

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17034

研究課題名（和文）髄液シヌクレイン凝集体測定を利用したパーキンソン病の病理学的マーカーの開発

研究課題名（英文）Development of a biomarker for Parkinson's Disease Using CSF Synuclein Aggregate Measurement

研究代表者

角田 溪太（Kakuda, Keita）

大阪大学・医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：20815500

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病は原因不明の難病であるが、脳内で  $\alpha$ -シヌクレイン蛋白が異常に凝集し蓄積することが神経障害の原因として注目されている。本研究ではマウスの髄液中の  $\alpha$ -シヌクレイン凝集体の蓄積量の評価と細胞モデルによる治療薬の探索を行った。マウスから回収した髄液ではパーキンソン病モデルマウスでは通常型マウスよりも  $\alpha$ -シヌクレイン凝集体量が多いことが確認できた。細胞モデルでは蛍光観察により  $\alpha$ -シヌクレイン凝集過程をリアルタイムに観察し、特定の薬剤が  $\alpha$ -シヌクレイン凝集抑制効果を示すことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はパーキンソン病の診断のための髄液検査法の改良に繋がるものである。現在はパーキンソン病は臨床医による総合的な評価により診断されるが、精度は80-90%程度であり、診断可能となる時期は当然症状の発症後である。本研究でも探索した  $\alpha$ -シヌクレイン凝集抑制はパーキンソン病の根本的治療法として有望であるが、この治療は早期に行う必要があり、髄液診断などの発症前診断が必要である。本研究の成果はこれらパーキンソン病の早期診断法・治療法の開発・改良に有用である。

研究成果の概要（英文）：Parkinson's disease is an intractable disease of unknown cause, but the abnormal aggregation and accumulation of  $\alpha$ -synuclein protein in the brain has attracted attention as a cause. In this study, we evaluated the accumulation of  $\alpha$ -synuclein aggregates in the cerebrospinal fluid of mice and explored therapeutic agents using cellular models. In cerebrospinal fluid collected from mice, we confirmed that the amount of  $\alpha$ -synuclein aggregates was higher in Parkinson's disease model mice than in normal-type mice. In the cellular model, we observed the process of  $\alpha$ -synuclein aggregation in real time by fluorescence observation and confirmed that certain drugs showed inhibitory effects on  $\alpha$ -synuclein aggregation.

研究分野：パーキンソン病

キーワード：パーキンソン病  $\alpha$ -シヌクレイン 髄液 蛋白凝集 神経難病

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病の病態に  $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -Syn) の凝集が関与することが示されて以来、 $\alpha$ -Syn 凝集の抑制が治療開発のターゲットとなってきた。しかし、脳内の  $\alpha$ -Syn 凝集体の蓄積を評価することはできず、臨床的にパーキンソン病と診断される時期には相当に  $\alpha$ -Syn 凝集も神経脱落も進行した状態にある。これでは  $\alpha$ -Syn 凝集抑制治療の効果が最も期待される早期の治療介入が不可能であり、 $\alpha$ -Syn 凝集抑制治療には  $\alpha$ -Syn 凝集体量の評価方法と治療薬の開発が同時に必要である。

## 2. 研究の目的

本研究は  $\alpha$ -Syn 凝集の進行度および抑制治療の効果判定のための髄液  $\alpha$ -Syn 凝集体増幅法の改良ならびに  $\alpha$ -Syn 凝集治療の開発を行うことである。

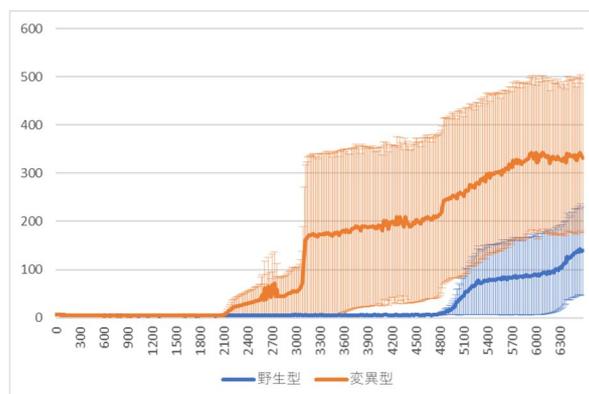
これまでのバイオマーカー研究は患者群と健常群の差異を検討するに留まり、真の疾患進行度 = 脳内の  $\alpha$ -Syn 蓄積の程度と直接的な相関を検討したものはない。本研究では培養細胞および実験動物モデルを用いて凝集体蓄積の程度との増幅速度の直接の相関を示し、また凝集抑制治療の効果判定の実証を行うことを目的とした。また細胞モデルを用いて  $\alpha$ -Syn 凝集を抑制する治療薬の選定も行った。

## 3. 研究の方法

- (1) PD モデルマウスの髄液中  $\alpha$ -Syn 凝集体の評価：運動症状および病理学的変化を呈する遺伝子改変 PD モデルマウス (A53T 変異  $\alpha$ -Syn 発現マウス) および Wild type マウス (WT マウス) の髄液中  $\alpha$ -Syn 凝集体を評価する。
- (2) 細胞モデルを使用した凝集体の定量および治療効果判定： $\alpha$ -Syn の凝集体を形成する stable cell line を樹立し、培養液と細胞体の凝集体の相関解析、および薬剤の治療効果判定を行う。

## 4. 研究成果

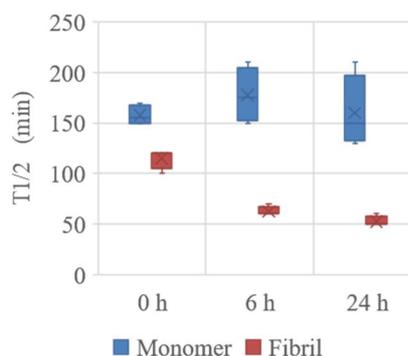
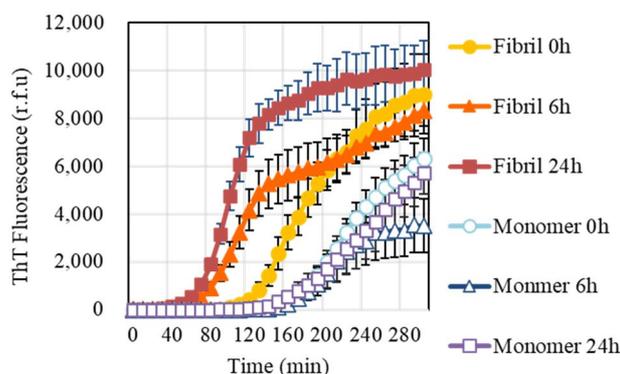
- (1) マウスモデル：大後頭孔からの髄液回収を実施し、A53T 遺伝子変異マウスと野生型マウスの髄液を横断的に回収し、 $\alpha$ -シヌクレイン凝集体量の評価を行った。当初は血液のコンタミネーションが問題となったが、技術の習熟とともにコンタミネーションは軽減し、RT-QuIC 法による髄液中の凝集体の増幅法により、それぞれの髄液中の  $\alpha$ -Syn 凝集体の評価を行った。その結果、変異型  $\alpha$ -Syn 発現マウスは野生型マウスよりも髄液の  $\alpha$ -Syn 凝集活性が高い傾向を確認した。



- (2) 細胞モデル

### 培養液からの $\alpha$ -Syn 凝集検出

脳と髄液の関係をモデルとして  $\alpha$ -Syn 凝集を誘導した細胞の培養液からの  $\alpha$ -Syn 凝集の検出を行った。下図のようにフィブリル処理により  $\alpha$ -Syn 凝集を誘導した細胞では有意に  $\alpha$ -Syn 凝集反



応が促進された。

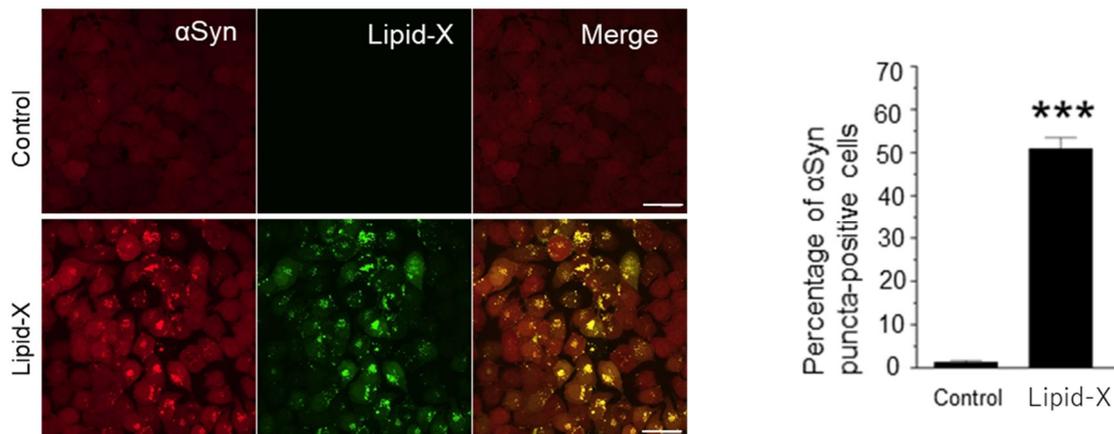
### Syn 過剰発現細胞の確立と Syn 凝集の促進・抑制因子の探索

蛍光標識した Syn 過剰発現細胞を樹立し Syn 凝集過程の観察を行った。外来の凝集体が内在の凝集を誘導する過程を超解像顕微鏡を用いてリアルタイムに可視化し、凝集が開始されやすい細胞内分画を同定し、凝集の伝播を防ぐ機構も同定した。(未発表データ)この細胞を用いて

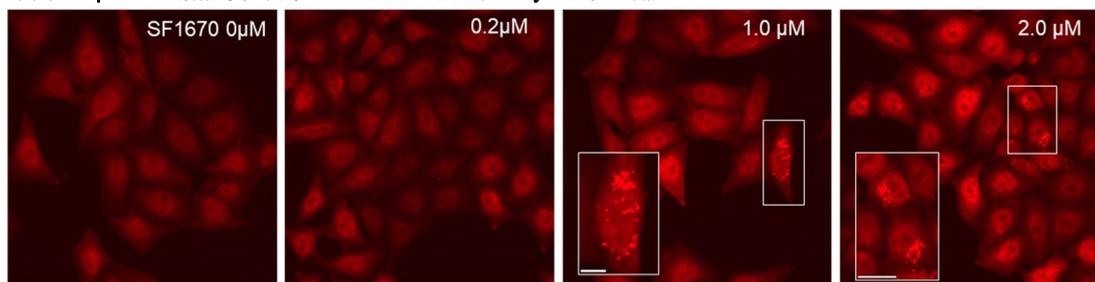
Syn 凝集を抑制・促進する因子の探索を行った。

またパーキンソン病の発症に関わると考えられる脂質を検証し、特定の脂質による凝集の誘導を確認した。

下図： Syn 過剰発現細胞への蛍光標識 Lipid-X の直接投与により、細胞内 Syn 凝集が増加

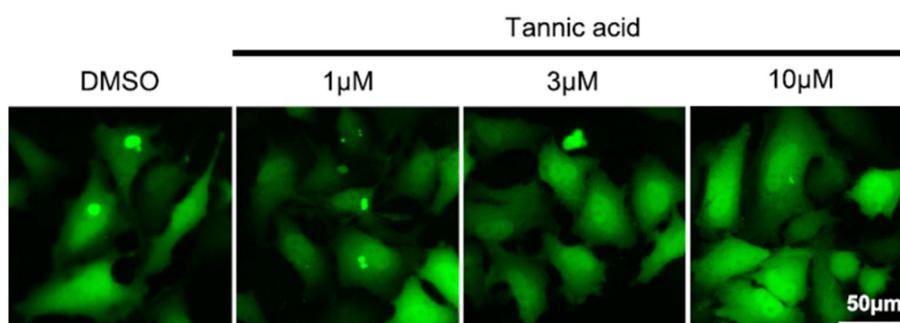


下図：Lipid-X 分解酵素阻害薬による処理で細胞内 Syn 凝集が増加



これら技術を用いて薬剤スクリーニングに行い Tannic acid が  $\alpha$ -シヌクレイン凝集抑制効果を示すことを確認した。

下図：Tannic acid による処理で細胞内 Syn 凝集が減少



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Hideshima Makoto, Kimura Yasuyoshi, Aguirre Cesar, Kakuda Keita, Takeuchi Toshihide, Choong Chi-Jing, Doi Junko, Nabekura Kei, Yamaguchi Keiichi, Nakajima Kichitaro, Baba Kousuke, Nagano Seiichi, Goto Yuji, Nagai Yoshitaka, Mochizuki Hideki, Ikenaka Kensuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Two-step screening method to identify $\alpha$ -synuclein aggregation inhibitors for Parkinson's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-04131-9	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 Keita, Ikenaka Kensuke, Araki Katsuya, So Masatomo, Aguirre Cesar, Kajiyama Yuta, Konaka Kuni, Noi Kentaro, Baba Kousuke, Tsuda Hiroshi, Nagano Seiichi, Ohmichi Takuma, Nagai Yoshitaka, Tokuda Takahiko, El-Agnaf Omar M. A., Ogi Hirotsugu, Goto Yuji, Mochizuki Hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 Ultrasonication-based rapid amplification of $\alpha$ -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 --
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keita Kakuda
2. 発表標題 Application of the amplification assay of $\alpha$ -synuclein aggregates to clinical biomarker and drug screening for Parkinson's disease
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角田 溪太
2. 発表標題 The analysis of the interaction between $\alpha$ -synuclein and the lipids inducing pathological aggregation
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角田 溪太
2. 発表標題 Application of the amplification assay of $\alpha$ -synuclein aggregates to clinical biomarker and drug screening for Parkinson's disease
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角田 溪太
2. 発表標題 The analysis of the interaction between $\alpha$ -synuclein and the lipids inducing pathological aggregation
3. 学会等名 第63回 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keita Kakuda
2. 発表標題 Amplification of $\alpha$ -synuclein aggregates in cerebrospinal fluid by rapid ultrasonication-based assay.
3. 学会等名 International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Nice, France, 2019. Sep. 23 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 角田 溪太	4. 発行年 2020年
2. 出版社 自然科学社	5. 総ページ数 999-1006
3. 書名 医学と薬学 vol.77 no.7	

〔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
---------	---------