アストロサイトの亜鉛関連分子を標的としたパーキンソン病治療戦略

宮崎 育子^{*a}, 浅沼 幹人^{*b}

パーキンソン病 (PD) は、黒質線条体路のドパミン神経の脱落により無動/寡動、静止時振戦、筋強剛などの運動症状を発現する進行性の神経変性疾患である。PD では、これら運動症状を発現する数十年以前より、嗅覚異常や起立性低血圧、便秘などの非運動症状を呈する。病理学的には、 α -シヌクレインを主要構成成分とする封入体 Lewy 小体、Lewy neurite の出現が中枢神経系のみならず末梢神経系においても認められる。現在のところ、PD の基本治療は L-DOPA、ドパミンアゴニスト、モノアミン酸化酵素阻害薬等によるドパミン補充・補充により運動症状を改善するものであり、神経変性を抑制する神経保護薬の開発が求められている。アストロサイトは、神経環境の維持に重要な役割を果たすとともに、抗酸化分子の産生、神経栄養因子の分泌および神経毒性分子の取り込みによって神経保護効果を発揮する。我々は、酸化ストレスに曝されると、アストロサイトが抗酸化分子であるメタロチオネイン (MT)-1/2 を発現・分泌し、ドパミン神経を保護することを報告した。MT はシステイン残基に富んだ金属結合タンパク質で、とくに亜鉛の調節因子として重要な働きを担う。さらに、MT は銅との結合能が高いことから銅による α -シヌクレイン凝集促進を抑制することが報告された。本稿では、アストロサイトにおける MT 発現を標的とした PD における神経変性に対する新たな治療戦略の可能性について概説する。

キーワード：アストロサイト、メタロチオネイン、パーキンソン病、神経保護、腸管神経系

1. はじめに

パーキンソン病 (PD) は、無動・寡動、静止時振戦、筋強剛、姿勢保持障害などの運動症状や、便秘、嗅覚障害、起立性低血圧などの非運動症状を呈する神経変性疾患である。これまで孤発性 PD の主病変は選択的な黒質ドパミン神経の消失と考えられてきたが、現在では中枢神経系のみならず消化管神経叢や心臓の交感神経終末など末梢自律神経系をも侵しうる全身病と考えられている。現在のところ、PD の基本治療は L-DOPA によるドパミン補充やドパミンアゴニストにより運動症状を改善する対症療法であり、ドパミン神経の変性機序の解明、神経変性を抑制する神経保護薬の開発が課題となっている。アストロサイトは、神経環境の維持に重要な役割を果たすとともに、様々な抗酸化分子を発現誘導し、神経保護効果を発揮する。亜鉛調節を行う金属結合タンパク質メタロチオネイン (MT)-1/2 はアストロサイトで発現し、強力な抗酸化作用を有する。本稿では、アストロサイトにおける MT 発現に着目した PD における神経変性に対する神経保護の治療戦略につながる試みを紹介する。

2. PD の神経病態

PD の病理学的特徴は、黒質緻密部のドパミン神経の脱落と残存する神経細胞に認められる α -シヌクレインを主要構成成分とする細胞質内封入体 Lewy 小体である。Braak らは Lewy 小体、Lewy neurite の出現分布を剖検脳で検討し、PD の病理変化が迷走神経背側運動核、嗅球から始まり、中脳、扁桃核へと上行し、病勢の進行とともにやがては大脳皮質へと広がるという Braak 仮説を提唱した¹⁾。その後、PD 患者の腸管神経叢において中枢神経系に先行して Lewy 小体を伴う変性脱落がみられることが報告された²⁾。また、Orimo らは、脊髄交感神経節細胞の変化に先行して、交感神経終末の Lewy neurite を伴う変性が生じること、交感神経節後線維の脱落がみられる症例が、後に PD の運動症状を呈するようになることを報告している³⁾。これらの所見に加え、胎児黒質組織の移植を受けた PD 患者の剖検脳で、移植片の神経細胞内に Lewy 小体が検出されたこと^{4,5)}、 α -シヌクレインがプリオン様に細胞間伝播することが報告されたことから^{6,7)}、現在、PD は α -シヌクレイン凝集を伴っ

た神経変性が末梢神経系から中枢神経系へと進行する全身の神経疾患と考えられている。

3. PD と酸化ストレス

酸化ストレスは、PD を含む様々な神経変性疾患に関与する。ドパミン神経における酸化ストレスには、ドパミンのモノアミンオキシダーゼによる代謝過程において生成する活性酸素種 (ROS) と小胞外の遊離ドパミンの自動酸化によって生成されるドパミンキノンなどが関与する⁸⁾。通常、ドパミンはシナプス小胞内では安定に存在しているが、シナプス小胞外に遊離したドパミンは自動酸化により、あるいはシクロオキシゲナーゼなどの酵素反応によりドパミンキノンに変換される^{9,10)}。ドパミンキノンはドパミントランスポーターやチロシン水酸化酵素などの様々な機能タンパク質のシステイン残基に結合し (キノプロテイン生成)¹¹⁻¹⁴⁾、それらのタンパク質の機能障害を引き起こすだけでなく、ミトコンドリア機能障害、炎症、ユビキチン・プロテアソーム系の機能障害など様々な細胞障害機構に関与することから、ドパミン神経特異的酸化ストレスとして注目されている⁸⁾。したがって、ドパミン神経はそれ自身が含有するドパミンから引き起こされる酸化ストレスに常時曝露されており、他の神経細胞よりも脆弱な細胞と考えられる。

4. 亜鉛関連分子 MT の抗酸化作用

MT は、1 分子あたり 20 基ものシステイン残基を含む低分子の金属結合タンパク質で、亜鉛や銅などの金属に結合し、これら金属の恒常性維持や金属毒性の解毒に関与するとともに、フリーラジカル消去作用、抗炎症作用を有する¹⁵⁾。MT には、MT-1~4 の 4 つのアイソフォームが存在し、MT-3 は脳に比較的多く存在するが、MT-1/2 は脳を含むほとんどの臓器で発現する最も多いアイソフォームである¹⁵⁾。我々は、電子スピン共鳴法により、MT-1 がドパミンセミキノンを直接消去することを捉えた¹⁶⁾。その消去作用は、脳における抗酸化分子として最もよく知られているグルタチオンよりも約 100 倍強力であった。また、ドパミン系神経細胞である CATH.a 細胞を亜鉛処置することにより MT 発現を誘導すると、ドパミン添加により生成されるキノプロテイン量が減少し、細胞生存率の低下が抑制されることを報告した¹⁶⁾。さらに、MT-1/2 ノックアウトマウス、野生型マウスの右側線条体に 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を注入し作製した PD モデルに L-DOPA を反復投与したところ、MT-1/2 ノックアウトマウスでは線条体のドパミンキノン量が有意に増加し、ドパミン神経終末が著しく変性脱落したが、野生型マウスでは影響が認められなかった¹⁶⁾。このことから、MT-1/2 はドパミンキノン毒性を減弱し、ドパミン神経保護作用を発揮することが考えられた。

5. アストロサイトの MT 発現誘導によるドパミン神経保護

MT-1/2 は神経細胞に直接作用し、神経保護効果をもたらすが、神経細胞における MT-1/2 発現量は極めて低く、主

にアストロサイトで発現誘導される¹⁷⁾。我々は、6-OHDA の右側線条体注入により作製した片側 PD モデルマウスの障害側線条体アストロサイトにおいて、MT-1/2 発現が著明に増加していることを報告した¹⁸⁾。実際、PD 患者脳においても MT-1/2 はアストロサイトに特異的に発現している¹⁹⁾。Chung らは、脳損傷において MT-1/2 がアストロサイトで特異的に発現誘導され、細胞外に分泌された MT は神経細胞にある LDL 受容体ファミリーに属するタンパク質メガリンに結合し、神経細胞内へと取り込まれ、神経保護作用を発揮することを報告している^{20,21)}。我々は、酸化ストレスとして過剰なドパミンに曝露すると、アストロサイトがドパミントランスポーターを介してドパミンを取り込み、その結果、転写因子である nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) の核内移行が促進され、MT-1/2 のプロモーター領域にある antioxidant responsive element (ARE) への結合が高まることで MT-1/2 発現が誘導され、細胞外に分泌されることを報告した¹⁸⁾。また、SD 系ラット胎仔 (胎生 15 日齢) 中脳からの初代培養神経細胞を、あらかじめドパミンで処置したアストロサイト培養液で前処置することによって、酸化ストレス曝露によるドパミン神経障害が減弱され、この保護効果は抗 MT-1/2 抗体による中和によりキャンセルされた。これらの結果より、ドパミン添加によってアストロサイトから細胞外に分泌された MT-1/2 がドパミン神経保護効果をもたらすことが明らかとなった¹⁸⁾。したがって、アストロサイトにおける MT-1/2 発現を誘導する薬剤がドパミン神経保護薬となりうると思われる。さらに我々は、アストロサイトにおける MT-1/2 発現を誘導する薬剤について検討し、セロトニン 1A (5-HT1A) 受容体フルアゴニストである 8-OH-DPAT が、アストロサイト上に存在する 5-HT1A 受容体を介して Nrf2 の核内移行とそれに続く MT 発現誘導・分泌を促進し、酸化ストレスに対してドパミン神経保護作用を示すことを報告した²²⁾。また、8-OH-DPAT で処置すると、アストロサイトで発現するカルシウム結合タンパク質 S100 β が細胞外に分泌され、それによりアストロサイト自体の増殖が促進されることがわかった。さらに、6-OHDA の右側線条体注入により作製した PD モデルマウスに、8-OH-DPAT を連日腹腔内投与すると、黒質ドパミン神経の変性脱落が抑制された²²⁾。そこで我々は、5-HT1A 受容体アゴニスト活性をあわせもつ PD 治療薬であるドパミンアゴニストのロチゴチンも 8-OH-DPAT と同様にアストロサイトの 5-HT1A 受容体に作用し、ドパミン神経保護効果を発揮する可能性を考え、検討を行った²³⁾。ロチゴチンはアストロサイトの 5-HT1A 受容体を介して Nrf2 系抗酸化機構を賦活し、線条体アストロサイトにおける MT-1/2 発現を誘導し、ドパミン神経保護作用をもたらした²³⁾。これらの知見は、アストロサイトの 5-HT1A 受容体がドパミン神経保護のターゲットになりうることを示すものである²⁴⁾。

6. 腸管グリア細胞における MT 発現およびその役割

腸管神経系は中枢神経系と同様に神経-グリア関

存在し、腸管アストロサイト様グリア細胞が抗酸化分子を発現し、腸管神経を保護することが報告されている²⁵⁾。我々は、PDの環境要因の一つとして考えられる農薬ロテノンをMT-1/2ノックアウトマウス、野生型マウスに4週間慢性皮下投与し、腸管神経系における神経変性とMT-1/2の保護効果について検討した²⁶⁾。野生型マウスでは、ロテノン投与により、GFAP陽性腸管グリア細胞におけるMT-1/2発現が有意に増加した。MTノックアウトマウスでは、野生型マウスと比べてロテノン曝露による腸管Auerbach筋間神経叢の脱落が有意に増悪した²⁶⁾。これらの結果は、腸管神経系において腸管グリア細胞が発現するMTが腸管神経保護に働くことを示す。また、我々は、C57BL系マウスに低用量ロテノンを4週間慢性皮下投与することにより、黒質-線条体路ドパミン神経のみならず、腸管Auerbach筋間神経叢の変性脱落と α -シヌクレインの発現増加が認められる中枢・末梢神経系でのPD病態を再現できるモデルを確立した。このモデルでは、腸管グリア細胞の障害もみられた²⁷⁾。また、SD系ラット胎仔(胎生15日齢)腸管からの初代培養神経・グリア細胞に低用量ロテノンを48時間曝露すると、腸管グリア細胞毒性とそれに伴ったMT-1/2発現の減少が認められ、腸管神経細胞死が惹起された²⁷⁾。これらの結果より、ロテノンは腸管グリア細胞の機能障害とくにMT発現低下を引き起こし、腸管神経障害をもたらすと考えられる。また、コーヒー成分のポリフェノールで抗酸化作用を有するコーヒー酸、クロロゲン酸を、この低用量ロテノン慢性皮下投与によるPDモデルマウスにロテノン曝露の1週間より曝露期間中にかけて連日経口投与すると、黒質ドパミン神経および腸管筋間神経叢の変性・脱落が有意に抑制された²⁷⁾。腸管初代培養細胞を用いた検討により、コーヒー酸、クロロゲン酸がロテノンによる腸管グリア細胞毒性とMT発現低下を阻止したためと考えられた²⁷⁾。

これらの結果より、PDにおける腸管神経系先行性の神経障害に対しても、腸管グリア細胞におけるMT発現を誘導することが神経保護にはたらく可能性が示唆された。

7. MTと α -シヌクレイン

α -シヌクレインは、シナプス前神経終末に多く存在し、シナプス機能調節に重要な役割を果たすと考えられている²⁸⁾。また、Ludtmannらは、 α -シヌクレインモノマーがミトコンドリアのATP合成酵素 α サブユニットに結合し、ATP合成とミトコンドリア機能を高めることを報告している²⁹⁾。一方、 α -シヌクレインの凝集・蓄積および伝播は、PDにおける神経障害の重要な要因として注目されている。銅は、ミトコンドリアのエネルギー変換、神経伝達物質の合成、細胞シグナル伝達などの重要なプロセスに関与する複数の酵素の触媒中心として不可欠な元素であるが^{30,31)}、近年、銅が α -シヌクレインの凝集を促進することが報告された³²⁾。銅は加齢に伴って脳に蓄積するが、PD患者脳では銅の恒常性が破綻していると言われている。PD患者の黒質ではニューロメラニンに結合した銅がむしろ減少しており³²⁾、このことは遊離した銅の増加を示唆する。実際、PD患者の脳脊髄液中の銅の濃度は増加している³³⁾。Roseらは、コンピュータシミュレーションを用いて銅と α -シヌクレイン間の相互作用を検討し、銅が α -シヌクレインと結合してタンパク質のミスフォールディングを引き起こすことを示した³⁴⁾。MTは銅に高い親和性を有し、銅と結合することで α -シヌクレインの凝集を抑制することが報告されており³⁵⁾、MTは α -シヌクレインの凝集を抑制する内在性因子としても注目されつつある。

8. 結語

アストロサイトは中枢神経系における抗酸化防御機構を担っており、特に強力な抗酸化作用、ドパミンキノン消

図1 メタロチオネインによるドパミン神経保護

去作用を有する MT の発現誘導は、ドパミン神経保護の標的となり得る。さらに、MT の金属結合能は銅を介した α -シヌクレイン凝集を抑制しうることから、MT は抗酸化作用に加え、 α -シヌクレイン凝集・伝播阻止により PD における神経保護効果をもたらすと予想される。我々が示した 5-HT1A アゴニスト活性をもつ薬剤によるアストロサイトにおける MT 発現誘導およびドパミン神経保護は、これまで低下したドパミン機能の補完という対症療法が主体であった PD 治療において、神経変性の抑制という新たな治療戦略をもたらすことが期待される (図 1)。また、5-HT1A アゴニストは、様々な抗酸化分子の発現を誘導するマスター転写因子である Nrf2 を活性化することから、その保護効果はドパミン神経に限るものではない。さらに、腸管神経系においても、腸管グリア細胞が発現する MT が腸管神経保護にはたらくことから、5-HT1A アゴニストは腸管神経系においても神経保護効果を発揮する可能性がある。今後、既存薬の中から、5-HT1A アゴニスト活性を有する薬剤をスクリーニングすることで drug repositioning による新規神経保護薬の開発が期待される。

著者の利益相反：宮崎 育子、浅沼 幹人（大塚製薬株式会社）。

文 献

- 1) Braak H, et al. *Neurobiol Aging*. 2003;24:197-211.
- 2) Braak H, et al. *Neurosci Lett*. 2006;396:67-72.
- 3) Orimo S, et al. *Brain*. 2008;131:642-650.
- 4) Kordower JH, et al. *Nat Med*. 2008;14:504-506.
- 5) Li JY, et al. *Nat Med*. 2008;14:501-503.
- 6) Desplats P, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:13010-13015.
- 7) Lee HJ, et al. *J Biol Chem*. 2010;285:9262-9272.
- 8) Miyazaki I, et al. *Acta Med Okayama*. 2008;62:141-150.
- 9) Graham DG. *Mol Pharmacol*. 1978;14:633-643.
- 10) Tse DC, et al. *J Med Chem*. 1976;19:37-40.
- 11) Kuhn DM, et al. *J Neurochem*. 1999;73:1309-1317.
- 12) LaVoie MJ, et al. *Nat Med*. 2005;11:1214-1221.
- 13) Whitehead RE, et al. *J Neurochem*. 2001;76:1242-1251.
- 14) Xu Y, et al. *J Neurosci Res*. 1998;54:691-697.
- 15) Penkowa M. *FEBS J*. 2006;273:1857-1870.
- 16) Miyazaki I, et al. *FEBS Lett*. 2007;581:5003-5008.
- 17) Aschner M. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;825:334-347.
- 18) Miyazaki I, et al. *Glia*. 2011;59:435-451.
- 19) Michael GJ, et al. *Neurogenetics*. 2011;12:295-305.
- 20) Chung RS, et al. *J Biol Chem*. 2008;283:15349-15358.
- 21) Chung RS, et al. *Neuroscience*. 2004;123:595-599.
- 22) Miyazaki I, et al. *Neurobiol Dis*. 2013;59:244-256.
- 23) Isooka N, et al. *Neurochem Int*. 2020;132:104608.
- 24) Miyazaki I, et al. *Curr Med Chem*. 2016;23:686-700.
- 25) Seguela L, et al. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2019;12:555-564.
- 26) Murakami S, et al. *Neurotox Res*. 2014;26:285-298.
- 27) Miyazaki I, et al. *Cells*. 2019;8:221.
- 28) Longhena F, et al. *Int J Mol Sci*. 2019;20:141.
- 29) Ludtmann MH, et al. *J Neurosci*. 2016;36:10510-10521.
- 30) Baker ZN, et al. *Metallomics*. 2017;9:1501-1512.
- 31) D'Ambrosi N, et al. *Neurochem Int*. 2015;90:36-45.
- 32) Davies KM, et al. *Neurobiol Aging*. 2014;35:858-866.
- 33) Pall HS, et al. *Lancet*. 1987;2:238-241.
- 34) Rose F, et al. *Sci Rep*. 2011;1:11.
- 35) Okita Y, et al. *Front Neurosci*. 2017;11:114.

著者プロフィール

宮崎 育子（みやざき いくこ）

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 脳神経機構学分野、講師、博士（医学）。

◇1997 年岡山大学薬学部卒業、2000 年岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門助手、2001 年岡山大学大学院医歯薬学総合研究科神経情報学分野助手（助教）、2015 年同脳神経機構学分野助教、2020 年～同講師。

浅沼 幹人（あさぬま まさと）

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 脳神経機構学分野、教授、博士（医学）。

◇1988 年岡山大学医学部医学科卒業、1992 年岡山大学大学院医学研究科修了、1994 年（財）長寿科学振興財団リサーチレジデント、1995 年岡山大学医学部助手、1996～1998 年米国国立保健研究所（NIH）、NIDA 分子神経精神学部門に留学、2000 年岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門助教授、2001 年岡山大学大学院医歯薬学総合研究科神経情報学分野助教授（准教授）、2014 年～同脳神経機構学分野教授。

◇研究テーマ：パーキンソン病の病態解析と神経保護・修復、神経疾患の治療標的としてのアストロサイトの役割の解明、内分泌攪乱物質の母胎暴露が産児脳発達に及ぼす影響、一次繊毛の神経伝達・神経病態における役割の解明、乱用薬物の神経毒性。

Therapeutic strategy for Parkinson's disease: targeting zinc-binding protein in astrocytes

Ikuko Miyazaki, Masato Asanuma

Department of Medical Neurobiology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Abstract. Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disease with motor symptoms, such as tremor, akinesia/bradykinesia, rigidity and postural instability due to a loss of nigrostriatal dopaminergic neurons; PD patients also exhibit non-motor symptoms, such as hyposmia, orthostatic hypotension and constipation, which precede motor symptoms. Pathologically, Lewy bodies and neurites, which contains α -synuclein, are observed in the central and peripheral nervous system. To date, it is hypothesized that PD pathology appears first in the olfactory bulb and the enteric nervous system, and propagates progressively through the substantia nigra to finally reach the cerebral cortex. Major medications at present are nosotropic treatments to improve motor dysfunction in PD. Therefore, development of disease-modifying drug is required to slow or prevent PD progression. Astrocytes are known to play an important role in the maintenance of the neuronal environment and exert neuroprotective effects by production of antioxidants and neurotrophic factors and clearing toxic molecules. In the previous study, we demonstrated that astrocytes produced antioxidative molecules metallothionein (MT)-1/2 in response to oxidative stress and protected dopaminergic neurons against oxidative stress. MTs are cysteine-rich proteins possessing antioxidative properties. MTs bind to metals such as zinc (Zn) and copper (Cu) and function in metal homeostasis and detoxification; MTs regulate Zn-mediated transcriptional activation of various genes. Recently, it is reported that MTs prevent Cu-induced aggregation of α -synuclein. In this article, we review a new therapeutic strategy of neuroprotection in PD by targeting MTs in astrocytes.