

平成 30 年 6 月 19 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：16H07185

研究課題名(和文) エキソソームをターゲットとしたパーキンソン病の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) The exploration of pathophysiology and therapeutic development of PD by targeting exosomes

研究代表者

常深 泰司 (Tsunemi, Taiji)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50401344

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)：in vitro invagination assayでスクリーニングし、ATP13A2/PARK9に関するFYVEタンパク質Aを発見した。ATP13A2と共局在し、免疫沈降法でも関連が確認された。ATP13A2の喪失でタンパク質Aの局在も変化した。この2つの機能的な関係について検討を進めている。

Kufor-Rakeb症候群(KRS)の患者のドーパミン細胞の分化初期よりエキソソーム分泌が低下した。ALIXのshRNAはエキソソームの分泌を亢進し、シヌクレイン蓄積、ミトコンドリア障害を軽減し、KRSの主病態がエキソソームの分泌障害で、この経路の改善が他の細胞内小器官にも有益かもしれない。

研究成果の概要(英文)：By screening FYVE proteins through in vitro invagination assay, "Protein A", which is associated with ATP13A2/PARK9 was discovered. It is co-localized with ATP13A2 on endosomes, and the association of two proteins was determined by immunoprecipitation analysis. The localization of Protein A is altered in ATP13A2-deficient cells. The functional association between two proteins is under investigation.

At the early stage after the initiation of differentiation of dopaminergic neurons taken from patients with Kufor-Rakeb syndrome, the secretion of exosomes was already reduced. Lentiviral shRNA against ALIX enhanced the secretion of exosomes and attenuated alpha synuclein accumulation and abnormal mitochondrial respiration, suggesting that the main pathology of KRS involves the impaired exosome secretion, and therefore, improving this pathway would be beneficial to the issues observed in other intracellular organelles.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：パーキンソン病 Kufor-Rakeb症候群 アルファシヌクレイン エキソソーム ATP13A2 PARK9

1. 研究開始当初の背景

(1) パーキンソン病 (PD) では中脳黒質のドパミン細胞が変性、脱落するが、残存する神経細胞にレヴィ小体と呼ばれる細胞質凝集体を認める。レヴィ小体の主要構成成分が前シナプスに局在する シヌクレインで、シヌクレインが脳内に凝集体を形成する疾患を総じてシヌクレオパチーと呼ぶ。シヌクレインの点変異により家族性 PD が、二重体、三重体変異により若年性、幼年性 PD が発症することは、シヌクレインが PD の病態に深く関与し、発現量の小さな変化でも容量依存性に神経細胞に毒性を呈することを示している (Xu, Neurobiol Aging; 36, 2015)。

(2) 長い研究によって シヌクレインが脳内に蓄積する原因は少しずつ明らかとなってきた。分解では、ユビキチンプロテアソーム経路、シャペロン介在性オートファジー、エンドソーム経路、マクロオートファジーなど多彩な経路によって シヌクレインが分解されることが報告されてきた。このうちユビキチンプロテアソーム経路を除く全てはライソゾームに終息する。近年はこのライソゾームの機能障害が注目されている (Tofaris, Mov Dis; 27, 2012)。ライソゾーム内の分解酵素、ライソゾームに局在するタンパク質の遺伝子変異は、60を超えるライソゾーム蓄積病の原因となっているが、その患者のほとんどが神経発達障害、神経変性を呈する。これらの神経症状にはパーキンソン症状が含まれ (Coutinho, Mol Genet Metab; 2015 Aug 18)、例えばゴーシェ病の中には典型的なパーキンソン症状を呈する症例があり、原因遺伝子である グルコシダーゼは孤発性 PD のリスク遺伝子でもある (Sidransky, NEJM; 361, 2009)。本研究ではもう1つのライソゾームタンパク質の機能喪失によってパーキンソン症状を呈する Kufor-Rakeb 症候群 (KRS) を対象とした。

(3) KRS はライソゾームタンパク質である ATP13A2/PARK9 (以後 PARK9 と略す) の機能喪失が原因で生じる若年発症の比較的急性に進行するパーキンソン徴候を主体とし、錐体路徴候、痴呆、核外性眼球運動障害を合併する (Ramirez, Nat Genet; 38, 2006)。PARK9 は中脳黒質に特に多く発現しており、アミノ酸配列から2価イオンの輸送体と想定されているが、基質は判明していない。興味深いことに孤発性 PD 患者のドパミン細胞で PARK9 の発現量が増加しており、様々なモデルで PARK9 の シヌクレインに対する神経

保護作用が示されているが、その機序は明確ではない。研究代表者らは KRS 患者より採取した線維芽細胞、PARK9 の発現を抑制した大脳皮質細胞を用いて PARK9 の機能低下によりライソゾームのタンパク分解能が低下すること (Usenovic J Neurosci; 32, 2012)、PARK9 の発現を shRNA で抑制したマウス大脳皮質細胞と PARK9 のノックアウトマウスにて シヌクレインが蓄積することを報告した (Schulthesis HumMolGenet; 22, 2013)。さらに小胞体に集積するべき亜鉛が PARK9 の機能低下した細胞では低下しており、これによって酸性スフィンゴミエリナーゼの活性が低下することがライソゾームの機能障害の一因であることを報告した (Tsunemi HumMolGenet; 23, 2014)。さらに PARK9 が multivesicular bodies (MVBs) にも局在し、intraluminal vesicles (ILVs, 胞内小胞体) の生成を制御していること。PARK9 の機能低下により exosome (エキソソーム) の放出が低下すること。さらにエキソソームが シヌクレインの細胞外放出に関与しており、この経路の低下により シヌクレインが蓄積する可能性を発見した (Tsunemi, J Neurosci; 34 2014)。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの知見をさらに発展させ、PARK9 の機能障害によるエキソソームの減少と シヌクレインの蓄積のメカニズムを解明し、ここをターゲットとした KRS のみならずより一般的なシヌクレオパチーの治療戦略を立てることを目的とする。具体的な目的は以下の2つに集約される。

1) 亜鉛を介した ILVs 生成における PARK9 の役割を明らかとする。

2) エキソソームと シヌクレインの放出障害が KRS の病態に与える影響を患者 iPS 細胞より分化したドパミン細胞をモデルに解明する。

3. 研究の方法

亜鉛を介した胞内小胞体生成における PARK9 の役割を明らかとする研究では、FYVE タンパク質に注目した。FYVE ドメインは 60~70 アミノ酸からなる亜鉛結合ドメインで、酵母からヒトまで 300 種類以上のタンパク質で同定されている。FYVE ドメインはホスファチジルイノシトール3リン酸 (PI(3)P) と結合する。エンドソームに局在する多くのタンパク質は FYVE ドメインをもち、PI(3)P が豊富なエンドソームへと集積するが、この結合

の安定化のために亜鉛が必要と考えられている。この FYVE タンパク質のエンドソームへの集積を亜鉛のキレーションと PARK9 の shRNA を用いた発現抑制、PARK9 変異を有するドパミン細胞モデルで *in vitro* invagination assay を用いて定量的に測定する。その結果 FYVE タンパク質をスクリーニングし、PARK9 の病態と関連している同定する。さらに PARK9 が亜鉛を通じて MVBs 内の ILVs を生成する分子生物学的なメカニズムを解明する。

続いてエキソソームと シヌクレインの放出障害が PD の病態に与える影響の研究では、研究代表者らが確立した iPS 細胞から分化したドパミン細胞の長期培養モデルを用いる。このモデルでは、分化後 40 日にてエキソソームの放出低下が、分化後 60 日よりライソゾームの機能障害が、分化後 90 日より不溶化 シヌクレインの蓄積が、分化後 120 日にミトコンドリア呼吸の低下と、継時的な細胞内の様々な器官の異常を認めた。つまりエキソソームの障害が KRS の病態における主症状である可能性を示唆している。本研究では、健常人と Kufor-Rakeb 症候群患者から分化したドパミン細胞でエキソソームの産生をコントロールした影響を観察する。また、近年 PD を含む神経変性疾患では、変性した異常タンパク質が細胞間を伝播して病態が拡散するプリオン病のような機序が提唱されている。エキソソームは伝播を介する 1 つの因子として注目されている。本研究ではエキソソームが シヌクレインの脳内伝播に与える影響を解明する。

4. 研究成果

目的 1 : PARK9 の病態と関連する FYVE タンパク質を同定する。

エンドソームの膜形成における EEA1、rabenosyn-5、phafin2、ESCRT 経路における Hrs、ホスファチジルイノシトールリン酸の転換における PIKFYVE、MTMR4 などのタンパク質は FYVE ドメインを有し、FYVE タンパク質と総称されている (Raiborg, FEBS J; 280, 2013)。本研究では *in vitro* invagination assay を確立して、FYVE タンパク質をスクリーニングし、PARK9 による胞内小胞体形成異常に関与するタンパク質 (タンパク質 A) を発見した。

グリセロリン脂質に分類されるホスファリジルイノシトール (PtdIns) はタンパクを細胞膜やエンドソームへ集積させることにより細胞骨格や小胞体輸送、受容体シグナル

を制御している。タンパク質 A は PtdIns をリン酸化することにより様々な細胞内活動に影響を与えている。タンパク質 A は細胞質の他、後期エンドソームにも位置する。FYVE タンパク質はエンドソームへ集積する (Kutateladze, Biochim Biophys Acta; 1761, 2006) にあたり、FYVE ドメインと PI(3)P が結合するが、この結合を安定化するのに亜鉛が必要である (Gaulhier, Nature; 394, 1998)。まず亜鉛をキレートすることによって、細胞質から後期エンドソームへの局在の偏移が消失した。共焦点レーザー顕微鏡による観察では、正常細胞では PARK9 と後期エンドソームで共局在していることが観察され、免疫沈降法で物理的な相互作用が確認された。一方、shRNA による PARK9 のノックダウン細胞、KRS 患者由来のドパミン細胞など PARK9 の機能が低下した細胞では、タンパク質 A の細胞内局在も変化して後期エンドソームへの局在が低下し、それにつれて MVB 内の ILVs も減少し、エキソソームの放出も低下した。一方、タンパク質 A の過剰発現は PARK9 のノックダウン細胞の表現形を部分的ではあるが改善した。KRS のエンドソームでは亜鉛が低下しているが (Tsunemi, HumMolGenet; 2014)、過剰発現のみでは完全には回復しないと考えられた。しかし亜鉛負荷ではタンパク質 A の細胞内局在は改善せず、むしろ細胞毒性が増した。PARK9 の機能障害では、エンドソームの亜鉛が減少するとともに細胞質の亜鉛は増加する結果が得られており、亜鉛の細胞内局在が変化している。つまり病態が単純ではないことを示唆している。PARK9 のノックダウン細胞、KRS 患者のドパミン細胞ではタンパク質 A の発現は亢進しており、PARK9 とタンパク質 A の機能的な補完関係が示唆された。タンパク質 A の変異はヒトでは眼病変、多彩な先天奇形とともに末梢神経障害の原因遺伝子であり、ノックアウトマウスは中枢神経変性が生じることが知られており、神経細胞の機能に重要な役割を果たしている。

現在、このタンパク質 A の機能喪失によって生じる神経障害の機序、蓄積するタンパク質について、また PARK9 との直接的な結合の有無についてさらに検討を進めている。

このように本研究では当初の予定通り PARK9 の病態に関連する FYVE タンパク質を同定し、機能解析を行った。

目的 2 : PARK9 の機能障害によるエキソソームと シヌクレインの放出障害が神経細胞に与える影響を解明する。

健常人4名と Kufor-Rakeb 症候群 (KRS) 患者2名の iPS 細胞から分化したドパミン細胞の長期培養を行い、分化40日目よりエクソソームの分泌が低下していることを観察した。ESCRT III 関連タンパク質で胞内小体生成に重要な役割を果たしている ALIX はエクソソームの源である ILVs に抑制的に作用していることが知られている。ALIX に対する shRNA を発現して ALIX の発現を低下させることに成功した。ALIX の発現抑制によって H4 細胞ばかりでなくドパミン細胞でもエクソソームの分泌が亢進し、シヌクレインの蓄積を軽減した。ALIX の発現抑制は Pulse chase 法によって測定したライソゾームタンパク質分解には影響を与えなかったが、エクソソームを介した細胞外放出は増加させたことからシヌクレインの発現低下は細胞外放出亢進によると結論づけた。

中性スフィンゴミエナーゼ (nSMase) の投与は ESCRT 経路非依存的にエクソソーム放出が増加することが報告されていた (Trajkovic, Science; 319, 2008) が、実際、H4 細胞でもドパミン細胞でも nSMase を細胞外液に加えたところ、エクソソームの分泌が亢進した。しかしシヌクレインの放出量は変化せず、よって細胞内蓄積量も軽減しなかった。これらの結果は、エクソソームの産生、分泌の刺激方法によってエクソソームが含有するタンパク質の組成も変わり、細胞内のタンパク量にも影響を与えることを意味する。

さらに KRS 患者のドパミン細胞では分化初期にはミトコンドリア呼吸能は上昇し、後期、120 日目からミトコンドリア呼吸が低下するか、このミトコンドリア機能の変化も、ALIX の発現抑制により改善した。以上の結果は KRS の細胞障害の大きな原因の1つがエクソソームの分泌障害であり、この経路を改善することで細胞内の他の細胞内小器官の障害も改善し得ることを示唆している。

更にレンチウイルスを用いた PARK9 の長期的な発現回復により、エクソソームの分泌低下、シヌクレインの細胞内蓄積、ミトコンドリア機能異常等の一連のイベントは正常化し、PARK9 の機能喪失が直接の原因となっていることを確認した。また shRNA を用いた

シヌクレインの発現抑制でも、エクソソームの分泌低下は改善し、ミトコンドリア機能異常多くの機能は回復したが、PARK9 の過剰発現ほどではなかった。これらの結果は、エクソソームの放出低下が一連のイベントの根本の原因である可能性を示唆している。

さらに、エクソソームの分泌促進が、周囲の細胞に与える影響について検討を行った。蛍光標識したシヌクレイン (Alexa555-syn) を細胞に取り込ませた後にエクソソームを回収して蛍光顕微鏡で観察し、エクソソーム内にシヌクレインが存在していることを確認した。このエクソソームは他の細胞に取り込まれ、含有しているシヌクレインが細胞質内に取り込まれることを確認した。以上の結果は、エクソソームの分泌促進によって分泌する細胞ではシヌクレインが軽減するため有益であるが、シヌクレインの細胞間の伝播を促進して病態を拡散する可能性があることを示している。

シヌクレインが神経細胞間を伝播するか解明するために micro fluidics を用いた。ここでは左右のチャンバーに別々に iPS 細胞から分化した神経細胞を培養して、チャンバーをつなぐグループを通る軸索のみで接触させることができる。これを用いてシヌクレインの細胞間伝播を実験した。まず、Alexa555-syn を培養液に投与したところ、健常人由来でも KRS 患者由来のドパミン細胞でもシヌクレインの取り込みに変わりはなく、取り込まれたシヌクレインは軸索を伝って輸送され、放出されることを観察した。さらに放出されたシヌクレインは対側の細胞に取り込まれることを観察した。さらにレンチウイルスを用いて PARK9 の発現を亢進したところ、細胞体からのエクソソームを介したシヌクレインの放出が亢進され、軸索輸送されて対側のチャンバーに放出されるシヌクレインの量は変化なかった。これらの結果は PARK9 の発現の変化はシヌクレインの神経細胞間の伝播には影響を与えない、ということの意味する。

脳内のシヌクレインの伝播には、グリア細胞が大きな影響を与えていると考えられる。グリア細胞は神経細胞の10倍以上多く存在して、神経細胞の機能を助けているばかりでなく、近年の研究からはより積極的に神経細胞活動に影響を与えていることがわかってきている。このグリア細胞の果たす役割を解明するため、研究代表者らはプロトコルに沿って健常人と KRS 患者の iPS 細胞から星状細胞へ分化させた。これらの細胞は星状細胞のマーカーである S100 β 、GFAP が同様に発現していた。まず、星状細胞から放出されるエクソソームを測定したところ、単位細胞あたり神経細胞よりはるかに多くのエクソソームが測定された。定常状態では星状細胞にシヌクレインは発現していないが、細胞

外液に シヌクレインを加えたところ、星状細胞に素早く吸収されることを観察した。星状細胞は神経細胞よりタンパク分解能に優れているとともに、細胞外への分泌能も高かった。これらは PARK9 の変異細胞では低下していたが、神経細胞ほどではないことが観察された。さらに神経細胞と星状細胞を共培養したところ、星状細胞は培養液に放出された

シヌクレインを吸収することのみならず、神経細胞の シヌクレイン量に影響を与えることを観察した。すなわち、星状細胞の共培養により神経細胞の シヌクレイン蓄積が軽減した。さらに、神経細胞間の シヌクレインの伝播に抑制的に機能することを観察した。以上の結果は、エキソソームの過剰発現により シヌクレインの放出を促進しても、周囲に存在する星状細胞が吸収して、脳内で シヌクレインの伝播は促進しない可能性を示唆している。現在 PARK9 のノックアウトマウスの線条体に繊維化した シヌクレインを注入し、3ヶ月後のリン酸化 シヌクレイン病理を検討し、PARK9 の発現量がシヌクレインの脳内伝播に影与える響を検討している。

本研究では、当初の目的であるエキソソームと シヌクレインの放出障害が KRS の神経変性の発端であることを示した。そしてエキソソームの放出促進により様々な細胞障害を改善することに成功した。以上の結果は、KRS のみならず シヌクレインの蓄積を呈するシヌクレインノパチーの新たな治療戦略を示している。さらに神経細胞から放出されたシヌクレインの行方の解明や、星状細胞が神経細胞に与える保護の効果の解明など、新たな研究テーマを提示している。

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7件)

Mazzulli JR, Zunke F, Tsunemi T, Toker NJ, Jeon S, Burbulla LF, Patnaik S, Sidransky E, Maragan JJ, Sue CM, and Krainc D, Activation of -Glucocerebrosidase Reduces Pathological -Synuclein and Restores Lysosomal Function in Parkinson's Patient Midbrain Neurons, J Neurosci, 査読有、36 巻、2016、7693-7706

常深泰司、「Dimitri Krainc」素顔のニューロサイエンティスト・クリニカルニューロサイエンス、査読無、34 巻 1 号、2016、123

常深泰司、「DRPLA の最新研究進歩」 特集 “ 脊髄小脳変性症病態の最新進歩 ” 、難病と在宅ケア、2016、15 巻 1 号、7-11、常深泰司、服部信孝・日本におけるパーキンソン病治療の変遷と展望 特集 パーキンソン病・日本臨床、査読無、75 巻 1 号、2017、14-20

常深泰司、服部信孝・「総論」特集 “ 脊髄小脳変性症の最近の治療と研究 ” ・難病と在宅ケア、査読無、23 巻 11 号、2018、5-8

石黒雄太、常深泰司、服部信孝・「パーキンソン症状をきたす脊髄小脳変性症」 特集 “ 脊髄小脳変性症の最近の治療と研究 ” ・難病と在宅ケア、査読無、23 巻 11 号、2018、17-20

常深泰司・ATP13A2 “ パーキンソン病(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート ” ・日本臨床、査読無、76 巻増刊 4、2018、73-78

[学会発表](計7件)

常深泰司、Kufor-Rakeb 症候群におけるエンドライソゾーム機能障害、第 35 回日本認知症学会学術集会、2016 年 12 月 1 日

Taiji Tsunemi、Asako Yoroizaka、Wado Akamatsu、Hattori Nobutaka、ATP13A2/PARK9 deficiency leads to impaired lysosomal exocytosis・老人性疾患病態・治療研究センター / ゲノム・再生医療センター合同研究発表会、2017 年 2 月 24 日

Taiji Tsunemi、Clarissa Valdez、Katarina Trajkovic、Asako Yoroizaka、Kana Hamada、Sohee Jeon、Malini Krishna Vangipuram Suresh、Nobutaka Hattori、

Dimitri Krainc、The effect of impaired biogenesis and release of exosomes on the alpha synuclein accumulation in Kufor-Rakeb syndrome、第 39 回日本分子生物学会・2017 年 9 月 17 日

Taiji Tsunemi、Yuta Ishiguro、Katarina Trajkovic、Zong Xie、Tamara Perez-Rosello、Joseph Mazzulli、Wado Akamatsu、Haoxing Xu、Jim Surmeier、Dimitri Krainc、Nobutaka Hattori、ATP13A2/PARK9 regulates intracellular a-synuclein levels through exocytotic pathways、XXIII World Congress of Neurology・2017 年 9 月 17 日

常深泰司、石黒雄太、鎧坂朝子、赤松和戸、服部信孝、パーキンソン病の遺伝子変異と環境因子が シヌクレインの伝播に与える影響、平成 29 年度プロジェクト研究報告会・2018 年 3 月 23 日

Taiji Tsunemi、Yuta Ishiguro、Asako Yoroizaka、Wado Akamatsu、Nobutaka Hattori、Lysosomal exocytosis and astrocytic uptake control the alpha-synuclein levels in PARK9 DA neurons、第 59 回日本神経学会学術大会、2018 年 5 月 23 日

Yuta Ishiguro、Taiji Tsunemi、Asako Yoroizaka、Wado Akamatsu、Nobutaka Hattori、The increased -syn expression inhibits exosome secretion、第 59 回日本神経学会学術大会、2018 年 5 月 24 日

〔図書〕(計 1 件)

常深泰司、エキソソーム放出障害による神経変性機序・、ブレインサイエンスレビュー-2018、2018 年、163-184

6. 研究組織

(1) 研究代表者

常深 泰司 (TSUNEMI Taiji)

順天堂大学・医学(系)研究科

・ 准教授

研究者番号 : 50401344