

令和元年6月3日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08904

研究課題名(和文) 新規V-1/CP複合体を標的としたドパミン関連疾患根本治療の創薬研究

研究課題名(英文) Development of fundamental therapy for dopamine-related disorders targeting novel protein complex V-1/CP

研究代表者

川畑 伊知郎 (KAWAHATA, ICHIRO)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：30579743

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)：私達はこれまでにV-1/CP複合体の形成が何らかの刺激で活性化しドパミン作動性機能を強力に賦活化することを明らかにしてきた(KAKENHI23790594, 25860389)。本研究ではV-1/CP複合体の活性化機序と同複合体を活性化する新規化合物を明らかにしその治療効果を検証した。同複合体はNMDA受容体およびニコチン受容体により活性化され、強力な神経保護作用によりドパミン機能を賦活化する分子機序を明らかにした。さらに加齢や実際のパーキンソン病において同複合体形成が低下することを明らかにした。また同複合体を標的とする新規化合物の同定に成功し、ドパミン機能を回復可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では超高齢化が進み、高齢者で多発するパーキンソン病患者の数が増加している。パーキンソン病の対症療法薬はあるものの、これまで根本治療薬は開発されていない。私たちはV-1/CPという新しいタンパク質複合体に着目し、そのドパミン機能の強力な賦活化作用を明らかにしてきた。本研究では同複合体がNMDA受容体やニコチン受容体により活性化される新しい機序を明らかにし、同複合体を標的とした新たな化合物のスクリーニングに成功した。またパーキンソン病や加齢によって同複合体が減少し、新規化合物により回復可能であることを明らかにした。これらの成果から、同複合体を標的としたドパミン疾患治療薬の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：V-1/CP complex formation is essential to maintain dopaminergic function, and the complex promotes dopamine biosynthesis by some stimulation (KAKENHI23790594, 25860389). In this study, we approached the mechanism to activate V-1/CP complex and screened novel compounds targeting V-1/CP that facilitate the complex formation then verified their therapeutic effects. We revealed that the complex is activated by NMDA receptors and nicotinic acetylcholine receptors to potentiate dopaminergic function and neuroprotective abilities to enhance cell survival. Furthermore, we found the complex formation of V-1/CP was attenuated by aging and in the postmortem brain of human with Parkinson's disease (PD). We also successfully identified natural compounds targeting V-1/CP complex and revealed the compounds could activate the complex to recover dopaminergic function and cell survival in aged or PD model. Thus, the therapeutics targeting V-1/CP complex is useful for PD and anti-aging treatment.

研究分野：神経科学、神経薬理学

キーワード：V-1/CP complex tyrosine hydroxylase Nurr1 dopamine aging Parkinson's disease nicotine receptor NMDA receptor

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に伴い増加するパーキンソン病 (以下 PD) の根本治療法開発が期待されている。PD は中脳黒質線条体のドパミン作動性神経が選択的に変性し、産生ドパミン量の低下により運動障害が現れる。申請者はこれまでに PD でドパミン神経が選択的に変性する分子機構を明らかにしてきた (Kawahata et al., 2009a,b, 2014, 2015)。一方、変性するドパミン神経を保護し減少するドパミン量を回復させる因子や、その作用機構は未知であり、新たなドパミン神経を移植する以外の PD の根本治療法は知られていなかった。遺伝子治療においてはこれまでに線条体への複数のドパミン生合成酵素群の遺伝子導入による PD 治療が試みられているが、後述する V-1/CP 遺伝子機能を利用すれば単一遺伝子による単純な遺伝子治療、または V-1/CP 複合体を標的とした新規化合物による簡便な根本的治療が期待できる。

2. 研究の目的

これまでの研究成果から、V-1/CP 複合体が RhoA/Rac1 を活性化すること、同複合体がドパミン作動性機能、具体的にはドパミン生合成酵素群の遺伝子発現およびドパミン生成量を強力に賦活化すること、V-1 と CP のいずれかが消失するとドパミン作動性機能が低下することを、明らかにしてきた。これらの成果から、V-1/CP 複合体が何らかの生理刺激により活性化され RhoA 依存的アクチン重合を促進し、ドパミン生合成酵素群の発現とドパミン産生を増強していることが想定される。また、実際に V-1/CP 複合体の創薬ターゲットとして有効を明らかにし、V-1/CP 複合体を活性化する新規化合物のスクリーニングにより同複合体の活性化が実際にドパミン機能を亢進させ、神経保護作用を発揮するかどうかを検討する必要がある。

そこで本研究では、培養ドパミン神経細胞およびマウス生体レベルで、私達が独自に作成した V-1 遺伝子多型に基づく変異型 V-1 発現ウイルスベクターを用い、V-1/CP 複合体形成の消失がドパミン神経の生存維持、ドパミン産生能にどのような脆弱性を与えるのを明らかにすることを目的とした。また、V-1/CP 複合体形成を制御する上流機構を見出し、同複合体を活性化する内在性因子と新規化合物を明らかにすることを目的とした。さらに、スクリーニングされた新規化合物が実際に PD モデルや老化によるドパミン機能の低下に有効であるのか、その薬効と安全性を明らかにすることを目的とし、V-1/CP 複合体を標的とした新たな PD 治療法の確立を最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) ラット初代培養中脳ドパミン神経細胞の培養

妊娠 16 日目の Wistar rat から、イソフルラン深麻酔下にて腹部正中切開により無菌的に子宮を摘出し、胎仔中脳を摘出後、神経細胞分散液で組織を分散させ、遠心した細胞ペレットを EMEM 培地中で懸濁、ポリ-L-リジンでコーティングしたプレートまたはディッシュに播種した。

(2) レポータージーンアッセイ

培養した中脳ドパミン神経細胞は、各種遺伝子の転写活性測定を目的とし、エフェクトプラスミドとウミシイタケ内部コントロールプラスミド (Promega) を、リポフェクタミン 3000 (Invitrogen) を使用して遺伝子導入した。翌日、各種濃度の化合物で処置し、24 時間処置を行った。PBS で 2 回洗浄後、95 μ L の passive lysis buffer (Promega) を添加し細胞溶解液を作成後、デュアルルシフェラーゼアッセイキット (Promega) を用いてレポーターアッセイを行った。取得した値は、内部標準コントロールとして使用したウミシイタケコントロールプラスミドの値で割り標準化した。またすべてのサンプルにおいて n=4 で試験し平均化した。

(3) V-1/CP 複合体形成変化の免疫沈降実験およびウェスタンブロット解析

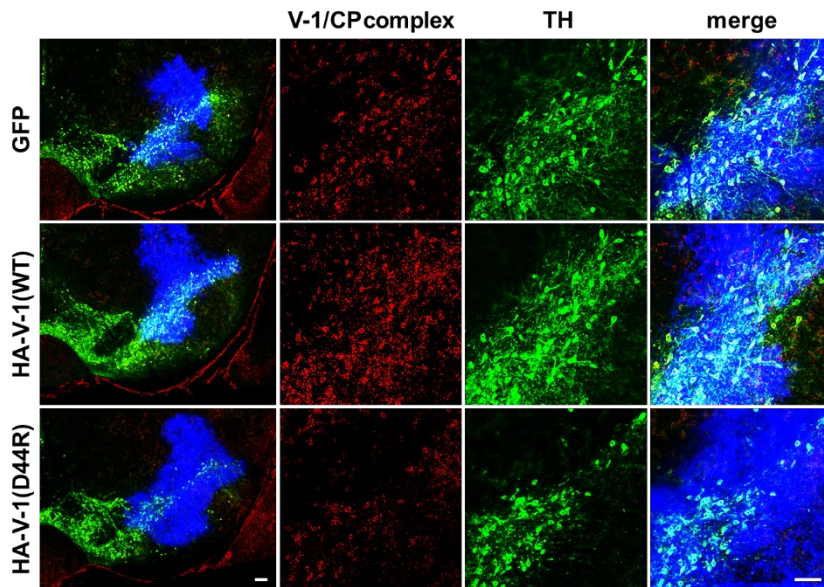
各種発現ベクター導入、または化合物で処置を行った後、細胞溶解液 mammalian lysis buffer (Promega) で溶解後、遠心上清を細胞抽出液として回収し、抗 V-1 抗体を結合させた免疫沈降用磁気ビーズ Dynabeads Protein G (Veritas) と混和し 4°C で 16 時間転倒混和し反応させた。その後、溶出バッファー (50 mM Glycine pH 2.8) で抗 V-1 抗体結合タンパク質を溶出、回収した。この免疫沈降物を、12% ポリアクリルアミドゲルで泳動分離し、抗 CP α 抗体を用いてウェスタンブロット法で分析した。

(4) PCR 法を用いた mRNA レベルの定量解析

PCR 法を用いた各種化合物および V-1/CP 遺伝子による mRNA レベル変化の定量解析では、養中脳ドパミン神経細胞から、RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて RNA を回収・精製した。鋳型 cDNA 合成には、ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡) を用いて行った。各種 mRNA レベルの変化解析には定量的 PCR 法を用いた。PCR にはリアルタイム定量 PCR 解析装置 LightCycler Nano (Roche) を用い、CyberGreen 法を用いた 2 ステップ PCR (95°C 15 秒、60°C 30 秒を 50 サイクル) によって定量的に解析した。

(5) 細胞内 ATP 量の定量解析

各種化合物および V-1/CP 遺伝子による細胞内 ATP 量変化の定量解析では、養中脳ドパミン神経細胞に 48 時間の各種発現ベクター導入または 24 時間の薬物処置の後、培地を破棄後、ATP 抽出試薬 (東洋ビーネット) を添加した。5 分間の静置により細胞から ATP を抽出後、キュベット



(図1)野生型または変異型 VSV-G/V-1 によるマウス中脳における V-1/CP 複合体の形成変化とチロシン水酸化酵素 (TH) の遺伝子発現レベルの変化、およびその拡大図。V-1/CP 複合体は赤、TH を緑、HA-tag を青色で示した。スケールバーは 50 μ m。

その後蛍光二次抗体で標識、封入後観察を行った (Keyence BZ-710)。また V-1/CP 複合体の可視化解析には DuoLink 法を用いた。

4. 研究成果

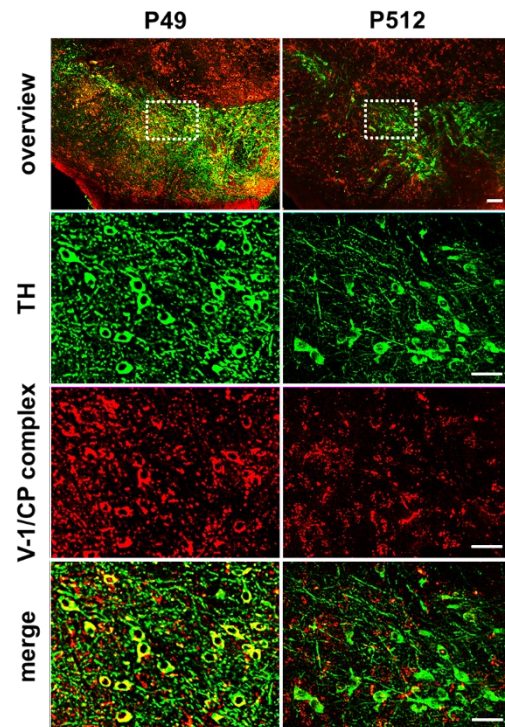
これまでに V-1/CP 複合体がドパミン作動性機能に必須であり、同複合体が *in vitro*, *in vivo* においてドパミン機能を強力に賦活化することが明らかになったことから (KAKENHI 23790594, 25860389)、V-1/CP 複合体は何らかの生理刺激により活性化を受けている可能性が示唆されてきた。本研究において同複合体の上流を解析した結果、NMDA 受容体またはニコチン性アセチルコリン受容体の生理的刺激により、V-1/CP 複合体の形成が促進されることを明らかにした。具体的には、NMDA 刺激またはニコチン刺激により、V-1/CP 複合体の可視化解析、および免疫沈降解析において、同複合体の形成数の増加が観察された。また NMDA 刺激または智子珍刺激が同複合体依存的な血清応答因子 (SRF-RE) 依存的転写活性、チロシン水酸化酵素 (TH) および芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) の転写活性、mRNA およびタンパク質発現レベルを上昇させることを明らかにした。さらに実際に NMDA 受容体のサブユニット NR2D のノックアウトマウスを使用し、V-1/CP 複合体形成とドパミン合成酵素群、V-1/CP 複合体依存的カスケードを解析した結果、NMDA 受容体ノックアウトにより V-1/CP 複合体形成が減弱し、各種ドパミン作動性マーカーの発現レベルが低下することを明らかにした。

一方で、パーキンソン病は高齢者に多発することから、加齢による V-1/CP 複合体の形成変化を検討した。老齢マウスを用い、マウス高齢モデルにおける V-1/CP 複合体形成を解析した結果、生後 7 週齢の成体マウスと比較し、生後 74 週齢のマウスでは V-1/CP 複合体形成が大きく低下していた。また V-1/CP 複合体形成の低下と、TH の発現レベルの低下に相関性が認められた。実際にマウス中脳に、CP に結合できない V-1 変異体を導入した結果、TH および AADC、Nurr1, VMAT2, DAT, GTPCH1 などの各種ドパミン作動性マーカーの発現が低下した。さらに実際のパーキンソン病患者剖検脳を用いた V-1/CP 複合体の可視化解析を行った結果、パーキンソン病の進行とともに同複合体形成が低下していることを明らかにした。また MPP (+) 処置パーキンソン病モデル細胞において、V-1/CP 複合体形成が阻害されることを明らかにした。

に検体 100 μ L を移し、発酵試薬である L/L 試薬 100 μ l と混合した後、キュベットを 3 回振って各藩し、ルミノメーターで 1 検体ごとに測定を行った。生データ値はコントロール群を 1 として変化率を算出した。

(6) 免疫組織化学的解析

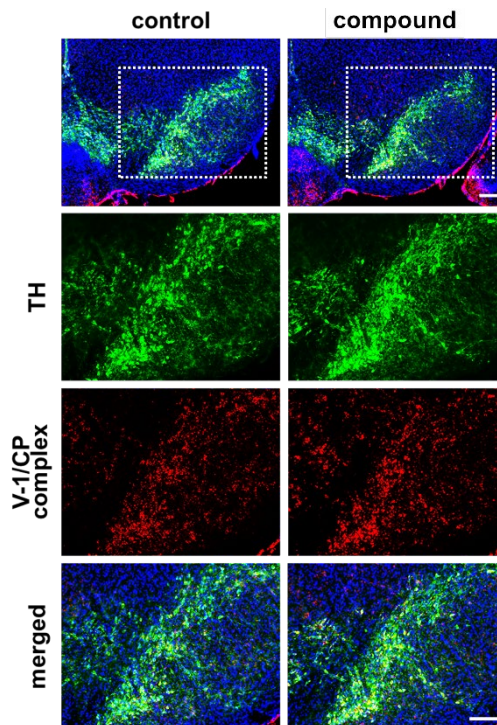
マウス脳組織は還流固定後、リニアスライサーを用いて 50 μ m の厚さで薄切片を作成し (堂阪イーエム)、免疫染色を行った。切片は 0.3% Triton-X/PBS で膜透過処理を行い、5% goat serum でブロッキング後、各種抗体で一晩反応させた。そ



(図2)生後 49 日および 512 日齢のマウス (C57BL6/N) における V-1/CP 複合体 (赤) の形成変化および TH (緑) の遺伝子発現の低下。スケールバーは 50 μ m。

また上記で明らかになった V-1/CP 機能を標的とし、V-1 遺伝子導入または新規化合物による V-1/CP 複合体形成の促進が、実際に神経保護作用を有するのか、検証を行った。まず、免疫沈降法およびレポータージーンアッセイを用い、V-1/CP 複合体の形成促進作用を持つ化合物のスクリーニングを行った結果、同複合体の形成促進活性を持つ複数の化合物の同定に成功した。また、V-1/CP 複合体の活性化がどのようにして神経保護作用を発現するのか具体的に解析した結果、PD モデル細胞において減少した神経突起数の回復、細胞生存率の上昇、ドパミン合成酵素群の発現レベル低下の抑制神経変性が抑制された。さらに詳細に抗神経変性作用のメカニズムについて検討したところ、低下したミトコンドリア構成タンパク質レベル、アデノシン三リン酸量、およびグルタチオン合成酵素群の発現の賦活化が認められた。実際に老齢マウスにおいて、V-1/CP 複合体の活性化を促進する同定化合物を投与したところ、ドパミン合成酵素群の発現レベル、およびドパミン量が回復した。

これらの成果から、V-1/CP 複合体の活性化、および同複合体を活性化する化合物は、疾患モデルおよび老化によって低下したミトコンドリア構成タンパク質レベル、アデノシン三リン酸量、およびグルタチオン合成酵素群の発現を賦活化し、強力な抗神経変性作用および抗加齢障害作用を有することを明らかにした。また摂取による運動障害、記憶認知障害等は認められなかった。これらの研究成果により、新たな化合物群および同化合物を高含有する生薬の摂取による V-1/CP 複合体の活性化は、加齢および神経疾患によるドパミン機能の低下を強力に回復可能であることが明らかとなり、同複合体を標的とした創薬の有効性および安全性を見出すことができた。



(図3) V-1/CP 複合体の活性化化合物の投与(右列)による老齢マウスにおける TH 発現(緑)および V-1/CP 複合体(赤)の形成促進。スケールバーは 100 μ m。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

1. Ichiro Kawahata, Huinan Xu, Michiyo Takahashi, Kiyoshi Murata, Wanying Han, Yoshihisa Yamaguchi, Akira Fujii, Kikuji Yamaguchi, Tohru Yamakuni. Royal jelly coordinately enhances hippocampal neuronal expression of somatostatin and neprilysin genes conferring neuronal protection against toxic soluble amyloid- β oligomers implicated in Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Functional Foods*. 51, 28-38 (2018) 査読有 DOI: 10.1016/j.jff.2018.10.006
2. Ichiro Kawahata and Tohru Yamakuni. Imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, facilitates tyrosine hydroxylase transcription and phenylethanolamine N-methyltransferase mRNA expression to enhance catecholamine synthesis and its nicotine-evoked elevation in PC12D cells. *Toxicology*. 394, 84-92 (2018). 査読有 DOI: 10.1016/j.tox.2017.12.004
3. Ichiro Kawahata, Tatsuya Suzuki, Evelyn Gutiérrez Rico, Shuichi Kusano, Hiroshi Tamura, Yoshihiro Mimaki, Tohru Yamakuni. Fermented Citrus reticulata (ponkan) fruit squeezed draff that contains a large amount of 4'-demethylnobiletin prevents MK801-induced memory impairment. *J Nat. Med.* 71, 617-631 (2017). 査読有 DOI: 10.1007/s11418-017-1091-8
4. Wen Sun, Ichiro Kawahata, Masaaki Yoshida, Hidehiro Ando, Tohru Yamakuni. Oral sinensetin, but not nobiletin alone, prevents MK801-induced impairment of memory formation in mice, like nobiletin-rich chinpi, a kamo medicine. *Traditional & Kampo Medicine* 4, 116-120 (2017). 査読有 DOI: 10.1007/s11418-017-1091-8
5. Ichiro Kawahata, Evelyn Gutiérrez Rico, Xu Huinan, Shiori Ohtaku, Yoshihisa Tomioka, Tohru Yamakuni. Tyrosine hydroxylase gene expression is facilitated by alcohol followed by the degradation of the protein by ubiquitin proteasome system. *Neuroendocrinology Letters*. 38(1), 43-49 (2017). 査読有 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2845614>
6. Ichiro Kawahata. Regulation of gene expression and degradation of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. *Arch Gen Intern Med*. 1, 1-3 (2016). 査読有 <http://www.alliedacademies.org/archives-of-general-internal-medicine/>

〔学会発表〕（計5件）

1. Ichiro Kawahata, Yensin Lai, Junichi Morita, Shigeki Kato, Shiori Ohtaku, Yoshihisa Tomioka, Akiko Tabuchi, Masaaki Tsuda, Chiho Ichinose, Katsunori Kondo, Yasuhiko Izumi, Toshiaki Kume, Akinori Akaike, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Kazuko Hasegawa, Hiroshi Ichinose, Kazuto Kobayashi, Tohru Yamakuni. V-1/CP complex formation is required for genetic co-regulation of adult nigrostriatal dopaminergic homeostasis via the RHO/MAL/SRF pathway in vitro and in vivo. Neuroscience 2018, November 7, 2018, San Diego, USA.
2. 川畑 伊知郎「新規 V-1/CP 複合体を標的とする天然化合物を用いたパーキンソン病根本治療の創薬研究」第 69 回日本薬理学会北部会、2018 年 9 月 21 日、富山（招待有）
3. Ichiro Kawahata, "Novel protein complex for a potent therapeutic target in Alzheimer's disease and Parkinson's disease" International Conference of Asia Pacific Society for Biology and Medical Sciences 2018, July 22, 2018, Hokkaido, Japan.（招待有）
4. Kyoko Hoshino, Kazue Kimura, Masaharu Hayashi, Yuri Nagao, Kei Hachimori, Yasuo Terao, Ichiro Kawahata, Haruo Shintaku, Hiroshi Ichinose. Gene Analysis of Segawa disease at the neurological clinic for children. XXIII World Congress of Neurology, September 19, 2017. Kyoto.
5. Ichiro Kawahata, Yensin Lai, Junichi Morita, Shigeki Kato, Shiori Ohtaku, Yoshihisa Tomioka, Akiko Tabuchi, Masaaki Tsuda, Chiho Ichinose, Katsunori Kondo, Yasuhiko Izumi, Toshiaki Kume, Akinori Akaike, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, Kazuko Hasegawa, Hiroshi Ichinose, Kazuto Kobayashi, Tohru Yamakuni. V-1/CP complex formation is required for genetic co-regulation of adult nigrostriatal dopaminergic function via the RHO/MAL/SRF pathway in vitro and in vivo. XXIII World Congress of Neurology, September 17, 2017. Kyoto.

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

1. 名称：医薬組成物
発明者：川畑 伊知郎、山國 徹
権利者：同上
種類：特許
番号：特許願 PCT/JP2019/012429 号
出願年：2019 年
国内外の別：国外
2. 名称：ミトコンドリアの恒常性維持・強化剤及びそのスクリーニング方法
発明者：川畑 伊知郎、山國 徹
権利者：同上
種類：特許
番号：特許願 2018-058171 号
出願年：2018 年
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：山國 徹 准教授
ローマ字氏名：Tohru Yamakuni
研究協力者氏名：小林 和人 教授
ローマ字氏名：Kazuto Kobayashi
研究協力者氏名：一瀬 宏 教授
ローマ字氏名：Hiroshi Ichinose
研究協力者氏名：長谷川 一子 医師
ローマ字氏名：Kazuko Hasegawa

※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。