

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830039

研究課題名(和文)パーキンソン病における発症の切っ掛けと増悪：リンパ組織の役割に関する検証

研究課題名(英文)Initiation and progression of alphasynuclein aggregation in Parkinson disease: with a special reference to lymphatic nodes.

## 研究代表者

鈴木 絵美(香山絵美)(SUZUKI, Emi)

信州大学・医学部・研究員

研究者番号：80623686

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)：パーキンソン病21剖検症例、対照11症例の脳、消化管、リンパ組織を用いて免疫組織染色を行い、各組織のリン酸化  $\alpha$ -synuclein ( $p$ -Syn) 陽性細胞を検索した。また、パーキンソン病モデルマウス8匹を用いてリン酸化  $\alpha$ -Syn陽性細胞について検討した。結果は、(1) パーキンソン病未発症患者の消化管でリン酸化  $\alpha$ -Synが蓄積されている可能性が示された、(2) パーキンソン病患者のリンパ組織のリン酸化  $\alpha$ -Syn陽性細胞対照例と比較して増加傾向であり、陽性細胞は主にマクロファージであった、(3) パーキンソン病モデルマウスのリンパ組織でのリン酸化  $\alpha$ -Syn陽性細胞割合は野生型と差がなかった。

研究成果の概要(英文)：Cells containing phosphorylated ( $p$ -) alphasynuclein aggregation were examined immunohistochemically in brains, alimentary tracts and cervical lymphnodes of patients with 21 Parkinson disease (PD) and neurologically free 11 control subjects and of 8 alphasynuclein Tg mice. The present study elucidated that 1. aggregation of  $p$ -alphasynuclein occurred in the peripheral nervous system in the alimentary tract of patients who don't develop PD, 2. number of cells immunopositive for  $p$ -alphasynuclein, which are considered to be macrophages, in the cervical lymphnodes was larger than that of controls, 3. number of cells immunopositive for  $p$ -alphasynuclein in the lymphoid tissue of the alphasynuclein Tg mice showed no difference from that of the wild type mice. These findings indicate that the lymphatic tissue may play a role in initiation and progression in aggregation of  $p$ -alphasynuclein in PD.

研究分野：機能生物化学

キーワード：alpha synuclein Parkinson disease alimentary tract

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は中脳黒質のドパミン神経細胞、橋青斑核のノルアドレナリン神経細胞などの脱落により発症する神経難病であり、震えや筋固縮を呈し、長期的には寝たきりとなる。患者は人口 10 万人あたり 100～200 人程度、全国では 10～20 万人と極めて多く、医学的のみならず社会的にも重大な問題であり、疾患の原因とメカニズムの解明、根本的治療法の開発が求められている。黒質ドパミン神経細胞等の神経細胞死の機序については、蓄積するリン酸化  $\alpha$ -synuclein(レビー小体の構成成分)によって生じるミトコンドリア機能障害、酸化ストレス、小体ストレスなどが報告されてきた。これらに加えて、免疫学の立場からは、ミクログリア (Iba-1 マーカー) やリンパ球細胞によりパーキンソン病の黒質や青斑核の神経細胞が障害されている可能性が報告されている<sup>1</sup>。すなわち、ヒトパーキンソン病で IgG 抗体がドパミン神経細胞上に存在すること<sup>2</sup>、またパーキンソン病モデルマウスで Fc $\gamma$ R の除去によってドパミン神経細胞死を回避したという報告<sup>3</sup>である。つまり、ドパミン神経細胞特異的抗体が病状を増悪させる要因の一つであるという<sup>4</sup>。しかし、免疫学の原理から見ると、ドパミン神経細胞特異的抗体が産生されるためには、ドパミン神経細胞由来のフラグメントが何らかの細胞によって貪食されリンパ組織に持ち込まれ、抗原提示細胞からリンパ球細胞へと情報交換が行わなければならない。抗原を取り込んでリンパ組織に移動し抗原に特異的な T 細胞 (CD3 マーカー) および B 細胞の活性化を誘導する樹状細胞が、脳にも存在する可能性が報告されている<sup>5</sup>が、リンパ組織への抗原持ち込みに関する研究は全く見られない。一方、パーキンソン病の原因として農薬などの外因の可能性が指摘されてきた。これらの「神経毒」ないしウイルス等の「病原体」が

経口的に消化管、または経鼻的に嗅粘膜から体内に入り、その場の末梢神経に入り込んで、正常型  $\alpha$ -synuclein をリン酸化させシートを形成させることが発症のきっかけではないかという報告がある<sup>6</sup>。リン酸化  $\alpha$ -synuclein が迷走神経の軸索末端に生じて神経を逆行し、繊維連絡によって次々と神経細胞に「伝播」するという脳幹上行仮説である<sup>7</sup>。嗅粘膜では嗅神経が粘膜表面へ突出し、さらにパーキンソン病患者の一部には嗅神経にレビー小体を生じていることが示されている<sup>8</sup>。しかし、消化管では神経細胞は粘膜表面に突出しておらず、腸管上皮から神経細胞末端部に繋がる部分での  $\alpha$ -synuclein の変化についての報告は見られない。腸管上皮には腸管腔から様々な抗原を取り込みリンパ球へ抗原提示を行う M 細胞が存在し、腸管の粘膜免疫の起点場所となっていることから<sup>9</sup>、M 細胞 (GP2 マーカー)、リンパ組織を介して上皮下部の神経叢へと外来からの刺激によって  $\alpha$ -synuclein の変性が生じる可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

ヒト剖検症例とヒト  $\alpha$ -synuclein をトランスジェニックしたパーキンソン病モデルマウスを用いて、1.パーキンソン病の発症のきっかけに関与するリンパ組織の検討、2. ドパミン神経細胞死の増悪にリンパ組織が及ぼす役割について検証を行うことを目的とした。脳の疾患に免疫系が積極的に関与することが示唆されることで、パーキンソン病の病態解明並びに新規治療方法の開発につながると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1)パーキンソン病症例の収集：長野県内 11 基幹病院が参加する「信州ブレインリソースネット」(信州大学医学部医倫理委員会承認 #1564) より提供を受けた、パーキンソン病 12 剖検症例、対照 8 剖検例を用いた。また、

ヒト病検証例のリンパ組織を検索するに当たって、国立精神・神経医療研究センター病院（齊藤裕子[研究協力者]）のパーキンソン病9症例と対照3例の提供を受けた。用いた症例は全てホルマリン固定パラフィン包埋材料である。

(2)h<sup>-</sup>Syn tg マウス:mThy-1 の exon2 から exon4 にヒト<sup>-</sup>synuclein カセット (nt53-475; Genbank accession No. L0885) が挿入されたマウスは、C57BL/6 マウスと掛け合わせて繁殖させた<sup>10</sup>。ジェノタイプチェックを行い、h<sup>-</sup>Syn tg マウスと同腹の non-tg マウスを野生型マウスとして実験に用いた。実験に用いたマウスは、生後7週、24週、32週に灌流固定を行い、脳、腋下リンパ節、膝下リンパ節、脾臓を摘出し、ホルマリン固定パラフィン包埋を行った。

(3)組織染色：ヒト剖検症例については、HE染色、KB染色、免疫染色を行った。免疫染色はリン酸化<sup>-</sup>synuclein (mouse anti-phosphorylated<sup>+</sup> alpha-synuclein monoclonal antibody, 1 : 20000)、Iba-1 (rabbit anti-Iba-1 polyclonal antibody, 1 : 1000)、CD163 (mouse anti-CD163 monoclonal antibody, 1 : 100)、SMI-31 (mouse anti-SMI-31, 1 : 1000)、CD3 (rabbit anti-CD3 monoclonal antibody, 1 : 400)、GP2 (mouse anti-GP2 monoclonal antibody, 1 : 400)を用い、リン酸化<sup>-</sup>synuclein と Iba-1 または CD3 については二重免疫染色を行った。リン酸化<sup>-</sup>synuclein は VINA Green chromogen kit (Biocare)で緑に発色し、レビ小体と鑑別が紛らわしいアミロイド小体を見分けるため PAS 染色(Periodic acid-Schiff stain)による対比染色もあわせて行った。h<sup>-</sup>Syn tg マウスは、HE染色、KB染色、免疫染色(リン酸化<sup>-</sup>synuclein、Iba-1、チロシン水酸化酵素 (Tyrosine hydroxylase ; TH (mouse anti-TH monoclonal antibody, 1 : 2000))を行い、リン酸化<sup>-</sup>synuclein と Iba-1

または TH については二重免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1)パーキンソン病の発症のきっかけに関するリンパ組織の検証

パーキンソン病は消化管、嗅粘膜からの外因が発症きっかけに影響を与えていると考えられており、本研究では消化管からの影響についてヒト剖検症例を用いて検討した。パーキンソン病症例を用いて中脳、延髄、腸管のリン酸化<sup>-</sup>synuclein 免疫染色を行った結果、消化管末梢神経叢から迷走神経背側核へと続く一連の蓄積が認められた。腸管でのリン酸化<sup>-</sup>synuclein は血管の近くを走る神経叢に多く認められ、一部、消化管上皮の直下を走る神経細胞の軸索上に認められた。しかしながら、消化管上皮細胞ではリン酸化<sup>-</sup>synuclein が非特異的に検出され、synuclein が変性しているきっかけの場を検出できなかった。また、本研究で用いた剖検症例において M 細胞の存在を免疫染色で確認ができず、神経細胞軸索末端部と M 細胞との接触について検証できなかった。剖検症例では死亡してから解剖までに生じた時間が長いほど消化管上皮が消化されることが生じるため、M 細胞を検出できなかったのではないかと考えられる。対照例では黒質ドパミン神経細胞にリン酸化<sup>-</sup>synuclein の蓄積は認められないが腸管末梢神経叢での蓄積が認められたことから、発症前段階の症例である可能性が考えられた。パーキンソン病発症のきっかけが消化管である可能性を示唆する所見を得られたが、腸管のリンパ組織でリン酸化<sup>-</sup>synuclein の明確な蓄積は認められなかった。

(2)ドパミン神経細胞死の増悪にリンパ組織が及ぼす役割についての検証

対照例を含めたすべてのヒト剖検症例のウィルヒョウリンパ組織でリン酸化<sup>-</sup>synuclein が認められ、陽性細胞数はパーキンソン病症例で 0.625 平方 mm あたり平均 4.3 個、対照例では平均 3.3 個であった。リン酸

化 synucein と Iba-1 の二重免疫染色により、リン酸化 synucein 陽性細胞は主にマクロファージであり、T 細胞を含むリンパ球細胞ではリン酸化 synucein 陽性細胞は明確に認められなかった。一方、パーキンソン病モデルマウス脳におけるリン酸化 -synuclein の蓄積は神経細胞内に凝集体として認められず、末梢リンパ組織のリン酸化 -synuclein 陽性細胞の存在は野生型マウスとの差が認められなかった。

#### 参考文献

1. Benner EJ, Banerjee R, Reynolds AD, Sherman S, Pisarev VM, Tshiperson V, Nemachek C, Ciborowski P, Przedborski S, Mosley RL, Gendelman HE. Nitrated alpha-synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons. *PLoS One*. 2008; 3(1):e1376
2. Orr CF, Rowe DB, Mizuno Y, Mori H, Halliday GM. A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain*. 2005; 128(Pt 11): 2665-74
3. Cao S, Theodore S, Standaert DG. Fc receptors are required for NF- B signaling, microglial activation and dopaminergic neurodegeneration in an AAV-synuclein mouse model of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 2010; 5:42
4. He Y, Le WD, Appel SH. Role of Fc gamma receptors in nigral cell injury induced by Parkinson disease immunoglobulin injection into mouse substantia nigra. *Exp Neurol*. 2002; 176(2): 322-7
5. D'Agostino PM, Gottfried-Blacjmore A, Anandasabapathy N, Bulloch K. Brain dendritic cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2012; 124(5): 599-614
6. Goedert M, Clavaguera F, Tolnay M. The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends neurosci*. 2010; 33(7): 317-25
7. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003; 24(2): 197-211
8. Funabe S, Talao M, Saito Y, Hatsuta H, Sugiyama M, Ito S, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Murayama S. Neuropathologic analysis of Lewy-related -synucleopathy on olfactory mucosa. *Neuropathology*. 2013; 33(1): 47-58
9. Man AL, Prieto-Garcia ME, Nicoletti C. Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys? *Immunology*. 2004 113(1): 15-22
10. Rockenstein E, Mallory M, Hashimoto M, Song D, Shults CW, Lang I, Masliah E. Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing -synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. *J Neurosci Res*. 2002; 68: 568-578

#### 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 0 件)

{ 学会発表 } (計 0 件)

{ 図書 } (計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 絵美（香山 絵美）(SUZUKI,  
Emi)

信州大学・医学部・研究員

研究者番号： 80623686