

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02744

研究課題名(和文) 骨格筋-脳連関に基づく新たなパーキンソン病病態進展因子の特定

研究課題名(英文) Identification of Parkinson's disease progression markers based on skeletal muscle-brain axis

研究代表者

斉木 臣二 (Saiki, Shinji)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：00339996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：新たにde novo PD患者群血漿においてLC/CE-TOF-MSによる代謝産物変化を検証したところ、健常者に比し、脂肪酸酸化機能低下を捉えることができた。2017年までの成果と合せ、levodopaの骨格筋への分布が脂肪酸酸化機能に影響すると結論した。さらにこの脂肪酸酸化機能低下が、抗パーキンソン病薬であるゾニサミド内服により改善することを報告した(Cells 8:14, 2019)。またPD患者脳MRIにて検出される白質変化と相関するジアセチルスペルミジンを同定した(Ann Neurol 86:251, 2019)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、パーキンソン病患者血液を用いた確定診断(カフェイン代謝変化、早期症例における脂肪酸酸化機能低下)、病状把握(ポリアミン代謝変化)、薬剤の影響(levodopa代謝産物)を判断することが出来るため、侵襲の低いバイオマーカー研究に道を拓いた点に意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Based on the plasma metabolome analysis of Parkinson's disease patients, we have already identified fatty-acid beta-oxidation insufficiency in 2017. Additional metabolome analysis with de novo PD patients showed insufficient beta-oxidation consistent with the previous study, suggesting of the influence of levodopa medication on the metabolic changes. Likewise, metabolic changes in polyamine, which correlated with axonal changes detected by cranial MRI, were identified in this study.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 メタボローム解析 代謝産物 脂肪酸 酸化 カフェイン代謝 ポリアミン代謝

1. 研究開始当初の背景

申請者は種々のパーキンソン病(以下 PD)特異的代謝異常に加え(*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87:295, 2016; *Neurology* 90:e404-e411, 2018)、carnitine palmitoyltransferase-1B(CPT1B)機能低下による骨格筋脂肪酸β酸化低下がPD早期例に生じ、これを反映する長鎖アシルカルニチン群の低下が早期診断バイオマーカーとして有用であることを報告した(*Sci Rep* 7:7328, 2017)。PD臨床症状として骨格筋機能変化による諸症状(振戦・無動・筋固縮)が特徴的とされるが、その約30年前から上腕二頭筋力・握力の低下が検出されるなど(*Neurology* 84:1862, 2015 他)、発症前・早期症状としての骨格筋機能異常の存在が明らかとなっている。また申請者は早期PD症例血漿にてmyocytokineの一つであるBrain-derived neurotrophic factor (BDNF)低下を明らかにしており、骨格筋内分泌機能低下による中枢神経細胞への影響の端緒を得ているが、骨格筋代謝機能異常と黒質ドパミン神経細胞との相互作用については殆ど報告が無い。

2. 研究の目的

上述の背景から、脂肪酸β酸化変化に由来する骨格筋放出分子の中から黒質ドパミン神経細胞に直接作用するものを特定できれば、骨格筋そのものまたは血中分子を治療標的にすることが可能となると考え、本研究の目的として、本研究の目的は「脂肪酸β酸化異常による骨格筋機能異常が黒質ドパミン神経細胞に与える分子を(myo)cytokine・(myo)exosome・(myo)metaboliteに着目して特定すること」とした。骨格筋は体重の40%を占める最大臓器であり、血流が豊富で薬剤到達が容易であることから、臨床応用しやすい新規治療薬に繋がると考えられる。

3. 研究の方法

(1) CPT1B KO 細胞作製(進行中)

CPT1A/1B 阻害薬(エトモキシル)添加 NRS-1 細胞(横紋筋肉腫細胞)作製: 本細胞に10 μM エトモキシル添加後24時間を経過した培養細胞を、共培養系システムに用いる。

NRS-1 細胞・iPS 細胞由来骨格筋細胞にCRISPR/Cas9にてCPT1Bをノックアウトした細胞作製: CPT1Bヘテロ/ホモノックアウト細胞を樹立し、共培養系システムに用いる。

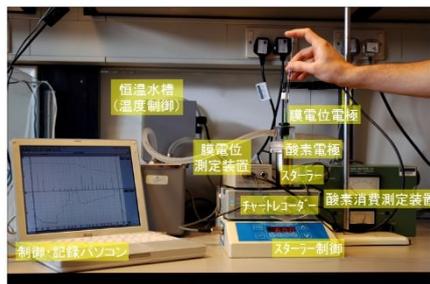
(2) PD-iPSC ドパミン神経細胞作製

既に遺伝性PDの各種タイプPARK1/2/6/9/12/22由来iPS細胞は樹立済みで、必要に応じ分化誘導を行い、共培養系システムに用いる。

(3) 共培養システム作製

非接触型(Alvetex® Scaffold 滄流プレート)を用いて作製する。神経細胞モデル(分化型SH-SY5Y細胞、PD-iPSCドパミン神経細胞)と脂肪酸β酸化障害骨格筋細胞モデル(エトモキシル添加NRS-1細胞、CPT1B-KO NRS-1細胞、PD-iPSC骨格筋細胞)を用いて作製する。長鎖アシルカルニチンの一部は骨格筋と神経筋接合部で接触する後根神経を活性化すると報告(*Exp Physiol* 102:48, 2017)があるため、非接触型に加え、神経筋接合部を介した神経細胞への直接作用を解析するため接触型共培養システム(CytoSelect 24-well システム)も構築する。

4. 研究成果



(1)- エトモキシル添加により脂肪酸β酸化機能を低下させたモデル細胞をNRS-1細胞にて作製を試みた。NRS-1細胞の増殖速度が極端に遅く、非常に大量に培養細胞を要する本実験(1回の実験に必要な細胞数=70%コンフルエントで10cmディッシュ×20枚程度)に必要な細胞数を得て、再現性のある実験を実施することが困難と判断し、C2C12細胞(マウス筋芽細胞)に変更した。C2C12細胞にエトモキシルを添加した実験系を防衛大学校天羽拓と共に構築した(左図)。本実験を用いて、palmitoyl-CoA と carnitine を添加し、carnitine-

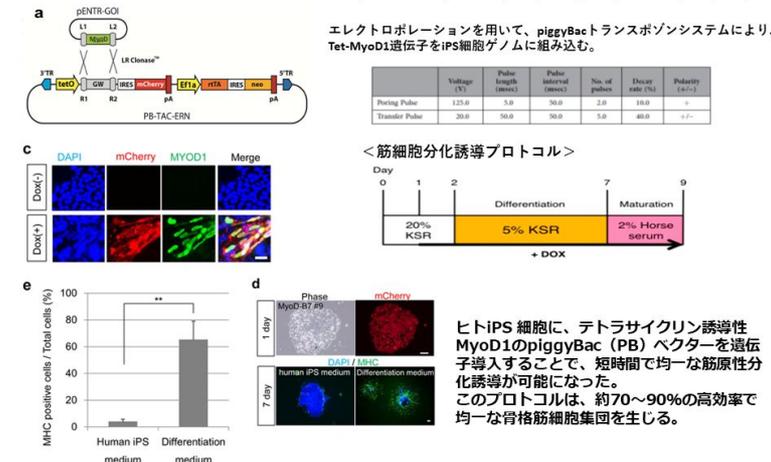
palmitoyltransferase1 によって palmitoyl-carnitine +CoA-SH が産生される反応が開始され、続いて脂肪酸β酸化により産生されたAc-CoAがクエン酸回路を経て、呼吸鎖によって酸化される代謝産物をアウトプットとして計測した様々な薬剤投与による呼吸鎖の変化を定量することで、十分な脂肪酸β酸化機能低下を確認した(左表)

基質	評価対象	呼吸速度(n mol/mg/min)		
		ADP添加時	ADP枯渇後	脱共役時
palmitoy-CoA + carnitine	β酸化	33.9	6.9	35.6
pyruvate + malate	呼吸鎖 I + III + IV	71.7	8.5	85.7
succinate	呼吸鎖 II + III + IV	56.3	10.5	52.4

(1)- 次にヒトiPS細胞由来骨格筋細胞の樹立を、myoD遺伝子導入により作製を試みた。

hiPS細胞から骨格筋細胞への分化誘導

(A Tanaka et al., PLoS One., 2013., E. Shoji et al., Science Reports., 2015)



詳細な tet-responsive element を持つ myoD 組み込みベクターを左図に示す (左図 a)。これをエレクトロポレーションにより iPS 細胞ゲノムに組み込み(b)、発現を doxycycline 添加時に確認した (左図 c の緑色発現)。図 d, e に示すように、短時間で均一な骨格筋細胞の分化誘導が可能であることを確認した。

しかし、筋芽細胞から更に骨格筋細胞に誘導した場合に、培養ディッシュ上への接着が不十分となり、それに対してエトモキシルを

添加すると大半の細胞が剥脱してしまうことが判明した。コラーゲンファイバー塗布ディッシュなども使用して、接着の改善を試みたが十分な負荷に対する耐性を持つ培養条件を設定できなかった。以上から、ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞を用いた実験の継続を断念した。

(2) iPS 細胞由来ドパミン神経細胞の樹立は、本研究開始時には完了していた。

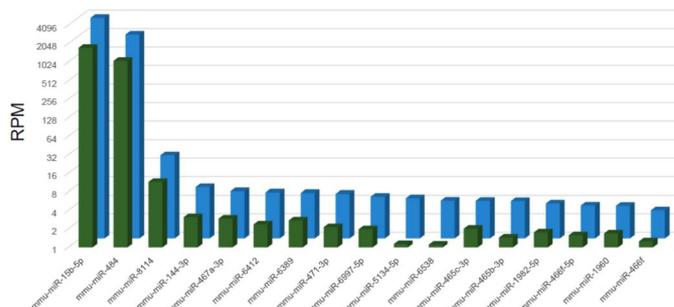
(3) 脂肪酸β酸化機能低下を呈する骨格筋細胞モデルとして上述の「エトモキシル添加型 C2C12 細胞」を用いることと決定し、骨格筋-脳連関の影響因子としてエクソソーム由来 miRNA に着

Sample No.	Agilent Total RNA 6000 Pico Chip		Agilent Small RNA Chip		
	Total RNA (ng/μL)	RIN値	Small RNA (ng/μL)	microRNA (ng/μL)	miRNAの新数
E1	7.86	2.1	12.13	8.38	69
E2	12.87	2.4	23.37	14.04	60
E3	10.52	2.5	22.61	14.36	64
C1	7.46	2.2	10.99	7.77	71
C2	15.94	2.3	23.69	15.18	64
C3	11.57	2.5	21.67	14.41	67

目し、網羅的アッセイを行った。まず、C2C12 細胞ライセートから miRNA のライブラリー化に必要な RNA 量が十分に得られるかの予備実験を行った。左表に示すように、エトモキシル添加サンプル (E1-E3) とコントロール (C1-C3) の合計 6 サンプルで平均 11.0 ng/ml の total RNA が得られた。その中で miRNA の占める割合は、60-71%であり、全サンプルで 5 ng/ml 以上得られたことからライブラリー化に十分であると判断し、RNAseq による発現量解析に進むこととした。

Sample	Total Reads	Reads Passing Filters (≥17 bp)	Aligned Reads	miRNA Reads	% Mapped Reads	% miRNA Reads	miRNA Detected (≥10 reads)
E1	10,469,578	3,694,735	2,842,788	1,130,231	76.94%	30.59%	469
E2	11,971,162	8,851,125	6,844,952	3,209,554	77.33%	36.26%	627
E3	9,871,738	4,869,711	3,932,924	1,887,595	80.76%	38.76%	535
C1	4,675,258	2,038,342	1,616,446	566,171	79.30%	27.78%	404
C2	12,398,958	8,646,156	7,007,740	3,953,123	81.05%	45.72%	656
C3	7,659,569	5,021,494	3,748,937	1,698,678	74.66%	33.83%	520

次に、RNAseq を実施したところ、左表に示すように miRNA のリード数はエトモキシル添加サンプル・コントロールサンプルの何れでも 100 万リード以上のリード数が得られた。その中で miRNA として 10 リード以上の読み込みが可能だった miRNA は概ね 400 以上を超えており、十分な網羅的解析が可能と判断した。



次に、エトモキシル添加時に発現が有意に変化した miRNA を左図に示す。このようにコントロールに比し発現量が低下するものが 17miRNA 存在したため、これらが神経細胞に与える影響を、現在検証している。

追記事項 (その他の成果): PD 患者特異的バイオマーカー候補として、ポリアミン代謝産物 (Ann Neurol 86:251-263, 2019) 鑑別診断マーカーとしてのカフェイン代謝産物 (Neurology 90:e404-e411, 2018; Mov Disord 35:1438-1447, 2020) 脂肪酸β酸化機能がゾニサミドにより保持される可能性があること (Cells 8:14, 2018) などを報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeshige Amano Haruka, Saiki Shinji, Fujimaki Motoki, Ueno Shin Ichi, Li Yuanzhe, Hatano Taku, Ishikawa Kei Ichi, Oji Yutaka, Mori Akio, Okuzumi Ayami, Tsunemi Taiji, Daida Kensuke, Ishiguro Yuta, Imamichi Yoko, Nanmo Hisayoshi, Nojiri Shuko, Funayama Manabu, Hattori Nobutaka	4. 巻 35
2. 論文標題 Shared Metabolic Profile of Caffeine in Parkinsonian Disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Movement Disorders	6. 最初と最後の頁 1438 ~ 1447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mds.28068	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 Saiki Shinji, Sasazawa Yukiko, Fujimaki Motoki, Kamagata Koji, Kaga Naoko, Taka Hikari, Li Yuanzhe, Souma Sanae, Hatano Taku, Imamichi Yoko, Furuya Norihiko, Mori Akio, Oji Yutaka, Ueno Shin Ichi, Nojiri Shuko, Miura Yoshiki, Ueno Takashi, Funayama Manabu, Aoki Shigeki, Hattori Nobutaka	4. 巻 86
2. 論文標題 A metabolic profile of polyamines in parkinson disease: A promising biomarker	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Neurology	6. 最初と最後の頁 251 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ana.25516	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 Mori Akio, Ishikawa Kei-Ichi, Saiki Shinji, Hatano Taku, Oji Yutaka, Okuzumi Ayami, Fujimaki Motoki, Koinuma Takahiro, Ueno Shin-Ichi, Imamichi Yoko, Hattori Nobutaka	4. 巻 14
2. 論文標題 Plasma metabolite biomarkers for multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0223113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0223113	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 Amo Taku, Oji Yutaka, Saiki Shinji, Hattori Nobutaka	4. 巻 519
2. 論文標題 Metabolomic analysis revealed mitochondrial dysfunction and aberrant choline metabolism in MPP+-exposed SH-SY5Y cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 540 ~ 546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.031	査読の有無 有
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 Hirano Kazuoki, Fujimaki Motoki, Sasazawa Yukiko, Yamaguchi Akihiro, Ishikawa Kei-Ichi, Miyamoto Kengo, Souma Sanae, Furuya Norihiko, Imamichi Yoko, Yamada Daisuke, Saya Hideyuki, Akamatsu Wado, Saiki Shinji, Hattori Nobutaka	4. 巻 518
2. 論文標題 Neuroprotective effects of memantine via enhancement of autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 161 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.025	査読の有無 有
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 Fujimaki Motoki, Furuya Norihiko, Saiki Shinji, Amo Taku, Imamichi Yoko, Hattori Nobutaka	4. 巻 39
2. 論文標題 Iron Supply via NCOA4-Mediated Ferritin Degradation Maintains Mitochondrial Functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00010 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00010-19	査読の有無 有
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 Ueno SI, Saiki S, Fujimaki M, Takeshige-Amano H, Hatano T, Oyama G, Ishikawa KI, Yamguchi A, Nojiri S, Akamatsu W, Hattori N	4. 巻 8
2. 論文標題 Zonisamide Administration Improves Fatty Acid -Oxidation in Parkinson's Disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8010014	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 Ishikawa-KI, Saiki S, Furuya N, Imamichi Y, Tsuboi Y, Hattori N	4. 巻 690
2. 論文標題 p150glued deficiency impairs effective fusion between autophagosomes and lysosomes due to their redistribution to the cell periphery.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 181-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.10.036.	査読の有無 有
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 Furuya N, Kakuta S, Sumiyoshi K, Ando M, Nonaka R, Suzuki A, Kazuno S, Saiki S, Hattori N.	4. 巻 19
2. 論文標題 NDP52 interacts with mitochondrial RNA poly(A) polymerase to promote mitophagy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO Report	6. 最初と最後の頁 e46363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201846363	査読の有無 有
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 Uehara Yuya, Ueno Shin-Ichi, Amano-Takeshige Haruka, Suzuki Shuji, Imamichi Yoko, Fujimaki Motoki, Ota Noriyasu, Murase Takatoshi, Inoue Takayoshi, Saiki Shinji, Hattori Nobutaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Non-invasive diagnostic tool for Parkinson's disease by sebum RNA profile with machine learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98423-9	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 Amo Taku, Oji Yutaka, Saiki Shinji, Hattori Nobutaka	4. 巻 34
2. 論文標題 Metabolomic analysis data of MPP+-exposed SH-SY5Y cells using CE-TOFMS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 106707 ~ 106707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2020.106707	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Shinji Saiki
2. 発表標題 New Biomarkers for Parkinson's disease
3. 学会等名 6th Asian and Oceanian Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊木臣二
2. 発表標題 パーキンソン病の代謝産物バイオマーカーについて
3. 学会等名 第13回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinji Saiki
2. 発表標題 Blood metabolic biomarkers for Parkinson's disease
3. 学会等名 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinji Saiki
2. 発表標題 Development of anti-Parkinson 's disease medicines focusing on autophagy/mitophagy modulation
3. 学会等名 第61回日本神経化学会大会・第40回日本生物学的精神医学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>化合物による治療探索研究・オートファジー関連研究 https://www.juntendo-neurology.com/ 化合物による治療探索研究・オートファジー関連研究 http://www.juntendo-neurology.com/n-kenkyu-syukai.html 化合物による治療探索研究・オートファジー関連研究 http://www.juntendo-neurology.com/pdf/saiki2015.pdf</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	笹澤 有紀子 (Sasazawa Yukiko) (20594922)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教 (32620)	
研究分担者	天羽 拓 (Amo Taku) (40453922)	防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群)・応用科学群・准教授 (82723)	
研究分担者	井本 正哉 (Imoto Masaya) (60213253)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授 (32620)	
研究分担者	赤松 和土 (Akamatsu Wado) (60338184)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (32620)	
研究分担者	石川 景一 (Ishikawa Kei-Ichi) (90733973)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (32620)	

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