

## 長寿医療研究開発費 平成26年度 総括研究報告

レビー小体病(Lewy body disease,LBD)の病因研究から治療への橋渡し研究の試み(26-23)

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

レビー小体病(Lewy body disease, LBD)は、老年期認知症の20%を占める重要な疾患であり、選択的な神経(迷走神経背側運動核、橋の諸核、黒質、Mynert基底核、扁桃核、大脳皮質、嗅球、末梢自律神経叢等)が変性に陥る。LBD疾患モデル細胞を用いた研究により特定の神経細胞に膜脂質過酸化物の蓄積がおこる原因を解明した。それとともに脂質過酸化物の蓄積により、神経細胞の維持に関わる機能、特にタンパク質分解系、ミトコンドリア機能が障害を受ける可能性について検証を行った。

最終的には基礎研究と臨床研究の結果に基づいた早期診断法を開発し、治療、介入研究に結びつけることが本研究課題の目的である。

### 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 (部長)

### 分担研究者

山岡 朗子 国立長寿医療研究センター 脳機能診療部第一脳機能診療科 (医師)

大澤 俊彦 (愛知学院大学 心身科学部 健康栄養学科) (教授)

直井 信 (株式会社ヘルスケアシステムズ) (顧問)

赤津 裕康 (名古屋市立大学院医学研究科 地域教育学) (教授)

### A. 研究目的

本研究課題の目標は高齢期変性性認知症であるLBDの病態解明を「脳の老化」という切り口で行う。従来の疾患研究においては「主に遺伝子に着目した基礎研究」と「臨床症状と画像所見に着目した臨床研究」の情報共有が必ずしも十分ではなかった。本研究課題では基礎研究と臨床研究の結果の「橋渡し」を行うことで、新たな知見を得ることを目的とする。

### B. 研究方法

LBDを中心とする変性性認知症における神経老化の役割を明らかにする。神経細胞膜を構成する脂質、特にDHAは酸化を受けやすく、その結果生成されたlipid peroxideによる修飾タンパ

ク質の蓄積が起こっていることを、LBDを中心とする変性性認知症の剖検脳を用い検討し、疾患特異性および部位選択性について検討した。剖検脳で認められたDHAの由来のlipid peroxideが修飾しているタンパク質を同定する。特に、alpha-synuclein、beta-amyloid protein、ミトコンドリア膜構成タンパク等は重要であり、免疫染色に引き続きタンパク質解析（免疫沈降法、TOF-Mass等）を用いて検討を行った。脳サンプルで得られた研究成果を基に、PDを伴うLBD患者の血漿中のlipid peroxideによる修飾タンパク質を鋭敏に定量する系を確立した。血漿中における老化関連分泌因や神経栄養因子の解析を行い、臨床症状との相関を検討した。LBDの新たな疾患モデルを作成し、細胞死の機序を解明した。具体的には神経系培養細胞にalpha-synucleinを強発現させ、lipid peroxideによる修飾タンパク質を蓄積させる。本細胞モデルを用いて、LBDの病態に関わるリン酸化alpha-synuclein、やalpha-synucleinオリゴマー、ミトコンドリア機能異常、タンパク分解系の低下について検討した。上記の細胞および動物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した。特に食品由来成分やB型モノアミン酸化酵素阻害剤の神経保護作用についてその機序を検討した。食品によるLBD治療介入の可能性について予備的検討を行った。

（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

国立長寿医療研究センター神経内科外来に通院中のLBDの診断基準を満たす患者約30例のサンプルを採取した。臨床データとして年齢、性別、経過年数、Yahr分類、MMSE、GDS、やる気スコア、MADRAS、BI、手段的ADLを計測した。血液生化学と血漿BDNF値を測定し、将来のバイオマーカー検索のためにサンプルを保存した。画像検査として頭部MRI所見（萎縮部位、白質病変Fazekas分類0～3）、SPECT所見（集積低下部位）を行った。その結果、平均年齢は $71.6 \pm 6.5$ 歳、男性14例 女性11例、経過年数は $6.7 \pm 4.9$ 年、Yahr分類は平均 $2.9 \pm 0.6$ 、MMSE平均 $25.8 \pm 3.6$ とほとんどがYahr分類3で認知機能の比較的良好な症例であった。また画像所見、特にSPECT結果はLBDに特徴的な後頭葉の低下がみられ、いずれも類似した結果であった。血漿BDNF値は最小値527、最大値22,282とばらつきがみられた。今後、これらの患者のサンプルを用い、脂質酸化ストレスマーカー、老化関連分子、メタボリックシンドローム関連因子の測定を行うとともに、臨床症状との相関を検討する予定である。

福祉村病院では500例を超すブレインバンクサンプルが保存されており、このサンプルを駆使して形態学、生化学、分子生物学的解析を行うことが可能である。これらのLBD患者剖

検脳を用い、lipid hydroperoxide に対する特異抗体を用いた免疫組織化学染色を進めており、レビー小体、 $\alpha$ シヌクレイン、細胞内小器官（ミトコンドリア、オートファゴゾーム等）との関連（共存）について予備的結果を得た。

LBD の新たな細胞モデルを構築した。レビー小体病剖検脳では $\alpha$ シヌクレインと長鎖不飽和脂肪酸である docosahexanoic acid (DHA)が超遠心可溶化分画で増加していることが報告されている(Sharon et al., 2003, Neuron)。 $\alpha$ シヌクレインを過剰発現した SH-SY5Y 細胞で docosahexanoic acid (DHA)の過酸化を亢進させたところ、細胞死が誘導された。本細胞では脂質酸化修飾をうけた $\alpha$ シヌクレインオリゴマーの蓄積、オートファジーを主体とするタンパク質分解系の阻害、ミトコンドリア障害が引き起こされていることを見いだした。特に、本年の新しい知見として、脂質酸化修飾をうけたタンパク質によりオートファゴゾームとリソゾームの融合が阻害されている可能性が示された。本細胞モデルとヒト剖検脳の所見を対比しつつレビー小体病細胞死の病因解明に結びつける結果を得ることが期待される。本モデルを用いて現在神経保護作用をもつ薬剤、食品成分のスクリーニングを行い、イソフラボン類の有効性が実証された。

膜脂質由来の lipid hydroperoxide に対するより鋭敏な特異抗体を作成するため、プロパノイルリン脂質付加体をリポソーム抗原として免疫し、モノクローナル抗体の作成を行った。同時に、安定同位体希釈法による検出定量を行うため、安定同位体を含んだプロパノイル化エタノールアミン標品を作成した。得られた抗体をアゾポリマーを用いたプロテインチップにスポットし、安定性、感度、特異度等を検討することで網羅的な解析の準備を行った。一方、HL-60 細胞由来の好中球の自然免疫反応を利用した細胞内カルシウムイオン濃度(蛍光)とスーパーオキシド産生(化学発光)を同時に検出するシステムを作成した。このシステムは免疫賦活・抗酸化・抗炎症作用の評価に使用可能であり、抗酸化食品因子による脳内神経細胞変性に対する保護効果の評価が可能となると期待される。本年度は DHA 過氧化物やヒドロキシドパミンの神経細胞死誘導のメカニズムの解析と共に、抗酸化食品因子、特に、フェルラ酸や $\gamma$ -オリザノールを対象とした保護作用を明らかにした。

ミトコンドリアのアポトーシスシグナルの活性化に焦点をあて、これを抑制することで神経保護作用を持つ低分子化合物について検討を行った。ミトコンドリアからのカルシウム( $\text{Ca}^{2+}$ )流出を細胞質での増加として測定することで膜透過性の変化を定量的に測定する方法論を確立した。この系で従来抗アポトーシス活性が認められている rasagiline, selegiline で  $\text{Ca}^{2+}$ と活性酸素の増加が抑制された。さらに食品由来のセサミン誘導体がミトコンドリア膜の透過性増加を抑制することを証明した。

#### D. 考察と結論

今まで不明であった LBD の病因を「膜脂質の過酸化」という新たな観点から明らかとすることが期待される。さらに、上に記した通りレビー小体病は中枢神経だけでなく末梢神経にも早期より神経変性が認められる点でアルツハイマー病とは異なっている。末梢病変由来の分子、特に膜脂質の過酸化により修飾されたタンパク質が診断あるいは治療効果判定のマーカーとして有用

であることが期待される。

これまで主任研究者は加齢健康脳科学研究部長として室長と共同で「脳の老化とレビー小体病」について研究に取り組んでおり、脳を含む全身諸臓器の老化-抗老化のバランスを司る因子として神経栄養因子である **brain derived neurotrophic factor (BDNF)** と **interleukin** のバランスについてモデル動物とヒト血漿を用いて検討を行ってきた。その結果、**BDNF** の増減が認知症介入研究におけるマーカーとして有用である可能性を虚弱老人にて見いだしている (Yamaoka A. et al., in preparation)。

今回の研究ではさらに、病因に直接関わる分子として **DHA** 由来の **lipid hydroperoxide** で修飾されたタンパク質に着目し、血漿における分析系を構築するための特異抗体と、それを用いた分析系を作成中である。

**DHA** はレビー小体病患者脳の超遠心可溶性分画に  $\alpha$  シヌクレインとともに蓄積していることが報告されている膜構成脂肪酸である。本年の研究では **DHA** 由来の **lipid hydroperoxide** がレビー小体病剖検脳で蓄積されていることが見いだされた (Akatsu et al., in preparation)。さらに、**DHA** 由来の **lipid hydroperoxide** は  $\alpha$  シヌクレインを修飾することで毒性をもつオリゴマー化を促進し、タンパク分解系を阻害することを細胞実験で見いだした。これらの結果を基にしてレビー小体病の病因を解明する糸口としたい。

脂質過酸化、特に **DHA** 由来の **lipid hydroperoxide** の生成を抑制させる低分子化合物を開発し、レビー小体病、特にパーキンソン病の早期例に対しヒト介入試験を行うことは将来の課題である。レビー小体病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

分担研究報告参照