科研費

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号: 32620

研究種目: 研究活動スタート支援

研究期間: 2016~2017 課題番号: 16H07184

研究課題名(和文)リソソーム病の病態とパーキンソン病発症機序の関与の検討

研究課題名(英文) Investigation of the association between lysosomal storage disorder and Parkinson's disease

研究代表者

王子 悠(Oji, Yutaka)

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号:60777845

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文):研究代表者は、リソソーム病に関わる遺伝子Xの新規病的変異を3家系の常染色体優性パーキンソン病において見出した。iPS細胞由来ドパミン神経細胞の解析ではオートファジーリソソーム系の異常を見出し -シヌクレインの増加を確認した。さらに遺伝子X導入マウスでは黒質のチロシンヒドロキシラーゼ陽性細胞の脱落を確認した。これらの結果は、リソソーム病の病態メカニズムがパーキンソン病の発症機序に重要に関与することを示唆すると考えられた。

研究成果の概要(英文): Research leader found a novel mutation of gene X involved in the onset of lysosomal disease in three families of autosomal dominant Parkinson's disease. Impairment of autophagic-lysosomal pathway and elevation of -synuclein were revealed in induced pluripotent stem cells (iPSCs)-derived dopaminergic neurons. Neuronal loss of tyrosine-hydroxylase (TH) positive neurons in the substantia nigra was revealed in mice harboring mutation in gene X. These findings suggest the important involvement of mechanism of lysosomal storage disorder in the pathogenesis of Parkinson's disease.

研究分野: パーキンソン病

キーワード: リソソーム病 オートファジー iPS細胞 -シヌクレイン

1.研究開始当初の背景

パーキンソン病(以下PD)は中脳黒質のドパミン神経細胞の変性にともない,運動機能障害が前景となる神経変性疾患である。ほとんどは孤発性に発症するが、一部患者である遺伝性 PD としてれまで原因遺伝子が報告されている。その遺伝性 PD の原因遺伝子産物の機能解析のより PD 病態におけるドパミン神経細胞のより PD 病態におけるドパミン神経細胞のより PD 病態におけるドパミン神経細胞のより PD 病態におけるドパミン神経細胞のより PD 病態におけるドパミン神経細胞のより アポトーシス、蛋白分解機構のよりでは、アポトーシス、蛋白分解機構の異常が一下リソソーム系)など様々な機構の異常が示唆されている。

近年はゴーシェ病の原因遺伝子であるグ ルコセレブロダーゼ遺伝子(以下 GBA)変異が PD 発症の最大の遺伝的リスクであることが 知られている。ゴーシェ病はスフィンゴ脂質 代謝異常を来す疾患であり最も頻度の高い リソソーム病のひとつである。GBA 機能低下 により基質であるグルコシルセラミドが細 胞内に蓄積することで臓器障害を引き起こ す疾患である。ゴーシェ病は GBA 変異のホモ 接合体で発症するが、GBA 変異の関連する PD はヘテロ接合体で発症することが知られて いる。興味深いことに GBA 変異関連 PD では、 特発性 PD に特徴的な脳病理所見であるレビ ー小体をみとめるため、GBA 機能異常は孤発 性 PD の病態に関与する可能性が高いと考え られる。先行研究では GBA 機能異常により小 胞体ストレス、オートファジー・リソソーム 系の異常、ミトコンドリア障害などが報告さ れており PD 病態との関連が示唆されてきた が、ドパミン神経細胞死を引き起こす直接的 な原因は未だ明らかになっていない。

一方、非常に稀ではあるがゴーシェ病以外のリソソーム病関連遺伝子変異において PD 患者例が報告されている。これらの PD 患者においてもレビー小体陽性のパーキンソニズムを示す例が報告されている。これらの背景から、研究代表者はリソソーム病の病態には PD 発症に関わる重要なメカニズムが存在する可能性があるのではないかと考えた。

2.研究の目的

研究代表者は、先行研究にてリソソーム病関連遺伝子(X)に病的変異を持つ常染色体優性 PD 患者を 3 家系見出した(論文投稿準備中)。遺伝子 X は、ホモ接合体変異や複合へテロ接合体変異でリソソーム病を発症し得るが、遺伝子 X 変異陽性 PD 患者はヘテロ接合体変異で PD を発症しており、遺伝子 X 変異を持つ PD 患者の臨床像は特発性 PD に酷似していた。本研究では、遺伝子 X 変異陽性 PD 患者由来の皮膚線維芽細胞および iPS 細胞由来ドパミン神経細胞を用いて、オートファジー・リソソーム系の変化の評価を中心と

した機能解析を行うことにより、PD を発症するメカニズムにおけるリソソーム病の病態関与について検討することを目的とする。また、遺伝子 X 変異導入マウスを用いた形態学的検討を行うことも目的とする。

3. 研究の方法

遺伝子 X 変異を持つ PD 患者から皮膚線維芽細胞を得て電子顕微鏡、免疫染色法、ウェスタンブロット法を用いて健常対照との比較を行った。また、患者由来 iPS 細胞を樹立しドパミン神経に分化させた細胞を用いてウェスタンブロット法によりオートファジー・リソソーム機能の変化やレビー小体の主要構成蛋白である -シヌクレインの蛋白量を健常対照と比較した。

遺伝子 X 変異導入マウスについては免疫染色法にて黒質の tyrosine-hydroxylase 陽性細胞を同定し細胞カウントを行い野生型マウスとの比較を行った。さらに、アストロサイトやミクログリアのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP)と ionized calcium binding adaptor molecule1 (Iba1)による染色も行い野生型マウスとの比較を行った。

4. 研究成果

リソソーム病関連遺伝子(X)の病的遺伝子 変異をもつ 3 家系の常染色体優性 PD 患者に ついて、皮膚線維芽細胞を電子顕微鏡および 免疫染色法で形態学的解析を行った。電子顕 微鏡による解析では遺伝子X変異陽性パーキ ンソン病患者においてオートファゴソーム の増加が顕著にみられた。また、免疫染色法 により lysosome associated membrane protein-2 (LAMP-2)の増加もみとめた。これ らは遺伝子X変異によりリソソーム機能障害 を示唆する所見と考えられた。次にリソソー ム阻害薬であるバフィロマイシン A1 を用い autophagy flux をウェスタンブロット法によ リ評価した。遺伝子 X 変異陽性 PD 患者由来 細胞では、健常対照に比べてオートファゴソ ームのマーカーである LC3-II が定常状態で 増加していたが、バフィロマイシン A1 を添 加した状態では健常対照に比べて LC3-II の 顕著な上昇がみられなかった(図 1)。この結 果は、定常状態における LC3-11 の上昇がリ ソソーム障害に起因することを示唆する所 見と考えられた。

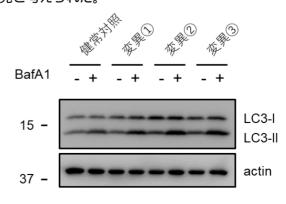


図1. 遺伝子 X 変異由来 PD 患者の皮膚線維芽細胞では autophagic flux の障害がある。

さらに遺伝子 X 変異陽性 PD 患者由来の皮膚線維芽細胞では、健常対照に比べて選択的オートファジーの基質である p62 蛋白の上昇もみとめた(図 2)。これらの所見は、遺伝子 X 変異によるオートファジー・リソソーム系の異常と考えられた。

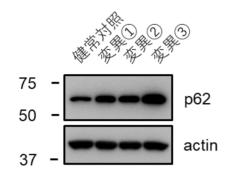


図2. 遺伝子 X 変異由来 PD 患者の皮膚線維芽細胞では p62 の上昇がある。

パーキンソン病の病態においてオートフ ァジー・リソソーム系の異常は、 -シヌク レインの蓄積を起こし細胞障害に関与する とされている。皮膚線維芽細胞で得られたオ ートファジー・リソソーム系の異常を示唆す る結果を踏まえて、iPS 細胞由来ドパミン神 経細胞による解析を行い、遺伝子X変異陽性 PD 患者由来ドパミン神経細胞で LC3-II の上 昇をみとめた。さらに、LAMP-1 や LAMP-2 な どリソソーム膜蛋白、カテプシン D や GBA な どリソソーム酵素の蛋白レベルの減少およ びそれらのリソソーム酵素の活性低下をみ これらのリソソーム異常に加えて、 遺伝子 X 変異陽性 PD 患者由来の細胞では シヌクレインの蛋白レベルの上昇もみとめ た(図3)。これらの結果は、リソソーム病の 病態とパーキンソン病の病態の関与を示唆 するものと考えられた。

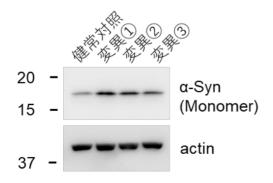
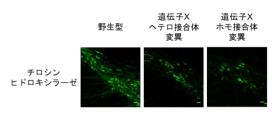


図3. 図2. 遺伝子 X 変異由来 PD 患者の iPS 細胞から分化させたドパミン神経細胞では -シヌクレイン(-Syn)の上昇がみられる。

遺伝子 X の異常が PD 病態に関与することを検証するために、遺伝子 X 変異導入マウスにて中脳黒質のチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞のカウントを行いその脱落の有無を評価した。遺伝子 X 変異導入マウスは、加齢により歩行障害など運動障害を呈しリソソーム病の表現型としてスフィンゴ脂質の構成変化をみとめた。

7月齢の遺伝子 X 変異導入マウスの中脳黒質についてチロシンヒドロキシラーゼ抗体を用いて免疫染色を行ったところ、野生型マウスと比較してヘテロ接合体マウスおよびホモ接合体マウスのいずれにおいても顕著にチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞が減少していた(図 4)。



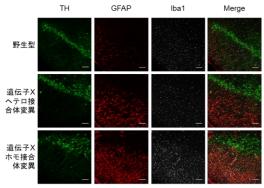
Scale Bar = 20 µm

図 4.の遺伝子 X 変異導入マウス(7 月齢)では、 中脳黒質のチロシンヒドロキシラーゼ陽性 神経細胞の減少がみられる。

さらに8月齢のマウスにてチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞のカウントを行い、遺伝子 X 変異導入マウスでは、野生型と比較してヘテロ接合体変異で57%、ホモ接合体変異で60%のチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞の脱落をみとめた。これらの結果は遺伝子 X 変異導入マウスにおけるドパミン神経細胞障害を示唆する所見と考えられた。

さらに遺伝子 X 変異導入マウスの中脳黒質において GFAP 抗体と Iba1 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、遺伝子 X 変異導入マウスではヘテロ接合体とホモ接合体のいずれにおいても顕著な増加をみとめた。これらは神経炎症を示唆する所見と考えられた(図 5)。リソソーム病では中枢神経症状を来すことが多いが神経炎症の関与が注目されている。これらの所見はリソソーム病の病態がドパミン神経細胞脱落に関与することを示唆する所見と考えられた。

本研究では、リソソーム病の発症に関与する遺伝子変異がオートファジー・リソソーム機能異常を来し PD の病態に関与し得ることを明らかにした。今後、iPS 細胞由来ドパミン神経細胞やモデルマウスの解析を継続し病態解明を目指し、さらにその表現型の改善をもたらす化合物を探索することにより創薬を目指す。



Scale Bar = 100 um

図 5.遺伝子 X 変異導入マウスでは、GFAP お よび Iba1 陽性細胞の増加をみとめた。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

<u>王子悠(OJI, Yutaka)</u>

順天堂大学・神経学講座・助手

研究者番号:60777845

(2)研究分担者

()

研究者番号:

| (3)連携研究者 | (|) |
|----------|---|---|
| 研究者番号: | | |
| (4)研究協力者 | (|) |