

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09322

研究課題名(和文) パーキンソン病の神経障害性  $\alpha$ -シヌクレインオリゴマーの同定と分子標的治療への応用研究課題名(英文) Identification of neurotoxic  $\alpha$ -synuclein oligomers in Parkinson's disease and its application to molecular targeted therapy

研究代表者

徳田 隆彦 (Tokuda, Takahiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80242692

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)：パーキンソン病(PD)の発症・進展の分基盤として、細胞外に分泌された  $\alpha$ -シヌクレイン(A-syn)のオリゴマーが重要である。ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析では、ヒト血漿中のA-syn分子は主として60kDa(monomer)と約2000kDaに相当する画分に検出された。さらに、脂質分子を血漿から吸着するカラムを用いた解析では、脂質分子とassociateしているA-synは主としてHDL領域に存在し、ApoA1、ApoE、ApoJと共存しており、一部はオリゴマー化していた。ヒト血漿中のA-Syn分子がHDLとassociateしており、一部はオリゴマー化していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It is known that extracellular  $\alpha$ -synuclein (A-syn) oligomers are important as a pathogenic agent in Parkinson's disease. In this research project, we first analyzed A-syn molecules in human plasma using gel-filtration chromatography. A-syn molecules in plasma were found in fraction with a molecular mass of 60 kDa and ~2,000 kDa. Furthermore, analyses of human plasma using lipid-adsorption columns demonstrated that A-syn molecules associated with lipids exist in the fractions corresponding to HDLs, and co-exist with ApoA1, ApoE, and ApoJ molecules. Some of those HDL-associated A-syn molecules were detected as oligomers. Our studies revealed that A-syn molecules in human plasma are mainly associated with HDL particles, and at least some part of them are oligomerized.

研究分野：神経内科学、蛋白化学

キーワード： $\alpha$ -シヌクレイン オリゴマー パーキンソン病 脂質 エクソソーム

### 1. 研究開始当初の背景

近年のパーキンソン病(PD)研究では、細胞内で異常凝集して蓄積した線維性  $\alpha$ -synuclein (A-syn) よりも、その凝集過程の中間体である可溶性 A-syn オリゴマーこそが神経細胞毒性の責任分子であると考えられている(Science 300: 486-489, 2003)。また PD では、A-syn の異常蓄積が脳内に順次広がっていくプリオン病様の伝播現象(prion-like transmission)が注目されており、その分子基盤として、細胞外へ分泌された A-syn オリゴマーが神経線維連絡を介して次の細胞に取り込まれる病的機序が考えられている。以上からは、A-syn オリゴマーは、PD の発症(神経細胞毒性)及び進展( $\alpha$ -syn 病理の脳内進展)という二つの基本的な病理過程の両方の分子基盤となっていると考えられる。申請者は、ヒト体液中の A-syn オリゴマーを定量することができる ELISA 系を世界に先駆けて開発し、PD 患者では髄液中 A-syn オリゴマーが増加していることを報告した(Neurology 2010)。しかしながら、実際のヒトの血液・髄液中に存在する A-syn 分子がどのような存在様式をとっているか、すなわち単量体あるいはオリゴマーとして存在するのか、また、体液中の A-syn と associate している分子については十分明らかにされてはいなかった。

### 2. 研究の目的

以下を目的として研究を行った。

- (1) 対照患者および PD 患者の体液中に存在する A-syn オリゴマーの同定
- (2) ヒト体液中の A-syn オリゴマーの存在様式・蛋白化学的性質及び関連分子の解明
- (3) A-syn オリゴマーの神経細胞毒性発現機序の解明

### 3. 研究の方法

- (1) ヒト体液中の A-syn の分子量の分析。  
本研究では、まずは、PD ではない対照患者(頭蓋内圧亢進症、正常圧水頭症)の血漿および髄液をゲルろ過クロマトグラフィーで分画して、どの画分に A-syn 分子が存在するかを、Western blotting(WB)および我々が自己開発した A-syn 特異的 ELISA で検討した。また、対照患者の髄液を同様に分画して、解析した。ヒト髄液中に存在する A-syn 分子は、量的に非常に少なく、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの解析には不十分であった。したがって、我々は、まずは、ヒト血漿中の A-syn 分子について検討する方針を採用した。
- (2) ヒト血漿中の A-syn 分子と脂質との association の分析。

A-syn およびそのオリゴマーと脂質画分との association を検討した。脂質画分の調整には、NaBr による浮上分画遠心法と Superose6 カラムをタンデムで連結して高分子領域の分取を可能にしたゲルろ過クロマトグラフィーの 2 つの方法を用いた。これら

分が分取できていることをコレステロールおよびトリグリセリド濃度と抗アポタンパク抗体による WB で確認した。分取した脂質画分は、脱塩後に抗 A-syn 抗体による免疫沈降と複数の A-syn 抗体による WB で解析した。(3) 脂質吸着カラムによるヒト血漿中 A-syn 分子およびその結合分子の解析。

ヒト体液中の脂質結合型 A-syn 分子をより効率的に抽出・分析する手法として、脂質分子を血漿から吸着する特殊なカラムを用いて血漿から脂質を分離し、WB で分析して、脂質成分から A-syn を検出する方法を開発した。この方法により、ヒト血液中の脂質結合型 A-syn 分子のより詳細な分析が可能になった。

### 4. 研究成果

- (1) ヒト体液中の A-syn の分子量の分析。

ゲルろ過カラムを用いた分子篩クロマトグラフィーによる分析では、血漿においては、A-syn は主として  $\sim 60$ kDa と  $\sim 2000$ kDa に相当する画分に回収された。これらについては、 $\sim 2000$ kDa の画分は LDL 画分にほぼ相当し、従来想定されていたエクソソームが存在する画分よりも分子量の小さい画分であった。また、これまでの報告から、A-syn モノマーは分子篩クロマトグラフィーでは  $\sim 60$ kDa に溶出することが報告されているので、 $\sim 60$ kDa 画分に存在する A-syn はそのモノマーであると考えられた。

ヒト髄液中の A-syn 分子の同様の分析では、A-syn の収量が少なくその同定に難渋したが、starting の髄液を 5 倍濃縮することにより  $\sim 60$ kDa での A-syn の存在は確認できたが、高分子画分における A-syn の存在は確認できなかった。

- (2) ヒト血漿中の A-syn 分子と脂質との association の分析。

NaBr による浮上分画遠心法とタンデム Superose6 カラムによる分子篩クロマトグラフィーという 2 つの方法のいずれによっても、分取した脂質画分の A-syn 抗体による免疫沈降と WB による解析では、A-syn は LDL および HDL 画分に存在することがわかった。このような検討により、A-syn は血漿中では主としてリポ蛋白パーティクルである LDL、HDL と共存していることが明らかになった。

- (3) 脂質吸着カラムによるヒト血漿中 A-syn 分子およびその結合分子の解析。

この方法によるヒト血漿中の A-syn 分子の分析では、脂質分子と associate している A-syn は主として HDL 領域に存在しており、ApoA1、ApoE、ApoJ と同じ画分に存在した。また WB では脂質結合型 A-syn 分子は単量体が主体であったが、一部高分子領域にもバンドが認められた。本研究により、ヒト血漿中の A-syn 分子が、従来報告があったエクソソーム画分とは異なり、主として HDL と associate して存在しており、また、そのよう

な脂質結合型 A-syn 分子の一部はオリゴマー化していることが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

- 1) Kasai T, Tatebe H, Kondo M, Ishii R, Ohmichi T, Yeung WTE, Morimoto M, Chiyonobu T, Terada N, Allsop D, Nakagawa M, Mizuno T, Tokuda T. Increased levels of plasma total tau in adult Down syndrome. PLoS One. 査読有, 2017;12(11):e0188802. doi: 10.1371/journal.pone.0188802.
- 2) Tatebe H, Kasai T, Ohmichi T, Kishi Y, Kakeya T, Waragai M, Kondo M, Allsop D, Tokuda T. Quantification of plasma phosphorylated tau to use as a biomarker for brain Alzheimer pathology: pilot case-control studies including patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. Mol Neurodegener 査読有, 2017;12:63. doi:10.1186/s13024-017-0206-8.
- 3) Kasai T, Kondo M, Ishii R, Tanaka A, Ataka S, Shimada H, Tomiyama T, Mori H, Taylor M, Allsop D, Nakagawa M, Mizuno T, Tokuda T. A $\beta$  levels in the jugular vein and high molecular weight A $\beta$  oligomer levels in CSF can be used as biomarkers to indicate the anti-amyloid effect of IVIg for Alzheimer's disease. PLoS One. 査読有, 2017; 12(4): e0174630. doi: 10.1371/journal.pone.0174630.
- 4) Sakaue S, Kasai T, Mizuta I, Suematsu M, Osone S, Azuma Y, Imamura T, Tokuda T, Kanno H, El-Agnaf O, 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? Npj Parkinson's Disease 査読有, 2017; 3:13. doi:10.1038/s41531-017-0014-4.
- 5) Shahnawaz M, Tokuda T, Waragai M, Mendez N, Ishii R, Trenkwalder C, Mollenhauer B, Soto C. Development of a Biochemical Diagnosis of Parkinson Disease by Detection of  $\alpha$ -Synuclein Misfolded Aggregates in Cerebrospinal Fluid. JAMA Neurol. 査読有, 2017; 74(2):163-172. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.4547.
- 6) Majbour NK, Chiasserini D, Vaikath NN, Eusebi P, Tokuda T, van de Berg W, Parnetti L, Calabresi P, El-Agnaf OM. Increased levels of CSF total but not oligomeric or phosphorylated forms of alpha-synuclein in patients diagnosed with probable Alzheimer's disease. Sci Rep. 査読有, 2017;7:40263. doi: 10.1038/srep40263.
- 7) Koyama T, Kuriyama N, Ozaki E, Matsui D, Watanabe I, Miyatani F, Kondo M, Tamura A, Kasai T, Ohshima Y, Yoshida T, Tokuda T, Mizuta I, Mizuno S, Yamada K, Takeda K, Matsumoto S, Nakagawa M, Mizuno T, Watanabe Y. Serum albumin to globulin ratio is related to cognitive decline via reflection of homeostasis: a nested case-control study. BMC Neurol. 査読有, 2016;16(1):253.
- 8) Majbour NK, Vaikath NN, Eusebi P, Chiasserini D, Ardah M, Varghese S, Haque ME, Tokuda T, Auinger P, Calabresi P, Parnetti L, El-Agnaf OMA. Longitudinal changes in CSF alpha-synuclein species reflect Parkinson's disease progression. Mov Disord 査読有, 2016; 31(10): 1535-1542. doi: 10.1002/mds.26754.
- 9) Murakami K, Tokuda M, Suzuki T, Irie Y, Hanaki M, Izuo N, Monobe Y, Akagi K, Ishii R, Tatebe H, Tokuda T, Maeda M, Kume T, Shimizu T, Irie K. Monoclonal antibody with conformational specificity for a toxic conformer of amyloid  $\beta$ 42 and its application toward the Alzheimer's disease diagnosis. Sci Rep. 査読有, 2016;6:29038. doi: 10.1038/srep29038.
- 10) Yoshihara A, Fukatsu M, Hoshi K, Ito H, Yamaguchi Y, Ishii R, Tokuda T, Miyajima M, Arai H, Kato T, Furukawa K, Arai H, Kikuchi A, Takeda A, Ugawa Y, Hashimoto Y. Subgroup differences in "brain-type" transferrin and  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease and multiple system atrophy. J Biochem. 査読有, 2016; 160(2): 87-91. doi: 10.1093/jb/mvw015.
- 11) 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, 2016; 11(1): e0147574. doi: 10.1371/journal.pone.0147574.
- 12) Majbour NK, Vaikath NN, van Dijk KD, Ardah MT, Varghese S, Vesterager LB, Montezinho LP, Poole S, Safieh-Garabedian B, Tokuda T, Teunissen CE, Berendse HW, van de Berg WD, El-Agnaf OM. Oligomeric and phosphorylated alpha-synuclein as potential CSF biomarkers for Parkinson's disease. Mol Neurodegener. 査読有, 2016;11(1):7. doi: 10.1186/s13024-016-0072-9.
- 13) Kyotani A, Azuma Y, Yamamoto I, Yoshida H, Mizuta I, Mizuno T, Nakagawa M, Tokuda T, Yamaguchi M. Knockdown of the drosophila FIG4 induces deficient locomotive behavior, shortening of motor neuron, axonal targeting aberration, reduction of life span and defects in eye development. Exp Neurol. 査読有, 2015; 277: 86-95. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.12.011.

- 14) Chambers JK, Tokuda T, Uchida K, Ishii R, Tatebe H, Takahashi E, Tomiyama T, Une Y, Nakayama H. The domestic cat as a natural animal model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 査読有, 3(1): 78, 2015. doi: 10.1186/s40478-015-0258-3.
- 15) Kuriyama N, Yamada K, Sakai K, Tokuda T, Akazawa K, Tomii Y, Tamura A, Kondo M, Watanabe I, Ozaki E, Matsui D, Nakagawa M, Mizuno T, Watanabe Y. Ventricular temperatures in idiopathic normal pressure hydrocephalus (iNPH) using DWI-based MR thermometry. *Magn Reson Med Sci.* 査読有, 14(4): 305-12, 2015. doi: 10.2463/mrms.2014-0076.
- 16) Ishii R, Tokuda T, Tatebe H, Ohmichi T, Kasai T, Nakagawa M, Mizuno T, El-Agnaf OMA. Decrease in plasma levels of  $\alpha$ -synuclein is evident in patients with parkinson's disease after elimination of heterophilic antibody interference. *PLoS ONE* 査読有, 2015; 10(4): e0123162. doi: 10.1371/journal.pone.0123162.
- 17) Yoshita M, Arai H, Arai H, Arai T, Asada T, Fujishiro H, Hanyu H, Iizuka O, Iseki E, Kashihara K, Kosaka K, Maruno H, Mizukami K, Mizuno Y, Mori E, Nakajima K, Nakamura H, Nakano S, Nakashima K, Nishio Y, Orimo S, Samuraki M, Takahashi A, Taki J, Tokuda T, Urakami K, Utsumi K, Wada K, Washimi Y, Yamasaki J, Yamashina S, Yamada M. Diagnostic accuracy of  $^{123}\text{I}$ -meta-iodobenzylguanidine myocardial scintigraphy in dementia with lewy bodies: a multicenter study. *PLoS ONE* 査読有, 2015; 10(3): e0120540. doi: 10.1371/journal.pone.0120540.
- [学会発表](計 17 件)
- 1) 徳田隆彦: 3. 前頭側頭型認知症のバイオマーカー. シンポジウム 25: 前頭側頭葉変性症の分子病態と診断・治療 (座長: 新井哲明, 石津秀樹). 日本認知症学会学術集会(第 36 回), 2017 年 11 月 26 日, 金沢. (企画シンポジウム: 招待講演).
- 2) 徳田隆彦: 4. バイオマーカーからみたレビー小体病の多様性. シンポジウム 21: バイオマーカーからみたレビー小体病の多様性 (座長: 服部信孝, 藤城弘樹). 日本認知症学会学術集会(第 36 回), 2017 年 11 月 26 日, 金沢. (企画シンポジウム: 招待講演).
- 3) 徳田隆彦: 特別講演 2. 診断 AD BLD FTD の学際的アプローチ. 座長: 石垣泰則, 瀧山嘉久. 日本早期認知症学会学術大会(第 18 回), 2017 年 10 月 14 日, 両国 KFC ホール, 東京. (招待講演).
- 4) Kasai T, Sakaue S, Mizuta I, Suematsu M, Osone S, Azuma Y, Imamura T, Tokuda T, Kanno H, El-Agnaf O, 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? The 23rd World Congress of Neurology 2017, Kyoto, Japan, 2017.9.17.
- 5) 徳田隆彦: 3.  $\alpha$ -シヌクレインオリゴマーから  $\alpha$ -シヌクレイノパチーを考える. 優秀賞受賞者シンポジウム(小野賢二郎)「オリゴマー仮説に基づいて神経変性疾患の病態を考える」. 座長: 小野賢二郎, 岡野栄之. 演者: 小野賢二郎, 富山貴美, 徳田隆彦, 岡野栄之. 日本神経化学会大会(第 60 回), 2017 年 9 月 8 日, 仙台. (企画シンポジウム: 招待講演).
- 6) Aiba I, Ikeuchi T, Takigawa H, Shimohata T, Tokuda T, Morita M, Onodera O, Murayama S, Hasegawa K, Nakashima K: Progression of milestones by clinical types in progressive supranuclear palsy: a longitudinal observational study of a cohort of patients with PSP/CBD (the JALPAC project). The 21st International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (MDS), Vancouver, Canada, 2017.6.5.(6.4-6.8).
- 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. The 13th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases (AD/PD2017), Vienna, Austria, 2017.3.31.
- 8) 徳田隆彦: 3. バイオマーカーとしての  $\alpha$ -シヌクレイン. シンポジウム 15: パーキンソン病における  $\alpha$ -シヌクレインの役割: 遺伝子からその機能まで(座長: 服部信孝). 日本認知症学会学術集会(第 35 回), 2016 年 12 月 2 日, 東京. (シンポジウム).
- 9) 徳田隆彦: 3. バイオマーカー; CBS との鑑別を含めて. シンポジウム 9: Progressive Supranuclear Palsy: 基礎と臨床 (座長: 古川芳明). 日本認知症学会学術集会(第 35 回), 2016 年 12 月 1 日, 東京. (シンポジウム).
- 10) Tokuda T, Ikeuchi T, Takigawa H, Aiba I, Shimohata T, Morita M, Onodera O, Murayama S, Nakashima K: A longitudinal observational study of a cohort of patients with PSP/CBD: the JALPAC project. The 20th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (MDS), Berlin, Germany, 2016.6.20.
- 11) 徳田隆彦: LM-11-2. 国際的な現状と今後の展望. レクチャーマラソン(教育講演)11: 神経変性疾患とバイオマーカー. 座長: 祖父江元, 演者: 服部信孝, 徳田隆彦. 日本神経学会学術大会(第 57 回), 2016 年 5 月 20 日, 神戸. (招待講演).
- 12) 徳田隆彦: S-06-1. 臨床症候学の立場か

ら：血液・脳脊髄液バイオマーカーの研究  
成果を含めて。シンポジウム 06：3 大変性  
認知症疾患（AD、DLB、FTD）の病態解  
明に対する学際的アプローチ。日本神経  
学会学術大会（第 57 回）、2016 年 5 月 19 日、  
神戸。（シンポジウム）

- 13) 徳田隆彦：アルツハイマー型認知症のバ  
イオマーカーの現状と課題。第 21 回北海  
道老年期認知症研究会。2015 年 10 月 24 日、  
札幌市（招待講演）。
- 14) 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. The 8th Clinical Trials on  
Alzheimer's Disease (CTAD) 2015, Poster,  
Barcelona, Spain, 2015.11.6.
- 15) Tokuda T, Kondo M, Kuriyama N,  
Matsushima S, Nakanishi H, Ishikawa M:  
Distribution of amyloid burden is different  
between idiopathic normal pressure  
hydrocephalus and Alzheimer's disease. The  
7th Meeting of the International Society for  
Hydrocephalus & Cerebrospinal Fluid  
Disorders (Hydrocephalus 2015), Banff,  
Canada, 2015.9.21.
- 16) 徳田隆彦：教育講演ベーシック B-01-3:  
パーキンソン病とその関連疾患の生化学  
的バイオマーカー：up to date。日本神経学  
会学術大会（第 56 回）、教育講演ベーシッ  
ク B-01：明日からの臨床に役立つパーキ  
ンソン病診断 up to date。2015 年 5 月 20 日、  
新潟（企画シンポジウム：招待講演）。
- 17) 徳田隆彦：青年期以降のダウン症候群患  
者に出現する認知機能障害。日本小児科  
学会学術集会（第 118 回）、総合シンポジウ  
ム 2-2：21 トリソミーの”小児以降”を知る。  
2015 年 4 月 17 日、大阪。（企画シンポジウ  
ム：招待講演）。

〔図書〕（計 4 件）

- 1) 大道卓摩, 徳田隆彦. 第 9 章. 進行性核上  
性麻痺. 小野賢二郎監訳. 「アルツハイマ  
ー病 認知症疾患 臨床医のための実践  
ガイド」(Memory Loss, Alzheimer's Disease,  
and Dementia, 2nd ed. A.E. Budson & P.R.  
Solomon 著). 朝倉書店, 東京: p 99-105,  
2017.11.20.
- 2) 徳田隆彦. 第 5 章 診断・治療の対象とし  
てのバイオマーカー. 4) アルツハイマ  
ー病の髄液バイオマーカー研究: 過去・現  
在・未来. 森啓編, 実験医学 2017 年 7 月増  
刊号「認知症研究の新時代」, 羊土社, 東  
京: p. 156-160, 2017.8.1.
- 3) 徳田隆彦. 6.前頭側頭葉変性症の薬物療法  
②神経内科的側面から. 祖父江元・池田  
学・中島健二監修. 前頭側頭葉変性症の療  
養の手引き. 松江市: p.47-49. 平成 28 年度  
厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患政  
策研究事業)神経変性疾患領域における基  
盤的調査研究班. 2017.3.1.

- 4) 徳田隆彦. 特発性正常圧水頭症. 医学書院  
編. 今日の治療指針 2017 年版—私はこう  
治療している. 東京: p.931-932. 医学書院  
2017.1.1.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

徳田 隆彦 (TOKUDA, Takahiko)  
京都府立医科大学・分子脳病態解析学・教  
授  
研究者番号：80242692

### (2) 研究分担者

笠井 高士 (KASAI, Takashi)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・助  
教  
研究者番号：70516062

建部 陽嗣 (TATEBE, Harutsugu)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・助  
教  
研究者番号：00637027

渡邊 義久 (WATANABE, Yoshihisa)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・講  
師  
研究者番号：50363990

(3) 連携研究者：なし

(4) 研究協力者：なし