

令和元年6月25日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15239

研究課題名(和文) マンガン誘導性ミクログリア活性化によるパーキンソン病発症へのATP13A2の関与

研究課題名(英文) Involvement of ATP13A2 in the onset of Parkinson's disease by manganese-induced microglial activation

研究代表者

熊谷 智広 (Kumagai, Tomohiro)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：20528111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：中毒量に満たないマンガンによるミクログリア活性化とマンガントランスポーターとして機能し遺伝性パーキンソン病の一因となるATP13A2の関連についてマウス株化ミクログリアを用いて検討した。24時間暴露下でミクログリアの細胞死に影響しないマンガン濃度は $1\mu\text{M}$ までであり、その濃度では、ミクログリア活性化の指標として測定した各種サイトカインの産生量およびATP13A2のmRNA発現量に対照群と差を認めなかった。一方、細胞死に影響を与える $10\mu\text{M}$ では一部のサイトカインとATP13A2のmRNA発現量に有意な増加が認められ、ミクログリア活性化とATP13A2には何らかの関連があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまでまったく不明であったマンガンによるミクログリア活性化とATP13A2の役割について、何らかの関連性があることが推察された。このことは、マンガンによるパーキンソン病様症状発症メカニズムに、神経細胞のATP13A2だけでなくミクログリアのATP13A2も関与する可能性を示す重要な成果と思われた。

研究成果の概要(英文)：I examined the relationship between microglia activation by manganese that did not reach poisoning dose levels and ATP13A2 that functions as a manganese transporter and contributes to hereditary Parkinson's disease using established mouse microglia. Manganese concentration which did not affect cell death of microglia under exposure for 24 hours was up to  $1\mu\text{M}$ , and at that concentration, production of various cytokines measured as an index of microglia activation and mRNA expression level of ATP13A2 showed no difference from control group. At  $10\mu\text{M}$ , which affected cell death, there were significant increases in production of some cytokines and mRNA expression level of ATP13A2, suggesting that microglia activation is related to ATP13A2.

研究分野：衛生学

キーワード：パーキンソン病 マンガン ミクログリア

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

### 1. 研究開始当初の背景

マンガン中毒によるパーキンソン病様症状発症メカニズムや特発性パーキンソン病に対するマンガンの影響などは現在未解明である。近年、遺伝性パーキンソン病の一種である Kufor-Rakeb syndrome において、マンガン・トランスポーターとしての機能を有する lysosomal type5 p-type ATPase をコードする ATP13A2 遺伝子の変異が発見され、マンガンによる神経障害との関連が注目されている。一方、パーキンソン病およびパーキンソン病様症状の発症にはミクログリア活性による炎症反応が影響することも報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、マンガンがミクログリアを活性化させることから、マンガン誘導性ミクログリア活性における ATP13A2 の役割を解明し、中毒量に達しないレベルのマンガンがパーキンソン病発症に与える影響のメカニズムを明らかにする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)ミクログリアの生存に影響を及ぼさないマンガン濃度の検討

96 ウェルプレートにマウス株化ミクログリア細胞を 1 ウェルあたり  $1.0 \times 10^4$  cell 播き、マンガン濃度を調整した 100  $\mu$ l の培養液とともに 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 下で 24 時間培養した。マンガン濃度は 1, 10, 100, 500  $\mu$ M とし各 10 ウェルで検討した。生存細胞は生細胞測定試薬 SF を用いた比色法で測定し、マンガンを添加していないコントロールと比較した。

#### (2)ミクログリア活性化の評価

ミクログリアの細胞死に影響しないマンガン濃度におけるミクログリアの活性化について、産生サイトカインを測定することで検討した。37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 下で 24 時間の前培養後、マンガン濃度を調整しさらに 24 時間培養した。培養後に採取した上清中のサイトカイン (INF- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12, MCP1, TNF, IL-1 ) を BD CBA Kit/Flex Set を用い測定した。

#### (3)ATP13A2 の mRNA 発現量の検討

ミクログリアの活性に影響の出ないマンガン濃度と影響の出る濃度に設定した培養系で、24 時間暴露後のマウス株化ミクログリアにおける ATP13A2 の mRNA 発現量を、 $\beta$ -actin を内部標準とした RT-PCR により測定した。

### 4. 研究成果

(1)マンガン曝露によるミクログリアの生存率は、コントロール群と 1  $\mu$ M 群では有意な差を認めなかったが、10  $\mu$ M より高濃度な群では有意に低下した (図 1)。

(2)上記(1)の結果より、ミクログリアの細胞死に影響しないマンガン濃度を 1  $\mu$ M として、ミクログリア活性化によるサイトカインの産生量を測定した。コントロール群とマンガン濃度 1  $\mu$ M 群の比較では、産生量に有意差を認めたサイトカインはなかったが、10  $\mu$ M 群との比較では IL-10, IL-12, TNF, IL-1 で有意な増加を認めた (図 2)。

(3)上記(2)と同様の条件で培養されたミクログリアの ATP13A2 の mRNA 発現量を測定したところ、サイトカインの反応と同様に、コントロール群と 1  $\mu$ M 群では mRNA の発現量に有意な変化が見られず、10  $\mu$ M 群で発現量の有意な増加が認められた (図 3)。

この結果から、マンガンによるミクログリア活性化と ATP13A2 には何らかの関係があることが示唆された。

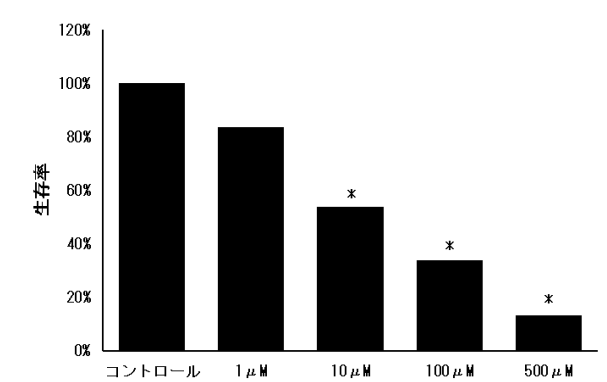


図 1 培養液中のマンガン濃度によるミクログリア生存率 (\* : p < 0.05)

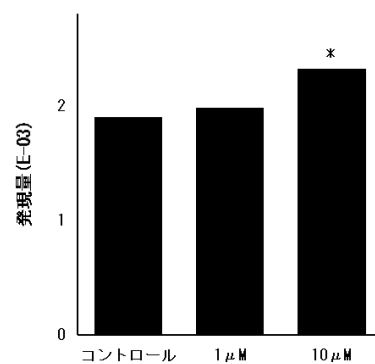


図 3 培養液中のマンガン濃度による ATP13A2 の mRNA 発現量 (\* : p < 0.05)

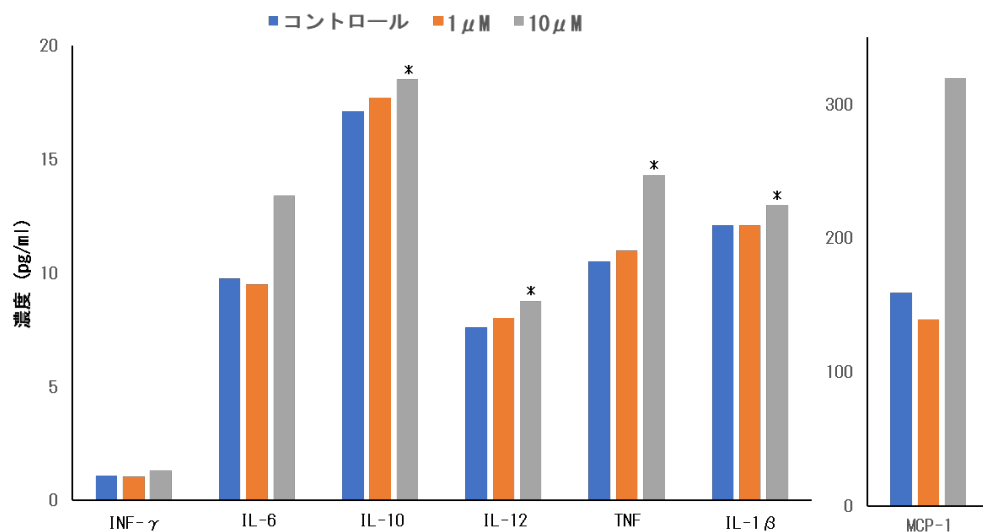


図2 培養液中のマンガン濃度によるサイトカイン産生量 (\*:p<0.05)

## 5. 主な発表論文

〔雑誌論文〕(計1件)

Kojima Y, Kumagai T, Hidaka T, Kakamu T, Endo S, Mori Y, Tsukamoto T, Sakamoto T, Murata M, Hayakawa T, Fukushima T. Characteristics of facial expression recognition ability in patients with Lewy body disease. Environ Health Prev Med. 査読有, 2018 Jul 18;23(1):32. doi:10.1186/s12199-018-0723-2.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。