

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：20K16605
研究課題名(和文)脳細胞由来エクソソームによるパーキンソン病と関連疾患の血液バイオマーカーの確立

研究課題名(英文)Brain-derived exosomes in plasma as a potential biomarker for Parkinson's and related diseases

研究代表者
大道 卓摩(Ohmichi, Takuma)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60869288
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)：ヒト血漿中脳細胞由来エクソソーム量の定量系の確立を目指し、PD患者および対照者から血漿を採集したが、エクソソームの分離・抽出は完遂できなかった。そのため、PDおよびPS患者の血漿中の疾患特異的蛋白の測定を進め、Leucine-rich 2 glycoprotein (LRG)に注目した。LRGは関節リウマチや炎症性腸疾患で増加することが知られており、PD患者の血清LRG濃度の上昇を確認した。また、PDの腸管炎症のバイオマーカー候補としてZonulinも検討したが、臨床項目や血清サイトカインとの相関は認められなかった。これらの結果から、血清LRG濃度はPDの腸管炎症を反映する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
パーキンソン病は、病理学的にも症候学的にも多様性を持った疾患である。本研究におけるパーキンソン病の腸管炎症のバイオマーカーの開発によって、パーキンソン病における腸管炎症の病態解明と疾患の早期診断が可能となることが期待される。また、多様であるパーキンソン病のバイオマーカーによる分類によって、個別化医療を推進することも期待できる。

研究成果の概要(英文)：Our study aimed to establish a quantification system for brain-derived exosomes in human plasma. We collected peripheral blood plasma from patients with PD and disease controls. However, we were unable to complete the separation and extraction of exosomes from the collected samples. Therefore, we focused on measuring disease-specific proteins in the plasma of PD and PS patients and identified potential blood biomarkers. One candidate, Leucine-rich 2 glycoprotein (LRG), was highlighted. LRG is known to increase in conditions such as rheumatoid arthritis and inflammatory bowel diseases. We confirmed elevated serum LRG levels in PD patients. Additionally, we investigated Zonulin as a candidate biomarker for intestinal inflammation in PD. Although we measured serum Zonulin levels in PD patients, there was no correlation with clinical parameters or serum cytokine levels. These results suggest that serum LRG levels may reflect intestinal inflammation in PD.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 血液バイオマーカー LRG zonulin 腸管炎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病関連疾患 (PS) やパーキンソン病 (PD) の前臨床期から PD や PS を鑑別できる血液バイオマーカーは未だ確立されていない。PD および PS において、ヒト血漿中の脳細胞 (神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト) 由来エクソソーム量とヒト血漿中の脳細胞由来エクソソームの含有蛋白が、早期診断の血液バイオマーカーとなることが期待された。

2. 研究の目的

ヒト血漿中の脳細胞由来エクソソームの定量について、『脳細胞由来エクソソーム量の定量系の確立』と『PD と PS 患者血漿における脳細胞由来エクソソーム定量系を用いた検討』を予定し、脳細胞由来エクソソーム量を測定するための、PD/多系統萎縮症 (MSA)/進行性核上性麻痺 (PSP) 患者および疾患対照者から末梢血血漿の採集をすすめた。しかし、採集サンプルからのエクソソーム分離と抽出が完遂できなかったため、当初の研究目的の1つであった『パーキンソン病 (PD) およびパーキンソン症候群 (PS) のヒト血漿中脳細胞由来エクソソームに含有される疾患特異的蛋白の測定』を進め、血液バイオマーカー候補分子の同定を実施した。

(1) 血液バイオマーカー候補分子の1つとして、Leucine-rich $\alpha 2$ glycoprotein (LRG) に注目した。LRG はロイシンリッチリピート (24 残基のアミノ酸) をもつ 50kDa の糖蛋白で、関節リウマチ患者のプロテオミクス解析から検出された。関節リウマチ以外に、クローン病や潰瘍性大腸炎などの免疫疾患の疾患活動性マーカーとなることが報告されている。脳脊髄液中の LRG 濃度は、特発性正常圧水頭症 (iNPH)、認知症を伴うパーキンソン病 (PDD)、PSP において、認知機能正常者やアルツハイマー病患者よりも高い事が報告されている。ラテックス凝集比重法で、市中の検査会社で依頼可能であり、炎症性腸疾患の活動期の判定の保険適用となっている。PD における血清 LRG 濃度の有用性を試験的に調査した。

(2) PD の腸管炎症における血液バイオマーカー候補分子として、第2番目に zonulin に注目した。Zonulin はハプトグロビン2前駆体であり、消化管の壁細胞間のタイトジャンクションの透過性を高める蛋白で、組織特異性については不明である。PD では糞便中の zonulin レベルが増加し、PD の運動症状や非運動症状と負の相関があることが報告されている。Frontiers in Neuroscience の報告で、PD22 例と 16 例のコントロールの比較で、血清中 zonulin 濃度は PD で上昇していることが報告されている。

(3) (1) において、PD における血清 LRG 濃度の試験的調査によって有用性を証明できたことから、LRG が、PD の腸管炎症を反映した血液バイオマーカーであることを検証するために、PD 患者における血清 LRG 濃度と腸管炎症との関連を別の採集サンプルを用いて調査した。

3. 研究の方法

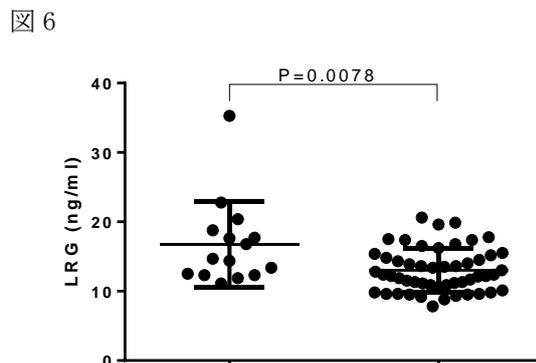
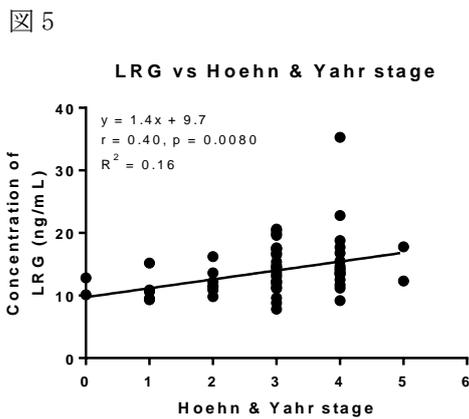
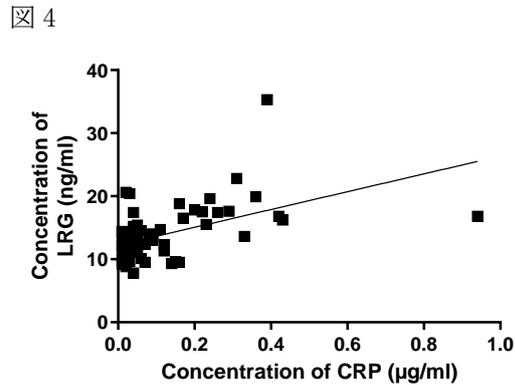
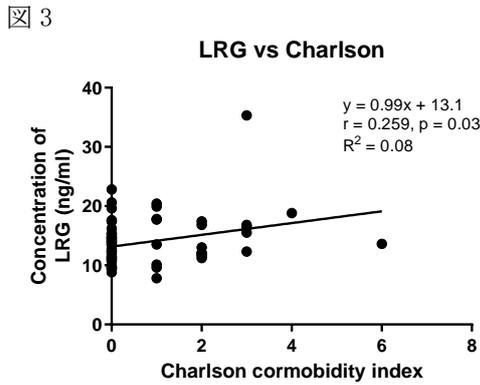
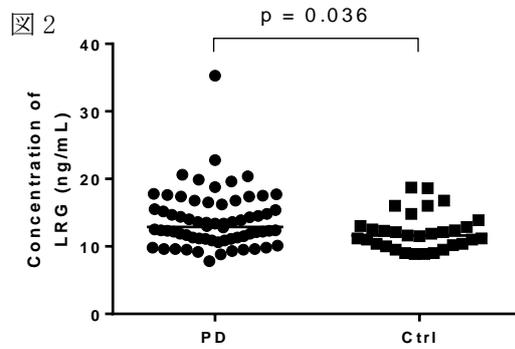
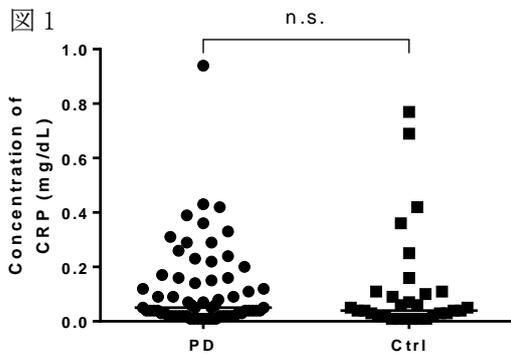
(1) 血清の LRG および C-reactive protein (CRP) 濃度を、PD 患者 66 例と年齢を一致させた対照者 31 例で測定した。血清 LRP, CRP 値は市中の検査会社で実施されている免疫凝集法を用いて測定した。

(2) PD 群 (n=84) と対照群 (n=41) の血清検体において、ELISA 法により zonulin 濃度を測定した。PD 群のみ TNF- α 、IL-13、IL-4、IL-10、IL-6、IL-2、TNF- β 、IFN- γ 、IL-12p70、APRIL、BAFF、sCD40L レベルをカスタム Bio-Plex マルチプレックスアッセイで測定した。

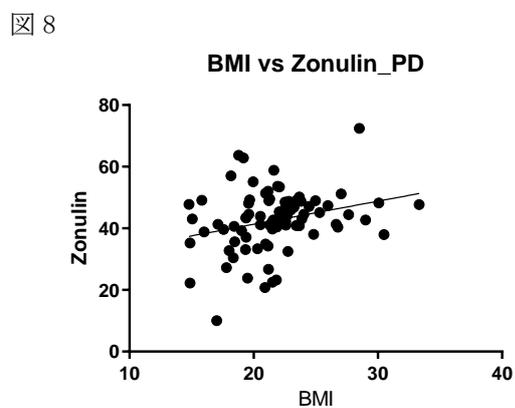
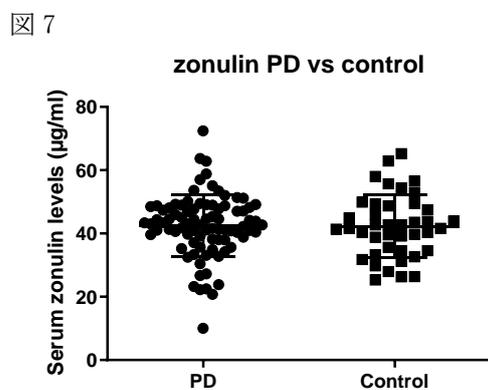
(3) The Gastrointestinal Dysfunction Scale for Parkinson's Disease (GIDS-PD) 質問票に記入した 52 人の PD 患者と 43 人の年齢をマッチさせた対照者の血清検体を分析した。

4. 研究成果

(1) PD 群と疾患対照群の2群間の年齢、性別に有意差はなく、Charlson 併存疾患指数 (CCI) で、併存疾患の重症度の違いも差はなかった。PD 群では対照群と比較し、CRP 濃度は有意差がなかったが (図 1)、LRG 濃度は有意に上昇していた ($p=0.036$, 図 2)。LRG 濃度は CCI および CRP 濃度と相関していた (図 3, 4)。PD 群の LRG 濃度は Hoehn & Yahr 分類と相関し ($r=0.40$, $p=0.008$, 図 5)、認知症のない PD 患者と比較して認知症のある PD 患者で有意に上昇していた ($p=0.0078$, 図 6)。CRP 濃度と CCI を調整した多変量解析では、PD の有無と LRG 濃度の間に関連があった ($p=0.019$)。



(2) PD 群と対照群との間に有意差はなかった (PD: 42.4 ± 9.8 ng/ml、対照: 42.2 ± 9.8 ng/ml, 図 7)。PD 群の血清ゾヌリン濃度は、body mass index と相関した (Spearman $r = 28, p = 0.01$, 図 8) が、その他の臨床項目および血清サイトカイン濃度と相関はしなかった。



(3) 血清 LRG 値は対照群と比較して PD 群で有意に高かった (PD 群 : 15.8 ± 4.6 ng/ml、対照群 : 13.7 ± 4.1 ng/ml、Mann-Whitney U 検定 $p = 0.015$)。さらに、PD 群では LRG 値は Hoehn & Yahr グレードと相関していた (Spearman $r = 0.33$ 、 $p = 0.017$)。血清 LRG 値は GIDS-PD 総スコア ($r = 0.28$ 、 $p = 0.01$) および腸過敏性スコア ($r = 0.31$ 、 $p = 0.025$) と相関を示した。

図 9

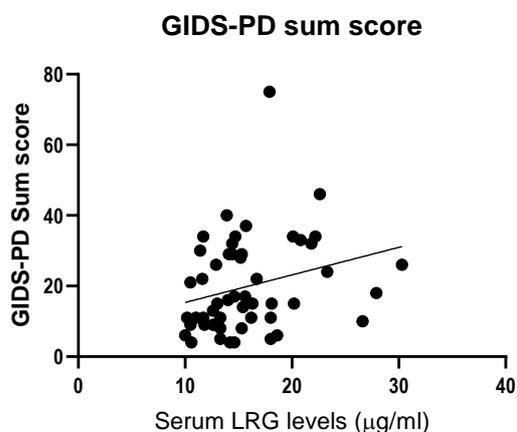
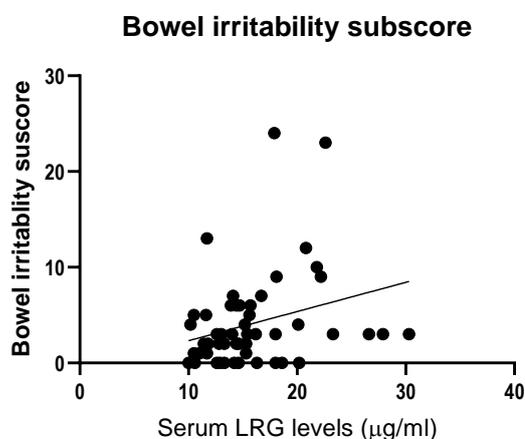


図 10



<引用文献>

- 1) Naka T, Fujimoto M. LRG is a novel inflammatory marker clinically useful for the evaluation of disease activity in rheumatoid arthritis and inflammatory bowel disease. *Immunol Med.* 2018; 41: 62–67.
- 2) Yoshida T, Shimodaira Y, Fukuda S, Watanabe N, Koizumi S, Matsushashi T, et al. Leucine-rich alpha-2 glycoprotein in monitoring disease activity and intestinal stenosis in inflammatory bowel disease. *Tohoku J Exp Med.* 2022; 257: 301–308.
- 3) Miyajima M, Nakajima M, Motoi Y, Moriya M, Sugano H, Ogino I, et al. Leucine-rich $\alpha 2$ -glycoprotein is a novel biomarker of neurodegenerative disease in human cerebrospinal fluid and causes neurodegeneration in mouse cerebral cortex. *PloS One* 2013; 8: e74453.

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 0件）

1. 著者名 Ohmichi Takuma, Kasai Takashi, Shinomoto Makiko, Kitani-Morii Fukiko, Fujino Yuzo, Menjo Kanako, Mizuno Toshiki	4. 巻 18
2. 論文標題 Serum leucine-rich 2 glycoprotein as a potential biomarker for systemic inflammation in Parkinson's disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0282153
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0282153	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大道卓摩, 笠井高士, 森井芙貴子, 藤野雄三, 篠本真紀子, 毛受奏子, 水野敏樹
2. 発表標題 Serum leucine-rich a2 glycoprotein levels correlate with bowel inflammation in Parkinson's disease
3. 学会等名 第65回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大道卓摩, 笠井高士, 篠本真紀子, 森井芙貴子, 藤野雄三, 毛受奏子, 水野敏樹
2. 発表標題 パーキンソン病の全身性炎症マーカーとしての 血清Leucine-rich 2 glycoprotein濃度の有用性の検討
3. 学会等名 第17回日本パーキンソン病・運動障害疾患コンgres
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大道卓摩, 篠本真紀子, 芦田真士, 笠井高士, 森井芙貴子, 藤野雄三, 毛受奏子, 水野敏樹
2. 発表標題 Serum zonulin levels in patients with Parkinson's disease
3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大道卓摩, 笠井高士, 篠本真紀子, 森井芙貴子, 藤野雄三, 毛受奏子, 水野敏樹
2. 発表標題 Leucine-rich 2 glycoprotein as a possible biomarker for the inflammation of Parkinson's disease
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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