

神経変性疾患におけるリン酸恒常性の理解と制御

岐阜薬科大学薬物治療学研究室

位田 雅俊

(研究目的)

本研究の目的は、神経細胞におけるリン酸トランスポーター・SLC20A2 の機能解明およびリン酸恒常性の制御機構を明らかにし、最終的には Neurovascular Unit (NVU) におけるリン酸恒常性の制御を介した神経変性疾患の予防・治療法の開発である。

飽食の現代、加工食品の普及や食の欧米化による過剰なリン酸の摂取はリン酸恒常性の破綻を導き、生活習慣病や肥満などの発症に大きく寄与する。これまでのリン酸恒常性に関する研究は、主に血管石灰化を対象に行われてきた。近年の食生活の急激な変化や超高齢化社会の我が国において、メタボリックシンドロームをはじめ、高血圧、糖尿病、脂質異常症や慢性腎不全などの疾患において引き起こされる血管石灰化の発症機序の解明や治療法の開発が期待されている。さらに上記の疾患だけではなく、リン酸恒常性が神経変性疾患の発症に大きく関与することも示唆されるようになってきたが、詳細な機序は不明である。またこのような中で、リン酸トランスポーターの研究も盛んにされてはいるが、それは腸管や腎臓における研究が主であり、脳さらに NVU における研究は世界でもない。

近年、神経変性疾患のひとつで脳にだけ石灰化が起きる特発性基底核石灰化症 (IBGC) の遺伝子研究により、リン酸を細胞内へ取り入れる SLC20A2 が原因遺伝子として同定された。申請者は脳内 SLC20A2 局在を検討し、神経細胞と血液脳関門 (BBB) をまとめりとして考える NVU に SLC20A2 が強く発現していることを明らかにした (Brain Res, 2012, Brain Res 2016)。そこで、NVU におけるリン酸恒常性の破綻は神経変性疾患に共通する発症要因であり、その制御は新しい創薬標的になると仮説を立てた。これまで神経細胞において、リン酸恒常性の破綻によるミトコンドリア機能障害と 5-アミノレブリン酸による神経保護効果を明らかにした (Sci Rep, 2017, Stem Cell Res, 2017, Sci Rep, 2019, BBRC, 2019)。しかし、未だ不明な点が多くこのため、その解明に向けて検討した。

(実験結果・考察)

・神経細胞におけるリン酸輸送体の働きと、PDGF-BB 処置の影響

SLC20A2 の詳細な検討を行うために、*SLC20A2* を一過性または安定的にノックダウンした SH-SY5Y 細胞を作成した。安定的なノックダウン株 (安定発現株) は、*SLC20A2* をノックダウンする microRNA を発現するプラスミドを組み込んだウイルスベクターを SH-SY5Y 細胞に感染させて作成した。安定発現株は細胞膜に発現する PiT1 または PiT2 を検出

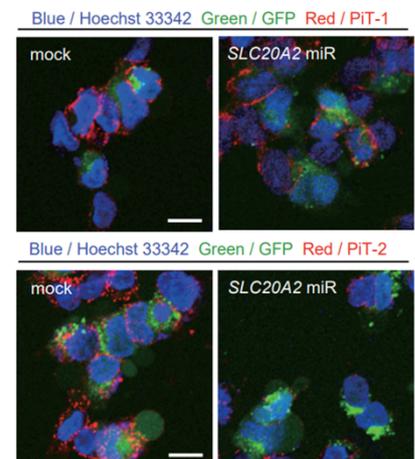


図1 META screen. Representative fluorescent microscopy images of mock and SLC20A2-suppressed cells expressing GFP (green) and membrane surface-expressed PiT-1 (upper) or PiT-2 (lower) (red). Scale bar, 20 μ m.

する META screen Kit を用いた染色により PiT2 に限定した発現低下を確認した (図 1)。これらの細胞を用いて、神経細胞におけるリン酸輸送体の働きと、PDGF-BB 処置の影響について検討を行った。初めに PDGF-BB の処置による神経細胞での影響について検討を行った。PDGF-BB 処置によるシグナルの活性化についてウエスタンブロット法により検討した。PDGF-BB の 1 時間処置で AKT、ERK の活性化を確認した。また、PDGF-BB の処置濃度依存的に細胞増加と細胞遊走能の増大を確認した。一方で、SLC20A2 ノックダウン細胞においては細胞生存率の低下、細胞遊走能の低下を確認した。これらの結果について PDGF-BB 処置による改善を確認した。続いて AKT シグナルの阻害剤である LY294002、ERK シグナルの阻害剤である PD98059 を処置した際のこれらの変化について検討した。細胞増殖には AKT、ERK の両方が、そして細胞遊走能には AKT シグナルが関与していることが示唆された。

【³²Pi transport assay】

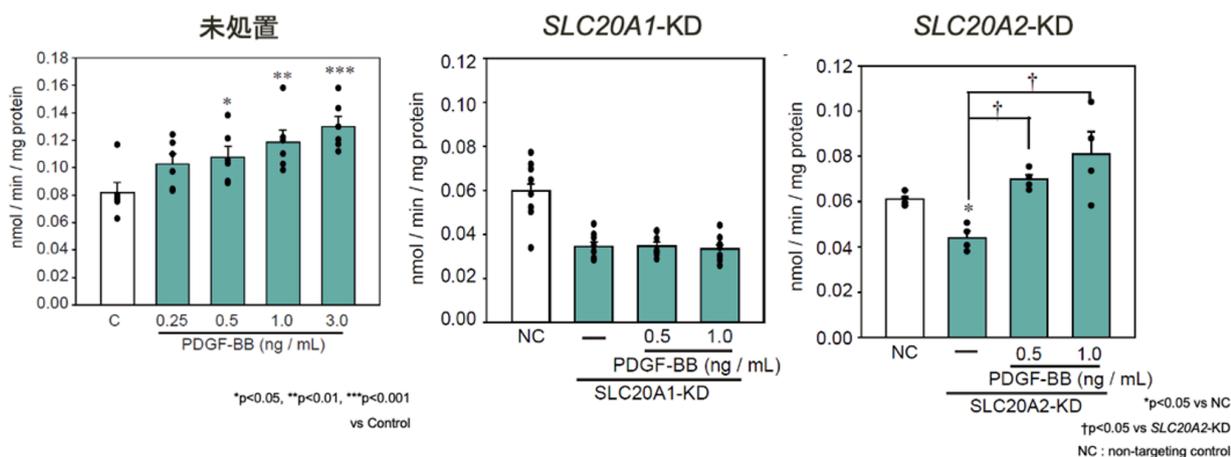


図2 PDGF-BB処置のリン酸輸送活性に対する作用

神経細胞において PDGF-BB がリン酸輸送に与える影響について検討を行った。PDGF-BB を処置し細胞内へのリン酸輸送活性を測定したところ、PDGF-BB 処置 24 時間でリン酸輸送活性の増加を確認した。このリン酸輸送活性の増加に関与するリン酸輸送体を特定するために、一過性の siRNA を用いて SLC20A1 および SLC20A2 をノックダウンさせた細胞株を用いてリン酸輸送活性を測定した。SLC20A2 をノックダウンさせた SH-SY5Y 細胞においてリン酸輸送活性の増加が見られたことから、PDGF-BB 処置によるリン酸輸送活性の増加は SLC20A1 によってコードされる PiT1 を介した効果であることが示唆された (図 2)。さらにこの効果は PDGF-BB が介するシグナル阻害剤を用いた検討から AKT シグナルを介することが示唆された。そこで、SLC20A1 の遺伝子発現量の変化を測定した。PDGF-BB は SLC20A1 の遺伝子発現量を増大させると予想されたが、SLC20A2 をノックダウンし PDGF-BB 処置したところ SLC20A1 発現には変化は見られなかった。SLC20A1 ノックダウン細胞に PDGF-BB を処置した際も同様に、PDGF-BB 処置によるリン酸輸送体の遺伝子発現に変化は見られず、PDGF-BB がリン酸輸送体の遺伝子発現に影響しないことが示唆された。

PDGF-BB による PiT1 を介したリン酸輸送活性増加のメカニズムを解明するために、PiT1 の細胞膜発現について検討を行った。リン酸輸送体は細胞内に局在しており、細胞膜に移行した後に細胞内へとリン酸を輸送する輸送体として機能することが知られている。そこで、細胞膜上に移行したリン酸輸送体のみを検出する META screen assay Kit を用いて、PDGF-BB 処置によ

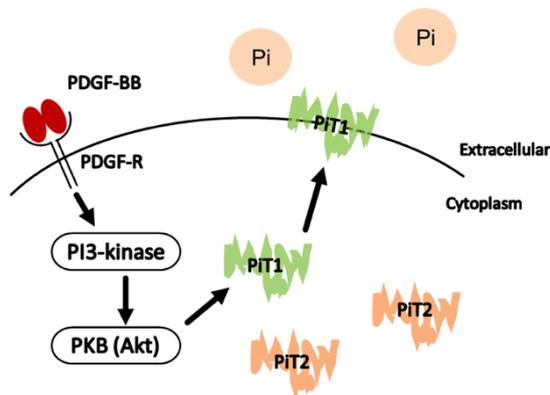


図3 Neuroprotective effect of PDGF-BB by promoting PiT1-mediated phosphate transport activity

る PiT1 の膜発現について検討を行った。SLC20A2 ノックダウンによる PiT1 の膜発現に変化は見られなかったが、PDGF-BB を処置することで PiT1 の膜発現の増加を確認した。さらに AKT シグナルの阻害剤を処置することで膜移行の増加が見られなかったことから、PDGF-BB 処置によるリン酸輸送活性の増大は AKT シグナルを介した PiT1 の膜移行の増加によることが示唆された (図 3)。

・ PiT2 タンパク質間相互作用に関する検討

PiT2 は細胞膜において二量体を形成することで細胞外から Pi を取り込むと考えられている。しかし、変異型 PiT2 の二量体形成への影響は未だ不明である。そこで、変異型 PiT2 の Pi 輸送機能の低下は野生型 PiT2 との二量体化が影響するかを検討するため、生物発光共鳴エネルギー転移 (bioluminescence resonance energy transfer: BRET) によるアッセイによってタンパク質間相互作用を評価した。BRET とは、NanoLuc ルシフェラーゼをエネルギー転移ドナー、リガンドで標識された HaloTag

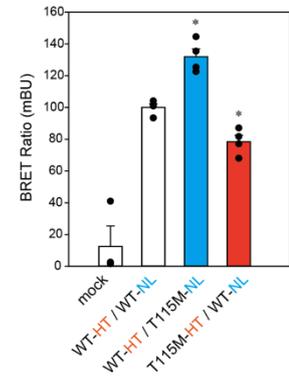
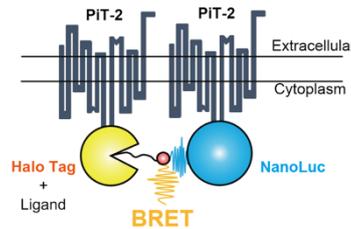


図4 BRETアッセイ系

タンパク質をエネルギー転移アクセプターとしてルシフェラーゼ活性により生じた発光エネルギーが蛍光タンパク質へ移動したときに蛍光放出が起こる現象である。NanoLuc タグ及び HaloTag をタンパク質に導入するとタンパク質同士が近接するときに BRET 波長が放出される。細胞内において、NanoLuc から放出された発光波長と BRET の蛍光波長の割合を算出することでタンパク質間相互作用を評価した。本研究では PiT2 の Loop7 領域内に NanoLuc タグまたは HaloTag を導入し検討を行った。変異型 PiT2 に HaloTag を導入し、野生型 PiT2 に NanoLuc タグを導入した場合は、T115M において有意に相互作用が低下した (図 4)。これらの結果は、変異型 PiT2 の T115M は 2 量体形成能に異常をもたらすことが推定された。今後さらなる解析が必要である。また、BRET 実験系は、PiT2 の 2 量体形成能をスクリーニングする有用であることが推定され、創薬に向けた基盤技術が構築できた。

以上より、神経細胞におけるリン酸トランスポーター・SLC20A2 の機能解明およびリン酸恒常性の制御機構の一端を解明することができ、また創薬に向けた基盤技術の構築もできた。課題ものこるが、今後さらなる解析を継続してリン酸恒常性の制御を介した神経変性疾患の予防・治療法の開発に寄与したいと考える。

(謝辞)

本助成をいただいた公益財団法人アステラス病態代謝研究会の関係者の皆様に深く感謝いたします。また岐阜薬科大学薬物治療学研究室のメンバーの方々に深く感謝の意を表します。