

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700433

研究課題名(和文) タンパク質の異常蓄積を標的とした神経変性疾患治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategies against neurodegenerative diseases targeting on abnormal protein aggregates

研究代表者

鈴掛 雅美(増田雅美)(MASUDA-SUZUKAKE, Masami)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・研究員

研究者番号：20583751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では新規の神経変性疾患モデルマウスの確立に成功しました。このモデルは野生型マウスを用いて患者脳内での変化を再現した画期的なモデルであり、疾患の発症・進行メカニズム解明や新規治療法評価に極めて有用と考えられます。

具体的には、パーキンソン病やレビー小体型認知症の患者脳内で蓄積しているシヌクレインタンパク質が線維構造をとっている事に着目し、試験管内で作ったシヌクレイン線維を野生型マウス脳内に接種しました。その結果わずか3ヶ月でマウス脳内にシヌクレイン蓄積病理が形成され、さらに患者脳と同様の蓄積病理の脳内分布拡大も認められました。

研究成果の概要(英文)：Alpha-Synuclein (asyn) is the major component of filamentous inclusions that constitute the defining characteristic of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. However, the molecular mechanisms underlying asyn accumulation and spread are unclear.

In this study, we show that intracerebral injections of fibrils of recombinant asyn efficiently induced asyn pathologies in wild-type mice, whereas mice injected with soluble asyn did not. Immunoblot analysis demonstrated that endogenous mouse asyn started to accumulate 3 months after inoculation, while injected human asyn fibrils disappeared in about a week. These results indicate that asyn fibrils have prion-like properties and inoculation into wild-type brain induces asyn pathology in vivo. This is a new mouse model of sporadic asynucleinopathy, and should be useful for elucidating progression mechanisms and evaluating disease-modifying therapy.

研究分野：医学薬学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：国際情報交流 シヌクレイン 神経変性疾患 プリオン パーキンソン病 レビー小体型認知症

1. 研究開始当初の背景

多くの神経変性疾患では異常なタンパク質の蓄積が認められ、その脳内分布は臨床症状と相関することが知られている。蓄積タンパク質の種類と蓄積部位は疾患によって異なり、アルツハイマー病では高度にリン酸化されたタウタンパク質が神経細胞内に、アミロイドペプチドが神経細胞外に蓄積し、パーキンソン病ではリン酸化シヌクレインが、前頭側頭葉変性症や筋萎縮性側索硬化症ではリン酸化 TDP-43 が蓄積している。蓄積タンパク質の多くはシート構造に富む線維を形成し、リン酸化されて蓄積しているという共通点を有するため、類似した蓄積機構と神経細胞傷害性を持つと考えることができる。

そのため、蓄積タンパク質の線維化・蓄積の抑制や除去により、タンパク質蓄積を伴う神経変性疾患の有効な治療法となる可能性がある。しかしながら、従来の蓄積阻害剤や蓄積メカニズムの解析は個々のタンパク質ごとに解析されており、その共通性に着目した研究は行われていなかった。

また、従来の神経変性疾患モデルマウスの多くは、野生型または家族性の遺伝子変異を導入した原因遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスであり、神経変性疾患の80%以上が孤発性発症である事を考慮すると最適なモデルとは言い難かった。

2. 研究の目的

アルツハイマー病やパーキンソン病など多くの神経変性疾患では、シート構造に富む線維構造をとって凝集したタンパク質の異常蓄積が認められ、その脳内分布は臨床症状と相関することが知られている。そのため、タンパク質の線維化・蓄積の抑制、または除去によって神経変性疾患の有効な予防法・治療法につながる可能性が高い。そこで本研究では、蓄積タンパク質の線維化阻害剤の開発とその阻害メカニズムの解明を目標とする。また、孤発性の神経変性疾患発症モデル動物の作成を試み、孤発性発症のメカニズム解明と新規治療開発への応用を目標とした。

3. 研究の方法

1) 既存医薬品化合物ライブラリーを用い、in vitro 蓄積モデル系で新規蓄積阻害剤のスクリーニング

2) in vitro で蓄積阻害効果を示した化合物はタンパク質蓄積培養細胞モデルでの阻害効果と作用メカニズムの解析

3) 既存の神経変性疾患モデルマウス(タウ P301L Tg マウス等)に新規蓄積阻害剤を投与後、行動異常の改善効果、脳の病理学的解析、生化学的解析により治療効果を評価

4) 孤発性発症の神経変性疾患モデル作成を目指し野生型マウス脳内にリコンビナントのタウ、シヌクレイン、または TDP-43 の線維を投与。その後、行動試験と脳の病理学的解析、生化学的解析により蓄積タンパク質

の量とその性質について評価

4. 研究成果

本研究では野生型マウスを用い、孤発性発症の神経変性疾患モデルマウスの作成に成功した。これまでのモデルマウスは遺伝子改変したトランスジェニックマウスが主であったが、今回野生型マウスを用いて患者脳と同様の病理形成・伝播をおこすモデルを作成することができた。具体的には、パーキンソン病やレビー小体型認知症の原因タンパク質であるシヌクレインに着目し、異常型構造のシヌクレインをマウスの脳内に注入するとマウス脳内の正常シヌクレインを異常型に変換し、その病変が広がる事を実証した。

方法としては、精製したシヌクレインを試験管内で異常構造にし、マウスの脳内に注入すると、注入後わずか3ヶ月でマウス脳内には患者脳内の変化と良く似た異常シヌクレイン蓄積が認められ、それは時間経過に伴い脳全体に広がった。さらに、この病変はマウス脳内の正常なシヌクレインが異常な構造に変換されて蓄積し形成されていた。この結果から、微量の異常型シヌクレインが細胞内に存在するだけで、正常なシヌクレインを異常型に変換し増幅され、細胞内を伝わって脳内に広がる事でレビー小体型認知症やパーキンソン病が進行すると考えられる。この機構はプリオンの伝播・増幅メカニズムと極めて良く似ている。本研究で確立したマウスモデルはレビー小体型認知症やパーキンソン病の新規治療法開発への応用が期待でき、今後 in vitro スクリーニングより得られた化合物の治療効果の評価を行う予定である。

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 11 件)

Mann DM, Rollinson S, Robinson A, Callister J, Snowden SJ, Gendron T, Petrucelli L, Masuda-Suzukake M, Hasegawa M, Davidson Y, Pickering-Brown S. Dipeptide repeat proteins are present in the p62 positive inclusions in patients with Frontotemporal Lobar Degeneration and Motor Neurone Disease associated with expansions in C9ORF72. *Acta Neuropathologica Communications*. 2013. doi: 10.1186/2051-5960-1-68. 査読有

Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji H, Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Tamaoka A, Hasegawa M, Akiyama H. Differential diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis from Guillain-Barré syndrome by quantitative determination of TDP-43 in cerebrospinal fluid. *Int J Neurosci*. 2013. doi: 10.3109/00207454.2013.848440. 査読有

Dan A, Takahashi M, Masuda-Suzukake M,

Kametani F, Nonaka T, Kondo H, Akiyama H, Arai T, Mann MA D, Saito Y, Hatsuta H, Murayama S, Hasegawa M. Extensive deamidation at asparagine residue 279 accounts for weak immunoreactivity of tau with RD4 antibody in Alzheimer's disease brain. doi:10.1186/2051-5960-1-54. Acta Neuropathologica Communications. 2013.1:54. 査読有

Foulds PG, Diggie P, Mitchell JD, Parker A, Hasegawa M, Masuda-Suzukake M, Mann DM, Allsop D. A longitudinal study on α -synuclein in blood plasma as a biomarker for Parkinson's disease. Sci. Rep. 2013 Aug 29;3:2540. doi: 10.1038/srep02540. 査読有

Nonaka T, Masuda-Suzukake M, Arai T, Hasegawa Y, Akatsu H, Obi T, Yoshida M, Murayama S, Mann DM, Akiyama H, Hasegawa M. Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. Cell Rep. 2013 Jul 11;4(1):124-34. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.007. 査読有

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann DM, Hasegawa M. Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. Brain. 2013 Apr;136(Pt 4):1128-38. doi: 10.1093/brain/awt037. 査読有

Kimura T, Tsutsumi K, Taoka M, Saito T, Masuda-Suzukake M, Ishiguro K, Plattner F, Uchida T, Isobe T, Hasegawa M, Hisanaga S. Isomerase Pin1 Stimulates Dephosphorylation of Tau Protein at Cyclin-dependent Kinase (Cdk5)-dependent Alzheimer Phosphorylation Sites. J Biol Chem. 2013 Mar 15;288(11):7968-77. doi: 10.1074/jbc.M112.433326. 査読有

Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H, Hasegawa M. Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. PLoS One. 2012;7(12):e52389. doi: 10.1371/journal.pone.0052389. 査読有

Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T, Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M, Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M, Mann DM, Tamaoka A. Molecular analysis and biochemical classification of TDP-43 proteinopathy. Brain. 2012 Nov; 135: 3380-91. doi: 10.1093/brain/aws230. 査読有

Wang Y, Shi M, Chung KA, Zabetian CP, Leverenz JB, Berg D, Srulijes K, Trojanowski JQ, Lee VM, Siderowf AD,

Hurtig H, Litvan I, Schiess MC, Peskind ER, Masuda M, Hasegawa M, Lin X, Pan C, Galasko D, Goldstein DS, Jensen PH, Yang H, Cain KC, Zhang J. Phosphorylated α -synuclein in Parkinson's disease. Sci Transl Med. 2012 Feb 15;4(121):121ra20. 査読有. doi:10.1126/scitranslmed.3002566.

Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A, Hasegawa M. Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 6;417(1):116-21. 査読有. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.066.

〔学会発表〕(計 5 件)

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama T, Mann D, Hasegawa M. Prion-like propagation of pathological α -synuclein in brain. 第 86 回日本生化学会, 2013 年 9 月 13 日口頭発表. パシフィコ横浜.

鈴掛(増田)雅美、野中隆、細川雅人、笈川貴行、新井哲明、秋山治彦、David Mann、長谷川成人. レビー小体型認知症患者脳不溶性画分の脳内接種は野生型マウス脳内にレビー小体型病理を形成させる. 第 54 回日本神経病理学会総会, 2013 年 4 月 25 日口頭発表. タワーホール船堀.

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M. Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. The 11th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's diseases. 2013 年 3 月 7 日ポスター発表, Florence Italy.

鈴掛(増田)雅美、笈川貴行、細川雅人、野中隆、秋山治彦、長谷川成人. シヌクレイン線維の脳内接種は野生型マウス脳にレビー小体型病理を形成させる. 第 31 回日本認知症学会, 2012 年 10 月 26 日口頭発表, つくば国際会議場.

Suzukake M, T Watanabe S, Suzuki N, Hisanaga S, Hasegawa M. Evaluation of tau aggregation inhibitors and immunization with phosphorylated tau peptides in tauopathy model mice. Alzheimer's association International Conference 2011. 2011 年 7 月 18 日ポスター発表 Paris France.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 新規タウオパチーモデルマウスの作製方

法

発明者：鈴掛 雅美、長谷川 成人

権利者：鈴掛 雅美、長谷川 成人

種類：特許

番号：特願 2013-268257

出願年月日：2013 年 12 月 26 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/research/topics/2013/0307.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴掛（増田） 雅美 （MASUDA-SUZUKAKE, Masami）

公益財団法人東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能研究分野・研究員

研究者番号：20583751