

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16928

研究課題名(和文) 血中alpha-synucleinの解析で明らかになる病態特異的な伝播メカニズム

研究課題名(英文) Pathology-specific propagation mechanisms revealed by analysis of alpha-synuclein in blood

研究代表者

奥住 文美 (Okuzumi, Ayami)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90826075

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)：パーキンソン病(PD)および多系統萎縮症(MSA)は臨床的には異なる症状を示す疾患であるが、ともにシヌクレイン(AS)を原因タンパク質としている。ASは本来可溶性であるが、シート構造を持つ異常構造凝集体が鋳型(シード)として働くことで正常型ASの構造変換を引き起こして線維化が加速する特性をもつ。多彩な組織でASシードが検出されているが、血液中にもASシードが存在しているかは不明である。IP/RT-QuIC法により血液中AS seedの検出に成功し、有用なバイオマーカーになることを示した。増幅したAS凝集体はPDとMSAで異なる構造や伝播能を保持しており、両者の鑑別にも有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

-シヌクレイノパチー患者の血液中に存在する -シヌクレインシードが -シヌクレイノパチーの診断と鑑別のマーカーとして有用であることを明らかにした。また、増幅された血清 -シヌクレインシードは伝播能を保持し、さらには、疾患毎に構造の異なる凝集体を形成することが分かった。今後は血液を用いた簡便かつ有用な診断方法の確立を目指すとともに、疾患ごとの凝集体構造の相違などに着目することで、病態解明をめざす。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease (PD) and Multiple system atrophy (MSA) are synucleinopathies, comprising pathomechanisms that involve alpha-synuclein (aSyn) seeds converting a native form of aSyn into abnormal conformational structures with propagative properties. Although aSyn seeds are detected in various tissues, it remains unclear whether these seeds exist in the serum. IP/RT-QuIC enables the detection of serum pathogenic aSyn seeds and proves a useful diagnostic biomarker for synucleinopathy. Furthermore, the amplified aSyn seeds maintain their disease-specific morphological and propagative properties. Finally, this novel approach also allows the distinction between PD and MSA.

研究分野：Neurology

キーワード：パーキンソン病 シヌクレイン 多系統萎縮症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)および多系統萎縮症(MSA)は進行性の神経変性疾患である。PDとMSAは臨床的には異なる症状を示す疾患であるが、ともにシヌクレイン(AS)を原因タンパク質としている。両疾患を鑑別するためには注意深い神経学的診察が必要だが、神経内科の専門医でさえも難しい場合が多い。また、一般採血や画像検査では確定診断は困難である。そのため、鑑別診断が可能となる疾患特異的なバイオマーカーの同定・確立が必要である。また近年、PDやMSAに対する進行阻止を目的とする先制医療の確立も重要視されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、タンパク質凝集の観点から(1)診断バイオマーカーの確立、(2)伝播様式を解明することで新規治療法の礎を築くことを目標とした。

### 3. 研究の方法

(1)我々は、異常タンパク質を増幅する技術である RT-QUIC (Real-time quaking-induced conversion)を利用することで PD および MSA 患者の体液中の微量 AS を検出することに成功した。RT-QuIC は異常構造型のタンパク質を増幅反応の核(シード)として凝集反応を連続的に試験管内で行い、血液中の異常構造型タンパク質を増幅して検出する。またこの増幅過程をシート構造のタンパク質に特異的に結合し蛍光を発するチオフラビン T (ThT)の蛍光強度を測定することで異常構造型タンパク質の存在の有無を real-time に測定するシステムである。バイオマーカーに関しては、PD 患者 221 名、MSA 患者 39 名、健常コントロール 128 について検討を行った。次に PD および MSA の血液 RT-QUIC から得られた産物において、AS 構造の違いについて電子顕微鏡を用いて検討を行った。さらに AS の C 末端に GFP が融合した、AS 凝集能がより高い A53T 変異をもつ AS を HEK293 細胞に安定発現させた細胞株を作成し、線維化した AS をシードとして細胞に導入し、細胞内で GFP-AS の凝集体を形成させ、構造解析をおこなった。(2)AS シードの凝集・伝播様式の解析については、PD および MSA 患者の血液から得られた血液 RT-QuIC 産物を野生型マウスの右線条体へ注入し、伝播の広がりについて免疫組織学的に解析した。

### 4. 研究成果

#### (1)バイオマーカーの確立

血液 RT-QuIC の ROC 解析は、PD: [AUC: area under the curve] 0.95 [95% confidence interval (CI) 0.92-0.98]、MSA: [AUC] 0.64 [95% CI 0.49-0.79]であり、シヌクレイノパチーと健常コントロールとが鑑別可能であることを示した(図1)。

電顕による構造解析では、PD 患者由来の AS と比較して MSA 由来 AS は短径が短いことが確認された(図2)。

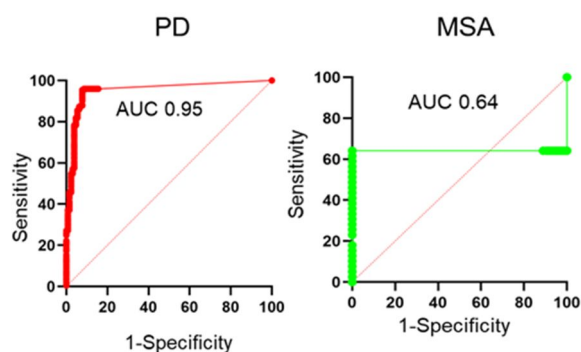


図1

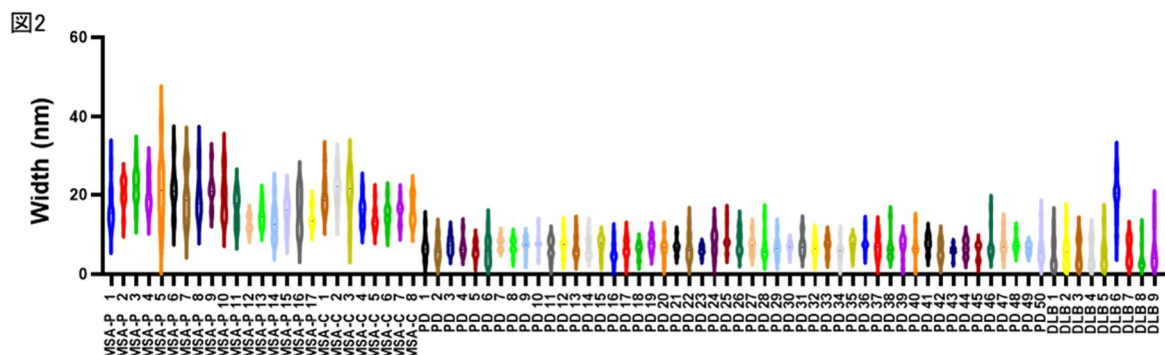


図2

電顕を用いた形態学的解析では、PD では twisted paired filaments、MSA では twisted filaments および straight filaments を呈した(図3)。

AS の C 末端に GFP が融合した、AS 凝集能がより高い A53T 変異をもつ AS を HEK293 細胞に安定発現させた細胞株を作成し、線維化した AS をシードとして細胞に導入し、細胞内で GFP-AS の凝集体を形成させた。PD シードを導入した場合に形成された細胞内凝集体は、Vine basket 様の構造を呈した。MSA シードを導入した場合は、Stuffed inclusions を呈した(図4)。

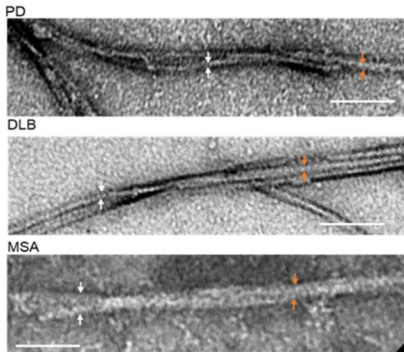


図3 Scale bar: 100nm

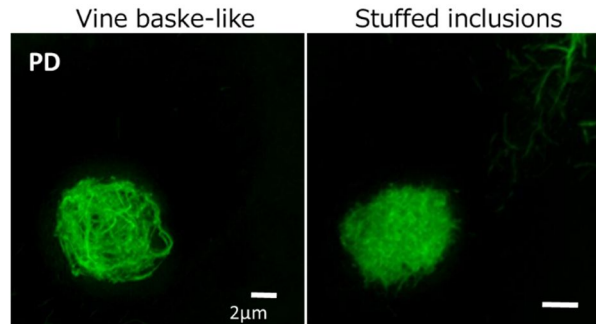
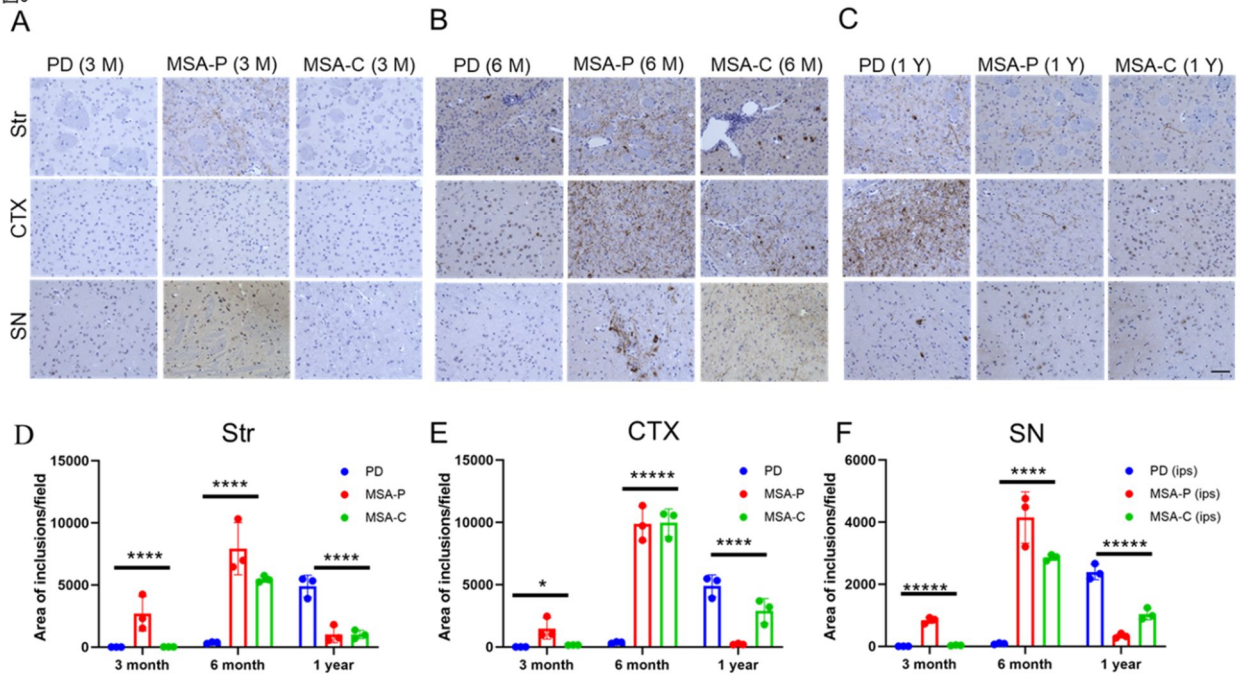


図4

(2)伝播様式の解析

PD および MSA 患者の血液から得られた凝集体をマウスの右線条体へ注入し、経時的に伝播の広がりについて免疫組織学的に解析を行った。MSA 由来 AS シードを投与した場合、PD 由来 AS シードを投与した場合と比較して急速に伝播することを見出した(図5)。

図5



本研究ではシヌクレノパチー患者を血液で高感度に診断できる血液 RT-QuIC 法を開発した。さらに血液 RT-QuIC で増幅した AS 凝集体は PD と MSA で異なる構造や伝播能力を保持しており、両者の鑑別にも有用であることを見出した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okuzumi A, Hatano T, Fukuhara T, Shinichi Ueno S, Nukina N, Imai Y, Hattori N.	4. 巻 2322
2. 論文標題 -Synuclein seeding assay using RT-QUIC	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 3-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-1495-2_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 Sakurai A, Tsunemi T, Ishiguro Y, Okuzumi A, Hatano T, Hattori N	4. 巻 269
2. 論文標題 Comorbid alpha synucleinopathies in idiopathic normal pressure hydrocephalus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurol.	6. 最初と最後の頁 2022-2029
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00415-021-10778-1	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 Takehige-Amano H, Saiki S, Fujimaki M, Ueno SI, Li Y, Hatano T, Ishikawa KI, Oji Y, Mori A, Okuzumi A, Tsunemi T, Daida K, Ishiguro Y, Imamichi Y, Nanmo H, Nojiri S, Funayama M, Hattori N.	4. 巻 35
2. 論文標題 Shared Metabolic Profile of Caffeine in Parkinsonian Disorders.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mov Disord	6. 最初と最後の頁 1438-1447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mds.28068.	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 Yamaguchi A, Ishikawa KI, Inoshita T, Shiba-Fukushima K, Saiki S, Hatano T, Mori A, Oji Y, Okuzumi A, Li Y, Funayama M, Imai Y, Hattori N, Akamatsu W.	4. 巻 14
2. 論文標題 Identifying Therapeutic Agents for Amelioration of Mitochondrial Clearance Disorder in Neurons of Familial Parkinson Disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports.	6. 最初と最後の頁 1060-1075
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 Oji Y, Hatano T, Ueno SI, Funayama M, Ishikawa KI, Okuzumi A, Noda S, Sato S, Satake W, Toda T, Li Y, Hino-Takai T, Kakuta S, Tsunemi T, Yoshino H, Nishioka K, Uchiyama Y, Akamatsu W, Wu YR, Matsuda J, Hattori N	4. 巻 143
2. 論文標題 Variants in saposin D domain of prosaposin gene linked to Parkinson's disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1190-1205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awaa064.	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 Yoshinaga A, Yamanaka T, Miyazaki H, Okuzumi A, Hiyama A, Murayama S, Nukina N.	4. 巻 522
2. 論文標題 Preserved proteinase K-resistant core after amplification of alphasynuclein aggregates: Implication to disease-related structural study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 655-661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.142.	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 Oji Y, Hatano T, Ueno SI, Funayama M, Ishikawa KI, Okuzumi A, Noda S, Sato S, Satake W, Toda T, Li Y, Hino-Takai T, Tsunemi T, Yoshino H, Nishioka K, Hattori T, Mizutani Y, Mutoh T, Yokochi F, Ichinose Y, Shindo K, Takiyama Y, Hamaguchi T, Yamada M, Farrer MJ, Uchiyama Y, Akamatsu W, Matsuda J, Hattori N	4. 巻 -
2. 論文標題 Variants in saposin D domain of prosaposin gene linked to Parkinson's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awaa064	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 該当する

1. 著者名 Ueno SI, Hatano T, Okuzumi A, Saiki S, Oji Y, Mori A, Koinuma T, Fujimaki M, Takeshige-Amano H, Kondo A, Yoshikawa N, Nojiri T, Kurano M, Yasukawa K, Yatomi Y, Ikeda H, Hattori N	4. 巻 7
2. 論文標題 Nonmercaptalbumin as an oxidative stress marker in Parkinson's and PARK2 disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Clin Transl Neurol	6. 最初と最後の頁 307-317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acn3.50990	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 Ikeda A, Nishioka K, Meng H, Takanashi M, Hasegawa I, Inoshita T, Shiba-Fukushima K, Li Y, Yoshino H, Mori A, Okuzumi A, Yamaguchi A, Nonaka R, Izawa N, Ishikawa KI, Saiki H, Morita M, Hasegawa M, Hasegawa K, Elahi M, Funayama M, Okano H, Akamatsu W, Imai Y, Hattori N	4. 巻 28
2. 論文標題 Mutations in CHCHD2 cause -synuclein aggregation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Mol Genet	6. 最初と最後の頁 3895-3911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddz241	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 該当する

1. 著者名 Mori A, Ishikawa KI, Saiki S, Hatano T, Oji Y, Okuzumi A, Fujimaki M, Koinuma T, Ueno SI, Imamichi Y, Hattori N	4. 巻 27
2. 論文標題 Plasma metabolite biomarkers for multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0223113	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 A, Hatano T, Inoshita T, Shiba-Fukushima K, Koinuma T, Meng H, Kubo SI, Spratt S, Cui C, Yamashita C, Miki Y, Yamamoto K, Hirabayashi T, Murakami M, Takahashi Y, Shindou H, Nonaka T, Hasegawa M, Okuzumi A, Imai Y, Hattori N	4. 巻 116
2. 論文標題 Parkinson's disease-associated iPLA2-VIA/PLA2G6 regulates neuronal functions and alpha-synuclein stability through membrane remodeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci	6. 最初と最後の頁 20689-20699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1902958116	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 該当する

1. 著者名 Okuzumi A, Hatano T, Kamagata K, Hori M, Mori A, Oji Y, Taniguchi D, Daida K, Shimo Y, Yanagisawa N, Nojiri S, Aoki S, Hattori N	4. 巻 26
2. 論文標題 Neuromelanin or DaT-SPECT: which is the better marker for discriminating advanced Parkinson's disease?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Neurol	6. 最初と最後の頁 1408-1416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ene.14009	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12件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Okuzumi A, Hatano T, Hattori N
2. 発表標題 Identification of disease-specific alpha-synuclein seeds in serum by IP-RT-QuIC
3. 学会等名 第61回日本神経学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥住 文美, 波田野 琢, 貫名 信行, 服部 信孝
2. 発表標題 シヌクレイノパチーの次世代標的
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mori A, Hatano T, Inoshita T, Fukushima-Shiba K, Koinuma T, Yamashita C, Okuzumi A, Imai Y, Hattori N
2. 発表標題 Parkinson's disease-associated mutations of PLA2G6 alters the membrane dynamics and $\alpha$ -synuclein stability
3. 学会等名 2019 International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ueno S, Hatano T, Okuzumi A, Saiiki A, Oji Y, Mori A, Koinuma T, Fujimaki M, Takeshige-Amano H, Yasukawa K, Yatomi Y, Ikeda H, Hattori N
2. 発表標題 Serum non-mercaptalbumin as a potential biomarker in Parkinson's disease and related disorders
3. 学会等名 2019 International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 波田野 琢, 鎌形 康司, 濃沼 崇博, 森 聡生, 王子 悠, 奥住 文美, 堀 正明, 青木 茂樹, 服部 信孝
2. 発表標題 PARK2の白質障害は酸化ストレスマーカーと関連する
3. 学会等名 第13回パーキンソン病・運動障害疾患 कांग्रेस
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濃沼 崇博, 波田野 琢, 鎌形 康二, 奥住 文美, 森 聡生, 王子 悠, 堀 正明, 青木 茂樹, 服部 信孝
2. 発表標題 拡散テンソル画像を用いたPARK2の白質変化について
3. 学会等名 第13回パーキンソン病・運動障害疾患 कांग्रेस
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥住 文美, 波田野 琢, 福原 武志, 常深 泰司, 貫名 信行, 服部 信孝
2. 発表標題 alpha-synucleinの伝播抑制因子の探索と複合療法の検討
3. 学会等名 第13回パーキンソン病・運動障害疾患 कांग्रेस
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹重 遥香, 齊木 臣二, 藤巻 基紀, 波田野 琢, 石川 景一, 森 聡生, 王子 悠, 奥住 文美, 濃沼 崇博, 上野 真一, 今道 洋子, 野尻 宗子, 天羽 拓, 服部 信孝
2. 発表標題 パーキンソン病関連疾患鑑別における脂肪酸 酸化変化のバイオマーカーとしての有効性
3. 学会等名 第13回パーキンソン病・運動障害疾患 कांग्रेस
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 森 聡生, 石川 景一, 斉木 臣二, 波田野 琢, 王子 悠, 奥住 文美, 藤巻 基紀, 濃沼 崇博, 上野 真一, 今道 洋子, 服部 信孝
2. 発表標題 MSAとPSPの血漿バイオマーカー
3. 学会等名 第13回パーキンソン病・運動障害疾患 कांग्रेस
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上野 真一, 波田野 琢, 奥住 文美, 斉木 臣二, 王子 悠, 森 聡生, 濃沼 崇博, 藤巻 基紀, 安川 恵子, 矢富 裕, 池田 均, 服部 信孝
2. 発表標題 パーキンソン病・PARK2患者におけるバイオマーカーとしての酸化型アルブミン測定
3. 学会等名 第13回パーキンソン病・運動障害疾患 कांग्रेस
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥住文美, 波田野琢, 服部信孝
2. 発表標題 シヌクレインシードのプリオン様伝播における神経回路を介した急速播種
3. 学会等名 カテコールアミンと神経疾患研究会2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥住文美, 波田野琢, 服部信孝
2. 発表標題 脳機能マイクロネットワークを介したアルファシヌクレインの伝播
3. 学会等名 これからのパーキンソン病を考える会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Yukio Imamura, Risa Yamano, Yuki Murakami, Ayami Okuzumi, Hisatake Matsumoto.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Nova Science	5. 総ページ数 35
3. 書名 Recent Findings and Imaging Technology to Evaluate the Possible Effect of Pre-Existing Nerve Injury and Neurological Symptoms.	

1. 著者名 奥住 文美, 波田野 琢, 服部 信孝	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 Clinical Neuroscience37	

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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