

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：84425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01387

研究課題名(和文) 脳内リンパ系新規バイオマーカーの確立とパーキンソン病生体リズム治療への応用

研究課題名(英文) Novel biomarkers of glymphatic systems and the application of them to biological therapy in Parkinson disease

研究代表者

遠藤 卓行 (ENDO, TAKUYUKI)

独立行政法人国立病院機構大阪刀根山医療センター(臨床研究部)・独立行政法人国立病院機構大阪刀根山医療センター・研究員(移行)

研究者番号：40573225

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)：脳内リンパ系は睡眠中に活性化することから、パーキンソン病の睡眠障害治療としての高照度光療法は、脳内リンパ系活性化を介して生体リズム改善をもたらしている可能性がある。本研究では、毛根細胞の採取による時計遺伝子発現リズムの評価により、高照度光療法後に睡眠が改善したほとんどのパーキンソン病患者は時計遺伝子の概日リズムが偏移しており、睡眠の改善と相関することを明らかにした。また、ヒトの概日リズムを制御している視交叉上核の神経に慢性ドーパミン刺激を与えると、時計遺伝子発現の自律振動が急速に減衰することを証明した。時計遺伝子発現の概日リズム評価は、高照度光療法の最適化に応用できるバイオマーカーである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高照度光療法は、パーキンソン病患者さんの睡眠を改善するための有望な治療法であり、その改善のメカニズムは、概日リズムの回復が原因である可能性がある。私たち生物は光とともに進化してきた。日の当たらない生活で、病気そのもので、薬剤で、老化などで、概日リズムが悪化する。この研究は薬剤で引き起こされる概日リズムの異常を光で訂正できることを示した世界で初めての報告である。この治療法が睡眠の質と量を改善し、脳内リンパ系を活性化することでパーキンソン症状が改善するのであれば、同様のメカニズムでアルツハイマー病など他の神経疾患の治療にも応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Since the intracerebral lymphatic system is activated during sleep, high-intensity phototherapy as a treatment for sleep disorders in Parkinson's disease may bring about improvement in biological rhythm through activation of the intracerebral lymphatic system. In this study, by evaluating the clock gene expression rhythm by collecting hair root cells, most Parkinson's disease patients whose sleep improved after high-intensity phototherapy had a shift in the circadian rhythm of the clock gene, which correlated with the improvement in sleep. Clarified to do. We also demonstrated that chronic dopamine stimulation to the nerves of the suprachiasmatic nucleus, which controls human circadian rhythm, rapidly attenuates the autonomous oscillations of clock gene expression. Circadian rhythm evaluation of clock gene expression is a biomarker that can be applied to the optimization of high-intensity phototherapy.

研究分野：神経内科学

キーワード：生体制御治療

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 脳には長年リンパ系は存在しないと思われていたが、最近脳内の小分子老廃物を排出する **Glymphatic システム(GS)**が発見され、パーキンソン病 (**PD**)やアルツハイマー病などの不溶性蛋白排出経路として注目されている。**GS**は睡眠中に活性化することから、我々がこれまでに確立してきた **PD** に対する高照度光療法 (**Bright Light Therapy=BLT**)は、**GS** 活性化を介して生体リズム改善→睡眠の改善→運動の改善をもたらしている可能性が想定される。

(2) **BLT**が睡眠の質と量を改善し **GS**を活性化することで **PD**の症状が改善するのであれば、同様のメカニズムでアルツハイマー病など他の神経疾患の治療にも **BLT**が応用できる筈である。また、**BLT**の効果が不十分な患者について、**GS**が活性化するように照射の時間や強さを最適化する治療プロトコルを立てることで、より多くの患者に運動改善の治療効果を得られると考えられる。本研究では、**PD**患者における **GS**の障害を評価できる日内変動バイオマーカーを確立し、**BLT**の最適化を目指す。

### 2. 研究の目的

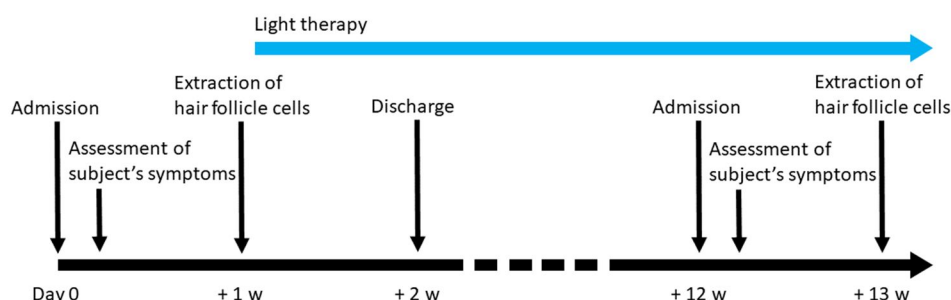
(1) ドーパミン製剤による治療を受けた **PD** 患者における **BLT** を介した睡眠の改善が中枢概日時計の機能変調を伴うかどうか、およびドーパミン製剤によって誘発される視交叉機能不全がこれらの患者の睡眠の問題の原因であるかどうかを検証した。これを行うには、メラトニン分泌の概日段階の前進と、ドーパミン治療を受ける **PD** 患者の早朝覚醒の頻度の増加を考慮して、夜の **BLT** が睡眠の問題に及ぼす影響を調査した。同時に、毛包を使用して末梢時計遺伝子発現リズムを検出することにより、夜間 **BLT** が概日相に及ぼす影響を確認し、概日周期の推定値と睡眠改善を比較した。さらに、視交叉上核機能への慢性ドーパミン曝露の負の影響に関する証拠を得るために、マウス視交叉上核 (**SCN**) の *ex vivo* 培養と、ドーパミンによる慢性治療下での時計遺伝子発現リズムのリアルタイム監視を行った。

(2) 脳内リンパ系新規バイオマーカーの探索  
上記のプロトコルにおいて、**BLT** 実施前後の血清生化学データから、毛根による時計遺伝子リズムと同時に **GS** の新規バイオマーカーを確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) **PD 患者の睡眠に対する BLT の有効性と概日リズム評価 (引用文献、 )**

**16**名の **PD** 患者 (男性 **6**名、女性 **10**名; **52**~**80**歳) について **BLT** を実施した。Figure 1 に示すように、被験者の毎日のスケジュールは入院によって管理された (起床時間 **6:00**、朝食 **8:00**、昼食 **12:00**、夕食 **17:30**、就寝時間 **22:00**)。被験者は **UPDRS** パート III によるパーキンソン症状の評価、エプワース睡眠スケール (**ESS**) およびパーキンソン病睡眠スケール **2** (**PDSS-2**) を使用して睡眠状態を評価された。入院後 1 週間、このスケジュールを守った上で、約 **6** 時間間隔で毛包 (毛髪または髭) を採取された。その後被験者は、**50cm** の距離で **5,000** ルクスとなる白色光を使用して、**1**日 **1**回、夕方の時間帯 (**19:00-21:00**) に **1**時間明るい光を照射された。**BLT** は、合計約 **3** か月間毎日行われた (最初の入院中は **1** 週間、退院後は自宅で **10** 週間以上、再入院中は **1** 週間。再入院後も、同様に臨床評価、睡眠評価を行い、1 週間入院でのスケジュールに管理された後、毛包を採取された。



**Figure 1** 研究デザインの概要 (PD 患者への **BLT** 治療による時計遺伝子発現の評価)

毛包の採集は、ピンセットで毛幹をつかんで引っ張ることにより行なわれ、**Lysis Solution (RNAqueous-Micro Kit; Thermo Fisher Scientific, U.S.A.)** にすばやく浸した。毛幹に付着した毛包細胞を、**RNA** 精製まで **-20** で保存した。各サンプリングタイムポイントで時計遺伝子の発現を検出するには、約 **2**~**10** 個の頭皮の毛包が必要であった。**RNA queous-Micro Kit** を凍結細胞溶解液とともに使用して、トータル **RNA** を精製した。**NanoDrop (LMS、日本)** を使用して品質と濃度を確認した後、**SuperScript VILO cDNA 合成キット (Life Technologies、米国)**

を使用してトータル RNA を逆転写し、TaqMan MGB プローブと逆転写産物の 1/20 量を用いてリアルタイム PCR を実行した。データは PRISM7300 (Applied Biosystems, U.S.A.) を使用して取得し、18S リボソーム RNA (18S-rRNA) で修正した。時計遺伝子として知られている Per3、Nr1d1、Nr1d2 および 18S-rRNA 転写産物のプライマーとプローブを用いた。

遺伝子発現データの時間経過は、振幅が 1 の 24 時間周期のコサインカーブに適合するように正規化された。時間 t での正規化された遺伝子発現は、それぞれ Per3、Nr1d1、および Nr1d2 の  $x(t)$ 、 $y(t)$  および  $z(t)$  として表された。次に、これら 3 つの遺伝子の発現データを、Per3 と Nr1d1 の間の位相差と Per3 と Nr1d2 の間の位相差がそれぞれ  $y$  と  $z$  であるという制約の下で、次の 24 時間コサイン曲線に適合させた。

$$\begin{aligned} x(t) &= A_x \cos(t + \phi_x) + C_x(1) \\ y(t) &= A_y \cos(t + \phi_y) + C_y(2) \\ z(t) &= A_z \cos(t + \phi_z) + C_z(3) \end{aligned}$$

**Per2-luciferase** ノックインマウス (Per2Luc マウス) を 12 時間/12 時間の明暗サイクル (午前 9 時に点灯) に維持し、食物と水に自由にアクセスできるようにした。SCN (300~400 $\mu$ m 厚) を含む冠状脳スライス、ピプラトームを使用して、成体の Per2Luc マウスから調製された。ペアになった SCN を冠状脳スライスから切除し、100 $\mu$ M ルシフェリンを含む培地で満たされた、カバーされ密封された培養皿の培養膜 (Millicell-CM; Merck, Germany) に配置した。生物発光は、光電子増倍管 (LM2400、浜松、日本) を使用してリアルタイムで測定された。データセットは、生データから 24 時間の移動平均を差し引くことでトレンド除去された。シングルニューロンイメージングを実行するには、生細胞イメージング用に最適化された発光顕微鏡 (LV200; オリンパス、日本) を使用した。

## (2) 脳内リンパ系新規バイオマーカーの探索

BLT 実施前後の血清生化学データから、BLT 前後で変動がみられる項目を検索した。

### 4. 研究成果

#### (1) PD 患者の睡眠に対する BLT の有効性と概日リズム評価 (引用文献、)

Figure 1 に示したスケジュールで BLT を 12 週間実施し、その前後で睡眠は、エプワース眠気スケール (ESS) およびパーキンソン病睡眠スケール 2 (PDSS-2) を使用して評価された。UPDRS パート III と ESS スコアに有意な変化は見られなかったが、PDSS-2 スコアでは、睡眠に有意な改善を認めた (Table 1)。BLT 前後の PDSS-2 の各項目の統計的比較により、夜間頻尿と腕または脚の痛みの 2 つの項目で有意な改善が明らかになった。BLT の有効性に対する加齢の影響を調べるために、PD 患者を若年グループと高齢グループ (n = 8 ずつ) に分け、統計分析を行なうと、BLT が若年グループでのみ PDSS スコアの統計的に有意な改善を認めた。これらの結果は、BLT がドーパミン治療を受けている PD 患者の睡眠障害の有望な治療法であることを示している。

Table 1 PD 患者の臨床症状と睡眠に対する BLT の影響

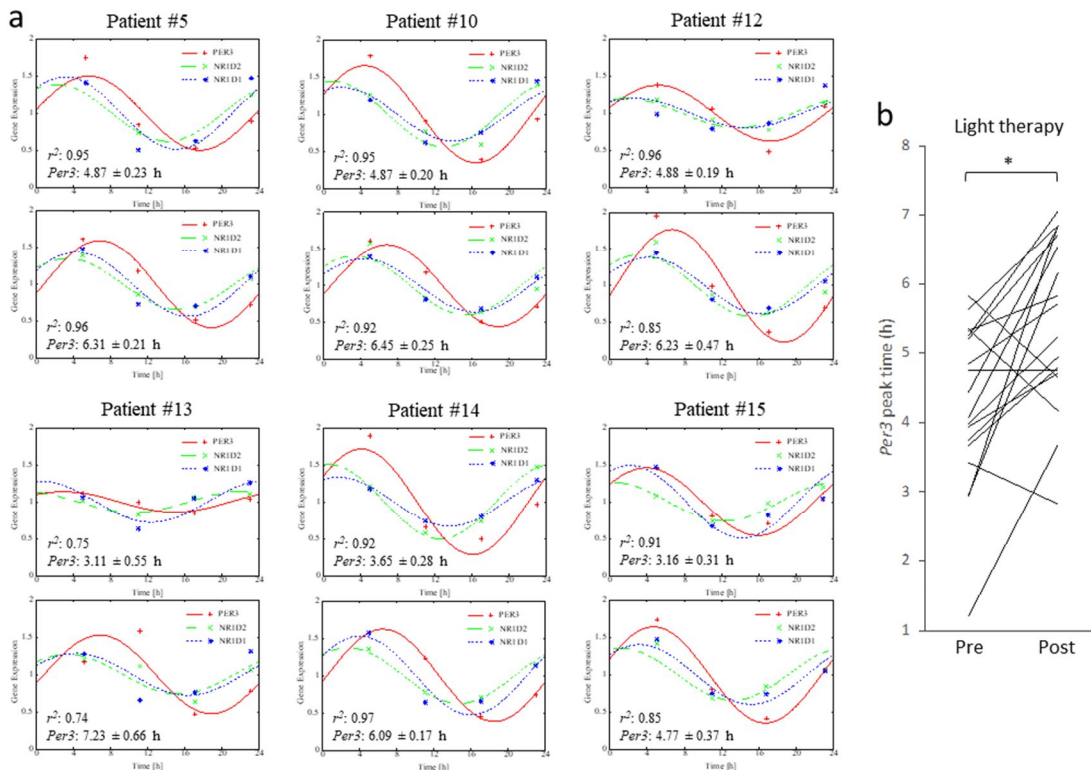
Effects of LT on Parkinson's disease severity and sleep	Mean (SD)		P Value
	Before LT	+12w LT	
UPDRS part III score	22.31(8.90)	22.64(8.33)	.970/ .599/ .792
ESS score	7.94(3.97)	7.56(3.61)	.663/ .492/ .958
PDSS-2 score	20.56(8.65)	14.56(7.87)	.038/ .007/ .371
#1 Overall sleep	2.19(1.38)	1.44(1.26)	.098/ .045/ .553
#2 Difficulty falling asleep	1.88(1.31)	1.13(1.36)	.091/ .615/ .554
#3 Difficulty staying asleep	3.00(1.59)	2.88(1.31)	.662/ .601/ .954
#4 Restlessness of legs or arms	1.44(1.36)	0.75(1.39)	.068/ .077/ .462
#5 Urge to move legs or arms	1.13(1.36)	1.06(1.48)	.770/ .502/ .909
#6 Distressing dreams	0.63(1.02)	0.38(0.62)	.730/ .350/ .573
#7 Distressing hallucinations	0.63(1.20)	0.25(0.45)	.582/ 1.00/ .488
#8 Nocturia	3.25(1.13)	2.38(1.31)	.044/ 253/ .103
#9 Immobility in bed	1.44(1.71)	0.94(1.29)	.473/ .856/ .508
#10 Pain in arms or legs	1.19(1.52)	0.19(0.40)	.019/ .052/ .212
#11 Muscle cramps in arms and legs	0.75(1.34)	0.38(1.03)	.261/ .349/ .587
#12 Morning dystonia	0.75(1.24)	0.63(1.09)	.913/ 1.00/ .904
#13 Morning tremor	0.31(0.60)	0.25(0.68)	.488/ .700/ .643
#14 fatigue and sleepiness in the morning	1.75(1.44)	1.31(1.25)	.394/ .698/ .546
#15 Snoring and difficulties of breathing	0.25(0.58)	0.44(1.09)	.934/ .587/ .706

\* All: All subjects, Younger: Subjects between the ages of 52 and 65, Older: Subjects between the ages of 66 and 80

我々の知る限り、BLT が PD 患者の睡眠の問題を改善する生理学的メカニズムに関する実験データを報告した研究はない。睡眠

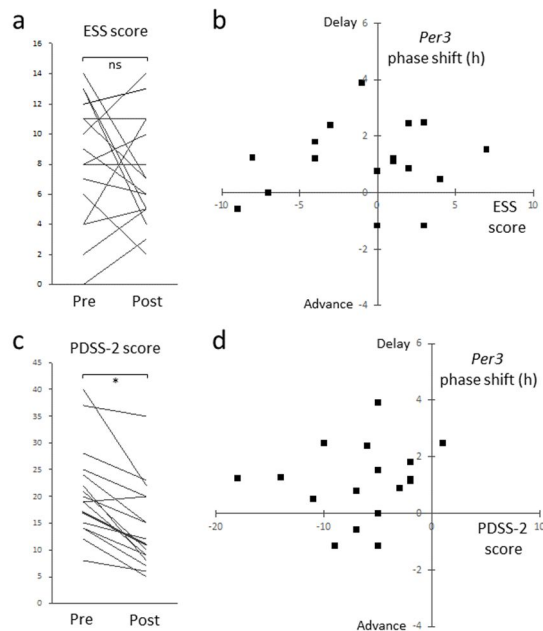
は、恒常性と概日機能の両方によって調節されているが、BLT が概日経路を介して睡眠を改善するという仮説に基づいて、PD 患者の概日機能に対する BLT の効果を評価した。SCN、視床下部にある中枢時計を機能的に評価することは技術的に非現実的であるため、毛包を用いて末梢時計の遺伝子発現を測定・評価することで、概日機能に対する BLT の効果を調べた。BLT 前後の毛包採取のスケジュールを Figure 1 に示す。ドーパミン治療を受けた 6 人の PD 患者の代表的な時計遺伝子発現リズムを Figure 2a に示す。3 つの時計遺伝子 (Per3、Nr1d1、Nr1d2) の発現レベルを半定量化した。概日相を確実に推定するには 6 時間間隔のサンプリングで十分であることを示した以前の報告があることから、3 つの時計遺伝子の発現レベルに基づいて末梢の概日相の数学的推定を行った。BLT 前後の Per3 ピーク時間の比較 (Figure 2a、それぞれ上部と下部のパネル) は、末梢概日相の遅延を明らかにした。Per3 の推定ピーク時間の決定係数

$r^2$  と 95%信頼区間は、コサインカーブフィッティングが成功したことを示す指標として図に示されている。光入力に対する標準的なヒト概日位相応答曲線から予想されるように、これらの結果は、時計遺伝子発現リズムが、夜にBLTを受けたPD患者の78%で概日位相遅延を示したことを示している (Figure 2b)。まとめると、これらの結果は、BLTが実際にドーパミン治療を受けているPD患者の概日時計に作用し、その機能的特性を調節することを示している。



**Figure 2 PD 患者の末梢時計遺伝子発現に対するBLTの効果**

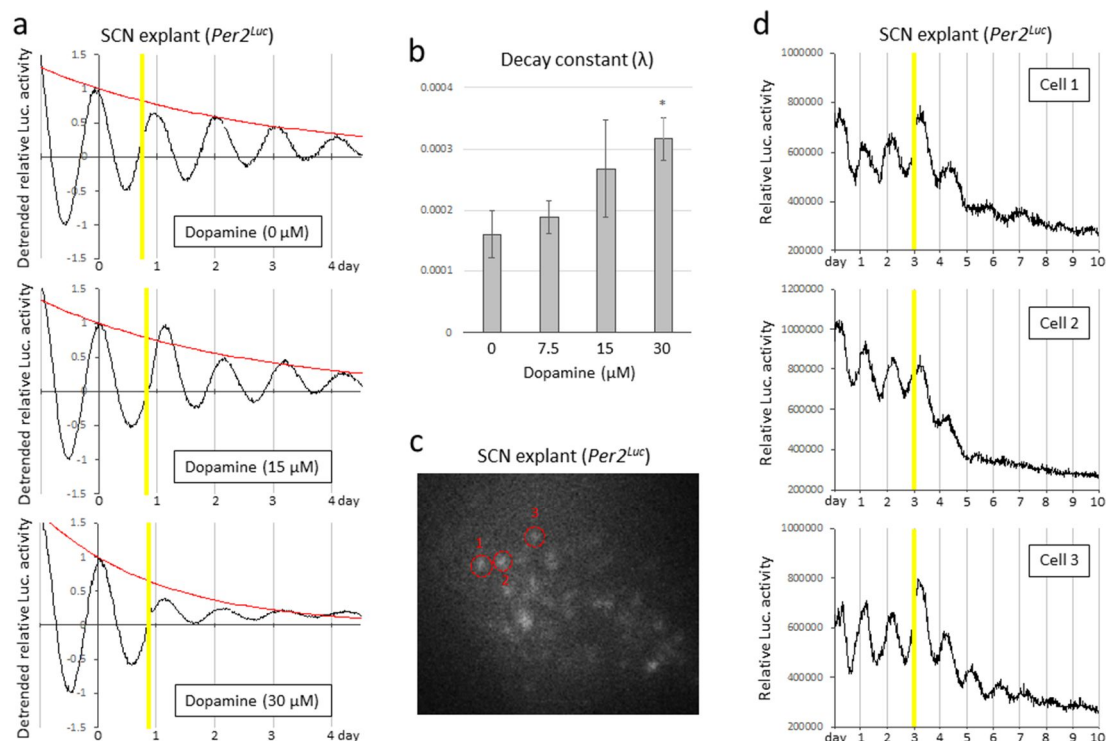
次に、BLTを受けたPD患者の概日変動と睡眠改善との関連を評価するために、BLT誘発変化、すなわち、時計遺伝子発現の概日相の変化と睡眠問題の重症度の変化の相関を調べた (Figure 3)。BLTを受けたPD患者ではESSを使用しても睡眠の有意な改善は検出されず (Figure 3a)、ESSスコアの変化と時計遺伝子発現の概日相の変化の2次元プロットは、これらのパラメーター間に明確な相関関係を示さなかった (Figure 3b)。対照的に、PDSS-2を使用すると、1人の患者を除いて、睡眠の有意な改善が検出された (Figure 3c)。さらに、PDSS-2スコアの変化対時計遺伝子発現の概日相の変化の2次元プロットは、これらのパラメーター間の明確な相関関係を示した (Figure 3d): 睡眠が改善したPD患者の75%は時計遺伝子発現の概日位相の遅延を示した。因果関係は不明だが、概日時計の機能的変動は、ドーパミン治療を受けているPD患者におけるBLTを介した睡眠改善の潜在的なメカニズムであると推測される。



**Figure 3 PD 患者の時計遺伝子発現と睡眠改善との関係**

ドーパミン治療を受けているPD患者のSCNは、ドーパミン作動性刺激に慢性的にさらされている。慢性ドーパミン作動性刺激がSCNの機能に及ぼす可能性のある影響を実験的に評価するため、概日時計遺伝子発現に対するex vivo培養マウスSCNへの慢性ドーパミン曝露の影響を調べた (Figure 4)。Ex vivoで培養されたSCNにおける概日タンパク質Period2 (Per2)の発現の自律的概日リズムは、ホタルルシフェラーゼに融合したPer2を発現するノックインマウス (Per2Lucマウス)を使用してリアルタイムで検出できた。培養したSCNをドーパミンに慢性的に曝露すると、それぞれ15および30  $\mu\text{M}$ の濃度で生物発光リズムが強く減衰した (Figure 4a)。生物発光リズムの減衰の統計的有意性を評価するために減衰定数が計算され、有意な減衰が30  $\mu\text{M}$ の濃度で確認された (Figure 4b)。この減衰がSCNニューロン間の概日リズムの非

同期化に起因するのか、または個々のニューロンの概日振動の減衰に起因するのかを明らかにするために、単一ニューロンレベルで高感度イメージングを使用して、ドーパミンへの慢性曝露が生物発光の概日リズムに及ぼす影響を調べた (Figure 4c)。このデータは、培養した SCN を 30  $\mu\text{M}$  のドーパミンに慢性的に曝露すると、個々のニューロンで生物発光リズムが急速に減衰することを明確に示している (Figure 4d)。まとめると、これらの結果は、ドーパミンへの慢性曝露によって引き起こされる SCN の機能障害が、ドーパミン治療を受けている PD 患者で観察される睡眠の問題の根底にある可能性があることを示唆している。



**Figure 4** 概日遺伝子発現に対する SCN への慢性ドーパミン曝露への影響

## (2) 脳内リンパ系新規バイオマーカーの探索

上記の結果から、末梢時計遺伝子発現の概日リズム評価は、BLT の最適化に応用できるバイオマーカーである。毛包を使った簡便な方法で評価できるため、患者ごとに末梢時計遺伝子発現を調べ、BLT の効果を最適化するための照度、照射時間を設定できるオーダーメイド治療が可能となる。

これとは別に、12 例のパーキンソン病患者の生化学データより、甲状腺機能は正常ながら非常に高い TSH 値を示し、BLT を 3 ヶ月実施した後にその TSH 値が大幅に下降するという現象が一部にみられた。近年 TSH には長日刺激により下垂体隆起葉で産生される PT-TSH が存在することが指摘された (引用文献)。通常の甲状腺を刺激するホルモン PD-TSH とは糖鎖が異なり、PT-TSH はヒトにおいても存在し睡眠と関係する報告がある。今後、パーキンソン病患者における甲状腺ホルモン、特に PT-TSH の役割を検討し、脳内リンパ系のバイオマーカーとしての可能性を探る。

### < 引用文献 >

**Yamaguchi A, Tatsumoto M, Matsumura R, Endo T, Hirata K, Tokuda I, Akashi M. Normal peripheral circadian phase in the old-old with abnormal circadian behavior. Genes Cells. 2018 Oct;23(10):849-859.**

**Endo T, Matsumura R, Tokuda IT, Yoshikawa T, Shigeyoshi Y, Node K, Sakoda S, Akashi M. Bright light improves sleep in patients with Parkinson's disease: possible role of circadian restoration. Sci Rep. 2020 May 14;10(1):7982.**

**Ikegami K, Liao XH, Hoshino Y, Ono H, Ota W, Ito Y, Nishiwaki-Ohkawa T, Sato C, Kitajima K, Iigo M, Shigeyoshi Y, Yamada M, Murata Y, Refetoff S, Yoshimura T. Tissue-specific posttranslational modification allows functional targeting of thyrotropin. Cell Rep. 2014 Nov 6;9(3):801-10.**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takuyuki Endo, Ritsuko Matsumura, Isao T. Tokuda, Tomoko Yoshikawa, Yasufumi Shigeyoshi, Koichi Node, Saburo Sakoda and Makoto Akashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Bright light improves sleep in patients with Parkinson's disease: possible role of circadian restoration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-64645-6	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 Yamaguchi Ai, Tatsumoto Muneto, Matsumura Ritsuko, Endo Takuyuki, Hirata Koichi, Tokuda Isao, Akashi Makoto	4. 巻 23
2. 論文標題 Normal peripheral circadian phase in the old-old with abnormal circadian behavior	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 849 ~ 859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12633	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤 卓行
2. 発表標題 パーキンソン病に対する時間治療学
3. 学会等名 全国パーキンソン病友の会大阪府支部若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤 卓行
2. 発表標題 パーキンソン病のサーカディアンリズム
3. 学会等名 地域で難病を支える会-パーキンソン病
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 遠藤 卓行
2. 発表標題 パーキンソン病の非薬物療法－高照度光療法
3. 学会等名 第11回地域連携リハビリテーション技術講習会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪刀根山医療センター / 病院紹介 / 学術活動  <a href="https://toneyama.hosp.go.jp/patient/department/study/gakkai202005.pdf">https://toneyama.hosp.go.jp/patient/department/study/gakkai202005.pdf</a></p>
---

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
研究分担者	佐古田 三郎  (Sakoda Saburo)  (00178625)	独立行政法人国立病院機構大阪刀根山医療センター(臨床研究部)・独立行政法人国立病院機構大阪刀根山医療センター・名誉院長   (84425)	

	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
研究協力者	明石 真  (Akashi Makoto)  (30398119)	山口大学・時間学研究所・教授   (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	プロノウスキー行動神経科学研究所			