

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17344

研究課題名（和文）遺伝的素因を考慮した低濃度化学物質のパーキンソン病誘発リスク評価系構築

研究課題名（英文）Establishment of a system to evaluate the Parkinson's disease-inducing potential of chemicals considering genetic predisposition

研究代表者

宮良 政嗣（MIYARA, Masatsugu）

広島大学・医系科学研究科（薬）・助教

研究者番号：60816346

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト中脳由来細胞株LUHMES細胞を分化誘導することでドパミン神経細胞様の表現型を示すことを確認し、本細胞におけるミトコンドリア神経毒MPP+の曝露条件を検討した。また、軽度ミトコンドリア障害に対する感受性を制御するグルコース利用関連遺伝子特定の第一段階として、ドパミン神経細胞において特徴的な発現パターンを示す遺伝子を抽出した。しかし、LUHMES細胞の培養に問題が生じ、評価系の構築には至らなかった。一方、当初は計画していなかったが、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いた解析から軽度ミトコンドリア障害とグルコース利用障害の両者による細胞死のメカニズムに関する知見も得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ゲノムワイド関連解析によりパーキンソン病（PD）の遺伝的素因（感受性遺伝子）が明らかになりつつあるが、PDの発症に強く寄与する決定的な環境要因（特に化学物質）ははまだ特定されていない。本研究では、遺伝的素因を考慮した低濃度化学物質のPD誘発リスク評価系構築には至らなかったが、その第一段階としてドパミン神経細胞において特徴的な発現パターンを示す遺伝子を抽出することができた。今後、抽出した遺伝子群の中からミトコンドリア神経毒に対する感受性を制御するグルコース利用関連遺伝子を特定し、上述の評価系を構築することができれば、PDの発症に関与する化学物質の特定につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we confirmed that the human mesencephalic-derived cell line LUHMES cells exhibit dopaminergic neuron-like phenotypes by inducing differentiation, and examined the conditions under which these cells were exposed to the mitochondrial neurotoxin MPP+. As a first step in identifying glucose utilization-related genes that control sensitivity to mild mitochondrial dysfunction, we extracted genes that show characteristic expression patterns in dopaminergic neurons. However, problems with the culture of LUHMES cells arose, and the evaluation system could not be established. On the other hand, although not initially planned, analysis using human neuroblastoma SH-SY5Y cells provided insight into the mechanism of cell death caused by both mild mitochondrial dysfunction and impaired glucose utilization.

研究分野：神経毒性学

キーワード：パーキンソン病 環境要因 ドパミン神経細胞 ミトコンドリア グルコース

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) は、中脳の黒質に存在するドパミン神経細胞が長期間かけて徐々に死滅する神経変性疾患であり、遺伝的素因と環境要因の相互作用により発症すると考えられている。近年、ゲノムワイド関連解析により PD の遺伝的素因 (感受性遺伝子) が明らかになりつつあるが、PD の発症に強く寄与する決定的な環境要因 (特に化学物質) はいまだ特定されていない。

1983 年に、合成麻薬の副産物である 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) がヒトにおいて PD 様症状を誘発することが報告されて以来、疫学研究を中心とした数多くの研究により PD の環境要因探索が行われてきた。しかし、化学物質の「低濃度・長期間曝露」による PD 誘発リスクを寿命が短いマウスを用いて評価するには限界があり、疫学研究により得られた知見を実験的に検証するには低濃度化学物質の PD 誘発リスクを評価できる実験系が必須であると考えられる。

MPTP の活性代謝物 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) は、ドパミン神経選択的毒性を示すことから PD モデル細胞の作製に汎用されており、これまでにミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 阻害をはじめとする様々な毒性メカニズムが報告されてきた。しかし、ほとんどの研究における MPP<sup>+</sup> 誘発 PD モデル細胞は高濃度曝露により作製されており、このようなモデルにおいて認められる急激な細胞内変化は長期間かけて徐々に進行する PD の細胞病態を再現できていない可能性が考えられた。そこで我々は、MPP<sup>+</sup> をヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に従来よりも低濃度で曝露することにより典型的な PD の細胞病態 ( $\alpha$ -シヌクレインの蓄積および緩徐性細胞死) を再現する新たな PD モデル細胞を作製し、本 PD モデル細胞がリソソーム機能低下を介してオートファゴソーム分解抑制を示すことを明らかにした (Miyara *et al.*, *J. Neurochem.*, 2016)。また、本 PD モデル細胞におけるオートファゴソーム分解抑制および細胞死は、「軽度ミトコンドリア機能障害」および「グルコース利用障害 (細胞内外グルコース枯渇)」の両条件が成立したときのみ、認められる現象であることを発見した。そこで我々は、両条件のうちどちらか一方につながる遺伝的素因を有する場合、もう一方を引き起こす化学物質は低濃度曝露でも PD の環境要因になり得るのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、少なくとも一部の PD は、図 1 の または により発症するのではないかと、という考えに基づき、遺伝的素因を考慮した低濃度化学物質の PD 誘発リスク評価系を構築することを目的とした。

	環境要因 (軽度)	遺伝的素因 (軽度)	PD
①	ミトコンドリア障害	× グルコース利用障害など	→ 発症
②	グルコース利用障害	× ミトコンドリア障害など	→ 発症

図1. 本研究の根幹をなすPD発症仮説

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト中脳由来細胞株 LUHMES 細胞の培養および分化誘導

LUHMES 細胞 (ATCC, CRL-2927) は、ポリ-L-オルニチン/フィブロネクチンコートディッシュまたはポリ-L-リジン/フィブロネクチンコートディッシュに播種し、増殖培地 (1% N-2 supplement, 40 ng/mL b-FGF 含有 DMEM/F-12) を用いて培養を行った。また、分化誘導培地 (1% N-2 supplement, 1  $\mu$ g/mL tetracycline, 1 mM cAMP, 2 ng/mL GDNF 含有 DMEM/F-12) を用いて 7 日間分化誘導を行った。

#### (2) タンパク質の抽出および発現量解析

細胞内タンパク質は、1% Nonidet P-40 含有 TNE バッファーを用いて可溶化した。タンパク質可溶化液は、SDS サンプルバッファーと混合後、熱処理を行い、SDS-PAGE によるタンパク質分離および PVDF 膜への転写を行った。PVDF 膜は、ブロッキング後、各種一次抗体および二次抗体反応を行い、Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque, 07880-70) または Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque, 02230-30) と反応させた。化学発光シグナルは、ケミルミイメージングシステム (FUSION SOLO.7S.EDGE, Vilber Lourmat) を用いて検出した。

#### (3) 細胞生存率の測定

細胞生存率は、Cell Counting Kit-8 (Dojindo, CK04) およびマイクロプレートリーダー (MultiSkan Go, Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

#### (4) ヒト iPS 細胞由来分化神経細胞の培養

FUJIFILM Cellular Dynamics 社の iCell ドパミン神経細胞 (C1028) および同一ドナー由来の iCell

グルタミン酸作動性神経細胞 (C1033) は、ポリ-L-オルニチン/ラミニンコートディッシュに播種し、同社の iCell Nervous System Supplement (M1010) および iCell Neural Supplement B (M1029) を添加した iCell Neural Base Medium 1 (M1010) を用いて 14 日間培養を行った。

(5) RNA の抽出

total-RNA は、ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega, Z6012) を用いて抽出した。

(6) RNA シークエンス解析

RNA シークエンス解析は、Novogene 社の受託解析サービスを利用して行った。

4. 研究成果

(1) 「軽度ミトコンドリア機能障害」に対する感受性を制御する遺伝子の探索

LUHMES 細胞の培養・分化条件の検討

本研究では、これまで我々が PD モデル細胞の作製に使用してきた SH-SY5Y 細胞と比較してよりドパミン神経細胞を反映することが期待される分化誘導後の LUHMES 細胞を実験に用いることにした。LUHMES 細胞をポリ-L-オルニチン/フィブロネクチンコートディッシュに播種し、増殖培地を用いて培養後、分化誘導培地を用いて分化誘導を行った。その結果、分化誘導後 5~7 日目において顕著な神経突起伸長が認められた (図 2A)。また、神経細胞マーカー  $\beta$ III-tubulin およびドパミン神経細胞マーカー tyrosine hydroxylase (TH) の顕著な発現増加も認められた (図 2B) ことから、LUHMES 細胞の培養・分化条件を決定できたと思われた。

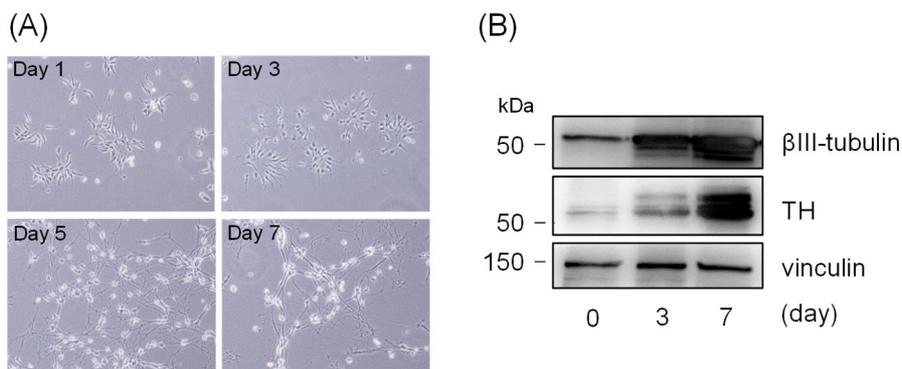


図2. 分化誘導後のLUHMES細胞の変化

LUHMES 細胞におけるミトコンドリア神経毒 MPP<sup>+</sup>曝露条件の検討

LUHMES 細胞をポリ-L-オルニチン/フィブロネクチンコート 96 ウェルプレートに播種したところ、細胞の接着が弱く凝集塊を形成するなどの問題が生じたため、様々な検討を行い、コーティング剤をポリ-L-リジン/フィブロネクチンに変更した。MPP<sup>+</sup> (1~500  $\mu$ M) を LUHMES 細胞に 72 時間曝露し、細胞生存率を測定したところ、200 および 500  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> 曝露により有意な細胞生存率の低下が認められた (図 3A)。また、顕著な細胞死を引き起こさない 10 および 100  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> を曝露した細胞において、エネルギーセンサータンパク質 AMP-activated protein kinase (AMPK) とその基質タンパク質 acetyl-CoA carboxylase (ACC) のリン酸化が認められた (図 3B) ことから、我々が以前に SH-SY5Y 細胞を用いて作製した PD モデル細胞と同様に軽度ミトコンドリア機能障害による ATP 産生量の低下が引き起こされていることが示唆された。

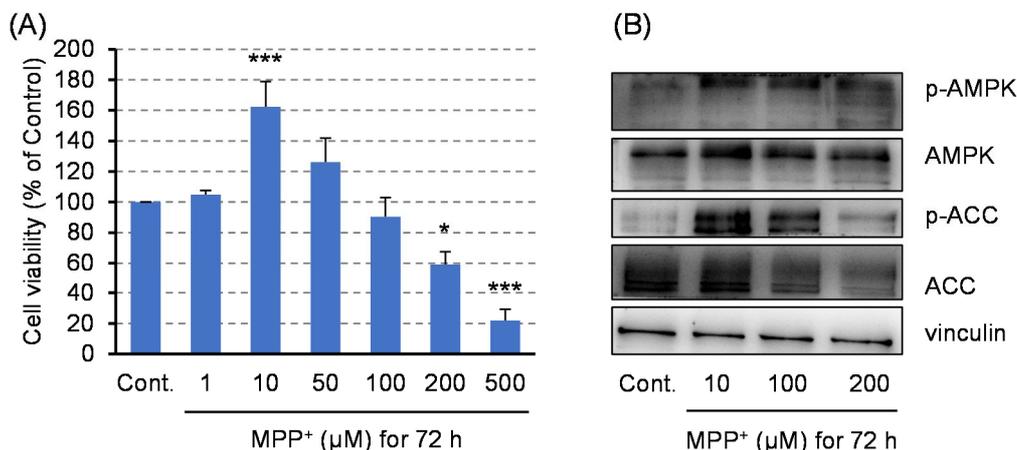


図3. MPP<sup>+</sup>が細胞生存率およびAMPKの活性に及ぼす影響

Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=3). \* $P$ <0.05 and \*\*\* $P$ <0.001 vs. Control.

### ドパミン神経細胞において特徴的な発現パターンを示す遺伝子の抽出

iCell ドパミン神経細胞および同一ドナー由来の iCell グルタミン酸作動性神経細胞を 14 日間培養後、両細胞から total RNA を抽出し、RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、グルタミン酸作動性神経細胞と比較してドパミン神経細胞において高発現する遺伝子を 1,218 種類、低発現する遺伝子を 1,225 種類確認することができた (図 4)。ドパミン神経細胞において高発現が認められた遺伝子の上位には、ドパミン神経細胞の分化や生存に重要であることが報告されている遺伝子が多く含まれていたことから、目的通りの遺伝子を抽出できたと考えられた。

研究開始当初は、抽出した遺伝子群の中から PD との関連性などを考慮して主にグルコース利用 (取り込み・代謝など) に関する遺伝子を絞り込み、さらにその中からノックダウンすることによって MPP<sup>+</sup> 誘発細胞死を著しく増強する遺伝子を特定することを計画していた。しかし、突如 LUHMES 細胞がディッシュに接着しなくなり、細胞や試薬一式を再購入・再調製するなどあらゆる可能性を検討したものの改善には至らなかった。

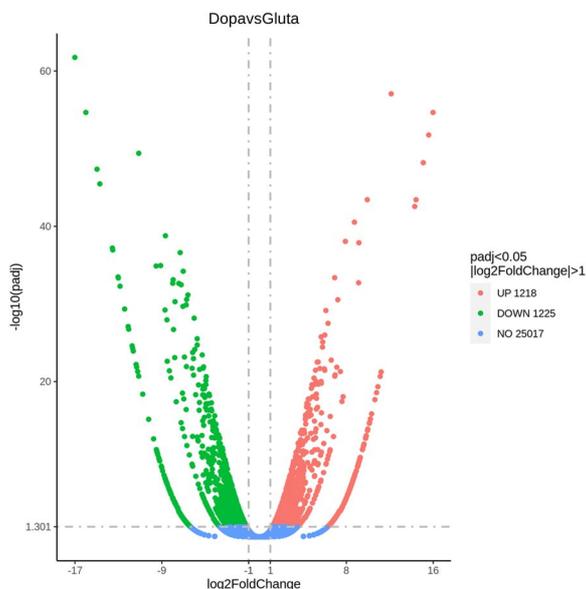


図4. ボルケーノプロット

(2) 「軽度ミトコンドリア機能障害」と「グルコース利用障害」の両者による細胞死のメカニズム解明

LUHMES 細胞の培養に問題が生じたため、当初は計画していなかったが、SH-SY5Y 細胞を用いて「軽度ミトコンドリア障害」と「グルコース利用障害」の両者による特徴的な細胞死のメカニズム解明を進めることにした。低濃度 MPP<sup>+</sup> 曝露により軽度ミトコンドリア障害を誘発し、小胞体ストレス応答関連タンパク質を中心とした数種類のタンパク質の発現量を評価したところ、細胞死が認められない早期から統合的ストレス応答に関与する eIF2 $\alpha$  のリン酸化が認められた (図 5)。

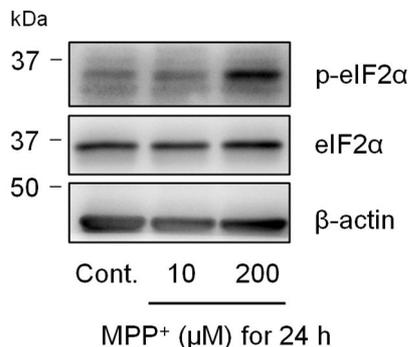


図5. 低濃度MPP<sup>+</sup>がeIF2 $\alpha$ のリン酸化に及ぼす影響

### (3) まとめ

本研究では、遺伝的素因を考慮した低濃度化学物質の PD 誘発リスク評価系構築には至らなかったが、その第一段階としてドパミン神経細胞において特徴的な発現パターンを示す遺伝子を抽出することができた。また、軽度ミトコンドリア障害による eIF2 $\alpha$  のリン酸化がグルコース利用障害に対する脆弱化に関与する可能性が示唆された。今後、LUHMES 細胞の培養条件を改善した後、軽度ミトコンドリア障害に対する感受性を制御するグルコース利用関連遺伝子を特定することで上述の評価系を構築し、PD 誘発リスクを有する化学物質の特定につなげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 楓大, 宮良 政嗣, 古武 弥一郎
2. 発表標題 パーキンソン病関連神経毒MPP+の毒性に關与するグルコース利用關連遺伝子の特定
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮良 政嗣, 古武 弥一郎
2. 発表標題 低濃度パーキンソン病關連化学物質によるグルコース代謝促進とオートファジー機能低下
3. 学会等名 フォーラム2023 衛生薬学・環境トキシコロジー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本 穂乃香, 宮良 政嗣, 桑原 由佳, 津元 裕樹, 三浦 ゆり, 古武 弥一郎
2. 発表標題 パーキンソン病關連神経毒によるp62核蓄積とp62核内機能の検討
3. 学会等名 フォーラム2023 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木 楓大, 宮良 政嗣, 古武 弥一郎
2. 発表標題 パーキンソン病關連神経毒MPP+の感受性に關与する遺伝子の探索
3. 学会等名 フォーラム2023 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢田 萌菜美, 宮良 政嗣, 岡田 奈都海, 藤原 なつみ, 橋本 穂乃香, 古武 弥一郎
2. 発表標題 慢性MPTPパーキンソン病モデルマウスの中脳黒質において発現変動を示す遺伝子の探索
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮良 政嗣, 古武 弥一郎
2. 発表標題 低濃度パーキンソン病関連化学物質によるオートファジー機能低下とp62核蓄積
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮良 政嗣, 岡田 奈都海, 神田 美幸, 田原 栄俊, 古武 弥一郎
2. 発表標題 マウス初代培養神経細胞におけるパーキンソン病関連神経毒MPP+応答遺伝子の探索
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢田 萌菜美, 宮良 政嗣, 岡田 奈都海, 橋本 穂乃香, 藤原 なつみ, 古武 弥一郎
2. 発表標題 MPTP慢性投与モデルマウスの中脳黒質における遺伝子発現変動解析
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮良 政嗣, 石谷 聡基, 古武 弥一郎
2. 発表標題 リソソームストレス応答性転写因子TFEBの核内消失経路の探索
3. 学会等名 フォーラム2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 児島 有佑, 宮良 政嗣, 岡田 奈都海, 古武 弥一郎
2. 発表標題 パーキンソン病関連神経毒1BnTIQがオートファジー・リソソーム系に与える影響
3. 学会等名 フォーラム2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高尾 紗亜, 宮良 政嗣, 渡辺 南海子, 古武 弥一郎
2. 発表標題 飢餓・ミトコンドリア障害時におけるタンパク質不溶化のメカニズム解明
3. 学会等名 フォーラム2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島大学 大学院医系科学研究科 生体機能分子動態学研究室ホームページ  
<https://kotakelab.hiroshima-u.ac.jp/homepage/>

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
研究協力者	古武 弥一郎  (KOTAKE Yaichiro)  (20335649)	広島大学・医系科学研究科(薬)・教授    (15401)	
研究協力者	鈴木 楓大  (SUZUKI Futa)	広島大学・医系科学研究科(薬)・大学院生    (15401)	

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