

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15374

研究課題名(和文)パーキンソン病原因分子LRRK2の変異による腸管神経障害機構の解明

研究課題名(英文)The role of LRRK2 in dysfunction of enteric nervous system

研究代表者

前川 達則(Maekawa, Tatsunori)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：30647673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸管運動解析の結果、LRRK2欠損マウスでは異常な蠕動運動を検出した。LRRK2が腸管神経系を介して腸管運動に関与することが示唆された。腸管神経系の形態を解析した結果、腸管神経節あたりの神経細胞数やグリア細胞数、面積、興奮性・抑制性神経の割合などに関して、野生型マウス、欠損マウス、LRRK2変異マウスの間で有意な差が無いことが明らかになった。一方で、欠損マウスでは幼弱性を表すSox2陽性の神経細胞が増加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

本研究成果により、パーキンソン病原因分子であるLRRK2タンパク質が、腸管神経の成熟や腸管運動の制御に関与していることが明らかになった。両成果の詳細な関連性については未だ不明である。しかしながら、パーキンソン病症状の一つである消化管運動障害に関与するタンパク分子が明らかになったことは、今後の新薬開発への重要な知見となる。また、未熟な神経細胞がLRRK2欠損マウスの腸管で多く見られたことは、新たに確認されたパーキンソン病病態の一部である可能性が考えられる。今後、詳細な解析を進めることで早期診断開発などに展開され、健康寿命の延伸も期待することができる。

研究成果の概要(英文)： Using spatiotemporal mapping to analyze colonic motility, we found that abnormal colonic motility in LRRK2 knockout mice accompanied by slow peristaltic movement and fragmented continuity of that. These dysmotility and normal motility were abolished by the addition of tetrodotoxin. Thus, it was neurogenic.

Our immunofluorescence analysis also revealed the increasing number of Sox2 positive enteric neurons in LRRK2 knockout mice, while there were no differences among WT, KO, and GS mice. The abnormal immunophenotypic neurons indicated that there were more immature neurons in LRRK2 knockout mice than WT mice and this shed light on the new role of LRRK2 in the enteric nervous system.

研究分野：腸管神経

キーワード：パーキンソン病 腸管神経

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

PD は振戦をはじめとする運動症状と便秘などの非運動症状を呈する老人性神経変性疾患であり、高齢化に伴い患者数が増加している。中脳黒質におけるドーパミン神経細胞の脱落が原因であるが、その発症メカニズムは未だ解明されておらず、治療は対症療法に限られている。近年、PD 患者において腸管運動障害が脳神経変性よりも先行すること、代表的な病理所見である -シヌクレインの凝集や異常ミトコンドリアの出現が腸管神経を起点として始まることが明らかになり、腸管神経へ注目が集まっている (Nat Rev Neurol. 2015, Sci Rep. 2016)。孤発性 PD 患者や薬剤モデルマウスを対象とした腸管神経研究が進む一方で、この腸管神経障害メカニズムの解明に PD 原因分子の観点から取り組む研究は未だ少ない。

このような背景の中、申請者は家族性 PD (PARK8) 原因分子である LRRK2 が腸管神経に発現していることを発見した (図 1, Dig Dis Sci. 2017)。LRRK2 はタンパク結合ドメイン、GTPase ドメイン、キナーゼドメインからなるタンパク質で、脳神経細胞や免疫細胞、腎臓足細胞に発現している。現在までに細胞死や軸索伸長、エンドソーム輸送、シナプス形成などの機能に関与することが報告されており (Proc Natl Acad Sci USA. 2016)、孤発性 PD 患者の中でも高い頻度で検出される変異分子であることから、PD 発症の最重要分子であると考えられている。また、LRRK2 変異型 PD 患者に孤発性患者同様の腸管運動障害や腸管神経変性が確認されることから、LRRK2 は腸管神経において重要な機能を担っていると推測される (Parkinsonism Relat Disord. 2017)。多くの研究が脳神経における LRRK2 の機能解析に重点を置く中、腸管神経における LRRK2 の機能とその変異によって引き起こされる病態の詳細は未だ明らかになっていない。

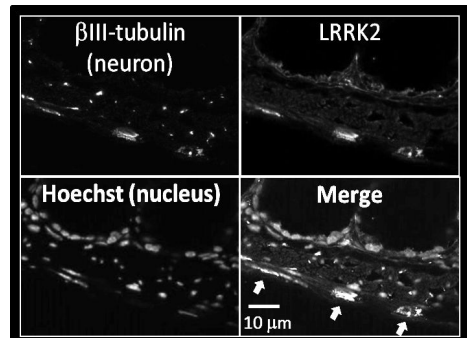


図 1. 腸管組織における LRRK2 の発現  
矢印で示される腸管神経細胞に LRRK2 が発現している。

### 2. 研究の目的

本研究ではマウスを用いた *in vivo* の解析により、LRRK2 を発現する腸管神経細胞の分類、腸管運動における LRRK2 の役割、変異型 LRRK2 が引き起こす腸管神経障害と腸管運動障害の詳細を明らかにする。これらの結果を統合して、PD の腸管神経障害メカニズムにおける LRRK2 の役割を解明することを目的とした。

#### (学術的独自性と創造性)

研究代表者は自らの最近の研究成果から、LRRK2 が PD の腸管神経障害に関与する可能性に着目した。近年、PD 患者や薬剤モデルマウスを対象とした腸管神経の解析が注目されているが、LRRK2 変異マウスを対象とした研究は未だ報告されていない。そこで、研究代表者が長年 LRRK2 研究に携わってきた経験と、留学で学んだ腸管神経実験の経験を生かし、PD における腸管神経障害メカニズムの解明に遺伝子改変マウスを用いた手法で取り組む点に本研究の独自性がある。本研究により、変異型 LRRK2 による腸管神経障害のメカニズムが明らかになれば、LRRK2 を標的とした治療薬開発に重要な知見を与えることができる。また、腸が生検可能な臓器であること、運動症状よりも腸症状が先行することから、発症前診断への発展も期待できる。早期診断と早期治療介入により発症時期を遅らせることができれば、介護・医療負担を軽減できるだけでなく、健康寿命の延伸も期待することができる。加速化する高齢化社会の中で本研究の持つ意義は大きい。

### 3. 研究の方法

本研究に用いる遺伝子改変マウスのうち、LRRK2 欠損 (KO) マウスは既に保有しており、G2019S 変異型 LRRK2 ノックインマウス (変異マウス) は米国ジャクソン研究所より購入した。

LRRK2 発現神経細胞の分類：実体顕微鏡下で C57BL/6J マウス (正常野生型マウス) から大腸筋層間神経叢および粘膜下神経叢のホールマウント試料を作製した。抗 ChAT, VIP, Calretinin, nNOS, CGRP, TH 抗体を用いて腸管神経層を構成する各神経を蛍光染色した。同時に抗 LRRK2 抗体を用いて共染色を行い、LRRK2 発現神経細胞を特定を試みた。

*ex vivo* による腸管運動解析：Spatiotemporal Map (時空間地図) は器官レベルでの複雑な腸管運動の解析を可能にする新たな手法として近年注目を集めている (J Vis Exp. 2016)。本研究ではバスユニット内にセットした大腸の腸管運動をビデオ撮影し、そのデジタルデータから MATLAB ソフトウェアを用いて Spatiotemporal Map を作成した。各マウス大腸の収縮回数・収縮速度・収縮パターンを比較した。なお、本解析に必要な MATLAB ソフトウェア内の解析プログラムは、メルボルン大学 (オーストラリア) 生理学の Bornstein 氏より譲り受けた。

腸管神経の形態解析：K0 マウス、変異マウスの腸管神経を上述のホールマウント染色法で可視化し、細胞数、神経節の大きさ、各神経細胞の比率を比較した。また、PD 病変の一つである -シヌクレインの蓄積やリン酸化 -シヌクレインの増加についても免疫染色法を用いて解析を行った。

これらの結果から腸管神経における LRRK2 の機能とその変異によって引き起こされる腸管運動異常、腸管神経障害の発症機序解明を試みた。

#### 4. 研究成果

##### 【腸管神経系における LRRK2 発現細胞の同定】

腸管神経系における LRRK2 発現細胞を特定するために、大腸筋層間神経叢のホールマウント染色を行った。本研究領域において一般的に使われている抗 LRRK2 抗体 (MJFF2) を使用した免疫蛍光染色の結果、K0 マウス大腸においても蛍光シグナルが確認された。そこで、抗原抗体反応に依存しない手法で解析するために LRRK2 レポーターマウスを作製した。このマウスでは、LRRK2 発現調節領域の塩基配列下流に蛍光タンパク質 (EGFP) の配列を有した人工染色体 (BAC) が組み込まれている。BAC の受精卵への導入とスクリーニングを経て、2 匹の初代マウスを得ることができた。現在解析を進めている (図 2)。

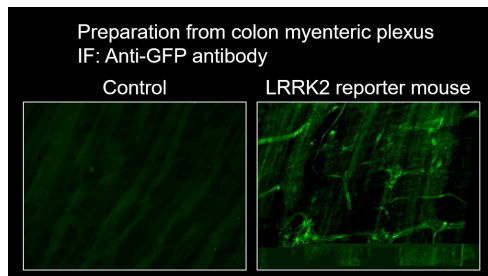


図 2. 作製された LRRK2 レポーターマウスにおける蛍光タンパク質の発現

##### 【大腸腸管運動における LRRK2 の役割】

Spatiotemporal map を用いた腸管運動解析の結果、K0 マウスでは異常な蠕動運動を検出した。特に、蠕動運動の肛門方向への伝播速度の低下や、大腸全長にかけての連続的な収縮の消失 (収縮の断片化) が顕著であった (図 3)。また、この異常運動は神経毒であるテトロドトキシンによって消失することから、神経性の運動であることが確認できた。腸管運動の制御にどのように LRRK2 が関与するのかは明らかにすることができなかったが、LRRK2 が腸管神経を介して腸管運動に関与することを、器官レベルの生理学的手法によって明らかにすることができた。

本実験によって明らかになった、蠕動運動速度の低下は、腸管運動神経の中でも、コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT)、サブスタンス P (SP) などを含む興奮性神経の活動低下が一因として考えられる。また、一酸化窒素合成酵素 (nNOS)、血管作動性腸ペプチド (VIP) を含む抑制性神経の機能亢進も要因として考えられる。収縮運動の連続性欠如を考えると、腸管の長軸方向に神経を繋いでいる介在性神経の機能異常が疑われる。LRRK2 は脳神経系において、シナプス小胞の輸送や開口放出に関与することが知られていることから、腸管神経系においても同様のメカニズムで運動異常に関与している可能性も考えられる。

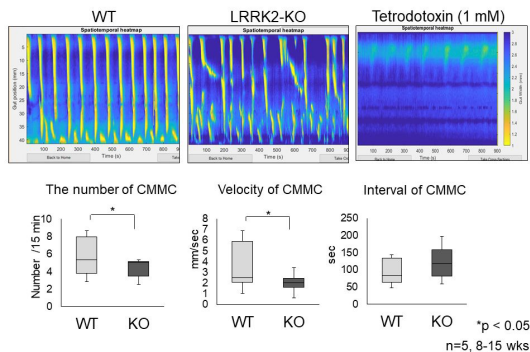


図 3. LRRK2 KO マウスにおける大腸運動の異常：K0 マウスでは収縮の連続性や速度が低下している

##### 【腸管神経系の形態解析 -LRRK2 欠損マウスにおける幼若神経細胞の増加-】

腸管神経系の形態をホールマウント試料を用いた免疫蛍光染色法で解析した。腸管神経節あたりの神経細胞数やグリア細胞数、面積、興奮性・抑制性神経の割合などに関して、野生型マウス、K0 マウス、変異マウスの間で有意な差が無いことが明らかになった。一方で、K0 マウスでは、未分化の細胞に発現している Sox2 タンパクを多く発現する腸管神経細胞が増加していることが明らかになった。この結果を裏付けるかのように、LRRK2 機能が亢進している変異マウスでは、Sox2 陽性腸管神経細胞の数が減少している傾向が確認できた (図 4)。これらの結果から、LRRK2 が腸管神経の新生・再生過程に関与する可能性が示唆された。

近年、腸管神経が持つ高い新生・再生能力に様々な研究領域から注目が集まっている [Kulkarni et al., PNAS, 2017]。腸炎後に見られるグリア細胞からの腸管神経分化や、腸間神経前駆細胞の候補として、シュワン前駆細胞が発見されている [Belkind et al., Sci Rep, 2017; Uesaka et al., J Neurosci, 2015]。LRRK2-KO マウスの腸管神経で増加していた Sox2 タンパク質は、腸管神経幹細胞や腸管グリア細胞に多く発現している。このことから、LRRK2 は腸管神経の新生・再生において、幹細胞系からの分化、もしくはグリア細胞からの分化を部

分的に抑制している可能性が考えられる。同様に考えると、分化途中に一時的に存在している未熟な Sox2+神経の成熟を促進している可能性も考えられる。本研究成果によって、ダイナミックに入れ替わる腸管神経系の細胞サイクルの中で、LRRK2 は神経分化を制御する分子であることが明らかになった。

パーキンソン病 (PD) では、腸管運動障害が脳神経変性よりも先行すること、代表的な病理所見である シヌクレインの凝集や異常ミトコンドリアの出現が腸管神経を起点として始まること明らかにされている (Nat Rev Neurol., 2015, Sci Rep., 2016)。孤発性 PD 患者や薬剤モデルマウスを対象とした腸管神経研究が進む一方で、腸管神経障害メカニズムの解明に PD 原因分子の観点から取り組んだ研究は少ない。本研究では、PD 原因分子である LRRK2 が腸管神経分化を制御することを世界に先駆けて明らかにした。消化管神経の変性が上行性に伝播し、さらには PD の本態であるドーパミン神経の変性をも引き起こすことが動物実験レベルで明らかにされていることから、変異型 LRRK2 による腸管神経の分化異常が PD 発症の引き金となる可能性も否定はできない (Sangjune et al., Neuron, 2019)。今後、PD 発症型 LRRK2 変異モデルマウスを比較しながら、LRRK2 のキナーゼ阻害剤を用いた実験などを行い、変異 LRRK2 による PD 発症機序を腸管神経の側面から明らかにしたい。

本研究により、パーキンソン病原因分子である LRRK2 タンパク質が、腸管神経の成熟や腸管運動の制御に関与していることが明らかになった (図 5)。これらの詳細な関連性については未だ不明である。しかしながら、パーキンソン病症状の一つである消化管運動障害に関与するタンパク分子が明らかになったことは、今後の新薬開発への重要な知見となる。また、未熟な神経細胞が LRRK2 欠損マウスの腸管で多く見られたことは、新たに確認されたパーキンソン病病態の一部である可能性が考えられる。今後、詳細な解析を進めることで早期診断開発などの展開が見込まれ、さらには健康寿命の延伸も期待できる。

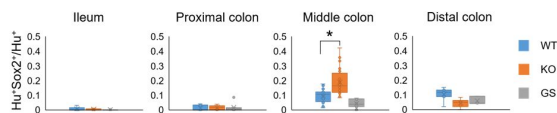
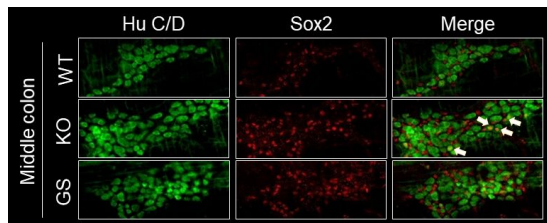


図 4. KO マウスにおける Sox2 陽性腸管神経細胞の増加: KO マウスでは矢印で示される Sox2 陽性の腸管神経細胞が増加している。

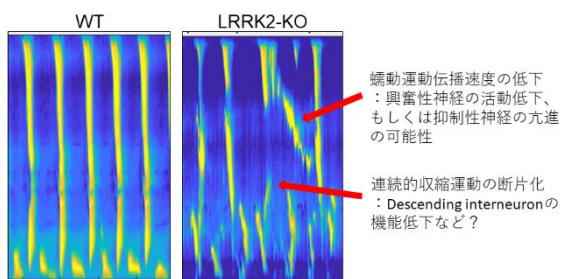
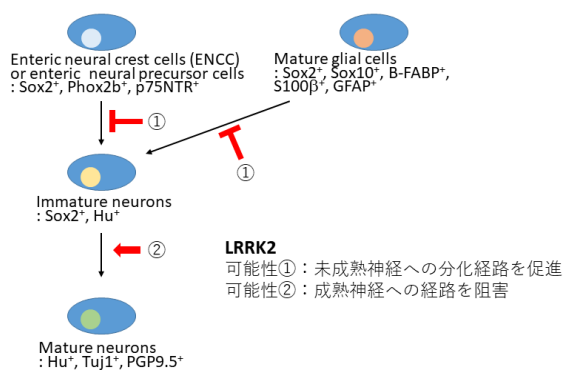


図 5. 本研究成果のまとめ

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 Maekawa T, Tsushima H, Kawakami F, Kawashima R, Kodo M, Imai M, Ichikawa T	4. 巻 13
2. 論文標題 Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Is Associated With Activation of the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus and Stress-Related Gastrointestinal Dysmotility.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3389/fnins.2019.00905.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 前川達則, 津島博道, 川上文貴, 川島麗, 市川尊文
2. 発表標題 LRRK2 is associated with gastrointestinal dysmotility induced by restraint stress.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前川達則, 川上文貴, 川島麗, Jaime Foong, Joel Bornstein, 市川尊文
2. 発表標題 腸管神経におけるLeucine-Rich Repeat Kinase 2の機能解析
3. 学会等名 第37回Cytoprotection研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tatsunori Maekawa, Fumitaka Kawakami, Rei Kawashima, Joel Bornstein, Jaime Foong, Takafumi Ichikawa
2. 発表標題 ATYPICAL MOTILITY PATTERNS IN GUT PREPARATION OF LRRK2 KNOCKOUT MICE
3. 学会等名 9th FAOPS CONGRESS（国際学会）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----