

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860720

研究課題名(和文) Alpha-synuclein分解におけるミクログリア-LRRK2の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of LRRK2-function in microglial alpha-synuclein clearance

研究代表者

前川 達則 (Maekawa, Tatsunori)

北里大学・医療衛生学部・助教

研究者番号：30647673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題によって、LRRK2遺伝子を持たないミクログリアではalpha-synucleinの分解が促進しており、特に細胞内への取り込みを行うエンドサイトーシスが異常な亢進状態になっていることが明らかになった。一方でalpha-synucleinの引き起こすミクログリアの炎症反応は、LRRK2遺伝子を持たないミクログリアでは低下しており、その炎症反応経路がToll様受容体4を介することが明らかになった。

本研究課題によって、LRRK2の新たな機能が明らかになったと同時に、alpha-synucleinとミクログリアを軸としたパーキンソン病病態メカニズムの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated alpha-synuclein clearance by microglia isolated from LRRK2-knockout (KO) mice and found that alpha-synuclein was taken up in larger amounts and cleared from the supernatant more effectively than from microglia isolated from wild-type (WT) mice. This higher clearance ability of LRRK2-KO microglia was thought to be ascribable to an up-regulation of early endocytotic pathway. We also analyzed TLR4-mediated TNF-alpha production by LRRK2-KO microglia upon stimulation with alpha-synuclein and found that this was decreased in comparison with WT microglia. These results indicate that LRRK2 negatively regulates the clearance of alpha-synuclein through down-regulation of the endocytosis pathway, and positively regulates the production of alpha-synuclein induced TNF-alpha production.

Our findings revealed a new functional role of LRRK2 in microglia and offer a new insight into the mechanism of Parkinson's disease pathogenesis.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：ミクログリア パーキンソン病 alpha-synuclein LRRK2

1. 研究開始当初の背景

(1) パーキンソン病 (PD) はアルツハイマー病に次いで頻度の高い老人性神経変性疾患である。中脳黒質におけるドーパミン神経細胞の脱落が原因であるが、その発症機序は未だ不明である。

(2) Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) は家族性 PD (PARK8) の原因分子として報告された分子であり、LRR、ROC、COR、kinase、WD40 ドメインを持つ [図 1]。現在までに細胞死や軸索伸長、オートファジー、エンドサイトーシスなどの生理機能に関与することが報告されている。LRRK2 は発見以来、神経細胞内での機能解明に焦点が当てられてきた。しかし、我々が LRRK2 は神経細胞だけでなく免疫系細胞にも高く発現していることを見出したことで、脳内免疫系を司るミクログリアでの機能が注目され始めた (Maekawa et al. Biochem Biophys Res Commun, 2010)。近年、ミクログリアの炎症反応が LRRK2 によってコントロールされていること、変異 LRRK2 を持ったミクログリアは、炎症性サイトカインの産生に異常をきたすことが報告された (Moehle et al. J Neurosci, 2012; Gillardon et al. Neuroscience, 2012)。このようにミクログリア-LRRK2 の機能が近年注目を集めているが、未だ不明な点も多く、さらなる解析が必要と考えられる。

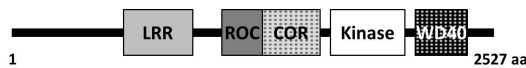


図 1 LRRK2 のドメイン構造

(3) α -synuclein (α SYN) も LRRK2 と同様に家族性 PD の原因分子である。過剰な α SYN は自身のオリゴマー化を促進し、神経細胞に毒性を与えると考えられている。また、 α SYN は細胞外に放出され、細胞間を伝播する。 α SYN は神経細胞同様にグリア細胞においても分解されるが、その分解能力はミクログリアにおいて最も高いことが明らかになっている。2009 年には、LRRK2 と α SYN のダブル TG マウスにおいて、 α SYN の誘発する病態を LRRK2 が増悪させるということが報告された (Xian et al. Neuron, 2009)。

(4) LRRK2 がミクログリアに高く発現している点、 α SYN の主要なスカベンジャー細胞がミクログリアである点、 α SYN が誘発する病態に LRRK2 が関与する点から、ミクログリア-LRRK2 と α SYN 分解の研究に着目した。ミクログリア-LRRK2 の機能に焦点を当て、PD 発症機序・病態進行をミクログリアの側面から解析することは、PD 研究に新たな知見を与えると共に、新規治療薬の開発を行う上でも非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

α SYN は過剰状態が PD を引き起こすと考えられており、ミクログリアで効率的に分解されることが明らかになっている。PD 原因分子である LRRK2 がミクログリアに高く発現していること、LRRK2 が α SYN 病態を増悪させることから、 α SYN 分解に LRRK2 が関与している可能性が考えられた。本研究では、LRRK2-ノックアウト (KO) マウスのミクログリアに α SYN を添加し、分解能力・ミクログリア機能の解析を行い、 α SYN とミクログリア-LRRK2 の関連性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ミクログリアにおける α SYN 分解能解析
LRRK2 KO マウスから初代培養ミクログリアを分離し、市販のリコンビナント α SYN タンパクを添加/非添加し、以下の項目について比較検討した。

LRRK2 の有無がミクログリアの生存率に影響を及ぼすか否かを、MTT アッセイにより解析した。

蛍光標識 microbeads を細胞に取り込ませ、蛍光顕微鏡で検出し、貪食能の解析を行った。

炎症性サイトカインの産生量を市販の ELISA-kit を用いて解析した。

(2) α SYN 分解時におけるエンドサイトーシスの解析

α SYN 添加から 24 時間後のミクログリアを、抗 Rab5 (前期エンドソーム) 抗 Rab7 (後期エンドソーム) 抗 Rab11 (リサイクリングエンドソーム) 抗体を用いて免疫蛍光染色した。染色結果を解析し、エンドサイトーシスによる取り込み機構に差があるか否かを確認した。

α SYN 添加から 24 時間後のミクログリアを、抗 LRRK2 抗体と抗 Rab5 抗体で共染色し、二つの分子が共局在しているか否かを検討した。

(3) α SYN による活性化機序の解析

α SYN が Toll 用受容体 4 (TLR4) を活性化し、炎症型ミクログリアへ誘導するという報告から、本研究においてもその経路に LRRK2 が関与するか否かを検討した。

α SYN の添加前に TLR4 の特異的阻害剤 (LPS-RS) を添加し、24 時間後の炎症性サイトカイン産生量を ELISA で測定した。

以上の実験より得られたデータを統合して、 α SYN 分解における LRRK2 の具体的な作用点とミクログリアにおける LRRK2 の役割を明らかにした。

4. 研究成果

(1) LRRK2 KO ミクログリアにおける表現型の変化

ミクログリアに対する特異的抗体 (Iba1) を用いた蛍光染色では、LRRK2 KO ミクログリアに形態的な異常がないことが明らかになった [図 2-A]。

LRRK2 KO ミクログリアにおける生存率の変化を野生型ミクログリアと比較するため、MTT アッセイを用いてミトコンドリア活性を解析した。その結果、LRRK2 KO ミクログリアでは α SYN の有無に関わらず、生存率が変化しないことが明らかになった [図 2-B]。

蛍光標識ビーズを用いた貪食能の解析では、LRRK2 KO ミクログリアは野生型ミクログリアと比較して貪食能に差がないことが明らかになった [図 2-C]。

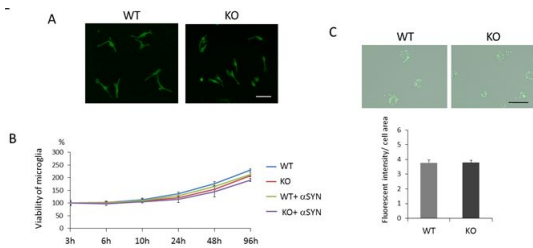


図 2 LRRK2 KO ミクログリアの表現型

(2) LRRK2 KO ミクログリアにおける α SYN 分解能の亢進

培養液中にリコンビナント α SYN を添加し、24 時間後の細胞内 α SYN 量を Western blotting で解析した。その結果、KO ミクログリアの細胞内 α SYN 量は野生型に比べ増加していることが確認された [図 3-A,B,C,D]。

上述の実験系において、各培養液中に残った α SYN を ELISA で定量した。その結果、KO ミクログリアでは野生型に比べ培養液中 α SYN が減少していた [図 3-E]。

以上の結果から LRRK2 KO ミクログリアでは α SYN の分解が促進していることが明らかとなった。

(3) LRRK2 KO ミクログリアにおけるエンドサイトーシスの異常

LRRK2 KO マウス、野生型マウスのミクログリアを各種エンドソームマーカー抗体で蛍光免疫染色した。その結果、KO ミクログリアの Rab5 (初期エンドソームマーカー) 陽性エンドソームが増加していることが明らかになった [図 4-A,B,C,D]。

前述の実験系において、膜の取り込み初期に関連する Dynamin1 との共染色を行ったところ、LRRK2 KO ミクログリアでは Rab5 と Dynamin1 の共局在率が上昇していることが明らかになった [図 5-A,B,C,D]。

以上の結果から、LRRK2 KO ミクログリアではエンドサイトーシス初期の取り込み機

構に異常があることが明らかになった。LRRK2 KO ミクログリアにおける α SYN 分解の亢進もこの経路を介している可能性が考えられた。

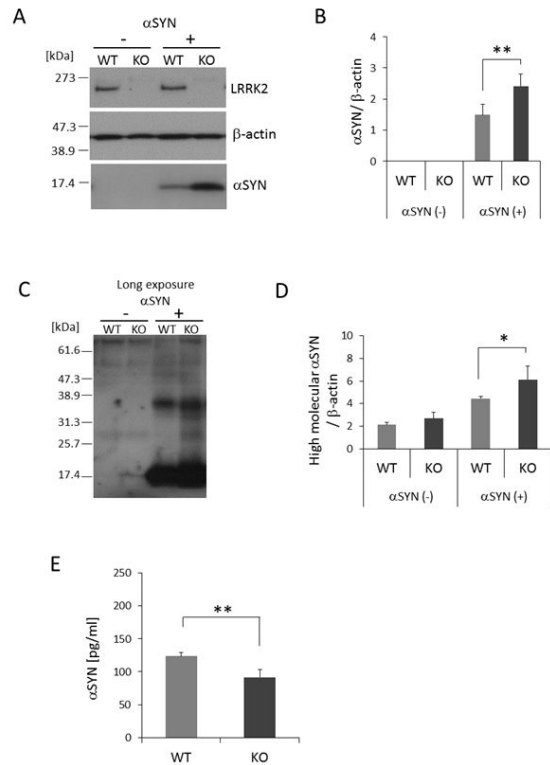


図 3 LRRK2 KO ミクログリアにおける α SYN 分解の異常

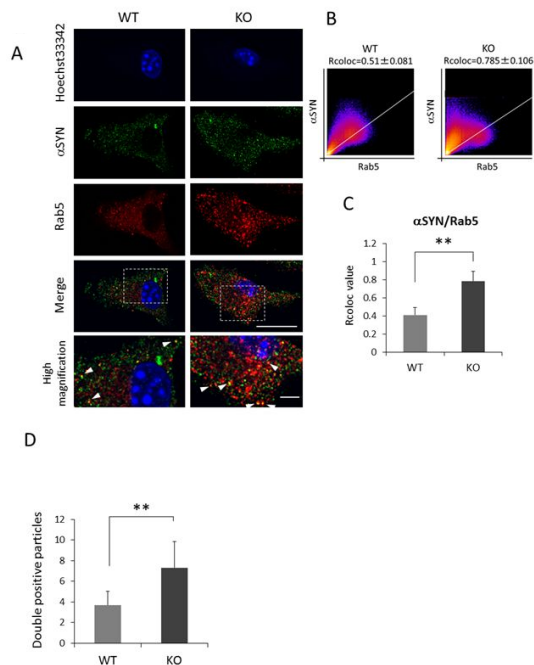


図 4 LRRK2 KO ミクログリアにおけるエンドサイトーシスの異常

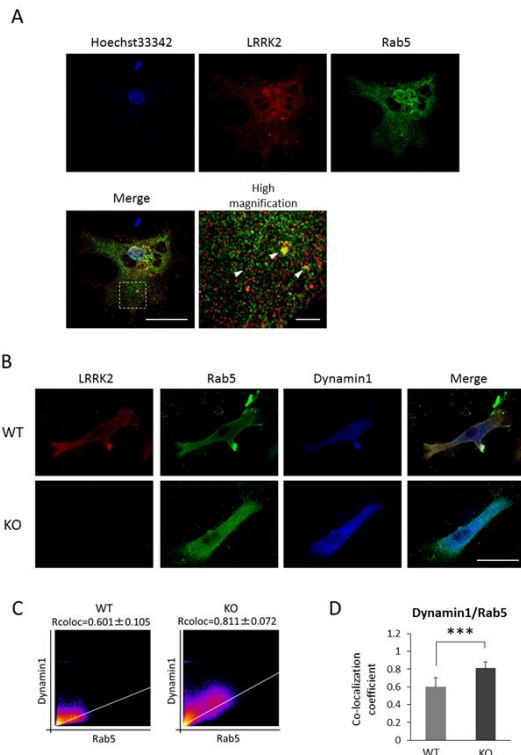


図5 LRRK2 KO ミクログリアにおけるエンドサイトーシスの異常

(4) LRRK2 KO ミクログリアにおける炎症性サイトカイン産生の異常

LRRK2 KO, 野生型マウスのミクログリアに LPS や α SYN を添加し、24 時間後の炎症性サイトカインの産生量を ELISA で測定した。その結果、KO ミクログリアでは炎症性サイトカインである TNF- α の産生が優位に減少していることが明らかになった [図 6-A,B]。

LRRK2 KO ミクログリアに見られる炎症性サイトカイン分泌の低下がどのようなシグナル経路に関連するのかを検討した。 α SYN 誘導性サイトカイン分泌への関連性が疑われた TLR4 のシグナル経路を解析するため、TLR4 阻害剤である LPS-RS を用いた実験を行った。その結果、LPS 同様に α SYN 誘導性のサイトカイン分泌が抑制された [図 6-A,B]。

以上の結果より、LRRK2 が脳内免疫を担当するミクログリアにおいて α SYN 分解に関与することが明らかになった。今後、ミクログリアにおける α SYN 分解と LRRK2 機能の作用点が詳細に明らかになれば、PD 研究や治療薬開発に大きな知見を与えることができると考えられる。

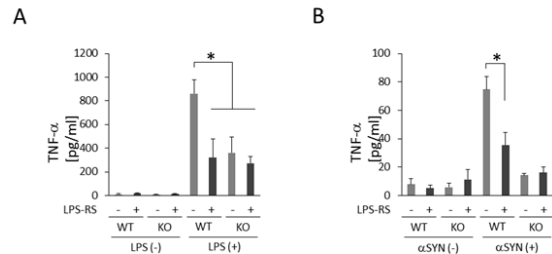


図6 LRRK2 KO ミクログリアにおける炎症性サイトカイン産生の異常

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)

Miyajima T, Ohta E, Kawada H, Maekawa T, Obata F. The mouse/human cross-species heterodimer of leucine-rich repeat kinase 2: Possible significance in the transgenic model mouse of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 査読有, 588, 2015, 142-146. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.01.003

Kawakami F, Shimada N, Ohta E, Kagiya G, Kawashima R, Maekawa T, Maruyama H, Ichikawa T. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates tau phosphorylation through direct activation of glycogen synthase kinase-3 β . *FEBS Journal*, 査読有, 281(1), 2014, 3-13. DOI: 10.1111/febs.12579

〔学会発表〕(計6件)

川島麗、雲井利亮、菅原節子、前川達則、川上文貴、石原和彦、市川尊文
「5-Fluorouracil 起因性消化管粘膜傷害に対する成分栄養剤の効果」 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 18 日 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

嶋山ひとみ、川上文貴、前川達則、山下博徳、市川尊文 「腸管粘膜防御機構における LRRK2 の機能解析」 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 18 日 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

前川達則、市川尊文、小幡文弥
「 α -synuclein 分解におけるミクログリア-LRRK2 の機能解析」 第 57 回日本神経化学会大会 2014 年 9 月 30 日 奈良県文化会館 (奈良県・奈良市)

前川達則、小幡文弥、市川尊文
「 α -synuclein 分解におけるミクログリア-LRRK2 の機能解析」 第 26 回日本神経

免疫学会学術集会 2014年9月4日 金
沢歌劇座(石川県・金沢市)

前川達則、久保誠、市川尊文、小幡文弥
「Alpha-synuclein 分解におけるミクログリ
ア-LRRK2 の機能解析」 第25回日本神経
免疫学会学術集会 2013年11月27日 海
峡メッセ(山口県・下関市)

川上文貴、川島麗、前川達則、嶋山ひと
み、石原和彦、市川尊文「LRRK2 による
GSK-3 β の活性化を介したタウのリン酸化
調節」 第86回日本生化学会大会 2013
年9月12日 パシフィコ横浜(神奈川
県・横浜市)

〔その他〕

講演

前川達則 「脳内免疫機構の破綻は神経
変性疾患発症の引き金になるのか」
第5回相模原・北里神経科学フォーラム
2014年6月23日 相模原

6. 研究組織

研究代表者

前川 達則 (MAEKAWA, TATSUNORI)

北里大学・医療衛生学部・病態生化学・助
教

研究者番号：30647673