

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07424

研究課題名(和文) 血清 シヌクレインシードに着眼したシヌクレイノパチーの病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the Pathology of Synucleinopathies and Development of New Therapies Focused on Serum Alpha-Synuclein Seeds

研究代表者

波田野 琢 (Taku, Hatano)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60338390

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)：-シヌクレインの病原性シードを血清から特定する新たな診断技術であるIP/RT-QuIC法を確立した。この方法で、特にパーキンソン病患者と健康なコントロールを高い精度で鑑別することに成功した。多系統萎縮症患者の診断では精度は若干低い、陽性症例はコントロールより多かった。海外での共同研究も行い盲検試験も成功し、診断マーカーとして技術開発をした。この成果はNature Medicineに掲載された。また、病理学的診断された症例にRT-QuIC法を駆使し全身臓器からシードを特定。マウスモデルで-シヌクレインシードの分布を追跡する研究も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した血清ASシードの同定はシヌクレイノパチーをバイオリジカルに診断する重要な手がかりとなった。さらに、得られた凝集体の構造がシヌクレイノパチーにおいて異なることは、鑑別診断に有用であることに加えて、病態メカニズムの解明にも一石を投じる革新的な研究である。また、血清にASシードが存在することの発見により、全身臓器にASシードが存在することが予想され、実際に病理学的に確認している点で学術的に重要な研究である。さらに血清や全身のASシードをターゲットとした治療法である血漿交換療法が確立されれば、新規疾患修飾治療として社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：We have established a new diagnostic technique called IP/RT-QuIC, which identifies pathogenic alpha-synuclein seeds from serum. This method has successfully differentiated patients with Parkinson's disease from healthy controls with high accuracy. While the precision for diagnosing patients with multiple system atrophy was slightly lower, there were more positive cases than in the controls. We also collaborated with Luxenberg, and their double-blind cohort successfully differentiated from Parkinson's disease to control. Thus, we developed our technique as a valuable detection of diagnostic marker. These findings have been published in sNature Medicine. In addition, using the RT-QuIC method, seeds were identified from whole-body organs in pathologically diagnosed cases. Research has also been conducted on a mouse model to track the distribution of alpha-synuclein seeds.

研究分野：神経内科学

キーワード：-シヌクレイン パーキンソン病 多系統萎縮症 IP/RT-QuIC

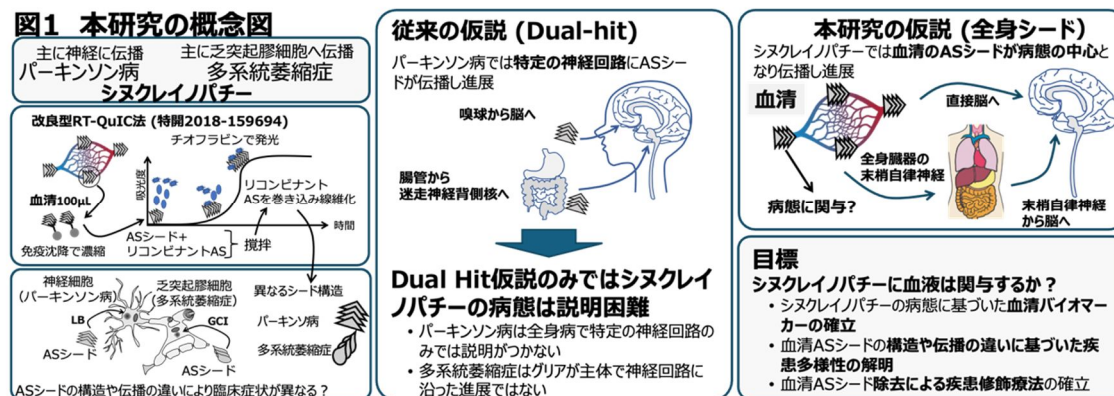
様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は運動障害が前景となる神経変性疾患であるが、認知症、睡眠障害、自律神経機能障害などの多彩な非運動症状を合併する。症状や経過は患者間で大きく異なり、急速に進行し認知症を合併する症例や長期経過でも振戦のみで緩やかに進行する症例など幅が広い。本疾患の病理学的特徴としてレヴィ小体(LB)と呼ばれる神経細胞内の封入体が挙げられる。LBの主な構成タンパクは α -シヌクレインであり、このタンパク質の凝集が病態の中心として考えられている。また、パーキンソン病と同様にAS凝集が原因であるが、主に乏突起膠細胞が標的となり封入体(GCI)が形成される疾患として多系統萎縮症がある。この疾患は小脳症状、自律神経機能障害も合併するためより重篤な経過をたどる。また、小脳症状が前景となる症例とパーキンソン症状が前景となる症例があり多様性を認める。パーキンソン症状が前景となる場合、初期にはパーキンソン病と酷似し鑑別が極めて困難であり、簡便で正確に診断できるバイオマーカーの開発は喫緊の課題である。

α -シヌクレインは β シート構造を持つ異常構造体が正常な構造を異常構造へ変換させて巻き込み、線維化が加速することで疾患を誘発する。この異常構造体を α -シヌクレインシードと定義するが、神経細胞間で伝播し広がることが推測されている。パーキンソン病の連続剖検脳の解析より腸管から迷走神経を介して脳幹から上行する経路と嗅球から嗅神経を伝わり大脳へ広がる2つの経路より病変が広がるdual hit仮説が定説となっている。しかし、パーキンソン病の臨床経過及び症状は多様性があり、この仮説どおりでは説明がつかない。また、多系統萎縮症は中枢神経における乏突起膠細胞をターゲットとして多数のシステムが広範囲に障害され、病態の主座は中枢神経と考えられている。しかし、末梢神経にも α -シヌクレイン凝集を認め、なおかつ血清より α -シヌクレインシードが検出されることから、中枢における α -シヌクレイン伝播のみでは病態の説明はできない。また、ヒトにおける疫学的、病理学的検討のみならず、マウスの静脈内から α -シヌクレインシードを全身投与すると、血液脳関門などを介して中枢神経全般に α -シヌクレイン凝集が認められたとする報告があり、血液を介した伝播進展も関与している可能性が強く示唆される。このような背景から、『 α -シヌクレイン凝集の起点は何か?』、『 α -シヌクレイン凝集の進展経路はどこか?』という疑問が解決すれば病態進展の全貌が解明され、それを標的とした疾患修飾療法が期待できると想起した。この疑問に対して、シヌクレイノパチー患者でも α -シヌクレインシードが特定の神経回路に沿った伝播のみではなく、血清から全身末梢神経および直接、血液脳関門や膠細胞介在リンパ管システム(glymphatic system)などを介して脳へ直接移行し、神経細胞や乏突起膠細胞へ伝播する経路も存在すると考えると幅広い病態進展パターンと、多彩な表現型の説明が可能であると想起した(全身シード仮説)(図1)。そこで、血清 α -シヌクレインシードを解析すれば解決できると考えて本研究計画を立案した。

図1 本研究の概念図



2. 研究の目的

本研究の目的はシヌクレイノパチー患者から得られた血清 α -シヌクレインシードが、病態の起点となることを証明し、構造の違いが病態の進展に影響を及ぼすことを確認し、それを除去することによる脳への進展抑制の実現化を目的とする。これが達成されることにより、シヌクレイノパチーの病態に基づいた血清バイオマーカーの確立、血清 α -シヌクレインシードの構造や伝播の違いに基づいた疾患多様性の解明、血清 α -シヌクレインシードの除去による疾患修飾療法の確立という成果が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 診断バイオマーカーとして血清 α -シヌクレインシードの有用性の検討

シヌクレイノパチーの鑑別に血清に存在する α -シヌクレインシードを免疫沈降で濃縮し、その後、シードを増幅させ可視化する方法であるRT-QuIC法を行う(IP/RT-QuIC)ことで血清 α -シヌクレインシードを検出した。この手法による α -シヌクレインシードの検出が診断に有用であるか検討を行った。パーキンソン病221症例、多系統萎縮症39症例、レヴィ小体型認知症76

症例、レム睡眠行動異常症 73 症例、進行性核上性麻痺 30 症例、アルツハイマー病 25 症例、PRKN 変異パーキンソン病 17 症例、正常対象 128 症例の血清を取得し IP/RT-QuIC による解析を行なった。また、一部の症例について、電子顕微鏡による解析を行い構造を確認した。また、A53T 変異 α -シヌクレイン安定発現 HEK293T 細胞にシードを導入し凝集体を作成させて構造を超解像度顕微鏡で確認した。これらの構造解析により血清 α -シヌクレインシードの構造異常とシヌクレイノパチーの疾患フェノタイプに関連があるか、さらに鑑別が可能かを検討した。

(2) 患者由来血清 α -シヌクレインシードの全身から脳への伝播様式の解析

全身臓器(脳、末梢神経、血液、肺、心臓、腎臓、肝臓、腸など)を採取し、免疫染色、RT-QuIC 法で α -シヌクレインシードの存在、構造解析を行い発症の起点を探索した。

(3) アフェレシス療法による病態進展の抑止

全身投与した α -シヌクレインシードの血漿交換による伝播抑制の可能性について、マウスパラピオースモデルを用いて検討した。リコンビナント α -シヌクレインシード 50 μ g を全身へ投与し伝播・凝集の程度について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 診断バイオマーカーとして血清 α -シヌクレインシードの有用性の検討

シヌクレイノパチーであるパーキンソン病で 95%、レビー小体型認知症で 90%、多系統萎縮症で 64%、またレム睡眠行動異常症では 44%の症例より AS シードが検出された。非シヌクレイノパチー全体では 9%、対照では 8.5%、PRKN では 0%の検出率であり、シヌクレイノパチー群での AS シードの検出が有意に高い結果であった。また、RT-QuIC におけるチオフラビン蛍光カーブの立ち上がりである凝集速度はシヌクレイノパチーで有意に上昇していた。(図 2)

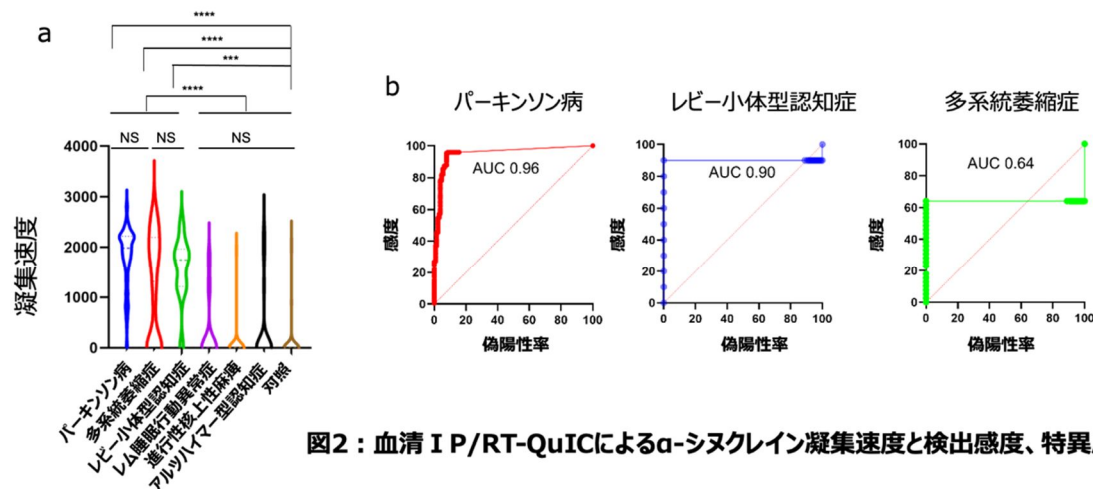


図2：血清 IP/RT-QuICによる α -シヌクレイン凝集速度と検出感度、特異度

また、各疾患患者群の血清から増幅した α -シヌクレイン凝集体を電子顕微鏡で確認したところ、パーキンソン病では 2 本の細い線維がねじれた構造を、レビー小体型認知症では数本の線維が複雑にねじれた構造を、また多系統萎縮症では太い線維がねじれる、または直線的な構造を示しており、疾患ごとに構造が異なることを同定した(図 3)。

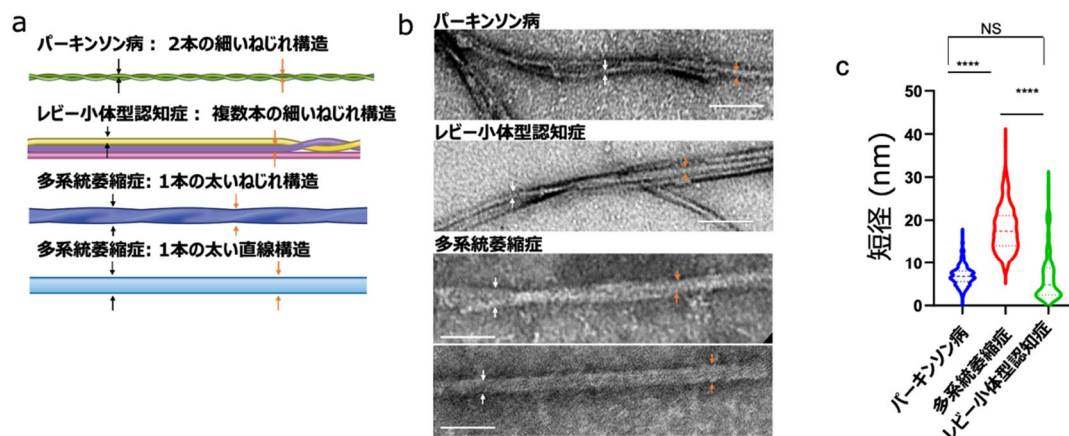


図3：各 α -シヌクレイノパチーにおける血清由来ASシードを用いて増幅した凝集体の構造の違い

次に、 α -シヌクレインパチー患者血清から増幅した α -シヌクレイン凝集体が、鑄型としてどのような性質を有するか、培養細胞を用いて検討した。増幅した α -シヌクレイン凝集体を、GFP 結合 A53T 変異型 α -シヌクレインを安定発現させた HEK293T 細胞へ導入し、細胞内に形成された凝集体を観察したところ、密度が低い紐型、高密度型、線維が絡み合いやや密度が低い中密度型と三つの異なった構造を持つ凝集体が観察され、各疾患で形成される凝集体の割合が異なることを見出した (図 4)。

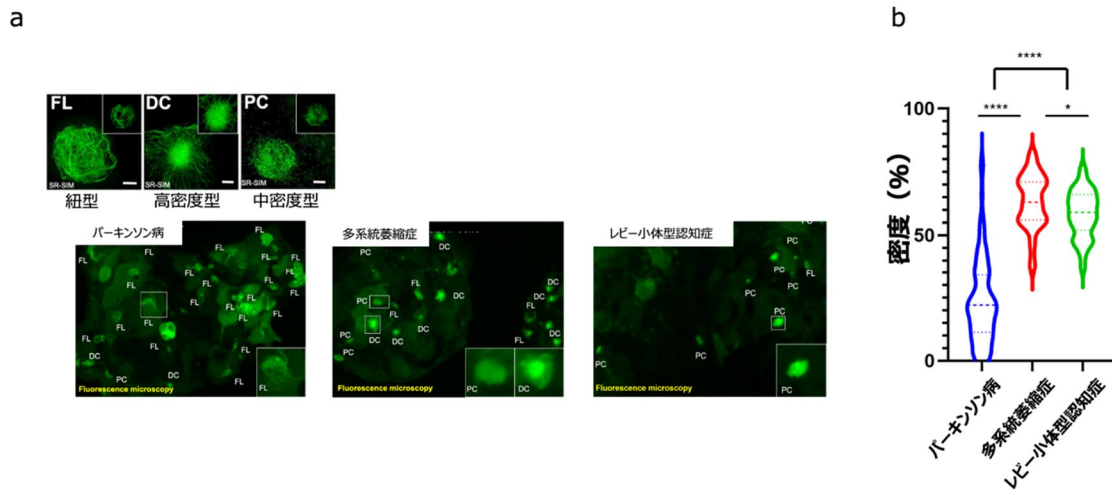


図 4 : 各 α -シヌクレインパチー患者血清由来のASシードの培養細胞における凝集体形成の検討

(2) 患者由来血清 α -シヌクレインシードの全身から脳への伝播様式の解析

ヒト病理検体に対して、proximity ligation assay (PLA)法による解析を着手した。PLA 法の問題点として SN 比の低さがあげられた。そのため SN 比を改善させたシグナル増幅システム(グルコースオキシダーゼによるグルコースの酸化反応とスチラミドシグナル増幅法 (PSA 法) を組み合わせた FS-GO (Fluorochromized styramide-Glucose Oxidase) 法も用いた解析を行い比較することで、相互作用を可視化できる系を立ち上げた。さらに、パラフィン切片から α -シヌクレインシードの検出に成功し、細胞アッセイで構造の違いを評価でき、PLA 法および FS-GO 法の結果と比較して、 α -シヌクレインシードの構造が神経変性疾患における凝集体形成に与える影響を解析する技術を確立した。

また、パーキンソン病 10 症例、正常コントロール 8 症例、変性疾患対象 7 症例の脳および全身臓器を取得した。パーキンソン病 1 症例とコントロール 1 症例について、各臓器における RT-QuIC を行い、AS シードを探索した。探索的な検討であるが、肺、精巣、腓腹神経に AS シードは確認されなかったが、脳、顎下腺、腸、心臓、甲状腺、副腎において AS シードを確認する事ができた。今後、症例数を増やして、全身臓器における α -シヌクレインシードの分布などを検討していく。

(3) アフェレシス療法による病態進展の抑止

マウスの血漿交換モデルとしてパラビオーシスを作成した。また、 α -シヌクレイン fibril を量子ドットでラベルしてマウスの尾静脈より全身投与し、in vivo 発光・蛍光イメージングシステム (IVIS) でシードの分布を見る実験系を立ち上げ評価をした。

パラビオーシスを作成し 1-2 週間後にリコンビナント α -シヌクレインシード 50 μ g の全身投与を行ったところ、非投与側への伝播を認めた。また、 α -シヌクレインシード 5 μ g の脳内投与を行ったところ、パラビオーシスをしていないマウスに α -シヌクレインシードの脳内投与を行った群と比較して、パラビオーシスマウス(投与側マウス)において、 α -シヌクレインの凝集の軽減を確認した。さらに、エクソソームに内包した α -シヌクレインシードはより脳内へ到達しやすいくことを確認した。

<参考文献>

Okuzumi A, Hatano T, Matsumoto G, Nojiri S, Ueno SI, Imamichi-Tatano Y, Kimura H, Kakuta S, Kondo A, Fukuhara T, Li Y, Funayama M, Saiki S, Taniguchi D, Tsunemi T, McIntyre D, Gérandy JJ, Mittelbronn M, Kruger R, Uchiyama Y, Nukina N, Hattori N. Propagative α -synuclein seeds as serum biomarkers for synucleinopathies. Nat Med. 2023 Jun;29(6):1448-1455. doi: 10.1038/s41591-023-02358-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nishikawa N, Murata M, Hatano T et al.	4. 巻 103
2. 論文標題 Idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder in Japan: An observational study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Parkinsonism and Related Disorders	6. 最初と最後の頁 129 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2022.08.011	査読の有無 無
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 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 無
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 Li Fangjun, Hatano Taku, Hattori Nobutaka	4. 巻 87
2. 論文標題 Systematic analysis of the molecular mechanisms mediated by coffee in Parkinson's disease based on network pharmacology approach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 104764 ~ 104764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jff.2021.104764	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 Sakurai Anri, Tsunemi Taiji, Ishiguro Yuta, Okuzumi Ayami, Hatano Taku, Hattori Nobutaka	4. 巻 269
2. 論文標題 Comorbid alpha synucleinopathies in idiopathic normal pressure hydrocephalus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurology	6. 最初と最後の頁 2022 ~ 2029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-021-10778-1	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 Ogawa Takashi, Hatano Taku, Kamagata Koji, Andica Christina, Takeshige-Amano Haruka, Uchida Wataru, Saito Yuya, Shimo Yasushi, Oyama Genko, Umemura Atsushi, Iwamuro Hirokazu, Ito Masanobu, Hori Masaaki, Aoki Shigeki, Hattori Nobutaka	4. 巻 90
2. 論文標題 White matter alterations in Parkinson's disease with levodopa-induced dyskinesia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parkinsonism and Related Disorders	6. 最初と最後の頁 8~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2021.07.021	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 Andica Christina, Kamagata Koji, Saito Yuya, Uchida Wataru, Fujita Shohei, Hagiwara Akifumi, Akashi Toshiaki, Wada Akihiko, Ogawa Takashi, Hatano Taku, Hattori Nobutaka, Aoki Shigeki	4. 巻 7
2. 論文標題 Fiber-specific white matter alterations in early-stage tremor-dominant Parkinson's disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Parkinson's Disease	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41531-021-00197-4	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 Pilotto A, Hatano T (23/30) et al	4. 巻 97
2. 論文標題 Association of Orthostatic Hypotension With Cerebral Atrophy in Patients With Lewy Body Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e814~e824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000012342	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 該当する

1. 著者名 Koinuma Takahiro, Hatano Taku, Kamagata Koji, Andica Christina, Mori Akio, Ogawa Takashi, Takeshige-Amano Haruka, Uchida Wataru, Saiki Shinji, Okuzumi Ayami, Ueno Shin-ichi, Oji Yutaka, Saito Yuya, Hori Masaaki, Aoki Shigeki, Hattori Nobutaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Diffusion MRI Captures White Matter Microstructure Alterations in PRKN Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Parkinson's Disease	6. 最初と最後の頁 1221~1235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JPD-202495	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 Ogawa Takashi, Hatano Taku, Kamagata Koji, Andica Christina, Takeshige-Amano Haruka, Uchida Wataru, Kamiyama Daiki, Shimo Yasushi, Oyama Genko, Umemura Atsushi, Iwamuro Hirokazu, Ito Masanobu, Hori Masaaki, Aoki Shigeki, Hattori Nobutaka	4. 巻 7
2. 論文標題 White matter and nigral alterations in multiple system atrophy-parkinsonian type	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Parkinson's Disease	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41531-021-00236-0	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11件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Okuzumi A, Hatano T, Matsumoto G, Nukina N, Hattori N.
2. 発表標題 Identification of seral disease-specific alpha-synuclein seeds using IP-RT-QuIC.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ueno SI, Hatano T, Okuzumi A, Oda Y, Hattori N.
2. 発表標題 Analysis of -synuclein aggregation and proteomics in 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

1. 発表者名 Taku Hatano and Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Lipid Metabolism and -synuclein aggregation
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波田野琢、服部信孝
2. 発表標題 腸管からパーキンソン病を考える
3. 学会等名 第74回日本自律神経学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 波田野琢、服部信孝
2. 発表標題 生体内の シヌクレインタンパク質が見たい!
3. 学会等名 第61回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taku Hatano, Ayami Okuzumi, and Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Searching for novel biomarkers in Parkinson's disease.
3. 学会等名 The 2021 Annual meeting of the Korean Society of Neurodegenerative Disease (KSND) 30th (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taku Hatano, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Updates in Neuroimaging for Parkinson Disease and Related Disorders
3. 学会等名 9th Singapore International Parkinson Disease and Movement Disorders Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taku Hatano, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Metabolite Biomarkers Parkinson Disease and Parkinsonism
3. 学会等名 9th Singapore International Parkinson Disease and Movement Disorders Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taku Hatano, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Mechanisms of α -synuclein aggregation and potential treatment strategy for PD
3. 学会等名 MDS-AOS Basic Science Summer School (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taku Hatano, Akio Mori, Yutaka Oji, Ayami Okuzumi and Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Mechanisms of α -synuclein aggregation and potential treatment strategy for PD
3. 学会等名 RIKEN Symposium ~ Mechanistic Insights into Neurodegenerative Disorders ~ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taku Hatano, Takashi Ogawa, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 The pathomechanisms of Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's disease.
3. 学会等名 第95回日本薬理学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 波田野琢 (服部信孝編)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本醫事新報社	5. 総ページ数 224
3. 書名 順天堂大学脳神経内科ではこうしている 最新パーキンソン病診療	

〔産業財産権〕

〔その他〕

NCER-PD https://parkinson.lu

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
研究分担者	奥住 文美 (Okuzumi Ayami) (90826075)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
研究分担者	上野 真一 (Ueno Shin-ichi) (40875944)	順天堂大学・医学部・助教 (32620)	

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