

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15681

研究課題名（和文）パーキンソン病に対する再生誘導療法の確立

研究課題名（英文）Investigation of the efficacy of regeneration inducing medicine for Parkinson's disease

研究代表者

木村 康義 (Kimura, Yasuyoshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50727451

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病は進行性の神経難病であるが、病気の進行自体を抑える効果がある、確立された治療法は現時点では存在していない。本研究では、再生誘導効果を持つペプチド（アミノ酸の短い鎖）を、パーキンソン病を模した動物モデルに投与することで、どのような変化が起きるか、また、病気に対する治療効果があるかについて調べた。再生誘導効果とは、当該ペプチドが間葉系幹細胞という様々な細胞になることができる幹細胞を自分の骨髄から誘導し、保護的な効果を示すものであり、このような薬剤がパーキンソン病の治療法となる可能性があるかについて検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病は罹患者数の多い進行性の神経難病であるが、病気の進行自体を抑える効果がある、確立された治療法は現時点では存在していない。本研究は、再生誘導効果を持つペプチド（アミノ酸の短い鎖）というユニークな特性をもつ治療薬候補の有効性や作用を、種類の異なる複数のパーキンソン病マウスモデルを用いて検証した。期待される有効性が示された場合は、新たなパーキンソン病治療薬として期待されるため、開発を継続し進めることで将来的に病気の進行を抑える治療薬として医療や社会に還元できると考える。また作用機序の解明は、脳の状態や働きを保つ仕組みを理解する一助になると考えるため学術的意義も高い。

研究成果の概要（英文）：Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative disorder without established treatment that is effective in suppressing the disease progression itself. In this study, peptides (i.e. short chains of amino acids) with a "regenerative inducing effect" were administered to animal models of Parkinson's disease to investigate what changes occur and whether they have a therapeutic effect on the disease. The regeneration inducing effect means that the peptide induces mesenchymal stem cells, which have the potential to differentiate into various types of cells, from the bone marrow and shows a protective effect against diseases. We examined whether such an agent could be a potential treatment for Parkinson's disease.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 疾患修飾療法 再生誘導療法

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え世界的に増加しているパーキンソン病は、罹患者の生命予後や健康寿命を制限し、介護・経済的な負担を強いるだけでなく、医療経済をも強く圧迫する。様々な治療薬や治療法が登場しているが、根本治療や進行を抑制する治療法は未だ見出されておらず、その確立は喫緊の課題である。近年、再生誘導医薬として内在の間葉系幹細胞を損傷部位へ誘導するペプチド医薬品が注目されている。動物実験において表皮水疱症や脳梗塞などへの有効性が示され、治験も実施されているが、パーキンソン病をはじめとする中枢神経変性疾患への有効性や中枢神経系の疾患への正確な作用機序は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、パーキンソン病のマウスモデルを作成し、再生誘導ペプチドの有効性を解析すること、及び、再生誘導ペプチドの中枢神経疾患への作用機序を解明することを目的とする。本研究は、パーキンソン病の進行を抑制する疾患修飾療法の開発、脳の恒常性維持機構の探索、新規治療標的の発見の可能性などにより社会及び科学に資するものである。

3. 研究の方法

パーキンソン病のマウスモデルとして、病的変異(G51D) シヌクレインの前繊維(Prefomed fibrils, PFFs)を脳に定位的に施注するマウスを作成し、再生誘導ペプチドまたは Vehicle を投与し解析を行う。具体的には、リコンビナント G51D- シヌクレインを精製し agitation 法で作成した繊維を超音波で破碎し PFFs を作成し、透過電子顕微鏡や初代神経培養投与により質評価を行ったうえで、PFFs または生理食塩水をマウスの黒質に定位的に投与する。PFFs 投与1カ月後から、複数の投与レジメンを設定して再生誘導ペプチドまたは生理食塩水を反復的に経静脈投与する。投与後に経時的に行動試験(ローターロッド試験やオープンフィールド試験)を実施しマウスの行動・運動機能を評価する。モデル作成から6カ月後に、脳組織を組織染色法で解析し、病的 シヌクレイン病理の広がり、ドパミン神経細胞減少の程度、その他のメカニズムに關与するデータの解析を行う(図1)。

また、上記の PFF モデルに加えて、ドパミン神経毒である 6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)を黒質ないし線条体に投与した毒性パーキンソン病モデルを作成し、2~8 週間の評価期間で、再生誘導ペプチド投与時の有効性やメカニズムの評価を実施する。本モデルにおいては、行動試験としてはアポモルフィン投与試験を実施する。

上記にくわえて、間葉系幹細胞レポーターマウスを用いてパーキンソン病モデルを作成し、再生誘導ペプチド投与実験を実施し、間葉系幹細胞が障害部位に動員されるかについての検討を行う。

なお、本研究で評価を実施する再生誘導ペプチドは、その主たる作用が内在の間葉系幹細胞の障害組織への動員にあると推測されており、in vitro の細胞実験での検証が困難であるため動物実験において解析を行うものとする。

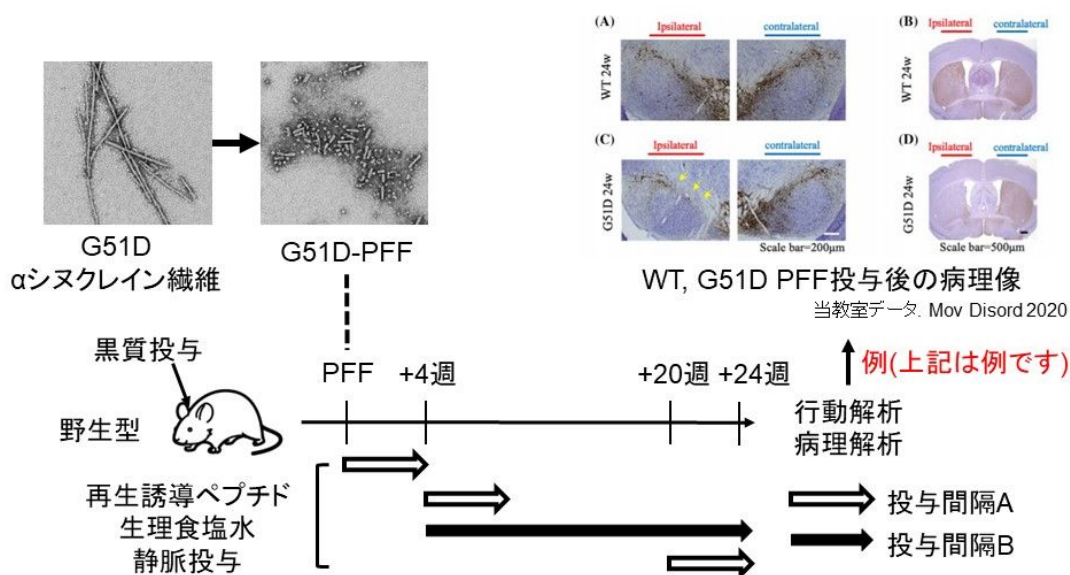


図1. 実験法の概念図

4. 研究成果

(1) PFF 投与パーキンソン病モデルにおける検証

計画に従い、G51D-PFFs を作成しサイズ等の評価を行った上で2ヵ月齢の野生型マウスの黒質に定位的に投与し、パーキンソン病モデルマウスを作成した。その後、再生誘導ペプチドを一定期間（PFF 投与早期と解析前のみ）または4週後から24週後まで継続して投与した。行動実験を実施し、PFFs 投与から6カ月後に脳組織を病理学的に解析した（6カ月後解析群：N=8-10/群，図1）。

PFF モデルでは作成した PFF の状態(バッチ)などの因子により病理の進展や神経障害の程度が異なることがあるが、本実験では シヌクレイン病理や神経障害の程度が比較的軽度であり、有効性の検証が困難であった。しかし、その中でも有効性に関する示唆的なデータおよび投与方法を最適化するための情報を取得した。

(2) 6-OHDA 投与パーキンソン病モデルにおける検証

6-OHDA 投与パーキンソン病モデルには黒質投与、線条体投与など複数のモデルが知られている。最初に黒質投与モデルを作成し評価を実施したが、毒性が想定より強くみられたため、線条体投与モデルにて評価を実施した。

野生型マウスの片側線条体に 6-OHDA 4 μ g (2 μ l) または生理食塩水 2 μ l を投与した後、再生誘導ペプチドまたは生理食塩水を事前規定した方法で静脈投与し、2週間ごとに行動実験での評価を実施するとともに2週後、8週後に脳組織を回収し病理学的な評価および各種蛍光染色による解析を実施しデータを取得している。

(3) PFF 投与パーキンソン病モデルにおける検証

(1)で得られた結果から、投与レジメンを作成し、G51D-PFF を新たに合成・準備し *in vivo* での評価を行った上で、モデル作成と再生誘導ペプチドの投与実験を2コース実施した。

1月毎の経時的な行動評価データを取得し、また、PFF 投与から6カ月後の脳組織を病理学的に解析した。病理学的解析では、リン酸化 シヌクレイン、TH 陽性ニューロンの細胞数評価（神経毒性評価）、マイクログリアやアストロサイトの評価、DCX などの神経再生に関連するマーカーの評価などを行っている。

(4) レポーターマウスを用いたモデル作成・投与実験

再生誘導ペプチドの投与により間葉系幹細胞が標的と想定している領域に動員されているかを確認するために、レポーターマウスを用いた実験を開始している。

以上の実験により、再生誘導療法がパーキンソン病治療として動物実験で有効性を示すかに関するデータおよび中枢神経系に与える影響についてのデータを解析している。

結果については後日公表する。

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

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