

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06710

研究課題名(和文) パーキンソン病原因遺伝子SNCAのexosomeを介した伝播分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of propagation molecule mechanism via exosome in Parkinson's disease related gene SNCA

研究代表者

河原 裕憲 (Kawahara, Hironori)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：00424177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは種々の細胞から分泌される小胞であり、神経系においても新たな細胞間情報伝達手段であり、神経変性疾患においても病態との関連がとらえられている。また、パーキンソン病関連疾患である多系統萎縮症は主要原因分子 α -シヌクレイン (α -syn) が本来発現していないオリゴデンドロサイトへ伝播・凝集体形成の解明が最大の疑問である。そこで、多系統萎縮症についてエクソソームを介した α -synの伝播機構モデルを明らかにした。これは、Rpn1がエクソソームを介した α -synucleinの伝播と伝播先のグリア細胞での発現増強を誘導することに起因していた。さらに、Rpn1の機能促進分子の同定も行った。

研究成果の概要(英文)：Exosome is not only signal small vesicle which is utilized as cell-cell communication in various cells but also in neuronal cells. Even in neurodegenerative diseases, it is considered to be related to the pathological condition. In addition, multisystem atrophy, which is a disease related to Parkinson's disease, is the most doubtful as to elucidation of the propagation / aggregate formation to oligodendrocytes in which the main causative molecule α -synuclein (α -syn) is not originally expressed. Therefore, the propagation mechanism model of α -syn mediated by Exosome for multisystem atrophy was clarified. This was due to the fact that Rpn1 induces the exosome-mediated propagation of α -synuclein and the enhanced expression in glia cells at the transmission destination. Furthermore, functional promoting molecules of Rpn1 were also identified.

研究分野：神経科学一般

キーワード：exosome α -synuclein

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は罹患者数も多く国の特定疾患に指定されている。病理所見として中脳黒質や橋の青斑核、不明瞭ながら大脳にレビー小体と呼ばれる封入体が観察され、このレビー小体の主要成分として同定されたのが、 α -synuclein (以下、 α -syn) 蛋白質である。また、家族性変異として (α -syn^{A53T}、 α -syn^{E46K}、 α -syn^{A30P})、ゲノムワイドな SNPs 解析から孤発性パーキンソン病の確実な感受性遺伝子としても同定されている¹。しかし、 α -syn 凝集体の蓄積やその分子作用機序には不明な点が多い。エクソソームと呼ばれる細胞外小胞が、脳脊髄液にも存在し、種々の神経変性疾患原因分子 (A β , Prion, Tau, TDP-43 など) の伝播・凝集化と病態発症に参与することが報告されている。実際、これら神経変性疾患の原因蛋白質はエクソソーム膜表面に相互作用することで伝播だけでなく、エクソソームは分解・解毒化の足場となっている。

2. 研究の目的

(1) Rpn1 の分子機序とマイクログリア活性化機構の解明；
申請者の先行研究で Rpn1 がエクソソームを介した α -syn の神経マイクログリア細胞間伝播促進効果を示した。そこで、マイクログリアを含めグリアにおける α -syn の Rpn1 による伝播能を分子レベルで解明する。

(2) Rpn1、 α -syn のマウスでの解析；
パーキンソン病へのエクソソームを介した発病機序の関係を解析する為に、マウスなどの *in vivo* レベルでの解析を行った。

(3) ヒト疾患研究への応用；
パーキンソン病などの α -syn 関連疾患 (シヌクレインパチー) 由来の脳脊髄液からエクソソームを回収して Rpn1、 α -syn などの関係を解析する。

3. 研究の方法

(1) Rpn1 結合蛋白質の同定と機能解析；
Rpn1 の分子機序解明をメインに解析した。Rpn1-FLAG を神経系細胞 SHSY5Y に安定発現させて、神経細胞に分化させて結合蛋白質を質量分析で探索した。さらに、この結合タンパク質の Rpn1 のエクソソームを介した α -syn 伝播効果への作用を検討した。

(2) マウスにおける Rpn1 による α -syn 伝播の解析；
 α -syn、Rpn1 とその結合蛋白質の関係をマウス脳内へのエレクトロポレーション法により解析。特に、組織学的に α -syn のグリア細胞への伝播を解析した。また、同様にショウジョウバエモデルを用い成体脳内での解析を目的に、Rpn1

のトランスジェニックハエ、Rpn1 協調因子 RTL1 トランスジェニックハエ、 α -syn および α -syn^{A53T} 変異トランスジェニックハエを作製し、これらトリプルトランスジェニックハエの交配作製を試みた。

(3) パーキンソン病関連疾患における Rpn1 による α -syn の発現変化；
患者さん由来脳脊髄液中のエクソソームの α -syn の発現変化を解析、剖検脳の Rpn1 による α -syn の発現変化も解析した。

4. 研究成果

(1-1) 新規 Rpn1 結合蛋白質の同定；
Rpn1 結合蛋白質候補として、PPM1A や SCCPDH、RTL1 が挙がってきた。そのうち、RTL1 は Rpn1 との強固な結合を有した。さらに、Rpn1 のエクソソームを介したグリア細胞への α -syn 伝播能を解析したところ、RTL1 によりこの効果が増強した。これは、RTL1 により Rpn1 がエクソソーム内ヘリクルートされることに起因することも明らかにした。

(1-2) Rpn1 の機能解析 1；
Rpn1 はそもそも endoplasmic reticulum (ER) 蛋白質であるが、マウス初代神経細胞において、IP₃-Ca²⁺ 依存的にエクソソームヘリクルートされる分子として同定・着目した。そこで、IP₃-Ca²⁺ シグナルによる Rpn1 の細胞内局在の変化を細胞染色で解析したところ、このシグナル依存的に神経細胞内において、CD63 陽性のエクソソームでの Rpn1 の存在率が増加した。

(1-3) Rpn1 の機能解析 2；
Rpn1 と α -syn 以外の他の神経変性疾患の関係を精査する為に、APP (アルツハイマー病などの主要原因分子)、tau (前頭側頭型認知症などの主要原因分子)、TDP-43 (筋萎縮性側索硬化症主要原因分子) について Alpha-Screen 法で相互作用を解析したところ、Rpn1 は α -syn と強固な相互作用を示した。

(2-1) グリア細胞での α -syn 伝播・蓄積 1；
マウス子宮内エレクトロポレーション法による解析を行った。組織染色からマウス脳内で Rpn1 や RTL1 により α -syn の予想発現とは異なる異所性の発現が観察された。これは、Rpn1 複合体による α -syn のグリア細胞への伝播の結果と考えられた。

(2-2) グリア細胞での α -syn 伝播・蓄積 2；
Rpn1 RTL1 α -syn トリプルトランスジェニックハエの交配作製の過程で、RTL1 トランスジェニックハエの複眼での解析を行った。その結果、成体において異常な複眼形成が観察された。

(3) 多系統萎縮症における Rpn1 の発現変化；

パーキンソン病症状を示し、 α -syn が主要原因の一つとされ疾患に、多系統萎縮症がある。この疾患由来の脳脊髄液からエクソソームを回収して解析を行った結果、患者群において α -syn の存在量が統計学的に増加していた。また、この患者の剖検脳において、Rpn1 の発現が増加していることが明らかとなった。

以上より、Rpn1 が「パーキンソン病原因遺伝子 SNCA の exosome を介した伝播分子制御を担う」重要な分子であることを強く示唆された。

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 2 件)

Hironori Kawahara, Rikinari HanayamaThe Role of Exosomes/Extracellular Vesicles in Neural Signal Transduction, *Biol. Pharm. Bull.* 2018, 査読有り, in press

Hironori Kawahara, Rie Nakatani, Taishi Tsutsui, Sunao Haitani, Shunsuke Kishimoto, Rikinari Hanayama, Behavior of Neuronal Exosomes in Synaptic Communication, *Pharmaceutical and medical device regulatory science*, 査読無し, 48(1), 24-29, 2017

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

河原 裕憲 仲谷利栄 筒井泰史 灰谷淳 岸本俊輔 華山力成、エヌ・ティー・エス、パラダイムシフトをもたらすエクソソーム機能研究最前線 (神経系エクソソームとグリア細胞制御～神経変性疾患との関連～) 2017、314 (81 - 88)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 裕憲 (KAWAHARA HIRONORI)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：00424177

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

華山 力成 (HANAYAMA Rikinari)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：40403191

(4) 研究協力者

望月 秀樹 (MOCHIDUKI Hideki)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：90230044

奥野 龍禎 (OKUNO Tatsusada)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：00464248

藤村 晴俊 (FUJIMURA Harutoshi)
独立行政法人国立病院機構 刀根山病院
副病院長
研究者番号：20263246

河崎 洋志 (KAWASAKI Hiroshi)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：50303904

新明 洋平 (SHINMYO Yohei)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：00418831

佐藤 純 (SATO Makoto)
金沢大学・新学術創成研究機構・教授
研究者番号：30345235

八杉 徹雄 (YASUGI Tetsuo)
金沢大学・新学術創成研究機構・助教

研究者番号：90508110