

令和 6 年 5 月 28 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：21K07444

研究課題名(和文) エキソソームによる シヌクレインの末梢組織から中枢神経への拡散機序の解明

研究課題名(英文) Exploration of the mechanism of α -synuclein propagation from peripheral tissues to the central nervous system via exosomes

研究代表者

常深 泰司 (Tsunemi, Taiji)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50401344

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)：iPS細胞から血管内皮細胞、壁細胞、星状細胞への分化に成功し、血管内皮細胞をインサート膜内へ、壁細胞と星状細胞をプレート底に培養することで、血管内皮細胞の一層構造を維持したiBBBモデルを確立した。このモデルはサイズ依存性の透過性とタイトジャンクション機能を有し、レセプター機能も有していた。パーキンソン病モデルとして用いたSNCA A53T変異と正常血管内皮細胞でも α -シヌクレイン(α -syn)が暴露することにより、血管内皮細胞のレセプター依存性透過性が変化したが、 α -synを輸送する既知のレセプターの発現量に変化なく、新規のレセプターは同定されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最大の成果は、従来はヒト不死化細胞を用いてしか作成されなかった血液脳関門(BBB)モデルをiPS細胞から各々の細胞に分化し構築し得たことである。そしてパーキンソン病患者から作成したiBBB、健常人から作成したiBBBも α -synに暴露されるとその透過性が変化し、全身から中枢神経へ α -synが移行が変化することを見出した。この機序は不明であるが、既知のレセプター機能の亢進によるものと考えられた。iBBBの確立により、パーキンソン病以外の他の神経変性疾患、免疫疾患、感染症におけるBBBの詳細な機能変化が解析可能となっており、今後の発展性の高い成果があったと言える。

研究成果の概要(英文)：We successfully differentiated induced pluripotent stem cells (iPSCs) into vascular endothelial cells, mural cells, and astrocytes. We established an iPSC-derived blood-brain barrier (iBBB) model by culturing vascular endothelial cells on an insert membrane and mural cells and astrocytes on the plate bottom, maintaining the multilayer structure of vascular endothelial cells. This model exhibited size-dependent permeability, tight junction, and receptor functions. Exposure to α -synuclein (α -syn) in both a Parkinson's disease model having SNCA A53T mutation and normal vascular endothelial cells altered the receptor-dependent permeability of vascular endothelial cells. Still, it did not affect the expression levels of known receptors that transport α -syn, nor were any novel receptors identified.

研究分野：脳神経内科

キーワード：パーキンソン病 シヌクレイン 血管脳関門

1. 研究開始当初の背景

シヌクレイノパチーはシナプス前タンパク質である α -シヌクレイン(α -syn)の異常凝集を特徴とする疾患群で、パーキンソン病(PD)、レヴィ小体型認知症(DLB)、多系統萎縮症、純粋自律神経不全症が含まれる。現在、根本的治療法はなく、治療法は対症療法に限られている。PDは最も患者数が多く、無動、固縮、振戦、姿勢保持障害を主症状とする運動障害性疾患であるが、嗅覚障害、便秘、うつ、認知機能障害などの非運動症状も合併する。加齢により患者数が増加するため、超高齢化社会を迎える全世界において治療法の開発が大きな課題となっている。本邦の指定難病の中でも最も患者数の多い疾患となっている。中脳黒質のドパミン細胞が変性、消失するが、残存するドパミン細胞に蓄積する α -syn を主要構成成分とするレヴィ小体を病理学的特徴としている。

近年、この α -syn が細胞間に広がり病態が進行するプリオン仮説が考えられている。ヒト剖検脳の病理解析からの PD や DLB は末梢組織に蓄積した α -シヌクレイン(α -syn)の異常構造体がシードとなり、何らかの経路で脳内に移行し、脳内の豊富に存在する正常な α -syn を異常構造体に変換して病態が進行する可能性が有力視されている。その経路として当初は自律神経の軸索を経た経神経的な輸送経路が考えられた。実際、虫垂を切除した人は将来的に PD を発症しにくいという疫学データもある。しかしマウスを用いた動物実験では、腸管にインジェクトした α -syn シードは神経を伝って脳内に侵入するも脳幹までしか広がらずヒトの病態を再現できなかった。一方、PD 患者の剖検脳や動物実験から、PD において血液脳関門(BBB)の破綻が報告されており、ここを介した液性因子による伝播の可能性も考えられる。実際、PD 患者の血液には α -syn シードが多く含まれていることが我々を含め多くの研究で報告されている。

これらのことを背景に、申請者らは末梢組織に蓄積した α -syn シードが BBB を通過して脳内に侵入する可能性を検討する必要があると考えた。その分子メカニズムを解明するためには BBB の細胞モデルを構築する必要があると考えた。

2. 研究の目的

これまでの研究の結果から、末梢組織の α -syn シードが神経回路を経て中枢神経に侵入する可能性とともに、血液中の α -syn シードが BBB を通過して脳内に侵入する可能性が考えられる。当初有力視されていた前者の可能性は動物実験からは支持される結果が得られず、本研究では後者の可能性を検討する。また、多くの PD は孤発性であるが少数ではあるものの遺伝的な背景を持って発症する PD もある。この重要な背景因子である遺伝子の影響を解明するためには動物モデルでは不十分で、ヒト iPS 細胞を用いた BBB モデル(iPSC-derived BBB; iBBB)の構築が必要と考えた。

よって本研究の目的は、iBBB の構築と、iBBB の PD における機能の変化を解明することである。

3. 研究の方法

これまでの BBB モデルは不死化したヒト血管内皮細胞、壁細胞、星状細胞を用いて作成されていた。今回は、まず健常人と *SNCA* A53T 変異を有する PD 患者の iPS 細胞からプロトコ

ールに則り BBB 構成細胞である血管内皮細胞、壁細胞、星状細胞への分化を行った。これらの細胞の分化は免疫染色により各々の細胞に特異的に発現しているタンパク質を確認することで証明した。

さらに血管内皮細胞の機能検査を行った。経上皮電気抵抗 (TEER) 測定器による電気抵抗の測定、蛍光標識した直径の異なるデキストランを持ちいたデキストラン透過性の検証、さらにレセプター依存性透過性の検証のため、トランスフェリンの透過性の検討を行った。さらにこれらの3種類の細胞を共培養して iBBB を作成した。具体的には壁細胞をインサート膜内へ培養し、その上部に内皮細胞を培養、さらにインサート膜裏に星状細胞を播種することによって、本来の BBB 構造により近い三重培養に成功した。この iBBB の電気生理学的、生化学的機能解析を行った。これの iBBB を PD 変異 (SNCA A53T 変異) を有する細胞からも作成し、健常人の iBBB との相違を検討した。

4. 研究成果

iPS 細胞から分化した血管内皮細胞、壁細胞、星状細胞を免疫染色にて確認した。具体的には血管内皮細胞への分化は CD31、Claudin5 の、壁細胞は PDGFRB の、星状細胞は GFAP の発現を免疫染色にて確認した。健常人と SNCA A53T 変異を有する PD 患者では大きな相違はなかった。さらに各々の mRNA の発現も各々の細胞から mRNA を抽出し、cDNA に変換、real time PCR で検討し、差がないことを確認した。

まず血管内皮細胞の機能実験を行なった。具体的には、経上皮電気抵抗 (TEER) 測定器を用いた経時的機能評価にてタイトジャンクション機能が約 2 日間保持されることが示された。さらに蛍光標識した 10 kDa と 400 Da のデキストランの透過を培養液の蛍光強度を測定した。その結果サイズ依存性の透過性 ($p < 1 \times 10^{-7}$) を確認した。さらにレセプター依存性にとりこまれるトランスフェリンと同サイズのデキストランとの透過性の比較からレセプター依存性の選択的透過性 ($p < 1 \times 10^{-6}$) を確認した。最後にエンドサイトーシス阻害剤である Dynasore を用いてエンドサイトーシス機能を有していること ($p < 1 \times 10^{-5}$) も観察した。以上から機能的な内皮細胞へ分化し得たことが示された。

そして壁細胞をインサート膜内へ培養し、その上部に内皮細胞を培養、さらにインサート膜裏に星状細胞を播種することで、本来の BBB 構造により近い三重培養モデルの構築に成功した。この iBBB も 10 kDa と 400 Da のデキストランの透過性からサイズ依存性の透過性を有しており、抗 Claudin5 抗体をインサートに投与することで透過性が上昇したことからタイトジャンクション機能を保持していることが確認された。さらに、これらの3種類の細胞を共培養して作成した iBBB は血管内皮細胞に比べバリア機能より強固になった。以上の結果は、これまでの不死化細胞を用いた BBB の細胞モデルと同等のモデルをヒト iPS 細胞で作成することに成功したことを意味する。

さらに SNCA A53T 変異を有する iBBB は健常人から作成した iBBB と比較して、デキストランの透過性やトランスフェリンの透過性は変わらないものの a-syn シードの透過性が変化していることを見出した。またエキソソームに含有された a-syn シードは a-syn シードそのままより iBBB をより通過しやすいことが判明した。さらに iBBB モデルにインサート側から a-syn を暴露することにより、iBBB のレセプター依存性透過性が変化することを見出した。

以上の結果をもとに a-syn を輸送するレセプターのプロテオミクス解析を行った。a-syn シード暴露前後の血管内皮細胞のレセプターの定量比較では発現量が変化する新規のレセ

プターは同定されず、既知の a-syn シードのレセプターの発現にも変化はなかった。以上の結果より、a-syn シードの透過性の更新は、既知の a-syn のレセプターの機能の亢進によるものと考えられた。

以上のように、当初の目的通り、iPS 細胞から分化した血管内皮細胞、壁細胞、星状細胞から BBB のモデル作成 (iBBB) に成功した、さらに *SNCA* A53T 変異を有する iPS 細胞からも BBB を作成し、機能の相違を検討し得た。これらの結果は BBB がパーキンソン病で変化しており、当初の予想通り BBB を超えた a-syn シードの移動が生じている可能性を裏付ける結果と言える。この iBBB により、パーキンソン病以外の他の神経変性疾患、免疫疾患、感染症における BBB の機能変化も解析可能で今後の発展性の高い成果があったと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 0件）

1. 著者名 Sasazawa Y, Souma S, Furuya N, Miura Y, Kazuno S, Kakuta S, Suzuki A, Hashimoto R, Hirawake-Mogi H, Date Y, Imoto M, Ueno T, Kataura T, Korolchuk VI, Tsunemi T, Hattori N, Saiki S	4. 巻 41
2. 論文標題 Oxidative stress-induced phosphorylation of JIP4 regulates lysosomal positioning in coordination with TRPML1 and ALG2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO J	6. 最初と最後の頁 e111476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2022111476	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 Tezuka T, Taniguchi D, Sano M, Shimada T, Oji Y, Tsunemi T, Ikeda A, Li Y, Yoshino Y, Ogata J, Shiba-Fukushima K, Funayama M, Nishioka K, Imai Y and Hattori N	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 Dise	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 Shiina Kenta, Tsunemi Taiji, Hattori Nobutaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Cerebellar blood perfusion is a diagnostic, but not a prognostic, marker for parkinsonian-dominant type multiple system atrophy.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Parkinsonism Related Disorders	6. 最初と最後の頁 106975 ~ 106975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parkreldis.2024.106975	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 Hatano Taku, Okuzumi Ayami, Matsumoto Gen, Taiji Tsunemi, Hattori Nobutaka	4. 巻 -
2. 論文標題 -Synuclein: A Promising Biomarker for Parkinson's Disease and Related Disorders	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Movement Disorders	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14802/jmd.24075	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 Cardoso F, Tsunemi T, Trenkwalder C	4. 巻 39
2. 論文標題 A Statement of the MDS on Biological Definition, Staging, and Classification of Parkinson's Disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Movement Disorders	6. 最初と最後の頁 259 ~ 266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mds.29683	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 Okuzumi A, Hatano T, Matsumoto G, Nojiri S, Ueno S, Imamichi-Tatano Y, Kimura H, Kakuta S, Kondo A, Fukuhara T, Li Y, Funayama M, Saiki S, Taniguchi D, Tsunemi T, McIntyre D, Grady JJ, Mittelbronn M, Kruger R, Uchiyama Y, Nukina N, Hattori N	4. 巻 29
2. 論文標題 Propagative α -synuclein seeds as serum biomarkers for synucleinopathies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 1448 ~ 1455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41591-023-02358-9	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 Ishiguro Yuta, Tsunemi Taiji, Shimada Tomoyo, Yoroi Asako, Ueno Shin-Ichi, Takeshige-Amano Haruka, Hatano Taku, Inoue Yuichi, Saiki Shinji, Hattori Nobutaka	4. 巻 703
2. 論文標題 Extracellular vesicles contain filamentous α -synuclein and facilitate the propagation of Parkinson's pathology	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149620 ~ 149620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2024.149620	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Taiji Tsunemi AND Nobutaka Hattori
2. 発表標題 21. Blood-brain barrier: a novel therapeutic target for neurological disorders.
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taiji Tsunemi, Yuta Ishiguro, Asako Yoroisaka, Tomoyo Shimada, Wado Akamatsu, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Glial exosomal secretion contributes to α -synuclein accumulation and propagation in brains
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoyo Shimada, Asako Yoroisaka, Taiji Tsunemi, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Establishment of iPSC derived-Blood Brain Barrier
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuta Ishiguro, Taiji Tsunemi, Asako Yoroisaka, Tomoyo Shimada, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Exosomal α -synuclein filaments as a novel biomarker for Parkinson's disease
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taiji Tsunemi, Yuta Ishiguro, Asako Yoroisaka, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Altered levels of exosomal secretion affect α -synuclein accumulation and propagation in brains
3. 学会等名 62th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuta Isiguro, Taiji Tsunemi, Asako Yoroisaka, Nobutaka Hattori
2. 発表標題 Exosomal alpha-synuclein filaments as a novel biomarker for Parkinson's disease
3. 学会等名 62th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taiji Tsunemi, YUTA ISHIGORO, TOMOYO SHIMADA, AYAKO YOROISAKA, NOBUTAKA HATTORI
2. 発表標題 Exosomes contribute to the development of Parkinson's disease
3. 学会等名 The 22nd "Takamatsu" International Symposium for PD & MD in Tokyo (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	赤松 和土 (Wado Akamatsu) (60338184)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授 (32620)	
研究分担者	竹下 幸男 (Takeshita Yukio) (70749829)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	

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