

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09770

研究課題名(和文) Synuclein蓄積を誘導する蛋白質による多系統萎縮症の治療法開発

研究課題名(英文) Therapeutic targets for multiple system atrophy

研究代表者

矢澤 生 (Yazawa, Ikuru)

常葉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：20312217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：多系統萎縮症(MSA)の病態モデルマウスを使って、MSAの発病に関わるタンパク質の蓄積を抑制する方法を検討した。MSAモデルマウスでは、MSA脳に類するオリゴデンドロサイトに蓄積するアルファシヌクレインが起点となり、神経変性を誘導することを明らかにした。MSAの神経変性ではシグナル分子などを介する間接的な伝播による発病を示唆し、オリゴデンドロサイトから発するシグナル誘導タンパク質の候補として、シスタチンCをモデルマウス脳より樹立した初代培養細胞から単離した。さらに、マウス初代培養細胞により、このシグナルを発するオリゴデンドロサイトでは、シグナル分子の放出はその分化の過程で異なる事を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いまだに治療法が確立していない神経変性疾患の一つ、多系統萎縮症のモデルマウスを使って、その発病機構を解明し神経変性に対する根本的な治療法の開発を目指した。同じアルファシヌクレインタンパク質の蓄積が原因となって発病する神経変性疾患群には複数の疾患が存在するが、各々の疾患ごとに臨床症状が異なるように発病様式が異なることが推測される。神経変性疾患では原因となるタンパク質蓄積から神経細胞が失われるが、神経変性の特徴や進行にかかる時間は異なる為、一律に同じタンパク質の蓄積機序とすることはできない。本研究では神経変性疾患では疾患ごとの特異的な発病様式にあった治療法の開発が必要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Multiple system atrophy (MSA) is a neurodegenerative disease caused by α -synuclein (α -syn) accumulation in oligodendrocytes and neurons. Using a transgenic mouse model overexpressing human α -syn in oligodendrocytes, we demonstrated that oligodendrocytic α -syn inclusions induced neuronal α -syn accumulation, resulting in progressive neuronal degeneration. We previously identified cystatin C, an oligodendrocyte-derived secretory protein that triggers α -syn upregulation and insoluble α -syn accumulation in neurons of the mouse central nervous system (CNS). Cystatin C is released by mouse oligodendrocytes overexpressing human α -syn, and extracellular cystatin C upregulates the endogenous α -syn gene in mouse neurons, leading to the accumulation of insoluble α -syn and apoptosis. Here, we reveal that the oligodendrocytic maturation relates to the cystatin C release in the CNS of the MSA mouse model.

研究分野：神経内科学

キーワード：多系統萎縮症 神経変性疾患 シヌクレイン オリゴデンドロサイト モデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン症候群では alpha-synuclein (Syn)が蓄積して神経細胞の脱落を起こす疾患群があり、遺伝性パーキンソン病では Syn 遺伝子の点変異や遺伝子重複等が神経変性の発病に関与する。この疾患群では Syn が神経細胞に蓄積して神経変性を起こすことから synucleinopathy と呼ぶ。抗パーキンソン病剤による症状の緩和も無効なことが多く、神経変性に対する根本的治療法の開発が難しい。病理学的に synucleinopathy の脳を調べるとパーキンソン病脳の黒質では神経細胞の細胞質に Syn が蓄積して、レビー小体の特徴的な封入体を形成する。他方、多系統萎縮症(MSA)脳では Syn のグリア細胞封入体(GCI)形成や神経細胞の軸索の Syn 蓄積が起こり、レビー小体を形成せずに神経細胞が脱落する。同じ Syn 蓄積が起こる2つの疾患間では異なる神経変性の機序が考えられ、応募者は以下に示す MSA 発病機構を明らかにした。

2005 年、オリゴデンドロサイト特異的に野生型ヒト Syn を強制発現する遺伝子改変マウス (CNP-Tg マウス) を作製して、マウス脳神経細胞では内因性のマウス Syn の蓄積が誘導されることを報告した(文献 1)。CNP-Tg マウスでは 10 ヶ月齢に運動機能の低下等の表現型が出現し、脳萎縮と神経細胞の脱落が観察された。グリア細胞のヒト Syn 封入体形成により、10 ヶ月齢に神経細胞の内因性マウス Syn の蓄積を認め、マウス脳の神経細胞変性は MSA 患者脳の病変に類似した。CNP-Tg マウス脳から確立した初代培養系では神経細胞に蓄積するマウス Syn は微小管タンパク質と結合して不溶化し、神経細胞の軸索に蓄積することを明らかにした(文献 2)。

今日知られている、Syn がプリオン病のように細胞間を伝播して神経細胞の変性を起こす伝播仮説では、発病後約 1 年以内に死に至るプリオン病と synucleinopathy とでは罹病期間が異なり、同じ機序で神経細胞の変性が起こるとは考えにくい。CNP-Tg マウス初代培養では発現するヒト Syn と蓄積する内因性マウス Syn とを区別して検討できる利点を有する。我々の過去の研究において、オリゴデンドロサイトから神経細胞に誘導される Syn は異なる Syn であることを示し、細胞間の直接伝播ではなくシグナル分子を介する間接的な伝播(Cystatin C による Syn 蓄積)であることを報告した(文献 3)。変性過程は 2 次的に起こり、直接の変性に比べて時間がかかることを示した。さらに、CNP-Tg マウスの脳初代培養で Syn が結合する Tub の結合部位をマッピングし、同部位のリコンビナント Tub 断端をおとりペプチドとして Syn と結合させると、Syn 不溶化と蓄積が抑制され(文献 4)、Syn 蓄積による神経細胞の変性が可逆性の変化であることを示した。

本研究においては、CNP-Tg マウスの脳初代培養を使って、MSA の初期病態に関係するオリゴデンドロサイトの Syn 蓄積について検討した。特に、オリゴデンドロサイトの分化の過程に着目して神経細胞の Syn 蓄積に与える影響を検討した。

[文献] 1. Yazawa I, et al, Neuron 2005

2. Nakayama K, et al. Am J Pathol 2009

3. Suzuki Y, et al. Am J Pathol 2014

4. Suzuki Y, et al. J Biol Chem 2014

2. 研究の目的

CNP-Tg MSA モデルマウスはヒトの病態を反映し、病態解明の手がかりになり、さらに治療法開発や創薬へと展開できる。本研究の独自性は、第一に、治療標的をオリゴデンドロサイトに絞り込み、その分化と Syn 動態をオリゴデンドロサイトと神経細胞それぞれについて検討して神経細胞の変性を明確にすることである。第二に、Cys C や神経細胞内因性マウス Syn 等の指標を明確にして神経変性の抑制効果を検討できる点である。神経細胞の変性について原因となるマウス Syn とその原因となるオリゴデンドロサイトのヒト Syn とを区別して検討することによりオリゴデンドロサイトに起こる病変と神経細胞の Syn 蓄積の病変を区別できる。したがって、本研究の目的は以下の3点である：

1. オリゴデンドロサイト分化と、Syn 蓄積と Cys C 産生との関係を明らかにする
2. オリゴデンドロサイトを治療標的とする臨床応用可能な化合物を探索する
3. リード化合物を投与開始する時期について、臨床的な特徴から検討する

3. 研究の方法

本研究は 3 年間の計画とする。1 年目にはオリゴデンドロサイト分化と alpha-synuclein (Syn) 蓄積の関係、2 年目以降にはオリゴデンドロサイト分化に関わる化合物の評価について神経変性

を抑制する具体的方法の検討を行った。

(初年度の研究) オリゴデンドロサイト分化と Syn 蓄積の関係

オリゴデンドロサイトはその分化の過程において、PDGFR 陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)から成熟オリゴデンドロサイト(OLG)までに細胞内 Syn の発現が異なることが報告されている。また、CNP-Tg マウスの脳初代培養では Non-Tg マウス脳初代培養に比べて OPC の減少が明らかである。そこで、脳初代培養の OPC と OLG について経時的に Cystatin C (Cys C) および Syn の発現量を免疫細胞染色法とイムノプロットにより比較検討した。次に、OPC を増加させる方法(化合物による細胞増殖または直接の細胞移植)により OPC を増やし、神経細胞 Syn の蓄積量の変化を調べる。さらに、CNP-Tg マウスの脳初代培養で起こることが確認されているアポトーシスについて、タネル法及び活性型 caspase3 タンパク質の定量法を用いて OPC 増加の与える影響を検討した。また、ヒト患者脳における OPC の解析を行った。

(2年度以降の研究) 化合物による Syn 蓄積の抑制方法の検討

CNP-Tg マウスの脳初代培養を使って、オリゴデンドロサイトの分化を抑制し OPC を増やす化合物について検討を行った。オリゴデンドロサイトが誘導する神経変性の評価方法として、オリゴデンドロサイト内に起こるヒト Syn と神経細胞に起こる内因性マウス Syn を区別して、治療指標として Syn 抑制の検討を行う。さらに、内因性 Syn の蓄積以外の指標として、オリゴデンドロサイト由来の Cys C と神経細胞に起こるアポトーシスについて検討した。

1) 神経細胞の Syn 発現の解析: MSA モデルマウス脳から脳初代培養細胞(混合培養、オリゴデンドロサイト培養)を作製する。培養中に化合物を投与し Syn の発現量を測定した。

Syn の解析: 初代培養細胞について免疫細胞染色法及びイムノプロットにより、神経細胞及びその軸索に蓄積する内因性マウス Syn 蓄積(不溶性 Syn)を検討する。また、Real-time PCR により Syn の発現誘導を検討し、Syn の mRNA 量の解析を行った。

Cys C の解析: 免疫細胞染色とイムノプロットにより経時的に変化を調べる。

2) アポトーシスの評価: 初代培養において化合物によるアポトーシスへの影響を調べる。

DNA 断片化: タネル法により DNA の断片化を判定した。

Caspase の活性化: 活性型 caspase 3 をイムノプロットにより定量化する。

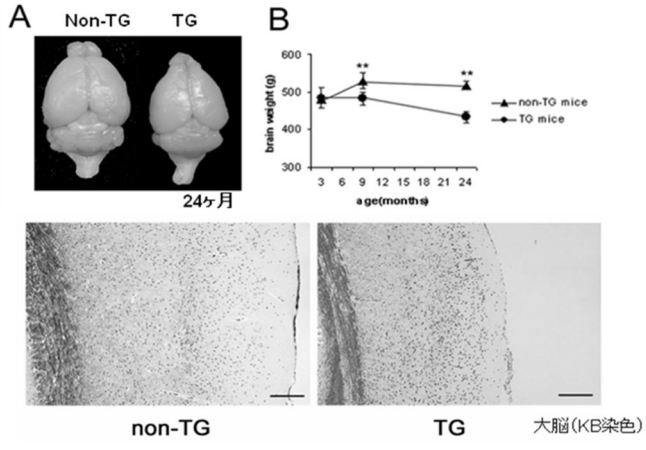
3) 遺伝子改変 MSA モデルマウスへの *in vivo* 化合物投与実験により、マウス脳重量の比較による脳萎縮の検討や免疫組織染色法による神経細胞における内因性マウス Syn 蓄積を検討した。

4. 研究成果

CNP-Tg マウスの中樞神経は加齢とともに脳の萎縮が起こる(次ページ図参照)。そのマウスから作製した脳初代培養では、non-Tg マウス脳初代培養に比べて、オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC; PDGFR)の割合が減少する。28 日間の初代培養中に全細胞の中で OPC の割合が減少し、OPC 減少の時期に合わせて Cystatin C (Cys C) を過剰に産生された。免疫細胞染色法において Cys C を産生するオリゴデンドロサイトは成熟した細胞(CNPase)であり、成熟オリゴデンドロサイトの割合は OPC とは逆に増加していた。

本研究では、OPC の増加が神経細胞の Syn 蓄積に与える影響を検討した。神経変性疾患の一つである多系統萎縮症(MSA)の病態モデルマウスを使って、発病機構とその発病に関わるタンパク質の蓄積を抑制する方法を検討した。MSA では中樞神経系の病理解剖所見から、中樞神経病変部では、オリゴデンドロサイトに蓄積する Syn タンパク質が起点となり、周辺の神経細胞にも Syn の蓄積により影響を与えて、神経変性を誘導することが明らかになった。Syn の蓄積では、他の神経疾患においても同タンパク質は細胞間を伝搬するとする仮説が知られている。しかし、MSA の臨床経過として、緩徐に進行する神経変性の病態は、他の神経疾患、例えば、プリオンタンパク質の伝播の病態と異なることが推定される。故に、MSA における神経変性の過程では Syn の直接の伝播ではなく、シグナル分子などを介する間接的な伝播による発病を示唆していると考えた。近年我々は、オリゴデンドロサイトから発するシグナル誘導タンパク質の候補としてシスタチン C を、マウス 脳初代培養細胞から見出した。実際に、Neuro2A 培養細胞についてシスタチン C を暴露された細胞では、Syn が蓄積することを確認した。さらに、モデルマウス脳組織から確立した初代培養細胞系を使って、このシグナルを放出するオリゴデンドロサイトでは、シグナル分子はその分化の過程では異なる事を示した。つまり、オリゴデンドロサイトの分化において OPC(オリゴデンドロサイト前駆細胞)などの未分化、幼弱な細胞は成熟したオリゴデンドロサイトとは異なるシグナルを放出することが予測された。今後、オリゴデンドロサイトの分化とシスタチン C、Syn における相互の関係を明らかにし、Syn 蓄積を抑制する方法の検討を進める。

図



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iwase T, Yoshida M, Iwasaki Y, Suzuki S, Yabuta H, Koizumi R, Moriyoshi H, and Yazawa I	4. 巻 41
2. 論文標題 Selective extension of cerebral vascular calcification in an autopsy case of Fahr's syndrome associated with asymptomatic hypoparathyroidism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 387-395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/neup.12760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 矢澤生	4. 巻 37
2. 論文標題 治療法開発のための動物モデル	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 中外医学社Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1073-1076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Iwase T, Yoshida M, Hashizume Y, Yazawa I, Takahashi S, Ando T, Ikeda T, Nokura K	4. 巻 39
2. 論文標題 Intracranial vascular calcification with extensive white matter changes in an autopsy case of pseudopseudohypoparathyroidism.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 39-46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/neup.12518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Oyanagi K, Kinoshita M, Suzuki-Kouyana E, Inoue T, Nakahara A, Tokiwai M, Arai N, Satoh JI, Aoki N, Jinnai K, Yazawa I, Arai K, Ishihara K, Kawamura M, Ishizawa K, Hasegawa K, Yagisita S, Amano N, Yoshida K, Terada S, Yoshida M, Akiyama H, Mitsuyama Y, Ikeda S.	4. 巻 27
2. 論文標題 Adult onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia (ALSP) and Nasu-Hakola disease: Lesion staging and dynamic changes of axons and microglial subsets	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 748-769
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bpa.12443	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11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 佐々木飛翔、金成花、岩瀬環、矢澤生
2. 発表標題 Oligodendrocyte precursor cells regulate alpha-synuclein accumulation in a mouse model of multiple system atrophy
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 / 第62回日本神経化学会大会NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢澤生
2. 発表標題 MSAにおけるalpha-synuclein蓄積の制御をめざして
3. 学会等名 第12回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iwase T, Yoshida M, Yazawa I
2. 発表標題 Brainstem calcification and extensive white matter changes in an autopsy case of bilateral striopallidodentate calcification with Alzheimer's disease
3. 学会等名 ICN2018 (19th International Congress of Neuropathology) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iwase T, Yoshida M, Yazawa I
2. 発表標題 Extensive white matter changes and brainstem calcification in an autopsy case of bilateral striopallidodentate calcinosis (Fahr's syndrome)
3. 学会等名 Neuroscience2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木飛翔、金成花、岩瀬環、矢澤生
2. 発表標題 多系統萎縮症多系統萎縮症モデルマウスにおける α -synuclein蓄積へのオリゴデンドロサイト成熟の役割
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢澤生
2. 発表標題 MSAの分子病態とモデル動物の開発：グリア細胞と神経細胞の関係
3. 学会等名 第36回日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yazawa I, Jin C, Sasaki A, Iwase T
2. 発表標題 Mouse models contribute to develop a therapeutic strategy for multiple system atrophy (MSA)
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (WCN2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Oyanagi K, Kinoshita M, Nakahara A, Satoh JI, Aoki N, Jinnai K, Yazawa I, Arai K, Ishiihara K, Kawamura M, Arai N, Hasegawa K, Yagishita S, Amano N, Yoshida K, Terada S, Yoshida M, Akiyama H, Mitsuyama Y, Ikeda S
2. 発表標題 Adult onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia (ALSP) and Nasu-Hakola disease (N-HD): Lesion staging and dynamic changes of axons and microglial subsets
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (WCN2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iwase T, Yoshida M, Hashizume Y, Yazawa I
2. 発表標題 Intracranial vascular calcification in an autopsy case of pseudopseudohypoparathyroidism
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (WCN2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iwase T, Yoshida M, Hashizume Y, Yazawa I
2. 発表標題 Intracranial vascular calcification in an autopsy case of pseudopseudohypoparathyroidism
3. 学会等名 Neuroscience2017, USA (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐々木飛翔、橋本成花、矢澤生
2. 発表標題 多系統萎縮症モデルマウスにおけるオリゴデンドロサイトのalpha-synuclein蓄積のメカニズム
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 (第90回日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 矢澤生、岩瀬環	4. 発行年 2020年
2. 出版社 一粒書房	5. 総ページ数 97
3. 書名 神経内科学概論	

1. 著者名 矢澤生	4. 発行年 2019年
2. 出版社 一粒書房	5. 総ページ数 108
3. 書名 生活習慣病ノートNotes on Lifestyle-related Diseases 病気と運動	

1. 著者名 矢澤生, 佐々木飛翔、金成花	4. 発行年 2019年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 4
3. 書名 非定型パーキンソニズム：基礎と臨床	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 シヌクレイノバシ어의治療および/または予防剤	発明者 矢澤生、小宮貴樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、087454	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

常葉大学教員情報 矢澤生 主な研究業績 https://www.tokoha-u.ac.jp/teachers/health-care/occupational/yazawa/
--

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	ペンシルベニア大学	CNR	