

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09673

研究課題名(和文) 部位特異的アストロサイト機能不全に着目した環境毒誘発パーキンソニズムの病態解析

研究課題名(英文) Studies of rotenone-induced dopaminergic neurodegeneration focusing on brain region-specific astrocyte dysfunction.

研究代表者

宮崎 育子 (Miyazaki, Ikuko)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40335633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ロテノン曝露による中脳アストロサイトを介した神経障害はドパミン(DA)神経特異的であり、その神経障害には細胞内DAの酸化により生成されたDAキノンが関与することが明らかとなった。ロテノン曝露による腸管神経障害には、腸管アストロサイト様グリア細胞における抗酸化分子メタロチオネイン(MT)発現低下が関与することが示された。さらに、ロテノン慢性皮下投与マウスへのコーヒー成分カフェイン酸あるいはクロロゲン酸の経口投与により、アストロサイト(様グリア細胞)におけるMT発現が誘導され、ロテノンによる黒質DA神経および腸管筋間神経叢の変性脱落が阻止された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、孤発性パーキンソン病における重要な課題である「なぜ特定の神経系のみが障害されるのか？」を解明するため、アストロサイトの部位特異性に着目し、環境毒による神経障害における神経-グリア連関を検討したものである。本研究により、部位特異的なアストロサイト(様細胞)の機能不全が神経脆弱性を規定しうることを明らかにした。また、アストロサイト(様細胞)の発現因子を修飾させることで神経変性を阻止するというパーキンソン病に対する全く新しい観点からの治療法開発の基礎データを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that astrocyte-conditioned media from low-dose rotenone-treated mesencephalic, but not striatal, astrocytes produced dopaminergic neuron-specific neurotoxicity, and that endogenous dopamine and its oxidation play an important role in mesencephalic astrocyte-mediated dopaminergic neurodegeneration. In addition, we demonstrated that reduction of antioxidative molecule metallothionein (MT) in enteric glial cells after rotenone-exposure induced enteric neurotoxicity. Oral administration of coffee components, caffeic acid and chlorogenic acid, upregulated MT expression both in the striatal astrocytes and enteric glial cells, and inhibited degeneration of central dopaminergic and peripheral enteric neurons in rotenone-treated mice. These results suggest possible involvement of brain region-specific glial dysfunction in neurotoxicity induced by environmental toxin rotenone.

研究分野：神経分子病態学，神経病態薬理学

キーワード：パーキンソン病 ロテノン アストロサイト ドパミン神経障害 腸管神経障害 メタロチオネイン

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

### 1. 研究開始当初の背景

孤発性パーキンソン病(PD)の主病変は選択的な黒質ドパミン(DA)神経の消失と考えられてきたが、Braakの仮説(Braak et al. Neurobiol. Aging, 24: 197-211, 2003)が提唱されて以来、現在では中枢神経系のみならず消化管 Auerbach 神経叢や心臓の交感神経終末など末梢自律神経系をも侵しうる全身病と考えられている(Wakabayashi et al., Acta. Neuropathol. 76: 217-221, 1988; Orimo et al., Brain 131: 642-650, 2008). PD 発症要因として注目される環境毒のひとつの農薬ロテノンをマウスの胃内に投与した PD モデルでは腸管神経叢の神経細胞、脊髄側角のコリン含有神経および迷走神経背側運動核において、黒質に先行して  $\alpha$ -synuclein の凝集がみとめられることが報告されている(Pan-Montojo et al. PLoS ONE, 5: e8762, 2010). 我々は、ロテノン慢性皮下投与マウスでの黒質、線条体、嗅球、胸髄、腸管における神経変性とアストロサイト(様細胞)の形態変化を経時的に検討したところ、黒質線条体 DA 神経、嗅球チロシン水酸化酵素(TH)陽性細胞、腸管筋間神経叢コリン含有神経の変性脱落はみられるが胸髄中間質外側核コリン含有神経には変化がみとめられず、神経障害発現には部位特異性があること、黒質 DA 神経変性に先行して腸管神経叢の変性脱落が惹起されること、部位特異的なアストロサイト(様細胞)の形態変化がみられることを見出している(平成 25-27 年度科研費 基盤研究(C), Murakami, Miyazaki et al., Neurochem Res. 40: 1165-1178, 2015). 現在のところ、PD における神経障害メカニズムは未だ明らかとなっていないが、末梢から  $\alpha$ -synuclein の凝集を伴う神経変性が上行伝播し、中脳黒質に至った段階で発症するという proteinopathy 仮説と、部位特異的な脆弱性が変性の差異をもたらすという仮説の二つの仮説が想定されている。我々はこれまで中枢および末梢神経系における神経-グリア連関について一連の研究を行い、アストロサイトの抗酸化機構賦活が中枢 DA 神経・腸管神経保護のターゲットとなりうること、アストロサイトの刺激に対する反応が部位ごとに異なることを報告してきた。さらに我々は、中脳、線条体あるいは腸管からの初代培養細胞を用いた検討により、中脳 DA 神経は低用量ロテノンの直接暴露では細胞毒性がみられず、中脳アストロサイト存在下でのみ毒性が惹起されること、このロテノンによる中脳 DA 神経毒性は線条体アストロサイト存在下ではみられないこと、腸管神経細胞も中脳 DA 神経と同様に腸管アストロサイト様細胞存在下でのみロテノン毒性が惹起されるが、中脳よりも毒性が強く発現することを見出した。これらの知見より、パーキンソニズムを惹起する環境毒による部位特異的なアストロサイトの機能不全が特定の神経系における神経障害あるいは神経脆弱性を規定するという本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

環境毒誘発パーキンソニズムにおける中脳、腸管の神経障害へのアストロサイト(様細胞)機能不全の関与を検討するとともに、部位特異的な神経脆弱性を規定しうるアストロサイト(様細胞)発現分子を明らかにし、孤発性 PD 発症機序の解明、さらにアストロサイト(様細胞)機能不全の改善による神経保護という全く新しい治療方策の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

(1)中脳・線条体からの初代培養細胞を用いて、ロテノン曝露による中脳アストロサイトを介した選択的 DA 神経障害への細胞内 DA の関与を検討し、また、(2)腸管からの初代培養細胞を用いて、ロテノンによる腸管神経障害へのアストロサイト様グリア細胞の関与ならびに抗酸化分子の発現変化を検討した。さらに、(3)ロテノン誘発 PD モデルを用いたアストロサイト(様グリア細胞)における MT 発現誘導による神経保護効果について検討した。

### 4. 研究成果

(1)ロテノン曝露中脳アストロサイトを介した選択的 DA 神経障害への細胞内 DA の関与  
SD 系ラット胎仔(15 日齢)の中脳を用いて培養した中脳神経細胞に  $\alpha$ -methyl-*p*-tyrosine (AMPT) を添加し、あらかじめ DA 神経細胞内の DA 量を低下させ、その後ロテノン(5 nM)を暴露した中脳アストロサイトの培養液(Rot-GCM)を 48 時間添加し、チロシン水酸化酵素(TH)陽性細胞数をカウントした。その結果、Rot-GCM 添加による TH 陽性細胞数の有意な減少は AMPT 処置によりほぼ完全にキャンセルされた。さらに、Rot-GCM で 48 時間処置した中脳神経細胞における GABA 含有神経細胞、セロトニン含有神経細胞についてそれぞれ神経障害性を検討した結果、いずれの神経細胞もその生存率に影響はみられなかった。さらに、ロテノン暴露した中脳あるいは線条体アストロサイトからの培養液を中脳神経細胞に添加したところ、ロテノン曝露中脳アストロサイトの培養液添加では中脳神経細胞におけるドパミンキノン生成の指標であるキノプロテイン量が有意に増加したが、ロテノン曝露線条体アストロサイトからの培養液添加では変化がみられなかった。以上の結果より、ロテノン曝露による中脳アストロサイトを介した神経障害は DA 神経特異的であり、またその神経障害には細胞内 DA の酸化により生成された DA キノンが関与することが示された。

### (2)ロテノンによる腸管神経障害へのアストロサイト様グリア細胞の関与ならびに抗酸化分子の発現変化

SD 系ラット胎仔(15 日齢)の腸管からの初代培養を行い、腸管神経細胞単独培養あるいは腸管神経細胞+腸管アストロサイト様グリア細胞共培養にロテノン(1-5 nM)を 48 時間添加した。そ

の結果、グリア細胞共存下においてのみロテノン曝露による腸管神経障害が惹起され、GFAP 陽性アストロサイト様グリア細胞の脱落およびグリア細胞における抗酸化分子メタロチオネイン (MT) の発現低下がみられた。以上の結果より、ロテノン曝露による腸管神経障害には、中枢神経系と同様に腸管グリア細胞における MT 発現低下が関与することが示唆された。

### (3)ロテノン誘発PDモデルを用いたアストロサイト(様グリア細胞)におけるMT発現誘導による神経保護効果

ロテノン慢性皮下投与 PD モデルマウスを用いて、中枢および末梢の神経障害ならびにアストロサイト(様グリア細胞)における抗酸化分子の発現変化とその賦活による影響について検討した。雄性 C57BL/6J マウス(8 週齢)に低用量ロテノン(2.5 mg/kg/day)を 4 週間慢性持続皮下投与したところ、黒質 DA 神経細胞および腸管筋間神経叢の有意な脱落がみられた。また、ロテノン慢性皮下投与マウスにコーヒー成分であるカフェイン酸(CA: 30 mg/kg/day)あるいはクロロゲン酸 (CGA: 50 mg/kg/day)をロテノン投与開始の 1 週間前からロテノン投与期間中の計 5 週間、連日経口投与を行った。その結果、CA あるいは CGA 投与により、ロテノンによる黒質 DA 神経および腸管筋間神経叢の変性脱落が有意に阻止された。さらに線条体および腸管のアストロサイト(様グリア細胞)における MT の発現変化を検討したところ、CA、CGA 投与により線条体アストロサイトにおける MT 発現が有意に増加した。ロテノン投与マウスの腸管切片では CA、CGA 投与による MT 発現変化を捉えることができなかった。

SD 系ラット胎仔(15 日齢)の腸管からの初代培養細胞を用いて、ロテノン曝露による腸管神経障害に対する CA、CGA 処置による神経保護効果および腸管アストロサイト様グリア細胞における MT 発現変化を検討した。腸管神経+グリア共培養系におけるロテノン誘発神経障害およびグリア細胞の脱落は、CA あるいは CGA 処置により著明に減弱された。また、ロテノン曝露による腸管グリア細胞における MT 発現低下は、CA あるいは CGA 処置により阻止された。

以上の結果より、ロテノン曝露による DA 神経障害および腸管神経障害は、これらの部位におけるグリア細胞での抗酸化分子発現誘導により阻止しうるということが明らかとなった。

本研究により、環境毒誘発パーキンソンニズムにおける部位特異的な神経障害へのアストロサイト(様細胞)機能不全の関与を明らかにし、アストロサイト(様グリア細胞)における抗酸化分子の発現誘導により神経障害が阻止しうることを *in vitro* および *in vivo* で示すことができた。本研究では、ロテノン曝露によるアストロサイトの機能不全に着目して検討を行ったが、今後はロテノン曝露によるミクログリアへの影響、さらにはアストロサイト-ミクログリア連関に関しても検討したい。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 15 件)

Miyazaki, I., Isooka, N., Wada, K., Kikuoka, R., Kitamura, Y. and Asanuma, M.: Effects of enteric environmental modification by coffee components on neurodegeneration in rotenone-treated mice. *Cells*, 査読有, 8: 221, 2019. doi:10.3390/cells8030221

Asanuma, M., Okumura-Torigoe, N., Miyazaki, I., Murakami, S., Kitamura, Y. and Sendo, T.: Region-specific neuroprotective features of astrocytes against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine. *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有, 20(3): 598, 2019. doi:10.3390/ijms20030598

Nakamura, Y., Kitamura, Y., Sumiyoshi, Y., Naito, N., Kan, S., Ushio, S., Miyazaki, I., Asanuma, M. and Sendo, T.: Involvement of 5-HT<sub>2A</sub> receptor hyperfunction in the anxiety-like behavior induced by doxorubicin and cyclophosphamide combination treatment in rats. *J. Pharmacol. Sci.*, 査読有, 138(3): 192-197, 2018. doi: 10.1016/j.jphs.2018.10.001

Murakami, S., Miyazaki, I., and Asanuma, M.: Neuroprotective effect of fermented papaya preparation by activation of Nrf2 pathway in astrocytes. *Nutr. Neurosci.*, 査読有, 21(3): 176-184, 2018. <http://dx.doi.org/10.1080/1028415X.2016.1253171>

Tanaka, K., Yagi, T., Nanba, T. and Asanuma, M.: Application of single prolonged stress induces post-traumatic stress disorder-like characteristics in mice. *Acta Med. Okayama*, 査読有, 72(5): 479-485, 2018.

Tanaka, K., Sonoda, K. and Asanuma, M.: Effect of alteration of glutathione content on cell viability in  $\alpha$ -synuclein-transfected SH-SY5Y cells. *Advances in Parkinson's Disease*, 査読有, 6: 93-100, 2017. doi: <https://doi.org/10.4236/apd.2017.63010>

Kim, M.S., Takahashi, T., Lee, J.Y., Miura, N., Asanuma, M., Hwang, G.W. and Naganuma, A.: Identification of transcription factors activated by methylmercury in mouse brain. *Fundam. Toxicol. Sci.* 査読有, 4(1): 37-39, 2017. <http://doi.org/10.2131/fts.4.37>

Kitamura, Y., Kanemoto, E., Sugimoto, M., Machida, A., Nakamura, Y., Naito, N., Kanzaki, H., Miyazaki, I., Asanuma, M. and Sendo, T.: Influence of nicotine on doxorubicin and cyclophosphamide combination treatment-induced spatial cognitive

impairment and anxiety-like behavior in rats. *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 査読有, 390(4): 369-378, 2017. doi: 10.1007/s00210-016-1338-z

Miyazaki, I.: Editorial: Astrocyte-targeted therapeutic strategies for neurological disorders. *Curr. Pharm. Des.*, 査読有, 23(33): 4933-4935, 2017.

Miyazaki, I. and Asanuma, M.: Therapeutic strategy of targeting astrocytes for neuroprotection in Parkinson's disease. *Curr. Pharm. Des.*, 査読有, 23(33): 4936-4947, 2017. doi: 10.2174/1381612823666170710163731

Miyazaki, I., Murakami, S., Nakano, T., Torigoe, N., Kikuoka, R., Kitamura, Y., Sendo, T. and Asanuma, M.: Serotonin-1A agonist 8-OH-DPAT alleviates motor dysfunction and motor neuron degeneration in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Pharmacol. Pharmaceut.*, 査読有, 1(1): 1003, 2016.

Tsuboi, C., Kawasaki, Y., Yoshitome, K., Yagi, K., Miura, T., Esumi, S., Miyazaki, I., Asanuma, M., Kiyamura, Y. and Sendo, T.: In vivo quantitative determination of the concentration of the polymerization agent methyl 2-benzoylbenzoate in intravenous injection solution and the cytotoxic effects of the chemical on normal human peripheral blood mononuclear cells. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 査読有, 23(10): 10262-10269, 2016. doi: 10.1007/s11356-016-6332-y

Asanuma, M. and Miyazaki, I.: 3-O-methyldopa inhibits astrocyte-mediated dopaminergic neuroprotective effects of L-DOPA. *BMC Neurosci.*, 査読有, 17: 52, 2016. doi: 10.1186/s12868-016-0289-0

Takehima, M., Miyazaki, I., Murakami, S., Kita, T. and Asanuma, M.: L-Theanine protects against excess dopamine-induced neurotoxicity in the presence of astrocytes. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 査読有, 59(2): 93-99, 2016. <http://doi.org/10.3164/jcbn.16-15>

Sogawa, C., Ikegame, M., Miyazaki, I., Ara, T., Imamura, Y., Okusha, Y., Ohyama, K., Asanuma, M., Sogawa, N., Yamamoto, T. and Kozaki, K.: Changes in metallothionein isoform expression in the bones of ovariectomized rats. *J. Hard Tissue Biol.*, 査読有, 25(1): 21-26, 2016. <http://doi.org/10.2485/jhtb.25.21>

[学会発表](計 55 件)

宮崎育子 他, Treatment with coffee ingredients protects central and myenteric neurons in parkinsonian model. 第 92 回日本薬理学会年会, 2019.

浅沼幹人, アストロサイトを介した神経変性抑制. シンポジウム, Current Trends in Parkinson's Disease 2018, 2018.

浅沼幹人, アストロサイトの抗酸化防御機構を標的にした神経保護薬探索と末梢先行性のパーキンソン病病態におけるグリア細胞. 特別講演, 第 29 回霧島神経薬理フォーラム, 2018.

磯岡奈未 他, ロテノン誘発神経毒性に対するカフェイン酸, クロロゲン酸の神経保護効果. 第 134 回日本薬理学会近畿部会, 2018.

Miyazaki, I. et al., Possible involvement of metallothionein in rotenone-induced dopaminergic neurotoxicity. 第 59 回日本神経学会学術大会, 2018.

宮崎育子 他, アストロサイトにおけるメタロチオネイン発現を標的とした神経保護. メタルバイオサイエンス研究会 2018 シンポジウム: メタロチオネイン研究の最新動向, 2018.

Miyazaki, I. et al., Neuroprotective effects of coffee ingredients against rotenone induced neurodegeneration in parkinsonian model. 22nd International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Hong Kong, 2018.

宮崎育子 他, 農薬ロテノン暴露による腸管神経障害とコーヒー成分による神経保護. 第 11 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ), 2017.

宮崎育子 他, 農薬ロテノンによる非細胞自律性ドパミン神経障害へのメタロチオネインの関与. メタルバイオサイエンス研究会 2017, 2017.

宮崎育子 他, 農薬ロテノンによるアストロサイト機能異常がもたらすドパミン神経障害. 第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2017.

宮崎育子 他, 農薬ロテノンによる非細胞自律性ドパミン神経障害. 第 44 回日本毒性学会学術年会, 2017.

Miyazaki, I. et al., Rotenone-induced dopaminergic neurotoxicity mediated by astrocytes. 第 90 回日本薬理学会年会, 2017.

Miyazaki, I. et al., Rotenone-induced dopaminergic neurotoxicity promoted by mesencephalic astrocyte dysfunction. 23rd World Congress of Neurology, Japan, 2017.

Miyazaki, I. et al., Rotenone induces astrocyte-mediated non-cell autonomous dopaminergic neurotoxicity. 21st International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Canada, 2017.

宮崎育子 他, 農薬ロテノン暴露によるドパミン神経障害におけるアストロサイトの関与. 第 10 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, 2016.

〔図書〕(計1件)

浅沼幹人,宮崎育子: Nrf2 .高橋良輔,山中宏二,樋口真人,漆谷 真編,脳内環境辞典,メディカルドゥ,大阪, pp122-123, 2017.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/mnb>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：浅沼 幹人

ローマ字氏名：ASANUMA, Masato

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学院医歯薬学総合研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 00273970

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。