

58. 神経変性疾患における FABP3 の機能解明と治療薬の開発

福永 浩司

東北大学 大学院薬学研究科 薬理学分野

Key words : パーキンソン病, α シヌクレイン, 脂肪酸結合タンパク質, 疾患修飾治療薬

緒言

脂肪酸結合蛋白質 (FABP) はアラキドン酸、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などの多価不飽和脂肪酸の細胞内輸送に関わる。脳内では3種の FABP (FABP3, FABP5, FABP7) が発現している。FABP3 は主に神経細胞に、FABP5 と FABP7 はグリア細胞に発現する。*FABP3*, *FABP5*, *FABP7* 遺伝子の変異が統合失調症や自閉症など精神疾患発症に関わるという報告がある。しかし、神経変性疾患における FABP3 の機能は不明である。私達は FABP3 がドパミン D2 受容体に結合して、錐体外路系運動機能を制御すること¹⁻³⁾。FABP3 がパーキンソン病の原因となる細胞内封入体を形成する α シヌクレインと結合すること、両者を神経細胞に共発現すると凝集体を形成することを見いだした⁴⁾。本研究ではパーキンソン病における FABP3 の機能的役割を解明し、FABP3 の標的とする疾患修飾治療薬の開発を目指した。パーキンソン病を発現する神経毒である 1-Methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) を *FABP3* 欠損マウスに投与しても、パーキンソン病様症状は見られない。すなわち、酸化ストレス障害によって誘発される α シヌクレイン細胞内蓄積は *FABP3* 欠損マウスの黒質ドパミン神経では見られない。つぎに、FABP3 に特異的に結合する FABP3 リガンドを開発し、凝集への効果を検討した。パーキンソン病モデル細胞および動物において、 α シヌクレイン細胞での発現と凝集を抑制することを確認できた。FABP3 リガンドはパーキンソン病の疾患修飾治療薬の創薬研究を紹介する。

方法および結果

1. α シヌクレインと FABP3 の細胞における凝集

PC12 細胞に myc 標識 α シヌクレインと Frag 標識 FABP3 を過剰発現させ、ミトコンドリア障害を引き起こす 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) (0.5 mM) で 24 時間処理して、 α シヌクレインと FABP3 の細胞内局在を検討した。無処置の PC12 細胞では両者の発現は細胞質でみられ、両者の共局在は見られない。一方、MPP+ で処置した細胞では α シヌクレインは細胞質で凝集し、FABP3 も主に α シヌクレイン凝集体近傍に集積した (図 1)。このことは、酸化ストレスにより、 α シヌクレインは凝集し、その凝集体に FABP3 が含まれる可能性を示している。

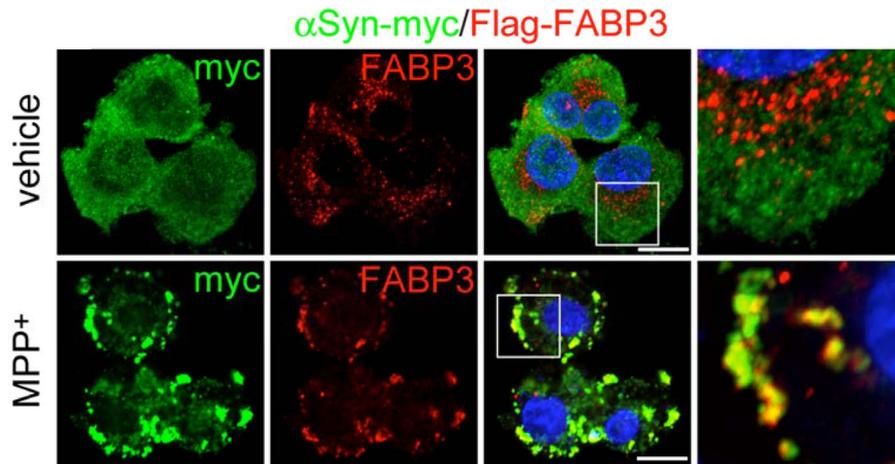


図1. PC12 細胞における myc- α シヌクレインと Flag-FABP3 の発現と MPP+ によるミトコンドリア障害の効果

無処置の PC12 細胞では高発現させた α シヌクレインと FABP3 は細胞内分布が異なる。酸化ストレス刺激 MPP+ で処置すると α シヌクレインと FABP3 は共局在し、凝集する。

2. α シヌクレインと FABP3 の *in vitro* における相互作用とアラキドン酸の効果

リコンビナントの α シヌクレイン (α Syn) と FABP3 を試験管内でインキュベートし、凝集が起こるか検討した。さらに、アラキドン酸の添加効果を調べた。アラキドン酸 (50, 100 μ M) は濃度依存性に α シヌクレインのオリゴマー形成を促進し、FAP3 の添加はオリゴマー形成をさらに促進した (図2)。次に、架橋剤 DSP 存在下で α シヌクレイン (α Syn) と FABP3 を試験管内でインキュベートして、電気泳動後に α シヌクレイン抗体と FABP3 抗体で免疫ブロットした。オリゴマーを形成する複合体の中には両蛋白質が含まれることが分かった。

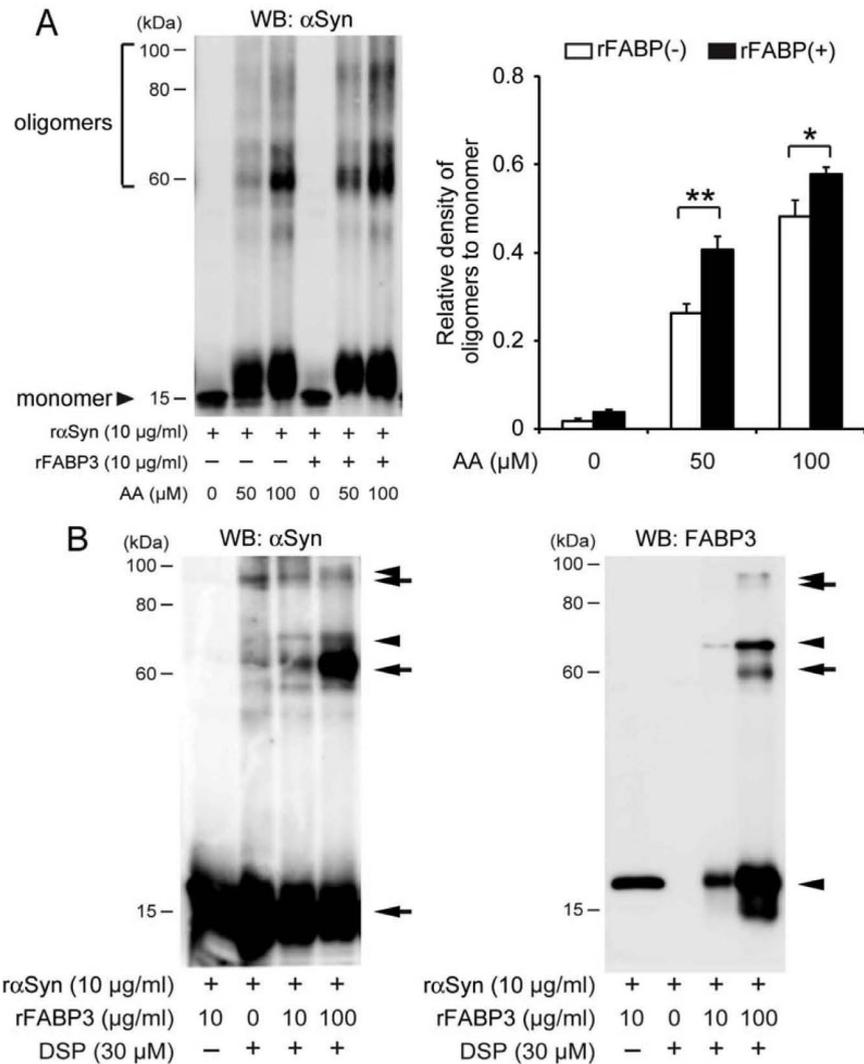


図2. α シヌクレインと FABP3 の *in vitro* における相互作用とアラキドン酸の効果
 A) リコンビナントの α シヌクレイン (α Syn) と FABP3 を試験管内でインキュベートし、電気泳動後にオリゴマー形成を検討した。オリゴマー量をモノマー量に対する割合で評価した。B) 架橋剤である dithiobis (succinimidyl)propionate) (DSP) 存在下にリコンビナント α シヌクレインと FABP3 (0, 10, 100 μg/ml) をインキュベートした。電気泳動後に α シヌクレイン抗体と FABP3 抗体で免疫プロットした。

3. パーキンソン病モデルマウス中脳におけるオリゴマー形成

野生型 (WT) マウスと *FABP3* 欠損 (KO) マウスに MPTP を処置するとパーキンソン病様症状が発現する。同時に黒質では α シヌクレインのオリゴマーが形成された (図3)。正常動物では α シヌクレインは神経終末に局在し、細胞体ではその発現がみられない。しかし、野生型マウスに MPTP を投与して、パーキンソン病症状を示したマウスでは細胞体での α シヌクレイン発現が著しく上昇し、FABP3 と共局在している。中脳黒質領域を摘出して、免疫プロットでオリゴマー形成を調べると、野生型マウスでは顕著にオリゴマー形成が見られるのに対して、*FABP3* 欠損マウスではオリゴマー形成の上昇がみられない。

以上の結果から、FABP3 は酸化ストレスに伴う α シヌクレインオリゴマー形成に必須であることが分かった。そこで、FABP3 に結合する低分子の中から、 α シヌクレインとのオリゴマー形成を抑制する化合物を検索した。

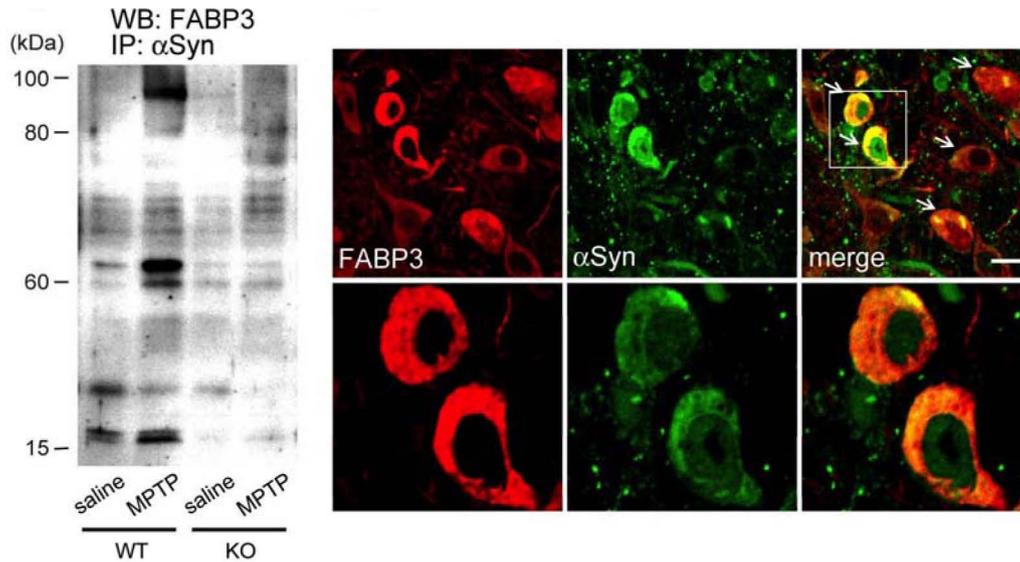


図 3. パーキンソン病モデルマウス中脳におけるオリゴマー形成

野生型 (WT) および *FABP3* 欠損 (KO) マウスに MPTP 処置して、4 週間後に中脳抽出物におけるオリゴマー形成と黒質ドパミン神経における α シヌクレインと FABP3 の免疫染色を行った。野生型ではオリゴマーが形成されるのに対して、*FABP3* 欠損マウスではオリゴマー形成が抑えられた (左図)。野生型マウスの黒質ドパミン神経では正常では見られない細胞体での α シヌクレインの発現と FABP3 との共局在がみられた。Scale bar : 20 μ m.

4. α シヌクレインオリゴマー形成を抑制する FABP3 リガンドの創製

宮地弘幸博士 (東京大学創薬機構) は FABP3 リガンドの合成を行っている。すでに、脂肪組織に発現する FABP4 リガンドは糖尿病治療薬の創薬ターゲットになっており、合成展開が活発に行われている。私達は宮地博士と共同で FABP3 により選択的な FABP3 リガンドの合成展開を行い、ある程を選択性の高い Ligand 1-4 を合成した。FABP3 に結合して、蛍光を発する 1-aminonaphthalene-8-sulfonic acid (ANS) の結合を阻害する活性で選択的リガンド 1-3 (Ligand 1-3) を創製した。次に α シヌクレインと FABP を過剰発現した Neuro2A 細胞を培養後に培養液に FABP3 ligand 1-3 を 10 μ M の濃度で添加した。期待通り、FABP3 リガンド 1-3 はオリゴマー形成を抑制した (図 4)。

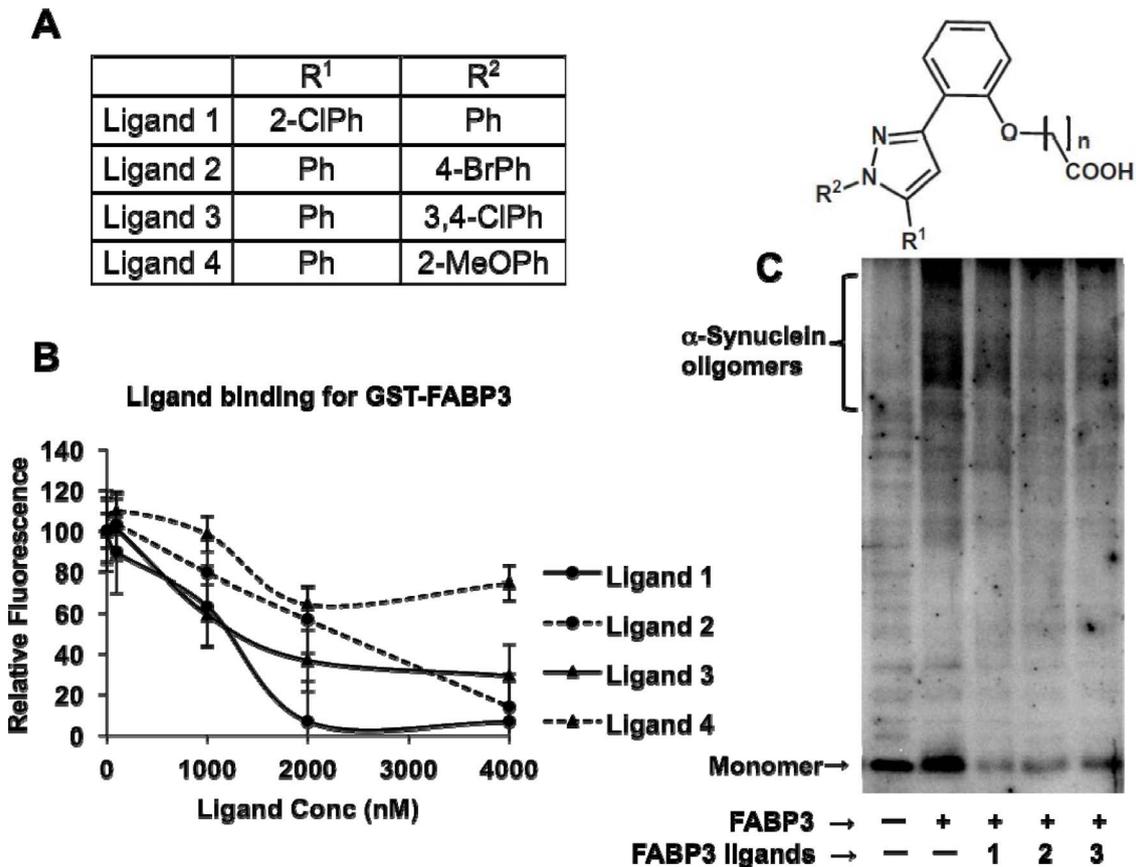


図4. FABP3 リガンドの創製と細胞におけるオリゴマー形成の抑制

宮地らが合成した FABP3 選択的リガンドをリードとして、新規 FABP3 リガンドを創製した (A)。蛍光分子 ANS の結合抑制を指標にして、GST-FABP3 への結合活性を測定した。調べた化合物の中で Ligand1 が最も親和性が高く Kd 値は 386 ± 141 nM であった (B)。次に PC12 細胞に α シヌクレインと FABP3 を過剰発現すると、オリゴマーが形成される。細胞系ではオリゴマー形成の抑制活性は Ligand1-3 でほぼ同等であった。

考 察

本研究では α シヌクレインの凝集を抑制する新規 FABP3 リガンドを探索した。ドパミン神経様細胞である PC12 細胞に α シヌクレインと FABP3 を発現させると MPP⁺ 処置による酸化ストレス条件下で α シヌクレインの凝集が抑制される。その α シヌクレイン凝集体には FABP3 も含まれると考えられる (図1)。同様に、マウス個体において MPTP 処置し、パーキンソン病を誘導すると、 α シヌクレインの凝集体が検出される。しかし、*FABP3* 欠損マウスでは α シヌクレインの凝集対形成が促進されない。以上の結果から私達は FABP3 リガンドが α シヌクレイン凝集を抑制することを予測した。これまでに脂肪組織に発現する FABP4 リガンドの開発は製薬企業で進められている。しかし、FABP3 選択的リガンドは今までに創製されていない。私達は FABP3 に選択的なりガンドを創出して、特許を申請した (PCT/JP2017/13742)。確かに PC12 細胞における α シヌクレイン凝集を抑制する (図4)。さらに、MPTP 処置したパーキンソン病モデルマウスで、細胞体における α シヌクレイン凝集を抑制すること、 α シヌクレインの黒質ドパミン神経での発現を抑制することを確認した (PCT/JP2017/13742)。このことは FABP3 リガンドが世界初のパーキンソン病の疾患修飾治療薬となる可能性を示している。今後は他のシヌクレイノパチー疾患であるレビー小体型認知症のモデルでも検討する予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は東北大学大学院薬学研究科薬理学分野の塩田倫史特任准教授、矢吹悌助教、篠田康晴助教、泉久尚大学院生、東北大学大学院医学系研究科器官解剖学分野大和田祐二教授である。最後に、本研究は脳科学研究推進プログラム（融合脳）（AMED）に採択され、前臨床試験を実施することになりました。上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Takeuchi Y, Fukunaga K. Differential subcellular localization of two dopamine D2 receptor isoforms in transfected NG108-15 cells. *J Neurochem.* 2003 May;85(4):1064-74.
- 2) Shioda N, Yamamoto Y, Watanabe M, Binas B, Owada Y, Fukunaga K. Heart-type fatty acid binding protein regulates dopamine D2 receptor function in mouse brain. *J Neurosci.* 2010 Feb 24;30(8):3146-55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4140-09.2010.
- 3) Yabuki Y, Takahata I, Matsuo K, Owada Y, Fukunaga K. Ramelteon improves post-traumatic stress disorder-like behaviors exhibited by fatty acid binding protein 3 null mice. *Mol Neurobiol* 2017 in press.
- 4) Shioda N, Yabuki Y, Kobayashi Y, Onozato M, Owada Y, Fukunaga K. FABP3 protein promotes α -synuclein oligomerization associated with 1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *J Biol Chem.* 2014 Jul 4;289(27):18957-65. doi: 10.1074/jbc.M113.527341.