

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16998

研究課題名(和文) リソソーム機能から探るパーキンソン病の分子病態およびその制御に基づく新規治療戦略

研究課題名(英文) Molecular mechanisms and therapeutic strategies of Parkinson's disease through lysosomal function

研究代表者

吉田 隼 (Yoshida, Shun)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：60822905

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)：パーキンソン病においてリソソーム機能は様々な細胞内小胞輸送により制御されている。本研究ではその中でもパーキンソン病におけるリソソーム機能との関係が示されているレトロマーに着目した。まずパーキンソン病関連変異DNAJC13を過剰発現させた細胞においてレトロマーによる輸送障害を観察した。更にDNAJC13はクラスリンとを契機としてレトロマー輸送に関与するSNX1のシャペロンとして働いていることを見出した。パーキンソン病のモデルとして広く使われているロテノン暴露細胞においてDNAJC13によるSNX1のシャペロン機能が阻害されると同時にレトロマー障害が引き起こされることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病において変異型DNAJC13がレトロマー障害を引き起こすと共に、パーキンソン病モデル細胞として広く使用されるロテノン暴露細胞や、パーキンソン病における主要分子であるシヌクレイン過剰発現でもレトロマー障害が引き起こされたという事実はパーキンソン病におけるレトロマー機能の重要性を示唆する結果であり、学術的意義があると考えられる。また、これを標的とした治療開発にもつながる結果と考えられ、社会的意義もあると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In Parkinson's disease, lysosomal function is controlled by various intracellular vesicle trafficking. In this study, we focused on the retromer, which has been shown to be related to lysosomal function in Parkinson's disease. First, we observed impaired retromer transport in cells overexpressing the Parkinson's disease-associated mutant DNAJC13. Furthermore, we found that DNAJC13 acts as a chaperone for SNX1, which is involved in retromer transport, triggered by clathrin. In rotenone-exposed cells, which are widely used as a model of Parkinson's disease, we confirmed that DNAJC13 inhibits the chaperone function of SNX1 and induces retromer impairment.

研究分野：神経内科学分野

キーワード：レトロマー

### 1. 研究開始当初の背景

$\alpha$  シヌクレイン ( $\alpha$ SYN) 凝集はパーキンソン病 (PD) の神経病理学的指標であると同時に、神経変性・脱落に密接に関与することが知られている。生理的には  $\alpha$ SYN は主にシナプス前末端に存在するが、病的状況下で生じる凝集  $\alpha$ SYN は軸索を逆行輸送され、リソソームで分解される (Volpicelli-Daley LA, et al, Mol Biol Cell 2014)。リソソームはゴルジ体から出芽した小胞がタンパク分解酵素をもつエンドソームと融合することで成熟するが、神経細胞においては未成熟なリソソーム前駆体 (protolysosome) が軸索を逆行性に輸送されると共に内腔の pH が低下し、成熟したリソソームとなる。リソソームは  $\alpha$ SYN 分解に不可欠であり、その機能破綻は  $\alpha$ SYN 異常凝集・蓄積を惹起する。一方、過剰に生じた凝集  $\alpha$ SYN は軸索輸送を障害し、リソソームの成熟を遅延させ  $\alpha$ SYN 凝集体の分解を妨げる悪循環をもたらす、さらなる  $\alpha$ SYN 凝集体蓄積を来たす (Ferguson SM, Curr Opin Neurobiol 2018)。このように、軸索輸送障害とリソソーム障害は互いに影響しながら PD 病態形成に深く関与していると推察される (Volpicelli-Daley LA, Neurobiol Dis 2017)。

神経軸索内におけるリソソーム成熟は、エンドソームからトランスゴルジ網あるいは細胞表面への積荷分子輸送を担うレトロマー複合体とよばれる細胞内輸送機構に依存している。興味深いことに、PD 原因・リスク遺伝子にはリソソーム (ATP13A2、GBA)・レトロマー制御因子 (VPS35、DNAJC13) が複数含まれており、これらの分子は相互に病態形成に寄与している可能性が推察される。

以前より PD をはじめとする神経変性疾患の病態パラダイムとして、異常凝集タンパクの細胞間伝播現象が注目を集めているが、リソソーム酵素の一つである GBA の機能喪失により  $\alpha$ SYN 凝集と同時に細胞間伝播が促進されることが示されている (Bae EJ, et al, Nat Commun 2014)。また、リソソーム機能維持に重要なレトロマー複合体を安定化させる分子シャペロン (R55, R53, R33) が、アルツハイマー病におけるエンドソーム-リソソーム機能を高め、A $\beta$  毒性を低減することが報告されている。同様の治療効果は他の神経変性疾患でも複数散見されており、レトロマー/リソソームは神経変性疾患の治療標的として魅力的な存在となっている (Mecozzi VJ, Nat Chem Biol 2014 ほか)。このように、リソソームおよびその成熟を支える細胞内輸送機構は  $\alpha$ SYN 凝集・伝播といった PD 脳内病理形成に深く寄与していると推測されるが、その詳細な制御機構については未解明の部分が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、PD 病態についてリソソーム障害と  $\alpha$ SYN 凝集・蓄積と細胞間伝播の關係に着目して掘り下げ、リソソーム機能の安定化による  $\alpha$ SYN の凝集・伝播の両者をターゲットとした新たな進行抑制治療の可能性を検証することを目的とする。

近年の PD 疾患修飾薬開発は、細胞自律的な機序による異常凝集タンパクの凝集阻害や核酸医薬による発現抑制、あるいは抗体・ワクチンを用いた伝播阻害に基づくものが主流となっている。本研究は、 $\alpha$ SYN 凝集と細胞間伝播の両面に影響を与えるレトロマー/リソソーム系に着目し、同機能の安定化により脳内環境を改善し  $\alpha$ SYN 病理形成を抑えることを目的としている。

### 3. 研究の方法

本研究ではリソソーム機能の制御を担っているレトロマーに着目し、最初にレトロマー関連分子であり、その変異が PD を引き起こす DNAJC13 について実験を行った。

最初に COS7 細胞に PD 関連変異 DNAJC13 と野生型 DNAJC13 を過剰発現させ、レトロマーによりエンドソームからトランスゴルジ網 (TGN) へ輸送されることが知られているマンノース 6 リン酸受容体 (M6PR) と TGN のマーカーである TGN46 の抗体で免疫染色を行い M6PR と TGN の共局在を定量化した。M6PR の輸送障害は SYN を分解するタンパクであるカテプシン D の成熟障害を介してリソソーム機能を阻害することが知られているため、野生型及び PD 関連変異型 DNAJC13 を過剰発現させた COS7 細胞を用いてカテプシン D 活性化のアッセイを行った。

DNAJC13 は Hsc70 と結合し、レトロマー関連分子である sorting nexin 1 (SNX1) のシャペロンとして働くことが報告されている。そのため Hsc70 阻害剤である VER155008 を野生型 DNAJC13 過剰発現細胞に暴露し DNAJC13 と SNX1 との結合を co-IP にて調べた。さらに野生型と変異型 DNAJC13 との SNX1 との結合の差を調べた。

次に PD 病態における DNAJC13 の関与を調べるために PD モデルとして広く用いられているロテノンを暴露した細胞において DNAJC13 と SNX1 との結合を調べ、ロテノン暴露細胞を M6PR と TGN46 の抗体で免疫染色し、共局在を定量化した。

さらに SYN 過剰発現細胞を用いて M6PR と TGN46 の抗体で免疫染色し、共局在を定量化した。最後にレトロマー安定化化合物である R33 を細胞に暴露し、SYN のタンパク量をウェスタン・ブロット法にて定量化した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 変異型 DNAJC13 によるレトロマー輸送障害

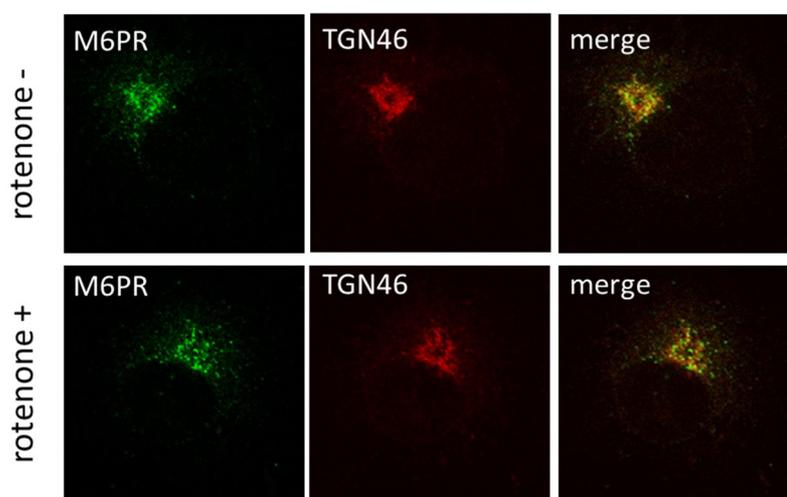
COS7 細胞に GFP、GFP タグ付きの野生型 DNAJC13 および PD 関連変異型 DNAJC13 を発現させたところ、変異型 DNAJC13 を発現させた細胞で有意に M6PR と TGN46 の共局在の割合の低下が認められた。DNAJC13 がレトロマーに関与することは報告されているが、変異型 DNAJC13 がレトロマー障害を引き起こすことは今までに報告がなく、新発見である。

(2) 変異型 DNAJC13 を過剰発現させた細胞でもカテプシン D 活性は野生型 DNAJC13 を発現させた細胞と同程度であった。変異型 DNAJC13 過剰発現細胞においては M6PR と TGN46 との共局在の低下は認めたものの、カテプシン D の活性に変化がなかった原因としては、一過性過剰発現細胞のため十分なカテプシン D 活性の低下が起こらなかった可能性や、変異型 DNAJC13 によるカテプシン D 活性低下がアッセイの感度以下である可能性などが考えられた。

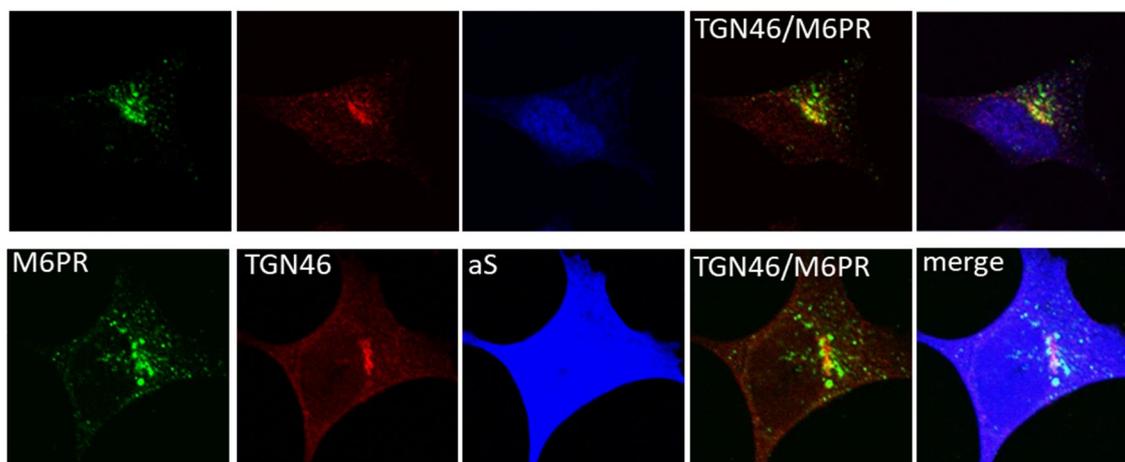
(3) VER155008 を暴露した細胞においては DNAJC13 と SNX1 の結合が強まることが確認できた。このことは DNAJC13 が SNX1 のシャペロンとして働くという既報を支持する結果である。

(4) しかしながら、野生型 DNAJC13 と変異型 DNAJC13 においては co-IP において SNX1 の結合の変化を認めなかった。既報にも同様の結果があるものの、変異型 DNAJC13 では SNX1 陽性の tubulation が多くみられることも報告されている。そのため co-IP 以外の方法も検討が必要である。

(5) ロテノン暴露細胞においては DNAJC13 と SNX1 の結合が強まった。ロテノンはミトコンドリア機能を阻害し細胞内の ATP を低下させることが知られており、DNAJC13 の SNX1 へのシャペロン機能を阻害した結果と考えられた。また、ロテノン暴露細胞においては M6PR と TGN46 の共局在の低下を認めた。このことは PD 病態におけるレトロマー機能の重要性を示している。  
(右図)



(6) SYN 過剰発現細胞においても M6PR と TGN46 の共局在の低下を認めた。また、細胞への R33 添加により凝集 SYN の低下を認めた。(下図) このことはレトロマーを標的とした新たな治療法の可能性を示す結果である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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<br>Yoshida Shun, Hasegawa Takafumi   | 4. 巻<br>155                   |
| 2. 論文標題<br>Deciphering the prion-like behavior of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Neurochemistry International  | 6. 最初と最後の頁<br>105307 ~ 105307 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.neuint.2022.105307   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Yoshida Shun, Hasegawa Takafumi   | 4. 巻<br>14      |
| 2. 論文標題<br>Beware of Misdelivery: Multifaceted Role of Retromer Transport in Neurodegenerative Diseases | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Aging Neuroscience   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fnagi.2022.897688  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔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<br>Shun Yoshida  |
| 2. 発表標題<br>Mutant DNAJC13 impairs retrograde trafficking by inhibiting clathrin assembly |
| 3. 学会等名<br>第15回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shun Yoshida, Takafumi Hasegawa, Junpei Kobayashi, Naoto Sugeno, Akio Kikuchi, Michinori Ezura, Shun Ishiyama, Masashi Aoki |
| 2. 発表標題<br>Mutant DNAJC13 impairs clathrin-mediated endocytosis.   |
| 3. 学会等名<br>第60回日本神経学会学術大会  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|