

199800359A

平成10年度厚生科学研究費補助金
(脳科学研究事業)
総括・分担研究報告書

「パーキンソン病における神経細胞
死の分子機構とその保護治療に関する
研究 (H10-脳-007)」

主任研究者 永津 俊治

分担研究者 水野 美邦
小川 紀雄
久野 貞子

パーキンソン病における神経細胞死の分子機構と
その保護治療に関する研究

主任研究者：永津俊治 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授

研究要旨 パーキンソン病は、老人に多発する運動障害を伴う神経変性疾患である。黒質線条体系ドーパミンニューロンの変性機序を分子レベルで解明し、神経細胞を保護する根本的治療法を開発することを目的として研究を進めて、次の成果を得た。パーキンソン病がサイトカイン類の増加と神経栄養因子類の減少でおこることを支持する動物モデルの成績として、MPTP パーキンソニズムマウスと 6-ヒドロキシドーパミンパーキンソニズムラットの 2 種の動物モデルで、線条体の IL-1 β と TNF- α の著明な増加を見出した。MPTP パーキンソニズムマウスで線条体に神経栄養因子 NGF が減少することを見出した。また MPTP パーキンソニズムサルで BDNF が低下することを見出した。6-ヒドロキシドーパミンの一侧の線条体内投与によるパーキンソニズムラットで、L-DOPA を連続投与しても、健常対照側の TNF- α は増加せず、また 6-ヒドロキシドーパミン注入側の著明な TNF- α の増加は、L-DOPA の連続投与でさらに増加することがないことを示した。この成績は、パーキンソン病線条体での TNF- α などのサイトカイン類の増加は、L-DOPA の二次的作用ではなくて、パーキンソン病の原因と関連すること、L-DOPA 投与は *in vivo* ではドーパミンニューロンを障害せず、L-DOPA による on-off などの副作用はドーパミンのシグナル伝達の異常によることを示す。発症機序に関して、酸化ストレスによる黒質の核酸障害を 8-hydroxydeoxyguanosine (8OHdG) とその修復酵素 8OHdGTPase の増大により証明した。遺伝的素因では、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I を構成する 24-kDa サブユニットの遺伝子多型が発症危険因子の一つであることを示した。また常染色体劣性遺伝の家族性パーキンソン病の原因遺伝子である Parkin を発見した。そのエクソン 10 の変異多型が神経保護に働く可能性を指摘した。ドーパミン神経由来 B65 細胞株で免疫抑制薬 FK506 は 6-ヒドロキシドーパミンによる神経細胞死を抑制することを見出した。また免疫抑制薬サイクロスポリンはドーパミン神経機構異常のあるジスキネジアラットでドーパミン神経機構の機能を亢進して、ドーパミン神経修復に応用できる可能性を示した。

研究者・研究協力者

永津 俊治（藤田保健衛生大学 総合医科学研究所）

一瀬 宏

茂木 真希雄（愛知学院大学 歯学部）

戸苺 彰史

水野 美邦（順天堂大学 医学部）

服部 信孝

王 梅

北田 徹

後藤 啓五

杉田 之宏

望月 秀樹

森 秀生

小川 紀雄（岡山大学 医学部）

田中 健一

浅沼 幹夫

久野 貞子（国立療養所 宇多野病院）

太田 光熙

山崎 俊三

水田 英二

A. 研究目的

パーキンソン病は、老人に多発する神経疾患であり、本邦における患者数は約12万人と推定される。本疾患の特徴である錐体外路性運動障害は、黒質線条体系ドーパミン作動性ニューロンの変性によりおこる。したがって、その治療はドーパミンニューロンの機能の改善を基本とする。L-DOPA及びドーパミンアゴニストによる、ドーパミンの補充療法は、症状の顕著な改善をもたらす。しかし、このドーパミン補充療法はあくまで対症療法であり、年余にわたる長期治療では約半数の患者で薬物効果不安定、異常不随意運動（ジスキネジア）、幻覚・妄想が出現し、患者・家族・社会に計り知れない負担を強いている。このため、L-DOPA療法に代わる根本的治療法を開発することは、高齢化社会を迎えつつある日本にとって、緊急かつ重要な課題である。

本研究は、パーキンソン病の原因を分子レベルで解明し、ドーパミンニューロンの変性を阻止あるいはドーパミンニューロンを保護する治療法を開発することを目的としている。パーキンソン病の病態が解明され、病気の進行を抑制することが可能になれば、患者本人のQuality of Life (QOL)を改善するだけでなく、看護する家族の負担を減らし、結果として医療経済上のメリットを生ずる可能性がある。

本研究の特色は、これまでパーキンソン病の原因解明と神経細胞保護療法に最も活潑に取り組んできた我が国の第一線の研究者が協力して、神経細胞死に最も寄与する因子を分子レベルで解明しつつ、その成果を踏まえた細胞保護療法の基礎的検討を行おうとするものである。比較的短期間に大きな成果が期待できる共同研究である。

永津グループ（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）はパーキンソン病患者の死後脳と脳室・脊髄脳脊髄液で、サイトカイン類（TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, TGF- α , TGF- β 1, EGF), apoptosis 関連タンパク質(bcl-2, sFas)の増加を報告し、パーキンソン病の神経細胞死の原因にサイトカインによる免疫反応とそれによ

りおこるアポトーシスが関連する可能性を報告してきた(Mogi M et al, Neurosci Lett 165: 208-210, 1994; Nagatsu T and Mogi M, Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Plenum, New York: pp. 407-412, 1998).

水野グループ（順天堂大学医学部）はパーキンソン病の発症機序に関して、ミトコンドリア複合体Iの低下のあることを早くから見つけ、さらに酸化的ストレスの関与を黒質細胞レベルで証明し、また遺伝素因に関しても世界をリードする発表を行ってきた(Mizuno Y et al, Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Plenum, New York: pp. 393-399, 1998)。

小川グループ（岡山大学医学部）は、パーキンソンモデル動物、培養細胞、*in vitro* 実験系などを用いて、神経変性機序ことにフリーラジカルや一酸化窒素消去薬の検定法を確立した。さらに「緩徐進行性」のドーパミン神経障害をイムノフィリン結合免疫抑制薬サイクロスポリンが阻止することを初めて報告した(Matsuura K et al, Exp Neurol 146: 526-535, 1997)。

久野グループ（国立療養所宇多野病院）は、神経栄養因子(GDNF)の剖検脳での変化と神経細胞保護への臨床応用を研究してきた。

この4グループが密接に協力して、パーキンソン病の神経細胞死の原因の分子レベルでの解明から、神経栄養因子や免疫抑制薬による神経細胞の保護療法にいたる、原因と治療の新しい解明確立をめざす。

B. 研究方法

1) 永津グループ（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）はパーキンソニズムモデルのマウスとラットで脳内サイトカイン類の変化を探索した。パーキンソン病及びパーキンソン病モデル動物におけるサイトカイン類・アポトーシス関連タンパク質・ドーパミンニューロン関連タンパク質の変化は、これまでの剖検脳材料や脳脊髄液での研究と同じく、我々の確立した高感度酵素免疫測定法によって測定した(Mogi M et al, Anal Biochem 138: 125-132, 1984)。パーキンソニズムモデルマウスの作製にはC57 BL/6Jマ

ウスに 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) を 30mg/kg/day、13 日間連続して腹腔内投与した。対照マウスには生理的食塩水を注射した。MPTP 投与マウスの脳を最後の MPTP 注射の 5 日後に採取した。脳は線条体 (尾状核/被核) と前頭葉を切り出し、0.32M sucrose/100 μ M phenylmethylsulfonylfluoride/50 μ g leupeptine, 50 μ g pepstatin, 50 μ l antipain per ml でホモジネートとして遠沈し、上清の IL-1 β と NGF を測定した。実験方法の詳細は原報の通りである (Mogi M et al, Neurosci Lett 250: 25-28, 1998)。

6-ヒドロキシドーパミンの一側線条体注入による半側パーキンソニズムラットの作製は共同で小川グループの方法によった (Matsuura et al, Exp Neurol 146: 526-534, 1997)。この方法では黒質線条体ドーパミンニューロンはゆるやかな変性をおこし、ドーパミンが減少し半側パーキンソニズムの症状の回転運動をおこした。L-DOPA はパーキンソン病に最も有効なドーパミン補充薬であるが、*in vitro* の培養細胞系では酸素ラジカル (reactive oxygen species, ROS) や OH ラジカルを生成してドーパミンニューロンのアポトーシスをおこすことが報告されている。我々の報告してきたパーキンソン病死後脳のサイトカイン類の増加も、L-DOPA 療法のためではないかとの疑問があった。そこで黒質ドーパミンニューロンに対する L-DOPA の影響をしらべる目的で、6-ヒドロキシドーパミン投与による半側パーキンソニズムラットに、L-DOPA 25mg/kg, 50mg/kg を、6-ヒドロキシドーパミンの 1 側の線条体内注射後 1 日-6 日の間連続して皮下注射で投与した。6-ヒドロキシドーパミン注入 4 週間後に、各ラットの半側パーキンソニズム (回転運動) を確認してから、両側の線条体と黒質及び大脳皮質を採取した。TNF- α の濃度は酵素免疫法で測定した。

ヒト黒質のチロシン水酸化酵素陽性のドーパミン神経にチロシナーゼが共存するか否かを免疫組織化学で共焦点レーザー顕微鏡によって検索した。ヒトチロシナーゼ特異抗体は Dr. King, Richard A. (University of Minnesota,

Mineapolis, USA) により供与された。

2) 水野グループ (順天堂大学) はパーキンソン病の素因遺伝子を探索した。ミトコンドリア電子伝達系複合体 I の 24kDa サブユニットの遺伝子多型の分析方法 (Hattori et al, 1988a); ミトコンドリア α ケトグルタル酸脱水素酵素複合体 E2 サブユニット遺伝子の変異分析の方法 (Kobayashi et al, 1998); Parkin 遺伝子の多型解析の方法 (Wang et al, 1999); 8-hydroxyguanosine triphosphatase (8-oxo-dGTP-ase) および 8-oxo-dihydroguanosine (8-oxo-dG) の免疫組織学による分析 (Shimura et al, 1999); Bcl-2, Bcl-XL, Bax の免疫組織学による分析 (Goto et al, 1999) は、いずれも既法の方法によった。

3) 小川グループ (岡山大学医学部) は、ドーパミン神経由来 B65 細胞株を用いて、6-ヒドロキシドーパミン暴露による神経細胞死評価系を確立した。細胞生存率は West-1 assay により調べた。この系で免疫抑制薬 tacrolimus (FK506) の神経細胞保護作用を検索できた。神経毒 iminodipropionitrile (IDPN) によるジスキネジヤラットを作製して、免疫抑制薬サイクロスポリン A の投与の効果を症状から解析して、脳を採取し、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) によって AP-1, CREB の DNA 結合活性を解析した。またドーパミン-D₁, D₂-レセプター、cyclophilin の mRNA を Northern blot analysis で解析した。砂ネズミ虚血モデルで海馬ムスカリン性レセプター結合能を、³H]-QNB ラジオレセプターアッセイで定量し、サイクロスポリンの効果を評価した。

4) 久野グループ (国立療養所宇多野病院) は、ドーパミンニューロンの栄養因子である GDNF タンパク質の特異抗体を作製して、パーキンソン病死後脳及び MPTP パーキンソン病サル脳の GDNF の変化を酵素免疫測定法 (ELISA) と免疫組織化学によって追求した。GDNF の特異抗体として、GDNF の部分ペプチド抗体、ヒトのレコンビナント GDNF の抗体を

作製した。GDNFのELISA法によって、パーキンソン病患者の脳室脳脊髄液のGDNF量を測定した。MPTPパーキンソン病サルはカニクイサル、ニホンサルで作製した。黒質緻密層のドーパミンニューロンをチロシン水酸化酵素とGDNFの免疫組織化学により染色して陽性細胞数を測定した。

C. 研究結果

1) パーキンソン病モデル動物（マウス・ラット）の黒質線条体部位のサイトカイン類の増加（永津グループ）

我々は、1994年世界で最初にパーキンソン病死後脳の線条体、脳脊髄液にTNF- α が増加していることを報告した(Mogi M et al, Neurosci Lett 165: 208-210, 1994)。さらにIL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, EGF, TGF- α , TGF- β 1がパーキンソン病死後脳や脳室・脊椎・脳脊髄液で有意に増加していることを見出した(Nagatsu T and Mogi M, Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Plenum, New York: pp. 407-412, 1998)。このパーキンソン病におけるサイトカイン類の増加が、パーキンソン病モデル動物でもおこるかどうかを、MPTPパーキンソニズムマウスと、6-ヒドロキシドーパミンの一侧の線条体内注射による半側パーキンソニズムラットについて検討した。MPTPマウスのIL-1 β を測定した。対照マウスで前頭葉で濃度が高く、線条体では低かった。IL-1 β 濃度はMPTPマウスの線条体で対照マウスの約23倍に著明に増加した(p<0.005)。これに対してMPTPマウスの前頭葉では対照マウスと比べてIL-1 β 濃度は変化しなかった。

神経栄養因子NGF濃度は、対照マウスで前頭葉で濃度が高く線条体では低かった。MPTPマウスの線条体でNGFは約50%と有意に減少した(p<0.05)。前頭葉では有意なNGFの変化はみられなかった。

6-ヒドロキシドーパミンのラットの一侧（右側、R）線条体への注射により緩徐な黒質線条体神経細胞死をおこした半側パーキンソニズムラットについて、TNF- α が、対照側（左側、

L）と破壊側（右側、R）で変化するかどうかを検索した。黒質でも線条体でも傷害側（R）のTNF- α 濃度、傷害側と対照側のTNF- α 濃度の比TNF- α （R/L）は有意に増加した。大脳皮質ではTNF- α （R/L）は約1.0で左右差はなかった。本実験系に、L-DOPA（25mg/kgおよび50mg/kg皮下注射）を6回連続投与したところ、黒質、線条体、大脳皮質のどの部位でも、また対照側（左側）でも、6-ヒドロキシドーパミンの線条体注射側（右側）でも、脳内TNF- α 量は変化しなかった。この結果は従来の*in vitro*の培養細胞系の実験ではL-DOPAはアポトーシスをおこしうるが、*in vivo*においては、TNF- α を増加させてアポトーシスを促進する危険性はないことを示す。

半側パーキンソニズムラットの線条体、黒質におけるTNF- α の増加は、パーキンソン病患者の線条体や脳脊髄液のTNF- α の増加と一致しており、TNF- α の増加がパーキンソン病の発症に関与する可能性を示唆する。

パーキンソン病の黒質線条体系ドーパミンニューロンの変性機序と神経メラニンが密接に関与することが推定されている。神経メラニンはチロシンからチロシン水酸化酵素でドーパを経てドーパ脱炭酸酵素によって生成するドーパミンから、非酵素的酸化によって生成されると推定されているが、どうして黒質ドーパミンニューロンだけ神経メラニンを生成するのか未定である。われわれはチロシナーゼがチロシン水酸化酵素と共存してドーパミンがドーパミンキノンに酸化されて神経メラニンを生成するか否かを検索した。Dr. King, Richard A. (University of Minnesota, Minneapolis, USA) から作製供与された、ヒトチロシナーゼ特異抗体を用いて、免疫組織化学によってチロシン水酸化酵素陽性黒質ドーパミンニューロンのチロシナーゼを共焦点レーザー顕微鏡で解析した。結果はチロシナーゼは黒質ドーパミン神経細胞に検出できなかった。ヒトメラノーマ細胞はチロシナーゼが強陽性でチロシン水酸化酵素は検出できなかった。この成績は、黒質ドーパミン神経の神経メラニンは、(1)ドーパミンから非

酵素的に酸化生成する、(2)極めて活性が低いチロシン水酸化酵素のチロシナーゼ活性で生成する、(3)検出できない極めて少量のチロシナーゼで生成する、のいずれかの可能性が考えられるが、神経メラニン生成にはチロシナーゼは主な関与はしていないことを示唆する(Ikemoto K et al, *Neurosci Lett* 253: 198-200, 1998)。

2) 水野グループ(順天堂大学医学部)はパーキンソン病の遺伝的素因と黒質変性機序に関して精力的に研究を進めた。

常染色体劣性遺伝の家族性パーキンソン病の新しい原因遺伝子を発見して Parkin と命名した(Kitada et al, *Nature* 392: 605-608, 1998)。Parkin 遺伝子に遺伝子多型を3カ所発見した(エクソン4 Ser67Asn; エクソン10 Val380Leu; エクソン10 Arg366Trp)。その頻度をパーキンソン病と対照で比較したところ、そのうちの1つエクソン10のArg366Trpの変異型アリル頻度は、対照4.4%に対しパーキンソン病1.2%とどちらも低かったが、その差は2%以下の危険率で対照で高く、この多型が神経保護力に働く可能性を指摘した。

遺伝的素因に関しては、水野らは世界に先駆けてパーキンソン病でミトコンドリア電子伝達系複合体Iと α -ケトグルタル酸脱水素酵素の活性低下を報告してきた。本研究でミトコンドリア電子伝達系複合体Iを構成するサブユニットの1つである24kDaサブユニットの遺伝子多型を用いた関連分析で、変異型ホモ接合体(Val/Val)の頻度が、PDで23.8%、対照で11.5%とパーキンソン病で有意に高かった。この遺伝子多型がパーキンソン病発症の遺伝的危険因子の1つになることが示された。

DNAの酸化的障害の指標としての8-oxo-dGTPase及び8-oxo-dGの免疫組織化学で、パーキンソン病の黒質メラニン含有神経細胞の大部分が陽性であり、核は染色されず、細胞質が染色されたことから、パーキンソン病では主にミトコンドリアDNAが酸化的障害を被っていると考えられた。

黒質変性機序に関して、アポトーシス関連タ

ンパク質を免疫組織化学によって解析した。anti-apoptotic proteinのBcl-2とBcl-XL, pro-apoptotic proteinのBaxを免疫組織化学で検討したところ、パーキンソン病ではBcl-XLの発現が対照に比して有意に低く、これがパーキンソン病の黒質神経細胞がアポトーシスに陥りやすい一因である可能性が示された。

3) 小川グループ(岡山大学医学部)は神経変性に対する免疫抑制薬の保護修復作用に関する研究を推進した。

ドーパミン神経由来B65細胞株で、神経毒6-ヒドロキシドーパミン暴露による神経細胞死評価系を確立して、この系を用いて免疫抑制薬FK506の効果を予備検討したところ、FK506は6-ヒドロキシドーパミン暴露による神経細胞死を抑制することを見出した。

また脳内ドーパミン神経系の異常が報告されているジスキネジアラットにおいて、免疫抑制薬サイクロスポリンAが転写因子(TRE, CRE)結合活性、ドーパミン含量、ドーパミンD1レセプターmRNAを高めて、神経機能の亢進作用を示すこと、従ってドーパミン神経修復に応用できる可能性を示した。正常ラットではこのような現象は見られず、病態モデルではじめてこのサイクロスポリンAの作用が検出された。

また脳虚モデル砂ネズミで、海馬ムスカリン性レセプター結合能の晩発性低下に対するサイクロスポリンAの保護効果が初期だけでよく、必ずしも連続投与の必要性がなかったことから免疫抑制作用とは別の機序である可能性を明らかにした。

4) 久野グループ(国立療養所宇多野病院)は、神経栄養因子GDNFの治療の臨床応用をめざして、GDNFのパーキンソン病における変化を追求した。

パーキンソン病患者の非悪性症候群と悪性症候群の剖検脳について、GDNT抗体とチロシン水酸化酵素抗体を用いて免疫組織化学法で、抗体陽性細胞を検索した。黒質緻密層でははず

れの患者でも GDNF 抗体陽性細胞とチロシン水酸化酵素抗体陽性細胞の数は著明に減少していた。

ドーパミン神経毒 MPTP(0.2-0.5mg/kg)をサル(カニクイサル、ニホンサル)に静脈注射して、経時的に黒質緻密層の GDNF タンパク質陽性細胞数とチロシン水酸化酵素タンパク質陽性細胞数を測定したところ、GDNF の染色がチロシン水酸化酵素の染色より早く低下し、MPTP によるドーパミン神経細胞死に先行して、神経栄養因子 GDNF が低下することが示唆された。

パーキンソン病患者の血中、髄液中の GDNF 濃度をパーキンソン病患者と非パーキンソン病患者について酵素免疫測定法で定量した。脳外科手術(pallidotomy など)前後、L-DOPA 投与前後で GDNF 濃度を測定したが、パーキンソン病患者と対照患者、手術、投薬との関連で、病態との間に有意な傾向は見いだし得なかった。

D. 考察

永津グループ(藤田保健衛生大学総合医科学研究科)は、これまでパーキンソン病剖検脳、脳室・脊椎・脳脊髄液のサイトカイン類・神経栄養因子類(TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, EGF, TGF- α , TGF- β 1)が増加することを報告してきた(Mogi M et al, Neurosci Lett 165: 208-210, 1994; Nagatsu T and Mogi M, 1998)。パーキンソン病は、他の神経変性疾患と共通して、特定の神経細胞(黒質線条体ドーパミンニューロン)が死に至り、線条体で神経伝達物質ドーパミンが減少して発症する。パーキンソン病における黒質線条体ドーパミンニューロンの神経細胞死は、素因遺伝子と神経毒のような環境因子との相互作用によって起こると推定されている。従来、脳は免疫寛容であり、免疫反応のサイトカイン類は神経細胞死に関与しないと推定されてきた。しかし脳のグリア細胞がサイトカイン類を生産し、サイトカインレセプターが脳のニューロンやグリア細胞に存在しており、神経変性疾患の神経細胞死においてもサイトカイン類や神経栄養因子(ニューロトロフィン)類が関与

する可能性がある。これまで、*in vitro* でドーパミンニューロンの培養細胞系でドーパミンニューロンの生存と維持に関連するサイトカイン類・神経栄養因子類が検索されてきた。サイトカイン類はアポトーシスを誘導して神経細胞死をおこすと共に、神経栄養因子としても働くという“pleiotropy”(多面作用)をもつ。TNF- α などの炎症性サイトカインは神経細胞の Programmed cell death (apoptosis)をひきおこす。従って、パーキンソン病における TNF- α などのサイトカインの増加は、病気の結果としてグリア細胞が神経細胞を保護する二次的な代償機構とも推定されるが、神経細胞死の原因であり、パーキンソン病は炎症免疫反応である可能性も示唆される。この仮説と一致して、我々はパーキンソン病死後脳の線条体で、アポトーシス関連タンパク質の bcl-2, soluble Fas (sFas)が増加することを見いだしている(Mogi M et al, Neurosci Lett 215: 137-139, 1996; Mogi M et al, Neurosci Lett 220: 195-198, 1996)。

死後脳の研究では、パーキンソン病の患者はいずれも L-DOPA を投与されていたので、サイトカイン類の変化は、L-DOPA の二次的影響である可能性も考えられた。そこで、パーキンソン病患者線条体のサイトカイン類の増加が L-DOPA の影響でないことを立証するためにも、パーキンソン病モデル動物におけるサイトカイン類の変化を検索した。

本研究で、MPTP モデルマウスの線条体での IL-1 β の増加はパーキンソン病死後脳の成績とよく一致しており、死後脳線条体の IL-1 β の増加は L-DOPA 投与の二次的反應でないこと、MPTP によるパーキンソニズム発症にもサイトカインが関与することが立証された。また MPTP モデルマウスの線条体で、神経栄養因子 NGF の有意な減少が初めて立証された。ドーパミン神経細胞の培養系で NGF を除去するとアポトーシスをおこすことが知られている。従って、MPTP パーキンソニズムマウス線条体での IL-1 β の増加と NGF の減少はパーキンソン病の神経細胞死もアポトーシスであることを支持する成績である。

久野ら（国立療養所宇多野病院）は、MPTP パーキンソニズムサルで、免疫組織化学法によって細胞レベルでドーパミン神経のマーカー酵素チロシン水酸化酵素の減少よりも早く、神経栄養因子の GDNF が減少することを見いだした。GDNF を髄液や血液でパーキンソン病と対照患者とについて酵素免疫測定法で定量する試みを進めている。

永津らは、小川らと共同して、6-ヒドロキシドーパミンの線条体注射により寛徐な黒質線条体ドーパミン神経の細胞死をおこした半側パーキンソニズムラットにおいて、傷害側での黒質と線条体で TNF- α が有意に増加することを認めた。さらに L-DOPA を 25mg/kg, 50mg/kg 連続投与したところ、対照側でも傷害側でも TNF- α は変化しなかった。この結果は、6-ヒドロキシドーパミンによるパーキンソニズムの病因に TNF- α が関係すること、L-DOPA は *in vivo* では、正常脳でも傷害脳でも TNF- α 量で調べた限りでは、神経細胞死をおこさないことを示唆する。

水野らのグループ（順天堂大学医学部）によるパーキンソン病の遺伝素因についての研究では、常染色体劣性遺伝家族性パーキンソン病の原因遺伝子 Parkin の発見(Kitada T et al, 1998) はパーキンソン病における黒質ドーパミン神経の変性機序に重要な手がかりを与えると期待される。Parkin 遺伝子に遺伝子多型が3カ所発見されたが Parkin 遺伝子の多型の1つは保護因子となる可能性が示された。また遺伝危険因子として、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I の 24kDa サブユニット及び α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体 E2 の遺伝子多型が危険因子となる可能性を示した。また免疫組織化学でアポトーシス関連タンパク質 bcl-XL が減少することを示した。上述のように、永津のグループは同じく anti-apoptosis タンパク質の bcl-2 がパーキンソン病の線条体で増加していることを報告した(Mogi M et al, Neurosci Lett 215: 137-139, 1996)。bcl-2 のパーキンソン病脳黒質線条体における増加は英国で Western blot により追試確認された(Marshall KA et al, Biochem Biophys Res

Commun 240: 84-87, 1997)。水野らの Bcl-XL の免疫組織化学による減少の成績は、同じ anti-apoptotic protein でも Bcl-2 と Bcl-XL とではパーキンソン病で異なる変化を示すことを示しており興味深い成績である。

永津グループはパーキンソン病死後脳線条体で apoptotic protein の Fas の soluble form (soluble Fas, sFas)の増加を報告したが(Mogi M et al, Neurosci Lett 220: 195-198, 1996)、さらに caspases のような apoptosis 関連タンパク質について検索する計画である。

水野グループはパーキンソン病危険因子の遺伝子多型の解析の研究にアポトーシス関連遺伝子について推進する計画である。

小川グループ（岡山大学医学部）は、神経細胞死の免疫抑制薬(FK505, cyclosporin A)による治療の機序を培養細胞系、IDPN ジスキネジアモデル、脳虚血モデルで検索し、ドーパミン神経の機能を活性化することを明らかにした。免疫抑制薬がドーパミン神経細胞死を保護することが確立された。そのメカニズムが免疫抑制作用によるのか、他のメカニズムもあるのか、神経保護修復作用にサイトカインとアポトーシスが関与しているかどうかを追求している。

E. 結論

1994 年以来、パーキンソン病剖検脳線条体で TNF- α , IL-1 β などのサイトカインの増加を報告したが、MPTP パーキンソンマウス、6-ヒドロキシドーパミンによる半側パーキンソンラットの黒質と線条体でも IL-1 β や TNF- α の著明な増加を証明した。L-DOPA の投与は、正常脳でも 6-ヒドロキシドーパミンによる傷害脳でも、TNF- α 量を変化させなかった。このことはパーキンソン病の線条体におけるサイトカインの増加は黒質線条体ドーパミン神経の細胞死に密接に関係しており、L-DOPA 治療は *in vivo* では神経細胞死を促進することはないことを示す。MPTP パーキンソンマウス線条体で神経栄養因子 NGF の減少を、さらにパーキンソン病黒質でも GDNF の減少を立証した。家族性パーキンソン病の原因遺伝子 Parkin を発見し、

Parkin 遺伝子の多型の1つが保護因子となる可能性を示した。素因遺伝子として電子伝達系複合体I 24kDaサブユニット遺伝子、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体 E2 遺伝子の多型が危険因子となることが示された。anti-apoptotic protein の bcl-XL の減少が免疫組織化学で示された。免疫抑制薬(FK506, cyclosporin A)が神経毒 (6-ヒドロキシドーパミンや iminodipropionitrile)による神経細胞死を保護することが、B65 培養細胞系、ジスキネジアラット、脳虚血スナネズミの *in vitro*、*in vivo* の系で立証された。

F. 研究発表

主任研究者の研究発表。

分担研究者の研究発表は各分担研究報告に記載。

1.論文発表

- Sawada, H., Nishii, K., Suzuki T., Hasegawa, K., Hata, T., Nagatsu, I., R. J. Kreitman, I. Pastan, Nagatsu T., Kobayashi, K. (1998) Autonomic neuropathy in transgenic mice caused by immunotoxin targeting of the peripheral nervous system. *J. Neurosci. Res.*, 51, 162-173.
- Nagatsu, I., Ikemoto, Takeuchi, T., Arai, R., Karasawa, N., Fujii, T., Nagatsu, T. (1998) Phenylethanolamine-N-methyltransferase-immunoreactive nerve terminals afferent to the mouse substantia nigra. *Neurosci. Lett.*, 245, 41-44.
- Song, H., Saito, K., Seishima, M., Fujigaki, S., Ishiguro, H., Nagatsu, T., Noma, A. (1998) Interleukin 1 β and tumor necrosis factor- α suppress apolipoprotein E secretion from a hepatoma cell line (HepG2). *Cytokine*, 10, 275-280.
- Imaoka, T., Date, I., Ohmoto, T., Nagatsu, T. (1998) Significant behavioral recovery in Parkinson's disease model by direct intracerebral gene transfer using continuous injection of plasmid DNA-liposome complex. *Human Gene Therapy*, 9, 1093-1102.
- Fan D.-S., Ogawa, M., Ikeguchi, K., Fujimoto, K.,

Urabe, M., Kume, A., Nishizawa, M., Matsushita, N., Kiuchi, K., Ichinose, H., Nagatsu, T., G. J. Kurtzman, Nakano, I., Ozawa, K. (1998) Prevention of dopaminergic neuron death by adeno-associated virus vector-mediated GDNF gene transfer *in vitro*. *Neurosci. Lett.*, 248, 61-64.

Cubells, J. F., van Kammen, D. P., Kelley, M. E., Anderson, G. M., O' Connor, D. T., Price, L. H., Malison, R., Rao, P. A., Kobayashi, K., Nagatsu, T., Gelernter, J. (1998) Dopamine β -hydroxylase: two polymorphisms in linkage disequilibrium at the structural gene DBH associate with biochemical phenotypic variation. *Human Genetics*, 102, 533-540.

Mogi, M., Togari, A., Ogawa, M., Ikeguchi, K., Shizuma, N., Fan, D.-S., Nakano, I., Nagatsu, T. (1998) Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1 β and nerve growth factor in the striatum. *Neurosci. Lett.*, 250, 25-28.

Gelernter, M., Kranzler, H., Cubells, J.F., Ichinose, H., Nagatsu, T. (1998) DRD2 allele frequencies and linkage disequilibria, including the -141 Clin/Del promoter polymorphism, in European-American, African-American, and Japanese Subjects. *Genomics*, 51, 21-26.

Sawada, M., Imai, F., Suzuki, H., Hayakawa, M., Kanno, T., Nagatsu, T. (1998) Brain-specific gene expression by microglial cell-mediated gene transfer in the mammalian brain. *FEBS Letter*, 433, 37-40.

Kaneda, N., Hikita, K., Naruse, Y., Fukuo, T., Matsubara, K., Nagatsu, T. (1998) Identification of the essential residue located in the active site of human phenylethanolamine N-methyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 405-409.

Ishiguro, H., Yamada, K., Ichino, N., Nagatsu, T. (1998) Identification and characterization of a novel phorbol ester-responsive DNA sequence in

- the 5'-flanking region of the human dopamine β -hydroxylase gene. *J. Biol. Chem.*, 273, 21941-21949.
- Nomura, T., Tazawa, M., Ohtsuki, M., Ichinose, C.S., Hagino, Y., Ota, A., Nakashima, A., Mori, K., Sugimoto, T., Ueno, O., Yazawa, Y., Ichinose, H., Nagatsu, T. (1998) Enzymes related to catecholamine biosynthesis in *tetrahymena pyriformis* — Presence of GTP cyclohydroxylase I. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120, 753-760.
- Ikemoto, K., Nagatsu, I., Ito, S., King, R.A., Nishimura, A., Nagatsu, T. (1998) Does tyrosine exist in neuromelanin-pigmented neurons in the human substantia nigra? *Neurosci. Lett.*, 253, 198-200.
- Ohye, T., Hori, T., Katoh, S., Nagatsu, T., Ichinose, H. (1998) Genomic organization and chromosomal localization of the human sepiapterin reductase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251, 597-602.
- Fan, D.-S., Ogawa, M., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., Ogasawara, Y., Urabe, M., Nishizawa, M., Nakano, I., Yoshida, M., Nagatsu, I., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kurtzman, G.J., Ozawa, K. (1998) Behavioral recovery in 6-OHDA-lesioned rats by cotransduction with tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase genes using two separate AAV vectors. *Human Gene Therapy*, 9, 2527-2535.
- Nishii K., Matsushita, N., Sawada, H., Sano, H., Noda, Y., Mamiya, T., Nabeshima, T., Nagatsu, I., Hata, T., Kiuchi, K., Yoshizato, H., Nakashima, K., Nagatsu, T., Kobayashi, K. (1998) Motor and learning dysfunctions during postnatal development in mice defective in dopamine neuronal transmission. *J. Neurosci. Res.*, 54, 450-464.
- Nagatsu, T. and Ichinose, H. (1999) Molecular biology of catecholamine-related enzymes in relation to Parkinson's disease. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 19, 57-66.
- Kobayashi, K. and Nagatsu, T. (1999) Mice lacking the tyrosine hydroxylase gene and transcomplementation with the human genome: ongoing prospects for human gene therapy. *Biogenic Amines*, 15, 1-20.
- Sawada, M., Suzumura, A., Hosoya, H., Marunouchi, T., Nagatsu, T. (1999) IL-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *J. Neurochem.*, in press.
- Nagatsu, T., Ichinose, H., Mogi, M., Togari, A. (1999) Neopterin and cytokines in hereditary dystonia and Parkinson's disease. *Pteridines*. in press.
- Nagatsu, I., Ikemoto, K., Kitahama, K., Nishimura, A., Ichinose, H. and Nagatsu, T. (1999) Specific localization of the guanosine triphosphate (GTP) cyclohydrolase I-immuno reactivity in the human brain. *J. Neural. Transm.*, in press.

2.学会発表

- Nagatsu, T. (1998). Tetrahydrobiopterin cofactor and Parkinson's disease. The 10th Rappaport Symposium Understanding Parkinson's Disease, Zichron Yaakov, Israel, May 10-13.
- D.-S., Fan, Ogawa, M., Ikeguchi, K., Fujimoto, K., Ogasawara, Y., Urabe M., Kume, A., Nishizawa, M., Matsushita, N., Kiuchi, K., Nagatsu, I., Ichinose, H., Nagatsu, T., Kurtzman, G.J., Nakano, I., Ozawa, K. (1998). Gene therapy for Parkinson's disease using adeno-associated virus vectors. American Society of Gene Therapy, Seattle, Washington, U.S.A., May 28-31.
- Nakashima, A., Mori, K., Nagatsu, T., Ota, A. (1998). Effects of dopamine on N-terminus-deleted human tyrosine hydroxylase type I expressed in *E. coli*. 4th Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Seoul, Korea, June 24-26.
- Mori, K., Nakashima A., Nagatsu, T., Ota, A. (1998). Effect of lipopolysaccharide on the gene expression of the enzymes involved in tetrahydrobiopterin de novo biosynthesis in

- murine neuroblastoma cell line N1E-115. 4th Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Seoul, Korea, June 24-26.
- Nomura, T., Tazawa, M., Ohtsuki, M., Sumi-Ichinose, C., Hagino, Y., Ota, A., Nakashima, A., Sugimoto, T., Nozawa, Y., Ichinose, H., Nagatsu, T. (1998). Identification of unconjugated pteridine derivatives synthesized in *Tetrahymena pyriformis*. 13th International Congress of Pharmacology, München, Germany, July 26-31.
- Nagao, Y., Ishiguro, H., Nagatsu, T., Nukina N. (1998). Death of *E. coli* induced by expression of truncated peptide of huntingtin harboring expanded polyglutamine. American Society of Human Genetics, Denver, Colorado, U.S.A., October 27-31.
- Cubells, J.F., Anderson, G.M., Kranzler, H., Price, L.H., Malison, R., Ichinose, H., Nagatsu, T., Gelernters, J. (1998). Haplotypes at DBH associate with differences in biochemical phenotype in European-Americans and vary in frequency and linkage disequilibrium across population groups. American Society of Human Genetics, Denver, Colorado, U.S.A., October 27-31.
- Nakashima, A., Mori, K., Matsubara, K., Nagatsu, T., Ota, A. (1998). Effects of dopamine on N-terminus-deleted human tyrosine hydroxylase type 1 expressed in *Escherichia coli* as a multose-binding protein fusion. Society for Neuroscience 1998, Los Angeles, California, U.S.A., November 7-12.
- Ichinose, H., Ohye, T., Suzuki, T., Inagaki, H., Sawada, H., Nishii, K., Nagatsu, T. (1998). Tetrahydrobiopterin in dopa responsive dystonia : tetrahydrobiopterin is an important factor for regulating the protein amount of tyrosine hydroxylase in the cell. Society for Neuroscience 1998, Los Angeles, California, U.S.A., November 7-12.
- Mitake, S., Suzuki, T., Usuda, N., Ishiguro, H., Nagatsu, T., Okumura-Naji, K. (1998). Presence of cAMP response element binding protein (CREB), in the postsynaptic sites of the brain. Society for Neuroscience 1998, Los Angeles, California, U.S.A., November 7-12.
- Nagatsu, I., Ikemoto, K., Kitahama, K., Nishimura, A., Ichinose, H., Nagatsu, T. (1998). GTP cyclohydrolase I in the human brain is stained by antibody to the C-terminal oligopeptide segment of the enzyme. Society for Neuroscience 1998, Los Angeles, California, U.S.A., November 7-12.

パーキンソン病の遺伝的素因と黒質変性機序に関する研究

分担研究者 水野 美邦 順天堂大学医学部教授

研究要旨

パーキンソン病の発症機序に関し、本症発症の遺伝的素因の解析と黒質変性機序の両面から研究を行った。遺伝的素因に関しては、ミトコンドリア電子伝達系複合体Iを構成するサブユニットの1つである24-Daサブユニットの遺伝子多型を用いた関連分析で、変異型ホモ合体 (Val/Val) の頻度が、PDで23.8%、対照11.5%とPDにおいて有意に高く ($P < 0.01$, Odds ratio 2.40, 95% CI 1.18 - 4.88)、この遺伝子多型がパーキンソン病発症の遺伝的危険因子の1つになることを示した。また常染色体性劣性遺伝の家族性パーキンソン病の原因遺伝子であるパーキン遺伝子に遺伝子多型を3カ所発見し、その頻度をパーキンソン病と対照で比較した。そのうちの1つエクソン10のArg366Trpの変異型アリル頻度は、対照4.4%に対しPD1.2%とどちらも低かったが、その差は2%以下の危険率で対照で高く、この多型が神経保護的に働く可能性を指摘した。黒質変性機序に関しては、アポトーシスを中心に解析し、アポトーシス関連蛋白であるBcl-2, Bcl-xl, Bax蛋白の発現を免疫組織学的に検討し、パーキンソン病においてはBcl-xlの発現が対照に比して低く、これがパーキンソン病の黒質神経細胞がアポトーシスに陥りやすい一因である可能性を示した。

A. 研究目的

パーキンソン病における神経細胞死の機序はかなり解明されてはきたが、詳細な分子機構はまだ不明な部分が多い。パーキンソン病の原因として遺伝的素因と環境因子の相互作用により酸化的ストレスとミトコンドリア呼吸障害が黒質に惹起され、アポトーシスが誘導されて黒質神経細胞が死に到るという仮説が有力になりつつある。本研究は本仮説の検証とパーキンソン病における黒質神経細胞死の分子機構を解明する目的で次の研究を行った。遺伝的素因に関しては、ミトコンドリア電子伝達系複合体Iを構成するサブユニットの1つである24k-Daサブユニット遺伝子、ミトコンドリア α ケトグルタル酸脱水素酵素複合体(KDGHCE2 component)遺伝子、常染色体性劣性遺伝を示す家族性パーキンソン病の原因遺伝子であるパーキン遺伝子で、それぞれの遺伝子多型を利用して、パーキンソン病の遺伝的危険因子を解析した。アポトーシスに関しては、Bcl-2, Bcl-xL, Baxに対する抗体と剖検黒質切片を用いて免疫組織学的検討を行った。また酸化的ストレスはアポトーシス誘導の重要なシグナルであることを考え、酸化的ストレスの有無を見る目的で、核酸の酸化的障害

の指標である8-hydroxyguanosine-triphosphatase (8-oxo-dGTP-ase) 及び 8-oxo-dihydroguanine (8-oxo-dG)の発現を免疫組織学的に検討した。

B. 研究方法

24kDaサブユニットの遺伝子多型の分析は、126名のパーキンソン病 (PD) 患者と113名の対照患者についてインフォームドコンセントを得た後末梢血の採血を行い常法に従いDNAを抽出して行った。我々の発見した遺伝子多型は、第二エクソンのC-to-T transitionによりAla29Valの変異を起こすもので、ミトコンドリアへのシグナルペプチドの部分に存在する。この変異の分析方法は既報の通りである (Httori et al., 1988a)。

KDGHCE2 componentの変異分析は、176例のPD患者と223例の対照患者について行った。この遺伝子多型は、G-toA transitionであるがアミノ酸の置換は起こさない。この変異の分析方法も既報の通りである (Kobayashi et al., 1998)。

Parkin遺伝子の多型解析は、160例のPD患者と160例の対照患者について行った。本遺伝子の多型はエクソン4に1カ所、エクソン10に2カ所あり、エク

ソン4の変異は、G-to-A transitionによりSer167Asnのアミノ酸置換がおきる。エクソン10の1つは、G-to-C transversionによりVal380Leu、もう1つはG-to-A transitionによりArg366Trpのアミノ酸置換がおきる。これらの分析を行った。方法は既報の通りである (Wang et al., 1999)。

遺伝子多型の解析を行ったPD患者はいずれも40歳以上発症の孤発性PDであり、対照患者は神経変性疾患を有さない症例である。

8-oxo-dGTPase及び8-oxo-dGの分析は、PD6例、対照4例、病的対照として多系統萎縮症3例につき、剖検脳黒質パラフィン包埋切片にて検討した。8-oxo-dGTPaseに対する抗体はウサギより得たポリクローナル抗体、8-oxo-dGに対する抗体は、日本油脂より得たモノクローナル抗体である。免疫組織は通常のdiaminobenzidineで発色させる方法をとった (Shimura et al., 1999)。

Bcl-2, Bcl-xL, Baxの分析は、PD7例、対照6例、病的対照として進行性核上性麻痺3例の剖検脳黒質切片について行った。Bcl-2に対する抗体はヒトBcl-2に対するモノクローナル抗体、Bcl-xLに対する抗体はラットBcl-xLに対するモノクローナル抗体、Baxに対する抗体はヒトBaxに対するポリクローナル抗体を使用した。免疫組織はdiaminobenzidineで発色させる方法をとったが、ニューロメラニンとの相異を解りやすくするため、更にnickel ammonium sulfateで処理する変法を用いた (Goto et al., 1999)。

C. 研究結果

24kDaサブユニット遺伝子の多型解析では、変異アレルの頻度は、PDで32.7%、対照38.9%と有意差はなかったが、遺伝子型でみると、変異型ホモ接合体 (Val/Val) の頻度が、PDで23.8%、対照11.5%とPDにおいて有意に高かった ($P < 0.01$, Odds ratio 2.40, 95% CI 1.18 - 4.88)。野生型ホモ接合体の頻度は、PD46.0%、対照46.0%と有意差はなく、野生型・変異型のヘテロ接合体の頻度は、PD30.2%、対照42.5%とPDにおいて有意に低かった ($P < 0.01$)。変異型ホモ接合体を有する人のパーキンソン病発病の危険率は、野生型ホモ接合体の人の2.40倍と計算された。

KGDCE2遺伝子の変異型アレル頻度は、PDで41.5%、対照で28.4%とPDに有意に高かった ($P < 0.001$)。変異型のホモ接合体の頻度は、PDで23.9%、対照で15.2%、野生型ホモ接合体の頻度は、PDで40.9%、

対照で40.9%、ヘテロ接合体の頻度は、PD35.2%、対照26.5%と、PDでは変異型を持つ遺伝子型の頻度が有意に高かった (変異型ホモ接合体のOdds ratio 2.23, 95% CI 1.31 - 3.81)。

Parkin遺伝子の変異については、エクソン4のSer167Asnについては、変異型アレル頻度は、PD43.4%、対照43.7%と全く有意差はなかった。次にエクソン10のVal380Leuについては、変異型の頻度は、PD1.9%、対照3.4%とどちらも低く、有意差もなかった。エクソン10のArg366Trpについては変異型アレル頻度は、対照4.4%に対しPD1.2%とどちらも低かったが、その差は2%以下の危険率で有意であり (Odds ratio 3.60, 95% CI 0.45-6.50)、本変異を有するとPD発病の危険が低くなるという結果であった。

8-oxo-dGTPase及び8-oxo-dGへの免疫染色の検討結果は、PDで大部分の黒質メラニン含有神経細胞が陽性であったのに対し、対照では10%以下の細胞が陽性であった。8-oxo-dGに対する免疫染色では、核は染色されず、細胞質が染色されたことから、主にミトコンドリアDNAが酸化的障害を被っていると考えられた。多系統萎縮症剖検脳では、8-oxo-dGTPase及び8-oxo-dG免疫染色の増加は認められなかった。これらの結果は、Western blottingでも確認した。

Bcl-2に対する免疫染色では、細胞質が陽性に染まり、陽性細胞の平均値は、PD59.7%、対照61.7%と有意差はなかった。Bcl-xLに対する免疫染色でも、細胞質が陽性に染まり、陽性細胞数は、PD22.5%、対照46.0%とPDで有意に低かった。Baxに対する免疫染色では、やはり細胞質が陽性に染まり、陽性細胞はPD92.5%、対照90.5%と有意差はなかった。Bcl-xLとBaxは一部の神経細胞では、核膜にも発現が見られた。一方進行性核上性麻痺剖検例では対照と全く有意差はなく、PDとの相異が観察された。

D. 考察

ミトコンドリア電子伝達系複合体Iの24kDaサブユニットは、鉄硫黄クラスターを1個もち電子伝達に重要なサブユニットのひとつである。今回検討した遺伝子多型は、シトコンドリアへの24kDaサブユニットの輸送に関するシグナルペプチドの部分にあり、Ala->Valの変異によりその付近の蛋白の二次構造がアルファヘリックスからベータシートに変わることが予想され、前駆体蛋白がミトコンドリアに

入ってから受けるプロセッシングの効率が低下すると予想される (Hattori et al., 1998). パーキンソン病にて複合体 I が低下していることを考慮に入れると、この遺伝子多型は大変興味ある多型である。今回の検討で、PDにおいては、変異型多型のホモ接合体の患者が対照に比して有意に高く、パーキンソン病のミトコンドリア障害とも矛盾しないデータで、本遺伝子多型はパーキンソン病に罹患する遺伝的危険因子を構成する可能性の高い多型であると考えられる。

一方KGDHCE2遺伝子多型も変異型の頻度がPDにて有意に高かったが、これはアミノ酸置換を伴わない変異であり、これ自体が危険因子というより、この遺伝子の近傍に別の危険因子となる遺伝子多型が存在するのではないかと推定される。

Parkin遺伝子の多型解析では、3つの多型のうち、1つだけがPDと対照で異なった頻度を示したが、むしろPDにて変異の頻度が低い結果であり、この点を額面通り解釈すれば、この変異は危険因子の逆で、神経細胞保護因子、或いはパーキンソン病発病に対する保護因子ということになる。しかし、この変異の頻度自体が低いものであったため、その意義については引き続き検討が必要である。

次に、8-oxo-dGTPase及び8-oxo-dGを解析した。8-oxo-dGは、deoxyguanineの8位の炭素がhydroxyl radical(\cdot OH)の攻撃を受けて生じるもので、DNAに対する酸化的侵襲のよい指標である。8-oxo-dGは、DNAの複製の際、adenineと読まれ、guanine-cytosineのペアからadenine-thymineのペアに突然変異を起こす可能性がある。8-oxo-dGの起源はDNA strand上のものとdNTPプールにある8-oxo-dGTPがある。8-oxo-dGTPaseは、8-oxo-dGTPを取り除く作用をしている。本酵素発現の上昇は、8-oxo-dGTP生成が亢進し、それに対する反応性上昇と解釈される。今回PDでは全例大部分の黒質細胞で8-oxo-dGTPase及び8-oxo-dGの免疫染色が亢進しており、DNAに対する酸化的障害が亢進していることが示された。更に興味ある点は、8-oxo-dGは核内には免疫染色は確認されず、細胞質に認められた。このことはミトコンドリアDNAの酸化的障害が亢進していることを示し、PDにおけるミトコンドリア障害とよく一致する所見である。PDにおける神経細胞死の機序としてアポトーシスによる神経細胞死が現在有力視されているが、ミトコンドリアにおける酸化的ストレスがアポトーシス誘導の

強力なシグナルであることを考えると、8-oxo-dGTPの細胞質における上昇は大変興味深く、アポトーシスによる神経細胞死を示唆する所見と考えられる。

PDにおけるアポトーシスに関しては、以前我々のグループは、PD黒質においてTANEL陽性細胞がわずかではあるが観察され、アポトーシスによる神経細胞死の可能性を示唆してきたが、今回更にアポトーシス関連蛋白であるBcl-2, Bcl-xl, Baxの発現をPD黒質において検討した。Bcl-2, Bcl-xlはミトコンドリア膜に発現していてアポトーシスを抑制する重要な蛋白である。Baxは逆にアポトーシスを誘導する。PDにおけるBcl-2, Baxの発現量には対照に比較して有意差はなかったが、Bcl-xLについては、PDで発現量の低下を認めた。Bcl-xLは、Bcl-2に似た作用を持つBclファミリーの蛋白であるが、中枢神経系ではBcl-2よりも重要と云われる。Bcl-xLの発現量低下の機序は、今後つめねばならない問題であるが、単なる変性に二次的変化でないことは、Bcl-2, Baxの発現量に差がないことを見れば明らかである。Bcl-xLの低発現は、PDにおける黒質神経細胞がアポトーシスに陥りやすいことを支持する所見と考えられる。アポトーシス同時に検索したPSPにはこのような変化は見られず、PDにおける神経細胞死の機序には、特有のものがあると思われる。

E. 結論

以上、パーキンソン病罹患に関する危険因子としてミトコンドリア電子伝達系複合体 I の構成成分である24kDaサブユニット遺伝子及びKGDHCE2遺伝子多型が危険因子を構成する可能性を示し、更にParkin遺伝子の多型の1つは逆に保護因子となる可能性を示した。またパーキンソン病における黒質の変性機序に関し、細胞質における酸化的ストレスの存在、アポトーシス抑制蛋白であるBcl-xlの低下を示し、これら両者があいまってアポトーシス誘導のシグナルとなる可能性を示した。以上の結果より、今後、パーキンソン病発症機序の解明並びに黒質変性機構の解析には、パーキンソン病患者黒質におけるアポトーシス関連蛋白の発現レベルの解析、それらの遺伝子の遺伝子多型の解析が重要であると考えられ、今後の2年間の研究でこれらを精力的に推進する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Goto K, Sugita Y, Mori H, Hatano T, Kato E, Ohta S, Mizuno Y (1999) An immunohistochemical study on Bcl-xL, Bcl-2, and Bax expression in Parkinson's disease. *Neurology*, (submitted)
- Hattori N, Yoshino H, Tanaka M, Suzuki H, Mizuno Y (1998a) Allele in the 24-kDa subunit gene (NDUFV2) of mitochondrial complex I and susceptibility to Parkinson's disease. *Genomics*, 49:52-58
- Hattori N, Matsumine H, Kitada T, Asakawa S, Yamamura Y, Kobayashi T, Yokochi M, Yoshino H, Wang M, Kondo T, Kuzuhara S, Nakamura S, Shimizu N, Mizuno Y (1998b) Molecular analysis of a novel ubiquitin-like protein (PARKIN) gene in Japanese families with AR-JP: evidence of homozygous deletions in the PARKIN gene in affected individuals. *Ann Neurol* 44:935-941
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392: 605-608
- Kobayashi T, Matsumine H, Matsubayashi S, Matuda S, Mizuno Y (1998) Polymorphism of the gene encoding dihydrolipoamide succinyltransferase, a subunit of α -ketoglutarate dehydrogenase complex, is associated with the susceptibility to Parkinson disease: a population based study. *Ann Neurol*, 43:120-123
- Matsumine H, Yamamura Y, Kobayashi T, Nakamura S, Kuzuhara S, Mizuno Y (1998) Early-onset parkinsonism with diurnal fluctuation maps to a locus for juvenile parkinsonism. *Neurology*, 50:1340-1345
- Mizuno Y, Hattori N, Matsumine H (1998) Neurochemical and neurogenetic correlates of Parkinson's disease. *J Neurochem*, 71: 893-902
- Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S, Hattori N, Kobayashi T, Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kondo T (1998) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 44:S99-S109
- Mori H, Kondo T, Yokochi M, Matsumine H, Nakagawa-Hattori Y, Miyake T, Suda K, Mizuno Y (1998) Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology*, 51:890-892
- Morikawa N, Naoi M, Maruyama W, Ohta S, Kotake Y, Kawai H, Niwa T, Dostert P, Mizuno Y (1998) Effects of various tetrahydroisoquinoline derivatives on mitochondrial respiration and the electron transfer complexes. *J Neural Transm*, 105:677-688
- Shimura H, Hattori N, Donchon K, Nakabeppu Y, Mizuno Y (1999) Increase of 8-oxo-dGTPase (*hMTH1*) in Nigrostriatum of Parkinsonian Brain. *Neurology*, (submitted)
- Urabe T, Hattori N, Yoshikawa M, Yoshino H, Uchida K, Mizuno Y (1998) Colocalization of Bcl-2 and 4-hydroxynonenal modified proteins in microglial cells and neurons of rat brain following transient focal ischemia. *Neurosci Lett*, 247:159-162
- Wang M, Hattori N, Kobayashi T, Yoshino H, Morioka A, Kitada T, Asakawa S, Shimizu N, Mizuno Y (1999) Polymorphism in the parkin gene among sporadic Parkinson's disease. *Ann Neurol*, (in press)

2. 学会発表

- Hattori N. Genetic predisposition in sporadic Parkinson's disease. 1st International Meeting on single nucleotide polymorphism and complex genome analysis, Skokloster, Sweden, Aug 29-Sept 1, 1998
- Hattori N, Kitada T, Asakawa S, Matsumine H, Yamamura Y, Yokochi M, Yoshino H, Kobayashi T, Elibol B, Kuzuhara S, Nakamura S, Shimizu N, Mizuno Y. Molecular genetic analysis of a novel parkin gene in Japanese families with AR-JP: evidence for variable homozygous deletions in the parkin gene in affected individuals. Fifth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, New York, Oct 10-14, 1998
- Hattori N. Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with ARJP. Evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. 123rd Annual Meeting American Neurological Association,

- Montreal, Canada, Oct 20, 1998
- Hattori N, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Yamamura Y, Yoshino H, Kobayashi T, Yokochi M, Wang M, Yoritaka A, Kondo M, Kuzuhara S, Nakamura S, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y. Molecular analysis of a novel parkin gene in Japanese families with AR-JP, The Thirteenth Rinshoken International Conference Ubiquitin and Proteasome A New World of Proteolysis, Nov 25-27, 1998
- Hattori T, Hattori Y, Mizuno Y. Mechanism of neuronal cell death induced by mitochondrial respiration inhibitors. Fifth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, New York, Oct 10-14, 1998
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Yoritaka A, Shimizu N, Mizuno Y, Elibol B. Positional cloning of the autosomal recessive juvenile parkinsonism gene. 123rd Annual meeting of the American Neurological Association, Montreal, Oct 18-21, 1998
- Kitada T. Positional cloning of the autosomal recessive early-onset Parkinsonism with diurnal fluctuation (AR-EP) gene: its diversity in deletion mutations. Third International Symposium on the Treatment of Parkinson's Disease, Kyoto, Oct 31-Nov 1, 1998
- Kobayashi H, Hattori N, Yoshino H, Brookes AJ, Mizuno Y. Analysis of genetic predisposition in Parkinson's disease: polymorphism of mitochondrial and nuclear DNAs. 1st International Meeting on Single Nucleotide Polymorphism and Complex Genome Analysis, Skokloster, Sweden, Aug 29-Sep1, 1998
- Kondo T, Sugita Y, Mizutani Y, Yokochi M, Hattori N, Mori H, Mizuno Y. Tyrosine hydroxylase (TH) activity in the nigrostriatal system of patients with Lewy body-negative parkinsonism (LBNP). Fifth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, New York, Oct 10-14, 1998
- Kondo T, Sugita Y, Mizutani Y, Yokochi M, Hattori N, Mori H, Mizuno Y. Tyrosine hydroxylase (TH) activity in the substantia nigra (SN) and striatum of the Patients with Lewy body-negative parkinsonism (LBNP). Society for Neuroscience 28th Annual Meeting, Los Angeles, Nov 7-12, 1998
- Kubo S, Hattori N, Yoshino H, Shimua H, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Shimizu N, Mizuno Y. Subcellular localization of the parkin using GFP fusion protein. Fifth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, New York, Oct 10-14, 1998
- Miwa H, Nishi K, Fuwa T, Mizuno Y. Haloperido-induced dystonic posturing in rats with unilateral globus pallidus lesions: and immunohistochemical study using c-Fos. Fifth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, New York, Oct 10-14, 1998
- Mizuno Y. Genetic aspects of Parkinson's Disease. The 10th Rappaport Symposium Understanding Parkinson's Disease, Sichron Yaakov, Israel, May 10-13, 1998
- Mizuno Y. Genetics of Parkinson's disease. 4th APSN Biennial Meeting, Seoul, Korea, June 24-26, 1998
- Mizuno Y, Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Shimizu N. The Juvenile parkinson disease gene and its phenotype. Fifth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, New York, Oct 10-14, 1998
- Mizuno Y, Kitada T, Hattori N, Matsumine H, Asakawa S, Minoshima S, Yamamura Y, Shimizu N. Familial Parkinson's Disease. Japan-Canada Neuroscience Symposium on Neurogenes "Functional Genomics of Neurodegeneration", Tokyo, Nov 18-19, 1998
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Shimizu N, Mizuno Y. Parkin gene responsible for AR-JP is targeted to Golgi complex: subcellular localization of Parkin protein. The 13th Rinshoken International Conference, Tokyo, Nov 25-27, 1998
- Sugita Y, Goto K, Mori H, Kondo T, Ota S, Mizuno Y. A immunohistochemical study of Bax and Caspase-3 (CPP32) expression in Parkinson's disease. Society for Neuroscience 28th annual meeting. Los Angeles, November 7-13, 1998

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

神経変性に対する免疫抑制薬の保護修復作用に関する研究

分担研究者 小川 紀雄

岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門 教授

研究要旨

ドパミン（DA）神経由来 B65 細胞株での神経毒 6-OHDA 暴露による神経細胞死評価系を確立した。この系を用いて免疫抑制薬 FK506 の効果を予備検討したところ、FK506 は 6-OHDA 暴露による神経細胞死を抑制することを見出した。一方、免疫抑制薬 CsA は、脳内 DA 神経系の異常が報告されているジスキネジアラットにおいて、転写因子（TRE, CRE）結合活性、DA 含量、D1 レセプター mRNA を高めることにより DA 系神経機構の機能亢進作用を示すことを明らかにし、DA 神経修復に応用できる可能性を示した。正常ラットではこのような現象は見られず、病態モデルを用いてはじめてこのような作用を検出できた。また、海馬ムスカリン性レセプター結合能の晩発性低下に対する CsA の保護効果が免疫抑制作用とは別の機序による可能性を明らかにした。

A. 研究目的

パーキンソン病は、老人に多発する運動障害を主体とする神経疾患である。現在は対症療法としての L-DOPA 内服療法が行なわれているが、病気の進行は抑えられず、さらに、L-DOPA の長期治療下では薬物効果不安定、不随意運動、幻覚・妄想等の副作用が発現する。このため、L-DOPA 療法に代わる根本的な治療法を開発することは、高齢化社会を迎えた我が国にとって、緊急かつ重要な課題である。そこで、本研究ではイムノフィリン結合性免疫抑制薬に着目して、その神経細胞保護効果を検討することとした。

すでに我々はイムノフィリン結合性免疫抑制薬 cyclosporin A (CsA) が様々な病態モデルにおいて神経変性を阻止することを報告してきた。ことに、神経毒 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA) によるドパミン (DA) 神経傷害を CsA が阻止することを報告したが、さらに最近、CsA が単に神経保護作用ばかりでなく、神経修復作用も有することも見

出した。加えて、これらの CsA の作用は CsA の免疫抑制作用ではなく、これまで知られていない未知の作用機序である可能性も想定されるようになってきている。一方外国では、免疫抑制薬が培養細胞系で神経栄養因子活性を示すことが報告され、また、免疫抑制作用を持たない免疫抑制薬のアナログにも同様の作用のあることが最近報告された。そこで免疫抑制薬 CsA および tacrolimus (FK506) が示す神経細胞保護効果の作用機序を明らかにする目的で、1) DA 神経由来 B65 細胞株と 2) in vivo 病態モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

1. B65 細胞株を用いた 6-OHDA 暴露による神経細胞死評価系の確立と FK506 の効果の予備検討

(1) DA 神経由来 B65 細胞株を用いた 6-OHDA 暴露による神経細胞死評価系の確立：10%FBS-DMEM 培地の入った 96 well プレートに 5,000 cell/well となるように細

胞をまき、37°C、5%CO₂-95% air の条件下で2日間培養した。薬剤処置は6-OHDA (最終濃度: 1, 3, 10, 30, 100, 300 μM) を添加して、24時間後にWST-1 assayにより細胞生存率を調べた。なお、各々の薬剤溶液は細胞培養液に添加し、その後に培地の交換は行っていない。WST-1 assayは1wellあたりWST-1を10μl添加し、CO₂ incubator内で35分間呈色反応を行い、0.5N HClで反応を停止させた。その後、速やかに450nmで吸光度を測定した。

(2) 6-OHDAによる細胞傷害に対するFK506の効果の予備検討

細胞を6,000 cell/wellになるようプレートにまき、約24時間後にFK506(最終濃度: 30, 100, 300nM)を培地に加えた。培養42時間後に6-OHDA(最終濃度: 25, 50, 100 μM)を添加し、その24時間後の生存率をWST-1 assayにより測定した。

2. 神経毒誘発ジスキネジアラットにおけるCsAの効果とその作用機序

7週齢雄性SD系ラットiminodipropionitrile (IDPN; 100 mg/kg)を1日1回、7日間腹腔内投与した。CsA (5 mg/kg)は毎回のIDPN投与の1時間前に皮下投与した。IDPNおよびCsAの対照としてそれぞれsaline (S), vehicle (V)を投与した。最終投与3週後にhead twitchingの頻度・重症度を観察した後に、断頭屠殺し脳組織から核抽出液を調製し、CREおよびTREを含む[α-³²P]dCTP標識2本鎖DNA probeと反応させるelectrophoretic mobility shift assay (EMSA)にてAP-1, CREBのDNA結合活性を解析した。また、dopamine-D1, D2-R, cyclophilin (CyP) mRNAはそれぞれに相補的な配列を有する[³²P]標識 oligoprobeを用いたNorthern blot analysisで解析した。DAと代謝産物はHPLCで定量した。

3. 海馬ムスカリン性レセプター結合能

を指標としたCsAの効果

7週齢雄性砂ネズミ(60-70g)を用いエーテル麻酔下で両側総頸動脈を露出し、覚醒後に動脈瘤クリップで5分間閉塞し再開通させた(虚血群)。また、両側総頸動脈閉塞を除き虚血群と同じ条件で行なったものを偽手術群とした。薬物投与はCsA (5 mg/kg)かvehicleを偽手術群、虚血群ともに、それぞれ手術直後、2時間後、6時間後の3回、皮下投与で行なった。何れの群も虚血再灌流14日後の時点でムスカリン性レセプター結合能と組織学的観察を行ない、CsAの効果の評価した。ムスカリン性レセプター結合能は[³H]-QNBによるラジオレセプターアッセイにて定量した。一方、組織学的観察はクレシルバイオレット染色とGFAP免疫染色を用いて行なった。

C. 研究結果

1. B65細胞株を用いた6-OHDA暴露による神経細胞死評価系の確立とFK506の効果の予備検討

B65細胞での6-OHDA添加後の細胞生存率は、濃度依存的に低下し、IC₅₀は約40μMであった。B65細胞における6-OHDA毒性に対するFK506の効果について検討した。細胞をFK506含有培地で培養した後、6-OHDAを添加した場合、6-OHDAによる細

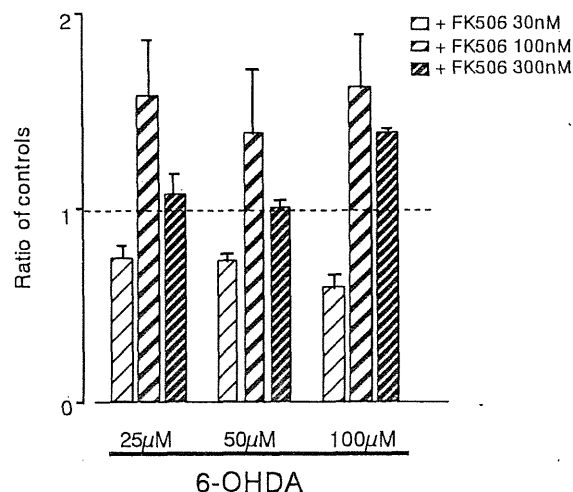


図1 B65細胞株を用いた6-OHDA暴露に対するFK506の保護効果

胞毒性は 30nM では防げなかったものの、100nM および 300nM では顕著に改善した (図 1)。特に 100nM FK506 で前処置した場合は 6-OHDA 毒性に対する保護効果だけでなく、神経栄養因子活性とも考えられる効果が認められた (図 1)。

2. 神経毒誘発ジスキネジアラットにおける CsA の効果とその作用機序

IDPN 誘発頸部ジスキネジア (head twitching) は CsA の同時投与により発現時期が早まり、頻度は 45.67 ± 1.96 No./min から 90.33 ± 8.52 No./min と 2 倍に増悪し重症化した。4 群のラットの各脳部位における DA とその代謝産物の濃度を表 1 にまとめる。vehicle+IDPN (VI) 群における線条体と側坐核の DA と 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) の濃度は V+saline (VS) 群に比較してやや減少していた。CsA 単独投与 (CsS 群) では DA と DOPAC のレベルには変化がみられなかったが、CsA と IDPN の両者を投与された群 (CsI 群) の線条体、側坐核、前頭皮質の DA 含量は IDPN 単独群

(VI 群) の値に比べて有意に高値を示した。DOPAC も VI 群に比べて CsI 群の線条体において明らかに増加していた。このように、各 IDPN 注射の前に CsA を反復投与すると、DA および DOPAC レベルは回復あるいはやや増加した。homovanillic acid (HVA) 濃度はどの実験群においても何ら変化を示さなかった (表 1)。

AP-1 の TRE 結合活性は IDPN 単独投与群の側坐核、海馬において増加したが、線条体では逆に減少した (図 2)。これに対して、IDPN と CsA を連日投与した群では側坐核、線条体の TRE 結合活性が IDPN 単独投与群に比して有意に増加していた。他の部位においてもこの CsA による増加傾向は認められた。CsA 単独投与群では TRE 結合活性は前頭皮質、海馬で増加した。CREB の CRE 結合活性も TRE 結合活性と同様の变化を呈した。IDPN 投与により主に前頭皮質、側坐核で増加し、線条体で減少した。また、すべての部位で IDPN+CsA 投与により CRE 結合活性は IDPN 群よりも増加した (図 2)。

表 1 ドパミンとその代謝産物の濃度に及ぼす CsA と IDPN の単独並びに併用投与の効果

	DA (ng/mg protein)	DOPAC (ng/mg protein)	HVA (ng/mg protein)
Striatum			
Vehicle+saline (VS)	40.99 ± 1.24^b	10.57 ± 0.21	6.94 ± 0.23
Vehicle+IDPN (VI)	$31.96 \pm 1.06^{a,c}$	9.84 ± 0.61	7.59 ± 0.36
CsA+saline (CsS)	41.69 ± 1.58^b	10.60 ± 0.47	6.73 ± 0.35
CsA+IDPN (CsI)	$49.45 \pm 2.61^{a,b,c}$	12.23 ± 0.94^b	7.39 ± 0.62
Nucleus accumbens			
Vehicle+saline (VS)	13.12 ± 1.31	1.79 ± 0.11	1.35 ± 0.11
Vehicle+IDPN (VI)	12.07 ± 0.67	1.54 ± 0.09	1.06 ± 0.07
CsA+saline (CsS)	13.92 ± 0.72	1.84 ± 0.10	1.10 ± 0.08
CsA+IDPN (CsI)	14.94 ± 0.54^b	1.99 ± 0.13^b	1.09 ± 0.12
Frontal cortex			
Vehicle+saline (VS)	8.54 ± 0.28	2.02 ± 0.16	1.40 ± 0.06
Vehicle+IDPN (VI)	7.56 ± 0.54	1.86 ± 0.15	1.44 ± 0.08
CsA+saline (CsS)	9.58 ± 0.59	2.05 ± 0.14	1.26 ± 0.10
CsA+IDPN (CsI)	$10.92 \pm 0.71^{a,b}$	2.18 ± 0.18	1.39 ± 0.17
Hippocampus			
Vehicle+saline (VS)	1.13 ± 0.11	0.64 ± 0.19	1.62 ± 0.17
Vehicle+IDPN (VI)	1.30 ± 0.11	0.67 ± 0.18	1.90 ± 0.18
CsA+saline (CsS)	1.19 ± 0.12	0.61 ± 0.09	1.38 ± 0.23
CsA+IDPN (CsI)	1.24 ± 0.12	0.59 ± 0.15	1.51 ± 0.58

DA, DOPAC and HVA levels were measured 21 days after the cessation of repeated CsA and/or IDPN injection. Data are the mean \pm S.E.M. for 6 rats.

^a $P < 0.05$ vs. VS; ^b $P < 0.05$ vs. VI; ^c $P < 0.05$ vs. CsS.

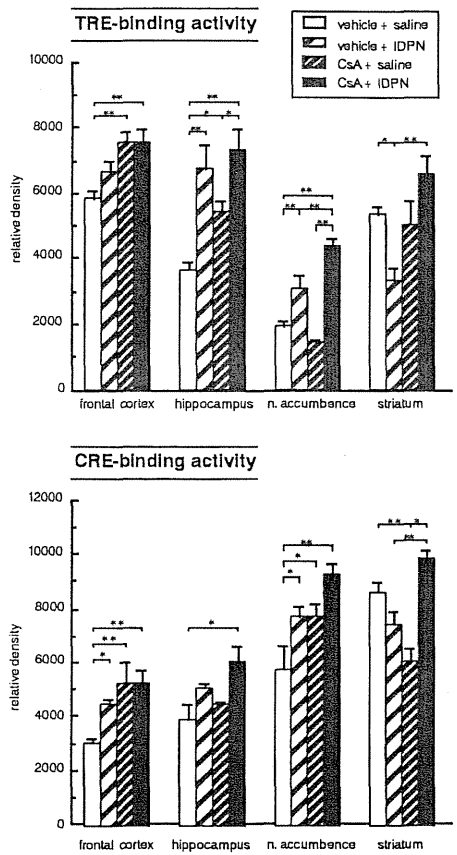


図2 IDPN誘発ジスキネジアラットにおけるCsA投与の脳内TRF, GRF結合活性への影響
*P < 0.05, **P < 0.01

一方、線条体の D1-R mRNA は、AP-1, CREB の DNA 結合活性と同様に IDPN 単独投与群で有意に減少し、IDPN+CsA 投与により対照群レベルにまで増加する傾向が認められた。また、CsA のみの連日投与により有意に減少した (図3)。線条体の D2-R, 側坐核の D1-R mRNA には各群間で有意な変化は認められなかった。さらに、線条体の CyP mRNA は IDPN の投与により著明に減少していたが、CsA の同時投与により増加する傾向がみられた。CsA のみを連投した場合にも対照群に比して有意に減少した (図3)。

3. 海馬ムスカリン性レセプター結合能を指標とした CsA の効果

海馬におけるムスカリン性レセプター結合能 (Bmax) は虚血再灌流 14 日後の時点で偽手術群に比べ虚血群では有意に低下する。CsA を投与すると、虚血によるムスカリン性レセプター結合能の晩発性低下を有意に抑制した。CsA が示したこの効果は偽手術群では

認められなかった。一方、組織学的観察ではクレシルバイオレット染色, GFAP 免疫染色ともに虚血による傷害に対する CsA の保護効果は認められなかった。

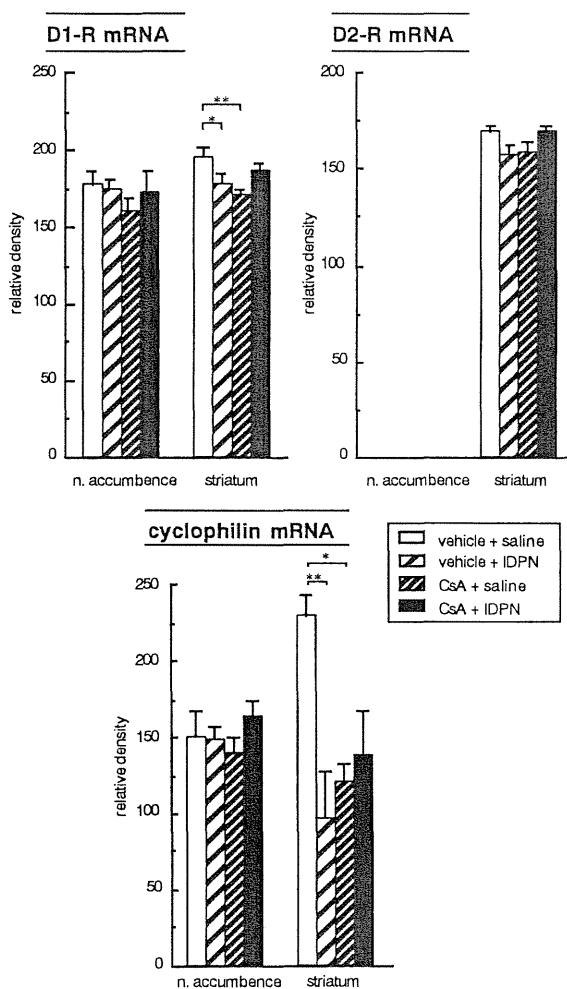


図3 IDPN/CsA投与による側坐核, 線条体でのD1-RD2-RCyP mRNAの変化
*P < 0.05, **P < 0.01

D. 考察

神経細胞の初代培養系ばかりでなく、B65細胞株でも6-OHDA暴露による神経細胞死が用量依存的に認められることが今回明らかとなった。また、FK506が6-OHDA暴露による神経細胞死に対し保護効果を示したことから、免疫抑制薬は少なくとも現象的には酸化ストレスに対する拮抗作用を有する可能性が示唆された。免疫抑制薬が直接フリーラジカル消去・抗酸化作用を持つのか、あるいはアポトーシス等の細胞死への過程を抑制するのかの検討が次の課題である。