

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21081

研究課題名(和文)パーキンソン病におけるミトコンドリア品質管理と変異型mtDNA蓄積の相関解析

研究課題名(英文) Analysis of the relationship between an accumulation of mutant mtDNA and the mitochondrial quality control in Parkinsonism

研究代表者

福家 聡 (Fuke, Satoshi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：20422660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：変異型mtDNA蓄積とmitophagy依存的なミトコンドリア品質管理の関係について、パーキンソン病における生理的意義を明らかにするために、Parkinによるmitophagyがミトコンドリア動態に果たす役割について調べた。マウス神経芽細胞株Neuro2aにおいて、ミトコンドリア脱分極剤処理によるmitophagy誘導後に、Parkin非局在ミトコンドリアが少なくないこと、mitophagyによる分解を受けないミトコンドリアが存在することを見出した。これらのことから、mitophagyによるミトコンドリア分解において、ミトコンドリア脱分極は必要条件であるが十分条件ではないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the physiological significance of relationships between an accumulation of mutant mtDNA molecules and the mitochondrial quality control depending on mitophagy in Parkinson's disease, a role of mitophagy due to Parkin in mtDNA dynamics was assessed. In a mouse neuroblastoma cell line (Neuro2a), we found that there are not a few Parkin-nonlocalized mitochondria that were undegraded after the induction of mitophagy by FCCP mitochondrial depolarizing agent. These result suggest that the mitochondrial depolarization is necessary but not enough for the removal of damaged mitochondria through mitophagy.

研究分野：分子神経生物学

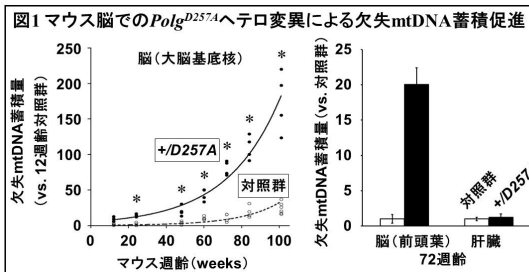
キーワード：ミトコンドリア パーキンソン病 ミトコンドリアDNA Parkin Polg

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は、中脳黒質ドパミン神経細胞の選択的な変性を伴う代表的な神経変性疾患の一つであり、振戦や筋固縮、無動・寡動、姿勢保持反射障害など運動症状のほか、気分障害や睡眠障害など多彩な非運動症状を併発する進行性の難治疾患である。本邦では10万人以上の患者の存在が推定され、加齢に伴って発病率が増加し病態も進行するため、高齢化社会において今後ますます重篤な患者が増えることが予想されることから、その疾患発症・病態進行メカニズムの解明は社会的急務であると言える。またパーキンソン病は遺伝的側面を持つことが知られ、これまでに同定された多くの家族性パーキンソン病原因遺伝子 *PARK1* ~ *18* の生理学的機能や病的変異の解析も進められているが、患者数の多くを占める孤発例に至っては発症の原因が不明な場合も多く、孤発性・家族性に共通した病態は未だ明らかにされていない。

一方、MPTP など薬物によるミトコンドリア機能障害が黒質ドパミン神経細胞死とパーキンソン病症状を誘発すること、孤発性患者の死後脳黒質でミトコンドリア機能障害が見られることから、パーキンソン病のミトコンドリア機能障害仮説が提唱され多くの研究が行われてきた。さらに近年、若年性パーキンソニズム原因遺伝子 *PARK2* (*Parkin*) が不良ミトコンドリアのオートファジーによる選択的分解 (mitophagy) を司ることが示唆され、ミトコンドリア機能障害仮説を強く支持するとして世界的に注目されている。これらはミトコンドリア機能障害が孤発性・家族性パーキンソン病患者に共通の中間表現型である可能性を示しているが、内因性ミトコンドリア機能障害が疾患の原因となる証拠はなく、*Parkin* 変異マウスも病態を再現しないこと、ミトコンドリアの脳部位特異性についての知見も乏しいことから、パーキンソン病とミトコンドリアの因果関係は未だ明らかにされていない。

申請者はこれまで、ヒト死後脳やマウスを用いてミトコンドリア DNA (mtDNA) 動態について研究を行ってきた。特に、孤発性パーキンソン病患者の黒質神経細胞でしばしば蓄積が認められ、ヒトの代表的な欠失 mtDNA 分子 “common deletion” (mtDNA 全長の約 1/3 に相当する 4977-bp を欠失) が、健常者でも年齢とともに増加することを明らかにした (Fuke *et al.*, *Neurosci Lett.* 2008)。この老化に伴う脳での欠失 mtDNA 蓄積は野生型マウスでも確認され、特に皮質や基底核で顕著であること、mtDNA ポリメラーゼ遺伝子 *Polg* の機能欠損変異をヘテロで持つ knock-in マウス (*Polg^{+D257A}*) では脳と筋特異的に蓄積が促進され、ミトコンドリア機能障害を呈することを示した (図 1、Fuke *et al.*, *Ann Clin Transl Neurol.* 2014)。



この脳における欠失 mtDNA の加齢に伴う普遍的な蓄積や、mtDNA メンテナンスの欠陥に対する脆弱性は、パーキンソン病の組織特異性や加齢に伴う発病率上昇を上手く説明する。また、マウス脳部位解析から、黒質や腹側被蓋野では、mtDNA コピー数が最も多いことを明らかにした (Fuke *et al.*, *BBA-Bioenergetics.* 2011)。これらの結果は、パーキンソン病関連脳部位における特徴的な mtDNA 動態の存在を示唆するとともに、これまでミトコンドリア機能障害仮説では説明が困難であったパーキンソン病の脳部位特異的な病態を理解する手掛かりとなるだろう。さらに、ヒト *POLG1* は脳や筋で欠失 mtDNA を蓄積する家族性慢性進行性外眼筋麻痺 (CPEO) 原因遺伝子の一つであるが、*POLG1* 遺伝子変異と孤発性パーキンソン病との相関が報告されているだけでなく、家族性 CPEO 患者でしばしばパーキンソニズム併発が見られることも強い相関を支持する。

2. 研究の目的

以上の背景から、mtDNA メンテナンス障害や老化によって起こる脳での欠失 mtDNA 蓄積と、その結果としてのミトコンドリア機能障害が、孤発性および家族性パーキンソン病患者の一部に共通の、発症や進行に関わる因子の一つとなり得ると考えられる。しかし、パーキンソン病におけるミトコンドリア機能障害仮説は未だ証明されていない。その理由として、中枢神経系のミトコンドリア機能障害がミトコンドリア病や他の精神神経疾患でも観察されること、パーキンソン病の症状を再現するモデル動物が存在しないことが挙げられる。

そこで本研究では、孤発性・家族性パーキンソン病の中間表現型としてミトコンドリア異常に焦点をあて、特に孤発例患者の脳で観察される欠失 mtDNA 蓄積をミトコンドリア機能障害における内因性の原因として注目し、ミトコンドリア機能の観点からパーキンソン病の病態の解明と動物モデルによる再現を目的とした。

一方、それぞれのミトコンドリアには、複数の mtDNA 分子が存在することが知られている。つまり、mitophagy によって不良ミトコンドリアが分解される際に、内部の mtDNA 分子も同時に分解されていると考えられる。したがって、ミトコンドリア機能障害の原因が変異 mtDNA の蓄積によるものだった場合、mitophagy は結果的に変異

mtDNA 分子の能動的な分解を行うとも考えられる。そこで、mitophagy によるミトコンドリア品質管理が、欠失 mtDNA の蓄積に与える影響を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

Polg^{+/-D257A}; Parkin^{-/-} マウスの作製と表現型の解析：先述の通り、*Parkin^{-/-}* マウスは顕著な神経変性や運動機能障害を示さず、パーキンソン病患者の病態を再現しない。その理由として、飼育環境下の *Parkin^{-/-}* マウスはミトコンドリア機能障害の発生頻度が低いために、正常ミトコンドリアによって機能が補填され、細胞への影響が小さいことが考えられる。したがって、*Parkin^{-/-}* マウス脳で欠失 mtDNA 蓄積を促進するために *Polg* 遺伝子変異を導入し、ミトコンドリア機能障害の発生頻度を上げることで疾患の発症もしくは顕著な表現型を示す可能性を探るため、*Polg^{+/-D257A}; Parkin^{-/-}* 二重変異マウスを作製する。このマウスがパーキンソン病の病態を再現するかを検討するために、運動症状などについての行動表現型や、脳のミトコンドリア機能を評価するとともに、解剖学的解析を行う。

Mitophagy によるミトコンドリアおよび mtDNA 分解の選択性の解析：先述の通り、mitophagy は変異 mtDNA 分子の分解に関わっている可能性が考えられる。しかし、mitophagy が正常に機能しているはずの健康者や野生型マウス、*Polg* 遺伝子変異マウスの脳においても欠失 mtDNA の加齢に伴う蓄積は観察される。つまり、mitophagy によって分解されるミトコンドリアおよび欠失 mtDNA 分子と、分解されずに蓄積するものが存在する可能性が考えられる。そこで、抗 *Parkin* 抗体を用いた免疫沈降によって得られる不良ミトコンドリアについて、欠失 mtDNA 分子と野生型 mtDNA 分子の割合を調べるとともに、mtDNA の DNA 配列についての解析を行うことで、mitophagy による mtDNA 分解の選択性について検討する。ここで得られた結果は、mitophagy の生理的意義の一端を明らかにするだけでなく、欠失 mtDNA の加齢に伴う蓄積メカニズムを理解する上で新たな知見を与える。

4. 研究成果

不良ミトコンドリアの mitophagy による分解経路の障害が、*in vivo* において mtDNA 動態に与える影響を検討するために、まず *Parkin^{-/-}* マウス (> 50 週齢) の脳 (frontal lobe、hippocampus、basal ganglia) と肝臓から精製した DNA を用いて、欠失 mtDNA 蓄積や mtDNA コピー数を調べた。しかしながら、*Parkin^{-/-}* マウスと *Parkin^{+/-}* マウス、*Parkin^{-/-}* マウスとの間に有意な差は見られなかった。これは、飼育環

境下の *Parkin^{-/-}* マウスでは、野生型マウスと同様に欠失 mtDNA 蓄積やミトコンドリア機能障害発生頻度が低いために mitophagy 障害の影響が小さい可能性が考えられた。そこで、欠失 mtDNA 蓄積モデルである変異 *Polg^{+/-D257A}; Parkin^{-/-}* マウス二重変異マウスを作製し、mitophagy 障害による欠失 mtDNA 蓄積量の変化について調べているが、現在のところ 24 週齢では顕著な違いは見られていないことから、より週齢が進んだマウスでの解析や、黒質や腹側被蓋野などの特異的な脳部位に注目した解剖学的解析が必要であると考えられる。

イオノフォアである FCCP 処理は、ミトコンドリア膜電位の消失とともに *Parkin* のミトコンドリアへの局在変化を誘導し、不良ミトコンドリアが mitophagy によって分解されることが知られている。しかしながら、これらの報告は非神経細胞株が用いられ、神経由来の細胞における mitophagy の知見は乏しい。そこで本研究では、GFP-*Parkin* を発現するマウス神経芽細胞株 Neuro2a に FCCP 処理を行ったところ、ミトコンドリア脱分極条件においても GFP-*Parkin* の局在が観察されないミトコンドリアが少なくないことを明らかにした。更に、FCCP 処理によって時間とともに Neuro2a 細胞の *Parkin* タンパク量が減少することから、脱分極ミトコンドリアとともに mitophagy で分解されると考えられるが、一方でミトコンドリア外膜・内膜のマーカータンパクの減少が *Parkin* ほど顕著ではないこと、細胞分画後のミトコンドリア画分でも同様に *Parkin* が減少することを生化学的手法により明らかにした。これらの結果から、*Parkin* が局在しない、もしくは mitophagy に分解を受けないミトコンドリアが存在すると考えられるとともに、mitophagy によるミトコンドリア品質管理において、ミトコンドリアの脱分極は必要条件ではあるものの十分条件ではないことを示唆している。そこで、mitophagy によって分解されるミトコンドリアの特徴を明らかにするため、FCCP 処理による mitophagy 誘導後、*Parkin* に対する免疫沈降法によって *Parkin* 局在ミトコンドリアを濃縮し、これらが持つ mtDNA を精製する手法を確立した。今後、mitophagy による分解を受けるミトコンドリアについて、mtDNA の特徴について解析を行う。

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 1 件)

Takaoki Kasahara, Mizuho Ishiwata, Chihiro Kakiuchi, Satoshi Fuke, Nakao Iwata, Norio Ozaki, Hiroshi Kunugi, Yoshio Minabe, Kazuhiko Nakamura,

Yasuhide Iwata, Kumiko Fujii, Shigenobu Kanba, Hiroshi Ujike, Ichiro Kusumi, Muneko Kataoka, Nana Matoba, Atsushi Takata, Kazuya Iwamoto, Takeo Yoshikawa, Tadafumi Kato. "Enrichment of deleterious variants of mitochondrial DNA polymerase gene (POLG1) in bipolar disorder." *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. 査読有, DOI: 10.1111/pcn.12496, 2016.

〔学会発表〕(計 2 件)

Satoshi Fuke, Yasufumi Shigeyoshi, Natsu Koyama, Mie Kubota-Sakashita, Seiji Hitoshi, Tadafumi Kato "The local accumulation of mtDNA deletions in the brain and behavioral abnormalities in heterozygous Polg mutant mice." The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine & The 16th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, Tokyo, Japan, Oct. 2016

Satoshi Fuke, Mizue Kametani, Yasufumi Shigeyoshi, Mie Kubota-Sakashita, Kazuyuki Yamada, Seiji Hitoshi, and Tadafumi Kato. "A heterozygous mutation of *Polg* gene causes behavioral abnormalities due to the tissue-specific accumulation of multiple mtDNA deletions in mice." BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会年会 合同大会) ワークショップ(一般演題、査読有) 神戸、2015 年 12 月

〔図書〕(計 2 件)

福家聡、等誠司「免疫性神経疾患の病態・治療と神経幹細胞」*医学のあゆみ 免疫性神経疾患 病態解明と治療の最前線*、医歯薬出版、225 巻 5 号、557-562 頁、2015 年

福家聡、等誠司「免疫性神経疾患と神経幹細胞」*日本臨牀 免疫性神経疾患 基礎・臨床研究の最新知見*、73(増刊号)、57-65 頁、2015 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

福家 聡 (FUKE, Satoshi)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：20422660

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者