

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06206・19K21309

研究課題名（和文）線維化アルファシヌクレイン受容体を標的としたシヌクレイノパチー疾患修飾療法の開発

研究課題名（英文）Developing disease modifying therapy for Parkinson's disease: targeting fibrillar alpha-synuclein receptors

研究代表者

小林 潤平（Kobayashi, Jumpei）

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：00820680

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：線維化アルファシヌクレイン（S）受容体候補タンパク質を網羅的に検討するべく、マウス全脳由来の膜タンパク質を人工脂質二重膜へ再配置した試料と単量体・線維化 S を質量分析法により解析した結果、受容体候補タンパク質として5分子（NTM, LSAMP, DIP2A, HMGB1, CNTNAP2）を同定した。次の段階として、候補タンパク質を過剰発現させた培養細胞系を細胞外 S に暴露させた後、候補タンパク質に関する S 取り込みへの影響や S との結合能について検討する。さらに、パーキンソン病動物モデルを用いて表現型や S 病理の広がりに対する薬剤、抗体の阻害作用を証明する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病に次いで多い神経変性疾患であるパーキンソン病の原因究明と治療は、高齢化が進む全世界的な課題である。パーキンソン病の発症機序は完全には解明されておらず、治療は対症療法に限定されており、進行抑制・根本的治療法は存在しない。本研究は近年提唱されている病態仮説であるプリオノイド仮説に基づき、シヌクレイン病理拡大の原因の一端を担っている可能性のある線維化 S 受容体候補タンパク質を同定することを目的としている。同タンパク質が同定された暁には、疾患修飾療法へとつながる新たな創薬シーズとなりえ、症状進行による社会的資産の毀損の回避を介して医療・福祉への貢献に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cell-to-cell transmission of S is supposed to play a key role in the pathological progression of Parkinson's disease (PD). Endocytosis of S preformed fibrils (PFFs) could be facilitated by binding to the cell membrane through specific receptors. The purposes of this study were to perform comprehensive screening for the S PFFs receptors using artificial membrane protein library from mouse whole brain in combination with mass-spectroscopy and to isolate bona fide hits by secondary screening. Primary screening gave 5 candidates for S PFF receptors including NTM, LSAMP, CNTNAP2, DIP2A, and HMGB1. Secondary screening will be performed with using SH-SY5Y cells expressing each candidate protein exposed to S PFFs. The uptake of S PFFs is measured by immunoblotting and immunohistochemistry. Specific binding between candidate proteins and S PFFs is also assessed by co-immunoprecipitation. These strategies enable us to find the S PFFs receptors as disease-modifying candidates.

研究分野：パーキンソン病

キーワード：パーキンソン病 アルファシヌクレイン プリオノイド仮説 疾患修飾療法 エンドサイトーシス

1．研究開始当初の背景

パーキンソン病は線維化アルファシヌクレイン(SYN)を主要構成成分とする神経細胞内封入体であるレビー小体の出現と、カテコラミン産生細胞の脱落を特徴とする神経変性疾患である。近年、線維化 SYNの神経細胞間伝播、いわゆるプリオノイド仮説が注目され、病態研究のメインストリームの一つとなっている。しかし、基本的事項である SYNの細胞間伝播機構のメカニズムに関してはいまだ不明な点が多い。本研究では細胞外 SYNが神経細胞へ取り込まれる際に受容体として機能する特異タンパクの網羅的探索・同定を通じて SYN内在化過程をさらに詳細に検討し、神経・グリア細胞表面の線維化 SYN受容体分子をターゲットとした伝播阻害治療薬の開発を最終目標とする。

2．研究の目的

パーキンソン病においては異常凝集した SYNが細胞間を伝播して病変が拡大していくとするプリオノイド仮説が提唱されている。近年、神経・グリア細胞表面に局在し、SYN受容体として機能しえる分子が複数報告されているに至り、SYN伝播に直接関与するSYN受容体タンパクの網羅的探索・同定が望まれている。しかし、線維化SYNが生体膜に非特異的に結合しやすいことなどの障壁が存在したため、既存の方法には限界があった。本研究では、全脳由来の膜タンパクを人工脂質二重膜へ再配置することでライブラリ化し、線維化SYN結合分子をバイオチップに電気転写した後に質量分析法により受容体候補たんぱくを網羅的に検出する。既存の方法では検出しえなかった線維化SYN受容体タンパクが検出されることが期待され、同分子をターゲットとした全く新しい伝播阻害療法を開発したい。

3．研究の方法

(1) 神経・グリア細胞膜上に局在する SYN結合タンパク受容体の探索

細胞外に存在する線維化SYNが結合し得る形質膜上タンパクの網羅的解析を行う。まずSYNリコンビナントタンパク質を精製し、単量体SYNと振盪・超音波破碎の処理を経た線維化SYNを準備する。次に、全脳由来の膜タンパクを人工脂質二重膜へ再配置することでライブラリ化し、単量体SYN結合分子と線維化SYN結合分子の両者を別々にバイオチップに電気転写した後に質量分析法により受容体候補タンパクを網羅的に探索・検出する。単量体SYNと線維化SYNとの結果を比較することで、非特異的な膜タンパクへの線維化SYNの結合を除外できる。本研究プロセスは当該研究分野において試みられたことのない独創的な手法であり、既存の方法では検出し得なかった線維化SYN受容体タンパクが検出可能になるものと期待される。

(2) 線維化SYN受容体候補タンパク質の選定

手順1のデータを元に、線維化SYNにより強い結合性を示す受容体候補分子群について、培養細胞系を用い共免疫沈降法により実際の分子間会合を確認する第二段階目のスクリーニングを行う。同ウェット実験にて絞り込まれた受容体候補タンパクに関して、過剰発現またはサイレンシングにより発現量を変化させ、線維化SYNの細胞内への取り込み量をウェスタンブロット・免疫組織化学的に定量評価する。ここで優位差が得られた分子は真の線維化SYN受容体である可能性が高いと判定する。最終的には、SYN受容体候補分子に対する特異抗体や結合阻害分子を用いることで、選択的かつ効率的にSYN取込みを抑制が可能となる条件を探索する。培養細胞系にはSH-SY5Y、人工多能性幹細胞由来ドパミン神経細胞を用いる。

(3) In vivo マウスモデルでの検証

プリオノイド仮説を裏付ける線維化SYN伝播モデルとして、一側線条体への線維化SYN接種により対側大脳半球へとリン酸化シヌクレイン病理が拡大するマウスモデルが存在する。本研究では、受容体候補タンパク質のノックアウト、あるいは抗体の髄腔内投与などの手法を用いて、in vivo マウスモデルでのSYN脳内伝播抑制効果を観察する。

4．研究成果

(1) 線維化SYN受容体候補タンパク質を網羅的に検討するべく、マウス全脳由来の膜タンパク質を人工脂質二重膜へ再配置した試料と単量体・線維化SYNを質量分析法により解析した結果、受容体候補タンパク質として5分子(NTM, LSAMP, DIP2A, HMGB1, CNTNAP2)を同定した。

(2) 次の段階として、候補タンパク質を過剰発現させた培養細胞系を細胞外SYNに暴露させた後、候補タンパク質に関するS取り込みへの影響やSYNとの結合能について検討した。一例として、現段階までに判明しているNTMに関する結果を提示する。NTMを過剰発現したHEK293細胞を作成し、細胞培養液に単量体SYN、線維化SYNを添加することで細胞外暴露モデルとした。共免疫沈降の結果、線維化SYNとNTMの会合が確認された(図1)。全細胞溶解液を用いたウェスタンブロットの結果、NTM過剰発現細胞では線維化SYNが有意に多く含まれていた。

(図 2)。今後は、他の候補タンパク質を過剰発現させた培養細胞系に関しても順次解析を行っていく予定である。

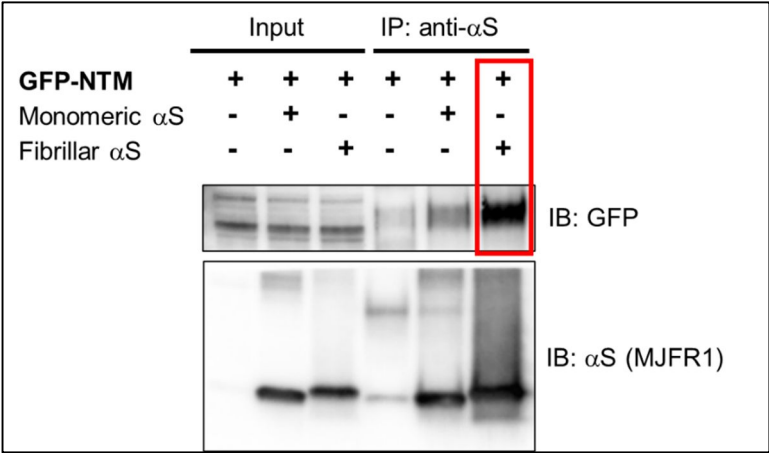


図 1 . 共免疫沈降

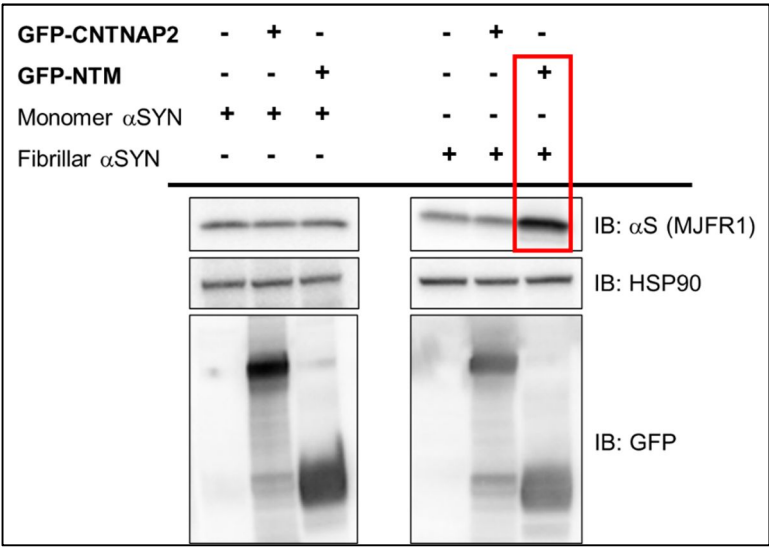


図 2 . ウェスタンブロット

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

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