

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790830

研究課題名(和文)

リン酸化 α -シヌクレインとドパミンの相乗的細胞毒性に関する研究

研究課題名(英文)

Cytotoxic effect induced by phosphorylated alpha-synuclein and dopamine

研究代表者

菅野 直人 (Sugeno Naoto)

東北大学・病院・医員

研究者番号：30509550

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病は神経変性疾患としてはアルツハイマー病に次いで有病率の高い疾患である。症状の主体である運動症状の本態は黒質におけるドパミン神経細胞の脱落であるが、なぜ選択的に細胞死が生じるかはわかっていない。一方で α -シヌクレインの病的代謝がパーキンソン病の分子病理において極めて重要と考えられている。本研究では、ドパミンの存在が α -シヌクレインの細胞毒性を増強する事を実験細胞を用いた手法により明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disorder. Motor deficits which are result of nigral cell death are main feature of Parkinson's disease, but it is unclear the pathomechanisms of selective neuronal loss in substantia nigra. Previous studies revealed alpha-synuclein plays important role in molecular basis of Parkinson's disease. This study figure out that intracellular dopamine facilitates the toxicity of alpha-synuclein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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：脳・神経，タンパク質

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病はアルツハイマー病に次いで多く、また65歳以上では人口10万人あたりの患者数が100～150人に達する、高齢化社会において重要度を増している神経変性疾患である。パーキンソン病の主たる症状である錐体外路症状(無動、振戦、固縮)の原因は中脳黒質におけるドパミン神経細胞

の変性脱落である。臨床的にドパミン補充療法が症状をみかけ上改善しうるのだが、神経変性そのものを遅らせる根本的治療法は存在しないのが現状である。根本的治療法開発のためにはパーキンソン病の分子病態の解明が不可欠と思われるが、いまだ解明されるには至っていない。

とはいえ、数多くのパーキンソン病に関する基礎研究が行われてきた結果、いくつかの

重要な事実が報告されてきている。パーキンソン病の病理を特徴づける構造物であるレビー小体の主要構成成分が α -シヌクレインであり、さらに α -シヌクレインは家族性パーキンソニズムの PARK1, PARK4 における原因遺伝子であった。これらのことから、 α -シヌクレインがパーキンソン病の分子病態を語る上でもっとも重要と考えられている。

しかしながら、 α -シヌクレインは中枢神経に広く高発現するタンパクであり、パーキンソン病における選択的黒質変性をそれだけでは説明する事ができない。一方で、選択的に脱落するのがドパミン神経細胞であることから、ドパミン自体の毒性が古くより研究されてきた。しかし、多くの研究は大量のドパミンを細胞外より暴露することにより毒性を論じているが、これは実際の脳とはかけはなれた条件であった。また、ドパミンが存在するのは細胞内であって、ドパミンが細胞外に放出されるのは線条体である。このため、細胞外からのドパミン暴露は黒質の神経細胞の再現にはなりにくいものと考えられる。細胞内のドパミン濃度を高める事ができれば、理想的な細胞モデルの実現が可能となる。さらに、ここで α -シヌクレインがどのように関わるを検討する事によってパーキンソン病の分子病態の一端を明らかにすることができると思われる。

2. 研究の目的

パーキンソン病における選択的黒質細胞死のメカニズムには諸説あるがいまだ不明である。より生体に近い自然なドパミン暴露環境を作成し、ここで脳に広範に発現する α -シヌクレインが、ドパミン存在下でより強い毒性を発揮する事を証明する。

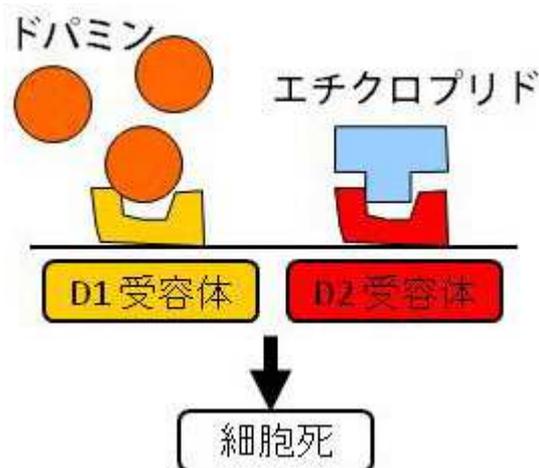
3. 研究の方法

Tetracycline-responsible transactivator (tTA) 調節下に外来遺伝子を発現調節できるベクターを用いて、チロシン水酸化酵素を発現調節できる神経系細胞株 (SH-SY5Y 由来) を作成。チロシン水酸化酵素を発現誘導した場合の細胞内外のドパミン量を ELISA を用いて測定。さらに、前述の細胞株に α -シヌクレインを過剰発現させ、stable transfectant を作成。 α -シヌクレイン過剰発現細胞において、細胞内ドパミン増加による酸化的ストレスをかけ、細胞死また信号伝達経路における検討をウェスタン・ブロット、蛍光基質を用いた 20S プロテアソーム活性測定、JC-1 染色を用いたミトコンドリア活性、各種免疫組織化学を用いて検討を行

った。

4. 研究成果

ドパミン産生能を持つヒト由来の neuroblastoma 実験細胞 SH-SY5Y に Tet-ON システムを導入し、チロシン水酸化酵素を発現誘導する細胞株を樹立。細胞内および細胞外にドパミンが産生・放出されることを確認した。チロシン水酸化酵素の過剰発現は細胞内に過量のドパミンを産生するため、ドパミンによってもたらされた酸化的ストレスによって細胞毒性が誘導されると考えたが、実際にはチロシン水酸化酵素の過剰発現のみでは細胞死を生じなかった。ELISA を用いて細胞内および培地のドパミンを測定したところ、細胞内のみならず培地にもドパミンの増加が認められた。細胞外の低用量のドパミンはドパミン受容体を刺激し、これが細胞保護的に働くとする報告が多くされているが、本実験系でも細胞毒性を導く細胞内ドパミンを増加させる一方で、培地に放出されたドパミンによりドパミン受容体が刺激されている可能性を考えた。



図：D2 受容体ブロックで細胞死が生じる

そこで、培地にドパミン D1 および D2 アンタゴニストを添加し、ドパミンの受容体への結合を阻害した。チロシン水酸化酵素の過剰発現と D1 アンタゴニストの添加では細胞死は生じなかったが、D2 アンタゴニストであるエチクロプリドでは細胞死 (アポトーシス) が観察された (図)。

この結果はドパミン D2 受容体刺激が細胞保護的に働いていることを示唆しており、確認のため D2 アンタゴニストに加え、D2 アゴニストを培地に添加すると、D2 アゴニストは容量依存性にアポトーシス誘導を抑制した。

同様の実験を α -シヌクレイン過剰発現下で行った。SH-SY5Yでは α -シヌクレインの過剰発現単独では細胞死は生じなかった。しかし、 α -シヌクレインを過剰発現にチロシン水酸化酵素過剰発現+D2 アンタゴニスト添加条件下とすると細胞死が観察された。このとき、caspase-3のcleavageが認められたことからアポトーシスを生じているものもと考えられた。ERK, JNK, c-Junに関しては有意な変動を認めなかった。また、細胞内には α -シヌクレインの凝集体が観察された。以上の事から、 α -シヌクレインは細胞内ドパミン過剰条件下において細胞毒性を発揮することが判明した。 α -シヌクレインがどのようなプロセスを経て細胞死をもたらすかに関しては今後の研究の課題である。

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 5 件)

① Baba T, Takeda A, Kikuchi A, Nishio Y, Hosokai Y, Hirayama K, Hasegawa T, Sugeno N, Suzuki K, Mori E, Takahashi S, Fukuda H, Itoyama Y., Association of olfactory dysfunction and brain Metabolism in Parkinson's disease., *Mov Disord.* 査読あり, 2011 26 巻, p.621-628.

② Hasegawa T, Baba T, Kobayashi M, Konno M, Sugeno N, Kikuchi A, Itoyama Y, Takeda A., Role of TPPP/p25 on α -synuclein-mediated oligodendroglial degeneration and the protective effect of SIRT2 inhibition in a cellular model of multiple system atrophy., *Neurochem Int.*, 査読あり, 2010 57 巻, p.857-866.

③ Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, Furumoto S, Kobayashi M, Sugeno N, Baba T, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Funaki Y, Iwata R, Takahashi S, Fukuda H, Arai H, Kudo Y, Yanai K, Itoyama Y., In vivo visualization of alpha-synuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy]benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy., *Brain.*, 査読あり, 2010 133 巻, p.1772-1778.

④ Takeda A, Saito N, Baba T, Kikuchi A, Sugeno N, Kobayashi M, Hasegawa T,

Itoyama Y., Functional imaging studies of hyposmia in Parkinson's disease., *J Neurol Sci.*, 査読あり, 2010 289 巻, p.36-39.

⑤ 菅野直人, 武田篤
DYT10 (Episodic kinesigenic dyskinesia 1; EKD1), *Clinical Neuroscience*, 査読なし, 2010 28 巻, p.771-773.

[学会発表] (計 11 件)

① 菅野直人, 加藤量広, 三浦永美子, 川口典彦, 井泉瑠美子, 鈴木直輝, 割田仁, 中島一郎, 武田篤, パーキンソン病の運動症状出現前に認められた antecollis の検討, 第 40 回日本臨床神経生理学会, 平成 22 年 11 月 2 日, 神戸

② 加藤量広, 井泉瑠美子, 菅野直人, 長谷川隆文, 中島 一郎, 糸山 泰人, Gabapentin 投与後に舞踏アテトーゼ運動を呈した視神経脊髄炎の一例, 第 40 回日本臨床神経生理学会, 平成 22 年 11 月 2 日, 神戸

③ 菅野直人, 武田篤, 長谷川隆文, 今野昌俊, 馬場徹, 菊池昭夫, 小林理子, 糸山泰人, Gaucher 病変異型 fibroblast のミトコンドリア複合体 I 阻害薬に対する脆弱性, 第 4 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS, 平成 22 年 10 月 8 日, 京都

④ 長谷川隆文, 菅野直人, 他
 α シヌクレイン分泌・ライソゾーム移行を制御する細胞内膜動輸送系の探索, 第 4 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS, 平成 22 年 10 月 8 日, 京都

⑤ 馬場徹, 菊池昭夫, 長谷川隆文, 菅野直人, 小林理子, 武田篤, 西尾慶之, 森悦朗, 平山和美, 高橋昭喜, 福田寛, 糸山泰人, パーキンソン病患者における嗅覚障害の神経基盤の検討, 第 4 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS, 平成 22 年 10 月 8 日, 京都

⑥ 菅野直人, 川口典彦, 遠藤薫, 三須建郎, 中島一郎, 堅山真規, 糸山泰人, 味覚障害を認めた慢性炎症性脱髄性多発根神経炎の 1 例, 第 21 回日本末梢神経学会学術集会, 平成 22 年 9 月 3 日, 仙台

⑦ 長谷川隆文, 馬場徹, 菅野直人, 菊池昭夫, 今野昌俊, 武田篤, 糸山泰人, 細胞内への α -シヌクレイン取り込み機構の解析, 第 51 回日本神経学会総会, 平成 22 年 5 月 23 日, 東京

⑧ 武田篤、馬場徹、菊池昭夫、長谷川隆文、菅野直人、小林理子、西尾憲之、森悦朗、平山和美、糸山泰人、パーキンソン病における自己の感情の認知障害の検討、第 51 回日本神経学会総会、平成 22 年 5 月 22 日、東京

⑨ 菅野直人、武田篤、長谷川隆文、小林理子、馬場徹、菊池昭夫、糸山泰人、Gaucher 病変異型 fibroblast のミトコンドリア複合体 I 阻害薬に対する脆弱性、第 51 回日本神経学会総会、平成 22 年 5 月 21 日、東京

⑩ 馬場徹、菊池昭夫、長谷川隆文、菅野直人、小林理子、武田篤、西尾慶之、森悦朗、平山和美、高橋昭喜、福田寛、糸山泰人、パーキンソン病患者における嗅覚障害の神経基盤の検討、第 51 回日本神経学会総会、平成 22 年 5 月 21 日、東京

⑪ 菊池昭夫、武田篤、長谷川隆文、小林理子、菅野直人、馬場徹、岡村信行、古本祥三、谷内一彦、田代学、工藤幸司、糸山泰人、多系統萎縮症における脳内 α -シヌクレイン蛋白凝集体の PET による画像化、第 51 回日本神経学会総会、平成 22 年 5 月 20 日、東京

[その他]

ホームページ等

東北大学医学部神経内科ホームページにて結果の一部を公開している。

<http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 直人 (SUGENO NAOTO)

東北大学・病院・医員

研究者番号：30509550

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：