#), [Miki Y](#), Yamada M, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H, [Wakabayashi K](#). Isopentenyl diphosphate isomerase, a cholesterol synthesizing enzyme, is localized in Lewy bodies. *Neuropathology* 35: 432-440, 2015. 査読有 10.1111/neup.12204
15. [Tanji K](#), [Miki Y](#), Maruyama A,

Mimura J, Matsumiya T, Mori F, Imaizumi T, Itoh K, Wakabayashi K. Trehalose intake induces chaperone molecules along with autophagy in a mouse model of Lewy body disease. Biochem Biophys Res Commun 465: 746-752, 2015. 査読有 10.1016/j.bbrc.2015.08.076

16. Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Maruyama A, Nikaido Y, Mimura J, Mori F, Warabi E, Yanagawa T, Ueno S, Itoh K, Wakabayashi K. p62 Deficiency Enhances alpha-Synuclein Pathology in Mice. Brain Pathol 25: 552-564, 2015. 査読有 10.1111/bpa.12214

〔学会発表〕(計6件)

1. 森 文秋、三木康生、丹治邦和、豊島靖子、吉田眞理、柿田明美、高橋 均、内海 潤、佐々木秀直、若林孝一. ポリグルタミン病および核内封入体病におけるパラスペククル関連蛋白の免疫組織化学的検討. [第57回日本神経病理学会] (2016年6月1日 - 2016年6月3日, ホテルニューキャッスル/青森県・弘前)
2. 森 文秋、丹治邦和、三木康生、豊島靖子、吉田眞理、柿田明美、高橋 均、内海 潤、佐々木秀直、若林孝一. ポリグルタミン病ならびに核内封入体病におけるGタンパク質共役受容体GPR26の局在. [第56回日本神経病理学会] (2015年6月3日 - 2015年6月5日, 九州大学/福岡県・福岡)
3. 森 文秋、三木康生、丹治邦和、柿田明美、高橋 均、内海 潤、佐々木秀直、若林孝一. 筋萎縮性側索硬化症のBunina小体におけるSorCS2の発現. [第56回日本神経病理学会] (2015年6月3日 - 2015年6月5日, 九州大学/福岡県・福岡)

4. Fumiaki Mori, Kunikazu Tanji, Yasuo Miki, Yasuko Toyoshima, Mari Yoshida, Akiyoshi Kakita, Hitoshi Takahashi, Jun Utsumi, Hidenao Sasaki, Koichi Wakabayashi. G protein-coupled receptor 26 immunoreactivity in intranuclear inclusions in polyglutamine and intranuclear inclusion body diseases. [The 3rd Congress of Asian Society of Neuropathology] (2014年11月6日 - 2014年11月8日, Seoul, Korea)

5. 森 文秋、豊島靖子、丹治邦和、柿田明美、高橋 均、若林孝一. 脊髄小脳失調症2型脳に認められた2種類の核内封入体. [第55回日本神経病理学会] (2014年6月5日 - 2014年6月7日, 学術総合センター/東京都)
6. 森 文秋、渡辺柚香、三木康生、丹治邦和、小田桐紗織、衛藤光明、若林孝一. オートファジー/ストレス顆粒関連蛋白陽性のエオジン好性封入体. [第55回日本神経病理学会] (2014年6月5日 - 2014年6月7日, 学術総合センター/東京都)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

森 文秋 (MORI FUMIAKI)  
弘前大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：60200383

##### (2)研究分担者

丹治 邦和 (TANJI KUNIKAZU)  
弘前大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：10271800

若林 孝一 (WAKABAYASHI KOICHI)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：50240768

(3) 連携研究者

三木 康生 (MIKI YASUO)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30709142