

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16949

研究課題名(和文) 液性因子としての シヌクレインの加齢に伴う血管内皮機能障害での病態機能の多様性

研究課題名(英文) Diversity of pathophysiological functions of alpha synuclein in age-related endothelial dysfunction as a secretory factor

研究代表者

永澤 元規 (Nagasawa, Motonori)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00823535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シヌクレイン(SNCA)オリゴマーはレビー小体型認知症において神経毒性を呈し、病態に重要な役割を担っているが、血管内皮に対する作用については明らかでない。リンコンヒナントSNCA preformed fibril (PFF)及び活性型SNCAモノマーとPFFの混合(rSNCA+PFF)は凝集活性を有し、PFF及びrSNCA+PFFをHUVECに添加するとNF- κ B活性上昇、炎症性サイトカインの発現が著増、eNOS発現の低下が認められた。一方で、SNCAの凝集体をHUVECに添加しても、これらの変化は認めなかった。神経細胞より分泌されたSNCAオリゴマーは脳血管障害にも関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レビー小体型認知症(DLB)は4大認知症の一つであり、SNCAがその原因分子であることは知られているが、その病態生理については不明なことが多い。本研究では毒性を有するSNCAオリゴマーの血管内皮機能障害への直接関与の可能性を見出した。臨床的にDLB認められる認知機能の変動性はSNCA oligomerに起因する血流障害に伴うものの可能性があることや、抗精神薬の過敏性は血管内皮障害に伴う透過性の亢進に起因する可能性が示唆された。これまでに見出してきたSNCA monomerの血管内皮への保護的な作用を考慮すると、SNCAはその分子形態により、血管への作用が異なることが考えられた。

研究成果の概要(英文)： α -synuclein (SNCA) oligomers are neurotoxic in dementia with Lewy body and play important roles in its pathogenesis, but their effects on vascular endothelium are not clear. Recombinant SNCA pre-formed fibril (PFF) and a mixture of active SNCA monomers and PFF (rSNCA+PFF) have aggregation activity, and addition of PFF and rSNCA+PFF to HUVECs increased NF- κ B activity, significantly increased inflammatory cytokine expression, resulting in decreased eNOS expression. On the other hand, these changes were not observed when SNCA aggregates were added to HUVECs. Thus, SNCA oligomers secreted from neurons may also be involved in cerebrovascular injury.

研究分野：老年医学

キーワード：シヌクレイン 老化 血管内皮機能 レビー小体型認知症 オリゴマー

1. 研究開始当初の背景

α シヌクレイン (SNCA) は主に神経細胞に発現する蛋白質であり、パーキンソン病では神経細胞に SNCA が重合、オリゴマーを形成することにより毒性を有し、神経変性を惹起する。SNCA は循環血液中においても検出可能であるが、パーキンソン病における血中 SNCA のバイオマーカーとしての意義については一定した報告はなく、血中 SNCA の機能は殆ど分かっていない。我々は、末梢において赤血球、血小板にも発現しており、更に血管内皮にも発現、分泌されていることを見出した。SNCA の液性因子としての機能に関して、血中 SNCA 濃度が加齢に伴い低下する老化関連分子であり、インスリン標的臓器における糖代謝やインスリン抵抗性の病態や (*Cell Mol Life Sci.* 2013、*Sci Rep.* 2015)、血管内皮における eNOS や NF κ B の活性調節、高血圧や動脈硬化の病態に関連していることを見出した。(論文投稿中) SNCA は中枢神経においてはオリゴマーを形成し、毒性を呈するが、循環血液中における分子形態の変化について、どのような生体環境により修飾を受け、それがどのような機能を有するのかわ不明である。更に、神経細胞において HSP70 や HSP90 が SNCA に結合し、凝集を抑制して、クオリティーコントロールをしているとの報告があるが (*Acta Neuropathol Commun.* 2013)、同様に血中においても SNCA の結合蛋白が存在し、機能修飾をしている可能性がある。以上より SNCA は中枢神経及び末梢組織において液性因子として分子形態の状態、他の蛋白との相互作用、そしてそれらを修飾する加齢などの生体環境により増悪因子、保護因子のいずれにもなり得る機能の多様性を有することが想定される。

2. 研究の目的

本研究では前述の疑問や仮説に基づき、中枢神経及び末梢組織において加齢に伴う生体環境の変化により液性因子としての SNCA の分子形態、結合蛋白との相互作用により、高齢者の予後を規定する心血管疾患に最も関与する血管内皮機能を修飾するかを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

リコンビナント SNCA (rSNCA、PFF、mono) は StressMarq Biosciences Inc. より購入した。その凝集状態は PROTEOSTAT[®] Protein aggregation assay (Enzo Life Sciences, Inc.) により評価した。HUVEC の培養、Western blot、リアルタイム PCR、免疫沈降等は既報告に従った (Takami Y, et al., *AJP* 2008)。質量分析は附属共同研究実習センターに依頼した。培養上清中のエクソソームは超遠心法により分離し、実験に用いた。

4. 研究成果

リコンビナント SNCA の凝集状態

HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) を培養し、monomeric rSNCA (rSNCA)、preformed fibril rSNCA (PFF)、PFF と active monomeric rSNCA (mono+PFF) を培養液に添加し、にて凝集状態を確認した。図 1 に示すように HUVEC 培養前及び 6 時間培養後の培地においてともに PFF、mono+PFF の凝集を確認できたが、rSNCA はともに凝集活性を示さなかった。

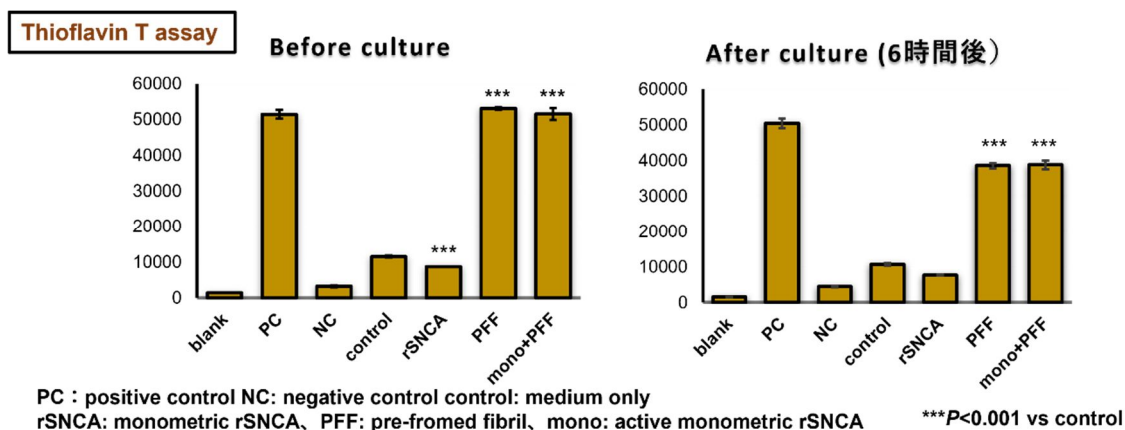


図 1

SNCA オリゴマーの HUVEC に対する作用

次に、rSNCA の分子形態の違いに伴う血管内皮細胞 (HUVEC) に対する炎症性分子の発現について検討した。その結果、図 2 に示すように、添加後 6 時間では、凝集活性を示さなかった rSNCA では炎症性分子の発現上昇を認めなかったが、PFF 及び mono+PFF では有意な炎症性分子の発現上昇を認めた。更に図 3 に示すように PFF 及び mono+PFF を添加すると HUVEC における eNOS の蛋白発現の低下が認められ、SNCA オリゴマーによる炎症惹起作用に伴うも

のと考えられた。

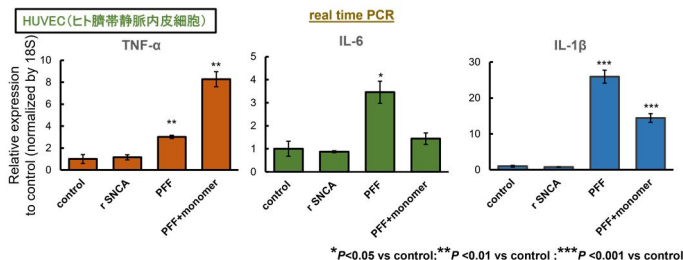


図 2

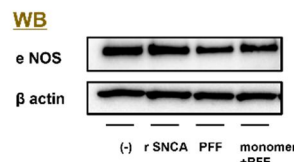


図 3

SNCA の凝集体 (aggregate) の HUVEC に対する作用

更に図 4 に示すように mono+PFF を 37 で 48 時間振盪させて凝集体(aggregate)を作成、同時に rSNCA を 37 で 48 時間振盪させてオリゴマーを作成した。これらを HUVEC に添加すると、SNCA オリゴマーにて炎症性分子の発現が上昇するのに対し、SNCA 凝集体では上昇を認めなかった。このことから SNCA はオリゴマーから更に凝集体に分子形態を変化させると血管内皮における炎症惹起作用がなくなり、無機能になる可能性がある。

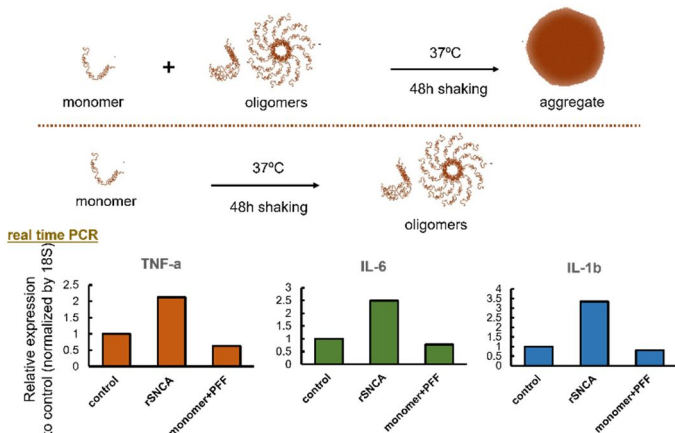


図 4

Casein Kinase 2 による SNCA オリゴマーの血管内皮細胞への作用

まず、monomeric rSNCA を CK2 によりリン酸化させ、凝集、オリゴマー形成を促進させ、その経時的な凝集状態を図 5 に示す。また、本方法により作成したオリゴマーによっても HUVEC における炎症を惹起することを確認できた。(図 6)

Phosphorylation and aggregation of rSNCA by Casein Kinase 2

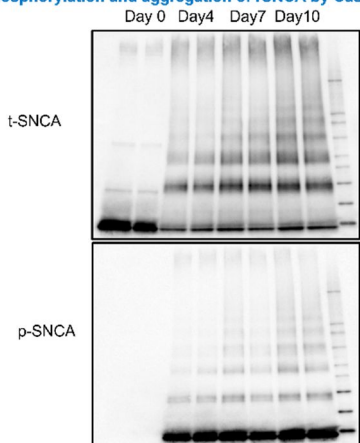


図 5

SNCA凝集体の血管内皮細胞への影響

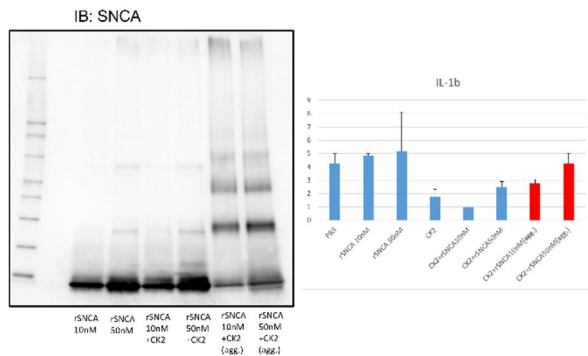


図 6

ヒト血清中の SNCA の分子形態の解析

非高齢のヒト (健康人) 及びマウスにおいて図 7 に示す様に、循環血液中では SNCA は各々 3 量体及び 4 量体で存在している割合が多く、それ以上の分子量のオリゴマーも存在し、同様にエクソソーム中にも検出された。また、図 8 に示す様にヒト血液由来のエクソソームは血管内皮細胞に膜融合可能で SNCA を輸送している可能性が示唆された。更に免疫沈降によりヒト血

清中の SNCA の分子形態を検討すると、図 9 に示すように、同様に 3 量体で存在する可能性があった。

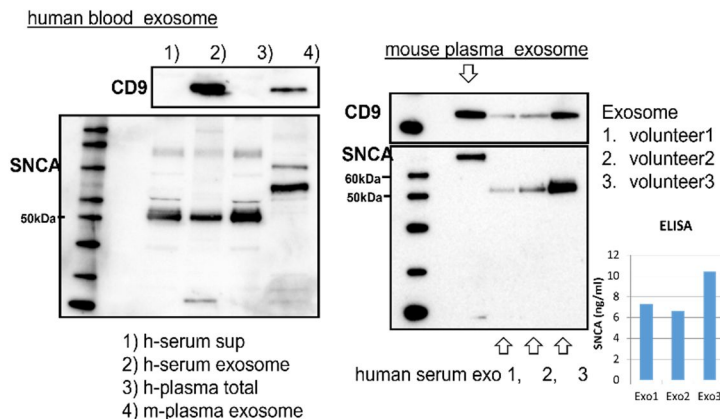


図 7

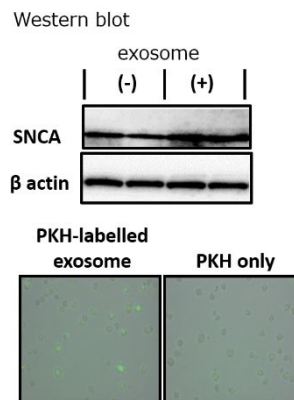


図 8

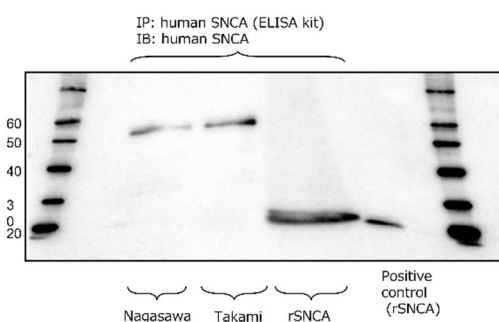


図 9

SNCA の結合蛋白の検索

HUVEC において siRNA (scramble、SNCA の siRNA) を transfection し、2 種類の SNCA に対する抗体にて免疫沈降を行った。そして、図 10 に示すように各々の蛋白溶液を SDS-PAGE にて電気泳動し、銀染色を行い、SNCA のノックダウンにより減少するバンドを切り取り、質量分析を行った。その結果、当該バンドに含まれる蛋白は thrombospondin-1(TSP-1)であることが分かった。HUVEC の細胞溶液を SNCA にて免疫沈降すると図 11 に示すように TSP-1 との結合が示唆された。TSP-1 は血中にも検出可能な蛋白であり、液性因子としての SNCA の結合蛋白である可能性が考えられた。

培養細胞 (HUVEC) を用いて SNCA の結合蛋白を検索

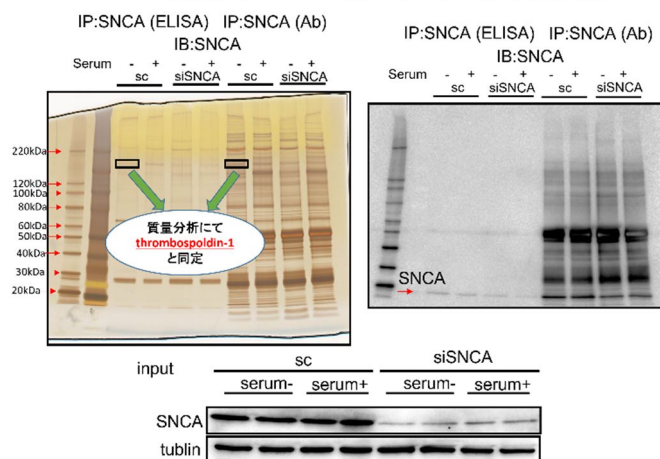


図 10

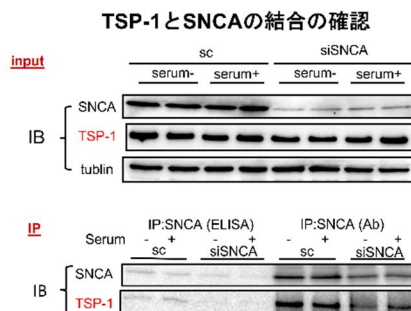


図 11

中枢神経及び末梢組織において加齢に伴う生体環境の変化により液性因子としての SNCA の循環血液中の局在 (エクソソームに包含されているか、free な状態で存在するか) 及び分子形態、結合蛋白との相互作用の変化により、高齢者の予後を規定する心血管疾患に最も関与する血管内皮機能を修飾する可能性を考え、検討してきた。これまで我々は中枢神経における病理的意義

について報告されてきた SNCA について、末梢組織における液性機能性分子として、血管内皮機能や糖代謝について SNCA の生理的機能及び関連する加齢性疾患について検討を行ってきたが、単量体としての SNCA 単独の機能解析を行ってきた。レビー小体型認知症(DLB)は 4 大認知症の一つであり、SNCA がその原因分子であることは知られているが、その病態生理については不明なことが多い。本研究では毒性を有する SNCA オリゴマーの血管内皮機能障害への直接関与の可能性を見出した。臨床的に DLB で認められる認知機能の変動性は中枢神経間質に存在する SNCA オリゴマーに起因する血管内皮障害による血流障害に伴うものの可能性があることや、抗精神薬の過敏性は血管内皮透過性の亢進による可能性が示唆される。これまでに見出してきた SNCA モノマーの SNCA の血管内皮への保護的な作用を考慮すると、SNCA はその分子形態により、血管への作用が異なることが考えられた。また、健常人における血中においては、3 量体で存在する SNCA が大きな割合を占め、その生理的意義については今後の課題である。更に液性因子としての SNCA の結合蛋白としての TSP-1 の可能性を見出したが、その生理的及び加齢性を含む病態生理的意義については更なる検討を要する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

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