

再生医療学研究部門

「生体内におけるイノシールポリリン酸の役割」

【研究概要】

イノシールリン酸は、植物界を含む生物界に広く存在し、細胞膜を構成する分子の一つであり、生命維持には欠かすことのできない物質である。イノシールリン酸は、六角形のイノシール環にリン酸基が結合することにより、イノシール1リン酸 (IP)、2リン酸 (IP2) などとなり、代表的には、イノシール3リン酸 (IP3) がセカンドメッセンジャーとして細胞内カルシウム動態と深く関連し、様々な生命現象を引き起こすことが周知されている。しかし、さらにイノシール環にリン酸基が結合する高次のイノシールポリリン酸であるIP5、IP6、さらにIP6にリン酸が結合するIP7 (ピロリン酸) (IP7 (PP-IP5))、IP8に関しては、生体内での役割は不明である。イノシールリン酸は、生体内ではIP6が最も多く存在しており、IP6をIP7にリン酸化する酵素であるイノシール6リン酸キナーゼ (IP6K) は、中枢神経系に多く分布している。我々は、IP6、IP7、IP6Kに関して以前より研究を進めており、IP6Kを過剰に発現させた神経培養細胞において細胞死が誘導されるということを示した。IP6Kは、哺乳類にはサブタイプが3種類 (IP6K1、IP6K2、IP6K3) あり、いずれも中枢神経系、特に大脳の海馬や小脳、脊髄前角細胞に多く発現している。細胞内局在としては、IP6K1とIP6K3は核内、細胞質に均一に存在し、IP6K2は主に核内に存在する。IP6K2に関しては、活性化されると核より細胞質へのトランスロケーションが起きることを明らかにした (J Biol Chem, 2005)。

さらに我々は、IP6、IP7、IP6Kと神経変性疾患との関連を研究してきた。特にIP6K2は中枢神経系に多く存在し、ハンチントン病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) で活性が上昇しており、神経細胞死を促進していることを明らかにした。近年、我々は生体内のIP6、IP7を定量的に測定することに成功した。全身におけるIP6、IP7の分布ならびに神経変性疾患において、IP6、IP7を測定および機能解析し、さらに神経変性疾患における神経細胞異常凝集体の生成に係る液-液相分離現象 (LLPS) にIP7が深く関与していることを見出した。これらのことより、新たな神経変性疾患メカニズムの解明および疾患特異性としてのバイオマーカー、治療創薬の可能性につき検討する。

【研究成果】

(1) 哺乳類におけるIP6、IP7の各臓器における分布

C57BL/6Jマウスを用いて各臓器におけるIP6、IP7の定量測定を行った。その結果、IP6、IP7ともに消化管 (胃、十二指腸、小腸、大腸) に、大脳、脊髄などよりも多くのIP6、IP7が含まれることを明らかにした (図1)。通常のマウス飼料やマウス糞便に多くのIP6やIP7が含有されているために、IP6、IP7含有量の少ない飼料と断食を行ったマウスにて、同様の測定を行った。その結果、IP6、IP7の値は減少したが、むしろIP7/IP6の比率が高くなり、IP7産生が増加している結果を得た (Ito M, et al., JBC, 2023)。

(2) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者におけるIP6、IP7、IP6Kの検討

コントロール5例 (年齢 70歳前後)、ALS患者9例 (年齢 70歳前後) の凍結脊髄サンプル (胸髄) のイノシール6リン酸 (IP6)、7リン酸 (IP7) を測定した。コントロールと比較してALS患者で、IP7、IP8の値が有意に高値であった。また、IP6とIP7の比率 (IP7/IP6: IP6からIP7への生成量) でもALS患者で有意に高値を示した (図2)。しかし、ALS患者、年齢をマッチさせた健常者での末梢血液採血中のIP6、IP7、IP7/IP6の測定値は明らかな差異は認められなかった (Ito M, et al., Front Neurol, 2023)。また、脳内異常 α シヌクレインの細胞間伝搬実験において、IP6K2ノックアウトマウスの脳内ではこの異常 α シヌクレインがpropagationを起こしにくいということを我々は発見した。今後疾患発症メカニズムとしてのIP6Kと脳腸連関 (Brain-Gut Axis) 関連につき検討していく。

(3) IP7と液-液相分離現象 (liquid-liquid phase separation: LLPS)

近年神経変性疾患における神経細胞内凝集体は、このLLPS現象により起こることが明らかとなってきたが、この現象のIP7が深く関与していることが明らかとなった。ALSなどの細胞内凝集体の1つであるFUS蛋白が、細胞に一定量の光源を照射すると細胞内にLLPS現象によりdropletを形成する系 (Optdroplet法) を用いて、IP7生成の阻害薬であるTNPを細胞に投与しておくことでdroplet形成の光量によるエネルギーがより必要となることが明らかとなった。また、IP7を含有するリポソーム添加では、droplet形成が促進されることも確認している (図3)。(未発表データ)。

【今後の展望】

本研究は、生体内においてIP6、IP7、また、IP6Kがどのような変化、役割を示しているのかを追求していく研究である。特に神経変性疾患と関連が深いことが明らかとなってきた。現在、神経変性疾患の病因として、脳腸連関あるいは、液-液相分離現象 (LLPS) が話題であるが、脳腸連関に関しては、IP7やIP6Kが腸管の神経叢に多く分布することが明らかとなり、さらにLLPSに関しては、IP7によりこの現象が加速されることも見出した。このようにIP6、IP7、IP6Kは、神経変性疾患の発症メカニズムに重要な因子であると考えられる。

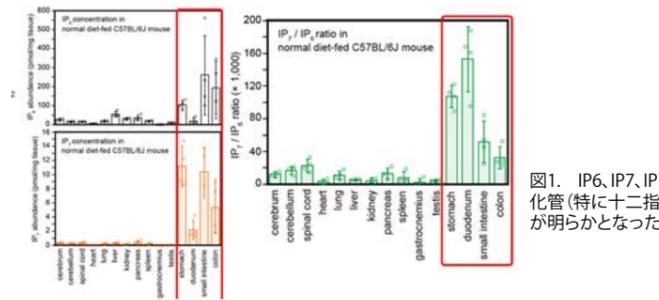


図1. IP6、IP7、IP7/IP6はマウスにおいて消化管 (特に十二指腸) に多く分布していることが明らかとなった。

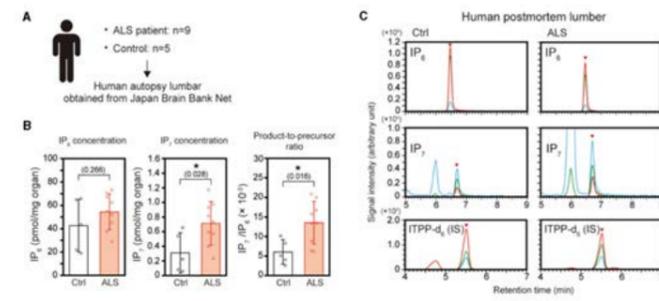


図2. A. ALS患者9名; コントロール5名の凍結脊髄標本で測定した。B. 胸髄においてIP7、IP7/IP6の値が有意に上昇していた。C. ALS患者、コントロールのLC/MS測定IP6、IP7、Internal standard ITPP-d6のグラフ

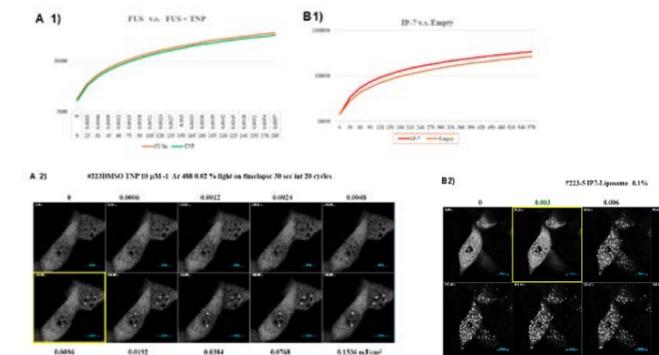


図3. 細胞内のdroplet形成が、wildは全く形成されないが、FUS蛋白が存在すると細胞質内にdropletを形成する。しかし、IP7生成阻害薬であるTNPを加えるとdroplet形成がより強いエネルギーの光量が必要である (A1)、(A2)。また、IP7を加えると逆にdroplet形成が弱いエネルギーの光量にて起きる (B1)、(B2)。



プロジェクトリーダー: 永田栄一郎
Nagata Eiichiro

医学部医学科内科学系脳神経内科学 領域主任教授
認知症疾患医療センター センター長



水間敦士
Mizuma Atushi
脳神経内科学 准教授



中山 平
Nakayama Taira
脳神経内科学 助教



鈴木直人
Suzuki Naoto
脳神経内科学 助教



伊東丈夫
Ito Jobu
脳神経内科学 客員研究員



小原さおり
Kohara Saori
脳神経内科学 技術職員



安部貴人
Abe Takato
脳神経内科学 教授



今関良子
Imazeki Ryoko
脳神経内科学 講師



柁津静花
Netsu Suzuka
脳神経内科学 助教



伊藤誠敏
Ito Masatoshi
脳神経内科学 客員研究員



藤井奈津子
Fujii Natsuko
脳神経内科学 技術職員

Selected Papers

- Suzuki K, Takeshima T, Igarashi H, Imai N, Danno D, Yamamoto T, Nagata E, Haruyama Y, Mitsufuji T, Suzuki S, Ito Y, Shibata M, Kowa H, Kikui S, Shiina T, Okamura M, Tatsumoto M, Hirata K. Impact of the COVID-19 pandemic on migraine in Japan: a multicentre cross-sectional study. J Headache Pain 22: 53, 2021.
- Iino K, Toriumi K, Agarie R, Miyashita M, Suzuki K, Horiuchi Y, Niizato K, Oshima K, Imai A, Nagase Y, Kushima I, Koike S, Ikegami T, Jinde S, Nagata E, Washizuka S, Miyata T, Takizawa S, Hashimoto R, Kasai K, Ozaki N, Ito K, Arai M. AKR1A1 Variant Associated With Schizophrenia Causes Exon Skipping, Leading to Loss of Enzymatic Activity. Front Genet 12: 762999, 2021.
- Mizuma A, Netsu S, Sakamoto M, Yutani S, Nagata E, Takizawa S. Effect of early enteral nutrition on critical care outcomes in patients with acute ischemic stroke. J Int Med Res 49: 3000605211055829, 2021.
- Mizuma A, Enokida K, Nagata E, Takizawa S. Cerebellitis in a human T-lymphotropic virus type 1 carrier: a case report. BMJ Case Rep 14: e241366, 2021.
- Takizawa S, Mitamura H, Ohnuki Y, Kawai K, Ohnuki Y, Nagata E, Takahashi W. Case report: corneal endothelial degeneration and optic atrophy in dentatorubral-pallidolusian atrophy quantified by specular micrography and optic coherence tomography. Front Neurol 13: 953787, 2022.
- Ito M, Fujii N, Kohara S, Hori S, Tanaka M, Wittwer C, Kikuchi K, Iijima T, Kakimoto Y, Hirabayashi K, Kurotaki D, Jessen HJ, Saiardi A, Nagata E. Inositol pyrophosphate profiling reveals regulatory roles of IP6K2-dependent enhanced IP7 metabolism in the enteric nervous system. J Biol Chem 299: 102928, 2023.
- Ueno Y, Miyamoto N, Hira K, Doijiri R, Yamazaki H, Sonoda K, Koge J, Iwata T, Todo K, Yamagami H, Kimura N, Morimoto M, Kondo D, Okazaki S, Koga M, Nagata E, Hattori N; CRYPTON-ICM investigators. Left atrial appendage flow velocity predicts occult atrial fibrillation in cryptogenic stroke: a CRYPTON-ICM registry. J Neurol. 2023 Dec;270(12):5878-5888.
- Watanabe N, Shinozaki Y, Ogiwara S, Miyagasaki R, Sasaki A, Kato J, Suzuki Y, Fukunishi N, Okada Y, Saito T, Iida Y, Higashimoto M, Masuda H, Nagata E, Gotoh K, Amino M, Tsuji T, Morita S, Nakagawa Y, Hirayama N, Inokuchi S. Diphenyl-tetrazol-propanamide Derivatives Act as Dual-Specific Antagonists of Platelet CLEC-2 and Glycoprotein VI. Thromb Haemost. 2023 Dec 29;doi: 10.1055/a-2211-5202. Online ahead of print.
- Mitsunaga S, Fujito N, Nakaoka H, Imazeki R, Nagata E, Inoue I. Detection of APP gene recombinant in human blood plasma. Sci Rep. 2023 Dec 7;13(1):21703.
- Ito M, Fujii N, Kohara S, Tanaka M, Takao M, Mihara B, Saito Y, Mizuma A, Nakayama T, Netsu S, Suzuki N, Kakita A, Nagata E. Elevation of inositol pyrophosphate IP7 in the mammalian spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis. Front Neurol. 2024 Jan 11;14:1334004.doi: 10.3389/fneur.2023.1334004. eCollection 2023.