

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：84303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591265

研究課題名(和文) 生体内で部分凝集した シヌクレインがもたらす神経細胞機能異常の解明

研究課題名(英文) analysis of abnormal neuronal excitability mediated by alpha-synuclein oligomer

研究代表者

山本 兼司 (Kenji, Yamamoto)

独立行政法人国立病院機構(宇多野病院臨床研究部)・その他部局等・研究員

研究者番号：50378775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病やレビー小体型認知症で、臨床症状が発現する以前から蓄積すると推定されている部分凝集 シヌクレインがもたらす発火特性について細胞電気生理学的に解析した。その結果、部分凝集 シヌクレインは、細胞内カルシウムやSK型Kチャンネルに依存して、スパイク後過分極を増強して発火頻度を抑制することが判明した。この結果は、部分凝集 シヌクレインが、神経活動を抑制すると共に、神経細胞内カルシウム動態を攪乱して細胞機能障害を生じている可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We examined the action of alpha-synuclein oligomers on neuronal excitabilities by injecting protein into pyramidal neurons in mouse cortical slices through whole-cell patch pipettes. Western blot analysis showed that the pipette solution including alpha-synuclein incubated with dopamine (aS+DA), had higher order oligomer. Intracellular application of aS+DA suppressed spike firing during current injection. Nimodipine and apamin blocked the effect of aS+DA on spike firing. aS+DA prolonged the duration of spike afterhyperpolarization (AHP) and increased the charge transfer carried by the current during AHP under current clamp, both of which were inhibited by apamin. These results suggest that alpha-synuclein oligomers suppress spike frequency by enhancing AHP, and apamin-sensitive SK-type calcium-activated potassium channel is involved with the enhancement. This mechanism may cause the downregulation of neocortical activities in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies.

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：シヌクレイン オリゴマー パーキンソン病 レビー小体型認知症 カリウムチャンネル カルシウム 膜興奮性 パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) やレビー小体型認知症 (DLB) は、選択的神経細胞死とレビー小体の特徴とする。このレビー小体は、シヌクレインが重合して不溶化したフィブリルとして目に見える形をとっているが、近年の研究では、むしろ部分凝集した可溶性シヌクレイン、すなわち、見えない凝集体が神経細胞死の原因となっている可能性が示されている。レビー小体は中脳ドパミン細胞だけでなく大脳皮質、扁桃体など神経回路網内で広範に分布していることから、部分凝集した

シヌクレインが、脳全体に共通したメカニズムで神経細胞機能異常を生じて神経細胞に脆弱性をもたらしている可能性があるが、その作用点はまだ明らかになっていない。

これまでに、申請者らは、サイズ排除クロマトグラフィーを用いることにより、シヌクレインを過剰発現させた培養細胞内に可溶性モノマーに加えて、少量の部分凝集した2-3量体、4-10量体が存在すること、ドパミン負荷によりこれらの部分凝集体が増大することを証明した (Yamakawa, 2010)。さらに、海馬や大脳皮質スライスにおける錐体細胞に電気生理学的解析を適用して、アルツハイマー病 (AD) の初期に神経細胞内から蓄積する可溶性アミロイド (A β) がBKチャンネルを抑制してCa²⁺流入を促進する機能異常を生じ、homer1aがこの機能異常をレスキューすることを、A β をパッチピペットから細胞内投与する手法やADモデルマウスを用いて明らかにしてきた (Yamamoto, 2011)。これらの結果や手法を用いることによって、臨床症状が発現する以前から部分凝集を生じたシヌクレインが蓄積し、神経細胞の機能障害やその後生じる細胞死を引き起こしうる未知の作用点を見いだすアプローチが可能になる。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに確立した手法を用いて、PDやDLBにおいて重要とされている部分凝集シヌクレインをパッチピペットから細胞内注入した細胞で電気生理学的解析を行い、シヌクレインが神経細胞の興奮性やシナプス伝達に与える機能異常を調べる。この部分凝集体の形をとったシヌクレインが引き起こす神経機能異常とその作用点

を明らかにする本研究により、細胞内凝集タンパクがどのような仕組みで機能障害をもたらし、神経細胞死を引き起こしていくかが明らかにでき、神経変性の進行を防御する新たな治療の足がかりを提供できる。

3. 研究の方法

- (1) C57BL/6 マウス (P20-50) より作成した前頭葉皮質スライスを用いた
- (2) 合成シヌクレイン (aS) \ ドパミン存在下にて 37 °C 3日間インキュベートした合成シヌクレイン (aS+DA) をウェスタンブロットにて解析した。合成シヌクレインは、野生型 (WT) \ A30P 変異型、A53T 変異型の三種類について調べた。
- (3) / 層、又は 層錐体細胞 にパッチクランプを施行し、ドパミン (DA) \ 37 °C 3日間インキュベートしたシヌクレイン (WT or A53T : aS or aS53) \ ドパミン存在下にて 37 °C 3日間インキュベートしたシヌクレイン (WT or A53T : aS+DA or aS53+DA) \、又は両者を含まない内液 (Control) をパッチピペットより細胞内投与した。
- (4) ホールセル、電流固定下で膜電位、脱分極刺激時の単発スパイク、連発スパイクを記録した。
- (5) ホールセル、電圧固定下で H 電流、AHP 電流を記録した。

4. 研究成果

(1) シヌクレインオリゴマーは、神経細胞の発火頻度を低下させる

ウェスタンブロットによる解析では、合成シヌクレインは、野生型、A30P 変異型、A53T 変異型の三種類でいずれにおいても、ドパミンとインキュベートした場合に、シヌクレイン単独と比較して高次オリゴマーのバンドを検出した。シヌクレイン+ドパミン溶液におけるオリゴマーの検出は、同条件で調べられた過去の報告に合う結果であった。

シヌクレイン+ドパミン溶液の細胞内投与で、連発スパイクにおけるスパイク頻度が有意に減少した (図1)。つまり、シヌクレインオリゴマーの細胞内投与により、神経細胞の発火頻度が抑制されることが判明した。

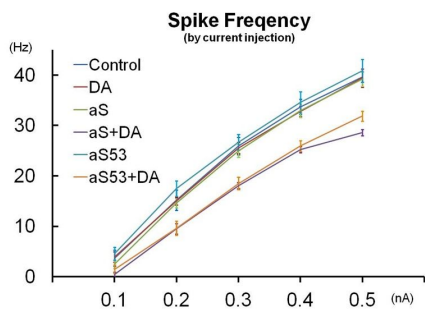
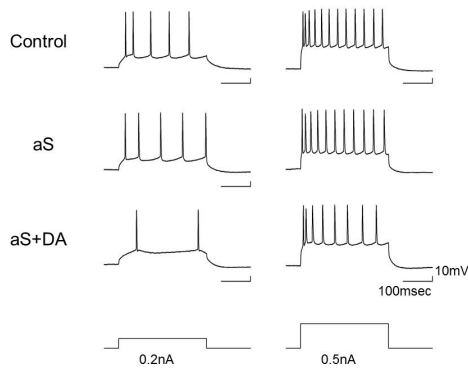


図1 シヌクレイン+ドパミン (aS+DA、aS53+DA)の細胞内投与によりスパイク頻度が減少した。ここでは、パッチピペットからの脱分極通電で生ずるスパイク発火の実例と周波数比較を示した。

(2) シヌクレインオリゴマーによる発火抑制へのスパイク後過分極の関与
高次オリゴマーを含む シヌクレイン+ドパミン溶液 (aS+DA) と、含まない シヌクレイン溶液 (aS) を用いて、単発スパイクに伴う静止膜電位、スパイク幅、スパイク後脱分極、H 電流を比較したが、両者で差を認めなかった。一方、aS+DA によるスパイク抑制効果は、電位依存性 Ca²⁺チャンネル阻害薬である nimodipine、SK 型 K チャンネル阻害薬である apamin の投与によって打ち消された(図2)。

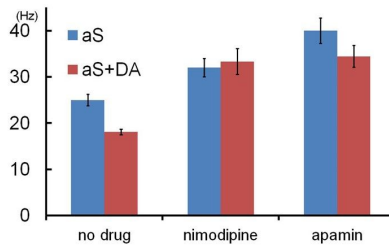
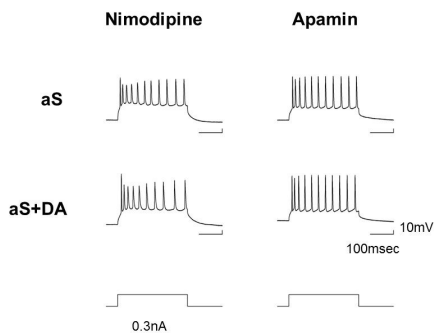


図2 nimodipine、apamin 投与下では シヌクレイン+ドパミン (aS+DA) による発火抑制が阻害された。

SK 型 K チャンネルの特徴として、スパイク後過分極 (AHP) を担い、スパイク間隔が長くなることで、発火抑制に寄与すること、Ca²⁺依存性と電位依存性の両者を持つこと、大脳皮質錐体細胞で電位依存性 Ca²⁺チャンネルとカップリングしていること、があげられる。よって、aS+DA 投与下では、スパイク連発時に AHP が増強している可能性が示唆された。そこで、5 連発スパイク後の AHP を aS+DA と aS で比較したところ、AHP 振幅に有意差は認めなかったが、AHP 持続時間は、aS+DA の方が有意に延長しており、aS+DA による AHP の増強が実際に確認された (図3)。

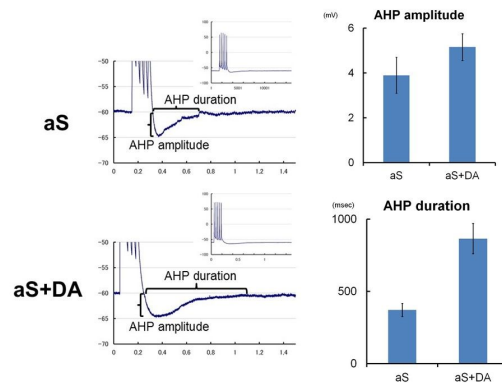


図3 シヌクレイン+ドパミン (aS+DA) では連発スパイク後の AHP の持続時間が有意に延長した。

(3) シヌクレインオリゴマーによる発火抑制への SK 型 K チャンネルの関与
電圧固定モード (-55mV) で5発の脱分極通電を加えた後の tail current は、apamin の投与でブロックされることから、電流固定時における5連発スパイク後の AHP に対応する電流 (I_{AHP}) と考えられる。この I_{AHP} による電荷量 (I_{AHP} charge) を比較したところ、aS+DA では aS に比べて I_{AHP} charge が増加していた。これらの結果からは、シヌクレインオリゴマーが、SK 型 K チャンネルに依存する AHP を

増強することによって、スパイク間隔が延長して発火頻度を低下させることが明らかになった(図4)。

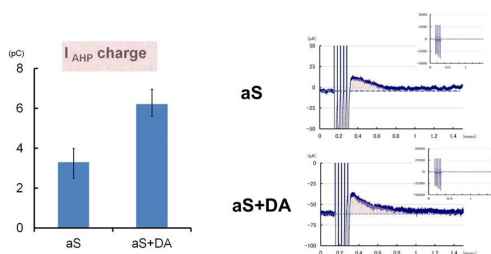


図4 シヌクレイン+ドパミン(aS+DA)では連発スパイク後のAHPによる電荷量(I_{AHP} charge)が有意に増加した。

SK型Kチャンネルがカルシウム依存性をもつことを考慮すれば、以上の結果は、部分凝集したシヌクレインが、神経活動を抑制すると共に、神経細胞内 Ca^{2+} 動態を攪乱することによって細胞機能障害を生じている可能性を示唆している。シヌクレインオリゴマーがAHPを増強するメカニズムとして、細胞外からの Ca^{2+} 流入の増加、小胞体やミトコンドリアからの Ca^{2+} 放出、または取り込み障害、SKチャンネルへの直接作用、などが候補に挙げられる。シヌクレインは膜親和性があることから、シヌクレインが、これらを行う Ca^{2+} チャンネル、 Ca^{2+} ポンプ、 Na^+/Ca^{2+} 交換輸送体、又はSK型Kチャンネルに作用することによって、大脳皮質錐体細胞の膜興奮性を抑えて活動性を低下させている可能性が推定された。

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5件)

(1)Yamamoto K, Ueta Y, Wang L, Yamamoto R, Inoue N, Inokuchi K, Aiba A, Yonekura H, Kato N. Suppression of a neocortical potassium channel activity by intracellular amyloid- and its rescue with Homer1a. *J Neurosci*. 31(31):11100-11109, 2011, 査読有

DOI:10.1523/JNEUROSCI.6752-10.2011

(2)Sawada H, Oeda T, Yamamoto K Catecholamines and Neurodegeneration in Parkinson's Disease-From Diagnostic Marker to Aggregations of α -Synuclein

Diagnostics 3(2), 210-221, 2013, 査読有
DOI:10.3390/diagnostics3020210

(3) Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, Uemura A, Tomita S, Hayashi R, Kohsaka M, Kawamura T. Trigger medications and patient-related risk factors for Parkinson disease psychosis requiring anti-psychotic drugs: a retrospective cohort study. *BMC Neurol*. 13:145, 2013 査読有

DOI:10.1186/1471-2377-13-145

(4) Uemura A, Oeda T, Hayashi R, Tomita S, Kohsaka M, Yamamoto K, Sawada H. Diagnostic accuracy of apparent diffusion coefficient and ¹²³I-metaiodobenzyl-guanidine for differentiation of multiple system atrophy and Parkinson's disease. *PLoS One* 8:e61066, 2013 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0061066

(5) Sawada H, Oeda T, Uemura A, Tomita S, Hayashi R, Kohsaka M, Yamamoto K, Sudoh S, Sugiyama H, Subclinical Elevation of Plasma C-Reactive Protein and Illusions/Hallucinations in Subjects with Parkinson's Disease: Case-control Study *PLoS One* 9:e85886, 2014 査読有
DOI:10.1371/journal.pone.0085886

[学会発表](計10件)

(1) 山本兼司、山川健太郎、澤田秀幸

シヌクレインオリゴマーは大脳皮質錐体細胞の発火頻度を低下させる

第54回日本神経学会学術大会(2013年5月29日、東京)

(2) 山本兼司、山川健太郎、澤田秀幸

シヌクレインオリゴマーによる大脳皮質錐体細胞の発火制御機構

第36回日本神経科学大会(2013年6月20日、京都)

(3) K. Yamamoto, K. Yamakawa, H. Sawada Suppression of spike frequency by α -Synuclein oligomer in neocortical pyramidal neurons.

24th World Congress of Neurology (24 September 2013, Vienna, Austria)

(4) 山本兼司、山川健太郎、澤田秀幸

Down-regulation of spike frequency by α -synuclein oligomer

第 55 日本神経学会学術大会 (2014 年 5 月 22 日、福岡)

(5) Sawada H, Oeda T, Umemura A, Tomita S, Hayashi R, Kohsaka M, Nakano H, Yamamoto K

Hallucinations and Delusions in Patients with Parkinson ' s Disease - Evaluation by the Parkinson Psychosis Questionnaire

15th Congress of the European Federation of Neurological Societies (12 September 2011), Budapest, Hungary

(6) Umemura A, Oeda T, Kohsaka M, Tomita S, Hayashi R, Yamamoto K, Sawada H

Role of Brain MRI Apparent Diffusion Coefficient (ADC) in the Differential Diagnosis of Parkinson ' s Disease (PD) and Progressive Supranuclear Palsy (PSP)

15th Congress of the European Federation of Neurological Societies (12 September 2011) Budapest, Hungary

(7) Motoyama R, Oeda T, Hari Y, Hayashi R, Uemura A, Tomita S, Kohsaka M, Yamamoto K, Konishi T, Sawada H

Nutritional status as a predictor of the mortality in patients with Parkinson ' s disease

16th Congress of the European Federation of Neurological Societies (9 September 2012, Stockholm, Sweden)

(8) Umemura A, Oeda T, Kohsaka M, Tomita S, Hayashi R, Yamamoto K, Sawada H

Brain MRI apparent diffusion co-efficient (ADC) in Parkinson ' s disease with dementia

16th Congress of the European Federation of Neurological Societies (9 September 2012, Stockholm, Sweden)

(9) Kohsaka M, Oeda T, Nakano H, Umemura A, Tomita S, Hayashi R, Yamamoto K, Sawada H

Ocular application of oxybuprocaine hydrochloride against apraxia of lid opening: a randomized controlled trial

16th Congress of the European Federation of Neurological Societies (9 September 2012, Stockholm, Sweden)

(10) Tomita S, Oeda T, Nakano H, Umemura A, Hayashi R, Yamamoto K, Sawada H

Levodopa responsiveness for progressive

supranuclear palsy can predict early onset of aspiration pneumonia

16th Congress of the European Federation of Neurological Societies (10 September 2012, Stockholm, Sweden)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本 兼司 (Yamamoto Kenji)

独立行政法人国立病院機構 (宇多野病院臨床研究部) ・ 研究員

研究者番号 : 50378775

(2)研究分担者

澤田 秀幸 (Sawada Hideyuki)

独立行政法人国立病院機構 (宇多野病院臨床研究部) ・ 臨床研究部長

研究者番号 : 30335260

山川 健太郎 (Yamakawa Kentaro)

独立行政法人国立病院機構 (宇多野病院臨床研究部) ・ 研究員

研究者番号 : 70447960