

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09769

研究課題名（和文）CHCHD2欠損による神経細胞特異的ミトコンドリア障害および封入体形成機構の解明

研究課題名（英文）Mitochondrial dysfunction by loss of CHCHD2.

研究代表者

天羽 拓 (Amo, Taku)

防衛大学校（総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群）・応用科学群・准教授

研究者番号：40453922

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではパーキンソン病分子病態に関する知見を得るため、パーキンソン病原因遺伝子CHCHD2欠損によるミトコンドリア機能障害、およびミトコンドリア機能障害を引き起こすMPP+添加モデル細胞における細胞全体の代謝変化について明らかにした。また、エチルアンモニウム塩による、レビー小体の構成成分  $\alpha$ -シヌクレインのアミロイド凝集抑制効果を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病の発症機序は十分に解明されていないが、ミトコンドリア機能障害や  $\alpha$ -シヌクレイン凝集に端を発するレビー小体形成が重要であると考えられる。本研究の成果は、パーキンソン病の病態解明、ミトコンドリアや  $\alpha$ -シヌクレイン凝集を標的にした新規治療薬開発への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial dysfunction is a hallmark of Parkinson's disease. In this study, we showed mitochondrial dysfunction caused by loss of CHCHD2. We also revealed comprehensive metabolic disturbances including mitochondrial dysfunction in a cellular model of Parkinson's disease. Further, we investigated the anti-amyloid effect of ethylammonium salts in vitro.

研究分野：生化学

キーワード：ミトコンドリア パーキンソン病  $\alpha$ -シヌクレイン

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (以下 **PD**) は主に **50~60** 代で発症し、静止時振戦、無動、筋固縮、姿勢反射障害などを呈する進行性の神経変性疾患である。厚生労働省の統計によると平成 **26** 年時点で患者数は **16.3** 万人であり、約 **25** 年で **2** 倍に増加している。現在の治療は薬剤による対症療法および外科手術であり、完治を実現する根治療法は開発されていない。

**PD** 発症機序は十分に解明されておらず、第 **1** の要因である加齢に加え遺伝的素因や環境有害物質などが関与する多因子疾患と考えられているが、ミトコンドリア機能障害が **PD** の主原因ではないかという説が有力である。そのきっかけは **1980** 年代初めに南カリフォルニアで発生した **1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)** によってドパミン神経細胞死を伴う **PD** 様症状を呈するという症例報告 (**Science, 1983**) である。**1980** 年代半ばには **MPTP** やロテノンなどのミトコンドリア毒による **PD** モデル動物が次々に樹立され、また **PD** 患者の剖検脳黒質においてミトコンドリア機能低下が報告された。さらに **1997** 年以降遺伝性 **PD** の存在が明らかにされ、原因遺伝子産物の機能解析によりミトコンドリア機能不全や異常ミトコンドリア除去機構 (マイトファジー) が **PD** 発症機序に関与していることが報告された (**J Cell Biol, 2008** など)。

我々は **2015** 年、常染色体優性遺伝性 **PD** の新規原因遺伝子 (**PARK22**) として **coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain containing 2 (CHCHD2)** を単離した (**Lancet Neurol, 2015**)。 **CHCHD2** はミトコンドリア移行配列を持ち、膜間腔に局在していた。さらには、移行配列の変異が孤発性 **PD** の危険因子になることも判明した (**Neurology, 2015**)。また、**CHCHD2** 変異陽性患者の神経病理学的検討の結果、びまん性にレビー小体が出現していた。以上から、**CHCHD2** はミトコンドリア機能不全と **PD** 発症を繋ぐ重要な因子であると考えられた。

## 2. 研究の目的

遺伝性 **PD** 原因遺伝子 **CHCHD2** の分子病態を明らかにする目的で、**CHCHD2** 欠損細胞およびマウスのミトコンドリア機能を多面的に評価し、 $\alpha$ -シヌクレイン凝集に端を発するレビー小体形成など **PD** 発症へと至るメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ミトコンドリアの単離、解析

**CHCHD2** 欠損細胞は **CRISPR/Cas9** 法により作製した。培養した細胞を **Dounce Homogenizer** で破碎し、遠心分画によりミトコンドリアを単離した。**CHCHD2** 欠損マウス全脳からも同様にミトコンドリアを単離し、クラーク型酸素電極を用いて酸素消費量を測定した。単離ミトコンドリアは、**DDM** または **digitonin** で可溶化して **Blue Native PAGE**、もしくは **RIPA buffer** に溶かして **SDS-PAGE** で分離し、**Western Blotting** に供した。

### (2) メタボローム解析

ヒト神経芽細胞腫 **SH-SY5Y** にレチノイン酸を加えて、ドパミン神経様細胞へ分化誘導を行った。その後 **1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>)** (0, 30, 300  $\mu$ M) を添加し、**24** 時間培養した。培養上清と細胞溶解物から代謝物を抽出し、**CE-TOFMS** (キャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析装置) により分析した。 $m/z$  と泳動時間 (**MT**) から代謝物を同定、**Metaboanalyst** (<https://www.metaboanalyst.ca>) を用いて解析した。

### (3) アミロイド構造転移の解析

新規抗アミロイド剤の基礎知見を得るために、幅広い濃度範囲 ( $x = 0 \sim 27$  mol%) における常温下でのエチルアンモニウム塩 **EAX (X = NO<sub>3</sub>, Cl, Br, I)** 水溶液中の  $\alpha$ -シヌクレインの構造転移をフーリエ変換赤外分光法およびラマン分光法により **in vitro** で検討した。

## 4. 研究成果

### (1) **CHCHD2** 欠損ミトコンドリア

筋萎縮性側索硬化症の原因遺伝子である **CHCHD10** は、**CHCHD2** 遺伝子のパラログであり、細胞内では両タンパクがミトコンドリア内で複合体を形成していると報告された (**Hum Mol Genet, 2018**)。そこで **Blue Native-PAGE** により **CHCHD10** の複合体形成を調べたところ、**CHCHD2** 欠損細胞では、いずれのクローンも複合体が消失していた。したがって作製した **CHCHD2** 欠損 **SH-SY5Y** 細胞は、**CHCHD2** のミトコンドリアにおける機能を理解し、パーキンソン病における **CHCHD2** 遺伝子変異の病態生理を明らかにするのに、有用なモデルになると考えられた。

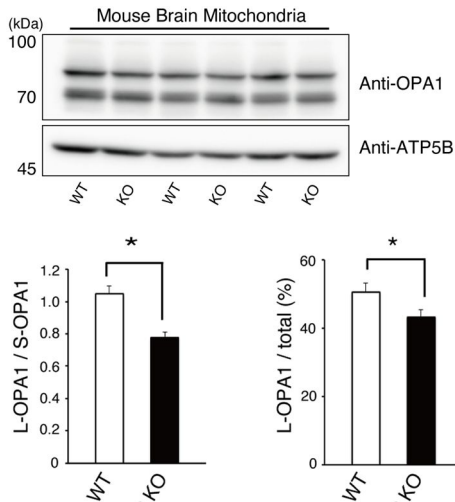


図1 OPA1の切断

一方、**CHCHD2** 欠損マウスは加齢により **p62** 凝集体形成とドパミン神経の減少が認められるが、高齡 **CHCHD2** 欠損マウスのミトコンドリアでは、内膜融合因子の **OPA1** の **long form** の切断 **and/or** 減少が促進されていた (図1)。一方で、外膜融合因子の **Mfn1** および **Mfn2**、分裂因子の **Drp1** (総量およびリン酸化状態) には変化は認められなかった。さらに、**CHCHD2** のパラログである **CHCHD10** が欠損マウスでは減少しており、強い関連性が示唆された (図2)。

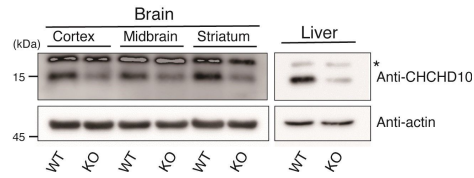


図2 CHCHD10の減少

## (2) MPP+添加 SH-SY5Y 細胞のメタボローム解析

ミトコンドリア機能障害が引き起こす代謝変化を包括的に解析するため、呼吸鎖複合体 I 阻害剤でヒトや実験動物が摂取するとパーキンソン病様症状を引き起こす **MTPT** の代謝物、**MPP+** を培養細胞に添加し、メタボローム解析を実施した。細胞外 (培養上清) において、**MPP+** 添加による顕著な乳酸濃度の上昇 (図3) それに伴うピルビン酸濃度の減少が認められ (図3)、ミトコンドリア酸化的リン酸化から解糖系へ代謝がシフトしていると考えられた。細胞内 (細胞溶解物) においては、ピルビン酸濃度に変化はなかったものの乳酸濃度は同様に上昇していた。またクエン酸回路の中間代謝物が **MPP+** 添加により一様に減少していたことも、酸化的リン酸化から解糖系への代謝シフトを示唆していた。また **ADP/ATP** 比の増加 (図3) から、**MPP+** 添加によりエネルギー不足に陥っていることが考えられた。このことは、**AMP** 濃度の上昇やクレアチンリン酸濃度の減少からも推測された。以上から、**MPP+** によりミトコンドリア呼吸鎖が阻害され、代謝が解糖系へシフトしたものの十分なエネルギーを作り出せていない状況であると考えられた。

また、細胞外において最も顕著に増加していたのがコリンであった (図3)。コリン代謝の異常はパーキンソン病患者でも報告があり (**Exp Biol Med, 2006**)、細胞外コリンが早期診断バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

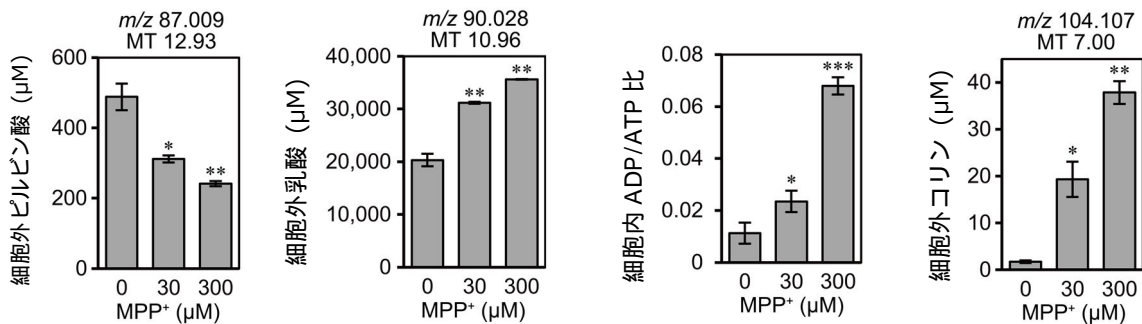


図3 MPP+添加による代謝物の変化 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )

### (3) 新規抗アミロイド剤の検討

アミロイド凝集体の安定化因子の 1 つである静電相互作用を標的にした抗アミロイド剤の知見を得るために、エチルアンモニウム塩 **EAX** ( $X=NO_3, Cl, Br, I$ ) 水溶液中の  $\alpha$ -シヌクレインの構造転移を評価した。その結果、**EANO<sub>3</sub>** 中では、高塩濃度領域 ( $x > 20$ ) でアミロイド凝集体が形成されたものの (図 4) ハロゲンを持つ **EAX** 中では、全濃度領域で形成されないことが分かった。また、**EABr** と **EAI** 中では、アミロイド形成過程の中間体である **helix** 構造を形成することも明らかになった。**EAX**-アミノ酸残基間の相互作用解析から、アニオンサイズが大きく、アニオン-解離性アミノ酸残基間の静電相互作用が強くなるほど、アミロイド形成を抑制できることが示唆された。

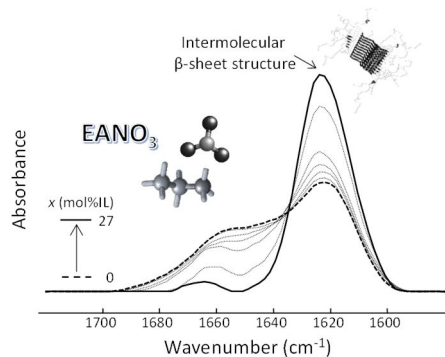


図 4 **EANO<sub>3</sub>** 中の  
フーリエ変換赤外分光スペクトル

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sato Shigeto, Noda Sachiko, Torii Satoru, Amo Taku, Ikeda Aya, Funayama Manabu, Yamaguchi Junji, Fukuda Takahiro, Kondo Hiromi, Tada Norihiro, Arakawa Satoko, Watanabe Masahiko, Uchiyama Yasuo, Shimizu Shigeomi, Hattori Nobutaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Homeostatic p62 levels and inclusion body formation in CHCHD2 knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 443 ~ 453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab057	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 Amo Taku, Oji Yutaka, Saiki Shinji, Hattori Nobutaka	4. 巻 34
2. 論文標題 Metabolomic analysis data of MPP+-exposed SH-SY5Y cells using CE-TOFMS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 106707 ~ 106707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2020.106707	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takekiyo Takahiro, Yamada Natsuki, Amo Taku, Yoshimura Yukihiro	4. 巻 759
2. 論文標題 Effects of ethylammonium halides on helix formation of proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Physics Letters	6. 最初と最後の頁 137970 ~ 137970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cplett.2020.137970	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 Takekiyo Takahiro, Yamada Natsuki, Nakazawa Chikako T., Amo Taku, Asano Atsushi, Yoshimura Yukihiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Formation of synuclein aggregates in aqueous ethylammonium nitrate solutions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biopolymers	6. 最初と最後の頁 e23352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bip.23352	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 Sotome Rina, Hirasawa Akira, Kikusato Motoi, Amo Taku, Furukawa Kyohei, Kuriyagawa Anna, Watanabe Kouichi, Collin Anne, Shirakawa Hitoshi, Hirakawa Ryota, Tanitaka Yuta, Takahashi Hideki, Wu Guoyao, Nochi Tomonori, Shimmura Tsuyoshi, Warden Craig H., Toyomizu Masaaki	4. 巻 53
2. 論文標題 In vivo emergence of beige-like fat in chickens as physiological adaptation to cold environments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 381 ~ 393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-021-02953-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Amo Taku, Oji Yutaka, Saiki Shinji, Hattori Nobutaka	4. 巻 519
2. 論文標題 Metabolomic analysis revealed mitochondrial dysfunction and aberrant choline metabolism in MPP+-exposed SH-SY5Y cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 540 ~ 546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.031	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 Baba Megumi, Shinmura Aya, Tada Shigeru, Amo Taku, Tsukamoto Akira	4. 巻 16
2. 論文標題 Mitochondrial Remodeling in Endothelial Cells under Cyclic Stretch is Independent of Drp1 Activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Biomechanics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32604/mcb.2019.05199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujimaki Motoki, Furuya Norihiko, Saiki Shinji, Amo Taku, Imamichi Yoko, Hattori Nobutaka	4. 巻 39
2. 論文標題 Iron Supply via NCOA4-Mediated Ferritin Degradation Maintains Mitochondrial Functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00010-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00010-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takekiyo Takahiro, Yamada Natsuki, Amo Taku, Yoshimura Yukihiro	4. 巻 112
2. 論文標題 Aggregation selectivity of amyloid 1 11 peptide in aqueous ionic liquid solutions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 e24138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pep2.24138	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 竹清 貴浩, 武川 裕大, 山田 菜月, 天羽 拓, 吉村 幸浩	4. 巻 65
2. 論文標題 アミロイド凝集体に及ぼす冷却効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 63 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20585/cryobolcryotechnol.65.2_63	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 Hakamata Yuki, Watanabe Kouichi, Amo Taku, Toyomizu Masaaki, Kikusato Motoi	4. 巻 55
2. 論文標題 Characterization of Mitochondrial Content and Respiratory Capacities of Broiler Chicken Skeletal Muscles with Different Muscle Fiber Compositions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 210 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2141/jpsa.0170141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Amo T, Kamimura N, Asano H, Asoh S, Ohta S	4. 巻 7
2. 論文標題 Cisplatin selects short forms of the mitochondrial DNA OriB variant (16184-16193 poly-cytosine tract), which confer resistance to cisplatin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 46240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep46240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saiki S, Hatano T, Fujimaki M, Ishikawa KI, Mori A, Oji Y, Okuzumi A, Fukuhara T, Koinuma T, Imamichi Y, Nagumo M, Furuya N, Nojiri S, Amo T, Yamashiro K, Hattori N	4. 巻 7
2. 論文標題 Decreased long-chain acylcarnitines from insufficient $\beta$ -oxidation as potential early diagnostic markers for Parkinson's disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-06767-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 竹清 貴浩、武川 裕大、山田 菜月、天羽 拓、吉村 幸浩
2. 発表標題 アミロイド凝集体に及ぼす冷却効果
3. 学会等名 第64回 低温生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹重 遥香、齊木 臣二、藤巻 基紀、波田野 琢、石川 景一、森 聡生、王子 悠、奥住 文美、濃沼 崇博、上野 真一、今道 洋子、野尻 宗子、天羽 拓、服部 信孝
2. 発表標題 パーキンソン病関連疾患鑑別における脂肪酸 酸化変化のバイオマーカーとしての有効
3. 学会等名 第13回 パーキンソン病・運動障害疾患コンgres
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 袴田 祐基、天羽 拓、豊水 正昭、喜久里 基
2. 発表標題 肉用鶏と産卵鶏のミトコンドリア呼吸鎖複合体超複合体(SCs)形成量およびエネルギー代謝特性の違い
3. 学会等名 日本畜産学会 第126回大会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 山田 菜月、天羽 拓、竹清 貴浩、吉村 幸浩
2. 発表標題 イオン液体を用いた $\alpha$ -シヌクレインアミロイド形成の制御
3. 学会等名 第42回 溶液化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹清 貴浩、山田 菜月、天羽 拓、吉村 幸浩
2. 発表標題 イオン液体水溶液中のAmyloid 1-11ペプチドの凝集選択性
3. 学会等名 第42回 溶液化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 菜月、天羽 拓、竹清 貴浩、吉村 幸浩
2. 発表標題 エチルアンモニウム系イオン液体を用いた $\alpha$ -synucleinのアミロイド凝集選択性
3. 学会等名 第10回 イオン液体討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T.Amo, M.Funayama, J.S.Park, N.Furuya, S.Saiki, W.Akamatsu, C.M.Sue, N.Hattori
2. 発表標題 CHCHD2 deficiency leads to mitochondrial dysfunction in human neuroblastoma SY-SY5Y cells.
3. 学会等名 Keystone Symposia, Mitochondrial Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Amo T, Kamimura N, Asano H, Asoh S, Ohta S
2. 発表標題 Cisplatin selects short forms of the mitochondrial DNA OriB variant (16184-16193 poly-cytosine tract), which confer resistance to cisplatin
3. 学会等名 Euromit 2017 (International meeting on mitochondrial pathology) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Funayama M, Park JS, Amo T, Funayama T, Akamatsu W, Sue CM, Hattori N
2. 発表標題 CHCHD2 deficiency leads to mitochondrial dysfunction and increasing oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (WCN 2017) (国際学会)
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
研究 分担者	竹清 貴浩  (Takekiyo Takahiro)  (00545981)	防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群)・応用科学群・准教授   (82723)	

	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
連携 研究者	斉木 臣二  (Saiki Shinji)  (00339996)	順天堂大学・医学部・准教授   (32620)	
連携 研究者	舩山 学  (Funayama Manabu)  (70468578)	順天堂大学・医学部・准教授   (32620)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	佐藤 栄人  (Sato Shigeto)  (00445537)	順天堂大学・医学部・准教授    (32620)	

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