

令和 5 年 5 月 6 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07838

研究課題名(和文) ノックインゼブラフィッシュを用いたヒト α -シヌクレインの炎症応答性の解析研究課題名(英文) Analysis of inflammatory response of human α -synuclein using transgenic zebrafish

研究代表者

守屋 彰悟 (Moriya, Shogo)

千葉大学・大学院医学研究院・特任講師

研究者番号：00793837

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)：レビー小体病の発症機構解明を目指し、レビー小体形成機構の解明のため、マクロファージでヒト α -シヌクレインを発現するノックインゼブラフィッシュを作製し、 α -シヌクレインの炎症応答性の解析を行った。マクロファージが α -シヌクレインの多量体/凝集体を形成・放出し、神経細胞が取り込むことを見出し、その過程へ翻訳後修飾の関与を示した。また、この過程において炎症反応は起こっておらず、炎症反応と独立してマクロファージから神経細胞への α -シヌクレインの伝播が行われ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

レビー小体病は α -シヌクレインの異常凝集体を主な構成成分とするレビー小体の存在を特徴とする神経変性疾患の一つである。レビー小体の形成機構は明らかになっておらず、治療法確立の大きな障壁となっている。本課題により得られた結果よりマクロファージやミクログリアが α -シヌクレインの多量体/凝集体を形成・放出し、神経細胞へ取り込まれることがレビー小体形成のトリガーとなる新たな可能性を示した。これはレビー小体形成機構の解明、さらにはレビー小体病の治療法開発へつながる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathogenesis of Lewy body disease, we generated knock-in zebrafish expressing human α -synuclein in macrophages and investigated the inflammatory responses of α -synuclein. Multimers/aggregates of α -synuclein were formed and released from macrophages, and taken up by neurons. Post-translational modifications suggested to be involved in this process. Meanwhile, no inflammatory response was induced, suggesting that α -synuclein multimers/aggregates spread from macrophages to neurons independently of the inflammatory response.

研究分野：神経科学

キーワード： α -シヌクレイン マクロファージ 神経細胞 ゼブラフィッシュ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レビー小体病は α -シヌクレインの異常凝集体を主な構成成分とするレビー小体の存在を特徴とし、パーキンソン病やレビー小体型認知症が知られており、アルツハイマー病に次ぐ主要な神経変性疾患である。レビー小体病は今日でも対処療法が基本となり、根本的な治療法がないのが現状である。 α -シヌクレインのポリマーや凝集体は細胞毒性を持つことが報告されていることから、レビー小体形成はレビー小体病の発症機構に関与していることが強く示唆されている。しかしながら、 α -シヌクレインがポリマーや凝集体を形成する機構については未だ不明であり、レビー小体病の治療法開発に必須であるレビー小体形成の分子機構の解明に至っていない。外的要因が α -シヌクレインへ作用して凝集体形成を促すことが考えられるが、 α -シヌクレインは脳内において様々な細胞種に発現が認められるため、外的要因が作用する α -シヌクレイン発現細胞の同定や α -シヌクレイン発現細胞への作用機構を明らかにする必要がある。レビー小体病においては脳内で慢性炎症が起こっていることが広く知られており、炎症が主要な外的要因として α -シヌクレインの発現や凝集へ影響を及ぼすことが考えられる。

2. 研究の目的

ヒト α -シヌクレインノックインモデル動物の作成とそのモデル動物を用いたヒト α -シヌクレインの炎症応答性を系統的に解析することを目的とした。本研究では以下の利点からゼブラフィッシュをモデル動物と使用した。

- ・ 基本的な脳の構造がヒトと類似している。
- ・ 胚や幼魚の時期は体が透明なため直接脳神経が観察でき、脳神経疾患のモデル動物として有用である。
- ・ ヒトとほぼ同じ遺伝子セットを有している。また、ゲノム情報が整備されているため分子生物学的手法や CRISPR システム等が利用可能である。
- ・ ヒト神経変性疾患では自然免疫の関与が示唆されている (Wendeln A et al. Nature 2018; 556:332-8) が、ゼブラフィッシュにおいても同様の自然免疫システムが備わっており、ヒトと同様の炎症反応が期待できる。

3. 研究の方法

(1) ヒト α -シヌクレインノックインゼブラフィッシュの作製

ゼブラフィッシュにおいてもシヌクレイン遺伝子が発現しており、これをヒト α -シヌクレインで置換する方法や、細胞に特異的に発現する遺伝子のプロモーターを用いて細胞特異的にヒト α -シヌクレインをノックインさせる方法によってヒト α -シヌクレインノックインゼブラフィッシュを作製した。

(2) ヒト α -シヌクレインノックインゼブラフィッシュのトランスクリプトーム解析

ヒト α -シヌクレイン発現による発現変動を mRNA レベルで解析するため、作製したヒト α -シヌクレインノックインゼブラフィッシュから全 RNA を抽出し、RNA-seq 法によりトランスクリプトーム解析を行った。

(3) マクロファージ細胞におけるヒト α -シヌクレイン凝集形成の解析

ヒト α -シヌクレインノックインゼブラフィッシュにおける α -シヌクレインの状態を解析した。さらに、マクロファージ細胞 (A-THP-1 細胞) にヒト α -シヌクレインモノマーを加えて培養し、ヒト α -シヌクレインの形態的な変化や A-THP-1 細胞の発現変化をリアルタイム PCR 法により解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト α -シヌクレインノックインゼブラフィッシュの作製

最初に CRISPR 法によってゼブラフィッシュに発現するシヌクレイン遺伝子をヒト α -シヌクレインで置換する方法を試みた。ヒト α -シヌクレインはゼブラフィッシュのゲノム内にノックインされたことは PCR 法によって確認できたものの、生殖細胞にはノックインされなかった。次にトランスポゾンを用いてヒト α -シヌクレイン (野生型、A53T 変異型) をノックインすることを試みた。マクロファージ特異的に発現する *mpeg* 遺伝子のプロモーターによってヒト α -シヌクレイン (野生型、A53T 変異型) を発現する遺伝子組換えゼブラフィッシュが作製され、生殖細胞にもノックインされたことを確認した。野生型ヒト α -シヌクレインノックインゼブラフィッシュ (*Tg(mpeg:SNCA-KO2)*) では α -シヌクレインはマクロファージ内に局在していた (図 1A, B)。一方、A53T 変異型ヒト α -シヌクレインノックインゼブラフィッシュ (*Tg(mpeg:SNCA_A53T-KO2)*) では α -シヌクレインはマクロファージの他に神経細胞にも局在していた (図 1C-F; Cell Mol Life Sci. 2022;79(5):234)。

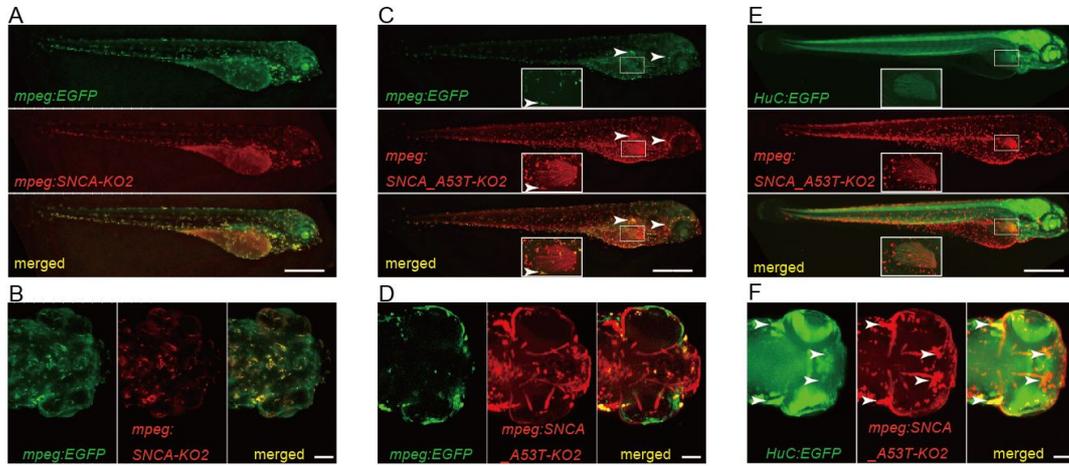


図 1. ヒト τ -シヌクレインノックインゼブラフィッシュにおける τ -シヌクレインの局在。
A-D. マクロファージは緑に染色し、ヒト τ -シヌクレインは赤に染色している。E, F. 神経細胞は緑に染色し、ヒト τ -シヌクレインは赤に染色している。

(2) ヒト τ -シヌクレインノックインゼブラフィッシュのトランスクリプトーム解析

野生型ゼブラフィッシュ (wild type), *Tg(mpeg:SNCA-KO2)*, *Tg(mpeg:SNCA_A53T-KO2)* の全身から全 RNA を抽出し、RNA-seq 法によってトランスクリプトーム解析を行った。wild type と *Tg(mpeg:SNCA-KO2)* の比較では発現差のある遺伝子は 4737 遺伝子が抽出され、*Tg(mpeg:SNCA-KO2)* と *Tg(mpeg:SNCA_A53T-KO2)* の比較では 5658 遺伝子が抽出され、*Tg(mpeg:SNCA-KO2)* と *Tg(mpeg:SNCA_A53T-KO2)* の比較では 1008 遺伝子が抽出された (図 2A)。さらに、*Tg(mpeg:SNCA-KO2)* と *Tg(mpeg:SNCA_A53T-KO2)* では翻訳後修飾関連遺伝子、キナーゼ遺伝子やユビキチン化関連遺伝子、が有意に高く発現していた (図 2B; Cell Mol Life Sci. 2022;79(5):234)。また、炎症関連遺伝子が抽出されなかったことより、*Tg(mpeg:SNCA_A53T-KO2)* で観察された τ -シヌクレインの神経細胞への伝播には炎症が関与しないことが示唆された。

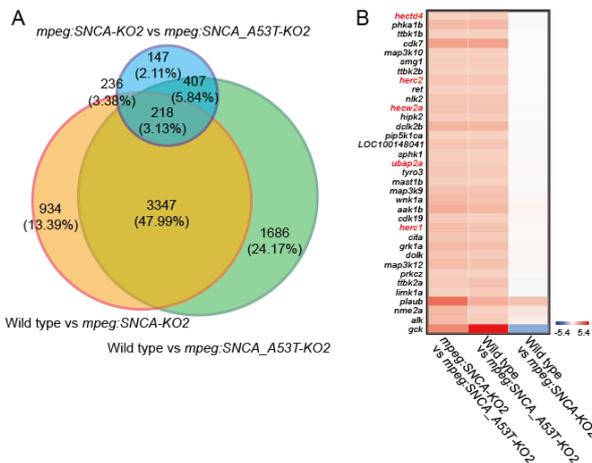


図 2. wild type, *Tg(mpeg:SNCA-KO2)*, *Tg(mpeg:SNCA_A53T-KO2)* のトランスクリプトーム解析。

A. 3 比較によって抽出された遺伝子のベン図。B. *Tg(mpeg:SNCA-KO2)* と *Tg(mpeg:SNCA_A53T-KO2)* で有意に高発現していた翻訳後修飾関連遺伝子。

(3) マクロファージ細胞におけるヒト τ -シヌクレイン凝集形成の解析

wild type, *Tg(mpeg:SNCA-KO2)*, *Tg(mpeg:SNCA_A53T-KO2)* の全身からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング法によってヒト τ -シヌクレインを検出したところ、*Tg(mpeg:SNCA_A53T-KO2)* では 315kDa 以上の τ -シヌクレインが検出されなかった (図 3A)。これにより *Tg(mpeg:SNCA_A53T-KO2)* においては τ -シヌクレインが凝集などによって不溶化していることが示唆された。一方、トランスクリプトーム解析によって翻訳後修飾関連遺伝子が抽出されたことよりリン酸化阻害剤 (H7) 存在下で A-THP-1 細胞に A53T 変異型 τ -シヌクレインモノマーを添加し培養したところ、 τ -シヌクレインの凝集/多量化は H7 処理によって減少した (図 3B, C)。また、E3 ユビキチンリガーゼ遺伝子の発現も H7 処理によって発現変動した (図 3D-G) ことから τ -シヌクレインの凝集/多量化はリン酸化やユビキチン化等が相互作用することによって調節されることが示唆された (Cell Mol Life Sci. 2022;79(5):234)。

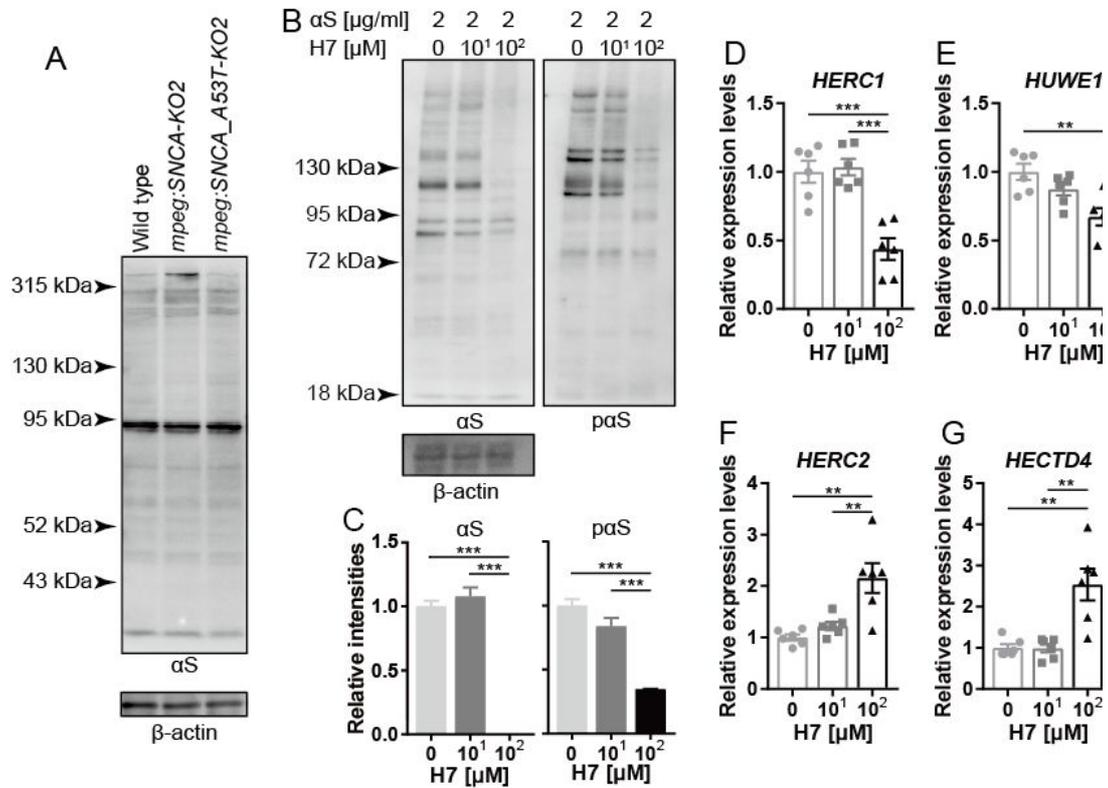


図 3. ヒト α -シヌクレインノックインゼブラフィッシュにおける α -シヌクレインの検出とマクロファージ細胞における α -シヌクレインのリン酸化阻害の影響。

A. *Tg(mpeg:SNCA-KO2)*、*Tg(mpeg:SNCA_A53T-KO2)*における α -シヌクレインの検出。B, C. A-THP-1 細胞におけるリン酸化阻害剤 (H7) による α -シヌクレインの状態の変化。D-G. リン酸化阻害剤 (H7) による E3 ユビキチンリガーゼ遺伝子の発現への影響。

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 0件）

1. 著者名 Moriya Shogo, Hanazono Michiko, Fukuhara Takeshi, Iwase Katsuro, Hattori Nobutaka, Takiguchi Masaki	4. 巻 79
2. 論文標題 A53T mutant -synuclein fibrils formed in macrophage are spread to neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-022-04263-9	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 -

〔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 守屋 彰悟
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた老化関連遺伝子bpi fclの機能解析.
3. 学会等名 第5回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会
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
---------------------------	-----------------------	----

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