

令和元年6月14日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09321

研究課題名(和文) シヌクレイン凝集体形成とリソファジーを標的とする病態伝播と神経細胞死の回避

研究課題名(英文) A trial of avoiding disease propagation targeted on the synuclein aggregation and lysophagy

研究代表者

辻村 敦 (Tsuji-mura, Atsushi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50236890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：レビー小体を構成する SynGFPを発現する細胞に Synの凝集核を導入すると凝集体の強い蛍光が観察されるが、オートファジーKO細胞では大幅に増加し、凝集体はオートファジーで処理されることが示された。オートファジーの再活性化に伴いそれまで見られなかった細胞毒性は上昇するため、凝集体や障害リソソームの分解過程で生じる産物、それらを種とする再凝集時のオリゴマーが毒性を発揮していることが示唆された。また細胞内にドーパミンが存在すると凝集体は増加し、オートファジー活性化に伴い、細胞毒性も大幅上昇することから、凝集/分解/再凝集のサイクルがドーパミン産生神経細胞の脆弱性を引き起こしていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病では、神経細胞中に シヌクレインが凝集したレビー小体が出現し、凝集体の形成過程で毒性が発揮されると考えられるが、細胞内で隔離された凝集体は毒性を発揮しにくいとも考えられる。オートファジーで再分解が始まると凝集の核となる種(シード)が再出現し毒性の高いオリゴマーが作られる機会が増加して細胞毒性が増幅される可能性が示された。シードの再出現を抑制することによる病態抑制の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：When -Syn aggregation nuclei were introduced into cells expressing -Syn-GFP, fluorescence of intracellular aggregates like Levy bodies was observed. In autophagy KO cells, the amount of intracellular aggregation was significantly increased, and aggregates were shown to be processed mainly by autophagic process. Cytotoxicity increases with the reactivation of autophagy, and products resulting from degradation of aggregates and damaged lysosomes were considered to be a causative. It was also suggested that the oligomers produced by the seeds generated from the degradation products are toxic. Also, in the presence of dopamine in cells, an increase in aggregates was observed. The cycle of aggregation / degradation / reaggregation is thought to cause vulnerability of DA-producing neurons, as cytotoxicity was also significantly increased with autophagy activation in these cells.

研究分野：分子神経学

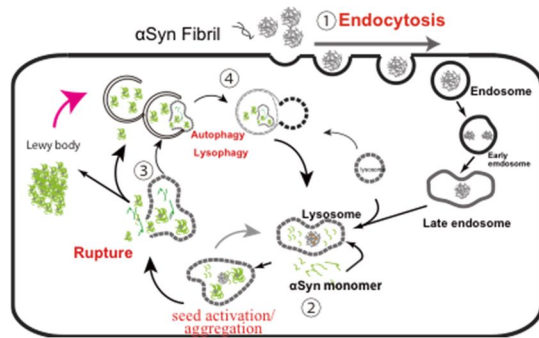
キーワード：パーキンソン病 シヌクレイン オートファジー ドーパミン

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患であるパーキンソン病 (PD) は、ドーパミン (DA) 産生細胞の脱落による運動制御の機能不全が主な症状であり、病理学的には中脳黒質の DA 産生細胞の脱落と、神経細胞内の シヌクレイン (Syn) の凝集体 (レビー小体) を特徴とする。脳内でのレビー小体の拡散と病状の進行が相関することが明らかとなり (Braak et al 2003) さらに異常な構造を持った Syn オリゴマー/凝集体が細胞間を移動し正常な Syn を病理的な凝集体へと変化させていることが示され (Luck, K.C., 2012) 細胞間伝播を阻止することにより PD の発症/進行を防ぐワクチン療法のトライアルが開始されている。しかしながら、細胞間伝播を担う病理的 Syn の物質的実態は解明されておらず、細胞内凝集 Syn の病原性発現も完全には解明されておらず、メカニズムの解明と発症予防/進行抑制の方法の開発が待ち望まれている。

2. 研究の目的

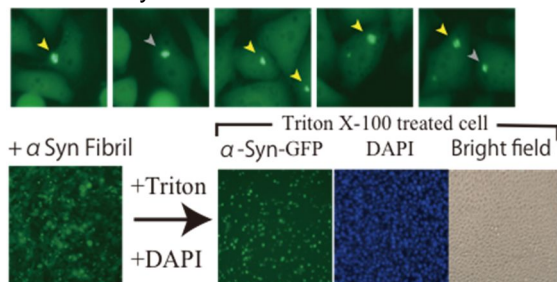
神経変性疾患では、細胞内のタンパク質分解系の機能不全により凝集体の細胞内蓄積が亢進し、細胞機能不全を引き起こすことが主要な神経細胞死の原因と考えられていたが、より小さなオリゴマーが強い毒性を示すこと、病的な重合体が細胞間を伝播し脳組織で病態が拡散することが明らかとなってきた。我々は試験管内で作成した Syn のフィブリルが細胞内で凝集核となるためには、リソソームでカテプシンによる修飾が必要であり、活性化された凝集シードが成長してリソソーム破壊を引き起こす像を得ている (Tsujiura et. al 2015)。細胞質内で成長した凝集体や機能不全を起こしたリソソームは細胞内分解系で処理されるが、細胞質内で凝集/分解から隔離されている凝集体も、オートファジーによって分解する過程で新たな凝集核の活性を獲得し、細胞内では凝集体形成/分解/凝集能獲得/凝集体形成のサイクルが存在し、低分子の病的オリゴマーが出現する危険性が増大している可能性がある (図 1)。実際に細胞内での負のサイクルによって細胞毒性が発現するか、凝集能を獲得するメカニズムを解明し、そのプロセスをターゲットとした病的凝集体の形成や伝播を阻止する方法の開発に寄与することが目的である。



3. 研究の方法

(1) 細胞内凝集体形成・観察、定量システム

CMV の制御下で Syn-GFP を発現する 293 や HeLa 細胞株を作成し凝集体形成をリアルタイムで観察できるシステムを構築した。大腸菌で発現/精製した Syn を P 試験管内で 37 °C で 7 日間攪拌して作成したフィブリルを凝集のシードとして用いた。細胞へのフィブリル導入は、2ug の Syn フィブリルとトリプシン処理し血清不含 DMEM に懸濁した上記細胞を 96well で混合し、1 時間後等量の 20%血清/500uM の LLoMe を含む DMEM を加え 37 °C で 0/N 培養を行う。細胞内で強い蛍光を発する凝集体を蛍光顕微鏡で確認後、細胞を TritonX100/DAPI を含む PBS で洗浄し細胞内の可溶性 Syn-GFP を取り除き、残った凝集体の蛍光強度を撮影し、ImageJ で定量化を行った。



(2) オートファジー KO 細胞の作成

上記で作成した細胞に CAS9/CRISPR を使用して ATG7 遺伝子の欠損細胞株を単離した。ATG7 の蛋白質発現、飢餓状態での培養下で LC3-mCherry の細胞内凝集を観察しオートファジー機構の欠損を確認した。また、ATG7 を発現する AAV を感染させ相補性を確認した。

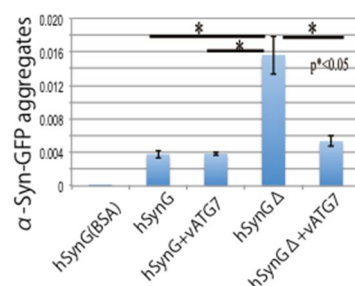
(3) 細胞毒性測定

フィブリル導入時の細胞障害は、CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay Kit (Promega) を用い、ルミノメーターで細胞外プロテアーゼ量を定量した。

4. 研究成果

(1) Syn 細胞内凝集体はオートファジーによって分解処理されている

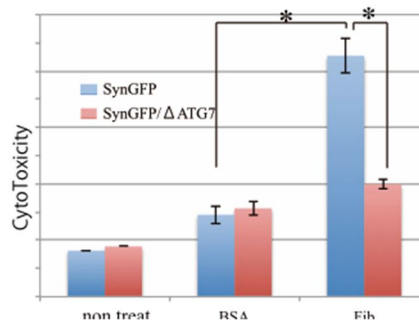
試験管内で作成した Syn のフィブリルは、特別なトランスフェクション試薬を加えなくてもエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれており、LLoMe によってリソソーム膜を一時的に障害することによって安定的に細胞内で凝集体を生じる。この細胞内 Triton 不溶性の蛍光強度は、導入したフィブリルの量に比例しており、凝集体形成を定量化することができた。ATG7 をノックアウトした HeL 細胞 (hSynG) での凝集体形成は、



格段に増加し、また、ATG7 を発現する AAV ベクターを感染させた場合は、ほぼ元の凝集体形成量に帰ることが確認され、細胞内で生じた Syn 凝集体はオートファジー/リソソーム系によって分解処理されていることが確認された。

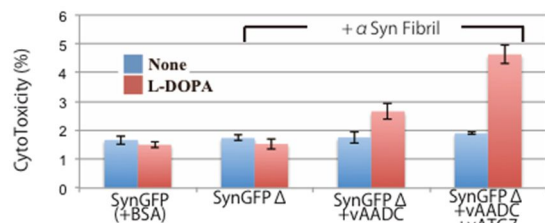
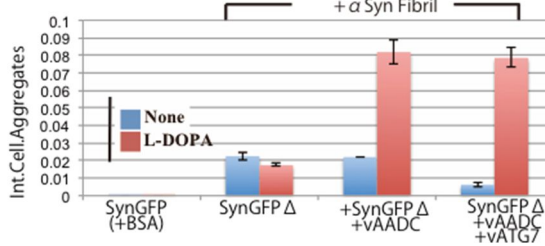
(2)細胞内凝集体形成による細胞毒性

一般に細胞内に不溶性凝集体が蓄積すると、細胞機能の障害により細胞毒性が発揮されると考えられる。Syn フィブリルを導入すると野生型細胞 (293SynGFP) には細胞毒性が上昇している。同様にオートファジー欠損株 (293SynGFP/ ATG7) にフィブリルを導入すると、細胞内凝集体形成は増加するにもかかわらず、細胞毒性はコントロールの BSA を導入した時と同程度の値しか示さないことがわかった。この結果より、細胞内の凝集体そのものよりも、凝集体の分解過程または分解産物から新たに作られる低分子重合体 (オリゴマーなど) が細胞毒性を発揮していると考えられる。



(3)ドーパミン産生細胞の脆弱性と細胞内凝集

パーキンソン病の発症は中脳黒質のドーパミン (DA) 産生ニューロンの選択的脱落が起こり、運動機能制御に障害が生じることに起因する。黒質細胞が選択的に脱落するメカニズムは、DA による酸化ストレスが主な原因であると説明されているが、今回我々が確立した培養細胞でのシステムでの DA の影響を検討した。一般的に DA は、細胞膜を透過せず、レセプターやトランスポーターを介して細胞内に取り込まれるが、今回実験に用いた HeLa 細胞にはそれらの機構は存在しない。そこで細胞内での DA の合成系を導入することにした。PD の治療薬として用いられる DA の前駆体である L-DOPA とそれを代謝する酵素芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (Aromatic L-amino acid decarboxylase ; AADC) を発現する AAV ベクター (vAADC) を用いて細胞内 DA 生産系を導入した。AADC の発現の有無単独、LDOPA の投与のみでは細胞内凝集体量に変化は見られないが、vAADC+L-DOPA 添加群では凝集体産生量が4倍以上増加した。さらに vATG7 を感染させオートファジーを活性化した場合 L-DOPA 非存在下では凝集体の減少が見られるが、AADC+LDOPA 群ではオートファジーの活性化では凝集体を減少させることはできなかった。この時の細胞毒性を測定してみると、AADC+LDopa 添加によって細胞毒性の上昇が見られるが、さらにオートファジーの活性化によって細胞毒性が2倍程度に増加することが確認された。(DA 代謝による活性酸素の産生の影響も予想されたが、グルタチオン添加によっても細胞障害には変化が見られなかった。) これらのことから、ドーパミン産生細胞では Syn 凝集体の形成が他の細胞よりも起こりやすく細胞毒性の上昇も見られる。しかし細胞毒性の多くの部分は凝集体形成よりはオートファジーによる分解過程によって引き起こされており、リソソーム系障害、凝集核再活性化によるオリゴマー分子の発生などが考えられ、DA ニューロンの脆弱性の原因になっていると考えられる。



(4)凝集核再活性化の本体、オートファジー活性化による細胞毒性発揮のメカニズム

細胞内凝集体の分解によって生じると想定される凝集核の再活性化の本体を解明するため、フィブリルの凝集能を評価するアッセイ系を試みた。ニトロセルロース上に Syn のフィブリルを固定し、HiBiT タグを付加した Syn を加えた溶液中で凝集体重合を行わせ、洗浄後 NanoLuc を結合させてフィブリルの成長を発光強度の増加として測定した。メンブレンへ直接スポットするフィブリル量を変化させて定量性を調べると、 10^3 濃度のレンジで直線性が見られた。しかしフィブリルをカテプシンなどで切断した時の発光強度の変動を観察することはできず、また Native PAGE で分画してメンブレンに転写した場合、巨大な高分子量に分画では凝集能を確認できたが、再活性化された凝集能を持つと期待される低分子のコア部分を検出することはできなかった。絶対的な感度不足、活性化部分の安定性などの要因が考えられる。

以上の結果より、細胞内凝集体の蓄積を伴う PD モデル細胞では凝集体そのものの毒性よりも、分解処理/再凝集活性化による細胞毒性が顕著であることが示された。細胞内の分解系の活性化による病態の進行抑制方法は神経細胞の生存にとっては逆効果であり、凝集体の分解処理に続く再凝集活性化を阻止することが有効であると考えられる。将来的には、エクソソームなどを伝播を担うメカニズムを標的とする治療法以外に、標的的特異的な分解抑制や再活性化部位を優先的に破壊する分解促進方法などを視野に入れ、再活性化機構の詳細を明らかにしたい。

<引用文献>

Braak HJ, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. 'Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease.' *Neurobiol Aging*. 2003 Mar-Apr;24(2):197-211.

Tsujimura A, Taguchi K, Watanabe Y, Tatebe H, Tokuda T, Mizuno T, Tanaka M. 'Lysosomal enzyme cathepsin B enhances the aggregate forming activity of exogenous -synuclein fibrils.' *Neurobiol Dis*. 2015 Jan;73:244-53.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

1. Watanabe Y, Tsujimura A, Aoki M, Taguchi K, Tanaka M. Development of the 5-HT2CR-Tango System Combined with an EGFP Reporter Gene. 査読有 *J Mol Neurosci*. 2016 Feb;58(2):162-9

DOI: 10.1007/s12031-015-0650-2

2. Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M. Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *J Comp Neurol*. 2016 Apr 15;524(6):1236-58

DOI: 10.1002/cne.23901

3. Aoki M, Watanabe Y, Yoshimoto K, Tsujimura A, Yamamoto T, Kanamura N, Tanaka M

Involvement of serotonin 2C receptor RNA editing in accumbal neuropeptide Y expression and behavioural despair 査読有 *Eur J Neurosci*. 2016 May;43(9):1219-28.

DOI: 10.1111/ejn.13233

4. Watanabe Y, Tsujimura A, Taguchi K, Tanaka M. HSF1 stress response pathway regulates autophagy receptor SQSTM1/p62-associated proteostasis. 査読有 *Autophagy* 2017, 13: 133-148.

DOI: 10.1080/15548627.2016.1248018

5. Shirahase T, Watanabe Y, Tsujimura A, Kwak S, Yamamoto T, Kanamura N, Tanaka M. Ethanol Preference and Drinking Behavior Are Controlled by RNA Editing in the Nucleus Accumbens. 査読有 *Front Behav Neurosci*. 2019 Jan 15;12:331.

DOI: 10.3389

[学会発表](計28件)

1. 渡邊義久, 辻村敦, 田口勝敏, 田中雅樹, 「カテプシン B による線維化 -シヌクレインの凝集体形成活性の促進」日本分子生物学会 2015

2. 渡邊義久, 辻村敦, 田口勝敏, 田中雅樹, 「熱ショック因子 1 (HSF1) を介した p62 のリン酸化制御は不良蛋白質の封入体形成に関与する」日本分子生物学会 2015

3. 田口勝敏, 渡邊義久, 辻村敦, 田中雅樹, 「パーキンソン病関連分子 -シヌクレインを高発現する嗅球傍系球体細胞の解析」日本解剖学会年会 2016

4. 渡邊義久, 辻村敦, 田中雅樹, 「5-HT_{2c} 受容体の RNA 編集と情動行動」第 13 回 GPCR 研究会 2016

5. 田口勝敏, 渡邊義久, 辻村敦, 田中雅樹, 「パーキンソン病関連分子 -シヌクレイン高発現嗅球傍系球体細胞に関する解析」第 39 回日本神経科学大会 2016

6. Tanaka M, Aoki M, Tsujimura A, Taguchi K, Watanabe Y. 「Non-edited isoform of 5-HT_{2C} receptor affects NPY expression in the nucleus accumbens and behavioral despair in mice.」*Neuroscience* 2016 San Diego, USA.

7. Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M. 「Characterization of alpha-synuclein-enriched periglomerular cells in the olfactory bulb.」*Neuroscience* 2016. San Diego, USA.

8. 辻村敦, 渡邊義久, 田口勝敏, 田中雅樹. 「細胞内 シヌクレイン凝集体の形成/分解サイクルと細胞生存への影響について」第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 (優秀ポスター賞受賞)

9. 渡邊義久, 青木美空, 吉本寛司, 辻村敦, 田中雅樹. 「セロトニン 2C 受容体の RNA 編集は側坐核 NPY 発現と絶望行動の制御に関与する」第 39 回日本分子生物学会年会. 2016

10. 田口勝敏, 渡邊義久, 辻村敦, 田中雅樹. 「パーキンソン病関連分子 -シヌクレインを高発現する嗅球傍系球体細胞の解析.」第 6 回 4 大学連携研究フォーラム 2016

11. 田口勝敏, 渡邊義久, 辻村敦, 田中雅樹 「パーキンソン病関連分子 -シヌクレインを高発現するマウス嗅球傍系球体細胞の解析」第 122 回日本解剖学会学術集会 2017

12. 白波瀬崇平, 渡邊義久, 辻村敦, 青木美空, 山本 俊郎, 金村成智, 郭伸, 田中 雅樹 「RNA 編集酵素/ADAR2 の側坐核特異的ノックアウトマウスの行動解析」第 40 回神経科学大会 2017

13. 田口勝敏, 渡邊義久, 辻村敦, 田中雅樹. 「パーキンソン病関連分子 -シヌクレインを高発現する嗅球傍系球体細胞の解析」第 40 回神経科学大会 2017

14. 渡邊義久, 辻村敦, 田口勝敏, 田中 雅樹 「HSF 1 による不良蛋白質のオートファジークリアランスの制御」第 22 回日本病態プロテオーム学会学術集会 2017

15. 義久, 辻村敦, 田口勝敏, 田中 雅樹 「HSF1 によるオートファジーレセプター p62 活性化調節機構の解明」第 12 回臨床ストレス応答学会大会 2017

16. 田口勝敏,渡邊義久,辻村敦,田中雅樹.「パーキンソン病関連分子 α -シヌクレインを高発現する嗅球傍系球体細胞の解析」第 93 回 日本解剖学会近畿支部学術集会 2017
17. 白波瀬崇平,渡邊義久,辻村敦,青木美空,山本俊郎,金村成智,郭伸,田中雅樹「RNA 編集酵素/ADAR2 の側坐核特異的ノックアウトマウスの行動解析」第 93 回 日本解剖学会近畿支部学術集会 2017
18. 田口勝敏,渡邊義久,辻村敦,田中雅樹.「パーキンソン病関連分子 シヌクレインを高発現する嗅球傍系球体細胞の解析」4 大学連携研究フォーラム 2017
19. 田口勝敏,渡邊義久,辻村敦,田中雅樹.「神経細胞間伝播性 α -シヌクレインの分離・同定とその解析」第 123 回日本解剖学会総会 2018
20. 田口勝敏,渡邊義久,辻村敦,田中雅樹.「嗅球傍系球体細胞に高発現する α -シヌクレインの機能解析」第 123 回日本解剖学会総会 2018
21. 田口勝敏,渡邊義久,辻村敦,田中雅樹「 α -Synuclein counteracts immature identity of the periglomerular cells in the mouse olfactory bulb after ischemic stroke.」第 41 回日本神経科学大会 2018
22. 山田俊児,呉胤美,森琢磨,ポーフェイ・ソニー,辻村敦,田中 雅樹「単シナプス性逆行性トレーシングを用いた視床下部背内側核の NPY 神経に対する神経入力探索」第 41 回日本神経科学大会
23. 呉胤美,渡邊義久,山田俊児,辻村敦,田中雅「側坐核の NPY ニューロンの活動が不安行動に与える影響」第 41 回日本神経科学大会 2018
24. K., Taguchi, Y., Yorihiisa, A., Tsujimura and M., Tanaka「 Isolation and characterization of cell-to-cell transmissible α -synuclein seeds」 8Th APICA 2018
25. 山田俊児,森琢磨,辻村敦,田中雅樹「 視床下部背内側核および外側視床下部に局在するニューロペプチド Y 発現ニューロンの解剖学的解析」第 94 回日本解剖学会近畿支部学術集会 2018
26. 田口勝敏,渡邊義久,辻村敦,田中雅樹「神経細胞間伝播性 α -シヌクレインシードの同定とその解析」第 124 回日本解剖学会総会 2018
27. 田口勝敏,渡邊義久,辻村敦,田中雅樹.「脳虚血モデルを用いた嗅球傍系球体細胞に高発現する α -シヌクレインの機能解析」124 回日本解剖学会総会 2019
28. 辻村敦,渡邊義久,田口 勝敏「細胞内 α -シヌクレインの凝集とクリアランスによって生じる細胞毒性」第 41 回日本分子生物学会年会 2018

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：渡邊 義久
 ローマ字氏名：Yoshihisa Watanabe
 所属研究機関名：京都府立医科大学
 部局名：医学（系）研究科（研究院）
 職名：講師
 研究者番号（8桁）：50363990

研究分担者氏名：田口 勝敏
 ローマ字氏名：Katsutosi Taguchi
 所属研究機関名：京都府立医科大学
 部局名：医学（系）研究科（研究院）
 職名：助教
 研究者番号（8桁）：60462701

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。