

令和元年6月24日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06780

研究課題名(和文)パーキンソン病の分子病態を基盤としたバイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Development of biomarker based on the pathogenesis of Parkinson's disease

研究代表者

佐藤 栄人(SATO, SHIGETO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00445537

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)：不良なミトコンドリアの蓄積は、細胞の機能不全を招き、癌・変性疾患など様々な病態発症の原因となる。その際、不良ミトコンドリア除去機構が発動されることが推測される。これまでに *in vitro* の系で明らかになってきた除去機構発動のためのリン酸化シグナルは神経変性の指標となりうる。脳病理標本を検索した結果、神経原線維変化をきたす神経細胞ではリン酸化Parkinのシグナルの亢進が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In vitro で明らかになりつつある不良ミトコンドリア除去機構が実際に生体内で機能しているかは不明であり今後のさらなる研究が必要である。認知症病理標本でリン酸化シグナルが亢進しているとの本研究結果は認知症の病態解明に迫るものであると同時に新たなバイオマーカーを提案するものである。

研究成果の概要(英文)：Abnormal mitochondrial accumulation leads to cell dysfunction and causes various pathological conditions such as cancer and degenerative diseases. At that time, it is speculated that the defective mitochondrial removal mechanism is triggered. Phosphorylation signals for activation of removal mechanisms, which have been clarified in *in vitro* systems, can be indicators of neurodegeneration. As a result of searching the brain pathology sample, it was suggested that the phosphorylation of Parkin is enhanced in the neuronal cells causing neurofibrillary tangles.

研究分野：神経内科

キーワード：パーキンソン病 Parkin ミトコンドリア 神経変性疾患 バイオマーカー 認知症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不良なミトコンドリアの蓄積は、細胞の機能不全を招き、癌・変性疾患など様々な病態発症の原因となる。実際、ミトコンドリアの機能異常(呼吸鎖の低下や MtDNA の欠失等)の知見は、パーキンソン病など様々な神経変性疾患で集積している。特に、老化に伴って亢進した活性酸素(ROS)の産生は、ミトコンドリアの機能異常ひいては神経細胞死を引き起こす。従って、損傷ミトコンドリアをクリアランスして自律的なミトコンドリア増殖を促し、健全なミトコンドリアを維持する品質管理(不良品の処理)は、細胞分裂によって異常ミトコンドリアを希釈できないニューロンでは、不可欠である。最近、ミトコンドリア品質管理機構の研究が、国内外で爆発的に進展している。

本申請者は、若年性に発症する常染色体劣性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物である Parkin(コビキチン連結酵素)と PINK1(セリン/スレオニン型タンパク質リン酸化酵素)に着目し、これらのミトコンドリア品質管理における役割を明らかにすることで、神経変性疾患の発症機構解明に挑んできた。即ち、ミトコンドリアの膜電位が低下(ミトコンドリア損傷の指標)すると、安定化して外膜上に蓄積しそれがシグナルとなって細胞質の Parkin が損傷ミトコンドリアに移行、複数の外膜タンパク質をコビキチン化する。次いで、このコビキチン化修飾が引き金となって選択的なミトコンドリアのオートファジーによる分解(ミトファジー)を受け、ミトコンドリアの恒常性が維持される。これまでに健康な細胞において潜在型として存在する PINK1・Parkin 系の制御機構を中心に研究を推進し成果を挙げてきた。その結果、「PINK1 と Parkin が協調してミトコンドリア品質の良・不良を識別し、コビキチン化することで、不良ミトコンドリアをクリアランスする仕組み」が判明し、その破綻(病的変異による機能不全)による異常ミトコンドリアの蓄積が遺伝性パーキンソン病の原因になりうる可能性を提案してきた。

2. 研究の目的

診断マーカーが少ないパーキンソン病は、病初期において類似疾患との鑑別にししばしば困難をきたす。最近、遺伝性パーキンソン病の発症機序として、PINK1 変異 異常ミトコンドリアの蓄積 神経変性、の流れが明らかになってきたが、我々は異常ミトコンドリア蓄積に伴い PINK1 リン酸化活性が亢進することを発見した。本研究ではこの知見を応用し、遺伝性疾患と同様にミトコンドリア障害が指摘されている孤発性パーキンソン病において、PINK1 リン酸化活性亢進に伴うリン酸化対象を同定し、リン酸化特異的抗体を作製することにより、パーキンソン病の早期診断を可能とするバイオマーカーを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

老化や活性酸素の影響によって生み出された異常ミトコンドリアの識別機構は未だ不明な点が多い。遺伝病研究からの類推によると PINK1 は自身の分解を介してミトコンドリアの膜電位を監視しており、膜電位が低下したミトコンドリアに PINK1 が蓄積することにより識別する。異常ミトコンドリア除去の経路は膜電位が低下した時にのみ発動するよう巧妙に調節されているが、次の起こる現象として、PINK1 の自己リン酸化を契機とした活性型への変化こそが異常ミトコンドリアクリアランスのためのシグナルとなる。このことから PINK1 がリン酸化され活性型に変化することが異常ミトコンドリア浄化に重要であるとの知見を得ている。このような点に着眼すると、孤発性パーキンソン病の患者では何らかの原因による異常ミトコンドリアの蓄積が起きていることから、この PINK1 の活性化が亢進し、同時にリン酸化対象タンパク質が増加していることが推測された。そこで当該施設内に設置された高性能の質量分析計を用いて(LTQ OrbiTrap ETD, TripleTOFTM 5600) PINK1 野生型とノックアウトマウスの脳ミトコンドリア分画を用いて網羅的リン酸化プロテオーム解析を実施する。その後、候補リン酸化タンパク質を特異的に認識するリン酸化抗体を作製する。このようなリン酸化抗体を用いてパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の脳病理標本を用いてリン酸化タンパク質の上昇を確認し、病理解析ツールとして有用か検討する。

4. 研究成果

申請者は当該施設内に設置された高性能の質量分析計(LTQ OrbiTrap ETD, TripleTOFTM 5600)を用いて、PINK1 野生型とノックアウトマウスの脳ミトコンドリア分画を抽出し、網羅的にリン酸化プロテオーム解析を行った。その結果、PINK1 ノックアウトマウスで Tau と Parkin のリン酸化が見られなかったが、PINK1 野生型のマウスでは同タンパク質のリン酸化が顕著であった。サンプルとして高齢マウスの脳を用いているため、同定した Tau リン酸化タンパク質は、加齢によるミトコンドリア障害を感知した PINK1 のキナーゼ活性が亢進した結果と推定している。そこで、リン酸化 Tau とリン酸化 Parkin を認識する抗体を作製し、in vitro の系でリン酸化抗体を評価した。具体的には HeLa 細胞に Parkin と Tau をそれぞれ発現させたのち、ミトコンドリア脱分極剤を処理することにより損傷ミトコンドリアを誘導した。そのような細胞を

回収したタンパク質を溶出したのち、獲得したリン酸化抗体にてウエスタンブロットを実施した。その結果、*in vitro*の実験系において PINK1 存在下に Tau と Parkin リン酸化認識抗体は高い特異性を示すことを確認した。そこでパーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の病理標本に対して免疫染色を実施した。実験計画の段階ではパーキンソン病検体にてリン酸化抗体の陽性像が推測されたがパーキンソン病脳病理標本では明らかなリン酸化抗体陽性像は得られなかった。

そこで孤発性パーキンソン病の組織での検討は中断とし、Parkin に遺伝子変異を有する PARK2 家系の剖検脳での検討を実施することとした。PARK2 の家系は様々な遺伝子変異の報告があり遺伝性パーキンソン病の中でももっとも多くの家系が存在する。孤発性パーキンソン病に比べ早期の発症が特徴的であることから変異ミトコンドリアの蓄積が亢進していることが推測される。このことはミトコンドリアクリアランスが亢進していることを意味している。現在のところ Parkin にどのような変異が加わると、どの程度、クリアランスが阻害されるかは不明であるが、Parkin のリン酸化サイトが保存されているような剖検脳の組織を利用して Parkin リン酸化抗体にて染色を行なった。しかしながら遺伝性パーキンソン病のサンプルでも明らかなリン酸化像は得られなかった。これらの理由として遺伝性パーキンソン病の家系については十分なサンプルが獲得困難であったこと、あるいはヒトサンプルに有効な抗体ではないことが考えられた。

そこでパーキンソン病以外の神経変性疾患のサンプルについても検索を実施した。興味深いことにアルツハイマー型認知症患者標本のリン酸化 Parkin 抗体を用いた免疫染色では神経原線維変化周囲に陽性変化を認めた。このことはミトコンドリア障害と神経原線維変化には関連性があることを示唆している。予想外の結果が得られたために神経原線維変化とミトコンドリア障害(リン酸化 Parkin の蓄積)の相関を明らかにするために、認知症動物モデルとして知られる Tau トランスジェニックマウスの海馬を用いて免疫染色をしたところ、高齢化に伴いリン酸化 Parkin 抗体による染色性を示した。

Tau トランスジェニックマウスは加齢とともに海馬に Tau タンパク質が蓄積し神経原線維変化を引き起こす。蓄積した Tau タンパク質がミトコンドリア障害を引き起こし海馬神経細胞の脆弱性が強まった結果、神経細胞死が誘導されたものと推測された。その過程においてリン酸化 Parkin が増加したと考えられた。そこで機序解明のため次のような検討を行った。Tau の過剰発現がミトコンドリア機能へ与える影響として Amadoro らの報告 (*Neurobiology of Disease* 2014) がある。Tau の N 末断片の過剰産生がミトコンドリアを障害し、その結果ミトコンドリア膜電位を低下させ不良ミトコンドリアを生み出す。我々がこれまでに見出した PINK1/Parkin による不良ミトコンドリア除去のシステムはミトコンドリア膜電位の低下が起点となっている。即ち、膜電位の低下により PINK1 が不良ミトコンドリアに蓄積し Parkin をリン酸化し、その結果 Parkin が活性化され損傷ミトコンドリアに移行しユビキチン化作用を発揮する。以上のメカニズムを証明することにより Tau トランスジェニックマウスの海馬染色の理由を証明できると考えた。そこで既報に習い NH2-Tau フラグメント(N 末 22 アミノ酸から 230 アミノ酸を含む Tau 断片)を一過性に発現するベクターを作製し、神経系の培養細胞である SHSY5Y に過剰発現させミトコンドリアの変化を観察した。NH2-Tau フラグメントは細胞毒性を示すとのことであったが一過性の発現にて神経細胞死は確認されなかった。さらにミトコンドリアの性状を確認するためにミトコンドリア膜電位を観察したところ、膜電位の低下も認められなかった。今回の現象を説明する分子機構の解明には至らなかった。

次に、Tau トランスジェニックマウスの海馬組織を用いてリン酸化 Parkin を認識する高感度 ELISA システムの構築を検討した。原理としては非リン酸化 Parkin 抗体とリン酸化 Parkin 抗体によるサンドイッチ方式でリン酸化 Tau の定量を試みた。結果としては免疫染色に見られるような加齢に比例したリン酸化 Parkin の上昇は ELISA システムでは確認することはできなかった。一般に免疫染色では定量は困難であるためリン酸化 Parkin がアルツハイマー病のバイオマーカーであると言いきれない。リン酸化 Parkin 抗体による他疾患サンプルを用いてのスクリーニングと定量評価方法の確立が必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- 1) Sato S, Uchihara T, Fukuda T, Noda S, Kondo H, Saiki S, Komatsu M, Uchiyama Y, Tanaka K, Hattori N. (2018) Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes Lewy pathology and motor dysfunction in aged mice. *Sci Rep.* 8:2813.
- 2) Sato S, Hattori N. (2018) Dopaminergic Neuron-Specific Autophagy-Deficient Mice.

Methods Mol Biol. 1759:173-175.

- 3) Sato S, Furuya N. (2018) Induction of PINK1/Parkin-Mediated Mitophagy. *Methods Mol Biol.* 1759:9-17
- 4) Sato S, Li Y, Hattori N. (2017) Lysosomal defects in ATP13A2 and GBA associated familial Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 124:1395-1400.
- 5) Shiba-Fukushima K, Ishikawa KI, Inoshita T, Izawa N, Takanashi M, Sato S, Onodera O, Akamatsu W, Okano H, Imai Y, Hattori N. (2017) Evidence that phosphorylated ubiquitin signaling is involved in the etiology of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 26:3172-3185.
- 6) Meng H, Yamashita C, Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Funayama M, Sato S, Hatta T, Natsume T, Umitsu M, Takagi J, Imai Y, Hattori N. (2017) Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. *Nat Commun.* 8:15500
- 7) Sato S, Koike M, Funayama M, Ezaki J, Fukuda T, Ueno T, Uchiyama Y, Hattori N. (2016) Lysosomal storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in brain-specific Atp13a2-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 186:3074-3082.
- 8) Matsumoto T, Fujimori K, Andoh-Noda T, Ando T, Kuzumaki N, Toyoshima M, Tada H, Imaizumi K, Ishikawa M, Yamaguchi R, Isoda M, Zhou Z, Sato S, Kobayashi T, Ohtaka M, Nishimura K, Kurosawa H, Yoshikawa T, Takahashi T, Nakanishi M, Ohyama M, Hattori N, Akamatsu W, Okano H. (2016) Functional Neurons Generated from T Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells for Neurological Disease Modeling. *Stem Cell Reports.* 6:422-435.

〔学会発表〕(計2件)

- 1) Sato S, Uchihara T, Fukuda T, Noda S, Kondo H, Saiki S, Komatsu M, Uchiyama Y, Tanaka K, Hattori N.: Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes Lewy pathology and motor dysfunction in aged mice.
第41回日本神経学会学術大会 神戸、2018年7月2日
- 2) 佐藤栄人、服部信孝：Parkin ノックアウトマウスのミトコンドリア変性と神経細胞死
第18回日本ミトコンドリア学会年会・福岡県久留米。2018年12月8日

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称：パーキンソン病モデル非ヒト動物
発明者：佐藤栄人、野田幸子、服部信孝
権利者：順天堂大学
種類：特許
番号：特開2018-068136
取得年：2018年
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。