

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461291

研究課題名(和文)2段階モデルに基づく新規パーキンソン病マウスの確立

研究課題名(英文)Generation of the novel mouse model for Parkinson's disease derived from two-hit hypothesis

研究代表者

船山 学 (Funayama, Manabu)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70468578

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)：新規パーキンソン病(PD)モデルマウスを開発するため、ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iのサブユニットで且つPD発症感受性遺伝子であるNdufv2ヘテロノックアウトマウスの表現型であるMPTP脆弱性亢進の責任分子候補をプロテオミクス解析で17種同定した。新規常染色体優性遺伝性パーキンソン病原因遺伝子であるCHCHD2は脱共役剤処理で有意に増加することを見出した。CHCHD2ノックアウトSH-SY5Y細胞はミトコンドリア呼吸鎖複合体IVの構成タンパク質とその活性が著明に低下していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To identify the molecules related vulnerability of dopaminergic neurons to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity of NDUFV2 heterozygous knockout mice, I performed high throughput molecular profiling using isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analyses. A total of 17 proteins were identified as statistically different between wild-type and NDUFV2 heterozygous knockout mice in the midbrain of 48 hours after the MPTP administration. This results raise the possibility of discovering novel proteins related the pathogenesis of Parkinson's disease (PD). To analyze molecular phenotypes of CHCHD2, which have been reported as a novel causative gene for autosomal dominant PD, I generated CHCHD2 knockout SH-SY5Y cells using CRISPR-Cas9 system. CHCHD2 knockout SH-SY5Y cell was markedly decreased protein levels and activity of cytochrome c oxidase (Complex IV).

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ミトコンドリア パーキンソン病 電子伝達系 呼吸鎖複合体 感受性遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は主に 50-60 歳代で発症する進行性の神経変性疾患である。患者数は平成 26 年度厚生労働省患者調査によると約 16 万 3000 人と推計されており、発症率が年齢と共に上昇することから超高齢化社会を迎えた本邦において早急に克服しなくてはならない疾病の一つである。しかしながらその治療は薬物補充療法を主とした対症療法がほとんどであり、進行抑制・根治 (完治) を目指した治療は未開発である。

1980 年代初め合成麻薬の不純物である 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) によってドーパミン神経細胞死を伴う PD 様症状を呈することが発見された (Science, 1983)。MPTP はミトコンドリア機能障害作用を有することが指摘されている。また近年、遺伝性 PD の原因遺伝子である parkin や PINK1 が共にミトコンドリア品質管理を担う重要な分子であることが明らかにされた (J Cell Biol, 2010)。このように臨床的観察から分子・細胞生物学による実験的観察まで幅広い視点からミトコンドリアは PD の発症機序を理解する上で重要なオルガネラであると言える。

NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa (Ndufv2) は核ゲノムコードの遺伝子でミトコンドリア複合体 I の 24kDa のサブユニットをコードしている。Ndufv2 は PD 患者線条体で減少しており (BBRC, 1989)、さらに Ndufv2 が日本人のみならず人種を越えて PD の発症感受性遺伝子であることが複数の研究グループから報告されている (Genomics, 1998、Hum Mol Genet, 2006、Parkinsonism Relat Disord, 2010)。したがって、Ndufv2 は PD の病態を理解する上で非常に重要な分子であると言える。

このような背景から、我々は PD 発症における Ndufv2 の関与を明らかにする目的で Ndufv2 ノックアウトマウス (Ndufv2<sup>-/-</sup>) を作出した。今までに (1) Ndufv2<sup>-/-</sup>マウスは胎生致死であり、(2) Ndufv2 ヘテロノックアウトマウスは MPTP に対する脆弱性が亢進していることを明らかにした。ミトコンドリア複合体 I サブユニット遺伝子ノックアウトマウスの類似先行研究では Ndufs4-KO マウスが発表されているが (Cell Metab, 2008, PNAS, 2008)、発生過程での影響度、ミトコンドリアストレスに対する感受性、PD との関連いずれも本研究のマウスが重要であることは明らかである。また Parkin-KO など既知 PD 原因遺伝子ノックアウトマウスでも適切な PD 様表現型は見出されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では Ndufv2-KO マウスを新しい PD 動物モデルとして確立する目的で、(1) KO マウスの ES 細胞をもちいてミトコンドリア機能解析および MPP+などの薬剤投与試験を行う、(2) Ndufv2 +/-マウスの MPTP 脆弱性がどのようなメカニズムで起きているかを明らかにする、(3) Ndufv2 +/-マウスと Parkin-KO および PINK1-KO マウスを掛け合わせ表現型の有無を確認する、(4) 上記の結果および実験系を踏襲し、新規 PD マウスモデル系を確立することを目指す。

これまで遺伝性 PD の原因遺伝子改変マウスが数多く作出されてきた。しかしながらこれらのマウスのほとんどが定常状態での表現型は野生型と変わらない (J Biomed Biotechnol, 2012)。したがって遺伝子改変に加えて MPTP をはじめとする既知実験系が確立されている神経毒ならびに加齢やその他環境因子などを組み合わせた実験系によるモデルの確立が求められている (J Biomed Biotechnol, 2012)。

Ndufv2 遺伝子は既に感受性遺伝子として証明され、その遺伝子改変マウスは MPTP という神経毒に対する脆弱性が明らかとなっている。したがって、Ndufv2 マウスと既知 PD 遺伝子マウスを掛け合わせ、ミトコンドリアストレスなどを負荷することで新たな PD モデルマウスを創出することが可能である。Ndufs4-KO マウスなど、同じミトコンドリア複合体 I サブユニット遺伝子のノックアウトマウスであっても、その遺伝子が PD 患者を対象とした科学的根拠がなければ PD モデルとならないことは明らかであり、本研究の疾患感受性遺伝子をターゲティングした本マウスがいかに PD のマウスモデルとして学術的に緻密かつ独創的であるかを裏付けている。

本研究において、Ndufv2 遺伝子欠失によるミトコンドリアに対する影響と細胞死のメカニズムや MPTP に対する脆弱性を引き起こす分子メカニズムが証明されれば、見出された指標は PD 関連因子や新規 PD 治療薬並びに治療法の開発を行う上で強力なツールとして活用可能であり、未だ実現されていない PD の根治療法へつながら研究へ革新的な寄与が可能である。

## 3. 研究の方法

### 1) MPTP 投与試験

生理食塩水または生理食塩水に溶解した MPTP を野生型及びヘテロノックアウトマウス (Ndufv2<sup>+/-</sup>) に 15mg/kg の量を 2 時間おきに 4 回腹腔内投与した。

MPTP 最終投与 48 時間後に PBS を灌流し脱血し脳を摘出した。脳は大脳皮質、線条体、および中脳黒質部分を分画し種々の解析に

使用した。

### 2) iTRAQ-LC-MS/MS 解析

摘出・分画した野生型及びヘテロノックアウトマウス脳を抽出バッファー [HEPES/KOH (pH7.4), 1% NP-40, 0.1% SDS] 中でホモジナイズした。ホモジネートを isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation (iTRAQ) 試薬 (AB SCIEX Pte. Ltd., Foster City, CA) をもちいて各サンプルをラベルした後 LC-MS/MS (TripleTOFTM 5600 System, AB SCIEX) で質量分析を実施した。データ解析は ProteinPilot™ (AB SCIEX) を使用した。

### 3) ミトコンドリア阻害剤処理

SH-SY5Y 細胞に各種ミトコンドリア電子伝達系阻害剤、脱共役剤、酸化ストレスを添加し 24 時間後に細胞を回収し、Coiled-Coil-Helix-Coiled-Coil-Helix Domain Containing 2 (CHCHD2) のタンパク量をウエスタンブロット法により解析した。使用した薬剤およびその濃度はロテノン (2 µg/ml)、ミキソチアゾール (1 µM)、オリゴマイシン (5 µg/ml)、カルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン (CCCP) (10 µM)、バリノマイシン (1 µM)、過酸化水素 (250 µM) である。

### 4) CHCHD2 ノックアウト (CHCHD2 KO) 細胞の作製

HEK293 細胞および SH-SY5Y 細胞に CHCHD2 遺伝子開始コドンを選択的としたガイド RNA と FokI-dCas9 (pSQT1601) の発現ベクターを Lipofectamine® 2000 Reagent (Life Technologies) をもちいたりポフェクション法、または 4D-Nucleofector™ システム (ロンザジャパン株式会社、東京) をもちいたエレクトロポレーション法で co-transfection した。遺伝子導入 48 時間後 96 well プレートに 0.5 cells/well となるように播種した。6 well プレートに 50-80% confluent になるまで継代培養した。遺伝子変異の有無はサンガー法、リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法にて確認・検証した。

### 5) ミトコンドリア呼吸鎖複合体活性測定

野生型、SH-SY5Y CHCHD2 KO 細胞に加え、SH-SY5Y CHCHD2 KO 細胞に CHCHD2 の野生型および PD 患者から同定した変異型の発現ベクターを 4D-Nucleofector™ システムをもちいて遺伝子導入し 48 時間経過した細胞を Complex I Enzyme Activity Dipstick Assay Kit および Complex IV Enzyme Activity Dipstick Assay Kit (Abcam, Cambridge, UK) をもちいて電子伝達系複合体 I および IV の活性を測定した。

## 4. 研究成果

### 1) MPTP 投与後の脳内タンパクのプロテオミ

## クス解析

これまでの研究成果から Ndufv2 ヘテロノックアウトマウスは野生型マウスに比べ MPTP に対する感受性が亢進していることが明らかになっている。MPTP 投与後の行動試験より感受性亢進は投与後 48 時間で最大となるためこの時点のタンパク質動態をプロテオミクス解析で検討した。その結果、バイアス補正後の MPTP 投与中脳で 17 種のタンパク質が著明かつ有意に低下していることが明らかになった。これらのタンパク質は (1) イオンチャネル、(2) ニューロフィラメント、(3) エネルギー代謝、(4) アポトーシス、(5) ドーパミン合成、等に関与しており個々のヒットタンパク質について今後詳細に検討する必要がある。

### 2) CHCHD2 の病態機能解析

常染色体優性遺伝性 PD の新規原因遺伝子として CHCHD2 を単離・同定した (H26 年度新学術領域研究)。CHCHD2 はミトコンドリアに局在し、電子伝達系に関与することが示唆されている。本研究対象の Ndufv2 はミトコンドリア複合体 I のサブユニットであり、両遺伝子が機能的に関与している可能性は高いと考えられた。しかしながら CHCHD2 は遺伝性 PD の原因遺伝子であり、Ndufv2 よりも PD 発症に対する影響度は大きいことが明らかである。したがって CHCHD2 の病態機能解析を進めることが新規 PD モデルマウスの開発のために重要であると判断し、当初の計画を変更し CHCHD2 およびその変異とミトコンドリア機能の関係を明らかにするため種々の解析を進めた。

#### 2-1) ミトコンドリア阻害剤処理による CHCHD2 タンパク質への影響

これまでの報告から CHCHD2 はミトコンドリア電子伝達系に関与することが示唆されているため、培養細胞にミトコンドリアに対するさまざまな阻害剤を処理した後ウエスタンブロット法にて CHCHD2 タンパク質量の変化を解析した。その結果、CHCHD2 タンパク質は CCCP やバリノマイシンなどの脱共役剤で処理すると著明に増加することが明らかとなった (図 1)。

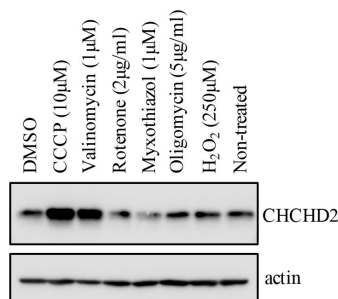


図 1. ミトコンドリア阻害剤に対する CHCHD2 タンパク質量の変化

Parkin や PINK1 など常染色体劣性遺伝

性 PD の原因遺伝子は脱共役剤処理によって機能低下したミトコンドリアを特異的に分解する反応（マイトファジー）に関与していることが報告されているが、この反応は脱共役剤処理後数分から数時間の短時間で起こる反応として知られている。CHCHD2 の脱共役剤処理による反応 8 時間から 24 時間で起こるためマイトファジーが終息した後に反応しているか、脱共役によるミトコンドリア膜電位低下に間接的に関与しているため反応に時間がかかることが考えられた。

## 2-2) CHCHD2 ノックアウト細胞作製

CHCHD2 の機能を明らかにするため CRISPR-Cas9 システムによる CHCHD2 ノックアウト細胞を作製した。作製したノックアウト細胞および野生型細胞について CHCHD2 発現量を qPCR およびウエスタンブロットで確認したところ、野生型に比べ著しく発現量が低下していることが明らかとなった（図 2 および 3）。

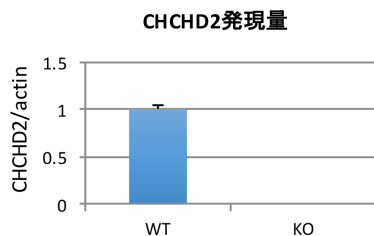


図 2. 野生型 (WT) およびノックアウト細胞 (KO) における CHCHD2 遺伝子発現量 (N=3)

さらに CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞ではミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV の構成タンパク質である COX II と COX IV タンパク質量が野生型に比べ著明に減少していることが明らかになった（図 3）。

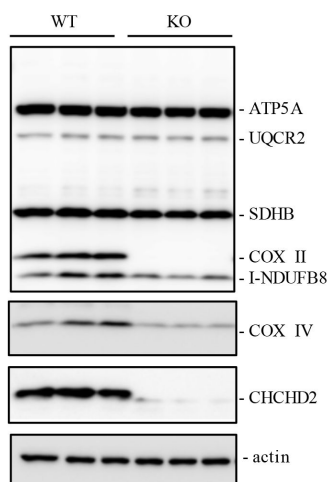


図 3. 野生型 (WT) およびノックアウト細胞 (KO) における CHCHD2 およびミトコンドリア関連タンパク質のウエスタンブロット

## 2-3) CHCHD2 ノックアウト細胞の呼吸鎖複合

## 体活性の検討

CHCHD2 ノックアウト細胞においてミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV のサブユニットタンパク質量が減少していることからその活性についても検討した。さらに CHCHD2 ノックアウト細胞に野生型 CHCHD2 および PD 患者から同定された変異を導入した CHCHD2 を 48 時間強発現させた細胞のミトコンドリア呼吸鎖複合体活性についても測定した。

その結果、呼吸鎖複合体 I はどのモデル細胞も野生型と同等の活性を有していたが、呼吸鎖複合体 IV はノックアウト細胞で明確な活性低下を見出した。しかしながらその活性低下は野生型 CHCHD2 を強発現しても回復しなかった（図 4）。

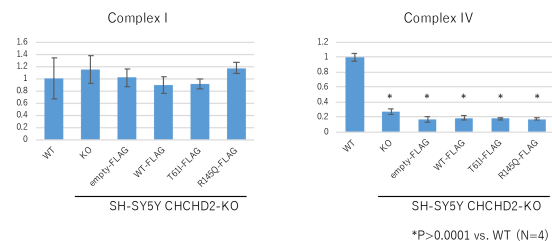


図 4. CHCHD2 ノックアウト細胞の呼吸鎖複合体 I および IV の活性

ヒト線維芽細胞において CHCHD2 遺伝子をノックダウンすると呼吸鎖複合体 IV の構成タンパク質およびその活性が低下することが報告されており (PLoS Genet 2009)、本研究において再現されたと同時にパーキンソン病細胞モデルとしてしばしば使われている SH-SY5Y 細胞において CHCHD2 ノックアウトに成功したことは *in vitro*、*in vivo* を含めパーキンソン病モデルを作製する一助となることが期待される。

ノックアウト細胞に野生型 CHCHD2 を一過性に発現させても機能回復が観察されなかったことはミトコンドリア呼吸鎖複合体のアセンブリに 48 時間以上必要である可能性が高く、今後長期発現可能なレンチウイルスベクター等を構築し機能回復可能か否かを再度詳細に検討する必要がある。

研究実施期間中に非常に重要な新発見があったことから、本研究は研究開始当初の計画から大きく変更せざるを得なかったが、ミトコンドリア電子伝達系を中心に据えたパーキンソン病の新規モデル作製という目的を達成するために多くの知見を得た。今後は本研究で得られた知見をさらに発展させ、新規パーキンソン病モデルマウスを開発することが重要である。

## 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 13 件) 全て査読有

Ogaki K, Koga S, Heckman MG, Fiesel FC,

Ando M, Labbé C, Lorenzo-Betancor O, Moussaud-Lamodière EL, Soto-Ortolaza AI, Walton RL, Strongosky AJ, Uitti RJ, McCarthy A, Lynch T, Siuda J, Opala G, Rudzinska M, Krygowska-Wajs A, Barcikowska M, Czyzewski K, Puschmann A, Nishioka K, Funayama M, Hattori N, Parisi JE, Petersen RC, Graff-Radford NR, Boeve BF, Springer W, Wszolek ZK, Dickson DW, Ross OA. Mitochondrial targeting sequence variants of the CHCHD2 gene are a risk for Lewy body disorders. *Neurology* 85(23):2016-25, 2015.

Funayama M, Hattori N. CHCHD2 and Parkinson's disease-Authors' reply. *Lancet Neurol.* 14(7):682-3. 2015.

Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Yuanzhe L, Ogaki K, Ando M, Yoshinon H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *LANCET Neurology.* 14, 274-282, 2015.

Hatano T, Funayama M, Kubo S, Mata IF, Oji Y, Mori A, Zabetian CP, Waldherr SM, Yoshino H, Oyama G, Shimo Y, Fujimoto K, Oshima H, Kunii Y, Yabe H, Mizuno Y, Hattori N. Identification of a Japanese family with LRRK2 p.R1441G-related Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 35(11):2656.e17-23, 2014.

Nishioka K, Funayama M, Vilarino-Guell C, Ogaki K, Li Y, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Kachergus JM, Cobb SA, Takahashi H, Mizuno Y, Farrer MJ, Ross OA, Hattori N. EIF4G1 gene mutations are not a common cause of Parkinson's disease in the Japanese population. *Parkinsonism Relat Disord.* 20(6):659-61, 2014.

〔学会発表〕(計 8件)

船山 学, 服部 信孝. ミトコンドリア呼吸鎖複合体に着目した新規パーキンソン病モデルマウスの解析. 第55回日本神経病理学会総会学術研究会 (2014.6.6, 東京都千代田区).

船山 学. CHCHD2 は家族性パーキンソン病の新規原因遺伝子である. 第56回日本神経学会学術大会 (2015.5.23, 新潟県新潟市).

Funayama M, Hattori N. CHCHD2 is novel

gene for autosomal dominant Parkinson's disease. 10th Annual GEPD Meeting in Tokyo (2015.10.2, 東京都港区).

船山 学, 服部 信孝. CHCHD2 は家族性パーキンソン病の新規原因遺伝子である. 第9回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (2015.10.15, 東京都品川区).

Funayama M, Hattori N. Keeping Up with New Genetic Predispositions and Mutations in

Parkinson's Disease. 5th Asian Oceanian Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress (2016.3.12, Manila, Philippines).

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: パーキンソン病の診断

発明者: 服部信孝, 船山学

権利者: 学校法人順天堂

種類: 特許

番号: 特願 2014-228827

出願年月日: 平成 26 年 11 月 11 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

船山 学 (FUNAYAMA, Manabu)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 70468578

(3)連携研究者

天羽 拓 (AMO, Taku)

防衛大学校・応用化学科・助教

研究者番号: 40453922