

主論文の要旨

**Endoplasmic reticulum chaperone BiP/GRP78  
knockdown leads to autophagy and cell death  
of arginine vasopressin neurons in mice**

〔 小胞体シャペロンである BiP/GRP78 のノックダウンは  
マウスバソプレシンニューロンのオートファジーと  
細胞死を誘導する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：有馬 寛 教授)

川口 頌平

## 【緒言】

小胞体は分泌タンパクや膜タンパクの合成や折りたたみ、組み立てを行う細胞内小器官である。種々の要因により、小胞体に正常な構造に折りたたまれなかった異常タンパクが蓄積すると小胞体ストレスが生じる。全身の細胞には小胞体ストレスに対する防御機構である小胞体ストレス応答が備わっており、小胞体ストレスが生じると小胞体におけるタンパク合成の負荷軽減、タンパク折りたたみ能力の増加、異常タンパクの分解促進などで対応する。それでもなお、小胞体ストレスが改善されない場合には、最終的には細胞死に至ることが知られている。BiP は主要な小胞体シャペロンであり、タンパクの折りたたみや異常タンパクの処理に関与している。

当研究グループはこれまでに、AVP ニューロンでは定常状態においても BiP は強い発現を認め、脱水下では AVP の発現増加に比例して、BiP の発現も増加することを報告している。この結果は、BiP が AVP の合成や分泌において関与していることを示唆しているが、AVP ニューロンにおける BiP の役割は未だ明らかになっていなかった。

## 【目的】

AVP ニューロンにおける BiP の役割を解明する。

## 【方法】

AVP プロモーター下に BiP shRNA を発現するアデノ随伴ウイルスをマウスの視索上核 (SON) と室傍核 (PVN) に注入し、AVP ニューロン特異的 BiP ノックダウンマウスを作成した。

(1) shRNA 投与から 12 週までの尿量、飲水量の測定とともに、尿中 AVP と血漿浸透圧を測定した。

(2) shRNA 投与前、2 週、4 週、12 週における SON と PVN の AVP ニューロン数を蛍光免疫染色にて検討した。

(3) 小胞体ストレスの指標として shRNA 投与 2 週の AVP ニューロンにおける小胞体面積を免疫電子顕微鏡にて観察するとともに、PVN における CHOP mRNA および spliced XBP1 mRNA を qPCR にて解析した。

(4) shRNA 投与 2 週、4 週におけるアポトーシスの評価を TUNEL 染色にて行った。さらに shRNA 投与 3 週、4 週の AVP ニューロンの形態変化を免疫電子顕微鏡にて検討した。

(5) オートファジー阻害薬であるクロロキン (CQ) を投与し、BiP ノックダウンによるオートファジー活性を検討するとともに、AVP ニューロンの細胞死に与える影響を shRNA 投与 2 週と 4 週の蛍光免疫染色にて評価した。

## 【結果】

(1) shRNA 投与 4 週により尿量および飲水量は増加した (Figure 1A, B)。さらに尿中 AVP は低下し、血漿浸透圧は上昇した (Figure 1C, D)。

(2) SON と PVN とともに shRNA 投与 2 週までは AVP ニューロン数に変化はなかったが、4 週間後から著明に減少していた (Figure 2A-C)。

(3) shRNA 投与 2 週では小胞体の拡張が観察され (Figure 3A-E)、PVN の qPCR では CHOP mRNA および spliced XBP1 mRNA の上昇が確認された (Figure 3F, G)。

(4) TUNEL 染色は陰性であり (Figure 4)、免疫電子顕微鏡にてもアポトーシスを疑う所見はなく、shRNA 投与 3 週ではオートファジーの活性化が見られ (Figure 5A, B)、4 週では空胞化が認められた (Figure 5D)。

(5) CQ 投与にて、BiP ノックダウンによりオートファジーが活性化していることが確認された (Figure 5E-I)。さらに BiP ノックダウン下で CQ を投与すると、AVP ニューロンの細胞死が加速していた (Figure 6A-C)。

### 【考察】

今回の研究にて SON、PVN に AVP プロモーター下で BiP shRNA を発現するアデノ随伴ウイルスを投与することで、AVP ニューロン特異的 BiP ノックダウンマウスを作成した。このマウスの解析により、AVP ニューロンにおける BiP のノックダウンは小胞体ストレスとオートファジーを誘導し、AVP ニューロンは細胞死に至ることが判明した。

BiP の全身性ノックアウトマウスは胎生致死に至るので、BiP の役割を検討するために様々な臓器におけるコンディショナルノックアウトマウスが解析されてきた。そして、BiP のノックアウトが小胞体ストレスと細胞死を誘導することが報告されている。今回の研究にても、AVP ニューロン特異的 BiP ノックダウンマウスでは、AVP ニューロンにおける小胞体の拡張や CHOP や spliced XBP1 の増加に示されるように小胞体ストレスが誘導されており、SON で 90%、PVN で 70%という著明な AVP ニューロンの細胞数の減少が確認されている。過去の報告がノックアウトであり、今回の研究の BiP のノックダウン効率が 50%であったことを鑑みると、AVP ニューロンにおける BiP ノックダウンの影響は著しい。当研究グループが過去に報告しているように、AVP ニューロンにおいて BiP の発現が高いことが関係している可能性がある。また、AVP ニューロンは小胞体ストレスに感受性が高く、BiP がより重要であることを示唆しているものと考えられる。

小胞体ストレス、小胞体ストレス応答およびアポトーシスは密接に関連しており、過去の BiP ノックアウトの研究ではアポトーシスによる細胞死が報告されている。ただし、今回の研究では TUNEL 染色は陰性でありアポトーシスの関与は否定的であった。形態学的に細胞死はタイプ 1 細胞死；アポトーシス、タイプ 2 細胞死；オートファジーを伴う細胞死、タイプ 3 細胞死；ネクローシスに分類される。今回、電子顕微鏡による形態評価を行うもアポトーシスやネクローシスを示唆する所見はなく、BiP ノックダウンによる細胞死の過程でオートファジーが活性化していることが示された。この結果は過去に当研究グループが報告した、視床下部において小胞体ストレスによってオートファジーが誘導されることと一致している。

今回の検討にて、CQによりオートファジーを阻害すると BiP ノックダウンによる AVP ニューロンの細胞死が加速した。この結果より、小胞体ストレスによって誘導されるオートファジーは細胞保護的であり、異常タンパクや損傷した細胞内小器官を処理するためのメカニズムであると考えられる。

#### **【結語】**

AVP ニューロンにおいて BiP のノックダウンは小胞体ストレスを誘導して細胞死を惹起すること、この過程で誘導されるオートファジーは細胞保護的であることが示された。