

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09239

研究課題名(和文)パーキンソン症候群の病態におけるchromogranin Bに関する研究

研究課題名(英文)Studies of chromogranin B in Parkinson's syndrome

研究代表者

瀧川 洋史(TAKIGAWA, Hiroshi)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：30511373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)や進行性核上性麻痺(PSP)を含めたパーキンソン症候群(PS)は、原因不明な進行性の神経変性疾患であり、未だに有効な治療法はない。脳脊髄液を用いた網羅的な質量分析にてPSPに特異的な変化を示すchromogranin B(CHGB)由来ペプチドであるbCHGB\_6255を確認した。CHGBは翻訳後に小分子が切り出され種々の活性を有することが知られており、CHGBからbCHGB\_6255が産生され過程を含めたCHGBが関連した分子カスケードが、PSP病態に関連していることが推測され、PSの病態解明のシードとなることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PSは原因不明で有効な治療法はなく、各疾患の関連や相違など疾患分類や位置づけについてこれまでも多くの議論がなされてきているが、未だ明らかにはなっていない。PSでは明確なバイオマーカーは確立されておらず、臨床症状、形態画像、薬剤への反応性などから臨床診断するしかなく、病初期には臨床診断が困難な場合が少なくない。脳脊髄液の解析から得られたPSPに特異的な変化を示すCHGBは、臨床診断におけるバイオマーカーとなることが示唆され、病態解明や治療法開発などにむけたシードになることが期待された。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's syndrome (PS), including Parkinson's disease (PD) and progressive supranuclear palsy (PSP), is a progressive neurodegenerative disease of unknown cause, and there is still no effective treatment. A comprehensive mass spectrometric analysis using cerebrospinal fluid confirmed bCHGB\_6255, a peptide derived from chromogranin B (CHGB) that exhibits PSP-specific changes. It is known that small molecules of CHGB are excised after translation and have various activities. It was speculated that the CHGB-related molecular cascade, including the process by which bCHGB\_6255 is produced from CHGB, is related to the pathophysiology of PSP, suggesting that it may be a seed for the pathological elucidation of PS.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：パーキンソン症候群 進行性核上性麻痺 大脳皮質基底核変性症 神経変性疾患 脳神経内科学 老年医学 分子生物学

## 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 (PD) は、振戦、筋強剛、無動、姿勢反射障害を四徴とした進行性の神経変性疾患であるが、根治療法は確立されていない。パーキンソン症候群 (PS) は、PD に加えて、パーキンソンニズムとして四徴のいずれかを含めた神経徴候を呈する症候群であり、進行性核上性麻痺 (PSP)、皮質基底核変性症 (CBD)、多系統萎縮 (MSA) などの多くの神経変性疾患が含まれる。PS のなかでも PSP は、眼球運動障害、易転倒性、歩行障害、動作緩慢、嚥下障害、認知症などを呈し、CBD は、大脳基底核症状としてのパーキンソンニズムと大脳皮質症状としての失行などの高次脳機能障害を呈し、左右差のある神経徴候を特徴としている。MSA は自律神経症状、パーキンソンニズムと小脳症状を呈する神経変性疾患である。PS は中年以降に発症し、通常は孤発性であり、原因不明であるが、高齢化とともに増加しており、老化との関連も推測されている。PSP、CBD、MSA は、しばしば PD と類似した症状を示すが、治療法、予後も異なり、鑑別診断が重要であるが、臨床症状が非常に多彩であり、病初期には鑑別診断が困難であることが少なくない。病理学的な知見からは、PD や MSA で認められる細胞内封入体にはシヌクレインが含まれ、PSP や CBD では異常タウの脳内への蓄積が指摘されており、これらのタンパクが病態に関与していると考えられているが、シヌクレインやタウに関する分子生物学的な解析では、これらのタンパクのみで病態の全貌を解明するのは困難であると考えられる。各疾患の関連や相違など疾患分類の位置づけに関しても多くの議論がなされてきており、臨床的、遺伝学的、病理学的、生化学的な詳細な研究の推進が待たれている。

PSP を含めた PS では明確なバイオマーカーは確立されておらず、臨床症状、形態画像、薬剤への反応性などから臨床診断するしかなく、確定診断には病理学的な検討に委ねられている。多様な臨床像のために病初期には臨床診断が困難であることがある。これまでも PSP のバイオマーカー候補として脳脊髄液のタウ、ニューロフィラメント軽鎖、YKL-40 などが報告されているが、十分な検証には至っていない。申請者は PSP、PD ならびに健常対象者の髄液を用いた SELDI-TOF MS 法によるタンパク質発現プロファイリングを解析して、PSP において特異的に減少する候補分子として Chromogranin B (CHGB)由来ペプチド (bCHGB\_6255) を同定し、ROC 解析では、感度 91.7%、特異度 66.7%であった。CHGB は神経細胞に広く分布する酸性可溶性分子であり、神経分泌タンパクのひとつである。神経変性疾患のひとつである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では、CHGB の遺伝子多型と家族性 ALS における発症時期との相関について (Gros-Loiu F 2009)、精神疾患のひとつである統合失調症では髄液中の CHGB 低値や CHGB 遺伝子多型と疾患感受性との関連が報告されている。また、免疫学的機序の介在が想定されている神経脱髄性疾患である多発性硬化症では、病初期に増加し、病期の進行とともに減少することが報告されている (Mattsson N, 2007)。これらの知見から CHGB が、中枢神経疾患と関連を有することが推測され、PS の病態について研究を推進する上で有力な研究候補分子であることが期待された。

### 2. 研究の目的

CHGB について多数の PS 症例の脳脊髄液を用いて CHGB について検討し、疾患特異的なバイオマーカー候補となり得るかを検討すること、ならびに、bCHGB\_6255 について分子生物学的な手法を用いて PS の病態との関連について解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) CHBG の測定

PSP 53 例、PD 24 例、CBS 15 例、健常対象 (CTL) 20 例の脳脊髄液について Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)法を用いて CHGB について測定し、検討した。

#### (2) bCHGB\_6255 の抗体作成

質量分析の結果から bCHGB\_6255 に含まれると予想されるアミノ酸からなるペプチドを合成し、ウサギに免疫することによって得られたポリクローナル抗体、あるいは、別の2種類の抗体を用いた Western blotting 法による解析を行った。

#### (3) bCHGB\_6255 の解析

bCHGB\_6255 についての生物学的な機能解析を行うために、脳脊髄液を用いた de novo ペプチド配列解析法による解析、脳脊髄液よりクロマト精製による単離・LC-MS による解析、質量分析のデータからアミノ酸配列候補を推定し、ペプチド合成を行い、HPLC (High Performance Liquid Chromatography)法での解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) CHBG の測定

脳脊髄液中の CHGB は、PSP  $76.8 \pm 28.0 \mu\text{g/mL}$ 、PD  $61.5 \pm 17.8 \mu\text{g/mL}$ 、CBS  $61.2 \pm 22.1 \mu\text{g/mL}$ 、CTL  $68.2 \pm 25.2 \mu\text{g/mL}$  であり、PSP において PD や CTL よりも統計学的に有意に高値であった (図1)。ROC 解析では、Cutoff 値を  $62.9 \mu\text{g/mL}$  とすると感度は 62.3%、特異度は 66.1%であった。CHGB は、PSP の診断バイオマーカーとなることが期待されるが、臨床亜型での相違、臨床経過との相関など病理診断例を含めた更なる多数例での解析が望まれる。

CHGB の測定値は、質量分析で得られた bCHGB\_6255 値とは逆相関の結果であった。CHGB を含めた chromogranin 遺伝子族においては、翻訳後に種々のペプチドが切り出されることによって、糖代謝やホルモン産生、免疫系などに独自の生理活性を発揮することが報告されている (Bartolomucci, 2011)。bCHGB\_6255 は CHGB から切り出される新規のペプチドであると推定されるが、その機能は明らかではない。CHGB と bCHGB\_6255 が逆相関にあったことは、PS の病態において bCHGB\_6255

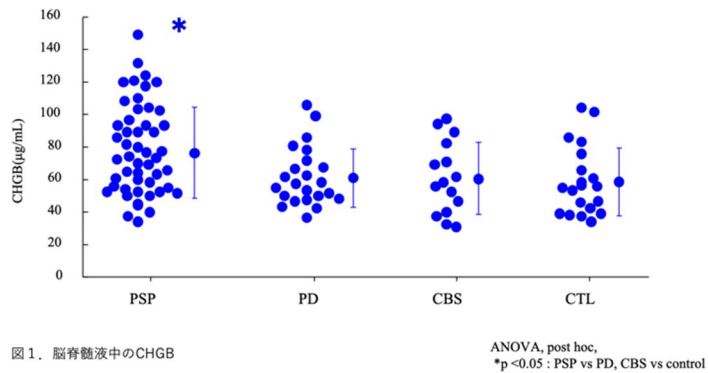


図1. 脳脊髄液中のCHGB  
ANOVA, post hoc, \*p < 0.05 : PSP vs PD, CBS vs control

そのものの生物学的な機能だけではなく、CHGB から bCHGB\_6255 が代謝され、活性をもつ一連のカスケードに病態に関連した分子機構が存在する可能性を示唆するものであり、詳細な検討が今後の課題である。

### (2) bCHGB\_6255 の抗体作成

質量分析による結果からは、bCHGB\_6255 は、CHGB の aa500-530 を含む m/z6255 の分子であると推定された aa500-530 のなかから抗原に適切と思われる領域から 13 アミノ酸 (GDLQDTKENREEA) のペプチド合成を行い、これを抗原としてウサギに免疫することによってポリクローナル抗体を作成した。血清での十分な抗体価の上昇が確認された。作成した抗体ならびに、bCHGB\_6255 周辺の 2 種類の抗体を用いて、Western blotting 法による bCHGB\_6255 の検出、定量化を試みた。十分な抗原抗体反応を得ることが出来ず、定量に適した検出は得られなかった。bCHGB\_6255 の分子量が小さいこと、脳脊髄液中での含有量の少ないことが検出を困難とさせた可能性が推測され、高感度デジタル ELISA による測定などを検討していく必要がある。

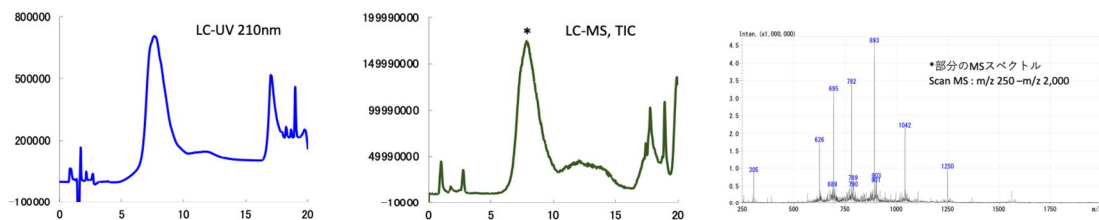
将来的な脳組織での免疫組織学的な解析や免疫沈降法を用いた bCHGB\_6255 との関連タンパクを探索する実験を進めるためにはより特異度の高い抗体の作成が望まれるが、bCHGB\_6255 のアミノ酸配列を決定し、その断端を抗原としたモノクローナル抗体を作成することが今後の課題である。

### (3) bCHGB\_6255 の解析

bCHGB\_6255 は、CHGB から切り出され、生物学的な活性を有する分子であると推定されるが、詳細は明らかではない。脳脊髄液を用いた de novo ペプチド配列解析法によるアミノ酸配列の決定を試みたが、十分なタンパクを検出することが出来ず、アミノ酸配列の決定には至らなかった。

脳脊髄液をイオン交換固相抽出カラム、逆相固相抽出カラム (Q Sepharose Fast Flow 固相抽出カラム、及び、C18) を用いて精製し、LC-MS により脳脊髄液中の bCHGB\_6255 と思われる m/z6255 のピークの検出と同定を試みた。しかしながら精製した試料では該当する目的物の検出及びアミノ酸配列の決定には至らなかった。質量分析法は非常に高感度な分析手法ではあるが、今回の前処理法では精製度が不十分であり、試料中の不純物が目的物のイオン化を阻害することで、目的成分が検出されていない可能性が示唆された。よって精製方法の改善は今後の重要な検討課題であると考えられた。

以前の質量分析の結果より、bCHGB\_6255 は CHGB (aa500-530) を含む m/z6255 と推測され、CHGB のアミノ酸データより bCHGB\_6255 のアミノ酸配列を予想し (HHRVQENQMDKARRHPQGAWKELDRNYLNLYGEEGAPGKWWQQGDLQDTKENR)、ペプチド合成を行った。合成したペプチドについて HPLC 測定を行い、ピークを検出することが出来た (図 2)。



今後は合成ペプチドを対照コントロールとして bCHGB\_6255 定量システムを構築することが望まれる。すなわち脳脊髄液試料の HPLC クロマトグラムにおいて、合成ペプチドの溶出時間に相当する部分を選択的に分取・濃縮することで目的成分の検出・同定が可能となると推察される。

bCHGB\_6255 の正確なアミノ酸配列を決定することは、分子の機能解析、抗体の作成、関連分子、カスケードの解析など多くの知見をもたらす、PS の病態との関連を含め生物学的な機能解析を行うことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Adachi T, Takigawa H, Nomura T, Watanabe Y, Kowa H	4. 巻 57
2. 論文標題 Cowden Syndrome with a Novel PTEN Mutation Presenting with Partial Epilepsy Related to Focal Cortical Dysplasia.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 97-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.9052-17. Epub 2017 Oct 16.	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 Yuan JH, Hashiguchi A, Okamoto Y, Yoshimura A, Ando M, Shiomi K, Saito K, Takahashi M, Ichinose K, Ohmichi T, Ichikawa K, Tadashi T, Takigawa H, Shibayama H, Takashima H	4. 巻 63
2. 論文標題 Clinical and mutational spectrum of Japanese patients with recessive variants in SH3TC2.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 281-287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-017-0388-5. Epub 2018 Jan 10.	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 瀧川洋史	4. 巻 34
2. 論文標題 レジストリー研究 JALPAC(Japanese Longitudinal Biomarker Study in PSP and CBD)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 神経治療学	6. 最初と最後の頁 278-282
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 中島健二, 瀧川洋史	4. 巻 35
2. 論文標題 【PSPとCBD-その共通点と相違点】 進行性核上性麻痺(PSP) 疫学と予後	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 275-276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Takigawa H, Kitayama M, Wada-Isoe K, Kowa H, Nakashima K	4. 巻 6
2. 論文標題 Prevalence of progressive supranuclear palsy in Yonago: change throughout a decade.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Brain Behav.	6. 最初と最後の頁 e00557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/brb3.557. eCollection 2016 Dec.	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 Takigawa H, Kowa H, Nakashima K	4. 巻 135
2. 論文標題 No associations between five polymorphisms in COMT gene and migraine.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Acta Neurol Scand	6. 最初と最後の頁 225-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ane.12583. Epub 2016 Mar 14.	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 Kashihara K, Nomura T, Maeda T, Tsuboi Y, Mishima T, Takigawa H, Nakashima K.	4. 巻 55
2. 論文標題 Beneficial Effects of Ramelteon on Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder Associated with Parkinson's Disease - Results of a Multicenter Open Trial.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Intern Med.	6. 最初と最後の頁 231-236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.55.5464. Epub 2016 Feb 1.	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 Watanabe Y, Raaphorst J, Izumi Y, Yoshino H, Ito S, Adachi T, Takigawa H, et al.	4. 巻 267
2. 論文標題 Cognitive and behavioral status in Japanese ALS patients: a multicenter study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurol	6. 最初と最後の頁 1321-1330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-019-09655-9. Epub 2020.	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 瀧川洋史, 池内 健, 饗場郁子, 森田光哉, 小野寺理, 下畑享良, 徳田隆彦, 村山繁雄, 長谷川一子, 古和久典, 花島律子, 中島健二, JALPACコンソーシアム
2. 発表標題 PSP Rating Scaleによる進行性核上性麻痺の経時的変化に関する検討
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阪田良一, 瀧川洋史, 花島律子
2. 発表標題 進行性核上性麻痺を中心としたパーキンソン症候群の鑑別診断に有用な脳脊髄液タンパク質の探索
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikuko Aiba, Takeshi Ikeuchi, Hiroshi Takigawa, Takayoshi Shimohata, Takahiko Tokuda, Mitsuya Morita, Osamu Onodera, Shigeo Muramaya, Kazuko Hasegawa, Kenji Nakashima
2. 発表標題 Progression of milestones by clinical types in progressive supranuclear palsy: a longitudinal observational study of a cohort of patients with PSP/CBD (the JALPAC project)
3. 学会等名 21st International Congress of Parkinson's disease and Movement Disorders (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Aiba I, Shimohata T, Murayama S, Hasegawa K, Iwasaki Y, Yokota O, Sakai M, Yabe I, Takigawa H, Yokota T, Sugaya K, Ikeuchi T, Hasegawa M, Yoshida M, Komori T, Wakabayashi K, Saito Y, Tokumaru M, Sakurai K, Nakashima K, J-VAC group
2. 発表標題 Clinical features and natural history of pathologically confirmed corticalbasal degeneration - Japanese validation study of CBD (J-VAC study) -
3. 学会等名 CurePSP International Reserch Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 瀧川洋史, 古和久典
2. 発表標題 胃瘦と経腸栄養による管理について再び考える 進行性核上性麻痺における自然史と経腸栄養に関する検討
3. 学会等名 第32回日本脈経腸栄養学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tokuda T, Ikeuchi T, Takigawa H, Aiba I, Shimohata T, Morita M, Onodera O, Murayama S, Nakashima K.
2. 発表標題 A longitudinal observational study of a cohort of patients with PSP/CBD: the JALPAC project.
3. 学会等名 20TH INTERNATIONAL CONGRESS OF PARKINSON'S DISEASE AND MOVEMENT DISORDERS (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Aiba I, Ikeuchi T, Takigawa H, Shimohata T, Tokuda T, Morita M, Onodera O, Murayama S, Nakashima K.
2. 発表標題 A longitudinal observational study of a cohort of patients with PSP/CBD (the JALPAC project): Progression of milestones by clinical types.
3. 学会等名 CurePSP International Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 瀧川洋史, 古和久典, 中島健二
2. 発表標題 進行性核上性麻痺の自然史と経腸栄養による治療介入についての検討
3. 学会等名 第57回日本神経学会学術集会
4. 発表年 2016年



1. 発表者名 瀧川洋史, 池内 健, 森田光哉, 饗場郁子, 小野寺理, 下畑享良, 徳田隆彦, 村山繁雄, 中島健二, JALPAC研究グループ
2. 発表標題 Barthel IndexならびにPSPRS-Jによる進行性核上性麻痺症例のADL評価に関する検討.
3. 学会等名 第34回日本神経治療学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 瀧川洋史
2. 発表標題 JALPAC (Japanese Longitudinal Biomarker Study in PSP and CBD)
3. 学会等名 第34回日本神経治療学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Takigawa H, Ikeuchi T, Aiba I, Morita M, Onodera O, Shimohata T, Tokuda T, Murayama S, Hasegawa K, Kowa H, Tokumaru A, Hanajima R, Nakashima K, JALPAC study group
2. 発表標題 Longitudinal study of PSP rating scale and clinical diagnosis in Progressive supranuclear palsy cases
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takigawa H, Kowa H, Nakano T, Nakashima K
2. 発表標題 Serum Interleukin-6 and Interleukin-18 levels in migraineurs
3. 学会等名 18th International Congress of Headache Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 中島健二, 和田健二, 中西亜紀, 上村直人, 藤戸良子, 柏原健一, 足立 正, 水上勝義, 山崎峰雄, 余郷麻希子, 森田昌代, 鈴木正彦, 古和久朋, 古和久典, 猪原匡史, 高橋牧郎, 新井哲明, 瀧川洋史, 玉置寿男, 布村明彦	4. 発行年 2017年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 223
3. 書名 認知症治療薬の考え方, 使い方	

1. 著者名 下畑享良, 花島律子, 瀧川洋史, 他48名	4. 発行年 2019年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 242
3. 書名 非定型パーキンソニズム-基礎と臨床-	

1. 著者名 中島健二, 湯浅龍彦, 下畑享良, 饗場郁子, 瀧川洋史, 他13名	4. 発行年 2017年
2. 出版社 神経変性疾患における基盤的調査研究班	5. 総ページ数 42
3. 書名 進行性核上性麻痺 (PSP) 診断とケアマニュアルVer.4	

〔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
---------------------------	-----------------------	----