

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22603

研究課題名(和文)パーキンソン病マウスモデルにおける免疫チェックポイント分子PD-1の解析

研究課題名(英文)Pathogenesis role of programmed cell death-1 in Parkinson's disease mouse model

研究代表者

服部 信孝(Hattori, Nobutaka)

順天堂大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80218510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：PD-1ノックアウトマウス、ヒト α -シヌクレイン(AS)トランスジェニックマウス、野生型(WT)、グルコセレブロシダーゼ(GBA)遺伝子L444Pノックインマウスにおいて、脳内におけるASの伝播や凝集やチロシンヒドロキシラーゼ陽性神経細胞の脱落、行動解析など検討したが、いずれも群間における有意差は認めなかった。一方、炎症性サイトカインはPD-1ノックアウトマウスやGBA L444Pノックインマウスの脳内で増加する傾向にあり、PD-1ノックアウトに対してASシードを脳内ヘインジェクションしたがWTと比較し明らかな変化はなく、今後GBAノックインマウスでの検討を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病(PD)の原因タンパクとして考えられている α -シヌクレイン(AS)は、全身炎症により凝集が引き起こされることが想定され、免疫チェックポイント分子であるProgrammed cell death-1(PD-1)阻害により全身炎症が惹起し、さらにPDのリスク遺伝子であるグルコセレブロシダーゼ(GBA)遺伝子変異を有することで脳内での炎症は増加する傾向にありAS凝集が促進する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In PD-1 knockout mice, human α -synuclein (AS) transgenic mice, wild type (WT), and glucocerebrosidase (GBA) gene L444P knock-in mice, there were no significant differences in propagation or aggregation of AS in the brain, shedding of tyrosine hydroxylase positive neurons, or behavioral analysis. On the other hand, inflammatory cytokines tended to increase in the brains of PD-1 knockout mice and GBA L444P knock-in mice. Injection of AS seeds into the brains of PD-1 knockout mice did not show any significant change compared to WT mice, and further studies will be conducted in GBA knock-in mice.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：パーキンソン病 Programmed cell death-1 制御性T細胞 α -シヌクレイン(AS) 腸脳関連

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) はドパミン神経細胞のみならず、腸管粘膜や心臓の交感神経節後線維にもレヴィ小体の主要構成成分である α -シヌクレインが蓄積することが分かってきた。このことは、PD は中枢神経系の疾患から全身性疾患として捉える必要があると言える。近年、腸内細菌叢の病態への関与が指摘されており、進行に腸内細菌叢が免疫学的機序を介して脳へ影響を与えているとする腸・脳連関現象が指摘されている。マウスモデルでの腸内細菌叢の関与を明らかにした研究は、緒に就いたばかりであるが、腸内環境が神経炎症に寄与すると考えられている。また、 α -シヌクレインの伝播は、腸から脳へ伝播するとされており、腸から脳への伝播機序の1つに腸内細菌叢や神経炎症の関与が想定されている。これまでの疫学調査からも非ステロイド性抗炎症薬の服用はPD発症のリスクを軽減すること、剖検脳では、以前よりマイクログリアの増生やサイトカインである IL-1 β や TNF- α の上昇が報告されている。血漿や血清のデータでも IL-6 の上昇、TNF- α 、TNF- α -receptor1 の上昇、更には CRP の上昇が進行と相関する報告もある。これら知見は、PD の進行期のみならず早期から神経炎症及び神経免疫の関与が推定されている。また、PD のリスク遺伝子としてこれまで HLA 抗原の DRB5*01 及び DRB1*15:01 型 MHC-II が特定されており、最近では、PD にも自己抗体が測定され、免疫学的機序の関与が指摘されている。2017 年には、PD 患者の T 細胞はレヴィ小体の主要構成成分である α -シヌクレイン由来ペプチドを認識することが報告された。以上のことから、“PD における直接的免疫学的機序の関与”を想定した。

2. 研究の目的

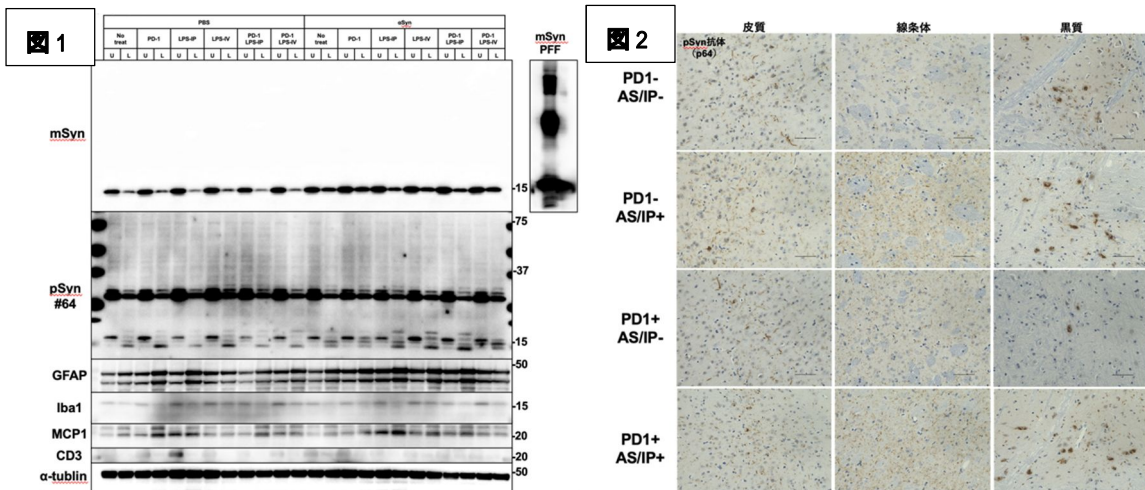
PD の神経病理学的検討において、マイクログリアの増生が観察されるなど、発症に免疫介在性機序の関与が考察されている。マウスモデルで IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 などサイトカインによる長期的な刺激により、マイクログリアの増生や、チロシンハイドロキラーゼ (TH) 陽性細胞の脱落がみられると報告され、慢性炎症の状態が病態の一因として考えられている。また、ゴーシェ病の原因遺伝子であるグルコセレブロシダーゼ遺伝子 (GBA) 変異のヘテロ接合体は、PD のリスク遺伝子として知られ、マウスモデルにおいて GBA 遺伝子変異を有することで、PD の原因産物である α -シヌクレインの凝集がより増幅されることが示されている。このモデルでは、蓄積したグルコシルセラミド (GlcCer) に対する自己抗体の生成から補体活性化が生じ、炎症を惹起することや、GlcCer が、ミンクル受容体に直接結合し、自然免疫系を賦活することが原因であると指摘されている。これら知見は、PD の進行期のみならず早期から神経炎症が関わるとするものである。また、PD のリスク遺伝子としてこれまで HLA 抗原である DRB5*01 及び DRB1*15:01 型 MHC-II が特定されている。最近では、PD 患者の T 細胞はレヴィ小体の主要構成成分である α -シヌクレイン由来ペプチドを認識することが報告された。そして PD において腸内細菌叢の影響も指摘されており、その免疫機序に制御性 T 細胞の関与が指摘されており、制御性 T 細胞の機能障害が PD の発症に影響を及ぼす可能性を考案した。免疫チェックポイント阻害剤である抗 programmed cell death-1 (PD-1) 抗体及び PD-1 ノックアウトマウスに注目して、インターフェロン γ (IFN- γ) を介した制御性 T 細胞を抑制することで免疫系の変化が生じることで PD への病態への関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、PD モデルマウスとして知られている GBA 遺伝子変異マウス及びヒト α -シヌクレイン過剰発現マウスに対して、1) 免疫チェックポイント阻害剤 (抗マウス PD-1 抗体)の投与と、2) PD-1 ノックアウトマウスを用い、制御性 T 細胞の抑制から脳内免疫の変化、 α -シヌクレインの蓄積、神経細胞死までに至るメカニズムを生化学的、免疫組織学的に検討した。また、上記に加えて、3) GBA 遺伝子変異マウス及び α -シヌクレイン過剰発現マウスと PD-1 ノックマウスを掛け合わせ、4) さらに PD-1 ノックアウトマウスと GBA 遺伝子変異との掛け合わせたモデルに対し α -シヌクレインを脳内へ投与したモデルでの表現系の変化や神経病理学的変化の有無を検討した。

4. 研究成果

1) 野生型マウスに対して、抗 PD-1 抗体を腹腔内に投与した状態で脳内、胃壁内へ α -シヌクレインシードをインジェクションし、脳内での α -シヌクレインの凝集・伝播を 6 週から 12 週で生化学的・免疫組織学的に検討したが、マウス脳内での α -シヌクレインの凝集や伝播に有意な変化を認めなかった。さらに上記モデルに対して腹腔内へリポポリサッカライドやフロイントアジュバントを用いて炎症を惹起したモデルでの α -シヌクレイン伝播・凝集の程度を観察したが、いずれも明らかな α -シヌクレインの凝集や伝播に有意な変化を認めなかった (図 1、2)。



2) PD-1 ノックアウト (KO) マウスとヒト AS トランスジェニック (BAC Tg-SNCA) マウスを交配し PD-1KO/BAC Tg-SNCA を作成した。野生型 (WT)、PD-1KO、BAC Tg-SNCA、PD-1KO/BAC Tg-SNCA の 4 群で検討として、40 週齢程度までの加齢マウスについて行動解析、脳内における α -シヌクレインの蓄積、チロシンヒドロキシラーゼ陽性 (TH) 神経細胞の脱落など観察したが、4 群いずれも群間における有意差は認めなかった (図 3)。また運動症状の観察するためロータロッドでの運動機能評価も行ったが、各群で有意差は得られなかった。さらに PD において関連がある炎症性サイトカイン IL-1、IL-6、TNF- α について免疫染色では確認できなかった。一方、マウス脳ホモジネートを用いて ELISA での検討を行ったところ、IL-1 が WT と比較し、PD-1KO では約 1.3 倍、PD-1KO/BAC Tg-SNCA では約 2 倍程度に増加する傾向があった。PD-1 を阻害することに加え、AS が存在することで、脳内における炎症が惹起される可能性が示唆された。

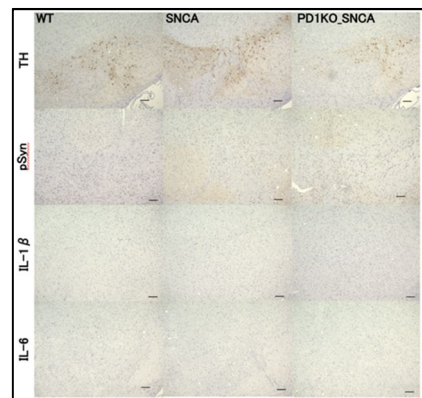


図 3

3) PD-1 と GBA 遺伝子ヘテロ変異 (L444P/WT) ノックイン (KI) マウスを掛け合わせ、より炎症を惹起することが想定されるマウスの飼育に成功した(図 4)。

PD-1 を阻害することで制御性 T 細胞による免疫寛容が破綻し、さらに GBA 遺伝子変異によりグルコシルセラミドの蓄積に伴い補体を介した免疫異常が生じることで脳内における α -シヌクレイン凝集促進の可能性を検討した。

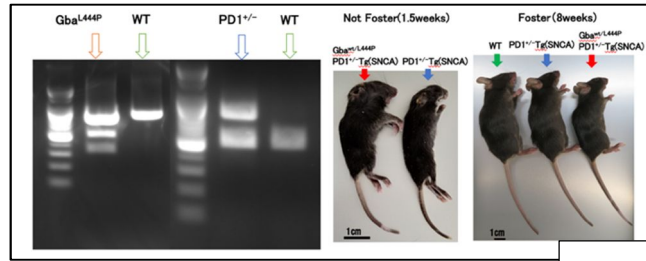


図 4

まず 2 ヶ月齢マウスで、WT、PD-1KO、PD-1KO/ BAC Tg-SNCA、GBAKI/PD-1KO/BAC Tg-SNCA において明らかな AS の蓄積や TH の脱落は認めなかったが(図 5)

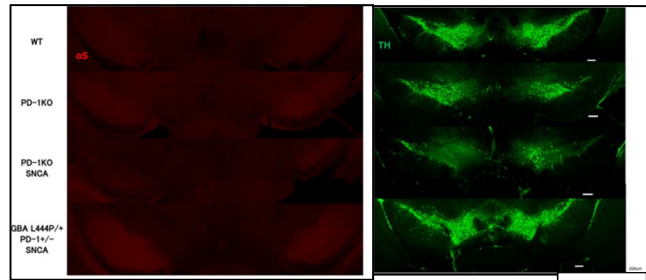


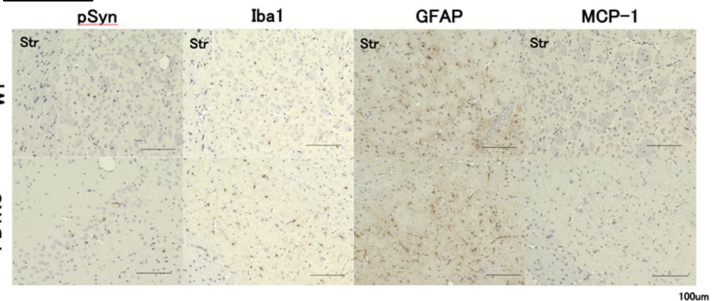
図 5

脳ホモジネートサンプルでサイトカインを ELISA で測定したところ GBAKI/PD-1KO/BAC Tg-SNCA において IL-1 の上昇を認めた。

図 6

4) WT, PD-1KO マウスに対して

α -シヌクレインシードをマウス脳線条体へインジェクションし、 α -シヌクレイン凝集や炎症細胞を免疫組織学的に評価を行った。少なくとも可視範囲内ではリン酸化 AS の凝集や



免疫介在を示唆する Iba1 や GFAP、MCP-1 などでの際は認めなかった(図 6)。今後は GBAKI/PD-1KO/BAC Tg-SNCA に対する α -シヌクレインインジェクションモデルでの凝集伝播の抑制メカニズムについて検討をすすめる。そしてサイトカインなど炎症の評価については ELISA による定量的な評価と、Iba-1 や GFAP、CD68、CD163 など活性型ミクログリアマーカーと併せて免疫組織学的評価を行う予定となっている。

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 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato S, Noda S, Torii S, Amo T, Ikeda A, Funayama M, Yamaguchi J, Fukuda T, Kondo H, Tada N, Arakawa S, Watanabe M, Uchiyama Y, Shimizu S, Hattori N.	4. 巻 30
2. 論文標題 Homeostatic p62 levels and inclusion body formation in CHCHD2 knockout mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hum Mol Genet.	6. 最初と最後の頁 443-453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddab057	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 Pathogenic insights to Parkin-linked model mice.	4. 巻 159
2. 論文標題 Sato S, Noda S, Hattori N.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 47-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.03.014.	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 Noda S, Sato S, Fukuda T, Tada N, Uchiyama Y, Tanaka K, Hattori N.	4. 巻 136
2. 論文標題 Loss of Parkin contributes to mitochondrial turnover and dopaminergic neuronal loss in aged mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiol Dis.	6. 最初と最後の頁 104717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2019.104717.	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 Ueno SI, Oyama G, Kanai K, Hatano T, Shimo Y, Hattori N	4. 巻 10
2. 論文標題 Ueno SI, Oyama G, Kanai K, Hatano T, Shimo Y, Hattori N. A Retrospective Imaging Evaluation of Presynaptic Dopaminergic Degeneration in Multiple System Atrophy with Levodopa Induced Dyskinesia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y).	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5334/tohm.58	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 Akio, Imai Yuzuru, Hattori Nobutaka	4. 巻 21
2. 論文標題 Lipids: Key Players That Modulate α -Synuclein Toxicity and Neurodegeneration in Parkinson's Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3301 ~ 3301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21093301	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 Saiki S, Sasazawa Y, Fujimaki M, Kamagata K, Kaga N, Taka H, Li Y, Souma S, Hatano T, Imamichi Y, Furuya N, Mori A, Oji Y, Ueno SI, Nojiri S, Miura Y, Ueno T, Funayama M, Aoki S, Hattori N.	4. 巻 86
2. 論文標題 A metabolic profile of polyamines in parkinson disease: A promising biomarker.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Neurol.	6. 最初と最後の頁 251-263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.25516.	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 Okuzumi A, Hatano T, Ueno SI, Ogawa T, Saiki S, Mori A, Koinuma T, Oji Y, Ishikawa KI, Fujimaki M, Sato S, Ramamoorthy S, Mohny RP, Hattori N.	4. 巻 6
2. 論文標題 Metabolomics-based identification of metabolic alterations in PARK2.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Clin Transl Neurol.	6. 最初と最後の頁 525-536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acn3.724.	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 14
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 e0223113.
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 -synuclein stability through membrane remodeling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	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 -

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, Hattori T, Mizutani Y, Mutoh T, Yokochi F, Ichinose Y, Koh K, Farrer MJ, Uchiyama Y, Akamatsu W, Wu YR, Matsuda J, Hattori N, et al.	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 Noda S, Sato S, Fukuda T, Tada N, Uchiyama Y, Tanaka K, Hattori N.	4. 巻 136
2. 論文標題 Loss of Parkin contributes to mitochondrial turnover and dopaminergic neuronal loss in aged mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiol Dis.	6. 最初と最後の頁 104717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2019.104717.	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 Noda S, Sato S, Fukuda T, Tada N, Hattori N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Aging-related motor function and dopaminergic neuronal loss in C57BL/6 mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Brain.	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00585-6.	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 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐藤栄人、野田幸子、舩山 学、服部信孝
2. 発表標題 Loss of CHCHD2 affects mitochondrial structure and dopaminergic neuronal loss in aged mice
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 常深泰司、石黒雄太、鏝坂朝子、奥住文美、貫名信行、服部信孝
2. 発表標題 ATP13A2/PARK9 protects brains from a-synuclein propagation
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石丸友博、斉木臣二、奥住文美、笹澤有紀子、福原武志、井本正哉、服部信孝
2. 発表標題 Development of PD mouse models with alpha-synuclein injection for assessment of chemical efficacy
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川 崇、波田野 琢、竹重遙香、鎌形康司、Christina Andica、内田 航、濃沼崇博、中村亮太、岩室宏一、大山彦光、下 泰司、梅村 淳、伊藤賢伸、青木茂樹、服部信孝
2. 発表標題 White matter alterations in Multiple System Atrophy-parkinsonian variant
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020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.
3. 学会等名 第13回パーキンソン病・運動障害学会コンgres
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ueno SI, Hatano T, Okuzumi A, Saiki S, 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 23rd International Congress of Parkinson ' s Disease and Movement Disorders. Sep 22-26, Nice, France. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hatano T, Mori A, Inoshita T, Fukushima-Shiba K, Koinuma T, Yamashita C, Imai Y, Hattori N.
2. 発表標題 Synaptic dysfunction in a Drosophila model of PARK14
3. 学会等名 23rd International Congress of Parkinson ' s Disease and Movement Disorders. Sep 22-26, Nice, France. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishiguro Y, Tsunemi T, Yoroizaka A, Hattori N.
2. 発表標題 The evaluation of exosomes as a biomarker of Parkinson ' s disease
3. 学会等名 23rd International Congress of Parkinson ' s Disease and Movement Disorders. Sep 22-26, Nice, France.
4. 発表年 2019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 Neuroscience Frontier Symposium 04: Structure and propagation of aggregated proteins
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 服部 信孝	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社法研	5. 総ページ数 160
3. 書名 ウルトラ図解 パーキンソン病	

1. 著者名 高久 史麿、堀 正二、菅野 健太郎、門脇 孝、乾 賢一、林 昌洋、服部信孝（パーキンソン病薬）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 じほう	5. 総ページ数 1586
3. 書名 治療薬ハンドブック2020	

1. 著者名 服部信孝	4. 発行年 2019年
2. 出版社 株式会社 中山書店	5. 総ページ数 659
3. 書名 大脳基底核の変性疾患、神経疾患、6 神経変性疾患、内科学書 Vol. 6 改訂第9版、神経疾患	

〔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
研究分担者	佐藤 栄人 (Sato Shigeto) (00445537)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
研究分担者	波田野 琢 (Hatano Taku) (60338390)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (32620)	
研究分担者	森 聡生 (Mori Akio) (60782878)	順天堂大学・医学部・助教 (32620)	
研究分担者	上野 真一 (Ueno Shin-ichi) (40875944)	順天堂大学・医学部・非常勤助教 (32620)	

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2件

国際研究集会 The 19th "Takamatsu" International Symposium for PD & MD ((IPDST)	開催年 2020年～2020年
国際研究集会 The 20th "Takamatsu" International Symposium for PD & MD ((IPDST)	開催年 2021年～2021年

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