

令和 2 年 5 月 2 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08311

研究課題名(和文) 2価鉄動態を切り口にした逆行性輸送異常と神経細胞死の分子機序の解明と創薬研究

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of retrograde transport abnormality and neuronal cell death based on divalent iron dynamics

研究代表者

位田 雅俊 (Inden, Masatoshi)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70512424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではオルガネラ特異的なFe²⁺蛍光プローブを活用し、Fe²⁺動態を可視化することで、PD原因遺伝子に起因する細胞内鉄動態の攪乱とPD発症機序の関係を解明し、新規の創薬基盤を創出することである。これまでに、PD原因遺伝子VPS35やATP13A2ノックダウン時において、それぞれに異なるFe²⁺動態の攪乱を明らかにすることができた。また、VPS35ノックダウン時において生じるFe²⁺動態の攪乱は、レトロマー安定化薬・R55を用いることで改善することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで不明であった細胞内の鉄動態に関して、新しいプローブをしようすることで可視化することに成功し、パーキンソン病の病態の理解や創薬に関して新たな基盤を提供することができた。また、認知症を含む多くの神経変性疾患においてVPS35や逆行性輸送経路が注目されており、本研究成果は、パーキンソン病のみならず神経変性疾患全般に応用できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used the organelle-specific Fe²⁺ + fluorescent probe to visualize Fe²⁺ kinetics and elucidate the relationship between the perturbation of intracellular iron dynamics caused by the PD causative gene and the PD pathogenesis mechanism in order to develop a new drug discovery platform for PD. We have been able to clarify the disruption of Fe²⁺ dynamics caused by VPS35 and ATP13A2 knockdown. Moreover, it was clarified that the disturbance of Fe²⁺ dynamics caused by VPS35 knockdown was improved by R55, a retromer stabilizer.

研究分野：神経薬理学

キーワード：パーキンソン病 鉄

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のパーキンソン病 (PD) 研究は目覚ましく、複数のゲノム相関解析などから、幾つかの遺伝子が PD の発症リスクに影響することがわかってきている。しかし、その同定された遺伝子が PD の発症をもたらす分子機構、それらの相互関係については不明な点が多い。2011 年、家族性 PD 患者より vacuolar protein sorting-associated protein 35 (VPS35) が PD 原因遺伝子 (PARK17) として同定された。後に VPS35 は家族性のみでなく孤発性 PD 患者からも報告された。VPS35 は、逆行性輸送を制御するレトロマーと呼ばれるタンパク質複合体の 1 つである。逆行性輸送経路は、細胞膜またはエンドソームを出発点としてゴルジ体へ、さらに一部の分子については小胞体へと運ばれる輸送システムでオルガネラの恒常性維持を担っている。しかし、この輸送経路は比較的近年に同定された経路であり、分子機構や疾患への関与など解析が遅れているのが現状である。未だ VPS35 機能異常と PD 発症との因果関係を示す有力な説は少ないが、divalent metal transporter 1 (DMT1) のミスソーティングという報告がある (Tabuchi et al, 2010)。DMT1 は、2 価鉄 (Fe²⁺) の細胞内取込みおよびエンドソーム内の Fe²⁺ をオルガネラへ輸送する際に重要な役割を担っている。従って VPS35 機能異常による逆行性輸送の破綻、すなわち DMT1 のミスソーティングがおり、細胞内 Fe²⁺ 動態が攪乱することでオルガネラの恒常性も破綻し、細胞死に繋がるのが推測されている (Tabuchi et al, 2010)。さらに、古くから PD では鉄代謝異常に伴う細胞内の鉄の過剰蓄積が黒質の変性に関連性や、PD 患者の中脳黒質では DMT1 の発現増加や、DMT1 変異が PD の発症リスクを上昇させることが報告されている (He et al, 2011)。しかし、Fe²⁺ 動態を詳細に可視化する方法・ツールがなく、鉄代謝異常と PD 発症とを結ぶ真の分子機序は不明である。この分子機序の解明は大きく PD 創薬を前進させる可能性がある。近年、連携研究者の平山らが新規に Fe²⁺ に選択性の高い蛍光プローブを開発した (Van de Bittner et al, 2016)。さらにオルガネラ特異的な Fe²⁺ 蛍光プローブの開発にも成功している (Niwa et al, 2014)。予備検討により、神経系細胞においても内因性 VPS35 ノックダウンにより、Fe²⁺ 動態の異常が認められた。そこで、新規ツールである Fe²⁺ 動態を可視化できる Fe²⁺ 蛍光プローブと申請者の PD 研究を基盤にすれば、VPS35 や逆行性輸送経路の破綻と PD の発症機序に関する因果関係を明らかにし、真の創薬基盤を創出できると考えた。さらに他の PD 原因遺伝子における Fe²⁺ 動態と PD 発症に関する新知見も得られると考えた。

2. 研究の目的

VPS35 をはじめとする PD 原因遺伝子における Fe²⁺ 動態異常をオルガネラ特異的な Fe²⁺ 蛍光プローブを用いて明らかにするとともに、細胞内の Fe²⁺ 動態を指標にして、VPS35 や逆行性輸送を標的にした神経変性疾患への創薬基盤を創出する。

3. 研究の方法

研究の方法

(1) 細胞培養および siRNA によるノックダウン

本研究には細胞株としてヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y)、ヒト肝がん細胞 (HepG2)、ヒト胎児腎細胞 (HEK293FT) を用いた。10% FBS 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) を用いて、それぞれ 37℃、5% CO₂ インキュベーターの下で培養を行った。SH-SY5Y 細胞を 6-well plate、12-well plate、96-well plate または 3.5 cm 4 分割ガラスボトムディッシュにそれぞれ 4.0 x 10⁵ cells/well、1.0 x 10⁵ cells/well、1.0 x 10⁴ cells/well、6.0 x 10⁴ cells/well で播種した。24 時間後に MISSION® esiRNA human VPS35、esiRNA human ATP13A2、または MISSION® siRNA Universal Negative Control を Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent を使用して添付のプロトコールに従いトランスフェクションした。48 時間後に各種処置または各種検討を行った。

(2) 細胞内二価鉄のイメージング

3.5 cm ガラスボトムディッシュに HepG2 細胞を 3 x 10⁴ cells/well、または SH-SY5Y を 6 x 10⁴ cells/well で播種し、siRNA を処置し 48 時間培養した。その後、HBSS で細胞を洗浄し 5 μM MtFluNox、3 μM HM-RhoNox M、5 μM Si-RhoNox を添加した HBSS を加え 37℃、15 分間インキュベートした。15 分後に Hoechst 33342 (1:1000) を培地に添加し、37℃、15 分間インキュベートした。HBSS で 3 回洗浄した後、HBSS を満たした状態で共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 700, Zeiss) にて観察・撮影した後、ImageJ を用いて蛍光強度を測定した。

(3) 原子吸光法による細胞内総鉄量測定

SH-SY5Y 細胞を 6-well plate に播種し、siRNA を処置し 48 時間後、D-MEM に培地交換しさらに 24 時間培養した。その後、各 well の細胞数を計測し、細胞を 1.5 mL マイクロチューブに回収した。500 μL の硝酸を加え、90℃、4 時間の条件で湿式灰化を行った。その後、超純水を加え合計 5 mL とした後に 0.45 μm PES Syringe Filter を用いて濾過し、サンプルとした。サンプルは超純水で 10 倍に希釈し、原子吸光分光光度計 (AA-7000, SHIMADZU Co.) でファーンエス法により吸光度を測定した。0.1、0.5、1、2 ppb の鉄標準液を作成し、その吸光度を測定することで検量線を作成し、細胞 1.0 x 10⁵ 個当たりの細胞内総鉄量を算出した。

(4) 免疫細胞染色

免疫染色

乾熱滅菌したカバーガラスを敷いた 12-well plate に SH-SY5Y 細胞を播種し、siRNA を処置し 48 時間後、FBS を含まない D-MEM に培地交換しさらに 24 時間培養した。その後 1x PBS で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドを用いて、室温で 15 分間固定した。その後、1x PBS で希釈した 0.2% TritonX-100 を用いて、室温で 10 分間膜透過処理を行った。その後、1x PBS で希釈した 2% normal goat serum を用いて、室温で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、1x PBS で希釈した 0.5%ウシ血清由来アルブミン (Albumin from Bovine Serum: BSA) (FujiFilm Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) で 1 次抗体を希釈し、4 で一晩反応させた。翌日、1x PBS で洗浄後、1x PBS で 2 次抗体を希釈し、室温で 1 時間反応させた。再度 1x PBS で洗浄し、Hoechst 33342 (1:1000) で核染色を行い、VECTASHIELD Mounting Medium で封入したものをサンプルとして保存した。サンプルを共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 700, Zeiss) で観察・撮影した後、Image J を用いて蛍光強度を測定した。

(5) qRT-PCR

SH-SY5Y 細胞を 12-well plate に播種し、siRNA を処置し 48 時間後、DMEM に培地交換しさらに 24 時間培養した。TRI Reagent® (SIGMA-ALDRICH, Co.) を用いて添付のプロトコールに従い total RNA を抽出した。得られた total RNA の濃度を SIMPLINANO™ SPECTROPHOTOMETER (Biochrom, Ltd.) で測定した後、total RNA の持ち込み量を 1 µg に揃え、Revertra Ace® qPCR RTMaster Mix (TOYOBO CO., LTD.) を用いて添付のプロトコールに従い逆転写反応を行い、相補的 DNA (以下 cDNA) を生成した。1 サンプル当たり、2x THUNDERBIRD SYBR® pPCR Mix (TOYOBO CO., LTD.) を 10 µL、5 µM Forward プライマーを 0.6 µL、5 µM Reverse プライマーを 0.6 µL、50x ROX reference dye を 0.4 µL、cDNA を 20 ng 混合し、滅菌水で 20 µL にメスアップした後、Applied Biosystems® StepOne™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) で反応を行った。それぞれの発現レベルを、GAPDH を内部標準として比較 CT 法により解析した。

(6) 生化学的検討

タンパク質を 7.5 %ポリアクリルアミドゲルにて 40 mA で 60 分間 SDS-PAGE 後、転写緩衝液 (25 mM Tris、192 mM glycine、20 % methanol、0.02 % SDS) 中で、PVDF 膜 (MILLIPORE) に 4 、100 V で 90 分間転写した。その後、PVDF 膜は 5 %スキムミルクおよび 0.05 % Tween20 を含むトリス塩酸緩衝化生理食塩水 (10 mM Tris、150mM NaCl、pH 8.0) で 1 時間反応させ、非特異結合を防止した。そして一次抗体を用いて室温で 1 時間反応させた。二次抗体にはそれぞれヤギ抗マウス抗体、ヤギ抗ウサギ抗体を用いて 30 分間反応させた。タンパク質の検出には ECL (Enhanced chemiluminescent) キット (GE healthcare) を用いた。定量解析は ImageJ 画像処理ソフトウェアを用いて行った。

(7) 統計学的解析

実験結果は平均値 ± 標準誤差 (standard error of mean, SEM) で表示した。比較群と対照群の有意差検定には、分散分析法 (analysis of variance, ANOVA) を用い、後検定には Bonferroni/Dunn 検定法を行った。危険率は、統計学的に 5 %未満を有意差があると判定した。

4. 研究成果

まず、SH-SY5Y 細胞において鉄負荷時の細胞内鉄動態を特異的プローブを用いて検討した。その結果、ゴルジ体において 30 microM と低濃度の鉄負荷において、プローブシグナルの上昇を確認することができた。一方リソソームにおいては、300 microM おいて急激なブリーチングシグナルの上昇を確認することができた。続いてレンチウイルスを用いて VPS35 ノックダウン細胞を作成した。GFP と VPS35 のマイクロ RNA を導入したベクターを使用した。ウエスタンブロット法および蛍光免疫染色により VPS35 のノックダウンを確認した VPS35 ノックダウン細胞において、イメージングを行った。その結果、ゴルジ体においてプローブシグナルの低下と、リソソームにおいてプローブシグナルの増加を確認した。原子吸光法を用いて細胞内鉄量を定量した。その結果、VPS35 ノックダウンによって細胞内総鉄量は変化しないことが分かった。これらの結果より、VPS35 機能低下は細胞内鉄量に影響を与えず、二価鉄イオンの局在変化が生じていることが示唆された。VPS35 は、VPS29 などと結合しレトロマーを形成することで、逆行性輸送を制御している。そこで、レトロマー安定化剤・R55 を用いることで、VPS35 ノックダウン細胞における鉄動態異常を改善できないかと考え、実験を行った。R55 を 48 時間処置した際には、無処置のノックダウンと比較して、蛍光強度がコントロールレベルまで増加した。次にリソソームにおいて、無処置のノックダウン細胞と比較して R55 処置により、プローブシグナルがコントロール程度まで減少した。以上の結果から、レトロマー安定化により、VPS35 ノックダウンによる鉄動態異常が改善されることを明らかにした。R55 の VPS35 ノックダウン細胞に対する作用について検討した。ウエスタンブロット法、real-time PCR の結果より、R55 は VPS35 の遺伝子発現に影響を与えず、レトロマー安定化によって VPS35 の発現を保っていることが示唆された。また、VPS35 ノックダウンにより DMT1 のミスソーティングが報告されているので、R55 処置による DMT1 の細胞内局在を検討した。ゴルジマーカー・TGN46 との共染色により、R55 処置によって DMT-1 の局

在がコントロール程度に回復した。次に、リソソームマーカー・LAMP2 との共染色を行い、こちらにおいても R55 の処置によりコントロールと同程度の回復が見られた。以上をまとめると、VPS35 ノックダウンによって細胞内の鉄量に影響なく、ゴルジ内 Fe²⁺の減少、リソソーム内 Fe²⁺の増加といった細胞内鉄動態異常が生じていることを明らかにした。また、その異常はレトロマ-安定化によって VPS35 を安定化させ、DMT1 の局在変化を修正することにより改善することが分かった。

さらに他のパーキンソン病原因遺伝子 Cation-transporting ATPase 13A2 (ATP13A2)についても、ノックダウン時における細胞内鉄動態を検討した。ATP13A2 ノックダウンを確認後、各プローブを用いて細胞内鉄動態を検討したところ、ミトコンドリアとリソソームにおいてプローブのシグナルが増加した。ゴルジ体でのプローブの増加は確認することができなかった。このことは、VPS35 ノックダウンにおける細胞内鉄動態とは異なる鉄動態を示した。従って、今後さらに PD 原因遺伝子と鉄動態に関して検討する必要があるが、各原因遺伝子ごとに鉄動態が変化する可能性を明らかにすることができた。

以上より、これまで細胞内の鉄動態に関して不明であったが、Fe²⁺蛍光プローブを活用することで、一部ではあるがその攪乱機序を解明することができた。また、その攪乱を薬剤を用いて改善できる可能性も明らかにすることができた。今後、細胞内鉄動態の攪乱と PD 発症に関する基盤的な知見を集積することで、あらたな創薬基盤の創出に繋がると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirayama Tasuku, Inden Masatoshi, Tsuboi Hitomi, Niwa Masato, Uchida Yasuhiro, Naka Yuki, Hozumi Isao, Nagasawa Hideko	4. 巻 10
2. 論文標題 A Golgi-targeting fluorescent probe for labile Fe(ii) to reveal an abnormal cellular iron distribution induced by dysfunction of VPS35	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 1514 ~ 1521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8sc04386h	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Tomoyuki, Inden Masatoshi, Asaka Yuta, Masaki Yuji, Kurita Hisaka, Tanaka Wakako, Yamaguchi Eiji, Itoh Akichika, Hozumi Isao	4. 巻 92
2. 論文標題 Effects of gem-dihydroperoxides against mutant copper/zinc superoxide dismutase-mediated neurotoxicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 177 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mcn.2018.09.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomoyuki Ueda, Masatoshi Inden, Taisei Ito, Hisaka Kurita, Isao Hozumi	4. 巻 i n press
2. 論文標題 Characteristics and therapeutic potential of dental pulp stem cells on neurodegenerative diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木内政徳、位田雅俊、中井岳、栗田尚佳、平山祐、永澤秀子、保住功
2. 発表標題 パーキンソン病原因遺伝子PARK9の発現低下に起因する 細胞内二価鉄イオンの局在変化
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuma Kawamura, Yuki Naka, Masatoshi Inden, Hisaka Kurita, Tasuku Hirayama, Hideko Nagasawa, Isao Hozumi
2. 発表標題 Effect of mutant Cu/Zn superoxide dismutase 1 on intracellular iron dynamics
3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 名嘉優熙, 位田雅俊, 栗田尚佳, 平山 祐, 永澤秀子, 保住 功
2. 発表標題 VPS35機能低下による鉄恒常性への影響
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河村拓磨, 名嘉優熙, 位田雅俊, 栗田尚佳, 平山 祐, 永澤秀子, 保住 功
2. 発表標題 ALSに関連する変異型SOD1は細胞内鉄動態異常を引き起こす
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	平山 祐 (Hirayama Tasuku) (10600207)	岐阜薬科大学・薬学部・准教授 (23701)	