

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591294

研究課題名(和文) 中枢神経における鉄の沈着が神経変性に寄与するメカニズムに関する研究

研究課題名(英文) The study about the mechanism underlying brain iron accumulation in the deficiency of iPLA2 beta.

研究代表者

別宮 豪一 (Beck, Goichi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20626353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：PLA2G6遺伝子の異常により、neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA2)が起こる。PLA2G6ノックアウト(KO)マウスにおいては、加齢に伴い、中枢神経系に高度の鉄沈着が見られた。鉄トランスポーターであるDMT1や鉄調節蛋白(IRP)の発現がKOマウスにて著明に亢進。同様の結果がPLA2G6をノックダウンしたヒト神経細胞でも見られ、同時にミトコンドリア内膜の変性を認めた。PLA2G6遺伝子の異常により、ミトコンドリア機能異常が起こり、IRPが活性化しDMT1の発現が亢進することにより脳内に鉄が沈着するメカニズムが示された。

研究成果の概要(英文)：Mutations in PLA2G6 (iPLA2 beta) have been proposed to be the cause of neurodegeneration with brain iron accumulation type 2. The present study aimed to clarify the mechanism underlying brain iron accumulation during the deficiency of iPLA2 beta. We demonstrated that marked iron deposition was observed in the brains of PLA2G6-KO mice since the early clinical stages. Divalent metal transporter 1 (DMT1) and iron regulatory proteins (IRPs) were markedly upregulated in the brains of aged PLA2G6-KO mice compared to age-matched wild-type control mice. DMT1 and IRPs were significantly upregulated in PLA2G6-KD cells. Degeneration of the mitochondrial inner membrane and decrease of ATP production were observed in PLA2G6-KD cells. These results suggest that the genetic ablation of iPLA2 beta increased iron uptake in the brain through the activation of IRPs and upregulation of DMT1, which was induced by mitochondrial dysfunction.

研究分野：神経内科学

キーワード：NBIA2 PLA2G6 DMT1 鉄調節蛋白質 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

Neurodegeneration brain iron accumulation (NBIA)とは淡蒼球や黒質に鉄沈着を伴い、主に同部位に神経細胞脱落や軸索腫大を認める神経変性疾患である。中枢神経における鉄の増加は、二価鉄(Fe²⁺)がH₂O₂からヒドロキシ・ラジカルを発生させることによって酸化ストレスを生じ(いわゆるFenton反応)、神経変性を加速すると考えられている。PLA2G6遺伝子の異常により、中枢神経系に鉄沈着を伴う神経変性疾患である、Neurodegeneration with brain iron accumulation type 2 (NBIA2)および乳児軸索ジストロフィ (Infantile neuroaxonal dystrophy, INAD)が引き起こされることが知られている。

以前、我々はPLA2G6遺伝子ノックアウト(KO)マウスを作成し、その神経病理学的変化がヒトINAD症例と同様であったことから、良い動物モデルとなり得ることを報告した。さらに、PLA2G6 KOマウスでは、発症前から、ミトコンドリア内膜が再構築不全に伴う変性をきたし、これらがINADの特徴である軸索変性につながっていることを示した(Beck et al., 2011)。

中枢神経における鉄代謝の分子メカニズムが近年に徐々に明らかになってきている。特に、鉄調節蛋白質(iron regulatory protein, IRP) -IRE (iron responsive element) システムである。IREとはmRNAの非翻訳領域に存在し、IRPが結合することにより、細胞内鉄トランスポーターの翻訳が制御されている。特にパーキンソン病では、鉄トランスポーターの1つであるdivalent metal transporter 1 (DMT1)の発現が亢進していることが報告され(Salazar et al., 2008)注目されている。

2. 研究の目的

PLA2G6遺伝子ノックアウト(KO)マウスおよびPLA2G6遺伝子をノックダウンした細胞系を用いて、中枢神経系に鉄沈着が起こるメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) PLA2G6 KOマウス脳のパラフィン包埋ブロックを作成し、高感度鉄染色(Perls-DAB染色)を施行し、脳内の鉄沈着の分布、経時的变化を評価、同年齢の野生型マウスとの比較を行う。

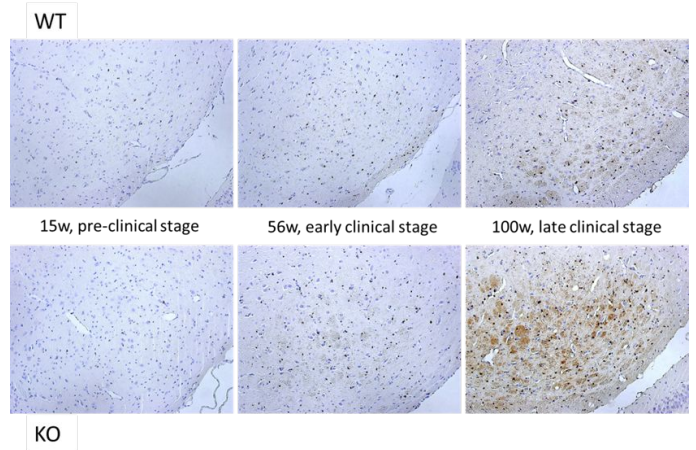
(2) PLA2G6 KOマウス脳における、鉄トランスポーター(トランスフェリンレセプター; TfR、divalent metal transporter 1; DMT1)の発現を免疫染色法、ウェスタンブロット法にて評価する。また同様に鉄調節蛋白質(iron regulatory protein; IRP)の発現

も調べた。

(3) 続いて、ヒト神経芽腫由来細胞である、SH-SY5Y細胞においてPLA2G6遺伝子をノックダウン(KD)した系を樹立した。KD細胞において、KOマウスと同様に、TfR、DMT1、IRPsの発現を評価した。また、KD細胞におけるミトコンドリア内膜機能の評価(主にATP産生)を行った。

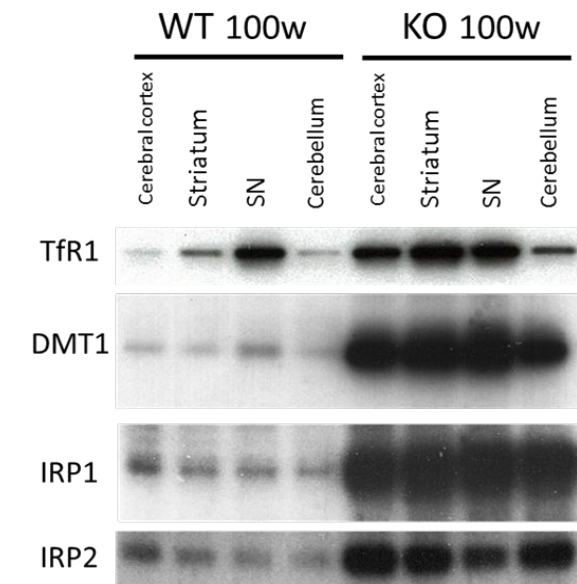
4. 研究成果

(1)PLA2G6ノックアウトマウスでは、加齢により脳内に著明な鉄沈着を認めた。



今回、我々はPLA2G6遺伝子ノックアウト(KO)マウス脳において、加齢により中枢神経系(特に中脳黒質、線条体、淡蒼球)に著明な鉄沈着を認めることを発見した。写真は、各週齢における、マウス中脳黒質のPerls-DAB染色を示す(上図)。56週齢以降で、野生型(WT)マウス(上段)と比較してKOマウス(下段)において、著明な鉄の沈着を認めることが分かる。

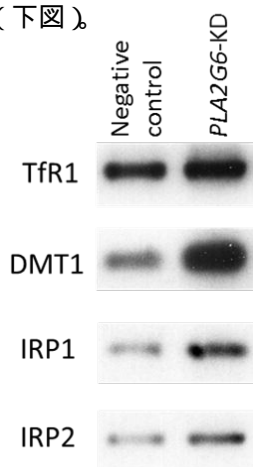
(2)PLA2G6ノックアウトマウスでは、DMT1やIRPsの発現が著明に亢進している。



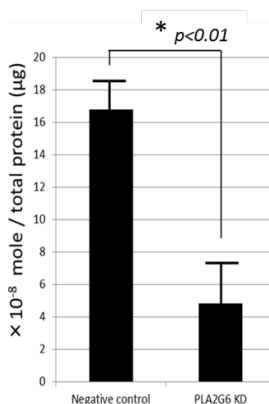
ウェスタンブロット法により、上に示す通り、KO マウスにおいて、鉄トランスポーターである divalent metal transporter 1 (DMT1) の発現が、野生型マウスと比較して、脳全体において著明に亢進していた。トランスフェリンレセプターも、KO マウスでは主に線糸体での発現が亢進していた。同時に、鉄調節蛋白質である iron regulatory protein (IRP1, 2) の著明な発現亢進も見られた。KO マウスでは、酸化脂質である 4-HNE の増加が見られた。

(3) PLA2G6 遺伝子ノックダウン SH-SY5Y 細胞の解析

続いて、ヒト神経芽腫由来細胞である、SH-SY5Y 細胞において PLA2G6 遺伝子をノックダウン (KD) した系を樹立した。同時に、negative control siRNA で処理した細胞も作成した。KD 細胞では、KO マウスと同様に、DMT1 や IRPs の発現亢進が見られた (下図)。



また、KD 細胞では、KO マウスで見られた (Beck et al., 2011) ように、ミトコンドリア内膜の変性 (内膜蛋白である CCO の発現低下) が見られ、同時にミトコンドリアにおける ATP 産生が低下していた (下図)。細胞内の鉄代謝にはミトコンドリアが大きく関与していることが知られており、特に ATP の低下や活性酸素種 (ROS) の産生により IRP が活性化し細胞内への鉄取り込みが亢進することが報告されている (Salazar et al., 2008)。



(4) まとめ

我々の結果により、PLA2G6 の欠損によりミトコンドリア内膜の変性および機能障害、特に ATP 産生の低下が起こる、IRPs が活性化し DMT1 などの鉄トランスポーターの発現が亢進する、その結果、中枢神経内での鉄沈着が増加する、という経路が示された。酸化脂質の増加はミトコンドリア機能異常の結果、あるいは過剰な鉄沈着の影響のいずれか (あるいは両方) と考えられた。

DMT1 の発現亢進に関しては、パーキンソン病と共通した鉄沈着のメカニズムと考えられる。PLA2G6 遺伝子の変異は家族性パーキンソン病 (PARK14) の原因となることも知られており (Paisan-Ruiz C et al., 2009) その関連も非常に興味深い。

参考文献:

- Beck et al., J Neurosci 2011
- Salazar et al., PNAS 2008
- Paisan-Ruiz et al., Ann of Neurol 2009

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 2 件)

- Neuroaxonal dystrophy in PLA2G6 knockout mice. Sumi-Akamaru H, Beck G, Kato S, Mochizuki H. *Neuropathology* (査読有り) 2015, 35:289-302

隅 寿恵、別宮 豪一、望月 秀樹

「PLA2G6 (PARK14) 遺伝子欠損に伴う軸索変性の病態」 *医学のあゆみ* (査読あり) 247 巻、2013 年、pp1061-1068

[学会発表](計 9 件)

白井 良樹、別宮 豪一、隅 寿恵、新沢 康英、安田 徹、辻本 賀英、望月 秀樹

「iPLA2 遺伝子欠損マウス脳における鉄沈着および軸索変性との関連性の検討」
第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 23 日 東京

別宮 豪一、白井 良樹、隅 寿恵、新沢 康英、安田 徹、辻本 賀英、望月 秀樹

「iPLA2 遺伝子欠損マウス脳における鉄沈着および軸索変性との関連性の検討」
第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会
2012 年 6 月 30 日 新潟

別宮 豪一、隅 寿恵、新沢 康英、加藤 信介、安田 徹、辻本 賀英、望月 秀樹

「PLA2G6 遺伝子欠損マウスにおけるドパミン作動性神経系の変性」
第6回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres
レス
2012年10月13日 京都

Goichi Beck, Hisae Sumi-Akamaru, Koei Shinzawa, Toru Yasuda, Yoshihide Tsujimoto, Hideki Mochizuki
「Brain iron accumulation in calcium-independent phospholipase A2 beta knockout mice」
Twenty-third meeting of the European Neurological Society 2013年6月10日 Barcelona

別宮 豪一、隅 寿恵、新沢 康英、安田 徹、辻本 賀英、佐古田三郎、望月 秀樹
「PLA2G6 遺伝子欠損マウス脳における tyrosine hydroxylase 陽性異常構造物の経時的変化」
第54回日本神経学会学術大会 2013年5月29日 東京

別宮 豪一、隅 寿恵、新沢 康英、早川 英規、辻本 賀英、望月 秀樹
「PLA2G6 欠損マウス線条体におけるドパミン神経終末マーカーの変化」
第7回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres
レス 2013年10月11日 東京

別宮 豪一、隅 寿恵、新沢 康英、早川 英規、辻本 賀英、望月 秀樹
「PLA2G6 遺伝子ノックダウンによる シヌクレインの細胞内動態」
第55回日本神経学会学術大会 2014年5月22日 福岡

望月 秀樹、隅 寿恵、別宮 豪一、新沢 康英、辻本 賀英
「PLA2G6 (Park14) 遺伝子欠損マウスにおける神経変性のメカニズム」
第55回日本神経学会学術大会 2014年5月21日

Goichi Beck, Hisae Sumi-Akamaru, Koei Shinzawa, Yuki Sugiura, Mitsutoshi Setou, Yoshihide Tsujimoto, and Hideki Mochizuki
「Neuroaxonal dystrophy in calcium-independent phospholipase A2 deficiency results from insufficient remodeling and degeneration of mitochondrial and presynaptic membranes」
6th international conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2015) 2015年2月11日 Tokyo

〔図書〕(0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(0 件)

取得状況(0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

別宮 豪一 (BECK, Goichi)
大阪大学・医学部附属病院 医員
研究者番号: 20626353

(2) 研究分担者

隅 寿恵 (SUMI, Hisae)
大阪大学・医学系研究科 助教
研究者番号: 30403059

望月 秀樹 (MOCHIZUKI, Hideki)
大阪大学・医学系研究科 教授
研究者番号: 90230044

(3) 連携研究者

なし