

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07299

研究課題名(和文)細胞間伝播性 β -シヌクレインシード産生機構の解明とプリオン様伝播阻害への応用

研究課題名(英文)Characterization of cell-to-cell transmissible alpha-synuclein pathogenic seeds

研究代表者

田口 勝敏 (Taguchi, Katsutoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60462701

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)：パーキンソン病の病理所見であるレビー小体の形成領域は病期の進行に伴い、脳幹から大脳皮質へと上行性に拡大する。この背景には病原性Seedの細胞間伝播が指摘されているが、Seedについては現在も不明な点が多い。本研究ではレビー小体様凝集体を有する病的神経が分泌したSeedを分離し、これを構成する β -Synuclein (β -Syn) の翻訳後修飾について詳細に解析することにより、Seedに特徴的な β -Synの切断サイトを同定することができた。更に、この分子内切断に関わることが予想される候補酵素を絞り込み、その阻害剤が凝集形成に与える影響を検討した結果、有意に凝集形成を抑制する阻害剤を特定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病は黒質ドーパミン神経の脱落に起因する様々な運動症状を示す。これに対してはドーパ製剤の投与による対症療法で対処するのが主流であり、進行する神経変性を積極的に阻止する方法は未だ確立されていない。本研究は病的神経が自ら産生した病原性Seedを分離し、網羅的生化学検索によって検出することができたSeedに特徴的な分子修飾に着目しており、内在性 β -Synが病原性を獲得するメカニズムを明らかにするのみならず、伝播性Seedを標的とした新規神経保護ストラテジーの構築につながる所見を得ることができたことと位置づけられ、PDの新規分子標的医薬開発の起点となる創造性を有している。

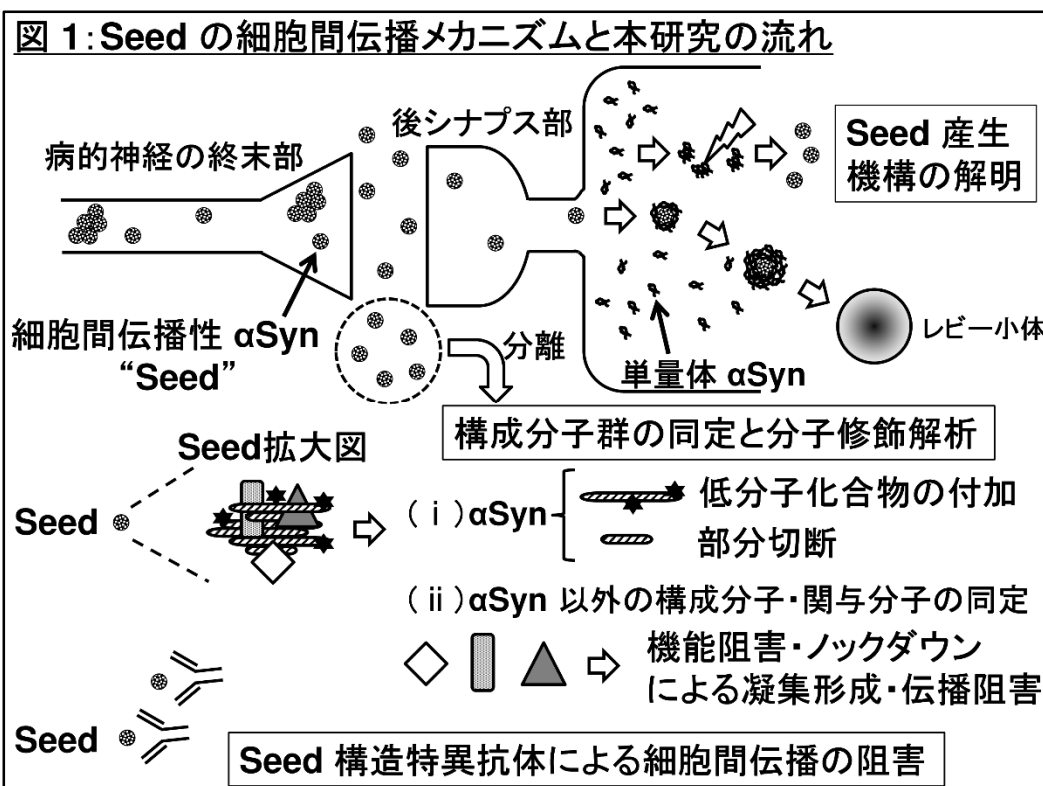
研究成果の概要(英文)：alpha-Synuclein (aSyn) is one of major constituents of Lewy bodies (LBs) and Lewy neurites (LNs), which are well-known pathological hallmarks of Parkinson's disease (PD) and dementia with Lewy bodies (DLB). Accumulated evidence suggests that prion-like transmission of pathogenic seeds is a critical event for progressive neurodegeneration. However, properties of the seeds remain to be elucidated. Here, we isolated aSyn oligomers released from pathological neurons harboring LB-like aggregates. These extracellular oligomers had uniform molecular weight and induced LB-pathology in cultured neurons. Interestingly, mass spectrometric analysis demonstrated the presence of characteristic truncation forms of aSyn constituting those seeds. We further identified inhibitor for the candidate enzyme which catalyzes aSyn truncation. Thus, post-translational modification of aSyn will be a better therapeutic target to inhibit the disease propagation through the seed-transmission in PD and DLB brain.

研究分野：神経科学

キーワード：パーキンソン病 レビー小体 β -シヌクレイン シード プリオン様細胞間伝播

1. 研究開始当初の背景

-Synuclein (Syn) はパーキンソン病に特徴的な細胞内凝集体「レビー小体」の主要構成タンパク質であり、その遺伝子の変異や重複が家族性パーキンソン病を引き起こすことから、パーキンソン病発症に関わる重要な分子と位置付けられている (Goedert, Science, 2015)。レビー小体の形成領域はパーキンソン病の最初期には嗅球において観察されると共に、病期の進行に伴って下部脳幹から大脳皮質に向かって上行性に拡大する。現在、この病変拡大の分子的背景として、病原性 Seed のプリオン様細胞間伝播が注目されている (Uemura et al., Trends in Mol. Med., 2020)。高分子化した Syn-Seed が細胞内へ取り込まれるとこれが重合核となり、内在性 Syn が更に重合を開始し、最終的にはレビー小体の形成に繋がると考えられている。これらのことから、この重合核は Seed と呼称されている (図 1)。



精製した単量体 Syn タンパク質 (recombinant Syn) を人工的に試験管内で重合させ、高分子化させた線維様 Syn (preformed fibrils, PFF) を含む培地で神経細胞を培養すると、レビー小体様の凝集体が形成されること (Volpicelli-Daley et al., Neuron, 2011)、更にマウス黒質あるいは線条体に PFF を投与することにより、凝集体形成が脳内各所及び大脳皮質にまで伝播すること (レビー小体 in vivo 再現モデル) が報告されている (Suzukake et al., Brain, 2013; Luk et al., Science, 2012)。しかしながら、人工的に PFF を用いて一次病的神経細胞を作製することはできても、生きた病的神経細胞が自ら産生した細胞間伝播性 Seed の性質や細胞内で Seed が産生される (Syn が高分子化する) 原因やその詳細な分子メカニズムについては現在も不明な点が数多く残されている。

申請者はこれまでに、レビー小体様凝集体を有する病的モデル神経細胞が産生した伝播性 Seed の分離方法を確立し、その分子性状の形態学的解析を通じてレビー小体形成メカニズムの研究を進めてきた。本研究では、伝播性 Seed を標的とした以下の学術的問いを設定し、研究を開始した。

: Seed を構成する分子を詳細に解析することによって、Seed 産生メカニズムを明らかにすることができるのではないかと。更に、その産生プロセスを細胞内で阻害すれば神経変性とその領域拡大を効果的に抑制することができるのではないかと。

: なぜ、Seed ができる (Syn が高分子化する) のだろうか。引き金は何か。

: Seed 産生のキーステップに関わる酵素を特異的に阻害すること、あるいは Seed 構造を特異的に認識するモノクローナル抗体によって、凝集体形成とプリオン様細胞間伝播を効果的に抑制することができるのではないかと。

以上のような問いを定め、本研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究の目的は細胞間伝播性 (病原性) Seed を標的とした神経保護ストラテジーを確立することである。そのために明らかにしなければならないことは以下の3点であると考えた。

Seed 産生に関わるキーステップとこれを修飾する分子 (例えば酵素などの関与) を特定することにより、Seed 産生の分子メカニズムを明らかにする。

Seed 産生のキーステップを触媒する酵素に対する阻害剤等の低分子化合物を同定し、凝集体形成及び細胞間伝播を効果的に抑制できることを証明する。

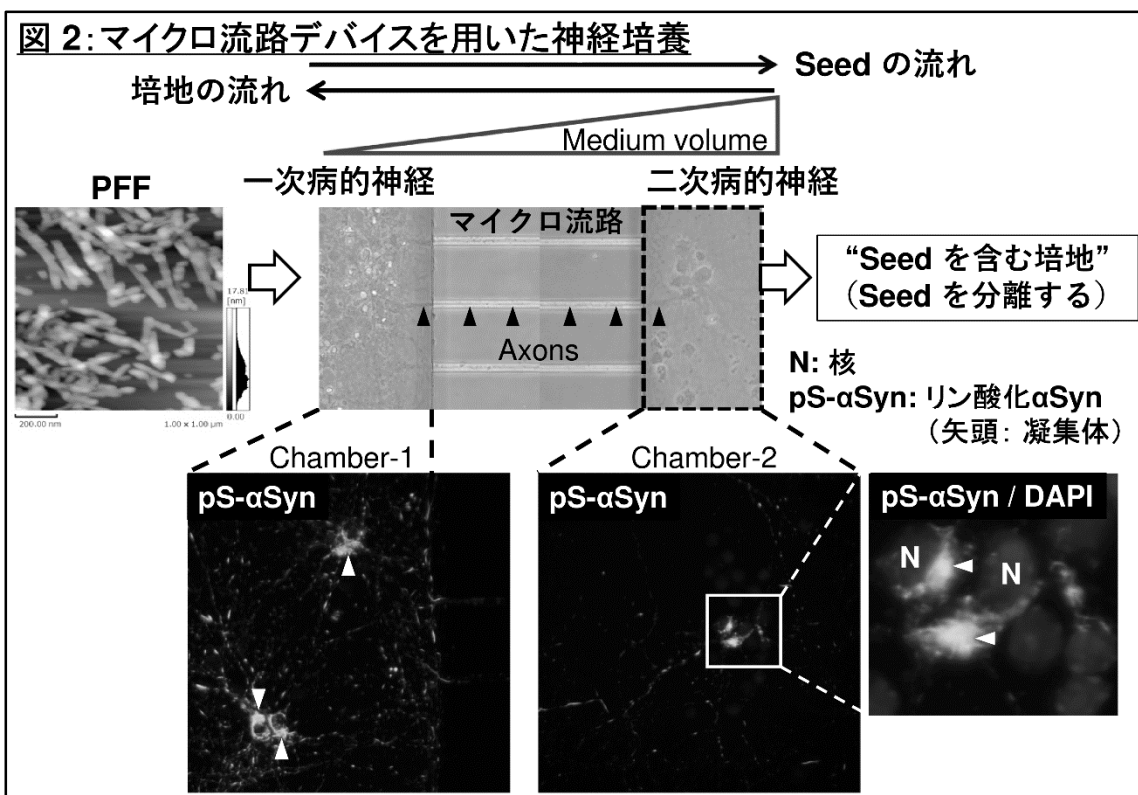
阻害剤以外に、抗 Seed 構造特異抗体が神経細胞間伝播を抑制することができるか検証する。

パーキンソン病治療の現状は未だ L-ドーパ製剤による対症療法が主流である。本研究によって Seed の産生メカニズムを解明し、細胞間伝播を効果的に阻害する方法を確立することを目的とし、これが実現できれば新しいパーキンソン病治療法開発の起点になることが期待される。

3. 研究の方法

: Seed 構成分子の解析

マイクロ流路デバイス内で培養した二次病的神経細胞の培養液を出発材料に Seed 画分を調製する (図 2 示した Seed を含む培地からシヨ糖密度勾配遠心法により分離する) 。



Seed 画分に含まれるタンパク質複合体を Native-PAGE によって分離し、銀染色によって検出できた主要バンド（生ゲルバンド）を切り出す。切り出したゲルに含まれる分子を質量分析（LC-MS/MS）により同定した。特に Syn についてはアセチル化や脂肪酸修飾などの低分子量修飾の存在、あるいは部分切断などの翻訳後修飾について重点的に検討した。部分切断を受けられる場合、その分解酵素の同定も実施する。各種阻害剤を用いて分解酵素を阻害した際、凝集形成および細胞間伝播を効果的に抑制することができるか、確認する。次に、Seed を構成する Syn 以外の各構成タンパク質、Seed 産生に関わる分子群に着目し、その機能阻害やロックダウンが凝集形成および細胞間伝播を抑制することができるか、in vitro, in vivo 両病的モデル実験系を用いて検証する。

：Seed 特異抗体の作製と伝播抑制効果の検証

抗体作製：Seed 画分を用いてマウス脾臓細胞を免疫する。その後、脾臓細胞はミエローマと細胞融合させ、ハイブリドーマを作製する。得られたハイブリドーマの中から、dot blot assay と ELISA により Seed 構造にのみ反応する構造特異抗体を産生するハイブリドーマを選別する。

抑制効果の検証：マウス線条体に PFF を注入すると共に、大脳皮質内へ構造特異抗体（あるいは正常マウス由来精製 IgG）を Osmotic pump を用いて持続投与する。PFF を注入後、30 日目に灌流固定を行い、大脳皮質における凝集形成効率について抗リン酸化 Syn 抗体を用いた免疫染色によって評価する（レビー小体を構成する Syn はリン酸化修飾されている）。

4．研究成果

本研究ではレビー小体様凝集体を有する病的神経が分泌した Seed を分離し、これを構成する Syn の翻訳後修飾について詳細に解析することにより、Seed に特徴的な Syn の切断サイトを同定することができた。更に、この分子内切断に関わるものが予想される候補酵素を絞り込み、その阻害剤が凝集形成に与える影響を検討した結果、有意に凝集形成・細胞間伝播を抑制する阻害剤を特定することができた。

パーキンソン病は黒質ドーパミン神経の脱落に起因する様々な運動症状を示す。これに対しては L-ドーパ製剤の投与による対症療法で対処するのが主流であり、進行する神経変性を積極的に阻止する方法は未だ確立されていない。本研究は病的神経が自ら産生した病原性 Seed を分離し、網羅的生化学的検索によって検出することができた Seed に特徴的な分子修飾に着目しており、内在性 Syn が病原性を獲得するメカニズムを明らかにするのみならず、伝播性 Seed を標的とした新規神経保護ストラテジーの構築につながる所見を得ることができた。

Seed 構造特異抗体の作製については、大容量のマイクロ流路デバイスを開発して Seed の大量調製を実施したが、抗体を作製できるだけのタンパク量を回収するには至らず、今後の更なる研究を継続する必要がある。

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 1件）

1. 著者名 Watanabe Yoshihisa, Taguchi Katsutoshi, Tanaka Masaki	4. 巻 24
2. 論文標題 Roles of Stress Response in Autophagy Processes and Aging-Related Diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13804 ~ 13804
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms241813804	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 田口勝敏、田中雅樹	4. 巻 131
2. 論文標題 パーキンソン病における α -シヌクレインを介した神経変性メカニズムについて	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 京都府立医科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 123-132.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32206/jkpum.131.02.123	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、澤村正典、高橋良輔、田中雅樹
2. 発表標題 Differential expression profiles of α -synuclein in rodent and primate brain
3. 学会等名 北米神経科学会 SfN2023（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 マウス嗅球の傍系球体細胞に高発現するパーキンソン病関連分子 α -シヌクレインの機能解析
3. 学会等名 第129回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 ヒト及びマウスの大脳皮質にけるパーキンソン病責任分子 -シヌクレインの発現プロファイル解析
3. 学会等名 第45回 日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 Differential expression profiles of -synuclein in human and non-human primate brain
3. 学会等名 第63回 日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 霊長類脳におけるパーキンソン病関連分子 -シヌクレインの内在性発現プロファイル解析
3. 学会等名 第128回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 パーキンソン病関連分子 シヌクレインのヒト脳内における内在性発現プロファイルについて
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 Differential expression profiles of α -synuclein in the cerebral cortex of hman brain
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都府立医科大学 生体構造科学 大学ホームページ https://www.kpu-m.ac.jp/doc/classes/igaku/seitai/35.html 京都府立医科大学 生体構造科学 研究室ホームページ http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anatomy1/</p>
--

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