

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07865

研究課題名（和文）レボドパ誘発性ジスキネジアでのグリア介在性の神経可塑性の異常

研究課題名（英文）Glial-mediated abnormal neuroplasticity in levodopa-induced dyskinesia

研究代表者

馬場 孝輔（Baba, Kousuke）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90750159

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病（PD）の晩期運動合併症であるレボドパ誘発性ジスキネジアの病態を解明する為、まずドパミン神経変性前の前駆期でのドパミン神経細胞の状態を評価した。前駆期のPDモデルマウスの黒質のドパミン神経細胞の遺伝子発現解析を実施した。その結果、ドパミン神経変性の前段階で多くの遺伝子発現が変動することを確認した。これらのなかでPDとの関連が指摘されていない遺伝子Xに関して解析を行った。シヌクレインフィブリル接種によって黒質のドパミン神経で発現が誘導されることを確認した。更にPD患者の黒質ドパミン神経での発現上昇をも確認した。更にヒトPD患者の生体サンプルでの測定系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題でこれまでパーキンソン病との関連が指摘されていなかったgene XがPDマウスモデルでドパミン神経変性が起こる前に発現上昇することを見出した。これはPDにおける緩徐進行性のドパミン神経変性の分子機序を解明する足掛かりとなりうる。更に、ドパミン神経変性前に発現上昇だけでなく、ヒトPD患者の死後脳サンプルでも発現上昇が確認された。これはPDにおける新たなバイオマーカーの開発につながる可能性があり大きな学術的、社会的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia, a late motor complication of Parkinson's disease (PD), we first analyzed the state of dopamine neurons in the prodromal phase before dopamine neurodegeneration. We performed RNAseq analyses of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) of a PD mouse model in the prodromal stage. As a result, we observed that many gene expressions are altered before dopaminergic neurodegeneration occurs. Among these, we analyzed gene X, which has not been previously implicated in PD. We confirmed that -synuclein fibril inoculation induces gene X expression in the SN dopaminergic neurons of mice. We also confirmed that gene X is upregulated in the SN dopaminergic neurons of PD patients. Furthermore, we established a measurement system using biological samples from human PD patients.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 シヌクレイン ドパミン神経変性 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は高齢化社会を迎える本邦において、今後も患者数は増加の一途をたどると考えられる。l-dopa 製剤等の薬物療法により生命予後が改善されたが、その結果、l-dopa 製剤の長期投与による合併症が問題となっている。その代表的な合併症としてレボドパ誘発性ジスキネジア (levodopa induced dyskinesia : LID) がある。ヒトにおいて LID の発現は PD 発症および l-dopa 投与開始から 10 年前後の時間を要する。これは慢性の l-dopa 投与等に伴う神経可塑性の異常と考えられる。この LID のコントロールは临床上、困難なことが多く、ADL の障害要因となっている。

LID の発症機序の解明とそれに基づく制御法の開発が求められている。前述のように LID の発生機序には緩徐進行性のドパミン神経細胞の変性 l-dopa 製剤の慢性投与により神経可塑性の異常がもたらされ、更にグリア細胞による神経炎症の関与も指摘される。我々は シヌクレインフィブリル投与による PD マウスモデルで シヌクレインの凝集によるレビー病理の再現とそれに続く緩徐進行性のドパミン神経の変性の再現に成功している (Hayakawa H, et al. *Mov Disord.* 2020)。本モデルを用いることで発症早期から LID を発症する晩期までのドパミン神経細胞やグリア細胞の長期にわたる変化の検証が可能であり LID の病態解明につながると予想された。

2. 研究の目的

シヌクレインフィブリルを用いた PD モデルマウスを用いて LID 発症の背景にある関係可塑性の異常やグリア細胞による神経炎症の分子機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

シヌクレインフィブリル黒質接種モデル (前述の PD モデル) を用いる (Hayakawa H, et al. *Mov Disord.* 2020)。

シヌクレインフィブリルに関しては組み換え大腸菌から精製し振盪法による作成を以前に確立している (Hayakawa H, et al. *Mov Disord.* 2020)。

C57BL6J マウスに対して G51D シヌクレインフィブリル 20 μ g を片側黒質に定位脳手術的に接種する。LID を発症する晩期の状態に対するコントロールとして前駆期 (接種 6 週) での黒質ドパミン神経細胞での遺伝子発現変化を RNAseq 法を用いて解析する。遺伝子発現解析を行う前に接種 6 週後の黒質ドパミン神経の状態を確認するために免疫染色法による病理解析を行う。ドパミン神経細胞のマーカーとしてチロシンヒドロキシラーゼ、レビー病理のマーカーとしてリン酸化シヌクレインのそれぞれの抗体を用いた。

LID モデルマウスについても C57BL6J マウスに対して G51D シヌクレインフィブリル 20 μ g を片側黒質に定位脳手術的に接種する。フィブリル接種後から 2 回/日で l-dopa 6mg/kg + benserazide 15mg/kg で腹腔内投与を連日行う。生理食塩水投与群をコントロールとする。LID モデルに関してはフィブリル接種から 4 週ごとに apomorphine induced rotation test および abnormal involuntary movement (AIM) test を行い LID の評価を行う。LID 発症を認めた時点で同様に RNAseq 法を用いた遺伝子発現解析を行いコントロール群、前駆期群と比較し LID 病態にかかわる分子変化を同定する。

4. 研究成果

PD の晩期運動合併症であるレボドパ誘発性ジスキネジアの病態を解明する為、まずドパミン神経変性前の前駆期 (接種後 6 週) でのドパミン神経細胞の状態を評価した。まず前駆期の PD モデルマウスの脳を回収し、免疫組織化学染色法にて黒質でレビー病理が形成されているが、ドパミン神経の変性が起きていないことを病理学的に確認した。そこで黒質のドパミン神経細胞の選択的な RNAseq による発現解析を前駆期にあたる 6 週とドパミン神経変性が起こる 12 週の 2 群で実施した。その結果、接種 6 週の時点 (ドパミン神経変性前) で多くの遺伝子発現が変動することを確認した。これらのなかでパーキンソン病との関連が指摘されておらず、最も変動の大きい遺伝子 X に関して解析を行った。シヌクレインフィブリル接種によってマウス脳黒質のドパミン神経で発現が誘導され、コントロール群である生理食塩水接種群のマウス脳黒質のドパミン神経では発現を認めなかった。これは遺伝子 X は シヌクレインフィブリルがドパミン神経細胞内に存在するとき特異的に誘導される事を示す。更に PD 患者の剖検脳サンプルを用いて免疫組織染色法により黒質ドパミン神経での遺伝子 X が染色され、対照群では染色されないことを初めて確認した。現在、ヒトパーキンソン病患者の生体サンプルでの初期から晩期にお

ける発現量変化についての解析を始めた。これらはヒト PD におけるバイオマーカーになりうる可能性を示す成果と考える。また、LID は運動障害であるため、それらを含めた PD モデルでの運動機能の定量的な評価を行うため自由行動下での移動量をトラッキングするシステムの構築を行った。コントロールとして ALS のモデルマウスで従来のロータロッド法よりも詳細な運動障害を検知できた。引き続き、複数の運動障害を呈するモデルマウスを用いて測定を行い最適なプロトコルの作成を行っている。

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 Jiang S, Baba K, Okuno T, Kinoshita M, Choong CJ, Hayakawa H, Sakiyama H, Ikenaka K, Nagano S, Sasaki T, Shimamura M, Nagai Y, Hagihara K, Mochizuki H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Go-sha-jinki-Gan Alleviates Inflammation in Neurological Disorders via p38-TNF Signaling in the Central Nervous System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurotherapeutics	6. 最初と最後の頁 460-473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13311-020-00948-w	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
---------------------------	-----------------------	----

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