

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07850

研究課題名（和文）ミトコンドリア品質管理の破綻によるドーパミン神経の脆弱性と特異性の解明

研究課題名（英文）Loss of mitochondria quality control induce dopaminergic neurodegeneration

研究代表者

佐藤 栄人（Sato, Shigeto）

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：00445537

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）：遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子であるParkinとCHCHD2に着眼し、遺伝子欠損マウスを作製・解析した結果、欠損マウスでは100週齢以上の高齢で運動症状とドーパミン神経の脱落が観察された。老化マウスの中脳黒質ドーパミン細胞には断片化した損傷ミトコンドリアが蓄積し、ドーパミン細胞の脆弱性の高まりが神経細胞死に関与するものと推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モデルマウスの解析から不良なミトコンドリアの蓄積がパーキンソン病の原因であることが有力となり、古くから指摘されてきたミトコンドリア障害説を裏付ける結果となった。このモデルマウスの利用はミトコンドリアをターゲットとした治療法の開発に有益である。

研究成果の概要（英文）：Parkin knockout mice and CHCHD2 knockout mice showed motor symptoms and dopaminergic neuronal loss over the age of 100 weeks. Fragmented and damaged mitochondria accumulated in the substantia nigra dopaminergic cells in the aged mice, suggesting that increased vulnerability of dopaminergic cells is involved in neuronal cell death.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 ミトコンドリア ドーパミン細胞 神経変性 Parkin CHCHD2 モデルマウス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝性パーキンソン病の発症機序として、Parkin 遺伝子変異 異常ミトコンドリアの蓄積 神経変性、の流れが明らかになってきた。しかしながら、このようなミトコンドリア病態(変異ミトコンドリアの蓄積)に関する知見が集積しつつあるも、病態の全容解明には至っていない。その理由として、in vitro(神経細胞以外)の研究が主体であることがあげられる。

## 2. 研究の目的

これに対して異常ミトコンドリアが蓄積すると予想される Parkin ノックアウトマウスを従来よりも長期観察することによって、パーキンソン病類似の表現系を呈することを見出した。そこで本研究では老化マウスの神経細胞(in vivo)でのミトコンドリアの挙動を追跡することにより、ミトコンドリア障害説に解を得る。

## 3. 研究の方法

パーキンソン病のモデル動物としてマウスに注目すると、遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子改変モデルマウスは運動症状や神経細胞死が起こらないことが問題とされてきた。これに対してモデルマウスを従来より長期に観察することで運動症状や神経細胞死を観察した。運動症状の評価として、ロタロッド試験、ビーム課題試験を実施し、運動症状が生じた週齢のマウスについて病理学解析による神経細胞脱落や微細構造解析によるミトコンドリア形態解析や生化学的解析によりミトコンドリア酵素活性を測定した。

## 4. 研究成果

### 1. Parkin ノックアウトマウスの表現型とミトコンドリア異常

一般的に Parkin ノックアウトマウスは表現系に乏しいとされてきた。そこでさらに長期間にわたって運動症状を観察することにした。その結果、Parkin ノックアウトマウスは 100 週齢以降に運動障害を示し始めることを発見した。ビーム課題では、野生型マウスは 3cm の木製ポールを尻尾でバランスを取りながら絶妙に歩行するが、Parkin ノックアウトマウスはポール上で頻りに後脚を滑らせる歩行が特徴的である。マウスのパーキンソニズムの評価方法は確立されていないが、このようなマウス特有な歩行様式は類似の運動症状として捉えられる。また、フットプリントでは野生型マウスに比べ Parkin ノックアウトマウスでは歩幅の短縮が観察された。運動機能の評価のためにはロタロッド試験を用いるのが一般的であるが、Parkin ノックアウトマウスでは老化とともに落下潜時が短縮され、110 週齢以降では野生型マウスと有意な差が出現する。ミトコンドリア品質管理の分子機構については多くの知見が集積し理解が深まってきた。しかし、Parkin が in vivo でミトコンドリア機能や構造にどのように影響するかは不明である。そこで、運動症状を示す高齢 Parkin ノックアウトマウスのドーパミン細胞に含まれるミトコンドリア観察を実施した。TH 染色陽性細胞の細胞体に存在するミトコンドリア面積を解析したところ、Parkin ノックアウトマウスのドーパミン神経細胞では、ミトコンドリアの平均面積が野生型のものよりも小型で、ミトコンドリアが占める細胞体領域の割合が高い傾向にあった。これらの結果からは、Parkin ノックアウトマウスではミトコンドリアが断片化し蓄積しているのが観察された。一般に、不良なミトコンドリアはオートファジーによって分解されるために、分裂し小型化することが必要とされている。Parkin 変異(欠損)によるマイトファジーの破綻が生じ、本来分解されるべき不良なミトコンドリアが蓄積した結果である。微細構造のさらに詳細に観察したところ、断片化ミトコンドリアは正常な外膜構造を有している一方で、内部構造(マトリックスおよびクリステ)の破壊が顕著である。多くのパーキンソン病モデルマウスが開発されたが、そのほとんどがドーパミン神経の変性を伴わない。不良なミトコンドリアの蓄積が細胞死に関与するかを検討するために、ドーパミン細胞数を比較したところ Parkin ノックアウトマウスではドーパミン神経細胞の脱落が観察された。運動症状が Parkin 欠損による他神経領域の変性の影響である可能性を除外するために、皮質、小脳などの病理検索を実施したが、レビー病理を含め明らかな神経変性疾患は見られなかった。不良ミトコンドリアの蓄積はドーパミン神経特異的に脆弱性を生み出し、その喪失が高齢で観察される運動症状の原因と考えられた。実際、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による線状体ドーパミンを測定したところ、Parkin ノックアウトマウスでは線状体ドーパミンレベルが減少する。

### 2. CHCHD2 ノックアウトマウスの表現型とミトコンドリア異常

2015 年 Parkin/PINK1 に次いでミトコンドリアに関与する遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子 CHCHD2 が同定された。CHCHD2 は 151 アミノ酸からなる 17kDa のタンパク質で、N 末端にミトコ

ンドリア移行シグナルを有し、C末端に coiled-coil ドメイン構造を持つ。各臓器に広く発現するが、肝臓、腎臓、骨格筋に強く発現する。ミトコンドリアの膜間腔に局在し膜構造の維持に関与するとされるが詳細な機能は不明である。CHCHD2 の in vivo での役割を明らかにすべく CHCHD2 欠損マウスを作製・解析を実施した。Parkin ノックアウトマウスと同様に長期に観察したところ、100 週齢以降の高齢で運動症状を呈することを発見した。高齢マウスのドーパミン細胞内のミトコンドリアを評価するために TH 染色陽性細胞の細胞体に含まれるミトコンドリアを解析したところ、CHCHD2 ノックアウトマウスのミトコンドリアは面積が小さく、一方で細胞質に占める割合が高い。このことは断片化した不良ミトコンドリアがドーパミン細胞に蓄積していることを示唆した。CHCHD2 ノックアウトマウスで観察される断片化ミトコンドリアは通常の外膜構造を有しているが、内部構造(マトリックスおよびクリステ)の破壊が顕著にみられるのが構造的特徴的で、機能としてはミトコンドリア複合体 I と III の有意な活性の低下が見られた。病理学的にはドーパミン細胞の変性脱落と、P62 と SNCA 陽性の凝集体形成が観察され、そのような病理学的所見はドーパミン細胞特異的であった。

#### 結論

Parkin ノックアウトマウスと CHCHD2 ノックアウトマウスは 100 週齢以上の高齢にて運動症状とドーパミン神経の脱落が観察された。高齢マウスの中脳黒質ドーパミン細胞には断片化した損傷ミトコンドリアが蓄積し、ドーパミン細胞の脆弱性の高まりが神経細胞死に関与するものと推測された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Noda S, Sato S, Fukuda T, Tada N, Uchiyama Y, Tanaka K, Hattori N	4. 巻 136
2. 論文標題 Loss of Parkin contributes to mitochondrial turnover and dopaminergic neuronal loss in aged mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiol Dis.	6. 最初と最後の頁 104717
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 -

1. 著者名 Oji Y, Hatano T, Ueno SI, Funayama M, Ishikawa KI, Okuzumi A, Noda S, Sato S, Satake W, Toda T, Li Y, Hino-Takai T, Kakuta S, Tsunemi T, Yoshino H, Nishioka K, Matsuda J, Hattori N	4. 巻 143
2. 論文標題 Variants in saposin D domain of prosaposin gene linked to Parkinson's disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1190-1205
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 -

1. 著者名 Noda S, Sato S, Fukuda T, Tada N, Hattori N	4. 巻 13
2. 論文標題 Aging-related motor function and dopaminergic neuronal loss in C57BL/6 mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Brain.	6. 最初と最後の頁 46
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 -

1. 著者名 Noda S, Sato S, Fukuda T, Tada N, Uchiyama Y, Tanaka K, Hattori N.	4. 巻 136
2. 論文標題 Loss of Parkin contributes to mitochondrial turnover and dopaminergic neuronal loss in aged mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiol Dis.	6. 最初と最後の頁 104717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2019.104717.	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 Sato S, Noda S, Torii S, Amo T, Ikeda A, Funayama M, Yamaguchi J, Fukuda T, Kondo H, Tada N, Arakawa S, Watanabe M, Uchiyama Y, Shimizu S, Hattori N	4. 巻 30
2. 論文標題 Homeostatic p62 levels and inclusion body formation in CHCHD2 knockout mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hum Mol Genet.	6. 最初と最後の頁 443-453
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 -

1. 著者名 Cossu D, Yokoyama K, Sato S, Noda S, Sechi LA, Hattori N.	4. 巻 359
2. 論文標題 PARKIN modifies peripheral immune response and increases neuroinflammation in active experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Neuroimmunol.	6. 最初と最後の頁 577694
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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 パーキンソン病モデル非ヒト動物	発明者 佐藤栄人、野田幸子、服部信孝	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-154898	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------