

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890197

研究課題名(和文) アルファ・シヌクレインの神経毒性及びプリオン様伝播の分子機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) The elucidation of the neurotoxic and prion-like propagative molecular mechanism of alpha synuclein and the clinical application

研究代表者

建部 陽嗣 (Tatebe, Harutsugu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00637027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：アルファ・シヌクレイン( $\alpha$ -syn)は、パーキンソン病を含むシヌクレイン病の主要な病理構成成分である。海馬初代培養神経細胞において、 $\alpha$ -synは興奮性シナプスマーカーである小胞グルタミン酸トランスポーター1と共局在することを発見した。

また、リコンビナント  $\alpha$ -syn単量体およびヒト髄液中の  $\alpha$ -synを、分子ふるいクロマトグラフィー(SEC)で分画すると60kDaの大きさを呈するが、変性ゲルでは15kDaを呈した。 $\alpha$ -syn二量体やオリゴマーは、SECでより大きなサイズで分画された。よって、髄液中の  $\alpha$ -synは、主に単量体で存在することが分かった。

研究成果の概要(英文)：alpha-Synuclein( $\alpha$ -syn) is the major pathological component of synucleinopathies including Parkinson's disease. In primary mouse hippocampal neuronal cultures,  $\alpha$ -syn-positive synapses were colocalized with the excitatory synapse marker vesicular glutamate transporter-1.

When  $\alpha$ -syn was evaluated with non-denaturing gels or size exclusion chromatography (SEC) columns,  $\alpha$ -syn monomers migrated as 50- to 60-kDa proteins; however, in denaturing gels, they migrated as 15-kDa proteins. The disulfide-linked dimer and oligomer migrated slower than either the unfolded recombinant  $\alpha$ -syn or the native  $\alpha$ -syn in SEC. As a result,  $\alpha$ -Syn exists predominantly as a disordered monomer in CSF.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学

キーワード：アルファ・シヌクレイン 髄液 オリゴマー モノマー

1. 研究開始当初の背景

わが国のパーキンソン病(PD)の有病率は10万人に100-150人と言われ、高齢化社会を迎え今後その頻度はますます増加すると思われる。そのため、PDの病態の解明及び治療法の開発が求められている。

最近のPDの研究では、異常に凝集した線維性アルファ・シヌクレイン( $\alpha$ -syn)よりも、その凝集過程の中間体である $\alpha$ -synオリゴマーこそが神経細胞毒性の原因であると考えられるようになってきている。

また、PDにおいては、 $\alpha$ -synの異常な細胞内蓄積物が特定の分布様式に従い広がるプリオン様伝播現象(prion-like expansion)が注目されており(図2)、その伝播様式には可溶性の $\alpha$ -synオリゴマーが神経細胞から分泌され、隣接する神経細胞へと取り込まれるという分子病態が想定されている。以上から、 $\alpha$ -synオリゴマーは、PDの発症(神経細胞毒性)及び進展( $\alpha$ -syn病理の伝播)の両方に関わる重要な分子であると考えられている。

そのため、 $\alpha$ -synオリゴマーに関する未解決の基礎的な問題を解明し、 $\alpha$ -synを利用した新しい診断方法や治療薬への臨床応用に展開するための基礎研究を行う必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究ではPDに特徴的な病理所見であるLewy小体の主要な構成成分である $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ -syn)蛋白について、未だ解明されていない以下の基礎的な問題を解決し、さらにPD診断バイオマーカーおよび治療標的として臨床応用するための研究基盤を確立する。

- 1) 神経毒性を有する可溶性 $\alpha$ -synオリゴマーの構造及び伝播様式を明らかにする。
- 2) 変異型 $\alpha$ -synを用い、神経毒性を有する因子の探索と分解過程を検証する。
- 3) PD患者における細胞外液中の $\alpha$ -synの構造を特定する。

3. 研究の方法

- 1) 神経毒性を有する可溶性 $\alpha$ -synオリゴマーの構造及び伝播様式を明らかにする

どのような構造の $\alpha$ -synが神経毒性を有し、伝播しやすいのかは未だ明らかとなっていない。本研究では、まず、 $\alpha$ -synオリゴマーを合成し、培養神経細胞に対する毒性を評価する。毒性の強い、もしくは弱いオリゴマー種を同定し、その分子量や安定性などを明らかにする。また、各種 $\alpha$ -synの細胞内への取り込みおよび細胞外への放出を観察し、伝播しやすい $\alpha$ -syn型を同定する。

- 2) PD患者における細胞外液中の $\alpha$ -synの構造を特定する

ヒトにおける細胞外 $\alpha$ -synモノマー及びオリゴマーの分子量や安定性を、髄液・血液から同定する。また、PDおよびその他の疾患における $\alpha$ -synの分子種及びそれらの異同は明らかになっていない。従って、

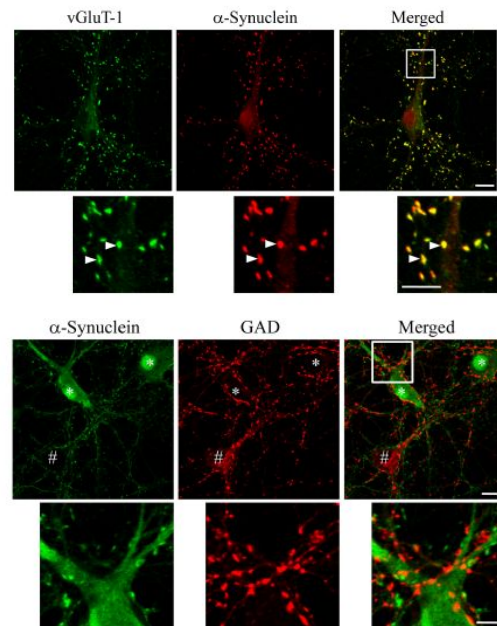
本研究では、PDおよびその他神経変性疾患患者の髄液および血液を用い、PD特異的な細胞外 $\alpha$ -synモノマー及びオリゴマー分子の構造を解明する。

4. 研究成果

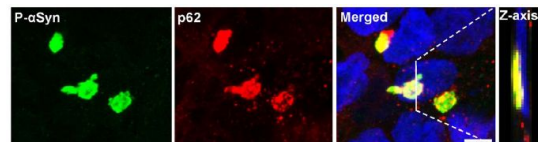
1) マウス海馬初代神経細胞において、 $\alpha$ -synは興奮性シナプスマーカー(vGluT-1)と強く共局在を示すが、抑制性シナプスマーカー(GAD)とは共局在を示さなかった。

また、外来的に $\alpha$ -syn線維を振りかけた場合も同様の結果を示した。以上の結果は、興奮性および抑制性ニューロンにおいて、 $\alpha$ -syn発現調節のために、異なる機序が存在することが示唆され、 $\alpha$ -syn伝播機序に関わる因子となり得ると考えられた。

以上の結果をPloS One誌(PLoS One. 25:9(2): e89327, 2014.)に報告した。

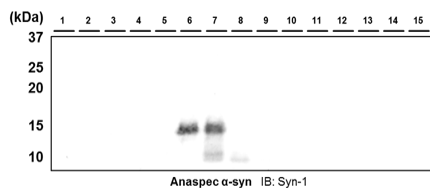
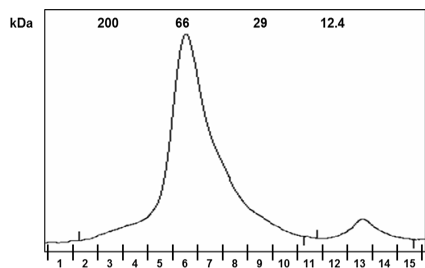


2)  $\alpha$ -syn線維を培養細胞に形質導入すると、細胞内 $\alpha$ -syn封入体は、アダプター蛋白であるp62/SQSTM1で取り囲まれており、その分解にはオートファジー・リソソーム系が関わっていることがわかった。



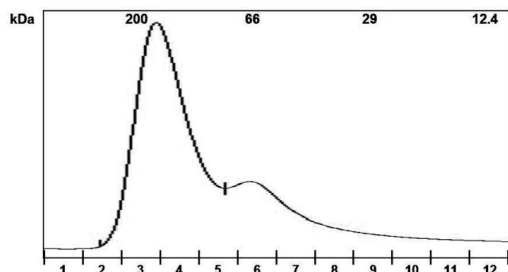
以上の結果をPloS One誌(PLoS One. 7(12):e52868, 2012.)に報告した。

3)リコンビナント  $\alpha$ -syn の構造について，分子ふるいクロマトグラフィー (SEC)にて分画すると，60kDa 画分に溶出される．しかし，ウエスタンブロット(WB)では 15kDa の大き

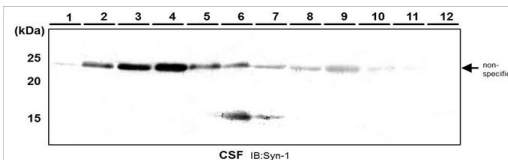
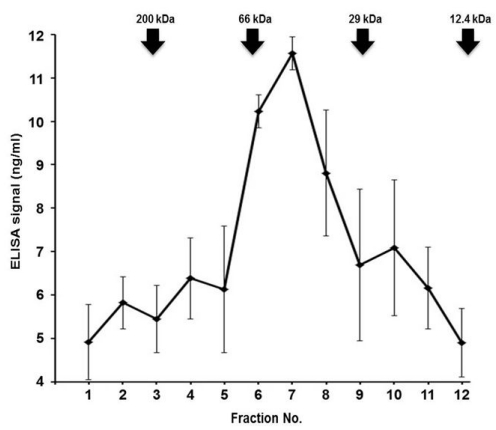


さで確認される．

二量体を形成する  $\alpha$ -syn A140C は，SECにて 140kDa の画分に溶出される．



次に，ヒト髄液を SEC にて分画した後， $\alpha$ -syn ELISA および WB にて各画分中の  $\alpha$ -syn を検出した．すると，髄液中の  $\alpha$ -syn は，SEC において 60kDa 画分で溶出され，WB では 15kDa の大きさを確認された．



以上の結果より，ヒト髄液中の  $\alpha$ -syn は主に単量体で存在していることが分かった．現在，論文執筆中である．

## 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 2 件)

Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tatebe H, Miyata S, Tokuda T, Mizuno T, Tanaka M. Differential expression of alpha-synuclein in hippocampal neurons. PLoS One. 25;9(2):e89327,2014. (査読あり)

Watanabe Y, Yoshimoto K, Tatebe H, Kita M, Nishikura K, Kimura M, Tanaka M. Enhancement of alcohol drinking in mice depends on alterations in RNA editing of serotonin 2C receptors. Int J Neuropsychopharmacol.17(5): 739-51,2014. (査読あり)

Watanabe Y, Tatebe H, Taguchi K, Endo Y, Tokuda T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M. p62/SQSTM1-dependent autophagy of Lewy body-like  $\alpha$ -synuclein inclusions. PLoS One.7(12):e52868, 2012. (査読あり)

〔学会発表〕(計 8 件)

Tatebe H, Tokuda T et al.  $\alpha$ -Synuclein is present as a monomer in the biological fluids. 20<sup>th</sup> World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders . Geneva , Switzerland . 2013.12.11.

Ishii R, Tatebe H et al. Interference from heterophilic antibodies in  $\alpha$ -syn ELISA. 20<sup>th</sup> World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders . Geneva , Switzerland . 2013.12.11.

Tatebe H, Egawa M et al. Effect of acupuncture for motor symptoms and quality of life in Parkinson's disease. 5<sup>th</sup> Global University Network of Traditional Medicine. Kyoto, Japan. 2013.11.16.

建部陽嗣，徳田隆彦ら．生体液中の  $\alpha$ -シヌクレインは単量体で存在する．第 54 回日本神経学会総会，東京，2013.5.31.

建部陽嗣，徳田隆彦ら．生体液中の  $\alpha$ -シヌクレインは単量体で存在する．第 36 回日本胃神経科学大会，京都，2013.6.20-23.

建部陽嗣，西村理恵ら．刺鍼による鍼体付着物の解析 第 62 回全日本鍼灸学会学術大会，福岡，2013.6.7-9.

Watanabe Y, Tatebe H et al. p62 / SQSTM1-dependent autophagic clearance of Lewy body-like  $\alpha$ -synuclein inclusions. 42th annual meeting of the Society for Neuroscience 2012. New Orleans, USA. 2012.10.13-17.

渡邊義久, 建部陽嗣ら．オートファジーによる  $\alpha$ -synuclein 凝集体と障害ミトコンドリアの分解．第 35 回日本神経科学会，名古屋，2012.9.18-21．

〔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〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

建部陽嗣 (TATEBE HARUTSUGU )

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：00637027