

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790314

研究課題名（和文） iPLA2beta 欠損マウスを用いた

神経軸索ジストロフィー発症メカニズムの解析

研究課題名（英文） Study of the pathomechanism of neuroaxonal dystrophy

using iPLA2beta-deficient mouse

研究代表者

新沢 康英 (KOEI SHINZAWA)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70403186

研究成果の概要（和文）：

ヒト神経軸索ジストロフィー疾患モデルマウスである iPLA2beta 欠損マウスを使用し、その発症メカニズムを病理学的、生化学的、そして遺伝学的な解析により明らかにしようとした。その結果、神経軸索ジストロフィー発症にミトコンドリア変性が関与していることを見出し、その変性をコントロールすることにより、病態の発症を遅延できること明らかにした。上記の知見により、ヒト神経軸索ジストロフィーの治療法確立に向け、新しい治療ストラテジーを提案できた。

研究成果の概要（英文）：

Using iPLA2 beta-deficient mouse for an animal model of human neuroaxonal dystrophy, the pathomechanism was studied by pathological, biochemical and genetical analysis. It was found that the mitochondrial degeneration is implicated in the pathogenesis of neuroaxonal dystrophy and its control can delay of disease development. Based on these results, we could propose new strategy for the establishment of human neuroaxonal dystrophy therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：神経軸索ジストロフィー、スフェロイド、疾患モデルマウス、ミトコンドリア、ホスホリパーゼ A2

1. 研究開始当初の背景

iPLA2beta はグリセロリン脂質の 2 位のアシル鎖を加水分解し、遊離脂肪酸とリゾリン脂質を産生する PLA2 (ホスホリパーゼ A2) であり、複数存在する PLA2 サブファミリーの中でカルシウム非依存性 PLA2 に分類される酵素である。iPLA2beta の生理的役割は長らく不明であったが、ヒト遺伝性疾患である乳児型神経軸索ジストロフィー (INAD) や鉄代謝異常神経疾患 (NBIA, Hellervorden-Spatz 病) の原因遺伝子として同定され、神経組織での生理機能が明らかとなった。ヒト INAD は歩行困難や精神運動発達遅延など多様な臨床像を示す神経変性疾患であり、主要な病理変化として、脳幹部、脊髄、小脳、基底核、大脳皮質にみられる軸索腫大、空胞形成が特徴として知られていた。我々は、iPLA2beta がヒト INAD の原因遺伝子として同定された時期と並行して、iPLA2beta の生理的役割を明らかにする目的で iPLA2beta 遺伝子欠損マウスを作成し、このマウスが、ヒト INAD で認められる病理学的特徴 (神経軸索腫大によるスフェロイド出現や空胞形成) や臨床症状 (運動機能の低下、歩行障害、テイルサスペンションテストによる後肢クラumping) をよく再現し、ヒト神経軸索ジストロフィーの疾患モデルマウスとして非常に有用であることを明らかにした。さらに、近年、家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つとして新たに iPLA2beta (PARK14) 遺伝子が同定され、実際に iPLA2beta 変異を有するパーキンソン病の患者では、 α -シヌクレインの蓄積 (レビー小体) が認められ、iPLA2beta 遺伝子変異は、神経軸索ジストロフィーだけではなく、多様な神経変性疾患スペクトルを形成していることが明らかにな

っている。しかしながら、iPLA2beta 遺伝子の機能欠失がどのような分子メカニズムで病態発症に至るのかは不明であり、そのメカニズムを解明するために我々が作成した疾患モデルマウスを使用した本研究課題を計画した。

2. 研究の目的

本研究の目的は iPLA2beta 遺伝子の機能欠失により、どのような分子メカニズムで神経軸索ジストロフィーの発症に至るのかを iPLA2beta 欠損マウスを使用し、解明することである。特に、本研究課題では iPLA2beta 欠損マウスのミトコンドリア形態や機能に着目し、病理学的、生化学的及び遺伝学的な解析を行う。さらに、ミトコンドリア膜透過性遷移現象 (mPT) を制御することにより、神経軸索ジストロフィーの新規治療法を探る。これらの成果により、神経軸索ジストロフィーの治療法確立に向け、新しい展望が開かれることが期待される。

3. 研究の方法

神経軸索ジストロフィーの発症メカニズムにおけるミトコンドリアの役割を明らかにするため、疾患モデルマウスである iPLA2beta 欠損マウスを使用し、(1) 病理学的、(2) 生化学的、(2) 遺伝学的手法を用いた実験を計画した。

(1) ミトコンドリア形態の解析

iPLA2beta 欠損マウスは神経軸索ジストロフィーの臨床症状が出現するまで生後約 1 年を要する。初期病変はすでに 15 週齢マウスで認められることが判明しており、ミトコンドリアの形態異常について、電子顕微鏡観

察や光顕レベルでの観察を行った。

(2) 単離ミトコンドリア機能解析

iPLA2beta 欠損マウス肝臓よりミトコンドリアを単離し、カルシウム負荷後の mPT 誘導活性ならびに、mPT の阻害剤の効果について検討した。

(3) CypD 欠損マウスとの交配によるダブルノックアウトマウスの作成

mPT を誘導できない CypD 欠損マウスと iPLA2beta 欠損マウスを交配し、ダブルノックアウトマウスを作成し、神経軸索ジストロフィーの発症メカニズムにおける mPT の関与について検討した。

4. 研究成果

(1) iPLA2beta 欠損マウスは臨床症状の出ない早期 (15 週齢) に神経軸索ジストロフィーの病理学的特徴であるスフェロイドと呼ばれる神経軸索腫大を認め、スフェロイドは変性ミトコンドリアを含むことを明らかにし、神経軸索ジストロフィーの初期病変がミトコンドリアであることを突き止めた。さらに、質量顕微鏡を使用した解析により、iPLA2beta 欠損マウスでは脂質組成が変化しており、特に脊髄後角で DHA (ドコサヘキサエン酸) を含むホスファチジルコリンの蓄積が認められ、脂質リモデリングにおける iPLA2beta の役割を明らかにした。

(2) iPLA2beta 欠損マウス肝臓より単離したミトコンドリアは、野生型マウスより単離したミトコンドリアに比べ、カルシウム負荷に対する脆弱性 (膜電位低下、膜透過性遷移現象の亢進) が観察され、iPLA2beta がミトコンドリアの機能維持に重要であることを示した。一方で、欠損マウスより単離した胎児線維芽の、各種ストレス種に対する抵抗性を検討したが、野生型に比べ差は見られな

った。

(3) ミトコンドリア膜透過性遷移現象を誘導できない CypD 欠損マウスと iPLA2beta 欠損マウスを交配し、ダブル欠損マウスを得た。ダブル欠損マウスでハンギングワイヤーグリップテストを行い、神経軸索ジストロフィーの発症が遅延することを明らかにした。さらに、ミトコンドリア特異的に赤色蛍光タンパク質を発現する TgmtDsRed マウスと交配し、iPLA2beta 欠損マウスのミトコンドリア形態をリアルタイムで観察できるマウスを樹立した。

以上、神経軸索ジストロフィーの疾患モデルマウスを使用し、その発症メカニズムにミトコンドリアが関与することを明らかにした。さらに、今後、ミトコンドリア膜透過性遷移現象を制御し、治療への応用を目指すための研究基盤が確立できた。また、iPLA2beta 欠損マウスで認められる神経異常 (ミトコンドリア変性、リン脂質代謝異常、スフェロイド形成) は、アルツハイマー病やパーキンソン病にも関与しており、本研究成果は、多様な神経変性スペクトルを解明する上での糸口になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

①Beck G, Sugiura Y, Shinzawa K, Kato S, Setou M, Tsujimoto Y, Sakoda S, Sumi-Akamaru H., Neuroaxonal dystrophy in calcium-independent phospholipase A2 β deficiency results from insufficient remodeling and degeneration of mitochondrial and presynaptic membranes.

J Neurosci. 31; 11411-20, 2011, 査読有

②Ueno N, Taketomi Y, Yamamoto K,
Hirabayashi T, Kamei D, Kita Y, Shimizu T,
Shinzawa K, Tsujimoto Y, Ikeda K, Taguchi
R, Murakami M.

Analysis of two major intracellular
phospholipases A(2) (PLA(2)) in mast cells
reveals crucial contribution of cytosolic
PLA(2) α , not Ca(2+)-independent PLA(2) β ,
to lipid mobilization in proximal mast cells
and distal fibroblasts. J Biol Chem 286:
37249-63, 2011, 査読有

[学会発表] (計1件)

①新沢康英

「iPLA2beta 欠損マウスは神経軸索ジストロフィー
を発症する」

第19回 日本 Cell Death 学会学術集会

2010年7月31日 名古屋

[その他]

ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gene/www/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新沢 康英 (KOEI SHINZAWA)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70403186

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：