

近接ライゲーションアッセイ法を用いたレビー小体病のモノアミン神経系変性の病態解明

水谷真志

東京大学医学部附属病院 精神神経科

【研究の背景】

近接ライゲーションアッセイ法 (PLA 法) は、タンパク質間相互作用や特定のタンパク質修飾を高感度に検出できる手法として注目されている。本法は、神経変性疾患においては病態初期の可溶性オリゴマーを高感度に検出できる手法として注目されている¹⁾。従来の免疫染色法では検出が困難であった初期段階の α シヌクレインのオリゴマー形成を、二つの異なる抗体を用いることで特異的に可視化することが可能となっており、本手法の特徴である増幅シグナルによる優れた検出感度は、従来の手法では捉えられなかった可溶性オリゴマーの形成過程を詳細に解析することを可能とし、神経変性疾患の発症機序の解明に重要な知見をもたらすことが期待される。

筆者は先行研究でレビー小体病におけるモノアミン神経系の線維密度について検討した²⁾が、これとオリゴマー蛋白との関係は未だ十分な研究がなされていない。

【目 的】

本研究では、PLA 法を用いた α シヌクレインのオリゴマー検出、及びレビー小体病患者のモノアミン神経系の変性との関連を調べる。また、タウのオリゴマー検出法の導入・確立を目的とする。

【方 法】

Duolink 社製の Proximity Ligation Assay Detection Kit を用いて、国立精神・神経医療研究センターに保管されているレビー小体病患者死後脊髄・アルツハイマー病患者死後脳を用いて、 α シヌクレイン及びリン酸化タウに対して近接ライゲーションアッセイ法を行った。

【結 果】

既に報告されている α シヌクレインに対する PLA 法による検出に成功した。検出されたパターンは、既報のパターンとも矛盾しないものだった。また、さらに世界的にも成功の報告が限定的³⁾であるリン酸化タウに対する PLA 法による検出に成功した。しかしながら、研究期間内にはレビー小体病患者のモノアミン神経系の変性との関連を調べるまでには至らなかった。

【考 察】

PLA 法を用いて、 α シヌクレインやリン酸化タウといった代表的な神経変性蛋白のオリゴマー検出のため手法を導入を行った。PLA法による検出が困難だった原因については、① α シヌクレインは他の蛋白に比して死後固定後に抗原の活性が低下しており、ギ酸処理など強力な賦活主義を用いる必要があること、②最も一般的な手技⁴⁾において使用される α シヌクレイン抗体の成分にアジ化ナトリウムが含まれるようになり反応が阻害されていることなどが考えられた。

α シヌクレインによる PLA 法が確立したため、今後はモノアミン神経系の線維密度と α シヌクレインオリゴマー密度との相

関関係を検討するなどして引き続き研究を継続していく。また、リン酸化タウのオリゴマー検出が可能となったため、今後はアルツハイマー病患者死後脳、特に疾患修飾薬治療後患者の死後脳や、皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺、Pick 病などに対するオリゴマー検出を行っていく。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

神経変性疾患・認知症に対する疾患修飾薬は新規開発が続いており、本邦でもレカネマブ⁵⁾やドナネマブが使用可能となっている。レカネマブはアミロイドβのプロトフィブリルに作用するとされていたが、これはアミロイドβのオリゴマーにも作用する⁶⁾ことが報告されており、今後神経変性蛋白のオリゴマーの研究は盛んになっていくと考えられる⁷⁾。PET 研究では蛋白質の微細な蓄積状況やそのパターンの認識は困難であり、しかし一般的な免疫組織化学染色ではオリゴマーの検出力は低く、今後PLA法を用いたタウやシヌクレインの研究は疾患修飾薬のヒト臨床使用後に作用メカニズムを確認していく上で直接的に役立っていく可能性が高い。本研究はその礎になるものである。

【参考・引用文献】

- 1) Roberts RF, Wade-Martins R, Alegre-Abarrategui J: Direct visualization of alpha-synuclein oligomers reveals previously undetected pathology in Parkinson's disease brain. *Brain* **138**: 1642-1657, 2015
- 2) Mizutani M, Sano T, Ohira M, Takao M: Neuropathological studies of serotonergic and noradrenergic systems in Lewy body disease patients with delusion or depression. *Psychiatry Clin Neurosci* **76**: 459-467, 2022
- 3) Bengoa-Vergniory N, Velentza-Almpani E, Silva AM, Scott C, Vargas-Caballero M, et al: Tau-proximity ligation assay reveals extensive previously undetected pathology prior to neurofibrillary tangles in preclinical Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications* **9**: 18, 2021
- 4) Bartels T: *Alpha-Synuclein Methods and Protocols: Methods and Protocols*. 2019
- 5) Dyck CHV, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, et al: Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* **388**: 9-21, 2023
- 6) Watanabe-Nakayama T, Tsuji M, Umeda K, Oguchi T, Konno H, et al: Structural Dynamics of Amyloid-β Protofibrils and Actions of Anti-Amyloid-β Antibodies as Observed by High-Speed Atomic Force Microscopy. *Nano Letters* **23**: 6259-6268, 2023
- 7) Ono K: Alzheimer's disease as oligomeropathy. *Neurochem Int* **119**: 57-70, 2018