

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11584

研究課題名(和文) 神経変性疾患における銅の脳内恒常性破綻に起因する神経細胞機能低下の分子機構の解明

研究課題名(英文) Dysfunction of neuronal cell caused by disruption of intracellular copper homeostasis

研究代表者

原 宏和 (Hara, Hirokazu)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30305495

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)はドパミン神経細胞の脱落により生じる神経変性疾患である。PD病薬のドパミン神経細胞傷害には、酸化ストレスに加え、鉄や銅(Cu)などの微量金属の恒常性破綻が関与しているとの報告があるが、不明な点も多い。本研究では、PDモデル作製に用いられる神経毒6-ヒドロキシドパミン(6-OHDA)が、Cu排出トランスポーター(ATP7A)およびCuシャペロン(Atox1)タンパク質の分解を促進し、細胞内のCu蓄積を増大させることを見出した。また、その機序として、6-OHDAに起因する酸化ストレスがリソソームにおけるATP7AおよびAtox1タンパク質の分解を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDとFeの関連性については解析が進んでいるが、PD発症にCuがどのように関与しているかは不明な点が多かった。本研究の実施により、6-OHDAにより神経細胞内のCu恒常性の破綻が生じることが初めて示された。金属イオンの細胞内外の恒常性の破綻は、アルツハイマー病などPD以外の他の神経変性疾患の発症とも密接に関連していることが報告されている。それゆえ、今回の研究で得られた6-OHDAにより誘発される酸化ストレスがCu恒常性破綻を引き起こすという結果は、PD以外の神経変性疾患の病態解明のみならず、有効な治療薬が少ない神経変性疾患の新規治療薬の開発にもつながる有益な知見となると考える。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons. Abnormalities in transition metals, such as iron and copper (Cu), are closely related to the etiology of neurodegenerative disorders. In this study, we examined the effects of 6-hydroxydopamine (6-OHDA), a neurotoxin, on cellular Cu trafficking in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. 6-OHDA decreased the protein levels of the Cu exporter ATP7A and the Cu chaperone Atox1, resulting in the accumulation of intracellular Cu and the decreased levels of the cuproenzyme dopamine α -hydroxylase protein. The decreases in ATP7A and Atox1 proteins were restored by the antioxidant and the lysosomal inhibitor. These results indicate that 6-OHDA-induced oxidative stress promotes degradation of ATP7A and Atox1 proteins. These findings suggest that 6-OHDA disrupts Cu homeostasis through the dysregulation of cellular Cu trafficking, leading to the dysfunction of neuronal cells.

研究分野：病態生化学

キーワード：パーキンソン病 銅 酸化ストレス 銅トランスポーター タンパク質分解

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) は中脳黒質のドパミン神経細胞の脱落により生じる神経変性疾患である。PD 病巣で認められるドパミン神経細胞傷害には酸化ストレスの関与が指摘されているが、未だ十分な解明はなされていない。一方、鉄 (Fe) や銅 (Cu) などの脳内微量元素の恒常性破綻が PD における神経細胞傷害を増悪させるとの報告もある。PD と Fe との関連性については解析が進んでいるが、Cu に関する知見は極めて少ないのが現状である。

ヒトにおいて Cu は必須微量元素のなかで 3 番目に多い金属元素であり、種々の酵素活性発現に重要な役割を担う。実際、Cu は抗酸化酵素や神経伝達物質の合成酵素の活性に必須であるため、Cu 欠乏はこれら酵素の機能不全を引き起こす。一方、過剰な Cu は細胞傷害を惹起することから、その細胞内動態は Cu 流入トランスポーター (CTR1)、Cu 排出トランスポーター (ATP7A) および Cu シャペロン (Atox1) などの Cu 輸送タンパク質により厳密に制御されている。PD 病態と Cu との関連性については、1) Cu が α -synuclein (α -syn; PD 脳内で認められる Lewy 小体の主要な構成成分) の凝集を促進すること、2) 先天的な Cu 過剰症では PD 様の錐体外路症状が認められることなどが知られており、細胞内 Cu 動態異常は PD 病態に影響を及ぼすと考えられる。しかし、PD の発症や病態進展に Cu がどのように関与しているかについては未解明な点が多い。

2. 研究の目的

我々は、PD モデル作製に使用される神経毒 6-hydroxydopamine (6-OHDA) により上述の Cu 輸送タンパク質の発現が神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において低下することを見出したが、その機序は現在十分に解明できていない。6-OHDA は酸化ストレスを引き起こし、神経細胞死を誘発することはよく知られているが、6-OHDA が細胞内 Cu 動態にどのような影響を及ぼすかについてはほとんど報告がない。本研究の目的は、6-OHDA による ATP7A および Atox1 タンパクの発現低下の分解機構や Cu 動態変化による細胞機能の変化について解析を行い、PD の発症・病態進展における Cu の関与を解明することである。

3. 研究の方法

細胞傷害性：ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞の培養は、10% FCS を含む DMEM 培地を用いて行った。SH-SY5Y 細胞を 96 well plate に 2.0×10^4 個/well になるように播種した。細胞傷害は MTT 方を用いて評価した。

ウエスタンブロッティング：SH-SY5Y 細胞を処理した後、PBS で洗浄し、lysis buffer により細胞を可溶化した。SDS-PAGE で分離した後、PVDF 膜に転写した。ブロッキング後、各種抗体で一晩反応させた。その後、HRP 標識 2 次抗体と反応させ、化学発光でタンパク質を検出した。

活性酸素種 (ROS) イメージング：SH-SY5Y 細胞を 8.0×10^5 cells/dish で 3.5 cm dish に播種した。細胞を FluoroBrite DMEM で 1 回洗浄した後、dihydroethidium (DHE, 10 μ M) を含む FluoroBrite DMEM を 1.5 mL 添加し、30 分間染色した。DHE の酸化体 2-hydroxyethidium の蛍光は、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (ZEISS、LSM700) を用いて検出した。

原子吸光分析法：SH-SY5Y 細胞を 2.0×10^6 cells/dish で 6.0 cm dish に播種した。刺激後、細胞を 6% マンニトール溶液で洗浄した後、6% マンニトール溶液 1 mL を添加し、細胞を回収した。細胞を濃硝酸処理した後、蒸留水で希釈し、ファーンズ型の原子吸光分光光度計 (株式会社島津製作所) を用いて Cu 含有量を測定した。

チオール基の酸化修飾：SH-SY5Y 細胞を 2.0×10^6 cells/dish で 6 cm dish に播種した。細胞を回収しホモジナイズした後、トリクロロ酢酸を加えタンパク質を沈殿させた。得られた沈殿を溶解させた後、polyethyleneglycol (PEG)-マレイミド試薬 (PEG-PCMal, Dojindo) を加え、プロトコールに従い反応させた。その後、反応液を 2-ME を含む 1 \times laemmli sample buffer で処理した後、SDS-PAGE にて分離後、ゲルに UV を 10 分間照射した。その後、ウエスタンブロッティング法によりタンパク質を検出した。

変異 Atox1 発現プラスミドの構築：野生型 (WT) -hAtox1 pcDNA3.1 プラスミドを鋳型として変異 (Cys を Ser に置換) を導入した。変異を導入したプラスミドは、変異 (Mut) -hAtox1 pcDNA3.1 と名付けた。

SH-SY5Y 細胞への遺伝子導入：SH-SY5Y 細胞を 5.0×10^5 cells/dish で 3.5 cm dish に播種した。翌日、新鮮な Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific 社) に交換した後、Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて WT-hAtox1 pcDNA3.1 または Mut-hAtox1 pcDNA3.1 をトランスフェクションした。24 時間培養後、新鮮な 10% FCS DMEM に交換し、さらに 24 時間培養し実験

に使用した。

4. 研究成果

1) 6-OHDA による Cu 輸送タンパク質の分解促進と細胞内 Cu 動態の破綻

SH-SY5Y 細胞において、6-OHDA は濃度依存的に ATP7A および Atox1 タンパク量を減少させたが、ATP7A および Atox1 mRNA 発現は 6-OHDA の影響を受けなかった。6-OHDA は 30 μ M 以上の濃度で細胞傷害を引き起こしたが、ATP7A および Atox1 タンパク量の減少は細胞傷害が生じない濃度でも認められた。一方、CTR1 タンパク量は 6-OHDA 処理によりほとんど影響を受けなかった。Cu 排出トランスポーター ATP7A および Cu シャペロン Atox1 タンパクが減少したことから、6-OHDA は Cu 排出経路を抑制すると考えられた。そこで、Cu による細胞傷害に対する 6-OHDA の影響を検討したところ、6-OHDA を前処理した細胞では、CuCl₂ 曝露による細胞内 Cu 蓄積および細胞傷害が増大した。また、6-OHDA 処理により ATP7A により Cu を受け取る Cu 含有酵素 dopamine β -hydroxylase (DBH) の細胞内タンパク量および細胞外分泌量も減少した。

次に、6-OHDA が ATP7A や Atox1 タンパク量を減少させる機序の解析に取り組んだ。これらの mRNA 発現は 6-OHDA により影響を受けないことから、タンパク質分解系が関与していると考えられた。そこで、リソソーム阻害剤 bafilomycin A1 (Baf A) とプロテアソーム阻害剤 MG132 の影響について検討した。その結果、Baf A は 6-OHDA による ATP7A および Atox1 タンパク量の減少を有意に抑制したが、MG132 にはそのような効果は認められなかった。

以上の結果から、6-OHDA による神経細胞の機能低下には、ATP7A および Atox1 タンパク質のリソソームによる分解の促進、それに続く細胞内 Cu 恒常性の破綻が関与していると考えられた。

2) 6-OHAD による Cu 輸送タンパク質の分解促進における酸化ストレスの関与

6-OHDA による細胞死では、酸化ストレスの関与が示されている。そこで、6-OHDA による ATP7A および Atox1 タンパク分解促進における酸化ストレスの関与を検証した。初めに、6-OHDA の ATP7A および Atox1 タンパク分解促進に対する抗酸化剤 N-acetylcysteine (NAC) の影響を検討した。その結果、NAC は ATP7A および Atox1 タンパク量の減少を有意に抑制した。実際、6-OHDA 処理した細胞では ROS の産生が亢進した。6-OHDA による ROS 産生は、ヒドロキシ基が結合したベンゼン環に起因すると考えられる。そこで、ベンゼン環に 2 個のヒドロキシ基が結合したカテコール誘導体が ATP7A および Atox1 タンパク質発現に及ぼす影響を検討した。カテコール誘導体によっても ATP7A および Atox1 タンパク量は低下し、この発現量の低下は NAC 存在下で抑制された。これらの結果から、6-OHDA の構造に起因する酸化ストレスにより、これらの Cu 輸送タンパク質の分解が促進することが明らかとなった。

Atox1 による Cu 輸送には glutathione (GSH) が重要な役割を担っていることが報告されている。そこで、GSH 枯渇剤 buthionine sulfoximine (BSO) が Cu 動態に及ぼす影響を検討した。BSO により CuCl₂ 曝露による細胞内 Cu 蓄積は増大したが、BSO は ATP7A および Atox1 タンパク質発現には影響を及ぼさなかった。6-OHDA は細胞内 GSH を減少させたことから、6-OHDA による GSH の動態変化も部分的に細胞内 Cu 動態に影響を及ぼしていると考えられた。

3) 6-OHAD による Atox1 の酸化修飾の亢進と分解促進との関連性

Cu 輸送タンパク質である Atox1 および ATP7A には Cu 結合モチーフ (Cys-X-X-Cys) が存在している。一方で、Cys は酸化修飾を受けやすいことが知られている。そこで、6-OHDA が Atox1 に存在する Cys-X-X-Cys の Cys 残基の酸化を引き起こすかどうかを酸化修飾試薬 PEG-PCMal を用いて検討した。6-OHDA を曝露した細胞では、Atox1 の酸化修飾が亢進した。そこで、この Cys による酸化修飾が Atox1 分解に促進に寄与しているかどうかを、Cu 結合モチーフの Cys に変異を導入した変異 Atox1 発現プラスミドを用いた検討した。6-OHDA による変異 Atox1 の分解は野生型 Atox1 に比較し抑制された。これらの結果から、Cys-X-X-Cys の 6-OHDA による酸化修飾が、Atox1 の分解促進に寄与している可能性が示された。

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 Kondo Mao, Hara Hirokazu, Kamijo Fuka, Kamiya Tetsuro, Adachi Tetsuo	4. 巻 13
2. 論文標題 6-Hydroxydopamine disrupts cellular copper homeostasis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metallomics	6. 最初と最後の頁 mfab041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mtomcs/mfab041	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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原 宏和、近藤真央、神谷哲朗、足立哲夫
2. 発表標題 神経細胞における銅動態に及ぼす神経毒6-hydroxydopamineの影響
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤真央、原 宏和、神谷哲朗、足立哲夫
2. 発表標題 神経細胞における銅動態制御因子に対する6-ヒドロキシドパミンの影響
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原 宏和
2. 発表標題 細胞内の銅恒常性破綻により誘導される神経細胞傷害の分子機構
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安田名保美、後藤紀香、神谷哲朗、原 宏和
2. 発表標題 神経細胞内銅動態に及ぼす硫化水素の影響
3. 学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原 宏和、安田名保美、後藤紀香、神谷哲朗、足立哲夫
2. 発表標題 硫化水素により引き起こされる細胞内銅輸送の破綻
3. 学会等名 第74回 日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上條風香、谷 綾乃、神谷哲朗、原 宏和
2. 発表標題 6-ヒドロキシドパミンによる細胞内銅恒常性破綻における酸化ストレスの関与
3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部第10回記念学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 優、安田 名保美、神谷 哲朗、原 宏和
2. 発表標題 銅/硫化水素による銅トランスポーターATP7Aタンパク分解機構の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 宏和、上條 風香、谷 綾乃、加藤 亜美、神谷 哲朗
2. 発表標題 酸化ストレスによる細胞内銅輸送経路の阻害
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜薬科大学 臨床薬剤学研究室 https://www.gifu-pu.ac.jp/lab/rinyaku/
--

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
研究分担者	足立 哲夫 (Adachi Tetsuo) (40137063)	岐阜薬科大学・薬学部・教授 (23701)	
研究分担者	神谷 哲朗 (Kamiya Tetsuro) (60453057)	岐阜薬科大学・薬学部・准教授 (23701)	

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