

令和 4 年 9 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16914

研究課題名(和文)新規パーキンソン病モデルマウスを用いたドパミン神経細胞死メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of dopaminergic cell death based on the analysis of a novel mouse model of Parkinson's disease.

研究代表者

生野 真嗣 (Ikuno, Masashi)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：30808960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病の発症や進行を予防するためには、ドパミン神経が大量に減少してしまう前の、前駆期における病態の解明が重要です。パーキンソン病ではその前駆期から脳以外の部分にも様々な異常が現れることが知られています。そこで本研究では、前駆期パーキンソン病を再現したモデルマウスを用いて、その血液の代謝産物解析を行いました。結果として、ミトコンドリア異常と関連していると考えられるイソブチリルカルニチンやピリミジンヌクレオシドの増加が認められました。これらの結果は、パーキンソン病においてその前駆期でも既に全身的なミトコンドリア機能障害が存在する可能性を示唆しています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、パーキンソン病を始めとした中枢神経疾患における中枢神経以外の臓器との関連が注目されています。特にパーキンソン病では腸脳連関と言って脳の病態と腸管の状況が関連していることが知られています。本研究はパーキンソン病モデルマウスでも脳以外の異常が存在することを示すとともに、パーキンソン病の予防のための前駆期・全身病態の重要性を示唆する成果であると言えます。

研究成果の概要(英文)：In order to prevent the onset or progression of Parkinson's disease, it is important to understand the pathogenesis of the disease in the prodromal phase, before the dopamine nerves are reduced in large amounts. It is known that Parkinson's disease manifests various abnormalities in areas other than the brain from the prodromal stage. In this study, I used a mouse model of Parkinson's disease in the prodromal stage and analyzed its blood metabolites. The results showed an increase in isobutyricarnitine and pyrimidine nucleosides, which are thought to be associated with mitochondrial abnormalities. These results suggest that systemic mitochondrial dysfunction already exists in Parkinson's disease, even in its prodromal stage.

研究分野：臨床神経学

キーワード：パーキンソン病 アルファシヌクレイン 神経細胞死 モデルマウス 前駆病態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の研究により、レビー小体 (LB) は中枢神経系 (CNS) だけでなく、パーキンソン病 (PD) の前駆期にも身体の様々な部位で発見されることが分かってきました。例えば、LB は PD の診断前に消化管組織に分布しており、PD の早期あるいは前駆期のバイオマーカーとなる可能性があります。このことから、PD は今や早期でも全身性の疾患と考えられており、早期または前駆 PD (p-PD) の新規バイオマーカーを同定するためには、CNS 以外の組織における変化にも注目する必要があります。さらに、本格的な神経変性が起こっていない段階での疾患修飾療法の開発には、病態生理の解明とともに非侵襲的バイオマーカーの同定が急務となっています。ヒトの疾患を忠実に反映した動物モデルは、疾患の前駆期を評価するための貴重なツールです。

PD を全身性疾患と考えるもう一つの根拠はミトコンドリア機能障害の関与です。ミトコンドリア機能障害が PD の病態に重要な役割を担っていることは広く知られています。例えば、PD 患者の脳だけでなく血小板においても複合体 1 の活性が低下していることが示されており、ミトコンドリア複合体 阻害剤を用いて PD モデルマウスが作製されています。Parkin や PINK1 など家族性 PD の原因遺伝子の多くはミトコンドリア機能に関連しています。さらに、アルファシヌクレイン (α -Syn) がミトコンドリア複合体 と相互作用し、ミトコンドリア機能障害を誘導することが報告されています。

近年、プロテオーム解析や遺伝子発現解析により、病態メカニズムの解明や疾患バイオマーカーの同定が進められています。これらの高分子物質に加えて、アミノ酸、有機酸、脂肪酸などの低分子物質も疾患バイオマーカーとなり、病態形成に寄与する可能性があります。PD が全身性の疾患であることを考えると、PD 患者の血漿のメタボローム解析は、PD の病態生理を反映すると考えられる変化を検出するための合理的な非侵襲的方法となると考えられます。しかし、ヒト試料を用いたメタボローム解析は、遺伝的背景、環境、食事、薬剤などの交絡因子の影響を強く受け、これらすべてが結果の解釈を妨げています。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトサンプルのメタボローム解析に伴うこれらの欠点を克服するために、p-PD のモデルマウスを採用しました。このモデルは、特発性 PD の 2 つの主要な遺伝的危険因子に基づいて、 α -syn の BAC (Bacterial Artificial Chromosome) トランスジェニックマウスと β -グルコシダーゼ (GCase) をコードする Gba1 遺伝子のヘテロ接合ノックアウトを交配して作成しました。このモデルマウスはヒト α -syn をネイティブプロモーターで生理的に発現し、運動表現型を伴わずに PD 脆弱部位に α -syn の蓄積と軽度のドーパミン神経細胞の減少を示し、PD の前駆モデルとして報告済みのものです (Hum Mol Genet, 2019)。同じ遺伝的背景を持ち、同じ環境下にあるこの p-PD マウスモデルを解析することで、パーキンソン病発症メカニズムに繋がる前駆期の変化について偏りのない情報を得ることを目的としました。

3. 研究の方法

モデルマウスを前日の正午以降絶食とした上で、下大静脈から静脈血を採取しました。試料はすべて 15 ヶ月齢の雄マウスから採取しました。キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) および液体クロマトグラフィー-飛行時間型質量分析計 (LC-TOFMS) での分析用に各群 (野生型および PD 前駆期モデル) 5 サンプルずつ準備しました。メタボローム測定は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社 (日本、鶴岡市) に外注委託しました。

4. 研究成果

合計 314 の代謝物が分析され、そのうち 10 が有意に変化したと判定されました ($P < 0.05$)。p 値 ($P < 0.05$)、2 群間の値比 (> 1.2 または < 0.8)、質量分析における全マウスサンプルの識別可能なピークという観点から、イソブチリルカルニチン、ピリミジンヌクレオチド(チミジン、デオキシウリジン)を取り上げています。

血漿中のイソブチリルカルニチンの平均ピークレベルは、野生型 (wt) マウスで $1.1E-04$ (S.D.: $1.9E-05$)、p-PD マウスで $1.8E-04$ (S.D.: $3.0E-05$) と有意差があり、p-PD マウスは野生型 (wt) マウスと比べて血漿イソブチリルカルニチンレベルが 1.5 倍高くなっていました (図 1)。

血漿中のチミジンとデオキシウリジンの平均ピークレベルは、p-PD マウスが wt マウスより有意に高くなっていました (図 2)。血漿中のチミジンレベルは、野生型 (wt) マウスでは $3.8E-04$ (S.D.: $3.5E-05$)、p-PD マウスでは $5.3E-04$ (S.D. = $7.2E-05$) であり、1.4 倍高い値でした。血漿中デオキシウリジン濃度は、p-PD マウスでは 1.3 倍、野生型 (wt) マウスでは $3.1E-04$ (S.D.: $1.6E-05$)、p-PD マウスでは $4.0E-04$ (S.D. = $3.1E-05$) となっていました。

酸化リン酸化 (OXPHOS) は、5 つの酵素複合体 (複合体 1-5) によって行われ、ミトコンドリアの主要な役割の一つです。ミトコンドリア DNA や核 DNA のミトコンドリアタンパク質に対する変異などにより、各ミトコンドリア複合体のタンパク質量の減少やアセンブリ不足は、ミトコンドリア複合体の活性低下によるミトコンドリア機能障害と密接に関連しています。アシルカルニチンやピリミジンヌクレオチドの増加はミトコンドリア機能障害を示唆するため、ミトコンドリア複合体の完全性を評価するために、各電子輸送鎖 (ETC) 複合体のタンパク質量レベルを測定しました。その結果、ミトコンドリア複合体 1 (CI-20) のタンパク質量が減少しており (図 3)、ミトコンドリアの組み立てとその機能に障害があることが示唆されました。

本研究で同定されたメタボローム変化は比較的小さいものでしたが、その多くがミトコンドリアに関連するものでした。イソブチリルカルニチン (C4-カルニチン) は、代表的なアシルカルニチン (AC) です。AC は重要な脂質キャリアーであることが知られており、その血清レベルはミトコンドリアにおける酸化の状態を反映することが報告されています。酸化経路では、脂肪酸はカルニチンと結合して AC を形成し、ミトコンドリアに入り、連続した炭素数 2 のユニットの酸化的除去を受け、各ステップでアセチル-コエンザイム A (CoA) が生成されます。ミトコンドリアにアシル-CoA が蓄積すると、カルニチンはアシル-CoA からアシル基を受け取って AC を形成し、アシル-CoA をミトコンドリアから除去します。したがって、イソブチリル-CoA は酸化経路の後期に生成する中間生成物であるため、イソブチリルカルニチンの増加は、ミトコンドリアでの脂肪酸代謝異常やミトコンドリア機能障害を示唆するものです。

ピリミジンヌクレオチドであるチミジンおよびデオキシウリジンは、ピリミジン塩基ガリボースまたはデオキシリボースと共有結合した有機分子であり、チミジンホスホリラーゼ (TYMP) の基質です。TYMP の異常はミトコンドリア神経消化管脳筋症 (MNGIE) の原因となり、MNGIE 患者は血漿および組織中のチミジンおよびデオキシウリジンの濃度が上昇し、ミトコンドリア DNA 合成および機能に異常をきたします。また、これらはミトコンドリアのチミジンキナーゼ 2 (TK2) の基質であり、その代謝物はミトコンドリア DNA 合成に必須です。TK2 活性の欠損はデオキシヌクレオチドの不均衡を引き起こし、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の枯渇を特徴とするミトコンドリア障害を引き起こします。ヌクレオチドプールの不均衡は、mtDNA 合成の欠陥やミトコンドリア呼吸の欠損につながるため、細胞内のデオキシヌクレオチドレベルは厳密に制御されています。現在のところ、ミトコンドリア内のヌクレオチドの不均衡に対するそれらの寄与の程度を決定することは困難であるため、さらなる研究が必要です。

本研究で確認された変化のいくつかは、ヒト血漿試料を用いたメタボローム研究でも報告さ

れています。Saiki らの報告 (Scientific Reports, 2017) では、1st コホートでは PD 患者の血漿中にイソブチリルカルニチン濃度が上昇していることを報告しましたが、2nd コホートでは顕著な差は認められませんでした。両コホートとも、H-Y ステージ 1~5 の対照群とパーキンソン病患者を含んでいました。この 2 つの結果の違いは、2 つのコホート間の患者の重症度の違いに一部起因すると考えられます。

イソブチリルカルニチンの増加はミトコンドリアでの酸化の障害を示唆し、ピリミジンヌクレオシドの増加はミトコンドリア機能障害の悪化因子となり得ます。メタボロミクスの結果と一致するように、p-PD マウスではミトコンドリア複合体 1 のタンパク質レベルが選択的に減少しており、その組み立てと機能の欠陥が示唆されました。

結論として、全身性のミトコンドリア機能障害は PD の前駆期にも存在し、PD の発症と進行に寄与している可能性があります。ただし PD の前駆期または早期バイオマーカーとしてこれらの候補メーカーを検証するためには、Parkinson Associated Risk Study (PARS) コホートのような p-PD コホートにおけるさらなる調査が必要です。

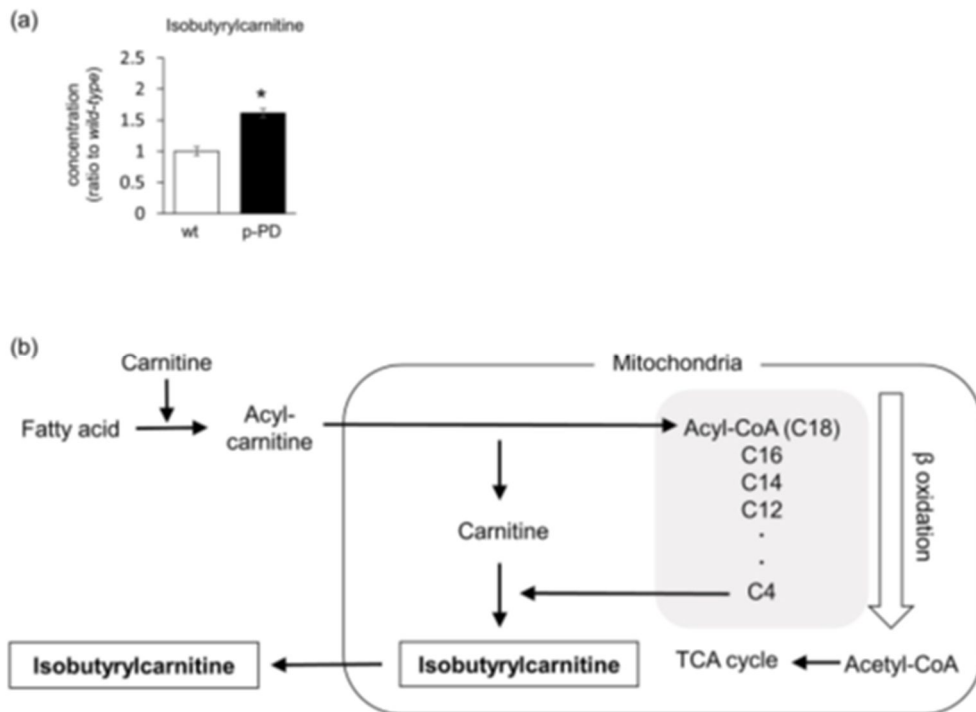


図 1 . p-PD マウスの血漿中ではイソブチリルカルニチンが増加していました

(a) メタボローム解析結果。値はコントロールとして野生型の血漿中のイソブチリルカルニチン濃度に対する比率で示しています。棒グラフは平均値 ± SEM 値を示しています。(b) ミトコンドリア 酸化経路におけるイソブチリルカルニチンの代謝を図示しています。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

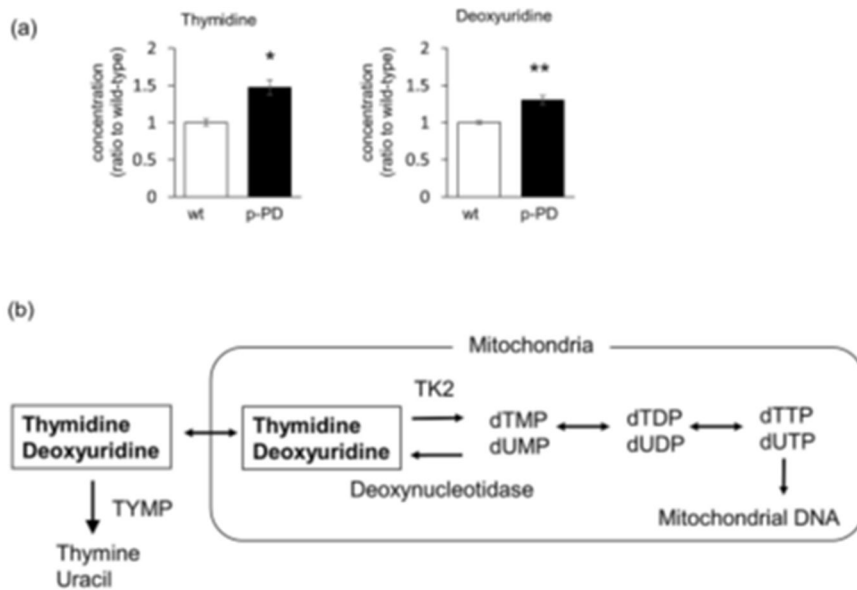


図 2 . p-PD マウスの血漿中のピリミジンヌクレオチドレベルは上昇していました

(a)メタボローム解析結果。値はコントロールとして野生型の血漿中のピリミジンヌクレオチド濃度に対する比率で示しています。(b) 細胞質およびミトコンドリアにおけるチミジンとデオキシウリジンの代謝の図。**P < 0.01.

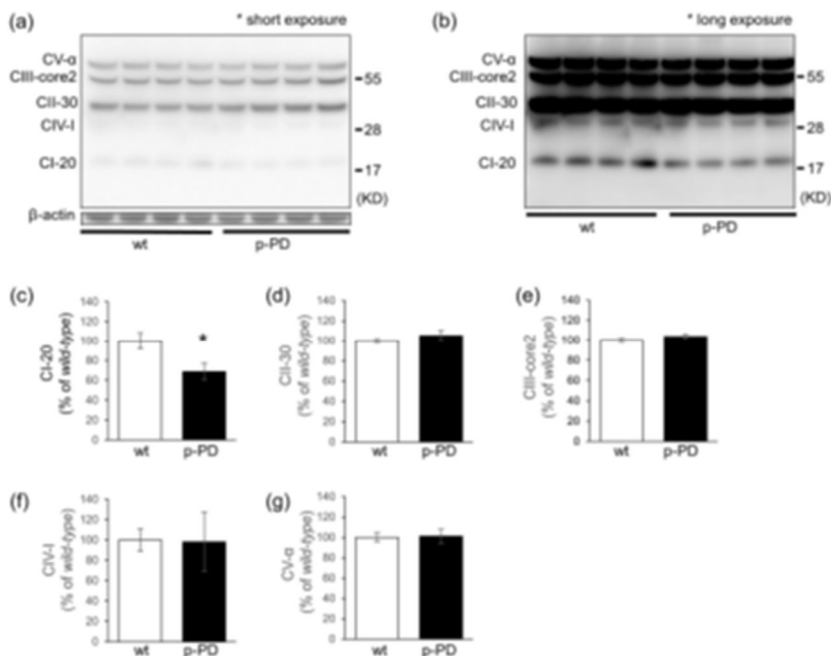


図 3 . p-PD マウスにおけるミトコンドリア複合体 のタンパク量が減少していました

酸化的リン酸化 (OXPHOS) カクテルを用いた野生型 (wt) および p-PD マウス脳におけるミトコンドリアタンパク質の代表的ウエスタンブロット画像およびそのデンシトメトリー評価。(a) 短時間露光によるウエスタンブロット膜の代表画像。(b)長時間露光によるウエスタンブロット膜の代表画像。(c-g) 強度は、複合体 I (C), 複合体 IV (C) は長時間露光、複合体 II (C), 複合体 III (C), 複合体 V (C) は短時間露光で測定し、 β -アクトンにより標準化しました。

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 0件）

1. 著者名 Ikuno Masashi, Yamakado Hodaka, Amano Ikuko, Hatanaka Yusuke, Uemura Norihito, Matsuzawa Shuichi, Takahashi Ryosuke	4. 巻 765
2. 論文標題 Mitochondrial dysfunction in a mouse model of prodromal Parkinson's disease: A metabolomic analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136267 ~ 136267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2021.136267	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 -

〔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 Masashi Ikuno
2. 発表標題 Mitochondrial dysfunction in mice model for prodromal Parkinson's disease: a metabolomic analysis
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 生野真嗣
2. 発表標題 パーキンソン病モデルマウスの血漿を用いたメタボローム解析
3. 学会等名 第14回MDSJ
4. 発表年 2021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
---------	---------