

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14339

研究課題名(和文) 生体内の微量アミロイド線維増幅によるパーキンソン病のバイオマーカーの研究

研究課題名(英文) Study of biomarkers of Parkinson's disease by the amplification of amyloid fibrils in biological sample

研究代表者

荒木 克哉 (Araki, Katsuya)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50649431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病の有用かつ簡便な診断法はまだまだ存在しない。今日においても確定診断は患者死亡後に剖検によってなされ、パーキンソン病に特徴的であるレビー小体の存在が重要となる。我々は患者髄液中でレビー小体の形成に関連して起こる変化を早期に感度よく検出する方法を考案した。本研究において、その実現の可能性を示す結果が得られたことから、一般の病院で行える検査としての実用化が期待される。

研究成果の概要(英文)：Useful and simple diagnosis of Parkinson's disease does not yet exist. The definitive diagnosis is made by autopsy, the presence of Lewy bodies, which are characteristic of Parkinson's disease, is important. We have devised a method of detecting early changes that occur in connection with the formation of Lewy bodies in Parkinson's disease patient's cerebrospinal fluid. In the present study, since we showed the result that our method could diagnose the Parkinson's disease, we aim to put the method into practical use in 5 to 10 years.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 医療診断装置 アミロイド レビー小体

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) における簡便かつ有用なバイオマーカーはいまだ存在せず、経験豊富な医師の診察を中心に各種検査結果や抗パーキンソン病薬への反応性を踏まえて診断されているのが現状であり、今日においても確定診断は患者死亡後に剖検によって行うしかない。ここ数年で保険適応にもなった MIBG 心筋シンチグラフィや DATSCAN 検査は早期診断に有用であると期待されるが、装置の大きさや費用の観点からは簡便な検査とは言い難い。一方、最近では進行抑制剤や iPS 細胞を用いた治療の研究がさかんに行われているが、将来これらの治療を有効活用させるためには、なるべく早期に精度よく PD と診断できる簡便な検査法の開発も必要不可欠である。最近の考え方では、PD においては特徴的な運動症状 (安静時振戦、固縮、動作緩慢、姿勢反射障害) が出現する前から便秘、嗅覚障害、レム睡眠行動異常といった非運動症状が出現するとされており、MIBG 心筋シンチグラフィで早期に心臓交感神経の障害を検出できることから、運動症状の出現するかなり前から神経変性は始まっているものと推察される。この早期に認められるわずかな変化を何らかの方法で検出できれば診断に役立つ可能性がある。

2. 研究の目的

血液や脳脊髄液を用いた画期的かつ安価な検査法を開発することによって、PD の診断精度を向上と近い将来に実用化されると見込まれる進行抑制治療に必要な早期診断を目指す。

3. 研究の方法

全自動タンパク凝集検出装置” HANABI”

HANABI は HANdai Amiloid Burst Inducer の略であり、大阪大学蛋白質研究所の後藤研究室がエレコン科学株、コロナ電気株と共同で開発した全自動で多数の蛋白質凝集を、しかも短時間で検出できる装置である。この装置は超音波発生装置とマイクロプレートリーダーを組み合わせたものであり、超音波の照射によってアミロイド原性蛋白質のアミロイド線維形成が促進されることを応用することで実現されたアミロイド線維のハイスループットアッセイ装置である (図 1)。

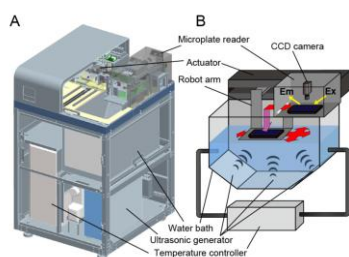


図 1

この装置を用いることで、一度に最大 96 サンプルのアミロイド線維形成の同時測定可能なことであり、短時間で大規模なスクリーニングを行うこともできる。

生体試料に対する HANABI による測定

HANABI を用いアミロイド線維形成の測定はすでに確立しており (Goto, et al. J. Biol. Chem. 2014 ; 289:27290-27299), 新たに検討が必要なことは測定溶液の調整方法である。これまでの経験から大腸菌リコンビナントの α シヌクレインを $100 \mu\text{M}$ に調整し、測定用のウェルに $200 \mu\text{l}$ 入れ、ここに患者から採取した試料 (髄液または血清) を $20 \mu\text{l}$ 添加した上で、さらに終濃度が $5 \mu\text{M}$ となるように ThT 溶液を添加した溶液での測定を行った。

患者群の設定

PD と PD 以外の神経疾患の患者 (正常圧水頭症、筋萎縮性側索硬化症など) の 2 群各 10 例程度でアミロイド線維形成反応に有意差がみられるかどうかを検討した。

測定条件の最適化

測定条件として、当初は α シヌクレイン濃度を 1.0mg/ml とし、 50mM Tris-HCl 150mM NaCl pH7.4 バッファー中で 3 分超音波照射 + 7 分インキュベーションしながら 10 分おきに測定という設定 (基本条件) から開始し、 α シヌクレイン濃度 NaCl 濃度、超音波照射時間、インキュベーション時間などを変化させて最適化条件の検討を行った。

レビー小体の構造解析

SPring-8 の BL43IR において、放射光顕微赤外分光法を用いて、実際の脳内のレビー小体がアミロイド線維と同様の構造を有しているかどうかの検討を行った (図 2)。

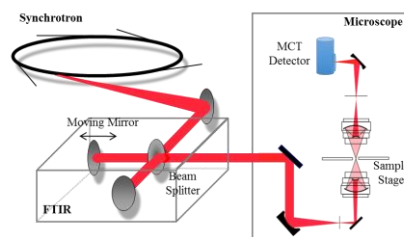


図 2

4. 研究成果

基本条件による Lag time による解析

PD患者群16例, 非PD患者群8例に対して, 基本条件での測定を行い, Lag time を ThT 蛍光値が最大値の 10%を超えた最初の時刻と定義して解析した結果を図1に示す. 図1が示すように, 明らかな有意差は得られなかったが, PD患者群ではLag time が若干早まる傾向も見られた.

なお, PD患者の重症度 (Hoehn-Yhar 分類) や MIBG 心筋シンチグラフィの結果で分類した患者群に対する解析を行ったところ, 重症度とLag time との間に明らかな相関は見られなかったが, MIBG 心筋シンチグラフィ陽性患者群ではLag time がやや早まる傾向が見られた.

発症からの年数とLag time との間には明らかな相関は見られなかった.

測定条件の検討

PD患者群と非PD患者群のLagtime の差により明確な有意差が見い出せる測定条件を検討すべく, α シヌクレイン濃度, バッファー, 超音波照射時間などのパラメータを変化させて測定を行った. 現時点では, まだ十分な改善は得られていないが, バッファーの塩濃度を上げる (150mM \rightarrow 1MNaCl) ことでPD患者群と非PD患者群のLagtime の差が明瞭化する傾向を見出ししている (図3).

表1に示すように, 図3が示す結果に基づくPD診断 (PD例10例, 非PD例7例) において, Lag time 1000minをカットオフとした場合で感度80%, 特異度71%, Lag time 1100minをカットオフとした場合で感度100%, 特異度57%の診断結果が得られた. このことから, 今後症例数をさらに増やした検討を行うことや測定条件を最適化させることで本研究手法を実用化しうる可能性が見い出せたものと考ええる.

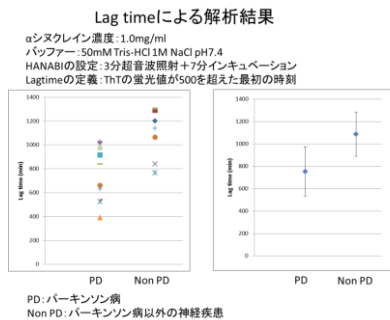


図3

Lag time < 1000min で PD と診断

	PD	Non PD	
陽性	8	2	80 陽性的中率
陰性	2	5	71 陰性的中率
感度	80	71	特異度

Lag time < 1100min で PD と診断

	PD	Non PD	
陽性	10	3	77 陽性的中率
陰性	0	4	100 陰性的中率
感度	100	57	特異度

表1

現在は主に超音波照射時間とインキュベーション時間の組み合わせの検討を行っている. 当初はアミロイド線維形成反応の促進による測定時間短縮のために比較的長時間の超音波照射を行っていたが, 脳脊髄液内の微量シードの増幅を評価するには逆に超音波照射時間をなるべく短くする方がよい可能性を見出しつつある.

今後は暫定的な最適化条件を決定し, 症例数を増やした検討を行っていく予定である.

PDの重症度とLag timeの関係

PDの重症度の標準的なH-Yの重症度分類とLag time は逆相関する可能性が示唆された (図4).

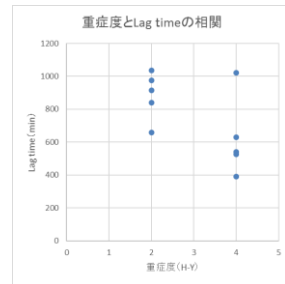


図4

PD発症からの年数とLag timeの関係

PD発症からの年数とLag time には逆相関の傾向があるかもしれないが, 症例数がまだ少なくまだ十分な検討はできていない. (図5).

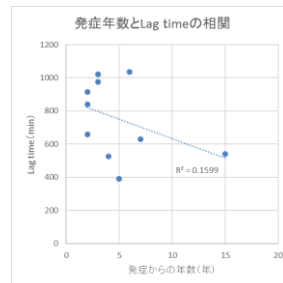


図5

非PD症例における年齢とLag timeの関係

非PD症例における年齢とLag time には逆相関の関係を認めた (図6). これは加齢によってLag time が早まる可能性があることを示唆すると思われた.

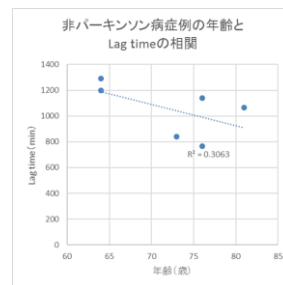


図6

レビー小体の構造解析

SPring-8 の放射光による顕微赤外分光法を用いて、PD 患者脳内の存在する実際のレビー小体が β シート構造を多く有していることを確認した (図7)。

この結果は患者髄液中に存在するとされるシードの存在を支持する結果と考えられ、本研究の実現可能性を支持する重要な成果である。

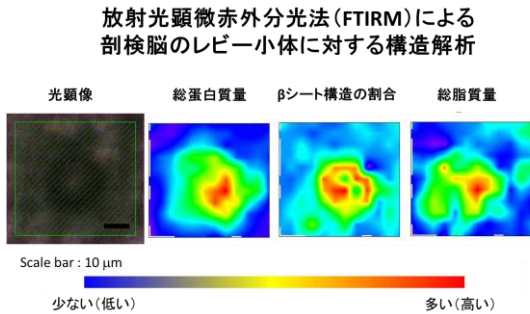


図7

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1件)

① Synchrotron FTIR micro-spectroscopy for structural analysis of Lewy bodies in the brain of Parkinson's disease patients. Katsuya Araki, Naoto Yagi, Yuka Ikemoto, Hisashi Yagi, Chi-Jing Choong, Hideki Hayakawa, Goichi Beck, Hisae Sumi, Harutoshi Fujimura, Taro Moriwaki, Yoshitaka Nagai, Yuji Goto, Hideki Mochizuki. Scientific Reports. 5, 17625 (2015)

DOI: 10.1038/srep17625

[学会発表] (計2件)

① The structure analysis for alpha-synuclein and Lewy bodies with synchrotron radiation. Katsuya Araki, Naoto Yagi, Rie Nakatani, Hideki Hayakawa, Kousuke Baba, Yuji Goto, Hideki Mochizuki. 第56回日本神経学会学術大会 2015年5月22日 新潟コンベンションセンター

② パーキンソン病の新しい治療に向けて～凝集阻害因子のハイスループットスクリーニング～. 荒木克哉, 藪本大紀, 宗正智, 馬場孝輔, 後藤祐児, 望月秀樹. 日本神経治療学会・2015年11月27日 名古屋国際会議場

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 克哉 (ARAKI, Katsuya)
大阪大学医学部附属病院・医員
研究者番号：50649431

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

望月 秀樹 (MOCHIZUKI, Hideki)
大阪大学大学院医学系研究科神経内科学・教授
研究者番号：90230044
後藤 祐児 (GOTO, Yuji)
大阪大学蛋白質研究所・教授
研究者番号：40153770
八木 直人 (YAGI, Naoto)
公益財団法人高輝度光科学研究センター (JASRI)・利用研究促進部門 副部門長
研究者番号：80133940