

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06702

研究課題名(和文)代謝性活性酸素種による黒質アストログリア細胞活性化機構の解明とその制御物質の同定

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of substantia nigra astroglial cell activation by metabolic reactive oxygen species and identification of its regulator

研究代表者

小椋 正人(Ogura, Masato)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10548978

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):アストログリア細胞群特異的SDHAY215F変異体発現トランスジェニック(Tg)マウスを用いて、代謝性活性酸素種(ROS)起因するアストログリア細胞活性化とドパミン神経損傷メカニズムの解明を目的とした。Tgマウスの黒質アストログリア細胞において、ROS増加が観察されただけでなくドパミン神経の減少が観察された。黒質アストログリア細胞の純化および解析から神経細胞死を惹起する新規分泌タンパク質を同定した。このタンパク質はPQA-18(プレニルオキシキノリンカルボン酸誘導体)の投与により発現抑制され、MPTPにより誘発されるパーキンソン様症状もまた改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アストログリア細胞の活性化はパーキンソン病を含む神経変性疾患の発症に深く関与することが知られているが、その分子メカニズムに関してよく理解されていない。本研究により、代謝性活性酸素種がアストログリア細胞の活性化を引き起こし、神経細胞死を惹起する新規分泌タンパク質発現を誘導することを見出した。また粘菌由来新規代謝物質PQAの投与によりその発現が抑制され、細胞死が抑制されることが判明した。これらの結果は、活性酸素種がアストログリア細胞の活性を調節することにより神経細胞死を制御すること、さらには、PQA物質によりその活性化を制御できる可能性を示している。

研究成果の概要(英文):Reactive oxygen species (ROS) are implicated in the modulation of diverse processes including glial activation. To evaluate the effect of metabolic ROS produced by mitochondria on astrocyte activation, we created transgenic (Tg) mice expressing a phosphorylation-defective mutant of succinate dehydrogenase A in astrocytes (aSDHAY215F). Astrocytes in substantia nigra of in male aSDHAY215F mice produced more ROS than those in control mice, and increased the levels of GFAP expression. On the other hands, TH-positive neurons were significantly reduced. We identified several secretion factors from the aSDHAY215F mice as a inducer of neuronal apoptosis. These results suggest that mitochondrial ROS may regulate dopaminergic neuronal death in substantia nigra through modulation of astrocyte activation.

研究分野：薬理学

キーワード：活性酸素種 ミトコンドリア アポトーシス アストログリア細胞 神経細胞死 神経変性疾患 プロテオーム 低分子化合物

1. 研究開始当初の背景

酸化リン酸化によるエネルギー産生はミトコンドリアの最も重要な機能であるが、同時に、ミトコンドリアは ROS の主な発生源である。代謝に伴う ROS 発生については、神経変性疾患をはじめとする種々の加齢性疾患の発症要因の一つとされている (Cheignon *et al.*, *Redox Biol.*, 2017)。ところが、ROS 発生から疾患の発症に至るまでの一連の分子メカニズムには、未だ未解明な点が多く残されており、解決すべき基本課題となっている。

申請者は、現在までにミトコンドリア機能制御に関与するシグナル系の解析を行い、非受容体型チロシンキナーゼである c-Src がミトコンドリア内に高レベルに発現することを見出した。このミトコンドリア内 c-Src の生理学的役割を解明する目的で、ミトコンドリア内 c-Src 特異的にチロシンリン酸化シグナルを抑制するミトコンドリア移行シグナル融合キナーゼ欠損 c-Src 変異体の作製し、この変異体発現細胞を用いて次の結果を得た。ミトコンドリア内 c-Src のキナーゼ活性の抑制が ROS 産生を著明に増加させた。呼吸鎖複合体 II の活性中心サブユニットである SDHA の 215 番目のチロシン残基が c-Src によりリン酸化された。この分子のリン酸化部位変異体 (SDHA^{Y215F}) 発現細胞による解析を行い、チロシン残基におけるリン酸化が ROS 産生の抑制に必須であった (Ogura *et al.*, *Biochem J.*, 2012)。さらに、ミトコンドリア内 c-Src 活性制御メカニズムの解析を行い、Src 活性依存的に flotillin-1 分子が呼吸鎖複合体 II に相互作用すること、この相互作用が代謝性 ROS 産生の抑制に必要なことを明らかとした。In vitro キナーゼアッセイを行い、flotillin-1 分子が Src ターゲットであると同時に、Src の活性化を行うことを見出した (Ogura *et al.*, *FEBS Lett.*, 2014)。

神経変性疾患患者の脳病変領域や損傷神経周囲のグリア細胞において 8-オキシグアニン、カルボニル化タンパク質および過酸化脂質の蓄積を指標とした酸化ストレス障害の亢進が見出され、ROS が病態の発症に関与していることが示唆されている。申請者は予備実験として代謝性 ROS の増加を引き起こす SDHA^{Y215F} 発現レンチウイルスを作製し、マウス胎児由来初代培養アストログリア細胞に感染させた。その結果、SDHA^{Y215F} の発現とともに ROS 産生が増加し、黒質・中脳由来アストログリア細胞では、グリア細胞株由来神経栄養因子 GDNF 発現の有意な減少が見られた。一方で、大脳皮質由来アストログリア細胞では、著変を見出せなかった (図 1)。さらに、SDHA^{Y215F} 発現はコハク酸脱水素酵素活性を変化させなかった (Ogura *et al.*, 2012)。したがって、SDHA^{Y215F} は、クエン酸サイクルを阻害することなく、ROS 産生を増加させ、部位特異的なグリア機能制御に関わると示唆された。

上記の予備実験結果に基づき loxP 配列を付加したクロラムフェニコールアセチル転移酵素 (CAT) および SDHA^{Y215F} 遺伝子を導入した CAT-SDHA^{Y215F}-Tg マウスを作出した。このマウスでは、全身の細胞において CAT 遺伝子のために SDHA^{Y215F} 発現が抑制されている。細胞群特異的なプロモーターを持つ Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配させることで、目的の細胞群においてのみ CAT 遺伝子が欠損し、SDHA^{Y215F} 発現が引き起こされる。本申請に先立ち B 細胞受容体の構成因子である mb-1 プロモーターを持つ Cre マウス (Hobeika *et al.*, *PNAS*, 2006) と交配を行い、B 細胞群特異的 SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスを作出した。その結果、SDHA^{Y215F} は B 細胞特異的に発現し、ROS 産生を有意に増加させた。また、この Tg マウスは、野生型と比較して特異抗原依存的に産生される IgG_{1,3}、IgM 力価の有意な低下を示す体液性免疫不全を示した (Ogura *et al.*, *Eur J Immunol.*, 2017)。次いで、アルデヒド脱水素酵素 1L1 (Aldh1l1) プロモーターを持つ Aldh1l1-Cre/ERT2 マウス (Srinivasan *et al.*, *Neuron*, 2016) と交配を行い、アストログリア細胞群特異的 SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスを作出した。タモキシフェンによる発現誘導を行った後、免疫染色法によって黒質切片を解析したところ、コントロールマウスと比較して Tg マウスでは、GFAP 陽性細胞数が増加する一方で TH 陽性細胞数が顕著に減少していた (図 2)。また、大脳皮質において、NeuN および GFAP 陽性細胞数に著変は認められなかった。

2. 研究の目的

本研究目的は、代謝性 ROS に起因するアストログリア細胞活性化とドパミン神経損傷メカニズムの解明を目的として、アストログリア細胞由来新規疾患分子の同定および機能解析を行う。さらに、このマウスと粘菌由来代謝物ライブラリー (Ogura *et al.*, *Biochem Pharmacol.*, 2016) を用いたスクリーニングを行い、ドパミン神経変性抑制物質の探索を行う。

- 1) 老齢期に至るまで Aldh1l1-SDHA^{Y215F}-Tg マウスの脳脊髄組織の形態変化と細胞死を解析する。
- 2) 疾患発症マウスの黒質活性化アストログリア細胞より産生されるミトコンドリア・細胞質分子を質量分析装置により同定する。
- 3) 同定した分子が神経形態変化・細胞死に与える影響を細胞・個体レベルで解析する。
- 4) Aldh1l1-SDHA^{Y215F}-Tg マウスを用いて粘菌由来代謝物からドパミン神経変性抑制物質を探索する。

3. 研究の方法

アストログリア細胞群特異的 SDHA^{Y215F}-Tg マウスの表現型解析

CAT-SDHA^{Y215F}-Tg マウスとアストログリア細胞に特異的に発現する Aldh1l1 プロモーターを持つ Cre/ERT2 発現マウスを交配させ、SDHA^{Y215F}-Tg マウスを作成する。行動薬理的解析および脳形態解析、脳切片を用いた免疫組織化学解析を行う。

アストログリア細胞由来新規疾患候補分子の同定

野生型マウスおよび SDHA^{Y215F}-Tg マウスの2群において、疾患発症時期および1ヵ月前の期間から黒質を実体顕微鏡下にて分離回収し、グルタミン酸トランスポーター (GLAST) 抗体結合型磁気ビーズを用いて、アストログリア細胞の純化を行う。次いで、ポッター型ホモジナイザーを用いて、ゆるやかに細胞を破碎し、遠心分離にて、粗ミトコンドリア分画および細胞質分画に分ける。さらに、粗ミトコンドリア分画からスクロス密度勾配法により高純度ミトコンドリアを回収する。このミトコンドリアおよび細胞質分画を解析用のサンプルとし、二次元電気泳動法および質量分析により病態発症により変動するタンパク質を同定する。

疾患候補分子の生物活性の解析とドパミン神経変性抑制物質の探索

得られた疾患候補分子の cDNA 配列および RNA 干渉を引き起こす shRNA 配列を設計し、それぞれの配列を含むレンチウイルスを作製し、初代培養アストログリア細胞に感染させ、液性栄養因子、ミトコンドリア動態、遺伝子発現、ATP 含有量、ROS 産生に与える影響を解析する。さらに、Tg マウスおよび野生型マウスの黒質にレンチウイルスを接種し、候補分子がアストログリア細胞活性化およびドパミン神経細胞死に与える影響を免疫組織化学法により解析し、疾患分子を同定する。

粘菌由来代謝物ライブラリーからドパミン神経変性抑制物質の探索

MPTP 依存性ドパミン神経細胞死を顕著に抑制する PQA 物質3種を粘菌由来代謝物ライブラリー [15種類 (Ogura et al., 2016)] から得た。このPQAをTgマウスの腹腔内投与した後、黒質ドパミン神経変性をTH染色およびTUNEL染色により解析する。既に、PQAが血液脳関門を通過し脳内移行することをMS解析により確認している。反復投与(1.0 mg/kg, 週3回, 2ヵ月)により肝や腎臓の組織像や血清データ(ALT/ASTやLDH)に異常がでないことも確認している。

4. 研究成果

CAT-SDHA^{Y215F}-Tg マウスと Aldh1l1 プロモーターを持つ Cre/ERT2 発現マウスを交配させた後、生まれた産仔を SDHA および Cre に特異的なプライマーを用いた PCR 法により遺伝子型を解析した。その結果、雌雄においてアストログリア細胞群特異的 SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスを得ることが出来た。SDHA^{Y215F} 発現を確認する目的で、脳を摘出し、タンパク質サンプルを調製した後、特異的な抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。アストログリア細胞群特異的 SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスのサンプルでは、約 70kDa の位置にシグナルが観察された。さらに、凍結脳切片を作成し、特異的な抗体を用いた免疫染色を行ったところ、黒質 GFAP 陽性細胞における SDHA^{Y215F} 発現が確認された。さらに、この黒質脳切片を用いて活性型 Caspase-3 染色および TH 染色を行ったところ、両陽性細胞がコントロール群と比較して、有意に増加していた。ミトコンドリア活性酸素種産生を ROS 感受性蛍光指示薬 MitoSox Red を用いて測定したところ、SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウス群の脳切片において有意な蛍光強度の増加が観察された。ロータロッドテストを実施したところ、コントロール群と比較してアストログリア細胞群特異的 SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスでは、保持時間が有意に短くなった。黒質部位のアストログリア細胞を純化した後、各種細胞分画を行い、サンプルを回収した。コントロール群と比較してアストログリア細胞群特異的 SDHA^{Y215F} 発現 Tg マウスにおいて変化するタンパク質スポットを精製した後、質量分析装置により同定した (新規病態関連タンパク質 6 種)。これらのタンパク質の遺伝子をクローニングおよび発現抑制のための siRNA を設計し、レンチウイルスベクターに組み込みレンチウイルスを作製した。6 種の内 2 種は、分泌タンパク質として知られているので、リコンビナントタンパク質も合わせて作製した。これらの分泌タンパク質をアストログリア細胞に過剰発現させ培養上清を回収し、初代培養神経細胞に添加すると有意なアポトーシス誘導が観察された。リコンビナントタンパク質を用いた実験でも同様の結果を得た。siRNA および中和抗体を用いた実験およびその他の新規病態関連タンパク質の機能解析を現在行っている。MPTP モデルを用いて、3 種の PQA 物質実験を行ったところ、MPTP により誘導される TH 陽性細胞数の減少およびロータロッドテストの保持時間短縮を有意に改善された。また、このモデルにおいてアストログリア細胞において分泌新規病態関連タンパク質の発現増強が確認されると共に、PQA 物質の投与により発現が抑制されることを観察した。

以上の結果は、アストログリア細胞における代謝性活性酸素種の増加は、神経細胞死を誘導する新規分泌タンパク質の発現・分泌増加を通して、黒質ドパミン神経の障害を惹起する可能性を示唆している。PQA 物質は、この分泌タンパク質発現を抑制することによりパーキンソン様モデルの症状を改善するものと推察される。今後、PQA 物質の中の 1 種 PQA-18 が PAK2

阻害活性を有しているという点 ([Ogura et al., 2016](#); [Ogura et al., *Biochem Pharmacol*, 2019](#); [Ogura et al., *PlosOne*, 2021](#)) を踏まえ、神経傷害を惹起するアストログリア細胞活性化における PAK2 シグナルの役割の解明が期待される。

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 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Norshalena Shakespear, Masato Ogura, Junko Yamaki, Yoshimi Homma	4. 巻 45
2. 論文標題 Astrocyte-Derived Exosomal microRNA miR-200a-3p Prevents MPP +-Induced Apoptotic Cell Death Through Down-Regulation of MKK4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochem Res.	6. 最初と最後の頁 1020-1033
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-020-02977-5	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 該当する

1. 著者名 Ogura Masato, Kikuchi Haruhisa, Shakespear Norshalena, Suzuki Toshiyuki, Yamaki Junko, Homma Miwako K., Oshima Yoshiteru, Homma Yoshimi	4. 巻 162
2. 論文標題 Prenylated quinolinecarboxylic acid derivative prevents neuronal cell death through inhibition of MKK4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 109 ~ 122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2018.10.008	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 該当する

1. 著者名 Ogura Masato, Endo Kumiko, Suzuki Toshiyuki, Homma Yoshimi	4. 巻 16
2. 論文標題 Prenylated quinolinecarboxylic acid compound-18 prevents sensory nerve fiber outgrowth through inhibition of the interleukin-31 pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246630
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0246630	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ogura Masato, Kikuchi Haruhisa, Shakespear Norshalena, Suzuki Toshiyuki, Yamaki Junko, Homma Miwako K., Oshima Yoshiteru, Homma Yoshimi
2. 発表標題 Prenylated quinolinecarboxylic acid derivative prevents neuronal cell death through inhibition of MKK4
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ogura Masato, Endo Kumiko, Suzuki Toshiyuki, Homma Yoshimi
2. 発表標題 Prenylated quinolinecarboxylic acid compound-18 prevents sensory nerve fiber outgrowth through inhibition of the interleukin-31 pathway
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究者データベース https://www.fmu.ac.jp/kenkyu/html/1017_ja.html 福島県立医科大学医学部附属生体情報伝達研究所生体物質研究部門ホームページ https://www.fmu.ac.jp/home/biomol/HTML/index.html</p>
--

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------