

高野 桂	
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第914号
学位授与の日付	平成19年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	メグシン過剰発現ラットを用いた小胞体ストレスと神経変性の関連に関する研究
論文審査委員(主査)	米田 幸雄(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副主査)	小川 智(自然科学研究科・教授), 山田 清文(自然科学研究科・教授), 田熊 一敏(自然科学研究科・助教授), 谷浦 秀夫(医学系研究科・助教授)

Serpinopathies including FENIB (familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies) are caused by intracellular accumulation/polymerization of mutant serine protease inhibitors. Transgenic rats overexpressing megsin (Tg meg), a newly identified serine protease inhibitor (serpin), displayed severe cellular damages in the kidney and pancreas, most likely as a result of enhanced endoplasmic reticulum (ER) stress (*Med. Mol. Morphol*, 2005). We performed further analysis in the central nervous system of Tg meg rats. Tg meg rats demonstrated intraneuronal periodic-acid Schiff (PAS)-positive inclusions distributed throughout deeper layers of cerebral cortex, CA1 of the hippocampus, and substantia nigra. Impaired memory, determined by the water maze test, was also observed in Tg meg animals. Histological and immunological experiments revealed decreased neuronal density, enhanced levels of ER stress proteins, and the activation of caspase-12 and caspase-3 in the hippocampal neurons. Changes in Tg meg brains occurred slowly, and reached the peak 4-6 months after birth. Similar findings were observed in the tyrosine hydroxylase-positive nigro-striatal neurons of Tg meg rats, accompanied with the impairment of motor coordination. These observations suggest vulnerability of hippocampal and nigro-striatal neurons to ER stress, and provide a novel animal model of ER stress and serpinopathy in the brain.

【緒言】

小胞体は、分泌蛋白や膜蛋白が規則正しく折りたたまれ、糖鎖修飾やジスルフィド結合によってその立体構造を整える場であるとともに、細胞内Ca²⁺の主要な貯蔵庫として、また脂質代謝の主要器官として、きわめて多岐にわたる生理作用を有している。一方、虚血、低酸素、熱ショック、アミノ酸飢餓、さらには遺伝子変異などのストレスは、それぞれ異なるメカニズムによって小胞体内に異常な折りたたみ構造を持つ蛋白質 (unfolded protein) の蓄積を招き、小胞体の機能障害を引き起こす (小胞体ストレス)。これらの小胞体ストレスに対して、基本的に細胞はunfolded protein response (UPR)ならびに endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) と呼ばれる小胞体特異的なストレス応答機構によって異常な蛋白の蓄積による小胞体の破綻を回避しようとする。UPRは小胞体内に異常蛋白が蓄積した場合に、蛋白全体の合成を抑制して小胞体内に流入する蛋白を減少させる機構と、glucose-regulated protein (GRP)78 のような小胞体分子シャペロンを誘導して、小胞体内で異常蛋白が変性するのを抑える経路を起動するのに対し、ERADは小胞体内の異常蛋白を細胞質側へ引きずり出し、ユビキチン化して、プロテアソームによって分解するシステムである。しかしながら、強い小胞体ストレスの状態が続くと、細胞はストレスに抵抗できず、自ら細胞死 (主にアポトーシス) を選択する (小胞体ストレス由来細胞死)。このような小胞体ストレスおよび小胞体ストレス由来細胞死は、中枢神経系において、脳虚血、およびアルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病等の神経変性疾患など様々な疾患の発症・進行に関与していることが報告されている。

Tissue plasminogen activator (tPA)とその阻害蛋白 plasminogen activator inhibitor (PAI) に代表されるように、serine protease とその阻害蛋白 serine protease inhibitor (serpins と総称される)は生体内に

おける種々の生命現象に関わっている。一般に **serpins** は複雑な蛋白構造を持ち、小胞体内で高次修飾され、細胞外に運ばれるため、**serpin** 遺伝子の変異は小胞体内に異常な **serpin** 蛋白の蓄積をもたらし、その結果、**serpinopathy** と呼ばれる疾患群を引き起こすことが知られている。中枢神経系でもシナプス可塑性に関与する **serine protease** が存在するが、その阻害蛋白は **neuroserpin** と呼ばれており、**neuroserpin** の変異は **familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies (FENIB)** と呼ばれる神経変性疾患を呈する。**FENIB** は中高年で初発し痴呆を主病態とする神経変性疾患であり、小胞体内に変異した **neuroserpin** が蓄積し **PAS (periodic-acid/Schiff)** 染色陽性の封入体を形成することが病理学的特徴である。**Neuroserpin** は中枢神経系のほとんどの神経細胞に均一に発現しているものの、**PAS** 染色陽性封入体の分布は一様でなく、大脳皮質深層、海馬、黒質緻密層などに偏在することが報告されている。

Mesangial cell-predominant gene with a homology to serine protease inhibitor (Megsin) は東海大学の宮田らによってヒトの腎系球体メサンギウム細胞に発現している新規の **serpin** としてクローニングされた。**Megsin** を全身に強制発現させたトランスジェニックラット (**Tg meg rats**) のホモ接合体では、加齢に伴って、**serpinopathy** に特徴的な **PAS** 染色陽性の細胞内封入体が腎臓とすい臓に認められ、糖尿病、腎不全、低蛋白血症、呼吸器障害などを呈し 12 週齢以前に死亡した。また、**Tg meg rats** の糸球体上皮細胞では小胞体ストレスシャペロンが誘導されており、**Tg meg rats** は小胞体ストレスに関連した新規の腎臓、すい臓における **serpinopathy** を引き起こしたと推察された。異常な蛋白が小胞体に蓄積することにより、小胞体ストレスを引き起こし、細胞死を誘導することは **serpinopathy** の 1 つである **FENIB** や、他の神経変性疾患の発症メカニズムと共通する可能性が考えられるため、本研究では、生後 12 ヶ月を経ても主たる臓器異常の認められなかった **Tg meg rats** のヘテロ接合体を用いて、中枢神経系における詳細な解析を行った。

【方法】

・ **In vivo**における組織化学：**Tg meg rats** および **non Tg rats** を灌流固定し、全脳を摘出して、脳切片を作成した。作成した切片を用いて、**Nissl** 染色、**PAS** 染色および各種抗体（抗 **megsin** 抗体、抗 **ORP150** 抗体、抗 **MAP2** 抗体、抗 **NeuN** 抗体、抗 **TH** 抗体、抗活性化型 **caspase-12** 抗体、抗活性化型 **caspase-3** 抗体）を用いた免疫染色を行った。

・ 行動学的解析：海馬神経回路の機能は、**Morris** 水迷路試験によって評価した。水槽内に透明アクリル製のプラットホームを設置し、ランダムな 3 個のスタート地点から、ラットがプラットホームにたどり着くまでの時間 (**mean latency**) を 7 日間計測した。黒質ドパミン神経細胞の機能として、協調運動をポールテストにより評価した。木製の棒の最上端にラットを上向きにつかまらせ、回転して下を向くまでの時間 (**time to turn around**) と床面につくまでの時間 (**time to reach the floor**) を計測した。

・ **イムノブロッティング**：**Tg meg rats** あるいは **non Tg rats** から得られた脳組織および細胞をホモジナイズし、**SDS** 電気泳動後、各種抗体を 1 次抗体としてウェスタンブロット解析を行った。

・ 細胞内遊離 **Ca²⁺** 濃度測定：海馬由来培養神経細胞に、**Ca²⁺** 感受性蛍光指示薬である **fluo-3** を 15 分間前処理したのち、**ORCA-ER 1394 fluorescent imaging processor** を用いてその蛍光強度変化を観察した。

【結果・考察】

Tg meg rats のヘテロ接合体では、中枢神経系において、**PAS** 染色陽性の細胞内封入体が特徴的な分布で認められ、**FENIB** と類似した大脳皮質深層、海馬 **CA1** 領域、黒質などに多く観察された。一方、線条体や脳幹、小脳などには **PAS** 染色陽性の封入体はほとんど認められず、野生型の **non Tg rats** においても **PAS** 染色陽性封入体は観察されなかった。**PAS** 染色陽性の封入体は、連続切片を抗 **megsin** 抗体で染色した結果その発現が一致していたので、**megsin** を含む封入体であると考えられる。

PAS 染色陽性の細胞内封入体が認められた海馬においては、**Nissl** 染色および **MAP2** 抗体、**NeuN** 抗体を用いた免疫染色の結果から、**Tg meg rats** の加齢に伴って、**CA1** 領域を中心に著明な神経細胞脱落が観察された。同時に **caspase-12** および **caspase-3** の活性化が認められたことから、小胞体由来する神経細胞死が惹起されていることが示唆される。実際、**Tg meg rats** の海馬においては、ウェスタンブロッティングにより小胞体ストレス蛋白である **Oxygen-regulated protein (ORP)150** および **GRP78** の発現上昇が観察された。海馬における神経細胞脱落と一致して、**Tg meg rats** では、**Morris** 水迷路試験によって

評価される短期記憶の障害が確認されたことから、組織学的な神経変性だけでなく、神経回路の機能にも異常をきたしていることが示唆された。Tg meg ratsから得られた海馬由来培養神経細胞は、グルタミン酸による細胞死に対し、non Tg ratsと比較して、明らかに脆弱性を示し、グルタミン酸刺激による細胞内Ca²⁺濃度上昇がより増強されていた。Tg meg ratsではmegsinの発現によって小胞体の機能が低下し、グルタミン酸によるCa²⁺上昇を小胞体が緩衝できないため、細胞内Ca²⁺濃度の持続的な上昇をきたし、カルパインなどの細胞死関連酵素を活性化すると考えられる。

黒質では、緻密層の錐体細胞にPAS染色陽性の細胞内封入体が認められ、網様層の細胞にはほとんど認められなかった。PAS染色陽性の封入体が見られた黒質緻密層の錐体細胞は1) ドパミン神経細胞のマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) が強陽性でmegsinが弱陽性の細胞、2) TH、megsinともに陽性の細胞、3) TH陰性でmegsinが強陽性の細胞の3群に分けることができ、3)の細胞においてmegsinとco-localizeしたPAS染色陽性の封入体が観察された。また、Tg meg ratsの加齢に伴って、より3)を示す神経細胞の割合が増加し、TH陽性を示す神経細胞数の減少が認められたことから、黒質においても海馬と同様に神経変性が誘導されていること、および慢性的に進行する神経細胞死も、megsinが小胞体内に蓄積することによって起こる神経細胞死の繰り返しであることが示唆された。黒質の神経細胞脱落と一致して、Tg meg ratsではポールテストによって評価される協調運動の障害が認められた。また、免疫染色の結果から、Tg meg ratsの黒質でも、non Tg ratsと比較して、ORP150の発現増加が認められ、TH陽性神経細胞の減少とともに活性化型caspase-12の発現増加が観察されたことから、小胞体ストレスに起因する神経細胞死が誘導されていると推察される。

Megsinの過剰発現と小胞体ストレスとの関係をさらに詳しく解析する目的で、Tg meg ratsからアストロサイトを分離培養したところ、non Tg ratsから得られた培養アストロサイトに比べ、ウェスタンブロットティングにおいて小胞体ストレス蛋白質の発現上昇が認められたことから、megsinの発現により潜在的な小胞体ストレスが存在していると考えられる。さらに、Tg meg rats由来の培養アストロサイトは、non Tg ratsに比べ、低酸素曝露による細胞死に対し脆弱性を示し、小胞体ストレス由来細胞死に関与する活性化型caspase-12の発現上昇が認められた。また、Tg meg ratsから得られた培養アストロサイトを低酸素に曝露すると、小胞体内にmegsin蛋白質の蓄積が観察された。

したがって、Tg meg ratsではmegsinを過剰発現することにより、小胞体内に異常なmegsin蛋白質が蓄積され、小胞体ストレスを誘導していることが示唆される。さらに、脳内において、特に小胞体ストレスに対し脆弱な細胞がTg meg ratsにおいて細胞死を起こしていると考えられる。

【結論】

本研究の結果から、megsinを過剰発現させたトランスジェニックラットのヘテロ接合体は小胞体ストレスによるアポトーシス経路で選択的な神経変性を引き起こすモデルとなる可能性が示唆される。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患において小胞体ストレスの関与が示唆される報告が多くなるにつれ、小胞体における蛋白質のフォールディングと品質管理が、疾患発症メカニズムに重要であるとともに治療戦略のターゲットともなり得ることが期待されている。Tg meg ratsにおける神経細胞死のメカニズムを解析することは、serpinopathyを含む細胞内での蛋白質の蓄積が関与する神経変性疾患における神経細胞の機能異常および細胞死のメカニズム解明に有用であると考えられる。

学位論文審査結果の要旨

本研究では、Serine protease の阻害蛋白 serine protease inhibitor (serpins) の一種であるメグシンを、全身に強制発現させたトランスジェニックラット (Tg meg rats) を用いて、中枢神経系における機能変化の可能性を追究した。

まず、脳切片を用いて periodic acid/Schiff (PAS) 染色を行ったところ、大脳皮質深層、海馬、黒質を中心に PAS 染色陽性のメグシン封入体が散在し、その局在部位はヒトで見られる familial encephalopathy with neuroserpin inclusion bodies (FENIB) の場合と類似していた。次に、PAS 染色陽性の封入体が観察された海馬および黒質に特に注目して、Tg meg rats における神経変性を解析したところ、海馬 CA1 領域において、野生型と比較して著明な神経細胞脱落が観察されるとともに、数種類の小胞体ストレス応答蛋白の発現増加と caspase-12 および caspase-3 の活性化が見出された。さらに、Tg meg rats の黒質では、緻密層錐体細胞に PAS 染色陽性の封入体が見られたのに対して、網様層の細胞にはほとんど封入体は見られなかった。この黒質緻密層では、ドパミン神経細胞のマーカである TH (tyrosine hydroxylase) 染色陽性細胞数が、野生型動物よりも著明に加齢に伴って減少するだけでなく、小胞体ストレス蛋白増加や caspase-12 と caspase-3 の活性化が、Tg meg rats の黒質緻密層において認められた。そのうえ、黒質緻密層の神経変性と一致して、Tg meg rats ではポールテストで評価される協調運動能の障害が観察されたので、組織学的な神経変性だけでなく、神経回路としての機能異常が誘発されたと推察される。本研究結果から、Tg meg rats では、中枢神経系においても小胞体内にメグシンが蓄積することにより、小胞体ストレス由来細胞死が誘導されることが明らかとなった。しかしながら、Tg meg rats においては脳全体に均一にメグシンが発現するにもかかわらず、特定脳内部位のみに神経変性が起こることは、小胞体理論に基づくアルツハイマー病やパーキンソン病など神経疾患発症メカニズム解明研究において、本動物が有力なモデルとなる可能性を示唆するものである。

以上の研究成績は、serpins の過剰発現が小胞体ストレスを介して神経細胞変性を誘発する可能性を世界に先駆けて提唱した点で、生物学的および薬理学的観点からも高く評価されるので、論文審査委員会は本論文が博士(薬学)に値すると判断する。