

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2018～2020

課題番号：18KT0027

研究課題名(和文)多階層解析を利用したポリアミン代謝異常に基づくパーキンソン病病態進行機序の解明

研究課題名(英文) Research on PD pathogenesis based on polyamine metabolism using multiomics analysis

研究代表者

斉木 臣二 (Saiki, Shinji)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00339996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：PD患者群ではジアセチルスベルミジン、モノアセチル化体4種、スベルミジンが有意に増加している一方、スベルミンは減少していることを発見した。これらの代謝物のうち、ジアセチルスベルミジンはPDの重症度に相関して上昇していた。さらにポリアミン7種の各濃度により高確率でPDを診断できることがわかり、バイオマーカーとしての有用性を実証できた。またPD患者では黒質ドパミン神経細胞だけでなく、他の神経軸索ネットワークも障害されているとされるがMRI像の脳の軸索変化とジアセチルスベルミジン値の関係を検討したところ、ジアセチルスベルミジンが高いほど脳の軸索障害が強いことが分かった。

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における血清ポリアミン代謝産物の濃度変化は、新たなパーキンソン病診断バイオマーカーとしてだけでなく、疾患重症度を推定することを可能とするサロゲーティングバイオマーカーとしての有用性が確認された。現在臨床応用のため、測定条件などの詳細な検討を進めている。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the ability of each polyamine metabolite to act as age-related, diagnostic and severity-associated PD biomarkers. Comprehensive metabolome analysis of plasma was performed in Cohort A (controls: 45, PD: 145), followed by analysis of seven polyamine metabolites in Cohort B (controls: 49, PD: 186, progressive supranuclear palsy: 19, Alzheimer's disease: 23). Furthermore, 20 patients with PD who were successively examined within Cohort B were studied using diffusion tensor imaging. In Cohort A, N8-acetylspermidine and N-acetylputrescine levels were significantly and mildly elevated in PD, respectively. In Cohort B, spermine levels and spermine/spermidine ratio were significantly reduced in PD, concomitant with hyperacetylation. Furthermore, N1,N8-diacetylspermidine levels had the highest diagnostic value, and correlated with H&Y, UPDRS-III, and axonal degeneration. The spermine/spermidine ratio in controls declined with age, but was consistently suppressed in PD.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 バイオマーカー オートファジー ポリアミン ジアセチルスベルミジン

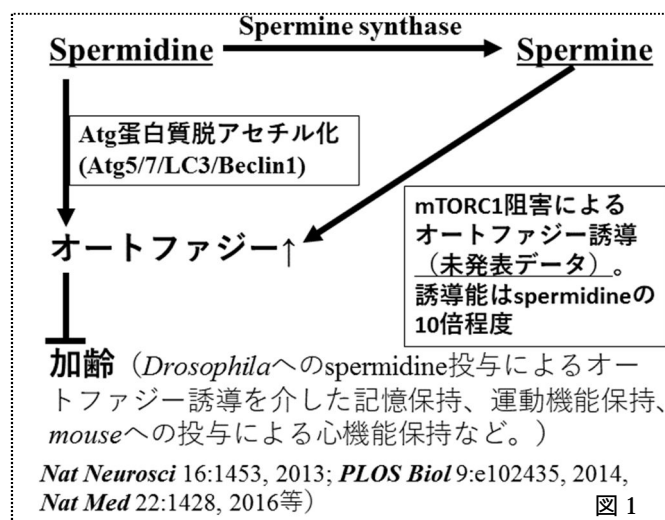
1. 研究開始当初の背景

(1) PD 血液バイオマーカー研究の現状と問題点のまとめ

既報の PD 血液成分バイオマーカーはリスク遺伝子の SNP などの単一の核酸変化、単一炎症性蛋白質、単一代謝産物に関する報告が大半で、分子病態との関連が不明瞭であると同時に病態進行とリンクするものは臨床応用されていない(*Nat Rev Neurol* 12:622, 2016)。実地臨床・新薬薬効評価に必須な疾患進行を反映するバイオマーカーを同定するため、申請者は網羅的代謝産物解析により特定代謝異常を推測し、候補経路構成代謝産物の詳細な解析で validation を行う手法を実践し、PD 特異的な骨格筋脂肪酸β酸化異常(*Sci Rep* 7:7328, 2017)、カフェイン代謝異常(*Neurology* 90:e404, 2018)を同定したが、同変化は早期診断に役立つものの、疾患重症度を反映しなかった。

PD は有病率 140 人/10 万人の我が国で 2 番目に多い神経変性疾患である。発症前期、前駆症候期を経て運動症状(振戦、無動、筋固縮など)を発症し、経時的に進行する。運動症状発症時には中脳黒質ドパミン神経細胞は 50-70%程度まで減少し、10 年以内に 20-30%まで減少する。PD バイオマーカーとして様々なリスク遺伝子・炎症蛋白・リン酸化蛋白・代謝産物などが疾患特異的と報告されているが、過酸化状態、慢性炎症、セロトニン代謝異常など漠然とした病態把握にとどまっており、その**代謝変化を招来するゲノム変化を包括したメタボロゲノミクスの研究報告は無い**。以上から将来的な病態は正治療開発には、**ゲノム変化を含め「PD 疾患病態進行と密接に繋がる」確証を得た PD 代謝産物バイオマーカーを確立することが最優先**であると考えた。

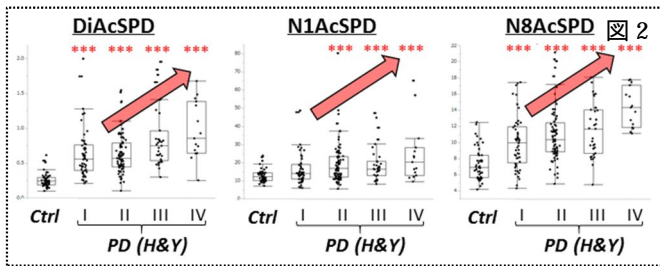
(2) ポリアミン代謝変化と加齢・オートファジーの関与が明らかになりつつある。



我々は PD 血漿・血清におけるポリアミン代謝異常の中で **SPM が低下している**ことに着目した。その理由は PD 発症最大リスクである加齢変化(*Lancet Neurol* 5:525, 2006)を、SPD がショウジョウバエ・マウスでオートファジーを介して抑制されるとされており(図 1) SPD 経口投与は速やかに SPM に転換されると考えられ、**最もオートファジー誘導作用が強い SPM 作用の低下は加齢促進に働く**と予測される

ためである。また PD では Lewy 小体構成蛋白α-synuclein がオートファジーの基質であること(*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83:430, 2012)、家族性 PD 原因遺伝子産物 parkin、PINK1 が選択的オートファジーを調節するなど(*J Cell Biol* 189:211, 2010; *FEBS Lett* 584:1073, 2010)、PD がオートファジーと関連が深い疾患であることも、オートファジー機構の関与を支持する。

2. 研究の目的



申請者らは図2のように独立3コホートの孤発性パーキンソン病(以下 PD) 血漿・血清メタボローム解析によって疾患重症度と正の相関を示す、ジアセチルスペルミジン、N1-アセチルスペルミジン、N8 アセチルスペルミジンを同定

している。本研究では、この PD 特異的恒常性変化のメカニズムを DNA・RNA 変化 蛋白機能変化 患者 iPS 細胞由来神経細胞機能変化の系統的解析によって明らかにすることにより、ポリアミン代謝異常による PD 病態進行機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SMS, HDAC10 遺伝子の SNP 検討: SMS は X 染色体に位置し Y328C 変異により精神発達遅滞、筋緊張亢進、骨粗鬆症等を呈する Snyder-Robinson 症候群(OMIM: 309583)を発症する。SMS エクソンには SNP が 23 カ所存在するため、ゲノム DNA のダイレクトシーケンスにて評価し、症例毎のポリアミン濃度変化(SPD・アセチル化 SPD・SPM)と比較し、SMS 酵素活性を変化させる SNP の有無を検討する。HDAC10 については 23 エクソンのシーケンスを行い SNP の評価を行い、同様にポリアミン濃度変化との関連を評価する。

(2) 多くの細胞種における、ポリアミン代謝産物添加によるオートファジー活性変化の検討: 各種細胞のの内因性オートファジー活性を評価する。神経細胞では基底レベルのオートファジーが一定レベルで存在し、アミノ酸飢餓によるオートファジー誘導はほとんど生じないとされるが、バリエーションにより変化する可能性も考慮し、a)富栄養状態、b) アミノ酸飢餓状態、c) mTORC1 阻害剤 Torin 1 添加時、d) 10 μM E64d + 10 μM PepA 添加時、e) MPP+添加時、b)+d)、c)+d)、の各条件下におけるオートファジーフラックスを免疫腺細胞染色(内因性 LC3 陽性顆粒数定量、内因性 LAMP2 陽性顆粒定量)で評価する。さらに 7 種ポリアミン代謝産物のオートファジー誘導作用を iPS 細胞由来神経細胞で検証する。以上により、PD 患者血漿・血清ポリアミン代謝変化と同一患者(ほぼ同一遺伝学的背景)神経細胞ポリアミン代謝との比較検討、その内在性変化がオートファジー活性に与える影響を定量でき、オートファジー調節に影響する一連の変化を明らかにすることができる。

(3) 血清エクソソーム由来 miRNA の網羅的スクリーニング・血漿代謝産物とのトランスオミクス解析: ヒト血清からキットを用いてエクソソームを抽出し、miRNA を RT-PCR にて増幅・ライブラリー化し、RNA-seq にて発現量を定量化する。

4. 研究成果

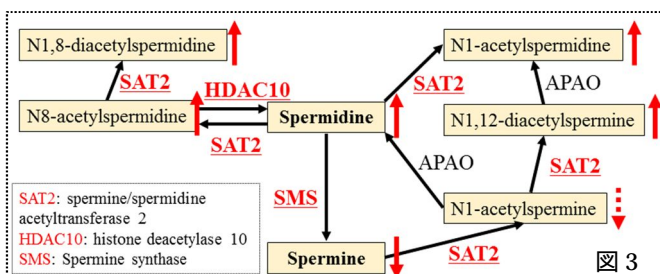


図3に本研究により同定した、ポリアミン代謝変化をまとめた。第1コホートでは、N8 アセチルスペルミジン濃度、N アセチルプトレシン濃度が PD 患者で有意に上昇していた。第2コホートでは PD 患者群でスペルミン濃度、スペルミン/スペルミジン比が低下していたが、ジアセチルスペルミジン、4 種のアセチル化スペルミジン・アセチル化スペルミンは疾患重症度に相関して上昇していた。無作為に抽出した PD 患者 20 名における拡散テンソル画像にて、白質の軸索障害を反映する fractional anisotropy 値は

スパーミン/スパーミジン比が低下していたが、ジアセチルスペルミジン、4 種のアセチル化スペルミジン・アセチル化スペルミンは疾患重症度に相関して上昇していた。無作為に抽出した PD 患者 20 名における拡散テンソル画像にて、白質の軸索障害を反映する fractional anisotropy 値は

血清ジアセチルスベルミジンと正の相関を示したことから、PD 患者におけるジアセチルスベルミジンは、脳トランスレータブル血清バイオマーカーとして有用であると考えられた。またこれらポリアミン・アセチル化ポリアミンの培養細胞でのオートファジー誘導能を評価したところ、SH-SY5Y 細胞（神経系細胞）にてスベルミンが最大のオートファジー誘導能を示した。その他に、スベルミジン・N アセチルスベルミンがオートファジー誘導能を有した。現在、そのオートファジー誘導メカニズムを詳細に検討し、新たな知見を得ている。またヒト血清エクソソーム由来 miRNA のライブラリー化（約 500 種以上の miRNA を検出）に成功した。

本研究成果は、*Annals of Neurology* 86:251-263, 2019 に発表し、2019 年 7 月 3 日朝日新聞朝刊 1 面に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7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 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 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 Reports | 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 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 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5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 |

| |
|-----------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Shinji Saiki |
| 2. 発表標題 Serum polyamine metabolic changes in neurodegenerative diseases. |
| 3. 学会等名 第59回日本神経学会総会 |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>順天堂大学脳神経内科研究紹介ページ http://www.juntendo-neurology.com/n-kenkyu-syoukai.html</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 | 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 | 舩山 学 (Funayama Manabu) (70468578) | 順天堂大学・医学部・准教授 (32620) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 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 |
|---------|---------|
| | |