

令和元年5月18日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16119

研究課題名(和文) 最初期病変から再現する新規パーキンソン病モデルマウスの開発

研究課題名(英文) Development of novel mice models replicating Parkinson's disease pathology from its initial lesion

研究代表者

上村 紀仁 (Uemura, Norihito)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：90749045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：嗅球へのフィブリル接種では、野生型マウスでは、嗅覚伝導路と辺縁系を中心に粗な神経細胞内 α -Syn凝集病変が観察されたのみであった。一方、 α -Syn BAC Tgマウスでは、同様の分布で α -Syn凝集病変の劇的な伝播が観察され、パーキンソン病の非運動症状である嗅覚障害、不安様行動、記憶保持の障害を認め、本伝播経路でこれらの症状が惹起されると考えた(投稿準備中)。また、野生型マウス胃壁にフィブリルを接種した際に、迷走神経を介して脳幹迷走神経背側核に α -Syn凝集病変が形成されることを論文として発表した(Uemura N et al., Mol Neurodegener 2018)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病(PD)のドパミン欠乏に基づく運動障害を主徴とする神経変性疾患で、病理学的特徴は神経細胞内 α -シヌクレイン凝集病変と黒質緻密部ドパミン神経細胞脱落である。しかし、 α -シヌクレイン凝集病変は脳内に広く観察され、また運動障害以外にも多様な非運動症状を呈する。これまで、多数の剖検解析から、 α -シヌクレイン凝集病変は嗅球と消化管神経叢から起こるとされるという仮説が提唱されていたが、これら最初期病変に由来する病理学的進展と症状発現については不明であった。本研究は、マウスの嗅球と消化管神経叢に α -シヌクレインフィブリルを接種して解析することにより、PDの病態進行について新たな知見をもたらした。

研究成果の概要(英文)：The WT mice injected with α -Syn PFFs into the olfactory bulb (OB) showed sparse α -Syn pathology along the olfactory tract and in the hippocampus. Meanwhile, α -Syn BAC Tg mice injected with α -Syn PFFs into the OB displayed similar distribution of α -Syn pathology but drastic pathology. These mice manifested smell loss, anxiety in new environments, deficit of memory retention at 7-8 months post-injection, which are seen as non-motor symptoms of patients with Parkinson's disease (article in preparation). The WT mice injected with α -Syn PFFs into the stomach developed α -Syn aggregates in the dorsal motor nucleus of vagus nerve (dmX), a finding that was completely abolished when vagotomy was performed prior to inoculation of α -Syn PFFs. This suggests that the aggregates in the dmX were retrogradely induced via the vagal nerve (Uemura N et al., Mol Neurodegener 2018).

研究分野：臨床神経学

キーワード：パーキンソン病 シヌクレイン 伝播 マウスモデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は運動機能障害を主徴とする進行性の神経変性疾患であり、病理学的にはシヌクレイン (α -Syn) の凝集体であるレビー小体形成を伴う黒質緻密部ドパミン神経細胞死を特徴とする。ドパミン補充療法にて一時的に症状が改善するが、長期的には緩徐に症状が増悪する。加齢によって PD 発症率は増加し、60 歳以上の 1% 程度が PD を発症するとされている。現在、我が国の患者数は 15 万人以上で、超高齢化社会を迎えるにあたり更なる患者数増加が予想され、予防法の確立と新規治療法開発が求められている。

従来、PD の病理学的特徴は、 α -Syn 凝集病変を伴う黒質緻密部ドパミン神経細胞死とされてきたが、多数例の剖検解析より、Lewy 病理が嗅球または延髄迷走神経背側核から一定のパターンに従って広がる可能性が報告された (Braak H et al., *Neurobiol Aging* 2003)。また、初期から消化管神経叢にも Lewy 病理が認められるため、Lewy 病理が消化管神経叢から出現し、その後に迷走神経背側核に伝播する可能性が示唆された (Braak H et al., *Neurosci Lett* 2006) (Braak 仮説)。この病理解析結果は、ドパミン欠乏に基づく運動症状のみならず、PD の様々な非運動症状 (嗅覚低下、不安、うつ、認知機能低下、REM 睡眠行動異常症、便秘、疼痛など) の発現と対応して理解され、PD の病態に対する理解は大きく変わった。しかし、剖検解析から推測されるこの病態は実験的に検証されていない。

申請者らは最近、人工細菌染色体 (BAC) に広範なヒト α -Syn 遺伝子調節領域を導入した α -Syn BAC トランスジェニック (Tg) マウスを作出した。同 Tg マウスの外因性 α -Syn は生理的な発現パターンを維持して発現しており、 α -Syn 遺伝子の重複により起こる稀な家族性 PD (PARK4) を再現するモデルであり、PD の起始から進行を再現することが期待された。しかし、同 Tg マウスは脳内 α -Syn が約 1.5-2 倍に増加していたものの、18 ヶ月齢までの観察で脳内に PD 特有の病理学的な変化を示さなかった (Taguchi T et al., in revision)。

2. 研究の目的

近年、in vitro で作製した α -Syn を重合・線維化 (フィブリル化) して実験動物の脳に接種することにより、 α -Syn 凝集病変が脳内に形成され、これが経時的に神経回路に沿って伝播することが報告された (Luk KC et al., *Science* 2012; Masuda-Suzukake et al., *Brain* 2013)。この現象は、 α -Syn の prion 様伝播とも呼ばれ、PD の病態進行を説明できる可能性があり、広く注目されている。しかし、野生型マウスにおける Lewy 病理の伝播の程度は限定的である。これまでの研究で、 α -Syn KO マウス脳内に α -Syn フィブリルを接種しても伝播が起こらないことが報告されているが、申請者らはこの逆、すなわち α -Syn を過剰発現させたマウスでは、伝播が促進される可能性を考えた。さらに、申請者らの α -Syn BAC Tg マウスでは、外因性 α -Syn は生理的な脳内発現パターンを維持しているため、Lewy 病理の伝播パターンも同じく維持されることが期待できる。

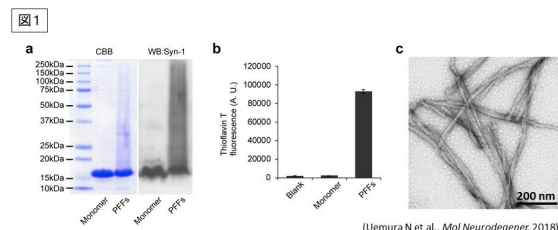
本研究では、 α -Syn BAC Tg マウスに α -Syn フィブリル接種の技術を適用し、PD の最初期病変とされる嗅球と消化管への接種により、PD の起始から病態の進行を再現し、病理学的な病態進行と、運動・非運動症状発現の解明に有用なモデルを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

既報告 (Masuda-Suzukake et al., *Brain* 2013) に従い、大腸菌によるマウス α -Syn の発現と精製、精製 α -Syn を 1000 rpm, 37 °C にて 10 日間振盪培養することにより、 α -Syn フィブリルを作製した。 α -Syn フィブリル化は、SDS-PAGE、WB、Thioflavin T assay、透過型電子顕微鏡によって確認した (図 1 a-c)。

嗅球への α -Syn フィブリル接種によるマウスモデルの作製

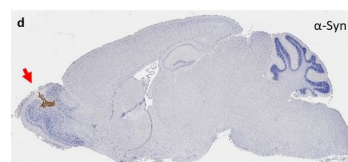
2 ヶ月齢のオスの野生型マウスの両側嗅球に脳定位的に α -Syn フィブリルまたは PBS の接種を行い、1、3、7、12、18 ヶ月後に病理学的解析を行い、 α -Syn 病理の分布を解析した。また、7 ヶ月後に Smell test、7、18 ヶ月後に網羅的な行動解析 (Wire Hang、Rotarod test、Light and Dark Test、Elevated Plus Maze、Open Field Test、Tail Suspension Test、Forced swim test、Y-Maze Test、Barnes Maze Test、Fear Conditioning Test、Hotplate Test) を行った。また同様に、2 ヶ月齢の α -Syn BAC Tg マウスの両側嗅球に α -Syn フィブリルの接種を行い、1、2、4、6、10 ヶ月後に病理学的解析を行い、2 ヶ月後に Smell test を、7 ヶ月後に網羅的な行動解析を行った。



(Uemura N et al., *Mol Neurodegener* 2018)

消化管への α -Syn フィブリル接種によるマウスモデルの作製

2 ヶ月齢のオスの野生型マウスの腹壁を切開し、胃を露出させ、37G 針にて α -Syn フィブリルまたは PBS を接種し、45 日、4、8、12 ヶ月後に病理学的解析を行い、 α -Syn 病



理の分布を解析した。-Syn BAC Tg マウスも同様に -Syn フィブリルの接種と病理学的解析を行った。

4. 研究成果

嗅球への -Syn フィブリル接種によるマウスモデルの解析

まず、-Syn フィブリルがマウス嗅球に適切に接種できているかを確認した。-Syn フィブリルを嗅球に接種した3時間後にマウスを還流固定し、脳を矢状断にて薄切し、-Syn 免疫染色を行ったところ、-Syn フィブリルが嗅球に接種できていることが確認できた(図1d)。次に、野生型マウスについて解析を行った。-Syn フィブリル接種後1ヵ月では凝集 -Syn のマーカーであるリン酸化 -Syn(p- -Syn)陽性凝集体が嗅覚伝導路と海馬 CA1 に認められた。接種後3ヵ月には、分布はほぼ変わらないもののリン酸化 -Syn 陽性凝集体の増加を認めた(図2)。接種後7ヵ月以降は、リン酸化 -Syn 陽性凝集体の増加は認めず、むしろ AON ではリン酸化 -Syn 陽性凝集体の減少を認めた。これは -Syn 凝集体形成に伴う神経細胞死を反映しているものと考えた(Osterberg VR et al., *Cell Rep* 2015)。接種後12ヵ月では、新規脳部位リン酸化 -Syn 陽性凝集体の出現を認めたが、いずれの脳部位においても病変は粗であった。PBS 接種群ではいずれのタイムポイントでもリン酸化 -Syn 陽性凝集体の形成は認めなかった。接種後7ヵ月に Smell test を行ったところ、-Syn フィブリル接種群において、PBS 接種群と比較してマウスが好む匂いであるメスの尿や、ピーナツバター匂いの識別が有意に低下していることが確認された。しかし、他の行動解析では、接種後7ヵ月と18ヵ月後において、-Syn フィブリル接種群とPBS 接種群でいずれも有意差を認めなかった。

一方、-Syn BAC Tg マウスでは、接種1ヵ月後では野生型マウスとほぼ同様のリン酸化 -Syn 陽性凝集体形成を認めたが、経過とともにリン酸化 -Syn 陽性凝集体は嗅覚伝導路と辺縁系を中心に劇的な増加を認めた(図3)。海馬では特に CA1 と歯状回にリン酸化 -Syn 陽性凝集体形成を多数認め、接種後6ヵ月において腹側海馬の、接種後10ヵ月において背側海馬の神経細胞の高度の脱落を認めた(図4)。また、それに伴って高度のアストロサイトとミクログリアの増生を認めた。海馬以外には、側坐核や乳頭体、視床下部に多数のリン酸化 -Syn 陽性凝集体の形成を認めた。一方で、PD の運動機能に関わる黒質緻密部ドパミン神経細胞や、認知機能低下に関わるとされるマイネルト基底核のコリン作動性神経細胞への伝播はほとんど認めなかった。PBS 接種群ではいずれの

いずれのタイムポイントでもリン酸化 -Syn 陽性凝集体の形成は認めなかった。接種後2ヵ月に Smell test を行ったところ、-Syn フィブリル接種群において、PBS 接種群と比較して匂いの識別が有意に低下していることが確認された(図5)。接種後7ヵ月に網羅的な行動解析を行ったところ、Light and dark test において、-Syn フィブリル接種群で明箱に入るまでの時間が延長していた。また、Open field test において、解析装置に入れた直後10分間の移動距離が有意に低下していた(図5)。これらの結果は、いずれも -Syn フィブリル接種群の新規環境下における不安の亢進を反映している

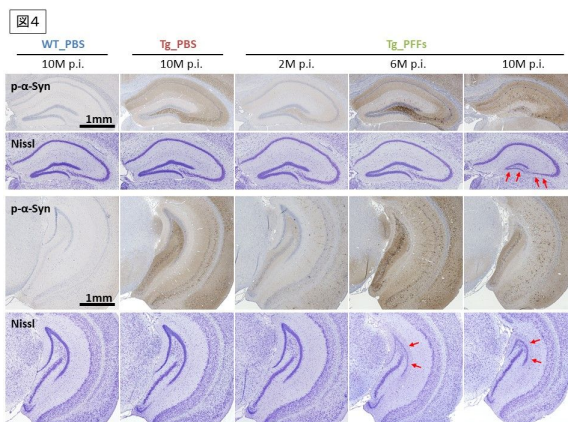
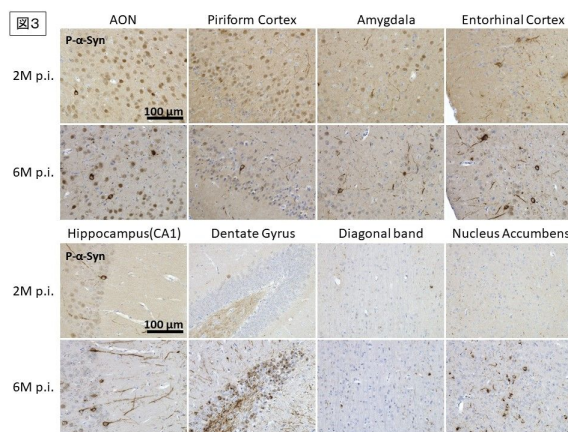
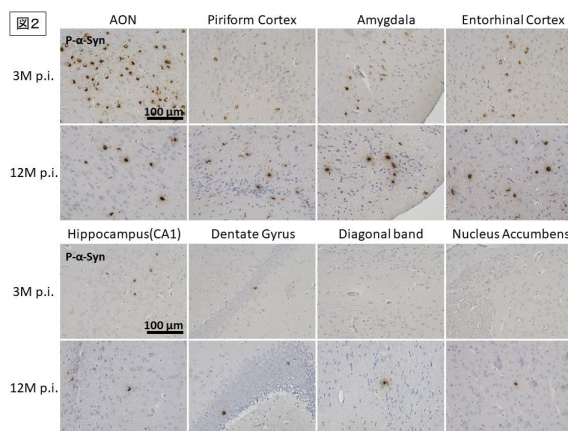
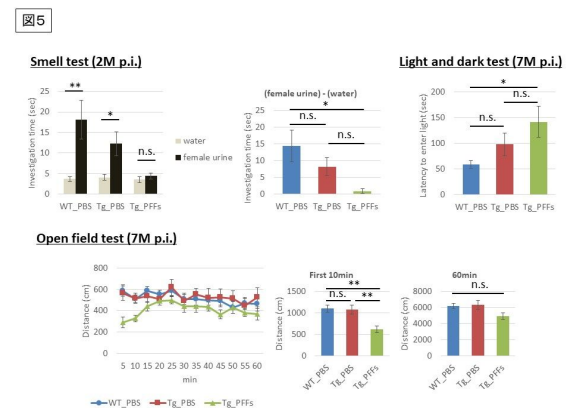


図3) 海馬では特に CA1 と歯状回にリン酸化 -Syn 陽性凝集体形成を多数認め、接種後6ヵ月において腹側海馬の、接種後10ヵ月において背側海馬の神経細胞の高度の脱落を認めた(図4) また、それに伴って高度のアストロサイトとミクログリアの増生を認めた。海馬以外には、側坐核や乳頭体、視床下部に多数のリン酸化 -Syn 陽性凝集体の形成を認めた。一方で、PD の運動機能に関わる黒質緻密部ドパミン神経細胞や、認知機能低下に関わるとされるマイネルト基底核のコリン作動性神経細胞への伝播はほとんど認めなかった。PBS 接種群ではいずれの



と考えた。また、Fear conditioning testにおいて、電気刺激直前に音を聞かせることで条件付けを行い、音のみを聞かせたところ、PBS 接種群では音を聞かせた直後に Freezing time が有意に延長するのに対し、 α -Syn フィブリル接種群においては延長せず、恐怖記憶の保持が障害されていることが示唆された(図6)。以上の結果は、 α -Syn BAC Tg マウスにおいて嗅球を起点とした α -Syn 凝集病変の伝播が嗅覚伝導路と辺縁系を中心に行き、行動異常としてPDの非運動症状である嗅覚低下、不安の亢進、認知機能低下が起こることが示唆された(論文投稿準備中)。

図6

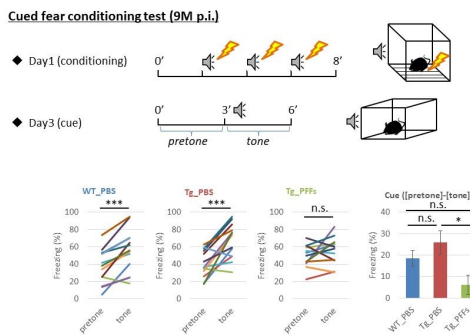


図7

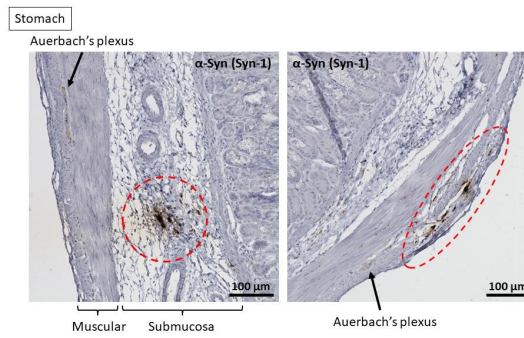


図8

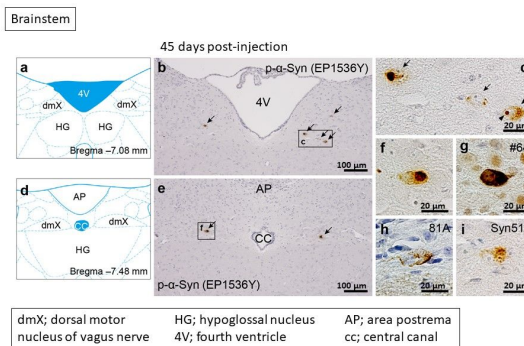


図9

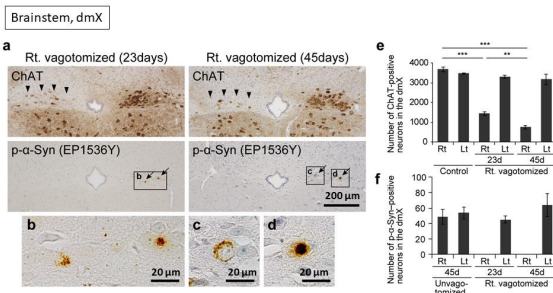
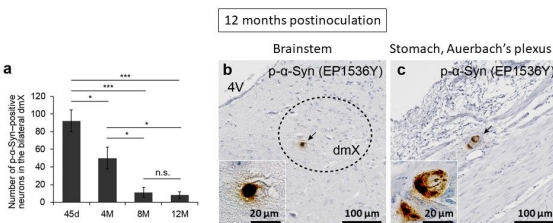


図10



消化管への α -Syn フィブリル接種によるマウスモデルの解析

まず、 α -Syn フィブリルがマウス胃壁に適切に接種できているかを確認した。 α -Syn フィブリルを胃壁に接種した45日後にマウスを還流固定し、胃を薄切して α -Syn 免疫染色を行ったところ、 α -Syn フィブリルが胃壁の筋層や粘膜下層への α -Syn の沈着が確認され、適切に接種できていることが確認できた(図7)。接種後45日に野生型マウスの解析を行ったところ、迷走神経背側核に一致してリン酸化 α -Syn 陽性凝集体の形成を認めた(図8)。PBSを接種したマウスでは、リン酸化 α -Syn 陽性凝集体の形成は認めなかった。解剖学的に、胃壁に接種した α -Syn フィブリルが迷走神経背側核に逆行性にリン酸化 α -Syn 陽性凝集体の形成を引き起こしたと考えたが、これを確認するため、迷走神経切断術を行った直後に胃壁に α -Syn フィブリルを接種した。迷走神経切断術を行うと、経時的に迷走神経背側核の神経細胞が脱落するため、接種後45日に加えて23日にも病理学的解析を行った(図9)。迷走神経切断後に経時的な神経細胞が脱落が認められたものの、切断側の迷走神経背側核にはいずれのタイムポイントでもリン酸化 α -Syn 陽性凝集体の形成を認めなかった。この結果は、胃壁に接種した α -Syn フィブリルが迷走神経背側核に逆行性にリン酸化 α -Syn 陽性凝集体の形成を引き起こすことを示すと考えた。最後に、 α -Syn フィブリル接種後12ヵ月まで経時的にリン酸化 α -Syn 凝集病変の形成を解析した。意外なことに、リン酸化 α -Syn 陽性凝集体は経時的に減少し、迷走神経背側核以外への脳部位におけるリン酸化 α -Syn 凝集病変は認めなかった(図10)。 α -Syn BAC Tg マウスの胃壁にも α -Syn フィブリルを接種し、経時的な病理学的解析を行ったが、野生型マウスと比較して、迷走神経背側核のリン酸化 α -Syn 陽性凝集体の数は多く認めたが、これは経時的に減少し、脳他部位への伝播も認めなかった。以上の結果は、脳幹から他脳部位へ伝播するためには、何らかの遺伝要因や環境要因が必要であると考えられた。本研究結果は国際学術誌に報告した(Uemura N et al., *Mol Neurodegener* 2018)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Uemura N, Yagi H, Uemura MT, Hatanaka Y, Yamakado H, Takahashi R. “Inoculation of α -synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve.” *Mol Neurodegener.* 13:21, 2018 (査読有)

澤村正典、上村紀仁、高橋良輔、「シヌクレインの凝集・伝播と細胞死」医学のあゆみ、医歯薬出版、pp585-589, 2017年8月(査読無)

中西悦郎、上村紀仁、「GBA 遺伝子変異とパーキンソン病」医学のあゆみ、医歯薬出版、597-601, 2017年8月(査読無)

上村紀仁、「パーキンソン病(2) シヌクレイン」和光純薬時報、FUJIFILM、86(3):12-14, 2018年7月(査読無)

〔学会発表〕(計6件)

Norihito Uemura, Maiko Uemura, Hisashi Yagi, Ryosuke Takahashi. “Inoculation of alpha-synuclein fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy-like pathology in the brain via the vagal nerve”, WCN2017, Kyoto, Japan, 2017年9月18日(口頭、査読有)

Norihito Uemura, Shinya Okuda, Hisashi Yagi, Ryosuke Takahashi, “Gut-to-brain propagation of α -synuclein aggregates in mice” 第12回MDSJ、京都、2018年7月5日(ポスター、優秀演題発表 基礎部門、査読有)

Norihito Uemura, Hodaka Yamakado, Ryosuke Takahashi, “Pathological pathway via the olfactory bulb represents non-motor symptoms of Parkinson’s disease” 第59回日本神経学会学術大会、札幌、2018年5月24日(口頭、シンポジウム「Neuroscience Frontier Symposium 02」、査読有)

上村紀仁、「遺伝子改変とシヌクレイン接種による新規パーキンソン病モデルマウスの開発」ConBio2017、神戸、2017年12月8日(口頭、ワークショップ「神経変性疾患への分子生物学的アプローチ」、査読無)

上村紀仁、高橋良輔、「シヌクレインの消化管から脳幹への伝播について」第70回日本自律神経学会総会(JSNR 2017)、名古屋、2017年9月1日(口頭、査読有)

Norihito Uemura, Hisashi Yagi, Ryosuke Takahashi, “Inoculation of alpha-synuclein fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy-like pathology in the brain via the vagal nerve”, 第40回日本神経科学大会、幕張、2017年7月20日(ポスター、査読有)

〔図書〕(計1件)

Norihito Uemura and Ryosuke Takahashi “Medaka Fish Model of Parkinson’s Disease: New Model Animals in Biology, Medicine, and Beyond” *Zebrafish, Medaka, and Other Small Fishes* (Springer Nature) pp235-249, 2018

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等:

なし

6. 研究組織

本研究は研究代表者が遂行した。

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。