

Title	神経変性疾患における超早期タンパク蓄積寄与因子の解明
Sub Title	Elucidation of factors contributing to protein accumulation at early stage of neurodegenerative diseases
Author	小林, 玲央奈(Kobayashi, Reona) 岡野, 栄之(Okano, Hideyuki)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究では、タンパク質凝集体形成に至る一連のメカニズムを解明するアプローチとしてマーモセット嗅球をツールとしたタンパク蓄積過程の追跡を計画した。申請者の先行研究で明らかになった、マーモセット嗅球において一定の年齢を超えると短期間にシヌクレイン凝集体が形成される現象に着眼した。凝集前・後のマーモセット嗅球を収集し、片側の嗅球を免疫染色により組織解析、片側をプロテオーム解析に使用した。プロテオーム解析により、凝集直前からプロテアソームの構成タンパク質の発現が大きく変化していることが明らかになった。その他、ミトコンドリアの構成タンパクやSOD1などの細胞内ストレス軽減因子の変化を認めた。</p> <p>In this study, we planned to follow the protein accumulation process using the marmoset olfactory bulb as a tool to clarify the sequence of mechanisms leading to the formation of protein aggregates. We focused on the phenomenon that α-synuclein aggregates were formed in the marmoset olfactory bulb in a short period of time after a certain age, which was clarified in our previous study. Marmoset olfactory bulbs (before and after aggregation) were collected and one olfactory bulb was used for tissue analysis by immunostaining and the other for proteomic analysis. Proteome analysis revealed significant changes in the expression of proteasome components immediately before aggregation. In addition, changes in mitochondrial constitutive proteins and intracellular stress-reducing factors such as SOD1 were observed.</p>
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2017 ~ 2018 課題番号 : 17K14957 研究分野 : 神経科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K14957seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和元年5月30日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14957

研究課題名（和文）神経変性疾患における超早期タンパク蓄積寄与因子の解明

研究課題名（英文）Elucidation of factors contributing to protein accumulation at early stage of neurodegenerative diseases

研究代表者

小林 玲央奈 (Kobayashi, Reona)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問研究員

研究者番号：40784062

交付決定額（研究期間全体）：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、タンパク質凝集体形成に至る一連のメカニズムを解明するアプローチとしてマーモセット嗅球をツールとしたタンパク蓄積過程の追跡を計画した。申請者の先行研究で明らかになつた、マーモセット嗅球において一定の年齢を超えると短期間にシヌクレイン凝集体が形成される現象に着眼した。凝集前・後のマーモセット嗅球を収集し、片側の嗅球を免疫染色により組織解析、片側をプロテオーム解析に使用した。プロテオーム解析により、凝集直前からプロテアソームの構成タンパク質の発現が大きく変化していることが明らかになった。その他、ミトコンドリアの構成タンパクやSOD1などの細胞内ストレス軽減因子の変化を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患関連タンパク質に着目した加齢性変化は、これまでにも様々な動物種を用いた議論がなされてきた。しかし、10歳齢以上の靈長類でさえもヒト老化病理と類似した劇的な変化を認めた報告はなく、寿命の短さやヒトとの進化的格差から、実験動物ではヒト老化病理の再現に限界があると考えられてきた。本研究で明らかになった凝集前後におけるタンパク発現の変化データから、今後の検証実験によりシヌクレイン凝集に寄与する因子が同定された場合に、シヌクレイン病理の上流にある新たな原因タンパクとしての可能性を持ち、PDに限らず神経変性疾患で従来ブラックボックスとされてきた蓄積開始機序の解明の糸口となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we planned to follow the protein accumulation process using the marmoset olfactory bulb as a tool to clarify the sequence of mechanisms leading to the formation of protein aggregates. We focused on the phenomenon that α -synuclein aggregates were formed in the marmoset olfactory bulb in a short period of time after a certain age, which was clarified in our previous study. Marmoset olfactory bulbs (before and after aggregation) were collected and one olfactory bulb was used for tissue analysis by immunostaining and the other for proteomic analysis. Proteome analysis revealed significant changes in the expression of proteasome components immediately before aggregation. In addition, changes in mitochondrial constitutive proteins and intracellular stress-reducing factors such as SOD1 were observed.

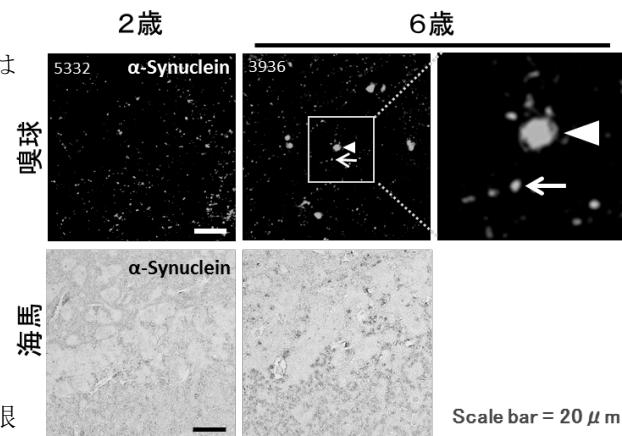
研究分野：神経科学

キーワード： α -synuclein 嗅球 マーモセット

1. 研究開始当初の背景

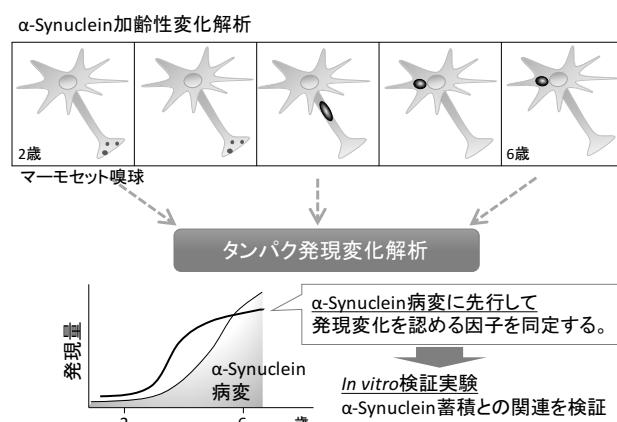
神経変性疾患におけるタンパク質異常蓄積のメカニズムについて未だ十分な解明には至っていない現状にある一方で、神経変性疾患の原因タンパク質の殆どが、患者だけでなく健常者の脳でも老化に伴い蓄積することが知られている（Li W. et al. J. Neurosci., 2004）。パーキンソン病（Parkinson's Disease; PD）の原因タンパク質である α -Synuclein もその1つである。

申請者は先行研究にて、野生型マーモセットの α -Synuclein の明瞭な加齢性変化を検出した（Kobayashi et al. Neuroscience Research, 2015）。具体的には、6歳齢マーモセット嗅球において α -Synuclein は大きな凝集体を形成し、更に本来の局在であるシナプス局在性を失った異常な状態にあることが示唆された。このような凝集体は2歳齢の嗅球では検出されず、6歳までの4年間に起こる劇的な変化であると推定された。申請者はヒト PD 症例との共通点を示唆する上記の観察に基づいて、凝集体形成に至る一連のメカニズムを解明するアプローチとして、マーモセットを新規 α -Synuclein 蓄積モデルとした新たな研究展開に着眼した。



2. 研究の目的

本研究の目的を、新規 α -Synuclein 蓄積モデルを用いた超早期凝集寄与因子の解明と位置付けた。マーモセット嗅球サンプルを利用した網羅的タンパク発現解析により α -Synuclein 病変に先行する変化を捉え、培養細胞を用いた *in vitro* の実験系により α -Synuclein 凝集への寄与を検証することを達成目標とする。将来的には、所属研究室で申請者が中心となって作製している変異型 α -Synuclein トランスジェニックマーモセット個体を用いた発症抑制の前臨床治験に発展する可能性を追求したい。



3. 研究の方法

具体的な方法として、2歳から蓄積に至る6歳までの期間の複数年齢の嗅球サンプルを採取し、プロテオーム解析により複数のタンパク質発現変化を病理進行の時間軸と照合して解析することを方策とする。これにより、病変開始前及び超早期段階に変化を認める凝集寄与因子を抽出することができる。本研究課題を遂行するにあたり、実施内容を(1)～(4)に分類した。

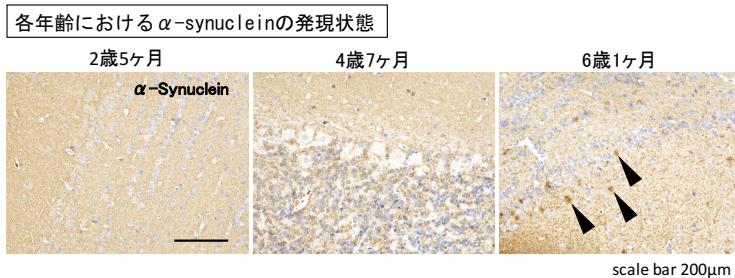
- (1) 組織染色による α -Synuclein 病変出現時期の予測：プロテオーム解析前に各年齢の嗅球サンプルの組織染色により α -Synuclein の凝集体形成に至るまでのタイムコースを予測する。
- (2) 局在変化前～凝集時期における嗅球プロテオーム解析・早期発現変化タンパク質の同定：
 - (1) の結果から予測されるタイムポイントサンプルについてプロテオーム解析を行い、早期に発現変化を認めるタンパク質を同定する。
 - (2) 組織染色による早期発現変化タンパク質の発現・局在解析：(2) で同定したタンパク質の細胞内局在等の基礎情報を得ると同時に α -Synuclein 病変に至るまでの変化を追跡する。
- (4) 培養細胞を用いた α -Synuclein 凝集への寄与検証：培養ニューロン内において候補タンパク質が α -Synuclein 凝集に寄与するかを検証する。

4. 研究成果

2歳、4歳、6歳のマーモセット嗅球を収集し、片側を免疫染色により組織解析、片側をプロテオーム解析に使用した。

(1) まず、嗅球のタンパクサンプル採取については、これまでに3歳以下のサンプルを4匹、4～6歳のサンプルを3匹分収集した。事前の組織解析により、2歳ではシヌクレインの蓄積

は認めず 6 歳でシヌクレインの凝集体が検出されていたが、その間の状態については未確認であった。プロテオーム解析に先立ち病理変化を調べたところ 6 歳未満ではあるが近くの年齢でも凝集にまでは至っていない個体を認め、現在 N 数を重ねて検証中である(右図)。



(2) 組織でのシヌクレイン蓄積レベルを踏ました上で、反対側の嗅球についてプロテオーム解析を行い、より詳細なタンパク質発現変化を調べた。今回比較した 3930 種類のタンパクのうち、2 歳に比べ 6 歳で発現が上昇した 620、低下した 517 のタンパクが同定された。そのうち 4 歳で既に変化を認めたタンパクが、発現狭小 230、発現低下 263 種類検出された。中でも低下した群にはプロテアソームの構成タンパクが多く含まれていた。一部は 4 歳で既に 2 歳に比べ半分以下の量まで低下していることから、早期の変化である可能性も考えられる。しかしながら、プロテアソーム系の異常が引き金である可能性を示すには、更に検証が必要である。この他、ミトコンドリアの構成タンパクの低下が目立ち、また増加した群 SOD1 など細胞内ストレスを軽減する因子や hnRNP などの核局在 RNA 結合タンパクが含まれていた。これらの早期に変化を認めたタンパク質がシヌクレインの凝集を誘発するか、について今後強制発現の実験系により検証を進める。

神経変性疾患関連タンパク質に着目した加齢性変化は、これまでにも様々な動物種を用いた議論がなされてきた。しかし、10 歳齢以上の靈長類でさえもヒト老化病理と類似した劇的な変化を認めた報告はなく、寿命の短さやヒトとの進化的格差から、実験動物ではヒト老化病理の再現に限界があると考えられてきた。申請者は、靈長類ではその小ささや周囲の複雑な構造から特に採取が困難とされる嗅球に着目し、明瞭な凝集体を形成するマーモセットの特殊な性質を見出し、新規 α -Synuclein 蓄積モデルとした点において、比類ない独自性と優位性を持つ。今後の検証実験によりシヌクレイン凝集に寄与する因子が同定された場合に、シヌクレイン病理の上流にある新たな原因タンパクとしての可能性を持ち、PD に限らず神経変性疾患で従来ブラックボックスとされてきた蓄積開始機序の解明の糸口となることが期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 小林玲央奈、Transgenic marmoset as a novel non-human primate model of Parkinson's disease、第 8 回日本マーモセット研究会大会、2019.
- (2) 小林玲央奈、靈長類コモンマーモセットを用いた新規パーキンソン病モデル、第 27 回 LINK-J ネットワーキングナイト、2019.
- (3) Reona Kobayashi、Transgenic marmoset as a novel non-human primate model of Parkinson's disease、Neuroscience 2018、2018.
- (4) Reona Kobayashi、Transgenic marmoset as a novel non-human primate model of Parkinson's disease.、French-Japanese Scientific Meeting on Neurobiology of Diseases and Ageing、2017
- (5) Reona Kobayashi、Transgenic marmoset as a novel non-human primate model of Parkinson's disease.、Symposium on Severe Mental Illness、2017

[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：

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：

国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：岡野 栄之

ローマ字氏名：OKANO, Hideyuki

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等について、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。