

称号及び氏名 博士(理学) 榎田 くみこ

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 31 日

論 文 名 Involvement of nitric oxide/reactive oxygen species signaling via
8-nitro-cGMP formation in 1-methyl-4-phenylpyridinium
ion-induced neurotoxicity in PC12 cells and rat cerebellar granule
neurons
(PC12 細胞及びラット小脳顆粒細胞の
1-methyl-4-phenylpyridinium ion 誘発性神経毒性における
8-nitro-cGMP を介したレドックスシグナル伝達の関与)

論文審査委員 主査 居原 秀
副査 八木 孝司
副査 佐藤 孝哉
副査 原 正之

PC12 細胞及びラット小脳顆粒細胞の 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) 誘発性神経毒性における 8-nitro-cGMP を介したレドックスシグナル伝達の関与

梶田 くみこ(分子生物学)

【研究背景】

パーキンソン病は、ふるえ、筋肉の硬直などの症状を示す神経変性疾患であり、中脳黒質ドーパミン神経細胞の変性により線条体でのドーパミン放出が減少することによって生じる。パーキンソン病に関する多くの研究が進められているが、原因は未だ明らかにされておらず、現時点で根治治療薬も見出されていない。1983 年に合成麻薬生成時の不純物として発見された 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) は、パーキンソン病モデル動物の作成に多用されており、活性代謝物である 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) が、ヒトやげっ歯類にパーキンソン様症状を引き起こす原因物質として知られている。MPP⁺は中脳黒質のドーパミン分泌細胞内に侵入後、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I の活性を抑制することにより、活性酸素 (O₂) を産生させ、細胞死をもたらす。これまでに MPTP 誘発性神経毒性の作用機構がいくつか報告されている。神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) との関連性として、ラット小脳顆粒細胞 (CGNs) やヒト神経芽細胞の MPP⁺による毒性発現には、nNOS 由来の活性酸素種 (ROS) が関与すること、nNOS ノックアウトマウスでは、ワイルドタイプと比べて MPTP 誘発性神経毒性が緩和すること、nNOS 阻害剤である 7-Nitroindazole は MPTP 誘発性神経毒性に対して保護効果を示すことが報告されている。しかしながら、MPP⁺による毒性発現メカニズムの詳細は明らかにされていない (Fig. 1)。

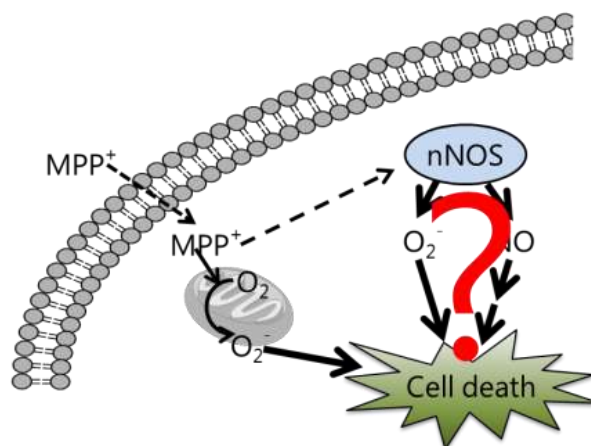


Fig. 1 MPP⁺による毒性発現メカニズム

一方、NO と ROS に依存して産生される新規のセカンドメッセンジャー、8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-nitro-cGMP) が発見され、新しいシグナル伝達機構として NO/ROS レドックスシグナルについての解析が進められている。8-Nitro-cGMP はタンパク質のシステイン残基に cGMP 構造を付加する S-グアニル化と呼ばれる新規のタンパク質翻訳後修飾作用を有し、シグナル伝達関連タンパク質を修飾することで、さまざまな生理作用に関与することが明らかにされつつある (Fig. 2)。近年、当研究グループは、心筋細胞または神経細胞において、H-Ras を S-グアニル化し、活性化することで Ras/ERK シグナルを活性化させ、細胞障害を誘導することを明らかにした。

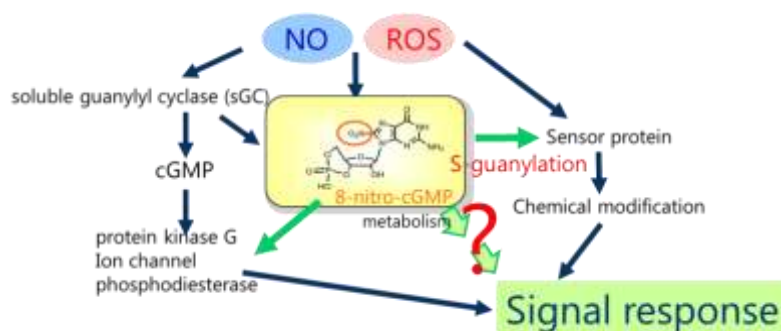


Fig. 2 NO/ROS レドックスシグナル伝達機構

本研究では、パーキンソン病における神経毒性メカニズムの解明につなげるため、MPP⁺による神経毒性とレドックスシグナル伝達の関与について検討した。

【方法】

- nNOS 発現 PC12 細胞における MPP⁺誘発性細胞毒性評価:
ラット脳よりクローニングした nNOS 遺伝子を組み込んだレンチウイルスを PC12 細胞に感染させ、nNOS 恒常発現 PC12 (NPC12) 細胞を作製した。細胞毒性評価は MTS アッセイ及びアネキシン V 結合アッセイにより行った。
- NPC12 細胞における MPP⁺誘発性 ROS 産生:
細胞内 ROS と反応する蛍光色素 ジハイドロエチジウム (DHE) を用いた蛍光顕微鏡検査により、NPC12 細胞を MPP⁺で処理した時の ROS 産生量を調べた。
- ラット CGNs における MPP⁺誘発性細胞毒性評価:
7 から 10 日齢の Wister ラットから CGNs を調製し、MTS アッセイ法により細胞毒性評価を行った。
- 各種阻害剤の MPP⁺誘発性細胞毒性への影響:
nNOS 阻害剤である L-NAME、ROS 捕捉剤である Tiron 及びグアニル酸シクラーゼ (sGC) の阻害剤である NS2028 を用いて、NPC12 及びラット CGNs を MPP⁺で処理したときの細胞毒性への影響について調べた。
- NPC12 細胞及びラット CGNs における MPP⁺誘発性 8-nitro-cGMP の産生:
8-nitro-cGMP 特異的マウスモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、各細胞を MPP⁺で処理したときの 8-nitro-cGMP の産生量を調べた。
- 活性化 Ras/ERK シグナル経路の関与:
NPC12 細胞及びラット CGNs を MPP⁺で処理後、活性化 H-Ras を回収する Ras-pulldown アッセイを行い、S-グアニル化タンパク特異的抗体、H-Ras 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。また、H-Ras の下流にある ERK の活性化を、リン酸化 ERK 抗体を用いたウェスタンブロッティングで評価した。さらに MAPK キナーゼ (MEK) の阻害剤である PD98059 を用いて、NPC12 細胞及びラット CGNs を MPP⁺で処理したときの細胞毒性への影響について調べた。

【結果】

nNOS には脳内において異なる発現プロファイルを示すスプライズバリエーション nNOS- α 及び nNOS- μ が存在し、以前我々は nNOS- α と nNOS- μ では、NO 産生活性はほぼ等しいが、アンカップリング反応によるスーパーオキシド産生量に差があることを見出している。MPP⁺誘発性細胞毒性と ROS との関係性を確認するために、ROS 産生量が異なる nNOS- α 及び nNOS- μ それぞれの発現 PC12 細胞を作製した。nNOS- α 並びに nNOS- μ 発現 PC12 細胞に対する MPP⁺による細胞毒性を MTS アッセイで評価したところ、いずれの nNOS 発現細胞においても、正常 PC12 細胞に比べて細胞生存率は有意に減少し、さらに nNOS- μ 発現細胞よりも nNOS- α 発現細胞で強い細胞毒性が認められた。同様に MPP⁺で処理したときのアポトーシスを示す細胞数の割合をアネキシン V アッセイで調べたところ、nNOS 発現 PC12 細胞におけるアポトーシスの割合は

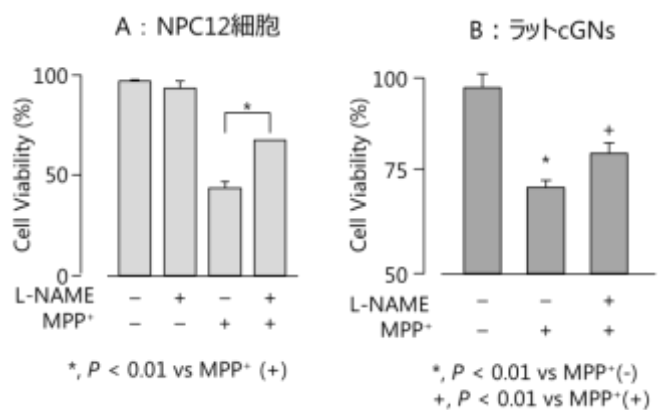


Fig. 3 nNOS 阻害剤 (L-NAME) の MPP⁺誘発細胞毒性への影響

正常 PC12 細胞よりも高く、nNOS- μ 発現 PC12 細胞よりも nNOS- α 発現 PC12 細胞の方がアポトーシスの割合は高いことが確認された。このことから、nNOS が MPP⁺による細胞毒性を増悪させていることが明らかとなり、特に nNOS- α 発現 PC12 細胞で強い細胞毒性が誘発されていることが確認された。MPP⁺による細胞毒性が生じる条件下における ROS 産生の関与を調べたところ、DHE を用いた蛍光顕微鏡検査において、正常 PC12 細胞では MPP⁺処理による ROS 産生量の増加は認められなかったが、nNOS- α 並びに nNOS- μ 発現 PC12 細胞では、MPP⁺処理により蛍光強度の増加が認められた。ROS 産生量は nNOS- μ 発現 PC12 細胞よりも nNOS- α 発現 PC12 細胞で明らかに高かったことから、MPP⁺誘発性細胞毒性は ROS 産生量に依存して増悪することが示された。また、nNOS- α 発現 PC12 細胞(NPC12 細胞)を MPP⁺と nNOS 阻害剤である L-NAME、ROS 捕捉剤である Tiron 及び、NO/cGMP シグナル伝達に関与している sGC の阻害剤である NS2028 を共処理したところ、いずれにおいても細胞毒性が軽減されたことから、MPP⁺誘発性細胞毒性には nNOS、ROS 及び sGC が関与していることを確認できた (Fig. 3A)。MPP⁺は神経細胞であるラット CGNs に対しても、NPC12 細胞同様に濃度依存的に細胞毒性を誘発し、その細胞毒性には nNOS 並びに sGC が関連していることが明らかとなった (Fig. 3B)。

ここまでの結果から、MPP⁺による細胞毒性発現メカニズムには、NO/ROS レドックスシグナル経路 (Fig. 2) が大きく関わることを示され、NO と ROS 産生に依存して産生される 8-nitro-cGMP の関与が推察された。そこで、NPC12 細胞及びラット CGNs を MPP⁺で処理したときの 8-nitro-cGMP の産生量を免疫染色法で解析したところ、両細胞で明らかな MPP⁺誘発性の 8-nitro-cGMP の産生が認められた。8-nitro-cGMP は H-Ras を活性化することで Ras/ERK シグナル (Fig. 4) を活性化し、MAPK シグナルの活性化は神経細胞死に関与することから、MPP⁺による細胞毒性においても、Ras/ERK シグナル経路が関与すると考えられた。MPP⁺誘発性細胞毒性と H-Ras の関与を調べるため、MPP⁺処理をした NPC12 細胞及びラット CGNs の Ras-pulldown アッセイを行ったサンプルを用いて、活性化 H-Ras 及び S-グアニル化された H-Ras をウェスタンブロットティングで確認したところ、活性化 H-Ras の増加と活性化 H-Ras の S-グアニル化が認められた (Fig. 5)。次に H-Ras 下流の MAP キナーゼである ERK の活性化を解析したところ、MPP⁺処理により ERK の活性化が確認できた。さらに、NPC12 細胞及びラット CGNs を H-Ras 下流の MEK 阻害剤である PD98059 と MPP⁺で共処理すると、ERK のリン酸化が抑制され、細胞毒性も軽減された。以上の結果から、MPP⁺誘発性細胞毒性には MAPK シグナル伝達が関与していることが明らかとなった。

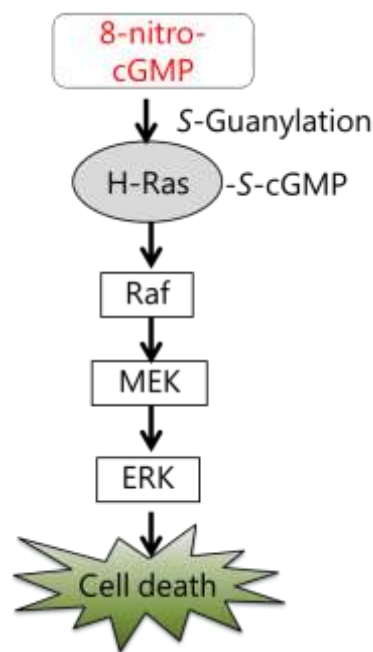


Fig. 4 活性化 Ras/ERK シグナル経路

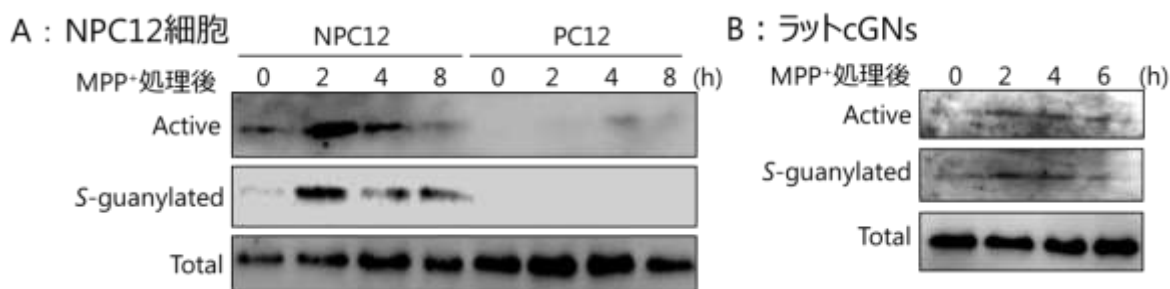


Fig. 5 MPP⁺誘発性細胞毒性と H-Ras の関与

【まとめ】

MPP⁺による細胞毒性はPC12細胞と比較してnNOS- α またはnNOS- μ 発現PC12細胞でより強く認められた。nNOS依存性細胞毒性の増強効果はnNOS- μ 発現PC12細胞よりnNOS- α 発現PC12細胞(NPC12細胞)で強く、さらにnNOS阻害剤及びROS捕捉剤により消失したことから、増強効果にはnNOS由来のROSが関与していることが示された。ラットCGNsにおいてもMPP⁺の濃度依存的な細胞毒性が認められた。MPP⁺により誘発されたNPC12細胞及びラットCGNsの細胞毒性はnNOS阻害剤及びsGC阻害剤により軽減されたことから、MPP⁺による細胞毒性はNO/ROSレドックスシグナル伝達機構が関与していることが示された。さらにMPP⁺誘発性細胞毒性では、8-nitro-cGMP産生量の増加、H-Rasの活性化及びS-グアニル化、並びにERKの活性化が認められ、MEK阻害剤によりERKのリン酸化が抑制され細胞毒性も軽減した。

以上の結果から、MPP⁺誘発性神経毒性とNO/ROSレドックスシグナル伝達の関連性とまとめるとFig. 6のようになる。MPP⁺により活性化したnNOSは、NOとROS産生を誘導しsGCの活性化により8-nitro-cGMPを産生し、8-nitro-cGMPはH-RasをS-グアニル化することで活性化させ、活性化H-RasはRafと複合体を形成し、その下流にある細胞死経路の1つであるMEK/ERKシグナルを経由して、細胞死を誘導すると考えられた。今回、MPP⁺誘発性の神経毒性には、NO/ROSレドックスシグナル伝達の下流分子である8-nitro-cGMPが関与し、活性化Ras/ERKシグナル経路を介して細胞死を誘導することが新たに確認された。本研究はパーキンソン病の発現メカニズム解明の発展に寄与し、神経毒性発生時における8-nitro-cGMPの作用を抑制することで、パーキンソン病の治療及び予防にもつながることが期待される。

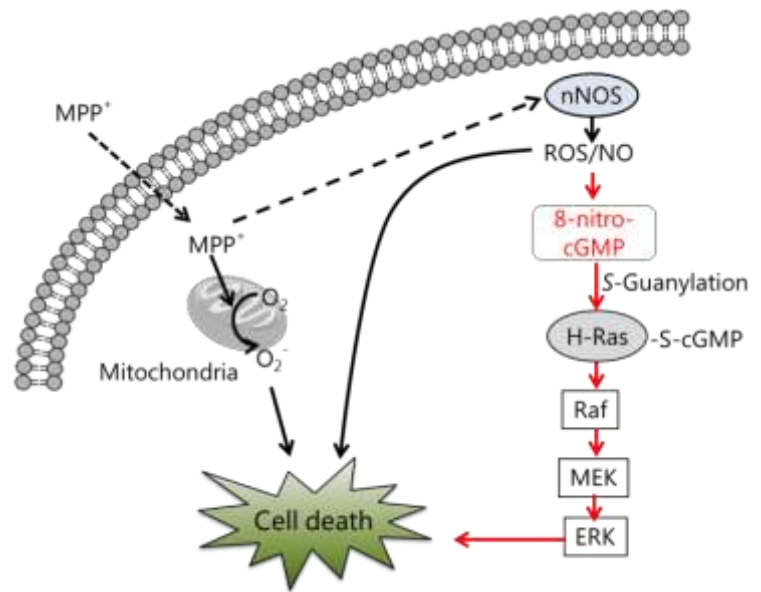


Fig. 6 MPP⁺誘発性神経毒性におけるレドックスシグナル制御

【業績】

- Involvement of nitric oxide/reactive oxygen species signaling via 8-nitro-cGMP formation in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons, Kumiko Masuda, Hiroyasu Tsutsuki, Shingo Kasamatsu, Tomoaki Ida, Tsuyoshi Takata, Kikuya Sugiura, Motohiro Nishida, Yasuo Watanabe, Tomohiro Sawa, Takaaki Akaike, Hideshi Ihara, Biochem Biophys Res Commun, 495, 2165-2170 (2018)
- (参考) Involvement of nitric oxide/reactive oxygen species signaling in MPP⁺-induced neurotoxicity, 2012年 第6回 Asian Society of Toxicology 国際学会にてポスター賞受賞

2 学位論文審査結果の要旨

本学位論文は、パーキンソン病の発病メカニズムとして、レドックスシグナルに着目した研究である。パーキンソン病は、ふるえ、筋肉の硬直などの症状を示す神経変性疾患であり、多くの研究が進められ、活性酸素種（ROS）や一酸化窒素（NO）の関与が報告されている。しかしながら、発病の原因は未だ明らかにされておらず、現時点で根治治療も見出されていない。本研究では、パーキンソン病様症状を引き起こす原因物質として知られている 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) による毒性発現機構を NO 合成酵素 (NOS) 恒常発現細胞、ラット小脳顆粒神経細胞 (CGNs) 初代培養系を用いて検討し、NO/ROS レドックスシグナルが関与する新たなシグナル経路を明らかにしている。

近年、NOS の下流で、NO/ROS レドックスシグナル経路が明らかにされ、セカンドメッセンジャーとして 8-nitroguanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-nitro-cGMP) が同定されている。本研究では、神経系株化細胞である PC12 細胞、ラット初代培養神経細胞 CGNs を用いて、MPP⁺ 誘発性の神経毒性に NOS 由来の ROS が関与していること、その下流で 8-nitro-cGMP が産生されることを明らかにしている。さらに、8-nitro-cGMP が、低分子量 GTP 結合タンパク質である H-Ras を翻訳後修飾、活性化し、下流の Erk のリン酸化などを介し細胞毒性を誘発していることを明らかにした。これらの結果は、MPP⁺ 誘発性の神経毒性において、8-nitro-cGMP 産生を介した NO/ROS シグナルが関与していることを示す世界で初めての研究成果である。

上記の研究成果は、パーキンソン病の発現メカニズム解明の発展、さらには、新規治療・予防薬の開発に貢献することが期待される。研究内容は、詳細な実験に基づいて論理的に結論が導かれており、学位授与に値する内容であると認められた。

学位論文審査委員会

委員長 准教授 居原 秀

教授 佐藤孝哉

教授 原 正之

教授 八木孝司