

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 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：2019～2020

課題番号：19K23779

研究課題名（和文）非ヒト霊長類の嗅球へのシヌクレイン凝集体の接種によるパーキンソン病モデル

研究課題名（英文）alpha-synuclein propagation via olfactory pathway in non-human primate model

研究代表者

澤村 正典（Masanori, Sawamura）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：60852423

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病（PD）は運動障害を主徴とする神経変性疾患で、病理学的にはシヌクレイン（ α -Syn）凝集体であるレビー小体の特徴とする。これまでげっ歯類を使った研究では α -Synの凝集体がプリオンのように神経細胞から神経細胞へ伝播し増幅していくことが示されているが、霊長類では研究が進んでいない。我々はマーマセットの片側の嗅球に α -Syn凝集体を接種することで α -Syn凝集体が嗅覚系経路に伝播する新しいマーマセットのレビー小体病モデルを作成した。このモデルを使用することで霊長類における凝集体の伝播経路を解明し、さらに $[18F]FDG$ -PETにより広範な糖代謝低下が生じていることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病（PD）はアルツハイマー病に次いで多い神経変性疾患であり、1000人に1人で発症するといわれているが、高齢化社会の進行に伴いPD患者数が増加している。PDは運動症状を主体とする疾患であるが、それに加えて進行期では認知機能障害の合併を認めることから、今後もますます介護・経済面からも非常に大きな問題となる可能性が高い。しかしながら現状ではPDの病態は不明な点が多く残されており根本的な治療薬がない。本研究はPDの病態解明、治療法の開発に重要な新しいPDモデルとして役立つものである。

研究成果の概要（英文）：Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by motor symptoms, which is pathologically characterized by aggregates of alpha-synuclein (α -Syn), called Lewy bodies. Previous studies using rodents have shown that α -Syn aggregates propagate and amplify from neuron to neuron like prions, but there is limited evidence of α -Syn propagation in primates. We have created a new model of Lewy body disease in marmosets in which α -Syn propagate via the olfactory pathway by inoculation into the unilateral olfactory bulb of the marmoset. This model revealed the pathway of α -Syn propagation in primates, and $[18F]FDG$ -PET demonstrated that extensive hypoglycemia occurs in brains.

研究分野：パーキンソン病

キーワード：パーキンソン病 マーマセット シヌクレイン 伝播 霊長類

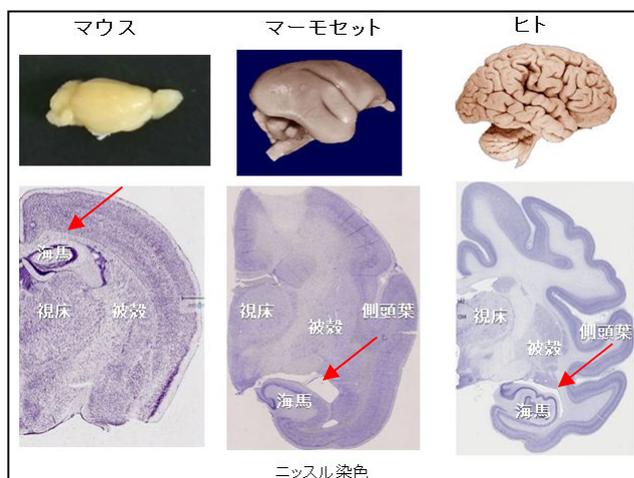
1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は運動障害を主徴とする神経変性疾患であり、病理学的には α -シヌクレイン (α -Syn) の凝集体であるレビー小体を特徴とする。約 1000 人に 1 人が罹患する頻度が高い難病で我が国の患者数は 15 万人以上である (難病情報センター)。高齢化社会の進行に伴い、さらに患者数が増加していることから早急な病態解明と根本的な治療法の開発が望まれている。細胞培養やマウスなどげっ歯類を使った実験では α -Syn の凝集体はプリオンタンパク質のように神経細胞から神経細胞へと次々と伝播し増幅していくことが示されているが、一方で霊長類では研究が進んでおらず、神経回路に沿った伝播が霊長類でも生じるのかは不明であった。

我々はマーモセットの片側の嗅球に α -Syn 凝集体を接種することで嗅覚系に α -Syn 凝集体が伝播するマーモセットモデルを作成することに成功し、このマーモセットモデルを使用することで霊長類における凝集体の伝播経路を解明する。またマーモセットの利点である脳のサイズが大きいことを生かし、[18F]FDG-PET などの脳機能画像検査を行う。凝集体の伝播による脳機能低下について明らかとし、PD 患者における認知障害の病態を解明する。さらにこのマーモセットを使用し、PD の前駆症状として知られているレム睡眠行動異常症 (RBD) についても解析を試みる。

2. 研究の目的

これまで多くの PD 研究では培養細胞やげっ歯類を使用した実験を行っているが、レビー小体病理は神経回路に沿った形で伝播するため、霊長類とげっ歯類の脳構造の差が無視できず、ヒト PD での正確な伝播経路を明らかにするには、げっ歯類の実験だけでは限界がある。例えば右図赤矢印で示すようにマウスの海馬の形状や位置はヒトと大きく異なっている。一方で霊長類であるマーモセットではヒトに類似した構造を持っている。また嗅覚系神経回路はげっ歯類と霊長類では大きく異なる可能性が高い。げっ歯類は夜行性であることから視覚に比べ嗅覚が優位である一方、霊長類では昼行性で嗅覚に比べて視覚が優位である。これを反映し、げっ歯類は霊長類と比較して脳に占める嗅球の体積が大きく、嗅覚系の構造も異なっていることから、げっ歯類で得られた知見を霊長類であるヒト PD の病態と単純に結びつけることは出来ない。



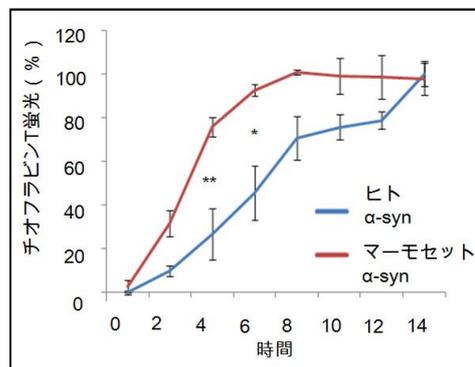
このように霊長類における嗅球への α -Syn 凝集体の接種実験が重要と考えられるが、これまで α -Syn 凝集体の嗅球接種はげっ歯類でのみ報告されている。一つの理由としては一般的に実験動物としてよく使用されるマカクサルやヒトなどの霊長類では嗅球が前頭葉の下方に存在していることから、実験手技として嗅球への α -Syn 凝集体を接種が困難である。一方でマーモセットでは嗅球は前頭葉の前方に存在するため、直達手術などによる α -Syn 凝集体を接種が可能である。我々はマーモセットの解剖学的特徴を生かし、 α -Syn 凝集体を嗅球へ接種することで、霊長類における α -Syn 凝集体の伝播経路を明らかとし、さらに PD における嗅覚系伝播経路の病態意義についての解明を試みる。

3. 研究の方法

我々は以前よりマウスを使用し α -Syn 凝集体接種による PD モデルを作成してきた。我々はマウスの消化管に α -Syn 凝集体接種し、迷走神経背側核にレビー小体様病理の伝播することを報告している。さらに嗅覚系伝播を再現するためマウスの嗅球への α -Syn 凝集体接種を行い、げっ歯類では嗅覚系の伝播が再現できることを確認した。一方でげっ歯類と比較して嗅覚系があまり発達していない霊長類で同様の現象が生じるのか、また脳の構造が大きく異なる霊長類でどのような伝播経路で病態が進行するかを明らかにする必要があることから、非ヒト霊長類における研究に着目した。

まず接種する α -Syn 凝集体の種について解析を行った。マーモセットの α -Syn モノマーにヒトとマーモセットの α -Syn 凝集体を 1% の濃度で混合し、持続的に振盪しながらチオフラビン T

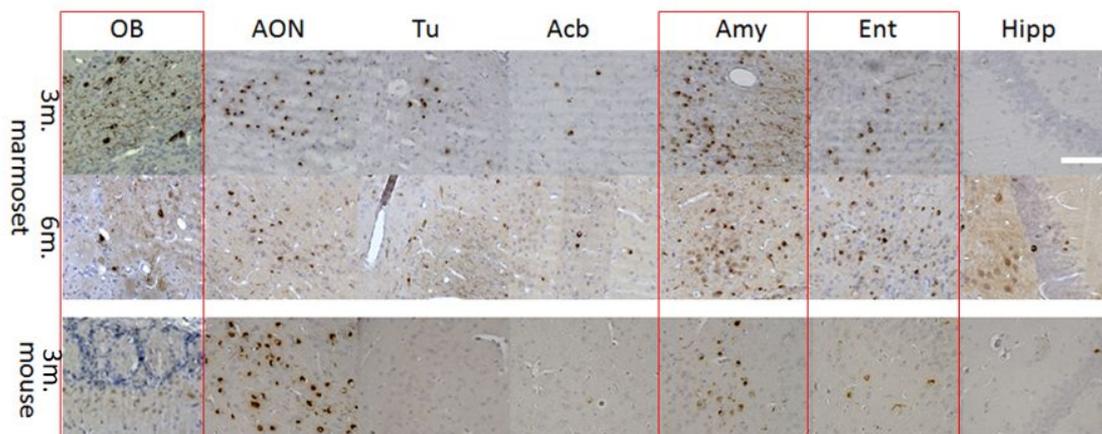
を使用することで凝集性を評価した。この検討ではヒトと比較し、マーモセット α -Syn 凝集体がより効率的に凝集化を促進することを確認した(右図)。この結果を元にマーモセット α -Syn 凝集体を作成し、ペレットの状態 -80°C で保存した。この α -Syn 凝集体を脳定位手術により嗅球へ接種を行った。接種後、3 か月で MRI を撮影し脳萎縮についての評価を行った。



さらに3 か月後・6 か月後において $[18\text{F}]\text{FDG}$ -PET を用いて脳機能について評価を行った。その後にマーモセットを sacrifice し病理評価を行った。病理学的には異常な α -Syn 凝集体であることを示す抗リン酸化 α -Syn 抗体によりマーモセットの脳サンプルを評価することで脳内の病理分布を検討し、PD 患者における脳病理の分布との比較を行った。

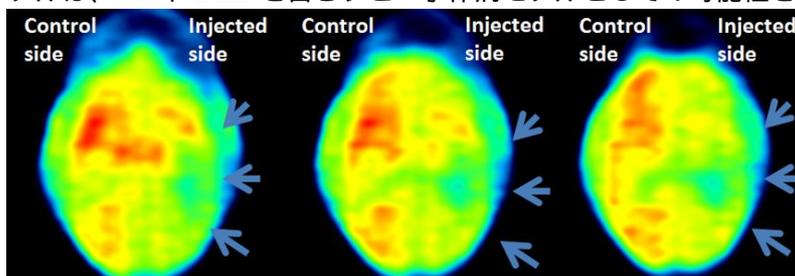
4. 研究成果

3 ヶ月後に sacrifice を行いリン酸化 α -Syn 抗により病理を評価したところ、嗅球 (OB) に多数の凝集体を認めた(下図)。さらに嗅球と結合のある脳部位である前嗅核、扁桃体 (Amy)、嗅内野 (Ent) などへの伝播を認めた。少数であるが海馬や脳幹の青斑核などにも伝播を認め、これらの凝集体が広く脳内へ伝播することを明らかとした。これらの所見は 6 か月後ではさらに増悪を認め、病理学的な進行を認めた。このことから霊長類においても α -Syn 病理の嗅覚系伝播が生じることを明らかとした。これらの所見はマウスにおける凝集体伝播と比較しても同程度以上生じていると考えられた。またこれらの伝播した部位は嗅球は嗅覚障害、扁桃体は不安や情動障害、嗅内野は記憶障害などとそれぞれ関連があることから、嗅覚系伝播と PD の前駆症状や非運動症状の関連が示唆された。



また我々はこのマーモセットモデルにおいて MRI も撮影を行い各脳部位においての左右の大きさを比較した。嗅球、前頭葉では α -Syn 凝集体の接種側では有意な萎縮を認めた。

最後に $[18\text{F}]\text{FDG}$ -PET を行い脳機能について評価を行った。 α -Syn 凝集体の接種側では下図のように広範な糖取り込みの低下を認めた。この結果により側頭葉、頭頂葉、後頭葉などの脳機能低下が示唆された。特に興味深いことに PD やレビー小体型認知症 (DLB) では後頭葉の血流低下や糖取り込み低下が疾患特異的な所見として知られていることから、このマーモセットモデルは、PD や DLB を含むレビー小体病モデルとしての可能性を示唆するものと考えられる。



以上のように我々は新しいマーモセットモデルの開発に成功し、このような霊長類モデルは他に報告がない独自のモデルであり、嗅覚系伝播というヒト病理を再現する有用なモデルと考えられる。このマーモセットを解析することで PD の病

態解明や前駆症状である RBD の解析が可能となる。この研究成果を元にさらに RBD の解析を行うため、現在は脳波や行動評価を継続し、さらなる病態解明を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 澤村正典, 尾上浩隆, 塚田秀夫, 伊佐かおる, 上村紀仁, 伊佐正, 高橋良輔 |
| 2. 発表標題 Alpha-synuclein propagation via olfactory pathway in non-human primate model |
| 3. 学会等名 第60回 日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 澤村正典, 尾上浩隆, 塚田秀夫, 伊佐かおる, 上村紀仁, 伊佐正, 高橋良輔 |
| 2. 発表標題 Alpha-synuclein propagation via olfactory pathway in non-human primate model |
| 3. 学会等名 第9回日本マーモセット研究会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 澤村正典, 尾上浩隆, 塚田秀夫, 伊佐かおる, 上村紀仁, 伊佐正, 高橋良輔 |
| 2. 発表標題 Alpha-synuclein propagation via olfactory pathway in non-human primate model |
| 3. 学会等名 第61回 日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
|---------|---------|