

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08312

研究課題名(和文) ドパミン作動性神経への亜鉛過剰流入から視たパーキンソン病・運動障害の機序と回避

研究課題名(英文) Pathogenic mechanisms of Parkinson's disease and movement disorders mediated by excess zinc influx into dopaminergic neuron and its rescue

研究代表者

玉野 春南 (Tamano, Haruna)

静岡県立大学・薬学部・特任講師

研究者番号：30322697

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)：パーキンソン病モデル作製に用いられる神経毒で活性酸素産生物質の6-ヒドロキシドパミンやパラコートを用いた黒質投与すると、黒質-線条体のドパミン作動性神経変性と運動障害を惹起する。この黒質神経変性には、黒質ドパミン作動性神経のグルタミン酸受容体サブタイプのAMPA受容体活性化を介した細胞外亜鉛流入による亜鉛毒性に起因すること、加齢による黒質神経変性増大に亜鉛毒性が密接に関係すること、AMPA受容体活性化には活性酸素産生を介した黒質グルタミン酸作動性神経終末の興奮が関与することが示唆された。黒質細胞内亜鉛恒常性破綻の阻止はパーキンソン病の予防・阻止に有用で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

活性酸素産生物質によって誘発されるパーキンソン病モデル動物を用いた本研究から、脳黒質ドパミンニューロン変性のメカニズムには、活性酸素によって誘導される黒質細胞外亜鉛の速やかな過剰流入による細胞内亜鉛毒性が重要であること、この亜鉛毒性を阻止することはパーキンソン病の予防・阻止につながることを示された。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease (PD) is characterized by a selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra in the brain. This study demonstrates a unique mechanism of nigral dopaminergic degeneration, in which rapid intracellular Zn²⁺-dysregulation via reactive oxygen species (ROS) production causes PD in rats, which is induced by paraquat (PQ) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA). ROS produced with PQ and 6-OHDA, which is retrogradely transported to presynaptic glutamatergic neuron terminals, activate TRPM2 cation channels and increase glutamate release, resulting in intracellular Zn²⁺ dysregulation in postsynaptic nigral dopaminergic neurons via rapid extracellular Zn²⁺ influx via AMPA receptor activation.

研究分野：神経科学

キーワード：パーキンソン病 黒質 細胞外亜鉛 亜鉛毒性 活性酸素 ドパミン作動性神経 グルタミン酸興奮毒性

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸興奮毒性、すなわちグルタミン酸受容体の異常な活性化による細胞内 Ca^{2+} 増加による神経細胞死は脳虚血などの脳疾患で報告されてきた。しかし、 Ca^{2+} より細胞外 Zn^{2+} の過剰な流入が神経細胞死に強く関与するとの指摘がある。海馬神経細胞において細胞外 Ca^{2+} ではなく、細胞外 Zn^{2+} が過剰に流入すると、記憶獲得が障害され、保持されていた記憶も消失することを明らかにした^{1,2,3}。すなわち、神経細胞への過剰な Zn^{2+} 流入により海馬の長期増強 (LTP) などシナプス機能が障害されるとの新規エビデンスに基づき、黒質緻密部ドパミン作動性神経細胞においても細胞外 Zn^{2+} の過剰な流入が神経変性を介したパーキンソン病様症状のカギとなるとの考えに至った。

2. 研究の目的

神経細胞死においても細胞内 Ca^{2+} でなく、細胞内 Zn^{2+} レベルの過剰な増加がカギとなるとの考えに基づき、パーキンソン病モデル作製の神経毒で活性酸素産生物質の 6-ヒドロキシドパミン (6-hydroxydopamine: 6-OHDA) もしくはパラコートを黒質に投与し、誘導される神経細胞死および運動障害のメカニズムにドパミン作動性神経への過剰な細胞外 Zn^{2+} の流入が関与すること、この Zn^{2+} 流入の阻害あるいは流入した Zn^{2+} をキレート化することで障害が改善・回避されることを実証することを目的とした。

3. 研究の方法

ラットの黒質緻密部 (ドパミン作動性神経の細胞体が存在する部位) にインジェクションカニューレ (内径 0.15 mm、外径 0.35 mm) を用いて 6-OHDA、パラコート等を投与した。投与 2 週間後における運動障害をアポモルフィン皮下投与誘発回轉運動により評価した。この運動障害の評価後に、脳切片を作製し、黒質または線条体でのドパミン作動性神経の変性をドパミンニューロンの指標であるチロシンヒドロキシラーゼの免疫染色により評価した。

4. 研究成果

(1) ラットの黒質緻密部に 6-OHDA を投与すると 2 週間後に黒質-線条体ドパミン作動性神経の脱落と運動障害が誘導される。6-OHDA 黒質投与により黒質緻密部細胞内 Zn^{2+} レベルは速やかに増加すること、この増加は細胞外 Zn^{2+} キレーターの CaEDTA およびグルタミン酸受容体サブタイプの AMPA 受容体の阻害剤である CNQX の存在下で抑制された。また、6-OHDA 誘発運動障害および黒質-線条体ドパミン作動性神経の脱落は、細胞内 Zn^{2+} キレーターと 6-OHDA の同時投与で改善された。すなわち、6-OHDA 誘発性黒質神経変性は黒質ドパミン作動性神経への AMPA 受容体を介した細胞外 Zn^{2+} 流入による細胞内 Zn^{2+} 毒性が密接に関係することが示唆された⁴。

そこで、AMPA 受容体活性化とパーキンソン症状である黒質神経変性・運動障害との関係を追求した。AMPA 受容体作動薬の AMPA を黒質に投与したラットでは、黒質緻密部の細胞内 Zn^{2+} レベルが増加し、黒質神経変性と運動障害が誘導された。この増加は AMPA と細胞内 Zn^{2+} キレーターを同時投与することで、抑制され、黒質神経変性と運動障害が改善されたことから、黒質 AMPA 受容体活性化は、細胞内 Zn^{2+} 増加を介しラットパーキンソン症状を誘発することが明らかとなった⁵。

(2) パラコート誘発黒質神経変性および運動障害においても、6-OHDA の場合と同様に細胞内 Zn^{2+} キレーターの同時投与により運動障害および黒質神経変性は改善された。

さらにマイクロダイアリシス法により、パラコート由来活性酸素産生を介して活性酸素感受性カチオンチャンネルの TRPM2 チャンネルが活性化され、黒質では細胞外グルタミン酸濃度が増加し、細胞外 Zn^{2+} レベルが減少することが示された。また、開口放出蛍光指示薬を取り込ませた脳スライス実験により、細胞外グルタミン酸濃度の増加はグルタミン酸作動性神経終末の TRPM2 チャンネル活性化を介した開口放出の増加であることが示された。一方、パラコート誘発活性酸素産生ならびに細胞外グルタミン酸濃度の増加は若齢 (10~15 週齢) と老齢 (>70 週齢) ラットで同程度であった。興味深いことに、パラコート誘発黒質緻密部細胞内 Zn^{2+} レベルの増加は老齢ラットで顕著に増加した。プレニューロン (グルタミン酸作動性神経) の TRPM2 チャンネル活性化を介し、細胞外 Zn^{2+} はポストニューロン (ドパミン作動性神経) のグルタミン酸受容体である AMPA 受容体活性化により流入し、この流入が老齢ラットで増加した。さらに、パラコート誘発神経細胞死は老齢ラットで顕著に増加したが、この増加は細胞外 Zn^{2+} キレーター-CaEDTA の同時投与により完全に阻止された。また、線条体では Zn^{2+} 毒性は惹起されず、パラコート誘発神経脱落は観察されなかった。以上から黒質ドパミン作動性神経変性に対する加齢に伴う脆弱化は黒質での TRPM2 チャンネル活性化を介した Zn^{2+} 毒性によることが明らかとなった^{6,7}。

(3) 本研究結果から、黒質ドパミン作動性の AMPA 受容体活性化を介した速やかな Zn^{2+} 流入による細胞内 Zn^{2+} 恒常性破綻が黒質神経変性の鍵となること、これにより運動障害を誘発することを明らかにした。すなわち、活性酸素産生物質誘発性の黒質神経変性・運動障害のメカニズムが、黒

質細胞内亜鉛毒性に起因することを国内外に初めて報告するものである。さらに、細胞内亜鉛毒性を改善する亜鉛キレーターやAMPA受容体阻害剤はパーキンソン病発症の予防・阻止に有用であることが本研究で示された。

[文献]

1. Miki Suzuki, Yuki Fujise, Yuka Tsuchiya, Haruna Tamano, and Atsushi Takeda: Excess influx of Zn^{2+} into dentate granule cells affects object recognition memory via attenuated LTP. **Neurochem. Int.**, 87, 60-65 (2015) DOI: org/10.1016/j.neuint.2015.05.006.
2. Atsushi Takeda and Hanuna Tamano: Insight into cognitive decline from Zn^{2+} dynamics through extracellular signaling of glutamate and glucocorticoids. **Arch. Biochem. Biophys.**, (2016) DOI: 10.1016/j.abb.2016.06.021.
3. Atsushi Takeda and Hanuna Tamano: Innervation from the entorhinal cortex to the dentate gyrus and the vulnerability to Zn^{2+} . **J. Trace Elem. Med. Biol.**, 38, 19-23 (2016) DOI: org/10.1016/j.jtemb.2016.05.006.
4. Haruna Tamano, Ryusuke Nishio, Hiroki Morioka, Atsushi Takeda: Extracellular Zn^{2+} influx into nigral dopaminergic neurons plays a key role for pathogenesis of 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. **Mol. Neurobiol.**, 56, 435-443 (2019). DOI: 10.1007/s12035-018-1075-z.
5. Haruna Tamano, Hiroki Morioka, Ryusuke Nishio, Azusa Takeuchi, Atsushi Takeda: AMPA-induced extracellular Zn^{2+} influx into nigral dopaminergic neurons causes movement disorder in rats. **NeuroToxicology**, 69, 23-28 (2018). DOI: 10.1007/s12035-018-1398-9.
6. Haruna Tamano, Ryusuke Nishio, Hiroki Morioka, Atsushi Takeda: Extracellular Zn^{2+} influx into nigral dopaminergic neurons plays a key role for pathogenesis of 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. **Mol. Neurobiol.**, 56, 435-443 (2019). DOI: 10.1007/s12035-018-1075-z.
7. Haruna Tamano, Ryusuke Nishio, Hiroki Morioka, Ryo Furuhashi, Yuma Komata, Atsushi Takeda: Paraquat as an environmental risk factor in Parkinson's disease accelerates age-related degeneration via rapid influx of extracellular Zn^{2+} into nigral dopaminergic neurons. **Mol. Neurobiol.** (2019) DOI: 10.1007/s12035-019-01642-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamano Haruna, Nishio Ryusuke, Morioka Hiroki, Furuhata Ryo, Komata Yuuma, Takeda Atsushi	4. 巻 56
2. 論文標題 Paraquat as an Environmental Risk Factor in Parkinson's Disease Accelerates Age-Related Degeneration Via Rapid Influx of Extracellular Zn ²⁺ into Nigral Dopaminergic Neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 7789 ~ 7799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1007/s12035-019-01642-5	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 Tamano Haruna, Morioka Hiroki, Nishio Ryusuke, Takeuchi Azusa, Takeda Atsushi	4. 巻 56
2. 論文標題 Blockade of Rapid Influx of Extracellular Zn ²⁺ into Nigral Dopaminergic Neurons Overcomes Paraquat-Induced Parkinson's Disease in Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 4539 ~ 4548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-018-1398-9	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 Haruna Tamano, Hiroki Morioka, Ryusuke Nishio, Azusa Takeuchi, Atsushi Takeda	4. 巻 69
2. 論文標題 AMPA-induced extracellular Zn ²⁺ influx into nigral dopaminergic neurons causes movement disorder in rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 NeuroToxicology	6. 最初と最後の頁 23-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuro.2018.08.008.	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 Tamano Haruna, Nishio Ryusuke, Morioka Hiroki, Takeda Atsushi	4. 巻 56
2. 論文標題 Extracellular Zn ²⁺ Influx into Nigral Dopaminergic Neurons Plays a Key Role for Pathogenesis of 6-Hydroxydopamine-Induced Parkinson's Disease in Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 435 ~ 443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s12035-018-1075-z	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35件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 竹内梓紗, 西尾隆佑, 森岡洋貴, 玉野春南, 武田厚司
2. 発表標題 ドパミン作動性ニューロンへの細胞外Zn ²⁺ 流入は6-ヒドロキシドパミン誘発性ラットパーキンソン病のキーとなる
3. 学会等名 第29回日本微量元素学会（名古屋）Biomed. Res. Trace Elements, 29, p.80
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森岡洋貴, 西尾隆佑, 竹内梓紗, 玉野春南, 武田厚司
2. 発表標題 パラコート誘発性ドパミン作動性神経細胞内Zn ²⁺ 増加はパーキンソン症候群を惹起する
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会（大阪）プログラム・要旨集, S227,
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西尾隆佑, 森岡洋貴, 竹内梓紗, 玉野春南, 武田厚司
2. 発表標題 6-ヒドロキシドパミン誘発ラットパーキンソン病はドパミン作動性神経への細胞外Zn ²⁺ 流入に起因する.
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会（大阪）プログラム・要旨集, S250
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Morioka, Ryusuke Nishio, Azusa Takeuchi, Haruna Tamano, Atsushi Takeda
2. 発表標題 Blockade of rapid influx of extracellular Zn ²⁺ into nigral dopaminergic neurons overcomes Paraquat-induced Parkinson's disease in rats
3. 学会等名 Society for Neuroscience 48th Annual Meeting (San Diego, USA) Program No. 743.15 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Takeda, Ryusuke Nishio, Hiroki Morioka, Haruna Tamano
2. 発表標題 Extracellular Zn ²⁺ influx into nigral dopaminergic neurons plays a key role for pathogenesis of 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats
3. 学会等名 Society for Neuroscience 48th Annual Meeting (San Diego, USA) Program No. 753.21 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐伯奈々, 西尾隆佑, 森岡洋貴, 竹内梓紗, 玉野春南, 武田厚司
2. 発表標題 黒質AMPA受容体活性化は細胞内Zn ²⁺ 毒性を介しパーキンソン病様運動障害を誘導する
3. 学会等名 日本薬学会第139年会 (千葉) 23N-pm23S
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西尾隆佑, 森岡洋貴, 竹内梓紗, 佐伯奈々, 玉野春南, 武田厚司
2. 発表標題 パラコート黒質投与によるパーキンソン病様運動障害は活性酸素種産生を介した細胞外Zn ²⁺ 流入に起因する
3. 学会等名 日本薬学会第139年会 (千葉) 230-pm08S
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内梓紗, 西尾隆佑, 森岡洋貴, 佐伯奈々, 玉野春南, 武田厚司
2. 発表標題 黒質細胞外Zn ²⁺ 流入は 6-ヒドロキシドパミン誘発性ラットパーキンソン病のトリガーとなる
3. 学会等名 日本薬学会第139年会 (千葉) 230-pm10S
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruna Tamano, Ryusuke Nishio, Hiroki Morioka, Azusa Takeuchi, Atsushi Takeda
2. 発表標題 Extracellular Zn ²⁺ influx into nigral dopaminergic neurons plays a key role for pathogenesis of 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease model in rats
3. 学会等名 14th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases(AD/AD 2019)リスボン(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruna Tamano, Hiroki Morioka, Ryusuke Nishio, Azusa Takeuchi, Atsushi Takeda
2. 発表標題 Blockade of rapid influx of extracellular Zn ²⁺ into nigral dopaminergic neurons overcomes Paraquat-induced Parkinson's disease in rats
3. 学会等名 14th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases(AD/AD 2019), リスボン(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruna Tamano
2. 発表標題 LTP and memory are lost by extracellular Zn ²⁺ influx: its relationship to aging
3. 学会等名 International Society for Zinc Biology 2017 Meeting (Pyla, Cyprus), June 22, 2017(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 玉野春南
2. 発表標題 海馬および黒質のシナプス亜鉛イオン毒性：記憶障害からパーキンソン病様運動障害まで
3. 学会等名 日本薬学会第138年会一般シンポジウムS31(金沢)3月27日(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 玉野春南
2. 発表標題 海馬細胞外Zn ²⁺ 流入は老齡に伴う認知機能障害に關与する
3. 学会等名 フォーラム2017：衛生薬学・環境トキシコロジー（仙台）講演要旨集，p.136，2017年9月1日（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 玉野春南，武田厚司
2. 発表標題 認知活動における海馬細胞外Zn ²⁺ の陰と陽
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2017（日本毒性学会 生体金属部会）（岡山）講演プログラム・要旨集，p.44，2017年10月13日（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西尾隆佑，森岡洋貴，玉野春南，武田厚司
2. 発表標題 6-ヒドロキシドパミンによるパーキンソン病様運動障害における細胞内Zn ²⁺ シグナルの關与とその回避
3. 学会等名 フォーラム2017：衛生薬学・環境トキシコロジー（仙台）講演要旨集，p.291，2017年9月1日
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西尾隆佑，森岡洋貴，竹内梓紗，玉野春南，武田厚司
2. 発表標題 ドパミン作動性ニューロンへの細胞外Zn ²⁺ 流入は6-ヒドロキシドパミン誘発パーキンソン病様運動障害の一因である
3. 学会等名 日本薬学会第138年会（金沢）プログラム集28J-pm08S，2017年3月28日
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森岡洋貴、西尾隆佑、竹内梓紗、玉野春南、武田厚司
2. 発表標題 パラコート誘発性運動障害は黒質ドパミン作動性神経細胞内の遊離Zn ²⁺ キレート化により改善される
3. 学会等名 第5回メタロミクス研究フォーラム（京都）講演要旨集, p. 32, 2017年11月25日
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