

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590112

研究課題名(和文) 海馬神経細胞のS1P受容体をターゲットとした新規てんかん治療法の開発

研究課題名(英文) S1P receptors on neuronal cells as a target of medicine for epilepsy

研究代表者

岡田 太郎 (Okada, Taro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80304088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳脊髄液中のalpha-synuclein (ASN)が難治性てんかんのバイオマーカーであるとの報告に基づき、神経細胞のS1P受容体に対するASNの影響について検討したところ、細胞外に添加したASNがS1P1受容体とGiタンパク質の共役を阻害するという、きわめて興味深い現象が見いだされた。さらに、このASNによるS1P受容体-Gタンパク質共役の阻害について、そのサブタイプ特異性を検討したところ、ASNはS1P1受容体およびS1P3受容体とGタンパク質の共役のみを特異的に阻害することが明らかとなった。この知見は、未だ不明な点の多いてんかんの病理メカニズムを考える上できわめて重要である。

研究成果の概要(英文)：Since it has recently been reported that alpha-synuclein (ASN) in cerebrospinal fluid is a biomarker of epilepsy, we investigated the effect of extracellular ASN on the neuronal cell functions. We found the extracellular ASN causes the inhibition of S1P1 receptor-Gi protein coupling. The ASN effect was subtype specific because it inhibits S1P1 as well as S1P3 receptors but doesn't inhibit S1P2-induced cell signaling. This finding is very important because it was already reported by our group that S1P receptor is involved in the neuronal functions. And this study also suggests the possibility of novel therapeutic strategy for treating epilepsy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：スフィンゴシン1-リン酸 スフィンゴ脂質

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン1-リン酸 (S1P) は細胞の分化、増殖、走化性、アポトーシス、炎症などに関わる重要な脂質メディエーターであり、細胞表面の S1P 受容体に結合して生理機能を発揮する。我々は最近の研究において、海馬苔状線維が脱分極した際にシナプス前終末でスフィンゴシンキナーゼ1 (SPHK1) が活性化し、その結果産生・放出された S1P がオートクライン的に S1P₁ 受容体および S1P₃ 受容体を活性化し、神経伝達物質放出を制御するという全く新しいメカニズムを報告した (Kajimoto, T. *et al. Mol. Cell. Biol.* 27, 3429-3440. (2007); Okada, T. *et al. Cell. Signal.* 21, 7-13. (2009))。さらに、記憶・学習に深く関わることが知られている海馬 CA3 領域での長期増強 (LTP) が SPHK1 ノックアウトマウスにおいては認められないこと、それに伴い空間学習能力が低下していることを初めて見いだして報告した (Kanno, T. *et al. Neuroscience*, 171, 973-980 (2010))。興味深いことに、多くの細胞系において抑制性の作用を示す S1P 受容体である S1P₂ 受容体のノックアウトマウスは側頭葉てんかんを起こすことが報告されている。このてんかん発症メカニズムは従来まったく不明であったが、我々の研究結果から、促進性の S1P₁ および S1P₃ 受容体と抑制性の S1P₂ 受容体とのバランスが神経伝達物質放出の制御において重要であり、その破綻により側頭葉てんかんという病態が生じている可能性が極めて高い。しかし、そもそも S1P₁ 受容体および S1P₃ 受容体刺激により神経伝達物質放出が引き起こされ、逆に S1P₂ 受容体により抑制されるメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

S1P₁ 受容体および S1P₃ 受容体刺激により神経細胞からの神経伝達物質放出が引き起こされ、一方で S1P₂ 受容体により抑制されるメカニズムの詳細を明らかにする。そのため、まず S1P₁ 受容体と S1P₂ 受容体の刺激によって引き起こされる細胞内情報伝達の違いを明らかにする。さらに、S1P₁ 受容体と S1P₂ 受容体のバランスの破綻が神経活動および神経生存性に影響を与えるメカニズムについて検討する。

また、我々の研究室による予備的検討により、パーキンソン病やレビー小体型認知症の原因とされる α -シヌクレイン (ASN) が、S1P₁ 受容体の情報伝達系を阻害することが明らかとなっていた。当初、この現象は側頭葉てんかんの原因究明と治療法の開発を目指す本研究とは関係ないものと考えていたが、その後てんかんモデルマウスの海馬にて ASN 発現の変化が認められることが報告され、また脳脊髄液中の ASN 量は難治性てんかんのバイオマーカーになることが報告されるに至り、

未だ機能不明なタンパク質である ASN が S1P₁ 受容体系を阻害することにより、神経活動に障害をもたらすメカニズムの詳細についても検討した。

3. 研究の方法

神経細胞における各 S1P 受容体サブタイプの分布およびそれらを活性化した際の細胞内情報伝達経路について、特に促進性の S1P₁、S1P₃ 受容体と抑制性の S1P₂ 受容体の違いに注目して解析した。具体的には S1P₁ 受容体および S1P₂ 受容体に蛍光タンパク質 CFP を融合させたコンストラクトを作製し、三量体型 G タンパク質のサブユニットに YFP を融合させたコンストラクトとともに神経細胞 SH-SY5Y に遺伝子導入し、細胞を S1P によって刺激した際の CFP と YFP の間で起こる FRET の変化を検出することにより、各 S1P 受容体サブタイプと三量体型 G タンパク質との共役を検出した。さらに細胞内 cAMP やカルシウムを測定した。各 S1P 受容体の違いについて検討する上では、siRNA による S1P 受容体サブタイプ特異的ノックダウンの他、S1P₁ 受容体特異的遮断薬である W146、S1P₂ 受容体特異的遮断薬である JTE-013 などを用いた。

さらに、ASN が神経細胞の S1P₁ 受容体の情報伝達に影響をもたらすメカニズムについて検討するため、大腸菌で組換え ASN および家族性パーキンソン病を引き起こすことが知られている ASN 変異体である ASN(A53T) の組換え体を作製し、神経細胞である SH-SY5Y に細胞外より添加した上で、上記で確立した S1P 受容体各サブタイプと G タンパク質との共役への影響について検討した。

4. 研究成果

(1) S1P 受容体サブタイプが引き起こす情報伝達系

SH-SY5Y 細胞において、S1P 刺激による細胞内カルシウム動員は主に S1P₂ 受容体を介するもので、おそらく三量体型 G タンパク質 Gq や G12/13 を介するものと考えられた。一方で S1P₁ 受容体は SH-SY5Y 細胞の遊走性や低分子量 G タンパク質 rac の活性化において重要な機能を担っているものの、S1P 刺激時のカルシウム動員におけるその役割は限定的であった。(図1)

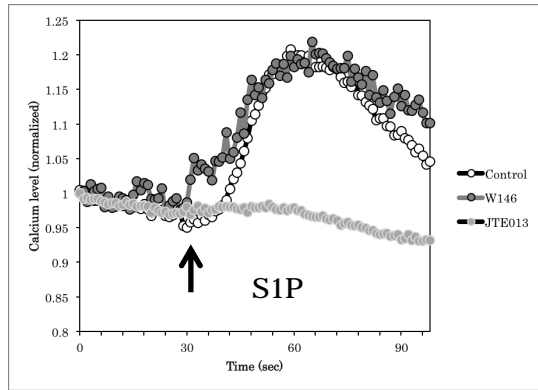


図 1
神経細胞 SH-SY5Y における S1P 刺激時の細胞内カルシウム動員と S1P 受容体遮断薬の作用

S1P 刺激時に認められる細胞内カルシウム動員を S1P2 遮断薬である JTE-013 はほぼ完全に抑制した一方で S1P1 受容体遮断薬である W146 は S1P の作用に対してほとんど影響しなかった。

(2) 細胞外 ASN による S1P 受容体情報伝達の阻害

SH-SY5Y 細胞に組換え ASN あるいは ASN(A53) を処理することで、S1P 刺激や PDGF 刺激による細胞遊走性が阻害されることを見いだした。一方で S1P 刺激時の細胞内カルシウム動員については ASN 処理で阻害されなかった。(1)の結果を考慮すると、ASN の作用は S1P1 受容体系に特異的なものであることが考えられた。

続いて(1)で確立した、各受容体サブユニットと三量体型 G タンパク質の共役検出系を用いて検討したところ、細胞外に添加した ASN が S1P1 受容体と Gi タンパク質の共役を阻害するという、きわめて興味深い現象が見いだされた。(図 2)

さらに、この ASN による S1P 受容体-G タンパク質共役の阻害について、そのサブタイプ特異性を検討したところ、ASN は S1P1 および S1P3 と G タンパク質の共役のみを阻害し、S1P2 受容体と G12/13 受容体との共役は抑制しないことが明らかとなった。

この現象は、S1P 受容体がサブタイプ特異的に神経の興奮を制御しているという最近の我々の知見を考えるときわめて興味深い。先に述べたように、脳脊髄液中の ASN 量は難治性てんかんのバイオマーカーとなりうるということが報告されているが、その理由については全くわかっていない。本研究結果より、神経

細胞外の ASN が S1P 受容体をサブタイプ特異的に制御し、てんかんをはじめとする神経疾患を引き起こす可能性が初めて明らかとなった。

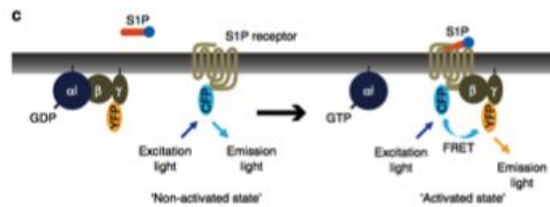
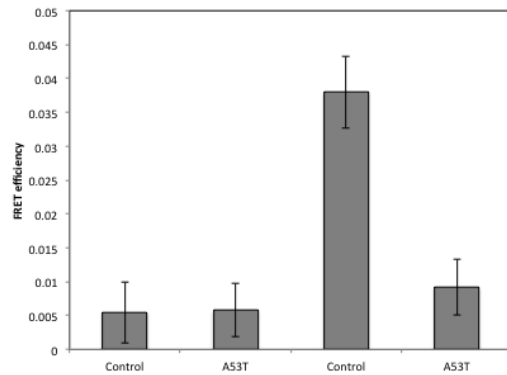


図 2
SH-SY5Y 細胞における S1P 刺激時の S1P1 受容体と G タンパク質の共役に対する ASN の阻害作用

下段の図に原理を示す。S1P1-CFP と G α -YFP を発現させた細胞では、定常状態では S1P1 受容体と G タンパク質は離れており、CFP と YFP の間での FRET はほとんど起こっていないが、S1P1 受容体が活性化すると G タンパク質との共役が起こり、その結果 G タンパク質の α サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニットの解離が起こる。放出された $\beta\gamma$ サブユニットは S1P1 受容体と結合することが知られており、結果として CFP と YFP が接近し、FRET が起こる。

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 1件)

(1) Kajimoto T, Okada T, Miya S, Zhang L, Nakamura S.
Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation

of exosomal multivesicular endosomes.
Nat Commun. 査読有り
2013, 4:2712.
doi: 10.1038/ncomms3712.

〔図書〕(計 2件)

(1)「エキソソームの形成機構」
梶本武利、岡田太郎、中村俊一
細胞工学、総説、査読なし
2015年、第34巻、第2号、168-173

(2)「細胞内外で機能するS1Pの役割」
岡田太郎、中村俊一
日本生化学会機関誌「生化学」総説、査読なし
2012年、第84巻、第2号、92-101

〔その他〕

ホームページ等
研究成果について、解説付きで以下のホームページで公表している。
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/biochemistry/Home.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
岡田 太郎 (Okada, T.)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80304088

(2)研究分担者
該当なし。

(3)連携研究者
該当なし。