

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591228

研究課題名(和文)シヌクレイノパチーにおけるプリオン仮説の分子病態解明

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanisms behind the prion hypothesis in synucleinopathy

研究代表者

長谷川 隆文(Hasegawa, Takafumi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70361079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：近年神経変性疾患において、凝集性タンパクの細胞間伝播現象が確認され注目を集めている。一方、凝集性タンパクの分泌、取り込み、分解に関わる機構に関しては未だ未知な点が多い。本研究ではパーキンソン病患者脳内に蓄積するシヌクレイン(aS)の細胞外分泌、吸収に関する小胞輸送機構の探索を行った。細胞外aSの大部分はエキソソーム小胞に高密度で存在するプリオンとは異なり、細胞外でfreeな形で存在していた。またRab11を介するリサイクリング経路がaSの分泌に関与することを見出した。一方、aSの取り込みに関しては、ダイナミン依存性エンドサイトーシスが重要な役割をもつことを示した。

研究成果の概要(英文)：The intracellular deposition of misfolded proteins is a common neuropathological hallmark of most neurodegenerative disorders. Increasing evidence suggests that these pathogenic proteins may spread to neighboring cells and induce the propagation of neurodegeneration. In this study, we showed that unlike prion protein, extracellular alpha-synuclein (aS), a major constituent of intraneuronal inclusions in Parkinson's disease, was mainly recovered in the supernatant fraction rather than in exosome-containing pellets from the neuronal culture medium and cerebrospinal fluid. In addition, we identified that the extracellular secretion of aS was secreted via Rab11-mediated recycling pathway (Hasegawa T, et al., PLoS One 2011). Furthermore, we demonstrated that aS was taken up by neuronal and oligodendroglial cells by dynamic-dependent endocytosis (Konno M, et al., Mol Neurodegener 2012).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：パーキンソン病 異常凝集タンパク シヌクレイン プリオン仮説 エキソソーム 小胞輸送 ダイナミン エンドソーム

1. 研究開始当初の背景

多くの神経変性疾患において、病初期に特定の領域に病理変化を生じ、時間経過と共に周辺へと拡大してゆく現象は、臨床症状、病理および画像所見の経時的観察から容易に推定されることである。最近、胎児中脳ドパミン神経移植後 10 数年経過した PD 患者脳の剖検例の検討において、ドナー由来の神経細胞内に シヌクレイン (S) 陽性のレビー小体 (LB) 様封入体が確認されたという驚くべき事実が複数のグループから報告された。このような現象は、病理組織学的観察においてのみならず、培養細胞や動物モデルにおいても実証されており、アルツハイマー病 (AD) や PD をはじめとする神経変性疾患においても、プリオン病同様に細胞間において病原性タンパクの伝播が起こり、隣接する神経組織へ神経変性が拡大する可能性 - いわゆるプリオン仮説とよばれる新たな病態機序が提唱され注目を集めている。PD の病因タンパクが腸管ないし扁桃より迷走・舌咽神経を逆行し、中枢神経系に到達して LB 病理の初期変化を迷走神経背側核と孤束核周囲に生じ、以後連続性に拡大するという Braak の LB 病理脳幹上行仮説も、正にプリオン仮説を背景とするものである。その一方、病原性タンパクの細胞間伝播の背景にある分子病態、即ち「病原性タンパクがどのような機序で細胞外へ分泌され、隣接する細胞へ取り込まれていくのか？」という基本的な問いに対する明確な解答は未だ得られておらず、同メカニズムの早急な解明が求められている。

2. 研究の目的

本研究では PD とその関連疾患を対象とし、S プリオン細胞間伝播に関わる分子機構を明らかにする。具体的には培養神経・オリゴデンドログリア細胞モデルを用い、細胞間における S 伝播プロセスを、大きく (i) S 細胞外分泌と (ii) S 細胞内吸収のプロセスに分け、その背景にある分子機構を解明する。なかでも S 分泌・ライソゾーム移行を規定する VPS4 およびその上流にある制御因子 (Vta1・Ist1) の機能、およびクラスリン依存性エンドサイトーシス機構に注目して、S の細胞外分泌・細胞内吸収の調節機構を解明すると共に、これらの経路を選択的に阻害する薬剤についてのスクリーニングを行う。

3. 研究の方法

(1) S 分泌・ライソゾーム移行に影響する後期エンドソーム形成因子 VPS4 の機能的役割の探索

細胞内において S は主に細胞質に存在するが、一部はエンドソームコンパートメントや細胞外に存在することが示されている。先述の通り申請者らは予備実験において、後期エンドソーム形成に必要な AAA 型 ATPase である VPS4 の dominant-negative 変異体 (E228Q

VPS4) の過剰発現により同エンドソーム形成を抑制することで S のライソゾーム移行が減少すると共に、リサイクリングエンドソーム経路を介する S 細胞外分泌が著増するという実験結果を得ている。本研究では内因性 VPS4 の機能制御に携わる上流の因子である stimulator (Vta1) および inhibitor (Ist1) を Myc- β -synuclein (Myc- β -SYN) と共に HEK293T 細胞および SH-SY5Y 神経細胞に過剰発現した後、培地および cytosol、endosome および lysosome の各細胞分画を分離し、内在性 VPS4 の機能促進/障害により S 分泌・ライソゾーム移行が影響されるかを検討する。さらに RNAi 法による VPS4 遺伝子ノックダウンにて細胞外に分泌される S 量に変化を生じるかを同様の手法で確認する。

(2) S 吸収過程におけるクラスリン依存性エンドサイトーシスの機能的役割の探索

S の細胞内吸収経路に関しては、以前からクラスリン依存性エンドサイトーシス機構の関与が推測されている。本研究ではリコンビナント S を SH-SY5Y 神経細胞培地に曝露する系を用い、同エンドサイトーシス経路の鍵となる分子である Dynamin I の K44A dominant-negative 変異体発現による S 取り込み阻害についてウェスタンブロット法と免疫染色法で確認する。さらに、同エンドサイトーシスを阻害する各種薬剤 (クロルプロマジン、セルトラリンなど) のスクリーニングを実施する。

4. 研究成果

神経細胞培地上清および PD 患者脳脊髄液を用いたショ糖密度勾配遠心法による実験結果から、細胞外 S の大部分は予想に反してエキソソーム小胞に高密度で存在するプリオンとは異なり、細胞外で free な形で存在していることが判明した。またドミナントネガティブ変異型 VPS4 (Vacuolar Protein Sorting 4) 発現によるエキソソーム経路阻害は S 分泌には影響せず、Rab11 を介するリサイクリング経路が S の分泌に関与することを見出した (Hasegawa T, et al., PLoS One 2011)。

ヒト SH-SY5Y 神経細胞、KG1C オリゴデンドログリア細胞を 5 μ M S 存在下で一定時間培養し、疎水性・親水性画分に分離後ウェスタンブロット法にて細胞内 S の検出を行った。S 添加 1 分後には細胞内の主に親水性画分に S モノマーが検出され、以後経時的に SDS 抵抗性を示す 2-3 量体の S 出現・増加が確認された。ほ乳類のシヌクレインには、 α -syn、 β -gal、 β -gal の 3 種類が存在するが、SH-SY5Y 神経細胞を用いた曝露実験では S のみが選択的に細胞内へと取り込まれること、さらに野生型 S と比較し凝集性が高く細胞毒性が高い A30P・A53T 変異型 S は、細胞内へ取り込まれた後より強い凝集傾向を示すことが確認された。続いて S 曝露細胞における S 陽性封入体の出現について、免疫染色法による確認を行った。5 μ M S を 24 時間培地に

添加したところ、神経・オリゴデンドログリア細胞の細胞質内に SYN 陽性かつユビキチン、チオフラビン S および Ser129 S 陽性といった患者脳内にみられる Lewy 小体、GCI 類似の染色特性を有する封入体出現が認められた。

細胞内に取り込まれた S の subcellular distribution について、免疫染色法による検討を行った。S 曝露後出現する封入体の一部は、エンドゾームマーカー (Rab5A) およびリソソームマーカー (Lamp-1) と共存していた。さらに、取り込まれた S がリソソームで分解を受けているか確認するために、リソソーム機能阻害剤である bafilomycin A1 にて処理した SH-SY5Y 細胞を用い 5 μ M S を 24 時間曝露させた。コントロールと比べ bafilomycin A1 処理群では親水性画分において高分子 S オリゴマーが蓄積する傾向が確認された。以上の結果から、神経・オリゴデンドログリア細胞に取り込まれた S はリソソーム・オートファジー系で処理されている可能性が示唆された。

細胞外からの物質の取り込みにはクラスリン依存性エンドサイトーシスが重要な役割を有している。同過程において細胞膜と coated vesicle の離断は dynamin 分子により実行される (図 3A)。ほ乳動物の dynamin には 3 つのサブタイプが存在し、うち dynamin 1・2 が同エンドサイトーシスに関与している。これらの知見を下に、S の神経およびオリゴデンドログリア細胞への取り込みにおける dynamin GTPase の機能的役割を調べてみた。

これまでの先行研究により、抗うつ薬である selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) は class effect として dynamin GTPase 活性を抑制することが知られている。なかでも第 2 世代 SSRI である sertraline は既知の dynamin 阻害剤の中で最強の阻害活性を示すと報告されている。そこで SH-SY5Y 細胞および KG1C 細胞を sertraline で 24 時間処理後に、培地に 5 μ M SYN を添加し細胞内移行について確認したところ、何れの細胞株においても sertraline は濃度依存的に S の取り込みを減少させることが示された。さらに SH-SY5Y 神経細胞にて K44A DN 変異型 dynamin 1 あるいは siRNA で同分子の機能を抑制すると、コントロールと比べ S の細胞内取り込みが著しく抑制されることが判明した (Konno M, et al., Mol Neurodegener 2012)。

本研究では S の分泌経路がプリオンとは異なりエキソソームを介しておらず、Rab11 を介したリサイクリング経路がその分泌を司ることを世界で初めて証明した。また細胞外 S が神経・オリゴデンドログリア細胞に取り込まれ、オリゴマー化とともに細胞内封入体を形成することを確認した。また、これらの細胞における S 取り込みはエンドサイトーシス実行分子である dynamin 機能に依存していることを多角的に証明した。PD 患者脳

における神経細胞の変性脱落は十数年以上に渡り緩徐に進行することから、発症早期に sertraline などの dynamin 阻害剤を投与することにより、周辺細胞への S 伝播が抑えられ病変拡大・症状進行を遅らせることが可能かもしれない。異常タンパク伝播は神経変性疾患に共通してみられる現象とも考えられているが、個々のタンパク、細胞毎に細胞間伝播に関与する分子機構が異なる可能性もある。今後 S の吸収・分解・分泌に関与する細胞内小胞輸送システムをさらに詳細に解明し、シヌクレイノパチーの進行阻止を目指した治療介入法を提案したい。

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 8 件)

Kikuchi A, Baba T, Hasegawa T, Kobayashi M, Sugeno N, Konno M, Miura E, Hosokai Y, Ishioka T, Nishio Y, Hirayama K, Suzuki K, Aoki M, Takahashi S, Fukuda H, Itoyama Y, Mori E, Takeda A. Hypometabolism in the supplementary and anterior cingulate cortices is related to dysphagia in Parkinson's disease: a cross-sectional and 3-year longitudinal cohort study. *BMJ Open* 3, (3), (2013). DOI: 10.1136/bmjopen-2012-002249. 査読有 Konno M, Hasegawa T, Baba T, Miura E, Sugeno N, Kikuchi A, Fiesel FC, Sasaki T, Aoki M, Itoyama Y, Takeda A. Suppression of dynamin GTPase decreases alpha-synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy. *Mol Neurodegener* 7(1), 38, (2012). DOI:10.1186/1750-1326-7-38. 査読有 Baba T, Kikuchi A, Hirayama K, Nishio Y, Hosokai Y, Kanno S, Hasegawa T, Sugeno N, Konno M, Suzuki K, Takahashi S, Fukuda H, Aoki M, Itoyama Y, Mori E, Takeda A. Severe olfactory dysfunction is a prodromal symptom of dementia associated with Parkinson's disease: a 3 year longitudinal study. *Brain* 135, 161-9, (2012). 査読有 Kikuchi A, Baba T, Hasegawa T, Sugeno N, Konno M, Takeda A. Differentiating Parkinson's disease from multiple system atrophy by [(123)I] meta-iodobenzylguanidine myocardial scintigraphy and olfactory test. *Parkinsonism Relat Disord* 17, 698-700, (2011). 査読有 Hasegawa T, Konno M, Baba T, Sugeno N,

Kikuchi A, Kobayashi M, Miura E, Tanaka N, Tamai K, Furukawa K, Arai H, Mori F, Wakabayashi K, Aoki M, Itoyama Y, Takeda A. The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of alpha-synuclein. PLoS One 6(12), e29460, (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0029460. 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

Hasegawa T, Konno M, Miura E, Sugeno N, Nagai Y, Fujikake N, Suzuki M, Kikuchi A, Aoki M, Takeda A. RNAi-mediated silencing of VPS35 exacerbates phenotypic and locomotor abnormalities in alpha-synuclein transgenic drosophila. 17th International Congress of Parkinson's Disease and Related Disorders, 2013 年 6 月 17 日, シドニー, オーストラリア

Hasegawa T, Konno M, Miura E, Sugeno N, Nagai Y, Fujikake N, Suzuki M, Kikuchi A, Aoki M, Takeda A. RNAi-mediated knockdown of VPS35 impairs alpha-synuclein degradation by inhibiting the maturation of cathepsin D. The 11th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD 2013). 2013 年 3 月 7 日, フローレンス, イタリア

Hasegawa T. Regulation of alpha-synuclein internalization and secretion: what do we know, and where are we headed? 7th International Conference on alpha-Synuclein in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Diseases: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. 2013 年 3 月 2 日, ドバイ, UAE

Hasegawa T, Konno M, Sugeno N, Miura E, Baba T, Kikuchi A, Aoki M, Takeda A. Suppression of Dynamin GTPase Activity Decreases alpha-synuclein Uptake in Neuronal and Oligodendroglial Cells. The 17th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience. "Therapeutic Approach for Neurodegenerative Diseases: Focusing on Alzheimer & Parkinson Diseases". 2012 年 12 月 7 日, 大阪

Hasegawa T, Konno M, Baba T, Sugeno N, Kikuchi A, Miura E, Takeda A. The AAA-ATPase VPS4 Regulates Extracellular Secretion and Lysosomal Targeting of alpha-synuclein.

The 16th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. 2012 年 6 月 18 日, ダブリン, アイルランド

Hasegawa T., Konno M, Baba T, Sugeno N, Kikuchi A, Miura E, Takeda A. The AAA-ATPase VPS4 regulates Extracellular Secretion and Lysosomal Targeting of Alpha-synuclein. NRF-JSPS Asian Science Seminar. 2012 年 2 月 14 日, ソウル, 韓国

〔その他〕

ホームページ

<http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 隆文 (Hasegawa, Takafumi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 70361079

(2) 研究分担者

武田 篤 (Takeda, Atsushi)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 70261534

(3) 連携研究者

永井 義隆 (Nagai, Yoshitaka)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・室長

研究者番号: 60335354