

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16135

研究課題名(和文) リソソーム遺伝子の発現調節機構に着目した新規パーキンソン病治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Exploration of therapeutic target molecules for Parkinson's disease by focusing on the regulatory mechanism of lysosomal gene expression

研究代表者

宮良 政嗣 (Miyara, Masatsugu)

広島大学・医系科学研究科(薬)・助教

研究者番号：60816346

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)：本研究では、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞において、低濃度パーキンソン病(Parkinson's disease: PD)関連化学物質がリソソーム遺伝子の転写因子TFEBの核移行阻害とは異なるメカニズムでリソソーム遺伝子発現低下を引き起こすことを明らかにした。また、PD関連化学物質(MPTP)慢性投与により作製したPDモデルマウスの中脳黒質において発現変動が認められる遺伝子をTaqMan Arrayにより数種類特定した。なお、PDモデルマウスの中脳黒質において、評価を行ったリソソーム遺伝子の顕著な発現変動は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病(PD)発症においてリソソームの機能低下が重要な役割を果たす可能性が指摘されているが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究では、PDモデル細胞において認められるリソソーム遺伝子発現低下の原因を絞り込むことができた。PDモデル動物の中脳黒質においては、評価したリソソーム遺伝子の顕著な発現変動を捉えることができなかったが、発現変動が認められるその他の遺伝子を数種類特定することができた。今後、さらに多くのリソソーム遺伝子を解析するとともに、本研究により特定した遺伝子とリソソーム機能との関連性についても検証を行うことで、PD発症メカニズムの解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that low concentrations of Parkinson's disease (PD)-related chemicals reduce lysosomal gene expression without inhibiting nuclear translocation of TFEB, a master regulator of lysosomal genes, in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. In addition, we identified several genes whose expression was up- or down-regulated in the substantia nigra of PD model mice, which were generated by chronic administration of MPTP, a PD-related chemical. No significant expression changes in the evaluated lysosomal genes were observed in the substantia nigra of PD model mice.

研究分野：神経毒性学

キーワード：パーキンソン病 MPTP/MPP+ オートファジー リソソーム

## 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 (Parkinson's disease: PD) は、中脳黒質に存在するドパミン神経細胞が長期間かけて徐々に死滅する神経変性疾患である。現在のところ、この神経細胞死の詳細な原因が不明であるため、これを止める PD の根本的治療法も確立されていない。オートファジーとは、リソソームを介した細胞内分解機構である。2006 年に、脳特異的オートファジー欠損マウスは典型的な神経変性疾患の特徴を再現することが報告されて以来、PD を含む神経変性疾患にオートファジーの機能低下が関与する証拠が蓄積してきている。しかし、その詳細なメカニズムはいまだ明らかになっていない。

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) は、ヒト、サル、マウスにおいてドパミン神経細胞死および PD 様症状を誘発することから、PD モデル動物の作製に汎用されてきた。また、その活性代謝物 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) は、PD モデル細胞の作製に汎用されてきた。これまでに、MPP<sup>+</sup> の様々な毒性が報告されてきたが、PD におけるドパミン神経細胞死の詳細な原因の解明には結びついていない。我々は、実際の PD におけるドパミン神経細胞死は長期間かけて徐々に進行するにも関わらず、ほとんどの研究における MPP<sup>+</sup> 誘発 PD モデル細胞は高濃度・短期間曝露により作製されている点に着目した。そこで、MPP<sup>+</sup> をドパミン神経細胞モデル細胞に「低濃度・長期間」曝露し、PD の病態をより反映することが期待される新たな PD モデル細胞を作製した。また、本 PD モデル細胞が 1) 典型的な PD の特徴 ( $\alpha$ -シヌクレインの蓄積および緩徐性細胞死) を再現すること、2) 早期からリソソーム遺伝子発現低下を介してオートファジーの機能低下を示すことを明らかにした。さらに、他の PD 関連化学物質であるロテノンの低濃度曝露によっても同様の現象が認められることを明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、PD モデル動物においてもリソソーム遺伝子発現低下が認められるか否かを明らかにするとともに、低濃度 PD 関連化学物質を用いて作製した PD モデル細胞におけるリソソーム遺伝子発現低下のカギとなる分子、すなわち PD 治療ターゲット候補分子を特定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞質/核タンパク質の抽出および解析

細胞質タンパク質は低張バッファーおよび界面活性剤 (0.5 % Nonidet P-40) を、核タンパク質は高塩濃度バッファーを用いて抽出し、各画分に含まれる transcription factor EB (TFEB) 量を抗 TFEB 抗体 (4240, CST) を用いたウェスタンブロッティングにより評価した。

#### (2) 免疫細胞化学染色

上記 TFEB 抗体および Alexa Fluor 555 標識二次抗体 (A31629, Thermo) を用いて細胞を染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FV1000-D) 観察により TFEB の細胞内局在を評価した。

#### (3) マウス胎仔大脳皮質初代培養神経細胞の単離および培養

妊娠 17.5 日齢の C57BL/6J マウスから胎仔を取り出した後、大脳皮質を単離し、細胞分散処理を行った。細胞播種後、CultureOne™ Supplement (A3320201, Thermo) を用いてグリア細胞を死滅させ、B-27™ Plus Neuronal Culture System (A3653401, Thermo) を用いて 14 日間培養を行った。

#### (4) 細胞生存率

PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent (P50200, Thermo) およびマルチモードプレートリーダー (PerkinElmer, EnSpire) を用いて測定した。

#### (5) RNA 抽出、逆転写、リアルタイム PCR

ReliaPrep™ RNA Miniprep System (Z6012 または Z6112, Promega) を用いて RNA を抽出後、AMV Reverse Transcriptase (M5101, Promega) または ReverTra Ace (FSQ-301, TOYOBO) を用いて逆転写反応を行った。その後、リアルタイム PCR 装置 (PikoReal または StepOnePlus, Thermo) を用いて SYBR Green 法または TaqMan プローブ法によりリアルタイム PCR を行った。

#### (6) ロータロッド試験

投与開始前に、ロータロッド装置 (KN-75, 夏目製作所) を用いて 15 rpm, 240 sec を 2 回達成するまで 2 日連続でトレーニングを行った。投与開始後、20 rpm における滞在時間 (最大 240 sec) を 3 回測定し、その平均値をスコアとした。

#### (7) 免疫組織化学染色およびレーザーマイクロダイセクション

抗 Tyrosine Hydroxylase (TH) 抗体および VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit (PK-6101,

VECTOR) を用いて脳組織切片に含まれるドパミン神経細胞を染色し、倒立顕微鏡 (Olympus, IX70) を用いて画像を取得した。また、抗 TH 抗体および Alexa Fluor 568 標識二次抗体 (SA5-10325, Thermo) を用いて脳組織切片を染色後、レーザーマイクロダイセクション (LMD6, Leica) により TH 陽性の黒質領域を分離した。

#### 4. 研究成果

(1) 低濃度 PD 関連化学物質を用いて作製した PD モデル細胞におけるリソソーム遺伝子発現低下のメカニズム解明

転写因子 TFEB は、通常、細胞質に局在しているが、リソソーム内タンパク質分解活性の低下などに応答して核に移行し、リソソーム遺伝子の発現を促進する。そこで、低濃度 PD 関連化学物質が TFEB を介したリソソーム遺伝子発現調節機構に及ぼす影響を評価した。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に 5 および 50 nM ロテノンを 12~48 時間曝露し、細胞質および核画分における TFEB の存在量をウェスタンブロットングおよび免疫細胞化学染色により評価した。5 および 50 nM ロテノンは、曝露後 12 および 24 時間において TFEB の細胞内局在に顕著な変化を引き起こさなかった。50 nM ロテノンは、リソソーム遺伝子発現低下を引き起こす曝露後 36 および 48 時間において、むしろ TFEB の核移行 (細胞質画分における減少および核画分における増加) を促進した。以上の結果より、低濃度ロテノンは、TFEB の核移行阻害とは異なるメカニズムでリソソーム遺伝子発現低下を引き起こすことが示唆された。また、低濃度ロテノン曝露後 36 および 48 時間においては、リソソーム機能低下に応答して TFEB の核移行が促進されたと予想される。

(2) マウス胎仔大脳皮質初代培養神経細胞において低濃度 PD 関連化学物質がリソソーム遺伝子発現量に及ぼす影響の解析

1 nM ~ 30  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> をマウス胎仔大脳皮質初代培養神経細胞 (株化細胞と比較してより生体を反映することが期待される) に 48~96 時間曝露し、細胞生存率を測定した。その結果、10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> 曝露後 48 時間から有意な細胞生存率の低下が認められ、この細胞生存率の低下は評価を行った曝露後 96 時間まで緩やかに進行した。そこで、100 nM ~ 10  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> を 48 時間曝露した細胞から RNA を抽出し、リアルタイム PCR によりリソソーム遺伝子の発現量を評価した。その結果、低濃度 MPP<sup>+</sup> によるリソソーム遺伝子の発現低下は認められず、むしろ増加傾向が認められた (図 1)。

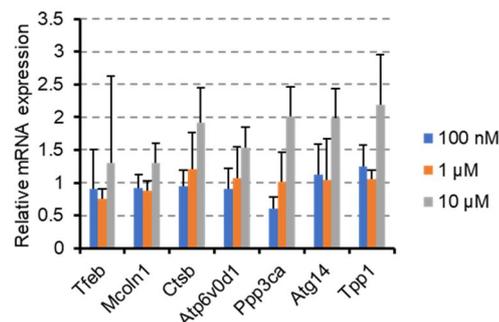


図1. マウス胎仔大脳皮質初代培養神経細胞において MPP<sup>+</sup> がリソソーム遺伝子発現量に及ぼす影響 (Mean  $\pm$  S.D. (n = 4))

(3) PD モデルマウスの作製とリソソーム遺伝子発現低下の検証

MPTP/probenecid 慢性投与による PD モデルマウスの作製および解析

8 週齢の C57BL/6J 雄マウスに 20 mg/kg MPTP および 250 mg/kg probenecid を週 2 回腹腔内投与し、1 週間ごとにロータロッド試験による運動機能の評価を行った。その結果、予想に反して MPTP/probenecid (MPTP/p) 週間投与後においても運動機能の低下は認められなかった (図 2A)。一方、MPTP/p 9 週間投与後のマウスの脳組織切片を作製し、抗ドパミン神経マーカー (TH) 抗体を用いて免疫細胞化学染色を行ったところ、中脳黒質におけるドパミン神経細胞の減少傾向が認められた (図 2B)。以上の結果より、本 PD モデルマウスは、PD の初期段階におけるドパミン神経細胞内変化の解析に有用なモデルである可能性が考えられた。

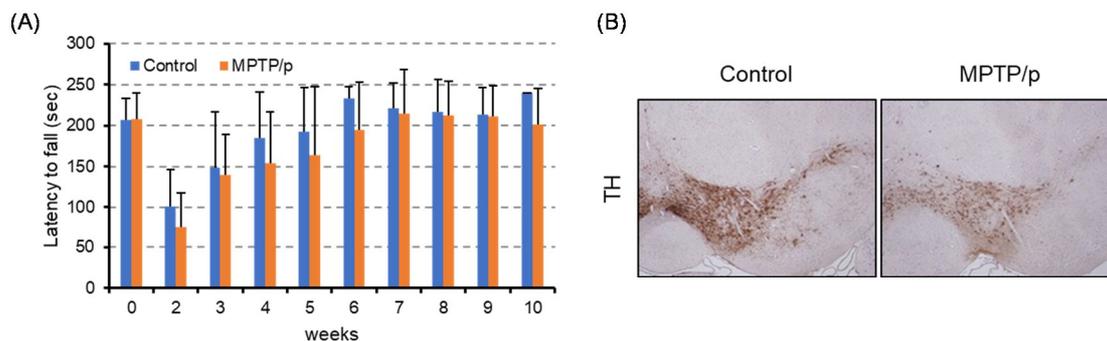


図2. MPTP/p 投与とマウスにおける運動機能およびドパミン神経細胞数の変化 (A) Mean  $\pm$  S.D. (Control: n = 10, MPTP/p: n = 7) (B) Control: n = 4, MPTP/p: n = 3

### 浸透圧ポンプを用いた MPTP 慢性投与による PD モデルマウスの作製および解析

8 週齢の C57BL/6J 雄マウスに浸透圧ポンプを用いて MPTP (50 mg/kg/day) を持続皮下投与し、1 週間ごとにロータロッド試験による運動機能の評価を行った。その結果、ぱらつきは大きいものの MPTP 投与開始後 1 週間から運動機能の低下傾向が認められ、この傾向は投与開始後 8 週間まで持続的に認められた。そこで、MPTP を 8 週間投与したマウスの脳組織切片から抗 TH 抗体を用いた免疫細胞化学染色およびレーザーマイクロディセクションにより中脳黒質を分離し、PD との関連が示唆されている 42 遺伝子の mRNA 発現量を TaqMan Array により評価した。その結果、本 PD モデルマウスの中脳黒質において発現変動を示す遺伝子を数種類特定することができた。

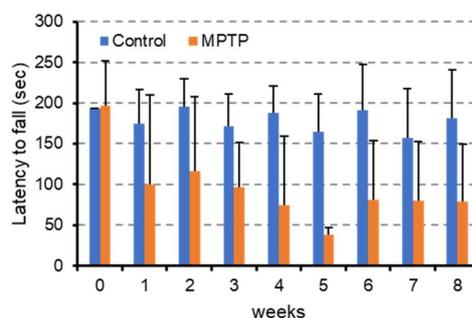


図3. MPTP投与マウスにおける運動機能の変化  
Mean  $\pm$  S.D. (n = 5)

#### (4) まとめ

本研究では、PD 関連化学物質を曝露したマウス胎仔大脳皮質初代培養神経細胞および投与した C57BL/6J マウスにおけるリソソーム遺伝子発現低下を捉えることができなかったが、PD モデルマウスの中脳黒質において発現変動を示す他の遺伝子を数種類特定することができた。今後、さらに多くのリソソーム遺伝子を解析するとともに、本研究により特定した遺伝子とリソソーム機能との関連性についても検証を行い、PD 発症におけるリソソームの役割を明らかにしたい。

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 0件）

1. 著者名 Yabuki Ayaka, Miyara Masatsugu, Umeda-Miyara Kanae, Takao Saya, Sanoh Seigo, Kotake Yaichiro	4. 巻 46
2. 論文標題 Mit/TFE family members suppress L-leucyl-L-leucine methyl ester-induced cell death	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 143 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.46.143	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 -

1. 著者名 Hatamiya Shunichi, Miyara Masatsugu, Kotake Yaichiro	4. 巻 592
2. 論文標題 Tributyltin inhibits autophagy by decreasing lysosomal acidity in SH-SY5Y cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 31 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.12.118	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 古武 弥一郎, 宮良 政嗣
2. 発表標題 疾患モデル細胞におけるリソソーム内酵素の変化
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 岡田 奈都海, 宮良 政嗣, 宮良 香苗, 畑宮 駿一, 児島 有佑, 高尾 紗亜, 古武 弥一郎
2. 発表標題 低濃度パーキンソン病関連神経毒MPP+によるリソソーム遺伝子発現制御機構の破綻
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畑宮 駿一, 宮良 政嗣, 古武 弥一郎
2. 発表標題 トリプチルスズによるオートファジー異常とそのメカニズム解明
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畑宮 駿一, 宮良 政嗣, 古武 弥一郎
2. 発表標題 トリプチルスズはリソソーム機能低下を通じてオートファジーを阻害する
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田 奈都海, 宮良 政嗣, 宮良 香苗, 神田 美幸, 田原 栄俊, 古武 弥一郎
2. 発表標題 低濃度MPP+誘発パーキンソン病モデル細胞における網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畑宮 駿一, 宮良 政嗣, 古武 弥一郎
2. 発表標題 トリプチルスズによるリソソーム酸性化阻害を介したオートファジー阻害
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 児島 有佑, 宮良 政嗣, 岡田 奈都海, 古武 弥一郎
2. 発表標題 パーキンソン病関連神経毒1BnTIQによるリソソーム機能低下を介したオートファジー阻害
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高尾 紗亜, 宮良 政嗣, 渡辺 南海子, 古武 弥一郎
2. 発表標題 飢餓・ミトコンドリア障害によるタンパク質性質変化に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>広島大学 大学院医系科学研究科 生体機能分子動態学研究室ホームページ  <a href="https://kotake-l.hiroshima-u.ac.jp/">https://kotake-l.hiroshima-u.ac.jp/</a></p>
--

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
研究協力者	古武 弥一郎  (Kotake Yaichiro)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	岡田 奈都海  (Okada Natsumi)		
研究協力者	畑宮 駿一  (Hatamiya Shunichi)		
研究協力者	児島 有佑  (Kojima Yusuke)		
研究協力者	高尾 紗亜  (Takao Saya)		
研究協力者	矢田 萌菜美  (Yada Monami)		

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