

助成番号 27-2-12

加齢とパーキンソン病に関する研究

大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学

木村 康義

1. 諸言

パーキンソン病は日本で 15～20 万人以上、世界で約 600 万人が罹患していると推定される進行性の神経変性疾患である。動作緩慢や歩行障害などの進行性の運動症状に加えて、多彩な非運動症状や認知機能障害・精神症状により、罹患者の生命予後や健康寿命を制限するだけでなく、介護負担を高め医療経済をも強く圧迫するため、発症機序の解明や治療法の確立は喫緊の課題である。加齢は孤発性パーキンソン病の最大の発症リスク要因かつ症状進行に影響する疾患修飾要因であるが、両者をつなぐ分子基盤や機構については、未解明の部分が多い¹⁾。

パーキンソン病では黒質緻密部のドパミン産生ニューロンを中心とする神経変性脱落や、 α シヌクレインを主要構成成分とするレビー小体・レビーニューライトという異常封入体が認められ、その病理が進展することがヒトの剖検脳の解析から報告されている²⁾。本研究では、ドパミン代謝に関わる Dopa-decarboxylase (Ddc, 別名 Aromatic L-amino acid decarboxylase : Aadc) 産生ニューロンの新規蛍光レポーターマウス³⁾を用い、その老齡マウスやパーキンソン病モデルマウス作製技術などにより、中脳黒質・腹側被蓋野の Ddc 産生ニューロンに加齢が与える影響や、加齢のパーキンソン病モデルに与える影響を解析することで、加齢とパーキンソン病の関連を解析する。本研究は、加齢がドパミン産生ニューロンに与える影響や加齢による神経脆弱性を明らかにすることで、病態基盤の解明や治療薬開発につながる意義がある。

2. 方法

ドパミン産生ニューロンなどのカテコラミン産生ニューロンで発現している Ddc 遺伝子に、赤色の蛍光蛋白である hKO1 を CRISPR/Cas9 を用いてノックインした、新規のレポーターマウス (Ddc-hKO1 マウス) を用いて研究を行った。胎生期から 3 ヶ月齡の Ddc-hKO1 マウスでは、赤色蛍光の発現が Ddc の発現に忠実に沿うこと、黒質・腹側被蓋野領域では Ddc-hKO1 陽性神経の約 95% がチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 陽性のドパミン産生ニューロンであることが確認されている³⁾。

最初に、老齢マウスでも Ddc-hKO1 の発現がみられることを確認した。

次に、FACS-RNAseq 法により、若年マウスと老齢マウスの黒質・腹側被蓋野における Ddc 陽性/陰性細胞の遺伝子発現プロファイルを比較した。具体的な方法は次の通りである。若年（約 3 ヶ月齢）と老齢（約 2 歳齢）の Ddc-hKO1 マウスの脳を全身麻酔下で採取し、95%酸素で飽和させた冷却した Hibernate A 溶液に回収した。95%酸素飽和下の解剖用溶液内でマイクロダイセクションにより黒質・腹側被蓋野領域を切り出した。切り出した黒質・腹側被蓋野領域を、パパイイン、DNaseI、ディスパーゼ II を含む単一分散様溶液内におき 37 度で処理し、自作した径約 40 μm のガラスピペットで単一分散した。得られた細胞を、溶液 A (20mM HEPES、40 mg/mL BSA、10% D-(+)-トレハロース、RNase 阻害剤) に懸濁し、40 μm のストレイナーでフィルター処理した後、遠心して溶液 B (0.9M スクロース、10% D-(+)-トレハロース、RNase 阻害剤) に再懸濁し、溶液 A で洗浄処理後に細胞ソーティング用の溶液に懸濁した。得られた懸濁液を FACS AriaIII で hKO-1 陽性細胞と陰性細胞に分取した。解析に十分な細胞数を得るため、2 つの脳から得られた細胞を統合して Isogen に回収した。以上の工程により、若年・hKO1 陽性、若年・hKO1 陰性、老齢・hKO1 陽性、老齢・hKO1 陰性の 4 群のサンプルを得た。得られた細胞から RNA を抽出し、BioAnalyzer で品質確認後に、次世代シーケンサー (NovaSeq 6000) を用いて 100 bp ペアリード・1,000 万リード/サンプルで遺伝子発現の解析を行った。

次に、パーキンソン病疾患モデルの一つであるロテノン全身投与モデルを作出し、上述の FACS-RNAseq 法により若年・老齢マウスのドパミン産生ニューロンの脆弱性を検討した。ロテノンは Complex I を阻害するミトコンドリア毒素であり、齧歯類への皮下ポンプを用いた持続投与を行うと、行動異常および α シヌクレイン病理を含むパーキンソン病病理を呈するため、パーキンソン病モデルの作出に用いられる⁴⁾。若年および老齢（約 18 ヶ月齢）の Ddc-hKO1 マウスの皮下に埋め込み式輸液ポンプを手術的に埋め込み、ロテノンまたは生理食塩水を 1 カ月間持続投与した後、黒質・腹側被蓋野領域の hKO1 陽性および陰性細胞を FACS で分取し、RNAseq により遺伝子発現変化を解析した。

また、網羅的な遺伝子解析実験で得られた結果を検証するために、無処理の若年マウス、老齢マウスおよびロテノン/生食持続投与を行った若年・老齢マウスの脳組織を採取し、4% PFA 固定および凍結で保存した。

3.結果

Ddc-hKO1 マウスにおいて、hKO1 の赤色蛍光は報告されている Ddc の発現パターンを忠実に再現し、2 歳齢の老齢マウスにおいても発現が認められることを確認した (図 1)。

次に、老齢マウスにおいても若年マウスと同様に、FACS により hKO1 陽性・陰性細胞が分取できることを確認した (図 2)。

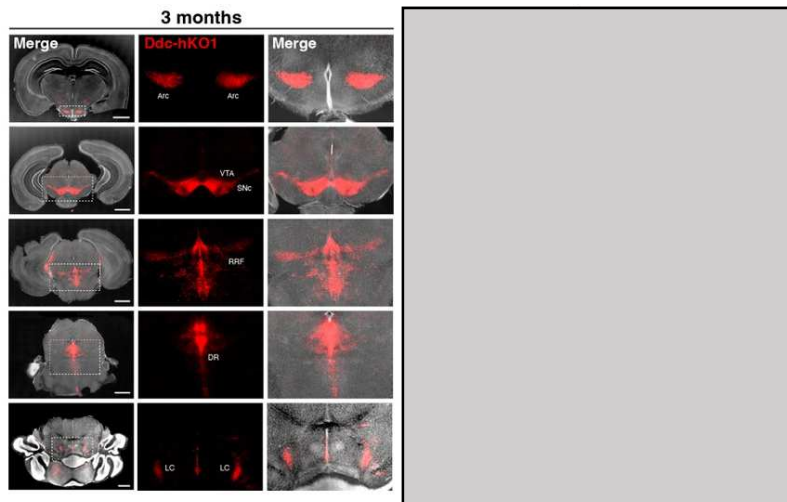


図 1 Ddc-hKO1 マウスにおける hKO1 の発現パターン

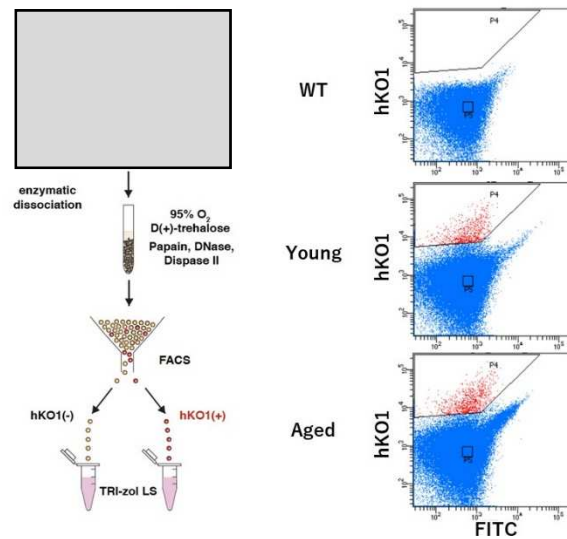


図 2 若年および老齢マウスの FACS ソーティング

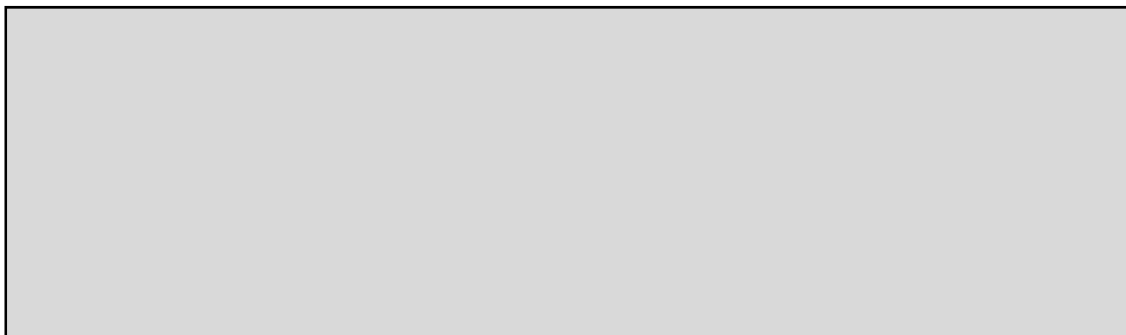


図 3 加齢による Ddc-hKO1 陽性細胞の遺伝子発現変化

False discovery rate (FDR) 0.05 未満かつ Fold change (FC) 2 以上を有意とし、発現上昇を赤色のプロット、発現低下を青色のプロットで示す。

FACS-RNAseq の解析では、hKO1 陽性群と陰性群で有意な遺伝子発現変化を認め、得られた細胞群が目的の細胞集団であることを確認した。加齢に伴う遺伝子発現プロファイルの変化は、hKO1 陰性の細胞と比較して陽性細胞で顕著であった。hKO1 陽性細胞は主にドパミン産生ニューロンであるため、ドパミン産生ニューロンは加齢による影響をより受けやすいことが示唆された。

ロテノン慢性投与モデルは、最初の実験では老齢マウスを中心に手術後や投与期間中に個体死亡がみられたため麻酔条件や投与条件を調整し、若年マウス・老齢マウスともにロテノン投与群、生食投与群の Ddc-hKO1 陽性・陰性細胞を分取した。分取した細胞の解析を進めている。

4.考察

加齢はパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患の最大のリスク要因であるが、加齢がどのように病態や特定の神経細胞の脆弱性に影響を与えるかについては、まだ十分解明されていない。本研究では、新規のレポーターマウスである Ddc-hKO1 マウスを用いて、加齢の影響を解析した。

最初に、老齢マウスにおいても Ddc-hKO1 の発現は予想通りのパターンを示し、また、若年マウスと同様に 2 歳齢のマウスからも FACS により目的の細胞集団を得ることができていることを確認した。以上から、Ddc-hKO1 マウスが加齢の研究において有用であることを示した。また、Ddc-hKO1 陽性神経細胞はマイクロダイセクションで得る部位により、アセチルコリン系やカテコラミン系のニューロンを得ることも可能なため、今後異なる神経集細胞群の解析にも有用と考えられた。

FACS-RNAseq の結果から、加齢は Ddc 陽性ニューロンの遺伝子発現に強く影響を与えることが示唆された。ドパミン産生ニューロンは、ドパミン代謝による酸化ストレスなど、加齢による影響を受けやすいと考えられることと一致する。現在、GO 解析などの解析を進めるとともに、注目する遺伝子発現産物について取得済みの組織を用いた検証を進めている。

また、ロテノン持続投与を行った若年・老齢マウスから解析に必要な Ddc-hKO1 陽性・陰性細胞を得ている。若年または老齢、ロテノン投与または生食投与、hKO1 陽性または陰性の計 8 群で N=3~4 のサンプルの RNA シークエンシングを行っており、上述の結果と合わせて、加齢による Ddc 陽性神経応答の変化について解析を進める。

1 年の研究期間においては確定的な結論は得られていないが、今後の解析により加齢によりドパミン産生ニューロンで特に影響を受ける経路・機構や、若年と老齢マウスでのロテノンへの応答性の違い、また既に解析済みである若年 Ddc-hKO1 マウスの PFF 投与モデルでの hKO1 陽性ニューロンの応答とロテノンへの反応性の違いを照合することで、病態

における重要な機構や治療標的が明らかとなることが期待される。

5.結語

Ddc-hKO1 マウスが加齢の研究に有用であることが示唆された。また、加齢が黒質・腹側被蓋野のDdc陽性ニューロンに影響を与えることが示唆された。得られた結果については、組織染色などの手法による検証が待たれる。また、ロテノン持続投与パーキンソン病モデルでの実験については、進捗途中であり併せて今後解析を進めたい。

6.文献

- 1) 木村康義, 望月秀樹. 加齢と神経疾患 : パーキンソン病. Clin Neurosci. 2021; 39(1): 87-90.
- 2) Goedert, M., Spillantini, M., Del Tredici, K., Braak H. 100 years of Lewy pathology. Nat Rev Neurol. 2013; 9: 13-24.
- 3) Sheng KY, Hayakawa H, Baba K, Kimura Y, Mochizuki H, Nakano T, et al. Establishment of dopaminergic neuron purification system in mice for the Parkinson's disease study. [preprint, Research square 2021 doi.org/10.21203/rs.3.rs-296465/v1]
- 4) Miyazaki I, Isooka N, Imafuku F, Sun J, Kikuoka R, Furukawa C, et al. Chronic Systemic Exposure to Low-Dose Rotenone Induced Central and Peripheral Neuropathology and Motor Deficits in Mice: Reproducible Animal Model of Parkinson's Disease. Int J Mol Sci. 2020; 21(9): 3254.

7.成果発表

本研究結果は報告時点で学会・論文発表前である。

関連する総説として、以下を発表している

木村康義, 望月秀樹. パーキンソン病講座 パーキンソン病の分子病態. 難病と在宅ケア. 2022; 27(12): 53-57.