

MSA とオートファジー

若林 孝一¹⁾ 丹治 邦和¹⁾

要旨：オートファジーは細胞内分解システムの一つであり、ヒトではオートファゴソーム膜の形成に Atg8 ホモログ (LC3, GABARAP, GABARAPL1, GATE-16) が必須である。レビー小体病 (LBD) と多系統萎縮症 (MSA) 剖検脳を対象に、Atg8 ホモログの変化について病理学的および生化学的検討をおこなった。これらのタンパク質は正常対照では神経細胞の胞体に局在していた。一方、LBD ではレビー小体に陽性所見をみとめ、MSA ではグリッパ封入体が LC3 強陽性を示した。凍結組織をもちいた定量解析の結果、LBD の側頭葉皮質では GABARAP/GABARAPL1 が正常対照と比較し有意に減少していた。MSA の小脳でも LC3, GABARAP/GABARAPL1 および GATE-16 が有意に減少していた。LBD および MSA では、オートファゴソーム膜の形成に異常が生じている可能性が示唆される。オートファジーの活性化や適切な制御によって、神経細胞内の異常タンパク質蓄積が抑制できれば、LBD や MSA をふくむ神経変性疾患に治療効果が発揮できる可能性がある。

(臨床神経 2014;54:966-968)

Key words：オートファジー、多系統萎縮症、レビー小体病、Atg8、封入体

はじめに

オートファジー (macroautophagy) は細胞内のタンパク質分解系の一つであり、オートファゴソーム膜の形成に始まり、細胞にとって有害な分子や不必要となったセルオルガネラを二重膜が取り囲んだ構造物、つまりオートファゴソームが形成される。その後、オートファゴソームはリソソームと融合しオートリソソームとなり、内部の物質が分解される。このオートファゴソーム膜の形成に必須の蛋白がイーストでは Atg8 と呼ばれるタンパク質であり、ヒトでは Atg8 のホモログとして、LC3, GABARAP, GABARAPL1 および GATE-16 の4つが知られている。たとえば、LC3 の多くは cytosol に存在し、LC3-I (細胞質型) と呼ばれている。これがオートファゴソームの膜に結合したものが LC3-II (膜結合型) である。オートファジーが活性化される状態として良く知られているものに飢餓状態がある。飢餓状態では LC3-I が減り、LC3-II が増えること、オートファゴソームの数と LC3-II の量はよく相関することが知られている¹⁾。また、神経系特異的にオートファジー必須遺伝子 (Atg5 または Atg7) を欠損させたマウスではユビキチン陽性の封入体が神経細胞にみとめられ、神経細胞脱落をきたし、運動失調から死にいたることが報告されている²⁾。

タンパク質蓄積病としての神経変性疾患

レビー小体病 (パーキンソン病およびレビー小体型認知症) (LBD) の進行を遅延・阻止する治療法は確立していない。一

方、LBD の脳内では、異常 α シヌクレインが神経細胞の胞体や突起 (軸索および樹状突起) に加え、前シナプスにも広範に蓄積している³⁾。とくに、前シナプスにおける異常 α シヌクレインの蓄積は神経細胞の機能を障害し、症状の発現に関与している可能性が高い。さらに筆者らは、異常分子の蓄積機序として細胞内分解システムの機能低下に焦点を当て研究を進めてきた。これまでに、LBD をふくむ複数の神経変性疾患でオートファジーが障害されており、オートファジー基質 (p62, Keap1, NBR1 など) の細胞内蓄積がみとめられることを報告してきた^{4)~7)}。

レビー小体病と MSA におけるオートファジーの異常

Atg8 ホモログ (LC3, GABARAP, GABARAPL1, GATE-16) に着目し、LBD および多系統萎縮症 (MSA) 剖検脳の病理学的および生化学的検討をおこなった⁴⁾⁵⁾。LBD10 例 (Braak PD stage 4~6)、MSA 5 例、正常対照 5 例の前頭葉、側頭葉、基底核、中脳、橋、延髄および小脳のホルマリン固定パラフィン切片をもちい、オートファゴソーム関連タンパク質 (LC3, GABARAP, GABARAPL1, GATE-16) に対する抗体をもちい免疫組織化学的検討をおこなった。GABARAP と GABARAPL1 は相同性が高く、今回もちいた抗体は両者を認識するため以下 GABARAP/L1 と記載する。Western blot 解析には、LBD 5 例の側頭葉皮質、MSA 5 例の小脳、正常対照 5 例の側頭葉皮質と小脳皮質をもちいた。

正常対照脳では LC3, GABARAP/L1, GATE-16 とともに神経細胞の胞体がびまん性に淡く染色された。一方、LBD では脳

¹⁾ 弘前大学大学院医学研究科脳神経病理学講座 [〒 036-8562 青森県弘前市在府町 5] (受付日：2014 年 5 月 22 日)

幹型および皮質型レビー小体が LC3, GABARAP/L1, GATE-16 陽性であった。連続切片をもちいた検討では、皮質型レビー小体の 40%, 15%, 32% がそれぞれ LC3, GABARAP/L1, GATE-16 陽性であった。MSA では、ほとんどのグリア細胞質内封入体 (GCI) が LC3 強陽性、一方、GABARAP/L1 は陰性、GATE-16 は弱陽性であった。

凍結組織をもちいたタンパク質定量解析の結果、LBD の大脳皮質では GABARAP/L1 が正常対照と比較し有意に減少していた。MSA の小脳では、GABARAP/L1 および GATE-16 のタンパク質量が正常対照と比較し有意に減少していた。小脳白質だけを用いると膜結合型 LC3 は有意に増加、一方 GABARAP/L1 および GATE-16 は有意に減少していた。

今回の免疫組織化学の結果から、LBD および MSA では神経細胞内 (レビー小体) およびグリア細胞内封入体 (GCI) の形成あるいは分解にオートファジーが関与していることが示唆された。一方、LBD および MSA でみとめられる封入体は細胞体の多くを占めるものであり、封入体の形成がオートファジーの機能に影響をおよぼしている可能性も否定できない。

さらに、MSA の小脳では膜結合型 LC3 は増加、GABARAP/L1 および GATE-16 は減少していた。膜結合型 Atg8 ホモログはオートファゴソームの数と正の相関を示すことが知られている。これらの所見から、MSA ではオートファゴソーム数が増加している可能性が示唆される。一方、細胞質型 LC3, GABARAP/L1 および GATE-16 のタンパク質量は MSA の小脳において減少しており、LBD の大脳皮質でも GABARAP/L1 が正常対照と比較し有意に減少していた。これらの結果から、MSA および LBD では、オートファゴソーム膜の形成に異常が生じている可能性が示唆される。とくに MSA においては異常なオートファゴソーム数が増加しており、結果的にオートファジーの機能を抑制している可能性がある。

オートファジー活性化による治療の可能性

これらの知見から、オートファジーの活性化や適切な制御

によって、神経細胞内の異常タンパク質蓄積が抑制できれば、LBD や MSA をふくむ神経変性疾患に治療効果が発揮できる可能性があると考えている。現在、オートファジーを活性化し、異常分子を分解することを目的に細胞および動物レベルでの検討を進めている。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文 献

- 1) Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, et al. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 2004;15:1101-1111.
- 2) Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006;441:880-884.
- 3) Tanji K, Mori F, Mimura J, et al. Proteinase K-resistant α -synuclein is deposited in presynapses in human Lewy body disease and A53T α -synuclein transgenic mice. *Acta Neuropathol* 2010; 120: 145-154.
- 4) Tanji K, Mori F, Kakita A, et al. Alteration of autophagosomal protein (LC3, GABARAP and GATE-16) in Lewy body disease. *Neurobiol Dis* 2011;43:690-697.
- 5) Tanji K, Odagiri S, Maruyama A, et al. Alteration of autophagosomal proteins in multiple system atrophy. *Neurobiol Dis* 2012;49C:190-198.
- 6) Odagiri S, Tanji K, Mori F, et al. Autophagic adapter protein NBR1 is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions and is involved in aggregate formation in α -synucleinopathy. *Acta Neuropathol* 2012;124:173-186.
- 7) Tanji K, Maruyama A, Odagiri S, et al. Keap1 is localized in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in various neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013;72:18-28.

Abstract**Multiple system atrophy and autophagy**Koichi Wakabayashi, M.D., Ph.D.¹⁾ and Kunikazu Tanji, Ph.D.¹⁾¹⁾Department of Neuropathology, Hirosaki University School of Medicine

Macroautophagy is a dynamic process whereby cytoplasmic molecules are sequestered within autophagosomes. There exist two groups of mammalian autophagy-related gene (Atg) 8 homologues (LC3 and GABARAPs), which play essential role in autophagosomal formation. We determined whether Atg8 homologues are affected in Lewy body disease (LBD) and multiple system atrophy (MSA). The level of LC3 was increased in an insoluble fraction from the brain of patients with LBD, whereas the level of GABARAPs was decreased in LBD. The level of matured GABARAPs was significantly decreased in the cerebellum of MSA, and that the higher levels of matured and lipidated LC3 were detected in detergent-insoluble fraction of MSA. Furthermore, immunohistochemical staining revealed that both LC3 and GABARAPs were localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions in MSA were positive for LC3. These findings suggest that autophagic function is impaired through alteration of Atg8 homologues in LBD and MSA. Autophagy-enhancing strategies can therefore have therapeutic efficacy for various neurodegenerative diseases including LBD and MSA.

(Clin Neurol 2014;54:966-968)

Key words: autophagy, multiple system atrophy, Lewy body disease, Atg8, inclusion body
