

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870494

研究課題名(和文) レヴィ小体 in vivo 再現モデルを用いた神経変性伝播経路の解析

研究課題名(英文) Identification of transmission pathway of pathological alpha-synuclein in non-transgenic mouse.

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)・助教

研究者番号：60462701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： α -シヌクレイン(aSyn)はレヴィ小体の主要構成分子であり、その高い発現は神経変性に深く関与すると考えられている。本研究ではパーキンソン病の進行に伴って障害を受けやすい脳部位に着目し、マウス脳内におけるaSynの発現解析を行った。迷走神経背側運動核や黒質緻密部に存在する神経ではその高い発現を観察することができた。また、興奮性シナプスの多くはaSyn陽性であるのに対し、抑制性シナプスにおける発現は脳部位によって大きく異なっていた。以上の結果から障害を受けやすい部位では、ヒト脳においてもaSynの高い発現が推察されるだけでなく、その発現が神経細胞の種類により厳密に制御されていることを示している。

研究成果の概要(英文)：alpha-Synuclein (aSyn), the major component of Lewy bodies, is normally expressed in presynapses and is involved in synaptic function. Accumulated evidence suggests that abundant intracellular expression of aSyn is one of the risk factors for pathological aggregation. Here we investigated the precise expression profile in the adult mouse brain with special reference to vulnerable regions along the progression of idiopathic Parkinson's disease (PD). Our results show that aSyn was highly expressed in the neuronal cell bodies of some early PD-affected brain regions. Synaptic expression of aSyn was mostly accompanied by expression of excitatory presynaptic marker. In contrast, expression of aSyn in the inhibitory synapses was different among brain regions. These results suggest that some neurons in early PD-affected human brain regions express high levels of perikaryal aSyn, as happens in the mouse brain. Additionally, synaptic profiles expressing aSyn are different in various regions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：alpha-Synuclein Parkinson's disease expression inhibitory neuron excitatory neuron

1. 研究開始当初の背景

《一般的背景について》

α -Synuclein 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、遺伝子の変異あるいは重複が家族性パーキンソン病の発症をもたらすことから、その発症に関わる重要な責任分子の一つであると考えられている (Stefanis, Cold Spring Harb Perspect Med, 2012; Nishioka et al., Ann Neurol, 2006)。

レビー小体はパーキンソン病の進行に伴って中脳黒質から大脳皮質に伝播・拡大する。近年、神経細胞に障害を引き起こす過程において、 α -Synuclein が高分子化した重合核“Seeds”となって細胞間を伝播し、近傍の細胞内へ取り込まれることが重要であるとの報告が相次いだ (Emmanouilidou et al., J. Neurosci, 2010; Desplats et al., PNAS, 2009)。これは“細胞間伝播仮説”と呼ばれ、脳内で病変が伝播する分子メカニズムとして注目されている。これまでに人工的に重合させ、高分子化させた線維様 α -Synuclein を含む培養液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投与することにより、凝集体の形成が脳内各所及び大脳皮質にまで伝播するという結果が報告された (Suzukake et al., Brain, 2013; Luk et al., Science, 2012)。しかしながら、黒質で生じた一次病変が大脳皮質にまで伝播する過程、特に伝播に関わる神経回路については依然不明な点が多い。

《研究代表者の研究背景について》

研究代表者はこれまでに *in vivo* に近い系として、 α -Synuclein を豊富に発現する初代培養神経細胞を用いたレビー小体様凝集体形成機構の解析を行ってきた。その過程で海馬における抑制性神経では α -Synuclein の発現が非常に低いことを見出した (Taguchi et al., PLOS ONE, 2014)。一方、興奮性神経では非常に高い発現を検出することができた。更に神経病態の再現実験を行ったところ、抑制性神経では細胞内凝集体の形成をほとんど検出することができなかった。以上の結果は α -Synuclein の発現が神経細胞の性質により異なること、そしてレビー小体様凝集体の形成と α -Synuclein の内在性発現が密接に関係することを示しており、上記の病変伝播経路と密接な関係を有することが推察された。

2. 研究の目的

病変の伝播経路に関してはこれまでパーキンソン病の進行に伴ったレビー小体の病理学的観察による報告が主であり、 α -Synuclein の内在性発現量とこれを高発現する神経細胞の性質については未だ不明な点が多い状況にあった。そこで研究代表者のこれまでの研究結果を踏まえ、各脳部位にお

ける神経細胞の種類に着目しながら、脳内全域における α -Synuclein の発現解析を行い、レビー小体の伝播経路との関係を明らかにすることを本研究の目的とした。

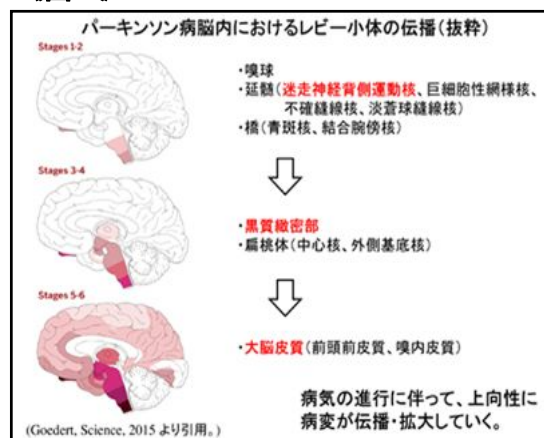
3. 研究の方法

これまでの病理学的解析によって明らかとなったレビー小体好発部位について (Braak and Del Tredici, 2009)、免疫組織化学的手法を用いて α -Synuclein の内在性発現 (特に細胞体及びシナプスにおける細胞内発現パターン) と共に、興奮性シナプスマーカー v GluT-1 あるいは抑制性神経マーカー GAD との共発現性を観察した。これにより各脳部位における α -Synuclein の細胞内分布及び興奮性シナプスにおける発現か、抑制性シナプスにおける発現かを区別してその発現パターンを分類した。

4. 研究成果

パーキンソン病の進行に伴って (初期ステージから順に) レビー小体好発する脳部位における α -Synuclein の発現プロファイルを以下に挙げた (図1を参照)。

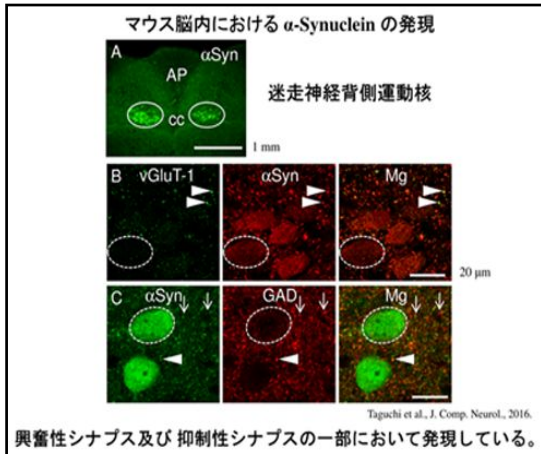
《図1》



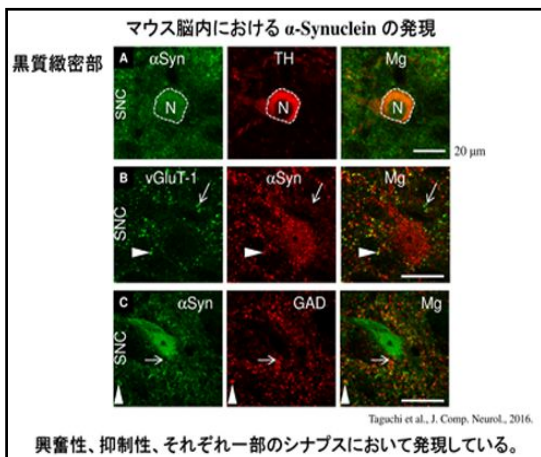
パーキンソン病初期ステージ (Stage1-2) に障害を受ける迷走神経背側運動核では、細胞体における α -Synuclein の非常に強い発現を検出することができた (図2)。一方、神経終末について、 α -Synuclein は興奮性シナプス及び抑制性シナプスの一部において発現していた。

次に中期 (Stage3-4) に障害を受ける中脳黒質緻密部における α -Synuclein の発現について観察を行った (図3)。 α -Synuclein はドーパミン作動性神経の細胞体において強く発現していた。神経終末においては迷走神経背側運動核と同様、興奮性及び抑制性シナプスの一部においてその発現を検出することができた。

【図2】

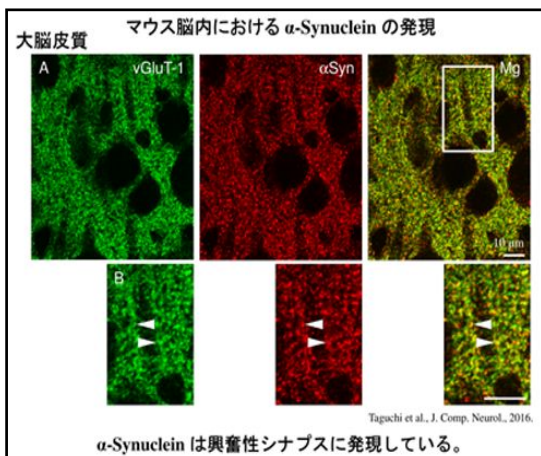


【図3】

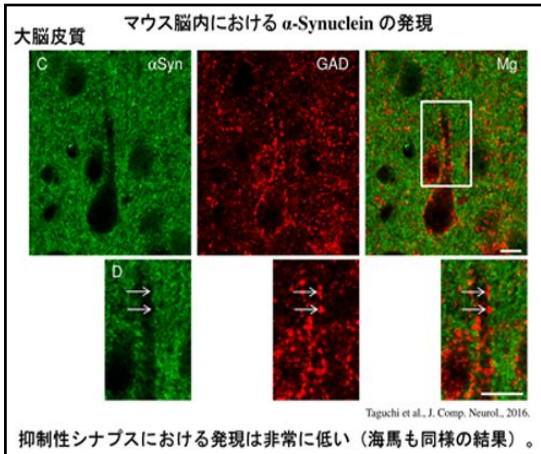


パーキンソン病後期 (Stage 5-6) に障害を受ける大脳皮質では、上述した脳部位とは異なる発現パターンを示した。まず大脳皮質に存在する神経細胞ではその細胞体における発現を検出することはできなかった (図4)。更に、 α -Synuclein は興奮性シナプスにおいては明瞭にその発現を検出することが出来る一方、抑制性シナプスにおいては全くその発現を検出することはできなかった (図4、図5)。これらの発現パターンは海馬における α -Synuclein の発現と同様のものではなかった (Taguchi et al., PLOS ONE, 2014)。

【図4】



【図5】



以下に脳内全域における α -Synuclein の発現プロファイルを示した (表1)。

【表1】

	Presynaptic IR ¹	Somatic IR ¹	vGluT-1/ α -synuclein ²	GAD/ α -synuclein ²
Offactory bulb*				
GL	++	++	+	+
EPL	+++	(-)	(-)	++
IML	++	(-)	++	(-)
Ant olfactory N	++	(-)	++	(-)
Medulla oblongata				
DMN*	++	++	+	+
GRN*	+	(-)	+	+
Raphe pallidus N*	+	(-)	+	+
Raphe obscurus N*	+	(-)	+	+
Inferior olive	+	(-)	+	+
Pons				
Locus coeruleus*	++	(-)	+	+
Parabrachial N*	+++	(-)	+	+
Midbrain				
SNC*	+	++	+	+
SNR	+++	(-)	+	++
Cerebrum				
Amygdala				
Central*	+++	(-)	+	+
Basolateral*	++	(-)	++	+
Cerebral cortex*	++	(-)	++	(-)
Piriform cortex*	++	(-)	++	+
Entorhinal cortex	++	(-)	++	+
Hippocampus (CA1)	+++	(-)	++	(-)
Striatum	++	(-)	++	(-)
Lateral GP	+++	(-)	+	++
Medial GP	+++	(-)	+	++
Thalamus	++	(-)	++	(-)
Subthalamic N	+	(-)	++	(-)
LMN / MMN	++	++	+	+
Cerebellum				
Molecular layer	+++	(-)	+	(-)
Granule cell layer	+	(-)	++	(-)

1) Intensity of α -synuclein immunoreactivity graded as absent (-), weak (+), moderate (**), and strong (***).
2) ++: Clearly colocalized or positive; +: partially colocalized; (-): not colocalized or negative

(Taguchi et al., J. Comp. Neurol., 2016)

表1中の*印はパーキンソン病 Stage 1-3 に障害を受けることが報告されている脳部位を示したものである。

【総括】

1) パーキンソン病の進行に伴って障害を受けやすい脳部位の内、複数の箇所て細胞体における α -Synuclein の高い発現を検出することができた。ヒト脳においても、このような高い発現を呈する神経細胞が存在することが推察される。

2) 興奮性シナプスの多くは α -Synuclein 陽性であるのに対して、抑制性シナプスでは脳部位により多様な発現プロファイルを示した。

3) パーキンソン病の初期に障害を受ける部位では興奮性のみならず、抑制性シナプスにおいても α -Synuclein 陽性を示す傾向があった。

以上の結果は、 α -Synuclein の内在性発現が脳部位あるいは神経細胞の種類によって異なる制御を受けていることを示している。 α -Synuclein の発現調節機構を知ることによってその生理機能と共に、パーキンソン病における病変の脳内伝播経路について更に詳細に解明することができることが期待される。

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2件)

《主論文》

Taguchi K., Watanabe Y., Tsujimura A., Tanaka M., 2016. Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. J. Comp. Neurol. 524: 1236-1258 (Epub 2015 Sep 29). 査読有

《本研究と関連する共著論文》

Tsujimura A., Taguchi K., Watanabe Y., Tatebe H., Tokuda T., Mizuno T., Tanaka M., 2015. Lysosomal enzyme cathepsin B enhances the aggregate forming activity of exogenous α -synuclein fibrils. Neurobiol. Dis. 73: 244-253. 査読有

[学会発表](計8件)

1) 第121回日本解剖学会総会全国学術集会(2016年3月28日-3月30日 ビッグパレットふくしま 福島県郡山市) ポスター発表 「パーキンソン病関連分子 α -シヌクレインを高発現する嗅球傍系球体細胞の解析」 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹

2) 第91回日本解剖学会学術集会・近畿支部会(2015年11月28日 京都工芸繊維大学 京都) 口頭発表 「パーキンソン病関連分子 α -Synuclein が示す多様な脳内発現プロファイルについて」 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹

3) 第38回日本神経科学大会(2015年7月28-31日 神戸国際会議場 神戸) ポスター発表 「Lysosomal enzyme cathepsin B

enhances the aggregate forming activity of exogenous α -synuclein fibrils」 辻村敦、渡邊義久、田口勝敏、田中雅樹

4) 第120回日本解剖学会総会全国学術集会(2015年3月21-23日 神戸国際会議場 神戸) ポスター発表 「Differential expression of alpha-synuclein with a cell-type dependent manner in vivo」 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹

5) 第4回4大学連携研究フォーラム(2014年12月2日 京都工芸繊維大学 京都) ポスター発表 「パーキンソン病に見られるレヴィ小体様凝集体の細胞内形成過程の解析」 辻村敦、田口勝敏、渡邊義久、田中雅樹

6) 第37回日本分子生物学会総会(2014年11月25-27日 パシフィコ横浜 横浜) ポスター発表 「 α シヌクレインの細胞内凝集はリソソームで形成される」 辻村敦、田口勝敏、渡邊義久、田中雅樹

7) 北米神経科学会 SfN2014(2014年11月15-19日 米国ワシントン DC) ポスター発表 「Differential expression of alpha-synuclein in vitro and in vivo」 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹

8) 第87回日本生化学会大会(2014年10月15-18日 国立京都国際会館 京都) ポスター発表 「レヴィ小体主要構成分子 α -Synuclein の脳内発現解析」 田口勝敏、渡邊義久、辻村敦、田中雅樹

[その他]

ホームページ

1) 京都府立医科大学
脳・血管系老化研究センター
基礎老化学部門
URL
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/cellbio/>

2) 京都府立医科大学
解剖学教室
生体構造科学部門
URL
<http://www.kpu-m.ac.jp/doc/classes/igaku/saitai/35.html>

6. 研究組織

(1) 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)・助教)

研究者番号: 60462701