

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300135

研究課題名（和文）新規モデルマウス及び剖検脳をもちいたβシヌクレイン神経変性作用の
解明研究課題名（英文）Analyses of neuropathogenic effects of β synuclein using a novel mouse
model of synucleinopathies and post mortem brains

研究代表者

橋本 款 (HASHIMOTO MAKOTO)

財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・副参事研究員

研究者番号：50189502

研究成果の概要（和文）：レビー小体型認知症に見出された変異型 P123H βシヌクレイン発現モデルマウスを新規に作製、解析した結果、これらのマウスは、β syn P123H の神経細胞末端への蓄積、空間認知障害などの神経変性の症状を呈し、さらに、α syn / β syn P123H ダブル交差マウスにおいては、神経細胞死や炎症などが認められた。これらの新規シヌクレインマウスは病態の解明や治療戦略に対する強力なツールとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We show that transgenic (tg) mice expressing DLB-linked P123H β s develop progressive neurodegeneration, as characterized by axonal swelling, astrogliosis and behavioural abnormalities, such as memory disorder. Furthermore, cross-breeding of P123H β s tg mice with α s tg mice, greatly enhanced neurodegeneration phenotypes, suggesting that P123H β s is pathogenic and cooperates with s to stimulate neurodegeneration in mouse brain. Thus, it is expected that P123H β s tg mice will be a invaluable tool for the elucidation of the mechanism and development of novel treatment for α-synucleinopathies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	7,000,000	2,100,000	9,100,000

研究分野：神経解剖学・神経病理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：アミロイド、シヌクレイン、パーキンソン病、レビー小体、神経変性疾患、蛋白凝集、遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

近年、α-シヌクレイン（α-syn）の遺伝子変異が家族性パーキンソン病（PD）において同定されて以来、組織学的、遺伝学的、及び生化学的な多くの

研究により、α-syn の蓄積、凝集による神経毒性、及び、神経-グリア系相互作用の破綻がシヌクレイノパチーの病態において、神経変性の発症から終末（神経細胞死）に至るまでの中心的な位置を占めることが明らかにさ

れてきた。これに関連して、我々はパーキンソン病などの病態において、 α -シヌクレイン (β -syn)が α -synの凝集を抑制し、神経保護的に作用する内因性分子ではないかという仮説を提唱してきた。これをトランスジェニック (tg)マウスモデルの交差試験により証明した；すなわち、 α -syn tgマウスの神経病理所見が α -syn/ β -syn tgマウスにおいては軽減されることを示してきた (Hashimoto et al, Neuron 2002)。

2. 研究の目的

(1) このような状況で、2004年に、 β -synの変異が関与すると考えられるようなDLBの症例がLa Spadaと辻 (現東京大学)らの共同研究により報告された (Ohtake et al, Neurology 2004)。 β -synの70番目のValがMetに置換した変異 (V70M)が国内の孤発性DLBから、123番目のProがHisに置換した変異 (P123H)がシアトルのDLB家系に連鎖していた (図1)。しかしながら、 α -synの遺伝子変異と異なり、P123Hの浸透率が100%でないこと、また、P123H患者の剖検脳のレビー小体に β -synが検出されなかったことなどから、これらの β -synのミスセンス変異がDLBの原因であるかどうか結論されるに至らなかった。それにもかかわらず、V70M、P123Hのいずれも単純なSNPではないこと、さらに、V70Mは α -synのNACドメインに、P123Hはセリン129残基へと (Fujiwara et al, Nat Cell Biol 2002)、いずれも α -synの凝集に関与する部位に対応することから、これらの変異は β -synの構造に影響する可能性が考えられた。

(2) 我々は、変異型 (V70M、P123H) β -synをB103神経芽細胞に過剰発現したところ、巨大なリソソーム様の封入体形成を認め、これらの封入体数は α -synの共発現により著しく増加することを観察した。さらに変異型 β -synは、野生型 β -synとは異なり、明らかな凝集傾向を示すことを確認した (Wei et al, J Biol Chem 2007)。これらの結果は、変異型 β -synの神経変性促進作用を示唆するものであった。

(3) 当該研究においては、 β

-synP123HTgマウスの解析を通して、新しいシヌクレイノパチーモデルとして確立する(I)。引き続き、 α -synTgマウスと変異型 β -synP123H TgマウスのダブルTgマウスを解析することにより(II)、 β -synP123Hの剖検脳に関する論文で報告されたように (Ohtake et al Neurology 2004)、変異型 β -synがどのような機序でレビー小体形成など α -synによる神経病理を誘導するのかという問いにアプローチする。最後に、多くの孤発性のPDやDLBにおいて β -synがどのようにして病態に関与するかという重要な課題に対して、これらの剖検脳の解析を通して検討する(III)。このように新規Tgマウスの樹立、ダブルTgマウスの解析、そして、剖検脳の解析を含む包括的なプロジェクトを遂行することにより、シヌクレイノパチー病態における β -synの役割に関する理解を一層深めることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新しいシヌクレイノパチーモデル、 β -synP123H Tgマウスを確立する。上記の様に変異型 β -synP123H過剰発現型Tgマウスを作製し、解析をおこなった結果、大脳基底核、特にGABA系神経の軸索変性を反映するような病理学的所見を得ている (図2)。これに関連して、オートファジー、リソソーム活性、GABA系神経の詳細な解析を完成させ、 α -synTgマウスとは異なる新しいシヌクレイノパチーモデルマウスとして確立する。

(2) α -syn/ β -synP123HダブルTgマウスの病理解析をおこなう。

α -synTgマウスと変異型 β -synP123H Tgマウスの交配実験をおこない、 α -syn/ β -synP123HダブルTgマウスを作製、解析する。ダブルTgマウスの神経変性がシングルTgマウスのそれらに比べて、有意に促進されていることを証明する。対照実験として、 α -synノックアウト (KO)マウスと変異型 β -syn P123H Tgマウスの交配実験も同時に遂行する。

(3) PD/DLB患者脳における β -synの異常蓄積を解析する。

PD/DLB剖検脳を線条体、淡蒼球を含む詳細な解析をおこない β -synの異常蓄積の有無を明らかにする。これによ

り、Tgマウスで得られた β -synP123Hの神経軸索変性作用がどの程度、PDやDLBの患者において適応できるのか検討し、Tgマウス実験へのフィードバックにする。

4. 研究成果

β syn P123Hを過剰発現したトランスジェニック (Tg)マウスを作製した結果、これらのマウスは、 β syn P123Hの神経細胞末端への蓄積、空間認知障害を呈した。さらに、 α syn / β syn P123H ダブル Tg マウスは、神経細胞死や炎症が著しく亢進した。これらの新規 α syn Tg マウスはDLBの病態の解明や治療戦略に対する強力なツールとなるものと期待された。

我々は、これらの新規シヌクレイノパチーマウス及び既存の α syn マウスを用いて i) 神経軸索変性のメカニズムを一部解明した。ii) 非ステロイド系消炎鎮痛薬の認知症に対する効果を検討した。iii) さらに、adiponectinの発現を解析し、治療における可能性を検討中である。

以上、研究代表者は、この基盤研究費に基づいて、Nat Commun. を含む10報の論文を発表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計16件)

1. Sekiyama K, Sugama S, Fujita M, Sekigawa A, Takamatsu Y, Takenouchi T, Waragai M, Hashimoto M., Neuroinflammation in Parkinson's disease and related disorders: lesson from genetically manipulated mouse model of α -synucleinopathy. *Parkinson's Disease*, 2012 (in press).
2. Hashimoto M. La Spada AR. α -Synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease and related α -synucleinopathies: Emerging roles and new directions *Future Neurol.* 2012 (in press)
3. Sugama S, Takenouchi T, Sekiyama K, Kitani H, Hashimoto M. Immunological responses of astroglia in the rat brain under acute stress: interleukin 1 beta co-localized in astroglia. *Neuroscience.* 2011 192:429-37(査読有).
4. Ho GJ, Liang W, Waragai M, Sekiyama K, Masliah E, Hashimoto M. Bridging molecular genetics and biomarkers in lewy body and related disorders. *Int J Alzheimers Dis.* 2011:842475(査読有).
5. Takenouchi T, Iwamaru Y, Sugama S, Tsukimoto M, Fujita M, Sekigawa A, Sekiyama K, Sato M, Kojima S, Conti B, Hashimoto M., Kitani H. The activation of P2X7 receptor induces cathepsin D-dependent production of a 20-kDa form of IL-1 β under acidic extracellular pH in LPS-primed microglial cells. *J Neurochem.* 2011, 117(4):712-23(査読有).
6. Sugama S, Takenouchi T, Fujita M, Kitani H, Hashimoto M. Cold stress induced morphological microglial activation and increased IL-1 β expression in astroglial cells in rat brain. *J Neuroimmunol.* 2011, 233 (1-2):29-36(査読有).
7. Fujita M, Sugama S, Sekiyama K, Sekigawa A, Tsukui T, Nakai M, Waragai M, Takenouchi T, Takamatsu Y, Wei J, Rockenstein E, LaSpada AR, Masliah E, Inoue S, Hashimoto M. A β -synuclein mutation linked to dementia produces neurodegeneration when expressed in mouse brain. *Nat. Commun.* 2010 Nov2, 10.1038/ncomms1101(査読有).
8. Waragai M, Sekiyama K, Sekigawa A, Takamatsu Y, Fujita M, Hashimoto M. α -Synuclein and DJ-1 as Potential Biological Fluid Biomarkers for Parkinson's Disease. *Int. J Med. Sci.* 2010, 11(11):4257-66(査読有).
9. Takenouchi, T.; Sekiyama, K.; Sekigawa, A.; Fujita, M.; Waragai, M.; Sugama, S.; Iwamaru, Y.; Kitani, H.; Hashimoto, M. P2X7 receptor signaling pathway as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2010, 58 (2), 91-6(査読有).
10. Crews L, Tsigelny I, Hashimoto M. Masliah E. Role of Synucleins in Alzheimer's Disease. *Neurotox Res.* 2009, 16(3), 306-17(査読有).
11. Fujita M, Sekigawa A, Sekiyama K, Sugama S, Hashimoto M. Neurotoxic conversion of β -synuclein: a novel

- approach to generate a transgenic mouse model of synucleinopathies? *J Neurol.* 2009;256 Suppl 3:286-92(査読有).
12. Parihar MS, Parihar A, Fujita M, Hashimoto M, Ghafourifar P. Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009, 41(10), 2015-24(査読有).
 13. Wei J, Fujita M, Nakai M, Waragai M, Sugama S, Takenouchi T, Masliah E, Hashimoto M. Protective role of endogenous gangliosides for lysosomal pathology in a cellular model of synucleinopathies *Am. J Pathol.* 2009, 174(5), 1891-909(査読有).
 14. Sugama, S Takenouchi T, Kitani H, Fujita, M, Hashimoto M, Microglial activation is inhibited by corticosterone in dopaminergic neurodegeneration *J Neuroimmunol.* 2009, 208(1-2), 104-14(査読有).
 15. Takenouchi T, Nakai M, Iwamaru Y, Sugama S, Tsukimoto, M, Fujita M, Wei J, Sekigawa A, Sato M, Kojima, S, Kitani H, Hashimoto M. The Activation of P2X7 Receptor Impairs Lysosomal Functions and Stimulates the Release of Autophagolysosomes in Microglial Cells. *J Immunol.* 2009, 182(4), 2051-62(査読有).
 16. Sugama, S Takenouchi T, Fujita M, Conti B, Hashimoto M, Differential microglial activation between acute stress and lipopolysaccharide treatment *J Neuroimmunol.* 2009, 207(1-2), 24-31(査読有).
- [学会発表] (計 11 件)
1. 関山一成, 藤田 雅代, 関川 明生, 高松 芳樹, 橋本 款 パーキンソン病及び関連疾患の病態におけるアディポネクチンの役割 第 7 回東京都福祉保健医療学会 (2011 年 12 月 16 日、東京)
 2. 関山一成, 藤田 雅代, 関川 明生, 高松 芳樹, 橋本 款 α - synuclein stimulates aggregation of adiponecin in the pathogenesis of Lewy body disease 第 84 回日本生化学会大会 (2011 年 9 月 22 日、京都)
 3. Akio Sekigawa, Masayo Fujita, Kazunari Sekiyama, Yoshiki Takamatsu, Makoto Hashimoto “Morphological analysis of synaptic loss and axon degeneration in α -synucleinopathy model mouse” 第 34 回日本神経科学大会 (2011 年 9 月 15 日、横浜)
 4. 橋本 款 新規シヌクレインマウスモデルを用いた神経変性機序の解明、及び治療法開発への応用、第 129 回ゲノム医学研究センター学術集会、埼玉医科大学ゲノム医学研究センター (2011 年 7 月 4 日) (招待講演)
 5. 関川 明生、藤田 雅代、関山 一成、高松 芳樹、橋本 款 “シヌクレインマウスの軸索腫脹病変におけるリソソーム系異常およびミトファジーの組織学的解析” 第 52 回日本神経病理学会総会 (2011 年 6 月 4 日、京都)
 6. Fujita, M. Sekiyaam, K, Sekigawa, A Yoshiki Takamatsu, Rockenstein, E, Masliah, M, Hashimoto, M A b-synuclein mutation linked to familial dementia with Lewy bodies produces neurodegeneration when expressed in mouse brain AD/PD 2011, バルセロナ, (2011 年 3 月 14 日)
 7. 鈴木京子、山口章、神崎誠一、都甲崇、勝瀬大海、青木直哉、藤田雅代、橋本款、山中正二、平安良雄, Sandhoff 病モデルマウス脳における α シヌクレインの病態関与の研究, BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会第 83 回日本生化学会合同大会) (2010 年 12 月 7 日)
 8. Fujita, M. , Sugama, S. , Sekiyama, K. , Sekigawa, A. , Tsukui, T. , Inoue, S. , Hashimoto, M. , Non-apoptotic cell death in hippocampus and cerebral cortex of bigenic mice overexpressing both beta-synuclein (P123H) and alpha-synuclein, BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会第 83 回日本生化学会合同大会), 神戸ポートピアアイランド, (2010 年 12 月 7 日)
 9. Sekiyama, K. , Takenouchi, T. , Sugama, S. , Kitani, H. , Hashimoto, M. , Adiponectin is produced by microglial cells: a possible role of a negative regulator of inflammation in the brain, BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会第 83 回日本生化学会合同大会), 神戸ポート

- ピアアイランド, (2010年12月7日)
10. 藁谷正明、関川明生、藤田雅代、関山一成、赤津裕康、魏建設、橋本款, シヌクレイノパチーマウス及び細胞モデルにおけるリソゾーム病変と糖脂質の蓄積, 第51回日本神経学会総会, 東京国際フォーラム, (2010年5月20日)
 11. Hashimoto, M. Neuropathological Characterization of a Novel Mouse Model of Dementia with Lewy Bodies, BIT' s 2nd International Congress of Antibodies-2010, 北京, (2010年3月27日)

[図書] (計2件)

1. Hashimoto M, Sekiyama K, Sekigawa A, Fujita M. Chaperone and Anti-Chaperone Properties of Synuclein: Implications for Development, Aging, and Neurodegenerative Disease. *Protein chaperones and protection from neurodegenerative diseases*. (Stephan N. Witt, Ed), **John Wiley & Sons**: New York, pp. 139-178. 2011. ISBN:978-1-118-06390-3
2. Sekigawa A, Fujita M, Sekiyama K, Takamatsu Y, Wei J, Hashimoto M. Gangliosides as a Double-Edged Sword in Neurodegenerative Disease. *Alzheimer's Disease Pathogenesis-Core Concepts, Shifting Paradigms and Therapeutic Targets*. (Suzanne De La Monte, Ed.), **InTech**:Rijeka, pp589-602. 2011. ISBN: 978-953-307-690-4

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: アディポネクチンを含む神経変性疾患の治療及び/又は予防用医薬組成物
発明者: 橋本款、関山一成
権利者: 橋本款、関山一成、高松芳樹、藤田雅代、関川明生
種類: 特許
番号: 特願 2011-274797
出願年月日: 2011年12月15日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 款 (HASHIMOTO MAKOTO)
財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・副参事研究員
研究者番号: 50189502

(2) 研究分担者

若林 孝一 (WAKABAYASHI KOICHI)
弘前大学・医学部・教授
研究者番号: 50240768

(3) 連携研究者

なし