

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 31 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21700399

研究課題名（和文）新規シヌクレインモデルマウスを用いた神経変性機序の解明及び治療・予防法の開発

研究課題名（英文）Investigation of neuropathology of synucleinopathies using novel model mice.

研究代表者

藤田 雅代 (FUJITA MASAYO)

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・主席研究員

研究者番号：90415539

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病(PD)やレビー小体型認知症(DLB)の病態をよく反映し、基礎的研究に有用なモデルマウスを確立し、病態解明に結び付けることを目的として、家族性 DLB 患者より発見された変異型 β シヌクレイン (syn) (123H) および α syn を過剰発現させたトランスジェニック(Tg)マウスを作製、解析した。 β syn(P123H)単独の Tg マウスは、非運動症状を顕著に示し、 β syn(P123H)/ α syn とともに発現するマウスは、神経細胞死をはじめ、PD、DLB で認められる症状を呈していた。これらのマウスを用いることで、PD や DLB の病態解明や、予防・治療薬のスクリーニングに役立てられる。

研究成果の概要（英文）：To establish useful model animal of Parkinson's Disease (PD) and dementia with Lewy bodies (DLB), transgenic (Tg) mice overexpressing dementia with Lewy bodies (DLB)-linked β syn(P123H) were made and analyzed. β syn(P123H) Tg mice mainly showed non-motor symptoms, whereas mice overexpressing β syn(P123H)/ α syn were characterized by extensive phenotypes, including neuronal cell death. These mice model could be a powerful tool with which to investigate the pathogenic mechanism of PD and DLB.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

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：神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) やレビー小体型認知症 (DLB) は、運動障害、精神症状、記憶障害などを伴った、主として高齢者に発症する神経変性疾患で、発症機序や有効な治療法は不明である。

PD や DLB の患者脳には、レビー小体と呼ばれる神経細胞内封入体特徴的に認めら

れる。レビー小体の主要構成成分は α シヌクレイン (syn) であることから、レビー小体形成を伴う一連の神経変性疾患はシヌクレインopathy と総称され、病態の解明に向けて α syn に着目した研究が数多く行われている。その一環として、 α syn を過剰発現させた Tg マウスが作製・解析されている。しかし、現在までに報告されている Tg マウスのほとん

どは PD/DLB 患者脳に形成されるようなレビー小体様封入体および神経細胞死は認められていなかった。さらに、それらの Tg マウスは、運動障害は引き起こすものの、記憶障害や精神症状などの非運動症状を含めた臨床症状は必ずしも再現されておらず、シヌクレイノパチーの病態をあらわすよいモデルとは必ずしも言えないのが実情で、よりよいモデル動物の作出が望まれていた。

研究代表者らは、 α syn だけでなく β syn の役割にも着目した。 β syn は、 α syn の凝集を抑制し、神経保護的に働くことが示唆されてきたタンパク質である。しかし、一方で、PD や DLB 患者の海馬の神経線維の週末に β syn が蓄積するなど、病的な状況下では α syn とは異なる機序で神経変性に寄与する可能性がある。これに関連し、2004 年に家族性および孤発性の DLB において β syn の 2ヶ所のミスセンス変異(V70M, P123H)が報告された。研究代表者らは変異型 β syn(P123H)を過剰発現させたトランスジェニック(Tg)マウスを作製したところ、レビー小体様封入体は認められなかったが、高齢マウスにおいて運動機能の低下を認め、病理学的には抗 syn 抗体陽性の蓄積物が認められた。また、運動能力が低下するよりも早い段階で、著しい認知機能の低下も認められ、より DLB に近い表現型を示すマウスであることが示唆された。

これらの結果は、変異型 β syn は軸索主体の病変に関与し、 α syn のとは異なる機序で病態発症に寄与することを示唆すると考えられた。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、変異型 β syn にも着目し、よりシヌクレイノパチーの病態を反映した新規モデルを確立し、治療法・予防法の開発に結び付けることを目的とする。具体的には、以下のことを行う。

(1) β syn(P123H)Tg および β syn(P123H)/ α syn ダブル Tg の表現型を詳細に解析し、新規モデル動物として確立する。

(2) 薬剤による治療効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) Thy1 プロモータ下で遺伝子発現を誘導した β syn(P123H)Tg マウス、および、 β syn(P123H)Tg マウスと α synTg マウスを交配させ bigenic マウスを作製し、脳を採取、半球に分け、一方は生化学的解析、もう一方は組織学的解析に用いた。生化学的解析は、特に部位による差異が大きいと、大脳皮質、海馬、線条体について、部位別に分け、検討に用いた。

また、 β syn(P123H)が α syn がなくとも単独で病態を起こしうるか確認するため、 α

syn ノックアウト(KO)マウスに β syn(P123H)を過剰発現させ、生化学的、組織学的解析を行った。

行動解析は、bigenic マウスに対し m、運動能力試験をロタロッドテストにて行った。また、シヌクレイノパチーにおいては、運動能力の低下が引き起こされる以前に、鬱症状などの非運動症状もしばしば表れることが知られている。そこで、 β syn(P123H)Tg マウスに対して、認知機能や社会行動の指標である巣作り行動、鬱状態の指標である尾部懸垂試験を行った。

(2) β syn(P123H)Tg マウスは、早い段階での認知機能低下がみられることから、DLB の病態を反映していると考えられるため、DLB に用いられる既存薬である塩酸ドネペジルを経口投与し、認知機能に改善が認められるか、検討した。

4. 研究成果

(1) Tg マウスの表現型の解析

① bigenic マウスの解析

bigenic マウスは、脳のあらゆる部位で syn の過剰発現がみられ、とくに皮質や海馬の錐体細胞体に syn の蓄積が認められた。生化学的には、単独の Tg マウスにくらべ α syn、 β syn(P123H)の可溶性がともに低下しており、それぞれの syn が相乗的に病的に作用していることが示唆された。

ロタロッドテストにて平衡運動能力を解析したところ、bigenic マウスでは、野生型マウス、 α syn 単独 Tg マウス、 β syn(P123H) 単独 Tg マウスに比べ、著しい低下が認められた(図 1)。

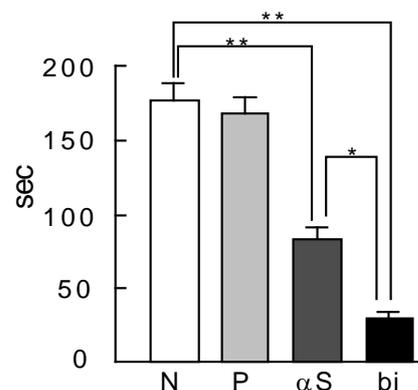


図 1・ロタロッドテスト。bigenic マウス (bi) では、他の遺伝子型のマウスに比べ、顕著な運動能力の低下が認められた

さらに、bigenic の線条体において、ドーパミン濃度の顕著な減少と、ドーパミン合成に関わる一連の酵素の発現低下が認められた。

一方で、bigenic マウスの大脳皮質および海馬 CA3 領域の錐体細胞において、fluoro jade 陽性の変性神経が見出された(図 2)。

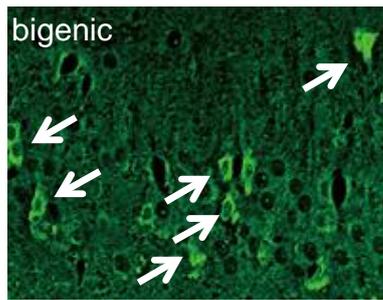


図 2・bigenic マウスで認められる fluoro jade 陽性像 (矢印が陽性細胞を示す)

変性神経は、 α syn に陽性を示していた。これらの細胞は TUNEL 陰性で、電顕による観察からもアポトーシスの所見は見られず、アポトーシス以外の細胞死が引き起こされていることが示唆された。

すなわち、これらの結果から、bigenic マウスは、単独の synTg と比べ、ドーパミン減少や神経細胞の変性など、シヌクレイノパチーの特徴を備えたモデルとして、病態発症機序や治療法開発に役立てられると考えられた。

② α synK0- β syn(P123H) Tg マウスの解析

内在性 α syn が不在の状態においても、 β syn(P123H) の蓄積が認められた。とくに、 β syn(P123H) Tg マウスで特徴的に認められる線条体・淡蒼球におけるスフェロイド状の蓄積も、認められた。また、アストロサイトの活性化も認められ、 β syn(P123H) はそれ単独で病的に作用し得ることが示唆された。

③ β syn(P123H) Tg マウスの非運動症状の解析

巣作り行動試験では、ほぼすべての野生型マウスでは紙の巣材を用いて巣を作製したのに対し、 β syn(P123H) Tg は一匹も巣を作る個体は認められず、認知機能、社会行動の異常が認められた。

また、尾部懸垂試験では、 β syn(P123H) Tg マウスは、野生型マウスにくらべ著しく無動時間が長く、鬱傾向にあることが見出された。したがって、 β syn(P123H) Tg マウスは、運動能力の低下以前に非運動症状を引き起こすというシヌクレイノパチーの病態を反映していることが示唆された。

④ まとめと今後の展望

以上の結果から、bigenic マウスは、運動障害やドーパミンの減少、細胞死など、従来のシヌクレイノパチーモデルマウスよりも病態を反映するモデルになると考えられる。

一方で、単独の β syn(P123H) Tg マウスは、認知機能低下、鬱症状などの非運動症状を主に引き起こすモデルになりうることが示唆された。これまでのシヌクレイノパチーモデルマウスは、PD を念頭においたものがほとんど

で運動障害に着目されたものがほとんどであるため、本研究で開発された β syn(P123H) Tg マウスは、シヌクレイノパチーの非運動症状の解析に有用なモデルとなると考えられる。

また、今回は変異型 β syn を用いての検討であったが、野生型 β syn も、加齢などの変化によって変異型とよく似た性質を持つ修飾を受け、病的に作用するようになる可能性を考え、今後、引き続いて検討していく予定である。

(2) 薬剤に対する効果の検討

実験開始の 10 日前より、塩酸ドネペジルを 10mg/kg/day で経口投与し、モリス水迷路を行い認知機能に対する影響を観察したが、この条件下では特に認知機能の改善は見いだせなかった。投与量や投与期間によって効果が異なる可能性があるため、効果の有無は、いくつかの投与条件を検討して判定する必要があると考えられる。

あるいは、 β syn(P123H) Tg マウスで認められる認知機能低下は、アセチルコリン系に起因しない可能性もある。実際の DLB でも塩酸ドネペジルが著効しないケースも知られており、病態によっては、多様な治療法を選択する必要があることを反映するのかもしれない。今後ほかの薬剤についても、効果を検討する予定である。

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 9 件)

1. Sekiyama K, Fujita M, Sekigawa A, Takamatsu Y, Waragai M, Takenouchi T, Sugama S, Hashimoto M. Ibuprofen ameliorates protein aggregation and astrocytic gliosis, but not cognitive dysfunction, in a transgenic mouse expressing dementia with Lewy bodies-linked P123H β -synuclein. *Neurosci Lett.* 515(1):97-101, 2012 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2012.03.037
2. 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-18 under acidic extracellular pH in LPS-primed microglial cells *J Neurochem.* 117(4):712-723, 2011 査読有
DOI:

- 10.1111/j.1471-4159.2011.07240.x
3. Sugama S, Takenouchi T, Fujita M, Kitani H, Hashimoto M. Cold stress induced morphological microglial activation and increased IL-1beta expression in astroglial cells in rat brain. *J Neuroimmunol.* 233(1-2):29-36, 2011 査読有
DOI: 10.1016/j.jneuroim.2010.11.002
 4. 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.* 1:110, 2010 査読有 DOI:10.1038/ncomms1101
 5. 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.* 41:2015-2024, 2009 査読有
DOI: 10.1016/j.biocel.2009.05.008
 6. Wei J, Fujita M, Nakai M, Waragai M, Sekigawa A, 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.* 174:1891-1909, 2009 査読有
DOI: 10.2353/ajpath.2009.080680
 7. Takenouch 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.* 182:2051-2062, 2009 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.0802577
 8. Sugama S, Takenouchi T, Kitani H, Fujita M, Hashimoto M. Microglial activation is inhibited by corticosterone in dopaminergic neurodegeneration. *J. Neuroimmunol.* 208:104-114, 2009 査読有
DOI: 10.1016/j.jneuroim.2009.01.016
 9. Sugama S, Takenouchi T, Fujita M, Conti B, Hashimoto M. Differential microglial activation between acute stress and lipopolysaccharide treatment. *J. Neuroimmunol.* 107:24-31, 2009 査読有
DOI: 10.1016/j.jneuroim.2008.11.007

[学会発表] (計 4 件)

1. Fujita M. et al., A β -synuclein mutation linked to familial dementia with Lewy bodies produces neurodegeneration when expressed in mouse brain. ADPD 2011, バルセロナ、スペイン、2011年3月11日、12日
 2. Fujita M. et al., Non-apoptotic cell death in hippocampus and cerebral cortex of bigenic mice overexpressing both β synuclein (P123H) and α synuclein. BMB 2010, 神戸 2010年12月7日
 3. 藤田雅代、他。 β シヌクレイン (P123H) 過剰発現型トランスジェニックマウスの解析、第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009年10月24日
 4. 藤田雅代、他。 β シヌクレイン (P123H) 過剰発現による新規シヌクレインパチーモデルマウスの確立、第 50 回日本神経病理学会総会、高松、2009年6月4日
6. 研究組織
(1) 研究代表者
藤田雅代 (FUJITA MASAYO)
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・主席研究員
研究者番号：90415539