

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591252

研究課題名(和文) アルファ・シヌクレインオリゴマーの物性・細胞毒性機序の解明と分子標的治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of characters and neurotoxic mechanisms of alpha-synuclein oligomers and its application to molecular targeted therapy

研究代表者

徳田 隆彦 (Tokuda, Takahiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80242692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)： α -シヌクレイン(α -syn)オリゴマー/線維作製方法として、高濃度(3 mg/mL)の合成 α -syn 溶液を攪拌しつつ37℃で7日間incubateする方法を確立した。溶液中の合成 α -synおよび髄液中の α -synはゲルろ過クロマトグラフィーでは60-70kDaに溶出されたが、8M尿素存在下でも解離せず、溶液中で単量体として存在することが明らかになった。培養細胞系では、 α -synオリゴマー/線維の添加により細胞内に凝集体が形成され、この凝集体の分解はオートファジーに依存していた。

研究成果の概要(英文)：We established the preparing method of alpha-synuclein (A-syn) oligomers and proto fibrils by incubating high-concentration solution, 3 mg/mL, of recombinant A-syn with stirring for 7 days at 37 C. Although recombinant A-syn molecules and natural A-syn molecules derived from human CSF were eluted from gel-filtration chromatography at around fractions of 60-70 kDa, those molecules were not dissociated with 8M urea, and accordingly have been demonstrated to exist as monomers in aqueous solution. In cultured cells, intracellular aggregates were formed by adding mixture of recombinant A-syn oligomers and proto fibrils into the culture medium, and their degradation was dependent on the autophagy pathway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード： α -シヌクレイン オリゴマー 神経細胞毒性 パーキンソン病 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)を代表とする神経変性疾患は加齢によってその頻度が増加するため、急速な高齢化社会を迎えている我が国ではその病態の解明及び治療法の開発が急務となっている。最近のPD研究では、 α -シヌクレイン(α -syn)が異常な凝集により最終的にアミロイド様となった線維性 α -synよりも、その凝集過程の中間体である可溶性 α -synオリゴマーこそが神経細胞毒性の主因であると考えられるようになってきている(Science 300: 486-489, 2003)。またPDにおいては、 α -synの異常な細胞内蓄積が脳内の神経線維連絡を介して広がるプリオン病様の伝播現象(prion-like expansion)が注目されており、その発現機序として、可溶性 α -synオリゴマーが神経細胞から分泌され別の神経細胞によって取り込まれるという分子病態が考えられている。以上からは、 α -synオリゴマーは、PDの発症(神経細胞毒性)及び進展(α -syn病理の脳内進展)の両方の病的基盤となる重要な分子と考えられている。

研究代表者の徳田は従来から、PD・アルツハイマー病(AD)などの脳内に異常凝集蛋白が蓄積する神経変性疾患の研究を行っている。PDにおいては、疾患特異的なレビー小体を構成する α -synの発現量及び凝集性という観点から、世界で最初にヒト髄液中の α -synを定量し、PD患者では髄液中 α -synが対照と比較して有意に減少していることを報告した(BBRC 349: 162-6, 2006)。さらに、前述した可溶性オリゴマーの病態発現における重要性に着目して、ヒト髄液中の α -syn及びA β のオリゴマーを特異的に定量できるELISA系を世界に先駆けて開発し、PD及びAD患者の髄液中ではこれらの可溶性オリゴマーが増加していることを報告した(α -syn: Neurology 2010 in press; A β : FASEB J 24: 2716-26, 2010)。また、科学研究費補助金(基盤研究(C): 20591007)の交付を受けた研究により、セリンプロテアーゼであるニューロシンが細胞外で α -syn分解活性を有することを明らかにした(Neurosci Res 67: 341-6, 2010)。

上記の国際的な研究状況及び自らの生体内・培養細胞系での α -synの動態及び代謝の検討から、可溶性 α -synオリゴマーがPDの発症に果たす役割を解明し、その病態発現を阻害する治療法を開発する上で、現状では、PDの発症に重要な、ヒト細胞外液中に存在して神経細胞毒性を有する α -synオリゴマーの物理化学的性質(物性)・その分解過程・ α -synオリゴマーの神経細胞毒性発現機序の解明が未解決の課題であると考えている。

2. 研究の目的

PDの発症及び進展の重要な責任分子と考

えられる細胞外の可溶性 α -synオリゴマーについて、以下の未解決の課題を解明することを目的とした。

(1) 神経細胞毒性を有する α -synオリゴマーの作製と物理化学的性質(物性)の解明

どのような物理化学的性質(物性)の α -synオリゴマーが神経細胞毒性を有するのかは未だ明らかになっていない。本研究では、第1段階としてまず、リコンビナント(Rec) α -synを用いて、in vitroで α -synオリゴマーを作製した。その上で、その分子量・形状などを検討して、 α -synオリゴマーの物性を明らかにした。この過程で、近年 α -syn研究で大きな問題となっている溶液中の α -synが、単量体で存在するのか、それとも4量体で存在するのかという問題をRec- α -synを用いて検討した。

(2) ヒト体液中の α -synの存在様式の検討

ヒト髄液・血漿中の α -synについても、それが単量体で存在するのか、それとも4量体で存在するのか、について検討した。また、 α -synオリゴマーを、髄液・血液から検出し、結合するリポ蛋白の有無などを明らかにした。

(3) α -synオリゴマーの神経細胞内蓄積・分解機序および神経細胞毒性の検討

(1)で作製した α -synオリゴマーの細胞毒性発現機序について検討した。 α -synオリゴマーは、神経細胞内に取り込まれて蓄積することにより細胞毒性を発現すると考えられるので、まずは α -synの神経細胞内での蓄積機序および分解に関する細胞生物学的機序を検討した。また、培養神経細胞に対する毒性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 合成 Rec- α -syn による神経細胞毒性 α -syn オリゴマーの作成・分析

神経細胞毒性の強い α -synオリゴマーを同定して、その分子量、高次形態を明らかにするための最初の段階として、Rec- α -synから種々の分子量の α -synオリゴマーを作製することを試みた。これには基盤研究((C): 20591007; H20-22年度)で確立した α -syn遺伝子(SNCA)導入大腸菌で作成したリコンビナント Rec- α -synを用いることができた。作製した種々の分子量の Rec- α -synオリゴマー混合液を分子篩クロマトグラフィーで分取し、それぞれの画分を原子間力顕微鏡で検討した。また溶液中での Rec- α -synの存在様式については、限外ろ過・分子篩クロマトグラフィー・western blotting・8M尿素による解離実験などによって検討した。

(2) ヒト体液中の α -synの存在様式の検討

ヒトの髄液・血漿をゲルろ過クロマトグラフィーによって分画して、 α -syn オリゴマーが存在する画分を解析した。このようにして分離・精製したヒト髄液・血漿中の α -syn オリゴマーを lipoabsorption することにより、体液中での脂質との結合性を検討した。また、ヒト髄液を(1)と同様の限外ろ過・western blotting・8M 尿素による解離実験などによって検討して、ヒト髄液中の α -syn の存在様式を検討した。

(3) α -syn オリゴマーの神経細胞内蓄積・分解機序および神経細胞毒性の検討

(1)で作成した種々の分子量の Rec- α -syn オリゴマー混合液を分子篩クロマトグラフィーで分取し、それぞれの画分を培養細胞 (HEK293 細胞) の培養液に添加して、 α -syn オリゴマーの細胞内蓄積を検討した。 α -syn の培養細胞への取り込みを効率化する目的には、リポフェクタミン試薬を用いた。オリゴマーの定量には申請者が確立した特異的 ELISA (Neurology 75:1766-1772, 2010)を用いた。細胞内での α -syn オリゴマー/凝集体の存在部位は免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡によって検討した。また、細胞内での α -syn オリゴマーの分解機構を検討するために、siRNA によりオートファジー関連蛋白である Atg5 のノックダウンを行った。

また、培養神経細胞に対する神経細胞毒性は、マウス海馬由来の初代培養神経細胞の培養液に、これらの α -syn オリゴマーおよび α -syn モノマーを添加して培養神経細胞に対する神経細胞毒性を検討した。

4. 研究成果

(1) 合成 Rec- α -syn による神経細胞毒性 α -syn オリゴマーの作成・分析

Rec- α -syn (野生型 α -syn)による安定的な α -syn オリゴマー作製方法の確立を第一の目標とした。研究開始前に予想されたとおり、Rec- α -syn 溶液を 37 °C で incubate するだけでは α -syn オリゴマーは殆ど生成されなかった。そのため、まずは α -syn オリゴマーを効率的に作製する条件の検討を行うことにした。最終的に、高濃度(3 mg/mL)の Rec- α -syn 溶液をスターラーで攪拌しつつ 37 °C で 7 日間 incubate することにより、 α -syn 線維が形成されることを原子間力顕微鏡で確認した。この開始溶液(Rec- α -syn 溶液)を様々な希釈倍率で検討したところ、10 倍希釈溶液を同様の方法で incubate することにより、球状から桿状の α -syn オリゴマーと考えられる分子を作製することができた(図 1)。また、家族性パーキンソン病の原因となる A30P 変異を有する Rec- α -syn(A30P- α -syn)を同様の方法で検討した。A30P- α -syn は、原子間力顕微鏡では、オ

リゴマーは形成するが線維は形成しにくい傾向があった。

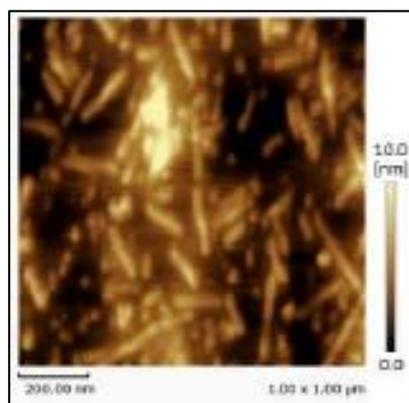


図 1. 作製した(Rec) α -syn オリゴマー

また、近年、溶液中の α -syn 分子が 4 量体であるのか単量体であるのかという論争が巻き起こっている。この問題(4 量体 vs 単量体問題)は、我々の研究の目的が溶液中の α -syn オリゴマーの神経細胞毒性の分子機構を解明することであるので、本研究にとっても非常に根本的な問題である。したがって、我々もまず、溶液中の α -syn の分子形態を明らかにする研究に取り組んだ。溶液中の Rec- α -syn はゲルろ過クロマトグラフィーでは 60-70kDa に相当する画分に溶出された。Rec- α -syn 溶液を、タンパク質変性剤である 8 M 尿素存在下で限外ろ過法で分析した。溶液中の α -syn は 8M 尿素を加えても 100kDa の限外ろ過膜は通過したが 30kDa の限外ろ過膜は通過しなかった。生理的条件下では 4 量体で存在するトランスサイレチン(TTR)は、8M 尿素存在下では単量体に解離して 30kDa 膜を通過した(図 2)。以上からは、 α -syn は溶液中では単量体として存在するが、分子のストークス半径が大きく、15kDa のタンパク質でありながら、ゲルろ過クロマトグラフィーや限外ろ過のような分子の大きさに依存する分画法では 60-70kDa のタンパク質のように振る舞う特異な分子であることが明らかにされた。

(2) ヒト体液中の α -syn の存在様式の検討

ヒトの髄液・血漿をゲルろ過クロマトグラフィーによって分画して、 α -syn オリゴマーが存在する画分を解析した。ヒトの髄液・血漿中の α -syn は 60-70kDa に相当する画分と約 2000kDa の画分に存在した。2000kDa の画分に存在する高分子 α -syn オリゴマーは lipoabsorption による影響を受けず、リポ蛋白との結合している可能性は低いと考えた。

また、(1)と同様の 8M 尿素存在下での限外ろ過法で分析したところ、髄液から得られた α -syn でも、Rec- α -syn の場合と同様に α -syn

は 8M 尿素を加えても 100kDa の限外ろ過膜は通過したが 30kDa の限外濾過膜は通過しなかった。

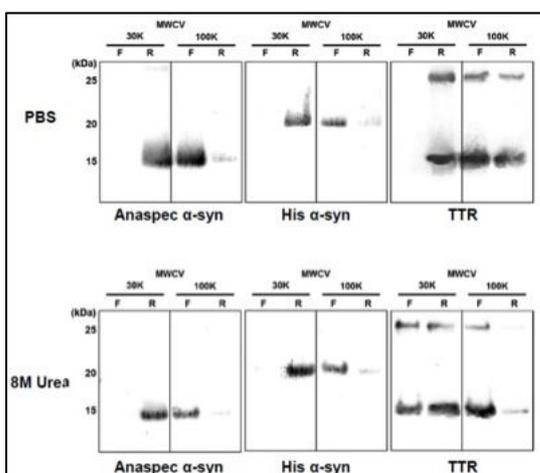


図 2. Rec- α -syn 及び TTR の 8M 尿素下での分子量の変化

(3) α -syn オリゴマーの神経細胞内蓄積・分解機序および神経細胞毒性の検討

外部からの α -syn 凝集体(すなわち細胞培養液に添加した Rec- α -syn 凝集体)によって細胞内に α -syn 凝集体を作製するモデル系の確立を行った。当初は2週間 incubate した Rec- α -syn (fibril/oligomer 混合物)を HEK293 細胞の培養液に添加していたが、凝集体の形成効率が悪くかつ不安定であったために、リポフェクタミン試薬とともに α -syn fibril/oligomer 混合物を培地に添加したところ、添加 4 時間後には細胞内に α -syn 免疫染色陽性の凝集体が形成された。この方法により、細胞内に効率よく α -syn 凝集体を形成することができたが、この凝集体は正常細胞では細胞内のタンパク分解系で効率よく分解され、添加 24 時間後では 80% 減少することがわかった。また、このように凝集体が効率よく処理された細胞では細胞死は見られなかった。そこで、この分解系について検討した。オートファジー関連蛋白である Atg5 をノックダウンすると α -syn 凝集体のオートファゴソーム内への取り込みおよび分解が阻害された。一方、ラパマイシン処理によりオートファジーを活性化すると凝集体の分解が促進された(図 3)。以上の結果から、 α -syn 凝集体の分解系はオートファジーに依存することが明らかになった。

また、上記(1)の方法で作成した野生型 α -syn オリゴマーおよび A30P α -syn オリゴマーの神経細胞毒性については、マウス海馬由来の初代培養神経細胞の培養液に、これらの α -syn オリゴマーおよび α -syn モノマーを添加して培養神経細胞に対する神経細胞毒性を検討した。その結果、 α -syn モノマーの添加では培養神経細胞に明らかな形態的变化は

認められなかったが、 α -syn オリゴマーでは培養神経細胞の胞体の扁平化および神経突起の短縮が観察された。これらの形態学的変化および MTT assay での細胞毒性は、野生型 α -syn オリゴマーと A30P α -syn オリゴマーとの間で有意な差は認めなかった。

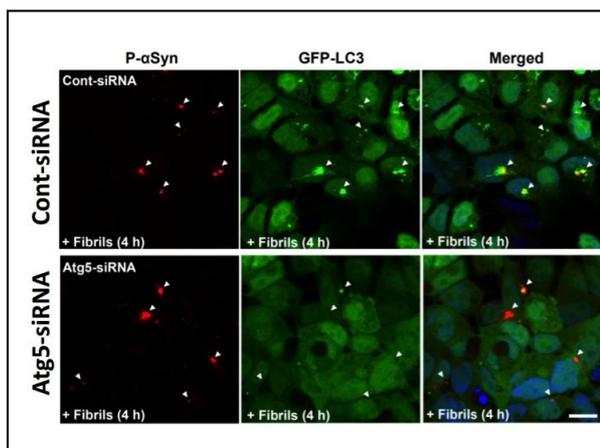


図 3. α -Syn 凝集体のオートファジーによる分解

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

El-Agnaf OMA, Tokuda T, Correspondence: Detection of elevated levels of α -synuclein oligomers in CSF from patients with parkinson disease. *Neurology*, 査読なし, Vol.77, 2011, pp. 510-511.

Ishigami N, Tokuda T, Ikegawa M, Komori M, Kasai T, Kondo T, Matsuyama Y, Nirasawa T, Thiele H, Tashiro K, Nakagawa M, Cerebrospinal fluid proteomic patterns discriminate Parkinson's disease and multiple system atrophy, *Movement Disorders*, 査読あり, Vol.27, 2012, pp. 851-857.

Kasai T, Tokuda T, Taylor M, Nakagawa M, Allsop D, Utilization of a multiple antigenic peptide as a calibration standard in the BAN50 single antibody sandwich ELISA for A β oligomers, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読あり, Vol.422, 2012, pp. 375-380.

Watanabe Y, Tatebe H, Taguchi K, Endo Y, Tokuda T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M, p62/SQSTM1-dependent autophagy of Lewy body-like α -synuclein inclusions, *PLoS One*, 査読あり, Vol.7, 2012, e52868.

Waragai M, Sekiyama K, Fujita M, Tokuda T, Hashimoto M, Biomarkers for the diagnosis and management of Parkinson's disease, *Expert Opin Med Diagn*, 査読あり, Vol.7,

2013, pp. 71-83.

Kasai T, Tokuda T, Taylor M, Kondo M, Mann DM, Nakagawa M, Allsop D, Correlation of A β oligomer levels in matched cerebrospinal fluid and serum samples, Neurosci Lett, 査読あり, Vol.551, 2013, pp. 17-22.

徳田隆彦, Corticobasal Syndrome: CBS のバイオマーカーと鑑別診断, BRAIN and NERVE, 査読なし, Vol.65, 2013, pp. 55-64.

〔学会発表〕(計 11 件)

徳田隆彦, 笠井高士, 石神紀子, 近藤正樹, 中川正法, ヒト髄液中の A β オリゴマーを定量する ELISA 系の開発と臨床応用, 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋国際会議場 (愛知県), 2011 年 5 月 20 日

徳田隆彦, パーキンソン病と ALS のバイオマーカー: 現状と展望: 1) パーキンソン病, 神経変性疾患に関する調査研究班平成 23 年度ワークショップ (招待講演) 都市センターホテル (東京都), 2011 年 7 月 15 日

徳田隆彦, 教育講演: パーキンソン病 biomarker 最新知見, 第 5 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ) (招待講演) 品川プリンスホテル (東京都), 2011 年 10 月 7 日

徳田隆彦, パーキンソン病のバイオマーカーの開発を目指して, 日本神経学会学術大会 (第 53 回) (招待講演) 東京, 2012 年 5 月 25 日

徳田隆彦, 石神紀子, 中川正法, 池川雅哉, 近藤誉之, 小森美華, パーキンソンニズム患者の髄液プロテオーム解析, 第 6 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (Movement Disorder Society of Japan), 京都, 2012 年 10 月 12 日

Tokuda T, Clinical application of ELISAs detecting pathogenic protein oligomers to the neurodegenerative disorders, 3rd International Conference on Neurodegenerative Disorders: Immunotherapy and Biomarkers (招待講演) Uppsala, Sweden, 2013 年 5 月 23 日

徳田隆彦, CSB のバイオマーカーと鑑別診断, 日本神経学会学術大会 (第 54 回) (招待講演) 東京, 2013 年 6 月 1 日

徳田隆彦, 髄液, 血清の α -synuclein などの定量でパーキンソン病の発症は予測できるか?, パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ: 第 7 回) (招待講演) 品川プリンスホテル (東京都), 2013 年 10 月 12 日

Tatebe H, Tokuda T, Ishi R, Watanabe Y, Kasai T, Taguchi K, Mizuta I, Tanaka M, Mizuno T, α -Synuclein is present as a

monomer in the biological fluids, The 20th World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, Geneva, Switzerland, 2013 年 12 月 11 日

Ishii R, Tokuda T, Tatebe H, Kasai T, Mizuno T, Nakagawa M, Interference from heterophilic antibodies in A-Syn ELISA, The 20th World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, Geneva, Switzerland, 2013 年 12 月 11 日

〔図書〕(計 件)

徳田隆彦, 中川正法, 日経メディカル開発社, ガイドライン外来診療 2012, 2012, 3(486-488)

笠井高士, 徳田隆彦, 中山書店, アクチュアル 脳・神経疾患の臨床, 2013, 7(312-318)

徳田隆彦, 中川正法, 中山書店, アクチュアル 脳・神経疾患の臨床, 2013, 8(428-435)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳田隆彦 (TOKUDA, Takahiko)

京都府立医科大学医学 (系) 研究科 (研究院)・准教授

研究者番号: 80242692

(2) 研究分担者

水野敏樹 (MIZUNO, Toshiki)

京都府立医科大学医学 (系) 研究科 (研究院)・教授

研究者番号: 30264782

中川正法 (NAKAGAWA, Masanori)

京都府立医科大学医学 (系) 研究科 (研究院)・教授

研究者番号: 50198040

渡邊義久 (WATANABE, Yoshihisa)

京都府立医科大学医学 (系) 研究科 (研究院)・講師

研究者番号: 50363990