

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870441

研究課題名(和文)パーキンソン病モデル細胞における シヌクレインとSOCE機構の関連についての研究

研究課題名(英文)The association between alpha-synuclein and SOCE mechanism in cellular models of Parkinson's disease.

研究代表者

伊藤 悟(Ito, Satoru)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20448195

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)：パーキンソン病(PD)は脳内に シヌクレイン(AS)蛋白凝集体を形成する。PD患者の脳で小胞体内カルシウム安定化機構であるTRPC1カルシウムチャネルの発現が低下していることが知られており、PDモデル細胞にて解析を行った。培養細胞PC12を用いてヒトAS蛋白を過剰発現できる系を構築しTRPC1とASとの関連性を調査した。まずミトコンドリア神経毒で細胞を刺激したところTRPC1蛋白の発現が抑制された。AS発現はこのTRPC1チャネルの発現量に影響しなかったが、阻害剤にてTRPC1チャネルを抑制した条件ではAS関連性の細胞死が誘導されたためTRPC1チャネルはASの上流シグナルにあると推察された。

研究成果の概要(英文)：The endogenous store-operated calcium entry (SOCE) mechanism via TRPC1 channel is important to the maintenance of endoplasmic reticulum function. In recent years, a decreased expression level of TRPC1 was shown in the autopsied brain of Parkinson's disease (PD) patients. In addition, α -synuclein (AS) is also known to have cytotoxicity to the dopaminergic cells in PD. We investigated the association between SOCE mechanism and AS pathology. We constructed PC12 cell line which overexpressed human AS. The expression level of TRPC1 was decreased by stimulation of mitochondrial stressors. Overexpression of human α -synuclein did not affect the TRPC1 suppression seen in mitochondrial stressor exposures. Meanwhile, TRPC1 inhibitor increased α -synuclein cytotoxicity. According to these results, it is considered that mitochondrial stressors causes dysfunction of SOCE by inhibition of TRPC1 expression, and TRPC1 inhibition may lead to enhance the α -synuclein cytotoxicity.

研究分野：神経内科学、神経分子生物学

キーワード：パーキンソン病 小胞体 TRPC1チャネル カルシウムチャネル モデル細胞 PC12細胞 ミトコンドリア毒性 SOCE機構

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は、動作緩慢、筋強剛、振戦、姿勢反射障害などの症状を呈する難治性の神経変性疾患である。少数の家系に遺伝が確認されているが、大部分は孤発例であり、高齢者に発症するために加齢性変性との関連が考えられる。病理所見として、黒質ドパミン神経や橋青斑核などに封入体であるレビー小体が出現し、神経細胞脱落がみられる特徴がある。シヌクレイン蛋白は常染色体優性遺伝性パーキンソン病である PARK1 あるいは PARK4 の原因遺伝子産物であり、同時にレビー小体の主要構成成分であり、ドパミン神経における細胞死へも関与していることが報告されている。

しかし、如何なる機序でレビー小体形成が起こり、ドパミン神経細胞死が誘発されるのか、その機序については未だ不明な点が多い。ただ、パーキンソン病全体では孤発例が多いこともあり、シヌクレインに加齢や、飢餓、酸化ストレス、ミトコンドリアストレス、小胞体ストレスといった細胞環境ストレスが2次的に加わることによって、少量のタンパク質であっても凝集しやすくなるものと考えられてきている。

申請者はこれまでに、パーキンソン病モデルとして、ドパミン細胞である PC12 培養細胞に、野生型ヒトシヌクレイン、変異型シヌクレイン、野生型ヒトシヌクレインを、それぞれテトラサイクリン調節機構によって過剰発現できる細胞系を構築してきた。その解析の結果、シヌクレイン過剰発現下では、長期培養や小胞体ストレス、ミトコンドリアストレスなどの各種ストレスに脆弱になることが確認された。また、小胞体ストレス下ではシヌクレインの重合化が促進される現象も確認されたが、その一方で、過剰なシヌクレインは小胞体-ゴルジ輸送を阻害することも示した (S. Ito, et al. Neuroscience Research. 2010.)。

パーキンソン病の病態において、ミトコンドリアや小胞体機能不全、ユビキチン・プロテアソーム機構 (UPS) 破綻などのそれぞれが原因のひとつとして考えられるが、それらの関連性についての明確な結論はついておらず、一連の障害を結び付ける病態の解明は必須であると考えられる。近年、パーキンソン病における小胞体機能障害において Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) カルシウムチャネル機能不全からの endogenous store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) 機構破綻が存在することが報告されている (Selvaraj S, et al. J Clin Invest. 2012)。ただ、SOCE 機構破綻とシヌクレイン蛋白との関連については未だ解明

されていない状況である。

2. 研究の目的

SOCE 機構は Ca²⁺透過型イオンチャネルである TRPC1 チャネルを介した Ca 流入の調節により小胞体内 Ca 蓄積の安定化に働く機構である。この SOCE 機構は、神経毒の刺激により TRPC1 チャネルのダウンレギュレーションを介してその機能低下を起こすとされている。SOCE とシヌクレイン蛋白との関連については未だ解明されていない状況であり、本研究ではシヌクレイン重合と SOCE 機能障害との関連に注目し、研究を行うこととした。

3. 研究の方法

1) MPTP やロテノンといった薬剤性パーキンソン病モデルに使用される薬剤を用いて、細胞死の評価と、薬剤の条件設定を行う。シヌクレイン蛋白はテトラサイクリン過剰発現系で調節発現が可能であるため、シヌクレインの発現/非発現時において MPTP やロテノンなどの細胞死誘導薬剤の投与条件も決定する。

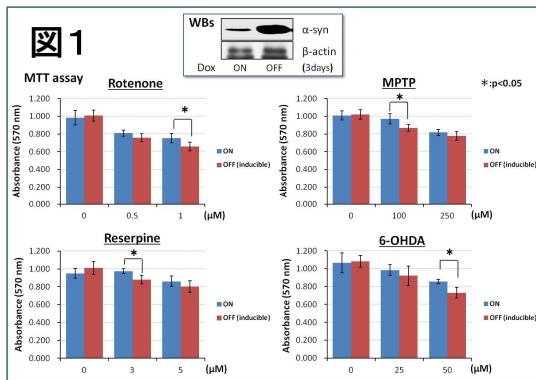
2) その条件下での SOCE 機構の評価を行う。また、細胞内 Ca 流入に伴い、細胞内 pH の変化などが影響することが予想されるため、細胞内 Ca 流入、細胞内 pH の動態を各条件下にて経時的に検討する。

3) 各オルガネラ障害、SOCE 機構などについてシヌクレイン過剰発現下での変化を観察し、シヌクレイン重合化との関連を調べる。

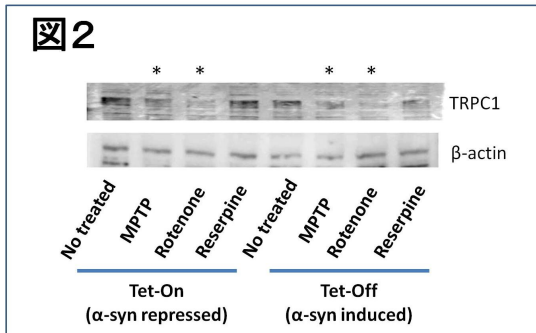
4) TRPC1 チャネルアゴニストなどの細胞保護効果を検討し、細胞内 Ca 流入や細胞内 pH 変化といった観点から細胞死抑制効果をもつ物質を探索する。

4. 研究成果

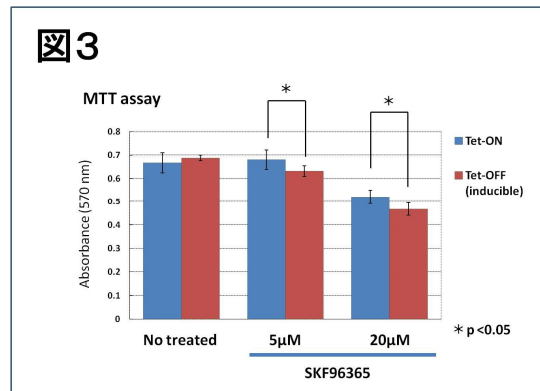
1) テトラサイクリン調節系にシヌクレインを過剰発現する PC12 細胞を用いて検討した。パーキンソン病モデルとして使用される MPTP やロテノン、レセルピン、6-OHDA などの神経毒と培地投与した状況での細胞死を MTT 法にて検討した。その結果、いずれの神経毒を投与した場合でも、シヌクレインを過剰発現している状態のほうが有意に細胞死を誘導していた (図 1)。



2)同様の神経毒を投与した条件において、ウェスタンブロット法にて TRPC1 タンパクの発現を確認したところ、Rotenone と MPTP では TRPC1 の発現が抑制されていた (図 2) .しかし、Reserpine では TRPC1 発現は抑制されなかった。また、Rotenone と MPTP でみられた TRPC1 の発現抑制について、ヒト シヌクレインの過剰発現は影響を与えていなかった。TRPC1 が抑制される病態はヒト シヌクレインが毒性をもつ病態の上流にある病態であると推察された。



3)TRPC1 の抑制が シヌクレイン毒性の上流にある病態かどうかを検討するため、次に TRPC1 の阻害剤である SKF96365 を投与した状態で シヌクレインの関連性を MTT 法にて評価した。その結果、5 μM と 20 μM の SKF96365 を投与した条件では、シヌクレインの非発現条件(Tet-On)に比較して発現条件(Tet-Off)で、それぞれ 7.2%、10.2%の生存率低下が確認された (図 3) .この細胞死解析の観点からは、TRPC1 阻害は シヌクレインに関連した細胞障害性を増強させていることが予想された。この機序の詳細はまだ不明であるが、細胞内 Ca や酸塩基平衡、シヌクレインの重合化などの病態が関与していることが推測されるため、現在解析を進めている状況である。



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 4 件)
斜台骨髄炎と海綿静脈洞部腫瘍性病変を呈しステロイドが奏功した Lemierre 症候群の 1 例 . 高橋正太郎, 伊藤悟, 田頭秀悟, 安井建一, 渡辺保裕, 中島健二 . 臨床神経学 . 査読有 . 55 : 327 - 332 , 2015

Parkinson 病にみられた性欲過剰症状に抑肝散が有効であった 1 例 . 伊藤悟, 安井建一, 田中 健一郎, 渡辺保裕, 中島健二 . 神経治療学 . 査読有 . 31 : 431-434, 2014.

在宅人工呼吸器装着患者の災害時個別支援マニュアルの作成 . 古和久典, 北山通朗, 朝妻光子, 神谷利恵, 鷺見美和, 伊藤悟, 瀧川洋史, 中島健二 . 難病と在宅ケア . 査読無 . 19 : 25-28, 2013.

Dopamine-Mediated Oxidation of Methionine 127 in α -Synuclein Causes Cytotoxicity and Oligomerization of α -Synuclein. Nakaso K, Tajima N, Ito S, Teraoka M, Yamashita A, Horikoshi Y, Kikuchi D, Mochida S, Nakashima K, Matura T. PLoS One. 査読有 .8: e55068, 2013.

[学会発表](計 3 件)
伊藤悟, 中曾一裕, 中島健二 . Cytotoxicity associated with mitochondrial stressor -induced TRPC1 inhibition in PC12 cells overexpressing human alpha-synuclein. 日本神経科学大会 . 2014 年 9 月 11 日 ~ 9 月 13 日, パシフィコ横浜(横浜市) .

伊藤悟 . パーキンソン病にみられた性欲過剰症状に抑肝散が有効であった 1 例 . 日本神経治療学会総会 . 2013 年 11 月 21 ~ 23 日 . 東京ドームホテル(文京区) .

伊藤悟.下垂体病変を合併しインフリキシマブ静注療法にて部分改善を認めた難治性神経パセツト病の1例.日本神経学会.2013年6月29日.松山市総合コミュニティーセンター(松山市).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 悟 (ITO, Satoru)
鳥取大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20448195

(2)研究協力者

中曾 一裕 (NAKASO, Kazuhiro)
中島 健二 (NAKASHIMA, Kenji)