

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20691

研究課題名（和文）パーキンソン病における シヌクレイン進展経路の新たな探索

研究課題名（英文）exploring new pathways of alpha-synuclein propagation in Parkinson's Disease

研究代表者

田口 智之（Taguchi, Tomoyuki）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：00909393

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病（PD）の進展様式として、腸管に出現した凝集  $\alpha$ -synが迷走神経を介して中枢神経へと伝播していく仮説が主流である。しかしPD 剖検脳の検討から全てのPDが上記仮説の通りに広がるわけではない。本研究では末梢免疫細胞を介した  $\alpha$ -synの新たな進展経路の可能性を検討した。結果としては、凝集  $\alpha$ -synを貪食した末梢血単核細胞（主にCD11b陽性細胞）は全身炎症下にて脳内に侵入することはできるが、それを起点に  $\alpha$ -syn病理が進展していくことはなかった。上記結果から末梢CD11b陽性細胞は凝集  $\alpha$ -synを分解する能力が高く、凝集  $\alpha$ -synの進展抑制につながる新たな治療開発の可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、パーキンソン病の病理進展メカニズムに対する新たな視点を提供し、従来の仮説を再評価するきっかけになったと考える。また末梢免疫細胞を応用した新たな治療法の開発につながる可能性を秘めていると言える。

研究成果の概要（英文）：The leading hypothesis for the onset and progression of Parkinson's disease (PD) suggests that aggregated  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn) starts in the gut and ascends to the central nervous system via the vagus nerve. However, studies on autopsied PD brains show that not all cases follow this pattern. In this study, we explored a new potential pathway for  $\alpha$ -syn progression through peripheral immune cells. Our results indicated that while peripheral blood mononuclear cells (mainly CD11b-positive cells) that phagocytosed aggregated  $\alpha$ -syn could enter the brain during systemic inflammation, this did not lead to the progression of  $\alpha$ -syn pathology. These findings suggest that peripheral CD11b-positive cells have a high capacity to degrade aggregated  $\alpha$ -syn, highlighting the potential for new therapies to inhibit  $\alpha$ -syn aggregation.

研究分野：パーキンソン病

キーワード：パーキンソン病 シヌクレイン 進展経路 末梢血単核細胞

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は、黒質緻密部のドパミン神経の脱落及び凝集  $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ -syn)の蓄積を特徴とした神経変性疾患である。PDの発症・進展仮説に、末梢組織である腸管に  $\alpha$ -syn 凝集体が出現し迷走神経を介して中枢神経に至り、その後神経細胞間を伝播し上行していくというプリオン仮説があり、現在の主流となっている。

申請者らを含めて複数のグループがマウスの腸管に  $\alpha$ -syn シードとなる preformed fibril (PFF)を injection し、神経細胞間を伝播していくか検証を行なった。しかし、脳幹より吻側へは伝播することはなかった。2019年にテント上への伝播が報告されたが、再現報告は未だ存在しない。また非ヒト霊長類において、腸管に PFF を injection した際にテント上にまで  $\alpha$ -syn 病理が観察されたが、経路地点と考えられる迷走神経背側核には  $\alpha$ -syn 病理は認められなかった(ML Arotcarena et al. *Brain* 2020)。これらから  $\alpha$ -syn 病理の進展において神経細胞間伝播だけでは不十分である可能性がある。実際 PD 剖検脳の結果からも全ての PD がプリオン仮説で説明することはできないことが示唆されている。

他の伝播経路として循環系を介した可能性が注目され始めており、PDの末梢血では免疫細胞内の  $\alpha$ -syn 含有量増加やその機能不全が報告されている(SJ Cardai et al. *PLoS One* 2013)。またマクロファージ・ミクログリアなどの貪食細胞は PFF を貪食するが、Lysosome による分解が困難なため細胞内に PFF を蓄積、もしくはエクソソームに内包させ細胞外に放出することが分かっている。ここで興味深いことに精神的ストレス下もしくは LPS などで全身炎症が起こった際に、末梢免疫細胞は中枢神経内に侵入することが動物実験で示されている(CA Thomson et al. *J Neuroinflammation* 2020)。これらから PFF を内在させた末梢免疫細胞は中枢神経内に侵入し病理の起点となる可能性がある。実際に PD 剖検脳でも T 細胞など末梢免疫細胞の存在が病初期より観察されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、PDにおける  $\alpha$ -syn 進展経路に末梢免疫細胞が関与しているかどうかを明らかにすることである。特に末梢で凝集  $\alpha$ -syn を貪食した免疫細胞が、直接脳内に侵入し、そこを起点として  $\alpha$ -syn 病理が進展するかを明らかにする。末梢免疫細胞を介した新たな  $\alpha$ -syn 進展仮説の検証には、野生型マウス(C57BL/6J)以外に申請者が作製した前駆期 PD モデルマウスを用いる(Taguchi T, Ikuno M, et al., *Brain* 2020)。この前駆期 PD モデルマウスは、 $\alpha$ -syn の発現調節領域を含んだコンストラクトを導入することにより、本来の  $\alpha$ -syn 発現パターンを維持することを可能とした。また世界で初めて  $\alpha$ -syn 蓄積に伴う複数の PD 前駆期症状(嗅覚障害やレム睡眠行動異常症様の睡眠障害)を再現したモデルである。

## 3. 研究の方法

- (1) マウスの末梢血より Peripheral Blood Mononuclear cells: PBMC を採取し、*ex vivo*にて標識した PFF を添加し、細胞内に取り込むことを確認する。
- (2) PFF を内在した PBMC を、野生型マウスの尾静脈より投与し、5日後に脳内に PFF 含有免疫細胞が存在するか確認する。
- (3) 予め LPS を腹腔内投与した野生型及び前駆期 PD モデルマウスの尾静脈に PFF 含有 PBMC を投与し、3ヶ月後に脳内における  $\alpha$ -syn 病理が惹起・悪化するかを確認する。

## 4. 研究成果

(1) PFF が細胞内に取り込まれることを確認するために、酸性環境化にて蛍光を発する色素(pH-rod)を使用し PFF をラベリングした。これにより酸性環境下である Lysosome に PFF が取り込まれた際は蛍光色素を発するため、細胞内に取り込まれたことがわかる。

野生型マウスの末梢血を 1 ml 程度ほど採取し、フィコールにて PBMC を分離した。10% FBS 含有 RPMI1640 培養液中にて、 $1 \times 10^5$  の PBMC に対して pH-rod にてラベリングした PFF を  $3 \mu\text{g}$  添加し、細胞内に取り込まれていることを確認した(図1)。

図1 pH-rod (red) でPFFをラベリング  
PFFが細胞内に取り込まれている

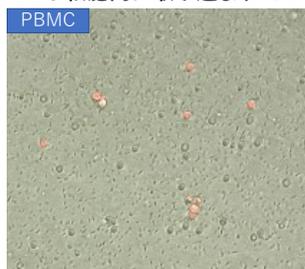


図2 末梢血に投与したPFFは、  
一部PBMCに取り込まれる

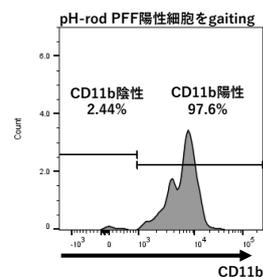


また pH-rod でラベリングした PFF 10  $\mu$ g をマウスの尾静脈に投与し、24 時間後に PBMC を採取し評価したところ、PFF を含有した細胞が確認できた (図 2)。

以上より PFF は ex vivo 及び in vivo の環境内で PBMC が PFF を細胞内に取り込むことがわかった。

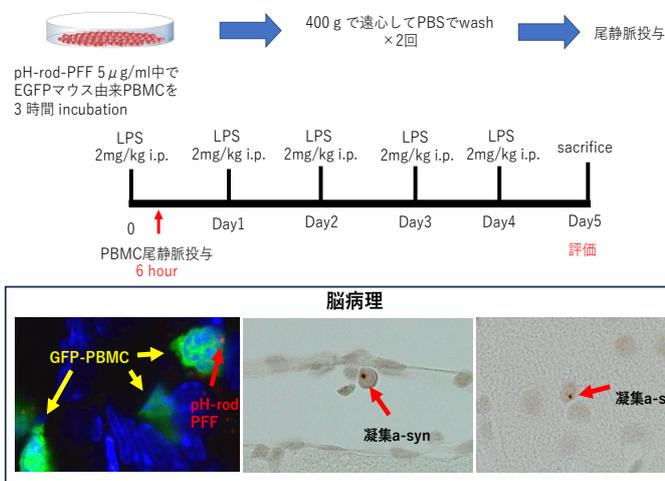
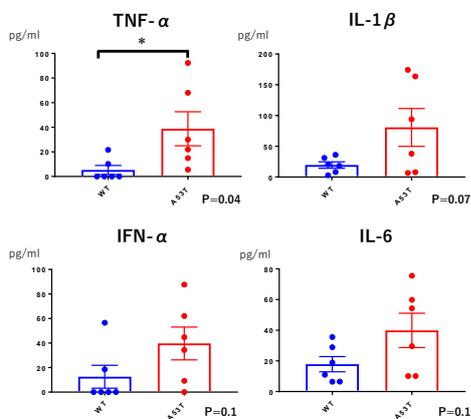
次に PBMC の内、どの免疫細胞が主に PFF を含有するのか Flow cytometry にて確認したところ、T 細胞や B 細胞には PFF の取り込みは認められず、CD11b 陽性細胞 (単球・マクロファージ系) がその主体であった (図 3)。

図3 PFF含有細胞はCD11b陽性細胞



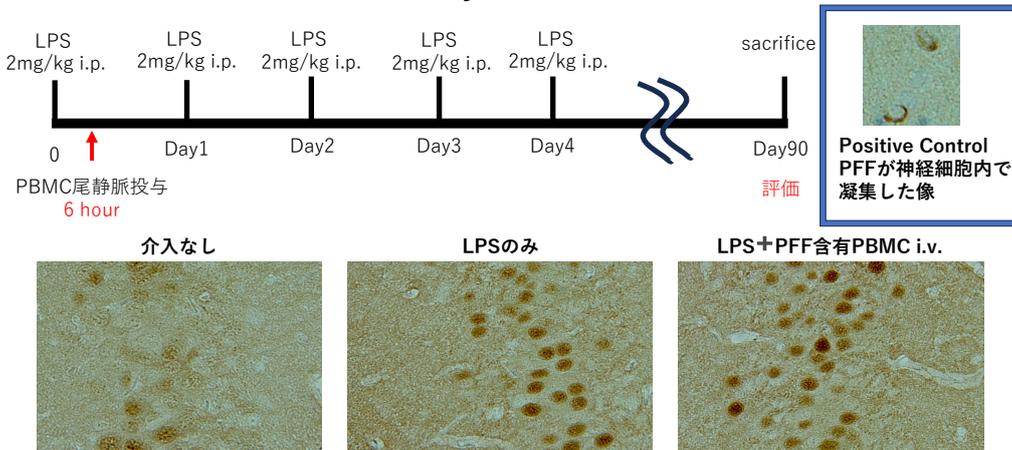
(2) PFF を内在した PBMC を野生型及び前駆期 PD モデルマウスの尾静脈に投与したが、脳内に PFF を含有した PBMC を認めることができなかった。前駆期 PD モデルマウスの末梢血において、炎症性サイトカインが上昇傾向ではあったが (図 4)、自然な状態では免疫細胞が脳内に容易に侵入することは難しいと判断した。そこで野生型マウスに LPS を予め腹腔内投与し、血液脳関門に障害を誘発した環境下で、再度 PFF を含有した PBMC (EGFP マウス由来) の尾静脈投与を行なった。投与 5 日後に脳病理を確認したところ、GFP 陽性細胞内に pH-rod でラベリングした PFF の存在が確認でき、また凝集  $\alpha$ -syn 特異的に反応する抗体による DAB 染色においても凝集  $\alpha$ -syn の存在が確認できた (図 5)。

図4 前駆期PDモデルマウスの末梢血のサイトカイン 図5 全身炎症下において、尾静脈投与したPFF含有PBMCが脳内に存在



(3) 脳内に存在する PFF 含有 PBMC が長期的に  $\alpha$ -syn 病理を惹起もしくは悪化させるか評価をするため、(2) の LPS 投与方法にて 3 ヶ月後の脳病理の状態を確認した。野生型マウス及び前駆期 PD モデルマウスいずれにおいても PFF を直接脳内に injection し、惹起される凝集  $\alpha$ -syn 像は認められなかった (図 6)。

図6 前駆期PDモデルマウスにおいて、PFF含有PBMCを起点に脳内 $\alpha$ -syn病理の悪化は認められなかった



\*LPSによりリン酸化 $\alpha$ -synの染色性は上昇するが、PFF含有PBMC i.v.による更なる病理の悪化は観察されず

今回の結果からは、脳内に侵入した PFF 含有 PBMC を起点に  $\alpha$ -syn 病理が進展していく可能性は低いと考える。逆に末梢 CD11b 陽性細胞は PFF を分解する能力が高く、凝集  $\alpha$ -syn の進展抑制につながる新たな治療開発へと発展する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Ueda Jun, Uemura Norihito, Ishimoto Tomoyuki, Taguchi Tomoyuki, Sawamura Masanori, Nakanishi Etsuro, Ikuno Masashi, Matsuzawa Shuichi, Yamakado Hodaka, Takahashi Ryosuke	4. 巻 38
2. 論文標題 Ca <sup>2+</sup> - Calmodulin- Calcineurin Signaling Modulates Synuclein Transmission	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Movement Disorders	6. 最初と最後の頁 1056 ~ 1067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mds.29401	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田口智之
2. 発表標題 Anemia and Lymphocytopenia in a mouse model of prodromal Parkinson's disease
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口智之
2. 発表標題 前駆期パーキンソン病モデルマウスにおけるリンパ球減少について
3. 学会等名 第17回パーキンソン病・運動障害疾患 कांग्रेस
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口智之
2. 発表標題 前駆期パーキンソン病モデルマウスにおける消化管運動障害及び末梢血リンパ球減少について
3. 学会等名 第53回日本神経精神薬理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口智之
2. 発表標題 前駆期パーキンソン病モデルマウスにおける貧血及びリンパ球減少について
3. 学会等名 第76回日本自律神経学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口智之
2. 発表標題 前駆期パーキンソン病モデルにおける免疫学的アプローチ
3. 学会等名 第41回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔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