

令和 5 年 6 月 11 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：20K16506

研究課題名（和文）分泌小胞を介した神経伝達物質放出と シヌクレイン細胞外分泌の機能的関連の解明

研究課題名（英文）Analysis of a functional link between secretory vesicle-mediated neurotransmission and alpha-synuclein extracellular secretion

研究代表者

重清 太郎 (Shigekiyo, Taro)

大阪医科薬科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：00849622

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）：パーキンソン病の病態に關与する シヌクレインの細胞間伝播を解明するため、シヌクレインの細胞外分泌機序を検討した。マウス大脳皮質初代神経細胞およびSH-SY5Y細胞を用いて細胞生物学的に解析した。その結果、シヌクレインの細胞外分泌は小胞体・ゴルジ体を経る古典的な分泌経路を介するのではなく、非古典的な経路を介することが示唆された。神経細胞において神経活動の上昇がシヌクレインの細胞外分泌を刺激し、この反応は細胞内カルシウム濃度の上昇およびRab8aの機能を介して行われることが示された。

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間伝播はパーキンソン病の発症と進行に深く關与している。本研究では、神経活動性の上昇が細胞内カルシウム濃度の上昇およびRab8aを介してシヌクレインの細胞外分泌を促進させることを見出した。この所見は、シヌクレインの細胞外分泌の観点から細胞間伝播機序を明らかにするものである。シヌクレインの細胞外分泌を調節することによって、パーキンソン病の神経変性を抑える方法の開発に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cell-to-cell propagation of α -synuclein is thought to develop neurodegeneration of Parkinson's disease. We investigated a mechanism that regulates α -synuclein secretion. We first tested whether secretory vesicle-mediated neurotransmission linked to α -synuclein secretion in mouse primary cortical neurons. α -Synuclein was secreted in a manner insensitive to ER/Golgi transport inhibitor brefeldin A suggesting that α -synuclein secretion was mediated via a non-classical secretory route, but not classical ER/Golgi secretory one. Additionally, treatment with glutamate and calcium ionophore A23187 facilitated α -synuclein secretion. These increases were blocked by calcium chelator BAPTA-AM. Glutamate-induced α -synuclein secretion was blocked by knockdown of Rab8a required for secretory vesicle fusion with plasma membrane in SH-SY5Y cells. These findings show that increasing neuronal activity promotes α -synuclein secretion via elevation of intracellular calcium concentration and Rab8a.

研究分野：神経内科

キーワード：神経変性疾患 病態生化学 細胞生物学 パーキンソン病 細胞外分泌 シヌクレイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病の神経変性は、シヌクレインがプリオン様に細胞間を伝播することによって拡がると考えられている。この伝播過程は、細胞内で異常凝集したシヌクレインの細胞外分泌、細胞内への凝集物の取り込み、取り込まれた凝集物が正常なシヌクレイン分子を凝集化、凝集物が神経毒性を發揮し神経変性を惹起させるといったステップから成り立っている。細胞外分泌から異常凝集体への構造変化過程のいずれかのステップを制御することができれば、シヌクレインのプリオン様伝播を止めることができる。その一つとして、細胞外シヌクレインを捕捉する抗体療法の開発が進行している。シヌクレインのトランスジェニックマウスおよびシヌクレイン凝集物を脳内に接種したマウスモデルにおいて、抗シヌクレイン抗体が細胞外シヌクレインを捕捉することによって、シヌクレインの細胞間伝播を抑制して神経症状を緩和することが示されている。現在、抗シヌクレイン抗体のヒトにおける臨床研究治験が開始され、有望な治療法として期待されている。しかし、抗体療法は、抗体は脳血管関門をほんのわずかしかなら通過しない、神経毒性を担う可溶性オリゴマーを特異的に認識する抗体ではないため効果的に神経毒性を抑制するか不明、アルツハイマー病の抗アミロイド抗体は抗体反応の副作用として脳浮腫様の変化が生じる、抗体医薬品は高額であり費用対効果が悪いといった問題点がある。シヌクレインの細胞外分泌の調節機構が明らかになれば、化合物によるシヌクレインの分泌制御という新たな選択肢が得られる可能性がある。シヌクレインの細胞外分泌については、ゴルジ体を介したエキソサイトーシス(古典的経路)、ゴルジ体を介さないエキソサイトーシス(非古典的経路)、エキソソームによる分泌によって行われることが考えられている。しかし、シヌクレインの細胞外分泌がどのような調節機構で制御されているかほとんど不明である。

2. 研究の目的

本研究を開始する当初の疑問は、「分泌小胞を介したドパミン放出とシヌクレインの細胞外分泌の間に機能的関連があるのか」ということであった。この疑問を立てた根拠は、①私たち研究グループは、細胞実験においてドパミン代謝に関わる選択的 MAO-B 阻害薬セレギリンにシヌクレインの細胞外分泌を亢進させる作用があることを見出した、MAO-B の阻害は細胞内ドパミン含量を増加させて分泌小胞を介したドパミン放出を亢進させることが報告されている、

シヌクレインは SNARE 複合体の一員として分泌小胞の細胞膜融合に関与していることが知られている3点である。これらの所見より、細胞内ドパミン濃度の上昇に伴うドパミン放出の亢進が、シヌクレインの細胞外分泌と機能的に関連している可能性を想定した。本研究は、シヌクレインの細胞外分泌の調節機構を解明することを目的とし、「神経伝達物質の分泌小胞を介した放出とシヌクレインの細胞外分泌との機能的関連」という疑問を検証した。

3. 研究の方法

本研究では、薬物処理実験はマウス大脳皮質初代神経細胞を用いて行った。siRNA によるノックダウンは、シヌクレインを安定発現した SH-SY5Y 細胞株を使用した。初代培養は、妊娠 17 日の ICR マウスから胎児を取り出し、実体顕微鏡下で大脳皮質を採取した。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) 中で行った。4-5 日ごとに半量ずつ培地を交換し、10-14 日目に実験に使用した。SH-SY5Y 細胞は MEM/F-12 培養液で培養した。シヌクレインの細胞外分泌を評価する実験

では、初代神経細胞は B27 サプリメント不含有 neurobasal 培養液に培養液を置換し、SH-SY5Y 細胞は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た。得られた培養液は、回収後トリクロロ酢酸沈殿を行い濃縮処理を施した。沈殿は Laemmli サンプルバッファーで溶解した。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。標的タンパク質の発現解析は、2-mercaptoethanol 含有サンプルバッファーで熱処理後、アクリルアミドゲルで電気泳動し、ウェ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、細胞抽出液は アクチンでプロットした。培養細胞の死滅に伴う影響の評価には、LDH アッセイを行った。MAO-B 阻害薬と brefeldin-A は 6 時間共処理した。グルタミン酸刺激は、30 分間処理した。カルシウムイオノフォア A23187 は、100nM の濃度で 6 時間処理した。siRNA は RNAiMAX 試薬を使用して行った。

4. 研究成果

1) シヌクレインの細胞外分泌における小胞体・ゴルジ体を介した古典的細胞外分泌の関係。

はじめに、分泌小胞を介したドパミン放出と シヌクレインの細胞外分泌の間に機能的関連があるのか検討するため、小胞体・ゴルジ経路の輸送を阻害する brefeldin A で SH-SY5Y 細胞を処理した。MAO-B 阻

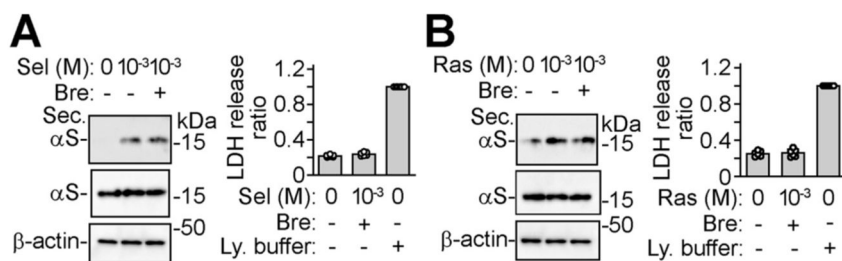


図 1. MAO-B 阻害薬によって惹起される シヌクレインの細胞外分泌における小胞体・ゴルジ体分泌経路の関与。SH-SY5Y 細胞を MAO-B 阻害薬 selegiline (A) および rasagiline (B) で処理し、小胞体・ゴルジ体輸送を阻害する brefeldin A で共処理した。MAO-B 阻害薬によって惹起される シヌクレインの細胞外分泌は、brefeldin A の投与に影響されていなかった。細胞内の シヌクレイン発現レベルおよび細胞死をモニターする LDH の細胞外放出に変化は見られなかった。

害薬 (selegiline および rasagiline) 処理によって促進される シヌクレインの細胞外分泌は、brefeldin A の投与によって、変化を受けなかった (図 1)。細胞内の シヌクレインの発現および細胞外への LDH 放出に有意な変化を生じていなかった。この結果は、シヌクレインの細胞外分泌は、小胞体・ゴルジ体を介した古典的細胞外分泌と関連がなく、非古典的な経路を介して行われることが示唆した。

2) 神経細胞における シヌクレインの細胞外分泌刺激の検討。

シヌクレインの細胞外分泌を制御するメカニズムを探索するため、神経細胞において シヌクレインの細胞外分泌を刺激する因子を検討した。マウス大脳皮質初代神経細胞にグルタミン酸を添加したところ、シヌクレインの細胞外分泌が促進した (図 2 A)。グルタミン酸によって誘導される シヌクレインの細胞外分泌は、NMDA 受容体阻害薬である AP5 と AMPA 受容体阻害薬である NBQX の混合物によって抑制された (図 2 B)。また、グルタミン酸を添加しない状態で観察される シヌクレインの基礎的な細胞外分泌は、AP5 と NBQX の混合物によって抑制されていた。これらの処置によって、細胞内の シヌクレインの発現および細胞外への LDH 放出に有意な変化を生じなかった。これらの所見は、神経活動性の上昇は シヌクレインの細胞外分泌を促進させることを示していた。シヌクレインの基礎的な細胞外分泌およびグルタミン酸によって誘導される細胞外分泌に、グルタミン酸受容体刺激が関与していることが示された。

3) 神経活動性の上昇で誘発されるシヌクレインの細胞外分泌を調節する因子の解析。

神経活動性の上昇は細胞内カルシウム濃度の上昇を伴うことから、細胞内カルシウム濃度とシヌクレインの細胞外分泌との関連を検討した。マウス大脳皮質初代神経細胞をカルシウムイオノフォア A23187で処理したところ、シヌクレインの細胞外分泌が増加した。

この反応は、膜透過性のカルシウムキレート薬であるBAPTA-AMを併用することによって阻害された。また、グルタミン酸によって誘発されるシヌクレインの細胞外分泌も、BAPTA-AMを加えることによって阻害された。これらの処

置によって、細胞内のシヌクレインの発現および細胞外へのLDH放出に有意な変化を生じなかった。これらの所見は、神経活動性の上昇によって生じ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引き起こされていることを示していた。

4) シヌクレインの細胞外分泌に関与する分子の探索。

次に、シヌクレインの細胞外分泌機構を調べるために分泌に関与する分子の働きを検討した。Rasスーパーファミリーに属する低分子量GTP結合タンパク質であるRab8aは、分泌小胞と細胞膜の融合にかかわる分子である。SH-SY5Y細胞において、Rab8aの発現をsiRNAでノックダウンすると、コントロールsiRNAで処理された細胞と比べ、グルタミン酸刺激によって誘発されるシヌクレインの細胞外分泌が有意に抑制されていた。siRNA処理によって、細胞内のシヌクレインの発現および細胞外へのLDH放出に有意な変化を生じなかった。この所見より、シヌクレインの細胞外分泌は、Rab8aを介する膜構造物と細胞膜の融合によって分泌されることが示された。

以上より、シヌクレインの細胞外分泌は、小胞体・ゴルジ体を経る古典的な分泌経路を介するのではなく、非古典的な経路を介することが示唆された。神経細胞において、神経活動の上昇がシヌクレインの細胞外分泌を刺激し、この反応は細胞内カルシウム濃度の上昇およびRab8aの機能を介して行われることが示された。パーキンソン病の発症と進行には、シヌクレイン凝集体の形成と伝播が関与している。シヌクレインの細胞間伝播を抑制するためには、1) 細胞間隙にあるシヌクレイン凝集シードを減少させる、2) 神経細胞から分泌されるシヌクレイン凝集シードを減少させる、3) 神経細胞から分泌されるシヌクレイン凝集シードを増加させて細胞外代謝系での排出・分解を促す、といった方法が考えられる。本研究は、生理的なシヌクレインの細胞外分泌を司る機構について検討した。この知見を基に、シヌクレイン凝集体の細胞外分泌メカニズムを解明していくことが期待される。シヌクレインの細胞間伝播を標的としたパーキンソン病治療法の開発において、シヌクレイン細胞外分泌機構の調節という新しい視点を提供するものとする。本研究結果の一部は、Journal of

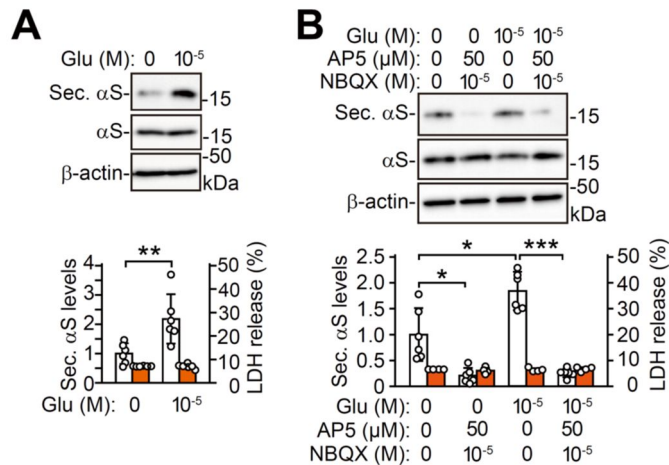


図2. グルタミン酸刺激によって惹起されるシヌクレインの細胞外分泌。(A)マウス大脳皮質初代神経細胞にグルタミン酸 (Glu) を投与するとシヌクレインの細胞外分泌が亢進した。(B)グルタミン酸刺激によって惹起されるシヌクレインの細胞外分泌は、NMDA 受容体阻害薬 AP5 および AMPA 受容体阻害薬 NBQX の投与によって阻害された。細胞内のシヌクレイン発現レベルおよび細胞死をモニターする LDH の細胞外放出 (グラフのオレンジ色カラムで示す) に変化は見られなかった。

Neuroscience (Nakamura Y, Arawaka S, Sato H, Sasaki A, Shigekiyo T, et al. Journal of Neuroscience 41 (35); 2021, 7479-7491) で論文発表した。

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 Y, Arawaka S, Sato H, Sasaki A, Shigekiyo T, Tsunekawa H, Takahata K, Kato T.	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 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
---------	---------