

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16122

研究課題名(和文) PD患者髄液中 Syn複合体解析による、エクソソームを介した凝集体伝播機構の解明

研究課題名(英文) Reveal the mechanisms of aSyn transmission via exosome in PD patients

研究代表者

池中 建介 (Ikenaka, Kensuke)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70774058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：シヌクレインフィブリルの高発現時に、エクソソームにおいて増加するタンパク質の解析を行い小胞体関連蛋白質Aが同定された。蛋白質Aを過剰発現すると、Synのエクソソームを介した細胞外への放出が増加した。また、免疫沈降では、Synと蛋白質Aが直接結合することを示した。興味深いことに、蛋白質Aを過剰発現した状態で Syn自体も過剰発現すると、細胞内に Syn陽性の封入体が確認された。

Synの病的変異のフィブリル過剰発現時、モノマー過剰発現時にさらに蛋白質Aの共発現でエクソソーム中のSynの量を比較するとG51D変異という変異は、蛋白質Aによるエクソソームへの包埋が非常に強く誘引することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、シヌクレインというパーキンソン病の発病原因の最も中核にある分子の一つが、どのように細胞から細胞に伝播していくか、その様式の一助を明らかにした。蛋白質Aの増加がパーキンソン病患者において特異的に、または加齢に伴い非特異的に、増加している場合、蛋白質Aの発現を押さえる治療がパーキンソン病の進展を予防する効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum-associated protein A was identified by analyzing the protein increased in exosomes when synuclein fibrils were highly expressed.

Overexpression of protein A increased the extracellular release of aSyn via exosomes. In addition, immunoprecipitation showed that Syn was directly bound to protein A. Interestingly, when Syn itself was overexpressed while protein A was overexpressed, Syn-positive inclusion bodies were confirmed in the cells.

When comparing the amount of Syn in exosomes when co-expressing protein A with fibril or monomer of Syn pathogenic mutation, the G51D mutation was very strongly incorporated to exosome.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：パーキンソン病 alpha synuclein 伝播 エクソソーム

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) の病態において、シヌクレイン (syn) 凝集体が細胞から細胞へ伝播して広がるプリオン仮説が広く認知されてきたが、細胞内凝集体の放出機序や標的細胞への取り込み機序は十分に明らかにされていない。先日 PD 患者髄液中エクソソームには凝集性の高い syn が含まれていることが報告され、髄液中エクソソームが凝集体伝播に参与している可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

エクソソーム中に syn 凝集体を誘導する因子を同定し、細胞内 syn 凝集体を細胞外へ放出する因子を同定する。さらに、その因子を制御する (発現量の調整、分子間相互作用の調整) syn 伝播抑制治療の有用性について、我々の構築してきた syn フィブリル伝播モデルを用いて検証する。

## 3. 研究の方法

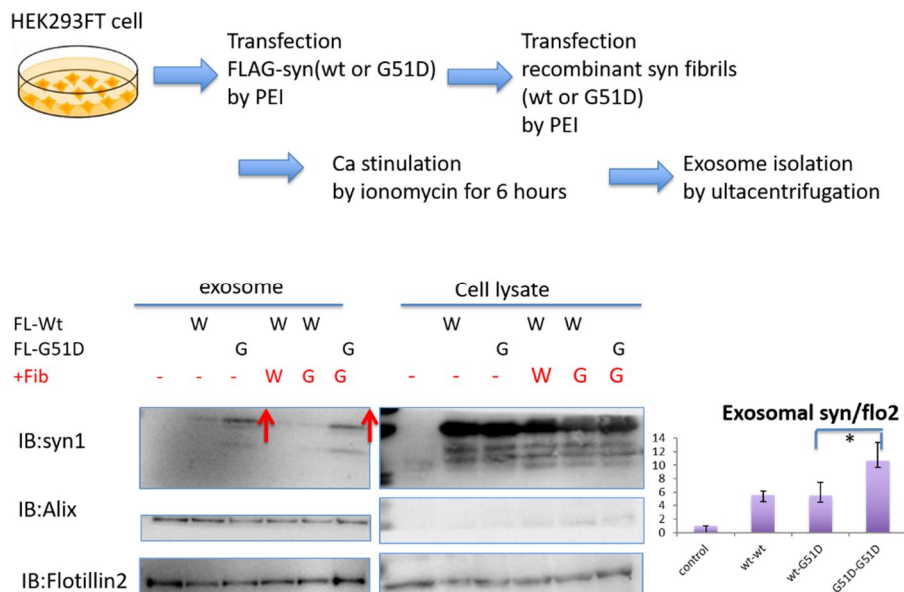
- ・エクソソーム内でシヌクレインと結合する因子の同定: 培養細胞でのシヌクレインフィブリル過剰発現状態において、エクソソーム画分におけるシヌクレイン結合因子を同定する
- ・結合因子の変動によるシヌクレインエクソソーム含有量の変化を確認
- ・変異シヌクレインによる変化を確認
- ・髄液における変化を確認

## 4. 研究成果

シヌクレインフィブリルの高発現時に、エクソソーム画分において増加するタンパク質の網羅的解析を行い、それによって小胞体関連蛋白質 A が同定された。蛋白質 A を過剰発現すると、Syn のエクソソームを介した細胞外への放出が増加した。また、免疫沈降では Syn と蛋白質 A が直接結合することを示した。興味深いことに、蛋白質 A を過剰発現した状態で、Syn 自体も過剰発現すると (モノマーの過剰発現) 細胞内に Syn 陽性の封入体 (レビー小体様構造物) が確認された。エクソソーム内において Syn の病的変異 (A53T, G51D, A30P, H50Q, E46K) コンストラクトを作成し、それぞれのフィブリル過剰発現時、モノマー過剰発現時にさらに蛋白質 A の共発現でエクソソーム中の Syn の量を比較した。興味深いことに、疾患関連変異は、特に G51D 変異という非常に患者脳内でのシヌクレイン病理が顕著である変異は、蛋白質 A によるエクソソームへの包埋が非常に強く誘引することを示した。また、その際細胞内でのレビー小体様凝集物も顕著に増加した。

図 1

### ① Can G51D mutation enhance $\alpha$ -syn secretion via exosome?



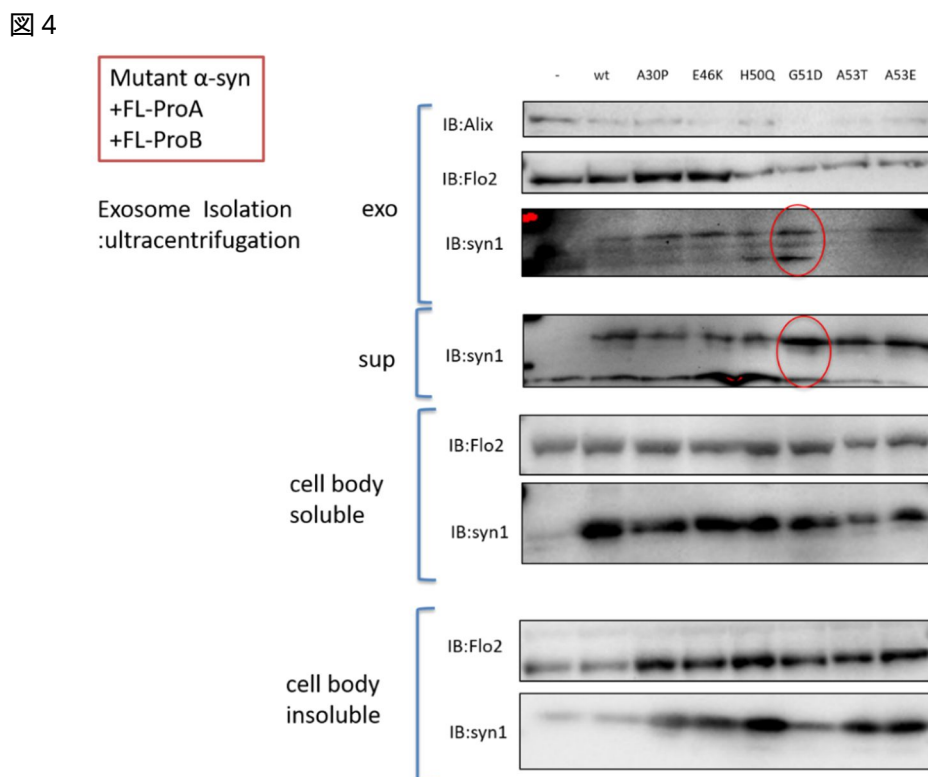
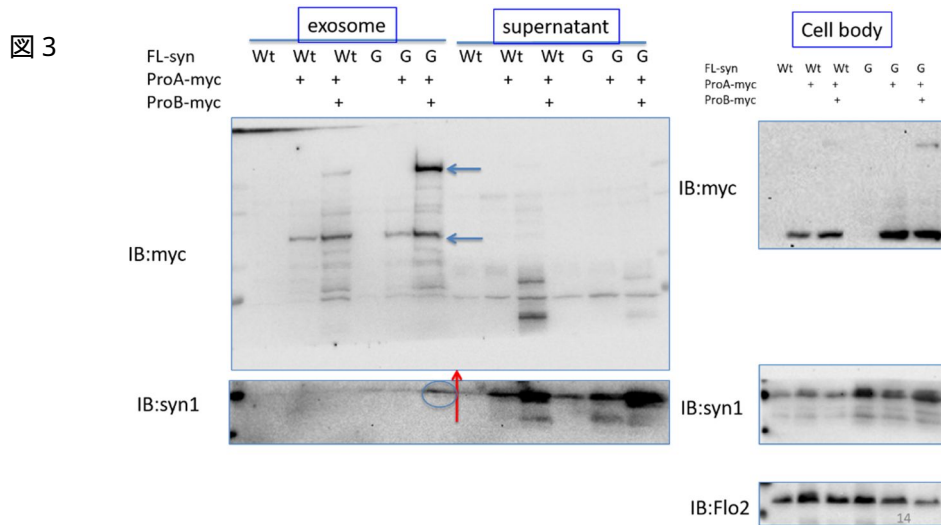
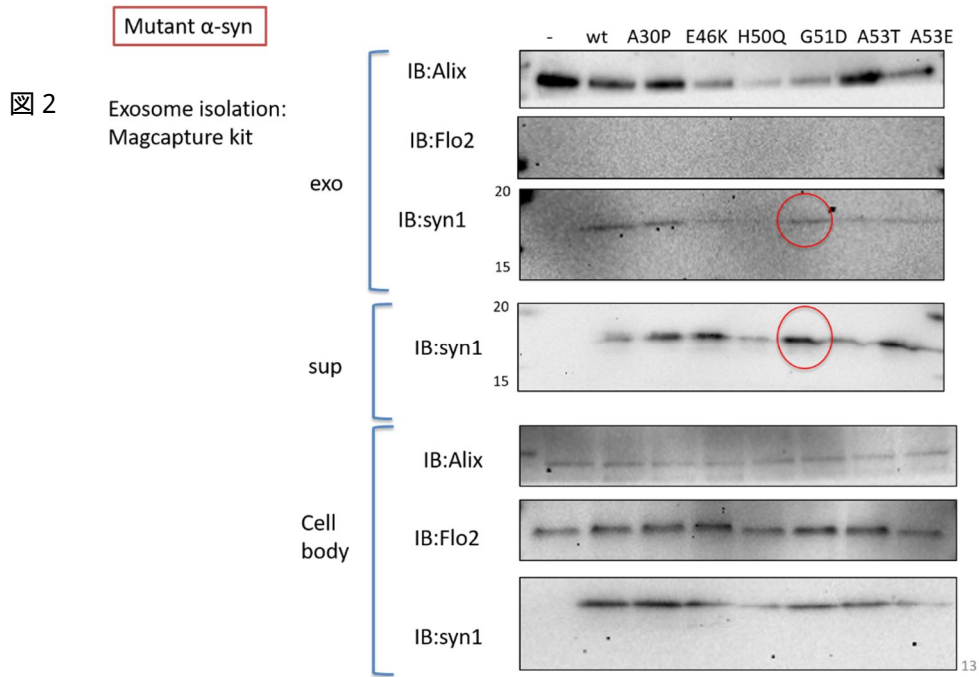
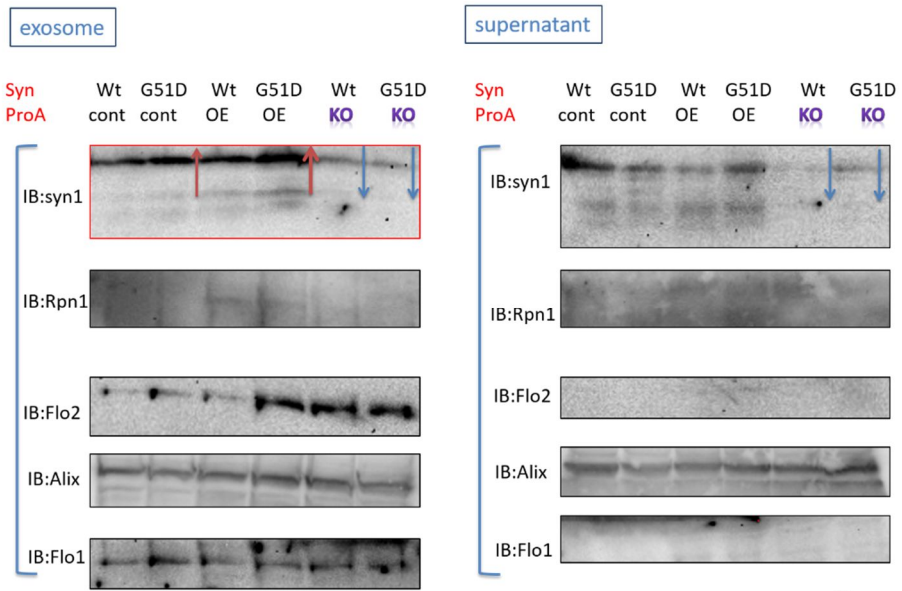


图 5



17

图 6



27

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kakuda K, Ikenaka K, Araki K, So M, Aguirre C, Kajiyama Y, Konaka K, Noi K, Baba K, Tsuda H, Nagano S, Ohmichi T, Nagai Y, Tokuda T, El-Agnaf OMA, Ogi H, Goto Y, Mochizuki H.	4. 巻 Apr,12;9
2. 論文標題 Ultrasonication-based rapid amplification of -synuclein aggregates in cerebrospinal fluid.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-42399-0.	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0件

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