

平成 30 年 7 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2015～2017

課題番号：15KK0354

研究課題名（和文）2段階モデルに基づく新規パーキンソン病マウスの確立（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Generation of new mouse model for Parkinson's disease(Fostering Joint International Research)

研究代表者

船山 学（FUNAYAMA, Manabu）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70468578

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：新規パーキンソン病遺伝子CHCHD2はミトコンドリアに関連しているが、その病態機序は不明である。本研究ではCHCHD2とミトコンドリアとの関与を解明するためCHCHD2-KO細胞を作製し、ミトコンドリア表現型解析を行った。ATPレベルおよびATP合成能はCHCHD2-KOにおいて劇的に減少した。ATPレベルは野生型CHCHD2過剰発現によって回復したが、変異CHCHD2では回復しなかった。膜電位、ROSおよびスーパーオキシドはCHCHD2-KOにおいて有意に増加した。CHCHD2は多くのミトコンドリア機能と関連しており、CHCHD2-KO細胞は有用なパーキンソン病細胞モデルとなり得る。

研究成果の概要（英文）：We recently identified CHCHD2 mutations as a novel gene associated with autosomal dominant Parkinson's disease (PD). CHCHD2 is localized to mitochondria and linked to mitochondrial complex IV function, however, its pathogenic mechanisms remain largely unknown. To elucidate the involvement between CHCHD2 and mitochondria, we generated CHCHD2-KO cells using CRISPR/Cas9 techniques, and performed mitochondrial phenotyping. Steady state ATP level and ATP synthesis rate were dramatically decreased in CHCHD2-KO cells. Steady state ATP level was partially rescued by overexpression of wildtype CHCHD2, but not by PD linked mutants of CHCHD2 (T61I and R145Q). Mitochondrial membrane potential, ROS, and superoxide were markedly and significantly increased in CHCHD2-KO cells. In conclusion, Loss of CHCHD2 impairs multiple mitochondrial functions and CHCHD2 KO cells may provide a useful cell model for understanding CHCHD2 function and pathophysiology of CHCHD2 mutations and PD.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：パーキンソン病 ミトコンドリア CHCHD2 遺伝 呼吸鎖複合体 神経分化

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は最も頻度の高い運動障害性神経変性疾患であり、加齢にともないその発症リスクが高くなるため、超高齢社会へ突入した本邦ではその疾患克服は喫緊の課題である。パーキンソン病のほとんどが孤発性で発症するが、患者の5-10%では何らかの遺伝歴があると推定されている。このような家族性パーキンソン病患者や家系を調査することで、パーキンソン病の発症に関与する遺伝子の情報を得ることができる。現在までに、20-30種類の遺伝子がパーキンソン病関連遺伝子として発表されている。2015年、研究代表者らは新規家族性パーキンソン病原因遺伝子として *Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2* (*CHCHD2*) を発見した。*CHCHD2* は常染色体優性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子で、これまでに4家系から3種類の病的変異を同定した。*CHCHD2* はミトコンドリアに局在し、*CHCHD2* をノックダウンするとミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV の活性が低下すると報告されている (PLoS Genet. 2009)。神経毒の 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) がドーパミン神経変性をともなうパーキンソン病様症状を引き起こし (Science. 1983)、さらに MPTP がミトコンドリア呼吸鎖複合体 I を阻害することから (Biochem Biophys Res Commun. 1986)、パーキンソン病発症とミトコンドリアは密接に関与することが指摘されてきたが、パーキンソン病の原因遺伝子でミトコンドリア呼吸鎖複合体に関与するものは *CHCHD2* が初めての報告である。しかしながら *CHCHD2* 変異によってなぜパーキンソン病を発症するか、そのメカニズムは未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

家族性パーキンソン病の新規原因遺伝子である *CHCHD2* の病態機能を明らかにするため、*CHCHD2* ノックアウトマウスをもちいて種々の解析を行う。その前段階として、ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞に CRISPR/Cas9 システムをもちいて *CHCHD2* ノックアウト SH-SY5Y 細胞を作製し、主にミトコンドリア機能に着目して *CHCHD2* ノックアウト細胞の表現型を解析する。得られた表現型について *CHCHD2* ノックアウトマウスで検証し、*CHCHD2* ノックアウトマウスが新規パーキンソン病モデルマウスとなりうるか検討する。本研究では上記の中で、ミトコンドリア研究分野で著名なオーストラリアシドニー大学/Kolling 研究所の Carolyn M Sue 教授の指導の下、*CHCHD2* ノックアウト細胞のミトコンドリア表現型解析を実施する。また、SH-SY5Y 細胞はレチノイン酸処理によってドーパミンニューロンの特徴を有した成熟神経細胞に分化誘導できることが知られている。これまでに *CHCHD2* の発現量が神

経分化に影響を及ぼすことが報告されており (Genomics. 2015、J Cell Biol. 2016)、*CHCHD2* ノックアウト SH-SY5Y 細胞をもちいて *CHCHD2* 発現の神経分化に対する影響についても検証する。

3. 研究の方法

(1) ノックアウト細胞の作製

NextGEN CRISPR system (株式会社アプロサイエンス、徳島) をもちいて *CHCHD2* ノックアウト SH-SY5Y 細胞を作製した。gRNA は *CHCHD2* の開始コドンを選択的としてデザインした。ゲノム編集後の SH-SY5Y 細胞を限界希釈法でシングルセルクローニングし、ゲノム DNA を抽出後、標的部位を PCR 増幅し、TA クローニング法によりクローニングし、サンガー法で配列を確認した。両アレル共にフレームシフト変異が確認されたクローンについて、RT-qPCR 法およびウエスタンブロット法で *CHCHD2* の発現の有無を確認した。使用した抗体は *CHCHD2* (Abcam, Cambridge, UK) および actin (Merck, Darmstadt, Germany) である。

(2) 酸素消費速度 (oxygen consumption rate: OCR) および細胞外酸性化速度 (extracellular acidification rate: ECAR) の測定

OCR および ECAR は細胞外フラックスアナライザー (Agilent, Santa Clara, CA) をもちいて測定した。細胞を各ウェルに 70,000 個播種し、37°C 5% CO₂ で一晚培養後、測定培地に交換し、OCR および ECAR を測定した。OCR は Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit (Agilent)、ECAR は XF Glycolysis Stress Test kit (Agilent) をもちいた。測定後、CyQuant Cell Proliferation Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で細胞数を計測し、OCR および ECAR を補正した。

(3) 細胞内 ATP 量および ATP 合成能の測定

細胞を各ウェルに 3x10⁵ 個播種し、37°C 5% CO₂ で一晚培養後、細胞を回収し、BCA 法でタンパク量を定量した。各サンプル 1 mg/mL となるように細胞懸濁バッファーに懸濁した。基質バッファーと混合し、すぐ反応停止させたものを ATP 量用サンプル、37°C 10 分反応後反応停止させたものを ATP 合成能用サンプルとした。ATP の測定は ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (Merck) をもちい、発光強度をルミノメーターで測定した。

(4) 酸化ストレス測定

細胞を各ウェルに 70,000 個播種し、37°C 5% CO₂ で一晚培養後、活性酸素の測定として、5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H2DCFDA) (Thermo Fisher Scientific)、スーパーオキシドの測定として MitoSOX™ Red

(Thermo Fisher Scientific) を添加し、37°C 30 分反応後 HBSS (Mg²⁺、Ca²⁺) に置換し、蛍光プレートリーダーで蛍光強度を測定した。

(5) ミトコンドリア膜電位の測定
細胞を各ウェルに 70,000 個播種し、37°C 5% CO₂ で一晩培養後、tetramethylrhodamine, methyl ester (TMRM) (Thermo Fisher Scientific) を添加し、37°C 30 分反応後 HBSS (Mg²⁺、Ca²⁺) (Thermo Fisher Scientific) に置換し、蛍光プレートリーダーで蛍光強度を測定した。

(6) レチノイン酸処理による分化誘導
野生型コントロール SH-SY5Y 細胞および CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞それぞれ 1 ウェルに 1x10⁵ 個の細胞を播種し、レチノイン酸 1 μM を 7 日間またはレチノイン酸 10 μM を 6 日間処理した。対照として DMSO を 7 日間および 6 日間処理した細胞を用意した。レチノイン酸処理後、細胞を回収しウエスタンブロット法で分化の程度を検討した。もちいた抗体は Nestin (幼若神経細胞: Abcam)、Synaptophysin (成熟神経細胞: Abcam)、beta III tubulin (成熟神経細胞: Abcam)、GFAP (アストロサイト: Abcam)、および CHCHD2、actin (前述) である。

4. 研究成果

(1) ノックアウト細胞の作製

CRISPR/Cas9 システムをもちいて CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞を作製した結果、1 クローンの CHCHD2 ノックアウト細胞が作製できた。この細胞から RNA を精製し qPCR を実施した結果、ゲノム編集未施行の SH-SY5Y 細胞 (野生型) に比べ著明に CHCHD2 mRNA 発現量が低下していた (図 1 下左)。さらにウエスタンブロット法で CHCHD2 タンパク質を確認した結果、mRNA の結果と同様に、野生型と比べ著明な発現量低下を確認することができ (図 1 下右)、CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞が作製できたことが確認された。

(2) OCR および ECAR の測定

細胞外フラックスアナライザーをもちいた OCR 測定の結果、CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞は野生型に比べ酸素消費量が著しく低下していることが明らかとなった (図 2 上)。すなわち CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞はミトコンドリア活性が低下していることが示唆された。一方、ECAR 測定の結果、CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞は定常状態で野生型に比べ ECAR が促進していた (図 2 下)。このことは CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞ではミトコンドリア呼吸鎖の活性が低下した結果、解糖系が亢進していることを示唆する結果である。

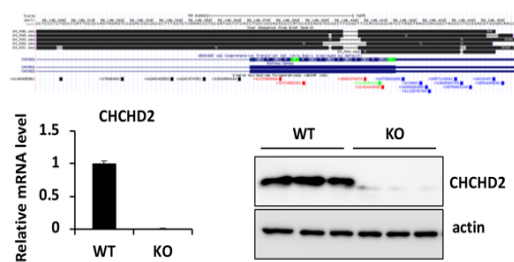
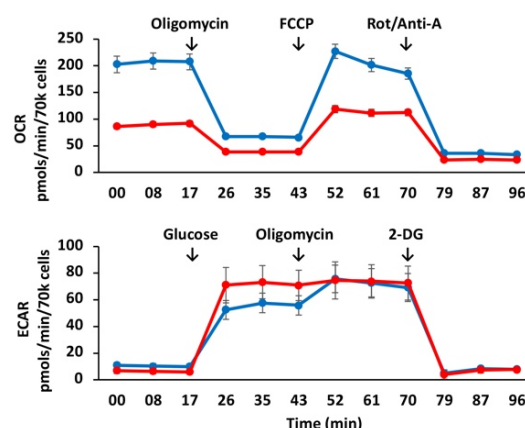


図 1. CHCHD2 ノックアウト細胞における配列解析および CHCHD2 発現量の測定

(上) TA クローニングした CHCHD2 PCR 産物のシーケンス解析結果。中央のギャップ部分がフレームシフト変異を示す。(下左) qPCR 法による CHCHD2 mRNA 発現量の比較。(下右) ウエスタンブロット法による CHCHD2 タンパク量の比較。WT: 野生型、KO: ノックアウト。qPCR、ウエスタンブロット共に内在コントロールとして actin を同時測定した。

図 2. OCR および ECAR の測定



上段は OCR、下段は ECAR の結果。青線が野生型、赤線がノックアウト細胞の結果を表す。

(3) 細胞内 ATP 量および ATP 合成能の測定

CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞の ATP 量 (図 3 右) および ATP 合成能 (図 3 左) はどちらも野生型に比べ著明かつ有意に低下していた。ノックアウト細胞に野生型 CHCHD2、およびパーキンソン病患者から同定した変異型 CHCHD2 (T61I および R145Q) を過剰発現した細胞において ATP 量および ATP 合成能を測定した結果、ATP 合成能では有意な回復は観察されなかったが、ATP 量では野生型 CHCHD2 を発現させた細胞のみ、ゲノム編集をしていない野生型コントロール SH-SY5Y 細胞と統計的に差が無いレベルまで回復した (図 3 左: KO+WT)。このことからパーキンソン病患者から同定した変異型 CHCHD2 は ATP 合成に何らかの阻害効果をもつことが示唆された。

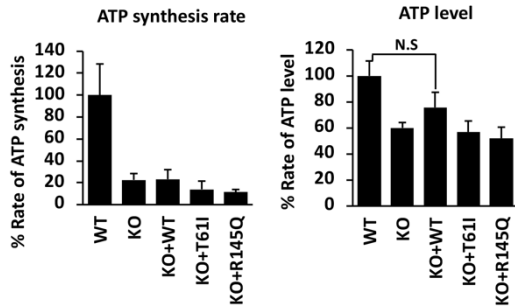


図3. 細胞内ATP量およびATP合成能の測定
ATP量およびATP合成能はそれぞれゲノム編集をしていない野生型コントロール SH-SY5Y 細胞 (WT)、CHCHD2 ノックアウト細胞 (KO)、KO 細胞に野生型 CHCHD2 を過剰発現した細胞 (KO+WT)、KO 細胞にパーキンソン病患者から同定された変異 CHCHD2 を過剰発現した細胞 (KO+T61I および KO+R145Q) について測定した。

(4) 酸化ストレス測定

①～③の結果から CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞はミトコンドリア呼吸鎖複体の活性低下が示唆された。ミトコンドリア呼吸鎖複体が活性低下すると酸化ストレスが増大することが予想されるため、CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞の酸化ストレス状態を測定した。CM-H₂DCFDA および MitoSOX™ Red をもちいた酸化ストレス物質の定量を行った結果、過酸化水素およびスーパーオキシド共に CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞において有意に上昇していることが明らかになった。したがって、CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞では野生型に比べ酸化ストレスが上昇していることが示唆された。

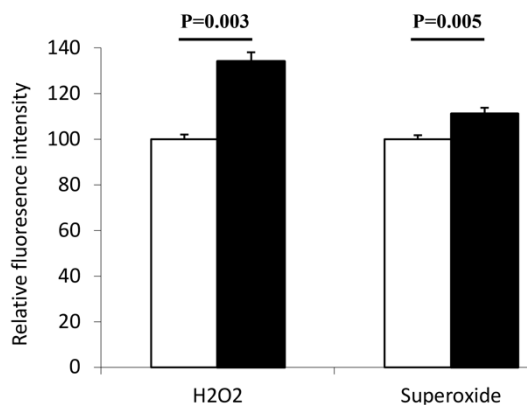


図4. 酸化ストレス測定

過酸化水素 (H₂O₂) およびスーパーオキシド (Superoxide) の測定結果。白棒グラフが野生型コントロール SH-SY5Y 細胞、黒棒グラフが CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞の結果を表す。

(5) ミトコンドリア膜電位の測定

ミトコンドリアのATP合成を阻害するとミトコンドリア膜電位が上昇することが報告されている (Cytometry 1998)。①～③の結果、CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞はATP合成が著しく低下しているため、ミトコンドリア膜電位が上昇していることが予想された。そこで、TMRM をもちいてミトコンドリア膜電位の定量を行った。その結果、CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞は野生型コントロール SH-SY5Y 細胞に比べミトコンドリア膜電位が有意に上昇していることが明らかとなった。このミトコンドリア膜電位の上昇は CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞のATP合成能低下に起因していると考えられた。

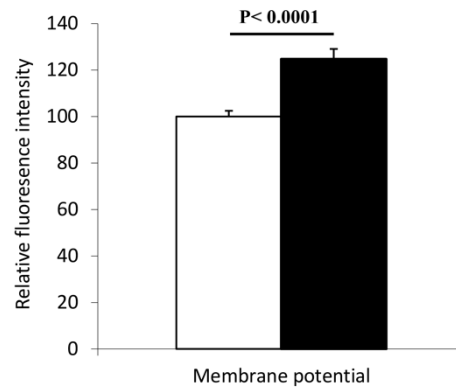


図5. ミトコンドリア膜電位の比較

TMRM をもちいたミトコンドリア膜電位測定の結果。白棒グラフが野生型コントロール SH-SY5Y 細胞、黒棒グラフが CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞の結果を表す。

(6) レチノイン酸による神経分化に対する CHCHD2 発現の影響

野生型コントロール SH-SY5Y 細胞 (WT) および CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞 (KO) にレチノイン酸処理後の神経分化についてウェスタンブロット法で検討した。1 μM レチノイン酸処理では幼若神経細胞マーカーである nestin の発現が上昇するが、CHCHD2 発現の有無で nestin 発現量に差は観察されなかった。一方、10 μM レチノイン酸処理では成熟神経細胞マーカーである synaptophysin が高発現していた。このことから、レチノイン酸処理による神経分化の程度は DMSO 処理 < 1 μM レチノイン酸処理 < 10 μM レチノイン酸処理の順で進行していることが示唆された。このときの WT 細胞における CHCHD2 発現量は DMSO 処理 > 1 μM レチノイン酸処理 > 10 μM レチノイン酸処理の順で減少していることが観察された。つまり、CHCHD2 発現量は神経細胞の分化の程度と逆相関することが明らかとなった。

一方、KO 細胞では、レチノイン酸未処理での nestin (幼若神経細胞マーカー) の発現量と全条件における synaptophysin の発現量が KO 細胞に比べ著しく低下していることがわか

った。このことから、CHCHD2は神経分化初期の未熟～幼若な神経細胞において、その先の分化誘導に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

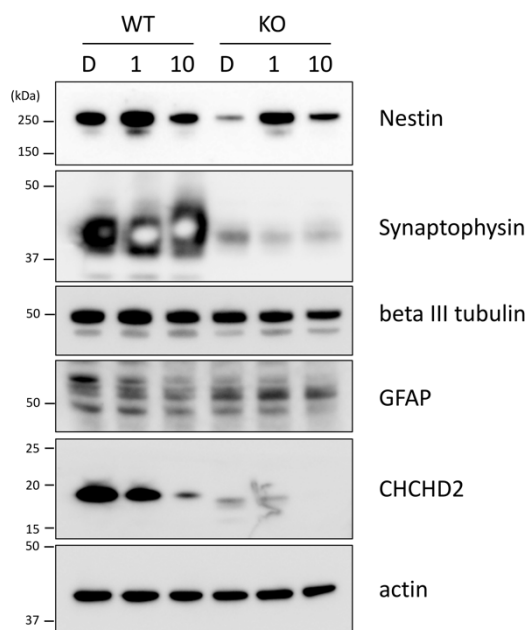


図 6. レチノイン酸処理による神経分化の比較

野生型コントロール SH-SY5Y 細胞 (WT) および CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞 (KO) にレチノイン酸 1 μM、7 日間 (1) またはレチノイン酸 10 μM、6 日間 (10) 処理した細胞の各種神経分化マーカーのウエスタンブロット。D: DMSO 処理: コントロール。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Sato S, Koike M, Funayama M, Ezaki J, Fukuda T, Ueno T, Uchiyama Y, Hattori N. Lysosomal Storage of Subunit c of Mitochondrial ATP Synthase in Brain-Specific Atp13a2-Deficient Mice. *Am J Pathol.* 186: 3074-3082, 2016. 査読あり
DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.08.006
- ② Yamashita C, Funayama M, Li Y, Yoshino H, Yamada H, Seino Y, Tomiyama H, Hattori N. Mutation screening of PLA2G6 in Japanese patients with early onset dystonia-parkinsonism. *J Neural Transm (Vienna).* 124: 431-435, 2017. DOI: 10.1007/s00702-016-1658-7 査読あり
- ③ Ikeda A, Matsushima T, Daida K, Nakajima S, Conedera S, Li Y, Yoshino H, Oyama G, Funayama M, Nishioka K, Hattori N. A novel mutation of CHCHD2

p.R8H in a sporadic case of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 34: 66-68, 2017.

DOI:

10.1016/j.parkreldis.2016.10.018 査読あり

- ④ Meng H, Yamashita C, Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Funayama M, Sato S, Hatta T, Natsume T, Umitsu M, Takagi J, Imai Y, Hattori N. Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. *Nat Commun.* 8: 15500, 2017. 査読あり
DOI: 10.1038/ncomms15500
- ⑤ Fujimaki M, Saiki S, Li Y, Kaga N, Taka H, Hatano T, Ishikawa KI, Oji Y, Mori A, Okuzumi A, Koinuma T, Ueno SI, Imamichi Y, Ueno T, Miura Y, Funayama M, Hattori N. Serum caffeine and metabolites are reliable biomarkers of early Parkinson's disease. *Neurology.* 90: 1-8, 2018. DOI: 10.1212/WNL.0000000000004888 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

- ① Funayama M, Hattori N. CHCHD2 is novel gene for autosomal dominant Parkinson's disease, 13th International Congress of Human Genetics, Kyoto, Japan, 2016. 4. 5.
- ② Funayama M, Hattori N. CHCHD2 is Novel Causative Gene for Autosomal Dominant Parkinson's disease, Symposium, 第 39 回日本神経科学大会, 横浜, 2016. 7. 20.
- ③ Funayama M, Park JS, Amo T, Funayama T, Akamatsu W, Sue CM, Hattori N. CHCHD2 deficiency leads to mitochondrial dysfunction and increasing oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, Japan, 2017. 9. 17.
- ④ 船山学, 池田彩, 松島隆史, 代田健祐, 中島翔, Silvio Conedera, 李元哲, 吉野浩代, 大山彦光, 西岡健弥, 服部信孝. 新規 CHCHD2 バリエントを同定した日本人孤発性パーキンソン病症例. 日本人類遺伝学会第 62 回大会, 神戸, 2017. 11. 17.

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/news/20170607-01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船山 学 (FUNAYAMA, Manabu)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70468578

(2) 研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

Carolyn M Sue (Carolyn M Sue)

シドニー大学/ Kolling 研究所・医学部・教授