

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07851

研究課題名(和文) イノシトール・ポリリン酸における神経変性疾患の病態生理機構の解明

研究課題名(英文) The pathophysiology of neurodegenerative diseases on inositol polyphosphates

研究代表者

永田 栄一郎 (Nagata, Eiichiro)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：00255457

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)：イノシトールポリリン酸、特に6リン酸(IP6)、7リン酸(IP7)およびIP6をリン酸化してIP7にする酵素(イノシトール6リン酸キナーゼ、IP6K)と筋萎縮性側索硬化症(ALS)との関連につき検討した。結果として、ALS患者では、IP7の上昇を認め、IP6Kが活性化されていることが明らかとなった。また、IP6、IP7は中枢神経系以外に消化管系統の臓器にも多く含有されていることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IP6、IP7およびIP6Kが中枢神経以外に消化管に多く分布していることが明らかとなったが、その機能、役割に関しては不明のままである。今後は脳-腸連関を含めた神経疾患での役割を解明していく必要がある。また、ALSでは、IP7ならびにIP7/IP6が有意にコントロールと比較して高値を示したことにより、IP6をIP7にリン酸化するIP6キナーゼ(IP6K)の活性化が起こっており、このことよりIP6、IP7、IP6Kは、ALS病態に深く関与しており、ALS診断バイオマーカーとなりうる可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between inositol polyphosphates, especially inositol hexakisphosphate (IP6), inositol pyrophosphate (IP7), and inositol hexakisphosphate kinase (IP6K), and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). In ALS patients, the level of IP7 was higher compared to controls. That means that IP6K is more activated in ALS. Moreover, IP6 and IP7 are also abundant in gastrointestinal organs.

研究分野：神経科学

キーワード：イノシトール6リン酸キナーゼ イノシトール・ポリリン酸 筋萎縮性側索硬化症 神経変性疾患 消化管

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン酸は植物界を含む生物界に広く存在し、細胞膜を構成する分子の一つであり、生命維持には欠かすことのできない物質である。イノシトールリン酸は、6角形のイノシトール環にリン酸基が結合することにより、イノシトール1リン酸(IP1)2リン酸(IP2)などとなり、代表的には、IP3がセカンドメッセンジャーとして細胞内カルシウム動態と深く関連し、様々な生命現象を引き起こすことが周知されている。しかし、さらにイノシトール環にリン酸基が結合する高次のイノシトール・ポリリン酸であるIP5、IP6、さらにIP6にリン酸が結合するIP7(ピロリン酸)(IP7(PP-IP5))に関しては、生体内での役割は不明である。イノシトールリン酸は、生体内ではIP6が最も多く存在しており、IP6をIP7にリン酸化する酵素であるイノシトール6リン酸キナーゼ(IP6K)は、中枢神経系に多く分布している(Curr Biol, 1999)(図1.)。研究申請者らは、IP6、IP7、IP6Kに関して以前より研究を進めており、IP6Kを過剰に発現させた神経培養細胞において細胞死が誘導されるということを明らかとした(J Biol Chem, 2005)。これはIP7が増加することにより細胞生存シグナルであるAkt活性が抑制されることによると考えられる(Cell, 2003)。IP6Kは、哺乳類にはサブタイプが3種類(IP6K1、IP6K2、IP6K3)あり、いずれも中枢神経系、特に大脳の海馬や小脳、脊髄前角細胞に多く発現している。細胞内局在としては、IP6K1とIP6K3は核内、細胞質に均一に存在し、IP6K2は主に核内に存在する。研究申請者らは既に筋萎縮性側索硬化症(ALS)において細胞内異常リン酸化TDP-43凝集体存在下で、IP6K2活性が上昇し、神経細胞死が促進されることを報告した(Mol Neurobiol, 2015)。さらに、ALSモデルマウスである変異型SOD1トランスジェニックマウス(G93A)において、ALS症状発症前に脊髄でIP6K2発現が野生型マウスと比較して明らかに上昇していることを明らかとした(Tokai J Exp Clin Med, 2017)。また、ハンチントン病患者リンパ芽球においてもIP6K2活性が上昇していることを報告した(JBC, 2011)。近年、研究申請者らは、今まで測定が困難であった生体内でのIP6、IP7の定量測定にLC/MSの技術を応用して成功した(J Chromatography A, 2018)(特願2018-129423)。これにより、直接的に生体内のIP6、IP7定量測定が可能となった。上述したように今までの研究申請者らの研究成果は、培養細胞や剖検検体を用いた神経変性疾患の解析が中心であったが、IP6、IP7定量測定技術の確立により患者検体を直接測定することを可能とした。そこで、本研究は、実際の神経変性疾患の患者でこのIP6、IP7、また、IP6Kがどのような変化、役割を示しているのかを追求していく。このことは、神経変性疾患の病態メカニズムをIP6、IP7、IP6Kという新たな分子から解析する。

2. 研究の目的

イノシトールリン酸は、生体内に広く存在し、生物活性を示す分子で、代表的には、リン酸基が3分子結合したイノシトール3リン酸(IP3)がセカンドメッセンジャーとして、様々な生命現象を引き起こすことが知られている。しかし、さらに高次のリン酸基を有するイノシトール6リン酸(IP6)や7リン酸(IP7)に関してはその役割は十分に解明されていない。研究申請者らは、このIP6、IP7、IP6をIP7にリン酸化する酵素であるイノシトール6リン酸キナーゼ(IP6K)と神経変性疾患との関連を研究してきた。特にIP6Kは中枢神経系に多く存在し、ハンチントン病や筋萎縮性側索硬化症(ALS)で活性が上昇しており、神経細胞死を促進していることを明らか

とした。しかし、生体内の IP6、IP7 を定量的に測定することは不可能であったが、近年、我々はその測定法を確立した。そこで、神経変性疾患において、IP6、IP7 を測定および機能解析することにより、新たな神経変疾患病態メカニズムの解明および疾患特異性としてのバイオマーカーの可能性につき検討する。

3. 研究の方法

(1) 哺乳類における IP6、IP7 の各臓器における分布の検討

C57BL/6J マウスの各臓器サンプルをホモジェネートした後に過塩素酸で分離して、TiO₂ ビーズを添加して、TiO₂ ビーズにイノシトールリン酸を吸着させて、10%アンモニア水でイノシトールリン酸を溶出した後のサンプルを親水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic interaction chromatography: HILIC) カラムを用いて LC/MS 分析を行う。それにより、微量な IP6、IP7 を定量測定する (J Chromatogr A, 2018)。

(2) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者における IP6、IP7、IP6K の検討

末梢血液中の IP6、IP7 の定量測定

入院中で ALS と確定診断した患者 18 名 (平均年齢 70.5 ± 9.6 歳) および年齢をマッチさせた健常者 (神経疾患以外の患者) 22 名 (平均年齢 70.4 ± 6.6 歳) の末梢血 20ml を採血し、素早く EDTA-2Na 含有のチューブに入れて攪拌する。その後、末梢血を各成分に分離する (赤血球、血小板、単球、血漿)。それぞれの成分に対して上述のように過塩素酸で分離して、TiO₂ ビーズを添加して、TiO₂ ビーズにイノシトールリン酸を吸着させて、10%アンモニア水でイノシトールリン酸を溶出した後のサンプルを HILIC カラムを用いて LC/MS 分析を行った。

ALS 患者剖検凍結脊髄の IP6、IP7 の定量測定

ALS 患者の剖検凍結脊髄 (胸椎) および年齢をマッチさせた神経疾患以外で亡くなられたコントロール凍結脊髄検体を使用して、実験を行った。サンプルをホモジェネートした後に上述したように IP6、IP7 を HILIC カラムを用いて LC/MS 分析を行った。

ALS 患者の採血、剖検脊髄の研究に関して東海大学倫理委員会の承認を得ている (承認番号: 10R-010)。また、検体に関しては、新潟大学脳研究所・病理学分野 柿田 明美教授のご紹介で、今回は日本ブレインバンクネット (JNNB) の村山 繁雄 先生 (元: 東京都健康長寿医療センター・神経内科・高齢者ブレインバンク・神経病理・部長; 現: 大阪大学大学院医学系研究科・神経内科学講座・特任教授)、齋藤 祐子 先生 (東京都健康長寿医療センター・老年病理学研究チーム (神経病理学) 研究部長) および高尾 昌樹 先生 (国立精神・神経医療研究センター・臨床検査部長) より供給して頂いた。

4. 研究成果

(1) 哺乳類における IP6、IP7 の各臓器における分布

C57BL/6J マウスを用いて各臓器における IP6、IP7 の定量測定を行った。その結果、IP6、IP7 ともに消化管 (胃、十二指腸、小腸、大腸) に、大脳、脊髄などよりも多くの IP6、IP7 が含まれることを明らかとした (図 1.)。更にその原因として、通常のマウス飼料やマウス糞便に多くの

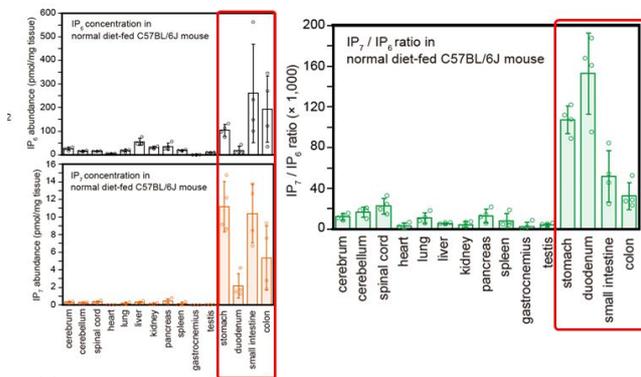


図1.

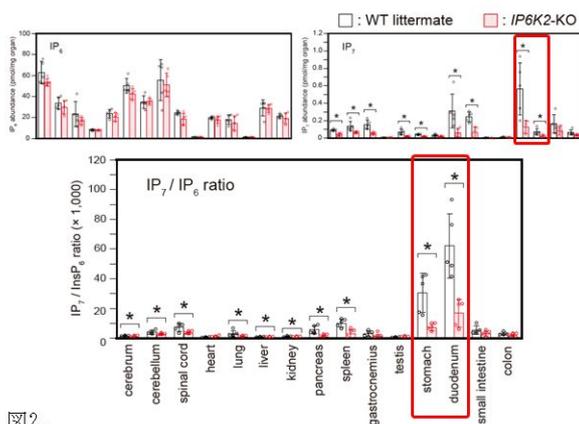


図2.

IP6 や IP7 が含有されているために、IP6、IP7 含有量の少ない飼料と断食を行ったマウスにて、同様の測定を行った。その結果、IP6、IP7 の値は減少したが、むしろ IP7/IP6 の比率が高くなり、IP7 産生が増加している結果を得た。つまり IP6 を IP7 にリン酸化する酵素であるイノシトール 6 リン酸キナーゼ (IP6K) の活性化が証明された。更に

IP6K2 活性が欠落したマウス (IP6K2 KO) を我々は所有しているために同様の実験を行ったところ、消化管において IP7 産生が野生型と比較して、有意に減少していることを明らかとした (図 2.)。さらにこの IP7 産生が消化管内のどの部位で産生されているかを確認するために IP6K2 抗体を用いて免疫組織を施行したところ、消化管のアウエルバッハ神経叢であることが明らかとなった。

(2) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者における IP6、IP7、IP6K の検討

末梢血液中の IP6、IP7 の定量測定

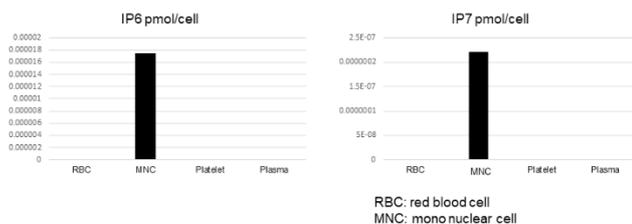


図3.

末梢血液を分析したところ、赤血球、血小板、血漿には IP6、IP7 は検出できなかったが、そのほとんど全てが単球成分で検出された (図 3.)。

その結果を受けて、末梢血の単球成分に関して、ALS 患者と対象コントロールとで IP6、IP7 を測定した。その結果、ALS で IP6、IP7、IP7/IP6 とともに高値を示し、IP6 に関しては有意差を認めた (図 4.)。

結果、ALS で IP6、IP7、IP7/IP6 とともに高値を示し、IP6 に関しては有意差を認めた (図 4.)。

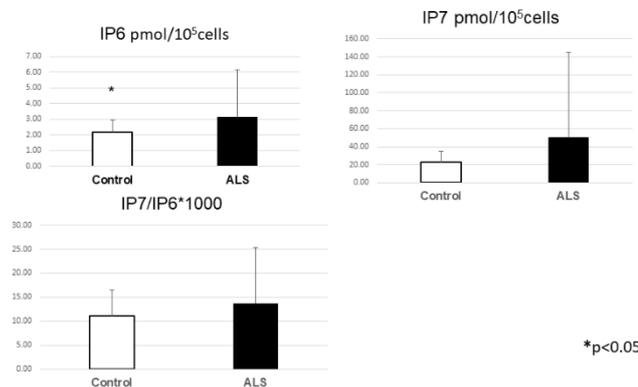


図4.

*p<0.05

ALS 患者剖検凍結脊髄の IP6、IP7 の定量測定

コントロール 5 例 (年齢 70 歳前後)、ALS 患者 9 例 (年齢 70 歳前後) の凍結脊髄サンプル (胸髄) のイノシトール 6 リン酸 (IP6)、7 リン酸 (IP7)、8 リン酸 (IP8) を測定中した。コントロールと比較して ALS 患者で、IP7、IP8 の値が有意に高値であった。また、

IP6 と IP7 の比率 (IP7/IP6 : IP6 から IP7 への生成量) でも ALS 患者で有意に高値を示した (図 5.)。

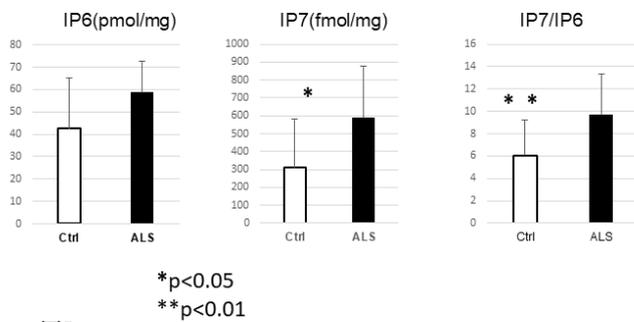


図5.

今回の結果より、IP6、IP7 および IP6K が中枢神経以外に消化管に多く分布していることが明らかとなったが、その機能、役割に関しては不明のままである。今後は脳-腸連関を含めた神経疾患での役割を解明していく必要がある。また、ALS 剖検凍結脊髄では、IP7 ならびに IP7/IP6 が有意にコントロールと比較して高値を示した。また、ALS 患

者末梢血中の IP6、IP7、さらには IP7/IP6 が高値を示すということより、IP7/IP6 の増加により、IP6 を IP7 にリン酸化する IP6 キナーゼ (IP6K) の活性化が起こっており、このことより IP6、IP7、IP6K は、ALS 病態に深く関与していることが、以前の我々の培養細胞の研究結果などからも推察され、さらに ALS 診断バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。さらに今後さらなる症例の追加を行い、より鮮明に IP6、IP7、IP6K の ALS 病態への関与を確立していく必要がある。

<引用文献>

Nagata E, Fujii N, Kohara S, Okada C, Satoh T, Takekoshi S, Takao M, Mihara B, Takizawa S. Inositol hexakisphosphate kinase 2 promotes cell death of anterior horn cells in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Biol Rep* 47; 6479-6485, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Nagata Eiichiro, Masuda Haruchika, Nakayama Taira, Netsu Shizuka, Yuzawa Hiroko, Fujii Natsuko, Kohara Saori, Sorimachi Takatoshi, Osada Takahiro, Imazeki Ryoko, Matsumae Mitsunori, Asahara Takayuki, Takizawa Shunya	4. 巻 10
2. 論文標題 Author Correction: Insufficient production of IL-10 from M2 macrophages impairs in vitro endothelial progenitor cell differentiation in patients with Moyamoya disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2396
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59305-8	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 -

1. 著者名 Nagata Eiichiro, Fujii Natsuko, Kohara Saori, Okada Chisa, Satoh Tadayuki, Takekoshi Susumu, Takao Masaki, Mihara Ban, Takizawa Shunya	4. 巻 47
2. 論文標題 Inositol hexakisphosphate kinase 2 promotes cell death of anterior horn cells in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 6479 ~ 6485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-020-05688-w	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 -

1. 著者名 Nagata E	4. 巻 60(1)
2. 論文標題 Recent advances in the elucidation of migraine pathophysiology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rinsho Shinkeigaku	6. 最初と最後の頁 20-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5692/clinicalneuro1.cn-001348	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 -

1. 著者名 Nagata E, Masuda H, Nakayama T, Netsu S, Yuzawa H, Fujii N, Kohara S, Sorimachi T, Osada T, Imazeki R, Matsumae M, Asahara T, Takizawa S.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Insufficient production of IL-10 from M2 macrophages impairs in vitro endothelial progenitor cell differentiation in patients with Moyamoya disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 16752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-53114-4	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 -

1. 著者名 Yokoyama M, Mizuma A, Terao T, Tanaka F, Nishiyama K, Hasegawa Y, Nagata E, Nogawa S, Kobayashi H, Yanagimachi N, Okazaki T, Kitagawa K, Takizawa S; CMB-NOW Study Investigators.	4. 巻 28(7)
2. 論文標題 Effectiveness of Nonvitamin K Antagonist Oral Anticoagulants and Warfarin for Preventing Further Cerebral Microbleeds in Acute Ischemic Stroke Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation and At Least One Microbleed: CMB-NOW Multisite Pilot Trial.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Stroke Cerebrovasc Dis	6. 最初と最後の頁 1918-1925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.03.050	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 -

1. 著者名 Komiya T, Nagata E, Hashida T, Sakama S, Ayabe K, Kamiguchi H, Sasaki A, Yoshioka K, Kobayashi H.	4. 巻 14(4)
2. 論文標題 Neurally mediated syncope diagnosis based on adenylyate cyclase activity in Japanese patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0214733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0214733	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 -

1. 著者名 Hasegawa M, Komiya T, Ayabe K, Sakama S, Sakai T, Lee KH, Morise M, Yagishita A, Amino M, Sasaki A, Nagata E, Kobayashi H, Yoshioka K, Ikari Y	4. 巻 16
2. 論文標題 Diagnosis and prevention of the vasodepressor type of neurally mediated syncope in Japanese patients.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0251450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0251450.	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 -

1. 著者名 Suzuki K, Takeshima T, Igarashi H, Imai N, Danno D, Yamamoto T, Nagata E, Haruyama Y, Mitsufuji T, Suzuki S, Ito Y, Shibata M, Kowa H, Kikui S, Shiina T, Okamura M, Tatsumoto M, Hirata K.	4. 巻 22
2. 論文標題 Impact of the COVID-19 pandemic on migraine in Japan: a multicentre cross-sectional study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Headache Pain	6. 最初と最後の頁 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s10194-021-01263-1.	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 -

1. 著者名 Iino K, Toriumi K, Agarie R, Miyashita M, Suzuki K, Horiuchi Y, Niizato K, Oshima K, Imai A, Nagase Y, Kushima I, Koike S, Ikegame T, Jinde S, Nagata E, Washizuka S, Miyata T, Takizawa S, Hashimoto R, Kasai K, Ozaki N, Itokawa M, Arai	4. 巻 12
2. 論文標題 AKR1A1 Variant Associated With Schizophrenia Causes Exon Skipping, Leading to Loss of Enzymatic Activity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Genet	6. 最初と最後の頁 762999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2021.762999.	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 -

1. 著者名 Mizuma A, Netsu S, Sakamoto M, Yutani S, Nagata E, Takizawa S.	4. 巻 49
2. 論文標題 Effect of early enteral nutrition on critical care outcomes in patients with acute ischemic stroke.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Int Med Res	6. 最初と最後の頁 30006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03000605211055829.	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 -

1. 著者名 Mizuma A, Enokida K, Nagata E, Takizawa S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Cerebellitis in a human T-lymphotropic virus type 1 carrier: a case report.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMJ Case Rep	6. 最初と最後の頁 e241366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bcr-2020-241366.	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 永田 栄一郎、水間 敦士、中山 平、藤井 奈津子、小原 さおり、岡田 千沙、佐藤 忠之、竹腰 進、高尾 昌樹、美原 盤、瀧澤 俊也
2. 発表標題 イノシトール6リン酸キナーゼ2は、筋萎縮性側索硬化症患者脊髄前角細胞での細胞死を促進する
3. 学会等名 第63回日本脳循環代謝学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤誠敏、藤井奈津子、堀秀帆、内藤佳津子、田中幸恵、荻原早苗、岩尾佳代子、佐々木亜由美、田中政之、瀧澤俊也、永田栄一郎
2. 発表標題 親水性相互作用クロマトグラフィー質量分析法による生体中イノシトールピロリン酸の解析
3. 学会等名 第63回日本脳循環代謝学会学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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