

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23111003

研究課題名(和文)脳内環境における封入体形成のメカニズム：封入体と神経細胞死の関連性について

研究課題名(英文)Mechanisms of the inclusion body formation in the brain: Association of an inclusion body and the neuronal cell death

研究代表者

服部 信孝(Hattori, Nobutaka)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80218510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 89,700,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病は環境的要因と遺伝的要因が複雑に絡み合い発症する。しかしながら、その原因は謎にまつまれている。また、レビー小体と呼ばれる封入体を病理学的特徴とするが、その形成メカニズムについても不明な点が多い。時を同じくして遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子としてミトコンドリア(PINK1遺伝子, CHCHD2遺伝子)やリソソーム(ATP13A2)の機能維持に關与するものが次々と発見された。それらモデル動物(細胞)の詳細な解析により、ミトコンドリアとタンパク質分解経路の要であるリソソームの障害が脳内環境の破綻をもたらし細胞死を誘導することが明らかになってきた。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease (PD) may be caused by mitochondrial and autophagy lysosome pathway dysfunction, which are probably affected by both genetic predisposition and environmental factors. The discovery of gene including CHCHD2 and the function of PINK1 and Parkin, which associated with the mitochondria, also enhanced the understanding of cellular functions. Kufor-Rakeb syndrome (KRS) was originally described in association with an autosomal recessive form of early-onset parkinsonism. The causative gene for KRS has been identified as ATP13A2, which encodes a lysosomal type 5 P-type ATPase whose physiological function in mammalian cells remains unknown. We recently showed that KRS/PARK9-linked mutations lead to several lysosomal alterations, including reduced proteolytic processing of a lysosomal enzyme.

研究分野：パーキンソン病

キーワード：パーキンソン病 封入体 タンパク分解 オートファジー ドーパミン細胞 神経細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に突入した今日、加齢に伴う様々な疾病が急増しているが、中でも脳・神経系の破綻を原因とする老人性疾患は増加の一途を辿っている。実際、神経難病についても有病率の上昇が確実視されるなか、病気の進行に伴う生活の質の激しい低下と付随する介護費用は大きな社会問題となっている。今後予想される社会的損失を軽減させるには病態に基づいた治療法の開発が必須であることは国内外での学術的分析から指摘されている。

パーキンソン病の多くは孤発性であるが、その約10%は遺伝性であり、これまでにいくつかの原因遺伝子が単離されパーキンソン病の病態解明に大きく貢献してきた。Parkin 遺伝子の変異を持つ患者の頻度は家族性パーキンソン病のなかでも最も多くの割合を占め、PINK1 の遺伝子変異を持つ患者も比較的多いことがわかってきた。ショウジョウバエを用いた遺伝学的な研究から両分子は協調して異常なミトコンドリアの除去を行うことが判明し、その分子基盤の解明が切望されている。

一方、Kufor-Rakeb syndrome (KRS) は若年発症パーキンソン病に認知症、錐体外路症状、ミオクローヌスを合併する常染色体劣性の原因不明の疾患群として知られていたが、2006年に *ATP13A2* (PARK9) が原因遺伝子として同定された。*ATP13A2* はリソソームに局在する P-type ATPase であるが、その機能については不明な点が多い。本邦にも新規変異を有する家系が存在し、その変異を含めた機能解析から *ATP13A2* 変異体はリソソームの機能障害を引き起こすことがわかってきた。若年発症遺伝性パーキンソン病の病態の一端が明らかになるにつれオートファジーリソソーム系の障害が指摘されている。

神経変性には部位特異性に残存神経細胞に封入体の形成が伴うため、タンパク分解系

(プロテアソーム系とオートファジーリソソーム系)の異常が推定されてきた。しかし、そのような異常が根本的原因であるか否か、細胞内封入体自体が神経細胞死に対し保護的に作用するのか否かなど、いまだ解決すべき謎は多い。

## 2. 研究の目的

これまでの基礎研究からオートファジーの障害は凝集体形成に直結することが知られているため、神経細胞選択的にオートファジーを欠損させることにより、封入体形成の影響を観察することが可能となる。そこでドーパミン神経特異的にオートファジーを欠損させたモデルマウス作製し、ドーパミン神経での凝集体形成過程ならびに細胞死への影響を観察すると共に凝集体の病理学的特徴を明らかにする。

パーキンソン病は遺伝的素因と環境要因が複雑に絡み合っており発症すると推測されている。本研究課題の最終目的は孤発性パーキンソン病の病態解明と、病態を基盤とした治療法の開発にある。一方で、遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子が孤発性パーキンソン病のリスクに関与することに着目し、遺伝性パーキンソン病と孤発性パーキンソン病には共通の病態が存在するとの仮説のもと、原因遺伝子産物の解析から分子病態の全容を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

遺伝性パーキンソン病の新規ならびに既知の原因遺伝子についてショウジョウバエ、メダカ、マウスなどの動物種において病的変異を有するモデル動物を作製し、その原因遺伝子産物の機能を明らかにする。

## 4. 研究成果

### **ATP13A2 遺伝子変異と機能解析**

*ATP13A2* はリソソームに局在すること、すべての臓器にわたり広範囲に発現する一方で、特に中脳に強く発現することがわかってい

るものの、その機能についてはほとんどが謎であった。我々の解析によると遺伝子の変異によって2種類の局在を呈することがわかってきた。すなわち変異の導入によりERに留まるタイプと、変異を加えてもリソソームに局在するタイプからなる。本邦でのF182Lの変異体はERに留まるタイプの変異であった。常染色体劣性の遺伝形式を呈することから病態としてはLoss of functionが推測された。また、解析の一端として恒常的にATP13A2を欠損した安定細胞株を採取し解析を行ったところ神経系の細胞で脆弱性を示した。このことはATP13A2が神経において重要な機能を有していることを示唆している。さらにリソソームの特徴を明確にするために電顕による観察を行ったところ、膜様構造を有する封入体を観察した。

#### ATP13A2 ノックアウトマウスの解析

さらにATP13A2の機能を明らかにするため脳特異的にATP13A2を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを用いてin vivoの検討を行った。このノックアウトマウスでは約90パーセント以上のATP13A2の発現が低下していた。高齢マウスではドーパミン細胞の欠損とfinger print likeな膜様構造物が観察された。ATP13A2については中脳において高度な発現が観察されることから、特にドーパミン細胞において重要な機能を有することが推測された。さらにカテプシンDの活性を測定したところ活性の低下を認めた。ATP13A2はリソソーム膜に局在するATPaseであることからリソソームの機能維持に重要な働きをしているものと推測された。さらに脳内にはsynucleinが蓄積しており、カテプシンDの活性低下を含めたリソソームの機能不全がsynucleinの分解に関与していることを示唆していることを見出し論文投稿中である。

#### ドーパミン特異的オートファジー欠損マウスの作製と封入体形成機構の解明

高齢化とともにドーパミン細胞にはp62陽性の凝集体の蓄積が認められた。詳細に検討していくと凝集体は軸索から進展していく拡大様式であることが確認された。凝集体の蓄積に比例して運動機能障害とドーパミン細胞の減少が観察され投稿にむけて準備中である。

#### PINK1のミトコンドリアにおける機能解析

家族性パーキンソン病の中にあってParkinとPINK1を原因遺伝子とする若年発症パーキンソン病はミトコンドリア機能異常がその病態の中核をなす疾患として注目されている。PINK1は損傷ミトコンドリアを認識し除去することにより細胞内環境を健全に保つ機能を有する。その一方で、ミトコンドリアにも局在するPINK1自身がミトコンドリア機能にいかに関与しているかは未だ不明な点が多い。そこでPINK1ノックアウトMEFを用いて呼吸鎖や膜電位への影響を以下のように検討したところPINK1ノックアウトMEFではガラクトース培地にて増殖の低下が顕著であった。またミトコンドリアからのプロトンリークやATP合成能には変化は認められないものの、基質酸化能は低下していることを報告した。

#### ミトコンドリア品質管理の分子機構の解明

遺伝性パーキンソン病の病態にオートファジー誘導不全による異常ミトコンドリアの蓄積が病態として急速な展開を遂げつつあり、ミトコンドリア分解機構の破綻が神経変性において重要な要因となってきた。Parkinは膜電位の低下した損傷ミトコンドリアをオートファジーの発動によって分解し、細胞内の環境維持に貢献している。ミトファジーが誘導されるための分子機構、すなわちParkinが損傷ミトコンドリアを認識する際

に膜電位依存的に PINK1 が Parkin の Ubl ドメイン(Ser65)をリン酸化することがミトコンドリア分解の契機になることを本期間内に明らかにした。

### パーキンソン病の新規原因遺伝子の同定と機能解析

遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子として CHCHD2 遺伝子変異(T61I, R145Q)を本邦の常染色体優性遺伝形式を呈する 4 家系から同定した。CHCHD2 は 151 アミノ酸からなるタンパク質で、N 末にミトコンドリア移行シグナル、C 末に coiled-coil domain(CHCHD)という構造モチーフを有する。我々はまずその局在を調べるために、細胞に一過性にタグ付き CHCHD2 を発現させて細胞分画ならびに免疫染色を行ったところ、ミトコンドリアへの局在が確認された。さらに免疫電顕により詳細にミトコンドリア内での局在を検討したところ、ミトコンドリア膜間腔への局在が示唆された。これとは別に、既に CHCHD2 ノックアウトマウス、ショウジョウバエの作製を完了した。ショウジョウバエの解析においては異常な形態を有するミトコンドリアの蓄積と呼吸機能の低下を認め論文投稿中である。今回、ミトコンドリアに関連した因子が見出されたことは遺伝性パーキンソン病の病態にミトコンドリア障害の関与を強く示唆するものである。これまでの実験から CHCHD2 はミトコンドリア調節因子である可能性が高く、本分子を標的としたミトコンドリア機能の活性化はパーキンソン病だけではなく、ミトコンドリア障害が起因となる癌や細胞老化の予防にも応用が期待される。CHCHD2 遺伝子は最近本邦の家系から見出されたものであり、本研究の推進は世界にさきがけた新たな治療法をリードする可能性を秘めている。

### 5. 主な発表論文

〔雑誌論文〕(計 23 件)

1. Hattori N. Movement disorders: advances in 2015. *Lancet Neurol.* 2016, 15(1):8-9. (査読あり)
2. Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol.* 2015, 14(3):274-82. (査読あり)
3. Amo T, Saiki S, Sawayama T, Sato S, Hattori N. Detailed analysis of mitochondrial respiratory chain defects caused by loss of PINK1. *Neurosci Lett.* 2014, 580:37-40. (査読あり)
4. Furuya N, Ikeda S, Sato S, Soma S, Ezaki J, Oliva Trejo JA, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T. PARK2 /Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy.* 2014, 10(4):631-41. (査読あり)
5. Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS Lett.* 2013, 587(9):1316-25. (査読あり)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Hattori N, Funayama M. Clinicogenetic study of CHCHD2 in patients with autosomal dominant familial Parkinson's disease, Poster, XXII World Congress of Neurology, World Congress of Neurology 2015- Nov. 1, 2015, Santiago, Chili
2. 船山 学、服部 信孝、CHCHD2 は家族性パーキンソン病の新規原因遺伝子である、第 9 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、品川プリンスホテル、2015 年

10月15日～17日、東京

3. 佐藤栄人、服部信孝 . オートファジー欠損マウスにおける封入体形成機構の解明、ポスター、文科省科研費補助金「新学術領域研究」 脳内環境：恒常性維持機構とその破綻、平成 27 年度夏のワークショップ、軽井沢プリンスホテルウエスト、2015 年 9 月 25 日、軽井沢
4. Hattori N. Presidential Lecture, Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease, International Symposium on Mitochondria 2013, The 13th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine(J-mit), Nov 6-7, 2013, Roppongi Academyhills, Tokyo
5. 江口博人、今泉美佳、塚口ケネス、福嶋佳保里、佐藤栄人、船山 学、斉木臣二、波田野琢、久保紳一郎、今居譲、永松信哉、服部信孝 . Parkin ノックアウトマウスにおける放出機構の検討 . 第 54 回日本神経学会学術大会、東京国際フォーラム、2013 年 5 月 29 日～6 月 1 日、東京

[ 図書 ] (計 5 件)

1. 服部信孝 . 7 . 大脳変性疾患、II 錐体外路系疾患、1～9、監修；平山恵造、編集；廣瀬源二郎、田代邦雄、葛原茂樹、臨床神経内科学、第 6 版 1 刷、pp409-441、2016 年 2 月 15 日、南山堂、東京
2. 波田野琢、服部信孝 . 1 番染色体に連鎖する遺伝性パーキンソン病 ( PARK6, PARK7, PARK9(Kufor-Rakeb 症候群), PARK10, PARK16 )、変性疾患、錐体外路系疾患・パーキンソニズムを主とする疾患、家族性パーキンソン病 優性遺伝性パーキンソン症候群、別冊 日本臨床新領域別症候群シリーズ No.27、神経症候群 ( 第 2 版 ) ( ) - その他の神経疾患を含めて -、pp93-98、2014 年 3 月 20 日、日本臨床社、大阪
3. 西岡健弥、服部信孝 . 6 番染色体に連鎖する遺伝性パーキンソン病 ( PARK2 )、変性疾患、錐体外路系疾患・パーキンソニズムを主とする疾患、家族性パーキンソン病 優性遺伝性パーキンソン症候群、別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.27、神経症候群 ( 第 2 版 ) ( ) - その他の神経疾患を含めて -、pp88-92、2014 年 3 月 20 日、日本臨床社、大阪
4. 船山 学、安藤真矢、服部信孝 . 16 番染色体に連鎖する遺伝性パーキンソン病 ( PARK17 )、変性疾患、錐体外路系疾患・パーキンソニズムを主とする疾患、

家族性パーキンソン病 優性遺伝性パーキンソン症候群、別冊 日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.27、神経症候群 ( 第 2 版 ) ( ) - その他の神経疾患を含めて -、pp82-85、2014 年 3 月 20 日、日本臨床社、大阪

5. 佐藤 栄人、服部 信孝.【脳内環境-維持機構と破綻がもたらす疾患研究】(第 1 章) 神経細胞内病態と脳内環境 パーキンソン病における封入体形成のメカニズムと細胞死の関連性について、遺伝子医学 MOOK 26:32-36, 2014

[ 産業財産権 ]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[ その他 ]

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

服部 信孝 ( HATTORI, Nobutaka )

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80218510

### (3) 連携研究者

佐藤 栄人 ( SATO, Shigeto )

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00445537