

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21531

研究課題名（和文）食物由来  $\alpha$ -Synucleinシードの伝搬能とそのリスク要因の解析研究課題名（英文）Analysis of propagation risk factors for food-derived  $\alpha$ -Synuclein seeds

研究代表者

今居 譲（Imai, Yuzuru）

順天堂大学・大学院医学研究科・先任准教授

研究者番号：30321730

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病は、 $\alpha$ -Synucleinの凝集が神経回路を伝搬して広がる「プリオン病」の一種であることが示唆されている。病理学的解析から、消化管神経叢が  $\alpha$ -Synucleinの凝集化の起始点の有力な候補の一つであるが、本課題では食餌由来の  $\alpha$ -Synuclein凝集が伝播する可能性とその条件を、ショウジョウバエをモデルとして解析した。その結果、食餌由来の  $\alpha$ -Synuclein凝集が神経終末に到達すること、消化管の炎症はリスクを増強することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病は  $\alpha$ -Synucleinの凝集が数十年にわたり神経回路を伝播し広がっていく全身性の神経変性疾患であると考えられている。本研究で消化管炎症が  $\alpha$ -Synuclein凝集の末梢神経終末への到達リスクになることが示唆された。 $\alpha$ -Synuclein凝集は、モデル動物にて種間を超えて伝播する可能性が示唆されている。更なる研究が必要であるが、食事からの  $\alpha$ -Synuclein凝集の感染・消化管炎症をパーキンソン病のリスクとして考慮していく必要性を提起するものである。

研究成果の概要（英文）：Parkinson's disease has been suggested to be a type of "prion disease" in which  $\alpha$ -Synuclein aggregates propagate and spread through neural circuits. Pathological analysis indicates that the gastrointestinal plexus is one of the most possible candidates for the starting point of  $\alpha$ -Synuclein aggregation. In this project, we analyzed the possibility and conditions for the propagation of diet-derived  $\alpha$ -Synuclein aggregates in *Drosophila* as a model. The results suggest that diet-derived  $\alpha$ -Synuclein aggregates reach neuronal terminals and that inflammation of the gastrointestinal tract enhances the risk of PD.

研究分野：神経内科学

キーワード： $\alpha$ -Synuclein パーキンソン病 ショウジョウバエ 炎症 消化管

## 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(PD)は、 $\alpha$ -Synuclein の凝集が神経回路を伝搬して広がる「プリオン病」の一種であることが明らかになってきた。これまでの病理学的なエビデンスから消化管神経叢が  $\alpha$ -Synuclein の凝集化の起始点の有力な候補として指摘された。実際に、マウスモデルで十二指腸神経叢から中枢神経に  $\alpha$ -Synuclein のシード(凝集の種)が伝搬することも報告されていた。しかし、なぜ消化管神経叢で  $\alpha$ -Synuclein の凝集化が早期から起こり易いかは不明であった。PD が「プリオン病」であるとすれば、消化管神経叢がシードの起点となる理由の一つとして、食物由来の  $\alpha$ -Synuclein シードが想定された。牛海綿状脳症(BSE)に感染した牛の肉骨粉を含む餌を食べた猫が海綿状脳症で死亡した例がある。また BSE 汚染した食肉からヒトへの感染リスクも否定されていない。実験的に食物由来の  $\alpha$ -Synuclein が神経へと伝搬する可能性が提示されれば、食肉リスクの再検に繋がると考えた。また伝搬を促進する条件の解明は、リスク回避の方策に寄与すると期待された。

### 2. 研究の目的

本研究では、 $\alpha$ -Synuclein シードが食餌から消化管上皮を経て消化管神経叢、中枢脳へと伝搬する可能性および伝搬リスクを高める要因(環境要因、遺伝的要因)をハエモデルで解析することを目的とした。樹立したモデルは、リスク・保護遺伝子のスクリーニング、創薬候補の評価にも貢献する。

### 3. 研究の方法

ヒト  $\alpha$ -Synuclein を大腸菌から精製し、凝集シードを調製した。 $\alpha$ -Synuclein シードを餌に混ぜハエ幼虫に経口投与し、腸管神経叢から脳へ伝搬するかどうかを、幼虫・成虫期にて確認した。 $\alpha$ -Synuclein の凝集・伝搬を促進するため、3つの実験条件(無処理、消化管炎症)4種の遺伝的背景(野生型, *PARK9*, *PARK14*, *PARK22*, *tau*)を設定した。

消化管炎症条件は、 $\alpha$ -Synuclein シードが腸管バリアを通過する可能性を高めるため、10%デキストラン硫酸ナトリウムを餌に混ぜ、潰瘍性大腸炎を起こさせた。

### 4. 研究成果

LexA-LexAop 発現システムを用いて、消化管神経叢を含む神経特異的に  $\alpha$ -Synuclein を発現するハエモデルを作製した。GAL4-UAS システムを併用し、食道に投射するセロトニン神経の神経回路を CD8::GFP にて可視化した(図1)。

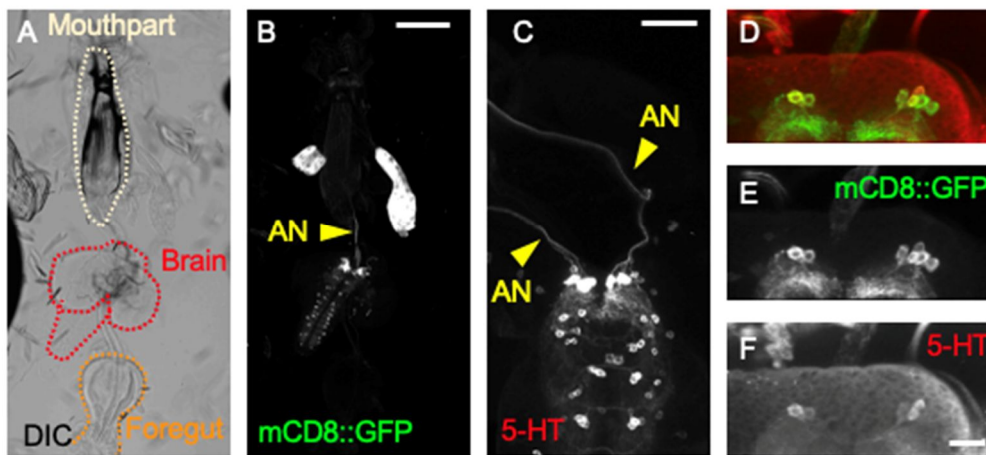
$\alpha$ -Synuclein 凝集の検出に関しては、市販の凝集特異的  $\alpha$ -Synuclein 抗体を複数種類試し、非特異的シグナルでない条件を設定した。デキストラン硫酸ナトリウムによる消化管炎症条件の有無、 $\alpha$ -Synuclein シードの有無の条件下、セロトニン神経軸索で形成された  $\alpha$ -Synuclein の凝集を検出した。その結果、 $\alpha$ -Synuclein シードの投与、消化管の炎症単独で凝集が検出されること、2条件が組み合わさると  $\alpha$ -Synuclein の凝集形成が増強することが明らかとなった(図2)。一方、セロトニン神経で  $\alpha$ -Synuclein を発現しないハエでは、凝集シグナルは見られなかったことから、 $\alpha$ -Synuclein シードは、消化管からセロトニン神経終末へと移行し、伝播していることが示唆された(図2)。

軸索に  $\alpha$ -Synuclein 凝集が出現したセロトニン神経の機能低下は、着色した餌の消化管への移送の遅れとして定量した(図3)。 $\alpha$ -Synuclein の凝集が顕著に出現する炎症条件では、消化管内での餌の移送が遅れることが分かった。これは、 $\alpha$ -Synuclein の凝集によってセロトニン神経の神経活動が低下したためと考えられた。

$\alpha$ -Synuclein 線維を含む餌で飼育したハエは、加齢した成虫においても消化管の機能低下が認められ、食餌からの  $\alpha$ -Synuclein 凝集の伝播性が示唆された。一方、中枢脳までの伝播に関しては、現在までのところ確認できていない。一つは、伝播する凝集が微量であり、免疫染色

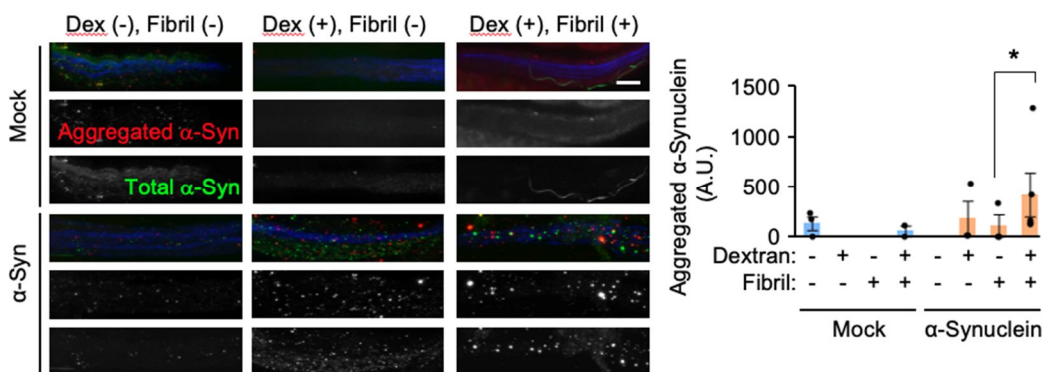
で評価するには感度不足であることが考えられた。末梢神経においても、免疫染色とは別の指標として、神経活動の低下を電気生理学に記録することを試みた。しかし、近傍の筋肉の収縮による運動が激しく、記録を取ることが困難であり、Ca<sup>2+</sup>イメージングに切り替え解析中である。4種の遺伝的背景に関しては、COVID19の影響下、八工系統の国内外への輸送制限から遅れが見られ、現在も解析中である。

八工において、消化管を介して  $\alpha$ -Synuclein凝集の末梢神経への伝播が観察されたことから、今後、炎症に関与するPD原因遺伝子の機能の解明のためのモデルとして応用することを計画している。



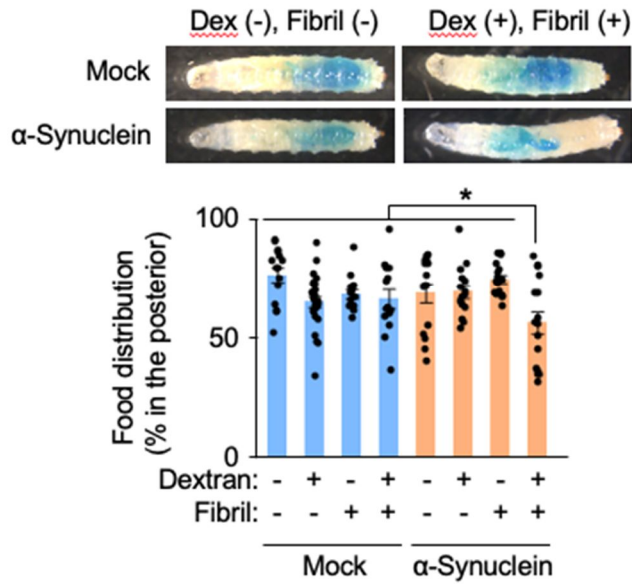
**図1. 八工幼虫消化管神経**

(A)三齢幼虫の口(mouthpart)、脳、胃(foregut)の位置を示す微分干渉像。(B-F)食道に注射するセロトニン神経軸索(antennal nerve: AN)と脳の食道下神経節に位置する細胞体を mCD8::GFP と抗 5-HT 抗体で可視化した。(D-F)セロトニン神経細胞体の拡大図。スケールバー、(A, B) 200  $\mu$ m, (C) 50  $\mu$ m, (D-F) 20  $\mu$ m.



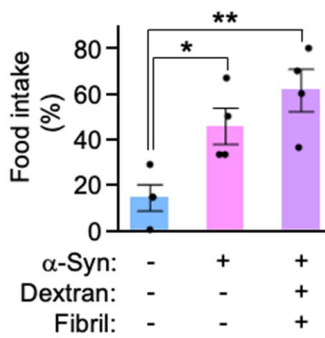
**図2. 八工幼虫セロトニン神経軸索**

(左、写真)  $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ -Syn) あるいはコントロールタンパク質(mock)を消化管セロトニン神経に発現させ、1~3 齢までの間、 $\alpha$ -Syn シード(Fibril) およびデキストラン(Dex)を含む餌(もしくは含まない餌)を与えて飼育した。(右、グラフ)食道を制御するセロトニン神経軸索に形成された $\alpha$ -Syn の凝集を、凝集特異的 $\alpha$ -Syn 抗体(赤)および $\alpha$ -Syn 抗体(緑)で染色し計測した。 $\alpha$ -Syn シードとデキストランを含む餌で飼育した場合、シードのみを投与した場合に比較し、凝集性が増強した(\*  $p < 0.05$ )



**図 3. ハエ幼虫セロトニン神経の機能評価**

(上、写真)  $\alpha$ -Syn、あるいはコントロールタンパク質(mock)を消化管セロトニン神経に発現させ、1~3 齢までの間、 $\alpha$ -Syn シード(Fibril)およびデキストラン(Dex)を含む餌(もしくは含まない餌)を与えて飼育した。その後、青色の食紅で着色した餌を 30 分間与え、消化管を移行する速度を測定した。(下、グラフ) 頭部から 6 番目の体節から 10 番目の体節に含まれる色素のシグナル強度を全体の色素のシグナル強度で割った値(6 番目以降の体節にある色素の割合)を数値化。 $\alpha$ -Synuclein を発現するハエは、 $\alpha$ -Syn シードとデキストランを含む餌で飼育した場合、消化管の運動性が低下していることが示唆された (\*  $p < 0.05$ )。



**図 4. ハエ成虫セロトニン神経の機能評価**

$\alpha$ -Syn、あるいはコントロールタンパク質を消化管セロトニン神経に発現させ、1~3 齢までの間、 $\alpha$ -Syn シード(Fibril)およびデキストラン(Dex)を含む餌(もしくは含まない餌)を与えて飼育した。羽化後、30 日齢まで加齢させ、青色の食紅で着色した餌を 16 時間与えた。 $\alpha$ -Syn の発現だけで摂食行動が低下するが (\*  $p < 0.05$ )、デキストランとシードを与えるとさらに増悪した (\*  $p < 0.01$ )。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Liu Jun-Yi, Inoshita Tsuyoshi, Shiba-Fukushima Kahori, Yoshida Shigeharu, Ogata Kosuke, Ishihama Yasushi, Imai Yuzuru, Hattori Nobutaka	4. 巻 31
2. 論文標題 Ubiquitination at the lysine 27 residue of the Parkin ubiquitin-like domain is suggestive of a new mechanism of Parkin activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 2623-2638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddac064	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 Ogata Jun, Hirao Kentaro, Nishioka Kenya, Hayashida Arisa, Li Yuanzhe, Yoshino Hiroyo, Shimizu Soichiro, Hattori Nobutaka, Imai Yuzuru	4. 巻 22
2. 論文標題 A Novel LRRK2 Variant p.G2294R in the WD40 Domain Identified in Familial Parkinson's Disease Affects LRRK2 Protein Levels	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3708 ~ 3708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22073708	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 Imai Yuzuru, Kim Kiyong, Wu Zhihao, Sato Shigeto	4. 巻 9
2. 論文標題 Editorial: Molecular Links Between Mitochondrial Damage and Parkinson's Disease and Related Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 734475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.734475	査読の有無 無
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 Kato Shun, Arasaki Kohei, Tokutomi Natsuki, Imai Yuzuru, Inoshita Tsuyoshi, Hattori Nobutaka, Sasaki Taeko, Sato Miyuki, Wakana Yuichi, Inoue Hiroki, Tagaya Mitsuo	4. 巻 134
2. 論文標題 Syntaxin 17, an ancient SNARE paralog, plays different and conserved roles in different organisms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs258699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.258699	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 Klionsky DJ, Imai Y et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1797280	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Hung Yu-Chien, Huang Kuan-Lin, Chen Po-Lin, Li Jeng-Lin, Lu Serena Huei-An, Chang Jui-Chih, Lin Han-Yi, Lo Wen-Chun, Huang Shu-Yi, Lee Tai-Ting, Lin Tai-Yi, Imai Yuzuru, Hattori Nobutaka, Liu Chin-San, Tsai Su-Yi, Chen Chun-Hong, Lin Chin-Hsien, Chan Chih-Chiang	4. 巻 36
2. 論文標題 UQCRC1 engages cytochrome c for neuronal apoptotic cell death	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109729 ~ 109729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109729	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 該当する

1. 著者名 Elahi Montasir, Motoi Yumiko, Shimonaka Shotaro, Ishida Yoko, Hioki Hiroyuki, Takanashi Masashi, Ishiguro Koichi, Imai Yuzuru, Hattori Nobutaka	4. 巻 30
2. 論文標題 High-fat diet-induced activation of SGK1 promotes Alzheimer 's disease-associated tau pathology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1693 ~ 1710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab115	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 Imai Y	4. 巻 21
2. 論文標題 Editorial for the Special Issue " Animal Models of Parkinson 's Disease and Related Disorders "	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 4250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21124250	査読の有無 無
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 A, Imai Y, Hattori N	4. 巻 21
2. 論文標題 Lipids: Key players that modulate $\alpha$ -synuclein toxicity and neurodegeneration in Parkinson's disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 3301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21093301	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 Iseki Tatou, Imai Yuzuru, Hattori Nobutaka	4. 巻 13
2. 論文標題 Is Glial Dysfunction the Key Pathogenesis of LRRK2-Linked Parkinson's Disease?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 178 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom13010178	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 Daida Kensuke, Shimonaka Shotaro, Shiba Fukushima Kahori, Ogata Jun, Yoshino Hiroyo, Okuzumi Ayami, Hatano Taku, Motoi Yumiko, Hirunagi Tomoki, Katsuno Masahisa, Shindou Hideo, Funayama Manabu, Nishioka Kenya, Hattori Nobutaka, Imai Yuzuru	4. 巻 37
2. 論文標題 Synuclein V15A Variant in Familial Parkinson's Disease Exhibits a Weaker Lipid Binding Property	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Movement Disorders	6. 最初と最後の頁 2075 ~ 2085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mds.29162	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 Tezuka Toshiki, Taniguchi Daisuke, Sano Mariko, Shimada Tomoyo, Oji Yutaka, Tsunemi Taiji, Ikeda Aya, Li Yuanzhe, Yoshino Hiroyo, Ogata Jun, Shiba-Fukushima Kahori, Funayama Manabu, Nishioka Kenya, Imai Yuzuru, Hattori Nobutaka	4. 巻 8
2. 論文標題 Pathophysiological evaluation of the LRRK2 G2385R risk variant for Parkinson's disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Parkinson's Disease	6. 最初と最後の頁 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41531-022-00367-y	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 Inoshita Tsuyoshi、Liu Jun-Yi、Taniguchi Daisuke、Ishii Ryota、Shiba-Fukushima Kahori、Hattori Nobutaka、Imai Yuzuru	4. 巻 25
2. 論文標題 Parkinson disease-associated Leucine-rich repeat kinase regulates UNC-104-dependent axonal transport of Arl8-positive vesicles in Drosophila	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105476 ~ 105476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105476	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 5件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 今居 譲
2. 発表標題 ミトコンドリア変性とパーキンソン病
3. 学会等名 第20回日本ミトコンドリア学会年会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今居 譲
2. 発表標題 シヌクレインの凝集要因、生体膜脂質とミトコンドリア
3. 学会等名 第35回日本大脳基底核研究会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuzuru Imai
2. 発表標題 Mechanism of $\alpha$ -Synuclein aggregation by the disturbance of biomembrane remodelling.
3. 学会等名 LIFS Seminar Series", at Division of Life Science, Hong Kong University of Science and Technology(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 今居 謙
2. 発表標題 パーキンソン病病態に関するリン脂質変化
3. 学会等名 第 63 回日本神経化学学会大会 公募シンポジウム7「脂質が制御する神経機能」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今居 謙
2. 発表標題 若年性パーキンソン病原因遺伝子産物Parkinの活性化メカニズムの新規知見
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Imai Y	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 228
3. 書名 Experimental Models of Parkinson's Disease.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>順天堂大学大学院 医学研究科 パーキンソン病病態解明研究講座  <a href="https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/parkinsons_disease/">https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/parkinsons_disease/</a>          順天堂大学 パーキンソン病病態解明研究講座  <a href="https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/parkinsons_disease/">https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/parkinsons_disease/</a>          順天堂大学 パーキンソン病病態解明研究講座 研究紹介動画  <a href="https://www.juntendo.ac.jp/news/20200325-02.html">https://www.juntendo.ac.jp/news/20200325-02.html</a></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
--	---------------------------	-----------------------	----

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