

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659435

研究課題名(和文)ミトコンドリア再生機構の網羅的かつ定量的解明 パーキンソン病モデル細胞を用いて

研究課題名(英文)Analysis of mitochondrial regeneration with cellular models of Parkinson's disease

研究代表者

斉木 臣二 (Saiki, Shinji)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00339996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間の2年間でPINK1/parkinを過剰発現させた、ミトコンドリアターンオーバー促進HeLa細胞モデルにて、アポトーシスが誘導されることを見出した。同アポトーシス機構の分子メカニズムを明らかにし、同アポトーシスを抑制することによりミトコンドリア再生機構を解明する手法を選択した。まず同アポトーシスはマイトファジー誘導12時間後から生じ、48時間後にはcaspase-8/9/3の活性化が生じていることを見出した。同現象はzVADおよびcaspase-8阻害剤にて抑制された。現在同アポトーシス抑制を図りながら、フローサイトメーターを用いてミトコンドリア消失細胞を抽出し解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：20-30% of HeLa cells transiently expressing PINK1/parkin, Parkinson's disease-associated genes, have shown apoptotic changes characterized by elevation of levels of cleaved caspase-8/9/3. The apoptosis induced by PINK1/parkin overexpression is inhibited by zVAD as well as caspase-8 inhibitors. Now we try to sort out cells with less mitochondria without apoptotic tendency and figure out the characteristics.

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：脳神経疾患 再生医療

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは酸化リン酸化による細胞エネルギー調達に不可欠であり、また活性酸素種産生源として細胞障害・apoptosis 誘導の役割も担うことから、適切なミトコンドリア品質管理が細胞機能保持に極めて重要であることは論を待たない。ミトコンドリア品質管理には 1)ミトコンドリア膜上での変性蛋白の選択的除去(分子シャペロン、protease による) 2)ミトコンドリア融合による膜電位保持(傷害ミトコンドリアの健常ミトコンドリアによる融合) 3) マイトファジーによる傷害ミトコンドリア除去、の3機構が重要とされる。酵母にて Atg32 を介する選択的マイトファジー (*Dev Cell* 17:87; 17:98, 2010)、哺乳類細胞での遺伝性パーキンソン病原因遺伝子産物 parkin 介在性マイトファジーが報告され(*J Cell Biol* 183:795, 2008)、研究代表者らは東京都臨床医学総合研究所松田憲之・田中啓二らと共に同現象を追試し、parkin 介在性マイトファジーが PINK1 により調節されることを報告した (*J Cell Biol* 189:211, 2010; *FEBS Lett* 584:1073, 2010)。しかしマイトファジー後に生じるミトコンドリア再生機構・細胞死との関連は殆ど検討されておらず、ミトコンドリア除去・再生調節機構全体についても、そのトリガーやフィードバックシステムなどは PGC1-alpha が関与する点以外は全く不明であった。

2. 研究の目的

独自に作製した PINK1/parkin 共強制発現によるミトコンドリアターンオーバー促進モデル細胞を用い、マイトファジー後に続発する細胞死を分子生物学的に検証し、さらにミトコンドリア再生を、DNA マイクロアレイによる網羅的検索とシステムズバイオロジーによる遺伝子相関の解明によって全体像を明らかにし、さらに最重要遺伝子(群)について培養細胞でのミトコンドリア機能回復を追尾し、実証することを目的とする。

3. 研究の方法

1) ミトコンドリアターンオーバー促進モデルにおける細胞死誘導機構の解明

研究代表者は、まず PINK1/parkin 共強制発現細胞において、Tom20/MitoTracker-Red CMXRos の両者による染色が著しく低下し、かつ健全な細胞を抽出すべく、同細胞群の特性を下記方法により検証した。

a) PINK1/parkin 共強制発現後 12、24、48 時間後のアポトーシス関連蛋白 (caspase3/8/9) の発現

b) PINK1/parkin 共強制発現後 24、48 時間後の免疫細胞染色による Tom20 陰性かつ、cleaved caspase-3, cleaved caspase-8 陽性細胞の算出

c) PINK1/parkin 共強制発現によるマイトファジー阻害作用を持つとされるプロテアソーム阻害剤 Lactacystin 投与によるマイトファジ

ー・細胞死の算出

2) ミトコンドリア再生機構の解明

PINK1/parkin 介在性マイトファジー亢進によるミトコンドリアターンオーバー促進モデル細胞に MitoTracker-Green を取り込ませ、FACS を用いてミトコンドリア喪失細胞のみを sorting out し、合計 200 細胞を回収する。同細胞群から mRNA を抽出後、RT-PCR にて cDNA を合成し、DNA マイクロアレイ (Affimetrix 社製) にアプライし、データを得る。

4. 研究成果

1) 通常の HeLa 細胞に PINK1 と parkin のプラスミド DNA を 2:1 の比率で強制発現すると、24 時間後には明らかなミトコンドリアの核周囲への集積を、48 時間後には一部ミトコンドリア外膜蛋白の発現をほとんど失ったものを 20 - 30% の比率で認めることを見出した。

図. PINK1/parkin 共強制発現による細胞死誘導効果。24 時間後は核周囲に蓄積したミトコンドリアを持つ細胞が 60% 程度 (全 GFP-parkin 陽性細胞中の比率) を占めるが、48 時間後には、20% 程度が Tom20 陰性細胞となる。

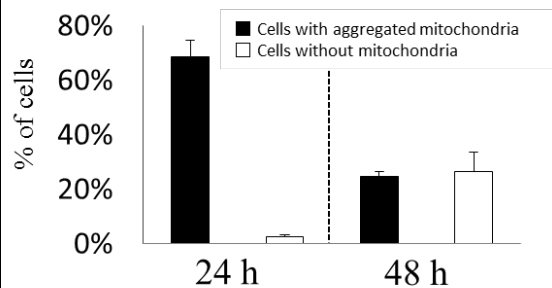
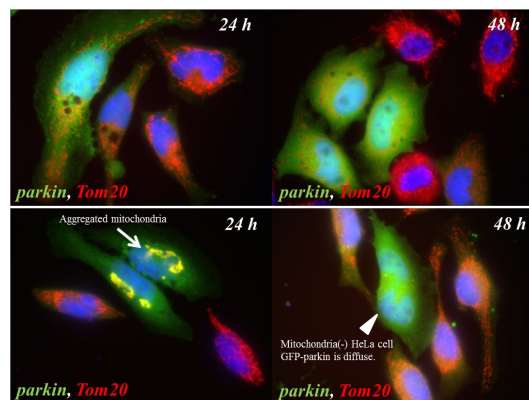


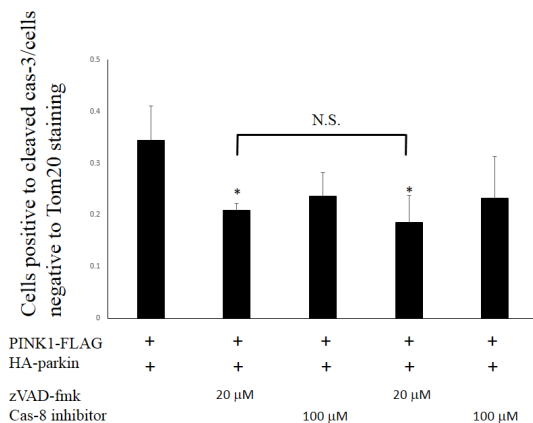
図. PINK1/parkin 共強制発現 24 時間後には矢印のように核周囲に凝集したミトコンドリアが観察され、48 時間後には Tom20 陰性の細胞 (矢頭) が認められる。



2) 同現象の後に、HeLa 細胞は細胞死を迎えるものと、ミトコンドリア再生を生じ、定常状態に戻るものがあることを確認したため、まずミトコンドリア再生を伴う細胞のみを

回収する為、細胞死を呈するものの特徴について検討したところ、同細胞死に伴い、著明な caspase-3/8/9 の活性化が生じることを確認し、同細胞死は zVAD 及び caspase-8 阻害剤にて著明に抑制された。

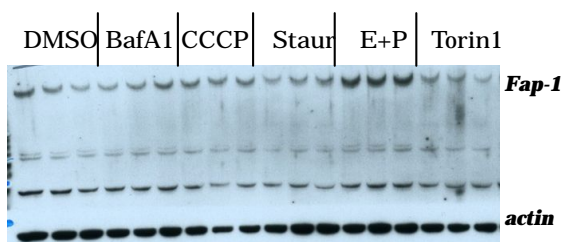
図. PINK1/parkin を過剰発現させ、48 時間後に細胞を固定し、cleaved caspase-3 (Alexa488-conjugated)、Tom20 にて染色後、Tom20 染色が著しく低下した細胞の中で cleaved caspase-3 陽性細胞をカウントした。



3) さらに同細胞死の特性を検討したところ、同細胞死はミトファジー初期に誘導されるプロテアソーム依存的なミトコンドリア外膜の除去を抑制する、プロテアソーム阻害剤にて抑制されることを確認した。

4) 同細胞死の調節機構として、Fap-1 という Fas 脱リン酸化酵素に着目して検討を進めている。

図. Fap-1 はオートファジー依存的に分解される。mTORC1 阻害薬である Torin1 により Fap-1 発現量は低下するが、リソソーム水解酵素阻害薬 E64d+pepA により発現レベルが上昇する。



BafA1: bafilomycin A1
Stauro: staurosporine
E+P: E64d + pepstatin A

5) MitoTracker-Red 陰性細胞群の抽出後、現在 cDNA を作製し、cDNA マイクロアレイにより網羅的検討を進めている。

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 1 件)

1. Ishikawa K, Saiki S, Furuya N, Yamada D, Imamichi Y, Li Y, Kawajiri S, Sasaki H, Koike M, Tsuboi Y, Hattori N. p150glued-associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway. *PLOS ONE* (in press)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 斉木臣二 「パーキンソン病と慢性炎症」 第 55 回日本神経学会総会 福岡国際会議場等 福岡県 2014 年 5 月 21 - 24 日
2. 斉木臣二 「パーキンソン病の臨床と創薬 -オートファジーとの関連を中心に-」 第 33 回ゲノム創薬フォーラム 東京大学医科学研究所 東京都 2013 年 7 月 25 日
3. 斉木臣二 「パーキンソン病病態とオートファジーの関連について」 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域 細胞内ロジスティクス・シンポジウム 淡路夢舞台国際会議場 兵庫県 2013 年 9 月 17-18 日
4. 斉木臣二 「オートファジーを標的としたパーキンソン病治療について」 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域 オートファジーの集学的研究シンポジウム・オートファジー研究会 ヤマハリゾート 静岡 静岡県 2013 年 12 月 19-21 日

〔図書〕(計 1 件)

Saiki S. Neuroacanthocytosis. In: Jankovic J, Tolosa E, eds. Parkinson's disease and movement disorders. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins (in press) (2014)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: パーキンソン病予防治療剤
発明者: 服部信孝、斉木臣二、井本正哉、藤巻貴宏
権利者: 学校法人順天堂
種類: 特許
番号: 2013-091903
出願年月日: 2013 年 4 月 25 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等
所属教室ホームページ (順天堂大学脳神経内科)

<http://www.juntendo-neurology.com/>

研究グループ紹介ページ

<http://www.juntendo-neurology.com/pdf/kenkyu-saeki-furuya.pdf>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

齊木 臣二 (SAIKI, Shinji)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：00339996

(2)研究分担者

矢野浩二郎 (YANO, Kojiro)
大阪工業大学・情報科学部・准教授
研究者番号：10612442

天羽 拓 (AMO, Taku)
防衛大学校・応用化学群・助教
研究者番号：40453992