

異常タンパク伝播に着目したシヌクレイノパチーの病態解析と新規治療法の確立

業務担当責任者：武田 篤 仙台西多賀病院神経内科
研究協力者：長谷川隆文 東北大学医学部神経内科学分野

研究要旨

近年パーキンソン病(PD)、多系統萎縮症(MSA)などの神経変性疾患病態において、凝集化シヌクレイン(α S)の細胞間伝播現象が注目を集めている。本研究では新たなシヌクレイノパチーマウスモデルを作製し、その病態解析をすすめる一方、異常タンパク伝播阻止による病変拡大阻止をめざした新しい治療薬のスクリーニングを行う。

A. 研究目的

近年、胎児中脳ドパミン神経移植後10数年経過したPD患者脳の剖検例の検討において、ドナー由来の神経細胞内に α シヌクレイン(α S)陽性のレビー小体(LB)様封入体が確認されたという事実が複数のグループから報告された。この様な現象は、病理組織学的観察においてのみならず、培養細胞や動物モデルにおいても実証されており、孤発性神経変性疾患においても、プリオン病同様に細胞間において病原性タンパクの伝播が起こり、隣接する神経組織へ神経変性が拡大する可能性 - いわゆるプリオン仮説とよばれる新たな病態機序が提唱され注目を集めている。申請者らは α Sの吸収・分泌・分解に関する細胞内分子機構を世界に先駆けて明らかにしてきた。一方、伝播に関わる α Sの分子種の詳細や、伝播現象がシナプスを介するのか否かという問題については未だ議論がある。これらを踏まえ、本研究では組換えヒト α Sを脳室内投与した新規 α S脳内伝播マウスモデルを作製し、運動機能に与える影響および病理変化・脳内に蓄積する α Sの生化学的特徴を経時的に観察した。これらの研究を通じ、異

常タンパク伝播阻止に立脚したこれまでにないシヌクレイノパチー進行抑制療法を提案することを最終目的とする。

B. 研究方法

BL21大腸菌を用いて組み替えヒト α Sを大量調製し、Amicon Ultra®を用いた限外濾過にて50kDa以下、50kD以上のoligomerに分離した。併せて37、180rpmで21日間振盪してfibrillar α Sを作製した。得られたoligomer・fibrillar α S各を麻酔下にマイクロインジェクターを用いマウス側脳室内に1, 5, 10, 25 μ M単回投与する(各5匹準備)。Vehicle処理マウスと共に1週毎に運動機能(open fieldでのspontaneous locomotion、vertical grid trial、rotarod test)を評価した。投与1、3、6および12ヶ月後にマウスをsacrificeし、免疫染色法にて脳組織内に蓄積する内在性のマウス α Sおよび外来性のヒト α Sを観察した。併せて抗tyrosine hydroxylase (TH)抗体によるドパミン神経細胞数の定量的評価を行った。

(本研究の一部に組み替えDNA実験・動物

実験を含むことから、「国立大学法人東北大学組換え DNA 実験安全管理規定」および「国立大学法人東北大学動物実験等に関する規程」に沿って実験計画を立案し、学内の所定機関にて実験内容はすでに承認されている（受付番号：2013 医組換-131。）

C. 研究結果

α S 脳内伝播マウスモデルではコントロール群との比較で、投与開始 6 週目以降において、open field での spontaneous locomotion の有意な低下、および vertical grid trial での T total・T turn 時間の有意な延長が観察された。マウス脳組織の抗ヒト α S モノクローナル抗体を用いた免疫組織学的観察では、 α S 投与群の嗅索、中脳黒質などにおいて、 α S 陽性細胞の増加を認めた。また、抗 TH 抗体を用いた免疫組織学的観察では、 α S 投与群の黒質および線条体にて、TH 陽性ニューロン数の減少傾向が観察された。これらの変化は、投与側の半球でより顕著であった。

D. 考察

これまでに作成された α S 脳内伝播マウスモデルはすべて脳実質への stereotactic injection によるものであったが、脳室内への単回投与モデルでも、PD 患者と同様に嗅索や中脳黒質に α S 病理が出現することが確認された。脳室壁への α S 沈着は目立っておらず、これらの病理変化は、神経線維連絡を介した伝播によるものと推測された。

E. 結論

組換えヒト α S を脳室内投与した新規 α S 脳内伝播マウスモデルを作製し、運動機能低下および脳組織における α S 病理変化を確認した。今後は投与する α S の分子種（オリゴマー、フィブリル）を複数種検討すると共に、複数回投与による運動症状・病理像の増強効

果がないか確認する予定である。また先行研究にて α S 取り込み抑制効果を確認した sertraline をはじめとする SSRI 製剤をマウスに同時投与し、臨床症状・病理変化の悪化が抑制されるか確認する。さらに BF227 α S アミロイド PET トレーサーを用い、sertraline 服用下における患者脳内での α S 病理拡大への影響についても経時的な観察を計画中である。

[参考文献].

1. Konno M, Hasegawa T, et al. Suppression of dynamin GTPase decreases α -synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy. *Mol Neurodegener* 2012;7(1):38.
2. Hasegawa T, Konno M, et al., The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of α -synuclein. *PLoS One* 2011; 6(12):e29460.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（2014/4/1～2015/3/31 発表）

1. 論文発表

- 1) Miura E, Hasegawa T, Konno M, Suzuki M, Sugeno N, Fujikake N, Geisler S, Tabuchi M, Oshima R, Kikuchi A, Baba T, Wada K, Nagai Y, Takeda A, Aoki M. VPS35 dysfunction impairs lysosomal degradation of α -synuclein and exacerbates neurotoxicity in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2014; 71:1-13.

- 2) Sugeno N, Hasegawa T, Tanaka N, Fukuda M, Wakabayashi K, Oshima R, Konno M, Miura E, Kikuchi A, Baba T, Anan T, Nakao M, Geisler S, Aoki M, Takeda A. Lys-63-linked Ubiquitination by E3 Ubiquitin Ligase Ned4-1 Facilitates Endosomal Sequestration of Internalized α -Synuclein. *J Biol Chem.* 2014; 289: 18137-18151.
- 3) Takeda A., Baba T., Kikuchi A., Hasegawa T., Sugeno N., Konno M., Miura E., Mori E., Olfactory dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.* 4:181-187, 2014.
- 4) Stankovic I., Krismer F., Jesic A., Antonini A., Benke T., Brown RG., Burn DJ., Holton JL., Kaufmann H., Kostic VS., Ling H., Meissner WG., Poewe W., Seppi K., Takeda A., Weintraub D., Wenning GK., Cognitive impairment in multiple system atrophy: A position statement by the Neuropsychology Task Force of the MDS multiple system atrophy

(MODIMSA) Study Group., *Movement Disorders* 2014;29:857-867,.

- 5) Shoji Y., Nishio Y., Baba T., Uchiyama M., Yokoi K., Ishioka T., Hosokai Y., Hirayama K., Fukuda H., Aoki M., Hasegawa T., Takeda A., Mori E., Neural substrates of cognitive subtypes in Parkinson's disease: a 3-year longitudinal study., *PLoS One.* 9:e110547, 2014.

2. 学会発表

長谷川隆文. **神経変性疾患関連タンパク分解における ESCRT 系の役割**. 第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月 16 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし