

令和元年6月13日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09308

研究課題名(和文) アデノシンA2a受容体ノックアウトによる α -シヌクレイン神経毒性緩和機序の解明研究課題名(英文) Effects of Adenosine A2a receptor deficiency on α -synuclein-induced neurotoxicity

研究代表者

荒若 繁樹 (Arawaka, Shigeki)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：00344789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アデノシンA2a受容体ノックアウトマウス脳の中脳黒質にアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いて α -シヌクレインを発現させることにより、 α -シヌクレインによって惹起されるドパミン神経細胞変性、 α -シヌクレイン凝集体形成および炎症細胞の集簇に対するアデノシンA2a受容体抑制の効果を解析することを目的とした。AAVをアデノシンA2a受容体ノックアウトマウスおよびコントロールマウスに接種し、接種後2、4、8週間後、脳を採取した。脳組織をチロシン水酸化酵素に対する抗体で免疫染色し、残存するドパミン神経細胞数を定量した。その結果、ノックアウトマウスでは神経細胞の脱落が抑制されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病は病理学的に黒質線条体系のドパミン神経細胞の脱落と α -シヌクレイン凝集体の形成によって特徴付けられる。 α -シヌクレインの凝集体形成過程が、ドパミン神経細胞の脱落に深く関与していると考えられているが、 α -シヌクレインによって惹起される神経毒性を抑制する方法は未だ確立されていない。本研究より、アデノシンA2a受容体の発現抑制が、 α -シヌクレインの神経毒性を緩和させる効果ももつ可能性が示唆された。さらに解析を進めることにより、アデノシンA2a受容体の機能抑制を介した治療の可能性が拡がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate effects of Adenosine A2a receptor deficiency on α -synuclein-induced neurotoxicity, we injected adeno-associated virus (AAV)- α -synuclein into the substantia nigra of Adenosine A2a receptor knockout mice. We collected the brain tissues at 2, 4 and 8 weeks after virus injection and immunostained these tissues with anti-tyrosine hydroxylase antibody to assess the nigrostriatal dopaminergic neuronal loss. The data suggested that dopaminergic neuronal loss in knockout mice was suppressed than that in non-knockout mice. Although it is necessary to further analyze the effects of Adenosine A2a receptor deficiency against α -synuclein-induced neurotoxicity, the present data might provide an insight for the potential of Adenosine A2a receptor as a target of Parkinson's disease therapy.

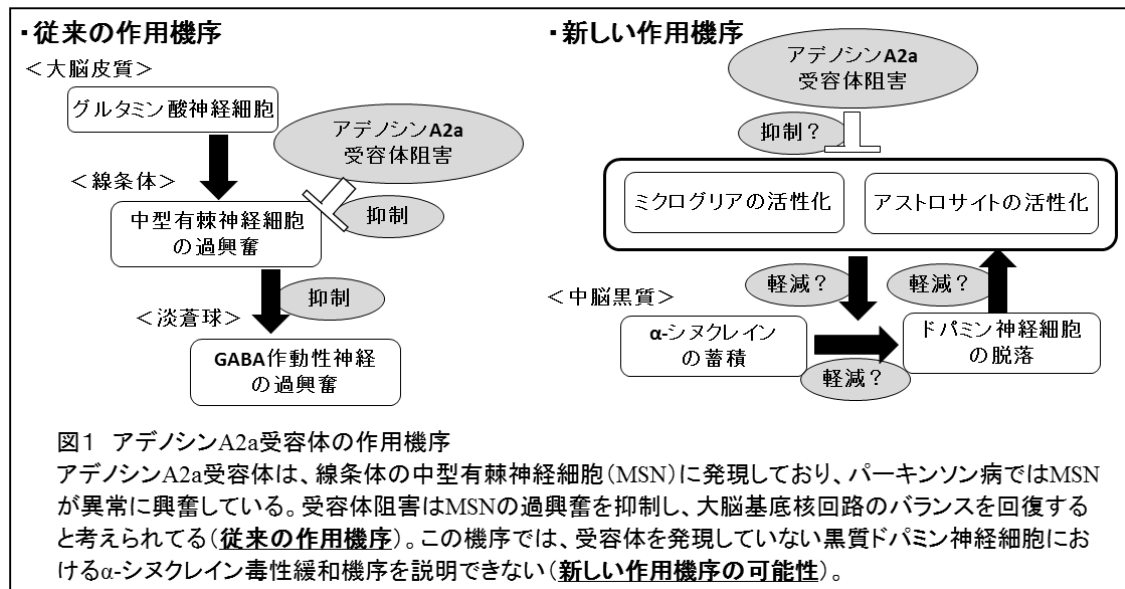
研究分野：神経内科

キーワード：神経病態 神経変性 パーキンソン病 α -シヌクレイン アデノシンA2a受容体 モデル動物 アデノ随伴ウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アデノシン A2a 受容体拮抗薬は、オフ時間の短縮効果の特徴とするパーキンソン病治療薬として既に国内で臨床応用されている。本受容体は線条体、淡蒼球などに特異的に発現していることから、ドパミン代謝に影響を及ぼす他の薬剤と全く異なった作用(線条体 - 淡蒼球の GABA 作動性中型有棘神経細胞の過剰興奮を抑制する機序)で運動機能異常を調節すると考えられている。一方、アデノシン A2a 受容体ノックアウトマウスと家族性変異をもつ α -シヌクレインのトランスジェニックマウスの掛け合わせから、アデノシン A2a 受容体欠損は、 α -シヌクレインによって惹起される黒質ドパミン神経細胞の脱落を強力に抑制することが報告されている (Kachroo A, et al. Ann Neurol 2012)。この結果は、黒質ドパミン神経細胞に直接作用せずに α -シヌクレインの毒性を緩和させる新しい機序の存在を示唆している(図1)。しかし、その作用



機序は全く不明である。この問題を解明する上で着目されるのは、

- 1) アデノシン A2a 受容体は、グリア細胞(マイクログリア・アストロサイト)に発現している、
- 2) アデノシン A2a 受容体拮抗薬は、MPTP 投与マウスモデルでマイクログリアの活性を抑制して神経保護効果を発揮する (Frau L, et al. Synapse 2011)
- 3) アデノシン A2a 受容体欠損は、アストロサイトのグルタミン酸取り込みを促進する (Matos M, et al. J Neurosci 2013) ことである。アデノシン A2a 受容体は従来中型有棘神経細胞以外に、グリア細胞を標的とし、抗炎症作用を発揮して変性を抑制する可能性を示している。

アデノ関連ウイルス (AAV) でラット黒質ドパミン神経細胞に A53T 変異型 α -シヌクレインを発現させることにより、黒質ドパミン神経細胞の脱落と α -シヌクレイン凝集体の形成を経時的に観察できる (Sato H, et al. J Neurosci 2011)。申請者は、このパーキンソン病ラットモデルを用いて、ゾニサミドは α -シヌクレインの凝集体形成に影響せずにその毒性を緩和させることを報告した (Arawaka S, et al. PLoS One 2014)。既存の抗パーキンソン病薬は、未知の効果をもつ可能性がある。アデノシン A2a 受容体は、グリア細胞に対する抗炎症作用によって α -シヌクレイン神経毒性を緩和させる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、「アデノシン A2a 受容体のグリア細胞に対する抗炎症作用を介した α -シヌクレインの神経毒性緩和機序の解明」を目的とする。アデノシン A2a 受容体ノックアウトマウスの黒質ドパミン神経細胞にウイルスを用いて α -シヌクレインを強制発現させたモデルで解析する。

3. 研究の方法

アデノシン A2a 受容体ノックアウトマウスの黒質に AAV を接種し、ドパミン神経細胞に A53T 変異型 α -シヌクレインを強制発現させたモデルを使用する。得られた脳組織を、免疫組織化学的方法（黒質及び線条体ドパミン神経細胞の脱落、 α -シヌクレインの凝集体形成）生化学的方法で解析する。非ノックアウトマウスを対照として使用する。

4. 研究成果

AAVをアデノシンA2a受容体ノックアウトマウスおよびコントロールマウスに接種した。接種後2、4、8週間後に脳組織を採取した。脳組織をチロシン水酸化酵素に対する抗体で免疫染色し、残存するドパミン神経細胞数を定量した。その結果、ノックアウトマウスでは神経細胞の脱落が抑制されている可能性が示唆された。この結果については、AAVによるマウス個体間の α -シヌクレインの発現状態の違いを考慮し、検討に耐えうる十分な個体数を確保して判断する必要がある。さらに、線条体における α -シヌクレイン凝集体の形成についての結果を合わせて、データを総括する。アデノシンA2a受容体の機能抑制により、 α -シヌクレインの神経毒性の緩和を介したパーキンソン病の治療に繋がる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Arawaka S, Sato H, Sasaki A, Koyama S, Kato T. Mechanisms underlying extensive Ser129-phosphorylation in α -synuclein aggregates. *Acta Neuropathologica Communications*. 査読有 5(1), 48, (2017). doi: 10.1186/s40478-017-0452-6.

〔学会発表〕(計 2 件)

Shigeki Arawaka, Hiroyasu Sato, Asuka Sasaki, Takeo Kato. Mechanisms underlying extensive Ser129-phosphorylation in α -synuclein aggregates. 第 59 回日本神経学会学術大会 2018 年
鈴木 佑弥、佐藤 裕康、荒若 繁樹、加藤 丈夫. Regulation and stress-induced reaction of Ser129 phosphorylated alpha-synuclein. 第 57 回日本神経学会学術大会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.osaka-med.ac.jp/class/in4.html/>

6 . 研究組織

該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。