

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461272

研究課題名(和文) NF B を分子標的としたL-ドーパ誘発性ジスキネジアの治療法開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy for L-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease targeting nuclear factor kappa b

研究代表者

森垣 龍馬 (MORIGAKI, Ryoma)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：70710565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：NF B p65サブユニットセリン276残基のリン酸化タンパク質(p65-pS276)は、正常マウス脳において線条体神経細胞の核に優位に発現していた。様々なドーパミン刺激により線条体機能分画ごとに発現パターンを形成し、機能分子として働いていた。P65-pS276はDNAに結合し転写活性を上昇させることで神経活性を誘導しており、p65-pS276を選択的に阻害するとパーキンソン病モデルマウスにおいて発症したL-ドーパ誘発性ジスキネジアを抑制した。これらの発見は、線条体における新たなシグナル伝達系を明らかにし、運動異常症の機序解明と治療法開発に寄与するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In mice brain, phosphorylation at serine 276 residue of NF B (p65-pS276) expressed predominantly in the nuclei of striatal medium spiny neurons (MSNs). Dopaminergic stimuli induced dose-dependent p65-pS276 expression pattern in differential functional compartments. This finding indicated that p65-pS276 was involved in the functions associated with striatum under the control of dopamine signaling. P65-pS276 bound to DNA and enhanced transcriptional activity. This resulted in neuronal activation of MSNs as determined by c-fos mRNA expression in these neurons. The specific inhibitor of p65-pS276 successfully alleviated L-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease mice model. These findings elucidated a new signaling cascade in the striatum, which was responsible for the mechanism in manifesting movement disorders. Targeting p65-pS276 might contribute to developing a new therapy for L-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease.

研究分野：不随意運動症

キーワード：NF B リン酸化タンパク質 線条体 機能分画 パーキンソン病 ジスキネジア 不随意運動症

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病はわが国では推計 13 万人以上の患者が存在し、10 万人に 100 ~ 150 人の有病率である。神経病理学的には黒質のドパミン産生細胞の進行性の変性が認められ、ドパミン産生細胞の投射先である線条体におけるドパミン量の低下が認められるが、詳細な発症の機序は不明である。しかし線条体を含む大脳基底核回路の異常が、パーキンソン病に伴う運動異常と密接に関連していると考えられている。ドパミン低下を補うため、病進行期ではドパミン前駆体である L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-ドーパ) 投与による内科的治療が中心となる。L-ドーパの長期繰り返し投与によって出現する合併症である L-ドーパ誘発性ジスキネジア (LIDs) は一度発症すると非常に難治であり、その詳細な発症機序解明と新たな治療方法の開発が強く望まれている。

一方、Nuclear factor kappa b (NF B) は生体にユビキタスに発現している転写因子であり、哺乳類の免疫系で広く研究されている。NF B の中でも脳内にて最も豊富に発現しているのは p65/p50 のヘテロダイマーであり、p65 は成熟した神経系においては学習や記憶に関与する。また神経系へ侵襲や神経炎症に対して活性化され、グルタミン酸、酸化ストレス、アミロイド タンパク質に対して神経保護効果を持つものに対し、虚血性脳損傷や神経変性疾患、炎症に対しては神経細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている。研究代表者は本課題応募前に、P65 のセリン 276 残基のリン酸化 (p65-pS276) が、特に線条体において恒常的に豊富な発現をしていることを発見した。このような豊富な発現様式は線条体において、p65 がセリン 276 残基のリン酸化を介して、なんらかの機能を持っていることを示唆するものであった。

2. 研究の目的

NF B (p65) がセリン 276 残基のリン酸化を通じて、脳線条体ドパミン神経伝達系においてどのような役割を持ち、また L-ドーパ誘発性ジスキネジアにどのように関与するのかを明らかにすること、そして p65-pS276 を分子標的とした治療法の可能性につき検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 正常マウス脳における p65 の発現

動物は雄性 8-10 週齢の C57/BL マウスを用いた。P65 およびセリン 276 残基のリン酸化 p65 (p65-pS276) について、それぞれに対する抗体を用いて免疫組織学的手法を用いて脳内および線条体内での発現を調べた。

(2) ドパミン刺激に対する線条体における p65-pS276 の発現に関する研究

アポモルフィン (3 mg/kg or 12 mg/kg) を投与し、p65-pS276 の線条体での発現を免疫組織学的に評価した。さらにドパミン D1 受容体 (D1R) の選択的阻害剤 SCH23390、ドパミン D2 受容体 (D2R) の選択的阻害剤 raclopride を用いて、D1R、D2R の p65-pS276 発現におよぼす影響を検討した。

(3) 線条体における p65 セリン 276 残基のリン酸化、転写に関する機序解明に関する研究

Vehicle control もしくはアポモルフィン (12 mg/kg) 投与後の脳線条体ライセートを用いて p65 の核内移行をウエスタンブロット法で、p65 の DNA B consensus sequence への結合能を TransAM™ NF- B ELISA (Active Motif, Carlsbad, CA, USA) を用いて調べた。また CBP、p65、MSK-1、MSK-2、PKAc に対する抗体を用い免疫沈降を行い、転写に関してのタンパク質相互作用やリン酸化キナーゼに関する同定を行った。

(4) P65-pS276 の発現による転写後神経活性に関する研究

P65-pS276 の発現が神経活性と関係しているかを検討するため、アポモルフィン (12 mg/kg) 投与後の組織を用いて、p65-pS276 の

発現と c-fos mRNA の発現の局在を線条体にて調べた。さらに、P65-pS276 を選択的に阻害すると報告されている small molecule inhibitor NSC-127102(1 mg/kg)を用いて、c-fos 発現を検討した。

(5)P65-pS276 抑制による L-ドーパ誘発性ジスキネジア抑制効果の検討

6-hydroxydopamine (6-OHDA)を用いた片側パーキンソン病モデルマウスを作成し、連日 L-ドーパ(6 mg/kg)を投与することで L-ドーパ誘発性ジスキネジアモデルを作成した。Alzet 社製のポンプを用いて、NSC-127102 を持続脳内投与し、24 時間後に L-ドーパ投与を行いジスキネジアを抑制するかどうか AIMs score で検討した。

4 . 研究成果

(1)P65 は脳内にほぼ一様に発現していたが、p65-pS276 は線条体に優位に発現しており、特に中型有棘細胞の核に発現していることが明らかになった。

(2)アポモルフィンを正常マウスに与えて、p65-pS276 の発現様式を脳線条体にて観察したところ、高濃度のアポモルフィン濃度で p65-pS276 の線条体での発現は有意に著名の増加を示した。一方、低用量投与(3mg/kg)では、ストリオソーム分画に優位に発現した。この所見により p65-pS276 がドパミンコントロール下に、機能分子として働いていることが明らかになった。高容量アポモルフィン投与による p65-pS276 発現の増加は SCH23390 前投与により基礎レベル以下に抑制され、D1R 刺激が必須と考えられた。また raclopride 前投与によっても有意に抑制され、D1R-D2R synergy がその誘導に重要であることが明らかになった。

(3)アポモルフィン高濃度投与は p65 の核内移動を促進せず、細胞質における I B の分解も認められなかった。免疫沈降法では p65-pS276 はアポモルフィン刺激にて、CBP をリクルートしており、転写活性を約 2 倍程

度に亢進していた。そして、従来報告されていた MSK-1 ではなく MSK-2、および PKAc によりリン酸化されていることが明らかになった。

(4)高濃度アポモルフィン刺激による

p65-pS276 発現は c-fos mRNA の発現と非常によく一致していた。アポモルフィン刺激前に NSC-127102 を投与すると、p65-pS276 の発現は有意にほぼ完全に抑制され、c-fos タンパクの発現も有意に抑制され、p65-pS276 の発現が c-fos を誘導することが明らかになった。

(5)6-hydroxydopamine (6-OHDA)による片側パーキンソン病モデルマウスを作成し、ドパミン受容体刺激を加えたところ、健側では誘導されない量の刺激で、ドパミン枯渇側の線条体では p65-pS276 の発現が強く上昇することが確認された。この結果はパーキンソン病の病態と p65 pS276 の線条体での発現上昇がなんらかの関連を持つことを示唆するものであった。そこで、最後に片側パーキンソン病モデルを用いた L-ドーパ誘発性ジスキネジアモデルに対し、NSC-127102 持続脳内投与を行ったところ、ジスキネジアはコントロール群 (vehicle 投与) では約 20%の減少であったが、NSC-127102 群では約 80% AIMs を有意に減少させた。この結果により p65-pS276 が L-ドーパ誘発性ジスキネジア治療の分子標的となる可能性を示した。以上結果は現在論文投稿準備中である。また、本研究中に発見した様々な関連所見、ジスキネジア・ジストニアに関する知見を雑誌、図書にて報告した。

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 6 件)

Morigaki R, Okita S, Goto S.

Dopamine-induced changes in Galpha-olf protein levels in striatonigral and striatopallidal

medium spiny neurons underlie the genesis of L-dopa-induced dyskinesia in parkinsonian mice. *Front Cell Neurosci* 11:26, 2017. 査読有
Morigaki R, Mure H, Kaji R, Nagahiro S, Goto S. Therapeutic Perspective on Tardive Syndrome with Special Reference to Deep Brain Stimulation. *Front. Psychiatry* 7:207, 2016. 査読有
Morigaki R, Goto S. A short commentary on globus pallidus internus deep brain stimulation in primary Meige syndrome. *J Neurol Neurophysiol* 7:405, 2016. 査読有
Morigaki R, Goto S. Putaminal mosaic visualized by tyrosine hydroxylase immunohistochemistry in the human neostriatum. *Front Neuroanat* 5;10:34, 2016. 査読有
Morigaki R, Goto S. Postsynaptic density protein 95 in the striosome and matrix compartments of the human neostriatum. *Front Neuroanat* 30;9:154, 2015. 査読有
Goto S, Morigaki R, Okita S, Nagahiro S, Kaji R. Development of a highly sensitive immunohistochemical method to detect neurochemical molecules in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues from autopsied human brains. *Front Neuroanat* 3;9:22, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

森垣龍馬、牟礼英生、大北真哉、溝淵佳史、永廣信治、宮本亮介、梶龍児、後藤惠. 脳線条体における NF B (p65/RelA) セリン 276 残基リン酸化の発現と motor stereotypy との関係. 第 17 回日本分子脳神経外科学会. 帝京大学

板橋キャンパス (東京都板橋区)

2016.8.26

森垣龍馬、宮本亮介、大北真哉、溝淵佳史、牟礼英生、永廣信治、梶龍児、後藤惠. NF B のマウス脳線条体における発現パターンとその役割. 第 55 回日本定位・機能神経外科学会. 江陽グランドホテル (宮城県仙台市) 2016. 1.23

森垣龍馬、宮本亮介、大北真哉、溝淵佳史、牟礼英生、永廣信治、梶龍児、後藤惠. Nuclear factor kappa b はマウス脳線条体においてドパミンシグナル支配下に機能する. 第 74 回 日本脳神経外科総会. さっぽろ芸術文化の館 (北海道札幌市) 2015.10.15.

森垣龍馬、大北真哉、溝淵佳史、牟礼英生、永廣信治、梶龍児、後藤惠. マウス脳線条体における Nuclear factor kappa b の機能的分子としての可能性. 第 16 回 日本分子脳神経外科学会. アクトシティ浜松コンgresセンター (静岡県浜松市) 2015.8.28.

〔図書〕(計 4 件)

森垣龍馬、後藤惠: ジストニアの脳内機序 病理所見, 内科系総合雑誌 *Modern Physician* ジストニアとジスキネジア. 目崎高広編, 新興医学出版社, 37 巻 6 号, 2017. 総ページ 531-655 (担当ページ 586-588). 査読無

Ryoma Morigaki, Satoshi Goto (2014). *Deep brain stimulation for essential tremor, Deep Brain Stimulation for Neurological Disorders*, Dr. Toru Itakura (Ed.), ISBN: 978-3-319-08475-6, Springer Cham Heidelberg Dordrecht London New York. 総ページ 1-208 (担当ページ 135-155). 査読有

森垣龍馬、梶龍児: 不随意運動症の内科的治療. 高橋良輔編. *アクチュアル*

脳・神経疾患の臨床. パーキンソン病と運動異常. 中山書店, 2013. 総ページ 1-514 (担当ページ 64-70). 査読有
森垣龍馬、梶龍兒: 不随意運動. 飯森眞喜雄、内山真一郎、片山容一、岸本年史、水澤英洋編. 神経・精神疾患診療マニュアル. 日本医師会雑誌, 142(2), 2013. 総ページ 1-362 (担当ページ 95-96). 査読無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森垣 龍馬 (MORIGAKI, Ryoma)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号: 70710565

(2) 研究分担者

後藤 恵 (GOTO, Satoshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任教授

研究者番号: 50240916

(3) 連携研究者

梶 龍兒 (KAJI, Ryuji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号: 00214304