

様 式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640028

研究課題名(和文) パーキンソン病モデルマウスへのマグネシウム-L-スレオネート投与の予防・治療効果

研究課題名(英文) Effect of Mg-L-threonate on alpha synuclein Tg mice

研究代表者

小柳 清光 (OYANAGI, Kiyomitsu)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：00134958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：アルファシヌクレイン遺伝子組換えパーキンソンモデル(aSynTg)マウスにマグネシウム-L-スレオネート(Mg-L-Th：脳脊髄液中Mg濃度を10～20%上昇せしめる。A社とB社から購入)を飲用投与し生後6ヶ月まで生存させ、行動解析と線条体ドパミン量をwild type(WT)と比較した。結果は、歩行時の前脚および後脚幅、前後脚差はMg-L-Th投与群で改善しなかった。aSynTgマウスがケージの壁にジャンプし続ける頻度は、Mg-L-Th投与群で減少しなかった。線条体ドパミン濃度は、WTよりaSynTgマウスで少なく、Mg-L-Th(A社)投与群ではaSynTgマウスで有意に増加した。

研究成果の概要(英文)：Magnesium-L-threonate (Mg-L-Th: It had been reported that the oral intake of Mg-L-Th increased the concentration of Mg in the cerebrospinal fluid by 10 to 20%. Mg-L-Th was purchased from two companies (A and B).) was administered to the alpha-synuclein transgenic (aSyn tg) mice, which are considered to be a model of Parkinson disease, and the wild type (WT) mice. Gait of aSyn tg mice, such as width of forefoot and hind foot, was not improved by Mg-L-Th administration. In addition, frequency of jumping to the cage wall of aSyn tg mice was not decreased. But the concentration of dopamine in the neostriatum, which was lower in aSyn tg mice than WT mice, was increased significantly in aSyn tg mice by Mg-L-Th from A company.

研究分野：神経病理学

キーワード：パーキンソン病 アルファシヌクレイン遺伝子組換えマウス マグネシウム マグネシウム-L-スレオネート

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は中年以降に発症して震えや固縮を来し、長期になると認知症や寝たきりになることがある神経難病であり、高齢者の増加に伴って患者が急増している。パーキンソン病は、中脳の黒質ドパミン神経細胞などが死んでドパミン等が脳内で減少する事によって発症するが、原因は不明で、神経細胞死のメカニズムとしては、 α -シヌクレインが凝集したレビー小体の出現と小胞体ストレス、ミトコンドリアを中心とした酸化ストレスなどが報告されて来たが¹⁻³、これらの病的現象が一元的連続的に解明されたとは言いがたい。

パーキンソン病における神経細胞死を防ぐ、あるいは傷害された神経機能を回復させる、という根本的な予防・治療法は今も無い。種々の治療薬は神経細胞死によって枯渇するドパミン等の神経伝達物質の補充療法であり、脳深部刺激療法では電極を視床下核などまで刺入するため侵襲が大きく、不効例も多い。てんかん治療中に偶然パーキンソン病への有効性が日本で発見され、2009年適応が認められた「ゾニサミド」⁴であるが、適応3年余りを経て、黒質神経細胞死を防ぐ根本的治療であるか、疑問が持たれるようになった。一方、マグネシウム (Mg) はパーキンソン病患者脳に生じる α -シヌクレインの凝集を阻害し、レビー小体の形成を妨げる事が知られ⁵、神経変性疾患では唯一、患者髄液中での減少が報告され⁶、酸化ストレス等に対する神経保護作用も報告されている⁷⁻¹³。

私どもは、低 Mg、低カルシウム摂取が原因と言われるグアム島のパーキンソン認知症の研究を30年間余り続け (*Oyanagi et al., Acta Neuropathol* 1986, *Brain* 2007 等論文計31編)¹⁴、これにヒントを得てパーキンソン認知症の原因を確認する実験を企て、世界でも初めて、ラットを用いた「世代にまたがる Mg 欠乏が黒質ドパミン神経細胞死を惹起する」ことを見出した (*Oyanagi, Hashimoto et al. 米国神経病理学会ワイル賞 [最優秀論文賞] 2002, Oyanagi, Hashimoto et al., Neuropathology* 2006)¹⁵。この裏返しとして、Mg がパーキンソン病の予防・治療薬とならないか、と考え、ラット黒質培養細胞を用いた in vitro パーキンソンモデル (MPP⁺ [1-methyl-4-phenylpyridinium] 曝露) への予防・治療実験を行い、培養液中

Mg 濃度を通常の 1.5 倍に増やすことで、「予防実験」でも、「治療実験」でも、その有効性を確認した (*Hashimoto, Oyanagi et al., Brain Research* 2008)¹⁶。

2. 研究の目的

パーキンソン病モデルマウスである α -シヌクレイン遺伝子組換えマウス ($\text{h}\alpha\text{-Syn tg}$ マウス) へ、脳内 Mg 濃度を上げると報告されている Magunesium L-Threonate (Mg-L-Th)¹⁹ を飲用させ、所見を観察解析して、パーキンソン病の予防・治療薬たり得るか、明らかにする。

3. 研究の方法

(1) $\text{h}\alpha\text{-Syn tg}$ マウスの作成と維持:

$\text{h}\alpha\text{-Syn tg}$ マウスは、mThy-1 の exon2 から exon4 にヒト α -シヌクレインカセット (nt 53-475; Genbank accession No. L08850) が挿入されたマウスである¹⁷。ヒト α -シヌクレインカセットはヒトの脳 mRNA から RT-PCR により作製し、mThy-1 カセットの exon2 から exon4 の間に挿入したベクターを作製した後、C57BL/6 $\times$ DBA/2F1 の受精卵にマイクロインジェクション法で遺伝子導入され、ヒト α -シヌクレインの発現量が高い line が $\text{h}\alpha\text{-Syn tg}$ マウスとして作製された¹⁷。

本研究では、 $\text{h}\alpha\text{-Syn tg}$ マウスのメスと C57BL/6N のオスを掛け合わせ繁殖させたマウスを使用した。繁殖したマウスは生後4週にジェノタイプチェックを行った。マウス尾を 5 mm 採取し 1.5 ml チューブに入れ、Cell Lysis Solution (QIAGEN) 150 μ l と Proteinase K (20mg/ml, Wako) 1 μ l を添加し混和した後、55°C で一晩培養し溶解させた。溶解液は遠心し上澄み 5 μ l を別のチューブに取り dH₂O 95 μ l を加えて希釈し、これをサンプル DNA として使用した。PCR の検出に用いたプライマーは、Forward: gac ggg tgt gac agc agt agc c、Reverse: gat gat ggc atg cag cac tgg で、PCR 産物は 349 bp である。PCR は 1 サンプルにつき 2X Ampdirect plus (島津製作所、京都市) 10 μ l、dH₂O 7.9 μ l、Forward プライマー 0.5 μ l、Reverse プライマー 0.5 μ l、サンプル DNA 1 μ l を混和し、LA Taq (タカラバイオ、大津市) 0.1 μ l を添加した。PCR の伸長反応は 60°C、30 秒で 30 サイクル行った。PCR 反応物は 1.0% アガロースゲルを用い 30 mV で 30 分間、電気

泳動により分離後、トランスイルミネーターにゲルを乗せてUV照射をすることでPCR産物の有無の確認を行った。PCR産物が確認できたマウスを α -Syn tg マウスとし、同腹の non-tg マウスを対照野生型マウスとして実験に用いた。

(2) Magnesium L-Threonate (Mg-L-Th, $C_4H_7O_5 \cdot C_4H_7O_5 \cdot Mg$, IS Chemical Terchnology LTD) の投与法 : Mg-L-Th は、飲用によりラット脳内 Mg 濃度を上昇させる、と報告されたものである¹⁹。A 社または B 社の Mg-L-Th は 3.0 mg/ml で通常の飲水に添加し、 α -Syn tg マウスおよびその対照に飲用させた。体重約 30g のマウスは一日あたり 6 ml の飲水を摂取する事を確認しており、およそ 50 mg/kg/day の Mg^{2+} を摂取していることになる。

(3) 大槽からの髄液採取と Mg^{2+} 濃度
麻酔後マウス後頸部を皮切し、27 ゲージ翼状針で大槽から髄液を 1-2 μ l 採取した。ミリ Q 水で 1000 倍に希釈後、誘導結合プラズマ質量分析装置を用いて Mg^{2+} 濃度を計測した¹⁸。

(4) 運動機能解析

α -Syn tg 並びに野生型マウスは、毎週 1 回程度、体重計測と肉眼による行動観察、足跡試験、ジャンプ試験を行った。

歩容の解析のための足跡検査は、前肢底と後肢底にそれぞれ赤と青のインクを塗布し、レーンを区切った 1mm マス目のグラフ用紙 80cm 程度の上を自由歩行させた。その足跡の第 II 指球部を足跡の「基準点」として、両前脚幅、両後脚幅、前後脚差を「マス目」で計測した。

α -Syn tg マウスは覚醒時のほとんどの時間をケージ壁に向かっての「飛び上がり」に費やす。この飛び上がりの頻度を「圧トランスジューサー」をケージの下に敷いてパソコンと連結し解析した。

(5) 線条体ドパミン量の計測

生後 24 週で深麻酔後エーテル深麻酔により屠殺して大脳線条体を採取し、Eliza 法によりドパミン量を定量した。

4. 研究成果

(1) 髄液中の Mg^{2+} 濃度

A 社の Mg-L-Th 飲用マウスでは、 α -Syn tg 並びに野生型マウスにおいて髄液 Mg 濃度は非飲用群より高い傾向を示したが統計的に

有意差は認められず、B 社の Mg-L-Th 飲用群でも髄液 Mg 濃度に差は見られなかった。

(2) 運動機能解析では、「足跡検査」で、前脚幅、両後脚幅、前後脚差に、Mg-L-Th の飲用群、非飲用群で差は見られなかった。「飛び上がり解析」でも、Mg-L-Th の飲用群、非飲用群で差は見られなかった。

(3) A 社の Mg-L-Th 投与群で、 α -Syn tg の線条体ドパミン量は有意に増加していた。一方 B 社の Mg-L-Th にはドパミンの有意な増加は見られなかった。

参考文献

1. Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG, Montine TJ. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am J Pathol* 1999; 154: 1423-1429
2. Hattori N, Tanaka M, Ozawa T, Mizuno Y. Immunohistochemical Studies on complexes I, II, III, and VI of mitochondria in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1991; 30: 563-571
3. Jellinger KA. The role of iron in neurodegeneration : prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Drugs Aging* 1999; 14: 115-140
4. Yokoyama H, Yano R, Kuroiwa H, Tsukada T, Uchida H, Kato H, Kasahara J, Araki T. Therapeutic effect of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) neurotoxicity in mice. *Metab Brain Dis* 2010; 25: 135-143
5. Golts N, Snyder H, Frasier M, theisler C, Choi P, Wolozin B. Magnesium inhibits spontaneous and iron-induced aggregation of alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2002; 277: 16116-16123
6. Bocca B, Alimonti A, Senofonte O, Pino A, Violante N, Petrucci F, Sancesario G, Forte G. Metal changes in CSF and peripheral compartments of parkinsonian patients. *J*

- Neurol Sci* 2006; 248: 23-30
7. Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, Montessuit S, Richter C, Sadoul R, Mazzei G, Nichols A, Martinou JC. Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg^{2+} ions. *J Cell Biol* 1998; 143: 217-224
 8. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herber A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* 1984; 307: 462-465
 9. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 1984; 309: 261-263.
 10. Lin JY, Chung SY, Lin MC, Cheng FC. Effects of magnesium sulfate on energy metabolites and glutamate in the cortex during focal cerebral ischemia and reperfusion in the gerbil monitored by a dural-probe microdialysis technique. *Life Sci* 2002; 71: 803-811
 11. Cojocaru M, Cojocaru IM, Muuroi C, Botezat M, Lazar L, Duruta A. Serum magnesium concentrations in migraine with aura. *Advances in Magnesium research: new data* 2006, pp31-35
 12. Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta* 2000; 294: 1-26.
 13. Oyanagi K, Hashimoto T. Magnesium in Parkinson's disease: an update in clinical and basic aspects. In: Vink R, Nechifor M, eds. *Magnesium in the central nervous system*. University of Adelaide Press, South Australia, 2011, pp229-236
 14. Oyanagi K, Hashimoto T, Yamazaki M. Parkinsonism-dementia complex. In: Dickson DW, Weller RO, eds. *Neurodegeneration. The molecular pathology of dementia and movement disorders*. 2nd ed. Wiley-Blackwell, Oxford, 2011, pp171-178
 15. Oyanagi K, Kawakami E, Kikuchi-Horie K, Ohara K, Ogata K, Takahama S, Wada M, Kihira T, Yasui M. Magnesium deficiency over generations in rats with special references to the pathogenesis of the parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam. *Neuropathology* 2006; 26: 115-128
 16. Hashimoto T, Nishi K, Nagasao J, Tsuji S, Oyanagi K. Magnesium exerts both preventive and ameliorating effects in an in vitro rat Parkinson disease model involving 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP^{+}) toxicity in dopaminergic neurons. *Brain Res* 2008; 1197: 143-151
 17. Rockenstein E, Mallory M, Hashimoto M, Song D, Shults CW, Lang I, Masliah E. Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing α -synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *J Neurosci Res* 2002; 68: 568-578
 18. Sun L, Kosugi Y, Kawakami E, Piao Y-S, Hashimoto T, Oyanagi K. Magnesium concentration in the cerebrospinal fluid of mice and its response to changes in serum magnesium concentration. *Magn Res* 2009; 22: 266-272
 19. Slutsky I, Abumaria N, Wu LJ, Huang C, Zhang L, Li B, Zhao X, Govindarajan A, Zhao MG, Zhuo M, Tonegawa S, Liu G. Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron* 2010; 65: 165-177
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 2 件）

1. Kaneko M, Noguchi T, Ikegami S, Sakurai T, Kakita A, Toyoshima Y, Kamve T, Yamada M, Inden M, Hara H, Oyanagi K, Inuzuka T, Takahashi H, Hozumi I: Zinc transporter (ZnT3 and 6) are downregulated in the spinal cords of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci Res 93: 370-379, 2015, 査読有
2. Ito U, Hakamata Y, Watabe K, Oyanagi K: Mannitol infusion immediately after reperfusion suppresses the development of focal cortical infarction after temporary cerebral ischemia in gerbils. *Neuropathology* 34: 360-369, 2014, 査読有

〔その他〕

ホームページ等

http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/department/medical_science/course/course35.php

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-nanbyou/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小柳 清光 (OYANAGI, Kiyomitsu)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：00134958

(2)研究分担者

鈴木 絵美 (香山 絵美) (SUZUKI, Emi)

信州大学・医学部・研究員

研究者番号：80623686

藤田 雅代 (FUJITA, Masayo)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・研究員

研究者番号：90415539

(3)連携研究者

()

研究者番号：