

令和 4 年 6 月 14 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：2020～2021

課題番号：20K22693

研究課題名(和文) 血液由来 -シヌクレインシードのPD病態との関連

研究課題名(英文) Association of blood-derived alpha-synuclein seeds with PD pathology

研究代表者

上野 真一 (Ueno, Shinichi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40875944

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)：パーキンソン病(PD)における剖検検体をホモジネートを作成しRT-QuIC法を用いて、各臓器における -シヌクレインシードを解析した。その結果、脳をはじめ顎下腺や肝臓、腎臓、心臓、甲状腺など全身臓器からシードが増幅されることを見出した。これは構造異常を伴う -シヌクレイン(AS)が全身臓器に分布していること裏付けする結果となった。さらにPDの虫垂では対照と比較しリポポリサッカライドが上昇しておりAS凝集に炎症の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液を循環する凝集する傾向を有した -シヌクレイン(AS)を確認した。ASが全身臓器に蓄積しているという知見からパーキンソン病は全身病であることを裏付けることができた。これはPD病態が脳のみでなく全身の多起源説を想起させるものであり、さらには腸管炎症がAS凝集と関与している可能性も示された。今後、病態のモニタリングや治療ターゲットの探索、血液浄化療法など疾患修飾療法の礎となる結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We prepared homogenates of autopsy specimens in Parkinson's disease (PD) and analyzed -synuclein seeds in each organ using the RT-QuIC method. We found that seeds were amplified in brain, submandibular gland, liver, kidney, heart, thyroid gland, and other systemic organs. This result confirms that structurally aberrant -synuclein (AS) is distributed throughout the body. Furthermore, lipopolysaccharide levels were elevated in the appendix of PD compared to controls, suggesting the involvement of inflammation in AS aggregation.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 -シヌクレイン RT-QuIC 全身臓器 リポポリサッカライド

1. 研究開始当初の背景

PD では α -シヌクレイン (AS) 凝集体が鋳型(シード)となり腸管迷走神経もしくは嗅球から神経回路を介して脳全体に伝播し神経細胞内で蓄積することから、神経回路を通じた AS 凝集の進行が PD の病態進展メカニズムで重要と考えられている。しかし近年、網膜や顎下腺など直接的な神経回路接続がない臓器にも AS の蓄積が確認されている。また AS 凝集体をマウスに経口摂取、静脈内、腹腔内投与しても中枢神経へ伝播凝集するという報告や、腸管と脳との間で双方向性に AS 凝集体が伝播する可能性が示されている。これらの研究は Braak 仮説で提唱された神経回路を上行する AS 進展経路以外の存在を想起させる。申請者らは、プリオン病診断で用いられている RT-QuIC 法 (Real-time quaking-induced conversion) を改良し、血中を循環している極微量な AS 凝集体の検出の開発に成功した (特願 2018-159694)。さらに PD 血中由来 AS から作成した AS 凝集体をマウス脳へ投与すると、脳内へ伝播し AS 凝集体が形成されることを見出した (投稿中)。これは血中に循環する AS 凝集体がシード能を持つことを証明するものである。

2. 研究の目的

シード能のある AS 凝集体が PD 患者の血液中を循環していることを見出している。しかしながら、血液を介して AS シードがどのように全身に伝播し、AS の凝集体を形成するかは未だ明らかにされていない。本研究では、1) 血中 AS 凝集体の特性を探索し、PD の剖検例から全身臓器における AS 凝集体の分布を評価する。また、2) マウスに標識した AS シードを持続投与し、*in vivo* イメージングによって AS 凝集体の全身への伝播を長期的に追跡する。3) 全身投与モデルで AS の脳内蓄積が確認できれば、血中 AS のシード能を踏まえて血漿交換によるシードの除去が AS の脳内蓄積を予防出来るか否かを検証する。

3. 研究の方法

全身臓器の解析については、PD や正常対照例の剖検検体から数 mg 採取し、ホモジネートしてサンプルを作成する。それらのサンプルから生化学的解析や免疫組織学的解析を行うことで、全身のどの臓器により蓄積しているか、またどの臓器に蓄積していないのか分布や程度を測定する。その結果を受けて、AS の伝播・凝集と臓器間の関連を見出す。生化学的解析では、微量な AS はウェスタンブロットイングのみでは検出できない可能性があり、より高感度な ELISA 法や RT-QuIC 法を用いることで、検出感度効率をあげる。AS 伝播モデルでも同様に、臓器毎に生化学的解析と免疫組織学的解析を行う。AS シードは量子ドットを用いてラベリングしており、蛍光免疫染色での検出の際に容易であることや、さらに *in vivo* イメージングシステムを用いて検出することも試みる。In vivo イメージングで可視化することができれば、より伝播・凝集を詳細に観察することが可能となる。AS 吸着実験については、まずリコンビナント AS 由来の AS シードが、血漿交換カラムと吸着するかどうか確認する。その上で、PD 患者由来 AS シードの吸着の検討を行う。並行してマウスのパラビオーシスを行った群に対しては順次、脳内、腹腔内へ AS シードを投与する。その後、投与同側、対側それぞれのマウスで、生化学的解析と免疫組織学的解析を行い、AS シードが生体膜を通じて伝播するかどうかを確認する。

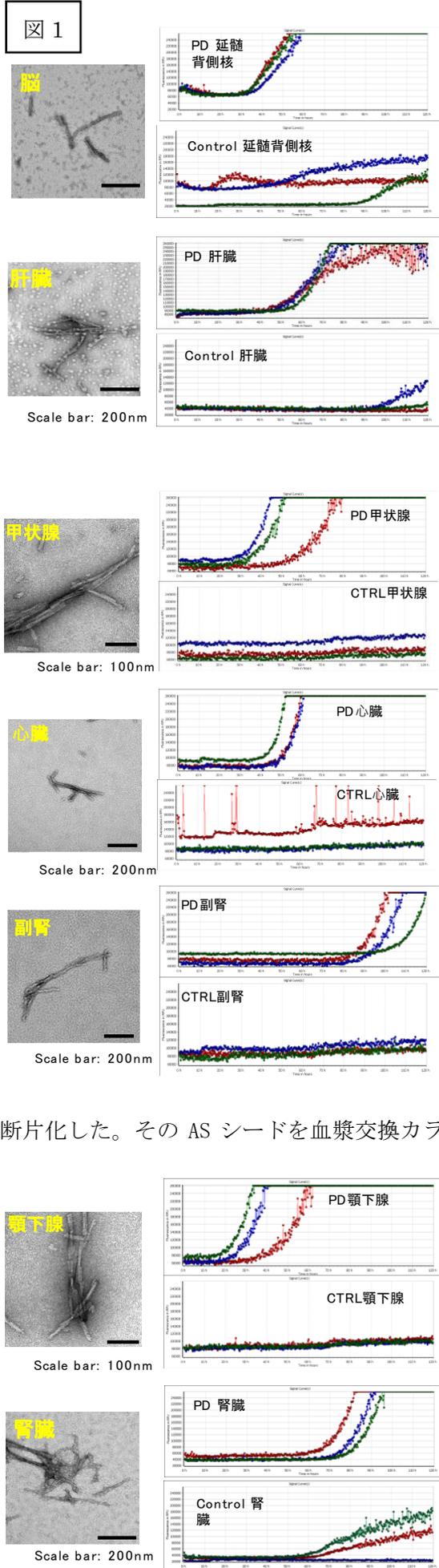
4. 研究成果

1) PD 剖検症例と対照症例の検体を、まず消化管、交感神経節、脾臓、膵臓、肝臓、副腎、甲状腺、顎下腺、肺、心臓、精巣、卵巣、子宮、腸腰筋、脳、脊髄、腓腹神経、中大脳動脈の採取を行った。

各臓器では、AS 凝集体が蓄積していることと想定し、脳をはじめ各組織の破碎を行った。各ホモジネートは蛋白濃度を調整し、今後 Real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC) 法を用いた解析や、ウェスタンブロットティングなど生化学的解析や、組織切片を取得し免疫組織学的な評価も併せて行った。各臓器における AS シードを確認したところ、脳をはじめ顎下腺や肝臓、腎臓、心臓、甲状腺など全身臓器からシードが増幅されることを見出した。さらに電子顕微鏡写真でも AS 凝集体を確認することができた。一方で、肺や精巣、腓腹神経といった臓器には α -シヌクレインシードは見い出されなかった (図 1)。

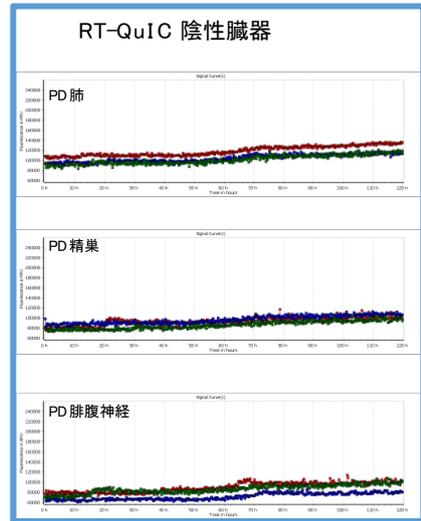
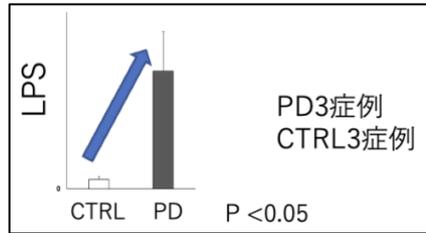
2) 次に、AS 伝播モデルについては、PD 患者血液由来 AS シードをリコンビナント AS と振盪し AS 凝集体を作成した。その AS 凝集体を超音波処理で断片化し、AS シードを作成した。その AS シードを Q-dot プロブを用いてラベリングし、投与器を用いて脳内へ投与する群と、浸透圧ポンプを用いて腹腔内へ留置し持続投与を行った群のいずれも飼育を継続した。

3) AS 吸着実験では、まずリコンビナント AS を振盪させ AS 凝集体を作成し、超音波処理で断片化した。その AS シードを血漿交換カラムを混和させ、溶液内の AS シードをウェスタンブロットティングを用いて吸着の程度を定量化することを試みたが、検出が困難であった。今後は Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) などを用いて微量な AS シードを測定する。そしてパラビオーシスは手技として安定し生存率の上昇が得られ、今後 AS シードの投与を行い、全身への伝播・凝集を確認する方針とした。



そして次に、虫垂においてリポポリサッカライド(LPS)の測定を行ったところ、パーキンソン病患者ではコントロール症例と比較して LPS が上昇していることを見出した。腸管においては炎症が惹起されることで PD 患者虫垂における AS 凝集体が LPS と相互作用を起こし病態に結びつく可能性が示唆された (図 2)。

図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------