

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：84303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461287

研究課題名(和文)部分凝集 シヌクレインによる神経細胞機能異常からパーキンソン病の病態を探る

研究課題名(英文)The neuronal dysfunction by alpha-synuclein oligomers in Parkinson's disease

研究代表者

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)・その他部局等・研究員(移行)

研究者番号：50378775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、電気生理学的、免疫化学的手法を用いて、部分凝集 シヌクレインが活動電位依存性カルシウム恒常性不全にどのような機能不全を生ずるかを検討した。その結果、細胞内部分凝集シヌクレインは、IP3受容体の開口を制御するcalcium binding protein 1と結合し、IP3受容体から引き離すことによって、連発発火時にIP3受容体からの異常カルシウム遊離を引き起こすことが判明した。この病的カルシウム遊離がパーキンソン病やレビー小体型認知症でカルシウム恒常性不全を生じて、選択的神経細胞脆弱性やシヌクレイン病理の拡がりをもたらす分子的基盤となっている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)： α -Synuclein oligomers and dysregulated activity-dependent Ca^{2+} homeostasis play pivotal roles in the selective neuronal damage occurring in Lewy body disease. The current study used electrophysiological and immunochemical analyses to evaluate how intracellular α -synuclein oligomers act on the neuronal excitability and Ca^{2+} dynamics in neocortical pyramidal neurons. Intracellularly applied higher-order α -synuclein oligomers directly capture calcium-binding protein 1, a negative regulator of inositol trisphosphate receptor (IP3R) gating, and cause the aberrant form of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from IP3R during multiple spikes. This is a non-physiological action in neocortical neurons and is blocked by L-type Ca^{2+} channel blockers. This oligomeric α -synuclein-mediated mechanism may cause intracellular Ca^{2+} dysregulation and could be the molecular basis for neuronal vulnerability in Lewy body disease.

研究分野：神経内科学

キーワード：シヌクレイン パーキンソン病 レビー小体型認知症 IP3受容体 カルシウム遊離 カルシウム結合蛋白 オリゴマー カルシウムチャンネル

1. 研究開始当初の背景

LBD(Lewy body disease; PD/DLB)の病理学的特徴であるレビー小体は、重合した シヌクレイン(S)が不溶化したフィブリルとして目に見える形をとっているが、近年の研究では、部分凝集した可溶性 S(見えない凝集体)が、レビー小体を形成する以前に、神経細胞機能異常や神経細胞死の原因となっている可能性が示されている。LBD では、自律神経・迷走神経背側核・縫線核・青斑核・マイネルト基底核・黒質緻密部から扁桃体、大脳皮質へ、レビー小体病理が広がって、パーキンソンズのみならず、精神症状や認知症を生じ、患者の QOL を低下させる

S は、通常神経終末に発現してシナプス小胞放出の制御に関わっているとされており、 S 凝集は、一般には神経終末から始まると考えられている。しかし近年の研究では、

S オリゴマーが、レビー小体や pale body といった LBD の病理学的特徴が出る前から細胞体に出現、蓄積していることが分かってきた。S オリゴマーは、ミトコンドリア負荷、小胞体ストレス、オートファジー・ライソゾーム経路による蛋白恒常性の異常、神経細胞間の S 病理の伝搬を生じて、LBD での神経脆弱性や LBD 病理の拡がりをもたらす。また、LBD 発症・進行リスクを高める S 変異・GBA 変異等の遺伝的要因や酸化ストレス、炎症などの環境要因と、LBD における神経細胞脆弱性とを繋げる重要な pathogenic pathway ともなっている。

さらに Ca^{2+} 恒常性不全もまた、S オリゴマー凝集形成、ミトコンドリア・小胞体ストレス、オートファジー・ライソゾーム異常を生じて、LBD での選択的神経細胞脆弱性を担っていることから、S オリゴマーと Ca^{2+} 恒常性不全の密接な関連が LBD 病理に重要であることが推察される。

DLB で脆弱性をもつ黒質緻密部(SNC)ドパミン神経・縫線核・青斑核・マイネルト基底核の神経細胞は、膜興奮性が高い、スパイク幅が広い、 Ca^{2+} 結合蛋白発現が少ない、といった Ca^{2+} 負荷がかかりやすい性質を持つ。一方、大脳皮質錐体細胞はそのような性質を持っておらず、S オリゴマーが大脳皮質錐体細胞で神経活動や Ca^{2+} 動態にどのような機能異常をもたらすのか、また、これらの LBD で脆弱性をもつ神経に共通した機能異常があるのか、その詳細はこれまで不明であった。

これまでに、申請者らは、サイズ排除クロマトグラフィーを用いることにより、シヌクレインを過剰発現させた培養細胞内に可溶性モノマーに加えて、少量の部分凝集した 2-3量体、4-10量体が存在すること、ドパミン負荷によりこれらの部分凝集体が増大することを証明した(Yamakawa 2010)。また、

海馬や大脳皮質スライスにおける錐体細胞に電気生理学的解析を適用して、シナプス足場蛋白である homer1a の発現下、乃至は細胞内投与下では、シナプス伝達抑制(Sala 2003)、錐体細胞の過分極(Sakagami 2005)、 Ca^{2+} スパイク発射促進(Yamamoto 2005)に働くことを報告してきた。また、アルツハイマー病(AD)の初期に神経細胞内から蓄積する可溶性アミロイド(A)がBKチャンネルを抑制して Ca^{2+} 流入を促進する機能異常を生じ、homer1aがこの機能異常をレスキューすることを、A をパッチピペットから細胞内投与する手法やADモデルマウスを用いて明らかにしてきた(Yamamoto 2011)。

2. 研究の目的

部分凝集した S をパッチピペットから、大脳皮質錐体細胞内に投与して電気生理学的解析を行い、神経細胞の発火特性や細胞内 Ca^{2+} にもたらす機能的異常を解析し、LBD で細胞死に先駆けて生じる神経機能異常の仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)マウスの前頭葉新皮質スライス(P20-50)を作成した。

(2)2/3層、又は5層錐体細胞にパッチクランプし、whole-cell 記録を行った。

(3)種々の recombinant S をピペット内から投与した。これらの溶液の凝集状態解析はイムノプロットによって行った。また、S オリゴマーと他の蛋白との結合状態は免疫沈降法にて解析した。

(4)電流固定記録にて静止膜電位、に脱分極刺激により単発スパイク、連発スパイクを記録した。電圧固定記録でSK(AHP)電流、 Ca^{2+} 電流を測定した。

(5)各受容体・チャンネルの阻害剤や関連蛋白とその抗体を細胞内外に投与して発火・ Ca^{2+} 動態の解析を行った。

4. 研究成果

(1) S オリゴマーの細胞内投与は、連発発火の発火頻度を低下させた。

ドパミン(DA)存在下で3日間インキュベートすることで、S は、野生型、A53T 型のいずれも、SDS-resistant な安定したオリゴマーを形成した。DA なしでは、野生型(WT) S はモノマー・ダイマーのみ形成し、A53T 型 S はモノマー・ダイマー・凝集体(フィブリル)を形成したが、いずれもオリゴマーは含まれなかった。

オリゴマーを含む WT S + DA(SNo)、A53T S + DA(SN53o)を細胞内投与した際には、オリゴマーを含まない WT S(SN)、A53T S(SN53)、DA、および Control(S

も DA も含まない)に比べて、連発発火時の発火頻度が有意に低下した(A53T型でできた凝集体・フィブリルはフィルターで除去したものを細胞内投与に使用。S、又はDAを含む各溶液は、3日間37度でインキュベートしたものを使用)。単発スパイク時のスパイク幅、スパイク後過分極、及び膜電位にはオリゴマーの有無は影響しなかった。また、V層錐体細胞でのH電流、微小後シナプス電流もSNとSNoで差を認めなかった。

(2) Sオリゴマーは、連発発火後のスパイク後過分極(AHP)の持続時間を延長し、AHP電流を増強した。

SNoはSN、DA、Controlに比べて、連発発火後のAHP振幅には変化をもたらさなかったが、AHP持続時間が有意に延長し、AHP電流を増強した。

これらの結果から、SオリゴマーはSK(SK型Ca²⁺依存性K⁺チャンネル)電流を増大させることが判明し、発火時の細胞内Ca²⁺増加を大きくする機序が働いていることが示唆された。

(3) Sオリゴマーは、L型電位依存性Ca²⁺チャンネル(L-VGCC)とSKチャンネルとカップリングしたIP₃受容体からのCa²⁺遊離によってAHP電流を延長させた。

SNoによる発火頻度低下とAHP電流の増強は、細胞内Ca²⁺キレーター、L-VGCC阻害、SK阻害だけでなく、IP₃受容体(IP₃R)阻害、小胞体Ca²⁺貯蔵枯渇剤によっても打ち消された。一方、P/Q型およびN型VGCC、BK阻害、リアノジン受容体阻害、ミトコンドリアCa²⁺ユニポーター阻害では、SNoの効果はそのまま持続した。

過去の大脳皮質や扁桃体における研究で、VGCC、IP₃R、SKの三者のカップリングがVGCCからのCa²⁺流入が引き金となって生ずるCa²⁺誘発性Ca²⁺遊離(CICR)と、その遊離したCa²⁺によって生ずるSK増大をもたらすことが知られている(Yamamoto,2000,2002; Yamada 2004)。以上の結果から、SNoは連発発火時にIP₃RからのCICRを生ずること、この型のCICRは、大脳皮質細胞では発火頻度低下とAHP電流の増強で検出できることが判明した。

(4) Sオリゴマーは、IP₃受容体のCa²⁺依存性不活性化を阻害して、連発発火時の異常CICR誘発する。

IP₃RからのCICRそのものは新皮質や扁桃体に限らず、IP₃Rが分布する神経細胞内の細胞体や樹状突起で広く生じうる。また、IP₃Rは、生理的にはIP₃とCa²⁺の両者と結合して効果的にCa²⁺遊離を生ずる。Sオリゴマーが、IP₃RからのCICRを生ずるメカニズムの

候補として、VGCCからのCa²⁺流入の増強、IP₃産生の増強、IP₃Rの開口制御不全の三者が挙げられる。

この中で可能性については、SNoがCa²⁺電流に影響を及ぼさなかったこと、についても、IP₃産生を担うPLCの阻害薬を投与してもSNoの作用が持続したことから、除外された。一方、IP₃の細胞内投与は、SNoの効果をも倣してさらなる上積みの効果を及ぼさなかった。(3)でIP₃R阻害がSNoの効果ブロックしたことと合わせると、Sオリゴマーの効果は、IP₃Rの開口制御不全、つまり本来Ca²⁺細胞内が高濃度になった作動すべきCa²⁺依存性という開口制御機構が働かなくなったために生じた病的なCICRであると考えられた。

(5) S高次オリゴマーは、calcium binding protein 1(CaBP1)と結合し、CaBP1が担っているIP₃受容体の不活性化を解除して、IP₃受容体からの異常CICRを誘起する。

Sオリゴマーが、異常CICRを生ずる作用点を同定するため、これまでの結果を踏まえて、IP₃Rの開口制御(Ca²⁺依存性不活性化)に関わり、Sオリゴマーと結合し、神経細胞内に発現している蛋白を文献的に検索した。その結果、CaBP1が、唯一その条件を満たした。また、CaBP1とアミノ酸配列に相同性をもつcalmodulinが、Sとの結合がオリゴマー特異的ではない点、IP₃Rとの親和性がCaBP1の約1/100である点を除けば、その条件に近い蛋白として挙げられた。そこで、この両者、及びその抗体をSNo、又はSNと同時に細胞内投与した際のSNoの効果を検証した。

その結果、CaBP1抗体はSNoの効果をも倣してさらなる上積みの効果を及ぼさなかった。逆にCaBP1はSNoの効果をも阻害した。一方、calmodulin、及びcalmodulin蛋白はSNoの効果に影響しなかった。CaBP1抗体の効果は、L-VGCC阻害、IP₃R阻害にて打ち消された。さらに、免液沈降による検討では、CaBP1が100kDa以上のSオリゴマーと結合した。

以上のことから、IP₃RのCa²⁺依存性不活性化を担っているCaBP1にS高次オリゴマーが結合してCa²⁺依存性不活性化が作動しなくなることによって、IP₃R異常CICRが生ずると結論付けられた。

本研究では、細胞内Sオリゴマーによる異常CICR機構を詳細に検討し、作用点を同定した。生理的に生ずるCa²⁺流入やIP₃の上昇を介さない点、IP₃RのCa²⁺依存性不活性化を担うCaBP1をオリゴマーが捉え、Ca²⁺上昇時に作動すべきIP₃R制御が働かないために

生ずる点で、今回見出した S オリゴマー誘発性 CICR は、病的な Ca²⁺放出機構であるといえる。L-VDCC、IP₃R は細胞体・樹状突起で、CaBP1 は細胞体・樹状突起・軸索で、神経細胞内に広く発現していることから、異常 CICR は、大脳皮質錐体細胞に限らず、主として細胞体・樹状突起でオリゴマーが出現した時に、高頻度発火時に Ca 制御不全を発生・伝搬すると考えられる。

IP₃R とミトコンドリアは IP₃R が存在する小胞体とミトコンドリアの生理的連結 (mitochondria associated ER membrane: MEM) で強くリンクしており、ER から IP₃R を介したミトコンドリアへの Ca²⁺流入は、オートファジーを抑制する。S は MEM に存在して、ミトコンドリア内 Ca²⁺を増加させ (Cali 2012, Guardia-Laguarta 2014) S オリゴマーは Ca²⁺誘発性ミトコンドリア機能不全を生ずる (Luth 2014)。我々の結果から、S オリゴマーはミトコンドリアに対する急性の Ca²⁺流入を促さなかったが、連発発火時の異常 CICR を頻発させることで、長期的にはミトコンドリア Ca²⁺負荷をもたらすと考えられる。また、Ca²⁺恒常性不全はミトコンドリア機能異常のみならず、蛋白恒常性の攪乱や S 凝集促進、S の細胞間伝搬にもかかわる。今回見出した異常 CICR が、S オリゴマーが出現した神経に、こうした多様な Ca²⁺制御不全をもたらす pathogenic pathway を活性化させて、LBD で Ca²⁺恒常性破綻が生ずる神経脆弱性と S 病理拡大を引き起こす分子的基盤となっている可能性が推察された。

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4件)

(1) Umemura A, Oeda T, Yamamoto K, Tomita S, Kohsaka M, Park K, Sugiyama H, Sawada H. Baseline plasma C-reactive protein concentrations and motor prognosis in Parkinson disease. PLoS One.10(8): e0136722, 2015, DOI:10.1371/journal.pone.0136722

(2) Tomita S, Oeda T, Umemura A, Kohsaka M, Park K, Yamamoto K, Sugiyama H, Mori C, Inoue K, Fujimura H, Sawada H. Impact of aspiration pneumonia on the clinical course of progressive supranuclear palsy: A retrospective cohort study. PLoS One. 10(8):e0135823, 2015, DOI:10.1371/journal.pone.0135823

(3) Sawada H, Oeda T, Umemura A, Tomita S, Kohsaka M, Park K, Yamamoto K, Sugiyama H. Baseline C-reactive protein levels and

life prognosis in Parkinson disease. PLoS One.10(7):e0134118, 2015

DOI:10.1371/journal.pone.0134118

(4) Zhang Y, Wang F, Luo X, Wang L, Sun P, Wang M, Jiang Y, Zou J, Uchiyama O, Yamamoto R, Sugai T, Yamamoto K, Kato N. Cognitive improvement by photic stimulation in a mouse model of Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res.12(9):860-869, 2015

DOI:10.2174/1567205012666150710115755

[学会発表](計21件)

(1) Yamamoto K, Sawada H: The involvement of the calcium binding protein in aberrant calcium release from IP₃ receptor by alpha-synuclein oligomers. Society for Neuroscience meeting 2016, San Diego, USA (2016.11.12)

(2) 山本兼司, 澤田秀幸: Aberrant calcium release from IP₃ receptor by alpha-synuclein oligomers: involvement of the calcium-binding protein. 第39回日本神経学会大会、横浜 (2016.7.21)

(3) Yamamoto K, Sawada H: The mechanism of aberrant calcium release from IP₃ receptor by intraneural alpha-synuclein oligomers. 第57回日本神経学会学術大会、神戸 (2016.5.21)

(4) 富田聡、大江田知子、梅村敦史、高坂雅之、朴貴瑛、東郷一行、上原尚子、田口智之、田原将行、山本兼司、杉山博、澤田秀幸: パーキンソン病における肺炎発症は咳感受性低下と関係している、第57回日本神経学会学術大会、神戸 (2016.5.21)

(5) Sawada H, Oeda T, Umemura A, Tomita S, Kohsaka M, Park K, Yamamoto K, Sugiyama H.: Baseline C-reactive protein level and life prognosis in Parkinson disease. 第57回日本神経学会学術大会、神戸 (2016.5.19)

(6) 梅村敦史、大江田知子、森裕子、朴貴瑛、山本兼司、富田聡、高坂雅之、杉山博、澤田秀幸: 髄液中 S-100 はパーキンソン病の運動症状進行とともに上昇する、第57回日本神経学会学術大会、神戸 (2016.5.18)

(7) 高坂雅之、大江田知子、梅村敦史、富田聡、朴貴瑛、山本兼司、杉山博、澤田秀幸: 自発的視性垂直位検査を用いたパーキンソン病の垂直認知についての検討、第57回日本神経学会学術大会、神戸 (2016.5.18)

(8) Yamamoto K, Sawada H: -Synuclein oligomers suppress spike firing by strengthening functional coupling of L-type calcium channel, SK-type potassium channel, and inositol trisphosphate receptor in neocortical pyramidal neurons. Society for Neuroscience meeting 2015 Chicago, USA (2015.10.19)

(9) 山本兼司、澤田秀幸: シヌクレインオリゴマーによる神経発火頻度抑制には SK チャンネル・IP₃受容体の機能連関が寄与する、第 38 回日本神経科学大会、神戸(2015.7.28)

(10) 高坂雅之、大江田知子、梅村敦史、富田聡、朴貴瑛、山本兼司、杉山博、澤田秀幸: パーキンソン病における視覚誘発電位の潜時延長とアセチルコリンとの関係、第 56 回日本神経学会学術大会、新潟(2015.5.23)

(11) 山本兼司、澤田秀幸: alpha-synuclein oligomers enhance functional coupling of SK, VDCC and IP3R. 第 56 回日本神経学会学術大会、新潟(2015.5.22)

(12) 梅村敦史、大江田知子、山本兼司、富田聡、高坂雅之、朴貴瑛、澤田秀幸: Subclinical elevation of plasma CRP and motor prognosis in Parkinson disease. 第 56 回日本神経学会学術大会、新潟(2015.5.21)

(13) 富田聡、大江田知子、梅村敦史、高坂雅之、朴貴瑛、田原将行、山本兼司、杉山博、澤田秀幸: Prediction of aspiration pneumonia using videofluoroscopy in Parkinson disease. 第 56 回日本神経学会学術大会、新潟(2015.5.21)

(14) Yamamoto K, Sawada H: Involvement of SK-type calcium-activated potassium channel in -synuclein oligomer-mediated suppression of spike frequency in neocortical pyramidal neurons. Society for Neuroscience meeting 2014, Washington DC, USA (2014.11.19)

(15) 山本兼司、澤田秀幸: シヌクレインオリゴマーはスパイク後過分極の増強により大脳皮質錐体細胞における発火頻度を抑制する、第 37 回日本神経科学大会、横浜(2014.9.12)

(16) 山本兼司、山川健太郎、澤田秀幸: シヌクレインオリゴマーによる大脳皮質錐体細胞の発火抑制機構、第 55 回日本神経学会学術大会、東京(2014.5.22)

(17) 林隆太郎、大江田知子、梅村敦史、富田聡、高坂雅之、朴貴瑛、山本兼司、杉山博、澤田秀幸: 認知症を伴うパーキンソン病における大脳白質病変とCholinergic pathwayの関連、第 55 回日本神経学会学術大会、東京(2014.5.23)

(18) 高坂雅之、大江田知子、山本兼司、梅村敦史、富田聡、林隆太郎、朴貴瑛、杉山博、澤田秀幸: 視覚誘発電位を用いたパーキンソン病の幻視の病態解明と予測因子の検討、第 55 回日本神経学会学術大会、東京(2014.5.23)

(19) 澤田秀幸、大江田知子、梅村敦史、富田聡、高坂雅之、林隆太郎、朴貴瑛、山本兼司、須藤慎司、杉山博: パーキンソン病の無症候

性 CRP 上昇は幻覚・錯覚と関連している、第 55 回日本神経学会学術大会、東京(2014.5.22)

(20) 梅村敦史、大江田知子、林隆太郎、富田聡、高坂雅之、朴貴瑛、山本兼司、杉山博、澤田秀幸: パーキンソン病の認知症と扁桃体連絡路との関係: MRI 拡散係数による検討、第 55 回日本神経学会学術大会、東京(2014.5.22)

(21) 富田聡、大江田知子、高坂雅之、梅村敦史、林隆太郎、朴貴瑛、山本兼司、杉山博、澤田秀幸: パーキンソン病および進行性核上性麻痺に対する呼吸筋力強化訓練の有効性、第 55 回日本神経学会学術大会、東京(2014.5.22)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者
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)・研究員
研究者番号: 30335260

(3) 連携研究者 なし
(4) 研究協力者 なし