

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790594  
 研究課題名（和文） V1 のドパミン生合成酵素群の発現制御機構を標的にした新規パーキンソン病治療法開発  
 研究課題名（英文） Development of novel therapy for Parkinson's disease targeted to V-1 regulatory system of dopamine biosynthesis  
 研究代表者  
 川畑 伊知郎 (KAWAHATA ICHIRO)  
 東北大学・大学院薬学研究科・助教  
 研究者番号：30579743

### 研究成果の概要（和文）：

本研究では V-1 遺伝子が RhoA 依存的なアクチン重合促進を介した MAL/SRF 依存的転写活性の促進によりドパミン (DA) 生合成酵素群の遺伝子発現を増強する新規制御機構を発見し、さらに V-1 遺伝子導入による DA 生合成機能の増強を細胞およびマウスレベルで明らかにした。本研究によりパーキンソン病治療に応用可能と考えられる DA 生合成酵素群の新規発現増強機構を標的とした新規 V-1 遺伝子治療の基礎確立が達成できた。

### 研究成果の概要（英文）：

The applicant discovered an unknown expression system of dopamine (DA) biosynthesizing enzymes for development of novel therapy of Parkinson's disease (PD). This regulatory system was found to be operated by V-1 through MAL/SRF-mediated pathway coupled with activation of RhoA and acceleration of actin polymerization *in vitro* and *in vivo*. The basis of V-1 gene therapy for PD was successfully established in this work.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

### 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学・薬物治療学

キーワード：V-1, tyrosine hydroxylase, dopa decarboxylase, dopamine, cofilin, MAL/SRF, RhoA, actin

#### 1. 研究開始当初の背景

現在、我が国では高齢化社会に伴いパーキンソン病 (PD) 患者の増加は深刻な社会問題である。PD では脳内とくに中脳黒質線条体でのドパミン (DA) レベルの低下により、手の震え (振戦) や動作緩慢などの臨床学的特徴にみられる運動障害が現れると考えられている。これまでの研究により、パーキンソン病患者の脳内における、DA の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) のタンパク質レベルおよび mRNA レベルの低下や (Ichinose *et al.*, 1994)、健常者では観察されないプロテアソーム機能の低下 (McNaught *et al.*,

2001)、ユビキチン・プロテアソーム関連遺伝子の変異 (Shimura *et al.*, 2000) が明らかとなり、申請者は DA 不足の代償作用と考えられる TH 活性の上昇、すなわち TH リン酸化レベルの上昇が、26S プロテアソームによるリン酸化 TH タンパク質の分解を亢進し、全 TH 量が減少するメカニズムを報告した (Kawahata *et al.*, 2009)。現在、日本では PD 治療薬として、L-Dopa 投与による脳内 DA 量回復を目的とした対症療法が主であり、根本的な治療法は見出されていない。近年では DA 生合成関連酵素群である TH、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC)、および TH の

補酵素であるテトラヒドロピオプテリン (BH4) の律速酵素である GTP シクロヒドロキシラーゼ I (GTPCHI) の、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた PD 患者脳内への遺伝子導入が試みられているが、V-1 はこれらの DA 生合成関連酵素群の発現レベルを全て引き上げる作用を持つため、その作用分子メカニズムを明らかにすることで、より単純な遺伝子治療で脳内 DA 生合成関連酵素群量の回復と DA 量回復が期待できるという遺伝子治療学的背景があった。

## 2. 研究の目的

本研究は V-1 タンパク質がカテコールアミン生合成酵素の発現量を上昇させる分子メカニズムをターゲットとした新規パーキンソン病治療法の確立を目指した。これは PD の根本的治療法を開発するうえで DA 生合成酵素群の協調的発現増強を図るための重要な意義がある。V-1 遺伝子は申請者らの研究から TH および AADC の発現レベルを上昇させることが明らかになっているが、V-1 の生理機能および V-1 の DA 生合成酵素における発現制御メカニズムについてはこれまで一切報告がなかった。V-1 による DA 生合成関連酵素群の発現制御メカニズムが細胞レベルおよび動物レベルで明らかになれば、PD やジストニアを始めとするモノアミン関連神経疾患の新規治療への応用が可能であると考えられる。そのためこの未知の制御システムを明らかにし、さらに V-1 遺伝子の導入により実際に DA 生合成酵素の発現および DA 産生レベルが上昇するのかを細胞およびマウスレベルで検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

V-1 強制発現、または V-1 ノックダウンが TH および AADC (DA 生合成酵素群) の発現に及ぼす影響は、RT-PCR 法、ウェスタンブロット法、免疫細胞化学的解析およびレポータージーンアッセイにより解析した。また V-1 による DA 生合成酵素群の発現制御カスケードに関連すると予想された各遺伝子については、Rho、LIMK、cofilin、SRF、およびそのコアクチベーター MAL 等の各種変異体発現プラスミドによる機能阻害、または siRNA を用いたノックダウン法により、各遺伝子の V-1 カスケードとの関連性を詳細に検討した。評価に用いる細胞には PC12D 細胞、HeLa 細胞を使用し、さらに本申請において新たに確立した中脳初代培養ニューロン (DA ニューロン) を用いて解析した。MAL/SRF 経路による TH または AADC 発現の直接制御はクロマチン免疫沈降 (ChIP) により検討した。また *in vivo* における V-1 過剰発現による DA 生合成酵素群の発現レベル変化を検証するため、C57BL7 マウスを用い、

V-1 レンチウイルスを脳内投与して、中脳および線条体での DA 生合成酵素群の発現変化を免疫組織化学的、および生化学的に解析した。さらに V-1 過剰発現による異常行動等が発現しないかを行動解析により検証した。

## 4. 研究成果

本申請により新たに確立した黒質 DA 作動性ニューロン初代培養系、および PC12D 細胞と HeLa 細胞を用い、V-1 によるアクチン重合依存的な DA 生合成酵素群、具体的には DA 生合成に必要なチロシン水酸化酵素 (TH) および芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) の発現制御機構を解析した。その結果、V-1 がアクチン重合制御因子である RhoA を活性化し、Rho/ROCK/LIMK/cofilin 経路を介してアクチン重合を促進させ、MAL/SRF シグナルを増強する新規カスケードが明らかとなった。

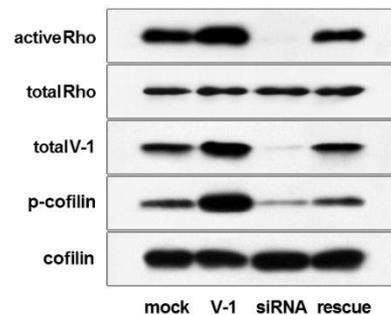


図 1) V-1 は RhoA 活性を上昇させコフィリン活性を抑制することでアクチン重合を促進させる。

また V-1 発現レベルに応じて G-actin プールサイズが増減し、V-1 過剰発現により MAL の核内移行が亢進することで SRF 依存的転写活性が増強されることが示された。さらに TH および AADC 遺伝子上の SRF 応答配列を同定し、V-1 発現レベル依存的に TH および AADC 上の SRF 応答配列に結合する SRF タンパク質量が変化することを ChIP アッセイにより検証した。同時に V-1 発現レベル依存的に TH と AADC の発現レベルが制御されることを明らかにした。このことから V-1 による TH と AADC の発現は両プロモーター領域への SRF 結合量により決定されることが明らかとなった。

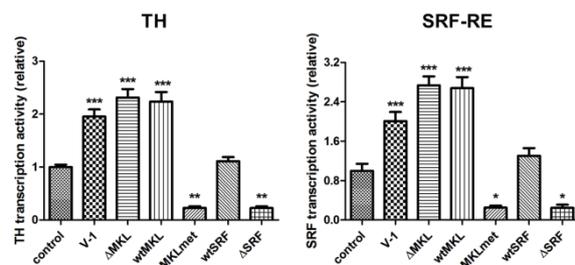


図 2) V-1 による TH および AADC の発現上昇は MAL/SRF 経路を介することが明らかとなり、図 1 の RhoA 活性化依存性が確認された。

さらに C57BL/6 マウスを用いて V-1 レンチウイルスを脳内投与した後、1 か月後に脳を摘出して黒質および線条体における TH および AADC の発現レベルと産生 DA 量を検討した結果、*in vivo* においてもこれらの発現増強、および DA 量の増大が確認できた。また TH および AADC の発現増強が確認されたマウス個体において異常行動は観察されなかったことから、V-1 遺伝子の過剰発現において新規 PD 治療法確立を想定した使用の安全性が確認できた。

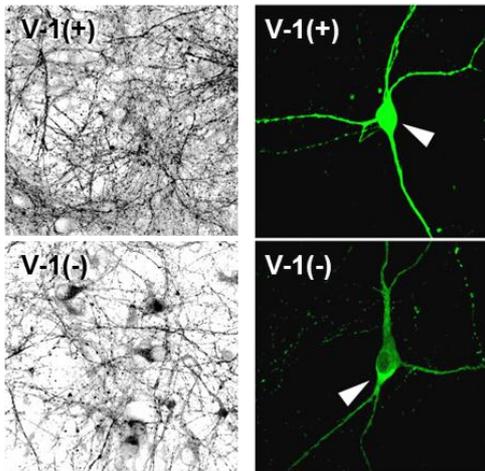


図3) V-1 を過剰発現させた DA ニューロンでは TH の発現(図右側)および Tau-1 陽性軸索の密度が上昇した。

これらの結果から、V-1 が RhoA 依存的なアクチン重合促進を介した MAL/SRF 依存的転写活性の促進により DA 生合成酵素群の遺伝子発現を増強する新規制御カスケードが明らかとなり、新規 V-1 遺伝子治療の基礎確立が達成できた。これにより神経変性と黒質線条体 DA 量低下を伴う PD におけるアクチン重合促進と DA 生合成酵素群発現量の連関的増強を標的とした PD の根本的治療への応用が期待できると考えられる。

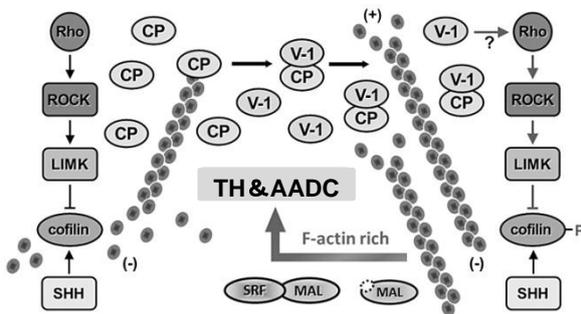


図4) 本申請により明らかとなった V-1 による TH および AADC の発現制御カスケード。Rho/ROCK/LIMK 経路の活性化によりアクチン重合が促進され、MAL/SRF 依存的転写活性が増強される結果、TH および AADC 遺伝子の発現が協調的に上昇し、DA 産生量が増大する。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

1. 川畑 伊知郎、大宅 史織、来 延新、森田 淳一、田渕 明子、津田 正明、一瀬 宏、加藤 成樹、小林 和人、泉 安彦、久米 利明、赤池 昭紀、富岡 佳久、山國 徹「V-1 によるアクチン重合促進を介した MAL/SRF 依存的なチロシン水酸化酵素の新規発現制御機構」日本薬学会 第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、横浜。
2. 川畑 伊知郎、森田 淳一、田渕 明子、津田 正明、一瀬 宏、加藤 成樹、小林 和人、泉 安彦、久米 利明、赤池 昭紀、山國 徹「V-1 はアクチン重合により活性化される MAL/SRF 依存的経路を介してチロシン水酸化酵素遺伝子の発現を促進する」第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18 日、名古屋。
3. 来 延新、川畑 伊知郎、一瀬 千穂、近藤 一直、一瀬 宏、小林 和人、山國 徹「チロシン水酸化酵素の転写促進因子 V-1 はドーパ脱炭酸酵素の遺伝子発現を増強する」第 51 回日本薬学会東北支部大会、2012 年 9 月 4 日、青森。
4. 川畑 伊知郎、森田 淳一、田渕 明子、津田 正明、一瀬 宏、泉 安彦、久米 利明、赤池 昭紀、山國 徹「V-1 はアクチン重合を介した SRF 依存的経路によりチロシン水酸化酵素遺伝子発現を制御する」第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14 日、京都。
5. 来 延新、金 京梅、川畑 伊知郎、森田 淳一、一瀬 宏、福永 浩司、山國 徹「PC12 細胞における V-1/DLK1/Notch1 を介したチロシン水酸化酵素の発現制御機構」第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14 日、京都。
6. 川畑 伊知郎、森田 淳一、田渕 明子、津田 正明、山國 徹「アクチンダイナミクス制御因子 V-1/CapZ 複合体によるチロシン水酸化酵素の新規発現制御機構」第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 15 日、横浜。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川畑 伊知郎 (KAWAHATA ICHIRO)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：30579743

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：