

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19682

研究課題名(和文) 糖尿病発症要因に着目したパーキンソン病発症リスク解明

研究課題名(英文) Risk of Parkinson's disease focused on the cause of diabetes

研究代表者

古武 弥一郎 (Kotake, Yaichiro)

広島大学・医系科学研究科(薬)・教授

研究者番号：20335649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病患者はパーキンソン病発症リスクが高いという疫学調査の実験的証明を試みるとともに、これらの基礎現象として、パーキンソン病関連神経毒性物質MPP+毒性が脳皮質初代培養神経細胞と株細胞SH-SY5Yでどのように異なるかを調べた。前者についてははっきりとした結果は示せなかったが、後者については脳皮質神経細胞において、AMPKが顕著に活性化されるにもかかわらず下流のacetyl-CoA carboxylase (ACC) が活性化されないなど、両者の反応性に相違が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病がパーキンソン病発症のリスクを高めるという疫学調査の動物実験による解明を試みたが、有意な結果は得られなかった。体重増加による運動機能低下とパーキンソン病態のそれを区別することが難しかったのがその一因として考えられる。一方、初代培養神経細胞と神経芽細胞腫はエネルギー代謝の面で異なる点が認められ、これは上記調査結果のメカニズムを考える上で有用な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We experimentally tried to evaluate epidemiological survey that the risk of Parkinson's disease is high in diabetic patients. However, we were not able to show clear data. Whereas, we investigated the differences of the reactivity of parkinsonian toxin MPP+ against primary cortical neurons and neuroblastoma. As the results, MPP+ did not activate acetyl-CoA carboxylase (ACC) though it activated AMPK only in cortical neurons. Such differences in energy metabolism between primary neurons and neuroblastoma may lead to experimentally clarify that diabetes is associated with an increased risk of Parkinson's disease.

研究分野：神経毒性学

キーワード：糖尿病 パーキンソン病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

PD は老年期に発症する神経変性疾患であり、中脳黒質から線条体に投射するドパミン神経が細胞死を起こすことが原因で発症するが、その原因については不明なままである。

フィンランドにおいて 5 万人を超える人を対象として 2 型糖尿病患者の PD 発症率を調べたところ、糖尿病患者はそうでない人と比較して約 2 倍高い傾向にあるという大規模疫学調査の結果が報告された(Hu *et al.*, *Diabetes Care* 30, 842-847 (2007))。また、糖尿病治療薬として用いられているエキセナチドなどのグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 受容体アゴニストは、運動機能改善をはじめとする PD 治療効果が報告されているものの、どのようなメカニズムで薬効を示すのかは全く不明である(Athauda and Foltynie, *Drug Discovery Today* 21, 802-818 (2016))。一般的に、疾患の発症や増悪において罹患する患者の栄養状態の関与は大きいと考えられるが、神経細胞の栄養状態と脳疾患の関係について実験的に調べた論文は少ない。

MPP⁺という化学物質は PD 病態モデル細胞を作製する際に汎用される神経毒性物質である。申請者は、従来用いられていた MPP⁺濃度より低濃度を用いて PD 病態に近いモデル細胞を作製した(Miyara, *Kotake, *et al.*, *Journal of Neurochemistry* 139, 294-308 (2016))。このモデル細胞を用いてグルコース濃度を減少させると、MPP⁺の神経毒性が顕著に増強されることを報告した (Sakamoto, Miyara, Sanoh, Ohta, *Kotake, *Scientific Reports* 7, 46668 (2017))。糖尿病病態のひとつに神経細胞内グルコースの減少が考えられており、この結果から、環境中の化学物質など従来の PD リスクと、糖尿病の原因の両者が PD 発症に関与している可能性が考えられた。

そこで、グルコース減少により MPP⁺毒性が増強される原因を精査するとともに、糖尿病モデルマウスに単独では毒性を示さない MPTP (動物実験で用いられる代謝されて MPP⁺になる前駆物質) を投与して PD モデルマウスを作製し、その神経毒性メカニズムを解明することにより、糖尿病と PD の関係や発症原因の共通性に迫れるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、培養細胞を用いた実験と糖尿病モデル動物を用いた実験の両面から、グルコースと PD 関連神経毒性の関係を明らかにし、糖尿病患者に PD 発症率が高いという疫学調査を裏づける実験的エビデンスを得るとともに、PD 発症の手がかりを見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

1) 糖尿病モデルマウスにおける MPTP 感受性の検討

C57BL/6J マウスに 60%高脂肪食 (high fat diet, HFD) を 8-9 週間自由摂餌させた糖尿病モデルマウスと、25 mg/kg MPTP および 250 mg/kg プロベネシドを週 2 回、4 週間腹腔内投与したパーキンソン病 (PD) モデルマウスを組み合わせ、糖尿病かつ PD モデルマウスを作製した。HFD に対するコントロールとして standard diet (SD) を自由摂餌させ、(Cont, SD)群、(MPTP, SD)群、(Cont, HFD)群、(MPTP, HFD)群の 4 群を作成した。各群 5 匹ずつ、計 20 匹を実験に用いた。経時的に体重、摂餌量、血糖値、自発的運動量、Rotarod 試験による運動能力、脳切片を作製し、組織染色による tyrosine hydroxylase 陽性ニューロンの変化を調べた。本実験に改良を加えて 2 回繰り返した。

2) インスリン抵抗性モデル神経細胞の作製および神経細胞における MPP⁺曝露の影響

マウス大脳皮質由来初代培養神経細胞においてインスリン抵抗性モデル細胞の作製を試みた。妊娠 18 日齢 C57BL マウスから大脳皮質を単離し、Neurobasal Plus Medium と B-27 Plus Supplement を用いて培養した。DIV13 で B-27 なしの培地に交換し、DIV14 で 20 nM インスリン、200 μ M パルミチン酸、200 μ M オレイン酸を曝露し、翌日に培地交換した後、インスリン刺激し、15 分後に回収した。また、上記大脳皮質神経細胞と SH-SY5Y 両細胞における MPP⁺曝露に対する応答性の違いを調べた。

4 . 研究成果

1-1) 体重変化

(Cont, HFD)群、(MPTP, HFD)群の両者において、(Cont, SD)群、(MPTP, SD)群と比較して著しい体重の増加が認められた。

1-2) グルコース負荷試験

16 時間以上絶食後に 2 g/kg d-グルコースを腹腔内投与し、30 分後、120 分後に血糖値を測定した。(Cont, SD)群、(MPTP, SD)群と比較して、(Cont, HFD)群、(MPTP, HFD)群において空腹時血糖値が上昇していた。特に 1 回目の実験において、(Cont, HFD)群、(MPTP, HFD)群において耐糖能の低下が認められた。

1-3) 自発的運動量測定

実験開始 6-7 週間 (MPTP 投与開始 2 週間)、実験開始 8-9 週間 (MPTP 投与開始 4 週間) の 2 回自発的運動量の測定を行った。試験前日に 20 分馴化を行い、当日 5 分間の動画を撮影し、行動解析ソフト Smart3.0 にて解析を行った。4 群の比較において MPTP 投与および高脂肪食を与えることによる自発運動量の増加は認められなかった。

1-4) 協調運動機能の測定

パーキンソン病様症状の一環として協調運動を調べるため、Rotarod 試験を行った。1 回目はマウス 1 個体につき 2 回ずつ 10 rpm で 100 秒間達成できるまで(棒につかまり続けられるまで)トレーニングを行った後、MPTP 投与開始 2 週間、4 週間後に試験を行った、15 rpm で 3 回試行を行い、その平均値をスコアとした。(平均 300 秒) 各試行の間隔は 10 分以上となるようにした。協調運動が評価できていないと考えられたため、2 回目は 1 回目と同様にトレーニングを行った後、15 rpm で 2 回試行を行い、その平均値が高い順に 20 匹を選んで実験に用いた。試験は MPTP 投与開始前と投与後 1 週間ごとに行った。15 rpm で 3 回試行を行い、その平均値をスコアとした。(平均 300 秒) これらの結果、コントロール群でスコアは上昇し、MPTP 投与群ではスコアは減少傾向にあったものの、HFD 群と SD 群で有意差は認められず、糖尿病モデルマウスにおいて MPTP 感受性の上昇は認められなかった。

2) インスリン抵抗性モデル神経細胞の作製および神経細胞における MPP⁺曝露の影響

インスリン曝露によるインスリン抵抗性誘発は確認できなかったが、インスリン濃度を上げることによりインスリン抵抗性を示すことが期待される。大脳皮質初代培養神経細胞において 10 μ M MPP⁺曝露により、SH-SY5Y 細胞において 200 μ M MPP⁺曝露によりそれぞれ AMPK のリン酸化レベル増加が認められた。一方、AMPK の基質であり、AMPK 活性の指標となる acetyl-CoA carboxylase (ACC) の顕著なリン酸化レベル増加は大脳皮質初代神経細胞においてのみ認めら

れなかった。このことから、初代培養神経細胞には飢餓状態ではたらく代償的な機構が存在している可能性が考えられる。10 μ M MPP⁺曝露 48 h から p62 および α -synuclein の減少が認められた。SH-SY5Y 細胞においては LC3-II の増加が認められたが、大脳皮質初代培養においては認められなかった。P62 および α -synuclein が凝集し、不溶性画分に移行している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 宮良 政嗣、徳永 航、桑原 由佳、渡辺 南海子、畑宮 駿一、中西 剛、太田 茂、古武 弥一郎
2. 発表標題 低濃度パーキンソン病関連神経毒によるオートファジー阻害とp62核内蓄積
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
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
研究分担者	宮良 政嗣 (Miyara Masatsugu) (60816346)	岐阜薬科大学・薬学部・研究員 (23701)	