

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06700

研究課題名(和文) CSPaリン酸化による神経終末保護作用に着目した新規パーキンソン病治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for Parkinson's disease focusing on the protective effect of CSPa phosphorylation on synaptic terminal

研究代表者

白藤 俊彦 (Shirafuji, Toshihiko)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：30595765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CSPaのSer34リン酸化抗体(CSPa pS34抗体)を作製し、CSPa pS34抗体が実際に特異的にSer34リン酸化を同定できることを確認した。マウス全脳から抽出したCSPaにおいて、CSPa pS34抗体によりバンドが検出された。一方、免疫組織染色では本抗体は機能しなかった。rThp promoter制御下にCSPa-WT, リン酸化欠損(SA), リン酸化模倣(SD), H43Qの4つのAAV PHP.eBを作製した。眼窩静脈叢経由での投与により、黒質線条体での発現を確認した。現在内在性のCSPとの発現比率を検証中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢社会を迎え、加齢とともに発症するパーキンソン病などの神経変性疾患の治療法を確立することは喫緊の課題である。パーキンソン病はドパミン神経終末の変性に引き続き、ドパミン神経死を起こす病気である。シナプス小胞に局在するシャペロンの α -synucleinの機能不全が発症に関与するが、病態は未解明で、細胞死を防ぐ方法は確立していない。本研究ではCSPaのリン酸化に着目してパーキンソン病を治療しようとするものである。

研究成果の概要(英文)：I generated antibodies against Ser34 phosphorylation of CSPa (CSPa pS34 antibody) and confirmed that CSPa pS34 antibody can indeed specifically identify Ser34 phosphorylation. In CSPa extracted from whole mouse brain, the CSPa pS34 antibody detected a band. On the other hand, this antibody did not work in immunohistochemistry. Four AAV PHP.eB were generated under the control of rThp promoter: CSPa-WT, phosphorylation-deficient (SA), phosphorylation-mimicking (SD), and H43Q. We confirmed their expression in the substantia nigra striatum by administration via the orbital venous plexus. The ratio of expression to that of endogenous CSPa is currently being verified.

研究分野：神経科学

キーワード：パーキンソン病 PKC リン酸化 CSPa アデノ随伴ウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢社会を迎え、加齢とともに発症するパーキンソン病などの神経変性疾患の治療法を確立することは喫緊の課題である。パーキンソン病はドパミン神経終末の変性に引き続き、ドパミン神経死を起こす病気である。シナプス小胞に局在するシャペロンの α -Synucleinの機能不全が発症に関与するが、病態は未解明で、細胞死を防ぐ方法は確立していない。

申請者は、PKC γ 欠損マウスがパーキンソン症状を呈することを証明し、PKC γ のリン酸化基質とパーキンソン病発症の関連を研究してきた。この研究の中で、PKC γ がCSP α をリン酸化することで神経終末での熱ショックタンパク質であるHSP70のシャペロン活性を促進し、神経終末を防御し、神経細胞死を防いでいることを証明した。高齢では、PKC γ -CSP α -HSP70経路は活性が低下するので、神経終末が脆弱化し、神経終末からパーキンソン病が始まると考えた。そこで、CSP α リン酸化変異体を用いて、神経終末のHSP70シャペロン活性を制御し、神経終末を保護し、ドパミン神経細胞変性を防ぐことができるかと考えるに至った。

2. 研究の目的

CSP α リン酸化変異体を用い、in vivoでのPKC γ によるCSP α リン酸化のドパミン神経終末での働きを解明し、ドパミン神経終末変性を防ぐことに着目したパーキンソン病治療を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

PKC γ によるCSP α リン酸化低下が発症に関与するパーキンソン病に焦点を当て、動物レベルで神経変性を防ぐ治療法を確立することをめざす。

CSP α のSer10のリン酸化はマウスの中枢神経系に存在することはすでに示していたが、Ser34のリン酸化については細胞レベルで示されたものでin vivoでは存在を証明されていなかった。

そこで第1段階として、細胞レベルでのCSP α のSer34のリン酸をCSP α Ser34特異的リン酸化抗体(CSP α pSer34抗体)を作製し、マウス中枢神経系のCSP α を抽出して調べる。その後、ドパミン神経特異的にCSP α リン酸化模倣変異体(神経終末強化モデル)、リン酸化欠損変異体(神経終末脆弱化モデル)を持つアデノ随伴ウイルスを作製する。このアデノ随伴ウイルスをドパミン神経系に導入したマウスを作製し、リン酸化欠損変異体のドパミン神経系での神経変性、SNAP25蛋白質レベルポリユビキチン化の程度の解析を行い、in vivoでのCSP α リン酸化の働きを解明する。同時に、パーキンソン病モデルマウスへCSP α リン酸化模倣変異体を導入し、治療効果を確かめる。

4. 研究成果

1. CSP α pSer34抗体作製とin vivoでのCSP α pSer34の存在の確認:

CSP α pSer34抗体を作製し、immunoblotを用いて、CSP α pSer34抗体が実際に特異的にSer34リン酸化を同定できることを確認した。マウス全脳からCSP α 抗体を用いて抽出したCSP α において、CSP α pSer34が実際に存在することを証明した。in vivoでマウス脳のCSP α pSer34が存在していること、PKCによるCSP α リン酸化、シナプス終末の防御の機構がin vivoで存在することを示唆する。一方、CSP α のpSer34抗体を用いて免疫組織染色を行ったが、残念ながら、免疫組織染色では使えないことが分かった。

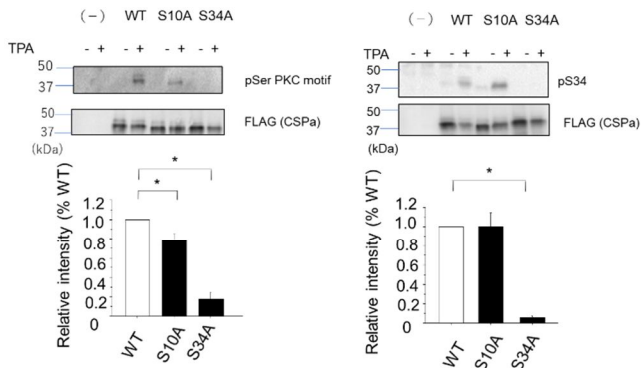


図1. 細胞レベルでのPKCリン酸化アッセイ
 左図：pSer PKC AbではS10リン酸化は低下する。
 右図：pS34 AbではS10Aではリン酸化は低下せず、S34Aではリン酸化を認めない。
 pS34抗体はS10リン酸化ではなく、S34のリン酸化を特異的に認識する。

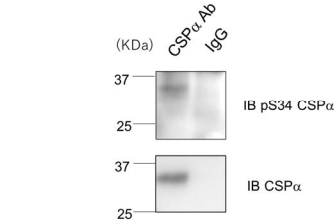


図2. マウス脳でCSPαのSer34リン酸化を検出
 pS34 CSPα抗体を作製した。マウス全脳から抽出したCSPαをpS34 CSPα抗体でIBを行い、CSPαのSer34リン酸化を確認した。

2. rThp promoter 制御下に CSPα-EGFP WT, リン酸化欠損 (SA) 変異体, リン酸化模倣 (SD) 変異体, H43Q を発現するアデノ随伴ウイルス PHP.eB の作製とマウスへの導入：

CSPαのリン酸化欠損変異体、模倣変異体を持つ AAV を作製し、PC12 細胞に発現させることで、無事 CSPα-EGFP が発現することを確認した。

6週令の C57BL/6N の眼窩静脈叢経由での AAV 投与により、黒質線条体系での CSPα-EGFP の発現を確認した。現在内在性の CSPαとの発現比率を検証中である。

十分な CSPα-EGFP の発現が確認できた後、長期観察により黒質線条体系の変性を解析する予定である。また、発現量が不十分な場合には AAV を用いて、黒質線条体系の内在性 CSPαを knockdown する予定である。これらの解析の後、パーキンソン病モデルマウスへ CSPαのリン酸化欠損変異体、模倣変異体を持つ AAV を導入して、ドパミン神経系の神経変性を解析する。

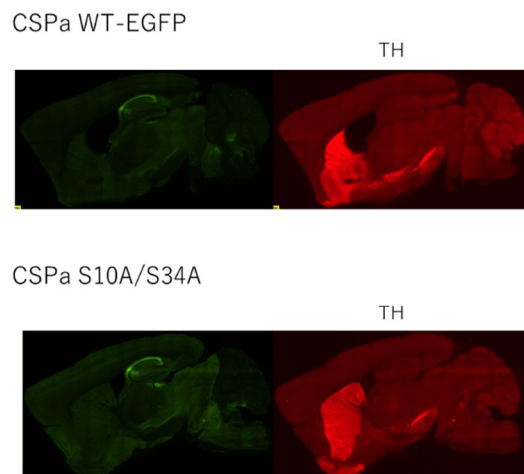


図3. In vivoでのCSPα-EGFPの発現
 WT, S10A/S34Aともに黒質線条体系をはじめとするドパミン神経系に発現を認める。海馬はAAV PHP.eBの感染効率が高いので発現を認める

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shirafuji Toshihiko, Shimazaki Haruo, Miyagi Tatsuhiro, Ueyama Takehiko, Adachi Naoko, Tanaka Shigeru, Hide Izumi, Saito Naoaki, Sakai Norio	4. 巻 98
2. 論文標題 Spinocerebellar ataxia type 14 caused by a nonsense mutation in the PRKCG gene	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 46 ~ 53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mcn.2019.05.005	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白藤俊彦, 上山健彦, 足立直子, 齋藤尚亮
2. 発表標題 Cysteine String Protein alpha (CSPa)Ser34特異的リン酸化抗体の作製と機能解析
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会
4. 発表年 2019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
研究分担者	齋藤 尚亮 (Saito Naoaki) (60178499)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・名誉教授 (14501)	
研究分担者	上山 健彦 (Ueyama Takehiko) (80346254)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・教授 (14501)	

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