様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ５ 月 ２５ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2019
課題番号：１６Ｋ１９５１２

研究課題名（和文）α-synuclein変異体とオリゴデンドロサイトへの輸送・凝集体形成能の解析

研究課題名（英文）Structurally distinct alpha-synuclein fibrils induce robust Parkinsonian pathology

研究代表者

早川　英規（Hayakawa, Hideki）

大阪大学・医学系研究科・特任研究員

研究者番号：７０４６８５９４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は本邦から報告のある早期発症で重篤な運動症状、認知機能低下、精神症状を呈する家族性PDの一つであるG51D αsyn変異に着目し、このタンパク質を繊維化(αsyn fibril)し、脳内投与マウスモデルの検討を行った。このマウスモデルは従来の野生型αsyn fibrilマウスモデルと比較し、強いp-αsyn陽性凝集体形成と緩徐進行性の黒質DA神経細胞の変性を示した。またαsyn凝集体を貪食したミクログリアやオリゴデンドロサイトにαsyn凝集を認めた。(Hayakawa H,et al. Movement disorders.2019)。

研究成果の学術的意義や社会的意義
パーキンソン病(PD)は神経変性疾患の中でアルツハイマー病についで2番目に多く、高齢化社会を迎える本邦に限らず、世界的に患者数の増加が予想される。現状では有効な予防法や根治療法はなく、その病態の解明と治療法の開発は医学研究の急務となっている。PDの治療研究における問題点は、病態を反映した優れたPDモデルが無いことであった。そのために、治療開発が大きく遅れており、その開発が急務である。我々は変異αシヌクレイン(αsyn) fibrilを用い、リン酸化αsyn(p-αsyn)凝集と黒質ドパミン(DA)神経細胞の変性脱落、それに伴う運動機能低下を有意に認める新規PDモデルマウスを作成し報告した。

研究成果の概要（英文）：Alpha-synuclein (α-syn) is a major component of Lewy bodies, which are the pathological hallmark in Parkinson's disease, and its genetic mutations cause familial forms of Parkinson's disease. Patients with α-syn G51D mutation exhibit severe clinical symptoms. We studied the mechanisms associated with severe neurotoxicity of α-syn G51D mutation using a murine model generated by G51D α-syn fibril injection into the brain. We found that G51D α-syn fibrils have higher β-sheet contents than wild-type α-syn fibrils. The addition of G51D α-syn fibrils to mammalian cells overexpressing α-syn resulted in the formation of phosphorylated α-syn inclusions at a higher rate. Similarly, an injection of G51D α-syn fibrils into the substantia nigra of a mouse brain induced more widespread phosphorylated α-syn pathology.

研究分野：パーキンソン病

キーワード：パーキンソン病　alpha-synuclein

※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。

１．研究開始当初の背景

多系統委縮症（MSA）はわが国の脊髄小脳変性症で最も多く厚生労働省の特定疾患に指定されている難病の一つである。臨床的には錐体路障害、錐体外路障害、小脳障害、自律神経障害、高次脳機能障害と多彩な症状を示す。また、病理学的にはパーキンソン病の原因因子の一つと考えられるα-synuclein（αsyn）がグリア細胞であるオリゴデンドロサイトに蓄積し GCI (Glial cell inclusions) 形成することを特徴とする。PD や MSA のようにαsyn を共通の病態因子とする疾患概念としてα-synucleinopathy という概念が提唱されているが PD と異なり薬物療法もほぼ無効で予後は 10 年以下と非常に厳しく、新たな治療法の開発に向けた研究進展が望まれている。

近年、MSA 患者脳から抽出したαsyn タンパクをαsyn Tg マウス脳内に投与し、αsyn タンパクの伝播を示した。また PD 患者から抽出した syn タンパクでは伝播を認めないことから MSA と PD におけるαsyn strains の違いが注目を集めている (AL Woerman et al. PNAS 2015) 。 MSA における GCI 形成はその病態理解に極めて重要な知見であるが、その分子基盤は明らかでない。しかし、元来αsyn はヒトでは神経細胞には豊富に存在するがグリア細胞には発現はほとんど認められていない。つまり GCI 形成の機序として何らかの病的状態によりオリゴデンドロサイトでの異常αsyn の伝播、αsyn 産生増加、もしくは外部からの取り込み増加が考えられる。文献的にもオリゴデンドロサイトでのαsyn の産生は少なく MSA 死後脳でもαsyn mRNA 発現は変化がない事からオリゴデンドロサイトでの取り込みが主因となっていると考えられる。

２．研究の目的

多系統委縮症（MSA）剖検脳においてαsyn の伝播が証明された（Prusiner SB, et al. PNAS 2015）。我々は、すでに詳細な病理学的解析から神経細胞死が生じる前にオリゴデンドロサイト内でαsyn の蓄積を認めること、Calbindin-D28k、DARPP-32 の発現低下部位から発症することを発見し、報告した(Hayakawa et al. J Neural Transm. 2013)。家族性パーキンソン病においても、いくつかの変異αsyn においては特異的に GCI が認められることに着目し、本課題においては動物モデルを作成し、変異αsyn のオリゴデンドロサイトでの GCI 形成の分子基盤を明らかにすることを目的とする。

３．研究の方法

1）in vitro でのαsyn のオリゴデンドロサイトへの取り込みと機能解析

培養細胞系に対してαsyn 変異型を用いて取り込み後の GCI 形成能の変化などの解析。神経細胞から神経細胞、また神経細胞からオリゴデンドロサイト間でのαsyn の伝播、取り込み、蓄積について検証した。ヒトオリゴデンドロサイト培養系である KG1C 細胞系を用い、（Hasegawa et al. Neurochem Int 2010） WTαsyn を導入した stable cell line を作製し、細胞内局在の違いを免疫組織化学的に評価する。

2）in vivo でのαsyn のオリゴデンドロサイトへの取り込みと機能解析

パーキンソン病では一般的に GCI は認めないが家族性パーキンソン病でのαsyn ミスセンス変異のうち G51D, A53E で 2 つのミスセンス変異では GCI を認める。これは通常では起こらないαsyn の神経細胞からオリゴデンドロサイトへの伝播、もしくはオリゴデンドロサイトでのαsyn の蓄積がその変異型特異的に惹起されることを強く示唆する。

我々は本邦から報告のある早期発症で重篤な運動症状、認知機能低下、精神症状を呈する家族性パーキンソン病の一つである G51D αsyn 変異に着目し、このタンパク質を繊維化(αsyn fibril)

し、脳内投与マウスモデルの検討を行った。

４．研究成果

1) in vitro でのαsyn のオリゴデンドロサイトへの取り込みと機能解析

αsyn fibril を SH-syn 細胞に添加することで syn 陽性ユビキチン陽性の凝集体を認めた。 また直接培養(neuron to neuron)において fibril を導入することで syn 凝集体の SH-EGFP 細胞内への伝播を認めた。 KG1C と直接培養した fibril を導入した SH-syn 細胞では、neuron to neuron で見られた syn の凝集体は少なかった。fibril 導入した SH-syn と co-culture した KG1C 細胞において内因性 syn が無いにも関わらず、細胞質内に Syn 凝集を認めた。今回使用した直接培養、2層培養系の2つの細胞モデルはドナー細胞からレシピエント細胞への syn の伝搬を示した。直接培養系や外部からの syn タンパクが neuron やオリゴデンドログリアモデル細胞に取り込まれることはすでに報告されている。 (M Konno et al. Mol Neurodegener 2012, JF Reyes et al. GLIA 2013).

今回我々の示した 2 層で培養された間接的な 2 つの細胞間での syn の伝播は、パーキンソン病や MSA の発症及び進展の機序に加え薬剤治療効果、細胞毒性を検討する上で重要である。

2) in vivo でのαsyn のオリゴデンドロサイトへの取り込みと機能解析

この G51D マウスモデルは従来の野生型αsyn fibril マウスモデルと比較し、線条体、皮質、黒質により多くのリン酸化 syn 病理を示し、24 週後では対側への広がりを認める。 また WT αsyn fibril マウスの黒質線条体では、ドーパミンニューロンの減少は検出されなかった。G51D αsyn fibril マウスでは、12 週目に神経変性はなかったが、24 週目に SN でドーパミンニューロンの減少を認め、線条体において TH 陽性線維も減少を示した。G51Dαsyn fibril マウスはドーパミンニューロン減少に伴い、アポモルヒン誘導回転試験において運動機能障害を示した。また多くのドーパミンニューロンや Tuj1 陽性神経細胞においてαsyn 凝集体を認めたが、ミクログリアやオリゴデンドロサイトにおいてもαsyn 凝集を認めた。この結果は、αsyn 凝集が神経細胞だけでなくグリア細胞にも何らかの影響を与える事を強く示唆する。G51D αsyn fibril 投与において、まず最初に強力な α-syn 病変を示し、続いて進行性の神経細胞死を示すことを実証した。この研究で示した黒質への G51D αsyn fibril モデルは、レビー小体様凝集体の形成、黒質におけるドーパミン作動性ニューロンの進行性変性および付随する運動障害などの PD の多くの特徴を再現する。この新しい PD マウスモデルは、PD の病理学的メカニズムを明らかにし、新しい治療薬を開発するための非常に強力なツールになると考えられる。 (Hayakawa H, et al. Movement disorders.2019)。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　2件／うちオープンアクセス　2件）

１．著者名 Uenaka Takeshi、Satake Wataru、Cha Pei-Chieng、Hayakawa Hideki、Baba Kousuke、Jiang Shiying、Kobayashi Kazuhiro、Kanagawa Motoi、Okada Yukinori、Mochizuki Hideki、Toda Tatsushi	４．巻 27
２．論文標題 In silico drug screening by using genome-wide association study data repurposed dabrafenib, an anti-melanoma drug, for Parkinson's disease	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Human Molecular Genetics	６．最初と最後の頁 3974-3985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddy279	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 早川　英規	４．巻 42
２．論文標題 パーキンソン病の動物モデル	５．発行年 2017年
３．雑誌名 オベリスク	６．最初と最後の頁 24-32
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 Hayakawa H, Nakatani R, Ikenaka K, Aguirre C, Choong CJ, Tsuda H, Nagano S, Koike M, Ikeuchi T, Hasegawa M, Papa SM, Nagai Y, Mochizuki H, Baba K.	４．巻 35
２．論文標題 Structurally Distinct α-Synuclein Fibrils Induce Robust Parkinsonian Pathology	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Movement Disorders	６．最初と最後の頁 256-267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mds.27887.	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

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 Hideki Hayakawa
２．発表標題 I Intranigral inoculation of Parkinson's disease linked mutation G51D alpha-synuclein firbils induces Lewy-like pathology in mice
３．学会等名 IAPRD2018（国際学会）
４．発表年 2018年

１．発表者名
早川　英規

２．発表標題
野生型及び変異α synuclein 凝集体の分子特性に関する in vitro 及び in vivo での比較検討

３．学会等名
第12回パーキンソン病・運動機能コングレス

４．発表年
2018年

１．発表者名
Hideki Hayakawa

２．発表標題
In vitro assessment of extracelluler alpha-synuclein secration

３．学会等名
World congress of neurology 2017

４．発表年
2017年

１．発表者名
早川英規

２．発表標題
Establishment of in vitro model to elucidate mechanism u nderlying propagation of alpha-synuclein

３．学会等名
第57回日本神経学会学術大会

４．発表年
2016年

１．発表者名
早川英規

２．発表標題
培養細胞系におけるαsynuclein伝播、凝集モデルの確立

３．学会等名
第10回パーキンソン病・運動障害疾患コングレス

４．発表年
2016年

１．発表者名 Hideki Hayakawa
２．発表標題 In vitro assessment of extracellular alpha-synuclein secretion
３．学会等名 NEURO2019
４．発表年 2019年

〔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