

令和元年9月5日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09685

研究課題名(和文) AD・PD患者での糖脂質による各原因蛋白修飾の実態とその意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the glycolipids-modified respective pathogenic proteins for the development of AD and PD patients

研究代表者

武藤 多津郎 (Mutoh, Tatsuro)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：60190857

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)：本研究では、我々が同定したTrkとGM1による脂質修飾の実態解明のため、様々な mutant を作成し、変異cDNAをtransfectし、stable cloneを作成。これら細胞を放射性同位元素でlabelし、抗Trk抗体で免疫沈降(IP)し、そのIP物より全脂質を抽出しGM1の存在を確認した。これら変異Trkを発現する stable transfectant では、Trkのリガンドに対する反応性は失われ、細胞内 trafficking も異常となった。一方、神経難病患者髄液の脂質をLC-MS/MSで高感度測定した。更に、神経学的に正常な200例の解析も行い、その脂質プロファイル化を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで知られて来なかった脂質類による細胞膜蛋白の翻訳後修飾の実態を神経栄養因子受容体を例にとり、その詳細な実態を解明出来た。さらに、ADやPD等の神経難病疾患での髄液中糖脂質プロファイル化を初めて明らかにすることが出来た。この詳細にプロファイルは今後各神経難病の成因解明に取り組む研究に革新的な情報提供をする事が出来た事を意味し、全く新たな治療法開発の可能性を示唆する重要な研究と成った。さらに、こうした糖脂質は食物にも大量に含まれており、上記プロファイルパターンから神経障害を発生させないような食事療法の可能性を切り開くものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified GM1 binding site in Trk neurotrophin receptor by using deletion mutant analyses. The proposed binding site of GM1 ganglioside within Trk protein was probed to be in the juxtamembrane region of the Trk protein. Stable transfectant of these mutant trk gene did not show any responses to its cognate ligand, NGF biochemically and morphologically (paper in preparation).

Another achievement of the present study is the discovery of disease specific lipidomic profiles. We performed lipidomic analyses of cerebrospinal fluid from neurologically normal controls (NNC) and patients with various neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Alzheimer's diseases and motor neuron disease as well. LC-MS/MS analyses disclosed that in NNC, there are significant differences in lipids profiles with age and gender, which be very important for future evaluation of their comparison with disease patients. Moreover, we identified disease specific lipidomic profiles for each diseases.

研究分野：神経内科学

キーワード：AD PD -synuclein Tau蛋白 アミロイド 糖脂質 脂質ラフト 神経栄養因子受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ごく最近の研究から遺伝性痙性麻痺、遺伝性感覚ニューロパチーtype 1、脊髄性筋萎縮症、AD、PDなどの患者組織では糖脂質(glycosphingolipids;GSL)などの異常が見出され、GSL異常がこれら疾患の病因・病態形成の少なくとも modulator の役割を担っている事実が明らかとなっている (Dawkins et al. **Nat Genet** 2001, Zhou J et al. **Am J Hum Genet** 2012, Boukhris et al. **Am J Hum Genet** 2013, Martin et al. **Am J Hum Genet** 2013, Mutoh T et al. **FASEB J** 2012, Michelle M et al. **PlosOne** 2013). 従って、これら神経疾患では、こうしたGSLの異常によりこれら **GSLによる蛋白修飾**にも種々の異常が生じている可能性が高い。更に、細胞膜に存在する膜蛋白は周囲に存在する糖脂質により複雑な制御を受けている実態を我々の報告を含め明らかにしてきた。こうした**糖脂質による蛋白修飾**の実態は、加齢の影響を受け易い脂質が神経変性疾患の病態発生にも深く関与すると想定されるが、こうした観点での知見は非常に乏しいのが現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、こうした課題に焦点を当て、パーキンソン病(PD)、アルツハイマー病(AD)の各々原因蛋白のアミロイド蛋白(A $\beta$ )、 $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn)、タウ蛋白(tau)と Trk 神経栄養因子受容体(Trk)や NMDA 受容体(NMDAR)などの膜蛋白を対象にこれら疾患で、**糖脂質による蛋白修飾の実態とその異常**が如何に病態形成に関わるのかを解明し、脂質を利用した新規治療法開発目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、**糖脂質による蛋白修飾**の実態把握とその生物学的意義を明らかにすることを目的することから、**A)** A $\beta$ 、 $\alpha$ -syn、tau 各蛋白の特異的抗体を用いてその associate している糖脂質、脂質の同定とそれらの結合部位の解明を試みる。これには我々が既に GM1 による Trk の糖脂質修飾発見で用いた手法を応用して行う。**B)** こうして同定された各糖脂質が各々疾患で如何なる異常が存在するのか否かを実際の患者試料を用いて検討する。**C)** さらに、蛋白の糖脂質修飾の意義を解明するため結合部位を欠く変異蛋白を作成し、その細胞生物学的影響を明らかにする事を通じ、各疾患に於ける糖脂質による蛋白修飾の意義解明を行うと共にこうした異常の是正を目指した新たな治療法開発の可能性を探りたい

## 4. 研究成果

先ず、Trk と GM1 の Trk 内結合部位に関して、同受容体の様々ない deletion mutant を作成し、1) 結合の有無、2) 結合が消失する変異 Trk を発現する stable transfectant を作成し、GM1 による Trk 蛋白の修飾が、如何なる細胞生物学的影響を与えるか検討したところ、このような変異 Trk を発現する細胞では、リガンドである神経成長因子(NGF)のシグナルが細胞内伝達されなくなるを見出した。さらに、LC-MS/MS を用いた神経変性患者脳脊髄液の糖脂質などのリポドミクスの解析を行った結果、神経難病患者では、各疾患特異的糖脂質異常が存在する事を見出し、新たな病院論的展開の契機となった。現在、この成果は数編の論文を準備中で、この成果を広く世界に発信していきたいと思っています。

## 5. 主な発表論文等

- Fukui T, Ueda A, Murate K-I, C, Ito S, Asakura K, **Mutoh T**. Depressive state as an initial symptom for subdural abscess. **Neurol Clin Neurosci**. 2016 4;1:31-3
- Takeuchi Y, Ueda M, Ochiai J, Mabuchi C, Shima S, **Mutoh T**. Case of limbic encephalitis with anti-neutral glycosphingolipid antibodies. **Neurol Clin Neurosci**. 2016 4;2:70-72
- Mizuma A, Yamashita T, Kono S, Nakayama T, Baba Y, Itoh S, Asakura K, Niimi Y, Asahi T, Kanemaru K, **Mutoh T**, Kuroda S, Kinouchi H, Abe K, Takizawa S.  
Phase II Trial of Intravenous Low-Dose Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Acute Ischemic Stroke. **J Stroke Cerebrovasc Dis**. 2016 25(6):145-7
- Kawabe M, Tachi R, Hideyama T, Yagi M, Kishida Y, Maekawa R, Shima S, **Mutoh T**, Shiio Y. Relapsing polychondritis-associated limbic encephalitis preceding the emergence of systemic inflammation. **Neurol Clin Neurosci**. 2016 4;4:162-4
- Hayashi K, Hamano T, Kawamura Y, Kimura H, Matsunaga A, Ikawa M, Yamamura O, **Mutoh T**, Higuchi I, Kuriyama M, Nakamoto Y.  
Muscle MRI of the Upper Extremity in the Myotonic Dystrophy Type 1. **Eur Neurol**. 2016

Kawai H, Morimoto S, Takakuwa Y, Ueda A, Inada K, Sarai M, Arimura T, **Mutoh T**, Kimura A, Ozaki Y. Hypertrophic Cardiomyopathy Accompanied by Spinocerebellar Atrophy With a Novel Mutation in Troponin I Gene. **Int Heart J**. 2016 57(4):507-10

Ito S, Ueda A, Murate K, Hirota S, Fukui T, Ishikawa T, Shima S, Hikuchi C, Mizutani Y, Kizawa M, Asakura K, **Mutoh T**. Differentiation of cancer from atrial fibrillation in patients with acute multifocal stroke. **J Neurol Sci**. 2016 368:344-8

**Mutoh T.**

Current Understanding of Immunopathogenesis of Parkinson's Disease. **Austin J Clin Neurol**. 2016 3(3): id1097 (2016)

Ishikawa T, Asakura K, Mizutani Y, Ueda A, Murate K, Hikuchi C, Shima S, Kizawa M, Komori M, Murayama K, Toyama H, Ito S, **Mutoh T**. MR neurography for the evaluation of CIDP. **Muscle & Nerve**. 2017 55(4):483-489

Niimi Y, Ito S, Murate K, Hirota S, Hikuchi C, Ishikawa T, Maeda T, Nagao R, Shima S, Mizutani Y, Ueda A, **Mutoh T**. Usefulness of combining 123I-FP-CIT-SPECT striatal asymmetry index and cardiac 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy examinations for diagnosis of parkinsonisms. **J Neurol Sci**. 2017 15;377:174-178

Kuwabara S, Mori M, Misawa S, Suzuki M, Nishiyama K, **Mutoh T**, Doi S, Kokubun N, Kamijo M, Yoshikawa H, Abe K, Nishida Y, Okada K, Sekiguchi K, Sakamoto K, Kusunoki S, Sobue G, Kaji R. Intravenous immunoglobulin for maintenance treatment of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a multicentre, open-label, 52-week phase III trial. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 2017 88(10):832-838

Ueda A, Nagao R, Maeda T, Kikuchi K, Murate K, Niimi Y, Shima S, **Mutoh T**. Absence of serum anti-NMDAR antibodies in anti-NMDAR encephalitis mother predicts having healthy newborn. **Clin Neurol Neurosurg**. 2017 161:14-16

Yamagishi Y, Suzuki H, Sonoo M, Kuwabara S, Yokota T, Nomura K, Chiba A, Kaji R, Kanda T, Kaida K, Ikeda SI, **Mutoh T**, Yamasaki R, Takashima H, Matsui M, Nishiyama K, Sobue G, Kusunoki S. Markers for Guillain-Barré syndrome with poor prognosis: a multi-center study. **J Peripher Nerv Syst**. 2017 Dec 22(4):433-439

Ueda A, Shima S, Murate K, Kikuchi K, Nagao R, Maeda T, Muto E, Niimi Y, Mizutani Y, **Mutoh T**. Anti-GM1 ganglioside antibodies modulate membrane-associated sphingomyelin metabolism by altering neutral sphingomyelinase activity. **Mol Cell Neurosci**. 2018 89:42-48

Ito S, Kikuchi K, Ueda A, Nagao R, Maeda T, Murate K, Shima S, Mizutani Y, Niimi Y, **Mutoh T**: Changes in serial D-dimer levels predict the prognoses of trousseau's syndrome patients. **Front Neurol** 9: doi: 10.3389/fneur.2018.00528, 2018

Saito K, Toru S, Shima S, **Mutoh T**: Anti-neutral glycolipids antibody-positive combined central and peripheral demyelination mimicking encephalomyeloradiculoneuropathy phenotype. **Clin Neurol Neurosurg** 172: 90-92, 2018

Murate K, Mizutani Y, Maeda T, Nagao R, Kikuchi K, Shima S, Niimi Y, Ueda A, Ito S, **Mutoh T**. A Patient With Thiamine Deficiency Exhibiting Muscle Edema Suggested By MRI. **Front Neurol** <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.01083>, 2018

Niimi Y, Ito S, Mizutani Y, Murate K, Shima S, Ueda A, Satake W, Hattori N, Toda T,  
**Mutoh T**. Altered regulation of serum lysosomal acid hydrolase activities in Parkinson's  
disease: A potential peripheral biomarker? **Parkinsonism Relat Disord** 61: 132-137,  
2019, S1353-8020(18)30468-1 doi:10.1016 2019

Harada M, Miura S, Kida H, Taiga M, Irie K-I, Kamada T, Uchiyama Y, Shima S, **Mutoh T**,  
Hoshino T, Taniwaki T. Reversible Conduction Failure in Anti-Lactosylceramide  
Antibody-Positive Combined Central and Peripheral Demyelination. **Front Neurol** (2019)  
(in press)

〔雑誌論文〕(計 **18** 件)

上記に記載済

〔学会発表〕(計 **43** 件)

〔図書〕(計 **1** 件)

Mizutani Y, Niimi Y, **Mutoh T**. Better neuroradiological approach for the diagnosis of  
early stage Parkinson's disease patients. **The Neuroscience of Parkinson's disease**  
**2019** (in press)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：朝倉邦彦 (平成 **28** 年 9 月に削除済)

ローマ字氏名： アサクラクニヒコ

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：医学部

職名：臨床教授

研究者番号 (**8** 桁): **50333159**

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。