

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04842

研究課題名(和文) 遺伝性パーキンソン病における脂質組成の分析及び組成変化が及ぼす病態への関与

研究課題名(英文) Analysis of lipid composition in hereditary Parkinson's Disease and the association with the pathology

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：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改変モデル動物を作成し、共通した病態を明らかにしてきた。リソソーム膜に局在するATP13A2やリソソーム酵素であるGBA遺伝子改変マウスに見られるリソソーム機能不全は膜脂質組成に影響を及ぼしシヌクレインの膜結合や分解に障害を与え、レビー小体形成の重要な要因となる。

研究成果の概要(英文)：We have generated model animals with hereditary Parkinson's disease (PD) causative genes to clarify the mechanism of Lewy body formation and common PD pathology. ATP13A2 and GBA mutations cause of PD and induce lysosomal defects and aberrant homeostasis. As the results, the change of lipid composition, which may affect synuclein metabolism and degradation was one of the important factor of Lewy body formation and PD pathology.

研究分野：神経学

キーワード：パーキンソン病 ミトコンドリア リソソーム ATP13A2 CHCHD2

1. 研究開始当初の背景

超高齢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予防や診断法の開発が有効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。それら根本的解決のためには未だ謎の多いパーキンソン病の病態解明が急務であり、そこから導かれる新たな治療法の確立が望まれている。

2. 研究の目的

パーキンソン病の約 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。それら遺伝性パーキンソン病の病態解析からミトコンドリア機能異常、リソソーム異常、NBIA で認められる鉄のホメオスタシスの破綻がパーキンソン病のレビー小体形成とドーパミン神経細胞死に密接に関わっていることが示唆されている。本研究課題は In vivo のモデルを用いてその病態メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

動物モデルに関しては、ノックアウトマウス、トランスジェニックマウス、ショウジョウバエを利用して病態を明らかにする。これまでは遺伝子改変マウスについては明らかな表現型が出ないとされてきたがこれまでになく長期に観察を行った。更にゴーシェ病 (GBA 変異) のヘテロ変異はパーキンソン病発症のリスクが高いことが知られていることからそのような患者の剖検脳を用いて脂質組成の分析を行う。

4. 研究成果

特に本研究課題の期間における特筆すべき成果として、

1) 新規遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子 CHCHD2 を同定しパーキンソン病の病態の一端にミトコンドリアの障害の存在を確固たるものとした。

2) リソソーム異常 (ATP13A2 変異) の機能解析とドーパミン細胞特異的オートファジー欠損マウスの解析からパーキンソン病の病理学的特徴である封入体形成メカニズムを解明した。

< 遺伝性パーキンソン病の病態: リソソームの異常とミトコンドリア障害 >

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、

ATP13A2 (PARK9) が原因遺伝子として同定された。この遺伝子がコードするタンパク質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判明した。即ち、変異の導入により小胞体に留まるタイプと、変異を加えてもリソソームに局在するタイプからなる。本邦で発見された F182L の変異体は小胞体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 が推測されるが、リソソームに局在できないことにより本来の機能が果たせないことが推測される。一方の変異群に関しては変異の導入によって本来有する機能不全を引き起こすことが考えられる。実際に電子顕微鏡観察によって野生型 ATP13A2 の局在を確認したがリソソームに局在することを確認した。解析として恒常的に 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は細胞死を引き起こすものの、肝臓系の細胞では細胞死が認められなかった。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。さらにノックダウン細胞においてリソソームの局在を確認するためにリソソームマーカーである Lamp1 と内在性の分解酵素であるカテプシン D で二重染色したところ、コントロールに比べ不正な形態の vesicle が核周囲に集積していた。さらにリソソームの形態学的な特徴を明確にするために電子顕微鏡による観察を行ったところ、オートファゴソームの構造に類似したリソソームとフィンガープリント構造を有する凝集体の集積を認めた。フィンガープリント構造についてはカテプシン D 欠損マウスでの報告があり、同様にカテプシン D の活性を測定したところノックダウン細胞では有意に活性の低下を認めた。ATP13A2 の機能を明らかにすめるために脳特異的なコンディショナルノックアウトマウスの解析を行った。高齢マウスではドーパミン細胞の欠損とフィンガープリント構造からなる膜様構造物の蓄積が観察された。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。さらに病理学的検討をすすめると脳内には synuclein やミトコンドリア構成成分であるサブユニット C が顕著に蓄積していた。Synuclein はパーキンソン病に見られる蓄積物であり、サブユニット C はリソソーム蓄積症で認められることから、リソソーム機能不全が遺伝性パーキンソン病とリソソーム蓄積症の両者の病態に関与していることを見出した。

一方、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。その局在を詳細に検討するために免疫電顕での観察を行ったところミトコンドリア膜間腔への局在が示唆された。CHCHD2 モデル動物としてショウジョウバエでの解析を行ったところ神経細胞死が観察された。またクリステ構造が不正なミトコンドリアが蓄積し内膜構造の維持に重要な働きをしていることを明らかにした。その結果としてミトコンドリア呼吸鎖の異常をきたし神経細胞死の原因となることを証明した。本研究により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。

< 孤発性パーキンソン病の病態：オートファジー欠損と封入体形成機構 >

一般的に神経変性には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は結論に至っていない。一方、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関与することから、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。同様にパーキンソン病においてもドーパミン細胞の選択的変性機序ならびに凝集体形成機構は未だ不明な点が多い。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(Atg7 F/F:TH-Cre)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パーキンソン病のモデルマウスとなりうるか検討してきた。長期にわたる観察の結果、高齢になるに従い運動障害を呈することを見出した。また、病理解析の結果として比較的早期から封入体の形成を認め、そこには内在性の synuclein が共局在することからレビー小体に類似した封入体を形成しているものと推測された。

表現型の解析の結果、本モデルマウスは以下のような特徴を示す。

- 1) 高齢になるにつれ運動障害を呈する。

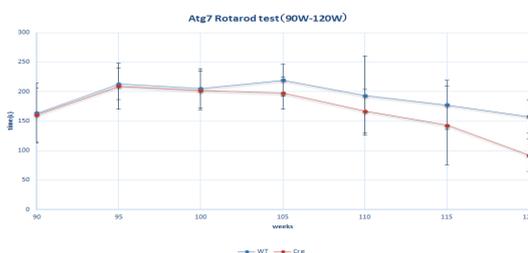


図 1: ロタロッド試験: 遺伝子改変マウス (Atg7 F/F:TH-Cre) は 110 週年齢以降に口

- 2) ピーム課題において後脚をひきずるような運動症状を示す。
- 3) 免疫染色においてユビキチン、P62 陽性の細胞内封入体を確認し、そこには synuclein が局在する。

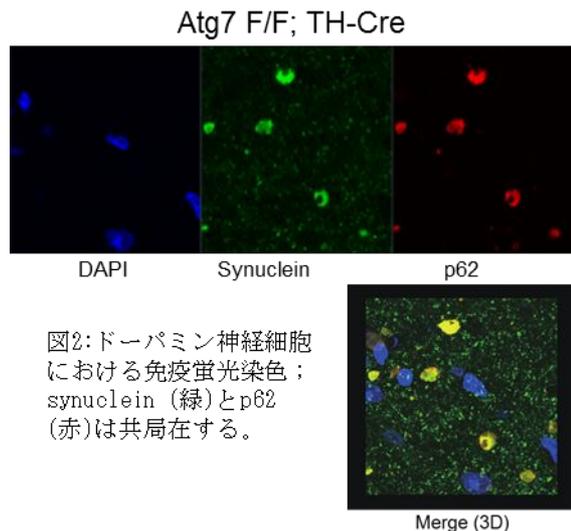


図2: ドーパミン神経細胞における免疫蛍光染色; synuclein (緑)とp62 (赤)は共局在する。

- 4) 電子顕微鏡観察にてレビー小体様の構造をもつことを確認した。

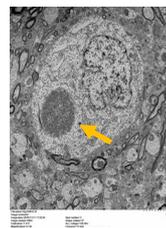


図 3: Atg7 F/F:TH-Cre マウスの中脳黒質ドーパミン細胞の線維構造を有するレビー小体類似の構造体を観察した。

- 5) 運動症状を呈するマウスのドーパミン細胞緻密部での細胞減少が認められた。

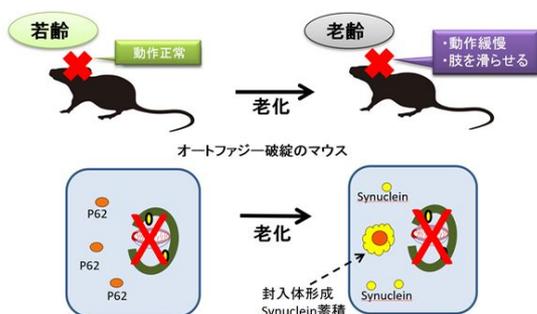
< 封入体形成のメカニズム >

Atg7 F/F:TH-Cre マウスを経時的に観察すると早期に p62 タンパク質の凝集体が形成される (若齢マウス)。Synuclein タンパク質は老化に伴い徐々に増加し、p62 凝集体を核として集積しレビー小体様の封入体を形成する (老齢マウス) ことを見出し、下図 3 のようなモデルを提案した。

形成されたレビー小体類似の封入体の局在を観察したところ、約 90% の封入体が神経線維上に局在していた。剖検脳から推測される封入体の形成仮説のひとつに神経線維分岐部に端を発し、やがて細胞体に凝集物が伸展するとされる。我々が観察した封入体の多くが末梢線維に存在することは上記仮説を支持するものである。末梢線維上にある封入体には複数のミトコンドリアが巻き込まれている様子が観察される。このような封入体は末梢線維におけるミトコンドリア輸送が障害されることが推測され、ドーパミン神経細胞の脆弱性をきたす原因のひとつと考えられた。実際、運動障害を呈する老齢マウスで

はドーパミン神経細胞の減少が観察された。

図 4: 封入体形成過程のモデル図



< パーキンソン病の脂質解析 >

パーキンソン病モデルマウス (GBA L444P 変異マウス) 脳において、変化がみられる細胞膜脂質をリポミクス (LC-MS、GCMS、MALDI MS imaging) により同定すると共に、同マウスにてレビー小体/アルファシヌクレイン凝集を免疫組織化学的に確認した。さらには上記マウスのレビー小体/アルファシヌクレイン凝集の抑制効果をもたらす摂取脂質組成を確定するために GBA L444P ヘテロ変異を有するマウス群とコントロールとして GBA WT マウス群、GBA の欠失変異である GBA ヘテロ KO マウス群を作製・解析した。ゴーシェ病の責任酵素であるグルコセラブロシダーゼと直接関連するセラブロシド、さらにパーキンソン病との関連が示唆されている gangliosid、glucosylceramide、sulfatide、ceramide を順次解析した。一方で、我々は新規遺伝性パーキンソン病原因遺伝子を同定しつつあり、その候補遺伝子改変マウスの解析を同時に進めた。当該マウスは早期に運動症状を呈し、脂質組成の関与が示唆されるためリポミクス解析を行った。その結果は患者脳の imaging MS (JEOL 社製: JMS-S3000 Spiral TOF) でも高値となることからパーキンソン病に共通した脂質組成の変化を見出しつつある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 16 件)

1. Sato S, Uchihara T, Fukuda T, Noda S, Kondo H, Saiki S, Komatsu M, Uchiyama Y, Tanaka K, Hattori N. Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes Lewy pathology and motor dysfunction in aged mice. *Sci Rep*. 8: 2813, 2018 (査読有)
2. Sato S, Li Y, Hattori N. Lysosomal defects in ATP13A2 and GBA associated familial Parkinson's disease, *J Neural Transm (Vienna)*, 124: 1395-1400, 2017 (査読有)

3. Meng H, Yamashita C, Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Funayama M, Sato S, Hatta T, Natsume T, Umitsu M, Takagi J, Imai Y, Hattori N. Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c, *Nat Commun*, 8: 15500, 2017 (査読有)
4. Shiba-Fukushima K, Ishikawa KI, Inoshita T, Izawa N, Takanashi M, Sato S, Onodera O, Akamatsu W, Okano H, Imai Y, Hattori N. Evidence that phosphorylated ubiquitin signaling is involved in the etiology of Parkinson's disease, *Hum Mol Genet*. 26: 3172-3185, 2017 (査読有)
5. Sato S, Koike M, Funayama M, Ezaki J, Fukuda T, Ueno T, Uchiyama Y, Hattori N. Lysosomal Storage of Subunit c of Mitochondrial ATP Synthase in Brain-Specific Atp13a2-Deficient Mice. *Am J Pathol*. 186(12):3074-3082, 2016 (査読有)

[学会発表](計 31 件)

1. Hattori N. (Invited Speaker), Advanced in the Genetics of Parkinson's disease, XXIII World Congress of Neurology, International conference center, Kyoto, Sept. 16th-21st, 2017, Kyoto, Japan
2. Hattori N. The Promise of Gene Based Technology in Movement Disorders, Hot Topic; Focusing on Genetics and Imaging in Movement Disorders, XXII World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders 2017, Vietnam. 2017 年 (招待講演)(国際学会)
3. 服部信孝. Symposist, Lysosomal enzyme 欠損とパーキンソン病、シンポジウム 1 PD 治療はどこをめざすのか、第 11 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS、東京、2017 年
4. 佐藤栄人、小池正人、舩山 学、野田幸子、江崎淳二、福田隆浩、上野 隆、内山安男、服部信孝。遺伝性パーキンソン病 PARK9(ATP13A2)の分子病態とリソソームの障害、シンポジウム 1AS19-4、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、パシフィコ横浜、横浜
5. Hattori N, Funayama M, Imai Y, Sato S. The function of CHCHD2, the novel gene responsible for a familial form of Parkinson's disease, Symposium, Pathogenetic mechanisms underlying Parkinson's disease - On the roles of alpha-synuclein, mitochondria and lysosomes, The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, July 20-22, 2016, Pacifico Yokohama, Yokohama

〔図書〕(計 3 件)

1. 今居 譲、柴佳保里、服部信孝. 遺伝子から探るパーキンソン病病態へのミトコンドリアの関与、ミトコンドリア研究 UPDATE、医学のあゆみ、医歯薬出版株式会社、東京、2017 年
2. 佐藤栄人、服部信孝. ATP13A2, 脳内環境辞典、メディカル ドゥ、大阪、2017 年
3. 佐藤 栄人、服部 信孝. 【パーキンソン病の新展開-発症の分子機構と新規治療】分子機構解明の新しい展開 PARK9(ATP13A2)モデル動物の解析と病態、医学のあゆみ、2017 年

〔その他〕

1. 佐藤栄人、服部信孝. プレスリリース、パーキンソン病のレビー小体形成メカニズムを解明、～オートファジーの破綻がパーキンソン病の原因となる～、2018 年 3 月 2 日、順天堂大学、東京

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

(2)研究分担者

佐藤 栄人 (SATO, Shigeto)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：00445537

(3)連携研究者

今居 譲 (IMAI, Yuzuru)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：30321730

船山 学 (FUNAYAMA, Manabu)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：70648578

波田野 琢 (HATANO, Taku)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：60338390