

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07834

研究課題名(和文)オートファジー制御因子Beclin 1を標的とした シヌクレイン神経毒性緩和効果

研究課題名(英文)Protective effects of autophagy-related factor Beclin 1 on a-synuclein-induced neurotoxicity

研究代表者

荒若 繁樹(Arawaka, Shigeki)

大阪医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：00344789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病の病態に深く関わる シヌクレインの細胞内クリアランスを解明するため、オートファジー誘導因子であるBeclin 1のノックアウトマウスを用いて、シヌクレインとオートファジーの関係を検討した。Beclin 1ノックアウトマウスの初代大脳皮質神経細胞において、ラパマイシン刺激によって誘発されるシヌクレインの細胞外分泌が抑制されていることを見出した。また、野生型マウスと比し、5ヵ月齢のノックアウトマウスヘテロ接合体の大脳、線条体において不溶性シヌクレインが蓄積していることを認めた。オートファジーは細胞外分泌を介してシヌクレインの細胞内クリアランスに関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シヌクレインの細胞内クリアランスの異常が、パーキンソン病の神経変性を引き起こすシヌクレインの凝集体形成と細胞間伝播に関与していると考えられている。今回の研究結果は、オートファジーが従来考えられてきたタンパク質分解のみならず、細胞外分泌を介してシヌクレインの細胞内クリアランスに寄与していることを示していた。オートファジーによる細胞外分泌の調節機構は、シヌクレインの凝集体形成および細胞間伝播を修飾するパーキンソン病進行抑制治療の新たな候補と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cell-to-cell transmission of α -synuclein aggregates seems to cause neurodegeneration of Parkinson's disease (PD). We investigated the contribution of autophagy to α -synuclein metabolism by using knockout (KO) mice of autophagy-inducer Beclin 1. Treatment with rapamycin facilitated extracellular secretion of α -synuclein in mouse primary cortical neurons. Rapamycin-induced α -synuclein secretion was significantly suppressed in primary neurons from Beclin 1 heterozygous KO mice, as compared with those from wild-type littermates. Additionally, Beclin 1 KO mice at 5 months of age accumulated detergent-insoluble α -synuclein in the cerebrum and striatum. These data suggest that autophagy affects intracellular clearance of α -synuclein by modulating α -synuclein secretion in neurons. The autophagy-based machinery of α -synuclein secretion could be a new target to suppress cell-to-cell transmission of α -synuclein in PD.

研究分野：神経内科

キーワード：神経変性疾患 病態生化学 パーキンソン病 タンパク質分解 オートファジー シヌクレイン

1. 研究開始当初の背景

オートファジー制御因子の欠損は神経細胞変性を惹起し、細胞内にタンパク質の異常凝集を引き起こす。タンパク質の異常凝集過程を発症の基盤とする神経変性疾患の治療法として、オートファジー誘導による細胞内クリアランスの活性化が考えられている。オートファジー制御因子 mTORC1 の阻害薬であるラパマイシンは、動物モデルにおいてポリグルタミンタンパク質および不溶性タウタンパク質の細胞内クリアランスを促進し、神経毒性を緩和させることが示されている。しかし、mTORC1 阻害薬は、強い副作用のため臨床応用は難しい。

パーキンソン病を病理学的に特徴づけるレビー小体は、シヌクレインが異常に凝集した構造物である。パーキンソン病の病変の拡がりを説明する仮説として、“シヌクレインの細胞間伝播”が考えられている。この細胞間伝播は、シヌクレインの細胞外分泌、細胞内への取り込み、異常凝集物が正常体を異常体に変換といったステップから構成されている。シヌクレインの細胞間伝播過程は、パーキンソン病の進行を緩和させる標的と考えられている。シヌクレインの細胞内分解はオートファジーによって行われるため、オートファジーを活性化することによって、細胞内で生じるシヌクレインの異常凝集物の産生が抑制できるのではないかと考えられる。しかし、どのようなオートファジー制御因子が、どの程度シヌクレインの分解に寄与しているか明らかでない。オートファジー制御因子の中で、class III phosphoinositide 3-kinase と複合体を形成し、オートファゴソームの形成を開始させる働きをもつ Beclin 1 が注目される。その理由として、培養細胞において Beclin 1 の過剰発現はオートファジーを誘導し、

シヌクレインの細胞内クリアランスを促進させること、Beclin 1 コンディショナルノックアウトマウスでは神経細胞の変性・脱落が生じ、Beclin 1 は神経生存に必要であることが報告されていることが挙げられる。Beclin 1 は、オートファジーを修飾することによってシヌクレインの神経毒性を緩和させる可能性がある。この可能性を探るために、Beclin 1 はオートファジーを介してシヌクレインの凝集体形成および細胞間伝播に影響を及ぼすか明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

本研究課題は、オートファジー制御因子 Beclin 1 とシヌクレインの関係に焦点をあて、Beclin 1 によるシヌクレイン凝集体形成および細胞間伝播への影響を明らかにし、オートファジー修飾による新たなパーキンソン病の進行抑制療法の可能性を探求することを目的とする。

3. 研究の方法

Beclin 1 の効果を調べるため、Beclin 1 ノックアウトマウス (系統 C57B6/J、ストックナンバー 028796、ジャクソン研究所) を購入し、ヘテロ接合体マウス (ホモ接合体は胎生致死) の脳を採取した。採取した脳は、大脳、線条体、脳幹、小脳に分けた。これらの組織に 1% Triton X-100 を添加した緩衝液を加え、ポッター型ホモジナイザーでホモジナイズした。3,000g で 5 分間遠心し、粉碎されなかった細胞塊を除いた。次に、10 万 g で 30 分間超遠心し、上清を 1% Triton X 可溶性画分とした。残った沈査は洗浄するため再度 1% Triton X-100 含有緩衝液中でホモジナイズし、同様に超遠心処理した。得られた沈査は、2% ドデシル硫酸ナトリウムに 8M 尿素を加えた溶液でホモジナイズし、10 万 g で 30 分間超遠心した。上清を 1% Triton 不溶性画分として保存した。1% Triton 可溶性および不溶性画分をアクリルアミドゲルで電気泳動後、ウエスタンブ

ロットティングで解析した。また、シヌクレインを安定発現する SH-SY5Y 細胞とマウス初代大脳皮質神経細胞を用いてシヌクレインの細胞外分泌メカニズムを解析した。初代培養は、妊娠 17 日の ICR マウスから、実体顕微鏡下で大脳皮質を採取し分散処理後、6 ウエルプレートに 1.5×10^6 個となるように播種した。培養は無血清培地 (B27 サプリメント添加 Neurobasal 培地) 中に行った。Beclin 1 ノックアウト妊娠マウスでは、胎児をジェノタイプリングし、同様の方法で野生型同腹子とヘテロ接合体子の初代大脳皮質神経細胞を作製した。シヌクレイン細胞外分泌の評価には、SH-SY5Y 細胞では一定時間タンパク質成分が入っていない Opti-MEM 培養液に置換して培養し、初代神経細胞では人工脳脊髄液または B27 サプリメント不含有 neurobasal 培養液中で培養した。これらの培養液は、回収後トリクロロ酢酸沈殿処理を行い、濃縮処理を施した。沈殿を Laemmli サンプルバッファー中で溶解後、ウエスタンブロットティングで解析した。また、トリクロロ酢酸沈殿を 1% Triton X-100 含有緩衝液中で超音波処理後、10 万 g で 30 分間超遠心し、1% Triton 可溶性画分と不溶性画分を得た。不溶性画分は Laemmli サンプルバッファー中で溶解し解析に使用した。細胞抽出液の作製には、細胞塊を 1% Triton X-100 含有緩衝液中で超音波処理後、氷中に 30 分間静置し、12,000g で 30 分間遠心した。得られた上清を実験に使用した。培養細胞の死滅に伴う影響を評価するため、LDH アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) 細胞外分泌による不溶性シヌクレイン細胞内クリアランスへの効果。はじめに、細胞内伝播を構成する細胞外分泌が不溶性シヌクレインの細胞内クリアランスに与える効果を検討した。シヌクレインを安定発現する SH-SY5Y 細胞を用いて解析したところ、モノアミンオキシダーゼ-B (MAO-B) 活性阻害は、シヌクレインの細胞外放出を促進すること、この放出は ABC トランスポーターを含む経路を介していること、MAO-B 阻害はライソゾーム機能障害を引き起こすクロロキン処理によって生じる不溶性シヌクレインを優先的に細胞外へ放出し細胞内の不溶性シヌクレインの蓄積を抑制することを見出した。これらの結果は、細胞外分泌を刺激することによって、シヌクレインの細胞内クリアランスを促進させ、不溶性シヌクレインの細胞内蓄積を抑制することを示していた。

(2) Beclin 1 によるシヌクレイン細胞外分泌への影響。次に、マウス初代大脳皮質神経細胞において、シヌクレイン

の細胞外分泌が見られることを確認した。この生理的なシヌクレイン細胞外分泌とオートファジーとの関係について検討した。mTORC1 を阻害するラパマイシンで初代神経細胞を処理すると、細胞内ではオートファジーの活性化を示す p70S6 キナーゼのリン酸化の低下および LC3-II の産生亢進が認められた (図 1A)。オートファジーの選択的基質受容

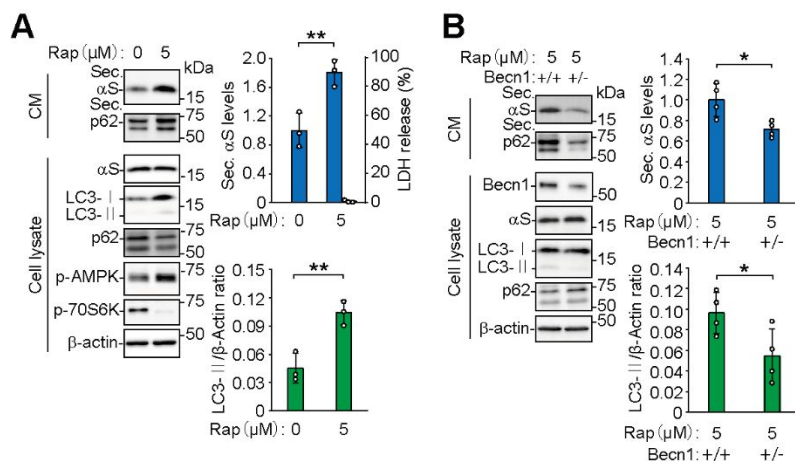


図1. 神経細胞におけるオートファジーを介したαシヌクレイン(αS)の細胞外分泌、マウス初代大脳皮質神経細胞を5μMのラパマイシン(Rap)で6時間処理し、培養液(CM)および細胞抽出液(Cell lysate)をウエスタンブロットティングで解析。β-actinはcell lysateのローディングコントロールを示す。A) Rap刺激は分泌されるαシヌクレイン(Sec. αS)とp62を増加させる。細胞内のαS発現に変化はないが、オートファジーの促進を反映してLC3-IIの産生は亢進し、p62の発現は減少している。また、p70S6キナーゼ(p70S6K)のリン酸化は抑制され、AMPKのリン酸化は亢進している。上のグラフはSec. αSの変化とLDH放出を示す。Rap処理はLDH放出に変化をもたらさない。B) αSの細胞外分泌におけるオートファジー誘導因子Beclin 1(Beclin 1)の寄与。Beclin 1ノックアウトマウスヘテロ接合体由来(+/-)の初代神経細胞では、野生型(+/+)と比べRap刺激下におけるSec. αSが減少している。p62の分泌も同様に減少している。Cell lysateでは、Beclin 1ノックアウトマウス由来の初代神経細胞ではオートファジーの抑制を反映してBeclin 1の発現およびLC3-IIの産生が低下しp62の発現が増加している。αSの発現に変化はない。

体である p62 分子の細胞外分泌は、ラパマイシン非処理の場合と比べ、ラパマイシン処理によって亢進していた。シヌクレインの細胞外分泌は、p62 と同様にラパマイシン処理によって亢進していた。このラパマイシンによって誘導されるシヌクレインと p62 の細胞外分泌は、Beclin 1 ヘテロ接合体ノックアウトマウスに由来する初代神経細胞では、野生型より有意に減少していた(図 1B)。SH-SY5Y 細胞において、オートファジー誘導因子である Atg5 の発現をノックダウンしたところ、コントロールと比しシヌクレインの細胞外分泌は抑制されていた。これらの結果は、シヌクレインの細胞外分泌にオートファジーが関与していることを示し、オートファジーの促進によって、シヌクレインの細胞外分泌が亢進する可能性を示唆していた。

(3) 神経細胞におけるシヌクレインのオートファジーを介した細胞外分泌の調節機構。初代神経細胞において、グルタミン酸刺激による神経活動の上昇は、シヌクレインの細胞外分泌を促進させ、この促進現象は細胞内カルシウム濃度に依存していることを見出した。グルタミン酸刺激およびカルシウムイオノフォア A23187 処理は、細胞内 LC3-II の産生を亢進させ、細胞内 p62 の発現を低下させていた。これらの所見は、神経活動の上昇はオートファジーを刺激し、シヌクレインの細胞外分泌亢進を引き起こすことを示していた。

(4) オートファジーを介したシヌクレインの細胞外分泌における ABC トランスポーターの関与。さらに、オートファジーによるシヌクレインの細胞外分泌経路を調べるため、ABC トランスポーター阻害薬であるプロベネシドを用いて検討した。プロベネシドで初代神経細胞を処理すると、グルタミン酸刺激によって惹起されるシヌクレインの細胞外分泌は抑制された。また、培養液をエクソソームリッチな画分と非エクソソーム画分に分けて検討したところ、プロベネシドは、両方の画分でシヌクレインの分泌を抑制していた。これらの所見は、エクソソーム及びエクソソームを内包する膜状構造物(後期エンドソームに相当)に ABC トランスポーターが発現している可能性を示唆していた。

(5) Beclin 1 ノックアウトマウス脳におけるシヌクレインの変化。野生型マウスと比し、5 ヶ月齢のノックアウトマウスヘテロ接合体の脳、線条体において不溶性シヌクレインが蓄積していた。LC3-II の産生亢進は観察されなかった。Beclin 1 ノックアウトマウス由来の初代神経細胞において、ラパマイシン刺激によって細胞内 LC3-II およびシヌクレインの細胞外分泌に変化が見られたことより、刺激によって誘導されるオートファジーの反応性低下が、不溶性シヌクレインの蓄積に影響を与えている可能性が考えられた。

以上より本研究課題では、シヌクレインの細胞間伝播に必須ステップである細胞外分泌に新たな知見を加えた。神経細胞において、シヌクレイン細胞外分泌の経路としてオートファジーがあること、この細胞外分泌は神経活動によって細胞内カルシウム濃度依存性に調節されること、この分泌経路に ABC トランスポーターが含まれること、生体において Beclin 1 の発現欠損は不溶性シヌクレインの蓄積を引き起こすことを明らかにした。これらの結果は、オートファジーを操作することによって、シヌクレインの細胞内クリアランスをタンパク質分解だけではなく細胞外分泌によって調節できる可能性を示していた。パーキンソン病におけるシヌクレインの細胞間伝播を修飾する治療標的として、オートファジーによる細胞外分泌があることを示した。(1)の結果について、Journal of Neuroscience (Nakamura Y, Arawaka S, et al. Journal of Neuroscience 41 (35); 2021, 7479-7491)で論文発表した。(2)から(5)の内容は、国際学会 Neuroscience 2021 (2021, November 8-11, Online)で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Yoshitsugu, Arawaka Shigeki, Sato Hiroyasu, Sasaki Asuka, Shigekiyo Taro, Takahata Kazue, Tsunekawa Hiroko, Kato Takeo	4. 巻 41
2. 論文標題 Monoamine oxidase-B inhibition facilitates α -synuclein secretion in vitro and delays its aggregation in rAAV-based rat models of Parkinson's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 7479-7491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0476-21.2021	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakamura Yoshitsugu, Sato Hiroyasu, Takahata Kazue, Tsunekawa Hiroko, Shigekiyo Taro, Kato Takeo, Arawaka Shigeki.
2. 発表標題 MAO-B inhibition facilitates α -synuclein secretion via an ABC transporter-mediated pathway and delays its aggregation.
3. 学会等名 The Neuroscience 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村善胤, 荒若 繁樹.
2. 発表標題 α -シヌクレイン細胞外分泌におけるMAO-B阻害薬の効果の細胞生物学的解析.
3. 学会等名 第14回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakamura Yoshitsugu, Arawaka Shigeki.
2. 発表標題 MAO-B inhibition modulate secretion of insoluble α -synuclein via secretory vesicle-associated pathway.
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福瀬智隆, 中村善胤, 荒若繁樹.
2. 発表標題 脱分極刺激による シヌクレイン放出機構の解析.
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前住那子, 中村善胤, 荒若繁樹.
2. 発表標題 オートファジー誘導異常における -シヌクレイン発現変化の in vivo 解析.
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Arawaka Shigeki
2. 発表標題 Updates of liquid biomarkers and disease-modifying potential of an antiparkinsonian drug in PD.
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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