

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08302

研究課題名(和文) ドパミン代謝とミトコンドリアストレスによる細胞毒性の相互増強機構

研究課題名(英文) Mechanism of reciprocal enhancement of dopamine metabolism and mitochondrial stress-induced neurotoxicity

研究代表者

笹島 仁 (SASAJIMA, Hitoshi)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：00374562

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)：ドパミン神経細胞は他の神経細胞に比べミトコンドリアストレスに脆弱であり、その神経変性は嗅覚障害やパーキンソン病の原因となる。本研究は、従前アポトーシスによると考えられてきたドパミン神経変性が、非アポトーシス性であること、ドパミン代謝調節が細胞死の抑制に効果的であること、モノアミン誘導体の一種に強力なドパミン神経細胞保護作用があることを明らかにした。また、この細胞死はドパミン合成阻害剤、モノアミン酸化酵素阻害剤、鉄キレート剤、オートファジー阻害剤によって抑制しうる事が判明し、ドパミン神経変性における鉄依存的オートファジーであるフェリチノファジーの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存のパーキンソン病の治療では、ドパミン前駆体の投与もしくはドパミン代謝酵素阻害薬の投与により、脳内ドパミン濃度を保つことが主眼となっているが、いわば対症療法に過ぎず、原因であるドパミン神経変性の進行は阻止も遅延もできないため、やがて投薬効果が減少する。そこで次世代パーキンソン病治療に求められる方策は、iPS由来ドパミン神経細胞移植と、ドパミン神経変性阻止と言える。本研究では、ドパミン神経変性阻止方法の新たなプラットフォームとして細胞内鉄動態の調節を提示する。フェリチノファジー誘導感度の調節、あるいは細胞内2価鉄の局在管理により、ドパミン神経変性を未然に防ぐ可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Dopaminergic neurons are more vulnerable to mitochondrial stress than other neurons, and their neurodegeneration causes olfactory dysfunction and Parkinson's disease. This study revealed that dopaminergic neurodegeneration, previously thought to be caused by apoptosis, is nonapoptotic, that modulation of dopamine metabolism is effective in suppressing cell death, and that a type of monoamine derivative has potent dopaminergic neuron protective effects. It was also found that this cell death could be inhibited by dopamine synthesis inhibitors, monoamine oxidase inhibitors, iron chelators, and autophagy inhibitors, suggesting the involvement of ferritinophagy, an iron-dependent autophagy in dopaminergic neurodegeneration.

研究分野：細胞生物学

キーワード：神経変性 フェロトーシス ドパミン ミトコンドリアストレス 鉄代謝 活性酸素 モノアミン

1. 研究開始当初の背景

脳内ドパミン神経細胞は加齢とともに減少し、後期高齢者における中枢性運動機能低下の主因となる。ドパミン神経変性が加速した病態であるパーキンソン病では、中脳黒質ドパミン神経細胞の脱落により、運動・情動障害が表出する。加齢や孤発性パーキンソン病におけるドパミン神経変性の直接原因は不明である。一方、家族性パーキンソン病ではミトコンドリア品質管理に関わる遺伝子に変異があること、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤はドパミン神経変性を誘導することが明らかにされている。すなわち、ミトコンドリア品質管理の破綻や呼吸鎖阻害による異常ミトコンドリアの蓄積は、ドパミン神経細胞の脆弱点のひとつであると考えられている。

異常ミトコンドリアでの不完全な電子伝達反応は、活性酸素産生を増大し、細胞死誘導に関与する。しかし、ミトコンドリア活性酸素の除去酵素をノックアウトした動物では、特異的なドパミン神経細胞の変性は見られない。なぜドパミン神経細胞が、他の細胞に比べミトコンドリア機能低下(ミトコンドリアストレス)に脆弱なのかは依然として不明なままである。ミトコンドリアストレスによるドパミン神経細胞死は、ドパミン産生酵素の阻害により防ぐことができるため、細胞内ドパミン代謝機構そのものも、ドパミン神経細胞の脆弱点のひとつであると考えられている。しかし、どのようにドパミン代謝がミトコンドリアストレスとともに神経変性をもたらすのか、その関係性には不明な点が多く残されている。両者の関連機序を明らかにすることは、加齢や病態におけるドパミン神経変性の予防・阻止方法を開発するために必須の課題である。

臨床病態に着目すると、現在のパーキンソン病治療はドパミン補充を主体とする対症療法であり、過剰なドパミン補充が神経変性を加速する危険性が示唆されるとともに、原因となるドパミン神経変性の阻止はできない。また、これまでにドパミン神経変性の予防・進行阻止法は確立されていない。先端研究における iPS 由来ドパミン神経細胞の移植は、重度パーキンソン病治療に極めて有望であるが、現段階では安全性や費用対効果に高いハードルを持つことに加え、神経変性を進めるバックグラウンドのもとでは、移植細胞も変性する恐れが高い。一方、ドパミン神経細胞の脆弱性の根源を解明することは、ドパミン神経変性の予防法開発に必須であり、現行の治療・研究と異なる予防医学を発展させることが期待できる。

2. 研究の目的

ドパミン神経変性の要因となる”ミトコンドリアストレス”と”ドパミン代謝機構”は、相互に細胞毒性を増強するが、両者の関連機序は不明である。本研究では、ゲノム編集により樹立したドパミン代謝遺伝子ノックアウト細胞を用いて、ミトコンドリアストレスとドパミン代謝機構による細胞毒性増強機構の究明を目的とする。また、細胞毒性評価試験において獲得される数値指標をもとに、ミトコンドリア機能調節およびドパミン代謝調節による神経変性の薬理的阻止方法の開発を企図する。嗅球ドパミン神経変性モデルマウスに対して、神経変性阻止の候補化合物を嗅覚輸送により脳内薬物送達し、生体内でのドパミン神経変性阻止効果を検証する。

3. 研究の方法

ラット PC12 細胞は、神経成長因子添加培地においてドパミン神経細胞様に分化する。ロテノンはミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害剤であり、動物への慢性投与時に中脳黒質緻密部ドパミン神経細胞の脱落をもたらすことが知られている。そこで、未分化型 PC12 細胞とドパミン神経様分化型 PC12 細胞に対し、ミトコンドリアストレスとして種々の濃度のロテノンを添加培地で培養を行い、ドパミン神経様分化型細胞にのみ特異的な細胞死を与える濃度域を決定した。

このロテノンによるミトコンドリアストレス条件下で、ドパミン神経細胞固有の脆弱性をもたらすと目されるドパミン合成・代謝酵素の阻害剤を加え、細胞生残性を測定することで、ミトコンドリアストレスとドパミン代謝の負のシナジーたる細胞死相互増強効果を検討した。また、未分化 PC12 細胞を用いてドパミンの合成酵素、分解代謝酵素のノックアウト細胞をゲノム編集により作成し、分化後のミトコンドリアストレス耐性を検討することにより、ドパミン代謝酵素の欠損がドパミン神経細胞固有の脆弱性であることを確認した。

従来、ドパミン神経変性機構はアポトーシス誘導によるものと考えられていることから、ロテノン誘導細胞死を、アポトーシス阻害剤が抑制しうるか検討した。一方、非アポトーシス性の細胞死誘導についても検討をおこなった。主たるプログラム細胞死機構は、アポトーシス、ネクローシス、オートファジー細胞死に大別されるが、このうち、ドパミン変性疾患患者の剖検からもネクローシスは可能性が除外されるため、オートファジーの関与についても検討を行った。

オートファジー細胞死は、通常、細胞の栄養飢餓状態がトリガーとなり無差別なオルガネラの自食により細胞機能が欠落し細胞死をもたらす。しかし近年、オートファジーには様々なオルガネラ特異的な分解代謝機構が存在することが明らかになっている。ミトコンドリア特異的なオートファジーであるマイトファジーは、異常ミトコンドリアのクリアランス機構として機能し、細胞内ミトコンドリアの健全性の維持に関わる。家族性パーキンソン病の責任遺伝子群には、マイトファジー関連遺伝子が含まれており、マイトファジー誘導不全がドパミン神経変性をもたら

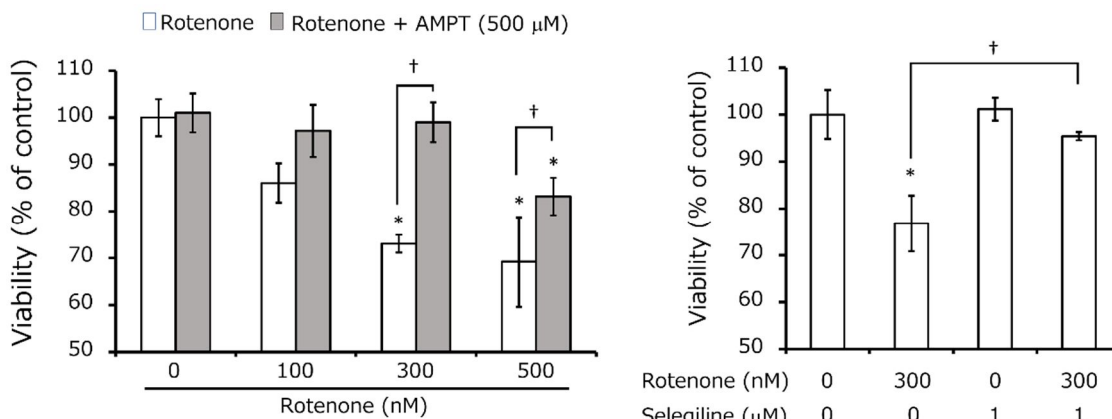
すことから、ロテノン誘導ドパミン神経変性において過剰ミトファジーによる細胞死誘導の可能性は低い。他方、細胞質鉄プール(フェリチン貯蔵鉄)特異的なオートファジーであるフェロトーシスは、細胞質に活性酸素産生の連鎖反応をもたらす2価鉄イオンの氾濫をもたらし、タンパク質、脂質の過酸化により細胞死を誘導することが、近年明らかとなった。そこで本研究では、ロテノン誘導ドパミン神経変性に鉄イオンの関与があるか検討した。

4. 研究成果

PC12細胞を未分化条件、NGF分化条件(75 ng/mL マウス顎下腺由来神経成長因 2.5S, 48時間)で培養した後、種々の濃度のロテノンを培地に添加し24時間の培養を行った。細胞を回収しトリパンブルー染色後に生細胞、死細胞を自動セルカウンターで計測した。その結果、ドパミン神経細胞様に分化したPC12細胞でのみ、300 nMという低濃度で細胞死誘導が見られたが、未分化細胞では500 nM以上のロテノンで細胞死を誘導することが明らかとなった。従前のドパミン神経変性研究では、1 μMロテノンによる細胞死誘導という方法が散見されるが、同濃度では、未分化PC12細胞のみならず、HeLa細胞やU2OS細胞など、非神経細胞でも細胞死を誘導しうることから、ドパミン神経細胞固有の脆弱性に注目するには、低濃度ロテノン処理が必要であるといえる。ただし、より分化条件を強く(長時間NGF処理)した場合は、よりロテノン感受性が高まる可能性が考えられるが、より長期の分化により基底側からの細胞剥離が問題となることから、ドパミン神経細胞のミトコンドリアストレス耐性の測定を上記条件に固定した。

低濃度ロテノン処理による細胞死が、アポトーシスによるものであるか検討するため、ロテノン処理24時間前より細胞透過性の全カスパーゼ阻害剤Z-VAD-FMKを培地に添加し、細胞生存性を検討した。その結果、Z-VAD-FMKは部分的にロテノン誘導細胞死を抑制したのみであり、ミトコンドリアストレスによるドパミン神経変性には、非アポトーシス性の細胞再誘導機構が介在するものと考えられた。

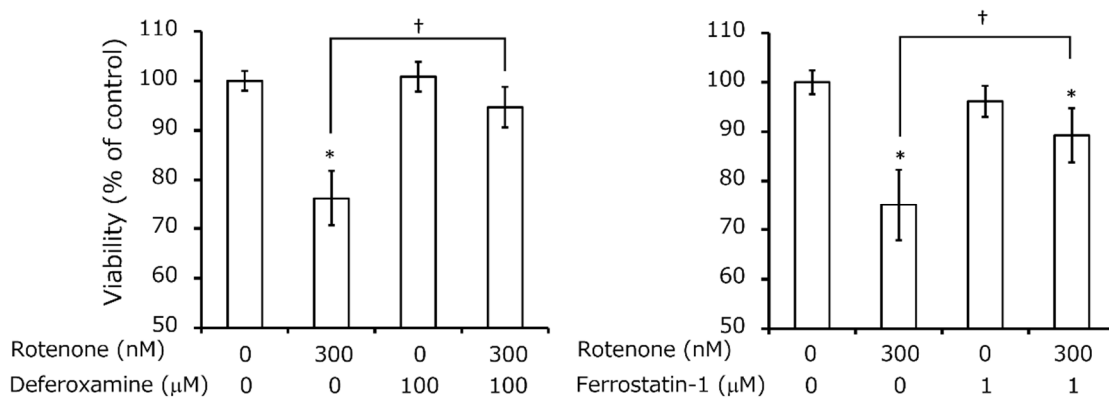
ドパミン神経細胞の脆弱性は、ドパミンもしくは、ドパミン生合成・分解代謝に起因するものであることを確認すべく、ドパミン合成阻害剤{α-メチル-p-チロシン(AMPT); チロシンヒドロキシラーゼ(TH)阻害)、ドパミン分解代謝阻害剤(エンタカポン; カテコール-o-メチルトランスフェラーゼ(COMT)阻害、セレギリン; モノアミンオキシダーゼ-B(MAOB)阻害)の存在下で、低濃度ロテノン誘導細胞死を測定した。その結果、AMPT(下図左)とセレギリン(下図右)処理によって、大部分の細胞死が抑制されたことから、MAOBによるドパミン分解代謝が、ロテノンとの細胞死誘導に寄与することが示唆された。未分化PC12細胞に対しゲノム編集を行い、TH、COMTやMAOBの欠失細胞株を作成し、ロテノン誘導細胞死を検討したところ、前述阻害剤の結果と同じく、TH欠失細胞、MAOB欠失細胞では細胞死が抑制された。



小胞体外のドパミンは自動酸化によりドパミンキノン体を形成し、活性酸素反応を助長することが知られている一方、MAOBによるドパミン分解代謝過程でも活性酸素が発生することが知られている。このことから、ロテノンによるミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの阻害による不完全な電子伝達系が生ずる活性酸素の増大とともに、ドパミン代謝による活性酸素の相加効果がドパミン神経細胞固有の脆弱性である可能性も考えられる。しかし、この場合、抗酸化物質がラジカル除去に著効するはずであるが、従前報告では抗酸化物質による大幅な細胞死抑制は報告例が無い。上記で生ずる活性酸素は、細胞死誘導のトリガーとなっていることが推測されるが、第三の因子が細胞死誘導の律速を担っていると考えられた。

非アポトーシス性細胞死の誘導機構を検討すべく、オートファジー阻害剤(バフィロマイシンA1; V-ATPase阻害によるリソソーム中和)を添加したところ、Z-VAD-FMKに比して大幅に細胞死を抑制した。そこで、フェリチン貯蔵鉄特異的なオートファジー誘導による細胞質鉄イオンの氾濫を想定し、鉄キレート剤であるデフェロキサミン(次頁図左)で処理したところ、同じくロテノン誘導細胞死を抑制した。ここで、ドパミン神経変性に鉄依存的細胞死誘導機構であるフェロトーシスの関与が推察されたため、フェロトーシス阻害作用を有するフェロスタチン(次頁図右)で処理したところ、こちらも細胞死を抑制し、ミトコンドリアストレスが誘導するドパミン神経

変性機構とは、フェロトーシスであることが示唆された。



ミトコンドリアは、鉄-硫黄クラスターの働きによりクエン酸回路のみならず電子伝達系を駆動することから、ロテノンによる呼吸鎖複合体Iの阻害がミトコンドリアへの鉄動員のシグナルとなり、フェロトーシスを誘導した可能性が考えられる。細胞質の2価鉄が、ドパミン代謝で生じた活性酸素をトリガーとして、フェントン反応による活性酸素産生の連鎖反応を生み出しフェロトーシスを誘導した可能性が挙げられるが、ドパミン代謝と鉄イオンの相互作用については、さらなる解析を必要とする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sayaka Kashiwagi, Yoichiro Fujioka, Takeshi Kondo, Aya O. Satoh, Aiko Yoshida, Mari Fujioka, Hitoshi Sasajima, Maho Amano, Takanori Teshima, Yusuke Ohba	4. 巻 44
2. 論文標題 Localization of BCR-ABL to Stress Granules Contributes to Its Oncogenic Function.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 195-204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sayaka Kashiwagi, Yoichiro Fujioka, Aya O. Satoh, Aiko Yoshida, Mari Fujioka, Prabha Nepal, Atsushi Tsuzuki, Ozora Aoki, Sarad Paudel, Hitoshi Sasajima, Yusuke Ohba	4. 巻 44
2. 論文標題 Folding Latency of Fluorescent Proteins Affects the Mitochondrial Localization of Fusion Proteins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 183-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sasajima H, Fujioka Y, Sato A, Nepal P, Kashiwagi S, Tsuzuki A, Aoki O, Fujioka M, Yoshida A, Paudel S, Nanbo A, Ohba Y
2. 発表標題 Analysis of non-apoptotic cell death mediated by dopamine catabolism under inhibition of mitochondrial respiration
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 笹島仁, 野口智弘, 宮園貞治, 柏柳誠
2. 発表標題 ドバミン代謝とミトコンドリア機能障害の合成神経毒性に対するハーブ由来抗酸化成分カルノシン酸、ローズマリン酸の効果.
3. 学会等名 日本味と匂学会第51回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------