

機関番号：11301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790974
 研究課題名（和文）グルコセレブロシダーゼ変異が誘導する α -シヌクレイン細胞毒性に関する研究
 研究課題名（英文）Glucocerebrosidase mutation accelerates alpha-synuclein cytotoxicity

研究代表者
 菅野 直人 (SUGENO NAOTO)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：30509550

研究成果の概要（和文）： グルコセレブロシダーゼはパーキンソン病のリスク遺伝子であるものの、その変異が神経変性に及ぼす役割はいまだわかっていない。グルコセレブロシダーゼ変異型 fibroblast ではグルコセレブロシダーゼ活性が著しく低下していた。さらに、変異型 fibroblast にミトコンドリア複合体 I 阻害薬を暴露するとアポトーシスが誘導され、同時にカテプシン B の活性が抑制された。カテプシン B が α シヌクレインの分解に関わっているとすれば神経変性との関わりがあるものと思われたが、 α シヌクレインがカテプシン B の基質である事を証明する事は出来なかった。

研究成果の概要（英文）： Recent report showed glucocerebrosidase (GBA) mutation is a risk of PD, however, precise function between GBA mutation and neuronal degeneration. In this study, we explored the function of GBA mutation in its pathological process. GBA mutation fibroblasts showed apoptotic cell death after addition of mitochondrial toxin or starvation. Moreover, lysosomal enzyme, cathepsin B (CTSB) activity was significantly reduced. But we could not clearly show that alpha-synuclein is the substrate of CTSB.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

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：脳・神経、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は有病率の高い神経変性疾患であり、ドパミン補充療法が運動機能を改善はさせるものの根本的治療はいまだ存在しない。 α -シヌクレインが分子病態においてもっとも重要な役割を果たしているが、神

経細胞死にはさらに上流のイベントが必要であると思われる。グルコセレブロシダーゼはパーキンソン病のリスク遺伝子であるが、その変異が神経変性に及ぼす役割は不明であった。グルコセレブロシダーゼはタンパク分解酵素であり、一方 α -シヌクレインの蓄積

は細胞毒性を持つ。これらから、グルコセレブロシダーゼが α シヌクレインの上流で神経変性に関わっている可能性がある。

2. 研究の目的

変異型グルコセレブロシダーゼが最終的に神経細胞死を誘導する経路の解明が目的である。変異型グルコセレブロシダーゼ変異 fibroblast、変異型グルコセレブロシダーゼ発現コンストラクトを用い、ミトコンドリア複合体 I 阻害剤、starvation 負荷を組み合わせ、変異型により強く細胞死が生じる事、その時に特定のカタプシンが活性化される事を明らかとする(グルコセレブロシダーゼ-カタプシン経路)。次いで、同定された key となるカタプシンと α -シヌクレインを共発現させ、 α -シヌクレインのリン酸化、細胞内凝集体、さらに細胞死が生じる事を確認する。最後に、治療の試みとしてカタプシンに対する阻害剤および siRNA を用い、系が抑制され細胞保護効果を示す事を明らかにする。

3. 研究の方法

主にグルコセレブロシダーゼ変異型 fibroblast (wt/wt 、 R120W/L444P 、 RecNciI/L444P, N370S/N370S, L444P/L444P) を用いて実験を行う。グルコセレブロシダーゼの酵素活性は 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucopyranoside (4-MUG) を基質として蛍光プレートリーダー (Excitation 355 nm, Emission 460nm) で測定。これらの fibroblast に、パーキンソン病の細胞・動物モデルで汎用されるミトコンドリア複合体 I 阻害薬(MPP+, rotenone)

を暴露。また、培地からブドウ糖・FBS を除き starvation 負荷を行い、アポトーシスやオートファジー誘導について検討を行う。また、このときに活性が誘導または低下するカタプシンに関してウェスタンブロットやキットを用い確認する。

4. 研究成果

グルコセレブロシダーゼ変異型 fibroblast (wt/wt 、 R120W/L444P 、 RecNciI/L444P, N370S/N370S, L444P/L444P) を用い、4-methylumbelliferyl-beta-D-glucopyranoside (4-MUG) を基質として測定し、変異型ではグルコセレブロシダーゼ活性が著しく低下している事を確認した。野生型と変異型グルコセレブロシダーゼ fibroblast ではミトコンドリア複合体 I 阻害薬に対する反応が異なっており、野生型がオートファジーを生じるのに対し、変異型では、オートファジー誘導が野生型ほど強くなく、アポトーシスが認められた。変異型 fibroblast において、オートファジー誘導を試みると、rapamycin では caspase-3 の cleavage が減弱し細胞保護的に働いた。変異型 fibroblast ではカタプシン B の発現・活性ともに誘導が抑制されていた。さらに、免疫沈降法によってグルコセレブロシダーゼとカタプシン B との interaction がみられた。

以上の結果より、グルコセレブロシダーゼの変異はカタプシン B の活性を減弱させる事によって細胞毒性を発揮するものと考えられた。カタプシン B が α シヌクレインの分解に関わっているとすれば神経変性との関わ

りがあるものと思われたが、 α シヌクレインがカタペシンBの基質である事を証明する事は出来なかった。

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 12 件)

1. 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 (2013) 査読有
2. 平出桜, 菅野直人, 坪井博文, 堅山真規, 石山勝也, 青木正志 維持透析中の4度肥満患者に発症した Guillain-Barre 症候群に対して免疫グロブリン静注療法を行った1例. *神経治療*. 30: 57-60 (2013) 査読有
3. Konno M., Hasegawa T., Baba T., Miura E., Sugeno N., Kikuchi A., Fiesel F.C., 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. 14:38 (2012) 査読有

4. 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*. 135:161-169 (2012) 査読有

5. Nishiyama S., Sugeno N., Tateyama M., Aoki M. Late-onset Charcot-Marie-Tooth disease type 1B due to a novel mutation in the extracellular disulfide bridge of MPZ gene. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 115:208-209 (2012) 査読有

6. Sugeno N., Kawaguchi N., Hasegawa T., Kuroda T., Nakashima I., Kanbayashi T., Kusunoki S., Aoki M. A case with anti-galactocerebroside antibody-positive Mycoplasma pneumoniae meningoencephalitis presenting secondary hypersomnia. *Neurol. Sci.* 33:1473-1476 (2012) 査読有

7. Kawaguchi N., Sugeno N., Endo K., Miura E., Misu T., Nakashima I., Itoyama Y. Recurrent hypogeusia in a patient with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP). *J. Clin.*

Neurosci. 19:604-605 (2012) 査読有

8. 鈴木潤, 菅野直人, 西山修平, 金子仁彦, 三須建郎, 豎山真規, 遠藤俊毅, 青木正志 脳脊髄液中にのみ好酸球増多をみとめた再発性脳脊髄炎の1例. 臨床神経. 52: 571-575 (2012) 査読有

9. 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 α -synuclein. PLoS One. 6(12):e29460 (2011) 査読有

10. Kikuchi A., Baba T., Hasegawa T., Sugeno N., Konno M., Takeda A. Differentiating Parkinson's disease from multiple system atrophy by [123I] meta-iodobenzylguanidine myocardial scintigraphy and olfactory test. Parkinsonism Relat. Disord. 17(9):698-700 (2011) 査読有

11. Baba T., Takeda A., Kikuchi A., Nishio Y., Hosokai Y., Hirayama K., Hasegawa T., Sugeno N., Suzuki K., Mori E., Takahashi S., Fukuda H., Itoyama Y. Association of olfactory dysfunction and brain. Metabolism in Parkinson's disease. Mov. Disord. 2011 26:621-628. (2011) 査読有

12. 林聖也, 菅野直人, 西山修平, 長谷川隆文, 青木正志 両眼性の視力障害をきたした MPO-ANCA 関連肥厚性硬膜炎の1例. 臨床神経. 52: 152-155 (2012) 査読有

[学会発表] (計6件)

1. Naoto Sugeno, Takafumi Hasegawa, Masatoshi Konno, Emiko Miura, Akio Kikuchi, Masashi Aoki, Atsushi Takeda, E3 ubiquitin ligase Nedd4 facilitates alpha-synuclein internalization. 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

2. 菅野直人、長谷川隆文、今野昌俊、三浦永美子、菊池昭夫、馬場徹、青木正志、武田篤、 α -シヌクレイン細胞内取り込み機構の解析. 第6回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres. 2012年10月12日 京都

3. Naoto Sugeno, Takafumi Hasegawa, Masatoshi Konno, Emiko Miura, Toru Baba, Akio Kikuchi, Masashi Aoki and Atsushi Takeda, The role of Nedd4 in the internalization of alpha-synuclein. 16th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. 2012年6月21日 ダブリン、アイルランド

4. 菅野直人、長谷川隆文、今野昌俊、三浦永

美子、菊池昭夫、武田篤、青木正志 E3 ユビ
キチンライゲース Nedd4 は α シヌクレイン内
在化を制御する。第 53 回日本神経学会学術
大会 2012 年 5 月 25 日 東京

5. Naoto Sugeno, Takafumi Hasegawa,
Masatoshi Konno, Emiko Miura, Toru Baba,
Akio Kikuchi, Masashi Aoki and Atsushi
Takeda, The molecular basis of abnormal
fear response in Parkinson' s disease.
Interplay between alpha-synuclein and
acid-sensing ion channel in amygdala. 15th
International Congress of Parkinson' s
Disease and Movement Disorders. 2011 年 6
月 6 日 ダブリン、アイルランド

6. 菅野直人、長谷川隆文、今野昌俊、三浦
永美子、菊池昭夫、武田篤、Gaucher 病変異
型 fibroblast の細胞死におけるカテプシン B
の関与。第 52 回日本神経学会学術大会。
2011 年 5 月 18 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 直人 (SUGENO NAOTO)

東北大学・病院・助教

研究者番号 : 30509550