

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07089

研究課題名(和文) 高密度の異常シヌクレインを利用したレビー小体病の早期診断技術の開発

研究課題名(英文) Development of precise detection system for early stage of Lewy body disease

研究代表者

丹治 邦和 (TANJI, Kunikazu)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：10271800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シヌクレイン(Syn)はパーキンソン病(PD)やレビー小体型認知症(DLB)の病態に深く関与する分子である。PDおよびDLBを早期に診断するため、コスト面、簡易さの点から血液中のバイオマーカーが必要とされるが、健常者の脳にある「正常Syn」と患者脳内の「異常Syn」を区別できないため検出法の精度が低い。我々はこれまでに「異常Syn」を区別・検出する方法を確立し、異常Synを認識する分子NUB1を同定してきた。特に2017年～2019年の研究では、患者脳にあるNUB1が健常者にあるNUB1と異なり、異常Synとの結合能・分解能が高いことを見出した。今後この特性を生かし、簡易な検出系を開発する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病(PD)やレビー小体型認知症(DLB)を早期に診断できれば、早期から治療を開始することができる。しかし上述したように、健常者の脳にある正常なSynと患者脳内の異常Synを区別できないため検出法の精度が低く、実用化には至っていない。2017年～2019年に得た知見は、これまでに培ってきた技術と知識をさらに発展させたものである。早期のPD、DLBの診断を可能にする簡易な検出系を開発する準備が整ったといえる。

研究成果の概要(英文)：Neurodegenerative diseases are characterized by the aggregation of specific molecules, especially alpha-synuclein (Syn), which is aggregated in the brains of patients with Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies (DLB) and multiple system atrophy (MSA), which are called synucleinopathies.

We revealed that NUB1 coexists with abnormal Syn in LB disease patients and Tg mice expressing Syn, raising the possibility that NUB1 highly contributes to pathogenesis of synucleinopathies.

In this study, we found that post-modified NUB1 is different from native NUB1 especially, phosphorylation of NUB1 at S46 (P-NUB46) exhibited the greatest impact on the degradation of aggregates and cell-viability. Using our specific antibody against P-NUB46, we found that NUB1 is indeed phosphorylated at S46 in the brain, and P-NUB46 levels are significantly higher in DLB brains than in control brains. These findings suggest that P-NUB46 plays a important role in the pathogenesis of synucleinopathies.

研究分野：神経難病 認知症

キーワード：神経難病 認知症 パーキンソン病 レビー小体型認知症 多系統萎縮症

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) やレビー小体型認知症 (DLB) はいまだ原因が不明の神経難病である。国内には数十万人の罹患者があり、病早期から治療を始めるほど効果が高いことが知られている。これらの疾患の原因遺伝子および危険因子としてアルファシヌクレイン (Syn) が同定されている。生理的状況下では、Syn は神経細胞の前シナプスに局在しており、タンパク質分解酵素で容易に可溶化される。一方、PD や DLB の病的状況下では Syn は不溶性となり、神経伝達物質の貯蔵および放出の調節が損なわれることが病態の増悪にかかわっているとされている。我々は不溶性 Syn の結合タンパク質の一つとして新規ユビキチン様タンパク質「NUB1」を同定した。また、NUB1 は効率的なタンパク質分解機能を有することをこれまでに報告してきた。

## 2. 研究の目的

PD および DLB を早期に診断するため、コスト面、簡易さの点から血液中のバイオマーカーが必要とされ、実際に血中や髄液中の Syn を指標にした検出キットも市販されている。しかし、健康者の脳にある「正常 Syn」と患者脳内の「異常 Syn」を区別できないため検出法の精度が低く、また結果が不安定であり、臨床診断に応用するまでには至っていない。

我々はこれまでに異常 Syn を区別・検出する方法を確立し、異常 Syn を認識する分子 NUB1 を同定してきた。特に患者脳においては NUB1 が異常リン酸化されていることを作製した抗体で明らかにした。そこで本研究課題では以下 2 点を明らかにすることを目的とした。

1. NUB1 の異常リン酸化部位を同定する。
2. リン酸化 NUB1 と病態との関わりを明らかにする。

## 3. 研究の方法

ステップ(1)、(2)、(3)の順で本研究を施行した。

- (1) 異常 Syn の目印分子である NUB1 の「リン酸化模倣変異体」を 7 種類作製した。ヒト NUB1 のアミノ酸番号に相当する (46、161、228、353、445、489、589) である。作製したリン酸化 NUB1 による凝集体への影響を培養細胞を用いて検討した。2 種類の凝集体「レビー小体様凝集体」および「異常ハンチンチンの凝集体」を指標にした。細胞障害性は MTT 測定を用いた。また凝集体への影響は蛍光強度を測定した。
- (2) 異常凝集体への影響が確認された「リン酸化 NUB1」に対する抗体を作製した。ウサギにリン酸化ペプチドを免疫し、定法に従って、抗体を作製後、硫酸法により精製した。
- (3) 作製した抗体を用いて、ヒトおよびマウス凍結脳組織、パラフィン包埋切片および血清・脳脊髄液サンプル (既に凍結保存済み) を用いて局在の検討や定量を行った。

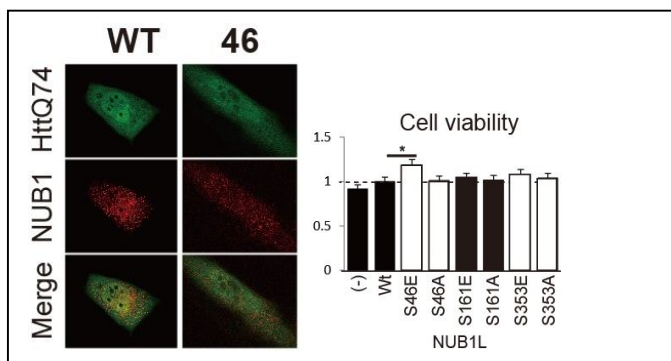
本研究における動物実験計画は、弘前大学動物実験委員会により承認され、弘前大学実験動物に関する指針に遵って行った。遺伝子組み換え動物使用に当たっての拡散防止処理を踏まえ、組み換え DNA 実験の弘前大学動物倫理委員会の承認を得ている。本研究に使用するヒト剖検脳は本研究室に保管、または新潟大学脳研究所から入手しており、いずれも書類による審査を経て、使用しており倫理上問題はない。

## 4. 研究成果

2015 - 2017 年の科研費採択課題で作製した NUB1 抗体を用いて、ヒト凍結脳から NUB1 を免疫沈降したところ、DLB では NUB1 の異常リン酸化が確認された。そこで本課題 (2017 - 2019) では NUB1 の異常リン酸化が病態とより関連していると想定した。

まずリン酸化 NUB1 による凝集体への影響をしらべるために、培養細胞を用いて Cell-based assay を構築した。2 種類の凝集体「レビー小体様凝集体」および「異常ハンチンチン (Htt) の凝集体」を指標にした。その結果、以下 2 つのことが明らかとなった。

- (1) N 末端側のリン酸化 NUB1 (46 番目) において凝集体数が有意に減少した (図 1 左)。
- (2) 同じ N 末端側のリン酸化 NUB1 において細胞毒性が軽減された (図 1 右)。



**図1 リン酸化 NUB1 変異体の Htt 凝集体への影響**

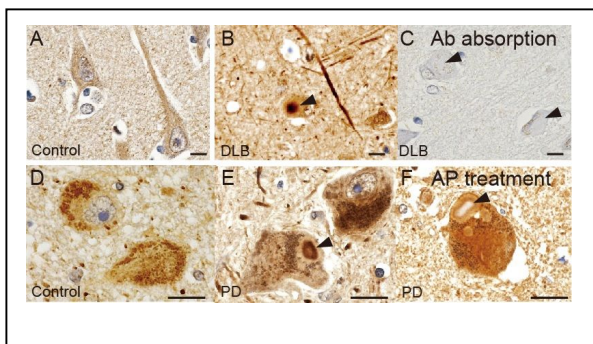
異常ハンチンチン(Htt、緑色)は NUB1 (赤色)と共発現させると、変異体によって凝集体数に変化が現れる。特に46番目セリン残基のリン酸化は凝集体数を減少させ、細胞障害を軽減した。

そこでこのリン酸化部位に対する「リン酸化 NUB1 特異抗体」を作製した。そしてヒトおよびマウスの免疫染色および量的比較を行った。46番目のセリン残基がリン酸化された NUB1 を特異的に認識する抗体が作製できた。そこでヒトのパラフィン切片に対して免疫染色を行った(zy2)。このリン酸化 NUB1 抗体は正常の神経細胞の胞体で淡く陽性を示した。一方、レビー小体型認知症やパーキンソン病に認められるレビー小体の中心部分が強陽性を示した。抗体による特異的な染色であることを確認するために、2つの実験をおこなった。1つ目は抗原で抗体を吸収した吸収実験(図2C)と2つ目は脱リン酸化であらかじめ処理した切片を染色した(図2F)。いずれの場合も陽性反応がなくなることから、今回作製したリン酸化特異的 NUB1 抗体の反応であることを確認した。

**図2 S46番目リン酸化 NUB1 の脳内の局在**

ヒトパラフィン切片において健常者の脳内では、S46番目リン酸化 NUB1 は淡く神経細胞に局在する(A、D)。一方、レビー小体型認知症(DLB)もしくはパーキンソン病(PD)の患者脳においてはレビー小体の中心部分に局在する(矢印、B、E)。抗体特異性を確認するために2種類の陰性コントロールを置いた。1つ目は抗体吸収試験(C)。2つ目は脱リン酸化酵素による前処理をおこなった(F)。

側頭葉皮質(A,B,C) 黒質(D,E,F) Bar= 20 μm



(総括として)レビー小体病に認められる「異常 Syn」は病態に直結しているため、簡易に検出できれば、病態解明ばかりでなく、早期診断にも応用できる。しかし、これまで技術面で問題があり実現できていない。そこで本研究では異常 Syn の結合分子である NUB1 に着目し、大きく2つの結果を得た。

- (1) NUB1 自体が異常 Syn と関わっており、特に NUB1 のリン酸化が寄与していること。
- (2) レビー小体病の脳内では NUB1 は異常リン酸化されていること。特に NUB1 の C 末端側(46番目セリン)のリン酸化部位が凝集体数を減少させて、細胞障害を軽減すること。

これらの結果はシヌクレイノパチーの病態解明にむすびつくと同時に異常 Syn の検出技術へ応用できる可能性がある。今後、これらの分子の特性を組み合わせることで早期の臨床診断に耐えうる Syn の検出技術を開発する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanji Kunikazu, Miki Yasuo, Mori Fumiaki, Nikaido Yoshikazu, Narita Hidemi, Kakita Akiyoshi, Takahashi Hitoshi, Wakabayashi Koichi	4. 巻 127
2. 論文標題 A mouse model of adult-onset multiple system atrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 339 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2019.03.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanji Kunikazu, Miki Yasuo, Mori Fumiaki, Kon Tomoya, Kakita Akiyoshi, Takahashi Hitoshi, Wakabayashi Koichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Phosphorylated NUB1 distinguishes synuclein in Lewy bodies from that in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 803 ~ 812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bpa.12728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Fumiaki, Tada Mari, Kon Tomoya, Miki Yasuo, Tanji Kunikazu, Kurotaki Hidekachi, Tomiyama Masahiko, Ishihara Tomohiko, Onodera Osamu, Kakita Akiyoshi, Wakabayashi Koichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Phosphorylated TDP-43 aggregates in skeletal and cardiac muscle are a marker of myogenic degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and various conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-019-0824-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Narita Hidemi, Tanji Kunikazu, Miki Yasuo, Mori Fumiaki, Wakabayashi Koichi	4. 巻 514
2. 論文標題 Trehalose intake and exercise upregulate a glucose transporter, GLUT8, in the brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 672 ~ 677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.05.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanji Kunikazu, Mori Fumiaki, Miki Yasuo, Utsumi Jun, Sasaki Hidenao, Kakita Akiyoshi, Takahashi Hitoshi, Wakabayashi Koichi	4. 巻 112
2. 論文標題 YOD1 attenuates neurogenic proteotoxicity through its deubiquitinating activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 14 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2018.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kon Tomoya, Tanji Kunikazu, Mori Fumiaki, Kimura Akari, Kakita Akiyoshi, Wakabayashi Koichi	4. 巻 39
2. 論文標題 Immunoreactivity of myelin associated oligodendrocytic basic protein in Lewy bodies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 279 ~ 285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12564	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kon Tomoya, Mori Fumiaki, Oyama Yoshinobu, Tanji Kunikazu, Kimura Tamaki, Takahashi Shirushi, Wakabayashi Koichi	4. 巻 39
2. 論文標題 An autopsy case of early stage amyotrophic lateral sclerosis with TDP 43 immunoreactive neuronal, but not glial, inclusions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 224 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kon Tomoya, Mori Fumiaki, Arai Akira, Miki Yasuo, Tanji Kunikazu, Kurotaki Hidekachi, Tomiyama Masahiko, Wakabayashi Koichi	4. 巻 39
2. 論文標題 Atypical globular glial tauopathy with a combination of types I and II pathology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 127 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12536	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Fumiaki, Miki Yasuo, Kon Tomoya, Tanji Kunikazu, Wakabayashi Koichi	4. 巻 78
2. 論文標題 Autophagy Is a Common Degradation Pathway for Bunina Bodies and TDP-43 Inclusions in Amyotrophic Lateral Sclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 910 ~ 921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlz072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Fumiaki, Tanji Kunikazu, Miki Yasuo, Toyoshima Yasuko, Sasaki Hidenao, Yoshida Mari, Kakita Akiyoshi, Takahashi Hitoshi, Wakabayashi Koichi	4. 巻 662
2. 論文標題 Immunohistochemical localization of exoribonucleases (DIS3L2 and XRN1) in intranuclear inclusion body disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 389 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2017.10.061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miki Yasuo, Tanji Kunikazu, Mori Fumiaki, Utsumi Jun, Sasaki Hidenao, Kakita Akiyoshi, Takahashi Hitoshi, Wakabayashi Koichi	4. 巻 684
2. 論文標題 Autophagy mediators (FOXO1, SESN3 and TSC2) in Lewy body disease and aging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 35 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.06.052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miki Yasuo, Tanji Kunikazu, Mori Fumiaki, Tataru Yota, Utsumi Jun, Sasaki Hidenao, Kakita Akiyoshi, Takahashi Hitoshi, Fimia Gian Maria, Wakabayashi Koichi	4. 巻 28
2. 論文標題 AMBRA1, a novel -synuclein-binding protein, is implicated in the pathogenesis of multiple system atrophy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 28 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bpa.12461	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miki Yasuo, Shimoyama Shuji, Kon Tomoya, Ueno Tatsuya, Hayakari Ryo, Tanji Kunikazu, Matsumiya Tomoh, Tsushima Eiki, Mori Fumiaki, Wakabayashi Koichi, Tomiyama Masahiko	4. 巻 63
2. 論文標題 Alteration of autophagy-related proteins in peripheral blood mononuclear cells of patients with Parkinson's disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurobiology of Aging	6. 最初と最後の頁 33 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neurobiolaging.2017.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miki Yasuo, Mori Fumiaki, Seino Yusuke, Tanji Kunikazu, Yoshizawa Tadashi, Kijima Hiroshi, Shoji Mikio, Wakabayashi Koichi	4. 巻 38
2. 論文標題 Colocalization of Bunina bodies and TDP-43 inclusions in a case of sporadic amyotrophic lateral sclerosis with Lewy body-like hyaline inclusions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 521 ~ 528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kasai Shuya, Yamazaki Hiromi, Tanji Kunikazu, Engler M?t? J?nos, Matsumiya Tomoh, Itoh Ken	4. 巻 64
2. 論文標題 Role of the ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.18-37	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tanji K., Miki Y., Mori F., Nikaido Y., Narita H., Kakita A., Takahashi H., Wakabayashi K
2. 発表標題 New MSA model mice recapitulate some pathological and clinical features in human patients
3. 学会等名 19th International Congress of Neuropathology (国際学会)
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 丹治邦和, 三木康生, 森文秋, 今智矢, 柿田明美, 高橋均, 若林孝一
2. 発表標題 Synphilin-1結合タンパク質 (NUB1) のリン酸化とレビー小体への局在
3. 学会等名 第60回日本神経病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森文秋, 三木康生, 今智也, 丹治邦和, 若林孝一
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症の脊髄前角におけるBunina小体とTDP-43封入体の関連
3. 学会等名 第60回日本神経病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今智矢, 中村琢洋, 羽賀敏博, 森文秋, 丹治邦和, 鬼島宏, 東海林幹夫, 若林孝一
2. 発表標題 アルツハイマー病変を合併した原発性側索硬化症の1剖検例
3. 学会等名 第60回日本神経病理学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 多系統萎縮症モデル動物	発明者 丹治邦和 若林孝一	権利者 弘前大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-98854	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 TDP-43プロテインパチーの治療薬並びに予防薬	発明者 若林孝一 丹治邦和 森文秋 清宮啓之	権利者 弘前大学 他一機 関
産業財産権の種類、番号 特許、2020-8430	出願年 2020年	国内・外国の別 国内



〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三木 康生  (Miki Yasuo)  (30709142)	弘前大学・医学研究科・助教    (11101)	
研究分担者	若林 孝一  (Wakabayashi Koichi)  (50240768)	弘前大学・医学研究科・教授    (11101)	