

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02716

研究課題名(和文) 異所性のミトコンドリアDNAがもたらす神経変性

研究課題名(英文) Neurodegeneration induced by ectopic mitochondrial DNA

研究代表者

松井 秀彰 (Matsui, Hideaki)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：60710853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、パーキンソン病の状態を模した培養細胞やゼブラフィッシュでミトコンドリアDNAが細胞質に漏出していることを明らかにした。また細胞質に漏出したミトコンドリアDNAのセンサー阻害や細胞質ミトコンドリアDNAの分解促進により炎症反応や神経変性が改善することを示した。さらにヒトパーキンソン病剖検脳でも細胞質に漏出したミトコンドリアDNAやそのセンサーであるIFI16の蓄積を認めた。以上の結果は、ミトコンドリアDNAの細胞質漏出がパーキンソン病の神経変性の重要な原因となる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに見いだされていなかったパーキンソン病の新たな病態を明らかにした研究である。細胞質に漏出したミトコンドリアDNAの分解、あるいはそのミトコンドリアDNAセンサーの阻害が、パーキンソン病の病態に立脚した新規治療法につながる可能性がある。またパーキンソン病以外の疾患、例えば心不全や肝臓線維化などでも同様のメカニズムが存在する可能性がある。パーキンソン病のさらなる解明や治療の開発と並行して、その他の疾患解析も検証を進める。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that mitochondrial DNA leaks into the cytoplasm in cultured cells and zebrafish that mimic the state of Parkinson's disease. It was also shown that the inflammatory reaction and neurodegeneration are improved by inhibiting the sensor of mitochondrial DNA leaked into the cytoplasm and promoting the degradation of cytoplasmic mitochondrial DNA. In addition, mitochondrial DNA leaked into the cytoplasm and its sensor IFI16 were accumulated in PD brains. These results suggest that cytoplasmic leakage of mitochondrial DNA may be an important cause of neurodegeneration in Parkinson's disease.

研究分野：病態神経科学、神経内科学

キーワード：ミトコンドリアDNA パーキンソン病 リソソーム IFI16 DNaseII

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)はその記載より200年が経つ現在もその病態の多くは不明のままの神経難病である。危険因子で明らかなものに加齢があり、健常老人でもドパミン神経の減少がおこると言われ、Lewy小体がPDの症状のない剖検例でも見いだされることもある。孤発性PDの危険因子となりうる遺伝要因の遺伝子産物にシヌクレイン、GBA、そして家族性PDの原因遺伝子産物にはシヌクレイン、PINK1、Parkin、ATP13A2などがある。シヌクレインはその生理機能は不明ながら様々な病的な役割がいわれ、PINK1、Parkinはミトコンドリア機能維持およびミトファジーで機能し(Matsui et al., *Hum Mol Genet* 2013; Matsui et al., *J Neural Transm* 2017等) GBA、ATP13A2は主にリソソームで働く酵素である(Matsui et al., *FEBS Lett* 2013; Uemura, Matsui et al., *PLOS Genet* 2015; Matsui et al., *Neurosci Res* 2017 神経科学学会奨励賞受賞論文等)。しかし様々な病態を統一的に理解するには至っていない。

2. 研究の目的

本研究計画ではこれまでの様々な知見および申請者らの実験結果から、PDはミトコンドリアDNA(mtDNA)のもつ毒性により惹起される神経変性であるという仮説を提案する。そのために以下の4つのことを示す。

- (1) PDモデルにおいて不要のmtDNAが異所性に蓄積する
- (2) 不要のmtDNAが分解できないと神経変性が惹起される
- (3) ヒトPD剖検脳にmtDNAが蓄積している
- (4) 種々のPDモデルにおいて不要のmtDNAを分解することで神経変性が改善する

3. 研究の方法

(1) PDモデルにおいて不要のmtDNAが異所性に蓄積する

ミトコンドリアを含め細胞内小器官は厳密に品質管理を受けている。ミトコンドリアであれば不要になった構成タンパクはプロテアソームやリソソームで分解される。機能不全に陥ったミトコンドリア全体をオートファジーリソソームで分解する経路はミトファジーと呼ばれ、家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物であるPINK1とParkinがこの経路の重要な分子であることがわかっている。ミトコンドリアがしかし他の細胞内小器官と異なる点は、その中にDNAを含んでいるということである。mtDNAは微生物由来のDNAの成れの果てであると言われ、実際に微生物のDNAと同様に、ミトコンドリア外に存在した場合、強い毒性を発揮する。神経細胞のように分裂をしない細胞は、特にmtDNAを適切に分解しなければいけない。

申請者のグループは培養細胞においてPD関連遺伝子PINK1、GBA、ATP13A2の機能不全が、加算的にミトコンドリア外へのmtDNAの蓄積を招くことを見いだした。まずはこれらの実験を継続し、様々な培養細胞において同様の所見を確認する。ついですでに作製済みのPDモデルゼブラフィッシュにおいても、細胞死と並行しておこる異所性のmtDNAの蓄積を確認する。ゼブラフィッシュPDモデルのアッセイは培養細胞と同様の異所性のmtDNAに対する蛍光免疫染色とTH陽性細胞のカウント(Matsui et al., *PLoS ONE* 2017)で行う。これらの実験によりPDの病態を

模す培養細胞、および *in vivo* 動物モデルにおいて、不要となった mtDNA が異所性に蓄積することを確認する。

(2) 不要の mtDNA が分解できないと神経変性が惹起される

それでは不要となった mtDNA が神経細胞において異所性に蓄積することで PD に類似の病態は起きるのであるか。DNaseII はリソソーム内において不要になった mtDNA を、場合によっては微生物や核の DNA を、分解する酵素である。マウスで DNaseII の KO を作製すると赤血球の脱核の不全をおこすためか、重度の貧血で死亡する。しかし魚類では赤血球の脱核というイベントがないために、KO は長期生存可能である。そこで DNaseII KO ゼブラフィッシュを作製し、異所性の mtDNA の蓄積および神経変性を検索する。そのことで不要の mtDNA が分解できないと神経変性が惹起されることを明らかにする。

(3) ヒト PD 剖検脳に mtDNA が蓄積している

このような分解すべき mtDNA は細胞が健康なうちはリソソームの酵素 DNaseII で分解される。しかし加齢や PD ではリソソームの機能低下を認め、mtDNA は徐々に蓄積することが想定される。申請者は新潟大学脳研究所の膨大な剖検脳の蓄積を活用し、ヒト PD 剖検脳に mtDNA が蓄積しているかどうかを検証する。

(4) 種々の PD モデルにおいて不要の mtDNA を分解することで神経変性が改善する

本研究計画の最後では、これまで示した PD における不要の mtDNA の蓄積を DNaseII の過剰発現において解消し、そのことで神経変性を改善できることを示す。GBA、ATP13A2 をノックダウンした培養細胞では、細胞死、mtDNA の蓄積、ともに DNaseII の過剰発現で改善することを示しつつある。培養細胞での実験を継続するとともに、PD モデルゼブラフィッシュにおいて DNaseII を過剰発現する系統を作製する。それらを利用し、PD モデルゼブラフィッシュの神経変性が DNaseII の過剰発現によって改善されることを示す。

4. 研究成果

リソソームなどでの分解から逃れたミトコンドリア由来の細胞質 DNA が、PD を模す培養細胞およびゼブラフィッシュにおいて細胞毒性および神経変性を誘導することを報告した。培養細胞では PD に関連する遺伝子である PINK1、GBA、または ATP13A2 の減少は、ミトコンドリア由来の細胞質 DNA の増加を引き起こし、I 型インターフェロン応答と細胞死を誘導した。これらの表現型は、DNA を分解するリソソーム DNase である DNaseII の過剰発現、またはミトコンドリア DNA のセンサーとして機能する IFI16 の減少によって改善した。PD モデルゼブラフィッシュの 1 つである *gba* 変異体においても、ヒト DNaseII を過剰発現させることにより、その運動障害とドーパミン作動性神経の変性が改善された。IFI16 およびミトコンドリア由来の細胞質 DNA は、ヒト PD 剖検脳の病変部位において蓄積を認めた。

以上の結果は、ミトコンドリア DNA の細胞質漏出が PD の神経変性の重要な原因となる可能性を示唆している(図)。細胞質に漏出したミトコンドリア DNA の分解、あるいはそのミトコンドリア DNA センサーの阻害が、PD の治療につながる可能性がある。また PD 以外の疾患でも同様のメカニズムが存在する可能性があり、引き続き検証を進める。なお上記結果の一部を論文報告した ([Matsui et al., Nat. Commun. 2021](#) 等)。

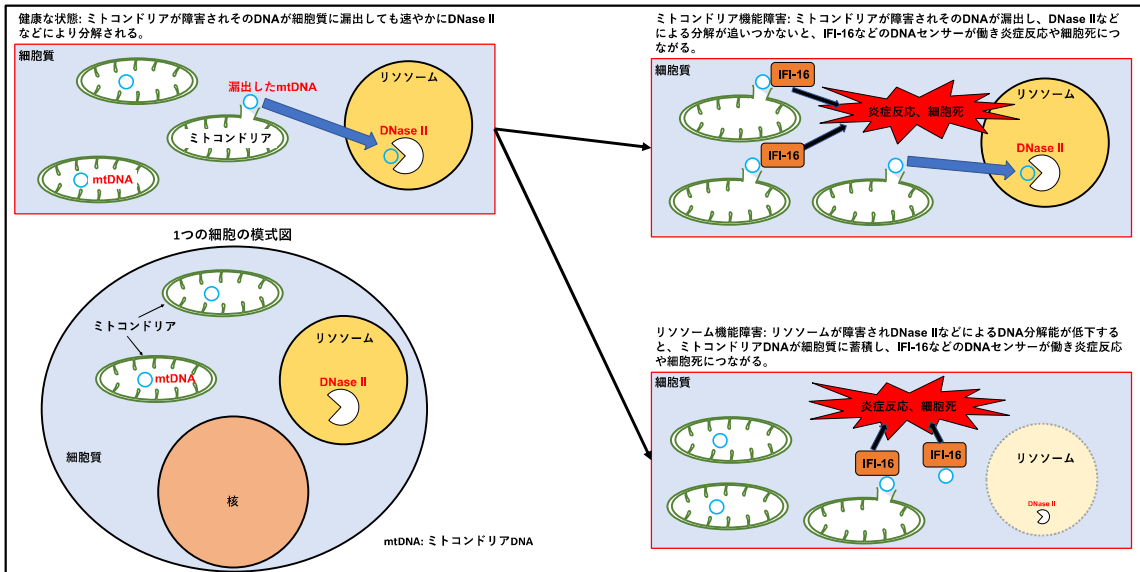


図: 本研究成果から考えられるパーキンソン病の病態仮説

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ozawa Tetsutaro, Shimizu Hiroshi, Matsui Hideaki, Onodera Osamu, Kakita Akiyoshi	4. 巻 221
2. 論文標題 Shrinkage of the myenteric neurons of the small intestine in patients with multiple system atrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Autonomic Neuroscience	6. 最初と最後の頁 102583 ~ 102583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.autneu.2019.102583	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 Matsui Hideaki, Kenmochi Naoya, Namikawa Kazuhiko	4. 巻 26
2. 論文標題 Age- and -Synuclein-Dependent Degeneration of Dopamine and Noradrenaline Neurons in the Annual Killifish <i>Nothobranchius furzeri</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1727 ~ 1733.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.01.015	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 Matsui Hideaki, Takahashi Ryosuke	4. 巻 125
2. 論文標題 Parkinson's disease pathogenesis from the viewpoint of small fish models	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neural Transmission	6. 最初と最後の頁 25 ~ 33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00702-017-1772-1	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 Matsui Hideaki, Ito Junko, Matsui Noriko, Uechi Tamayo, Onodera Osamu, Kakita Akiyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Cytosolic dsDNA of mitochondrial origin induces cytotoxicity and neurodegeneration in cellular and zebrafish models of Parkinson's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23452-x	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 Sato Hiroki, Kamimura Kenya, Matsui Hideaki, Owaki Takashi, Morita Shinichi, Tanaka Yuto, Ishikawa Natsuki, Shimada Yoshifumi, Yokoyama Junji, Wakai Toshifumi, Terai Shuji	4. 巻 -
2. 論文標題 Esophageal High-Resolution Manometry for Diagnosing the Severity of the Chronic Intestinal Pseudo-Obstruction: A Case Series	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-020-06701-9	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 Nyuzuki Hiromi, Ito Shinji, Nagasaki Keisuke, Nitta Yohei, Matsui Noriko, Saitoh Akihiko, Matsui Hideaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Degeneration of dopaminergic neurons and impaired intracellular trafficking in Atp13a2 deficient zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IBRO Reports	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibror.2020.05.002	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5件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Matsui H.
2. 発表標題 Age - and -synuclein dependent degeneration of dopamine and noradrenaline neurons in the annual killifish Nothobranchius furzeri.
3. 学会等名 5th World Parkinson Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsui H.
2. 発表標題 Ectopic dsDNA of mitochondrial origin induces neurodegeneration. 異所性のミトコンドリアDNAが起こす神経変性.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsui H.
2. 発表標題 Cytosolic dsDNA of mitochondrial origin exerts cytotoxicity and neurodegeneration in PD
3. 学会等名 第42回神経科学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsui H.
2. 発表標題 Age - and -synuclein dependent degeneration of dopamine and noradrenaline neurons in the annual killifish <i>Nothobranchius furzeri</i> .
3. 学会等名 第60回神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsui H.
2. 発表標題 Neurodegeneration induced by ectopic mtDNA
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------	---------