

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591230

研究課題名(和文)パーキンソン病治療標的としての α -シヌクレイン発現抑制の *in vivo* 解析研究課題名(英文) *In vivo* analysis of suppression of the α -synuclein expression as a Parkinson's disease therapeutic target

研究代表者

荒若 繁樹 (Arawaka, Shigeki)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：00344789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病治療標的として α -シヌクレインの発現抑制が有効であるか調べるために、アデノ関連ウイルスに Tet-off システムを組み込み、外部から目的遺伝子の発現を制御できる動物モデルの樹立を試みた。ひとつのベクターに Tet-off システムを組み込んだものを 3 種類作製した。培養細胞上で、各ベクターの α -シヌクレイン発現抑制効率を比較した。その結果、有意に抑制する新規ベクターを見出した。このベクターを含むウイルスを作製した。このようなベクターの情報が少ないため、適するものを同定するまでの予備実験に時間を費やした。動物実験まで至らなかったが、今後目標を達成するための基盤を作ることができた。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether suppression of the α -synuclein expression level has a potential for Parkinson's disease therapy, this study was aimed at making an animal model that is capable of externally controlling the target gene expression by using a Tet-off system-based adeno-associated viral vector. We constructed three different vectors, which collectively contained Tet-off and target gene expression elements. We assessed the suppressive efficiency of these vectors on the α -synuclein expression in cultured cells. We found that one newly developed vector significantly reduced the expression of α -synuclein by the Tet-off system. We then obtained the viral particles containing this vector. It took a considerable time to select this vector, because there is a little information on this kind of vectors. Unfortunately, we did not reach the experimental step to see the effect of this vector in the animal. However, we could prepare the basic materials to perform *in vivo* study in the future.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経内科 神経病態学 パーキンソン病 神経毒性 モデル動物

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は、運動障害を主とした神経変性疾患であり、神経変性疾患の中ではアルツハイマー病に次いで多い。PD は、病理学的に中脳黒質のドパミン神経細胞の変性・脱落を認め、レビー小体と呼ばれる異常細胞質内封入体の出現を特徴とする。臨床的に PD の運動障害は、ドパミン補充療法で軽減される。しかし、根本的な治療法は未だない。PD 患者は約 10 数年の経過で寝たきりの状態になってしまう。根本的治療法の開発が重要な課題である。

α -シヌクレイン遺伝子の点変異と重複が、家族性 PD を引き起こす。さらに、 α -シヌクレインは、レビー小体として凝集するタンパク質の主要分子である。これらは、 α -シヌクレインが PD の発症に関与していることを示す。 α -シヌクレインの神経毒性メカニズムは未解明であるが、有力な説として α -シヌクレイン重合化仮説がある。これは、正常では可溶性である α -シヌクレインが、何らかの作用で異常に重合・凝集し、この異常重合過程で生じる中間的重合体が神経毒性を発揮するというものである (Lee VM, and Trojanowski JQ. *Neuron* 2006)。この仮説に従えば、 α -シヌクレインの発現を抑制すれば、その神経毒性を軽減させると考えられる。これに関連して、Tet-off システムを組み込んだトランスジェニックマウスにおいて、 α -シヌクレインの発現を途中から抑制すると認知機能が回復することが報告されている (Lim Y, *et al.* *J Neurosci* 2011)。これは、 α -シヌクレインの神経毒性が可逆的である可能性を示唆している。しかし、 α -シヌクレインの発現抑制が、凝集体の形成と神経細胞の変性を停止・緩和させるか明らかではない。また、どの程度 α -シヌクレイン神経毒性が進行したときまで、緩和効果をあらわすことができるか全く不明である。

2. 研究の目的

パーキンソン病治療標的として、 α -シヌクレインの発現抑制が有効であるか動物モデルを用いて調べる。

3. 研究の方法

アデノ関連ウイルス (AAV) に Tet-off システムを組み込み、外部から目的遺伝子の発現を制御できる動物モデルの樹立を試みた。一般的に Tet-off システムは、テトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tTA) 発現ベクターとテトラサイクリン応答因子 (TRE) を含む発現ベクターの 2 種類を別々に導入しなくてはならない。この方法では、ウイルスを 2 回接種する必要があり、組織に対する侵襲が大きい。この問題を回避するため、Tet-off と α -シヌクレイン発現の要素をひとつのベクターに組み込むことを考えた。この方法は異なる目的遺伝子で成功例があるが、効率的な配列の一般的法則は知られていない。よって、いくつかのベクターをデザインし、コンストラクトを作製した上で、ベクター間の Tet-off 効率を比較評価するところから始めた。このようなベクターを 3 種類作製した。培養細胞上で、各ベクターの α -シヌクレイン発現抑制効率を比較した。

4. 研究成果

Tet-off システムによる α -シヌクレイン発現抑制を比較するため、はじめに形質転換効率の高い非神経系培養細胞である HEK293 細胞に作製したベクターを導入した。形質転換から 48 時間後に、Tet-off を誘導するためドキシサイクリンを添加した。その後、経時的に細胞を回収し、細胞抽出液をウエスタンブロットで解析した。その結果、全てのベクターにおいて、形質転換 48 時間で α -シヌクレインの発現が認められたが、ひとつのベクターでのみ有意な発現抑制が認められた。次に、神経系培養細胞である SH-SY5Y 細胞を用い

て検討を行った。その結果、HEK293 細胞と同じベクターで有意な α -シヌクレインの発現抑制が認められた。次に、このベクターを組み込んだ AAV 粒子の作製を行い、ウイルス粒子の精製と濃縮を、密度勾配遠心法とアフニティクロマトグラフィーで行った。得られたウイルスの粒子数を ELISA で定量し、ゲノムコピー数を RT-PCR で定量した。実験に使用できるウイルス粒子が得られたことを確認した。このように Tet-off システムを導入した α -シヌクレイン AAV が作製済みであり、動物実験にとりかかる準備がなされた。

本研究期間中に、AAV をベースにしたラットモデルを用いて、 α -シヌクレインの神経毒性に関する論文を J Neurosci に 2011 年発表し、薬物の効果を評価した研究を PLoS One に 2014 年発表した。また、 α -シヌクレインの生理的役割についてドパミントランスポーター機能の調節機能を 2013 年に Moll Biol Cell に論文発表した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Arawaka S, Fukushima S, Sato H, Sasaki A, Koga K, Koyama S, Kato T. Zonisamide attenuates α -synuclein neurotoxicity by an aggregation-independent mechanism in a rat model of familial Parkinson's disease. PLoS One, 査読有, 9, 2014.
2. Hara S, Arawaka S, Sato H, Machiya Y, Cui C, Sasaki A, Koyama S, Kato T. Serine 129 phosphorylation of membrane-associated synuclein modulates dopamine transporter function in a G protein-coupled receptor kinase-dependent manner. Mol Biol Cell 査読有, 24, 2013, p1649-1660.

3. Sato H, Kato T, Arawaka S. The role of Ser129-phosphorylation of α -synuclein in neurodegeneration of Parkinson's disease: a review of in vivo models. Rev Neurosci 査読なし, 24, 2013, p115-123.
4. Sato H, Arawaka S, Hara S, Fukushima S, Koga K, Koyama S, Kato, T. Authentically phosphorylated alpha-synuclein at Ser129 accelerates neurodegeneration in a rat model of familial Parkinson's disease. J Neurosci 査読有, 31, 2011, p16884-16894.

[学会発表](計 7 件)

1. 佐々木飛翔, 荒若繁樹, 加藤丈夫. ウェスタンブロットにおける固定液を用いたシグナル増強法の検討: α -シヌクレイン微量検出の試み. 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11 日, パシフィコ横浜, 横浜市.
2. 荒若繁樹, 福島進吾, 加藤丈夫. ミトコンドリア障害による α -シヌクレイン Ser129 リン酸化促進機序の検討. 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013 年 5 月 29 日, 東京国際フォーラム, 東京都.
3. 荒若繁樹, 福島進吾, 佐藤裕康, 古賀香織, 小山信吾, 加藤丈夫. α -シヌクレインによるラットドパミン神経細胞変性に対するゾニサミドの効果. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 24 日, 東京国際フォーラム, 東京都.
4. 佐々木飛翔, 荒若繁樹, 福島進吾, 加藤丈夫. α -シヌクレイン Ser129 リン酸化反応における細胞内カルシウムの効果: パーキンソン病の病態への関与について. 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 15 日, マリンメッセ福岡, 福岡市.
5. 荒若繁樹, 原進, 佐藤裕康, 福島進吾, 小山信吾, 加藤丈夫. Ser129 リン酸化 α -シヌクレインのドパミン取り込みに対する効果. 第 52 回日本神経学会学術大

会, 2011年5月18日, 名古屋国際会議場, 名古屋市.

6. 佐々木飛翔, 荒若繁樹, 原進, 佐藤裕康, 福島進吾, 加藤丈夫. ドパミン取り込みにおける α -シヌクレイン Ser129 リン酸化の効果. 第 84 回日本生化学会大会, 2011年9月22日, 国立京都国際会館, 京都市.
7. Sato H, Arawaka S, Hara S, Fukushima S, Koyama S, Kato T. Authentically phosphorylated α -synuclein at Ser129 accelerates neurodegeneration in a rat model of familial Parkinson's disease. Neuroscience meeting 2011, 2011年11月14日, Walter E. Washington Convention Center, Washington, DC., USA.

〔図書〕(計 1 件)

1. 荒若 繁樹, 加藤 丈夫. 遺伝子・再生医療研究から学ぶパーキンソン病. α -Synuclein (PARK1/4) 機能における翻訳後修飾の役割 - リン酸化研究の現状. **医学のあゆみ**, 査読なし, 247, 2013, p1003-1008.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

現在まだ所属講座のホームページが、アップデートされていません。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

荒若 繁樹 (ARAWAKA Shigeki)

山形大学・医学部・講師

研究者番号 : 00344789