

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23782

研究課題名（和文）パーキンソン病の凝集体形成に着眼した病態解明と新規薬剤の開発

研究課題名（英文）Development of Pathogenesis and new drug that focuses on aggregate formation of Parkinson's disease

研究代表者

野田 幸子（NODA, Sachiko）

順天堂大学・医学部・特任助手

研究者番号：00846371

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：すでにヒトに対して効果のあることが知られている既知の化学合成シャペロンに着目し、それら薬剤をパーキンソン病モデルマウスに投与してin vivoにおける凝集体抑制効果を判定した。5週齢以上のマウスに合成シャペロンを投与しても減少は観察されず、凝集抑制効果に対するタイムコース測定の結果から、連続2週間において効果は飽和したことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は適正な高次構造の形成を補助する合成化学物質であるシャペロンタンパク質に着目し投与実験を行っており、マウスを使用した実験は新規性が高い。オートファジーの破綻によって形成された凝集体の神経細胞に対する毒性効果が立証されれば、凝集体形成抑制による神経保護治療研究に展開できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Focusing on known chemically synthesized chaperones that are already known to be effective against humans, these drugs were administered to Parkinson's disease model mice to determine their in vivo aggregate inhibitory effect. No decrease was observed even when synthetic chaperone was administered to mice aged 5 weeks or older, and the results of time course measurement of the anti-aggregation effect revealed that the effect was saturated in 2 consecutive weeks.

研究分野：神経学

キーワード：パーキンソン病 Atg7 シャペロンタンパク オートファジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は凝集体(レビー小体)とよばれる不溶性タンパク質が神経細胞内に集積し、病態に深く関与するとされている。凝集体の形成メカニズムとしてはいまだ不明な点が多いが、タンパク質に病的な変異が加わった際に繰り返し配列を持つ折り畳み構造が形成され、それらが重合することにより強固な不溶性の塊となることが知られている。パーキンソン病であれば synuclein タンパク質がこれにあたり、病的変異(A53T)が加わった synuclein 遺伝子がコードする変異 synuclein タンパク質は凝集体を形成し神経細胞死の原因とされた(Polymeropoulos MH, et.al. *Science* 1997; 276: 2045-7)。このような synuclein タンパク質の凝集体は前述の遺伝性パーキンソン病だけではなく、多くを占める孤発性(遺伝性ではない)パーキンソン病のドーパミン細胞内にも見られる。孤発性パーキンソン病では synuclein タンパク質に病的変異が加わっていないのになぜ凝集体が形成されるのだろうか? その解を得るにはタンパク質分解研究の発展が大きな影響を与えた。即ち、タンパク質は合成と分解を繰り返すが、タンパク質分解系の破綻により、もともと繰り返し構造を持つタンパク質が蓄積・凝集(例えば p62 タンパク質)することが明らかになった(Komatsu M, *Nature*. 2006;441:880-4)。そこでドーパミン細胞特異的にオートファジーを欠損したマウス(Atg7 F/F; TH-Cre)を作製し、封入体の形成過程を長期に観察した。その結果、ドーパミン細胞内で p62 が凝集の核(Seed)となり、そこに synuclein が沈着することによりレビー小体類似の凝集体となることを発見した(Sato S, Uchiyama Y, Fukuda T, Noda S, Kondo H, Saiki S, Komatsu M, Uchiyama Y, Tanaka K, Hattori N. Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes Lewy pathology and motor dysfunction in aged mice. *Sci Rep*. 2018;8:2813)。この観察からパーキンソン病の病態にオートファジーの破綻が深く関わることを立証でき、なぜ凝集体ができるのかという問いには一定の答えが出た。そこでパーキンソン病の病態を考える上で次なる課題、『凝集体の形成は神経細胞にとって毒なのか?』という問いが生じてくる。実際、開発したモデルでは凝集体形成が神経細胞の脆弱性を高めドーパミン神経細胞死を誘導したかのように見える。しかしこの結果は問いに対する必要条件であるが十分条件とは言えない。

### 2. 研究の目的

パーキンソン病の病理学的特徴である凝集体の形成が神経細胞にとって保護的に働くのか、毒性に作用するのか謎である。その解決のために病態を忠実に表現するモデル動物が必須と考え、ドーパミン細胞特異的にオートファジーを欠損するマウスを作製し、パーキンソン病類似の凝集体を形成するモデルマウスを樹立してきた。そこで本研究ではモデルマウスを応用し、凝集体の形成が神経細胞死につながる(毒性)との病態仮説に解を得る。本研究により、オートファジーの破綻によって形成された凝集体の神経細胞に対する毒性効果を立証し、凝集体形成抑制による神経保護治療研究を展開する。

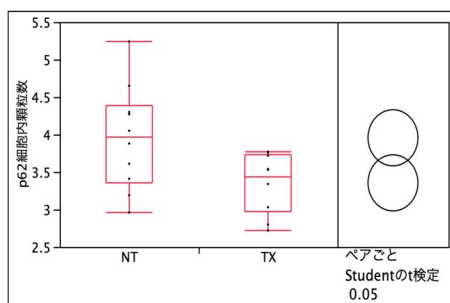
### 3. 研究の方法

すでにヒトに対して効果のあることが知られている既知の化学合成シャペロンに着目する。それら薬剤をパーキンソン病モデルマウスに経管を用いて直接胃に投与して *in vivo* における凝集体抑制効果を判定する。具体的には 1) synuclein 抗体を用いた免疫染色や電子顕微鏡観察により凝集体の形状を定量する。2) ドーパミン細胞を TH 抗体にて特異的に染色し、ドーパミン神経細胞死の有無を評価する。3) 行動試験(ビーム課題、ロタロッド試験)による薬剤効果を判定する。

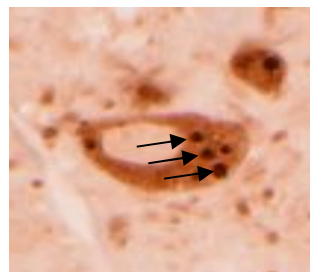
### 4. 研究成果

樹立したパーキンソン病モデルマウスを利用して凝集体形成抑制効果の判定を実施し、これまでの研究過程で確立したパーキンソン病モデルマウスの評価基準である、行動試験(ビーム課題等)、ドーパミン染色による細胞カウント、ドーパミン定量の組み合わせによる独自のパーキンソン病判定を行った。凝集体形成の初期段階である離乳直後の若齢マウスを用いて選択したタウロウルソデオキシコール酸(TUDCA)を1日1回、250ul/g(体重)で10日間連続経口投与を行った。無治療群にも同様に生理食塩水を10日間連続経口投与した。その結果、行動試験では変化はみられなかったが、ドーパミン染色による細胞カウントでは変化がみられた。細胞カウントは、単位面積当たりそれぞれ10ヶ所カウントし、単位面積内の p62 陽性顆粒の面積を測定した。生理食塩水投与の無治療群(n=191)の顆粒面積平均と有用薬剤 TUDCA 投与の治療群(n=303)の顆粒面積平均を比較し検定を行った。検定結果、治療マウスの黒質の p62 陽性細胞数は増加し、細胞あたりの p62 凝集体数は増加しており、p62 陽性凝集体面積は減少していた。つまり、有用薬剤 TUDCA による治療により p62 凝集体が細切れに増加し、細胞あたりの p62 凝集体の数が減り、しかも面積が小さくなっていることが分かった。初年度に凝集体形成の初期段階である離乳直後の若齢マウスを用いてタウロウルソデオキシコール酸(TUDCA)を1日1回、250ul/g(体重)で10日間連続経口投与し結果を得たことより、最終年度ではさらに効果を高

めるために経口投与期間を 3 か月に延長し、ドーパミン染色による細胞カウントを行った。さらに、マウスの腰椎髄腔内に直接投与する方法を検討した。マウスの腰椎髄腔内に TUDCA を 1 ショット(1日1回)最大で 5ul、1 投与を 4 日間連続で 4 ショット行い、中脳黒質における p62 凝集体の細胞カウントを行った。結果として、5 週齢以上のマウスに合成シャペロン TUDCA を投与しても減少は観察されず、また投与期間も連続 3 か月や連続 2 か月よりも連続 2 週間投与した方が減少傾向にあった。これらの凝集抑制効果に対するタイムコース測定の結果から、連続 2 週間において効果は飽和したことがわかった。



(左図 1)凝集体を形成するパーキンソン病モデルマウス (Atg7 F/F;TH-Cre) に合成シャペロン TUDCA を投与し細胞あたりの凝集体数を観察したところ、処理群では凝集体の減少が観された。NT: TUDCA なし TX: TUDCA あり (右図 2)凝集体(矢印)の染色例



本研究は適正な高次構造の形成を補助する合成化学物質であるシャペロンタンパク質に着目し投与実験を行っており、マウスを使用した実験は新規性が高い。オートファジーの破綻によって形成された凝集体の神経細胞に対する毒性効果が立証されれば、凝集体形成抑制による神経保護治療研究に展開できる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Noda Sachiko, Sato Shigeto, Fukuda Takahiro, Tada Norihiro, Uchiyama Yasuo, Tanaka Keiji, Hattori Nobutaka	4. 巻 136
2. 論文標題 Loss of Parkin contributes to mitochondrial turnover and dopaminergic neuronal loss in aged mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 104717 ~ 104717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2019.104717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akira Uehara, Hiroaki Kawamoto, Hisamasa Imai, Makoto Shirai, Masatomi Sone, Sachiko Noda, Shigeto Sato, Nobutaka Hattori, Yoshiyuki Sankai	4. 巻 57
2. 論文標題 Lateral Swing Support System for Parkinsonism patients with Freezing of Gait.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transactions of Japanese Society for Medical and Biological Engineering	6. 最初と最後の頁 206 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/S1146433.2020.9025882	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sachiko Noda, Shigeto Sato, Takahiro Fukuda, Norihiro Tada, Nobutaka Hattori	4. 巻 13
2. 論文標題 Aging-related motor function and dopaminergic neuronal loss in C57BL/6 mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00585-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Shigeto, Noda Sachiko, Hattori Nobutaka	4. 巻 159
2. 論文標題 Pathogenic insights to Parkin-linked model mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 47 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.03.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oji Yutaka, Hatano Taku, Ueno Shin-Ichi, Funayama Manabu, Ishikawa Kei-ichi, Okuzumi Ayami, Noda Sachiko, Sato Shigeto, Satake Wataru, Matsuda Junko, Hattori Nobutaka	4. 巻 143
2. 論文標題 Variants in saposin D domain of prosaposin gene linked to Parkinson's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1190 ~ 1205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awaa064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Sachiko Noda, Shigeto Sato, Takahiro Fukuda, Norihiro Tada, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Aging-related motor function and dopaminergic neuronal loss in C57BL/6 mice
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sachiko Noda, Shigeto Sato, Takahiro Fukuda, Norihiro Tada, Yasuo Uchiyama, Keiji Tanaka, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Loss of Parkin contributes to mitochondrial turnover dopaminergic neuronal loss in aged mice
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 パーキンソン病治療剤	発明者 佐藤栄人, 野田幸子, 服部信孝	権利者 順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-101232	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 パーキンソン病モデル非ヒト動物	発明者 佐藤栄人, 野田幸子, 多田昇弘, 服部信孝	権利者 順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-154898	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 パーキンソン病モデル非ヒト動物	発明者 服部信孝, 佐藤栄人, 船山学, 野田幸子	権利者 順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-107783	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------