

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09327

研究課題名(和文) レビー小体の形成機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a mechanism of Lewy body formation

研究代表者

久保 紳一郎 (KUBO, Shinichiro)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20327795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)は神経細胞内封入体であるレビー小体(LB)により病理学的に定義される。LBのできる機序は未解明であるが、その主要構成タンパクであるアルファシヌクレイン(AS)の挙動変化がLB形成において中核的役割を担っていると考えられている。ASは細胞膜脂質に結合し、またASの挙動は結合する細胞膜脂質組成により変化することから、PD脳では、神経細胞膜の脂質組成に変化が生じ、これがASの挙動を変化させ、ついにはLB形成に至るとする作業仮説を立てた。これに基づき本研究では、LBを呈する脂質代謝異常症の動物モデルにおいて脳の脂質組成変化を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Pathologically, Parkinson's disease (PD) is characterized by neuronal inclusions called Lewy bodies. Although the mechanism of Lewy body formation remains largely unknown, it is becoming clear that changes in the behavior of alpha-synuclein are critical in this process. alpha-Synuclein behaves differently depending on the lipid composition of membranes with which it interacts; therefore, one can postulate that the altered lipid composition of neuronal membranes may lead to Lewy body formation. The lipid composition of cellular membranes is consistently altered in the brains of patients with PD, and Lewy bodies are a common feature of several human lipidoses with mutations in enzymes that affect membrane lipids. This further supports the concept that alterations in the membrane lipids of neurons are central to Lewy body formation. Based on the working hypothesis, the present study revealed an altered lipid composition in brains of animal model of lipidoses.

研究分野：脳神経内科

キーワード：パーキンソン病 レビー小体 アルファシヌクレイン 脂質 細胞膜

1. 研究開始当初の背景

レビー小体病 (Lewy body disease: LBD) は運動症状に加え、認知機能障害など多彩な非運動症状を呈する神経変性疾患であり (McKeith et al. *Neurology* 65:1863-72, 2005) その名の通り神経細胞質内異常封入体であるレビー小体 (Lewy bodies; LBs) の出現により病理学的に定義される。神経系における LBs の拡がりに対応して種々の神経症状も拡がり、特筆すべきは神経症状を有さない一部の高齢例において少数の LBs がみられる、いわゆる preclinical LBD (incidental LBD; ILBD) が存在することである (Braak et al. *Neurobiol Aging* 24:197-211, 2003)。これは、LBs の形成が、本疾患の進行を規定していること、そしてその形成は病的過程の初期イベントであることを示唆している。つまり、LBs の形成機序の解明は根本的治療につながる可能性が高いと考えられる。LBs を構成する主要タンパクはアルファシヌクレイン (SNCA) であり (Spillantini et al. *Nature* 388:839-840, 1997, Spillantini et al. 95:6469-6473, 1998) LBs 形成において中核的存在であると考えられる (Hatano et al. *J Neurochem* 111:1075-1193, 2009)。LBs 形成の初期段階では、まず SNCA の挙動の変化 (細胞膜脂質との相互作用の変化、高次構造の変化、リン酸化などの翻訳後修飾の変化、産生と分解のバランスの変化) が起こると考えられている (Bendor et al. *Neuron* 79:1044-1066, 2013)。つまり、解明すべき問題はどのような機序により SNCA の挙動変化が生じるのかということである。LBs は、電顕的に線維状の構造に加えて膜様構造を呈し、脂質染色にてスフィンゴ脂質などの膜脂質を包含することがわかっている (Forno. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:259-72, 1996, Gai et al. *Exp Neurol* 166:324-33, 2000, Den Hartog Jager. *Arch Neurol* 21:615-619, 1969)。この膜様構造をとり囲む線維状構造

が SNCA から成っていることから (Spillantini et al. *Nature* 388:839-840, 1997, Spillantini et al. 95:6469-6473) SNCA と膜脂質の関連に注目した。そして、SNCA がスフィンゴ脂質、コレステロールに富む脂質ラフト (lipid rafts) と呼ばれる細胞膜上のマイクロドメインに局在すること (Fortin et al. *J Neurosci* 24:6715-23, 2004) SNCA の脂質ラフトへの局在は膜の脂質組成により厳密に制御されていること (Kubo S et al. *J Biol Chem* 280:31664-72, 2005) を証明した。この結果を基に、LBD 患者脳では、まず神経細胞膜の脂質組成に変化が生じ、これが SNCA の挙動を変化させ、ついには LBs 形成に至るとする仮説を立てた。Fabelo ら (Fabelo N et al. *Mol Med* 17:1107-18, 2011) は、ILBD および初期 PD の剖検脳の脂質ラフトでは脂質組成が変化していることを報告しており、この仮説と合致する。さらに、glucocerebrosidase (GBA) あるいは phospholipase A2 Group VI (PLA2G6) 遺伝子に変異が起こると LBs が形成される (Tsuang et al. *Neurology* 79:1944-1950, 2012, Gregory et al. *Neurology* 71:1402-1409, 2008, Paisan-Ruiz et al. *Neurobiol. Aging* 33:814-823, 2010, Riku et al. *Acta Neuropathol Commun* 2013) ことも、この仮説を支持する。なぜなら、これらの遺伝子がコードする GBA と iPLA2 タンパクはいずれも膜脂質を基質とする酵素だからである。つまり、まず細胞膜脂質の組成に変化が生じ、その結果 LBs が形成されるという作業仮説が立てられる。

2. 研究の目的

本研究の目的はレビー小体病 (LBD) を病理学的に特徴づける神経細胞体内封入体であるレビー小体の形成機序を解明することである。本疾患は加齢がリスクファクターであり高齢化社会に伴いレビー小体病の有病率は増加すると考えられる。現行の治療は患者

の QOL を保つのに十分ではなく、その病態解明が急務である。レビー小体病の原因は明らかになっていないが、レビー小体はその発症および進行に関与することは確実であることから、その形成機序を解明することにより効果的な治療法が期待できる。遺伝性脂質代謝異常症であるゴーシェ病(GD)では、レビー小体が形成されパーキンソン病類似の表現型が知られていることからGDのモデルマウスを解析することにより封入体形成を解き明かす。また、LBDとコントロールの剖検脳を用いて、細胞膜の脂質組成を検討することにより、レビー小体の形成機序を解明することを目指す。

3. 研究の方法

PDモデルマウス(GBA L444P変異マウス)脳において、変化がみられる細胞膜脂質をリピドミクス(LC-MS、GCMS、MALDI MS imaging)により同定すると共に、同マウスにてレビー小体/アルファシヌクレイン凝集を免疫組織化学的に確認する。

マウスのレビー小体/アルファシヌクレイン凝集の抑制効果をもたらす摂取脂質組成を確定するためにGBA L444Pヘテロ変異を有するマウス群とコントロールとしてGBA WTマウス群、GBAの欠失変異であるGBAヘテロKOマウス群を作製し、含有脂質成分の異なる飼料(具体的に n6/n3 比を 8, 15, 30, 331 の4種類に調整)を3か月間継続的に与え効果を判定する。

剖検脳解析については、LBDとコントロールの前部帯状回皮質と後頭葉皮質の凍結切片を用い、イメージングマススペクトロメトリーにより脂質組成を解析する。

4. 研究成果

遺伝性脂質代謝異常症であるゴーシェ病(GD)はGBA遺伝子のホモ変異によって若年に発症する重篤な疾患であるが、GBA遺伝子のヘテロ変異はパーキンソン

病類似の臨床像を呈し、レビー小体が形成される。そこでGBAヘテロ変異を有するモデルマウスを解析することにより封入体形成の影響を観察した。GBAヘテロノックアウトマウスに3系脂質組成の異なる餌を与え長期の渡る表現型を観察した。GBA野生型マウスとヘテロ変異群についてそれぞれ通常の餌を与えた群と脂質組成の異なる群を準備しロタロッド試験により行動試験を1年半継続して行った。ロタロッド試験では回転ローターからマウスが落下するまでの潜時を測定した。しかしながら野生群と遺伝子変異群、あるいは脂質組成の異なる各群においても明らかな差は認められなかった。さらにパーキンソン病の病態と関連のある糖脂質としてGM1に着目しLCMSによる解析を行った。各マウス群の脳を取り出しGM1を抽出した後LCMSによる定量を行ったが明らかな変化は認められなかった。一方で、リソソーム関連遺伝子に遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子候補を見出しており、それら遺伝子改変マウスのリピドミクスによりいくつかの脂質の変化を見出している。それらの候補脂質は本研究課題で同時に行っている患者剖検脳での解析でも見られる変化でありパーキンソン病の病態に脂質組成の変化が関与していることが推測された。

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1件)

Kubo S: Membrane lipids as therapeutic targets for Parkinson's disease: a possible link between Lewy pathology and membrane lipids. *Expert Opin Ther Targets* 20:1301-1310, 2016、査読あり

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保 紳一郎 (KUBO, Shinichiro)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20327795