

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06681

研究課題名(和文)新規パーキンソン病関連遺伝子midnolinの生理的、病理的な役割の解明

研究課題名(英文)Clarification of pathophysiological roles of MIDN, a novel genetic risk factor for Parkinson's disease

研究代表者

小原 祐太郎(OBARA, YUTARO)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：40400270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの山形における分子疫学的な研究から、Midnolin(MIDN)遺伝子の異常とパーキンソン病との関連性が明らかになっていった。本研究では英国の大規模疫学データを解析した結果、山形と同様の相関性が認められ、MIDNがパーキンソン病の普遍的なリスク遺伝子であることが明らかになった。MIDN遺伝子の発現制御機構を調べたところ、MIDN遺伝子上流の特定部位に転写因子のTFAP2とAP-1が結合して、MIDNの遺伝子発現を制御することが明らかになった。Midnノックアウトマウスの表現型を調べたところ、ノックアウトのマウスの中脳ドパミン神経の線条体への投射が著しく減少していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病は厚生省が指定する特定疾患の中でも特に患者数が多い神経難病であるが、その明確な発症機序や根本的な治療法が確立されていない。MIDN遺伝子は2000年に初めて報告されたが、その遺伝子産物の機能や病気との関連性はほとんど不明だった。我々がMIDNの遺伝子異常とパーキンソン病が関連し、その発症メカニズムを部分的に解明出来たのは新しい発見であり、学術的な独創性が高いと思われる。また、MIDNの発現制御機構が明らかになったため、MIDNを利用した新しい作用機序を有する抗パーキンソン病薬の開発に貢献出来る可能性があり、将来的な創造性、応用性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Our previous molecular epidemiological study in Yamagata, Japan revealed that Midnolin (MIDN) variants were correlated to Parkinson's disease. In this study, we reanalyzed molecular epidemiological data in a large British population cohort, and replicated the correlation between MIDN variants and Parkinson's disease as observed in Yamagata, suggesting MIDN is a universal genetic risk factor. We examined the molecular mechanism of MIDN gene expression and found that transcription factors including TFAP2 and AP-1 bound to specific sites upstream of the MIDN gene and regulated the transcription. As a phenotype of Midn knockout mice, the projection of dopaminergic neurons from midbrain to striatum was largely inhibited in knockout mice.

研究分野：薬理学

キーワード：パーキンソン病 Midnolin (MIDN)

1. 研究開始当初の背景

我々は PC12 細胞や交感神経細胞を NGF (神経成長因子) で刺激すると、MAPK (mitogen-activated protein kinase) ファミリーに属する ERK5 の活性化を介して、神経突起 (軸索) の伸長が促進し、さらにカテコラミン (主にドパミン) の生合成が亢進することを報告してきた (Obara et al., *J Biol Chem*, 2009; *Mol Pharmacol*, 2010; *Cell Signal*, 2016)。また、マイクロアレイ法により、ERK5 依存的に発現が誘導される遺伝子群を網羅的に探索し、その一つとして *Midnolin* (*Midn*) 遺伝子を見出した。

一方、山形大学医学部内科学第三講座 (神経内科) では、健常者と孤発性パーキンソン病患者のゲノム解析を行っていた。そこで、共同でドパミン生合成と関連する ERK5 および ERK5 シグナルにより発現が誘導された遺伝子を解析したところ、*MIDN* 遺伝子のコピー数の減少が孤発性パーキンソン病患者の 10.5% で認められ、健常者ではその異常が認められなかった。既知の各原因遺伝子がパーキンソン病に占める割合はほとんどが 1% 以下であり、単一の遺伝子異常が 10.5% のパーキンソン病患者の原因になっているとしたら、これは大きな割合である。さらに、培養細胞を用いて、病気の発症メカニズムの解析に着手し、*Midn* の発現を抑制させた細胞では、神経突起の伸長が完全に抑制すること、Parkin コピキチンリガーゼの発現が低下することを、研究開始当初に明らかにしていた (Obara et al., *Sci Rep*, 2017)。

2. 研究の目的

MIDN 遺伝子は、2000 年に初めて報告されたが (Tsukahara et al., *Gene*, 2000)、それ以降の報告は極端に少ない。さらに、我々が *MIDN* 遺伝子異常とパーキンソン病が関連し、*MIDN* がパーキンソン病の原因遺伝子 (またはリスク遺伝子) としての可能性を推定したことは新規の発見である。パーキンソン病は厚生省が指定する特定疾患の中でも二番目に患者数が多く、根本的な治療法が確立されていない進行性の神経難病である。*MIDN* がパーキンソン病の新しい原因遺伝子と推察され、その発症メカニズムが解明されると、*MIDN* が創薬の標的に繋がる可能性があるため、将来的な創造性、応用性も十分に考えられる。したがって、本研究ではパーキンソン病の病因、病態進展の側面に *MIDN* の機能不全があることを示し、*MIDN* の生理的、病理的な役割を細胞レベル、個体レベルで包括的に解明することを目指す。

3. 研究の方法

英国人のコホートデータ (WTCCC2 および 1958 British Birth Cohort) は、European genome archive (<https://ega-archive.org>) から入手して、*MIDN* 遺伝子のコピー数多型を解析した。

PC12 細胞の培養は 10% ウシ胎仔血清と 5% ウマ血清および抗生物質を加えた DMEM 中で、SH-SY5Y 細胞の培養は 10% ウシ胎仔血清および抗生物質を加えた DMEM 中で培養した。遺伝子発現に関しては RNA-Seq 法または RT-qPCR 法で定量し、タンパク質の発現量は特異的抗体を用いたウェスタンブロッティング法で解析した。*MIDN* 遺伝子プロモーターの活性は、プロモーター部位とホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結した DNA コンストラクトを作製し、そのルシフェラーゼ活性をプロモーター活性の指標とした。*MIDN* 遺伝子発現に重要な転写因子の活性は、クロマチン免疫沈降アッセイにて定量した。

Midn ノックアウトマウスは、山形大学附属遺伝子実験センターにて、CRISPR-Cas9 法により作製した。ノックアウトマウスの凍結脳切片 (特に中脳黒質、線条体) を作製し、中脳黒質から線条体に投射するドパミン神経細胞の形態に異常が認められるかどうか、チロシン水酸化酵素抗体を用いた免疫染色法などで検討した。ノックアウトマウスの自発的運動量はオープンフィールド試験にて測定した。

ヒトの遺伝子研究は、山形大学医学部倫理委員会に承認されたプロトコール従って行った。遺伝子改変マウスに関する研究は、山形大学動物実験委員会と遺伝子組換え実験安全委員会で承認されたプロトコールに従って行った。

4. 研究成果

(1) 英国大規模コホート研究のデータ解析

先述したように、山形の100人規模での分子疫学的な研究から、10.5%の孤発性パーキンソン病患者において *MIDN* 遺伝子のコピー数の減少が認められた一方で、健常者ではその異常が全く認められなかった。しかし、他人種、他地域の集団においても同様のことが再現出来るかどうかは、疫学上重要な点である。そこで、英国で行われた2000人規模のコホート研究(WTCCC2)のデータを入手して、*MIDN* 遺伝子のコピー数を再度解析した。その結果、6.55%の孤発性パーキンソン病患者と1.64%の対照群において *MIDN* 遺伝子のコピー数の減少が認められ、患者群では有意に *MIDN* 遺伝子の異常を有する割合が多かった。つまり、山形に加えて英国においても、*MIDN* 遺伝子の異常とパーキンソン病の相関が認められ、*MIDN* が普遍的なパーキンソン病のリスク遺伝子であることが明らかになった (Obara et al., *Ann Clin Transl Neurol*, 2019)。

(2) *MIDN* の細胞内での役割について (in vitro の研究結果)

以前に、ラットPC12細胞を用いてトランスクリプトーム解析(RNA-seq法)を行った。そして、*Midn*によって発現が4倍以上亢進または抑制する遺伝子群を抽出し、それらの遺伝子プロモーターに共通する配列を調べたところ、それらの共通配列に結合すると予想される転写因子の候補4つを見出した。現在は*MIDN*とこれらの転写因子の結合を調べている段階である。また、このトランスクリプトーム解析により、*Midn*遺伝子を欠損させると、パーキンソン病の原因遺伝子である*Snca*の発現上昇および*Parkin*の発現低下が認められた。しかし、ヒト神経細胞芽腫由来のSH-SY5Y細胞においては、*MIDN*ノックダウンによる*Parkin*の発現の減少を再現出来たが、*SNCA*の発現量は増大しなかった。

また、SH-SY5Y細胞をインスリンや脳由来神経栄養因子(BDNF)で刺激すると、*MIDN*遺伝子の発現が亢進することを見出したので、その作用機序の解明を試みた。PI3K阻害薬のWortmanninやMEK阻害薬のU0126の前処理によって、インスリンによる*MIDN*遺伝子の発現の亢進が抑制されたことから、PI3KあるいはMAPKシグナル依存的に*MIDN*遺伝子の発現が促進されることが明らかになった。さらに、これまで全く不明であったヒト*MIDN*のプロモーターの解析を行った。SH-SY5Y細胞から*MIDN*遺伝子プロモーター部位(-600 bp ~ +125 bp)をクローニングし、ホタルルシフェラーゼ遺伝子と連結した。このルシフェラーゼの酵素活性を*MIDN*プロモーターの活性の指標とした。インスリンは*MIDN*プロモーターの活性を増強し、このプロモーターの長さを徐々に短くすると、-150 bpから-100 bpにプロモーター活性を負に調節する領域があること、さらに-100 bpから-50 bpには正に調節する領域があることを見出した。-121 bpから-99 bpにはTFAP2のコンセンサス配列が、-71 bpから-57 bpにはAP-1とCREBのコンセンサス配列が存在し、これらの配列に変異を導入すると、*MIDN*プロモーター活性が大きく変化した。また、インスリンによりAP-1とCREBの活性が上昇し、ERK1/2とPI3Kシグナルを阻害すると、これらの転写因子の活性が減弱した。CREBのドミナントネガティブ変異体(S133A)を過剰発現した細胞をインスリンで刺激しても、*MIDN*プロモーターの活性化は抑制されなかった一方で、AP-1阻害薬SR11302およびAP-1デコイオリゴデオキシヌクレオチドで前処理した細胞では、*MIDN*プロモーターの活性化が完全に抑制されることが明らかになった。さらに、AP-1を構成するc-FOSとc-JUNの抗体を用いたクロマチン免疫沈降アッセイを行うと、インスリン刺激によりc-FOSとc-JUNの*MIDN*プロモーターへの結合が顕著に亢進した。以上のことから、インスリンはAP-1を活性化して、さらにはTFAP2の活性を抑制して、*MIDN*遺伝子の発現を誘導していることが示唆された (Sagehashi et al., *J Pharmacol Exp Ther*, 2022)。

(3) *Midn* ノックアウトマウスの表現型の解析 (in vivo の研究結果)

*Midn*ノックアウトマウスをゲノム編集法により作製し、8塩基および11塩基遺伝子を欠損する2系統のノックアウトマウスの繁殖に成功した。そのヘテロノックアウトマウスと野生型のマウスを交配させると、野生型およびヘテロノックアウトマウスがメンデル則に従って1:1で生まれるが、ヘテロノックアウトマウス同士を交配させると、ホモノックアウトマウスはほぼ生まれず、稀に生まれた個体も生後すぐに死亡する。これらのことから、*Midn*遺伝子の完全なノックアウトは致死的になり、*Midn*が生体内での必須の役割を担っているものと思われる。

8週齢の*Midn*ノックアウトマウスの中脳ではドパミン神経細胞の異常は認められなかったが、線条体におけるチロシン水酸化酵素 (TH) 陽性の神経線維が著しく減少していた。しかし、約18ヶ月齢のマウスを用いてオープンフィールド試験を行い、マウスの自由行動量を測定したが、野生型とノックアウトマウス間で行動量に有意な差は認められなかった。

以上のヒト、in vitro および in vivo の研究結果から、*MIDN* 遺伝子の異常により中脳ドパミン神経細胞の投射異常が引き起こされ、パーキンソン病が発症する可能性が示唆された。さらに、*MIDN* の発現制御機構が明らかになったため、*MIDN* 遺伝子の発現を促進するような化合物が抗パーキンソン病薬の候補となる可能性が生じ、将来的な創造性、応用性も十分に考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

1. 著者名 Yutaro Obara, Hidenori Sato, Takahiro Nakayama, Takeo Kato, Kuniaki Ishii	4. 巻 -
2. 論文標題 Reply to: MIDN locus structural variants and Parkinson's disease risk.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann. Clin. Transl. Neurol.	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） 10.1002/acn3.51011	査読の有無 無
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 Yutaro Obara, Hidenori Sato, Takahiro Nakayama, Takeo Kato, Kuniaki Ishii	4. 巻 6(11)
2. 論文標題 Midnolin is a confirmed genetic risk factor for Parkinson's disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann. Clin. Transl. Neurol.	6. 最初と最後の頁 2205-2211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acn3.50914	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 Naoki Sagehashi, Yutaro Obara, Ohki Maruyama, Tadashi Nakagawa, Toru Hosoi, Kuniaki Ishii	4. 巻 381
2. 論文標題 Insulin enhances gene expression of Midnolin, a novel genetic risk factor for Parkinson's disease, via ERK, PI3-kinase and multiple transcription factors in SH-SY5Y cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Pharmacol. Exp. Ther.	6. 最初と最後の頁 68-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/jpet.121.001076	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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小原祐太郎、佐藤秀則、中山貴博、加藤丈夫、石井邦明
2. 発表標題 MIDN遺伝子座の構造変化とパーキンソン病の発症リスクについて
3. 学会等名 第71回 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 提箸尚貴、小原祐太郎、丸山央記、石井邦明
2. 発表標題 パーキンソン病の新規リスク遺伝子Midnolinの発現調節機構の解明
3. 学会等名 第71回 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小原祐太郎、佐藤秀則、中山貴博、加藤丈夫、石井邦明
2. 発表標題 日本と英国において、MIDN遺伝子はパーキンソン病の強いリスク遺伝子である。
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎野友利奈、小原祐太郎、岡本洋介、実吉岳郎、林康紀、石井邦明
2. 発表標題 PC12細胞において、ERK5によるKv4.2のリン酸化によって、A電流の不活性化が抑制される。
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 提箸尚貴、小原祐太郎、石井邦明
2. 発表標題 Midnolinとパーキンソン病の関連性
3. 学会等名 第70回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小原祐太郎、今井亨、佐藤秀則、武田裕司、加藤丈夫、石井邦明
2. 発表標題 Midnolin is a novel risk factor for Parkinson's Disease and regulates expression of parkin and other causative genes.
3. 学会等名 第18回 World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小原祐太郎、今井亨、提箸尚貴、佐藤秀則、武田裕司、加藤丈夫、石井邦明
2. 発表標題 Midnolinは神経突起伸展とparkinユビキチンリガーゼの発現を促進し、パーキンソン病と関連する。
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小原 祐太郎
2. 発表標題 パーキンソン病に関する最新の話
3. 学会等名 日本早期認知症学会春季ワークショップ2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小原祐太郎、提箸 尚貴、丸山 央記、石井 邦明
2. 発表標題 インスリンはAP-1を介して、パーキンソン病の新規リスク遺伝子であるMIDNの発現を促進する。
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
研究協力者	野呂田 郁夫 (Norota Ikuo)		
研究協力者	提箸 尚貴 (Sagehashi Naoki)		
研究協力者	石井 邦明 (Ishii Kuniaki) (10184459)	山形大学・医学部・名誉教授 (11501)	

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
---------	---------