

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07371

研究課題名（和文）マイクロ流路デバイスを用いた伝播性 α -シヌクレインの同定と伝播阻害システムの構築研究課題名（英文）Characterization of transmissible α -synuclein pathogenic seeds

研究代表者

田口 勝敏（Katsutoshi, Taguchi）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：60462701

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究ではレビー小体様凝集体を形成させた病態神経が産生したSeedを分離し、その生化学的性質について、Native-PAGEやHPLC、ウエスタンブロッティング法による解析を実施した。更に、原子間力顕微鏡や電子顕微鏡観察によってSeedの超微細構造解析を実施した。その結果、ある特定の分子サイズを有し、特徴的な形態を有する高分子化 α -Synucleinを見出すと共に、Seedがある均一な分子形態を有し、de novo合成されることを示す結果を得た。今後はより詳細にSeedの性質について解析することにより、その産生メカニズムの解明を通して神経変性抑制ストラテジーの確立に貢献できるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病において脳内変性領域の拡大を引き起こす細胞間伝播性分子の情報は未だ少ない状況にある。本研究は病態神経がSeedとして自ら産生・分泌した α -Synuclein構造体を分離できることを示したものであり、分子構造を実際に可視化できた点に意義がある。今後、Seedの性質をより詳細に解析し、その産生メカニズムについて明らかにすることによって、神経保護療法を開発する過程で必要となる基礎的知見が得られつつあると位置付けることができる。また、本研究で開発した大容量マイクロ流路デバイスは多岐にわたる神経科学分野において神経細胞が刺激依存的に産生した分子の分離・同定に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）： α -Synuclein (α -Syn) is one of major components of Lewy bodies and Lewy Neurites, the well-known pathological hallmarks of synucleinopathies including Parkinson's disease (PD) and dementia with Lewy bodies (DLB). According to recent studies, cell-to-cell transmission of pathological α -Syn or so called α -Syn-seeds in the brain is critical event for neurodegeneration. However, biochemical properties of these pathological seed molecules remain to be elucidated. Here, we isolated characteristic α -Syn-oligomers as transmissible pathological seeds secreted from cultured neurons harboring Lewy body-like aggregates. These extracellular α -Syn-oligomers have uniform molecular mass and granule-like structure. Now, we are further characterizing the pathogenic species of α -Syn-seeds. These molecules will be a better target to inhibit the disease propagation via cell-to-cell transmission in PD and DLB.

研究分野：神経解剖学

キーワード：パーキンソン病 プリオン様伝播 細胞間伝播 伝播性シード α -シヌクレイン

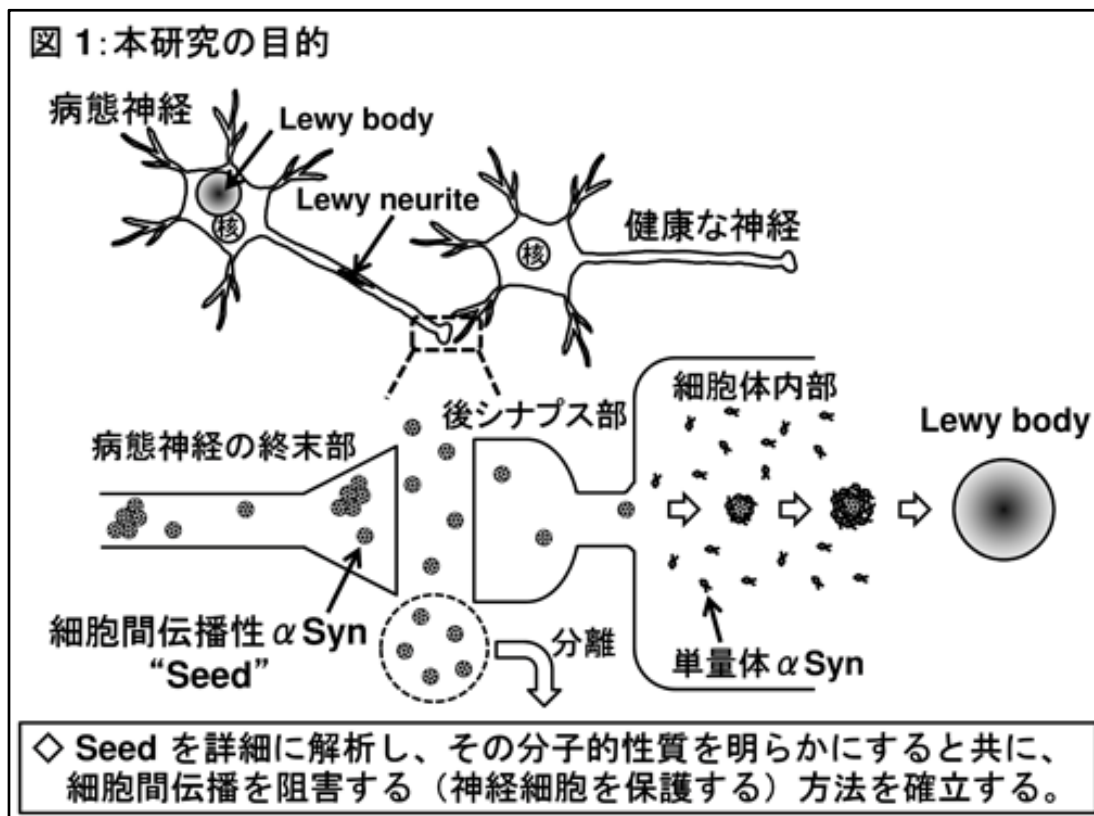
1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病に特徴的な病理学的所見である細胞内凝集体「レビー小体」の主要構成タンパク質の一つに α -Synuclein を挙げることができる。 α -Synuclein 遺伝子の変異、あるいは重複が家族性パーキンソン病の発症をもたらすことから、その発症に関わる重要な責任分子の一つであると考えられている (Goedert, Science, 2015; Stefanis, Cold Spring Harb Perspect Med, 2012)。

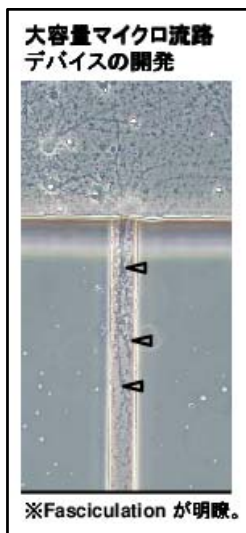
レビー小体の形成領域はパーキンソン病の最初期には嗅球において観察されると共に、病期の進行に伴って脳幹から大脳皮質に向かって上向性に広がって行く。近年の多くの研究により、神経細胞に障害を引き起こす過程において、高分子化した α -Synuclein が病態神経細胞から分泌され、近傍の健康な神経細胞内へ取り込まれることが神経変性領域の拡大に重要であることを示す知見が蓄積されつつある (Wong and Krainc, Nat. Med., 2017)。この細胞間伝播は「プリオン様伝播」と呼ばれ、神経変性プロセスを明らかにする上で重要な分子的背景として注目されている。高分子化した α -Synuclein が細胞内へ取り込まれるとこれが重合核となって、細胞内に発現する内在性単量体 α -Synuclein が更に重合を開始し、最終的にはレビー小体の形成に繋がると考えられている。以上のプロセスを踏まえ、この重合核は「Seed (種)」と呼ばれている。精製した単量体 α -Synuclein を人工的に試験管内で重合させ、高分子化させた線維様 α -Synuclein (PFF, Preformed fibrils) を含む培地で神経細胞を培養するとレビー小体様の凝集体が形成されること (Volpicelli-Daley et al., Neuron, 2011)、更にマウス黒質、あるいは線条体に PFF を投与することにより、凝集体の形成が脳内各所、及び大脳皮質にまで伝播するという結果がこれまでに報告されている (Suzukake et al., Brain, 2013; Luk et al., Science, 2012)。 α -Synuclein は重合する過程において、様々な分子形態を取り得ることは既に知られているが、生きた病態神経が自ら産生し、細胞間を伝播する能力を持った Seed の分子構造がどのようなものか、生化学的にどのような特性があるのか、そしてその産生メカニズムについては依然として不明な点が数多く残されている状況にある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、レビー小体様凝集体を PFF 処理によって人工的に形成させた一次病態神経が自ら産生・分泌した Seed (以下、図1参照) を「マイクロ流路デバイス」を用いて高精度に分離・分画を行い、その性質に関する生化学的あるいは形態学的解析を通して、パーキンソン病やレビー小体型認知症といったシヌクレオパチーにおける神経変性を抑制する戦略を確立させることにある。



3. 研究の方法



マイクロ流路デバイス内に一次病態神経を作製し、その軸索終末と二次病態神経から分泌された Seed を含む培養液を回収した。予備検討によって予め定めた分画条件を用いて Seed を分離・濃縮する (⇒ Seed 画分の調製)。尚、本研究を遂行するに当たり、Seed 画分を効率よく回収し、タンパク量を確保するため、「大容量マイクロ流路デバイス」を独自に開発した (左図)。

1) Seed 分子のサイズとプロテアーゼ抵抗性検定

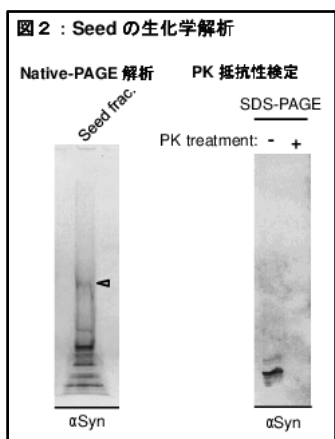
Seed 画分を Native-PAGE にかき、Seed の分子量を算定した。また、HPLC も併用し、異なる方法によって Seed の分子サイズを明らかにする。更に Seed の二次構造を予測するため、プロテアーゼ K (PK) 処理による分解抵抗性アッセイを実施した。

2) 原子間力顕微鏡 (AFM) 及び電子顕微鏡 (電顕) による分子形状の解析

Seed 画分を AFM 及び電顕を用いて観察し、Seed 分子の超微細構造を観察した。

3) 質量分析による Seed 構成 α -Synuclein の分子修飾検索

α -Synuclein の C 末端切断 (Dufty et al., Am. J. Pathol., 2007) や酸化ストレスによる分子修飾 (Burbulla et al., Science, 2017) が単量体 α -Synuclein の凝集能に影響を与えることが明らかになりつつある。Seed を構成する α -Synuclein が細胞内で病的な分子修飾を受けていないか、特に分子内切断に着目し、質量分析法によって解析を行った。



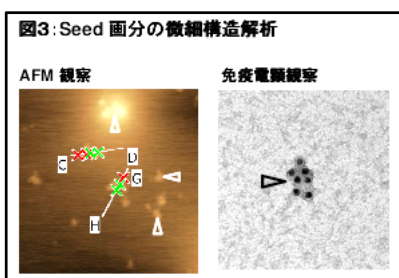
4. 研究成果

1) Native-PAGE による Seed 画分の解析

Native-PAGE により Seed 画分を分離し、ウエスタンブロッティング法 (抗 α -Synuclein 抗体) により Seed を構成する α -Synuclein を検出した (図 2 左)。その結果、ある高分子量域において再現性よくバンドが検出された (図 2 左 矢頭)。また、Seed 画分を PK により処理したところ、バンドは検出することはできず、プロテアーゼに対する抵抗性は非常に低いことが明らかとなった (図 2 右)。Seed を構成する α -Synuclein はそれほど強い rigid な構造を有していないことが推察された。

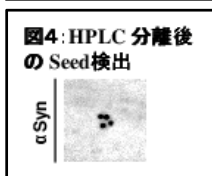
本研究では方法でも述べたように、大量の Seed 画分を調製することを目的として、大容量マイクロ流路デバイスを開発した。これにより一回の培養で回収できる Seed 量が大幅に増加した。このデバイスは神経細胞から刺激依存的に分泌される分子の分離・回収に適しており、生化学解析を実施する上で非常に有用なツールであると言える。本研究のみならず、神経科学領域において広く貢献できることが期待される。

分離・回収に適しており、生化学解析を実施する上で非常に有用なツールであると言える。本研究のみならず、神経科学領域において広く貢献できることが期待される。



2) AFM 及び電顕による Seed の超微細構造観察

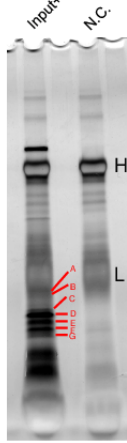
得られた Seed 画分に関して、AFM による超微細観察・サイズ計測を実施したところ (図 3 左)、均一な顆粒状構造を検出することができた。更に、これが α -Synuclein を含む構造である確証を得るため、抗 α -Synuclein 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を実施した (図 3 右)。AFM による分子計測と電顕による分子計測による結果はほぼ一致しており、Seed 画分にはある一定サイズの Seed 分子が含まれており、細胞間伝播を担う分子の分離が可能となったものと評価す



ることができる。更に、この Seed はマウス由来 α -Synuclein を含んでいることが明らかとなっており、Seed が de novo 合成されていることを示す結果が得られた。

次に、Seed 画分を出発材料として HPLC に掛け、細分画を行った。各画分を免疫電子顕微鏡で観察することにより、目的の Seed 分子が含まれる溶出画分を特定することができた (図 4)。広域分子量マーカーも同条件でカラム分画を行うことにより、当該画分の含む分子の分子量を算定することができる。HPLC-電顕法によって算定された分子量は Native-PAGE で算定された分子量よりも大きいことを示す結果が得られた。現在のところ、Native-PAGE による分子量は Seed を構成する基本ユニット (α -Synuclein の低重合体) に該当しており、HPLC により分離できた分子はこの基本ユニットが更に会合してできた高重合体であり、これが Seed としての成熟型分子であると推測している。

図5: 質量分析による分子修飾解析



3) 質量分析による Seed 構成 α -Synuclein の分子修飾解析

Seed 画分を出発材料として、抗 α -Synuclein 抗体を用いた免疫沈降法により Seed を濃縮した後、SDS-PAGE に掛け、構成分子の電気泳動分離を行った (図5)。バンドの検出は銀染色によって行い、図中 A~G のバンドについて LC-MS/MS による切断箇所の実施した。より詳細な解析は現在進行中であるが、切断部位の同定を行い、そのプロセッシングが Seed 形成に与える影響を今後明らかにすることにより、Seed 形成阻害方法の確立、神経保護戦略の開発に大きく貢献できるものと期待される。

4) マウス脳内における内在性 α -Synuclein の発現及び生理機能に関する解析

上述の研究を遂行する過程において、マウス嗅球に存在する傍糸球体細胞が α -Synuclein を高発現することを見出し、これらの細胞が成体においても幼若性を有したまま存在していること (下図6)、

図6: α Synを高発現する嗅球傍糸球体細胞は幼若な性質を強して存在する。

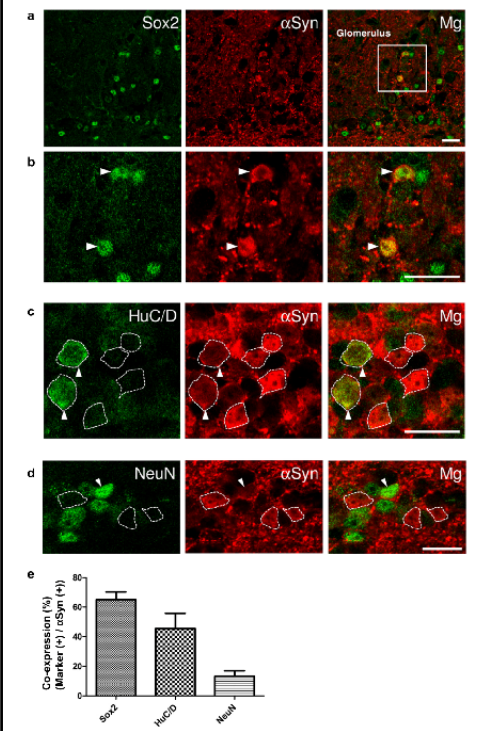
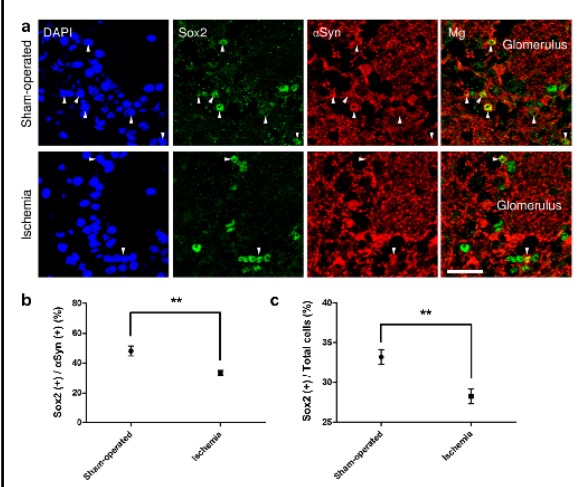
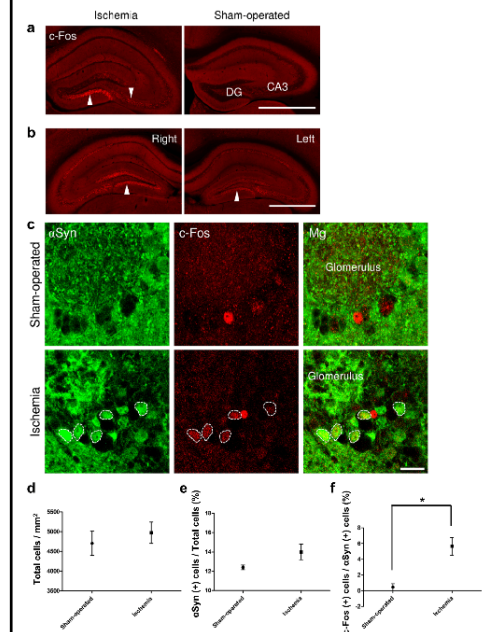


図7: 嗅球傍糸球体細胞に高発現する α Synは虚血刺激依存的な神経分化を促進する。



一過性脳虚血刺激が神経分化のプロセスを促進させると共に (上図7)、このプロセスに α -Synuclein の内在性発現が不可欠であることを明らかにした (Taguchi et al., Mol. Neurobiol., 2020)。興味深いことに、嗅球傍糸球体細胞の神経活動について検討したところ、一過性脳虚血後、 α -Synuclein を高発現する細胞の c-fos 陽性率が有意に増加しており、神経活動が亢進していることを見出した (左図8)。

図8: 虚血刺激後、 α Syn高発現細胞においてc-fos発現の有意な亢進を検出した。



【総括】

本研究により、生きた病態神経細胞が分泌した Seed 分子の回収方法を確立できたと共に、その基本的な生化学的性質のみならず、超微細構造が明らかとなった。今後は、より詳細に Seed 分子の性質について解析することにより、その産生メカニズムの解明を通して、神経変性の抑制戦略の確立に貢献できるものと期待される。また、大容量マイクロ流路デバイスは薬理学的手法と組み合わせることにより神経細胞が様々な刺激依存的に分泌した分子を分離する方法として非常に有用なツールでありであり、本研究のみならずより広い神経科学分野の研究に貢献できる。一方、 α -Synuclein の内在性発現に関する成果は α -Synuclein の生理機能を知る上で重要であり、今後はその機能破綻がもたらす現象について解析することにより、疾患への関与を明らかにすることができるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Taguchi K., Watanabe Y., Tsujimura A., Tanaka M.	4. 巻 57
2. 論文標題 -Synuclein Promotes Maturation of Immature Juxtglomerular Neurons in the Mouse Olfactory Bulb	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 1291-1304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12035-019-01814-3.	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9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 -Synuclein promotes maturation of immature juxtglomerular neurons in the mouse olfactory bulb
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（オンライン開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 一過性脳虚血モデルを用いた嗅球傍系球体細胞に高発現するパーキンソン病関連分子 -シヌクレインの機能解析
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 -Synuclein promotes maturation of immature juxtglomerular neurons in the mouse olfactory bulb
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会（誌上開催） 日韓解剖学会合同国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 -Synuclein promotes maturation of immature juxtglomerular neurons in the mouse olfactory bulb
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 脳虚血モデルを用いた嗅球傍糸球体細胞に高発現するパーキンソン病関連分子 - シヌクレインの機能解析
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 -Synuclein counteracts immature identity of the periglomerular cells in the mouse olfactory bulb after ischemic stroke.
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 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 Isolation and characterization of cell-to-cell transmissible -synuclein seeds
3. 学会等名 8th Asia Pacific International Congress of Anatomists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 神経細胞間伝播性 -シヌクレインシードの同定とその解析
3. 学会等名 第94回 日本解剖学会学術集会・近畿支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 脳虚血モデルを用いた嗅球傍系球体細胞に高発現する -シヌクレインの機能解析
3. 学会等名 第124回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都府立医科大学 生体構造科学 http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anatomy1/ 京都府立医科大学 解剖学教室 生体構造科学部門 http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anatomy1/
--

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
---------	---------