

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K07883
研究課題名(和文) レビー小体病に対するREM睡眠制御治療法の確立

研究課題名(英文) Novel Therapy Targeting REM Sleep in Lewy Body Disease.

研究代表者

江川 斉宏 (Egawa, Naohiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20534340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：シヌクレイン(α -Syn)凝集体(mPFFs)をマウス脳内に接種し、病理進展と睡眠表現型の関連性を検証した。SNCA A53T変異マウスの線条体にmPFFsを投与すると、1ヶ月後に大脳皮質、海馬・脳幹部の橋脚被蓋核(PPT)のコリン作動性ニューロンにリン酸化 α -Synで染色されるmPFFsが伝播・蓄積し、REM睡眠の増加、REM睡眠行動異常(RBD)様表現型を示すことを明らかにした。(Okuda S., Egawa N et al. IJMS 2022)次に、嗅球にmPFFsを投与し、REM睡眠構造の異常とその神経回路異常を明らかにし、ウイルスベクターを用いてレム神経回路の制御を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、レビー小体病のモデルマウスを用いて、シヌクレイン蛋白の伝播と蓄積が同疾患のレム睡眠の異常とレム睡眠の筋活動の異常を増強することを初めて明らかにした。レム睡眠の異常はレビー小体病の発症・診断時期の約10年先行することから、重要なバイオマーカーと考えられる。本研究は、レム睡眠の異常を引き起こす神経回路を明らかにし、シヌクレインをターゲットにしたレビー小体病の早期治療介入プラットフォームを提供した。今後、同定されたレム睡眠神経回路異常の制御を目指し、病態進行の予防を図る。これらの成果は、ますます増加するレビー小体病に対する新たな治療法につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We inoculated α -synuclein (α -Syn) aggregates (mPFFs) into the mouse brain and examined the association between pathological progression and sleep phenotype. mPFFs injected into the striatum of SNCA A53T mutant mice propagated and accumulated in cholinergic neurons in the brainstem (PPT) one month later, resulting in increased REM sleep and a REM sleep behavior abnormalities (RBD)-like phenotype. (Okuda S., Egawa N et al. IJMS 2022) Next, we injected mPFFs into the olfactory bulb to reveal abnormal REM sleep structure and its neuronal circuitry, and used viral vectors to control the REM neuronal circuitry.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：レビー小体病 レム睡眠 認知症 シヌクレイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レビー小体病(Lewy body disease: LBD)は、認知症を引き起こすレビー小体型認知症(Dementia with Lewy bodies: DLB)と運動異常を引き起こすパーキンソン病 (Parkinson's disease: PD)をふくむ神経難病であり、その病理学的な特徴であるレビー小体の主成分は シヌクレイン(α -Syn)である。多量体 α -Syn は凝集して fibril (Lewy body)を形成し、時間とともに神経回路を介して中枢神経に伝播することが知られている。認知機能低下/運動症状等の発症期には、すでに中脳黒質ドパミン神経、脳幹部アセチルコリン神経を含む中枢神経細胞死がすでに高度に進行しており、 α -Syn の凝集と伝播を抑制する早期の α -Syn 修飾治療介入が望まれる。

レム睡眠時に筋活動の上昇(REM sleep without atonia: RWA)は LBD の発症・診断時期の約 10 年先行し、進行と共に増悪することから、レム睡眠の異常は LBD 病態進行の原因の一端を担っている可能性があり、発症前の重要なバイオマーカーと考えられる。 α -Syn 凝集によるレム睡眠の異常を早期に捉え、その異常なレム睡眠神経回路を制御することは、病態の進行を予防することにつながるかと期待される。

2. 研究の目的

α -Syn の凝集伝播動物モデルを用いて、レム睡眠構造変化と α -Syn 病理の関連性を解析する。さらに、 α -Syn 凝集による異常なレム睡眠神経回路を同定し、その制御とその介入効果について検証した。

3. 研究の方法

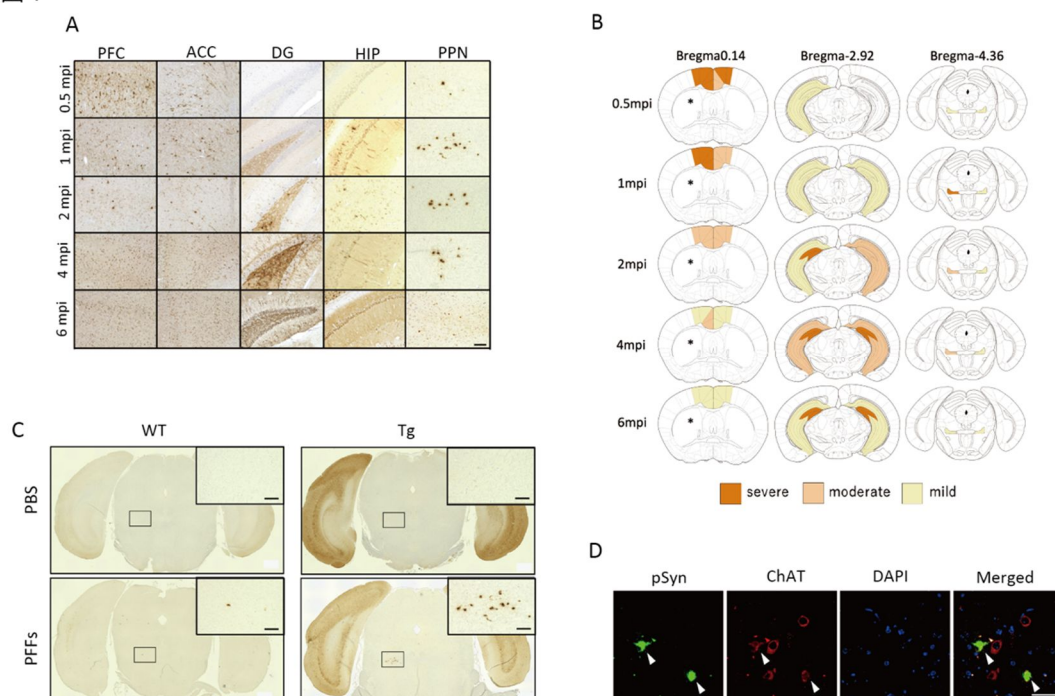
シヌクレイン(α -Syn)凝集体(α -Syn preformed fibrils:mPFFs)をマウス脳内に接種し、病理進展と睡眠表現型の関連性を検証した。以下の3つの段階の研究方法を計画した。

シヌクレイン遺伝子 SNCA A53T 変異トランスジェニックマウス(以下 TG マウス)の線条体にマウス由来の mPFFs を投与し、睡眠構造変化と病理変化の関連を検証する。LBD は、認知症を引き起こす前駆症状として、嗅覚低下をきたし、嗅球に α -Syn 凝集が観察されることが知られているため、より臨床経過に近いモデルを作成すべく、TG マウスの嗅球に mPFFs を投与し、睡眠構造変化と病理変化の関連を検証する。アデノ随伴ウイルスベクターを用いて同定されたレム睡眠回路の制御を行う。

4. 研究成果

TG マウスの線条体に mPFFs を投与すると、リン酸化 α -Syn 病理変化は、接種後 1 ヶ月後に大脳皮質、海馬・脳幹部に伝播した。脳幹部では、橋脚被蓋核(PPT)のコリン作動性ニューロンにリン酸化 α -Syn で染色される mPFFs が著明に伝播・蓄積した。(下図 1)

図 1

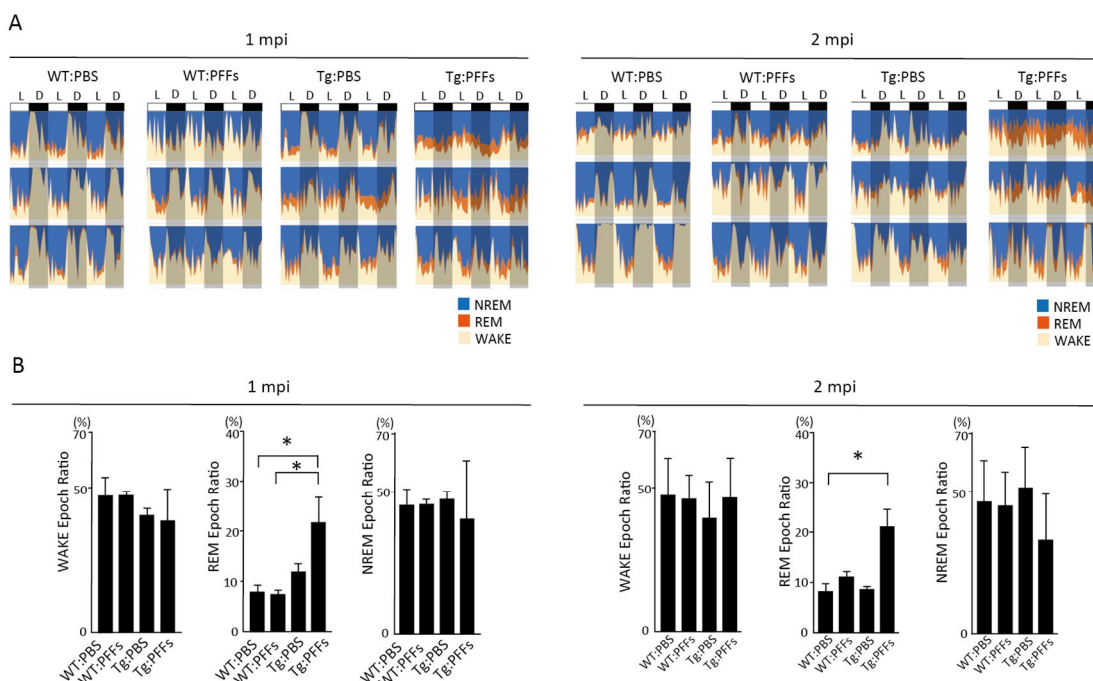


(図1) Tg:PFFs マウスにおける α -syn 凝集体の病理

- A. SNCA A53T トランスジェニック (Tg) マウス (Tg:PFFs マウス) の α -syn PFFs を接種した脳の各部位における P- α -syn 免疫染色。PFC: 前頭前皮質、ACC: 前帯状皮質、DG: 歯状回、HIP: 海馬、PPN: pe-dunculo pontine nucleus。スケールバー: 100 μ m。
- B. Tg:PFFs マウス群における α -syn 凝集体病態のヒートマップ。* は α -syn PFFs の注入部位を示す。
- C. 接種1ヶ月後 (1mpi) の野生型 (WT) または SNCA A53T トランスジェニック (Tg) マウスにおける PPN のリン酸化 α -シヌクレイン (P- α -syn) 免疫染色。選択された各フレームには右上の高倍率画像が含まれる。スケールバー: 100 μ m。
- D. Tg:PFFs マウスの PPN において、P- α -syn (左パネル、緑) を抗 ChAT 抗体 (左パネルから2番目、赤) と共染色した。矢印は共染色された細胞を示す。スケールバー 100 μ m。

また、REM 睡眠の増加(下図2)、夜間活動低下と REM 睡眠時の筋活動亢進を引き起こす REM 睡眠行動異常 (RBD) 様表現型が増強すること(下図3)を初めて明らかにし、機関紙に発表した。(下記文献1)

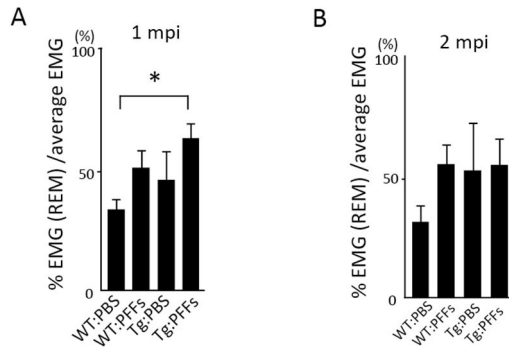
図2



(図2) A53T-SNCA BAC-Tg(Tg:PFFs)を接種した α -syn PFFs マウスにおける睡眠特性。

- A. 接種後1ヶ月 (mpi) の明期 (L, ZT:8-20) および暗期 (D, ZT:20-8) における12時間ごとの睡眠段階 (左パネル) または2mpi (右パネル): PBS 接種 WT マウス (WT:PBS)、 α -syn PFFs 接種 WT マウス (WT:PFFs)、PBS 接種 A53T トランスジェニックマウス (Tg:PBS)、 α -syn PFFs 接種 A53T-SNCA BAC-Tg (Tg:PFFs)。1時間あたりの睡眠段階のパーセンテージを計算し、色付きのタイムテーブルにプロットした。NREM: ノンレム睡眠 (青)、REM: レム睡眠 (オレンジ)、WAKE: 覚醒 (黄色)。
- B. 1mpi (左図) または2mpi (右図) の睡眠段階における全エポック数に対する各エポック数 (覚醒、レム睡眠、ノンレム睡眠) の割合 (4群間)。データは一元配置分散分析を用い、多重比較は Tukey-Kramer 検定で分析した (各群 n=4)。アスタリスクは有意差を示す。

図 3



(図 3) Tg:PFFs マウスの RWA 表現型は、 α -syn PFFs の脳内接種によって悪化した。A, B. 4 群のマウスにおける、接種後 1 ヶ月 (mpi) (A) または 2 mpi (B) の全睡眠段階における筋電図 (EMG) に対するレム睡眠段階のエポックごとの筋電図 (EMG) の積分値の割合。データは一元配置分散分析を用い、多重比較は Tukey-Kramer 検定で分析した (各群 n=4)。アスタリスクは有意差を示す。

次に TG マウスの嗅球に mPFFs を投与して、その表現型を解析した。1 ヶ月後にリン酸化 α -Syn で染色される mPFFs が大脳辺縁系へ伝播し、レム睡眠構造の異常を明らかにした。(機関紙準備中)

さらに、これらの神経回路を制御すべく、神経特異的に Cre を発現するマウスに、アデノ随伴ウイルスを注入し、薬物による、神経回路の制御を実施した。現在、より詳細な病理解析とともに睡眠覚醒制御による病理進展への効果について介入実験を実施中である。

本研究は、レビー小体病のモデルマウスを用いて、シヌクレイン蛋白の伝播と蓄積が同疾患のレム睡眠の異常とレム睡眠の筋活動の異常を増強することを初めて明らかにした。レム睡眠の異常はレビー小体病の発症・診断時期の約 10 年先行することから、重要なバイオマーカーと考えられる。本研究は、レム睡眠の異常を引き起こす神経回路を明らかにし、シヌクレインをターゲットにしたレビー小体病の早期治療介入プラットフォームを提供した。今後、同定されたレム睡眠神経回路異常の制御を目指し、病態進行の予防を図る。これらの成果は、ますます増加するレビー小体病に対する新たな治療法につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Egawa Naohiro, Hamanaka Gen, Chung Kelly K., Ishikawa Hidehiro, Shindo Akihiro, Maki Takakuni, Takahashi Ryosuke, Inoue Haruhisa, Lo Eng H., Arai Ken	4. 巻 23
2. 論文標題 High Mobility Group A1 Regulates Transcription Levels of Oligodendrocyte Marker Genes in Cultured Oligodendrocyte Precursor Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2236 ~ 2236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23042236	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
1. 著者名 Li Fangzhou, Matsumori Shoya, Egawa Naohiro, Yoshimoto Shusuke, Yamashiro Kotaro, Mizutani Haruo, Uchida Noriko, Kokuryu Atsuko, Kuzuya Akira, Kojima Ryosuke, Hayashi Yu, Takahashi Ryosuke	4. 巻 4
2. 論文標題 Predictive Diagnostic Approach to Dementia and Dementia Subtypes Using Wireless and Mobile Electroencephalography: A Pilot Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioelectricity	6. 最初と最後の頁 3 ~ 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/bioe.2021.0030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawazoe Tomoya, Tobisawa Shinsuke, Sugaya Keizo, Uruha Akinori, Miyamoto Kazuhito, Komori Takashi, Goto Yu-ichi, Nishino Ichizo, Yoshihashi Hiroshi, Mizuguchi Takeshi, Matsumoto Naomichi, Egawa Naohiro, Kawata Akihiro, Isozaki Eiji	4. 巻 61
2. 論文標題 Myoclonic Epilepsy with Ragged-red Fibers with Intranuclear Inclusions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 547 ~ 552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.7767-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Yumi, Kojima Katsutoshi, Taura Daisuke, Sone Masakatsu, Washida Kazuo, Egawa Naohiro, Kondo Takayuki, Minakawa Eiko N., Tsukita Kayoko, Enami Takako, Tomimoto Hidekazu, Mizuno Toshiki, Kalaria Raj N., Inagaki Nobuya, Takahashi Ryosuke, Harada-Shiba Mariko, Ihara Masafumi, Inoue Haruhisa	4. 巻 13
2. 論文標題 Human iPS cell-derived mural cells as an in vitro model of hereditary cerebral small vessel disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 open access
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00573-w	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 Suzuki Hidefumi, Egawa Naohiro, Kondo Takayuki, Imamura Keiko, Enami Takako, Tsukita Kayoko, Suga Mika, Shibukawa Ran, Okanishi Yasue, Uchiyama Tsuyoshi, Inoue Haruhisa, Takahashi Ryosuke	4. 巻 45
2. 論文標題 Generation of a human induced pluripotent stem cell line derived from a Parkinson's disease patient carrying SNCA duplication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101828 ~ 101828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101828	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okano Takayuki, Yamamoto Yosuke, Kuzuya Akira, Egawa Naohiro, Kawakami Koji, Furuta Ichiro, Mizuno Kayoko, Fujino Kiyohiro, Kojima Ken, Omori Koichi	4. 巻 73
2. 論文標題 Development of the Reading Cognitive Test Kyoto (ReaCT Kyoto) for Early Detection of Cognitive Decline in Patients with Hearing Loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 981 ~ 990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-190982	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Egawa Naohiro, Suzuki Hidefumi, Takahashi Ryosuke, Hayakawa Kazuhide, Li Wenlu, Lo Eng H, Arai Ken, Inoue Haruhisa	4. 巻 40
2. 論文標題 From in vitro to in vivo reprogramming for neural transdifferentiation: An approach for CNS tissue remodeling using stem cell technology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	6. 最初と最後の頁 1739 ~ 1751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X20910324	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江川斉宏、吉本秀輔、小林勝哉、葛谷聡、松橋眞生、木下彩栄、池田昭夫、高橋良輔
2. 発表標題 生体活動データと深層学習を組み合わせた新たな認知症診断ツールの可能性を探る
3. 学会等名 第62回 日本神経学会総会、京都、2021.5.21
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 井村裕夫、足立壯一、稲垣暢也、尾野 亘、木下彩栄、妹尾 浩、長尾美紀、平井豊博、藤井康友、森信 暁雄、柳田素子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 1016
3. 書名 わかりやすい内科学 第5版	

〔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
---------	---------