

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830044

研究課題名(和文) シヌクレイノパチーにおける抗糖尿病因子アディポネクチンの機能解析と治療応用

研究課題名(英文) Adiponectin, anti diabetic adipokine, as a novel therapeutic strategy for synucleinopathies.

研究代表者

関山 一成 (SEKIYAMA, Kazunari)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主任研究員

研究者番号：40572764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患と生活習慣病は様々な病態が共通することから共通の治療ターゲットが存在するのではないかと考え、パーキンソン病(PD)の病態モデルである α -シヌクレイン(α -S)を発現させた神経細胞に対し抗糖尿病・抗動脈硬化因子として知られるアディポネクチン(APN)を添加した結果、 α -Sの凝集を抑制しました。さらに、マウスモデルに対するAPNの投与によって、非投与群と比較し α -Sの凝集や運動機能障害が抑制されるなど、APNがPDモデルの病態を改善することが示されました。今後、APNの抗神経変性作用の詳細なメカニズムを解明し、近い将来、PDなどの予防、あるいは根治療法の開発に繋がることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：The main objective of this study was to determine whether adiponectin (APN), a adipokine with anti-diabetic and anti-atherosclerosis properties, may protect against α -synucleinopathies, such as Parkinson's disease (PD) and dementia with Lewy bodies (DLB). First, APN was protective in vitro; aggregation of α -synuclein (α -S) in B103 neuroblastoma cells expressing α -S, was significantly ameliorated by treatment with recombinant APN. Second, various neuropathological features in α -S transgenic mice, including α -S aggregation and movement disorder, were significantly ameliorated by nasal treatment of the mice with APN. Our results suggest that APN may act as anti-neuropathogenic in the pathogenesis of α -synucleinopathies and that APN signaling pathway might be a therapeutic target of α -synucleinopathies.

研究分野：病態神経学

キーワード：神経変性疾患 シヌクレイノパチー アディポネクチン α -シヌクレイン トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

特定の神経細胞が進行性に変性・脱落する神経変性疾患は高齢化社会に伴い増加し大きな問題となっており、その予防法や根治療法の確立が待ち望まれている。近年、多くの臨床研究において糖尿病が孤発性のアルツハイマー病やパーキンソン病(PD)などの神経変性疾患の後天的危険因子であることや、神経変性疾患の発症が生活習慣に関係することが示唆されてきた。また、ミトコンドリアの異常やERストレス、慢性炎症をはじめとする様々な病態が糖尿病などの生活習慣病と神経変性疾患に共通することがわかってきた。本研究では、神経変性疾患と他の生活習慣病と共通の治療ターゲットが存在するのではないかと考え、抗糖尿病・抗動脈硬因子として知られるアディポネクチン(APN)に着目した。

2. 研究の目的

研究者は、APNと神経変性との関連を調べる目的でPDおよびレビー小体型認知症(DLB)などのシヌクレイノパチー患者の死後脳において、抗APN抗体を用いた免疫組織化学染色や免疫蛍光染色をおこなった結果、レビー小体にAPNの陽性像を確認し、APNがシヌクレイノパチーの病態に関与している可能性が示唆された。そこで本研究では、シヌクレイノパチーの病態モデルに対しAPNを添加/投与することにより神経変性の病態におけるAPNの機能を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) はじめに、APNの効果を培養細胞モデルにより検討する。ヒト α -シヌクレイン(α S)を恒常的に発現させたB103神経芽細胞は α Sの蓄積に起因する細胞毒性により、プロテアソーム活性の低下などの機能障害が生じる。この細胞に対しリコンビナントAPN(rAPN)添加し、APNの神経毒性への影響

を解析する。(2) 培養細胞により得られた知見を *in vivo* で検討する。神経細胞特異的にヒト α Sを発現するトランスジェニック(Tg)マウスを用い、rAPNの鼻粘膜内投与実験をおこなう。Tgマウス脳内におけるシヌクレイン蓄積・凝集やグリアの活性、運動機能異常に対するAPNの効果を検討し、APNおよびそのシグナル伝達系がシヌクレイノパチーの新たな治療標的となりうるか検証する。

4. 研究成果

(1) はじめに、APNの効果を検討するため、 α S発現B103神経芽細胞に対しリコンビナントAPNを添加した。APN添加/非添加 α S発現細胞をTBS、1%SDS、70%ギ酸(FA)可溶分画に分け各分画ごとの α Sを定量し α Sの可溶性を検討した結果、APN添加によりギ酸分画における α Sが減少することから、APNが α Sの凝集が抑制されることが示された(図1)。

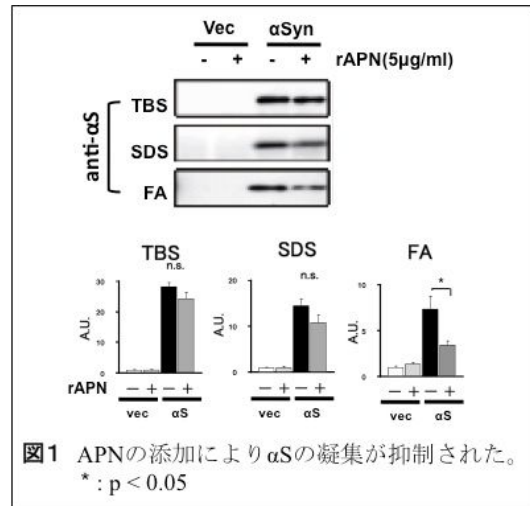


図1 APNの添加により α Sの凝集が抑制された。
*: p < 0.05

また、この α Sの凝集抑制効果は、APN受容体であるAdipoR1および、その下流のAMPキナーゼの活性化を介していることがわかった。さらに、APN添加により、 α Sの凝集マーカーであるリン酸化Sの減少や神経細胞からの α S放出が抑制されること、薬剤による神経毒性(ERストレス、ミトコンドリアやプロテアソームの機能障害)に対しAPNが神経保護的に作用することがわかった。以上のように培養細胞モデルにおいてAPNは、抗神経変性作用を示すことがわかつ

た。

(2) 次に、マウスモデルに対する APN の効果を解析するため、APN 投与法の検討をおこなった。その結果、rAPN の鼻粘膜投与により APN の C 末球場ドメイン (gAPN) が脳実質に浸透することを確認した。培養細胞を用いた実験から全長の APN と同様に gAPN においても α S の凝集抑制効果が見られたため、運動機能異常が顕著でない 2~3 ヶ月齢の α S Tg マウスに gAPN を長期間投与した結果、行動試験 (ロータロッド、ビームテスト) により α S マウスの運動機能異常が改善する事を観察した (図 2)。また、病理学的な解析の結

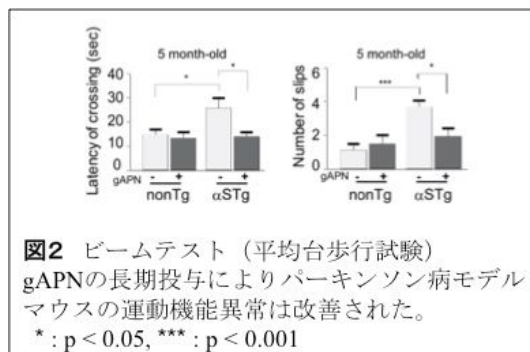


図2 ビームテスト (平均台歩行試験) gAPNの長期投与によりパーキンソン病モデルマウスの運動機能異常は改善された。
*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$

果、 α S Tg マウスにおいて観察された神経軸索末端の α S の蓄積が gAPN の投与により抑制することがわかり、さらに、生化学的な解析においても、 α S Tg マウス脳における α S の凝集が gAPN の投与により抑制していた。以上の結果、 α S Tg マウスの病態が gAPN の長期投与により改善することが示された。

(3) APN や AMP キナーゼが代謝に関わることが報告されていることやシヌクレイノパチー病態における代謝の変化を検討するため細胞内の代謝産物を網羅的に測定するメタボローム解析をおこなった。その結果、細胞およびマウスモデルのいずれの系においても APN の添加により、GMP や IMP といった低リン酸化ヌクレオチドが有意に減少していた。さらに、 α S のリコンビナント蛋白を用いた実験から GMP や IMP のいずれもが α S の蛋白凝集を促進させる作用をもつことがわかり APN の抗神経変性作用の機序の一つであることが示唆された。

(4) 肥満や糖尿病の研究において APN はインスリン抵抗性を改善することが報告されているが、ベクターのみを発現させたコントロール細胞に対し α S 発現細胞において、Akt のリン酸化などのインスリンへの反応性が低下していたが、APN の存在下では α S 発現細胞において低下していたインスリンシグナルが改善した (図 3)。また、インスリン

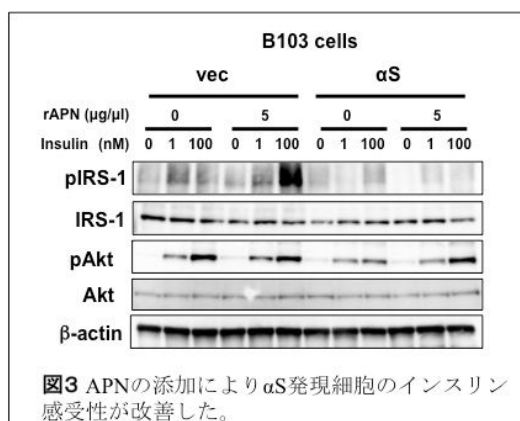


図3 APNの添加により α S発現細胞のインスリン感受性が改善した。

と APN の共添加により α S の凝集抑制効果が増大することから、APN 単独添加による α S 凝集抑制効果のみではなく、インスリンシグナルを亢進することにより抗神経変性作用を示すことが示唆された。さらに、 α S 発現 B103 細胞において AdipoR1 のアダプター蛋白であり Akt と結合が報告されている APPL1 の発現が上昇していることがわかったが、APN シグナルとシヌクレイノパチー病態との関連を検討するためにはさらなる研究が必要である。

以上の結果より、APN がシヌクレイノパチー病態を改善することが示された。今後、APN の抗神経変性作用やそのシグナル伝達系の詳細なメカニズムを解明し、近い将来、PD や DLB などの予防、あるいは根治療法の開発に繋がることを期待される。

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 3 件)

1. Sugama S, Sekiyama K, Kodama T, Takamatsu Y, Takenouchi T, Hashimoto M, Bruno C, Kakinuma Y. Chronic restraint

- stress triggers dopaminergic and noradrenergic neurodegeneration: Possible role of chronic stress in the onset of Parkinson's disease. *Brain Behav Immun*. 査読有 51, 2016, 39-46
DOI: 10.1016/j.bbi.2015.08.015.
2. Takenouchi T, Tsukimoto M, Iwamaru Y, Sugama S, Sekiyama K, Sato M, Kojima S, Hashimoto M, Kitani H. Extracellular ATP induces unconventional release of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from microglial cells. *Immunol Lett*. 査読有 167(2), 2015, 116-24 DOI: 10.1016/j.imlet.2015.08.002.
3. Sekiyama K, Waragai M, Akatsu H, Sugama S, Takenouchi T, Takamatsu Y, Fujita M, Sekigawa A, Rockenstein E, Inoue S, La Spada AR, Masliah E, Hashimoto M. Disease-Modifying Effect of Adiponectin in Model of α -Synucleinopathies. *Ann Clin Transl Neurol*. 査読有 3;1(7), 2014, 479-489
DOI:10.1002/acn3.77

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Sekiyama K, Waragai M, Takamatsu Y, Hashimoto M. Adiponectin, the anti-diabetic adipokine, has a therapeutic effect in models of α -synucleinopathies. Poster ADPD 2015 Nice, France. 2015/03/21
2. 関山 一成, 高松 芳樹, 橋本 款 アディポネクチンは α -シヌクレイノパチー細胞モデルのインスリンシグナルを亢進し神経変性の病態を改善する ポスター発表 第37回日本神経科学大会 2014年9月13日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
3. 関山 一成(代理発表), 橋本 款 パーキンソン病新規治療薬としてのアディポネクチン TOBIRA 第3回研究交流フォーラム、主催者講演. 2014年2月3日, お茶の水ソラシティカンファレンスセンター(東京都千代田区)
4. 関山 一成, 藤田 雅代, 高松 芳樹, 橋本 款 シヌクレイノパチー病態におけるアディポネクチンの治療効果について ポスター発表 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月4日 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
5. Sekiyama K, Fujita M, Sekigawa A, Takamatsu Y, Hashimoto M The anti-diabetic hormone, adiponectin, has protective effect on the pathogenesis of in vitro and in vivo models of α -synucleinopathies. *Neuroscience* 2013, San Diego, USA ポスター発表 2013年11月11日

〔図書〕(計 3 件)

1. 関山 一成, 橋本 款. 月刊細胞, シヌクレイントランスジェニックマウス 2015 Vol. 47 No.1; 16-19
2. 関山 一成, 高松 芳樹, 橋本 款 医学のあゆみ, シヌクレインの生理作用. 2013 247: 999-1002,
3. Sekiyama K, Fujita M, Sekigawa A, Takamatsu Y, Hashimoto M. InTech Therapeutic Effects of Ibuprofen on Transgenic Mice Models of Neurodegenerative Diseases. *Ibuprofen: Clinical Pharmacology, Medical Uses and Adverse Effects*. (Carter W and Brown B, Ed.) 2013, pp. 369-376. ISBN: 978-1-62618-659-0.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

公益財団法人 東京都医学総合研究所

<http://www.igakuken.or.jp/parkinson/>

6. 研究組織

研究代表者

関山 一成(SEKIYAMA, Kazunari)

公益財団法人 東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主任研究員

研究者番号: 40572764