

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07369

研究課題名(和文) ミトコンドリア呼吸阻害による軸索変性誘導機構の解明とパーキンソン病への展開

研究課題名(英文) Analysis of axonal degeneration mechanism by mitochondrial respiratory suppression in Parkinson's disease

研究代表者

村田 等 (Murata, Hitoshi)

岡山大学・医歯薬学域・講師

研究者番号：90579096

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)：SARM1の異常活性化を介したミトコンドリア呼吸阻害による軸索変性誘導機構の解析を行った。SARM1はJNKによるリン酸化で活性化し、NAD+を加水分解することによってミトコンドリア呼吸を阻害した。この経路がパーキンソン病(PD)の病態形成に及ぼす影響を見るために、Parkin遺伝子を欠失したPD患者由来の神経細胞やPD様症状を誘発するロテノンを用いた解析を行った。Parkin欠失やロテノンへの曝露でSARM1のリン酸化レベルは上昇し、軸索変性或細胞死の割合は上昇した。in vivoでも同様の現象が観察されたことから、SARM1の異常活性化がPDの病態形成に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病は中脳黒質から線条体に軸索を投射するドーパミン作動性神経の脱落を主な原因とする神経変性疾患である。我々はミトコンドリア呼吸を阻害し、軸索変性を誘導する分子であるSARM1の解析を行い、リン酸化によるSARM1の異常活性化がパーキンソン病の病態進行に関与する可能性を示す解析結果を得た。リン酸化SARM1の機能を阻害する低分子化合物を見出したので、今後パーキンソン病の治療薬開発に繋がるように研究を更に進めていく。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the mechanism of axonal degeneration induction by mitochondrial respiratory inhibition mediated by abnormal activation of SARM1. SARM1 was activated by JNK-mediated phosphorylation and inhibited mitochondrial respiration by hydrolyzing NAD+. In order to see the effect of this pathway on the pathogenesis of Parkinson's disease (PD), we performed analysis using neurons derived from PD patients lacking the Parkin gene and rotenone that induces PD-like symptoms. Parkin deletion and exposure to rotenone increased SARM1 phosphorylation levels and increased the rate of axonal degeneration and cell death. Similar phenomena were observed in vivo, suggesting that abnormal activation of SARM1 is involved in the pathogenesis of PD.

研究分野：分子生物学

キーワード：SARM1 ミトコンドリア 軸索変性 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

パーキンソン病は中脳黒質から線条体に軸索を投射するドーパミン作動性神経の脱落を主な原因とする神経変性疾患である。その中で軸索の変性やミトコンドリアの機能障害がパーキンソン病の発症や進行に関与することが知られているが (J Parkinsons Dis, 6, 2016、J Neurochem, 139, 2016)、その関連性については明らかとなっていなかった。Osterloh 等はショウジョウバエを用いたスクリーニングから軸索変性に関与する分子の探索を行い、ミトコンドリアに局在する SARM1 (Sterile alpha and TIR motif containing protein 1) を軸索変性誘導分子として報告した (Science, 337, 2012)。一方、我々は家族性パーキンソン病原因遺伝子産物 PINK1 と Parkin の解析から、ミトコンドリア呼吸を阻害し損傷ミトコンドリアの除去機構であるマイトファジーに関与する分子として SARM1 を見出していた (Murata et al, Mol Biol Cell, 24, 2013)。その後の解析で、SARM1 は JNK キナーゼによるリン酸化で活性化し、補酵素 NAD⁺ の分解を通じてミトコンドリア呼吸鎖の阻害に関与することを明らかにした (Murata et al, J Biol Chem, 293, 2018)。

2. 研究の目的

我々はマイトファジー誘導を担う *Parkin* 遺伝子を欠失した家族性パーキンソン病患者由来の神経細胞を用いた解析を進め、パーキンソン病患者由来の神経細胞では SARM1 のリン酸化や軸索の分解が健常者由来の神経細胞と比較して亢進している可能性を見出した。これらのことから、SARM1 の活性化に伴うミトコンドリア呼吸阻害が軸索変性を誘導し、パーキンソン病の病態進行に関与しているのではないかという仮説を立てた。

本研究では 1. SARM1 によってミトコンドリア呼吸が阻害されると、なぜ軸索変性が誘導されるのか、2. *Parkin* によるマイトファジー誘導は SARM1 による軸索変性抑制に寄与するのか、3. SARM1 阻害によるミトコンドリア呼吸の改善は軸索変性およびパーキンソン病の病態改善につながるのかを解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞

解析に用いた細胞はヒト胎児腎由来 HEK293T、健常者由来 iPS 細胞 (201B7、RIKEN BRC)、家族性パーキンソン病患者 (PARK2) 由来 iPS 細胞 (慶応義塾大学・岡野栄之先生より提供を受けた) である。HEK293T 細胞は DMEM/F12-10%FBS 培地で培養を行った。iPS 細胞は DMEM/F12 に NCAA、L-Gln、KSR、2-メルカプトエタノール、500 ng/ml bFGF を加えた培地を用い、フィーダー細胞上で培養を行った。iPS 細胞は PSC Neural Induction Medium (Thermo Fisher Scientific) を用いて神経幹細胞への分化誘導を行い、その後 Neurobasal Plus Medium (Thermo Fisher Scientific) に B-27 Plus、GlutaMAX、CultureOne supplement、アスコルビン酸を加えた培地を用いて神経細胞への分化誘導を行った。細胞へのプラスミド DNA のトランスフェクションは FuGENE-HD (Promega) を、siRNA のトランスフェクションは Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。細胞のゲノム編集は TrueCut Cas9 Protein v2 (Thermo Fisher Scientific) と TrueGuide Synthetic guide RNAs (Thermo Fisher Scientific, SARM1:A35511、PARK2:A35533) を混合し、Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) を用いて導入を行った。

(2) ウェスタンブロッティング

様々な処理を行った細胞は SDS sample buffer を用いて溶解し、ウェスタンブロッティング用のサンプルとした。サンプルを SDS-PAGE で展開した後、PVDF 膜への転写を行った。ブロッキングを行った後、1次抗体および HRP 標識 2次抗体を加え、HRP 基質溶液と反応させ、バンドの検出を行った。

(3) ATP 量、NAD⁺量、ROS 量の解析

ATP 量の検出は CellTiter-Glo assay (Promega)、NAD⁺量の検出は NAD/NADH-Glo assay (Promega)、ROS 量の検出は ROS-Glo H₂O₂ assay (Promega) を用いた。

(4) SARM1-FLAG の精製および NAD⁺分解活性の測定

ExpiSf9 細胞に FLAG タグを付加した SARM1 を発現させ 72 時間培養を行った。1% Triton-X100、20% Sucrose を含む細胞溶解液で細胞を溶かし、遠心後に上清を回収した。上清に anti-FLAG M2 affinity gel (SIGMA) を加え、4 で 3 時間反応させた。affinity gel を PBST および PBS で 3 回洗浄を行い、0.5 mg/ml FLAG ペプチドを加え 4 で 1 時間反応し、SARM1-FLAG を affinity gel から解離させた。SARM1-FLAG 溶液に化合物 (10 μM) を加え、37 で 30 分間反応させた。次に 1 μM NAD⁺を加え、37 で 30 分間反応させた。その後 NAD/NADH-Glo assay を用いて NAD⁺量を測定し、SARM1 の NAD⁺分解活性を測定した。

(5) パーキンソン病モデルマウスの作製と解析

パーキンソン病様症状を誘発する薬剤として一般的に用いられるロテノン及びパラコートを用いてモデルマウスの作製を行った。ロテノンの投与には浸透圧ポンプ(Alzet, #2004)を用いた。DMSOとPEG400を1:1で混合した溶液にロテノン(SIGMA)を溶かし、浸透圧ポンプに注入後、C57BL/6Jマウス(8週齢、雄)の皮下に移植した。浸透圧ポンプは28日間薬剤が放出され、ロテノンの濃度は0、5、10 mg/kg/dayとなるように調製した。パラコートは10 mg/kgで4日おきに5回腹腔内投与を行った。投与開始から4週間後に脳の摘出を行い、中脳部分をN-PER Neuronal Protein Extraction Reagent(Thermo Fisher Scientific)で溶解し、ウェスタンブロット用のサンプルとした。

4. 研究成果

(1) SARM1による軸索変性誘導機構の解析

SARM1はJNKキナーゼによるリン酸化で活性化することから、ヒトiPS細胞由来の神経細胞に対してJNK阻害剤(JNK inhibitor VIII)を使用し、ロテノン誘発性の軸索変性や細胞死に対する効果を検証した。ロテノンへの曝露はSARM1のリン酸化を誘導し、それに伴い軸索成分NF-MやNF-Lの分解や細胞死(CI. caspase 3の増加)が誘導された(図1)。一方、JNK阻害剤の添加によってこれらの現象は優位に抑制された(図1)。JNK阻害による軸索変性や細胞死誘導の抑制効果は、他の

JNK阻害剤であるSP600125でも観察されたことから、JNK-SARM1経路の活性化がロテノン誘発性の軸索変性や細胞死誘導に参与していることが示唆された。次にSARM1がこの経路に直接関与していることを確認するために、ゲノム編集によってSARM1を欠失させた神経幹細胞を樹立し、神経細胞に分化誘導させ

てロテノン耐性への変化を観察した。SARM1を欠失した神経細胞はコントロールの神経細胞と比較して軸索変性や細胞死の割合が減少していた。このことからJNK下流でSARM1が活性化することによって軸索変性や細胞死誘導に参与していることが示唆されたが、JNK阻害の場合と比較してその抑制効果は低いものであった。この理由として、樹立したSARM1欠失細胞がヘテロの状態であり、完全にクローン化された細胞を獲得できていないところに原因があると考えられた。神経幹細胞の状態ではシングルセルクローニングが困難であったため、現在はiPS細胞の状態ではゲノム編集とシングルセルクローニングを行い、細胞の樹立を再度行っている。

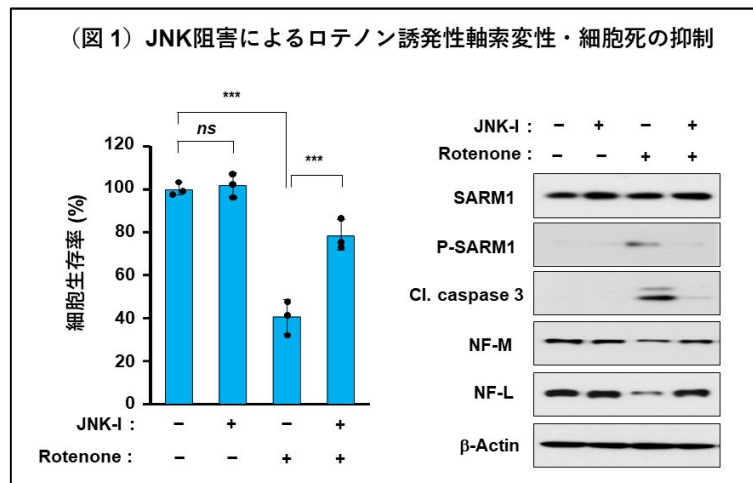
次にSARM1のリン酸化がロテノン誘発性の軸索変性、細胞死誘導に及ぼす影響を解析するために、SARM1の野生型(WT)もしくはリン酸化部位Ser548をAlaに置換したSARM1変異体(S548A)を過剰発現する神経幹細胞を樹立し、神経細胞に分化誘導してロテノン耐性への変化を観察した。SARM1-WTの過剰発現はコントロールと比較して軸索変性や細胞死の割合を増加させたが、SARM1-S548Aの過剰発現は軸索変性や細胞死を減少させた。SARM1は多量体を形成して機能するタンパク質であるので、不活性型のSARM1-S548Aが内在性SARM1の形成する多量体の中に取り込まれ、ドミナントネガティブ効果を発揮したことが示唆された。

SARM1はNAD⁺を加水分解することによってcADPRを産生することが報告されている(Neuron, 93, 2017)。cADPRはカルシウムのセカンドメッセンジャーとして作用し、細胞内のCa²⁺イオン濃度を上昇させ、Ca²⁺依存性のカルパイン酵素等を活性化させて軸索成分の分解につながると考えられる。細胞内のCa²⁺及びカルパインがSARM1の下流でロテノン誘発性の軸索変性や細胞死へ関与することを確認するために、Ca²⁺キレート剤EGTAとカルパイン阻害剤を用いた解析を行った。はじめにSARM1の過剰発現がCa²⁺イオン濃度を上昇させること、この作用はNAD⁺分解酵素活性部位であるTIRドメインを除くことによってなくなることを確認した。EGTA、カルパイン阻害剤の添加でロテノンによって誘導されるSARM1のリン酸化レベルに変化はなかったが、軸索分解や細胞死は抑制された。これらの結果からSARM1下流においてCa²⁺依存性のカルパインが活性化し、軸索変性や細胞死誘導に参与していることが考えられた。

(2) Parkin欠失がロテノン誘発性の軸索変性や細胞死誘導に及ぼす影響の解析

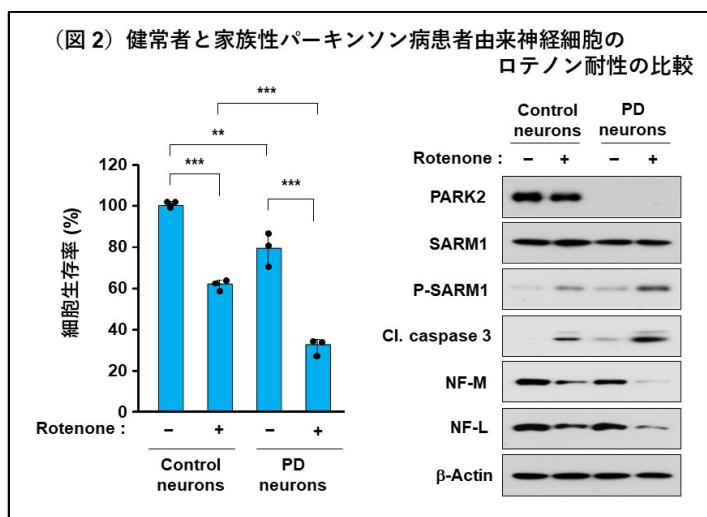
パーキンソン病の病態進行におけるSARM1を介した軸索変性の影響を解析するために、

(図1) JNK阻害によるロテノン誘発性軸索変性・細胞死の抑制



健常者及び家族性パーキンソン病患者 (*Parkin* 遺伝子の欠失) 由来の iPS 細胞から神経細胞を分化誘導し、比較検討を行った。パーキンソン病患者由来の神経細胞 (PD) はロテノンに対して脆弱であり、SARM1 のリン酸化レベル、軸索分解、細胞死の割合が健常者由来の神経細胞 (Control) と比較して高かった (図 2)。

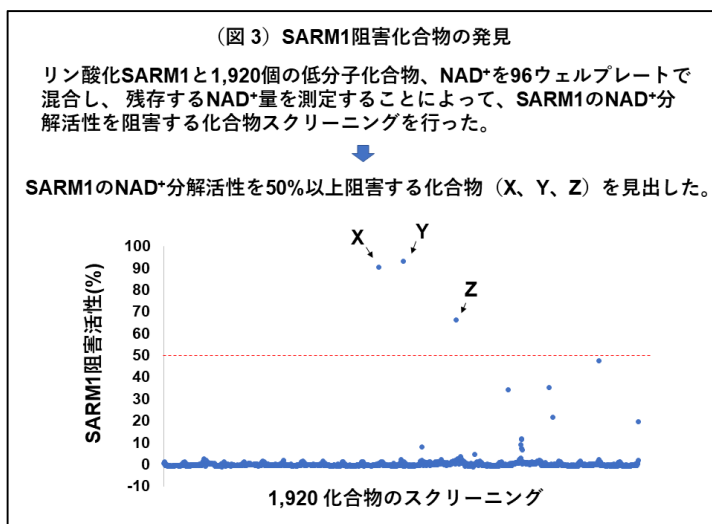
次にこの現象が *Parkin* の欠失に由来することを確認するために、ゲノム編集によって *Parkin* 遺伝子を欠失させた神経幹細胞を樹立し、神経細胞に分化誘導させてロテノン耐性への変化を観察した。*Parkin* を欠失した神経細胞はコントロールの神経細胞と比較してロテノン誘発性の軸索変性や細胞死の割合が増加していた。しかしその割合は家族性パーキンソン病患者由来の神経細胞と比較して低いもので、SARM1 の場合と同様、*Parkin* 欠失細胞を完全にクローン化できていないことが原因の 1 つであると考えられた。現在は iPS 細胞の状態でゲノム編集とシングルセルクローニングを行い、細胞の樹立を再度行っている。



(3) SARM1 阻害によるパーキンソン病の病態改善効果の検討

これまでの研究で、ストレス環境下で JNK が SARM1 をリン酸化することによって活性化し、軸索変性や細胞死誘導に関与することを明らかにしてきた。この現象が *in vivo* でも生じていることを確認するためにパーキンソン病モデルマウスを用いた解析を行った。パーキンソン病モデルとしては、浸透圧ポンプを用いたロテノン慢性皮下投与マウスとパラコート腹腔内投与マウスを使用した。投与 4 週間後に中脳領域の組織を回収し、ウェスタンブロットによる解析を行った。その結果、ロテノン及びパラコート投与群ではコントロール群と比較して SARM1 のリン酸化レベルが上昇し、軸索成分 NF-M の分解やドーパミン神経細胞マーカーである TH の減少が確認された。このことから *in vivo* でもストレス環境下で SARM1 が活性化され、ドーパミン神経の脱落やパーキンソン病の病態進行に関与している可能性が示唆された。

次に活性化した SARM1 の機能を阻害するために、リン酸化 SARM1 を用いたスクリーニングで SARM1 の NAD⁺分解活性を阻害する低分子化合物の探索を行った。様々な骨格を有する 1,920 化合物のスクリーニングを行い、SARM1 の NAD⁺分解活性を 50%以上阻害する化合物 (X、Y、Z) を見出した (図 3)。今後これらの化合物を用いて *in vitro*、*in vivo* のパーキンソン病モデルに対する保護効果を検討していく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田等、越智俊樹、山本健一、木下理恵、阪口政清
2. 発表標題 ロテノン誘発パーキンソニズムの病態形成におけるSARM1リン酸化制御の意義
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田等、山本健一、木下理恵、阪口政清
2. 発表標題 Regulation of SARM1-NAD ⁺ cleavage activity and mitochondrial function through phosphorylation by JNK
3. 学会等名 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田等、阪口政清
2. 発表標題 JNKによるリン酸化を介したSARM1のNAD ⁺ 代謝と軸索変性への寄与
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田等、越智俊樹、友信 奈保子、山本健一、木下理恵、阪口政清
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞と動物モデルを用いたパーキンソン病における軸索変性誘導分子SARM1のリン酸化制御解析
3. 学会等名 第93回日本組織培養学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 化合物、神経系疾患の予防又は治療薬	発明者 村田 等、阪口 政清、安藤 隆幸、福田 達也、中村 仁	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-135934	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	阪口 政清 (Sakaguchi Masakiyo) (70379840)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	浅沼 幹人 (Asanuma Masato) (00273970)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

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