

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07510

研究課題名(和文) シヌクレインを削減するエクソソームの生成過程の解明と新規PD治療法開発

研究課題名(英文) Exploration of the process of exosome generation which reduce alpha synuclein accumulation and development of novel PD therapy

研究代表者

常深 泰司 (Tsunemi, Taiji)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50401344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームとシヌクレインの脳内伝播の関係を解明するためエンドライソゾームタンパク質であるATP13A2のノックアウトマウスと過剰発現系を用いた。線状体への繊維化シヌクレイン(PFF)の注入でLewy小体様病理形成はノックアウトでは同じで、過剰発現で軽減した。PFFはグリア細胞に取り込まれ、神経細胞に蓄積した。これはLewy小体様病理形成に時間がかかり、PFFのグリアへの取り込みが必要である事を示唆する。また、アストロサイトはより多くのエクソソームとPFFを分泌し、神経細胞のシヌクレインを軽減し、神経細胞間の伝播を抑制した。これはグリア細胞が治療ターゲットとなる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、エクソソームがシヌクレインの脳内伝播とLewy小体病理形成に深く関与していることが明らかとなりました。また、アストロサイトはより多くのエクソソームを分泌し、シヌクレインを分泌することで神経細胞の蓄積を軽減するのみならず神経細胞間のシヌクレインの伝播を抑制しました。以上の結果はグリア細胞のエクソソームがパーキンソン病の新たな治療ターゲットとなる可能性を示しています。

研究成果の概要(英文)：To explore the relationship between exosomes and propagation of alpha-synuclein (a-syn) in brains, we used Atp13a2 null mice and lenti-virus mediated overexpression of ATP13A2, which is an endolysosomal protein and play a role for generation of exosomes. Although, after inoculation of a-syn fibrils, no differences were observed in the development of Lewy body-like pathology between wild-type and Atp13a2 null mice, this pathology was attenuated at regions far away from the inoculated site by ATP13A2 overexpression. Further studies revealed that PFFs were first taken up by glia, and then later accumulated in neurons. This suggests that the development of Lewy body-like pathology takes certain time, and requires glia's a-syn uptake. We also discovered that astrocytes can secrete more exosomes and PFF compared to neurons, attenuate neuronal a-syn accumulation and block a-syn transfer between neurons. This suggests that glia can be a novel therapeutic target for Parkinson's disease.

研究分野：パーキンソン病

キーワード：エクソソーム パーキンソン病 シヌクレイン レヴィ小体 アストロサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「何故、神経毒性を有する シヌクレイン (α -syn) が神経細胞に蓄積するのか、PD の病態へどのように関与しているのか」が本研究課題の「問い」である。パーキンソン病 (PD) をはじめとする神経変性疾患に共通して異常タンパク質の凝集体形成が観察される。過去 20 年間、凝集体が生成する要因や神経毒性の有無、発症との因果関係が様々な角度から検討されてきた。例えば α -syn の二重体や三重体を生じる遺伝子変異は家族性 PD の原因であり、過剰生成で発症する (Wong, Nat Med; 23, 2017)。また蛋白分解系の主要経路であるユビキチン・プロテアソーム系やオートファジー・ライソゾーム系の障害でも α -syn が蓄積する。しかし単なる過剰発現系の実験では病態を再現できず、一つの分解経路の破綻では毒性を呈しにくい。これから産生過剰、分解経路のみならず神経細胞内に α -syn が蓄積し毒性が生じる他のメカニズムの関与が必要であると考えられ、申請者らは遺伝性 PD である Kufor-Rakeb 症候群 (KRS) の研究から全く新しい機序を提案した。すなわち原因遺伝子産物である ATP13A2 がライソゾームのみならず、MVE (multivesicular endosome) にも局在し、その機能喪失が MVE における胞内小体 (ILV) 形成を阻害することを発見した。その結果、エキソソームの産生、放出が障害されて α -syn の分泌が低下し、細胞内に蓄積する。これはエキソソームを介した α -syn の細胞外放出が神経細胞に必要不可欠であり α -syn の細胞内の発現量を規定している可能性を示した最初の報告であるが、他の変性疾患でも分泌低下により発現量が増加する報告が蓄積しつつある (Iguchi, Brain; 139, 2016)。研究を進めると、エキソソームの産生増加にて α -syn の細胞内蓄積が軽減し、新たな治療ターゲットとなる可能性もひらけてきた (研究スタート支援)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エキソソームが神経細胞の生理機能に果たす役割と、 α -syn の発現量を規定するか解明し、 α -syn の神経間伝播、脳内拡散への影響を明らかにする、ことである。さらになぜエキソソームの産生、放出が細胞の正常な機能に必要なのか、 α -syn の蓄積を軽減する PD の新しい治療ターゲットとなりうるか明らかにする。さらにエキソソームが α -syn の神経細胞間伝播、脳内拡散に与える影響を解明する。

3. 研究の方法

エキソソームと シヌクレインの脳内伝播の関係を解明するためエンドライソゾームタンパク質である ATP13A2 のノックアウトマウスと共に過剰発現系としてレンチウイルスを介した系を用いた。マウス線状体へ繊維化 シヌクレイン (PFF) を線条体に注入し経時的な変化を免疫組織科学、分子生物学的に解析した。

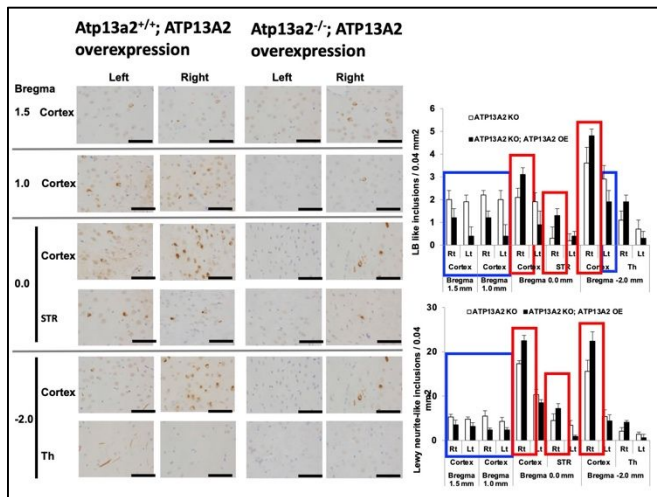
また細胞腫ごとのエキソソームと PFF の分泌を検討するため、iPS 細胞から分化したアストロサイトを用いて、エキソソームを定量評価し、PFF の分泌を immunoblot で解析した。またアストロサイトとドパミン神経細胞の共培養を用いてドパミン神経細胞に蓄積する α -syn の変化を検討した。さらにドパミン神経細胞とアストロサイトの三重培養系で α -syn の神経細胞間伝播を検討した。

4. 研究成果

エキソソームと α -syn の脳内伝播の関係を解明するためエンドライソゾームタンパク質である ATP13A2 のノックアウトマウスとレンチウイルスを用いた過剰発現系を用いた。ノックアウトでは線状体への PFF の注入で 3 ヶ月後の Lewy 小体様病理形成は同じであった。しかしレンチウイルスを用いた過剰発現では、注入部の蓄積は増加するも遠隔部位の病理形成は軽減した (Figure 1)。PFF はまずグリア細胞に取り込まれ、神経細胞に蓄積した。これは Lewy 小体様病理の形成は時間がかかり、PFF のグリアへの取り込みが必要である可能性を示している。

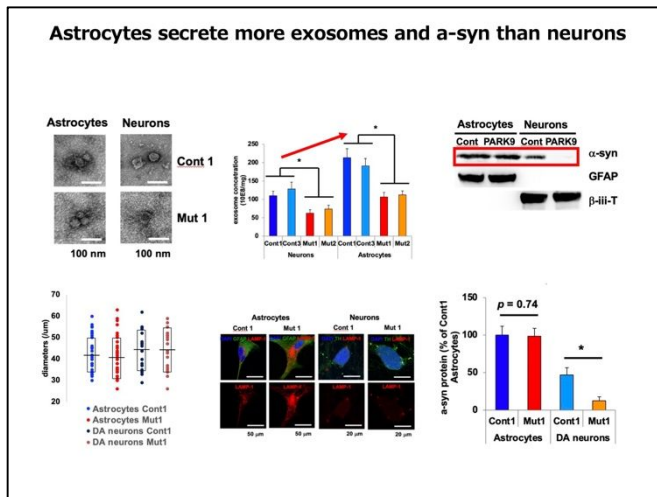
また、培養細胞を用いた検討では、アストロサイトはより多くのエキソソームと PFF を分泌し (Figure 2)、共培養した神経細胞の α -syn を軽減し、神経細胞間の伝播を抑制した (Tsunemi et al, J Neurosci. 2020;40:8618-28)。これはグリア細胞に神経保護効果があり、治療ターゲットとなる可能性を示唆している。

Figure 1 PFF 注入 3 ヶ月後のマウス脳の Lewy 小体様病理形成



ATP13A2 の過剰発現で注入部の線状体とその近傍の蓄積は増加する (赤) も遠隔部位の病理形成は軽減した (青)

Figure 2 アストロサイトから放出されるエキソソーム



アストロサイトから分泌されるエキソソームは神経細胞から分泌されるエキソソームと形態は変わらない (左) が、より量が多く (中央)、シヌクレインを放出できる (右)

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimada T, Tsunemi T, Hattori A, Nakazato-Taniguchi T, Yasuhara H, Ogaki K, Hattori N	4. 巻 5868
2. 論文標題 Bilateral thigh compartment syndromes from extended sitting with forward bending.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Neurosci	6. 最初と最後の頁 30213-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jocn.2019.03.027	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Taiji Tsunemi, Yuta Ishiguro, Asako Yoroisaka, Wado Akamatsu, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 FTD-3-associated CHMP2B mutations lead to impaired exosomal secretion
3. 学会等名 60th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 常深 泰司、石黒雄太、鎧坂 朝子、奥住 文香、貫名 信行、服部 信孝
2. 発表標題 Spreading of α -synuclein in Atp13a2-deficient mice
3. 学会等名 第13回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Tsunemi, Y. Ishiguro, A. Okuzumi, A. Yoroisaka, N. Nobuyuki and N. Hattori
2. 発表標題 The effect of ATP13A2/PARK9 levels on α -synuclein spreading in mice brains
3. 学会等名 International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taiji Tsunemi, Yuta Ishiguro, Wado Akamatsu, Dimitri Krainc, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Exosomal alpha synuclein secretion is beneficial for cellular models of Kufor-Rakeb syndrome
3. 学会等名 International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuta Ishiguro, Taiji Tsunemi, Asako Yoroisaka, Wado Akamatsu, Dimitri Krainc, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 The increased -syn expression inhibits exosome secretion
3. 学会等名 International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders (国際学会)
4. 発表年 2018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
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)	

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
---------	---------