

課題番号 18

パーキンソン症候群誘導薬ロテノンが神経細胞アポトーシスを誘発する分子メカニズムの検討

[1] 組織

代表者：富並 香菜子

(東北大学大学院歯学研究科)

対応者：家村 顕自

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

洪 光 (東北大学大学院歯学研究科)

工藤 忠明 (東北大学大学院歯学研究科)

石垣 寛高 (東北大学大学院歯学研究科)

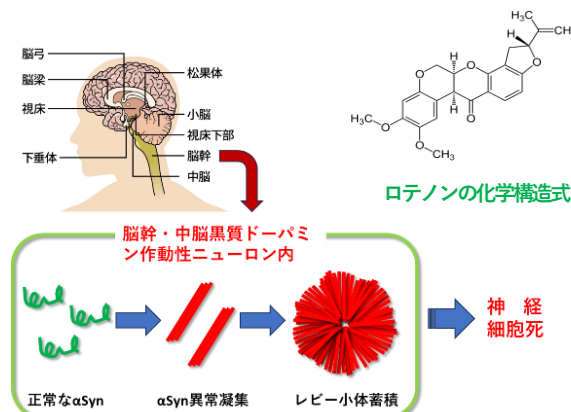
研究費：物件費 13 万円

[2] 研究経過

パーキンソン病(PD)は、安静時振戦、筋固縮、動作の鈍化、姿勢の不安定性などの主要症状を特徴とする神経変性疾患であり、脳幹にある中脳黒質の神経細胞(※随意運動の制御に関与)が変性を起こし、神経伝達物質であるドーパミンの量が不足することで発症するといわれる(図1)。PDの発症には、ミトコンドリア機能障害や α シヌクレインと呼ばれるタンパク質の凝集に関連すると考えられているが、その分子機構については不明な点が多く、現在においても根治的治療法は見つかっていない(図1)。

近年、ロテノンという物質を使用したパーキンソン病のモデル動物が作成され、パーキンソン病の病因解明の研究がされている。ロテノンは、主に植物の根や茎から得られる脂溶性の天然化合物で、かつては殺虫剤として使用されていた強い毒性を持つ物質である(図1)。ドーパミン作動性ニューロンの変性や運動障害を特徴とするパーキンソン様表現型を誘発させることから、ラット実験モデルにも適用されている。ロテノンは、ミトコンドリア呼吸鎖(MRC)の複合体Iの強力な阻害剤として作用し、ATP合成を制限する他、活性酸素種(ROS)の生成を引き起こす。このロテノン誘発性のROS生成によるミトコンドリアDNAの損傷は、最終的にはアポトーシスにつながる可能性がある(Heinz et al. 2016)。しかしながら、ロテノンの神経毒性が、細胞死を誘導するメカニズムの詳細については、多くが未だ不明であり、パーキンソン病の病因解明をさらに進めていく上で、ロテノンがいかなる分子機構により細胞毒性を発揮するのかを検討する必要がある。

そこで本研究では、細胞死誘導実験系ならびに神経分化モデルとして様々な研究に用いられてきた、神経分

図1. パーキンソン病・ α シヌクレイン(α Syn)とロテ

化モデルのラット副腎髄質由来PC12細胞株を使用する。PC12細胞では、ロテノン誘導性にアポトーシスが引き起こされたり、 α

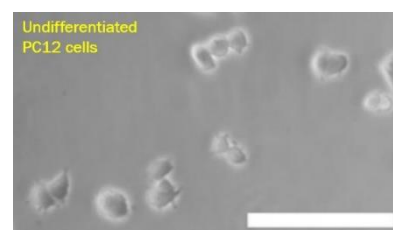


図2. ラットPC12細胞株の位相差顕微鏡

シヌクレインの発現量が上昇したり凝集することも知られており、パーキンソン病モデル細胞としての実績がある(Lin et al. 2017)。申請者らは以前に、精密な温度刺激や電磁場刺激を適用することで、PC12細胞(図2)に神経突起形成を誘導させる神経細胞分化モデルを確立しており(Kudo et al. 2013, 2015, 2020)、本研究ではこれらの知見を基に、ロテノン依存性細胞死誘導の分子メカニズム解明を目指す。

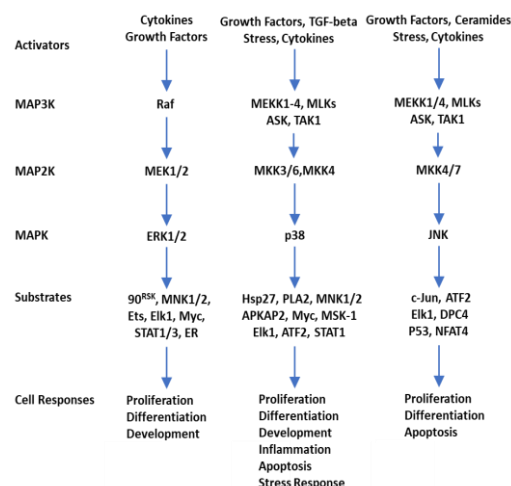


図3. MAPKスーパーファミリーシグナル伝達経路

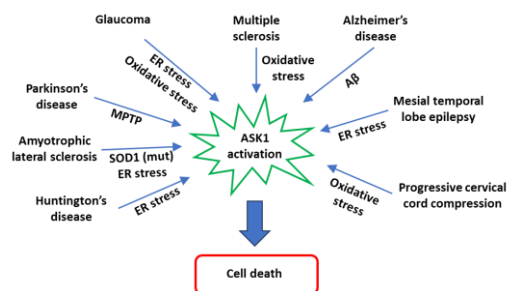


図4. ASK1 と各種神経変性疾患

本研究計画では、具体的には、ロテノン依存性神経細胞死に ASK1 シグナル伝達経路が仲介すると仮定し、ロテノンの神経細胞への投与がアポトーシス等の神経細胞死を誘導する条件下において、ASK1 自身の活性化や下流に位置するシグナル伝達分子（JNK や p38 等の MAPK 分子群）のタンパク質リン酸化酵素活性および下流遺伝子(図 3)の発現レベル等(いかなる影響を及ぼすかについて統計学的に評価する。ASK1 は MAP (Mitogen-activated protein) キナーゼ経路(図 4)の MAP3K という上段に位置する。ASK1 は細胞内タンパク質リン酸化酵素であり、活性酸素などの細胞にとってストレスとなる刺激によって活性化され、下流の MAP2K、MAPK の活性化を通じて、主に細胞のアポトーシスや分化を誘導する。

また、図4のようにパーキンソン病の他、緑内障や、アルツハイマー病など様々な病気について、ASK1 が活性化して細胞死を引き起こすことに関与すると考えられている。この背景の下、本年度は、ロテノン研究を推進するため、ロテノンを用いた PC12 細胞死やその抑制に関する基本的な技術的検討とその客観的な確立を中心に行った。研究打合せは、研究期間中、毎月（オンライン会議およびメール会議を含む）実施した。

〔3〕 成果

（3－1）研究成果：

申請者らの研究グループは、ロテノン依存性の PC12 細胞の細胞死を位相差画像で評価する上で、ASK1 阻害剤の使用濃度に関する基礎的な検討をおこなった。同時に細胞のバイアビリティを評価するための CCK8 の基礎的な実施条件の検討を行った。また、これまでの申請者らの研究グループにおいて実施し独自に取得していた PC12 細胞の全ゲノム情報をラットの標準的なゲノム情報と比較し、PC12 細胞の遺伝的な特徴を解析した。以下に方法と結果をまとめる。

〔方法〕

PC12 細胞株を 10 cm 培養皿にて培養し、増殖後、24 穴プレートに播種した細胞には、様々な条件下で細胞増殖を誘導した。ASK1 の阻害剤である NQDI-1 を様々な濃度条件で添加後、培養を継続し、位相差像を取得し、経時的な NQDI1 の影響を、細胞数などのデ

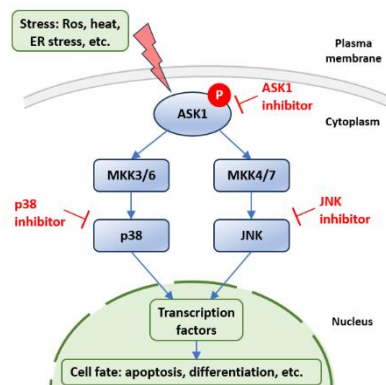


図5 ASK1 シグナル伝達経路と各種阻害剤

ータ解析により検討した。CCK8 アッセイは応用範囲の広い汎用的な細胞バイアビリティ評価のためのアッセイであるが、ロテノンによる細胞死は急速に進むことから、ロテノンの影響を適切に評価できるように初期播種細胞数や培養期間について文献等を活用しインシリコ解析を行った。

〔結果〕

ロテノン依存性の PC12 細胞の細胞死を位相差画像で評価する上で、ASK1 阻害剤の NQDI-1 の濃度条件の検討を行ったところ、著名な細胞毒性は確認されなかった。しかし濃度によっては阻害剤の結晶化・沈着が認められる場合があり、今後この点については他の ASK1 阻害剤を導入しさらに最適な実験条件の検討を実施する予定である。また、ロテノン依存性の PC12 細胞の細胞死を評価する上で、CCK8 アッセイの実施における最適条件の検討も行った。さらに、PC12 細胞のゲノム解析を行い、PC12 細胞のゲノムが有する特徴の一つとして、既に Perkin 遺伝子と Pink1 遺伝子にも変異があることを確認した。これらの遺伝子はミトコンドリアの機能異常に関連が深いことから、今後申請者らが PC12 細胞を神経細胞死のモデル細胞として使用する上で、こうした点について考慮した解析が必要であることが示唆された。

（3－2）波及効果や発展性など：

本共同研究では、ロテノンが PC12 細胞のアポトーシスを誘導するシグナル伝達経路の一端を解明することを目指している。これにより、本研究で得られる細胞レベルの研究結果が、ロテノン誘導性パーキンソン病モデルマウスにおける、いわゆるパーキンソン症候群の発症メカニズムの研究に応用されることが考えられる。このように、本研究は、パーキンソン病の病因解明に向けた研究の更なる発展に貢献し、パーキンソン病予防のための戦略立案において全く新たな選択肢ができるような研究成果を得られることが期待される。

〔4〕 成果資料

特になし