

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02741

研究課題名（和文）蛋白質構造多形から迫る疾患バイオマーカーの開発と新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of biomarker and new therapy using the protein structure

研究代表者

望月 秀樹 (Mochizuki, Hideki)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90230044

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：フィブリル構造多型と疾患との関係が示唆されている。しかし、多型の基になるメカニズムは完全に理解されていない。我々は、単量体の α -シヌクレインの構造変化がフィブリル構造多型の原因であることを示すことができた。分子内結合をするモノマーが多く存在すると、パーキンソン病のフィブリルと同様の、ロッドフィブリルを生成することが示され、伸びたモノマーはMSAと同様のねじれたフィブリルを生成します。私たちの結果は、各疾患を引き起こす必要な分子イベントについての分子機序を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病や多系統萎縮症は、未だに根本治療が全くない疾患である。その病態も未だ謎のことが多く、病態解明が急務であり、その先に治療薬の開発も想定される。今回我々が見出したことは、それらの疾患の主病態であるシヌクレインフィブリルがどのように構造の多型をつくるかという、根本的な機序である。その機序には疾患関連で知られる、様々な因子がかかわり、シヌクレインの凝集多型を規定していた。この発見は、単なる病態理解にとどまらず、それらの因子を取り除く治療、予防する治療に発展させることができ、今後根本的な治療薬開発につながる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：The accumulation of alpha-synuclein causes several diseases. A relationship between fibril polymorphs and distinct pathologies has been suggested; however, the underlying mechanisms of polymorphisms are not fully understood. Here, we demonstrate that conformations of monomeric alpha-synuclein are responsible for fibril polymorphisms. Alpha-synuclein can exist in a compact monomer that produces rod fibrils, similar to the fibrils from Parkinson's disease; while extended monomers generate twisted fibrils, resembling the fibrils from multiple system atrophy. Our results provide mechanistic insights into the causes of the variety of synucleinopathies and the required molecular events that trigger each disease.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：パーキンソン病 alpha synuclein 伝播 構造多型 アミロイド線維

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) や多系統萎縮症 (MSA) は脳内に シヌクレインが凝集・蓄積し神経細胞死を起こすことが知られている。その凝集したシヌクレインは一部髄液中に漏れ出ており、髄液中の凝集したシヌクレインの量を測定できれば PD や MSA の診断に有用である。この概念を実現するために、これまで主に二つの方法が開発されてきた。一つは、凝集したシヌクレインのみを検出する ELISA 法である。PD 患者と対象患者の比較で、PD 患者の方が凝集シヌクレインが多いことが示された。また、もう一つの方法が RT-QuIC もしくは PMCA 法と呼ばれる方法である。本方法は、試料中に含まれる微量の凝集したシヌクレインを、大腸菌で精製したリコンビナント シヌクレイン単量体と混合し、振盪または超音波などの刺激を加えることで、微量なシヌクレイン凝集物を増幅できる原理に基づく。溶液全体の凝集をチオフラビン T (ThT) という試薬を加えておくことで、凝集物の量に応じて発する蛍光を計測することで半定量できる。その際、試料中に含まれる凝集物 (シード) の量が多いほど、ThT の蛍光増加速度は速くなるため、どの程度もとの試料にシードが含まれるかを推測できる。本方法を用いて、これまで PD 患者や MSA 患者の髄液中には、対象患者より多くのシヌクレイン凝集シードが含まれることが示された (Shahnawaz M et al. JAMA Neurol. Feb 1; 74(2); 163-172) (Fairfoul et al. Ann Clin Transl Neurol, 2016 Aug 28; 3(10))。これらの報告では、PD 患者も MSA 患者も等しく凝集曲線の促進効果があり、両者の判別はできないものであった。

2. 研究の目的

PD と MSA 患者の早期鑑別診断は、治療方針の決定、予後の予測、さらには未だ根本的治療薬のないこれらの疾患に対する治験を行う際に極めて重要である。発症早期の PD と MSA を判別することの実現には、病態の背景を反映する判別方法の開発は極めて大きなニーズがある。本研究においては、RTQUIC 法を用いて、PD 患者の体液に反応しやすい方法と MSA 患者の髄液に反応しやすい条件を見出すことである。

3. 研究の方法

PD 患者、MSA 患者の髄液から増幅したフィブリル (F1) を作成する。F1 の構造解析を行い、異なるフィブリルが増幅されている事を確認する。F1 を用いて、様々なバッファー条件を用いて、PDF1、MSAF1 が増幅されやすい条件を探す。

4. 研究成果

シヌクレインの凝集物には、こん棒タイプ (ロッドタイプ) とひねりタイプ (ツイストタイプ) など複数種類あることが報告されており、構造多型によって異なる毒性や細胞親和性を示すことが知られている (Peelarts W. et al. Nature 2015 Jun 18; 522(7556))。また、シヌクレインのモノマーは、限外濾過 (SEC) によりサイズ分離をすると、見かけ上の分子量の異なる二つのピークが観察されることが知られる。これら二つのピーク (Conformer A, B とする) は、どちらも単量体であるが分子内結合の様式が異なることが推測されている。今回の発明に至る研究の中で、我々は、PD 患者髄液内にはロッドタイプの凝集体が多いこと、MSA 髄液内にはツイストタイプの凝集体が多いことを見出した (現在投稿準備中)。

さらに、二つの異なる単量体シヌクレイン Conformer A と B をそれぞれ単離して超音波、または振盪により凝集させることで、それぞれ Conformer A がロッドタイプ凝集体 (以下 Fibril A) に、Conformer B がツイストタイプ (以下 Fibril B) になることを見出した (未投稿)。これらの発見は世界的に報告がまだなく、我々が世界に先行して見出した現象といえる。

今回の発明の原理は、Conformer A および B に対する、Fibril A および B のシーディング効果の特異性、を用いることで、髄液中に含まれるシヌクレイン凝集物が Fibril A か B かを判別することができ、ひいては PD (Fibril A) か MSA (Fibril B) かを判別できることである。

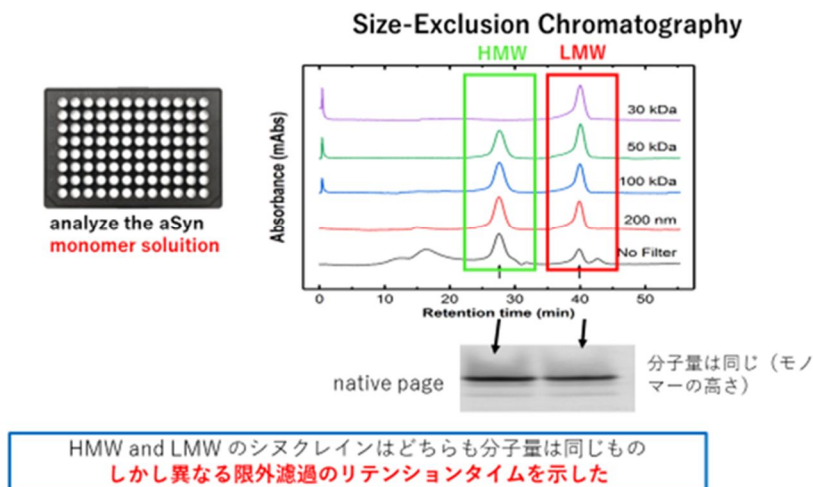
シーディング効果の特異性とあるが、シーディング効果というのは、あるタンパク質の単量体溶液に、微量の凝集物 (シード) を添加した場合、その添加した凝

集物により凝集反応が促進される現象、およびそれによりできる凝集産物が、もとのシードと同様の立体構造をもつ現象をさす。その原則通り、Conformer A に Fibril A を添加すると、すみやかに Fibril A が増幅し、Conformer A に Fibril B を添加すると速やかに Fibril B が増幅される。

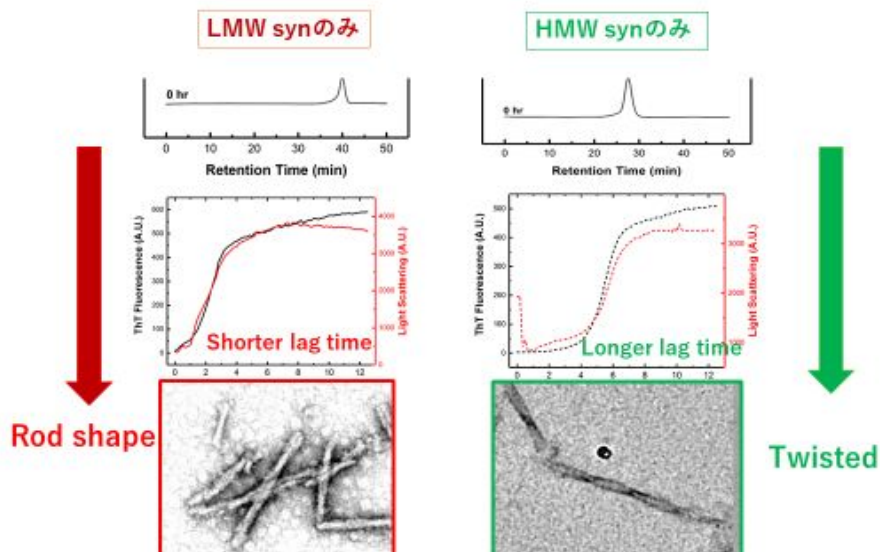
一方で、シーディング効果の特異性は、時に特定のシードが特定の単量体にシード効果を示さないことがあることをいう。Conformer B に Fibril A を添加しても Fibril A のシード効果はなく、凝集は通常通りの速さで最終産物は Fibril B ができる。Conformer B に Fibril B を添加する場合は、凝集は促進され Fibril B ができる。

この特異性を利用することで、もし髄液中に Fibril A が含まれていると仮定すると (PD 患者髄液であるとする) Conformer A 溶液に髄液を入れると非常に早く凝集反応が起こるが、Conformer B 溶液に髄液をいれても凝集反応は促進しないことになる。またもし髄液中に Fibril B が含まれていると仮定すると (MSA 患者と仮定すると) Conformer A 溶液にも Conformer B 溶液にも反応することになる。ただし、実際には、Conformer B と Fibril B の方が強い親和性を示すため Conformer B を加えた際の方がより早く反応する。また、Fibril B を含む髄液を用いる場合、最終産物を電子顕微鏡などで構造確認をすると、Fibril B がどちらもできていることがわかる。

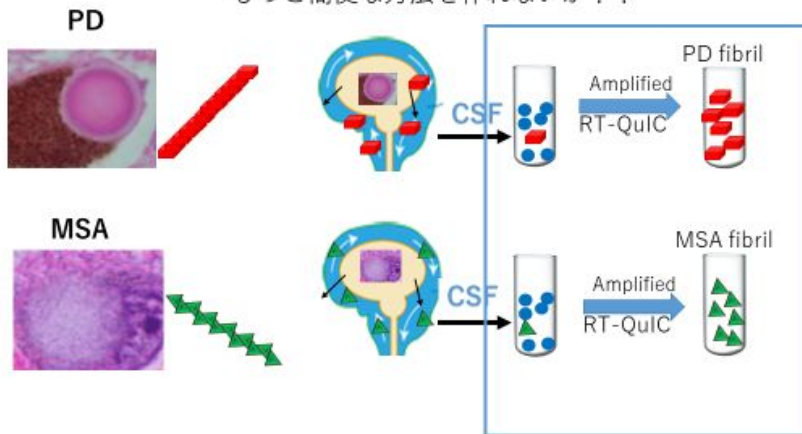
シヌクレイン溶液に多様性があった



モノマーの違い(HMW or LMW)がフィブリルの違いを生む

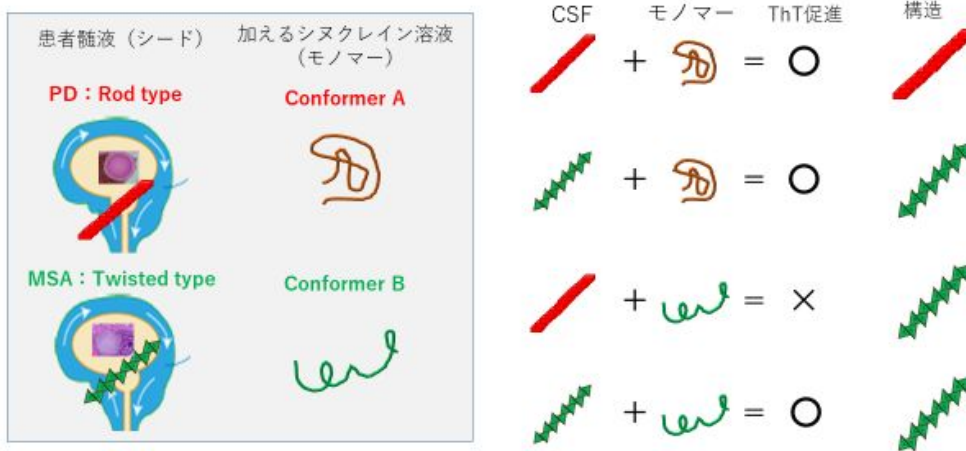


髄液検査で、PD・MSAを区別できる
もっと簡便な方法を作れないか??



この反応を改良して、「簡便診断キットを作る」

シードとモノマーの組み合わせによるシーディング効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fukusumi Hayato, Togo Kazuyuki, Sumida Miho, Nakamori Masayuki, Obika Satoshi, Baba Kousuke, Shofuda Tomoko, Ito Daisuke, Okano Hideyuki, Mochizuki Hideki, Kanemura Yonehiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Alpha synuclein dynamics in induced pluripotent stem cell derived dopaminergic neurons from a Parkinson's disease patient (PARK4) with SNCA triplication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 354 ~ 366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13060	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 Araki Katsuya, Yagi Naoto, Ikemoto Yuka, Hayakawa Hideki, Fujimura Harutoshi, Moriwaki Taro, Nagai Yoshitaka, Murayama Shigeo, Mochizuki Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 The secondary structural difference between Lewy body and glial cytoplasmic inclusion in autopsy brain with synchrotron FTIR micro-spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76565-6	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 Beck Goichi, Hori Yumiko, Hayashi Yoshito, Morii Eiichi, Takehara Tetsuo, Mochizuki Hideki	4. 巻 2020
2. 論文標題 Detection of Phosphorylated Alpha-Synuclein in the Muscularis Propria of the Gastrointestinal Tract Is a Sensitive Predictor for Parkinson's Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parkinson's Disease	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/4687530	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 Hideki Hayakawa, Rie Nakatani, Kensuke Ikenaka, Cesar Aguirre, Chi-Jing Choong, Hiroshi Tsuda, Seiichi Nagan, Masato Koike, Takeshi Ikeuchi, Masato Hasegawa, Stella M. Papa, Yoshitaka Nagai, Hideki Mochizuki and Kousuke Baba,	4. 巻 35
2. 論文標題 Structurally Distinct α -Synuclein Fibrils Induce Robust Parkinsonian Pathology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Movement Disorders	6. 最初と最後の頁 256-267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mds.27887	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 該当する

1. 著者名 Araki K, Yagi N, Aoyama K, Choong C, Hayakawa H, Fujimura H, Nagai Y, Goto Y, Mochizuki H	4. 巻 116
2. 論文標題 Parkinson's disease is a type of amyloidosis featuring accumulation of amyloid fibrils of - synuclein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 17963-17969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1906124116	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 Kakuda K1, Ikenaka K1, Araki K1, So M2, Aguirre C2, Kajiyama Y1, Konaka K1, Noi K3, Baba K1, Tsuda H1, Nagano S1, Ohmichi T4, Nagai Y5, Tokuda T6, El-Agnaf OMA7, Ogi H3, Goto Y2, Mochizuki H8.	4. 巻 Apr 12;9(1)
2. 論文標題 Ultrasonication-based rapid amplification of -synuclein aggregates in cerebrospinal fluid.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42399-0	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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hideki Mochizuki
2. 発表標題 Is Parkinson's disease systemic amyloidosis?
3. 学会等名 TOWARDS A CURE FOR AMYLOID DISEASES: A SUCCESSFUL EXAMPLE OF PRECISION AND TRANSLATIONAL MEDICINE (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 パーキンソン病と多系統萎縮症との判別方法および判別キット	発明者 望月秀樹、池中建介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、201918811	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 パーキンソン病モデル非ヒト動物	発明者 望月 秀樹、馬場 孝輔、早川 英規	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019170294	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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	宗 正智 (So Masatomo) (40746335)	大阪大学・蛋白質研究所・助教 (14401)	

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