

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06764

研究課題名(和文) 神経変性を引き起こす α -シヌクレインの制御機構研究課題名(英文) Effect of lysosomal enzymes on α -synuclein accumulation causing neurodegeneration

研究代表者

鈴木 康予 (Suzuki, Yasuyo)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・遺伝学部・研究員

研究者番号：60416188

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)： α -Synucleinは可溶性タンパク質であるが、シヌクレイノパシーと呼ばれる一群の神経変性疾患では、本タンパク質を主成分とする凝集体が形成され、神経細胞内やグリア細胞内に蓄積する。近年、様々なリソソーム病において、中枢神経系に α -synucleinが蓄積することが報告されている。したがって、リソソームの機能低下が α -synucleinの蓄積に関与すると考えられる。本研究では、 α -synucleinを分解するリソソーム・オートファジー系と α -synucleinの蓄積との関連を調べた。その結果、リソソーム酵素のカテプシンの活性低下が α -synucleinの不溶化に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)： α -Synuclein is a 140-amino acid protein and abundant in presynaptic terminals of neurons. Intracellular aggregation of α -synuclein is a pathological feature of neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease (PD). Lysosomal dysfunction and α -synuclein accumulation are considered as the major pathogenic features in PD. For instance, mutations in α -glucocerebrosidase (GBA) gene, responsible for Gaucher disease, are known as a risk factor for PD. Recent studies demonstrate that deficiency of lysosomal enzymes causes lysosomal dysfunction and α -synuclein accumulation; however, the molecular mechanism of α -synuclein accumulation remains unclear. In this study, we investigated the effects of reduced activity of lysosomal enzymes GBA and cathepsins B and D on α -synuclein accumulation. Our study suggested that dysfunctions of cathepsins B and D are more critical role in accumulation and insolubilization of α -synuclein than the GBA dysfunction.

研究分野：生化学

キーワード： α -synuclein パーキンソン病 リソソーム カテプシン α -グルコセレブロンダーゼ

1. 研究開始当初の背景

シヌクレイノパシーはパーキンソン病 (PD)、レビー小体型認知症、多系統萎縮症などの神経変性疾患群の総称であり、これらの疾患に共通する病理学的所見は、神経細胞内やグリア細胞内に見られる α -synuclein を含む凝集体の形成である。さらに、ニーマンピック病などの小児の疾患においても α -synuclein の蓄積が見られ (Saito et al., 2004)、本タンパク質の蓄積は多くの神経変性疾患の病態に関与していると考えられる。 α -synuclein の凝集体が細胞に及ぼす影響については、細胞毒性と細胞保護の両面から議論されている (Spillantini et al., 1997; Winner et al., 2011; Wan and Chung, 2012)。PD の神経細胞にみられるレビー小体と呼ばれる凝集体にはリン酸化された α -synuclein が含まれていることが明らかにされ (Fujiwara et al., 2002) また α -synuclein は二酸化によってその凝集が促進されるとも報告されており (Paxinou et al., 2001)、 α -synuclein の翻訳後修飾と凝集との関係も結論は得られていない。一方、 α -synuclein 遺伝子 (SNCA) の重複がみられる家系では PD を発症することが報告されている。すなわち、SNCA の gene dosage が増えるほど、PD は若年に発症し、症状の進行が速くなり、より重篤化する (Singleton et al., 2003)。さらに、本患者の脳では α -synuclein の凝集体形成が見られており、 α -synuclein 量の増加がシヌクレイノパシーに関与することが明らかになった。しかし、様々な神経変性疾患に見られるシヌクレイノパシーの病態は未だ十分には解明されていない。

我々は、オリゴドンドロサイトに特異的にヒト α -synuclein を強制発現させた多系統萎縮症モデルマウスを用いた研究により、変性したオリゴドンドロサイトの放出する液性因子が神経細胞内の α -synuclein 量を増加させることを報告した (Nakayama et al., 2009)。そこで、オリゴドンドロサイトから放出される液性因子の同定に着手し、シスタチン C が神経細胞の α -synuclein 発現の誘導に関連する因子であることを初めて明らかにした (Suzuki et al., 2014)。野生型マウス脳由来の初代培養細胞にシスタチン C を投与すると、神経細胞内の α -synuclein 量が約 3 倍に増加することもわかった。

2. 研究の目的

α -synuclein は 140 個のアミノ酸からなる可溶性タンパク質である。しかし、シヌクレイノパシーと呼ばれる一群の神経変性疾患では、本タンパク質を主成分とする不溶性の凝集体が形成され、神経細胞内やグリア細胞内に蓄積する。我々の研究から、神経細胞にシステインプロテアーゼインヒビターであるシスタチン C を投与すると α -synuclein の蓄積が亢進することが明らかになっている。さらに、近年の研究によってリソソーム病の

ひとつであるゴーシェ病の原因遺伝子である β -グルコセレブロシダーゼ (GBA) 遺伝子の変異が PD の危険因子であることや、様々なリソソーム病において中枢神経系に α -synuclein が蓄積することが報告されている。したがって、リソソームの機能低下が α -synuclein の蓄積を引き起こすと考えられる。そこで、 α -synuclein の分解系のひとつであるリソソーム・オートファジー系に関わる酵素の機能低下と α -synuclein の蓄積との関連を調べた。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

本研究では、HEK293 細胞、SH-SY5Y 細胞、HeLa 細胞を用いた。培養細胞は 10% fetal calf serum を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。SH-SY5Y 細胞の神経細胞様の分化誘導には 20 mM レチノイン酸を添加した。プラスミドベクターのトランスフェクションには、Lipofectamine 2000 を用いた。

(2) タンパク質溶液の調製

培養細胞は phosphate buffered saline (PBS) で 2 回 wash し、lysis buffer (1% SDS in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) で懸濁後、超音波破碎したものを whole cell lysate とした。 α -Synuclein の不溶解解析のため、細胞を extraction buffer (1% Triton X-100 (TX) in PBS with protease inhibitor) に懸濁し、氷上で 10 分間静置した後、15,000 x g で 30 分間遠心した。遠心上清を TX 可溶性画分とした。沈殿は lysis buffer で懸濁し、超音波でホモジェナイズして、TX 不溶性画分とした。各タンパク質溶液はウエスタンブロット解析に用いた。

(3) リソソーム酵素のノックダウン細胞株の樹立

リソソーム酵素のノックダウンには pSUPER RNAi system を用いた。pSUPER にハイグロマイシン耐性遺伝子を導入したベクター (pSUPER-h) に、カテプシン B、カテプシン D、GBA の siRNA 配列を組み込んだ。pSUPER-h ベクターをトランスフェクションした HeLa 細胞はハイグロマイシンでセクションを行い、shRNA を安定発現する細胞株を樹立した。

(4) 免疫細胞染色

培養細胞は、コラーゲンコートした 12 のカバーガラス上に撒いて培養し、4%パラホルムアルデヒド処理後、冷メタノールで固定をした。そして、0.5% TX で透過処理して、5% BSA でブロッキングした。固定した細胞は、 α -synuclein 抗体 Syn1 (1:200) で反応させ、Alexa Flour 488 で標識した二次抗体で可視化した。核は DAPI で対比染色した。

4. 研究成果

(1) リソソーム酵素阻害剤による α -synuclein の蓄積

α -synuclein を発現させた HEK293 細胞に、リソソームの pH を上昇させることによってその機能を阻害するクロロキン、GBA の特異的阻害剤である Conduiritol B Epoxide (CBE)、 α -synuclein を分解することが報告されているカテプシン B の阻害剤 CA-074 Me を投与した。細胞は whole cell lysate および TX の溶解度による画分を調製し、ウエスタンブロット解析を行った。クロロキンを投与した細胞ではいずれの画分にも α -synuclein の増加は認められなかったが、GBA 阻害剤では TX 可溶性画分、カテプシン B の阻害剤では TX 不溶性画分で増加が確認された。一方、リン酸化 α -synuclein は主に TX 不溶性画分で検出されたが、いずれの阻害剤でも変化が認められなかった。

さらに、免疫細胞化学的解析では、 α -synuclein を発現させた HEK293 細胞にカテプシン B の阻害剤を投与すると、細胞質に α -synuclein の凝集体様の集積が観察された (図 1)。また、 α -synuclein 発現ベクターをトランスフェクションした後にレチノイン酸で分化誘導した SH-SY5Y 細胞に、阻害剤を投与して観察を行った。分化誘導した SH-SY5Y 細胞でも、カテプシン B 阻害剤の投与群のみで α -synuclein の凝集体様の集積が観察された。また、 α -synuclein の凝集体様集積は neurite や細胞質に局在が見られた (図 1)。

(2) リソソーム酵素のノックダウン細胞での α -synuclein の蓄積

リソソーム酵素の量的低下が α -synuclein の不溶化に及ぼす影響を調べるため、 α -synuclein の分解への関与が報告されているカテプシン B (CTSB) とカテプシン D (CTSD) そしてその機能低下が PD の危険因子と考えられている GBA を標的とした siRNA 配列をいくつか設計した。siRNA 配列は shRNA 発現プラスミド pSUPER に導入した。ノックダウン効率を算出するため、標的配列を含む 600-800bp の cDNA をサブクローニングした siCHECK ベクターを作製し、各々の pSUPER ベクターと共に HEK293 細胞にトランスフェクションした。その結果、それぞれで最も有効な配列のノックダウン効率は CTSB が 79.1%、CTSD が 64.4%、GBA が 94.0%であった。

そこで、ノックダウン効率の高かったベクターを α -synuclein を過剰発現する HEK293 細胞にトランスフェクションし、shRNA の一過性発現による α -synuclein の不溶化を TX の溶解度によって分画し、ウエスタンブロットによって検討した。その結果、いずれの shRNA 発現も、Total および TX 不溶性 α -synuclein 量に明確な変化が認められなかった。

そこで、それぞれの酵素のノックダウン効率の高かった pSUPER ベクターを用いて HeLa 細胞で shRNA 安定発現細胞株を樹立した。shRNA 安定発現細胞株の判定は、ウエスタンブロットおよび siCHECK ベクターを用いた評価系で行った。得られた shRNA 安定発現細胞に α -synuclein 発現ベクターをトランスフェクションした。72 時間後に回収した細胞で TX 分画し、ウエスタンブロットで α -synuclein の不溶化を検討した。その結果、CTSB と CTSD の shRNA 安定発現株では TX 不溶性画分で α -synuclein の増加傾向が認められたが、GBA の shRNA 安定発現株では TX 可溶性画分、不溶性画分ともに α -synuclein の増加は認められなかった。

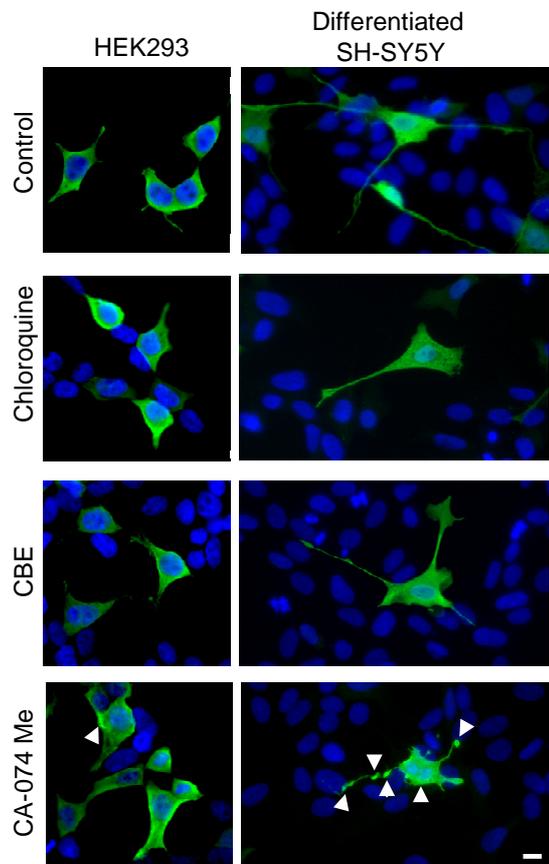


図 1. α -synuclein を発現した培養細胞に対するリソソーム阻害剤の影響

阻害剤を投与した α -synuclein 過剰発現細胞を α -synuclein 抗体である Syn1 で可視化した (Green)。核染色は DAPI を使用した (Blue)。矢頭は α -synuclein の集積を示す。Scale bar = 10 μ m。

以上の結果から、 α -synuclein の不溶化にはリソソーム全体の機能低下ではなく、カテプシン B およびカテプシン D の活性低下が強く影響していることが示唆された。一方、PD の危険因子として知られる GBA の活性低下が α -synuclein の不溶化や蓄積に及ぼす影響は本研究では確認できなかった。GBA が PD の危険因子となるメカニズムの解明には更なる解析が必要である。

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 3 件)

Suzuki Y, Enokido Y, Yamada K, Inaba M, Kuwata K, Hanada N, Morishita T, Mizuno S, Wakamatsu N. The effect of rapamycin, NVP-BEZ235, aspirin, and metformin on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway of *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS). *Oncotarget* 8: 45470-45483, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.17566.

Fukushi D, Kurosawa K, Suzuki Y, Suzuki K, Yamada K, Watanabe S, Yokochi K, Wakamatsu N. Clinical and molecular genetic characterization of two siblings with trisomy 2p24.3-pter and monosomy 5p14.3-pter. *Am J Med Genet A* 173A: 2201-2209, 2017. doi: 10.1002/ajmg.a.38313.

鈴木康予、水野誠司、榎戸靖、山田憲一郎、稲葉美枝、村松友佳子、花田直樹、森下剛、若松延昭. *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS)の1症例. 第27回日本整形外科学会骨系統疾患研究会記録集, 29-31, 2016.

[学会発表](計 9 件)

鈴木康予、榎戸靖、山田憲一郎、稲葉美枝、花田直樹、森下剛、水野誠司、若松延昭. メトホルミンが *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS)患者由来細胞におよぼす治療効果. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017. 2017.12.8-9.

佐々木飛翔, 鈴木康予, 金成花, 矢澤生. オリゴデンドロサイト由来液性因子の神経細胞 α -synuclein 蓄積における機序. 第89回日本生化学会大会(仙台)2016.9.26.

鈴木康予, 若松延昭. Deficiency of lysosomal enzymes leads to an increase in insoluble α -synuclein. 第57回日本神経学会学術大会(神戸)2016.5.21.

Suzuki Y, Enokido Y, Yamada K, Hanada N, Morishita T, Mizuno S, Wakamatsu N. Inhibition of overactivated PI3K/AKT/mTOR signalling pathway as a therapeutic strategy for *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS). The 13th International Congress of Human Genetics (ICHG 2016) (Kyoto, Japan) 2016.4.4.

Suzuki Y: Clinical characterization of a patient with *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS). 第8回 NAGOYA グローバルリトリート(名古屋)

2016.2.12.

鈴木康予, 水野誠司, 榎戸靖, 山田憲一郎, 稲葉美枝, 村松友佳子, 花田直樹, 森下剛, 若松延昭. *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS)の1症例. 第27回日本整形外科学会骨系統疾患研究会(岐阜)2015.12.5.

鈴木康予, 榎戸靖, 山田憲一郎, 花田直樹, 森下剛, 水野誠司, 若松延昭. *PIK3CA*-related overgrowth spectrum (PROS)の病態解明. BMB2015・第88回日本生化学会大会・第38回日本分子生物学会年会合同大会(神戸)2015.12.3.

鈴木康予: 病気を知る研究~治療法を見つけるために~. 静岡サイエンススクール「サイエンス・オースタムプログラム2015」キャリアデザインワークショップ(静岡)2015.11.15.

鈴木康予, 榎戸靖, 山田憲一郎, 若松延昭, 水野誠司, 花田直樹, 森下剛.

PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS)の1症例. 第103回東海臨床遺伝・代謝懇話会(名古屋)2015.6.30.

[その他]

ホームページ等

<http://www.inst-hsc.jp/d-genetics/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木康予 (SUZUKI, Yasuyo)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・遺伝学部・研究員

研究者番号: 60416188