

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590978
 研究課題名（和文）シヌクレイノパチーに於ける神経細胞死の機序：細胞モデルに於ける検討
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms of cell death in synucleinopathy
 研究代表者
 武田 篤（TAKEDA ATSUSHI）
 東北大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：70261534

研究成果の概要（和文）：

野生型 α シヌクレインと129番のセリン（S129）をアラニンで置換し同部位のリン酸化をブロックした変異（S129A）体を培養細胞（SH-SY5Y）に導入し過剰発現させる細胞モデルを作成しロテノンで低濃度長期間曝露後、 α シヌクレイン凝集体形成や細胞死との関連を検討した。その結果、ミトコンドリアの膜電位障害に先行して著明な小胞体ストレスの誘導が認められることが明らかとなり、 α シヌクレインを介した細胞死には129Sのリン酸化が必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In wild-type α -synuclein cells treated with rotenone, induction of unfolded protein response (UPR) markers were evident several hours before the induction of mitochondrial disruption and caspase-3 activation. On the other hand, the S129A mutant failed to activate UPRs. It seems plausible that α -synuclein toxicity is dependent on the phosphorylation at S129 that induces the UPRs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学・内科系臨床医学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：シヌクレイノパチー、パーキンソン病、多系統萎縮症、神経細胞死、神経変性

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病・レビー小体型痴呆や多系統萎縮症などのシヌクレイノパチーは、 α シ

ヌクレインを主たる構成成分とする細胞内封入体の形成を病理学的特徴とするが、一方で、特に黒質や自律神経系などカテコラミン

細胞の障害が目立つと言う共通点がある。通常特定の高次構造を持たない α シヌクレインが、酸化ストレスなどの存在下に conformation 変化を生じ、複数分子からなる protofibril と呼ばれるオリゴマーを形成、この protofibril オリゴマーが特に高い細胞毒性を示し、神経細胞変性の中核を担っている可能性が当時次第に示されて来ていた。更に、ドーパミン酸化物であるドーパミン・キノン誘導体が α シヌクレインに結合し、その protofibril 生成を促進することが示され、カテコラミン代謝とシヌクレイノパチーの接点が分子レベルで明らかにされつつあった。しかしこれらの病的代謝過程の詳細は明らかでなかった。

我々は本研究課題以前の研究成果により、 α シヌクレインを過剰発現する細胞モデル、及び同細胞にカテコール・キノン誘導体をテトラサイクリンにより発現誘導できる細胞モデルを作成、 α シヌクレインの病的代謝過程とドーパミン酸化物、特にカテコール・キノン体の細胞毒性を解析してきた。そしてそれまでの研究成果から、特にミトコンドリアの機能障害が一連のプロセスで key となっていることを明らかとしていた。

2. 研究の目的

パーキンソン病や多系統萎縮症などのシヌクレイノパチーにおける神経変性のメカニズムを細胞レベルで解析する。またその細胞治療法についての検討を進める。具体的には、本課題の期間内にシヌクレイン・オリゴマー形成と細胞膜、細胞内小器官膜の傷害機序とその後の細胞死へ至るプロセスの解明を目指す。

3. 研究の方法

シヌクレイノパチーの細胞モデルとして、 α シヌクレイン過剰発現細胞の他、カテコラミン発現をコントロールできる細胞を作成し、分子生物学的手法を用いて細胞死のメカニズムを解析する。具体的には以下の様な実験計画を立てた。

- (1) チロシナーゼまたはチロシン水酸化酵素の発現誘導下の蛋白代謝を検討する。生成・分解過程の変化、ニトロチロシン化の様な酸化修飾などの異常修飾の有無、コンフォメーション変化の有無を検討する。更にカテコラミン酸化物による化学修飾の有無を検討する。これらの検討のため、免疫電気泳動や免疫沈降など旧来の技術のほか、近年進展が著しいプロテオミクスの技術も応用し、病態の key molecule のスクリーニングを行う。

こうした解析を通じて、ドーパミン酸化物を介した apoptosis のプロセスで key となる蛋白分子を同定する。

- (2) 樹立したチロシン水酸化酵素、またはチロシナーゼ発現調節細胞に、さらに α シヌクレインの過剰発現（遺伝子導入）あるいは発現抑制（アンチセンス遺伝子導入またはアンチセンスオリゴの添加）することにより、cell viability の変化をみる。
- (3) α シヌクレインの病的修飾過程を詳細に分析する。導入する α シヌクレインについては A30P、E46K、A53T などの家族性パーキンソニズムに関連した変異体の他、病的リン酸化に関連することが知られている 129 番のセリン変異体 S129A も用意し、リン酸化の影響も調べる。

4. 研究成果

- (1) パーキンソン病の神経変性メカニズムを解明する目的で、チロシナーゼを過剰発現させ細胞内にカテコラミン酸化物質を過剰産生させることにより、細胞死を誘導する独自の培養細胞系を用いて以下の結果を得た。
 - ① チロシナーゼ過剰発現により、ミトコンドリアを介したアポトーシスが誘導される培養細胞モデルを確立した。
 - ② 上記細胞死の過程において、ガングリオシド GD3 の形質膜から細胞質内（一部ミトコンドリア）への局在変化がみられた。
 - ③ チロシナーゼ発現誘導後、初期より GD3 合成酵素 (ST8) の発現増加と分解酵素 (NEU4L) の発現低下が確認された。本細胞モデルでは、細胞死に先立ってミトコンドリア内 GD3 の増加が生じていることが示唆された。
 - ④ NEU4L はヒト中脳で高発現していることが確認された。GD3 およびその合成・分解酵素は、ミトコンドリアを介した黒質神経細胞変性に関与している可能性がある。

以上の結果は、黒質神経細胞の変性脱落にミトコンドリアの機能障害が関与している可能性が高いことを改めて示唆するとともに、特に黒質神経細胞に強く発現する新規のシアリダーゼである NEU4L は黒質細胞の機能維持に深く関わっていることを強く示唆する。

- (2) パーキンソン病の神経変性メカニズムを解明する目的で、野生型 α シヌクレイ

ンと 129 番のセリン (S129) をアラニンで置換し同部位のリン酸化をブロックした変異 (S129A) 体を培養細胞

(SH-SY5Y) に導入し過剰発現させる細胞モデルを作成した。さらにこの細胞にロテノンを低濃度長期間曝露し、 α シヌクレイン凝集体形成や細胞死との関連を検討し以下の結果を得た。

- ① ロテノン曝露下、野生型 α シヌクレイン過剰発現細胞では S129A 変異型に比し高い凝集体形成を認めた。
- ② 野生型 α シヌクレイン過剰発現細胞では S129A に比し高い caspase-3 陽性率が認められた。
- ③ 野生型 α シヌクレイン過剰発現細胞においては著明な小胞体ストレスの誘導が認められたが、これはミトコンドリアの膜電位障害に先行していた。

以上から、 α シヌクレインを介した細胞死には 129S のリン酸化が必要であり、また細胞死の経路として小胞体ストレスが重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

- (3) ゲノムワイド関連遺伝子研究により、パーキンソン病に於けるリスク遺伝子として α シヌクレイン遺伝子における変異を検出した。またパーキンソン病における脳代謝異常について検討し、シヌクレインパチーとしてのパーキンソン病の臨床像について、その病態基盤の一端を解明した。

- ① パーキンソン病に関連したリスク遺伝子として α シヌクレイン、LRRK2、その他の複数の遺伝子座を検出した。
- ② α シヌクレインの細胞毒性と家族性パーキンソン病の原因遺伝子である LRRK2 の相互作用を検討し、両者の共在下にミトコンドリア毒性が増強される事、その際に α シヌクレインのリン酸化が関連していることを示唆する結果を得た。
- ③ 軽度の認知症を伴うパーキンソン病患者に於いて、脳代謝異常の分布を検討し、側頭・頭頂・後頭葉の隣接域、頭頂葉内側域、側頭葉下方域等の代謝低下を認めた。
- ④ パーキンソン病における性格変化、特に欺瞞行動をし難いと云う特徴について脳代謝異常の面から検討を加え、その基盤として前頭前野における糖代謝の低下と有意に関連していることを示した。
- ⑤ パーキンソン病の嗅覚低下が広範な認知機能の低下と関連している

ことを解明し、それが α シヌクレイン病理の脳内での拡がりに関連することを示唆する結果を得た。

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 12 件)

- 1) Ning YP, Kanai K., Tomiyama H., Li Y, Funayama M., Yoshino H, Sato S., Asahina M., Kuwabara S, Takeda A., Hattori T., Mizuno Y., Hattori N., PARK9-linked parkinsonism in Eastern Asia: Mutation detection in ATP13A2 and clinical phenotype. Neurology 70: 1491-1493, 2008、査読有
- 2) Sugeno N., Takeda A., Hasegawa T., Kobayashi M., Kikuchi A., Mori F., Wakabayashi K., Itoyama Y., Ser129 phosphorylation of α -synuclein induces unfolded protein response mediated cell death. J. Biol Chem. 283: 23179-23188, 2008、査読有
- 3) Moreira PI., Nunomura A., Nakamura M., Takeda A., Shenk JC., Aliev G., Smith MA., Perry G., Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. Free Radic Biol Med. 44: 1493-505, 2008、査読有
- 4) Castellani RJ., Nunomura A., Rolston RK., Moreira PI., Takeda A., Perry G., Smith MA., Sublethal RNA oxidation as a mechanism for neurodegenerative disease. Int. J. Mol. Sci. 9:789-806, 2008、査読有
- 5) Petzold A., Brettschneider J., Jin K., Keir G., Murray N.M.F., Hirsch N.P., Itoyama Y., Reilly M.M., Takeda A., Tumani H., CSF protein biomarkers for proximal axonal damage improve prognostic accuracy in the acute phase of Guillain-Barré Syndrome. Muscle Nerve 40: 42-49, 2009、査読有
- 6) Baba T., Nakashima I., Kanbayashi T., Konno M., Takahashi T., Fujihara K., Misu T., Takeda A., Shiga Y., Ogawa H., Itoyama Y., Narcolepsy as an initial manifestation of neuromyelitis optica with anti-aquaporin-4 antibody. J. Neurol. 256: 287-8, 2009、査読有
- 7) Abe N., Fujii T., Hirayama K., Takeda A., Hosokai Y., Ishioka T., Nishio Y., Suzuki K., Itoyama Y., Takahashi S., Fukuda H., Mori E., Do parkinsonian patients have trouble telling lies?:

- The neurobiological basis of deceptive behavior. *Brain* 132: 1386-1395, 2009、査読有
- 8) Hosokai Y., Nishio Y., Hirayama K., Takeda A., Ishioka T., Sawada Y., Suzuki K., Itoyama Y., Takahashi S., Fukuda H., Mori E., Distinct patterns of regional cerebral glucose metabolism in Parkinson's disease with and without mild cognitive impairment. *Mov. Disord.* 24: 854-862, 2009、査読有
 - 9) Su B., Liu H., Wang X., Chen SG., Siedlak SL., Kondo E., Choi R., Takeda A., Castellani RJ., Perry G., Smith MA., Zhu X., Lee HG., Ectopic localization of FOXO3a protein in Lewy bodies in Lewy body dementia and Parkinson's disease. *Mol. Neurodegen.* 4: 32, 2009、査読有
 - 10) Satake W., Nakabayashi Y., Mizuta I., Hirota Y., Ito C., Kubo M., Kawaguchi T., Tsunoda T., Watanabe M., Takeda A., Tomiyama H., Nakashima K., Hasegawa K., Obata F., Yoshikawa T., Kawakami H., Sakoda S., Yamamoto M., Hattori N., Murata M., Nakamura Y., Toda T., Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nature Genet.* 41: 1303-1307, 2009、査読有
 - 11) Takeda A., Saito N., Baba T., Kikuchi A., Sugeno N., Kobayashi M., Hasegawa T., Itoyama Y., Functional imaging studies of hyposmia in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 289: 36-39, 2010、査読有
 - 12) Kikuchi A., Takeda A., Okamura N., Tashiro M., Hasegawa T., Furumoto S., Kobayashi M., Sugeno N., Baba T., Miki Y., Mori F., Wakabayashi K., Funaki Y., Iwata R., Takahashi S., Fukuda H., Arai H., Kudo Y., Yanai K., Itoyama Y., In vivo visualization of α -synuclein deposition by carbon-11-labeled 2-(2-[2-dimethylaminothiazol-5-yl]ethenyl)-6-(2-[fluoro]ethoxy)benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy. *Brain* (in press), 2010、査読有

[学会発表] (計 26 件)

国内学会

- 1) 平山和美、石岡俊之、武田 篤、細貝良行、鈴木匡子、西尾憲之、糸山泰人、福

- 田寛、森悦朗、パーキンソン病の錯綜図
認知障害と脳代謝、第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15-17 日
- 2) 武田 篤、菊池昭夫、菅野直人、小林理子、平山和美、森悦朗、糸山泰人、パーキンソン病患者における嗅覚低下と脳代謝の検討、第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15-17 日
 - 3) 西尾憲之、武田 篤、平山和美、鈴木匡子、細貝良行、石岡俊之、糸山泰人、森悦朗、軽度認知障害を有するパーキンソン病患者における大脳局所灰白質量減少、第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15-17 日
 - 4) 佐竹涉、水田依久子、渡邊雅彦、武田 篤、長谷川一子、中島健二、佐古田三郎、山本光利、服部信孝、村田美穂、戸田達史、パーキンソン病感受性遺伝子の同定—FGF20 と新規感受性遺伝子—、第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15-17 日
 - 5) 水田依久子、佐竹涉、角田達彦、渡邊雅彦、武田 篤、長谷川一子、中島健二、山本光利、服部信孝、村田美穂、戸田達史、パーキンソン病感受性遺伝子の同定および統計学的相互作用解析、第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15-17 日
 - 6) 小林理子、菅野直人、武田 篤、菊池昭夫、糸山泰人、ドパミン過剰産生細胞を用いた細胞死メカニズムの検討：酸化ストレスとの関連、第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15-17 日
 - 7) 菅野直人、武田 篤、小林理子、菊池昭夫、長谷川隆文、糸山泰人、 α シヌクレインリン酸化によって誘導される細胞死は小胞体ストレスを介する、第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15-17 日
 - 8) 菊池昭夫、武田 篤、菅野直人、小林理子、長谷川隆文、細貝良行、石岡俊之、西尾憲之、岡田和枝、平山和美、鈴木匡子、森悦朗、金田朋洋、高橋昭喜、福田寛、糸山泰人、パーキンソン病患者における嚥下障害と脳代謝の検討、第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15-17 日
 - 9) 武田 篤、パーキンソン病の病態：分子生物学から分かったこと。シンポジウム「パーキンソン病の臨床、基礎の最前線」、第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15-17 日
 - 10) 武田 篤、Wearing-offの機序とその評価、イブニングセミナー「PD治療におけるL-dopa療法を再考する」、第 49 回日本神経学会総会、横浜、2008 年 5 月 15-17 日

- 11) 武田 篤、Lewy小体は善玉である・YES、第2回MDSJ、京都、2008年10月2-4日
- 12) 武田 篤、パーキンソン病の病態：運動症候と非運動症候、シンポジウム「パーキンソン病の病因・診断・治療研究の進歩」、第50回日本神経学会総会、仙台、2009年5月20-22日
- 13) 菊池昭夫、武田 篤、馬場徹、菅野直人、小林理子、長谷川隆文、田代学、四月朔日聖一、伊藤正敏、関和則、糸山泰人、痙性斜頸患者における脳代謝の検討、第50回日本神経学会総会、仙台、2009年5月20-22日
- 14) 長谷川隆文、武田 篤、菊池昭夫、菅野直人、小林理子、馬場徹、糸山泰人、パーキンソン病における α SYN自己抗体の存在およびオリゴマークリアランスへの関与、第50回日本神経学会総会、仙台、2009年5月20-22日
- 15) 菅野直人、小林理子、武田 篤、長谷川隆文、菊池昭夫、馬場徹、糸山泰人、チロシン水酸化酵素発現細胞における細胞死、第50回日本神経学会総会、仙台、2009年5月20-22日
- 16) 小林理子、長谷川隆文、武田 篤、菅野直人、菊池昭夫、馬場徹、糸山泰人、GCI形成過程におけるTubulin polymerization promoting proteinの機能的役割、第50回日本神経学会総会、仙台、2009年5月20-22日
- 17) 馬場徹、菅野直人、小林理子、菊池昭夫、長谷川隆文、武田 篤、糸山泰人、平山一美、森悦朗、パーキンソン病患者における嗅覚障害の神経基盤の検討、第50回日本神経学会総会、仙台、2009年5月20-22日
- 18) 武田 篤、レビー小体がなければパーキンソン病とはいえない・Yes、第3回MDSJ、東京、2009年10月8-10日
- 19) 武田 篤、Dopamine Dysregulation Syndrome、シンポジウム「PD・DLBの認知・行動障害」、第14回日本精神神経医学会、仙台、2009年11月5日
- 20) 武田 篤、嗅覚異常、シンポジウム「パーキンソン病の診断をめぐる新機軸」、第62回日本自律神経学会、和歌山、2009年11月6日

国際学会

- 21) Takeda A., Kikuchi A., Sugeno N., Kobayashi M., Hirayama K., Mori E., Itoyama Y., Hyposomnia in Parkinson's disease is associated with changes in cortical metabolism, 12th International congress of Parkinson's disease and movement disorders, Chicago, USA, 2008年6月

- 23-26日
- 22) Sugeno N., Takeda A., Hasegawa T., Kobayashi M., Kikuchi A., Itoyama Y., Ser129 phosphorylation of α -synuclein induces unfolded protein response mediated cell death, 12th International congress of Parkinson's disease and movement disorders, Chicago, USA, 2008年6月23-26日
- 23) Takeda A., PET and fMRI of Olfaction in PD, 6th International Congress on mental dysfunctions & other non-motor features in Parkinson's disease, Dresden, Germany, 2008年10月16-19日
- 24) Kikuchi A., Takeda A., Baba, T. Sugeno N., Kobayashi M., Hasegawa T., Mori E., Itoyama Y., Changes in brain metabolism and dysphagia in Parkinson's disease, 13th International congress of Parkinson's disease and movement disorders, Paris, France, 2009年6月8-11日
- 25) Sugeno N., Kobayashi M., Hasegawa T., Takeda A., Kikuchi A., Baba T., Itoyama Y., Cytoprotective effects of extracellular dopamine under the dopamine overproduction, 13th International congress of Parkinson's disease and movement disorders, Paris, France, 2009年6月8-11日
- 26) Baba T., Takeda A., Kikuchi A., Sugeno N., Kobayashi M., Hasegawa T., Hirayama K., Mori E., Itoyama Y., Changes in brain metabolism and hyposmia in Parkinson's disease, 13th International congress of Parkinson's disease and movement disorders, Paris, France, 2009年6月8-11日

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 篤 (TAKEDA ATSUSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70261534

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者