

令和元年6月15日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09675

研究課題名(和文) iPLA2 の機能解析によるパーキンソン病の病態解明

研究課題名(英文) Pathomechanisms of Parkinson disease due to dysfunction of iPLA2G6

研究代表者

波田野 琢 (Hatano, Taku)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60338390

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)：PLA2G6はレヴィ小体を有する家族性パーキンソン病(PARK14)の原因遺伝子である。つまり、PLA2G6の機能障害は α -シヌクレイン(AS)の凝集に関わる。本研究ではPLA2G6ノックアウトハエモデルを作成し、AS凝集と神経変性について検討した。PLA2G6はリン脂質の酵素であり、ノックアウトハエモデルではドパミン神経細胞が脱落し、それに関連した運動障害、睡眠障害を呈した。さらに脂質構成が障害されており、シナプス終末の機能障害とASの凝集を認めた。この障害はヒトPLA2G6により回復したが、A80T病的変異体では回復しなかった。さらにリノール酸添加で脂質構成が回復し症状が改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

α -シヌクレイン(AS)は脂質膜、中でもリン脂質に直接結合する事が知られている。膜への結合能の変化はAS凝集に関連し神経変性の原因となる。本研究でリン脂質代謝障害とAS凝集との関連を明らかにしており、パーキンソン病(PD)の病態解明につながる成果を挙げた。さらに、脂質補充をすることで脂質膜を変化させAS凝集を抑制し、神経変性を改善させる事を明らかにした。これにより適切な脂質を摂取する食事療法による治療への応用、つまりは医食同源を実現できる可能性を示した研究である。神経難病であるPDの病態解明として、脂質酵素に焦点を当て治療への応用を検討しており、学術的および社会的意義が高い研究である。

研究成果の概要(英文)：PLA2G6 is known as the causative gene of familial Parkinson's disease (PARK14). Pathological studies of PARK14 revealed dopaminergic neuronal degeneration with Lewy bodies (LB). Thus, impairment of PLA2G6 may be associated with the aggregation of α -synuclein (AS). To reveal the association between PLA2G6 dysfunction and AS aggregation, PLA2G6 knockout *Drosophila* was generated and exhibited motor and sleep dysfunction due to dopaminergic neuronal degeneration. Additionally, the fly model had synaptic terminal dysfunction. These phenotypes were rescued by overexpression of wild type human PLA2G6 but not A80T pathogenic mutation. Furthermore, I found an alteration in lipid composition and AS aggregation in the brain of the fly model. Administration of linoleic acid could rescue the phenotypes and AS aggregation. Therefore, lipid composition in the brain may be critical for the mechanisms of LB formation and lipid administration therapy might have an effect on Parkinson's disease.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 PARK14 PLA2G6 α -シヌクレイン リノール酸 リン脂質代謝 レヴィ小体

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

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は脳内にレヴィ小体が出現する神経変性疾患である。レヴィ小体の主な構成タンパクは α -シヌクレイン(AS)であり、このタンパクをコードする遺伝子の点変異、遺伝子重複は家族性 PD に関連している。AS は β -ヘリックス構造を取り脂質膜に強く結合するが、シート構造を取ると凝集する傾向となる。膜上で凝集したり、膜に結合が難しくなったりすることで凝集したりする可能性が考えられている。AS の膜結合はリン脂質を介していることが知られているが、膜の脂質構成が異なることは AS の凝集と密接に関連する可能性がある¹。このような背景の中で家族性 PD に関わる脂質代謝酵素の役割について検討し、病態メカニズムを解明する事を着想し、候補となる酵素の一つとして PLA2G6 に注目した。PLA2G6 はリン脂質の代謝酵素であり、その病的変異は PARK14 の原因となることが明らかにされている²。PARK14 は孤発性 PD と同様、レヴィ小体が多数認められており、AS の凝集による神経変性に関連していることが示唆されている³。そのため、この酵素の機能障害による細胞内環境の変化は孤発性 PD の病態に類似している可能性が示唆され、黒質神経細胞死の原因にも関連しうる。PLA2G6 はホスホリパーゼ A2 であり、グリセロリン脂質のアシル基を切断する酵素として知られている⁴。つまりこの酵素の機能障害は膜脂質の組成を変化させる事が示唆される。さらに、最近の報告より PLA2G6 の酵素障害はミトコンドリアの機能に関与する事も示されている。研究代表者は PLA2G6 が生体膜の脂質構成を変化させ、シナプス終末の障害を引き起こし、PD 発症メカニズムに関与する可能性に注目し、本研究を開始した。

2. 研究の目的

ショウジョウバエモデルを用いて、PLA2G6 の機能障害による脂質構成の変化が ドパミン神経細胞死や膜輸送を障害する事を明らかにし、AS の凝集とそのメカニズムを同定し、脂質補充療法で症状を改善させる可能性を示す事を目的とする。

3. 研究の方法

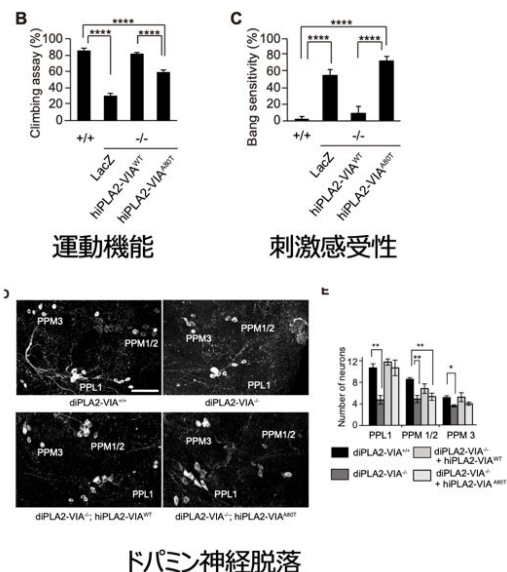
本研究ではショウジョウバエモデルを用いて脂質構成の変化と AS の蓄積およびそれに伴う神経変性について以下の検討を行った。

- (1) CLISPER/CAS9 により PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエモデルを作成した。このハエモデルについて、生存率、運動症状 (climbing assay)、刺激感受性 (bang sensitivity)、睡眠症状について行動異常の有無について検討した。
- (2) 組織学的にドパミン神経細胞の変性脱落について検討した。
- (3) マススペクトロスコピーを用いて脳内リン脂質の構成の変化を検討した。
- (4) 脂質の補充が症状を改善させるか検討した。
- (5) PLA2G6 のノックアウトに伴うシナプス小胞の形態及び機能障害について検討した。
- (6) AS 過剰発現ショウジョウバエと掛け合わせ AS 凝集が引き起こされる可能性について検討を行った。
- (7) 3 で得られた脂質構成によるリポソームを作成し、AS との結合について検討した。

4. 研究成果

(1) PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエモデルの表現型解析

PLA2G6 をノックアウトしたショウジョウバエモデルの表現系を解析した。Climbing assay を行ったところ、有意に運動機能障害の低下を認めた。また、bang sensitivity を行ったところ、ノックアウトショウジョウバエは過剰に反応し、痙攣および麻痺を起こし数秒間、体を動かすことができないという表現系を認めた。また、昼夜ともに睡眠障害をきたしていることが明らかになった。組織学的に解析したところ、カテコラミン神経細胞の脱落を認めた。運動症状、bang sensitivity、睡眠障害についてはヒト PLA2G6 を過剰発現させることで症状が回復した。しかしながら、病的変異である A80T PLA2G6 を過剰発現しても回復は一部に留まった。生存率についても検討を行ったが、PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエは優位に短くなった。



(2) PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエの組織学的解析

PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエのドパミン神経について組織学的に解析を行った。PPL1、PPM1/2、PPM3 のいずれに於いても神経細胞が脱落していることを明らかにした。この神経細胞脱落に関してヒト PLA2G6 を過剰発現させることで症状が回復した。しかしながら、病的変異である A80T PLA2G6 を過剰発現しても回復は一部に留まった。

(3) PLA2G6 の脂質解析

PLA2G6 はリン脂質のアシル基を切断し、リゾリン脂質へ代謝する酵素である。そのため、この酵素の機能障害は脂質構成を変化させる可能性がある。PLA2G6 のノックアウトショウジョウバエの脳組織について Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (ESI-MS) による解析を行った。ESI-MS では正常の PLA2G6 と比較して、18:0_18:2 のアシル基を持つリン脂質についての構成量は変化なかったが、14:0_16:1 および 14:0_14:0 と短鎖のアシル基の増加を認めた。さらに高温の状態にすると PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエは正常コントロールと比較して有意に死亡率が増加した。

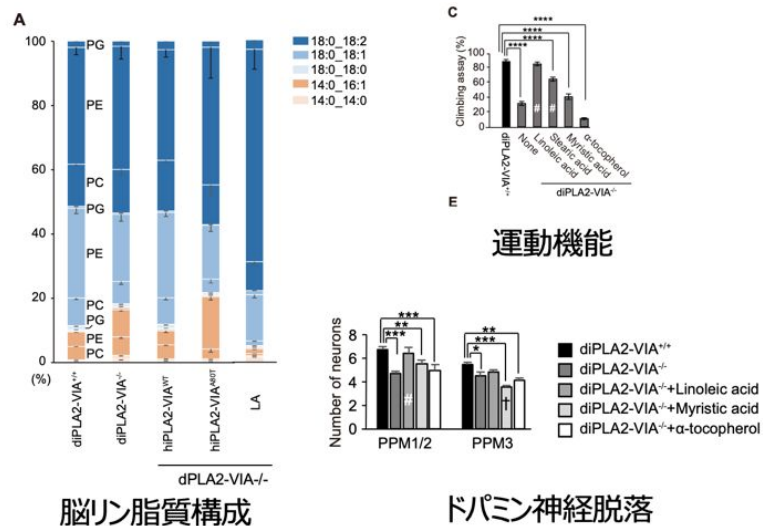
(4) 脂質補充療法の検討

PLA2G6 で認められた運動機能障害、ドパミン神経細胞脱落、温度感受性は脂質の厚生障害に伴う変化である可能性が示唆された。そのため、脂質補充療法により症状が改善する可能性について検討を行った。リノール酸 (18:2)、ステアリン酸 (18:0)、ミリスチン酸 (14:0) および抗酸化作用を持つ α -トコフェロールを餌に加えて投与した。Climbing assay を行いそれぞれの有用性を比較検討したところ、リノール酸で最も回復を認めた。そのためリノール酸を添加して検討を行ったところ、リン脂質の構成変化は改善し、ドパミン神経細胞脱落および温度感受性も回復を認めた。そのため脂質補充療法は PLA2G6 の障害に対して有用である可能性が示唆された。

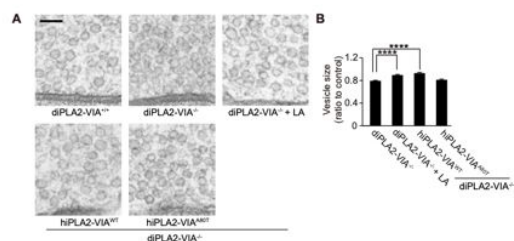
PLA2G6 ノックアウトバエではリン脂質のアシル基が短くなるが、リノール酸を添加することで構成が回復。運動機能やドパミン神経細胞脱落はリノール酸添加で回復

(5) PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエにおけるシナプス小胞の形態異常ならびに機能障害についての検討

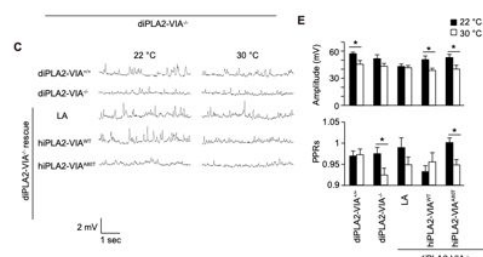
短鎖アシル基が増加すると小胞の膜構成を変化させ膜輸送に影響を与える可能性が示唆される。また、PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエでは Bang sensitivity が亢進していることからシナプス小胞や神経伝達に異常がある可能性を考えた。そのためシナプス小胞の形状について電子顕微鏡による解析を行った。PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエでは docked vesicle の数、シナプスボタンの数、active zone の数などは違いがなかった。しかし、シナプス小胞の大きさは減少していた。さらに、miniature excitatory junction potential (mEJP) を測定したところ、22 度と 30 度で発火パターンが異なることを明らかにした。これらの症状はヒト PLA2G6 を過剰発現すると回復したが、病的変異型 A80T PLA2G6 では回復しなかった。つまり、PLA2G6 をノックアウトすることで、シナプス小胞膜の形態が変化し、機能に影響を与えることを明らかにした。さらにリノール酸を投与すると、シナプス小胞の大きさ、電気活動の回復を認めた。以上から脂質のコンポ



PLA2G6 ノックアウトバエではリン脂質のアシル基が短くなるが、リノール酸を添加することで構成が回復。運動機能やドパミン神経細胞脱落はリノール酸添加で回復



PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエではシナプス小胞の形態が変化する

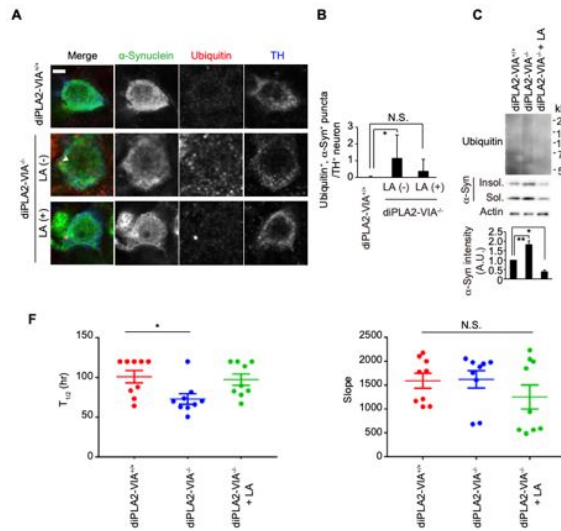


PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエではシナプスからの発火パターンが変化する

ーネットが神経終末の機能と形態に異常をもたらすことが明らかとなった。

(6) PLA2G6 の機能不全は α -シヌクレインの凝集に關与する。

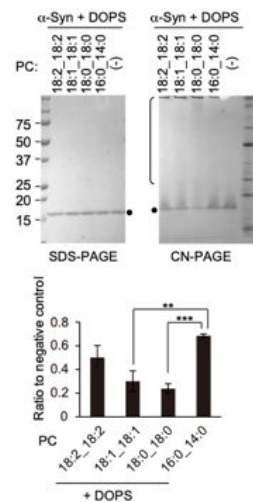
AS は N 末に α -ヘリックス構造を有しており、この構造からリン脂質を介して細胞膜へ直接結合することが知られている。我々は PLA2G6 の障害による PARK14 の病理学的検討で、レヴィ小体が認められることを明らかにしている。そのため、PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエは AS 凝集に影響を与える可能性が考えられる。ショウジョウバエは AS を持たないためヒト AS を過剰発現するショウジョウバエと交配させ、PLA2G6 ノックアウト/AS 過剰発現ショウジョウバエを作成した。このハエモデルではドパミン神経およびその他の神経細胞に AS の凝集が認められた。このハエモデルにリノール酸を投与すると AS の凝集が抑制された。また、ヒト PLA2G6 の過剰発現でも改善することができたが、病的変異 A80T PLA2G6 では改善しなかった。また、AS の凝集ポテンシャルについて RT-QUIC による検討を行った。結果、PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエはより早くに AS が凝集する傾向にあり、リノール酸を投与することで凝集能も改善することが示された。



PLA2G6ノックアウトショウジョウバエでは α -シヌクレインが凝集し、リノール酸の投与で改善する

(7) α -シヌクレインと膜の結合に関する検討

短鎖のアシル基が増えることで AS の凝集が生じる原因について、リポソームによる検討を行った。PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエでは 14:0_16:1 および 14:0_14:0 と短鎖のアシル基が増えており、このコンポーネントを持つリポソームを作成して検討を行った。16:0_14:0 の短鎖アシル基が増えているリポソームへは AS の結合が弱くなることが示された。AS の結合が弱くなる原因として Packing defect が増加している可能性を考えた。di-4NEPPDHQ という Packing defect を検出する色素を用いて検討した。結果、16:0_14:0 のアシル基を持つリポソームでは packing defect が増加していることが明らかになった。すなわち PLA2G6 ノックアウトショウジョウバエの膜に AS は結合しにくい状態となり、凝集傾向となることが示された。



研究成果のまとめ

PLA2G6 ショウジョウバエモデルではリン脂質のアシル基が短い短鎖リン脂質が増加することで、神経症状が前景となる機能異常が出現する。この異常は膜輸送のシナプスの大きさが変化し、放出能の異常が原因として考えられた。シナプス終末の機能障害からドパミン神経を含めた神経細胞の変性が生じ、運動機能障害、睡眠機能障害、生存率の低下を認めることが示唆された。これらの障害がリノール酸で回復することは興味深く、PLA2G6 の機能異常に関連した神経変性疾患の場合、医食同源による治療が可能になると考えられた。また、PLA2G6 がノックアウトされると AS の凝集が悪化する。この凝集についても脂質補充療法が有用である。つまり、孤発性 PD においても脂質補充療法が有用である可能性が考えられる。実際に過去のデータでパーキンソン病ではアラキドン酸の摂取が有意に多いという報告や、GM1 ガングリオシドが有用である可能性を示唆する報告もある。本研究成果より脂質療法はパーキンソン病の根治療法に繋がる可能性が考えられた。

アシル基の短いリポソームでは α -シヌクレインの結合が低下する

参考文献

1. Burre J, Sharma M, Sudhof TC. Cell Biology and Pathophysiology of alpha-Synuclein. Cold Spring Harb Perspect Med 2018;8.
2. Yoshino H, Tomiyama H, Tachibana N, et al. Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. Neurology 2010;75:1356-1361.
3. Miki Y, Yoshizawa T, Morohashi S, et al. Neuropathology of PARK14 is identical to idiopathic Parkinson's disease. Mov Disord 2017;32:799-800.
4. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 biochemistry. Cardiovasc Drugs Ther 2009;23:49-59.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 40 件)

1. Okuzumi A, **Hatano T**, Ueno SI, Ogawa T, Saiki S, Mori A, Koinuma T, Oji Y, Ishikawa KI, Fujimaki M, Sato S, Ramamoorthy S, Mohny RP, Hattori N. Metabolomics-based identification of metabolic alterations in PARK2. Ann Clin Transl Neurol 2019;6:525-536
2. Okuzumi A, Kurosawa M, **Hatano T**, Takanashi M, Nojiri S, Fukuhara T, Yamanaka T, Miyazaki H, Yoshinaga S, Furukawa Y, Shimogori T, Hattori N, Nukina N. Rapid dissemination of alpha-synuclein seeds through neural circuits in an in-vivo prion-like seeding experiment. Acta Neuropathol Commun. 2018 Sep 19;6(1):96.
3. Taniguchi D, **Hatano T**, Kamagata K, Okuzumi A, Oji Y, Mori A, Hori M, Aoki S, Hattori N. Neuromelanin and Midbrain Volumetry in Progressive Supranuclear Palsy and Parkinson's Disease. Mov Disord 2018;33:1488-1492
4. **Hatano T**, Okuzumi A, Kamagata K, Daida K, Taniguchi D, Hori M, Yoshino H, Aoki S, Hattori N. Neuromelanin MRI is useful for monitoring motor complications in Parkinson's and PARK2 disease. J Neural Transm 2017;124:407-415.
5. **Hatano T**, Saiki S, Okuzumi A, Mohny RP, Hattori N. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomics technologies. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2016;87:295-301

〔学会発表〕(計 46 件)

1. 波田野琢、服部信孝 神経化学からみた神経疾患 -ベンチとベッドサイドの間- 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会 合同年会 2018年9月17日
2. Hatano T, Taniguchi D, Kamagata K, et al. Neuromelanin Imaging and Midbrain Volumetry in Progressive Supranuclear Palsy and Parkinson's Disease. 16th Asia Oceanian Congress of Neurology 2018年11月8日
3. 森 聡生, 濃沼 崇博, 井下 強, 今居 譲, 波田野 琢, 服部 信孝 脂質改変治療はパーキンソン病の新たな疾患修飾治療になる 第36回日本神経治療学会学術集会 2018年11月23日から25日 東京
4. Hatano T, Okuzumi A, Saiki S, Sato S, Hattori N. Comprehensive metabolome analysis of serum of parkin knockout mice. Kyoto, 23rd World Congress of Neurology September 16-21 2017
5. Hatano T, Saiki S and Hattori N. Symposium; Fission, Fusion, Autophagy-2 Mitochondrial dysfunction and Parkinson's disease The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine [ASMRM] and The 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine [J-mit] Oct 30 2016-Nov 1 2016

〔図書〕(計 4 件)

1. 波田野琢, 水野美邦: 感覚障害, しびれ, 痛み 神経内科ハンドブック 鑑別診断と治療 第5版 水野美邦編 医学書院 2016年9月
2. 波田野琢, 水野美邦: 構音障害 神経内科ハンドブック 鑑別診断と治療 第5版 水野

- 美邦編 医学書院 2016年9月
3. 波田野琢, 森聡生, 服部信孝 遺伝性パーキンソン病 神経内科外来シリーズ 2 パーキンソン病外来 荒木信夫, 山元敏正, 高橋一司編 メジカルビュー社 2016年3月
 4. 波田野琢, 服部信孝 Lewy 小体型認知症 神経内科外来シリーズ 2 パーキンソン病外来 荒木信夫, 山元敏正, 高橋一司編 メジカルビュー社 2016年3月

〔産業財産権〕

取得状況(計2件)

名称: パーキンソン病診断薬及びモデル動物
発明者: 服部 信孝、王子 悠、波田野 琢
権利者: 学校法人順天堂・学校法人川崎医科大学
種類: 特許
番号: 2018-200039
取得年: 2018年10月24日
国内外の別: 国内

名称: -シヌクレイノパチーの診断
発明者: 服部信孝、波田野琢、奥住文美、上野真一
権利者: 学校法人順天堂
種類: 特許
番号: 2018-159694
取得年: 2018年8月28日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 該当なし

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: 該当なし

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。