

平成30年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20969

研究課題名(和文) 活動依存的アルファシヌクレイン放出解明に基づく新規パーキンソン病治療標的の探索

研究課題名(英文) Activity dependent regulation of alpha-synuclein release from neurons

研究代表者

山田 薫 (Yamada, Kaoru)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：00735152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病、レビー小体型認知症で蓄積する α -synucleinは細胞質タンパク質でありながら、細胞外にも分泌される。しかしながらシグナル配列を有さない α -synucleinの分泌機構は不明である。本研究では、*in vivo* microdialysis法、初代培養神経細胞を用い、 α -synucleinの分泌が神経活動特にグルタミン酸作動性の神経伝達によって制御されていることを明らかにした。またシナプス小胞の開口放出と α -synuclein分泌が密接に関連することを見いだした。さらに脳間質液中の α -synucleinが単量体とは異なる60kdaの高分子体として存在していることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The pathological aggregation of α -synuclein characterizes a set of neurodegenerative disorders collectively referred to as α -synucleinopathies. α -Synuclein is a cytoplasmic protein, however, it is actively released into the extracellular space. In this study, utilizing *in vivo* microdialysis and primary neuronal culture, we demonstrated that physiological release of α -synuclein highly depends on neuronal activity. Selective modulation of glutamatergic neurotransmission altered extracellular α -synuclein levels in freely moving mice. While neuronal activity tightly regulated α -synuclein release, elevated synaptic vesicle exocytosis per se efficiently elicited α -synuclein release. We also found that extracellular α -synuclein in brain interstitial fluid existed as 60kda high molecular weight species.

研究分野：病態神経科学

キーワード： α -synuclein 伝播 神経活動

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病・レビー小体型認知症患者脳神経細胞においては、 α -synuclein がレビー小体として凝集・異常蓄積することが知られている。近年この α -synuclein からなる凝集体が神経細胞から神経細胞へ伝播する現象が見出された (Luk et al., Science 2012)。細胞間伝播においては、何らかの異常型コンフォメーションを有した α -synuclein が、細胞外へ放出されると、次の細胞へ取り込まれ、凝集反応における核となって新たな凝集体を形成することで進展するという考えが有力である。また興味深いことに α -synuclein にとどまらず、アルツハイマー病で蓄積するタウや、筋萎縮性側索硬化症で蓄積する TAR DNA-binding protein (TDP-43) も同様に細胞間伝播を起こすことから、細胞間伝播はこれら神経変性疾患における病理像進展の共通機構である可能性も考えられている (Brettschneider et al., Nat Rev Neurosci 2015)。

α -Synuclein は分泌タンパク質が有するシグナル配列を有さないことから、細胞内に限局して存在するものと長らく考えられてきたが、生理的にも細胞外へ放出されることが明らかになった (Lee et al., J Neurosci 2005)。 α -Synuclein の細胞間伝播は細胞外腔を介して進行することから α -synuclein の細胞外分泌は、伝播を理解するうえで重要なメカニズムであるにも関わらず、その詳細な分子機構は未だ不明である。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに α -synuclein 同様、細胞間伝播を起こすタウが、やはりシグナル配列をもたない細胞質タンパク質であるにも関わらず、細胞外に分泌されること、またその分泌が神経活動依存的に生じることを明らかにしてきた (Yamada et al., J Neurosci 2011, Yamada et al., J Exp Med 2014)。そこで本研究においては、タウと α -synuclein のアナロジーに着目し、 α -synuclein の細胞外分泌が、神経活動依存的に生じているという仮説をたて、これを *in vitro*、*in vivo* の両面から明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、初代培養神経細胞に加え、*in vivo* microdialysis 法を用いることとした。*In vivo* microdialysis 法は、半透膜を有したプローブをマウス脳実質に挿入し、透析の原理を利用して、脳の細胞外液である脳間質液 (brain interstitial fluid, ISF) を継続的に持続回収可能な手法である (Yamada et al., Methods Mol Biol, 2017)。*In vivo* microdialysis において、透析はプローブの膜を介して両方向性に生じる。すなわちプローブのポアを通過できる大きさの薬剤を灌流液に加えることで、薬剤をプローブ周囲に局所的に投与することが可能になる。本研究で

は、この reverse microdialysis の手法を利用し、薬理的に神経活動を変化させた場合の ISF 中 α -synuclein 量の変化を ELISA で検出することとした。

4. 研究成果

従来 α -synuclein の分泌研究は α -synuclein を過剰発現する細胞を用いて行われて来たが、 α -synuclein の過剰発現は、分泌機構そのものに影響を及ぼすことが強く懸念されたため (Simón et al., Neurodegener Dis 2012)、野生型マウス由来の初代培養神経細胞を用いて、内因性の α -synuclein の細胞外分泌を検出することとした。

まず神経細胞に Na^+ チャンネルブロッカーである tetrodotoxin を投与し、活動電位の発生を抑制する実験を行った。その結果培養液中への α -synuclein 分泌が低下し、 α -synuclein 分泌が神経活動依存的に生じていることが示唆された。 α -Synuclein は興奮性神経細胞に発現することが知られている (Taguchi et al., Plos one 2014, Emmanouilidou et al., Brain 2016)。そこで興奮性神経伝達物質である、グルタミン酸を投与したところ、 α -synuclein の分泌は増加することが明らかになった。NMDA 受容体のアンタゴニストである AP5、AMPA 受容体のアンタゴニストである NBQX を同時投与するとグルタミン酸による α -synuclein 分泌上昇は生じないことから、 α -synuclein 分泌上昇は神経細胞におけるグルタミン酸受容体を介していることが考えられた。

末梢神経細胞においては、神経活動刺激によって α -synuclein の発現レベルが向上することが報告されている (Paillusson et al., J Neurochem 2010)。しかしながら本実験においてはいずれの薬剤処理においても α -synuclein のタンパク発現レベルの変化は見られなかったことから、中枢神経細胞において神経活動は α -synuclein の発現量ではなく、分泌に作用しているものと考えられた。

次に神経活動が α -synuclein の分泌に与える影響を *in vivo* で解析するために、野生型マウスにおいて 1000kda の cutoff プローブを用いた *in vivo* microdialysis を行った。Picrotoxin は GABA_A 受容体のアンタゴニストであり、興奮毒性を生じずに、神経活動を上昇させることが知られている (Yamada et al., J Exp Med 2014)。海馬に挿入したプローブを介し reverse microdialysis で picrotoxin を投与すると、ISF 中の α -synuclein 量は picrotoxin の用量依存的に上昇した。

次に tetrodotoxin を reverse microdialysis により投与することで神経活動を抑制したところ、ISF 中の α -synuclein 量は $\sim 70\%$ 程度抑制されることがわかった (図 1)。また海馬ではなく線条体にプローブを挿入した場合においても同様に tetrodotoxin は ISF α -synuclein 量を大きく低下させたことから、

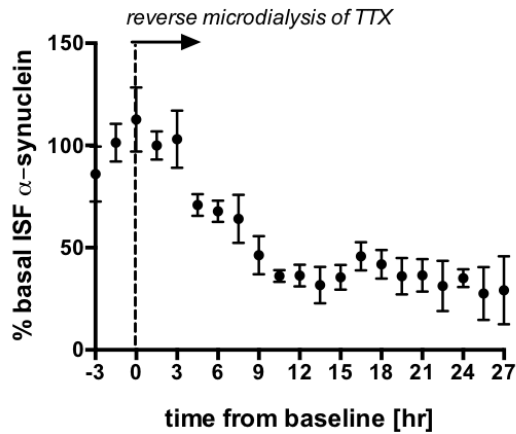


図 1 : Tetrodotoxin (TTX) は ISF 中

α -synuclein 量を低下させる

神経活動が、海馬だけでなくその他の脳領域においても α -synuclein 分泌に重要な役割を果たすことが示唆された。

ISF における α -synuclein の定常状態量は神経細胞からの分泌と細胞外におけるクリアランスのバランスによって規定されると考えられる。Tetrodotoxin が ISF α -synuclein 定常量に対して極めて大きな抑制効果を示したという実験結果は、(1) 神経活動依存的な α -synuclein の分泌が、細胞外における α -synuclein 量を制御する主要なメカニズムであること、(2) 細胞外において分泌された α -synuclein を除去する何らかの内因性機構が存在すること、を示唆するものと考えられた。

代謝型グルタミン酸受容体 mGluR2/3 は、プレシナプスにおいて、グルタミン酸の放出を負に制御することが知られている。従って mGluR2/3 のアンタゴニストは、シナプス小胞からのグルタミン酸放出を促進させることができる。mGluR2/3 アンタゴニストである LY341495 を reverse microdialysis で投与すると、ISF α -synuclein 量が増加したことから、 α -synuclein の分泌にシナプス活動が関与することが示唆された。

次に ISF において α -synuclein はどのような形態で存在しているのか検討を行った。 α -synuclein 単量体は 14kDa であり、30kDa のポアを持つ microdialysis プローブを通過することができる。しかしながら 30kDa の cutoff のプローブを用いた in vivo microdialysis を行ったところ、回収された ISF 中には α -synuclein が全く検出されることがわかった。そこで ISF における α -synuclein の存在様式をさらに調べるために、1000kDa のプローブで回収した ISF をゲル濾過クロマトグラフィーによって分画・解析した。すると、 α -synuclein は分子量約 60kDa のシングルピークとして検出され、単量体とは異なる何らかの高分子体として存在していることが明らかになった。

次に mGluR5 アンタゴニストである

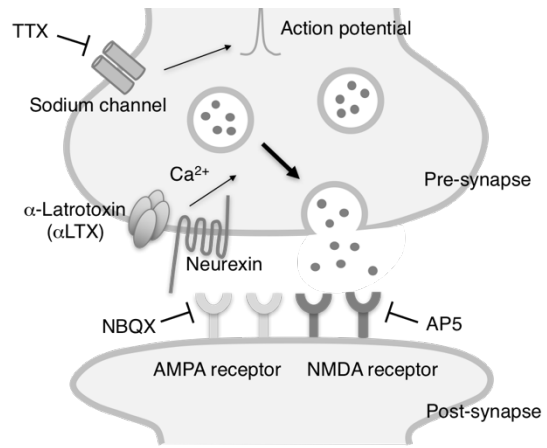


図 2 : 本研究で用いた薬剤の標的機構

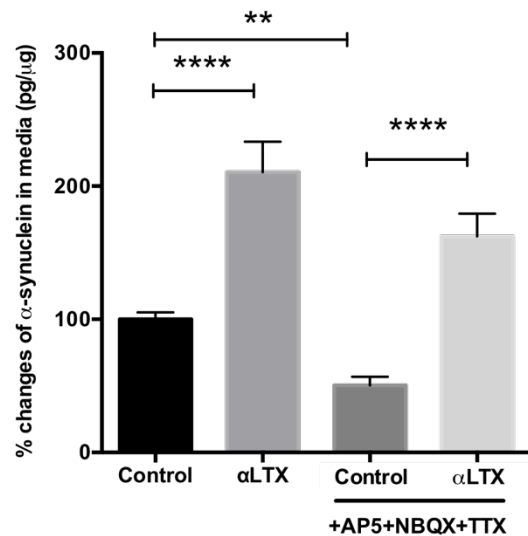


図 3 : α -Latrotoxin (α LTX)が α -synuclein 分泌に及ぼす効果

LY341495 が ISF α -synuclein 量を上昇させるという in vivo の結果をうけ、シナプス活動と α -synuclein 分泌の関係を初代培養神経細胞を用いて、詳細に検討することとした。

α -Latrotoxin はプレシナプスに存在する Neurexin に結合し、カルシウム依存的なシナプス小胞の開口放出を促進することが知られる神経毒である (図 2)。これまでの実験で得られた結果と一致し、 α -latrotoxin の投与は神経細胞からの α -synuclein 分泌を上昇させた。そこで α -latrotoxin によるシナプス小胞の開口放出と、これに付随して生じるグルタミン酸受容体の活性化や活動電位の発生を分けて、評価する実験を行った。AP5, NMDA, tetrodotoxin を同時投与したうえで、 α -latrotoxin を投与したところ、ポストシナプス側でのグルタミン酸受容体活性化がブロックされ、活動電位の発生が抑制されているにも関わらず α -synuclein 分泌が α -latrotoxin によって上昇した (図 3)。この結果は、 α -synuclein 分泌において、ポストシナプス側のグルタミン酸受容体の活性化や活動電位の

発生は必ずしも必要ではなく、シナプス小胞の開口放出が重要な役割を果たすことを示唆するものと考えられた。

本研究において、研究代表者は内因性の α -synuclein 分泌を *in vitro*、*in vivo* 両面で解析可能な実験系を用い、生理的な α -synuclein 分泌に対し、神経活動依存的な機構が主要な役割を果たすことを明らかにした。一方、神経活動がどのような細胞内機構を経て、シグナル配列をもたない α -synuclein 分泌を促進するのかについては不明であり、今後詳細な検討が必要である。

近年細胞外の α -synuclein が神経活動やシナプス活動に果たす役割が注目を集めている (Diógenes et al., *J Neurosci* 2012, Shrivastava et al., *EMBO J* 2015)。本研究から明らかになった神経活動依存的な α -synuclein 分泌は、神経活動における何らかのフィードバック機構を反映している可能性が考えられる。

本研究において、 α -synuclein は細胞外において単量体とは異なる 60kDa の高分子体として存在することが明らかになった。 α -synuclein は生理的に安定な四量体を細胞内で形成することが報告されている (Bartels et al., *Nature* 2011, Dettmer et al., *Nat Commun* 2015)。ISF における 60kDa の α -synuclein が四量体であるのか、また、この高分子体形成が、分泌にどのような影響を与えるのか、さらなる検討が必要である。

異常型コンフォメーションをとった α -synuclein は、細胞から細胞へ伝播し、病変を拡大させることが知られている。今回の検討では、正常なコンフォメーションを有する内因性の α -synuclein に着目したが、今後 α -synuclein 伝播のモデルマウスを用いることで、今回見いだした神経活動が異常型コンフォメーションをとった α -synuclein 分泌や、 α -synuclein の細胞間伝播に果たす役割を検討することも重要であると考えている。

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 1 件)

1. Yamada K, Iwatsubo T. Extracellular α -synuclein levels are regulated by neuronal activity. *Mol Neurodegener.* 2018 Feb 22;13(1):doi:10.1186/s13024-018-0241-0. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. 山田 薫 神経変性疾患関連タンパク質の細胞外分泌 第 12 回臨床ストレス応答学会 東京、2017 年 11 月 4 日-11 月 5 日

2. 山田 薫、岩坪 威 In vivo microdialysis 法を用いたアルファシヌクレイン分泌機構の解明 第 35 回 日本認知用

学会学術集会、東京、2016 年 12 月 1 日-12 月 3 日

3. Kaoru Yamada, Takeshi Iwatsubo Activity dependent pathway determines extracellular alpha-synuclein levels. Gordon research conference (Neurobiology of Brain), Girona, Spain, August 7-12, 2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://www.alzforum.org/news/research-news/when-neurons-get-excited-they-split-synuclein>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 薫 (YAMADA, Kaoru)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00735152