

ジスキネジアモデルの線条体 DA 値は IDPN 単独投与によって減少したが, CsA と IDPN の両者の投与はこの部位における DA のレベルを正常値以上まで増加させた. これはラットのチロシンヒドロキシラーゼ (TH) の 5' 側上流域には TRE と CRE が存在するので, CsA+IDPN 投与群の脳基底核における DA 値の増加は, TRE および CRE 結合活性の増加による TH 遺伝子の転写亢進が一部関与していると思われる. このような IDPN 誘発諸種変化に及ぼす CsA の効果は, CsA が直接脳内へ移行することによってもたらされる可能性,あるいは血液-脳関門を通過する末梢サイトカインを変化させることによる可能性などが考えられる.

一方,一過性脳虚血モデル動物では CsA (4 mg/kg) を 10 日間連投すると海馬における GFAP 陽性グリア細胞の発現を顕著に抑制するとともに,ムスカリン性レセプターの晩発性低下が阻止されることを我々はすでに報告した. 今回の結果では, CsA の投与は初期だけでよく,必ずしも連日投与の必要はなかった. このことは, CsA の持つ免疫抑制作用とは別の機序によって海馬ムスカリン性レセプターの晩発性低下に対する改善効果がもたらされていることを示唆する.

E. 結論

ジスキネジアのモデル動物を用いることによって, CsA は AP-1, CREB の TRE, CRE 結合を活性化し, それによって TH mRNA や D1-R mRNA などシナプス前およびシナプス後の機構を活性化することにより, DA 神経機能の亢進をもたらすことを明らかにした. これらの変化が CsA の免疫抑制作用に関連しているか否かについてはまだ明らかでなく, 今後明らかにされなければならない課題である. 最近, CsA や FK506 の類似体で免疫抑制作用を持たない物質が神経栄養因子活性を

もつことが報告された. このことと今回の初期 CsA 投与の海馬ムスカリン性レセプター結合能に対する効果とを考え併せると, CsA のもつ神経保護効果は免疫抑制作用とは別の機序による可能性が示唆される.

一方, 免疫抑制薬 FK506 についても CsA と同様な神経細胞保護効果を有する可能性を明らかにした. これら免疫抑制薬の神経保護修復作用にアポトーシス抑制薬が促進効果を示すか否かを次年度に検討する予定である.

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Iida, K., Iwata, E., Asanuma, M., Asanuma, S.N., Gómez-Vargas, M., Miyazaki, I., Nakanishi, T. and Ogawa, N.: Effects of repeated cyclosporin A administration on iminodipropionitrile-induced dyskinesia and TRE-/CRE-binding activities in rat brain, *Neurosci. Res.*, 30: 185-193, 1998.
- ② Gómez-Vargas, M., Nishibayashi-Asanuma, S., Asanuma, M., Kondo, Y., Iwata, E. and Ogawa, N.: Pergolide scavenges both hydroxyl and nitric oxide free radicals in vitro and inhibits lipid peroxidation in different regions of the rat brain, *Brain Res.*, 790: 202-208, 1998.
- ③ Aoki, C., Nakanishi, T., Sogawa, N., Ishii, K., Ogawa, N., Takigawa, M. and Furuta, H.: Stimulatory effects of 4-methylcatechol, dopamine and levodopa on the expression of metallothionein-III (GIF) mRNA in immortalized mouse brain glial cells (VR-2g), *Brain Res.*, 792: 335-339, 1998.

- ④ Iwata, E., Miyazaki, I., Asanuma, M., Iida, A. and Ogawa N.: Protective effects of nicergoline against hydrogen peroxide toxicity in neuronal cell line, *Neurosci. Lett.*, 251: 49-52, 1998.
- ⑤ Ogawa, N.: Early introduction of dopamine agonists in the long-term treatment of Parkinson's disease, *Neurology*, 51 (suppl. 2) : S13-S20, 1998.
- ⑥ Kondo, Y., Asanuma M., Iwata, E., Kondo, F., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Early treatment with cyclosporin A ameliorates the reduction of muscarinic acetylcholine receptors in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia, *Neurochem. Res.*, 24: 9-13, 1999.
- ⑦ Iwata-Ichikawa, E., Kondo, Y., Miyazaki, I. Asanuma, M. and Ogawa, N.: Glial cells protect neuronal cells against oxidative stress via transcriptional up-regulation of the glutathione system, *J. Neurochem.*, in press.
- ③ 小川紀雄: パーキンソン病における神経保護・修復療法の可能性, 日本薬学会第9回高次脳機能障害シンポジウム, 1998.
- ④ 宮崎育子, 十川千春, 中西 徹, 加太英明, 岩田恵美, 近藤洋一, 浅沼幹人, 飯田基之, 小川紀雄: hemi-parkinsonism モデルラットの基底核における MT-III mRNA 発現と levodopa による誘導調節, 第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会, 1998.
- ⑤ 岩田恵美, 宮崎育子, 小川紀雄: 酸化ストレスに対するグリア細胞の抗酸化防御機能亢進および神経細胞保護効果, 第21回日本神経科学・第41回日本神経化学合同大会, 1998.
- ⑥ 加太英明, 横井 功, 山本二平, 小川紀雄: ラット腹腔内 lipopolysaccharide 投与による血中 NO 生産, 脳内モノアミン代謝促進に及ぼす抗酸化剤 EPC-k1 の作用, 第71回日本生化学会大会, 1998.

研究協力者

田中健一 (岡山大学医学部神経情報学部門 助手)
浅沼幹人 (岡山大学医学部神経情報学部門 助手)

2. 学会発表

- ① Ogawa, N.: Recent advances in possible neuroprotective and neurorestorative therapies for Parkinson's disease, II International Congress of Pathophysiology, 1998.
- ② Iwata, E., Asanuma, M., Kondo, Y., Miyazaki, I. and Ogawa, M.: Transcriptional response to oxidative stress in cultured neuronal and glial cells, III International Congress of Pathophysiology, 1998.

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
分担研究者 久野 貞子 国立療養所宇多野病院 臨床研究部長

研究要旨 ドーパミン神経細胞死を抑制し、その保護治療に最も有用な神経栄養因子の一つである Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) は、パーキンソン病に酷似した MPTP によるパーキンソン病サルでの卓越した治療効果と細胞保護効果が知られている (1)。しかしその存在が超微量なため蛋白レベルでの脳内分布の検索は不十分であり、脳脊髄液や血中濃度に関する報告も我々の調べ得た限り存在しない。そこで、recombinant GDNF を大腸菌に組み込んで GDNF 蛋白を作り、ウサギに免疫して特異抗体を作製した。この抗体を用いて免疫組織染色により、パーキンソン病モデル作製過程に GDNF 蛋白質の発現が関与しているかを検討したところ、MPTP による黒質神経細胞の障害ではドーパミン神経細胞の減少に先行して、GDNF 蛋白の発現が減少することが判明した (実験 1)。また、高感度 ELISA 測定系を開発し人での血中、脳脊髄液中の蛋白量を測定した。その結果、健常者血中 GDNF 量は 6 歳から 40 歳にかけては比較的高値を示したが、6 歳以下および 60 歳以上では殆どが低値を示した。パーキンソン病患者血中 GDNF 量は、対照として年齢をマッチさせた健常者との間に統計的有意差は見られなかった。Pallidotomy 前後の患者の血中 GDNF 量は、多くの症例で減少傾向を示した。一方、脳脊髄液で比較すると、非パーキンソン病と有意差はなく、また、Pallidotomy、Thalamotomy 術後のレベルとも有意な差は認められなかった (実験 2)。

A. 研究目的

実験 1: MPTP パーキンソン病モデルサル脳黒質の抗 GDNF 陽性細胞および抗 TH 陽性細胞の経時的変化

GDNF 免疫染色陽性細胞は脳内でレンズ核、マイネルト核、大脳皮質など広い範囲で存在しており、黒質中にも免疫染色陽性を示す細胞が多数認められている。MPTP は黒質ドーパミンニューロンを障害し、パーキンソン病モデル動物作製を可能としたが、この MPTP パーキンソン病モデルサルに、GDNF を投与して黒質ドーパミンニューロンが回復することが知られている (Gash DM. et al: Nature 380 (6571): 252-5, 1996 Mar 21)。しかし、黒質には多数の GDNF 陽性細胞が存在しており、これらが MPTP 投与による黒質ドーパミンニューロンの変性にどのように関与しているかは不明である。黒質の GDNF 陽性細胞の状態は、MPTP パーキンソン病モデルに限らずパーキンソン病の発症や進

行にも影響を及ぼしている可能性が考えられ、パーキンソン病発症や進行のメカニズムを理解する上で重要な因子と考える。今回、我々はサルに MPTP を静脈内投与し、黒質ドーパミンニューロンの変化と GDNF 陽性細胞の変化を経時的に調べ、黒質ドーパミンニューロン死に対する GDNF の関与の有無を検討した。

実験 2: GDNF の高感度 ELISA 法の確立とパーキンソン病患者血中および脳脊髄液中の GDNF 量に関する研究

GDNF は 1993 年 Lin らによりラットグリア細胞株 B49 の培養上清中から胎児の中脳細胞におけるドーパミンの取り込みを増強する神経栄養因子として発見精製された。GDNF はラット胎児中脳初代培養細胞の TH 陽性細胞に対して、高い生存率と神経突起の伸長効果を有することから、当初はドーパミン作動性ニューロンに比較的特異的な栄養因子と推定されていた。しか

しその後、ドーパミン作動性ニューロンだけでなく、初代培養において非常に広範な神経細胞の生存を高めることが明らかになった。現在、GDNFはその生物活性により、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患に対する治療薬としての期待がもたれており、すでに臨床応用への取り組みも始まっているが、いまだヒト血中や脳脊髄液中のGDNF蛋白の存在量やその意義については不明である。今回、我々はGDNFの特異抗体をリコンビナントおよび部分ペプチドを用いて作製し、これを利用して高感度ELISA測定系を開発した。これを用いて健常者およびパーキンソン病患者血中のGDNF量を測定し、健常者との比較検討を行った。また、パーキンソン病患者淡蒼球術(Pallidotomy)施行前後における血中GDNF量を、さらに、一部の症例については脳脊髄液中のGDNF量を測定し、他の神経疾患患者と比較検討した。

B. 研究方法

実験1: MPTP 0.2mg/kg~0.5mg/kgを静脈内投与して6日目、10日目、20日目、96日目、136日目のサル各一頭の脳を2%パラホルムアルデヒドバッファー溶液で固定、電気冷却器付きミクロトームを用いて30 μ mに薄切し、自家作成した抗GDNF抗体(ウサギ)を用いて、ABC法によりFloating法で免疫染色を行った。対照としてMPTP未投与カニクイザルを用いた。黒質のDopamine neuronの状態をみるために抗tyrosine hydroxylase (TH)抗体(モルモット)を用いて同様の方法で免疫染色を行った。抗GDNF抗体による染色と抗TH抗体による染色は隣り合った切片をペアとして用い、出来るだけ同じ部位で比較するようにした。

実験2:(1) 抗体作製法

GDNFの部分ペプチド3種(N末端部、中央部、C末端部に相当する20アミノ酸

残基)を化学合成し、これにヘモシアニンを結合させたものを免疫源としてウサギに免疫してペプチド特異的抗血清を作製した。さらに、ヒト小脳よりRT-PCR法によりGDNF-cDNAを調製し、これをpMalcベクターに組み込み、大腸菌で発現させてリコンビナントGDNFを作製した。これをウサギに免疫し、特異抗血清を得た。さらにこれらの抗血清より、Protein GカラムによりIgG画分を得た。N末ペプチド抗体IgG画分は、検出用抗体として利用するため、ビオチン化した。

(2) GDNFのELISA

リコンビナントGDNF抗体IgG画分を捕捉抗体としてELISA系に使用した。5mg/ml(10mM炭酸バッファーpH9.3)のGDNF IgGをCoastar 96穴EIAプレートに固相化し、次に0.5%BSA、10%ブロッカーを含む上記バッファーでプレートの抗体非結合部をブロック後、検体(血清・血漿は100ml、リコールは10倍濃縮後の100ml)または、スタンダード溶液100mlを入れ、室温、1時間反応させた。洗浄後、ビオチン化GDNF N末ペプチド抗体(50ng/ml)100mlを加え、室温、1時間反応させた。洗浄後、ストレプトアビジンHRP 100mlを加え、室温、1時間反応させた。次に洗浄後、HRP基質(TMB)100mlを加え、約10~20分反応後、1Mリン酸にて反応をストップし、EIAリーダーにて測定波長450nm、対照波長620nmで測定した。

(3) 対象

パーキンソン病患者35例より血清、あるいは血漿を得た。さらに一部の患者より脳脊髄液を得た。またpallidotomy前、中、後の血漿または脳脊髄液を採取した。コントロールとして健常者75例より血漿を得た。

C. 研究結果

実験1: 抗GDNF、抗TH抗体いずれもMPTP未投与対照サル脳では黒質で陽性の

細胞が多数認められた。投与 6 日目サル脳黒質でも対照に比較してほとんど差のない数の抗 GDNF 抗体、抗 TH 抗体陽性細胞が認められた。投与 10 日目サル脳黒質では抗 TH 抗体陽性細胞は多数認められたが、抗 GDNF 抗体陽性細胞は対照に比べて明らかに減少していた。投与 20 日目サル脳黒質では抗 GDNF 抗体、抗 TH 抗体陽性細胞ともに著明に減少していた。MPTP による黒質神経細胞の障害では Dopamine-neuron の減少に先行して GDNF が減少することが示唆された。

実験 2:

(1) GDNF 蛋白測定用 ELISA 系の確立

ウサギより得た計 12 種の抗血清 (ペプチド 9 種、リコンビナント 3 種) より、IgG 画分を調製し、さらにこれらをビオチン化した。これらの中から最も抗体価が高く、さらに低バックグラウンドを示す組み合わせを選択した。その結果、補足抗体としてリコンビナント GDNF 抗体 No.1 を、また検出用抗体として、N 末ペプチド抗体 No.2 を選択した。図 1 は、GDNF の ELISA 法に基づく標準曲線を示した。測定限界は約 1~2pg/ml であり、1~1000pg/ml の範囲で定量可能であった。他の神経栄養因子 (NGF、BDNF、NT-3、CNTF) とは交叉反応性は 1%以下であった。

(2) 健常者およびパーキンソン病患者血中における GDNF 量

本測定系を用いて、健常者 75 例 (0~89 歳、平均年齢 42 才) の血中 GDNF 値を測定し、各年齢における GDNF 量を検討した (図 2)。○印は男性を、●印は女性を示す。図の如く、健常者の血中 GDNF 量は、男女とも 0~4 才齢では、きわめて低値を示し、その後上昇し、特に女性で著しく高値を示す例が多く認められる。25 才頃より 0 値付近を示すものが次第に多くなり、全体的には加齢に伴って低下する傾向を示した。特徴的なことは、男性に比し若年層の女性で著しく高値を示す例が多数認

められた点である。高齢者では男性、女性ともに 0 値か、または非常に低値を示した。パーキンソン病患者 35 例および年齢のほ

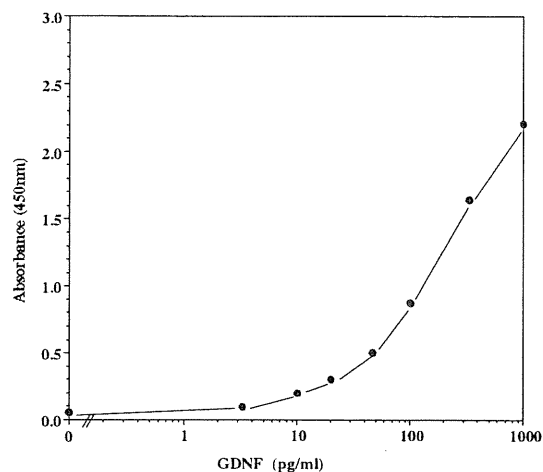


図1. ELISA法によるGDNFのStandard Curve

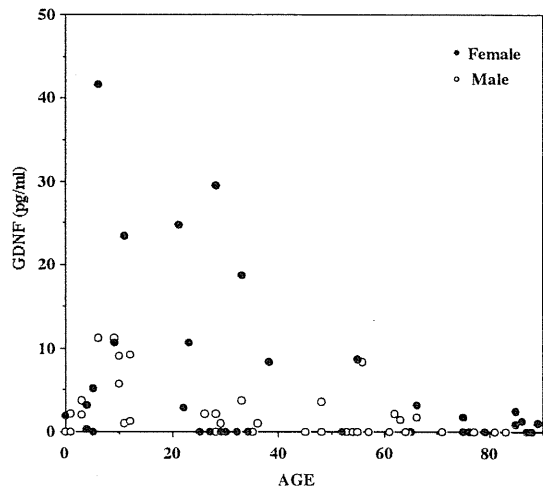


図2. 健常者における血清中のGDNF量と年齢との関係

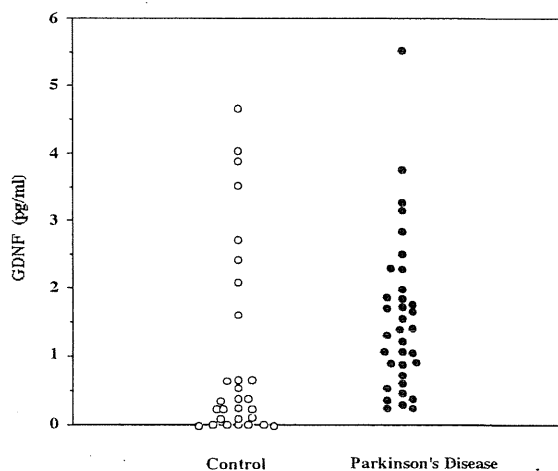


図3. Parkinson病患者血中におけるGDNF量

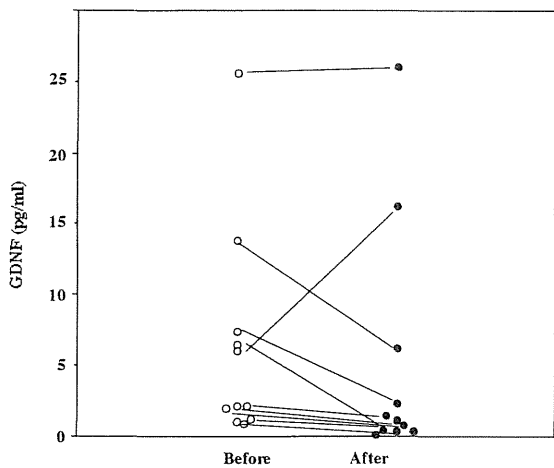


図4. Pallidotomy術前および術後における血中GDNF量の変動

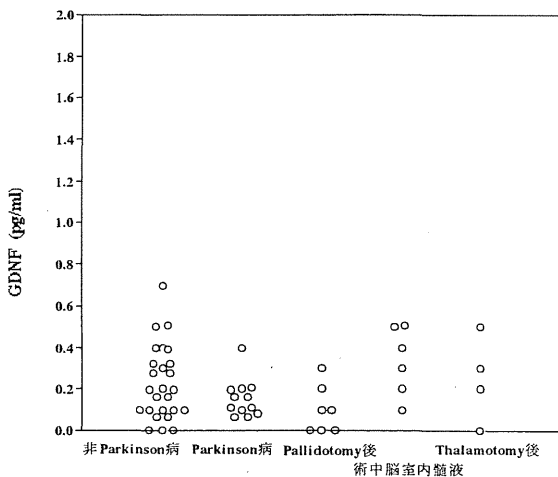


図5. Parkinson病およびその他の神経疾患患者髄液中のGDNF量

ほぼマッチした健常者 29 例の血中 GDNF 値を測定した (図 3)。パーキンソン病患者 35 例の年齢範囲は 45~79 才、平均年齢 63.7 才であり、健常者 29 例では、年齢範囲は 55~85 才、平均年齢 69 才であった。健常対照群の GDNF およびパーキンソン病患者の平均値 +SD は、それぞれ 1.02+1.43pg/ml、1.56+1.14pg/ml であり、パーキンソン病患者で若干高値傾向にあったが、統計的には有意差を示さなかった。

(3) パーキンソン病患者の Pallidotomy 前後における血中 GDNF 量

pallidotomy を行ったパーキンソン病患者 11 人について、術前および術後に採取

した血漿について GDNF 値を測定した (図 4)。図に示す如く、術後 GDNF 量が約 3 倍に増加した 1 例と、変動の見られない 1 例を除き、その他の 9 症例では、術前に比べ術後の GDNF 値は低値傾向を示した。

(4) パーキンソン病患者における脳脊髄液中の GDNF 量の変動

Pallidotomy 後 (6 例) および thalamotomy 後 (4 例) さらに、pallidotomy 術中の脳室内髄液 (6 例) のパーキンソン病患者の脳脊髄液中の GDNF 量を測定した (図 5)。非パーキンソン病患者 (25 例) の脳脊髄液を対照群として比較検討した結果、パーキンソン病患者より採取した各治療群の GDNF 量は極めて低値を示し、各群間に有意差は認められなかった。

D. 考察

パーキンソン病の特徴である錐体外路性運動障害は、黒質線条体ドーパミン (DA) 作動性ニューロンの変性によってもたらされる。従って、その治療は DA ニューロンの機能の改善を基本とする。L-DOPA および DA アゴニストによる DA 補充療法は、症状の顕著な改善をもたらす。しかし、この補充療法は、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、患者家族に計り知れない負担を強いている。我々は、20 年以上の長期に渡ってパーキンソン病患者の治療を 1000 名以上の患者で行っている。この臨床経験 (研究論文 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) と MPTP によって作製したサルの実験的パーキンソン病モデルを用いて (研究論文 1, 2)、新規の薬物の治療効果と副作用を検討してきた。しかしながら、対症療法の開発のみでは、不十分であり L-DOPA 療法に代わる根本的治療法の開発の一つとして、神経栄養因子による治療法がある。GDNF はサルのモデルでは、DA ニューロン死を抑制することが証明された蛋白ではあるが、その脳内分布や細胞

死との関わりは殆ど知られていない。パーキンソン病患者での治験は、すでに欧米では開始され日本でも計画が進行しているが、血液中や脳脊髄液中での GDNF 有無についても基礎資料が不十分な状態にある。そこで GDNF 抗体を実験 2 で示すように作製し、それを用いて検討を行った。

実験 1 では、得られた抗体を用いてサルの黒質、線条体、淡蒼球、大脳皮質、小脳皮質の免疫組織染色を行い、黒質では TH 染色陽性の DA 神経細胞を含む多数の細胞が染色された。特異的 DA 神経細胞毒 MPTP が、黒質 DA ニューロンを障害する際に GDNF が関与していることを、サルの実験で検討した。即ちパーキンソン病モデル作製過程で、経時的に染色した中脳の免疫染色標本では、DA 細胞が消失する前に GDNF 陽性細胞の明確な減少を定性的ではあるが確認した。GDNF は中脳 DA ニューロンの神経栄養因子として、最も注目されている蛋白であり、これが DA 神経細胞死の過程で関与しているとする研究成果は我々が最初であり、今後他の手法を用いてこの結果を確認すべき更なる研究の継続が必要と考える。

実験 2 においては現在市販の GDNF 抗体は主に組織染色用で、ELISA 系に適する高力価抗体は入手できず、したがって、ELISA 系確立のためリコンビナント GDNF を大腸菌で作製し、これに対する抗体を得た。一方、これとは特異性の異なる抗体を得るため、3 種の GDNF 合成ペプチドをヘモシアニンに結合させ、これを免疫源としてウサギに感作し、特異抗体を得た。このうち、1 組の組み合わせが最も高感度に定量できることが明らかになった。確立できた ELISA 系は pg/ml レベルで測定可能であった。これを用いてヒトの血中レベルを測定した。健常者では特に 4 才位までは 0 値か、低値を示すのに対し、6 才を越えると急速に増加する傾向を示したが、40 才を越えると多くは低値傾向を示した。この様に GDNF 量は、年齢に依存した一

定の傾向があることが明らかとなった。すなわちパーキンソン病患者は 50 才以上の高齢者が多く、年齢のマッチした健常者を対照群として GDNF 量を比較する必要がある。今回の検討結果では統計的有意差は認められなかったが、発病から死亡まで罹病期間が十数年から数十年の患者では、年齢の他に罹病期間や病態別に検討が必要であり、今後の課題である。また、我々は 1994 年よりパーキンソン病患者に脳定位手術 (pallidotomy) を行っているが、著明に ADL が改善する症例を認める一方で、軽度の改善にとどまる症例もある。このような術後の臨床症状の変化の多様性と病態との関係を血中 GDNF レベルの面より検討し、pallidotomy 施行 11 例のうち、9 例は術後で減少傾向を示したが、臨床症状との対応関係は見られなかった。また、同様のことを脳脊髄液で検討したが、他の神経疾患を対照群として GDNF 量を比較したところ、各群間に有意差は認められなかった。今後症例を増して詳細に検討するとともに、薬剤との関連についても検討が必要と考える。

E. 結論

recombinant GDNF を大腸菌に組み込んで GDNF 蛋白を作り、ウサギに免疫して特異抗体を作製した。この抗体を用いて免疫組織染色により、パーキンソン病モデル作製過程に GDNF 蛋白質の発現が関与しているかを検討したところ、MPTP による黒質神経細胞の障害ではドパミン神経細胞の減少に先行して、GDNF 蛋白の発現が減少することが判明した。また、ヒト GDNF に特異的な高感度 ELISA 測定系を開発しでの血中、脳脊髄液中の蛋白量を測定した。その結果、健常者血中 GDNF 量は 6 歳から 40 歳にかけては比較的高値を示したが、6 歳以下および 60 歳以上では殆どが低値を示した。パーキンソン病患者血中 GDNF 量は、対照として年齢をマッチさせた健常者との間に統計的有意差は見られなかった。pallidotomy 後の患者の血

中 GDNF 量は、多くの症例で減少傾向を示した。一方、脳脊髄液で比較すると、非パーキンソン病と有意差はなく、また、pallidotomy, thalamotomy 後のレベルとも有意な差は認められなかった。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Kuno S, Mizuta E, Sakamoto H, Ichihara K, Nagasaka M: Antiparkinsonian Effects of BAM-1110, a Novel Ergoline Derivative, in MPTP-Treated Cynomolgus Monkeys: *Clin Neuropharmacol* 21(1): 35-40, 1998
2. Yoshimura N, Mizuta E, Yoshida O, Kuno S: Therapeutic Effects of Dopamine D1/D2 Receptor Agonists on Detrusor Hyperreflexia in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Lesioned Parkinsonian Cynomolgus Monkeys: *J Pharmacol Exp Ther* 286: 228-233, 1998
3. 久野貞子: Wearing-off 現象、on-off 現象を示す症例: *Clin Pharmacotherapy* 4(1): 27-31, 1998
4. 久野貞子: パーキンソニズムの鑑別と治療の進めかた: *Medical Practice* 15(5): 837-842, 1998
5. 久野貞子: パーキンソン病: 理学療法ジャーナル 32(3): 203-208, 1998
6. 久野貞子: 神経細胞保護療法: 医学のあゆみ 186(1): 125-128, 1998
7. 久野貞子: パーキンソン病薬物治療の進め方: *Pharma Medica* 16, 75-80, 1998
8. 久野貞子: 悪性症候群の鑑別診断-特に抗 Parkinson 病薬に関連した悪性症候群について-: *臨床医* 24(10): 76-78, 1998
9. 久野貞子: 慢性硬膜下血腫の合併により頻回の転倒、歩行不能に陥った 1 例

患者と医師のためのパーキンソン病治療, 柳澤信夫、上野エリ子編, 株式会社ミクス (東京), pp132-134, 1998

10. 前田憲吾、安田斉、金森章人、久野貞子: パーキンソン病における胃排出能-健常者・多系統萎縮症との比較: *Functional dyspepsia* の病態分類とその対策, 三輪剛、青木照明、関口利和編, 株式会社協和企画通信 (東京), pp21-28, 1998
11. 久野貞子: 類縁体 (ドパミン受容体アゴニスト), 神経伝達物質 UPDATE 基礎から臨床まで, 中村重信編, 中外医学社, 神経疾患治療と神経伝達物質: 298-303, 1998
12. 久野貞子: neuroleptic malignant syndrome (悪性症候群), 症候群事典, 診断と治療 86 suppl, 119, 1998
13. 久野貞子: パーキンソン病, 臨床看護事典 第 2 版, 高久史麿 他編, メヂカルフレンド社, 1998, pp1648-1655

2) 学会発表

- Preclinical data on dopamine agonists 1998 update
New York, October 14, 1998
- Cabergoline in primates; Effects in L-dopa naive monkeys.
Sadako Kuno
- Global Medical Conference on Parkinson's Disease.
Recent advances in Parkinson's disease and other neurological disorders.
Indianapolis, April 23-24, 1998
- Assesment of voiding dysfunction in Parkinson's disease by using I-PSS questionnaire
Sadako Kuno

第 39 回日本神経学会総会 1998 年 5 月 京都
MPTP パーキンソン病モデルサルにおける

apomorphine 誘発 hyperactivity に対する
5HT₃ 受容体阻害剤の効果

齋木英資、山崎俊三、水田英二、久野貞子

第 39 回日本神経学会総会 1998 年 5 月
京都

パーキンソン病 (PD) における COMT 遺
伝子多型性と L-dopa 治療との関連

水田英二、水田依久子、山崎俊三、久野貞
子

第 39 回日本神経学会総会 1998 年 5 月
京都

悪性症候群で死亡したパーキンソン病患者
の抗 GDNF 抗体による免疫組織学的検討

山崎俊三、水田英二、齋木英資、太田潔江、
太田光熙、久野貞子

第 39 回日本神経学会総会 1998 年 5 月
京都

パーキンソン病 (PD) の排尿障害と QOL-
国際前立腺症状スコア (IPSS) を用いた
評価

久野貞子、水田英二、山崎俊三、荒木勇雄、
種田倫之

第 39 回日本神経学会総会 1998 年 5 月
京都

卒後教育セミナー

パーキンソン病の診断と治療

久野貞子

第 39 回日本神経学会総会サテライトシン
ポジウム 1998 年 5 月京都

パーキンソン病類似疾患をめぐるトピック
ス

淡蒼球・黒質・ルイ体変性 (PNLD/PNLA)

久野貞子

第 16 回日本神経治療学会総会 1998 年 7
月金沢

パーキンソン病に対する Pallidotomy の長
期効果

水田英二、齋木英資、久野貞子

第 69 回日本神経学会近畿地方会 1998 年
11 月尼崎市

L-dopa とビタミン C 併用によりすくみ現
象および前傾姿勢が改善したパーキンソン
病の 1 例

平出美和、渡士真奈美、山崎俊三、水田英
二、久野貞子

199800359A

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、下記の「研究成果の刊行に関する一覧」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧」

Autonomic neuropathy in transgenic mice caused by immunotoxin targeting of the peripheral nervous system.

Sawada H, Nishii K, Suzuki T, Hasegawa K, Hata T, Nagatsu I, Kreitman RJ, Pastan I, Nagatsu T, Kobayashi K.

Journal of Neuroscience Research. 1998 Jan 15;51(2):162-73.

Phenylethanolamine-N-methyltransferase - immunoreactive nerve terminals afferent to the mouse substantia nigra.

Nagatsu I, Ikemoto K, Takeuchi T, Arai R, Karasawa N, Fujii T, Nagatsu T.

Neuroscience letters. 1998 Mar 27;245(1):41-4.

IL-1 beta and TNF-alpha suppress apolipoprotein (apo) E secretion and apo A-I expression in HepG2 cells.

Song H, Saito K, Fujigaki S, Noma A, Ishiguro H, Nagatsu T, Seishima M.

Cytokine. 1998 Apr;10(4):275-80.

Significant behavioral recovery in Parkinson's disease model by direct intracerebral gene transfer using continuous injection of a plasmid DNA-liposome complex.

Imaoka T, Date I, Ohmoto T, Nagatsu T.

Human gene therapy. 1998 May 1;9(7):1093-102.

199800359A

Prevention of dopaminergic neuron death by adeno-associated virus vector-mediated GDNF gene transfer in rat mesencephalic cells in vitro.
Fan D, Ogawa M, Ikeguchi K, Fujimoto K, Urabe M, Kume A, Nishizawa M, Matsushita N, Kiuchi K, Ichinose H, Nagatsu T, Kurtzman GJ, Nakano I, Ozawa K.

Neuroscience letters. 1998 May 22;248(1):61-4.

Dopamine beta-hydroxylase: two polymorphisms in linkage disequilibrium at the structural gene DBH associate with biochemical phenotypic variation.

Cubells JF, van Kammen DP, Kelley ME, Anderson GM, O'Connor DT, Price LH, Malison R, Rao PA, Kobayashi K, Nagatsu T, Gelernter J.

Human genetics. 1998 May;102(5):533-40.

Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1beta and nerve growth factor in the striatum.

Mogi M, Togari A, Ogawa M, Ikeguchi K, Shizuma N, Fan D, Nakano I, Nagatsu T.

Neuroscience letters. 1998 Jun 26;250(1):25-8.

DRD2 allele frequencies and linkage disequilibria, including the -141CIns/Del promoter polymorphism, in European-American, African-American, and Japanese subjects.

Gelernter J, Kranzler H, Cubells JF, Ichinose H, Nagatsu T.

Genomics. 1998 Jul 1;51(1):21-6.

Brain-specific gene expression by immortalized microglial cell-mediated gene transfer in the mammalian brain.

Sawada M, Imai F, Suzuki H, Hayakawa M, Kanno T, Nagatsu T.

FEBS letters. 1998 Aug 14;433(1-2):37-40.

199800359A

Identification of the essential cysteinyl residue located in the active site of human phenylethanolamine N-methyltransferase.

Kaneda N, Hikita K, Naruse Y, Fukuo T, Matsubara K, Nagatsu T.

Biochemical and biophysical research communications. 1998 Aug 19;249(2):405-9.

Identification and characterization of a novel phorbol ester-responsive DNA sequence in the 5'-flanking region of the human dopamine beta-hydroxylase gene.

Ishiguro H, Yamada K, Ichino N, Nagatsu T.

The Journal of biological chemistry. 1998 Aug 21;273(34):21941-9.

Enzymes related to catecholamine biosynthesis in Tetrahymena pyriformis. Presence of GTP cyclohydrolase I.

Nomura T, Tazawa M, Ohtsuki M, Sumi-Ichinose C, Hagino Y, Ota A, Nakashima A, Mori K, Sugimoto T, Ueno O, Nozawa Y, Ichinose H, Nagatsu T.

Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology. 1998 Aug;120(4):753-60.

Does tyrosinase exist in neuromelanin-pigmented neurons in the human substantia nigra?

Ikemoto K, Nagatsu I, Ito S, King RA, Nishimura A, Nagatsu T.

Neuroscience letters. 1998 Sep 11;253(3):198-200.

Genomic organization and chromosomal localization of the human sepiapterin reductase gene.

Ohye T, Hori TA, Katoh S, Nagatsu T, Ichinose H.

Biochemical and biophysical research communications. 1998 Oct 20;251(2):597-602.

199800359A

Behavioral recovery in 6-hydroxydopamine-lesioned rats by cotransduction of striatum with tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase genes using two separate adeno-associated virus vectors.

Fan DS, Ogawa M, Fujimoto KI, Ikeguchi K, Ogasawara Y, Urabe M, Nishizawa M, Nakano I, Yoshida M, Nagatsu I, Ichinose H, Nagatsu T, Kurtzman GJ, Ozawa K.

Human gene therapy. 1998 Nov 20;9(17):2527-35.

Motor and learning dysfunction during postnatal development in mice defective in dopamine neuronal transmission.

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.

Journal of neuroscience research. 1998 Nov 15;54(4):450-64.

Molecular biology of catecholamine-related enzymes in relation to Parkinson's disease.

Nagatsu T, Ichinose H.

Cellular and molecular neurobiology. 1999 Feb;19(1):57-66.

Mice lacking the tyrosine hydroxylase gene and transcomplementation with the human genome: on going prospects for human gene therapy

Kobayashi K, Nagatsu T.

Biogenic Amines, 1999;15(1):1-20.

Specific localization of the guanosine triphosphate (GTP) cyclohydrolase I-immunoreactivity in the human brain.

Nagatsu I, Ikemoto K, Kitahama K, Nishimura A, Ichinose H, Nagatsu T.

Journal of neural transmission. 1999;106(7-8):607-17.

199800359A

Genotype in the 24-kDa subunit gene (NDUFV2) of mitochondrial complex I and susceptibility to Parkinson disease.

Hattori N, Yoshino H, Tanaka M, Suzuki H, Mizuno Y.
Genomics. 1998 Apr 1;49(1):52-8.

Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals.

Hattori N, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Yamamura Y, Yoshino H, Kobayashi T, Yokochi M, Wang M, Yoritaka A, Kondo T, Kuzuhara S, Nakamura S, Shimizu N, Mizuno Y.
Annals of neurology. 1998 Dec;44(6):935-41.

Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N.
Nature. 1998 Apr 9;392(6676):605-8.

Association between the gene encoding the E2 subunit of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex and Parkinson's disease.

Kobayashi T, Matsumine H, Matuda S, Mizuno Y.
Annals of neurology. 1998 Jan;43(1):120-3.

Early onset parkinsonism with diurnal fluctuation maps to a locus for juvenile parkinsonism.

Matsumine H, Yamamura Y, Kobayashi T, Nakamura S, Kuzuhara S, Mizuno Y.
Neurology. 1998 May;50(5):1340-5.

199800359A

Neurochemical and neurogenetic correlates of Parkinson's disease.

Mizuno Y, Hattori N, Matsumine H.

Journal of neurochemistry. 1998 Sep;71(3):893-902.

Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease.

Mizuno Y, Yoshino H, Ikebe S, Hattori N, Kobayashi T,
Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kondo T.

Annals of neurology. 1998 Sep;44(3 Suppl 1):S99-109.

Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q.

Mori H, Kondo T, Yokochi M, Matsumine H, Nakagawa-Hattori Y, Miyake T, Suda K, Mizuno Y.

Neurology. 1998 Sep;51(3):890-2.

Effects of various tetrahydroisoquinoline derivatives on mitochondrial respiration and the electron transfer complexes.

Morikawa N, Naoi M, Maruyama W, Ohta S, Kotake Y, Kawai H, Niwa T, Dostert P, Mizuno Y.

Journal of neural transmission. 1998;105(6-7):677-88.

Colocalization of Bcl-2 and 4-hydroxynonenal modified proteins in microglial cells and neurons of rat brain following transient focal ischemia.

Urabe T, Hattori N, Yoshikawa M, Yoshino H, Uchida K, Mizuno Y.

Neuroscience letters. 1998 May 15;247(2-3):159-62.

Polymorphism in the parkin gene among sporadic Parkinson's disease.

Wang M, Hattori N, Kobayashi T, Yoshino H, Morioka A, Kitada T, Asakawa S, Shimizu N, Mizuno Y.

Annals of neurology. 1999 in press.

Submitted.

An immunohistochemical study on Bcl-xL, Bcl-2, and Bax expression in Parkinson's disease

Yukihiro Sugita, MD; Keigo Goto, MD; Hideo Mori, MD; Toru Hatano, MD; Emiko Kato; Sigeo Ohta, MD and Yoshikuni Mizuno, MD

From the Department of Neurology (Drs. Goto, Sugita, Mori, Hatano, Kato and Mizuno), Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan; and the Department of Biochemistry and Cell Biology (Dr. Ohta), Institute of Gerontology, Nippon Medical School, Kanagawa, Japan

Acknowledgements: This study was in part supported by Grant-in-Aid Scientific Research on Priority Areas from Ministry of Education, Science, Sports, and Culture, Japan, grant-in-Aid for Health Science Promotion and Grant-in-Aid for Neurodegenerative Disorders from Ministry of Health and welfare, Japan, and by "Center of Excellence" Grant from National Parkinson Foundation, Miami.

Address Correspondence and reprint requests to Dr. Yukihiro Sugita, Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

Phone: +81-3-3813-3111, Fax: +81-5684-0476,

e-mail: ysugita@med.juntendo.ac.jp

Key words: Parkinson's disease, Bcl-xL, Bcl-2, Bax, Apoptosis

Article Abstract - We report expression of Bcl-xL, Bcl-2, and Bax proteins in the substantia nigra in 6 Parkinson's disease (PD) patients and 7 control (CTL) subjects using immunohistochemistry. The proportion of Bcl-xL-positive neurons among the melanized nigral neurons was significantly lower in the PD patients (22.5 ± 5.5 %) than in the CTL subjects (46.0 ± 5.9 %) (Mann-Whitney U-test; $P < 0.02$), whereas the proportions of Bcl-2- and Bax-positive neurons were essentially similar between PD patients (Bcl-2: 59.7 ± 10.3 %, Bax: 92.5 ± 4.2) and the CTL subjects (Bcl-2: 61.7 ± 14.7 %, Bax: 90.5 ± 2.6).

The Bcl-2 family proteins regulate cell survival and death in response to various apoptotic stimuli and Bcl-xL is an important anti-apoptotic protein in the central nervous system. Reduced expression of Bcl-xL may predispose nigral neurons to degeneration. Our results give a further support for apoptotic nigral neuronal death in PD. (147 words)

Parkinson's disease (PD) is characterized by progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN). Recently, apoptosis has been implicated as an important mechanism of neuronal death in many neurodegenerative disorders such as PD¹⁻³, Alzheimer disease (AD)⁴, Huntington's disease (HD)⁵ and amyotrophic lateral sclerosis (ALS)⁶. We and other groups reported DNA fragmentation in the SN of PD patients by the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL) or by the electronmicroscopy¹⁻³. But controversies exist in PD in that Drugnow et al.⁵ and Kösel et al.⁷ reported negative evidence against apoptosis. These discrepancies may in part be due to the limitation in the method of detection of apoptosis in small autopsy materials like SN. These situation prompted us to take another approach to explore the question of apoptotic neuronal death in PD, that is analysis of Bcl-2 family proteins.

Bcl-2 family proteins play an important role in the regulation of apoptosis. Bcl-2 inhibits apoptotic neuronal cell death induced by various *in vivo* stimuli such as removal of neurotrophic factors⁸, hypoxia⁹, and oxidative stress¹⁰. Furthermore neurons are protected from neuronal death in transgenic mice over-expressing Bcl-2 *in vivo*¹¹. Several homologues of Bcl-2 also play important roles regulating neuronal apoptosis¹². Bcl-x is alternatively spliced to produce three proteins, i.e., Bcl-xL, Bcl-xS and Bcl-xb. Bcl-xL inhibits apoptosis in a manner similar to Bcl-2 and is the predominant Bcl-X isoform in the central nervous system (CNS), while Bcl-xS promotes apoptosis¹³. Alterations in the expression of bcl-xL, bcl-2 and Bax mRNAs and their protein products have recently been demonstrated in some neurodegenerative diseases¹⁴⁻¹⁶. Bax is a pro-apoptotic protein

expressed in cytosol and mitochondria. To our knowledge, analysis on Bcl-xL and Bax have not been reported in PD.

Materials and methods. *Clinical subjects.* The clinical subjects consist of 7 PD patients and 6 CTL subjects. Their clinical features are summarized in Table 1. The postmortem diagnosis of PD was established by the analysis of clinical features and confirmed postmortem by the presence of nigral degeneration with Lewy bodies in the remaining SN neurons. Brains were fixed in 10 % neutral buffered formalin, embedded in paraffin, and cut into 6- μ m-thick sections. Serial coronal midbrain sections at the oculomotor nucleus level were prepared for immunohistochemical study.

Antibodies. The following antibodies were used for immunohistochemistry; for Bcl-xL, clone A-105-1 (monoclonal antibody raised against rat Bcl-xL; 1:75)¹⁷⁻¹⁸ for Bcl-2, clone 124 (monoclonal antibody raised against human Bcl-2, DAKO; 1:40), and for Bax, clone N-20 (polyclonal antibody raised against human Bcl-xL, Santa Cruz; 1:200). The monoclonal antibody to Bcl-xL was confirmed to react specifically with Bcl-xL but not with Bcl-XS or Bcl-2¹⁸.

Immunohistochemistry. The deparaffinized sections were pretreated by autoclaving in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) to