

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16505

研究課題名（和文）MAO-B発現欠損による シヌクレイン神経毒性と細胞間伝播緩和効果の解析

研究課題名（英文）Effects of MAO-B deficiency on neurotoxicity and cell-to-cell propagation of alpha-synuclein.

研究代表者

太田 真 (Ota, Shin)

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：70816751

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）：モノアミンオキシダーゼ-B (MAO-B) 欠損がパーキンソン病におけるドパミン神経細胞の脱落を緩和・抑制するのかを調べるため、MAO-Bの発現欠損による シヌクレイン神経毒性への効果および MAO-B阻害による シヌクレインの細胞内クリアランスに対する効果を解析した。その結果、MAO-Bノックアウトマウスの線条体では シヌクレインの不溶性化が促されていた。マウス大脳皮質初代神経細胞においてMAO-B阻害は、シヌクレインの細胞外分泌を促進させていた。MAO-B発現欠損と活性阻害は、シヌクレインの代謝に影響を及ぼすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MAO-B阻害薬は、神経保護効果を有する可能性が長い間議論されている。MAO-B阻害薬の投与は、ラットにおいて過剰発現した シヌクレインの凝集体形成を抑制することが知られている。MAO-Bノックアウトマウス脳ではシヌクレインの不溶性化が促され、一方でMAO-B阻害は シヌクレインの細胞内からのクリアランスを促進する可能性が示唆された。本研究結果は、MAO-Bの発現欠損と活性阻害では、シヌクレインに与える効果が異なる可能性を示唆した。MAO-B阻害と発現欠損の効果は、MAO-Bを標的とした神経保護効果を明らかにする上で検討すべき課題と考えられた。

研究成果の概要（英文）：To investigate whether monoamine oxidase-B (MAO-B) deficiency mitigates damage of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, we assessed the effects of MAO-B deficiency on α -synuclein-induced neurotoxicity and its cellular clearance. The results demonstrated that the levels of 1% Triton X-100-insoluble α -synuclein were increased in the striatum of MAO-B knockout mice as compared to that of wild-type littermates. Additionally, blockade of MAO-B activity by MAO-B inhibitors promotes extracellular secretion of α -synuclein in mouse primary cortical neurons. These findings showed that deficiency of MAO-B expression and inhibition of MAO-B activity affected the metabolism of α -synuclein.

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 モノアミンオキシダーゼ-B 細胞内クリアランス シヌクレイン

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病治療において、神経細胞変性を緩和させる神経保護効果を持つ薬剤の登場が切望されている。選択的モノアミンオキシダーゼ B (MAO-B) 阻害薬は約 20 年前からパーキンソン病の治療に用いられている。MAO-B 阻害薬はドパミン分解に関与する MAO-B 酵素の活性を不可逆的に阻害し、脳内ドパミン濃度を上昇させる。その薬理効果により臨床的に、ウェアリング・オフ症状の軽減、早期における運動症状の緩和効果、レボドパ開始時期を遅延させる効果が認められている。また、MAO-B 阻害薬は、神経保護効果を有する可能性が 80 年代から議論されてきた。その主な根拠は、1) MAO-B 阻害薬セレギリンは、早期パーキンソン病患者において、L-DOPA 開始時期を有意に遅延させる、2) 臨床的に保護の効果を評価する Delayed Start 研究において、MAO-B 阻害薬ラサジリン 1mg 投与群はパーキンソン病の進行を抑制し、神経保護的に作用することである。しかし、1) についてはドパミン増加効果による運動症状改善を見ていると批判されている。2) については、用量依存的な効果が見られなかったため保護効果の確証が得られていない。ヒト脳のドパミン神経細胞数を定量的に評価するイメージング技術が確立されていない現状では、臨床研究で神経保護効果を判断することは難しい。このように MAO-B 阻害薬の神経保護効果の有無は未解決の問題である。この問題は、ドパミン増加効果による運動改善効果を除くことが困難な臨床研究だけではなく、バイアスの少ない動物モデルにおける効果と組み合わせる必要がある。しかし、*in vivo* レベルの基礎実験において、MAO-B 阻害薬が黒質ドパミン神経細胞の脱落に対して神経保護的に働く証拠は明らかでない。また、MAO-B 阻害薬を投与した動物モデルでは、ヒトと動物モデル間での MAO-B 阻害薬の薬理代謝の違いなどから、動物モデルで使用された薬物投与量が、どの程度ヒトで使用される量を反映するのか判然としない。MAO-B 阻害薬の可能性を評価するために、MAO-B KO マウスを用いて、パーキンソン病の病態に深く関与していると考えられる シヌクレインの神経毒性に対する緩和効果を明らかにすることが重要と考えられる。また、MAO-B は シヌクレインと結合してその酵素活性を上昇させ、さらに シヌクレインの C 末端切断を誘導する酵素を活性化させて神経毒性を発揮することが報告されている。この研究結果は、MAO-B と シヌクレインが相互作用し、MAO-B 阻害が シヌクレインの神経毒性を緩和させることを示唆している。このように MAO-B は、これまで知られていない作用で神経保護効果を示す可能性がある。

2. 研究の目的

MAO-B 欠損がパーキンソン病におけるドパミン神経細胞の脱落を緩和・抑制する可能性が提示されているが、未だ明らかになっていない。MAO-B 阻害薬の作用は、実験的に様々なものが示されている。これまで、1) フリーラジカルの産生抑制と消去、2) BCL-2 と BCL-X の活性化、BAD と BAX の発現抑制を介する抗アポトーシス作用、3) ミトコンドリア外膜分子群を介するミトコンドリア膜電位・透過性の安定化、4) 活性酸素種 (ROS) に反応して生じる GAPDH の核移行抑制による抗アポトーシス作用が知られている。動物実験では、MPTP や 6-OHDA といった神経毒に対する保護効果が示されている。しかし、パーキンソン病におけるドパミン神経細胞の変性に対して、MAO-B 阻害薬がどのような作用を発揮するのか明らかではない。本研究は、MAO-B の発現欠損による シヌクレイン神経毒性の緩和効果を明らかにすることを目的とした。MAO-B 阻害薬による神経保護効果に実験的裏付けを与えるだけではなく、酵素活性阻害を上回る MAO-B 欠損の効果を明らかにすることによって、MAO-B 発現を標的としたパーキンソン病治療法のポテンシ

ヤルを開拓する。また、本研究は培養細胞を用いてこれまで知られていない MAO-B 阻害の シヌクレイン神経毒性に対する新しい作用(シヌクレインの細胞内クリアランスに対する作用)を探索する。これらの研究から、MAO-B を標的とした新しいパーキンソン病治療法の可能性を拡げてることを目指す。

3 . 研究の方法

MAO-B ノックアウトマウス (B6;129S-Maobtm1Shih/J) は、 Jackson Laboratory から購入し、繁殖させて実験に使用した。使用にあたり、遺伝子組換え実験および動物実験を本学の該当する委員会に答申し実験の許可を得た。生後 2 か月のマウス脳を採取し、氷冷下で大脳、線条体を回収した。脳組織は、 1 %Triton X-100 含有トリス緩衝液中でポッター型ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。6,000g で 5 分間遠心した後、上清を 100,000g で 30 分間遠心した。得られた上清は 1 %Triton X-100 可溶性画分として使用した。沈査は 1 %Triton X-100 含有トリス緩衝液で懸濁後、再度 100,000g で 30 分間遠心した。得られた沈査は、2% SDS と 8M 尿素を含有する溶液中で超音波処理し溶解した。12,000g で 30 分間遠心し、上清を回収した。この上清を 1 %Triton X-100 不溶性画分として使用した。サンプルはタンパク質濃度を測定後、2-mercaptoethanol 含有サンプルバッファーで熱処理し、アクリルアミドゲルで電気泳動した。その後、ウエスタンブロットングで解析した。ローディング量の指標として、可溶性画分は坑 GAPDH 抗体でプロットした。

マウス大脳皮質初代神経細胞は、妊娠 17 日目の ICR マウスから胎児を取り出して、大脳皮質を回収した。分散処理を行い 6 ウエルプレートに 1.5×10^6 個播種した。B27 サプリメント添加 Neurobasal 培地を用いて無血清の状態 で培養した。約 5 日ごとに半量ずつ培地を交換し、14 日目ごろ実験に使用した。MAO-B 阻害薬処理する際は、B27 サプリメントを含まない neurobasal 培養液に置換した。薬物処理後の培養液は、トリクロロ酢酸で沈殿処理を行った。沈殿は Laemmli サンプルバッファーで溶解した。細胞塊は、1% Triton X-100 含有緩衝液中で超音波処理後、氷中に 30 分間静置した。12,000g で 30 分間遠心して上清を回収した。サンプルは、アクリルアミドゲルで電気泳動し、ウエスタンブロットングで解析した。同時に、LDH アッセイを行い細胞死の誘導状態について評価した。

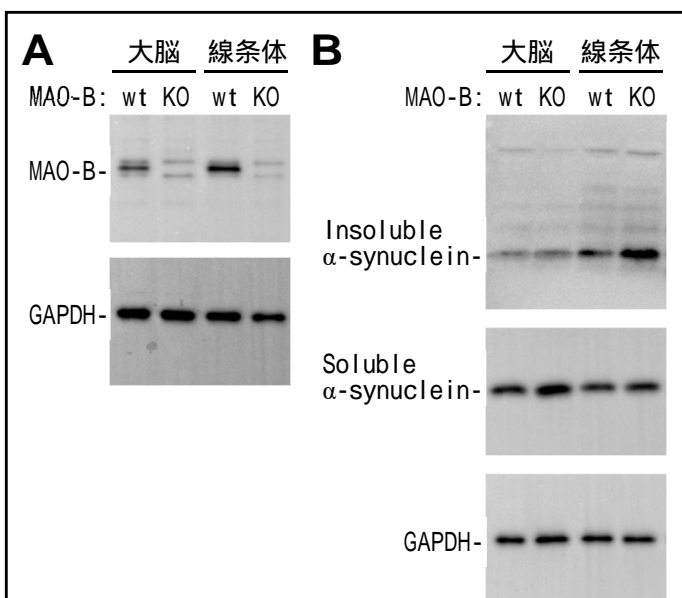


図 1 . MAO-B ノックアウトマウスにおける シヌクレインの発現と可溶性変化。2 か月齢のマウス大脳と線条体を 1% Triton X-100 含有バッファー中でホモジナイズし、超遠心して可溶性画分と不溶性画分にわけた。サンプルをウエスタンブロットで解析した。(A) MAO-B の発現。野生型 (wt) と比し、ノックアウトマウス (KO) では MAO-B の発現がみられない。(B) シヌクレインの発現と不溶性化。MAO-B KO の線条体では、wt に比し不溶性 シヌクレインが増加していた。可溶性 シヌクレインは、MAO-B KO の大脳で増加傾向を示していた。

4 . 研究成果

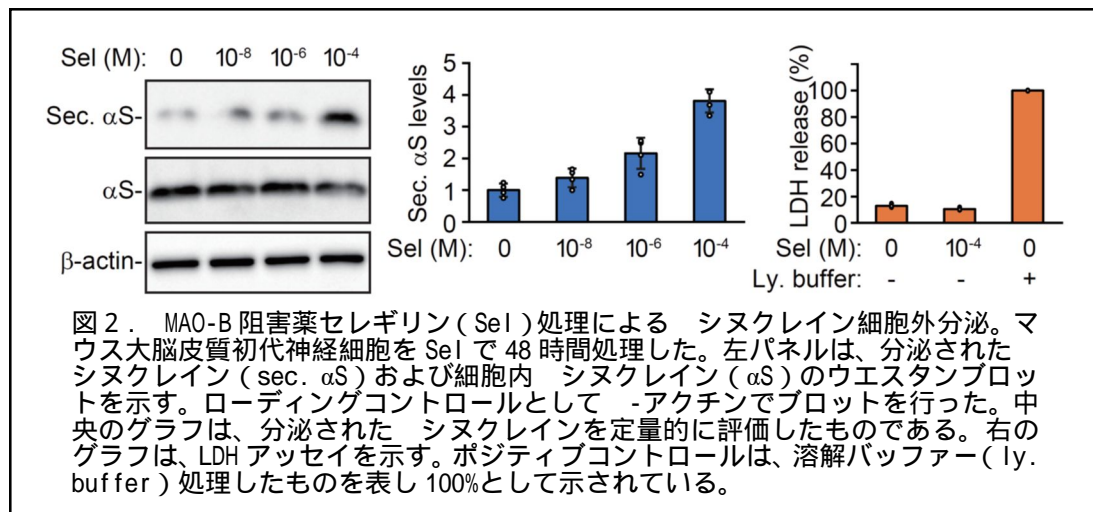
1) MAO-B ノックアウトマウスにおける シヌクレインの可溶性変化の検討 (図 1) 。

MAO-B の発現欠損により シヌクレインの発現および可溶性が変化しないか明らかにするため、2 か月

齢のマウス脳を用いて解析した。MAO-B の発現は、MAO-B ノックアウトマウスで見られないことを確認した。野生型の同腹仔と比較して、MAO-B ノックアウトマウスの線条体で 1 %Triton X-100 不溶性の シヌクレインが増加していた。大脳皮質ではより軽度ながら増加が観察された。1 %Triton X-100 可溶性の正常 シヌクレインは、野生型と比べて MAO-B ノックアウトマウスの大脳皮質で軽度増加していた。これらの所見は、マウス脳において MAO-B の発現を欠損させると、シヌクレインの不溶性化が生じることを示していた。

2) MAO-B 阻害が シヌクレインの細胞内クリアランスに及ぼす影響の検討 (図 2)

SH-SY5Y 細胞を用いた実験から、1)セレギリン、ラサギリンといった MAO-B 阻害薬の処理は、シヌクレインの細胞内発現を変えずに、シヌクレインの細胞外分泌を亢進させること、2)ラサギリンの S 型異性体による処理はシヌクレイン細胞外分泌の亢進を抑制することを認めていた。この所見について、マウス大脳皮質初代神経細胞で検討した。その結果、MAO-B 阻害薬セレギリンによる処理はシヌクレインの細胞外分泌を亢進させることを認めた。MAO-B 阻害は、神経細胞において細胞内の発現をほぼ一定にした状態で細胞外にシヌクレインを分泌させることが示された。また、MAO-B 阻害薬セレギリンによるシヌクレインの細胞外分泌の亢進は、細胞内カルシウムをキレートする BAPTA-AM の投与によって抑制された。この所見は、MAO-B 阻害によるシヌクレインの細胞外分泌は、細胞内カルシウム濃度の上昇を介して生じる可能性を示唆していた。



本研究の結果は、初代神経細胞において MAO-B 阻害は、細胞内におけるシヌクレインの発現に影響しない程度にシヌクレインを細胞外に分泌させることを示していた。細胞外分泌の亢進は、シヌクレインの細胞内からのクリアランスを促進する方向に向けることが示唆されるが、MAO-B ノックアウトマウス脳ではシヌクレインの不溶性化が促されていた。MAO-B 阻害薬の投与は、ラットにおいて過剰発現したシヌクレインの凝集体形成を抑制することが知られている。MAO-B の活性阻害と発現欠損では、生じる効果が異なることが示唆された。MAO-B はミトコンドリア外膜に分布する。MAO-B 分子が欠損するとミトコンドリアにストレスを与えるといった可能性が推測された。MAO-B 活性阻害と発現欠損の効果の違いは、MAO-B を標的とした治療の効果を明らかにする上で、検討すべき課題と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------