

長寿医療研究開発費 平成23年度 総括研究報告

レビー小体病(LBD)の病因解明とその知見に基づいた新たなバイオマーカーの開発
に関する研究 (23-2)

主任研究者 丸山和佳子 国立長寿医療研究センター 加齢健康脳科学研究部 (部長)

研究要旨

高齢者における代表的な認知症であるレビー小体病(Lewy body disease, LBD)の病因解明に関する研究を行った。加えて、LBDの早期診断に役立つバイオマーカーを開発し、発症を予防または遅延させる低分子化合物を探索した。LBDとは神経細胞内にレビー小体(Lewy body, LB)とよばれるalpha-synucleinタンパク質を主成分とする凝集体を伴う神経変性疾患の総称である。近年の病理学的研究によりLBDスペクトラムに属する疾患として延髄-末梢神経型(純粋自律神経障害, PAF)、中脳-黒質型(パーキンソン病, PD)、皮質型(瀰漫性レビー小体病, DLB)が存在し、認知症を伴うPDにDLBを加えたもの、すなわちLBDによる認知症は認知症全体の10-20%の原因であることが解明された。また、日本、欧米におけるゲノムワイドのリスク遺伝子検索解析(GWAS)により、alpha-synucleinのSNPが孤発性PDの発症リスクに影響を及ぼすことが一致して報告された。一方で、薬剤(神経毒)によりLBDと類似の病理学的、薬理学的変化をげっ歯類、あるいはヒトで惹起されることが証明されており、それらの薬剤の共通点としてミトコンドリア呼吸鎖のcomplex I阻害剤であることが明らかとされた。

本課題では、以下のことを目標として研究を行い、初年度の研究を行った。

- 1) 酸化ストレスによる脂質過酸化を介して、ミトコンドリア障害とalpha-synucleinの構造変化が神経細胞死を引き起こす機序をモデル系で明らかとする。
- 2) 1)の結果をヒトサンプル、特に剖検脳で検証する。
- 3) 1)および2)の結果を基に、臨床的に採取可能な血液等のサンプルでLBDの生化学的バイオマーカーを開発する。
- 4) 1)の結果を基に、LBDの神経変性を防御する血液-脳関門を容易に透過する低分子化合物(薬剤、食品由来成分)を開発する。

主任研究者

丸山和佳子 国立長寿医療研究センター 加齢健康脳科学研究部 (部長)

分担研究者

山岡朗子 国立長寿医療研究センター 神経内科 (医師)

大澤俊彦 愛知学院大学 心身科学部栄養学科 (教授)

直井信 (財)岐阜県研究開発財団岐阜県国際バイオ研究所 客来研究部門 (客来研究員)

赤津裕康 医療法人さわらび会 福祉村病院 長寿医学研究所 (研究所副所長)

A. 研究目的

LBDは認知症全体の10-20%の原因であることが報告されており、認知症の克服のため、その研究の重要性は極めて高い。LBDの病因にはalpha-synuclein (Syn)の神経細胞内異常蓄積が決定的な役割を果たしていると思定されているが、細胞死をきたす機序は不明である。現在、薬剤性LBDモデル動物や剖検脳の研究成果から、1) 老化に伴うミトコンドリア機能障害と酸化ストレス傷害の蓄積、1)の結果としての2) 構造変化を起こしたSynの細胞内蓄積、が細胞死過程の開始に決定的な役割を果たしていることが示唆されている。平成22年度、脂質過酸化物によるSynへの修飾が難分解性の変性Syn蓄積を引き起こすとの仮定に基づき、細胞モデルを作成した。それとともに、ヒトLBD患者サンプル(剖検脳、脳脊髄液、血液、尿等)のプロテオミクス解析を行うためにサンプル収集を行なった。特に、酸化修飾されたSyn断片や老化に関わるバイオマーカー候補(神経栄養因子、酸化ストレスマーカー)について特異抗体を作成し、定量する系を開発を試みた。この系を用いて、病院部門との連携研究の中でもLBDの生化学的マーカーに関する研究を推進し継続可能な研究協力体制を構築した。その結果として、LBDの早期診断あるいはリスク診断、あるいは介入治療効果判定に有用なマーカーを開発することが期待される。治療、介入研究については、申請者らはB型モノアミン酸化酵素阻害剤であるrasagilineによる神経保護作用がミトコンドリア由来のシグナル制御であることを既に報告している。本研究ではそのターゲット分子を明らかとするとともに天然化合物で同様な作用をもつ生薬あるいは食品成分について検討を行った。

孤発性LBDに関する環境要因を老化という視点で解明することは世界的に見ても斬新な発想であり、さらに、EBMに基づいた予防法の開発は当センターに求められる重要なミッションと考えられる。

B. 研究方法

詳細については、分担研究報告書を参照されたい。

酸化ストレス(老化)がLBDの病理学的特徴であるLB形成と細胞死を引き起こすメカニズムを細胞モデルで解明する(丸山)。さらに、神経細胞死に主要な役割を果たしていると考えられる、神経細胞膜脂質の酸化と脂質過酸化物による修飾をうけ、構造異常をきたしたタパク質について、ヒトサンプル(剖検脳、脳脊髄液、血液等)で解析を行うことで、モデル実験で得られた仮説を検証する(山岡、赤津)。酸化ストレスにより傷害をうけ、難分解性となるとともに毒性を持つ変性タンパク質について分析定量するための測定系を確立する(大澤)。LBDの病因に基づく画期的治療、予防薬の開発を目指す。上記の疾患モデルを

用いて神経保護作用をもつ低分子化合物の作用と効果を定量的に判定する。特にB型モノアミン酸化酵素阻害剤の誘導体であるpropargylamine化合物および生薬／食品由来のポリフェノール、ペプチドを候補としてスクリーニングと、作用機序解明を行う（直井、丸山）。

（倫理面への配慮）

- i) 動物を使った実験系については各施設の動物実験倫理委員会、実験動物委員会の許可の基に動物愛護上の配慮を行う。
- ii) 臨床研究については、各施設の臨床研究倫理委員会の許可と指導の基に行い、プライバシー保護には細心の注意を払う。
- iii) ヒトサンプルを用いた研究については各施設の臨床疫学倫理委員会の許可を受ける。
- iv) 本研究課題には利益相反の問題はない

C. 研究結果

平成 24 年度は、神経芽細胞種である SH-SY5Y 細胞に Syn を強制発現した細胞を確立し（直井、丸山）、多価不飽和脂肪酸(PUFA)を culture medium に添加することで PUFA の初期生成物が上記培養細胞の Syn に修飾を引き起こしていることを特異抗体を用い証明した(大澤、丸山)。本モデルにおいてはミトコンドリア機能障害と異常タンパク質の蓄積を伴う細胞死が認められ、パーキンソン病あるいはレビー小体病(LBD)の新たなモデルと考えられた。さらに、ヒト剖検脳 LBD サンプルを PUFA 酸化物に対する抗体で染色したところ、変性細胞の周囲に陽性像が示されたため、現在症例数を増やし、確認している（赤津、丸山）。それとは別に、パーキンソニズムを伴う LBD と臨床的に診断される患者について、臨床症状、血液サンプルの蓄積を開始したところであり、来年度から血液中のバイオマーカー、特に酸化ストレスマーカーと神経栄養因子について解析を開始する予定である（山岡、丸山）。

D. 考察と結論

パーキンソン病あるいはレビー小体病(LBD)に関する従来の研究は、主に、ミトコンドリア complex I の阻害剤である 1-methyl-4-methyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) による神経毒モデルと、家族例の遺伝子解析を用いた遺伝子改変モデル (Syn の増加、ミトコンドリアの品質管理不全、酸化ストレスへの脆弱性) の 2 種に分類される。本研究で確立した新たな LBD モデルは構造異常をきたした Syn 蓄積 とミトコンドリア障害、老化に伴う酸化ストレスを併せ持つものであり、孤発性 LBD と類似していることから、本疾患の病因解明の強力なツールとなることが期待される。さらに、LBD 剖検脳や患者由来サンプルの解析結果と比較検討することで、モデル系で得られた結果を検証することが可能である。現在、病因に基づいた LBD の surrogate marker を探索ことも同時に進めており、LBD では神経栄養因子の低下が認められるとの予備的結果を得ている。さらに、最終年度に向けて、脳内酸化ストレス、特に脂質過酸化を制御し、内因性の神経保護因子である神経栄養因子を増

加させる食品由来分子を培養細胞およびヒト介入試験でスクリーニングが進めている。少数例(10例前後)の pilot study でジペプチドの一部が有効との結果を得ている。LBDを含む老化に伴う神経変性疾患の予防あるいは発症遅延を可能とするための基盤的結果が得られれば、健康長寿社会の実現に向けて国民に貢献できることは疑いない。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表 (各分担研究者の報告書を参考のこと)

1. 論文発表
2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況 (各分担研究者の報告書を参考のこと)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし