

平成 21 年 11 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591026  
 研究課題名 (和文) 神経細胞死と封入体形成との関係をアグレソーム形成とオートファジーから探る  
 研究課題名 (英文) Relationship between neuronal death and inclusion body formation  
 研究代表者  
 澤田 秀幸 (HIDEYUKI SAWADA)  
 独立行政法人国立病院機構 (宇多野病院臨床研究部)・臨床研究部長  
 研究者番号 30335260

## 研究成果の概要：

パーキンソン病は、ドパミン神経の選択的細胞死と Lewy 小体と呼ばれる神経細胞台風入隊の出現を特徴とする神経変性疾患である。Lewy 小体の主要な構成要素には  $\alpha$  シヌクレインが含まれており、 $\alpha$  シヌクレインの 3 重複が家族性パーキンソン病を引き起こすことから両者は偶然的の合併でなく、この関係を理解することは、パーキンソン病の病態の理解に重要な治験をもたらす。パーキンソン病では、脳内ドパミン神経のみならずノルアドレナリン神経、セロトニン神経、さらに末梢神経である交感神経節後神経線維にも変性と封入体形成を生じる。これらの点からは、カテコラミンを神経細胞内に含有することが、神経細胞重要な要素であり、本研究では、この点に重点を置いて検討を進めた。その結果、神経細胞内のドパミンが神経細胞死に関与しており、ドパミントランスポーターの抑制により神経細胞死が回避できること (Izumi et al., 2008)、ドパミン負荷により、2 量体から 10 量体の  $\alpha$  シヌクレインが実際に細胞内に増大するものの、より分子量の大きなフィブリルは形成されず、封入体は形成されないこと (Yamakawa et al., 2009) が示された。これらの結果からは、ドパミン負荷は  $\alpha$  シヌクレインのオリゴマー形成と細胞死に関与するが、封入体形成には直接関与していない可能性が考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経細胞死、パーキンソン病、オリゴマー、ドパミン

## 1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化とともに患者数が急速に増大しているアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経難病の原因は特定されていないが、近年、家族性に発症するものについては原因遺伝子が特定され、また、その一部は遺

伝産物の機能が解明されてきた。常染色体劣性遺伝形式をとる若年性パーキンソニズム (Park2) の原因遺伝子産物 Parkin はユビキチンリガーゼ E3 の一つであり、このリガーゼによるユビキチン化の障害が発症の本質的な原因であることが解き明かされてい

る。しかし、大多数を占める孤発例については変性の機序はわかっておらず、その解明は急務である。申請者らは、孤発例の病理学的特徴である封入体形成と選択的ニューロン死の関係にその糸口を見つけないと考へた。封入体形成は、細胞内の不溶タンパクの処理結果である可能性があるが、この細胞内不溶タンパクの処理過程には、非選択的な処理過程であるオートファジー経路と選択的処理過程であるアグレソーム形成の2つの経路がある。Lewy 小体は、ユビキチン、 $\alpha$ シヌクレインを中間径フィラメントであるニューロフィラメントが取り囲むような構造をとっているが、アグレソームもまた、ユビキチン化されたタンパクを中間径フィラメントであるビメンチンが取り囲む構造をとっており、構造的には共通している。本研究では、この Lewy 小体形成とアグレソーム形成との類似性に着目し、Lewy 小体の主要な構成成分である  $\alpha$ シヌクレインの分子構造の変化、特に可溶性モノマーから最終的にアグレソームに集積するまでの過程とドーパミンニューロン死との関係に焦点を当てた。

## 2. 研究の目的

細胞内のタンパクは特定の三次元構造を保つことが機能維持に重要で、三次元構造が失われたものは、機能を喪失するのみならず、他の分子と結合、あるいは互いに重合することにより、細胞の機能を障害する。ユビキチンリガーゼは、こうした「ほどけた」タンパクを標識・処理する過程に重要な役割を果たすことから、ARJP の患者では Parkin の基質となる「ほどけた」タンパクが蓄積していると推定され、これまでに基質として Pael 受容体、グリコシル化  $\alpha$ シヌクレインなどが同定されている。一方、孤発型パーキンソン病では、選択的神経細胞死と細胞質内封入体である Lewy 小体が病理学的な特徴である。封入体と神経細胞死との関係については、1)前者が後者を促進する、2)前者は単なる随伴現象、3)前者は後者を回避するための現象である、という3つの可能性が考えられる。一方、申請者らは、これまでに封入体形成が促進される条件下ではドーパミンニューロン死はむしろ拮抗されることを *in vitro*, *in vivo* の両面から明らかにしてきた。アグレソーム形成が進むと光学顕微鏡でとらえられる封入体として観察されることになる。しかし、実際のパーキンソン病では、Lewy 小体が形成される割合は少なく、2-5%までである。これは、多くの変性過程にあるドーパミン神経では、目に見える封入体形成がなされていないが、ほどけた  $\alpha$ シヌクレインの重合化が起こっていることを示唆している。封入体形成が起こる前の段階での  $\alpha$ シヌクレインの重合状態を、特にドーパミン

との関係において明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

まず、細胞内ドーパミンの細胞死への影響を明らかにするため、PC12 細胞を用いて、細胞内のドーパミン含有量とグルタミン酸誘発細胞死との関連を検討した。

ついで、 $\alpha$ シヌクレインの重合状態について明らかにするために、 $\alpha$ シヌクレインを過剰発現させたヒトドーパミン神経由来ニューロblastoma である SH-SY5Y 細胞を用いて、ドーパミンを負荷した場合の  $\alpha$ シヌクレインの重合状態を検討した。

$\alpha$ シヌクレインの重合状態は、サイズ排除クロマトグラフィーと免疫電気泳動法とを組み合わせ検討した。

## 4. 研究成果

ラット初代培養を用いた系では、非ドーパミン神経に比べドーパミン神経はグルタミン酸毒性に対して脆弱で、このグルタミン酸誘発ドーパミン神経毒性は、NMDA 型受容体を介しており、MAP キナーゼの活性化を介していることが示された。

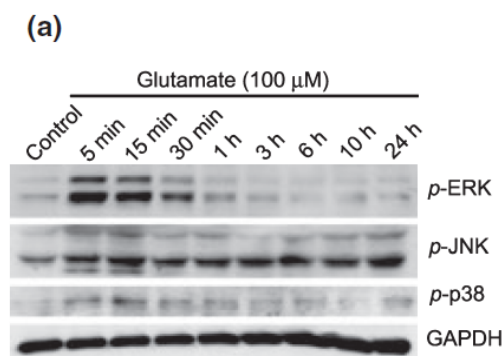


図1 グルタミン酸負荷時の MAP キナーゼの変化

グルタミン酸負荷により5-30分の間に ERK, JNK が活性化された。

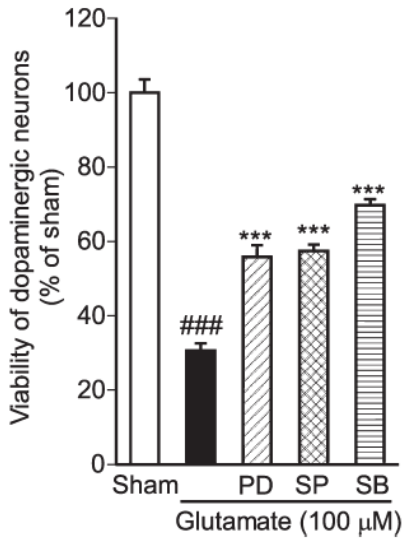


図2 グルタミン酸毒性は、ERK キナーゼ阻害薬である PD98059 (PD)、JNK 阻害薬である SP600125 (SP)、p-38 MAPK 阻害薬である SB203580(SB)によって拮抗された。

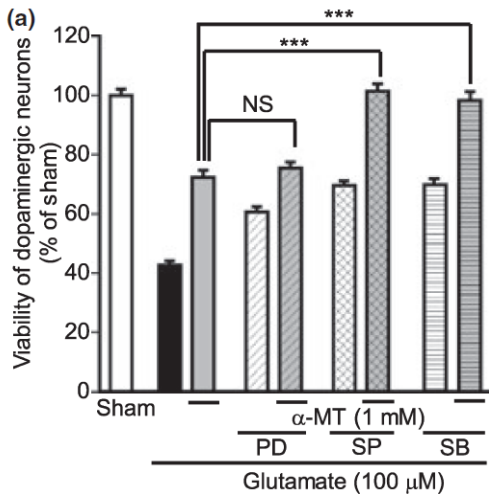


図3 グルタミン酸誘発神経細胞と内因性ドパミン、MAPK の関係

さらに、このドパミンニューロン死は、内因性ドパミンを  $\alpha$ -methyl-tyrosine により枯渇させると拮抗され、内因性ドパミンに依存していることが示された (図3)。一方、グルタミン酸負荷は、ドパミンニューロン内のチロシン水酸化酵素 (TH) のセリ

ン 31 をリン酸化し、TH 活性を増大させた。これらのことから、グルタミン酸誘発ドパミンニューロン死には、TH 活性の増大とナイン性ドパミンの増大が関与していることが示された。

ついで、細胞内ドパミンが  $\alpha$ シヌクレインの分子状態にどのような影響を与えるかを検討した。

検討は、野生型  $\alpha$ シヌクレインを過剰発現させた SH-SY5Y 細胞を用いて行った。まず、ドパミンを細胞培地中に負荷し、細胞内のドパミン濃度を調べたところ、負荷により細胞内ドパミン濃度が顕著に増大し、この増大はドパミントランスポーターを阻害すると拮抗された。ついで、ドパミン負荷により細胞内の  $\alpha$ シヌクレインに 2 量体、3 量体などのいわゆるオリゴマーが増大するかどうかをサイズ排除クロマトグラフィーにより分子量ごとに分取したサンプルを得、これをアルファシヌクレイン抗体を用いた免疫電気泳動で確認した。その結果、ドパミン負荷により SDS 耐性の 2 量体~8 量体までのオリゴマーが顕著に増大することが示された。

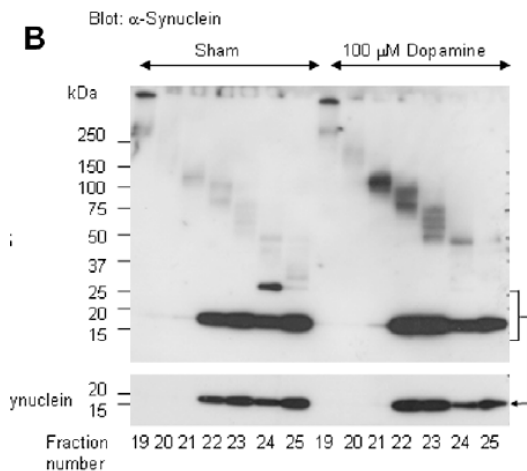


図4 サイズ排除クロマトグラフィーにより分取した各フラクションの電気泳動。ドパミン負荷により高分子の  $\alpha$ シヌクレインが増大し、この高分子  $\alpha$ シヌクレインはラダー状にならびオリゴマーを形成していることがしめされた。

さらに、このドパミン負荷により出現する $\alpha$ シヌクレインオリゴマーはドパミン負荷 24 時間後も継続していることが示された。一方、より分子量の大きなフィブリルは形成されず、封入体は形成されなかった。これらの結果からは、ドパミン負荷は $\alpha$ シヌクレインのオリゴマー形成と細胞死に関与するが、封入体形成には直接関与していない可能性が考えられた。

#### 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 6 件)

- ① Izumi Y, Yamamoto N, Kume T, Katsuki H, Sawada H, Akaike A. Regulation of intracellular dopamine levels by dopaminergic drugs: Involvement of vesicular monoamine transporter. *Eur J Pharmacol*. 582: 52-61, 2008
- ② Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, Takahashi R, Shimahama S. Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease model. *J Neurosci Res* 87: 576-585, 2009
- ③ Izumi Y, Yamamoto N, Matsuo T, Wakita S, Takeuchi H, Kume T, Katsuki H, Sawada H, Akaike A. Vulnerability to glutamate toxicity of dopaminergic neurons is dependent on endogenous dopamine and MAPK activation. *J Neurochem* 110: 745-755, 2009
- ④ Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, Takahashi R, Shimohama S, Sawada H. Dopamine facilitates a-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Comm* (in press).
- ⑤ Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, Kitagawa N, Mizuta E, Hosokawa R, Ohba M, Nishio R, Yamakawa K, Takeuchi H, Shimohama S, Takahashi R, Kawamura T. Diagnostic accuracy of cardiac metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson disease. *Eur J Neurol* 16: 174-182, 2009

⑥ 澤田秀幸 パーキンソン病における交感神経節後線維の障害 自律神経 44 巻 180-186, 2007

[学会発表] (計 3 件)

- ① Yamamoto N, Sawada H, Izumi Y, et al. Induction of heme oxygenase-1 by proteasome inhibition is involved in the protection of dopaminergic neurons: implication of ubiquitin-proteasome degradation. XVIIth WFN World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders (2007) Amsterdam, Netherland
- ② Takeuchi H, Yanagida K, Takata K, et al. Nicotine provides protective effects in dopaminergic neurons via the nicotinic receptors. XVIIth WFN World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders (2007) Amsterdam, Netherland
- ③ Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, et al. Cardiac metaiodobenzylguanidine scintigraphy as a peripheral biomarker for the diagnosis of Parkinson disease. XVIIth WFN World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders (2007) Amsterdam, Netherland

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

パーキンソン病診断キット

発明者: 澤田秀幸、下濱 俊

出願の日: 平成 15 年 12 月 4 日

特願 2003-405942

国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田秀幸 (SAWADA HIDEYUKI)

独立行政法人国立病院機構 (宇多野病院臨床研究部)・臨床研究部長

研究者番号: 30335260

(2) 研究分担者

山本兼司 (YAMAMOTO KENJI)

独立行政法人国立病院機構 (宇多野病院臨床研究部)・研究員

研究者番号: 50378775

(3) 連携研究者

泉安彦 (IZUMI YASUHIKO)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号 60456837