

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790847

研究課題名（和文） α シヌクレイノパチーにおけるアミロイド伝播機序の解明

研究課題名（英文） Investigation of the amyloid propagation in alpha-synucleinopathy

研究代表者

笠井 高士 (Kasai Takashi)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：70516062

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病患者において脳脊髄液中においてアミロイド伝播機序に中心的役割を果たしていると推測されている細胞外 α シヌクレインオリゴマーが増加していることを示した。また中枢神経系に発現するセリンプロテアーゼであるニューロシンが主として細胞外に分泌され、in vitro において細胞外 α シヌクレインに対する分解活性を有していることを示した。

研究成果の概要（英文）：We showed increased levels of extracellular alpha-synuclein oligomer in CSF space of patients with Parkinson disease, which is supposed to play a role of amyloid propagation in alpha-synucleinopathy. We also demonstrated that Neurosin, a kind of serine proteases predominantly expressed in the central nervous system, secretes into extracellular space and might play a role of extracellular degradation of alpha-synuclein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード： α -シヌクレイン、オリゴマー、ニューロシン、パーキンソン病、

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病に対する分子遺伝学および生化学的研究は、1) 特異的な神経細胞封入体(レヴィー小体)の主要な構成成分が α -シヌクレインであること、2) α -シヌクレインは点突然変異が家族性PDを引起すだけでなく、正常な α -シヌクレイン遺伝子であっても重複変異が家族性パーキンソン病の原因になり、 α -シヌクレインの発現量が臨床的な重症度を決定すること、3) ユビキチン・プロテアソーム系を含む細胞内蛋白分解系に関

連する蛋白変異が家族性パーキンソン病を発症することを示してきた。以上の知見は、「パーキンソン病の病態発現には神経細胞内の α -シヌクレインの産生過剰ないし分解系の機能低下が重要である」ことを示唆している。

一方で、病理学的検討は、こうした単一細胞レベルの α -シヌクレイン代謝だけでは説明困難な知見を報告してきた。例えば、Braakらのパーキンソン病患者脳の前核からの α -シヌクレインの蓄積は、「迷走神経背側核と嗅

球に最初に起こり、その後脳幹では延髄から中脳へ上向性に進展し、大脳皮質では側頭葉前内側部から他の皮質に広がっていく」ことが示唆されており、また胎児中脳黒質細胞移植を受けたパーキンソン病患者の剖検脳において、移植片神経細胞内に α -シヌクレインの蓄積が生じることが示されている。これらの報告は細胞間において α -シヌクレイン病理の伝播(アミロイド伝播)が存在することを示唆している。

従来、 α -シヌクレインはシグナルシーケンスを持たないので細胞外には存在しないと理解されていた。そのため上述の伝播機構に α -シヌクレインが直接関与する可能性は、これまでほとんど検討されていなかった。しかし最近の α -シヌクレインに関する細胞生物学的研究が提示する、細胞外 α -シヌクレインの存在とその生理的意義についていくつかの重要な証拠として、具体的には a) α -シヌクレインが培養上清中に分泌され、体液中に微量ながら存在すること、b) 分泌される α -シヌクレインは易凝集性であり、細胞障害性負荷によって分泌量が増加すること、最近ではさらに c) 易凝集性 α -シヌクレインフィブリルおよびオリゴマーが受容体依存性エンドサイトーシスによって神経細胞内に取り込まれ、細胞外環境からクリアランスされることが報告されていた。申請者はこうした研究経過から細胞外 α -シヌクレインは何らかの病的意義を有しているとの着想を持つに至り、上述したこれまで報告と併せて「障害された神経細胞から過剰かつ有害な易凝集性 α -シヌクレインが細胞外に分泌され、それを周辺細胞が取り込んで細胞障害が拡散することが α -シヌクレイン病理の伝播の中心的メカニズムである」との仮説をもって新たに研究を開始することが必要であると考えた。

2. 研究の目的

- 1) 代表的な中枢神経における細胞外液サンプルである脳脊髄液(CSF)において、易凝集性 α -シヌクレインに相当する α -シヌクレインオリゴマーを特異的に測定する検出系を開発し、パーキンソン病患者と対照患者間での比較を行うこと。
- 2) α -シヌクレインに対する分解活性を有するセリンプロテアーゼとして申請者が従来から注目していたニューロシンの細胞外における α -シヌクレイン分解に関与している可能性について検討すること。

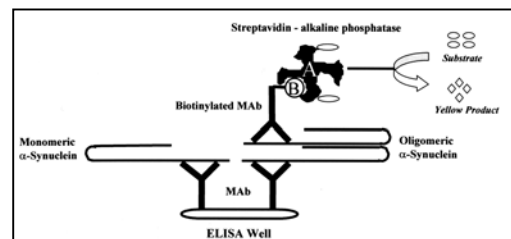
3. 研究の方法

- 1) ヒト髄液中 α -シヌクレインの定量

孤発性のパーキンソン病患者 32 名脳病変を有さない対照患者 28 名からなるグループ(第 1 コホート)とパーキンソン病患者 25 名、

アルツハイマー病(AD)患者 35 名、進行性核上性麻痺(PSP)患者 18 名および対照患者 43 名からなるグループ(第 2 コホート)を対象とした。今回我々が新たに開発した α -シヌクレインオリゴマーを特異的に定量する ELISA 系を用いて対象者の髄液中 α -シヌクレインオリゴマーを定量して比較した。

我々が用いた ELISA 系は、ヒト α -シヌクレインの 121-125 残基を抗原とする抗ヒト α -シヌクレインモノクローナル抗体 (C211, Santa Cruz Biotech.) をキャプチャー抗体に、またこの同じ抗体をビオチン化したモノクローナル抗体をレポーター抗体に用いている。この ELISA 系は α -シヌクレインモノマーがキャプチャー抗体と結合しても、抗原認識部位が既に占拠された状態になっているためレポーター抗体が結合できないためシグナルを検出しないが、 α -シヌクレインオリゴマーがレポーター抗体と結合した場合は残存する抗原認識部位にレポーター抗体が結合することによってシグナルを生じることを原理としており、実際にこれまでの検討においてオリゴマーを特異的に検出することを確認している。



(倫理面への配慮)

対象とした患者全員からは京都府立医科大学倫理委員会で承認された方法により説明および同意を得た上で、髄液を今回の研究に使用した。

- 2) α -シヌクレイン分解酵素であるニューロシンの細胞内および細胞外における酵素活性の検討

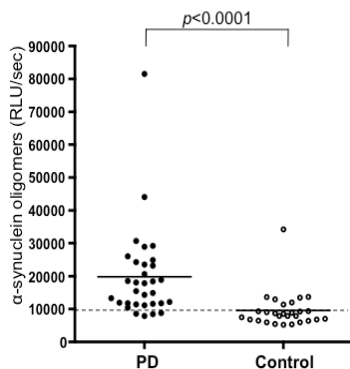
Pre-Pro ニューロシンおよび Pre-Pro ニューロシンと EGFP の融合蛋白質発現ベクター、さらに α -シヌクレイン発現ベクターを構築した。ニューロシンおよびニューロシン-EGFP 発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクトし免疫染色および蛍光顕微鏡によってニューロシンの局在を観察した。さらにニューロシン発現細胞の細胞抽出液および 12 時間後、24 時間後の無血清培養上清をウエスタンブロッティングで検討した。抗ニューロシン抗体は MAB2008(B&D systems)を用いた。また、発現細胞の培養上清のセリンプロテアーゼ活性を定量する目的で、培養上清を t-Butyloxycarbonyl-L-Glutaminyl-L-Alanyl-L-Arginine 4-

Methyl- Coumaryl- 7- Amide (Boc-Gln-Ala-Arg- MCA, ペプチド研究所) と反応させ、酵素反応によって遊離した 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) を蛍光分光光度計を用いて励起波長 380nm、蛍光波長 440nm で測定した。培養上清中のニューロシンによる α -syn 分解過程はリコンビナント α -シヌクレインを上清中に添加し、ウエスタンブロッティングによって検証した。抗 α -シヌクレイン抗体は抗 α / β シヌクレイン抗体 N-19(Santa Cruz Biotechnology) を用いた。細胞内ニューロシンの酵素活性の有無はゼラチンザイモグラフィによって評価した。細胞内ニューロシンによる α -シヌクレイン分解については、ニューロシンと α -シヌクレインを HEK293T 細胞に共発現させて、 α -シヌクレインの分解断片の有無をウエスタンブロッティングによって検討した。

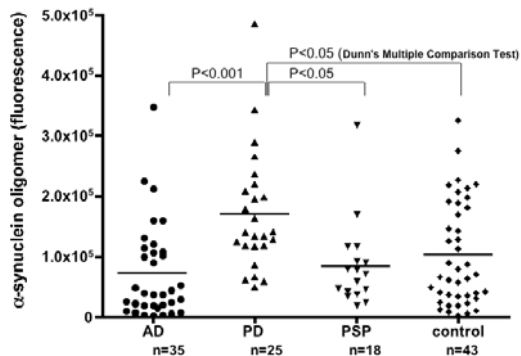
4. 研究成果

1)

脳脊髄液中の細胞外 α -シヌクレインオリゴマーは、第 1 コホートにおいて PD 患者群において対照患者群に比較して有意に高いことが示された ($P < 0.001$, マンホイットニー U 検定)。



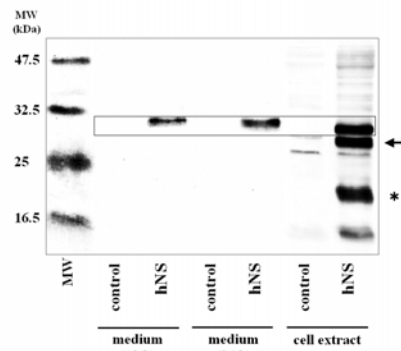
また第 2 コホートにおいても同様に PD 患者群が、AD 患者 ($p < 0.001$, Dunn の多重比較検定, $n = 35$)、PSP 患者 ($p < 0.05$, $n = 18$) および対照患者 ($p < 0.05$, $n = 43$) のいずれと比較しても、CSF 中 α -シヌクレインオリゴマーが有意に増加していることが示された。



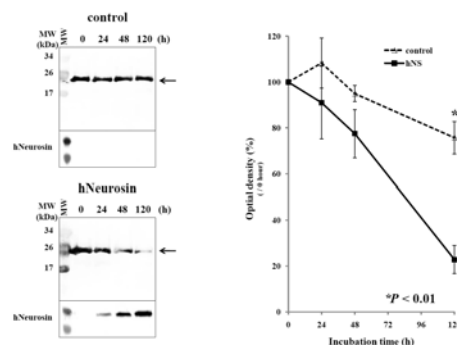
以上の結果はパーキンソン病において細胞外 α -シヌクレインオリゴマーが増加していることを示した最初の報告である。PD の生化学的診断にも応用できる可能性があると考え、Neurology 誌 (Neurology 16:1766-1772, 2010) に報告した。

2)

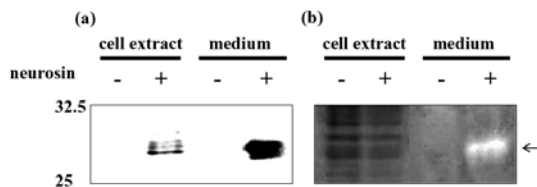
ニューロシンおよびニューロシン-EGFP 発現細胞におけるニューロシンの局在を蛍光顕微鏡によって観察したところニューロシンは ER マーカーと局在性が一致していたが、ミトコンドリアマーカーとは局在が一致しなかった。ライソソームマーカーとニューロシンは一部で局在性の一致が認められた。ニューロシン発現細胞の細胞抽出液および無血清培養上清のウエスタンブロッティングを図 2 に示す。細胞抽出液中にはニューロシンの全長に相当するバンド (図: 矢印) が検出され、さらにニューロシンが糖鎖修飾を受けたものと推測されるやや分子量の大きいバンドが検出された (図: 四角棒)。培養上清中では後者のバンドのみが検出された (図 1, 四角棒)。細胞抽出液中にはニューロシンの分解産物と推測されるニューロシン抗体陽性の断片ペプチドが検出された (図: アスタリスク)。以上の結果より、ニューロシンは細胞内では主として ER に局在し、細胞外に分泌される



培養上清におけるセリンプロテアーゼ活性の検討では、ニューロシンをトランスフェクトした細胞の培養上清中においてプロテアーゼ活性が検出された。ニューロシン発現細胞の培養上清中に添加したリコンビナント α -シヌクレインは経時的に減少した (図 2)。以上の結果より、細胞外に分泌されたニューロシンにはセリンプロテアーゼ活性が存在し、 α -シヌクレインに対する分解活性を有していることが確認された。



細胞内ニューロシンのプロテアーゼ活性を検討する目的で行ったゼラチンゼイモグラフィの結果を図に示す。培養上清中のニューロシンに相当するバンドにおいてゼラチンに対する分解が認められるのに対し、細胞抽出液中のニューロシンにはゼラチンに対する分解反応は認められなかった。



さらに、ニューロシンおよび α -シヌクレインを共発現させたHEK293T細胞のウエスタンブロッティングによる検討においてもニューロシン発現細胞の細胞抽出液中に α -synの分解産物は検出できなかった。以上から細胞内のニューロシンにはプロテアーゼ活性はなく、 α -シヌクレイン分解活性も有していないと考えられた。

以上の結果を Neurosci Res 誌(Neurosci Res67:341-346, 2010)に報告した

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5件)

Noto Y, Shibuya K, Sato Y, Kanai K, Misawa S, Sawai S, Mori M, Uchiyama T, Iose S, Nasu S, Sekiguchi Y, Fujimaki Y, Kasai T, Tokuda T, Nakagawa M, Kuwabara S. Elevated CSF TDP-43 levels in amyotrophic lateral sclerosis: specificity, sensitivity, and a possible prognostic value. Amyotroph Lateral Scler. 12. 140-143. 2010 (査読あり)

Tokuda T, Oureshi MM, Ardah MT, Varghese S, Shehab SA, Kasai T, Ishigami N, Tamaoka A, Nakagawa M, El-Agnaf OM. Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. Neurology. 75. 1766-1770. 2010(査読あり)

Tatebe H, Watanabe Y, Kasai T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M, Tokuda T. Extracellular neurosin degrades alpha-synuclein in cultured cells. Neurosci Res. 67. 341-346. 2010 (査読あり)

Fukumoto H, Tokuda T, Kasai T, Ishigami N, Hidaka H, Kondo M, Allsop D,

Nakagawa M. High-molecular-weight beta-amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. FASEB J. 24. 2716-2726. 2010(査読あり)

徳田隆彦 笠井高士 中川正法 脳脊髄液および血液中の TDP-43 定量とその臨床的有用性 最新医学 67 巻 7 号 1642-1647. 2010 (査読なし)

[学会発表] (計3件)

笠井高士, 建部陽嗣, 徳田隆彦, 渡邊義久, 田中雅樹: α -Synuclein 分解酵素である neurosin の細胞内動態の検討. カテコールアミンと神経疾患研究会(第17回), 東京, 2009. 4. 18.

建部陽嗣, 渡邊義久, 笠井高士, 徳田隆彦, 水野敏樹, 田中雅樹, 中川正法: Neurosin による α -synuclein 分解の解析. 日本神経科学大会(第32回), 名古屋, 2009. 9. 18.

笠井高士, 建部陽嗣, 徳田隆彦, 石神紀子, 水野敏樹, 中川正法, 渡邊義久, 田中雅樹: α -synuclein 分解酵素である neurosin の細胞内動態の検討. 日本神経学会総会(第50回), 仙台, 2009. 5. 20.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井高士 (KASAI TAKASHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号: 70516062