

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06598

研究課題名(和文) 反応性アストロサイト制御分子PAK2キナーゼの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of PAK2 in reactive astrocytes

研究代表者

小椋 正人 (Ogura, Masato)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10548978

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)：代謝性ROSに起因する反応性アストロサイトによるドパミン神経損傷メカニズムの解明を目的として、アストロサイト由来分泌因子の同定および機能解析を行った。アストロサイト特異的SDHAY215F変異体発現トランスジェニックマウスおよびp21-activated kinase 2阻害薬PQA18を用いた解析からドパミン神経毒性を示す分泌因子tubulointerstitial nephritis antigen like 1 (Tinagl1)を同定した。Tinagl1はMKK4を活性化し、神経細胞死を誘導した。PAK2/p53経路がTinagl1発現調節を担っていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性を含む多くの神経疾患発症にグリア細胞の活性化が関わっているが、活性化や神経細胞死制御に関わるメカニズムについて未だ未解明な点がある。本研究により、代謝性ROSによりアストロサイトが分泌するTinagl1がドパミン神経細胞死を惹起すること、および、PAK2/p53経路の活性化によりTinagl1発現が調節されること、を見出した。これらの結果は、アストロサイトにおけるPAK2シグナル経路が分泌因子Tinagl1発現・分泌を通して、ドパミン神経細胞死を誘導する可能性を示唆している。さらに、PQA18はPAK2の阻害を通して、反応性アストロサイトによる神経細胞死を抑制すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We created transgenic mice expressing a phosphorylation-defective mutant of succinate dehydrogenase A (SDHAY215F) in astrocytes for evaluation of the effects of mitochondrial ROS on astrocyte reactivity and showed that reactive astrocytes induce dopaminergic neuronal loss though the expression of tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 (Tinagl1) in substantia nigra. Administration of p21-activated kinase 2 (PAK2) inhibitor PQA18 inhibited the expression of Tinagl1 in astrocytes of SDHAY215F Tg mice. Recombinant Tinagl1 also significantly induced neuronal apoptosis in a dose-dependent manner. Signaling analysis revealed that Tinagl1 promotes MKK4 activation in primary neuron culture. Reporter assay revealed that PAK2/p53 pathway is involved in Tinagl1 expression. These results suggest that mitochondrial ROS may regulate dopaminergic neuronal death in substantia nigra through modulation of PAK2 signal in astrocytes and that Tinagl1 may induce neuronal death through MKK4 activation.

研究分野：薬理学

キーワード：活性酸素種 ミトコンドリア アポトーシス シグナル伝達 アストロサイト 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

酸化リン酸化によるエネルギー産生はミトコンドリアの最も重要な機能であるが、同時に、ミトコンドリアは ROS の主な発生源である。代謝に伴う ROS 発生については、神経変性疾患をはじめとする種々の加齢性疾患の発症要因の一つとされている (Cheignon *et al.*, *Redox Biol*, 2017)。申請者は、現在までにミトコンドリア機能制御に関するシグナル系の解析を行い、非受容体型チロシナーゼである c-Src がミトコンドリア内に高レベルに発現することを見出した。このミトコンドリア内 c-Src の生理学的役割を解明する目的で、ミトコンドリア内 c-Src 特異的にチロシンリン酸化シグナルを抑制するミトコンドリア移行シグナル融合キナーゼ欠損 c-Src 変異体の作製し、この変異体発現細胞を用いて次の結果を得た。ミトコンドリア内 c-Src のキナーゼ活性の抑制が ROS 産生を著明に増加させた。呼吸鎖複合体 II の活性中心サブユニットである SDHA の 215 番目のチロシン残基が c-Src によりリン酸化された。

この分子のリン酸化部位変異体 (SDHA^{Y215F}) 発現細胞による解析を行い、チロシン残基におけるリン酸化が ROS 産生の抑制に必須であった (Ogura *et al.*, *Biochem J*, 2012)。さらに、ミトコンドリア内 c-Src 活性制御メカニズムの解析を行い、Src 活性依存的に flotillin-1 分子が呼吸鎖複合体 II に相互作用すること、この相互作用が代謝性 ROS 産生の抑制に必要なことを明らかとした。In vitro キナーゼアッセイを行い、flotillin-1 分子が Src ターゲットであると同時に、Src の活性化を行うことを見出した (Ogura *et al.*, *FEBS Lett*, 2014)。

神経変性疾患患者の脳病変領域や損傷神経周囲のグリア細胞において 8-オキソグアニン、カルボニル化タンパク質および過酸化脂質の蓄積を指標とした酸化ストレス障害の亢進が見出され、ROS が病態の発症に関与していることが示唆されている。申請者は予備的実験として代謝性 ROS の増加を引き起こす SDHA^{Y215F} 発現レンチウイルスを作製し、マウス胎児由来初代培養アストロサイトに感染させた。その結果、SDHA^{Y215F} の発現とともに ROS 産生が増加し、黒質・中脳由来アストロサイトでは、GFAP 発現の増強と共にその培養上清が神経細胞死を惹起した。さらに、SDHA^{Y215F} 発現はコハク酸脱水素酵素活性を変化させなかった (Ogura *et al.*, 2012)。したがって、SDHA^{Y215F} は、クエン酸サイクルを阻害することなく、ROS 産生を増加させ、グリア活性制御に関わると示唆された。粘菌由来プレニルオキシキリンカルボン酸誘導体 (PQA) ライブラリーを用いたスクリーニングの結果、p21-activated kinase 2 (PAK2) 阻害薬として同定した PQA18 (Ogura *et al.*, *Biochem Pharmacol*, 2016) のアストロサイトへの投与により有意に神経細胞死が抑制された。一方、神経細胞への PQA18 の直接投与では抑制されなかった (Ogura *et al.*, *Biochem Pharmacol*, 2019)。

上記の予備実験結果に基づき loxP 配列を付加したクロラムフェニコールアセチル転移酵素 (CAT) および SDHA^{Y215F} 遺伝子を導入した CAT-SDHA^{Y215F}-Tg マウスを作出した。このマウスでは、全身の細胞において CAT 遺伝子のために SDHA^{Y215F} 発現が抑制されている。細胞群特異的なプロモーターを持つ Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配させることで、目的の細胞群においてのみ CAT 遺伝子が欠損し、SDHA^{Y215F} 発現が引き起こされる。本申請に先立ち B 細胞受容体の構成因子である mb-1 プロモーターを持つ Cre マウス (Hobeika *et al.*, *PNAS*, 2006) と交配を行い、B 細胞群特異的 SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスを作出した。その結果、SDHA^{Y215F} は B 細胞特異的に発現し、ROS 産生を有意に増加させた。また、この Tg マウスは、野生型と比較して特異抗原依存的に産生される IgG_{1,3}、IgM 力価の有意な低下を示す体液性免疫不全を示した (Ogura *et al.*, *Eur J Immunol*, 2017)。次いで、アルデヒド脱水素酵素 1L1 (Aldh1l1) プロモーターを持つ Aldh1l1-Cre/ERT2 マウス (Srinivasan *et al.*, *Neuron*, 2016) と交配を行い、アストロサイト群特異的 SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスを作出した。タモキシフェンによる発現誘導を行った後、免疫染色法によって黒質切片を解析したところ、コントロールマウスと比較して Tg マウスでは、GFAP および C3 陽性細胞数が増加する一方で TH 陽性細胞数が顕著に減少していた。さらに、ロータロッドテストを行ったところ、有意に保持時間が減少していた。これらの症状は、PQA18 の投与により改善された。

2. 研究の目的

本研究では、代謝性 ROS に起因する反応性アストロサイトによるドパミン神経損傷メカニズムの解明を目的として、アストロサイト由来新規分泌因子の同定および機能解析を行う。さらに、反応性アストロサイトにおける PAK2 の機能解析を通して、アストロサイト活性化における PAK2 の役割を明らかとする。

- 1) Aldh1l1-SDHA^{Y215F}-Tg マウスにおいて PQA18 投与群および非処置群の中脳・黒質領域の反応性アストロサイトから産生される分子および分泌因子を質量分析装置により同定する。
- 2) 同定した分子が神経形態変化・細胞死に与える影響を細胞・個体レベルで解析する。
- 3) 反応性アストロサイトにおける PAK2 による活性制御シグナルを明らかとする。

3. 研究の方法

反応性アストロサイト由来新規ドパミン神経変性候補因子の同定

野生型マウス、SDHA^{Y215F}-Tg マウスおよび PQA18 投与 SDHA^{Y215F}-Tg マウスの3群において、疾患発症時期(8 か月齢)および1ヵ月前の期間から黒質を実体顕微鏡下にて分離回収し、グルタミン酸トランスポーター(GLAST)抗体結合型磁気ビーズを用いて、アストロサイトの純化を行う。分泌因子分画と回収するため細胞培養を行い、培養上清を回収する。次いで、ポッター型ホモジナイザーを用いて、ゆるやかに細胞を破砕し、遠心分離にて、粗ミトコンドリア分画および細胞質分画に分ける。さらに、粗ミトコンドリア分画からスクロース密度勾配法により高純度ミトコンドリアを回収する。この分泌因子、ミトコンドリアおよび細胞質分画を解析用のサンプルとし、二次元電気泳動法および質量分析により病態発症により変動するタンパク質を同定する。

ドパミン神経変性候補因子の生物活性の解析

得られたドパミン神経変性候補分子の cDNA 配列および RNA 干渉を引き起こす shRNA 配列を設計し、それぞれの配列を含むレンチウイルスを作製し、初代培養アストログリア細胞に感染させ、液性栄養因子、ミトコンドリア動態、遺伝子発現、ATP 含有量、ROS 産生に与える影響を解析する。さらに、Tg マウスおよび野生型マウスの黒質にレンチウイルスを接種し、候補分子がアストロサイト活性化およびドパミン神経細胞死に与える影響を免疫組織化学法により解析し、疾患分子を同定する。

PAK2 による反応性アストロサイトの活性制御解析

PQA18 のターゲットである PAK2 のドミナントネガティブ変異体および野生型または PAK2 siRNA を用いて反応性アストロサイトにおけるドパミン変性因子発現制御に対する PAK2 の影響を解析する。PAK2 遺伝子発現制御を行ったアストロサイトを活性化物質 LPS、MPP⁺、凝集 α シヌクレインにより活性化した後、培養上清および共培養を用いて神経細胞死に与える影響を解析する。さらに、反応性アストロサイトの RNA-sequencing 解析を行い、変動発現遺伝子を同定する。Upstream 解析および Pathway 解析を行い、活性化制御に関わるシグナル系を明らかとする。

4. 研究成果

CAT-SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスとアルデヒド脱水素酵素 1L1(Aldh1l1) プロモーターを持つ Cre 発現マウスを交配させアストロサイト群特異的 SDHA^{Y215F} 変異体発現 Tg マウスを作出した。研究実施計画に従い、研究目的であるアストロサイト群特異的 SDHA^{Y215F} 変異体発現 Tg マウスの解析により同定したドパミン神経変性候補分子 tubulointerstitial nephritis antigen like 1 (Tinagl1) の機能解析を行った。Tinagl1 遺伝子をクローニングし、発現ベクターおよび発現レンチウイルスベクターに組み込み、発現用システムを構築した。一方、リコンビナントタンパク質は大腸菌を用いて精製した。さらに、PAK2 遺伝子配列に特異的な siRNA を設計し、発現抑制システムを構築した。Tinagl1 の過剰発現アストロサイトの培養上清およびリコンビナントタンパク質は、Akt シグナルの抑制および MKK4 シグナルの活性化を通して初代培養神経細胞死を惹起した。一方、PAK2 の siRNA を用いた発現抑制実験により、そのアストロサイト培養上清の神経毒性は減弱化した。Tinagl1 の発現調節メカニズムを解析するために、マウス Tinagl1 遺伝子プロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ発現ベクターに組み込み、レポーターアッセイシステムを構築した。生物データベースを用いてプロモーター領域の結合タンパク質を探索し、複数の重要な転写因子を同定した。デリーション変異体および部分配列変異体の解析から、その中の主要な候補として、p53 タンパク質を選択した。p53 をターゲットとする siRNA による RNA 干渉実験および特異的抗体を用いた阻害解析から、Tinagl1 発現調節に関わることが示唆された。さらに、p53 リコンビナントタンパク質を精製した。In vitro キナーゼアッセイおよびウエスタンブロットを行い、PAK2 が p53 のリン酸化および安定化に関わることを見出した。これらの解析から反応性アストロサイトにおいて p53 を介する PAK2 の新規シグナル経路の存在が明らかとなった。

反応性アストロサイトによるドパミン神経損傷メカニズムの解明を目的として、PAK2 阻害薬であるプレニルキリンカルボン酸誘導体(PQA18)のアストロサイトへの影響を解析した。コントロールおよび Tg

マウスにPQA18を週3回(1 mg/kg)腹腔内投与した。2ヵ月後、行動解析を行ったのち、脳凍結切片を作製し、GFAP、C3、TH、phospho-PAK2、Tinagl1 特異的抗体を用いて、黒質領域を免疫組織化学法により解析した。その結果、コントロールと比較して、Tg マウスのロータロッドテストの保持時間の減少およびグリップテストにおける握力の減少がPQA18によって有意に改善した。また、TH陽性細胞の減少もまた、PQA18の投与によって回復した。さらに、Tg マウスにおけるGFAP、C3、リン酸化PAK2、Tinagl1陽性細胞の増加もまたPQA18の投与により改善した。これらの結果からPQA18がPAK2阻害を通してROSによる反応性アストロサイトを抑制することで、ドパミン神経細胞死を減少させることが明らかとなった。

以上の結果は、黒質アストロサイトにおける代謝性活性酸素種の増加が、PAK2活性化を通して、p53のリン酸化およびターゲット分子であるTinagl1の発現増強・分泌を促進することによりドパミン神経細胞死を誘導する可能性を示唆している。PQA18は、PAK2阻害によりTinagl1発現を抑制し、パーキンソン様症状を改善するものと推察される。今後、PQA18は、「アストロサイトの活性化を抑制し、神経細胞死を抑制する」という新規メカニズムに基づく変性疾患改善薬の候補として更なる解析が期待される。

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 Masato Ogura and Ikuo Wada
2. 発表標題 Elucidation of the mechanism of substantia nigra astroglial cell activation by metabolic reactive oxygen species
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masato Ogura, Seya Onotsuka, Junko Yamaki, Ikuo Wada and Miwako K. Homma
2. 発表標題 Glial-derived secreted protein Tinagl1 regulates neuronal survival
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masato Ogura, Junko Yamaki and Miwako K. Homma
2. 発表標題 Mechanism of neurotoxic astroglial activation by mitochondrial reactive oxygen species
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福島県立医科大学医学部附属生体情報伝達研究所生体物質研究部門
<https://www.fmu.ac.jp/home/biomol/HTML/index.html>

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