

令和元年6月18日現在

機関番号：24303
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2015～2018
 課題番号：15K09319
 研究課題名(和文) シヌクレインの脂質関連代謝の解明とそれに注目した新しいパーキンソン病治療戦略

 研究課題名(英文) Investigation of lipid associated alpha-synuclein metabolism

 研究代表者
 笠井 高士 (Kasai, Takashi)

 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

 研究者番号：70516062
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は synucleinの新たな存在様式としてリボ蛋白共益代謝の存在を仮定した。ゲル濾過法により分子サイズふるい分けしたVLDL, LDL, HDL画分に synが存在していることを示し、また超遠心分取した脂質画分においても同様に synの存在を確認した。より簡便に脂質結合型 synを抽出する手法として、脂質分子吸着カラムを用いて血漿から脂質を分離し、脂質成分から synを検証した。こうした研究を通して脂質分子関連 -synは主としてHDL領域に多く存在しており、WesternblotでもApoA1 ApoE ApoJなどが検出される領域に認められることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はパーキンソン病の根本的な病態に関与する シヌクレインの新しい存在様式を提案するものである。本研究によって明らかにされた脂質分子関連型 シヌクレインの存在は、シヌクレイン代謝そのものを既存の脂質代謝調節薬によってコントロールできる可能性を支持するものであり、抗パーキンソン病治療開発スキームに新しい視点を加えた。

研究成果の概要(英文)：We postulated a lipid-associated -synuclein (-syn) as unknown molecular aspect of -syn can relate to the -syn metabolism and PD mechanism. To confirm its presence, we conducted the three independent proteochemical approaches as following. First, -syn immunoreactivities were observed in fractions with VLDL, LDL, and HDL by size exclusion chromatography. The corresponding lipoprotein fraction collected by ultracentrifugation also contained -syn. We also developed the method to purify lipid associated -syn using lipid absorption column as a more convenient technique. Taken all together, lipid-associated -syn are suggested to be accompanied mainly with HDL fractions containing ApoA1, ApoE, and Apo J.

研究分野：神経内科学

キーワード：-synuclein パーキンソン病 脂質 リボ蛋白

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Parkinson 病(PD)の発症を考える上でその主要な蓄積蛋白である α -synuclein (α -syn) の代謝過程の理解は重要である。現在、多くの研究者は「細胞内に過剰に α -syn を蓄積した神経細胞は自身のにとって有害な α -syn を細胞外に排出すること、そしてそれが隣接する神経細胞に取り込まれることが PD 病理の進展過程の分子生物学的機序であるという作業仮説」にほぼ同意している。この仮説は細胞外 α -syn のクリアランスを促進する方法の開発が PD の根治療法を確立する上で有望なアプローチであることを示唆している。

細胞外 α -syn の代謝経路について、申請者も含めた多くの研究者はこれまで主に、glia 細胞への取り込みや細胞外プロテアーゼによる分解(Kasai.T. Neuroscience Lett. 2008)(Tatebe H, Kasai T, Neurosci Res, 2010)に注目して研究を行ってきた。一方で α -syn は脳血液関門を通過できる可能性は低いと予想されていたため、中枢神経由来の細胞外 α -syn が体循環系へクリアランスされ、肝臓に代表される全身諸臓器によって分解・代謝されるという可能性はこれまで、あまり考慮されて来なかった。しかしながら、近年、PD 患者の血漿中 α -syn、特に血漿中リン酸化 α -syn が有意に上昇することが報告されており(Foulds.P, Allsop.D. FASEB J. 2011)、この結果は中枢神経由来の細胞外 α -syn は血液中にも移行することを強く示唆している。更に、 α -syn ノックアウトマウスでは中枢神経系の脂質量が約 1.5 倍に増加するという報告や脳脊髄液(CSF)中の α -syn の一部は脂質と結合しているという報告(Salem SA, Tokuda T, Allsop D. Brain Res 2007)を併せて考えると、 α -syn の中枢神経系から体循環系への排出は中枢神経における脂質恒常性を維持する上でなんらかの役割を果たしており、その運搬はおそらく脂質代謝経路すなわち Apo 蛋白と密接に関連した形態でなされていると推察することができる。

この仮説を強く支持する根拠として HDL の主要構成蛋白である血漿中 ApoA1 の低下が PD 早期発症リスクとなるという最近の報告が挙げられる(Ann Neurol 2013.74:119)。現時点で ApoA1 低下が PD を引き起こす分子メカニズムは全く分かっていないが、申請者は Lancaster 大学 Allsop 教授の下で、血漿 α -syn の免疫沈降物中に HDL を構成するアポ蛋白(ApoA1・ApoE)が共沈降されてくることを明らかにしてきた経緯から CSF・血漿中の α -syn はリポ蛋白と結合しており、脂質代謝経路を介して能動的に中枢神経系から体循環系へと運搬代謝される、さらにこのリポ蛋白運搬系に依存した α -syn 排出は脂質代謝系に介入することによって修飾され得るという着想を持ち本仮説を検証するため研究を計画した。

2. 研究の目的

ヒト血漿中において脂質に結合型 α -synuclein の存在を Westernblot 法、分子サイズクロマトグラフィー、超遠心法を含む、複数のモダリティーにおいて検証し証明する。

3. 研究の方法

ヒト血漿をゲル濾過クロマトグラフィー法によって分子サイズ依存性に分画しリポ蛋白各分を分子サイズおよび共存する、アポリポ蛋白の存在を Westernblot 法によって検証することによって同定する。同定された各分に対して α -syn ELISA および Westernblot によって α -syn の存在を証明する。

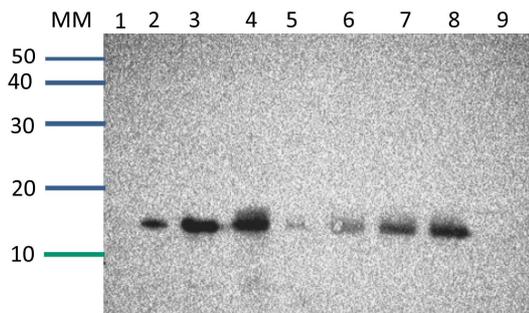
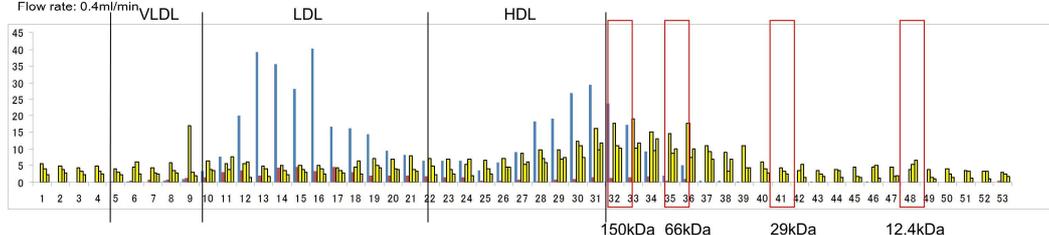
ヒト血漿を超遠心法によって密度依存性に分画しリポ蛋白各分を同定する。同手法は外注会社に委託した。リポ蛋白各分に対して α -syn westernblot を行うことによって α -syn の存在を証明する。

ヒト血漿を脂質分子吸着カラム処理して脱脂質化する。カラムに吸着された脂質分子および脂質関連蛋白分子を SDS サンプルバッファーによって解離され、抽出し、同方法によって精製された蛋白の Westernblot を用いて α -syn の存在を証明する。

HPLC gel filtration

Instrumentation: AKTA purifier
Column: Superose6 x2 tandem (Vo=14.5 column volume/24x2ml)
Sample: 200ul of plasma
Buffer: 1mM EDTA, 154mM (0.9%) NaCl 0.02% NaN₃, pH 8.2
Flow rate: 0.4ml/min

Yellow bars indicate α -syn concentration by the ELISA C211-FL140 done by Fatema Nouri at Lancaster
Concentration are indicated by arbitrary unit (absorbance \times 20).
Blue are Total cholesterol levels. Red are Triglyceride.



First Ab: N19
Blocking Buffer: 10% skimmed Milk
Capture Ab: C211, 1/1000
1-Ab conjugated dynabeads incubated within PBS as control
2-Fraction 31
3-Fraction 33
4-Fraction 35
5-Fraction 37
6-Fraction 39
7- Whole Plasma
8- R- α -syn 5 ng
9- Dynabeads incubated within Plasma as control

4. 研究成果

上記に記載した3種類の方法のいずれにおいても脂質およびアポリポ蛋白各分に syn の存在を確認することができた。syn は特に HDL 画分に多く存在していた。これらの結果は共同研究者グループが提示した syn 免疫沈降法によって共沈降される分子が ApoE であることなどと一致している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Shinomoto M, Kasai T, Tatebe H, Kondo M, Ohmichi T, Morimoto M, Chiyonobu T, Terada N, Allsop D, Yokota I, Mizuno T, Tokuda T. Plasma neurofilament light chain: A potential prognostic biomarker of dementia in adult Down syndrome patients. Plos One. 査読有. 2019. 14(4): e0211575, doi: 10.1371/journal.pone.0211575
2. 笠井高士:認知症と糖尿病、京都府立医科大学雑誌 2018年126巻697-784 査読なし オープンアクセスなし
3. 笠井高士、徳田隆彦:PDの認知機能障害と関連するバイオマーカー、認知症の最新医療 2018年8巻23-28 査読なし オープンアクセスなし
4. Ohmichi T, Kasai T, Kosaka T, Shikata K, Tatebe H, Ishii R, Shinomoto M, Mizuno T, Tokuda T. Biomarker repurposing: Therapeutic drug monitoring of serum theophylline offers a potential diagnostic biomarker of Parkinson's disease. Plos One. 査読有 2018.13(7): e0201260. doi: 10.1371/journal.pone.0201260.
5. Sakaue S, Kasai T, Mizuta I, Suematsu M, Osone S, Azuma Y, Imamura T, Tokuda T, Kanno H, El-Agnaf OMA, Morimoto M, Nakagawa M, Hosoi H, Mizuno T. Early-onset parkinsonism in a pedigree with phosphoglycerate kinase deficiency and a heterozygous carrier: do PGK1 mutations contribute to vulnerability to parkinsonism? npj Parkinson dis 査読有 2017.13 doi: 10.1038/s41531-017-0014-4.
6. Kasai T et.al. Increased levels of plasma total tau in adult Down syndrome. Plos One 2018. 11(1): e0199902. doi: 10.1371/journal.pone.0188802.
7. Kasai T, Tokuda T, Ohmichi T, Ishii R, Tatebe H, Nakagawa M, Mizuno T. Serum levels of Coenzyme Q10 in patients with multiple system atrophy. Plos One. 査読有. 2017;1. e0147574, doi: 10.1371/journal.pone.0147574.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Kasai T, Tokuda T, Tatebe H, Kondo M, Ishii R, Ohimich T, Mizuno T. Age dependent elevation of plasma total and phosphorylated tau in adult Down syndrome. Alzheimer Disease and Parkinson Disease (ADPD)2019
2. Kasai T, Sakaue S, Mizuta I, Suematsu M, Osone S, Azuma Y, Imamura T, Tokuda T, Kanno H, El-Agnaf OMA, Morimoto M, Nakagawa M, Hosoi H, Mizuno T. Early-onset parkinsonism in a pedigree with phosphoglycerate kinase deficiency and a heterozygous carrier: Do PGK-1 mutations contribute to vulnerability to parkinsonism? 2017 World Congress of Neurology.
3. Kasai T, Kondo M, Ishii R, Mizuno T, Tokuda T. Biomarker changes of plasma and CSF after the treatment of IVIg in patients with AD. 2015 Clinical Trial and Alzheimer Disease (CTAD)2015.
4. Kasai T, Tokuda T, Kondo M, Nakagawa M, Mizuno T. Imaging brain amyloid in nondemented young adults with Down syndrome using PIB.日本神経学会総会 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：水野敏樹
ローマ字氏名： Mizuno, Toshiki
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：医学(系)研究科(研究院)
職名：教授
研究者番号（8桁）：30264782

研究分担者氏名：大島洋一
ローマ字氏名： Oshima, Yoichi
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：医学(系)研究科(研究院)
職名：助教
研究者番号（8桁）：50516060

研究分担者氏名：徳田隆彦
ローマ字氏名：Takahiko Tokuda
所属研究機関名：京都府立医科大学
部局名：医学(系)研究科(研究院)
職名：教授
研究者番号（8桁）：80242692

(2)研究協力者 該当なし

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。