

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07764

研究課題名(和文) 腸管神経新生におけるLRRK2の役割と変異によるパーキンソン病病態形成機序の解明

研究課題名(英文) The role of LRRK2 in enteric neurogenesis and the pathogenesis of Parkinson's disease

研究代表者

前川 達則 (Tatsunori, Maekawa)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：30647673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)は中脳黒質ドーパミン神経細胞の脱落を特徴とする神経変性疾患であり、その発症メカニズムは未だ明らかになっていない。本研究ではPD原因分子であるLRRK2の腸管神経系における役割とその異常による病態形成機序を解明することを目的とした。本研究により、LRRK2は腸管グリア細胞に優位に発現していること、LRRK2欠損(KO)マウスのENSでは神経とグリアの特徴を有する細胞が増加していること、LRRK2はCREBのリン酸化を介して腸管神経新生を制御していることが明らかになった。また、KOマウスのENSではsynucleinが増加しており、PD発症の一因となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、LRRK2による腸管神経障害のメカニズムが明らかになれば、LRRK2を標的とした治療薬開発に重要な知見を与えることができる。また、腸が生検可能な臓器であること、運動症状よりも腸症状が先行することから、発症前診断への発展も期待できる。早期診断と早期治療介入により発症時期を遅らせることができれば、介護・医療負担を軽減できるだけでなく、健康寿命の延伸も期待することができる。加速化する高齢化社会の中で本研究の持つ意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease caused by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. The aim of this study is to elucidate the role of LRRK2 in the enteric nervous system (ENS) and the pathogenesis in the ENS of PD. We revealed that LRRK2 is predominantly expressed in enteric glial cells rather than neurons. Furthermore, the number of bi-phenotypic cells which has both phenotypes of neuron and the glial cells was increased in LRRK2-knockout mice. We also revealed that LRRK2 regulates enteric neurogenesis through the phosphorylation of CREB. In the ENS of KO mice, the protein level of alpha-synuclein was elevated which might become a trigger of the onset of PD.

研究分野：腸管神経

キーワード：パーキンソン病 腸管神経系

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) は振戦をはじめとする運動症状と便秘などの非運動症状を呈する老人性神経変性疾患であり、高齢化に伴い患者数が増加している。中脳黒質におけるドーパミン神経細胞の脱落が原因であるが、その発症メカニズムは未だ解明されておらず、治療は対症療法に限られている。研究開始当時、PD 患者において腸管運動障害が脳神経変性よりも先行すること、代表的な病理所見である alpha-シヌクレインの凝集や異常ミトコンドリアの出現が腸管神経を起点として始まるのが海外研究チームから発表され、腸管神経へ注目が集まり始めていた [Klingelhoefer et al., *Nat Rev Neurol.* 2015; Baumuratov et al., *Sci Rep.* 2016]。孤発性 PD 患者や薬剤モデルマウスを対象とした腸管神経研究が進む一方で、この腸管神経障害メカニズムの解明に PD 原因分子の観点から取り組む研究チームは少なかった。

そのような背景の中、我々は家族性 PD 原因分子である LRRK2 が腸管神経系 (ENS) に発現していることを発見した [Maekawa et al., *Front Neurosci.* 2019]。多くの研究が脳神経系における LRRK2 の解析に重点を置く中、ENS における LRRK2 の機能とその変異によって引き起こされる病態の詳細は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は遺伝子改変マウスを用いた解析により、(1) ENS における LRRK2 発現細胞の同定、(2) ENS における LRRK2 の役割、(3) LRRK2 の欠損による腸管神経病態の形成機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

LRRK2 発現神経細胞の同定：ENS における LRRK2 発現細胞を同定するため、LRRK2 プロモーター制御下に蛍光タンパク質 EGFP (改良型緑色蛍光タンパク質) を発現するマウスを作製した。発現した EGFP は実体顕微鏡下で作製した腸管神経層ホールマウント試料を用いた蛍光免疫染色法で確認した。

ENS 初代培養細胞を用いた腸管神経新生の解析：腸管神経新生における LRRK2 の役割を明らかにするため、ENS 初代培養細胞を用いた解析を行った。腸管神経新生の重要シグナルであるセロトニン受容体 (5-HT₄R) の下流には LRRK2 のキナーゼ基質として知られるタンパク分子が複数存在している。LRRK2 欠損 (KO) マウスと野生型マウスから作製した初代培養細胞に、5-HT₄ 受容体の作動薬 (GR-125487) や予想関連分子の作動薬・拮抗薬 (SCH772984, A-674563) を添加し、神経細胞の数や形態、シグナル分子のリン酸化を免疫染色法やウエスタンブロット法で解析した。

マウスを用いた腸管神経新生の解析：上述の初代培養細胞実験の結果が、マウスの個体レベルで再現されるか否かを確認するため、LRRK2 KO マウスに各作動薬・拮抗薬を投与した際の腸管神経新生を評価した。

腸管神経病態形成機序の解析：重要な PD 病変の一つである alpha-シヌクレインの蓄積やリン酸化 alpha-シヌクレインの増加、神経細胞の形態について LRRK2 KO マウスの腸管神経を解析した。

4. 研究成果

(1) ENS における LRRK2 発現細胞の同定：LRRK2 発現細胞に蛍光タンパク質 EGFP が発現する LRRK2 レポーターマウスを樹立した。これにより抗原抗体反応では検出困難であった ENS

における LRRK2 発現細胞を解析することが可能になった (図 1)。各神経細胞マーカー、グリア細胞マーカー抗体との共染色により、LRRK2 は腸管神経細胞のみならずグリア細胞にも発現していることが明らかになった。また、発現細胞における神経細胞マーカーとグリア細胞マーカーの割合を解析した結果、LRRK2 発現細胞のおよそ 26% が神経細胞、75% がグリア細胞であることが明らかになった。このことから LRRK2 は ENS においては神経細胞よりもむしろグリア細胞で優位に発現していることが明らかになった。

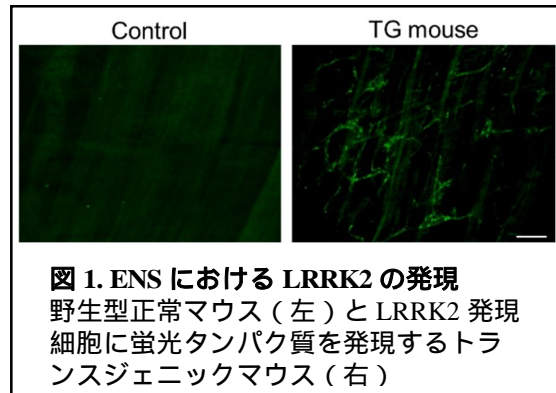


図 1. ENS における LRRK2 の発現
野生型正常マウス (左) と LRRK2 発現細胞に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウス (右)

(2) ENS における LRRK2 の役割： 腸管神経新生における LRRK2 の役割を明らかにするため、ENS 初代培養細胞を用いた解析を行った。予想関連分子の作動薬・拮抗薬を用いた実験の結果、セロトニン受容体の一つである 5-HT4 受容体への関与が疑われた。そこで 5-HT4 受容体アゴニストである RS67506 をマウスに 4 週間投与した結果、神経細胞とグリア細胞の両方の特徴を有した bi-phenotypic cell が正常マウス ENS において増加し、同時にグリア細胞内のリン酸化 CREB が増加していた (図 2)。また、LRRK2 レポーターマウスにおいて、RS67506 投与後に EGFP が bi-phenotypic cell にも確認されたことから、グリア細胞から bi-phenotypic cell へと細胞が transform する過程に LRRK2 が関与していることが明らかになった。

LRRK2 欠損 (KO) マウスの ENS では上述の bi-phenotypic cell が増加していた。ENS では 5-HT4 受容体への刺激条件下において、グリア細胞が神経細胞へ脱分化を経て分化する現象が知られており、本研究結果から腸管グリア細胞の 5-HT4 受容体下流のシグナル伝達を LRRK2 が負に制御している可能性が示唆された。また、KO マウスでは 5-HT4 受容体下流のシグナル分子である CREB のリン酸化が上昇していたことから、LRRK2 は CREB のリン酸化を介して腸管神経新生をコントロールしていることが考えられた (図 2)。

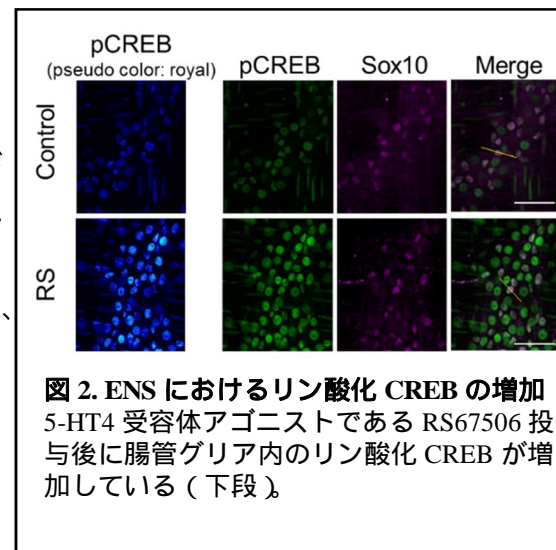


図 2. ENS におけるリン酸化 CREB の増加
5-HT4 受容体アゴニストである RS67506 投与後に腸管グリア内のリン酸化 CREB が増加している (下段)

(3) LRRK2 の欠損による腸管神経病態の形成機序： 他の PD 発症因子の一つである alpha-シヌクレインが KO マウスの ENS で優位に増加していた。この alpha-シヌクレインの免疫染色における蛍光シグナルは、ENS のシナプス様構造内、腸管神経細胞体内部などに確認された。これらの結果から、LRRK2 が ENS 内の alpha-シヌクレイン発現・分布を制御している可能性が示唆された。消化管神経における alpha-シヌクレインの凝集が、迷走神経を介して中枢神経に伝播し PD 発症の一因となる可能性が報告されていることから、LRRK2 の異常による alpha-シヌクレインの発現・分布変化は PD 発症の引き金になる可能性が考えられる [Challis et al., *Nat Neurosci.* 2020]。上述の腸管神経新生との因果関係は不明ではあるものの、PD 発症要因と ENS における alpha-シヌクレインの発現・分布解析には今後の研究価値を見いだすことができた。

<引用文献>

- Klingelhoefer L, Reichmann H. Pathogenesis of Parkinson disease--the gut-brain axis and environmental factors. *Nat Rev Neurol*. 2015 Nov;11(11):625-36. doi: 10.1038/nrneurol.2015.197.
- Baumuratov AS, Antony PM, Ostaszewski M, He F, Salamanca L, Antunes L, Weber J, Longhino L, Derkinderen P, Koopman WJ, Diederich NJ. Enteric neurons from Parkinson's disease patients display ex vivo aberrations in mitochondrial structure. *Sci Rep*. 2016 Sep 14;6:33117. doi: 10.1038/srep33117.
- Maekawa T, Tsushima H, Kawakami F, Kawashima R, Kodo M, Imai M, Ichikawa T. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Is Associated With Activation of the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus and Stress-Related Gastrointestinal Dysmotility. *Front Neurosci*. 2019 Aug 29;13:905. doi: 10.3389/fnins.2019.00905.
- Challis C, Hori A, Sampson TR, Yoo BB, Challis RC, Hamilton AM, Mazmanian SK, Volpicelli-Daley LA, Gradinaru V. Gut-seeded α -synuclein fibrils promote gut dysfunction and brain pathology specifically in aged mice. *Nat Neurosci*. 2020 Mar;23(3):327-336. doi: 10.1038/s41593-020-0589-7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前川達則
2. 発表標題 Leucine-Rich Repeat Kinase 2変異マウスにおける大腸運動異常と腸管神経病理像
3. 学会等名 第21回日本神経消化器病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前川達則
2. 発表標題 グリア細胞からの腸管神経新生におけるLRRK2の役割の解明
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前川達則
2. 発表標題 グリア細胞からの腸管神経新生におけるLRRK2の役割の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------