

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870068

研究課題名(和文)パーキンソン病診断を目指した血液、髄液リン酸化 シヌクレイン新規検出法の開発

研究課題名(英文)Phosphorylated alpha synuclein as a biomarker for Parkinson disease

研究代表者

佐藤 裕康 (Sato, Hiroyasu)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：90436204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)のバイオマーカーに シヌクレイン(p S)が検討されている。本研究ではウェスタンブロットで、p Sと非リン酸化 S(non-p S)の量比を検討した。血漿、脳脊髄液ではp Sは微量で検出が困難であった。その為、p S、non p S、総 SをPD患者および疾患コントロールの赤血球を用いて解析した。赤血球中総 Sは両群で有意差はなかった。p S、p S/non-p S比、p S/総 S比はPD患者で有意に低値で、その差はp S/non-p S比で最も顕著であった。赤血球中p Sの減少はPDで減少している可能性が示唆された。検体数を増やし再現性が得られるか確認する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Alpha-Synuclein (aS) is studied as a candidate for a biomarker of Parkinson disease (PD). We analyzed the ratio of phosphorylated aS (paS) to non-phosphorylated aS (non-paS) in western blot analyses to improve the performance as a marker of PD. It was difficult to detect paS in serum or CSF in western blot (WB). We analyzed paS, non-paS, and total aS in red blood cells (RBC) in WB in 15 patients with PD and 13 control patients with various neurologic disorders. There was no significant difference in total aS level in PD and disease control. The levels of paS, the ratio of paS to non-paS and the ratio of paS to total aS were reduced in PD. The difference of the ratio of paS to non-paS between PD and disease control was larger than those of paS or the ratio of paS to total aS. It is implicated that p S is reduced in RBC in PD. It is needed that the reproducibility of this study should be checked.

研究分野：神経内科

キーワード：パーキンソン病 シヌクレイン リン酸化 バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (以下、PD と略す) は病理学的に、1) 中脳黒質ドパミン神経細胞の変性・脱落、2) レビー小体 (LB) (タンパク質異常凝集構造物) の出現、を特徴とする。さらに、1) LB の主要構成成分は  $\alpha$  シヌクレイン ( $\alpha$ S) である、2) 家族性 PD の原因に  $\alpha$ S 遺伝子の変異、重複がある、3) LB に存在する凝集した  $\alpha$ S の約 90% は Ser129 でリン酸化されている<sup>(1)</sup>、ことが明らかにされた。 $\alpha$ S の凝集過程、Ser129 リン酸化  $\alpha$ S (p- $\alpha$ S) が PD の病態に深く関与していると考えられている。PD では、運動症状が出現し臨床診断が可能となる時点で、既に LB は広範囲に出現し、黒質ドパミン神経細胞は 50% 以上が脱落している。神経保護薬が開発された際に神経変性を抑制する為には、変性過程が進行していない早期に診断することが重要である。しかし、PD 発症早期の臨床診断や多系統萎縮症等との鑑別は難しく、診断を助ける生物学的マーカーの開発が求められる。PD の生物学的マーカーは  $\alpha$ S を中心に検討されてきた。PD では、1) 髄液  $\alpha$ S 低下、2) 髄液・血漿 p- $\alpha$ S 上昇、3) 髄液 p- $\alpha$ S/総  $\alpha$ S 量比の上昇、4)  $\alpha$ S oligomer 上昇が報告されている<sup>(2)</sup>。問題点として、① p- $\alpha$ S 値は PD 患者とコントロールで重なり合う部分が多く、感度が低い<sup>(3)</sup>、② 髄液 p- $\alpha$ S、髄液 p- $\alpha$ S/総  $\alpha$ S 量比の検討で質量分析器を用いた報告があるが<sup>(4)</sup>、操作に専門性が要求され、多検体処理が困難である、等の点が挙げられる。より望ましい生物学的マーカーの特徴として、① 簡便性、② PD 患者を正常者と感度よく識別可能なこと、③ 他のパーキンソン症候群 (多系統萎縮症など) との鑑別が可能なこと、が挙げられる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、当初 Phos-tag SDS-PAGE を用いて血液、髄液中のリン酸化  $\alpha$ S /非リン酸化  $\alpha$ S の量比を求め、PD の新規診断法を開発することを目標とした。具体的には、Phos-tag SDS-PAGE で総  $\alpha$ S をリン酸化  $\alpha$ S (p- $\alpha$ S) と非リン酸化  $\alpha$ S (non-p- $\alpha$ S) に分離し、p- $\alpha$ S /non-p- $\alpha$ S 量比を PD 患者とコントロールの血漿、髄液で検討する予定としていた。既報告では血液・髄液 p- $\alpha$ S、髄液 p- $\alpha$ S/総  $\alpha$ S 量比が PD で上昇することが指摘されている。しかしこれらの方法では正常者との重なりが大きい。この問題を解決する為、従来 ELISA で検出できなかった non-p- $\alpha$ S に対する p- $\alpha$ S の量比を検出する。この方法により p- $\alpha$ S の変化を検出し易くなる利点がある。PD を正常者や他のパーキンソン症候群から高感度に鑑別でき、簡便かつハイスループットな検査法の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) リコンビナント $\alpha$ S の精製

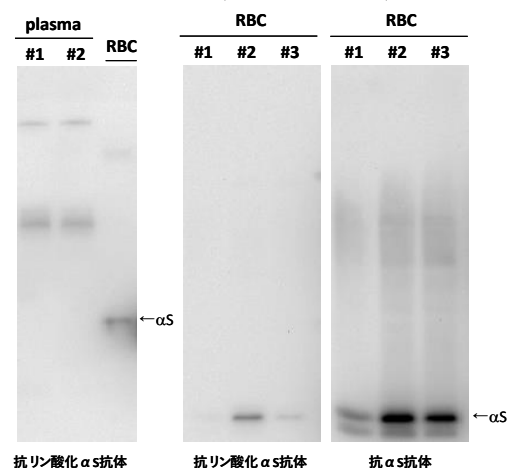
大腸菌で発現させた  $\alpha$ S タンパク質は、Q

sepharose を用いて精製した。

(2) リコンビナント  $\alpha$  の Ser129 リン酸化  
精製したリコンビナント  $\alpha$ S タンパク質に Casein kinase2 を添加し、37°C でインキュベーションした。

(3) 血漿、脳脊髄液、赤血球中  $\alpha$ S の検出  
通常のウェスタンブロットにおいて、患者検体を用いて p- $\alpha$ S の検出を試みた。血漿、脳脊髄液中の p- $\alpha$ S の検出は、検体の濃縮、PDVF 膜を 4% パラフォルムアルデヒド (PFA)、グルタルアルデヒドにより固定するといった検出感度を向上させる方法を用いたが、検出が困難であった<sup>(5)</sup>。赤血球中  $\alpha$ S のサンプル調整は既報を参考とした<sup>(6)</sup>。赤血球中  $\alpha$ S は p- $\alpha$ S、non-p- $\alpha$ S、総  $\alpha$ S とともに検出可能であった。その為患者検体は、赤血球中  $\alpha$ S を用いることとした。

#### ヒト血液 (血漿、赤血球)



(4) Ser129 リン酸化  $\alpha$ S と非リン酸化  $\alpha$ S を分離して検出する方法の検討

・Phos-tag SDS-PAGE による検討：当初の研究計画では Phos-tag SDS-PAGE を用いて p- $\alpha$ S と non-p- $\alpha$ S に分離することを目標としていた。しかし、Phos-tag 濃度、Acrylamide 濃度等の条件を複数検討したが、 $\alpha$ S をリン酸化体と非リン酸化体に分離することは出来なかった。

・その他の方法の検討：尿素 PAGE、等電点電気泳動、Native PAGE の方法を検討した。その結果尿素 PAGE で、Casein kinase 2 によってリン酸化したリコンビナント  $\alpha$ S を p- $\alpha$ S と non-p- $\alpha$ S に分離することが出来た。しかし、赤血球中  $\alpha$ S を尿素 PAGE で分離すると、p- $\alpha$ S 以外にも多数のバンドが現れ、p- $\alpha$ S のみを分離することが不可能であった。

(5) 抗 p- $\alpha$ S 特異抗体、抗 non-p- $\alpha$ S 特異抗体、抗総  $\alpha$ S 抗体による p- $\alpha$ S、non-p- $\alpha$ S、総  $\alpha$ S の検出

上述の経緯から赤血球中  $\alpha$ S を p- $\alpha$ S と

non-p- $\alpha$ S のバンドに分離することが困難と判断した。市販されている抗  $\alpha$ S 抗体を用いて、p- $\alpha$ S、non-p- $\alpha$ S に対する特異性を免疫沈降法にて検討した。その結果、市販されている抗 Ser129 抗体が p- $\alpha$ S に特異的であることを確認した。また、non-p- $\alpha$ S を特異的に認識する抗体を見出した。p- $\alpha$ S および non-p- $\alpha$ S のいずれも認識可能な抗体は総  $\alpha$ S を認識する抗体として使用した。

#### (6) 患者赤血球中 p- $\alpha$ S、non-p- $\alpha$ S、総 $\alpha$ S の定量

PD 患者 15 名 (70.8 $\pm$ 10.6 歳 平均 $\pm$ SD)、コントロールとして非 PD 患者 13 名 (69.2 $\pm$ 11.3 歳) の赤血球中  $\alpha$ S を SDS-PAGE で電気泳動した。抗 Ser129 リン酸化  $\alpha$ S 特異抗体、非リン酸化特異抗体、総  $\alpha$ S を認識する抗体でウェスタンブロットを行った。ウェスタンブロットで得られたバンドの相対的なバンド強度は、Quantity One ソフトウェア (version4.5.2、Bio-Rad) を用いて定量的に解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 赤血球中総 $\alpha$ S

PD 群と non-PD 群で、総  $\alpha$ S 量に差は認めなかった (p=0.84)。

##### (2) 赤血球中 p- $\alpha$ S

PD 群は non-PD 群に比して p- $\alpha$ S 量は有意に減少していた (p=0.46)。

##### (3) 赤血球中 non-p- $\alpha$ S

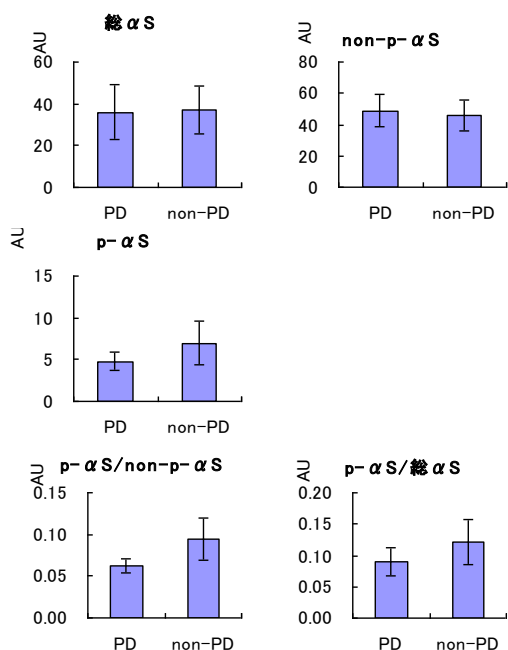
PD 群と non-PD 群で、non-p- $\alpha$ S 量に有意差は認めなかった (p=0.48)。

##### (4) 赤血球中 p- $\alpha$ S/non-p- $\alpha$ S 比

PD 群は non-PD 群に比して p- $\alpha$ S/non-p- $\alpha$ S 比は有意に減少していた (p=0.001)。

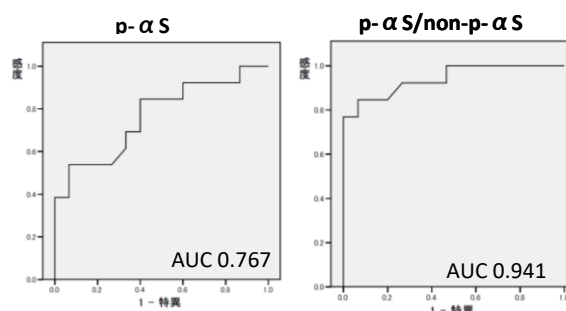
##### (5) 血球中 p- $\alpha$ S/総 p- $\alpha$ S 比

PD 群は non-PD 群に比して p- $\alpha$ S/non-p- $\alpha$ S 比は有意に減少していた (p=0.009)。



#### (6) ROC 曲線

赤血球中 p- $\alpha$ S/non-p- $\alpha$ S 比の ROC 曲線の AUC は 0.941、赤血球中 p- $\alpha$ S の ROC 曲線の AUC は 0.767 であった。



以上の結果から、赤血球中 p- $\alpha$ S は PD 患者で減少していることが示唆された。既報告で赤血球中の p- $\alpha$ S を検討したものではなく、新規の所見である。p- $\alpha$ S に比べて p- $\alpha$ S/non-p- $\alpha$ S 比は、PD 患者を non-PD 患者からよく識別できる可能性が示唆された。

当初予定していた Phos-tag を用いて  $\alpha$ S をリン酸化体と非リン酸化体に分離して、その比を測定することはできなかったが、通常のウェスタンブロットでリン酸化体特異的な抗体、非リン酸化体特異的な抗体を用いて、測定を行った。

本研究は少数例の検討であるため、データの再現性の確認が必要である。今後症例数を増やして検討したいと考えている。また、PD 患者において赤血球中 p- $\alpha$ S が減少しているメカニズムは不明であるためその機序を明らかにすることが PD の病態の理解につながる可能性があると考えられる。

#### <引用文献>

- (1) Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T. alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol.* 2002 Feb;4(2):160-4.
- (2) Parnetti L, Castrioto A, Chiasserini D, Persichetti E, Tambasco N, El-Agnaf O, Calabresi P. Cerebrospinal fluid biomarkers in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol.* 2013 Mar;9(3):131-40.
- (3) Foulds PG1, Mitchell JD, Parker A, Turner R, Green G, Diggle P, Hasegawa M, Taylor M, Mann D, Allsop D. Phosphorylated  $\alpha$ -synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J.* 2011 Dec;25(12):4127-37.
- (4) Wang Y1, Shi M, Chung KA, Zabetian CP, Leverenz JB, Berg D, Sruilijes K, Trojanowski JQ, Lee VM, Siderowf AD,

Hurtig H, Litvan I, Schiess MC, Peskind ER, Masuda M, Hasegawa M, Lin X, Pan C, Galasko D, Goldstein DS, Jensen PH, Yang H, Cain KC, Zhang J. Phosphorylated  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *Sci Transl Med.* 2012 Feb 15;4(121):121ra20.

- (5) Sasaki A, Arawaka S, Sato H, Kato T. Sensitive western blotting for detection of endogenous Ser129-phosphorylated  $\alpha$ -synuclein in intracellular and extracellular spaces. *Sci Rep.* 2015 Sep 18;5:14211.
- (6) Barbour R, Kling K, Anderson JP, Banducci K, Cole T, Diep L, Fox M, Goldstein JM, Soriano F, Seubert P, Chilcote TJ. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener Dis.* 2008;5(2):55-9.

#### 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3件)

1. Sasaki A, Arawaka S, Sato H, Kato T. Sensitive western blotting for detection of endogenous Ser129-phosphorylated  $\alpha$ -synuclein in intracellular and extracellular spaces. *Sci Rep*, 査読有, 2015
2. Sato H, Kato T, Arawaka S. Potential of Cellular and Animal Models Based on a Prion-Like Propagation of  $\alpha$ -Synuclein for Assessing Antiparkinson Agents. *Molecular Neurobiology*, 査読有, 2014.
3. Arawaka S, Fukushima S, Sato H, Sasaki A, Koga K, Koyama S, Kato T. Zonisamide attenuates  $\alpha$ -synuclein neurotoxicity by an aggregation-independent mechanism in a rat model of familial Parkinson's disease. *PLoS One*, 査読有, 2014

[学会発表] (計3件)

1. Suzuki Y, Sato H, Sasaki A, Arawaka S, Kato T. Regulation and stress-induced reaction of Ser129 phosphorylated alpha-synuclein. 第57回日本神経学会学術大会, 2016年5月21日, 神戸コンベンションセンター, 神戸市.
2. 佐藤裕康, 佐々木飛翔, 荒若繁樹, 加藤丈夫. AAV- $\alpha$ -synuclein 発現ラットパーキンソン病モデルでの  $\alpha$ -synuclein 凝集体伝播の検討. 第55回日本神経学会学術大会, 2014年5月22日, 福岡国際会議場, 福岡市.
3. 佐藤裕康, 荒若繁樹, 加藤丈夫. AAV- $\alpha$ -synuclein 発現ラットパーキンソン病モデルへの  $\alpha$ -synuclein 凝集体伝播

による病的変化の検討. 第55回日本神経病理学会総会, 2014年6月6日, 学術総合センター, 東京.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
佐藤 裕康 (SATO HIROYASU)  
山形大学医学部附属病院・助教  
研究者番号: 90436204

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号:

(4) 研究協力者 ( )