

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461290

研究課題名(和文) Glucocerebrosidaseの膜輸送への役割に関する研究

研究課題名(英文) Glucocerebrosidase associates with membrane trafficking system

研究代表者

波田野 琢 (Hatano, Taku)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60338390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：グルコセブロシダーゼ(GBA)の病的変異はGaucher病にの原因であるが、同時にパーキンソン病(PD)の発症にも関係があると報告されている。この酵素はグルコシルセラミドをセラミドに変換するが、我々の検討から病的変異型GBAの局在が変化し膜脂質組成に影響を与え、リソソームの機能障害を引き起こしている可能性が示唆された。これらの知見よりGBAをはじめとしたリソソーム関連脂質代謝酵素の異常は膜輸送に関与し、PD発症に関わる可能性を考えた。リソソーム関連脂質代謝酵素に直接作用するタンパクをコードする遺伝子について検討し、遺伝子Xの病的変異が常染色体優性遺伝性PDに関連することを見出した。

研究成果の概要(英文)：It is well known that the impairment of glucocerebrosidase is associated with not only Gaucher disease, but also Parkinson's disease. This enzyme catalyzes the hydrolysis of glucosylceramide to form ceramide and glucose. Therefore, the impairment of GBA might induce the alteration of membrane composition. I revealed that GBA inhibition might induce the alteration of membrane trafficking and lysosome. I investigated whether other lysosomal proteins might be associated with PD and found that one of lysosomal associated proteins also causes autosomal dominant familial PD. The impairment of the protein might induce the membrane trafficking perturbation and induce lysosomal dysfunction.

研究分野：神経学

キーワード：Parkinson's disease Glucocerebrosidase Lipid enzymes

1. 研究開始当初の背景

ゴーシェ病は *Glucocerebrosidase* が原因遺伝子として知られているが、家系内にパーキンソン病の罹患率が高いことから関連遺伝子である可能性が報告された。さらに GWAS 解析により *glucocerebrosidase* は孤発性パーキンソン病の発症に強く関わる遺伝的危険因子として注目されている。

Glucocerebrosidase はリソソームに局在する糖脂質代謝酵素であるが、興味深いことに、その他の糖脂質代謝酵素に異常を持つ疾患においても、病理学的にパーキンソン病の hallmark とされている Lewy 小体が出現したり、家族内にパーキンソン病を発症する家系が報告されたりしている。つまり、*glucocerebrosidase* を中心とした糖脂質代謝酵素の機能不全はパーキンソン病発症メカニズムに直接関与する可能性が考えられる。糖脂質代謝酵素の多くはリソソームの機能に関連していることが知られている。これらの酵素は小胞体からリソソームへ膜輸送により運ばれるが、病的変異体はリソソームから初期エンドソームやゴルジ装置、小胞体に局在を変化することで、膜輸送に影響を与え、それによりパーキンソン病が発症する可能性があると考えた。実際に病的変異型 *glucocerebrosidase* は局在が変化することで細胞機能に影響を与えていることが報告されている。*Glucocerebrosidase* のみならず、リソソーム関連脂質代謝酵素の異常は膜輸送に影響し、パーキンソン病発症に関連する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究は *glucocerebrosidase* をはじめとしたリソソーム関連脂質代謝酵素の異常がパーキンソン病発症にどのように関与するかを明らかにすることを目標として着手した。この目的を達成するために *glucocerebrosidase* の病的変異体の局在が変化するかどうかを検討し、この酵素の局在変化は Lewy 小体のおもな構成タンパクであり、家族性パーキンソン病の原因としても知られている α -synuclein の局在に影響を与えるか検討する。さらに *glucocerebrosidase* の酵素活性を阻害することで、①膜脂質に異常をきたしドパミン輸送に影響を及ぼすかどうか、② α -synuclein の細胞内局在に影響を与えるかどうか、について検討する。さらに、リソソーム関連脂質代謝酵素の輸送や活性に影響を与えるタンパクがパーキンソン病の原因となるかについて検討する。これらの検討を行うことでパーキンソン病の発症にリソソーム関連脂質代謝酵素がどのように関与するかを解明することができると考えられる。

具体的に本研究期間中では以下の項目を明

らかにすることを目的とした。

- 1) 内在性に α -synuclein を豊富に持つ培養細胞を用いて、パーキンソン病関連病的変異型 *glucocerebrosidase* の局在変化を検討し、 α -synuclein の局在変化に影響を与えるか明らかにする。
- 2) 薬剤により *glucocerebrosidase* の活性を低下させることで α -synuclein の細胞内局在が変化する可能性について検討する。また、ドパミンを含有し放出する培養細胞を用いて、*glucocerebrosidase* の活性低下がドパミン輸送に影響を与えるかを明らかにする。
- 3) *Glucocerebrosidase* のみならず、その他のリソソーム関連脂質代謝酵素の機能不全もパーキンソン病発症に関わる可能性があると考えた。そこで、*glucocerebrosidase* をはじめとしたリソソーム関連脂質代謝酵素の輸送や活性などに関与するタンパク X に注目し、このタンパクをコードする遺伝子変異が家族性パーキンソン病の原因となる事を明らかにする。

3. 研究の方法

- 1) メラノーマ細胞である SK-MEL28 細胞は α -synuclein を豊富に含むが、この細胞に *glucocerebrosidase* を強制発現させ、細胞内局在、免疫組織学的検討により局在の変化を検討した。また、内在性の α -synuclein と共局在するかどうかを検討した。
- 2) SK-MEL28 細胞に *glucocerebrosidase* の酵素活性を阻害する薬物である *condurotol b epoxide (CBE)* を投与し、 α -synuclein の局在の変化を検討した。さらに、SH-SY5Y 細胞はドパミンを含有しており、*glucocerebrosidase* の活性阻害がドパミン代謝にどのように影響を及ぼすかを検討した。SH-SY5Y 細胞はレチノイン酸を投与して培養することで分化誘導される。分化誘導された SH-SY5Y 細胞はドパミン神経細胞に類似した特性を持ち、ドパミンを分泌する。この状態で CBE を投与し、HPLC 法を用いて、培養液中のドパミン、DOPAC、5-HIAA、HVA を測定し、*glucocerebrosidase* の活性阻害がドパミン放出に影響を与える可能性について検討する。
- 3) *Glucocerebrosidase* をはじめとしたリソソーム関連脂質代謝酵素の輸送などに関わるタンパク X をコードする遺伝子 X について、274 症例の常染色体優性遺伝性パーキンソン病、92 症例の常染色体劣性

遺伝性パーキンソン病、92 症例の孤発性パーキンソン病および、111 症例のコントロール症例についてスクリーニングを行った。

4. 研究成果

1) 病的変異型 glucocerebrosidase は局在を変化させ、 α -synuclein と共局在する

SK-MEL28 細胞において変異型 glucocerebrosidase を過剰発現し、局在を検討した。その結果、正常型 glucocerebrosidase はリソソームに局在し、 α -synuclein とは共局在しなかった。一方で L444P および N370S は小胞体や Golgi 装置に局在が変わり、一部が α -synuclein と局在することが示された。この結果より、病的変異型 glucocerebrosidase の局在が変化し、リソソームにおける酵素活性が低下することで α -synuclein は局在が変化する可能性が考えられた (図 1)。

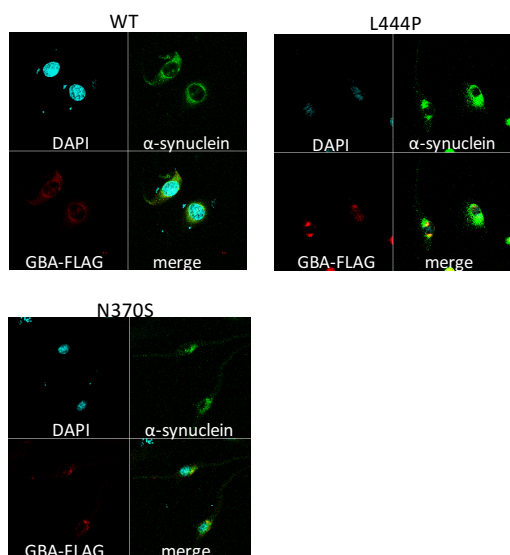


図 1 ; 病的変異型 glucocerebrosidase は小胞体や Golgi 装置に局在が移り α -synuclein と共局在する

2) Glucocerebrosidase の活性低下は α -synuclein の局在を変化させる

SK-MEL28 細胞に CBE を 25 μ mol、50 μ mol、100 μ mol、200 μ mol 投与すると、用量依存性に glucocerebrosidase の活性が低下することを確認した (図 2)。一方、SH-SY5Y 細胞では 50 μ mol 投与で十分に活性を低下させることができた。また、脂質の変化について薄層クロマトグラフィーで確認したところ、glucocerebrosidase が増加し、ceramide が低下した。Glucocerebrosidase と ceramide の比率は、CBE 投与群で有意に上昇して

いた (図 3)。

ドパミン放出に関する glucocerebrosidase の役割について検討する目的で、レチノイン酸で分化誘導した SH-SY5Y 細胞に CBE を投与した。分化した SH-SY5Y 細胞のドパミンの放出について、培養液内のドパミン、DOPAC、5-HIAA、HVA、について HPLC で確認したところ、CBE を投与することで、ドパミンが減少し DOPAC の濃度が増加していた。この結果より、glucocerebrosidase の活性低下による膜輸送障害が生じ、ドパミン放出が減少し、細胞内に残されたドパミンが DOPAC に代謝され細胞外に漏出している可能性が示唆された。また、SH-SY5Y 細胞は 5-HIAA を産生することが知られているが、コントロールと比較して変化はなかった。そのため、CBE による glucocerebrosidase 活性の低下はドパミン放出に特異的に影響を与えることが示唆された (図 4)。さらに、CBE による glucocerebrosidase の活性低下は病的変位の過剰発現と同様に α -synuclein の局在を変化させることを確認した (図 5)。上記の結果から glucocerebrosidase の活性低下はドパミン放出障害及び α -synuclein の局在変化をきたしドパミン神経細胞が脱落する可能性が考えられた。上記までの結果をまとめると、glucocerebrosidase の活性低下および病的変異型 glucocerebrosidase による細胞内局在の変化は α -synuclein の局在を変える可能性がある。また、glucocerebrosidase の活性はドパミン放出に影響を与え、この酵素の活性が低下するとドパミン放出が低下する可能性がある。局在を変えた α -synuclein は凝集体を形成し、細胞毒性に関わる可能性が考えられる。凝集に、glucocerebrosidase や ceramide がどのように関与するか、今後、 α -synuclein の凝集と細胞膜の脂質異常に着目し、検討を進める必要がある。

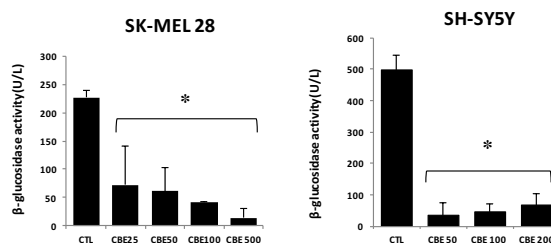


図 2 SK-MEL28 細胞および SH-SY5Y 細胞を conduritol b epoxide (CBE) で処理すると glucocerebrosidase の活性が低下する。SK-MEL28 細胞では用量依存性に活性低下を認めるが、SH-SY5Y 細胞では CBE 50 μ mol で十分に活性が低下した。

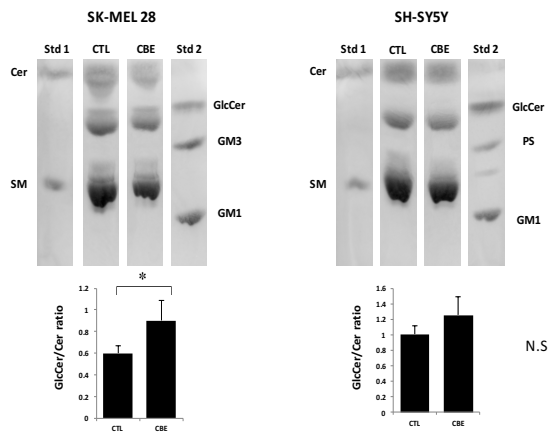


図3 SK-MEL28細胞およびSH-SY5Y細胞をcondurotol b epoxide (CBE)で処理するとglucocerebrosidaseが蓄積し、ceramideが減少する。

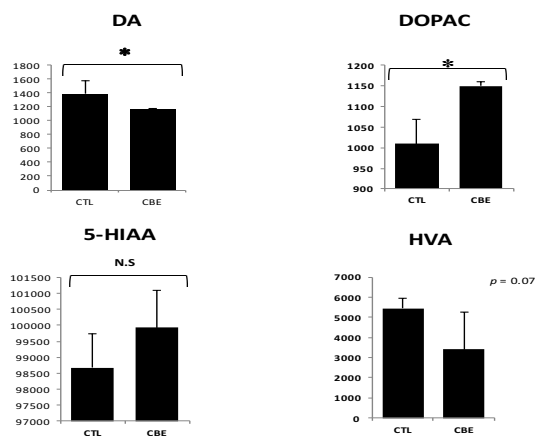


図4 SH-SY5Y細胞をcondurotol b epoxideで処理をすると細胞外へのドパミンの放出が低下する。

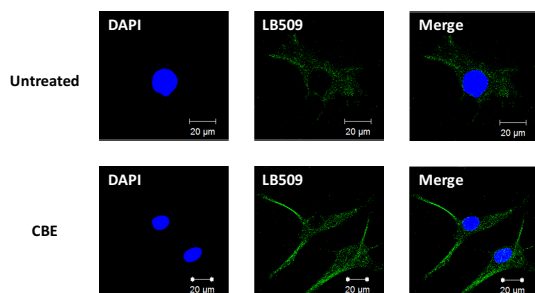


図5 SK-MEL28細胞をcondurotol b epoxideで処理をするとα-synuclein (LB509)の局在が変化する。

3) 糖脂質代謝酵素全般に関連するタンパクXをコードする遺伝子Xは家族性パーキンソン病に関連する

リソソーム関連脂質代謝酵素障害を持つ患者の病理所見ではLewy小体の出現が報告されている。また、家系内にパーキンソン病を発症するとの報告もある。そのため、glucocerebrosidase以外にもリソソーム関連脂質代謝酵素の機能障害はパーキンソン病の発症に関わる可能性がある。そこで、リソソーム関連脂質代謝酵素の輸送や活性機能に関与するタンパクXの障害はパーキンソン病の原因になる可能性を考えた。

そこで、274症例の常染色体優性遺伝性パーキンソン病、92症例の常染色体劣性遺伝性パーキンソン病、92症例の孤発性パーキンソン病および、111症例のコントロール症例についてタンパクXをコードする遺伝子Xについてスクリーニングしたところ、常染色体優性家族性パーキンソン病の二家系についてそれぞれ独立した変異を認めた。

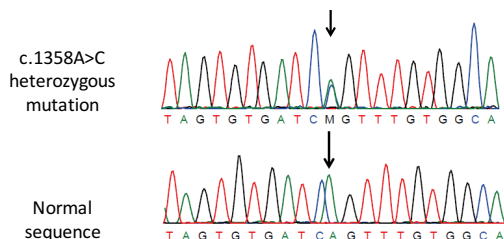
一つの変異はタンパクXの機能において重要な部位に位置するアミノ酸が変化した。このアミノ酸変異が及ぼす影響についてin silicoで見るPolyPhen2やSIFTでは病的変異と算出された。そのため、この変異によりタンパクXの機能が低下する可能性があり病的変異と判断した(図6)。

また、もう一つの変異ではexon12がskipしていることを示した(図6)。Exon12はこのタンパクの活性について重要な部位をコードしており、タンパクXの機能が低下していることが予想され、この変異も病的であると判断した。さらに、これらの遺伝子変異はタンパクXのC末端に近いところに位置する。既報ではタンパクXはC末でcargoタンパクと結合しリソソームへ輸送されることが知られている。つまり、これらの病的変位型は野生型と比較して局在を変化させる可能性がある。タンパクXの遺伝子改変マウスモデルはすでに作成されている。興味深いことに、このマウスモデルは加齢とともに海馬の神経細胞内にタンパクXの凝集体を認め変性する。また、小脳神経細胞の変性により加齢とともに運動障害を認めることが報告されている。

遺伝子Xに変異を認める症例は緩徐進行性の経過で高齢発症のパーキンソニズムであり、¹²³I-MIBG心筋シンチグラフィで心筋へのMIBGの取り込み低下を認めている。症状は極めて孤発性パーキンソン病に類似しており、Lドパへの反応は良好である。一部の症例はLドパ誘発性ジスキネジアを認める。タンパクXの機能障害はLewy小体に関連し、孤発性

パーキンソン病への病態に関連することが予想される。

家系 1



家系 2

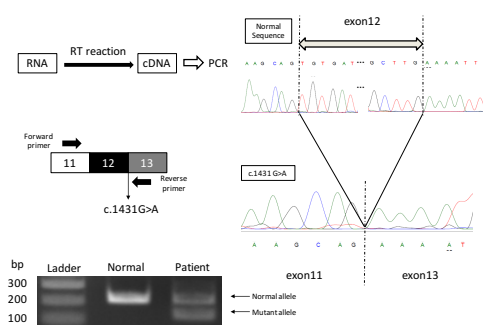


図 6 リソソーム関連糖脂質代謝酵素の輸送、活性などに関わるタンパク X をコードする遺伝子変異で常染色体優性遺伝性パーキンソン病に関わる。家系 1 に認められた点変異はタンパク X の活性中心に関わる部位に局在しており、タンパク X の機能が低下する可能性がある。家系 2 に関連している病的変異の影響で exon12 がスキップされる。Exon12 はタンパク X の活性及び局在に重要な部位をコードしていることが報告されている。

今後の展開

タンパク X の病的変異に伴うパーキンソン病の発症機序を解明するため、病的変異型タンパク X の局在変化に関する詳細な検討、患者由来の線維芽細胞を用いた検討、ノックアウトマウスの黒質ドパミン神経細胞に注目した解析を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 28 件)

- 1) Kamagata K, Hatano T, Okuzumi A, Motoi Y, Abe O, Shimoji K, Suzuki M, Hori M, Kumamaru KK, Hattori N, Aoki S. Neurite orientation dispersion and density imaging in the substantia

nigra in idiopathic Parkinson disease.

Eur Radiol 2015; *in press*. 査読あり

- 2) Hayashi Y, Iwasaki Y, Yoshikura N, Asano T, Hatano T, Tatsumi S, Satoh K, Kimura A, Kitamoto T, Yoshida M, Inuzuka T. Decreased regional cerebral blood flow in the bilateral thalami and medulla oblongata determined by an easy Z-score (eZIS) analysis of ^{99m}Tc-ECD-SPECT images in a case of MM2-thalamic-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. J Neurol Sci 2015; 358: 447-52. 査読あり
- 3) Hatano T, Kurita N, Kobayashi M, Hattori N. Re-emergent jaw tremor in Parkinson's disease. Neurology 2015; 85: e181 査読あり
- 4) Fukae J, Higuchi MA, Yanamoto S, Fukuhara K, Tsugawa J, Ouma S, Hatano T, Yoritaka A, Okuma Y, Kahihara K, Hattori N, Tsuboi Y. Utility of the Japanese version of the 9-item Wearing-off questionnaire. Clin Neurol Neurosurg 2015; 134: 110-115. 査読あり
- 5) Hatano T, Saiki S, Okuzumi A, Mohney RP, Hattori N. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomics technologies. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2016;87:295-301 査読あり

〔学会発表〕 (計 6 件)

2014 年 第 55 回 日本神経学会総会 福岡
5 月 21-24 日

波田野 琢ら. 本邦における LRRK2-R1441G 変異に関連したパーキンソン病の臨床的特徴

王子 悠, 森 聡生, 波田野 琢, 久保 紳一郎, 服部 信孝. GLUCOCEREBROSIDASE 変異による glucocerebrosidase の局在変化の検

討

森 聡生, 王子 悠, 奥住 文美, 波田野 琢,
久保 紳一郎, 服部 信孝. PLA2G6 における
細胞内局在の変化および病態の検討

June 8-12, 2014, 18th International
congress of Parkinson's disease and
movement disorders. San Diego, CA, USA

Hatano T, Funayama M, Kubo S-I, et al.
Identification of a Japanese family with
Parkinson's disease due to the LRRK2
p.R1441G mutation

Mori A, Oji Y, Okuzumi A, Hatano T, et al.
Intracellular localization of PLA2G6

Oji Y, Mori A, Hatano T, et al Mutant
glucocerebrosidase changes its subcellular
localization

〔図書〕 (計 1 件)

Hatano T, Kubo S-I, Hattori N, Mizuno Y.
(2014) Movement disorders in neoplastic brain
disease. in W. Poewe and J. Jankovic (eds.)
Movement disorders in neurologic and
systemic disease (Cambridge university press,
UK) pp. 279-292

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

特許出願

名称: パーキンソン病診断指標、[研究開発
科題名] パーキンソン病の代謝産物バイオ
マーカー創出およびその分子標的機構に基
づく創薬シーズ同定

発明者: 服部信孝、齊木臣二、波田野琢、山
城一雄、石川景一、王子悠、 森聡生、奥住
文美

番号: 2016-017794

取得年月日: 平成 28 年 2 月 2 日出願

国内外の別: 国内

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波田野 琢 (HATANO, Taku)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 60338390