

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料  
〔事後評価用〕

平成16年度採択分

平成22年3月31日現在

研究課題名（和文）

**オートファジー性神経細胞死の分子細胞生物学的研究**

研究課題名（英文）

**Molecular mechanisms of autophagic neuron death**

研究代表者

氏名 **内山安男** (Uchiyama Yasuo)

所属研究機関・部局・職 **順天堂大学・医学部・教授**



推薦の観点： 創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究

研究の概要： 新生仔マウスを用いた低酸素-脳虚血負荷モデルは、ヒト新生児の低酸素-虚血性脳症に類似する。しかし、これまでその傷害の実態は不明であった。私達は、オートファジーをできないマウスを用いて低酸素負荷実験を行ない、海馬錐体細胞の死が防御されることを示した。即ち、本研究で低酸素-脳虚血負荷による錐体細胞の死がオートファジー性によることを遺伝学的に初めて実証することができた。この結果は治療手段を考える上で極めて重要である。

研究分野： 神経科学、細胞生物学

科研費の分科・細目： 神経科学(含脳科学)・神経解剖学・神経病理学

キーワード： オートファジー、神経細胞、リソソーム、カテプシン、脳虚血

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞内で不要な物質をリソソームに送る主要な経路である。そのため、細胞の恒常性の維持に必須で、細胞の生存に働くと考えられている。私達は、脳虚血により死に行く細胞の形態はアポトーシスともネクローシスとも異なり、2型神経細胞死の形態をとると報告した。さらに、リソソームカテプシンDを欠損するマウスはリソソーム溜まり病の病態を呈し、オートファジーが誘導される。しかし、これらを分子レベルで説明できる環境には至っていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、(1) オートファジーが神経細胞の死に関係するか否かを遺伝学的に検証する。(2) 神経変性疾患にオートファジーがどのように関与するのかを、リソソームカテプシン欠損マウスやアルツハイマー病のモデルマウスで検討する。さらに(3) DNAマイクロアレイ法による、ラットの各臓器での遺伝子発現を解析した。

3. 研究の方法

本研究は、創造的・革新的・学際的学問領域を創成する研究を目指している。本研究は“オートファジー性細胞死”が実態として存在するのか、という観点で分子細胞生物学的に解析を進める。

オートファジー関連遺伝子 Atg7 欠損マウスの解析（肝および中枢神経特異的に Atg7 を欠損したマウスの解析）は田中啓二博士（臨床医学研究所）との共同研究（主に、和栗、小池、上野、谷田、内山が担当）。中枢神経特異的 Atg7 欠損マウスを用いて、新生仔の低酸素/脳虚血 (H/I) 負荷実験を施行する（和栗、小池、内山が担当）。Atg7 は、オー

トファゴソーム形成に必須のタンパク質 LC3 の C 末端グリシンにリン脂質を付加するための E1 酵素で、E2 酵素の Atg3 と共に LC3-I (細胞質型) を LC3-II (膜結合型) に変換する。オートファジーの誘導は、この LC3 をマーカーに行なったり、電顕的に解析する。細胞死は NeuN や TUNEL 染色で評価した。また、肝移植に際しての長期冷保存/移植再灌流傷害とオートファジーの関連性や TNF- $\alpha$  と actinomycinD (TNF/ActD) 刺激後の細胞死の形態について解析を加えた（柴田、小池、後藤、内山が担当）。

リソソームプロテアーゼ/オートファジーに関する研究では、カテプシン D や B と L を欠損するマウスの神経系で解析し、オートファジーとの関連性を検討する。同様に、アルツハイマー病 (AD) でも同様に解析する（柴田、小池、後藤、内山が担当）。

その他の Atg 分子 (LC3 や Atg9A) の解析も進めた。DNA マイクロアレイにより、発生期、成長期、成獣、老齢ラットから臓器を採取して、遺伝子発現を解析した（柴田、佐々木、谷田、内山が担当）。

4. 研究の主な成果

臓器特異的 Atg7 欠損マウスを解析した結果、脳では異常反射、ユビキチン複合体の神経細胞への沈着、神経細胞の脱落、神経変性を起こして 10 週以内に個体死に陥る。肝細胞では、同様に古くなったオルガネラの蓄積とユビキチン封入体の沈着がみられた。どちらも p62 の増加がみられたことから、p62/Atg7 のダブル欠損マウスを作製して検討した所、肝臓では様々なマーカーが良くなり、肝腫大がなくなった。しかし、その程度は脳では低く、個体死は抑制できなかった。

#### [4. 研究の主な成果 (続き)]

低酸素/脳虚血負荷実験では、新生仔期、成獣では、オートファジーが強く誘導され、海馬錐体細胞死に陥る。新生仔では、カスパーゼ-3の活性化はみられるが、陽性細胞とTUNEL陽性細胞が一致せず、カスパーゼ-3やカスパーゼ依存性DNaseをそれぞれ欠損するマウスでも錐体細胞は保護されなかった。成獣ではカスパーゼの活性化は起きなかった。Atg7を欠損する新生仔で検討した結果、海馬錐体細胞はほとんど障害を受けなかった。これらの結果から、HI負荷後の海馬錐体の細胞死はオートファジー性であることを遺伝学的に初めて証明できた。オートファジー性細胞死は、ラットの同種移植肝移植においても、長期冷保存/移植再灌流傷害の過程で肝細胞にオートファジーが誘導され、これをwortmanninで抑制すると、個体死も有意に抑制されること、さらには、リソソームプロテアーゼを抑制しても同様に肝細胞の脱落と個体死を有意に抑制することができた。また、典型的なアポトーシスと考えられていたTNF/ActD刺激後の肝細胞死にアポトーシスの経路と独立してオートファジー/リソソームプロテアーゼ、DNaseIIが関与した細胞死の経路が存在することを示すことができた(論文作製中)。これらの結果から、オートファジーは病的な細胞死にかなり関与していること、オートファジー/リソソームプロテアーゼの抑制剤の開発は治療の開発に繋がることが期待されることが明らかとなった。

リソソームカテプシンDやB、Lを欠損するマウスの神経細胞にはセロイドリポフスチンを持ったリソソームが蓄積し、そのモデルマウスであることを報告して来たが、本研究によってオートファジーがリソソーム蓄積の原因であることを明らかにできた。さらに、オートファジーはアルツハイマー病に関与し、パーキンソン病の危険因子の一つである $\alpha$ -シヌクレインはカテプシンDの基質であることを明らかにできた。

他のAtg遺伝子の解析から、LC3は脂肪滴形成に関与することAtg9Aは神経細胞体の小体や軸索の終末に局在し、神経細胞におけるオートファゴソーム形成のキーとなる因子であることが分かって来た。

DNAマイクロアレイで、ラット臓器における発現を網羅的に解析した。その結果を現在発表すべく準備している。

#### 5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

本研究によって、オートファジー性神経細胞死の存在を遺伝学的に世界で初めて示すことができた。Atg7を欠損するマウスを解析することで、神経変性疾患とオートファジーとの関わり、p62を介する選択的なタンパク分解とオートファジーなど、様々な分野で国内外で大きなインパクトを与えることができた。

#### 6. 主な発表論文

(研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)

Uchiyama, Y., Shibata, M., Koike, M., Yoshimura, K., Sasaki, M. (2008) Autophagy - Physiology and Pathophysiology. *Histochem Cell Biol* 129: 407-420

Tamura H, Shibata M, Koike M, Sasaki M, Uchiyama Y (2010) Atg9A protein, an autophagy-related membrane protein, is localized in the neurons of mouse brains. *J Histochem Cytochem* 58: 443-453

Shibata M\*, Yoshimura K\*, Furuya M, Koike M, Ueno T, Komatsu M, Arai H, Tanaka K, Kominami E, Uchiyama Y (2009) The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation. *Biophys Biochem Res Comm* 382: 419-423 (\* equally contributed)

Gotoh K, Lu Z, Morita M, Shibata M, Koike M, Waguri S, Dono K, Doki Y, Kominami E, Sugioka A, Monden M, Uchiyama Y (2009) Participation of autophagy in the initiation of graft dysfunction after rat liver transplantation. *Autophagy* 5:351-360

Koike M, Shibata S, Tadakoshi T, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S, Kawahara N, Kuida K, Nagata S, Kominami E, Tanaka K, Uchiyama Y (2008) Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol* 172: 454-469

Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou I, Ueno T, Hara H, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka T (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131: 1149-1163

Yoshimura K, Shibata M, Koike M, Gotoh K, Fukaya M, Watanabe M, Uchiyama Y (2006) Effects of RNA interference of Atg4B on the limited proteolysis of LC3 in PC12 cells and expression of Atg4B in various rat tissues. *Autophagy* 2: 200-208

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration. *Nature* 441: 880-884

Koike M, Shibata M, Waguri S, Yoshimura K, Tanida I, Kominami E, Gotoh G, Peters C, Figura K, Mizushima N, Saftig P, Uchiyama Y (2005) Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* 167:1713-1728

Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* 169: 425-434

ホームページ等  
[http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/shinkei\\_kozo/index.html](http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/shinkei_kozo/index.html)