

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20683

研究課題名（和文）パーキンソン病のシヌクレイン伝播におけるカルシウムダイナミクスの重要性

研究課題名（英文）The significance of calcium dynamics in alpha-synuclein propagation in Parkinson's disease

研究代表者

上田 潤 (Ueda, Jun)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：40762539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病の進行には特徴的な病理像であるアルファシヌクレイン凝集体の伝播が関与しており、このアルファシヌクレイン凝集体の伝播を抑制すればパーキンソン病の進行を防げる可能性がある。本研究の目的は、パーキンソン病におけるアルファシヌクレイン凝集体伝播へのカルシウムダイナミクスの関与について明らかにすることである。本研究では初代培養神経細胞とマウスを用いたパーキンソン病モデルにおいて、アルファシヌクレインフィブリルの取り込みにカルシウムダイナミクスが関与していること、カルシウムダイナミクスを抑制する薬剤を投与することでアルファシヌクレインフィブリルの取り込みが抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究ではアルファシヌクレイン凝集体伝播とカルシウムダイナミクスの関連性は報告されておらず、また神経細胞において神経活動依存性にアルファシヌクレイン凝集体伝播が起こる機序についても不明な点が多いため、本研究でこれらの点を明らかにしたことは学術的意義が大きいと言える。また本研究の成果はパーキンソン病においてアルファシヌクレイン凝集体の伝播が起こる機序の解明につながるだけでなく、カルシウムダイナミクスに關与する電位依存性カルシウムチャンネル、カルモジュリン、カルシニューリンなどを新たな治療ターゲットとすることで、今後パーキンソン病の病状進行を防ぐ治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The intercellular transmission of pathogenic proteins plays a crucial role in the progression of neurodegenerative diseases. Previous research has shown that the neuronal uptake of such proteins is activity-dependent; however, the detailed mechanisms underlying activity-dependent α -synuclein transmission in Parkinson's disease remain unclear. To examine whether α -synuclein transmission is affected by Ca^{2+} dynamics in cultured cells and mouse models of Parkinson's disease. In this study, we elucidated that modulation of Ca^{2+} dynamics signaling blocked the neuronal uptake of α -synuclein preformed fibrils via macropinocytosis. In wild-type mice inoculated with α -synuclein preformed fibrils, we found that inhibiting calcineurin ameliorated the development of α -synuclein pathology. Taken together, our data suggest that Ca^{2+} dynamics signaling modulates α -synuclein transmission and has potential as a therapeutic target for Parkinson's disease.

研究分野：パーキンソン病

キーワード：パーキンソン病 カルシウムダイナミクス シヌクレイン マクロピノサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は手足の震えや動作が緩慢になる等の運動機能障害を主要な症状とする進行性の神経変性疾患である。PDの病理学的な特徴として、アルファシヌクレイン(α -syn)の神経細胞内への異常な蓄積とレビー小体と呼ばれる凝集体の形成が知られており、さらにPDの病状進行には α -syn凝集体の神経細胞間伝播が関与していると考えられている(Braak H et al. *Neurobiol Aging* 2003)。すなわち、この α -syn凝集体の伝播を抑制できれば、病状の進行を遅らせることができると考えられている。研究開始当時、申請者らを含めて複数の研究グループが α -synシードとなる試験管内で形成させた凝集 α -syn、preformed fibril (PFF)を用いた実験により、神経活動を抑制することでエンドサイトーシスによるPFFの神経細胞への取り込みと α -syn凝集体の伝播が抑制されることを報告していた(Ueda J et al. *Movement disorders* 2021; Wu Q et al. *Acta Neuropathol* 2020)。しかし、「神経活動の抑制」が何故「PFFの取り込みおよび α -syn凝集体の伝播の抑制」につながるのかについては明らかでなかった(図1)。

α -syn凝集体はエンドサイトーシスによる神経細胞への取り込みや軸索輸送を介して伝播するが、エンドサイトーシスや軸索輸送の制御に関わる重要な因子の一つにカルシウムダイナミクスがあり、特に神経細胞内へのカルシウムイオンの流入は電位依存性カルシウムチャンネルによって変化し、さらに流入したカルシウムイオンはエンドサイトーシスに関与するカルモジュリンとカルシニューリンを活性化させる(図2)。以上の背景から、本研究ではパーキンソン病モデルの α -syn凝集体伝播にカルシウムダイナミクスが与える影響について検証した。

図1：本研究の概要

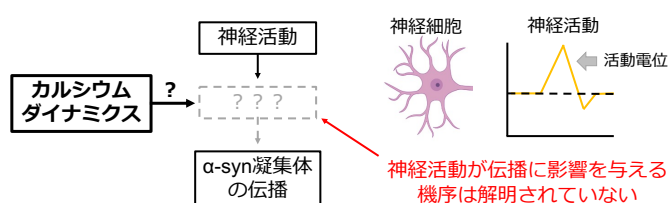
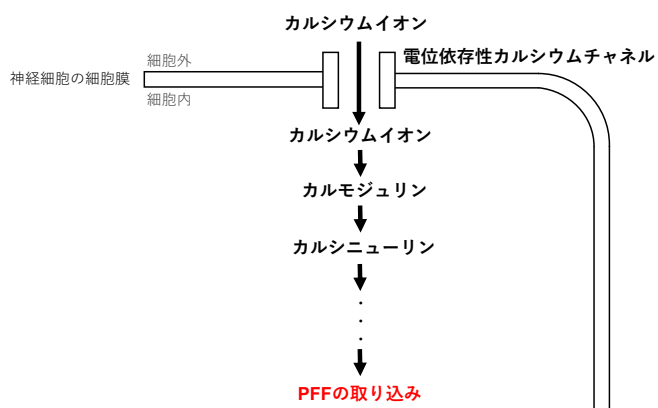


図2：カルシウムダイナミクスとPFF取り込み



2. 研究の目的

本研究の目的は、PDにおける α -syn凝集体伝播へのカルシウムダイナミクスの関与について明らかにすることであった。これまでの研究では α -syn凝集体伝播とカルシウムダイナミクスの関連性については報告されていない。また神経細胞において神経活動依存性に α -syn凝集体伝播が起こる機序についても不明な点が多く、これらの点を明らかにすることは学術的独自性が高いと考えられた。また本研究の成果はPD病態におけるカルシウムダイナミクスの関与の解明、ひいては新たな治療ターゲットの探求を通じて疾患修飾療法の開発に繋がることが期待された。

3. 研究の方法

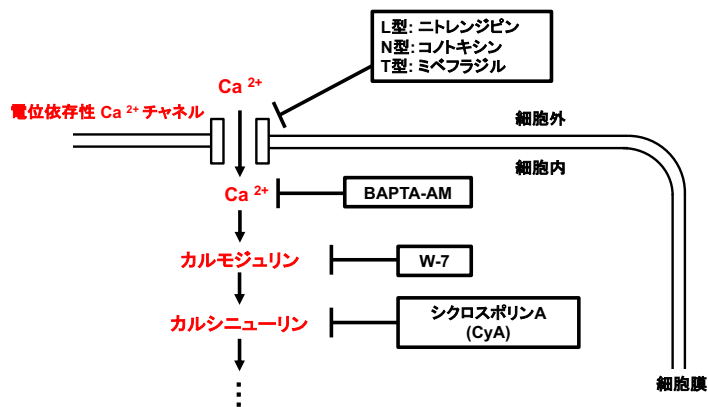
我々はpHrodo色素で標識したPFFを初代培養神経細胞に加えることで、神経細胞に取り込まれたPFFが細胞内で発色して観察できるようにして、神経細胞のPFF取り込みについて定量的に評価する方法を確立した。この実験系にカルシウムダイナミクスを標的とする薬剤(電位依存性

カルシウムチャネル阻害薬、カルモジュリン阻害薬、カルシニューリン阻害薬)を投与して、PFFの取り込みにカルシウムダイナミクスが関与しているか確認した。また PFF の取り込みには特にマクロピノサイトーシスというエンドサイトーシスの一種が関与しており、マクロピノサイトーシスのマーカーを投与した初代培養神経細胞に、カルシウムダイナミクスを標的とする薬剤を投与することで、マクロピノサイトーシスにカルシウムダイナミクスが関与しているか確認した。さらに我々は定位脳固定装置でマウス脳に PFF を投与して α -syn 凝集体が形成させた PD モデルマウスに対して、カルシウムダイナミクスを標的とする薬剤を投与して、培養細胞を用いた上記実験の結果と合致する結果が得られるか確認した。

4. 研究成果

まず我々は pHrodo 色素で標識した PFF を初代培養神経細胞に投与する実験系にカルシウムダイナミクスを標的とする薬剤(電位依存性カルシウムチャネル阻害薬、カルモジュリン阻害薬、カルシニューリン阻害薬)を投与することで、PFF の取り込みが抑制されることを見出した(図 3)。

図3 : カルシウムダイナミクス阻害薬は培養細胞のPFF取り込みを阻害する



さらに我々はこの PFF の取り込み抑制が、マクロピノサイトーシスの抑制によって起こっていることを明らかにした。次に我々は、マウスに対してカルシニューリン阻害薬シクロスポリン A (CyA)を経口投与することで、マウス脳におけるカルシニューリン活性が低下することを示し、CyA が経口投与後にマウスの脳内へ移行することを確認した(図 4)。さらに我々は定位脳固定装置でマウス脳に PFF を投与して α -syn 凝集体が形成させた PD モデルマウスに対して、CyA を経口投与することで PFF の取り込みが抑制されることを見出し、培養細胞を用いた実験系だけでなく動物を用いた実験系でもカルシウムダイナミクスを標的とする薬剤が PFF の取り込みを抑制するこ

図4 : CyA経口投与によってマウス脳のカルシニューリン活性が低下する

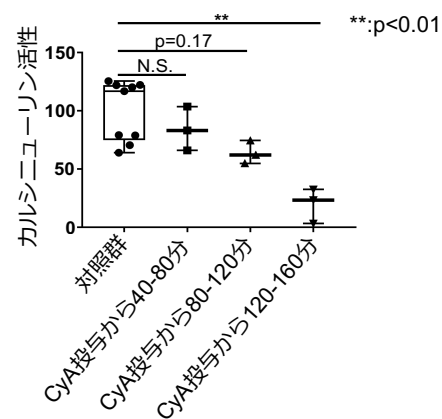
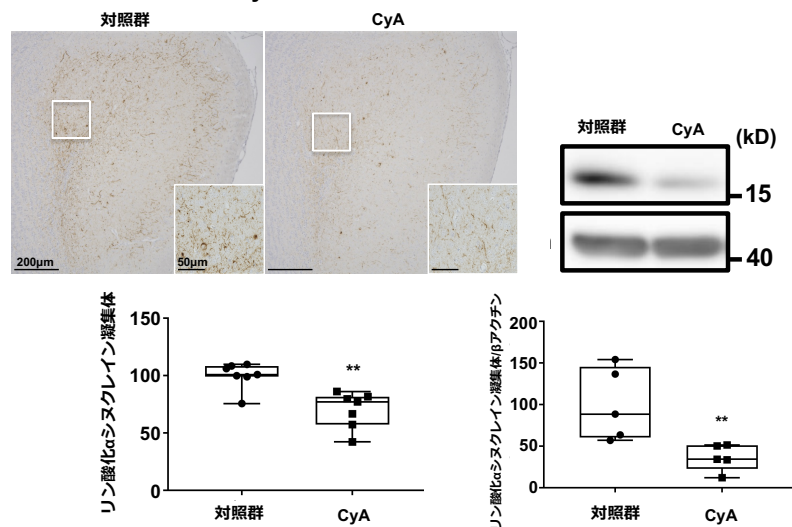


図5 : CyAは α シヌクレイン凝集体を抑制する



とを明らかにした(図 5)。本研究成果は国際学術誌 Movement Disorders に掲載され、国内外の学会で発表をおこなった。

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 Ueda Jun, Uemura Norihito, Ishimoto Tomoyuki, Taguchi Tomoyuki, Sawamura Masanori, Nakanishi Etsuro, Ikuno Masashi, Matsuzawa Shuichi, Yamakado Hodaka, Takahashi Ryosuke	4. 巻 38
2. 論文標題 Ca2+-Calmodulin-Calcineurin Signaling Modulates Synuclein Transmission	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Movement Disorders	6. 最初と最後の頁 1056 ~ 1067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mds.29401	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上田潤、上村紀仁、石本智之、田口智之、澤村正典、中西悦郎、生野真嗣、松澤秀一、山門穂高、高橋良輔
2. 発表標題 カルシウム-カルモジュリン-カルシニューリン経路は シヌクレイン伝播に影響を与える
3. 学会等名 第53回日本神経精神薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jun Ueda, Norihito Uemura, Tomoyuki Ishimoto, Tomoyuki Taguchi, Masanori Sawamura, Etsuro Nakanishi, Masashi Ikuno, Shuichi Matsuzawa, Hodaka Yamakado, Ryosuke Takahashi
2. 発表標題 Ca2+-calmodulin-calcineurin signaling modulates -synuclein transmission
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田潤、上村紀仁、石本智之、田口智之、澤村正典、中西悦郎、生野真嗣、松澤秀一、山門穂高、高橋良輔
2. 発表標題 カルシウム-カルモジュリン-カルシニューリン経路は シヌクレイン伝播に影響を与える。
3. 学会等名 第17回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jun Ueda, Norihito Uemura, Tomoyuki Ishimoto, Tomoyuki Taguchi, Masanori Sawamura, Etsuro Nakanishi, Masashi Ikuno, Shuichi Matsuzawa, Hodaka Yamakado, Ryosuke Takahashi
2. 発表標題 Ca2+-calmodulin-calcineurin signaling modulates -synuclein transmission
3. 学会等名 6th World Parkinson Congress (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Jun Ueda, Norihito Uemura, Tomoyuki Ishimoto, Tomoyuki Taguchi, Masanori Sawamura, Etsuro Nakanishi, Masashi Ikuno, Shuichi Matsuzawa, Hodaka Yamakado, Ryosuke Takahash
2. 発表標題 Ca2+-calmodulin-calcineurin signaling modulates -synuclein transmission
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023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
---------	---------