

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15465

研究課題名(和文)ミトコンドリア機能低下が  $\alpha$ -Synuclein 凝集を導く分子機序の解明研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism by which mitochondrial dysfunction leads to  $\alpha$ -Synuclein aggregation

研究代表者

孟 紅蕊 (Meng, Hongrui)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：90736498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)は中脳黒質ドーパミン神経脱落、不溶性凝集物蓄積を呈する神経変性疾患の一つである。CHCHD2はミトコンドリアで機能するPD原因遺伝子産物である。ミトコンドリア呼吸機能調節に関するCHCHD2変異と  $\alpha$ -synucleinの凝集化の関係を解析するため、CHCHD2欠損およびPD関連変異T61Iに着目して研究を実施した。患者脳、患者由来のiPS細胞とモデル動物ハエを用い、ミトコンドリア異常が  $\alpha$ -synucleinの凝集化を導く確固たる証拠をつかんだ。ミトコンドリア機能異常が  $\alpha$ -synucleinの凝集化を導く分子機序を解明するための優れたモデル動物の作製につながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CHCHD2変異により  $\alpha$ -synucleinが顕著に凝集・蓄積することが、病理解析で明らかとなった。患者由来のiPS細胞とミトコンドリア変性を再現するモデルハエを作製し、ミトコンドリア異常が  $\alpha$ -synucleinの凝集化を導く現象を再現できた。今後、ミトコンドリアの機能異常がいかに  $\alpha$ -synucleinの凝集化を導くか、その分子機序を解明することにより、予防的、治療的対策が可能になると期待される。老人性神経変性疾患に関しては、不溶性タンパク質の蓄積を削減に未然に防ぐことが最も効果的かつ経済的な対処法と考えられ、本研究で解析したモデル動物はその開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease (PD) is characterized by the accumulation of aggregated  $\alpha$ -synuclein into intraneuronal Lewy bodies (LBs). Mitochondrial dysfunction has been strongly implicated in the pathogenesis of PD. Our studies have shown that the missense mutation, T61I, in the familial PD-associated mitochondrial protein CHCHD2 causes mitochondrial dysfunction, exacerbating misfolded  $\alpha$ -synuclein aggregation and LB formation. Using Drosophila harboring CHCHD2 T61I mutation and dopaminergic neuron cultures prepared from a PD patient with CHCHD2 T61I, we investigated the mechanism underlying the mitochondrial dysfunction-induced  $\alpha$ -synuclein aggregation. Our in vivo and in vitro models characterized here will contribute to the understanding of the mechanism whereby mitochondrial dysfunction could be a risk factor for  $\alpha$ -synuclein aggregation in the pathogenesis of PD.

研究分野：神経内科学関連

キーワード：パーキンソン病  $\alpha$ -synuclein ミトコンドリア CHCHD2

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は、中脳黒質ドーパミン神経脱落を特徴とする老人性神経変性疾患である。前シナプスタンパク質  $\alpha$ -synuclein の凝集化がドーパミン神経細胞死を引き起こすと考えられているが、その凝集化の機序は未解明である。申請者ら研究グループが同定した家族性 PD 原因遺伝子 CHCHD2 は、ミトコンドリアタンパク質をコードする。CHCHD2 変異患者脳の病理解析から、凝集化  $\alpha$ -synuclein の高度な蓄積が認められた。

CHCHD2 はミトコンドリア膜間腔に局在する。申請者は、CHCHD2 のノックアウトおよび PD 変異導入ハエモデルを解析することにより、CHCHD2 生理的・病理的な役割を明らかにした(申請者ら、*Nat Commun.* 2017)。CHCHD2 の変異は呼吸鎖複合体電子伝達分子チトクロム C を不安定化させ、ミトコンドリア膜間腔からの電子漏洩の要因となる。電子漏洩は、構成的な活性酸素種の産生を導き、加齢と共に、ミトコンドリアの変性、脂質酸化、運動機能障害、ドーパミン神経脱落を引き起こす。さらに、CHCHD2 変異患者脳で、 $\alpha$ -synuclein の凝集化産物であるレビー小体の顕著な形成を認めた。本所見は、ミトコンドリア機能異常が  $\alpha$ -synuclein 凝集に積極的に寄与するエビデンスと考えられる。

#### 2. 研究の目的

$\alpha$ -synuclein の凝集化の要因として様々な仮説が提唱されている。ミトコンドリアの機能低下による酸化ストレスの関与、脂質代謝異常およびタンパク質分解経路の機能低下などが想定されているが、いずれも臨床でのエビデンスに直接結びつけるまでには至っていない。「ミトコンドリアの機能異常により、どのように  $\alpha$ -synuclein の凝集化が引き起こされるのか?」という問いが、神経内科学において解決すべき重要な課題の一つであり、本研究課題の核心である。本研究は、患者由来 iPS 細胞と CHCHD2 欠損・変異導入ショウジョウバエを用いて、「CHCHD2 変異ミトコンドリアにより  $\alpha$ -synuclein 凝集ができる分子メカニズム」の解明を目的とする。

#### 3. 研究の方法

CHCHD2 変異 PD 患者脳組織において生化学的分画及び病理染色、 $\alpha$ -synuclein 凝集のシード能解析、不溶性  $\alpha$ -synuclein の詳細解析を実施した。 $\alpha$ -synuclein を発現した CHCHD2 ノックアウトおよび PD 変異導入ショウジョウバエを作製、加齢依存性の  $\alpha$ -synuclein の蓄積・ドーパミン神経変性等を評価した。さらに、強力な界面活性剤であるサルコシルにて不溶化する  $\alpha$ -synuclein 凝集物の増加の有無を定量した。次に、神経変性への関与が考えられているオートファジー経路、ユビキチン-プロテアソーム経路の機能障害の有無を生化学的、組織化学的に評価した。オートファジー経路に関しては、生化学的な手段でその基質因子および誘導因子の集積の程度を観察した。

CHCHD2 変異患者 iPS 由来ドーパミン神経細胞にて、不溶性  $\alpha$ -synuclein の蓄積、オートファジー経路の異常、細胞死シグナルの亢進の有無の評価も実施した。

#### 4. 研究成果

(1) CHCHD2 変異 PD 患者脳組織において生化学及び病理染色解析から、広範囲に不溶性  $\alpha$ -synuclein 凝集物の集積が認められた。まず、CHCHD2 PD 患者剖検脳の解析から  $\alpha$ -synuclein の凝集産物であるレビー小体の顕著な蓄積が観察され、患者脳幹、辺縁部と新大脳皮質にアミロイド様な斑塊と神経原線維の高度な蓄積が見られた。CHCHD2 T61I 脳病理は広範囲にレビー小体が形成される認知症を伴うパーキンソン病のそれに類似していた。生化学的には、サルコシル不溶性  $\alpha$ -synuclein 凝集物の高度な集積が認められ、プリオン様のシード能を持つことを確認した。また CHCHD2 のミトコンドリア局在性が部分的に障害されていた。

(2) 実験動物としてのハエは、分子遺伝学的解析ツールが豊富でかつ加齢による影響を短時間で観察できる有利な点がある。我々は  $\alpha$ -synuclein をハエドーパミン神経に発現させ、神経脱落が再現できる本モデルを利用し、CHCHD2 と  $\alpha$ -synuclein の遺伝学的相互作用を解析した。CHCHD2 変異存在下、加齢依存的なミトコンドリアの変性、CHCHD2 のミトコンドリア局在性の喪失、ドーパミン神経細胞死が観察された。CHCHD2 欠失ハエや CHCHD2 変異体ハエモデルに  $\alpha$ -synuclein を共発現させたところ、加齢依存的なドーパミン神経の脱落の増加、寿命短縮が観察された。さらに、CHCHD2 変異存在下  $\alpha$ -synuclein の加齢依存的な蓄積の促進を認めた。

(3) CHCHD2 の変異により生じるミトコンドリアの機能異常が、 $\alpha$ -synuclein の凝集・蓄積を導く機構として、タンパク質分解系の障害、前シナプス動態の異常の可能性を分子のレベルで探索した。CHCHD2 の変異ハエでは、不溶化した高分子ポリユビキチンの増加、ハエモデルではプロテアソーム活性の上昇がみられた。これは、ユビキチン-プロテアソーム経路の代償的な機能亢進であると考えられた。一方、LC3-II の蓄積などから、オートファジー経路は障害されている可能性が示唆された。ミトコンドリア局在性 GCaMP および前シナプス局在 GCaMP をドーパミン神経に発現させ、ドーパミン神経細胞の電気刺激後の  $\text{Ca}^{2+}$  動態を評価した。その結果、ミトコンドリアによるシナプスの  $\text{Ca}^{2+}$  緩衝機能が低下していることが示唆され、これが  $\alpha$ -synuclein の凝集化に寄与している可能性も考えられた。この考えを証明するため、細菌由来の光駆動型プロトンポンプを CHCHD2 変異ハエミトコンドリアへ導入し、光依存的なミトコンドリアの賦活化を行った。その結果、ミトコンドリア  $\text{Ca}^{2+}$  緩衝機能が回復し、 $\alpha$ -synuclein 凝集化が抑制できることが、明らかとなった。

(4) iPS 細胞はドーパミン神経細胞に分化誘導可能であり、より病態に即した状態を再現できる。臨床脳剖検およびショウジョウバエモデルから得られた、ミトコンドリア変性による  $\alpha$ -synuclein 凝集化の観察について、その再現性を確認した。iPS 由来ドーパミン神経細胞においても不溶性  $\alpha$ -synuclein の蓄積が認め、リン酸化  $\alpha$ -synuclein の増加も観察された。本研究でキャラクタライズした iPS 細胞は、今後  $\alpha$ -synuclein の蓄積を抑制する創薬探索に用いることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Ikeda Aya, Nishioka Kenya, Meng Hongrui, Takanashi Masashi, Hasegawa Iwao, Inoshita Tsuyoshi, Shiba-Fukushima, et.al., Imai Yuzuru, Hattori Nobutaka	4. 巻 28
2. 論文標題 Mutations in CHCHD2 cause $\alpha$ -synuclein aggregation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 3895 ~ 3911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddz241	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 Mori Akio, Hatano Taku, Inoshita Tsuyoshi, Shiba-Fukushima Kahori, Koinuma Takahiro, Meng Hongrui, Kubo Shin-ichiro, Spratt Spencer, Cui Changxu, et.al., Okuzumi Ayami, Imai Yuzuru, Hattori Nobutaka	4. 巻 116
2. 論文標題 Parkinson's disease-associated iPLA2-VIA/PLA2G6 regulates neuronal functions and $\alpha$ -synuclein stability through membrane remodeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 20689 ~ 20699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1902958116	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 Imai Yuzuru, Inoshita Tsuyoshi, Meng Hongrui, Shiba-Fukushima Kahori, Hara Kiyotaka Y., Sawamura Naoya, Hattori Nobutaka	4. 巻 2
2. 論文標題 Light-driven activation of mitochondrial proton-motive force improves motor behaviors in a Drosophila model of Parkinson's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	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/s42003-019-0674-1	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 Imai Yuzuru, Meng Hongrui, Shiba-Fukushima Kahori, Hattori Nobutaka	4. 巻 20
2. 論文標題 Twin CHCH Proteins, CHCHD2, and CHCHD10: Key Molecules of Parkinson's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Frontotemporal Dementia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 908 ~ 908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20040908	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 孟 紅蕊、井下 強、柴-福島 佳保里、池田 彩、西岡 健弥、今居 謙、服部 信孝
2. 発表標題 CHCHD2変異が $\alpha$ -シヌクレインの凝集化を促進する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今居 謙、森 暁生、井下 強、柴-福島 佳保里、孟 紅蕊、服部 信孝
2. 発表標題 生体膜恒常性の変調による $\alpha$ -Synuclein凝集メカニズム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Meng H, Ikeda A, Nishioka K, Takanashi M, Inoshita T, Shiba-Fukushima K, Okuzumi A, Funayama M, Imai Y, Hattori N
2. 発表標題 Mutations of CHCHD2 accelerate $\alpha$ -synuclein aggregation, conferring a prion-like seeding property to $\alpha$ -synuclein
3. 学会等名 第42回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikeda A, Meng H, Nishioka K, Takanashi M, Li Y, Yoshino H, Inoshita T, Shiba-Fukushima K, Okuzumi A, Mori A, Yamaguchi A, Nonaka R, Izawa N, Ishikawa KI, Saiki H, Morita M, Funayama M, Hasegawa M, Okano H, Akamatsu W, Imai Y, Hattori N
2. 発表標題 Analyses of CHCHD2 pathophysiology by human brain, iPSC and Drosophila model
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 孟 紅蕊
2. 発表標題 Mutations of CHCHD2 exacerbate $\alpha$ -synuclein accumulation in Drosophila
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----