

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07361

研究課題名(和文) ミトコンドリア分子CHCHD2の疾患特異的変異体の性状解析

研究課題名(英文) Characterization of disease-specific variants of the mitochondrial protein CHCHD2

研究代表者

孟 紅蕊 (Meng, Hongrui)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：90736498

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)：晩発性パーキンソン病(PD)原因遺伝子CHCHD2の新たなミスセンスバリエーションが筋萎縮性側索硬化症(ALS)症例で見つかった。CHCHD2 ALSバリエーションは、PDバリエーション同様、CHCHD2ノックアウトハエのミトコンドリア変性を改善できず、病因性変異であることが示唆された。ALSバリエーションは細胞質へ局在する傾向があり、さらにミトコンドリアのCa²⁺緩衝能力が低下し、カルシウム毒性が起こる可能性が考えられた。一方、PDバリエーションはミトコンドリア内で凝集し、結合パートナーCHCHD10とともに不溶化することが明らかになった。これらの性質の違いが異なる神経変性疾患の発症要因とな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(PD)と筋萎縮性側索硬化症(ALS)は神経細胞内に異常タンパク質の封入体が認められる神経変性疾患である。これら2つの神経変性疾患については多くの原因遺伝子が同定されているが、同一の遺伝子がPDとALSの両方の原因となる例はCHCHD2が初めてである。一つの遺伝子が2種類の神経変性疾患の原因となる分子機序を明らかにすることにより、両疾患の共通の創薬標的を同定することに繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：New missense variants of the late-onset Parkinson's disease (PD) causative gene CHCHD2 were found in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) case. The CHCHD2 ALS variant, like the PD variant, failed to improve mitochondrial degeneration in CHCHD2 knockout flies, suggesting that it is a pathogenic mutation. One of the ALS variants tended to localize to the cytoplasm and has impaired mitochondrial Ca²⁺ buffering ability, possibly leading to calcium toxicity. In contrast, the PD variant was found to aggregate within mitochondria and become insoluble with its binding partner CHCHD10. Different properties of these variants may contribute to the pathogenesis of different neurodegenerative diseases.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 筋萎縮性側索硬化症 ショウジョウバエ ミトコンドリア -Synuclein TDP-43

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 (PD) と筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は神経細胞内に異常タンパク質の封入体が認められる神経変性疾患である。封入体の主要な構成タンパク質や変性する神経細胞は、それぞれ中脳黒質ドパミン神経 (PD)、上位・下位運動神経 (ALS) と異なっており、それが病態・臨床症状の違いを招く。一方、共に神経のミトコンドリアに変性が生じるなど、病態に共通性も認められる。申請者らは、晩発性 PD 原因遺伝子である CHCHD2 を同定し、本分子がミトコンドリア呼吸鎖の電子伝達の安定化に関与することを明らかにした。さらに我々は、PD と ALS の発症に CHCHD2 が関わることを見出していた。すなわち CHCHD2 の変異部位の違いにより PD や ALS を発症することが示唆される。一方、CHCHD2 ホモログである CHCHD10 は変異部位の違いで ALS や前頭側頭葉変性症 (FTLD) を発症する。さらに TBK1 や Optineurin など少なからず ALS 原因遺伝子が ALS と FTLD の共通の原因遺伝子となっている事実がある。

CHCHD2 変異による PD は晩発性で病変部位に顕著なレヴィ小体病理が見られる。レヴィ小体は線維化した前タンパク質 α -Synuclein から構成された神経封入体で、PD 病理の特徴の一つである。一方 ALS は、原因遺伝子群や神経封入体の構成分子 TDP-43 の発見により、その疾患概念も変化しつつある。選択的運動神経変性を示す ALS から、認知症を伴う ALS (ALS-D)、人格変化、認知機能障害、運動障害をもたらす FTLD は、連続性をもつスペクトラム病 (ALS-FTLD) であると考えられている。すなわち ALS-FTLD では、TDP-43 の封入体の蓄積という特徴的な病理や原因遺伝子群に共通性が認められる。これらの研究背景から、本課題では異なる CHCHD2 変異が異なる神経変性疾患を招く分子機序の解明を目指した。

2. 研究の目的

PD と ALS の原因となる 2 種類の変異 (T61I, P14L) が示す表現型や神経のミトコンドリア機能におよぼす影響を、動物モデル (ショウジョウバエ)、培養細胞を用いて詳細解析することを本課題の目的とした。CHCHD2 のホモログ CHCHD10 は ALS-FTLD の原因遺伝子である。CHCHD10 は CHCHD2 変異を原因とする PD の進行に影響することが報告されている。CHCHD10 は CHCHD2 とヘテロ二量体をとることから、PD と ALS 両疾患の発症に CHCHD2 と CHCHD10 とが密接に関わることが示唆される。両疾患の発症に関わる CHCHD2 変異体の機能から差異・共通点を明らかにすることは、それぞれの疾患特異的な病態機序を特定することにつながり、特異性の高い治療標的の探索・同定への発展が期待できる。

一遺伝子産物が PD と ALS の原因遺伝子となる例は、報告のある限りない。PD や ALS は、異常タンパク質の凝集体形成やミトコンドリア変調といった共通した表現型を持つが、それにより侵害される病変部位 (ドパミン神経あるいは運動神経) や封入体を形成するタンパク質の違いなど差異もある。一つの病因タンパク質による二疾患の発症機序の詳細な比較は、両疾患の発症機序の理解を推進すると期待される。

3. 研究の方法

(1) 加齢による CHCHD2 PD 変異体、ALS 変異体の局在変化

ヒト CHCHD2 の野生型・PD 変異体・ALS 変異体ハエを樹立し、CHCHD2 ノックアウトハエに導入した。ヒト野生型 CHCHD2 は、CHCHD2 ノックアウトハエの加齢依存的なミトコンドリアの変性 (クリステ構造の崩壊、ATP 産生の低下、活性酸素種の過剰産生) を抑制する。この条件下、PD 変異体、ALS 変異体による神経ミトコンドリア変性への影響を解析した。具体的には、PD で変性するドパミン神経と ALS で変性する運動神経の神経細胞体・終末のミトコンドリアの形態観察 (ミトコンドリアを可視化する mitoGFP でラベリング、CHCHD2 も抗体により二重染色)、Sytb-GCaMP6 (シナプスの Ca^{2+} のバイオセンサー) と mito-GCaMP6s (ミトコンドリア Ca^{2+} のバイオセンサー) による神経終末の Ca^{2+} イメージングを実施した。

ハエでの観察をヒトでも確認するため、CHCHD2 ノックアウトヒト培養細胞 (SH-SY5Y 細胞) にヒト CHCHD2 の野生型・PD 変異体・ALS 変異体を導入した細胞系統を作製し、局在の変化、 Ca^{2+} 動態の

変化、CHCHD10との結合性を解析した。

(2)加齢によるCHCHD2 PD変異体、ALS変異体の局在変化

これら二種の病因変異体の局在変化を、経時的に中枢ドパミン神経、胸部運動神経にて観察する。さらに、CHCHD2をmitoTimer（時間とともに緑色蛍光から赤色蛍光に変化する）と融合しパルスラベルする。PD、ALS変異体において、新規合成されたCHCHD2のミトコンドリアへの輸送能力が低下するのか、ミトコンドリア外への放出が促進されるのかどうかを明らかにする。

(3)CHCHD2 PD変異体、ALS変異体の疾患関連タンパク質の代謝への影響

ALS病理で見られるRNA結合タンパク質TPD-43の封入体は、CHCHD2 ALS患者病理においても観察された。ハエは内在性のTDP-43を有し過剰発現により強い神経毒性をもつ。CHCHD2のPD変異体、ALS変異体とTDP-43との遺伝的相互作用、免疫染色による内在性TDP-43の凝集性の有無を、ドパミン神経・運動神経細胞体で観察する。

4. 研究成果

CHCHD2 P14L は、T61I 同様、CHCHD2 ノックアウトハエのミトコンドリア変性（形態、ATP 産生）を改善できず、病因性変異であることが示唆された（図1）。CHCHD2 P14L を発現したハエのドパミン神経終末を電気刺激し、細胞質とミトコンドリアのCa²⁺動態の変化を観察した。その結果、CHCHD2 P14L 発現ハエでは、細胞質へのCa²⁺の流入が急峻になり、ミトコンドリア内へのCa²⁺の取り込みが低下することを観察した。これら観察から、P14L 変異ではミトコンドリアのCa²⁺緩衝能力が低下し、カルシウム毒性が起こる可能性が考えられた。ヒト培養細胞においても、ミトコンドリア呼吸が優位となるガラクトース存在下、P14L 発現細胞は細胞質へのCa²⁺流入が急峻になることを観察した。さらに、CHCHD2 P14L は、野生型、T61I と比較し、CHCHD10 との結合性が低下していた。

ドパミン神経と運動神経の神経細胞体のミトコンドリアは、T61I, P14L 共に断片化していた。重要なことに、CHCHD2 のミトコンドリアから細胞質への異所性の局在は、P14L の方が早期に起こることが観察された（図2）。この異所性の局在変化が、翻訳時に起こるのか、一旦ミトコンドリア内に局在したCHCHD2 が漏洩してくるものかを明らかにするため、CHCHD2 とmitoTimer を融合したハエを作製し、新規に合成されたCHCHD2 の経過を観察した。しかし予想外なことに、CHCHD2-mitoTimer は核へ局在し、目的の実験が達成できなかった。代替の実験として、CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞から単離したミトコンドリアと試験管で翻訳したCHCHD2 を混ぜ、ミトコンドリア内部への輸送過程を経時的に追跡した。その結果、P14L は、野生型、T61I 同様、正常にミトコンドリアへ輸送されることを観察した（図3）。従って、P14L の細胞質への異所性の局在は、すでにあったCHCHD2 がミトコンドリア外へと漏洩して起こるものと考えられた。

CHCHD2 ノックアウトハエとハエ TDP-43(TDPH)との遺伝学的相互作用解析を網膜神経で実施したところ、CHCHD2 非存在下 TDPH の過剰発現で致死になった。P14L との組み合わせにおいても同様に致死となった。運動神経特異的な TDPH もしくはヒト TDP-43 の発現自体で運動機能の低下、寿命の短縮が見られたが、CHCHD2 の非存在下、さらに運動機能の障害、寿命の短縮が増悪した（図4）。TDPH は運動神経の核に局在したが、ノックアウトハエ運動神経では、細胞質へと局在していた（図5）。細胞質へ局在した TDPH の一部は凝集化しミトコンドリア近傍もしくは内部に局在した。

以上の結果から、細胞質への異所性の局在、CHCHD10 との結合性の低下を示す P14L は、CHCHD2 ノックアウトと類似した機能喪失変異体の性質を持つことが示唆された。一方、T61I は、ミトコンドリア内で CHCHD10 とともに凝集化する機能獲得変異体であることが示唆される（Ikeda, Hum Mol Genet 2019 にて発表）。これらの変異体の性質の違いが、PD、ALS の 2 つの異なる神経変性疾患の発症に繋がると考えられた。

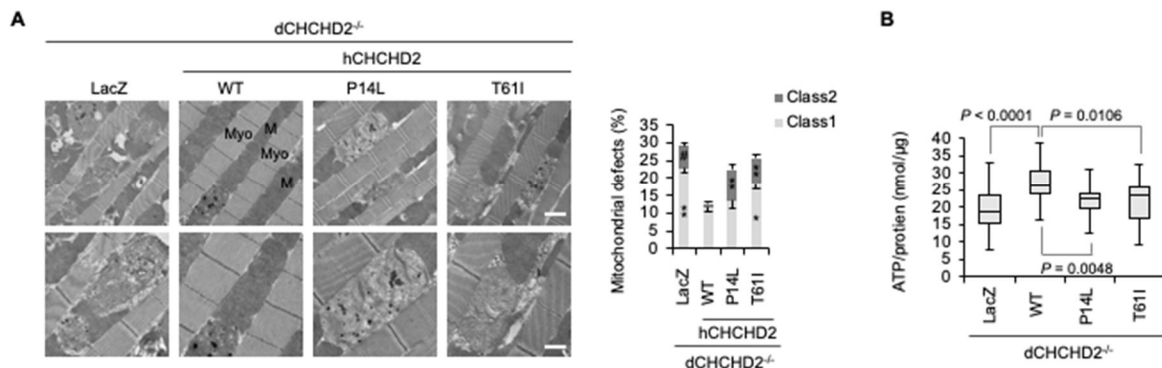


図 1. P14L 変異は病変変異である

CHCHD2 ノックアウトハエ ($dCHCHD2^{-/-}$) に、LacZ、ヒト CHCHD2 (hCHCHD2) の野生型 (WT), P14L, T611 変異を発現させ、胸部筋肉組織のミトコンドリアの形態 (A) と ATP 含量 (B) を測定した。LacZ は陰性コントロール。M, ミトコンドリア; Myo, 筋原線維。スケールバー, 1 μ m (上) and 500 nm (下)。ミトコンドリア変性のグラフで示す Class 1 はミトコンドリアクリステの開大、Class 2 は、クリステの断片化や電子密度の喪失。

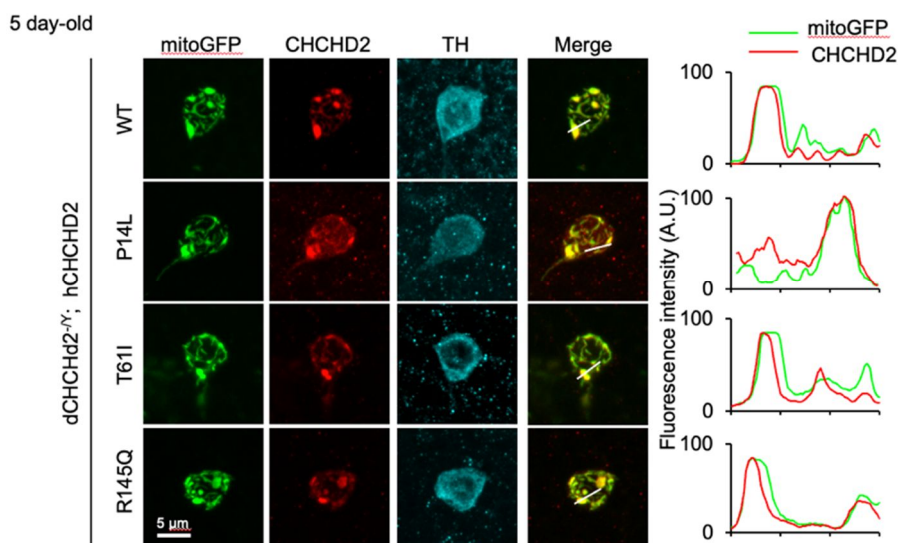


図 2. P14L 変異は病変変異である

CHCHD2 ノックアウトハエ ($dCHCHD2^{-/-}$) に、LacZ、ヒト CHCHD2 (hCHCHD2) の野生型 (WT), P14L, T611 変異を発現させた 5 日齢ハエの中枢ドパミン神経細胞体。mitoGFP でミトコンドリア、CHCHD2 を免疫染色にて可視化した。TH はドパミン神経のマーカー。右のグラフは、重ね合わせ像 (Merge) で線を引いた部分の mitoGFP と CHCHD2 シグナルの分布を示す。

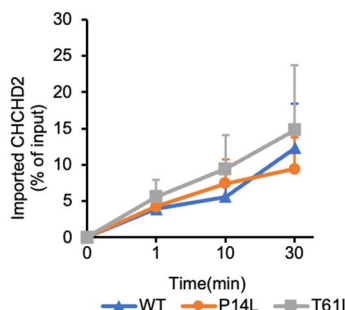


図 3. 新規に合成された CHCHD2 のミトコンドリア輸送効率

試験管で新規に合成した CHCHD2 の単離ミトコンドリア内への輸送効率をグラフに示した時間にて解析した。3 種類ともに同等の輸送効率であった。

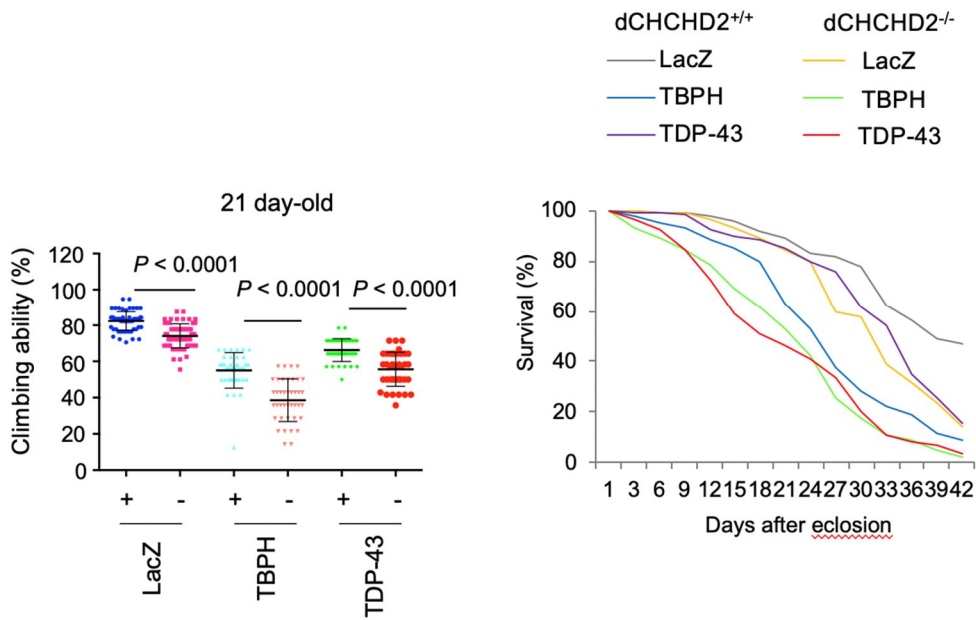


図4. TDP-43 と CHCHD2 の遺伝学的相互作用

(左) ハエ CHCHD2 の存在下(+)、非存在下(-)、ヒト TDP-43、ハエ TDP-43 (TDPH)、コントロール遺伝子 (LacZ) を発現させ、運動能力(登攀能力)を解析した。21 日齢のハエの結果を示す。

(右) CHCHD2 の存在下(+)、非存在下(-)、ヒト TDP-43、ハエ TDP-43 (TDPH)、コントロール遺伝子 (LacZ) を発現させたハエの生存曲線。TDP-43 は、CHCHD2 ノックアウトハエの表現型を増悪した。

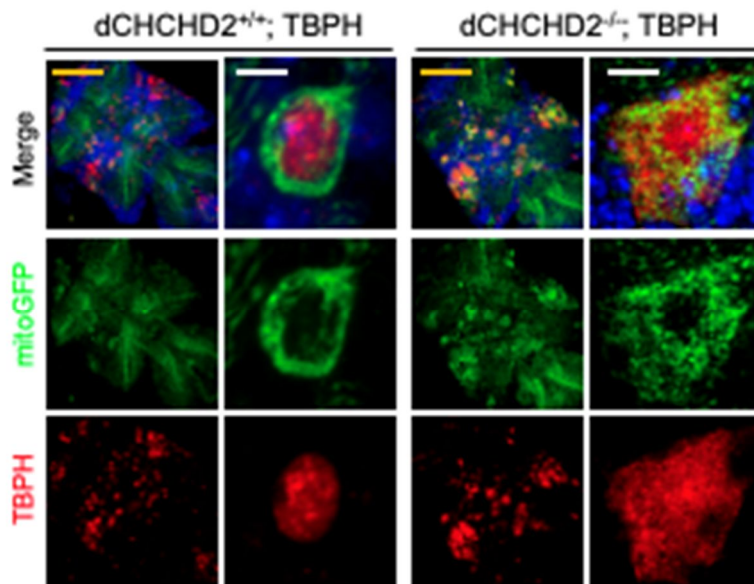


図5. CHCHD2 ノックアウトハエにおける TBPH の局在変化

CHCHD2 ノックアウトハエ(dCHCHD2^{-/-})の胸部運動神経に TBPH を発現させ、ミトコンドリア (mitoGFP) と TBPH を可視化した。それぞれの左カラムは胸部神経節の全体像。右カラムは、運動神経細胞体の拡大図。CHCHD2 非存在下、ミトコンドリアは断片化し、TBPH は細胞質へと局在変化した。スケールバー、100 μm (左カラム)、10 μm (右カラム)。

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 Aya Ikeda, Hongrui Meng, Kenya Nishioka, Masashi Takanashi, Yuanzhe Li, Hiroyo Yoshino, Tsuyoshi Inoshita, Kahori Shiba-Fukushima, Akio Mori, Risa Nonaka, Nana Izawa, Keiichi Ishikawa, Hidemoto Saiki, Masayo Morita, Manabu Funayama, Masato Hasegawa, Hideyuki Okano, Wado Akamatsu, Yuzuru Imai, Nobutaka Hattori |
| 2. 発表標題 Analyses of CHCHD2 pathophysiology by human brain, iPSC and Drosophila model |
| 3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 順天堂大学大学院 パーキンソン病病態解明研究講座 https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/parkinsons_disease/ |
|---|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|