

考 察

今回の報告は途中経過であるので、超大量メチルコバラミン筋注によりALSの臨床症状が改善するの否かははいまだ判断できない。今後さらに患者数を増して臨床症状の変化を検討する必要がある。作用機序は不明な点が多いが、以前の試験で得られた25mgメチルコバラミン連日2週間投与終了後の髄液ビタミンB12濃度は約 $8\mu\text{M}$ であり、この濃度がそのままメチルコバラミン濃度であればs-アデノシルメチオニン存在下でDNAメチレーションを阻害し、なんらかの蛋白を合成する方向へ遺伝子が活性化されている可能性がある(文献3)。今後DNAメチレーションの点でも検討が必要と考えられる。

文 献

1. T. Watanabe et al. Ultra-high dose methylcobalamin promotes nerve regeneration in experimental acrylamide neuropathy. *J. Neurol. Sci.*, 122; 140-143, 1994.
2. R. Kaji et al. Effect of ultrahigh-dose methylcobalamin on compound muscle action potentials in amyotrophic lateral sclerosis: a double-blind controlled study. *Muscle Nerve* 21: 1775-1778, 1998.
3. A. Pfohl-Leszkowicz et al. Effect of Cobalamin Derivatives on in Vitro Enzymatic DNA Methylation: Methylcobalamin Can Act as a Methyl Donor. *Biochemistry* 30: 8045-8051, 1991.

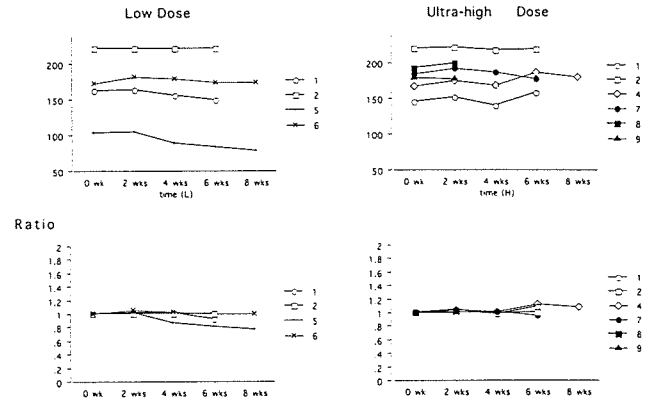


図1.徒手筋力試験の2週間ごとの経過
上下肢頸部筋あわせて32筋の7段階評価(224点満点)である。上のグラフは粗点を示し、下は投与開始時との比を示す。左は1.0mg、右は50mg投与を示す。

球脊髄性筋萎縮症における変異アンドロゲン受容体の熱 ショック蛋白(HSP)による凝集体形成抑制効果

祖父江 元¹⁾ 小林 靖¹⁾ 大塚 健三²⁾ 李 攻¹⁾ 竹内 英之¹⁾

はじめに

球脊髄性筋萎縮症(Spinal and bulbar muscular atrophy; SBMA)は性染色体劣性遺伝の緩徐進行性の運動ニューロン病である。1991年に La Spada¹⁾らによりアンドロゲン受容体遺伝子(AR)の第1エクソン内のCAGリピートが延長することが、SBMAの原因であることを見出された。これがその後相次いで発見されるCAGリピート病の発端となった。現在のところCAGリピート病としてはハンチントン舞蹈病(HD)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、各種脊髄小脳萎縮症(SCA1, 2, 3, 6, 7)などが知られている。これらCAGリピート病は延長したCAGリピートに対応するポリグルタミン鎖によって引き起こされるgain of a toxic functionを共通の病態発現機構として持つと考えられている。その病態発現機構としては、各責任遺伝子産物のポリグルタミン鎖部分を核とした部分にprocessingを受けることが重要な病因の一つであると考えられている²⁾。そしてprocessingをうけたポリグルタミン鎖がpolar zipper構造やtransglutaminaseによるcross-linkingなどによりaggregateを形成し、CAGリピート病の病態形成に関与すると考えられている。(processing—aggregate 仮説)。さらに最近の報告では各CAGリピート病の主要病変部に責任遺

伝子産物よりなる核内封入体の存在も確認されている³⁾。この核内封入体は基本的には各責任遺伝子産物のポリグルタミン鎖近傍のみより構成されており、processing—aggregate 仮説を支持する根拠となっている。しかし最近、Saudouら⁴⁾は核内封入体はCAGリピート病の直接的な病態発現機構とは関係ないと報告しており、このprocessing—aggregate 仮説にも更なる検証が必要となっている。そこで我々はprocessing—aggregate 仮説の検証と共にCAGリピート病の治療法を探るために熱ショック蛋白によるポリグルタミン鎖のaggregate形成抑制効果を検討した。

材料・方法

In vitro aggregation assay

大腸菌を用いgst-truncated AR 65-HA, HSC70-His, HSP40-Hisを精製した。gst-truncated AR 65-HA(0.5nM)に対しMol比1:20でHSC70-His, HSP40-Hisを加え30分incubate後Western blottingを施行した。抗HA抗体で免疫染色し、ECLで検出した。Densitometryで信号強度を測定した。

Transient expression assay

Neuro2a cell lineを用いた。CMV promotorで発現される

1) 名古屋大学医学部神経内科

2) 愛知県がんセンター研究所

truncated AR97-GFP と共に HSP70, HSP40, HSDJ の construct を co-transfection した。Transfection 後 24 時間及び 72 時間後に固定した。propidium iodide で核染色後、共焦点レーザーで観察した。

結果

In vitro aggregation assay (図 1, 2)

図 1 controle lane で示すように monomer は約 50Kd の位置の信号 (灰矢頭) を認めるが、SDS-PAGE の well 直下に相応する部位に aggregate による信号をも認める (黒矢頭)。HSP の添加によりこの aggregate の信号強度は種々の変化を示している。

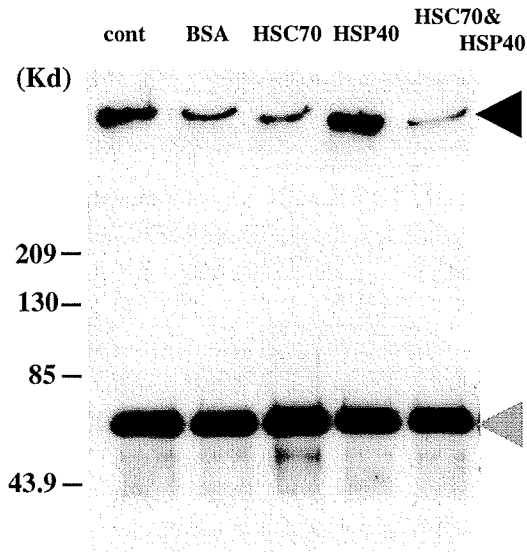


図 1. Western blotting

この変化を aggregate/monomer 比で見ると(図 2),

control 0.45, +BSA 0.19, +HSC70 0.08, +HSP40 0.6, +HSC70/HSP40 0.01 であった。HSC70 と HSC70/HSP40 では truncated AR65 による aggregate 形成を著明に抑制した。

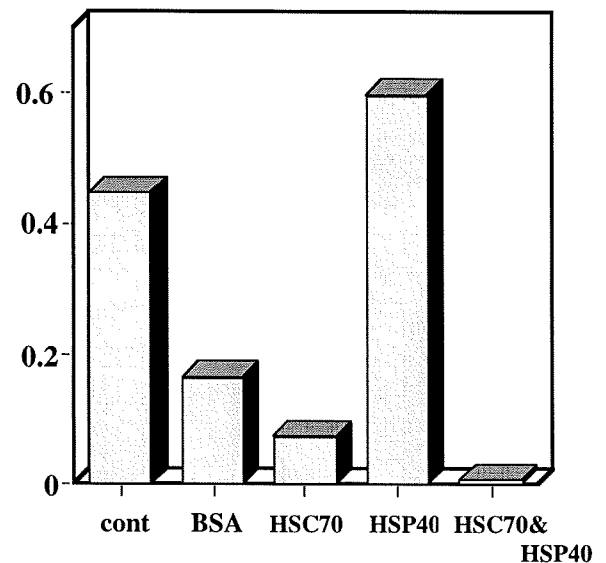


図 2. Aggregate/monomer ratio (=signal intensity of aggregate/signal intensity of monomer)

Transient expression assay (図 3, 4)

Neuro2a に CMV promoter で発現される truncated AR24-GFP および truncated AR97-GFP を transient expression すると、transfection 後 48 時間後には truncated AR97-GFP 群では transfection された細胞のほぼ 100%に aggregate を認めるも truncated AR24-GFP 群では全く認めなかった。また 48 時間後の生存細胞数も truncated

AR97-GFP 群は truncated AR24-GFP 群の半分程度に減少する(data not shown). この系に HSP70, HSP40, HSDJ を単独および相互に truncated AR97-GFP と共に co-transfection した.

図 3 で示すように+HSDJ 群以外では細胞内 aggregate の減少効果を見た. 特に+HSP70/HSP40 群で著明であった.

これは *in vitro* aggregation assay の結果とほぼ同様であった.

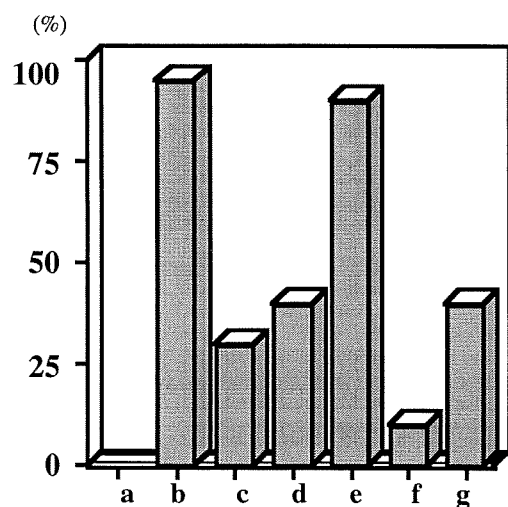


図 3. 細胞内 aggregate 出現率 (a; tAR24-GFP, b; tAR97-GFP, c; tAR97-GFP+ HSP70, d; +HSP40, e; +HSDJ, f; +HSP70/HSP40, g; +HSP70/HSDJ)

また図 4 で示すように transfection 72 時間後の生存細胞数も aggregate の減少効果を認めた+HSP70 群および +HSP70/HSP40 群で明らかに増加傾向を認めた.

(%)

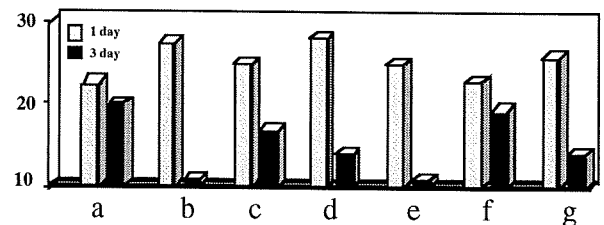


図 4. 生存率の変化 (記号は図 3 と同)

考 察

この結果でわかるように, HSP はポリグルタミン鎖による aggregate 形成抑制効果を持つ. また truncated AR97-GFP による aggregate 形成抑制を示した HSP (HSP70 及び HSP70/HSP40) は培養細胞の生存率の改善効果も示したことは, aggregate が CAG リピート病の病態発現機構に関与をしている可能性を示唆していると考えられる. これらのことより HSP は CAG リピート病の治療への応用が期待される.

文 献

- 1) La Spada et al. Nature 352, 77-79, 1991.
- 2) Ikeda H et al. Nat. Genet. 13, 196-202, 1996.
- 3) Mei Li et al. Ann Neurol 44, 249-254, 1998.
- 4) Saudou F et al. Cell 95, 55-66, 1998.

沖縄地方に多発する感覚障害を伴う遺伝性神経原性筋萎縮症 (Hereditary

Motor and Sensory Neuropathy with Proximal dominant involvement:

HMSN-P)の臨床・病理学的検討とその遺伝子連鎖解析

中川正法 高嶋 博 末原雅人² 平田圭子² 綾織誠人
松崎敏男 斉藤峰輝 出雲周二¹ 納 光弘

目 的

沖縄地方に多発する感覚障害, 神経ミオトニアを伴う近位筋優位の神経原性筋萎縮症 (Hereditary Motor and Sensory Neuropathy with proximal dominant involvement (以下 HMSN-P)¹) は, 臨床的に筋萎縮性側索硬化症や球脊髄性筋萎縮症との鑑別を必要とする疾患であり, 本症の解明は, これらの神経原性筋萎縮症の病態解明にも重要な知見を与えるものと考え¹⁾. 昨年度までの本班会議にて, われわれは, HMSN-P の疾患遺伝子座が, 3q13.1 領域にマッピングされることを報告した²⁾. 今年度は, その疾患遺伝子座の絞り込みと剖検組織の検討を行ったので報告する³⁾.

対象および方法

本症の臨床像を, 神経所見, 電気生理学的所見, 病理学的所見 (2例の剖検例を含む) にもとづいて検討した. 剖検例の病理組織は, HE 染色, K B 染色, 抗ユビキチン抗体による免疫染色にて検討した. 疾患遺伝子座の絞り込みのために HMSN-P の罹患者 42 名を含む 17 家系 59 名と本症家系と血縁のない正常沖縄県人 50 名より, 同意を得た上で採血を行い, DNA を抽出した. GDB より検索した 3p14-3q13.1 領域の 25 種類の (CA) リピートマイクロサテライト多型マーカーについて, 蛍光プライマーを用いた PCR 後, 自動シーケンサー (ABI PRISM377) にて電気泳動を行

い, 各 DNA マーカーのサイズを決定した. 決定された DNA マーカーサイズをもとに, 本症に連鎖するアレルタイプを決め, 家系内, 家系間での組み換えについて検討した. 2点連鎖解析は, Linkage package Ver5.1 の MLINK を用いて行った. 連鎖不平衡の検討は, DISLAM ver2.1 と DISMULT ver2.1 を用いて行った. また, 本症では世代間で, 発症年齢の若年化がみられる家系があることより, CAG リピート病の可能性を考え, DIRECT 法を用いて, CAG リピート異常の有無について検討した.

結 果

本症の臨床的特徴は, ①常染色体優性遺伝形式, ②成人発症, 緩徐進行性の四肢近位筋優位の筋力低下, ③四肢, 体幹の筋痙攣, fasciculations, ④深部腱反射の低下・消失, ⑤異常知覚, 深部感覚障害を伴う感覚障害, ⑥電気生理学的検査にて, 軸索優位の運動・感覚神経障害, Neuromyotonia の検出, ⑦血清 creatine kinase 値の軽度～中等度の上昇, ⑧高脂血症, 耐糖能異常の合併, ⑨末梢神経有髄神経の著明な脱落であった. 剖検例の検討では, 1) 脊髄前角神経細胞の著しい脱落とグリオーシスを認め, 頸髄・腰髄では外側で脱落が著明. Onuf 核神経細胞は残存, 2) 後根神経節細胞は頸髄>腰髄>胸髄の順で脱落が強い, 3) 脊髄全長にわたる後索の著明な萎縮, 神経線維の脱落, 4) 末梢神経有髄線維の著明な脱落, 5) 脳

鹿児島大学第医学部三内科

¹鹿児島大学医学部付属難治性ウイルス疾患研究センター

²国立療養所沖縄病院神経内科

神経系では、XII, X, XIで変性を認めたが、動眼神経核は保たれているなどであった。抗ユビキチン抗体染色では、核内封入体は認められなかった。

遺伝子連鎖解析では、DNAマーカーD3S3652, D3S1591, D3S1281にて、それぞれ最大lod score 4.63, 3.13, 3.09 ($\theta = 0.0, 0.043, 0.031$)を得た。D3S3652とD3S3638の間の9 DNAマーカーのハプロタイプを検討し、10家系について疾患連鎖アレルを決定した。家系内における遺伝的乗り換えから、D3S1591とD3S1281の間に疾患遺伝子座がある可能性が示された(図)。DISLAMによるlikelihood ratio test (LRT)では、D3S3652, D3S1591, D3S1291, D3S3654, D3S3638に有意な連鎖不平衡がみられた。この領域の9種類のDNAマーカーを用いたDISMULTによる分析では、lod score 4.93 ($p < 0.00000095$)であり、この領域に強い連鎖不平衡が示された。

4家系17例では、疾患と連鎖する3q13.1領域のD3S3652からD3S3638の9個のDNAハプロタイプが完全に一致していた。仮に、このDNAハプロタイプを示すアレルを祖先アレル(ancestral allele)と仮定し、他の家系例についてアレルタイプを比較したところ、D3S1291, A281WA5, D3S1563, D3S3654の4個のDNAマーカーアレルは、他の14例でも完全に一致していた(表)。また、D3S3654の160bpアレルは、検討した42例全例が持っていた。DIRECT法を用いた検討では、CAGリピート異常は現在までのところ認められなかった。

考 察

HMSN-Pは、常染色体優性遺伝、成人発症の近位筋優位の筋萎縮と脱力、感覚障害を示す疾患であり、病理学的には後根神経節細胞の障害を中心とした後索・末梢神経障害と脊髄前角の脱落を主病変とする疾患であると考えられた。鑑別すべき疾患として脊髄性筋萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、球脊髄性筋萎縮症、遺伝性運動感覚ニューロパチー2型等があるが、HMSN-P遺伝子座は3q13.1領域の3 c Mに存在し、本症が、臨床的、

病理学的、遺伝学的に新しい疾患単位であることを明らかにした。発症年齢に促進現象がみられる家系があることから、DIRECT法を用いて、CAGリピートの異常延長の有無について検討したが、現在までのところ明らかな異常は見られていない。Huntington病やKennedy症候群などのCAGリピート病では、神経細胞に核内封入体が認められることから、本症でも核内封入体を形成している可能性を考え、大脳、脊髄切片を抗ユビキチン抗体による免疫染色にて検討したが、明らかな異常は見られなかった。今後、抗ポリグルタミン抗体を用いた検討を予定している

DISMULTによる解析では、この3cM領域の9個のDNAマーカーは、連鎖不平衡を示しており、本症の遺伝子がこの領域に局在することを強く支持する結果であった。HMSN-Pは、現在までのところ沖縄でのみ見られており、本症における創始者の存在が考えられた。現在、HMSN-P遺伝子のクローニングを目指して、この領域にマッピングされるESTのスクリーニング、PAC contigの作成、CAGリピートの検索、neuromyotoniaと関連するチャンネル遺伝子類似配列の検索を行っている。

謝 辞

DIRECT法キットを提供して下さいました当班班長新潟大学脳研究所神経内科辻 省次教授に謹んで深謝いたします。

文 献

- 1) Takashima H, et al. Ann Neurol 41: 771-780, 1997
- 2) 中川正法他. 特定疾患に関する分子病態研究班平成9年度研究 報告書, pp80-83, 1998
- 3) Nakagawa M, et al. Ann New York Academy Sciences (in press)

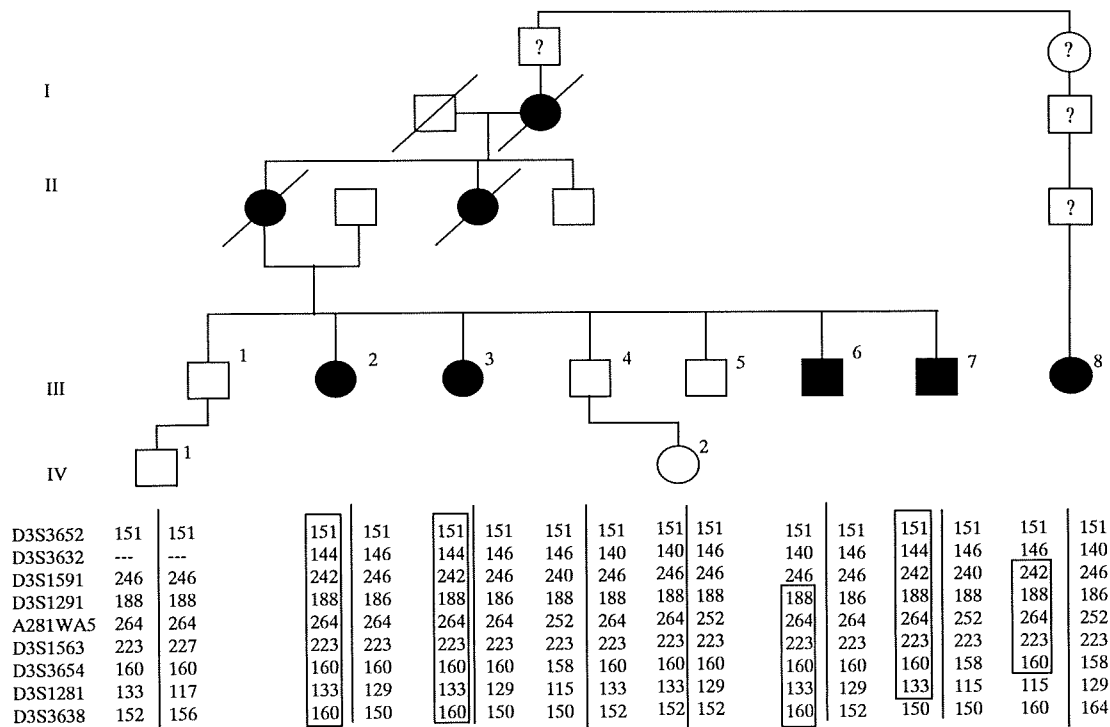


図. HMSN-P 家系 (第 8 家系) における 3q13.1 領域の DNA ハプロタイプの検討

Locus	Family									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
D3S3652	159	159	159	159	151	151	151	151	151	151
D3S3632	140	140	140	140	146	146	146	144	140	146
D3S1591	242	242	242	242	246	248	240	242	242	246
D3S1291	188	188	188	188	188	188	188	188	188	186
A281WA5	252	252	252	252	252	252	252	264	252	264
D3S1563	223	223	223	223	223	223	227	223	223	223
D3S3654	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160
D3S1281	119	119	119	119	129	119	115	133	129	129
D3S3638	152	152	152	152	160	152	152	150	164	160
症例数	6	6	3	2	2	3	3	5	2	3

表. 10 家系 (35 例) における疾患関連ハプロタイプの比較

パーキンソン病モデル動物の黒質-線条体系での metallothionein-III mRNAの変化とlevodopaの影響

小川紀雄 浅沼幹人 田中健一 宮崎育子

はじめに

Metallothionein (MT)-IIIは中枢神経系に特異的に発現する金属結合タンパク質の一種であり¹⁾、神経成長抑制因子とも呼ばれている²⁾。MT-IIIは脳内の亜鉛代謝調節に関与しており³⁾、Alzheimer病、Parkinson病患者脳で減少していることから^{2,4)}、神経変性疾患との関連が注目されているものの、その作用および発現調節などは未だ十分に解明されていない。われわれは平成9年度に既に、金属イオンがフリーラジカルの生成を介して酸化ストレスとしてDNA損傷を引き起こし、細胞傷害性に作用する可能性を明らかにした。また、Parkinson病の神経傷害過程に酸化ストレスが関与していると考えられている。したがって、Parkinson病モデルでの神経傷害にMT-IIIのような金属結合タンパク質が深く関与している可能性が考えられる。

本研究では、6-hydroxydopamine (6-OHDA)の黒質-線条体路注入により作製したParkinson病モデルラットを用いて、黒質-線条体系でのMT-III mRNA発現、さらにはlevodopa投与後の変動を解析し、脳内MT-IIIの役割および誘導調節を明らかにすることを目的とする。

方法

①正常動物にlevodopa/carbidopa (10/1, 25/2.5, 50/5 mg/kg)をそれぞれ腹腔内投与し、12, 24, 48時間後にそれぞれ線条体を摘出した。

②6-OHDA片側黒質-線条体路注入hemi-parkinsonismモデルラットを作製し、6-OHDA処置3週間後にlevodopa/carbidopa (25/2.5 mg/kg)を腹腔内投与し、24時間後に黒質および線条体をそれぞれ左右分けて摘出した。

③摘出した各組織からtotal RNAを抽出し、DNase処理を行った。MT-III mRNA発現レベルは、

total RNA, MT-III cDNAに特異的なprimer setと[α -³²P]dCTPを用いたreverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)を25cycleで行い、PCR生成物をポリアクリルアミドゲルで電気泳動し解析した。

結果

①線条体でのMT-III mRNA発現レベルはlevodopa/carbidopa 25/2.5, 50/5 mg/kgで24時間後に有意に増加した(Fig. 1)。また、この増加は用量依存性であった。levodopa/carbidopa 25/2.5 mg/kgを用いたMT-III mRNAの経時的変化の検討では、levodopa投与24時間後に有意に増加した。そこで、以下の実験では、levodopa/carbidopaは25/2.5 mg/kg投与し、24時間後において検討した。

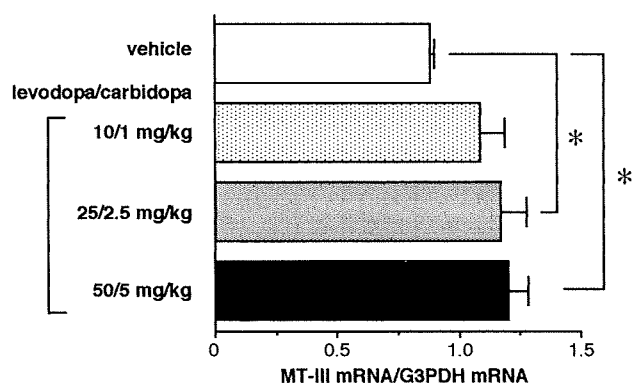


Fig. 1 Expression of striatal MT-III mRNA 24 hr after levodopa/carbidopa injection
* $p < 0.05$ vs vehicle injected group

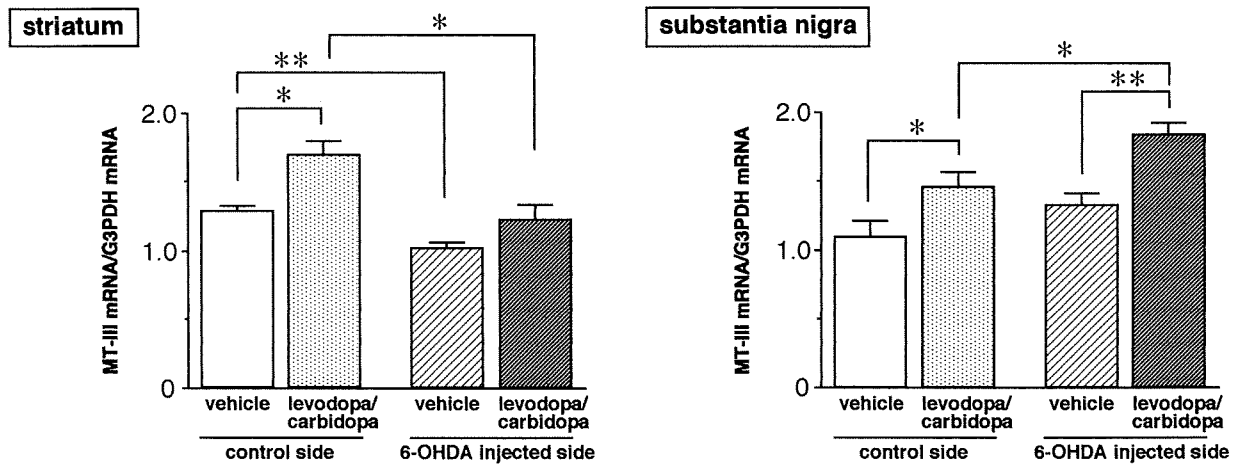


Fig. 2 Expression of MT-III mRNA and its regulation by levodopa/carbidopa (25/2.5 mg/kg) injection in hemi-parkinsonism rats. Left panel; striatum, right panel; substantia nigra. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ between indicated two groups

② hemi-parkinsonismモデルラットを用いた検討では、6-OHDA非投与（正常）側の線条体、黒質におけるMT-III mRNA発現は、levodopa投与により有意に増加した(Fig. 2)。一方、6-OHDA投与側の線条体では、MT-III mRNA発現レベルは有意に減少しており、正常側でみられたlevodopa投与による増加反応はみられなかった(Fig. 2, left)。

考 察

levodopaの単独投与により、線条体のMT-III mRNA発現レベルが用量依存性に増加した。われわれはlevodopa自体が酸化ストレスを惹起し、神経変性をさらに加速させてしまう恐れがあることを報告してきた⁵⁾。MT-IIIがフリーラジカル（特にhydroxyl radical）消去能をもつことから⁶⁾、このlevodopaによるMT-III mRNAの発現増加は、levodopaによって発生する酸化ストレスに対する生体防御反応と考えられる。

hemi-parkinsonismモデルラットの正常側の線条体、黒質においても、MT-III mRNAはlevodopa投与により有意に増加した。一方、6-OHDA投与側の線条体のMT-III mRNA発現レベルは有意に減少しており、正常側でみられたlevodopa投与による増加反応はみられなかった。この結果から、

Parkinson病脳ではMT-IIIなどによる生体側のラジカル消去能が低下しており、levodopa投与によって正常であれば生じるはずの生体反応の増加がみられないために病態が進行するという可能性が示唆された。

結 論

levodopaは黒質-線条体系でのMT-III mRNA発現を増加させる。しかし、Parkinson病モデル脳ではMT-IIIがdown-regulateされており、levodopaに対する生体の反応性も低下している。

文 献

- 1) Palmiter, R.D. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6333-6337, 1992.
- 2) Uchida, Y. et al.: Neuron, 7: 337-347, 1991.
- 3) Masters, B.A. et al.: J. Neurosci., 14: 5844-5857, 1994.
- 4) Uchida, Y. et al.: Biol. Signals, 3: 211-215, 1994.
- 5) Ogawa, N. et al.: Adv. Neurol., 60: 242-250, 1993.
- 6) Hussain, S. et al.: Neurochem. Int., 29: 145-152, 1996.

パーキンソン病および筋萎縮側索硬化症における 髄液中3-nitrotyrosine濃度の検討

阿部隆志¹⁾ 磯部千明¹⁾ 石崎恵理¹⁾ 村田隆彦¹⁾ 山崎公也¹⁾ 東儀英夫¹⁾

はじめに

我々は、昨年度までパーキンソン病(PD)および孤発性筋萎縮性側索硬化症(SALS)における一酸化窒素(NO)の関与を検討する目的で、未治療のPD, SALS患者の髄液中NO代謝産物(NO₂⁻, NO₃⁻)濃度を測定してきた。PDではNO₂⁻, NO₃⁻ともに有意な増加は認められず、PDの病態にNOが関与する可能性を支持する所見は得られなかった。しかしSALSではNO₃⁻およびtotal NO₂⁻+NO₃⁻の有意な増加を認め、SALSの病態にNOが関与している可能性があることを報告した。

本年度はこれらの研究をさらに推し進めるために、PDおよびSALS患者の髄液中3-nitrotyrosine濃度を測定した。3-nitrotyrosineはNOとsuperoxide(O₂⁻)とが反応して生じるperoxynitrite(ONOO⁻)がtyrosineをニトロ化することにより生成される物質であり、ONOO⁻による障害の生化学的マーカーと考えられている。

対象および方法

未治療のPD患者15例(66±10歳, 罹病期間 3.6±2.6年, Yahr's stage 2.5±0.6), SALS患者19例(58±13歳, 罹病期間 1.2±0.9年, JableckiのALS score 14±4), および正常対照群20例(63±11歳)を対象とした。

髄液採取は、検査前日の夕食以降は絶食, 当日起床後はベット上安静とし, 午前9時~10時の間に側臥位での腰椎穿刺にておこなった(全例においてインフォームドコンセントを得ている)。

測定は、髄液400μlに9.4N過塩素酸18μlを加え除蛋白した後, 上清80μlを高速クロマトグラフィー(HPLC)に注入し, クーロケム電気化学検出器(ECD)にて, 3-nitrotyrosineおよびtyrosine濃度を測定した。

統計学的処理には, Mann-Whitney test, Spearman順位相関係数(r_s)を用いた。

結 果

(1) PDにおける髄液中3-nitrotyrosine, tyrosine濃度 (Table 1)

①3-nitrotyrosine濃度(nM)は, 正常対照群(1.5±0.6), PD群(1.6±0.7)で有意差は認めなかった。

②Tyrosine濃度(nM)は, 正常対照群(5935±806), PD群(6558±942)で, PD群では正常対照群に比べ有意に

増加していた(p<0.05)。

③3-nitrotyrosine/tyrosine比(×10⁻⁴)は, 正常対照群(2.5±0.9), PD群(2.4±1.0)で有意差は認めなかった。

④PDの罹病期間と3-nitrotyrosine(r_s=0.14, p=0.61), tyrosine(r_s=0.35, p=0.19)濃度および3-nitrotyrosine/tyrosine比(r_s=-0.13, p=0.62)との間に有意な相関は認めなかった。

⑤PDの重症度(Yahr's stage)と3-nitrotyrosine(r_s=-0.21, p=0.43), tyrosine(r_s=0.25, p=0.34)濃度および3-nitrotyrosine/tyrosine比(r_s=-0.30, p=0.27)との間に有意な相関は認めなかった。

(2) SALSにおける髄液中3-nitrotyrosine, tyrosine濃度 (Table 1)

①3-nitrotyrosine濃度(nM)は, 正常対照群(1.5±0.6), SALS群(9.0±4.2)で, SALS群では正常対照群に比べ有意に増加していた(約6.4倍, p<0.0001)。

②Tyrosine濃度(nM)は, 正常対照群(5935±806), SALS群(6227±1071)で有意差は認めなかった。

③3-nitrotyrosine/tyrosine比(×10⁻⁴)は, 正常対照群(2.5±0.9), SALS群(15.6±8.8)で, SALS群では正常対照群に比べ有意に増加していた(約6.8倍, p<0.0001)。

④SALSの罹病期間と3-nitrotyrosine(r_s=0.07, p=0.77), tyrosine(r_s=-0.11, p=0.64)濃度および3-nitrotyrosine/tyrosine比(r_s=0.06, p=0.79)との間に有意な相関は認めなかった。

⑤ALSの重症度(JableckiのALS score)と3-nitrotyrosine(r_s=-0.20, p=0.39), tyrosine(r_s=-0.17, p=0.45)濃度および3-nitrotyrosine/tyrosine比(r_s=0.09, p=0.71)との間に有意な相関は認めなかった。

Table 1. The concentrations of 3-nitrotyrosine and tyrosine in the cerebrospinal fluid in patients with PD and SALS

	n	3-nitrotyrosine (nM)	tyrosine (nM)	3-nitrotyrosine /tyrosine(×10 ⁻⁴)
Controls	20	1.5±0.6	5935±806	2.5±0.9
PD	15	1.6±0.7	6558±942 ^a	2.4±1.0
SALS	19	9.0±4.2 ^b	6227±1071	15.6±8.8 ^b

a : p<0.05 compared with controls

b : p<0.0001 compared with PD and controls

1) 岩手医科大学神経内科

考 察

NOは細胞毒性があるが、NOとO₂⁻から生成されるONOOはさらに細胞毒性が強いことが示されている。ONOOは寿命が非常に短く、瞬時にヒドロキシラジカル(OH[•])を生成する。このOH[•]は非常に反応性の高いラジカル種であり、SH基の酸化や脂質の過酸化を起こすなどして細胞に障害を起こすとされる。また核酵素であるポリ(ADP-リボース-)シターゼ(PARS)を活性化して細胞内のエネルギーを消費してアポトーシスなどの細胞死を誘発するとされる。3-nitrotyrosineはONOOがtyrosineをニトロ化することにより生成される物質であり、ONOOによる障害の生化学的マーカーと考えられている。

現在まで、PDおよびALSにおける髄液中での3-nitrotyrosine濃度に関する報告は全くない。

これまでのPDにおける研究は、Goodら¹⁾がPD患者剖検脳の黒質を用いて免疫組織化学染色法で検討したものである。黒質のレビー小体内で3-nitrotyrosine発現が強く認められ、正常対照群ではこのような変化を認めないことより、PDの黒質ではONOOによる酸化的障害が神経細胞の変性に関与すると報告している。

ALSにおける検討では、最初にBeckmanら²⁾がfamilial ALSの脊髄前角の運動ニューロンで3-nitrotyrosineが存在することを報告した。Abeら³⁾もSALS患者剖検例の脊髄前角で正常対照群に比しSODは変化なかったが、3-nitrotyrosineの染色性は増加しておりtyrosineのnitrationが亢進していると報告している。Ferranteら⁴⁾はヒト変異SOD-1遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(ALS Tgマウス)を用い検討し、upper, lower spinal cordおよびcortexにおいて3-nitrotyrosineが増加していたとしている。また、Bealら⁵⁾はsporadicおよびfamilial ALS患者の胸腰髄前角で3-nitrotyrosineおよびその代謝産物である3-nitro-4-hydroxyphenylacetic acidを測定している。胸髄では3-nitrotyrosineが有意に増加し、胸髄、腰髄では3-nitrotyrosineおよび3-nitro-4-hydroxyphenylacetic acidが有意に増加していたことより、sporadicおよびfamilial ALSの病因として、いずれにおいてもONOOによる酸化的障害が考えられると報告している。

今回の髄液中での検討では、未治療PDにおいてtyrosineは増加していたが、3-nitrotyrosine濃度および3-nitrotyrosine/tyrosine比の増加は認められなかった。また、罹病期間や症状の進行とも相関を認めなかったことよりPDの病態にONOOが関与する可能性を支持する所見は得られなかった。

一方、未治療SALS群では髄液中3-nitrotyrosine濃度および3-nitrotyrosine/tyrosine比が正常対照群、PD

群に比し有意に増加しており、SALSではtyrosineのnitrationが亢進していること示唆された。このtyrosineのnitrationは、蛋白分解によるneurofilamentの障害やtyrosine kinaseのリン酸化を障害し、軸索輸送およびシナプス伝達系を障害し運動ニューロン死を引き起こす可能性がある。今回の検討では、髄液中3-nitrotyrosine濃度、3-nitrotyrosine/tyrosine比と罹病期間、重症度との間に有意な相関は認められなかったが、今回の症例は罹病期間が短く、発症後間もないことを考慮すると、ALSの発症機序にONOOが何らかの形で関与している可能性があると考えられる。

文 献

- 1) Good P.F., Hsu A., Werner P., et al : Protein Nitration in Parkinson's Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57 : 338-342, 1998.
- 2) Beckman J.S., Carson M, Smith C.D., et al : ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364 : 152-154, 1995.
- 3) Abe K., Pan L.H., Watanabe M., et al : Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 199 : 152-154, 1995.
- 4) Ferrante R.J., Shinobu L.A., Schulz J.B., et al : Increased 3-Nitrotyrosine and Oxidative Damage in Mice with a Human Copper/Zinc Superoxide Dismutase Mutation. *Ann. Neurol.* 42 : 326-334, 1997.
- 5) Beal M.F., Ferrante R.J., Matthews R.T., et al : Increased 3-nitrotyrosine in Both Sporadic and Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann. Neurol.* 42 : 646-654, 1997.

MPP+による培養小脳顆粒細胞への α -シヌクレイン蓄積

谷脇 考恭、 山田 猛、 朝原 秀昭、 三田 洋、
大八木保政、 吉良 潤一

はじめに

近年、家族性のパーキンソン病に於いてアミロイド蛋白である α -シヌクレインの遺伝子異常が報告され、さらに孤発性のパーキンソン病に於いても、疾患に特有のレビー小体が α -シヌクレインに対する抗体で強く染色されることから^{2,3)}、 α -シヌクレインの異常蓄積がパーキンソン病の病態に深く関わっていると考えられ、現在最も注目をあびている。 α -シヌクレインが蓄積する機序は不明であるが、パーキンソン病惹起物質であるMPTPを動物に投与すると、レビー小体様の構造物が形成されるとの報告がある⁴⁾。私どもはMPTP様物質によるミトコンドリアの機能障害が α -シヌクレイン蓄積の原因と考え、MPP+を培養小脳顆粒細胞に投与し、 α -シヌクレインの発現を解析した。

方法

生後7日目のラットより小脳摘出後、トリプシン処理を行い、培養小脳顆粒細胞を作成し、血清添加培地にて培養した。24時間後にAra-Cを10 μ M加え、Glial細胞増殖を抑制した。培養8日目にMPP+を加え、cell viabilityをfluorescein diacetateを用いて検討し、Hoechst 33258およびDNA fragmentation解析により、apoptosisを同定した。またWestern blot法を用いて、 α -シヌクレインの発現を解析した。さらに免疫染色を行い、 α -シヌクレインの発現を組織学的に検討した。

結果

1) MPP+の濃度および incubation time の設定。

MPP+の濃度を変化させ、投与24時間後にfluorescein diacetateを投与し cell viabilityを検討したところ、MPP+の濃度が50 μ Mではcontrolと差はないが、100 μ M以上で細胞死をきたした (Fig. 1)。Live cellを写真にとりcountして定量化すると、MPP+が100 μ M以上で有意に細胞数の減少をきたした (Fig. 2)。よって以下の実験ではMPP+は100 μ Mで行った。次にMPP+を100 μ M投与し、cell viabilityを時間を追って検討した。投与12時間までは変化ないが、18時間以降に初めて細胞数の減少をきたした (Fig. 3)。Time course analysisでは、MPP+投与18時間以降に、有意に細胞数の減少をきたした (Fig. 4)。

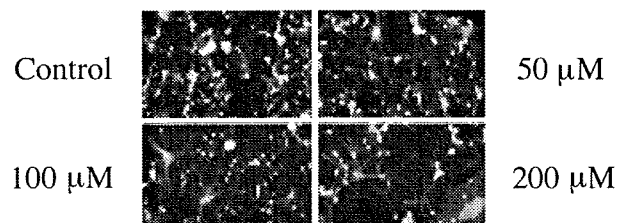


Fig. 1. Dose-response analysis of the effect of MPP+ on cell viability

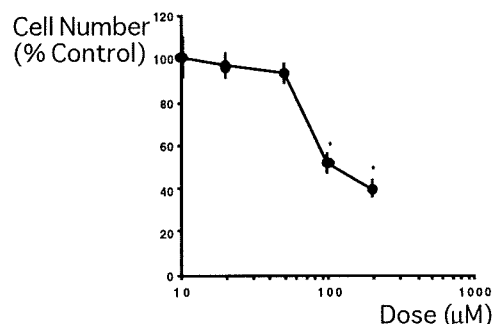


Fig. 2. Dose response curve showing the effect of MPP+ on cell number (Mean \pm SEM; * p <0.05 to control)

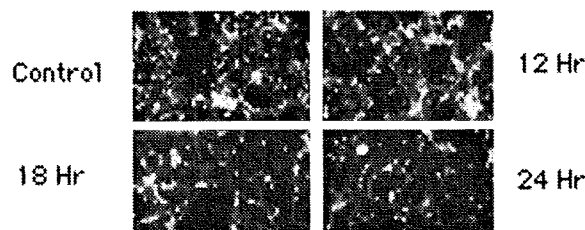


Fig. 3. Time course analysis of the effect of MPP+ (100 μ M) on cell viability

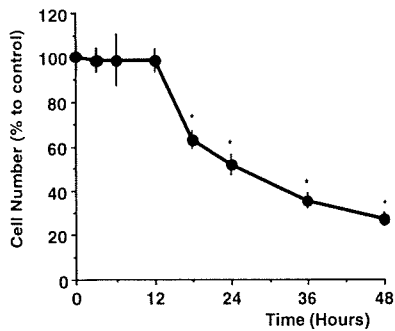


Fig. 4. Time course curve showing the effect of MPP+ (100 μ M) on cell number (Mean \pm SEM; * p <0.05 to control)

2) apoptosis の同定。

培養小脳顆粒細胞をパラフォルムアルデヒドにて固定し、Hoechst 33258にて染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。MPP+を100 μ M、24 hr投与すると、核の condensation が見られた (Fig. 5)。さらにMPP+を100 μ M、16 hr 投与後、DNAを回収してアガロースゲルにて泳動し、エチジウムブロマイドにて染色したところ、DNAの断片化を認めた (Fig. 6)。以上より神経細胞の減少は apoptosis によるものと考えられた。

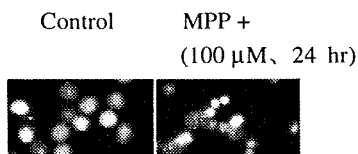


Fig. 5. Hoechst 33258 stain with or without MPP+

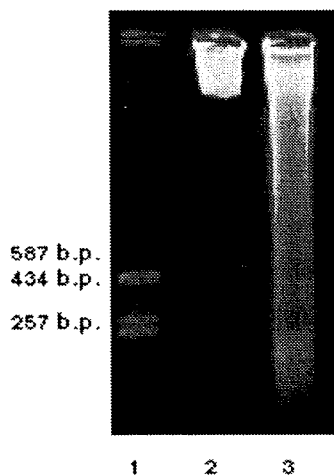


Fig. 6. DNA fragmentation induced by MPP+. 1: size marker, 2: Control, 3: MPP+ (100 μ M, 16 hr)

3) Western blot 法による α -シヌクレインの発現解析

MPP+を100 μ M投与し時間的検討を行うと、投与4、8時間後では変化ないが、投与12、18、24、36時間後で α -シヌクレインは有意な増加を示した (Fig. 7)。

MPP+投与24時間後に濃度依存解析を行ったところ、 α -シヌクレインは20 μ Mまでは変化ないが、50、75、150 μ Mにて有意な増加を認めた (Fig. 8)。

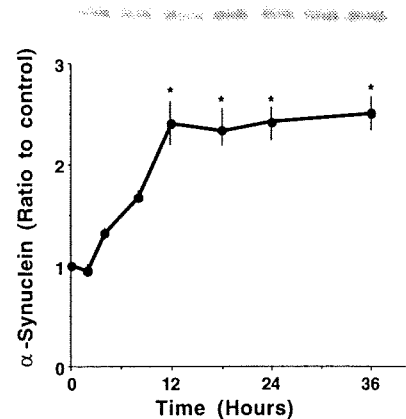


Fig. 7 Western blotting and time course curve showing the effect of MPP+ (100 μ M) on α -synuclein expression (Mean \pm SEM ; * p <0.05 to control)

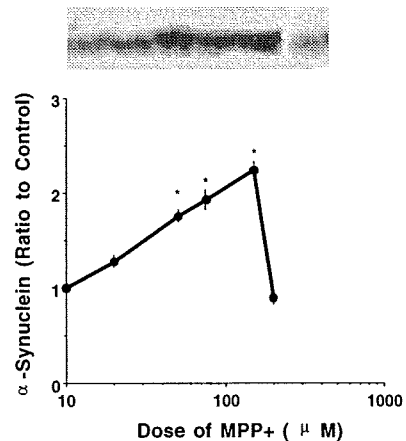


Fig. 8 Western blotting and dose response curve showing the effect of MPP+ on α -synuclein expression (Mean \pm SEM; * p <0.05 to control)

4) 免疫染色による α -シヌクレインの発現解析 (Fig. 9)

MPP+を150 μ M投与し、24時間後にパラフォルムアルデヒドを用いて固定し、 α -シヌクレインに対する抗体を用いて免疫染色を行い、DABにて発色した。その結果MPP+投与群では、多くの顆粒細胞にて染色性を認め

た。各々の細胞では特に細胞質が強く染まっていた。

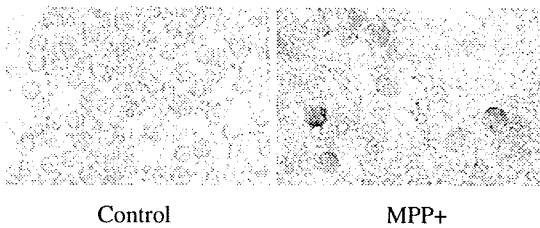


Fig. 9. Immunocytochemistry showing the effect of MPP+ (150 μ M, 24 hr) on α -synuclein expression

考察

時間的検討より、MPP+投与により α -シヌクレインは増加し、それに遅れて神経細胞死が起ったことより、 α -シヌクレインの発現は、MPP+による神経細胞死の比較的初期の段階で変化していることが示された。さらに濃度依存解析を行うと、50-150 μ Mの範囲にて濃度依存性を認めた。この濃度では主にapoptosisを来すが、これ以上の濃度ではnecrosisが主となることが報告されている⁵⁾。つまり α -シヌクレインの増加はapoptosisによる神経細胞死に関与しているが、necrosisには関与していないことが示唆された。

免疫染色による組織学的検討より、 α -シヌクレインの増加は顆粒細胞（神経細胞）に起っていることが示された。個々の細胞では主に細胞質辺縁の染色性が強かった。今後はmRNAの発現を含めて検討したい。

文献

- 1) Polymeropoulos MH et al; Science 276(5321): 2045-2047, 1997.
- 2) Spillantini MG et al; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6469- 6473, 1998.
- 3) Baba M et al; Am. J. Pathol. 152: 879-884, 1998.
- 4) Forno LS et al; Adv. Neurol. 60: 600-608, 1993.
- 5) Du Y et al; J. Neurochem. 69: 1382-1388, 1997.

神経変性疾患における glycation の関与

森若 文雄 新保 和賢 菊地 誠志 緒方 昭彦 田代 邦雄

はじめに

蛋白の Glycation は、可逆的な Schiff base の形成から初期反応生成物である Amadori 化合物を経て、様々な修飾のあと、最終産物である advanced glycation end products (AGEs) に至る。この過程において、reactive oxygen species の発生による細胞障害や、蛋白の生物活性の変化、架橋、凝集体形成への関与が指摘されている。従来糖尿病合併症において研究が進められてきたが、最近神経変性疾患においてもその関与が示唆されている。昨年我々は glycation の最終産物である AGEs の生成を促進する methylglyoxal (MG) と 3-deoxyglucosone (3-DG) の神経毒性を報告した。今回神経変性疾患、特に ALS と Parkinson 病における glycation の関与をさらに明らかにするために、培養 neuron 及び実際の剖検脳、脊髄を用いて検討したので報告する。

方法

胎生 14 日 SD ラット胎児から大脳皮質、中脳、脊髄を分離、脊髄はあらかじめ用意した皮質由来の glia sheet 上に、その他は直接 chamber slide に分散培養した。実験は培養 7 日から 10 日に行い、neuron 同定には MAP2、dopaminergic neuron の同定には tyrosine hydroxylase (TH)、motor neuron 同定には SMI 32 各染色を用いた。MG、3-DG (東海大学総合医学研究所 宮田敏男先生より御供与)、N-acetylcysteine (NAC)、buthionine sulfoximine (BSO) は 24 時間前処置、aminoguanidine (AG) は同時投与も追加した。神経毒性の評価は、生存 neuron の胞体数を直接数え control と比較し % 表示した。また、AGEs の存在を孤発性 Parkinson 病剖検脳 2 例と孤発性 ALS 剖検脊髄 3 例で検討した。抗体は polyclonal 抗 1-hexitollysine (1-HL) 抗体 (大阪大学医学部生化学 藤井順逸先生、谷口直之先生より御供与)、polyclonal 抗 carboxymethyllysine (CML) 抗体及び抗 non-CML 抗体 (いずれも北陸大学薬学部生化学 竹内正義先生より御供与) を用いた。

結果

北海道大学大学院医学研究科脳科学専攻
神経病態学講座神経内科学

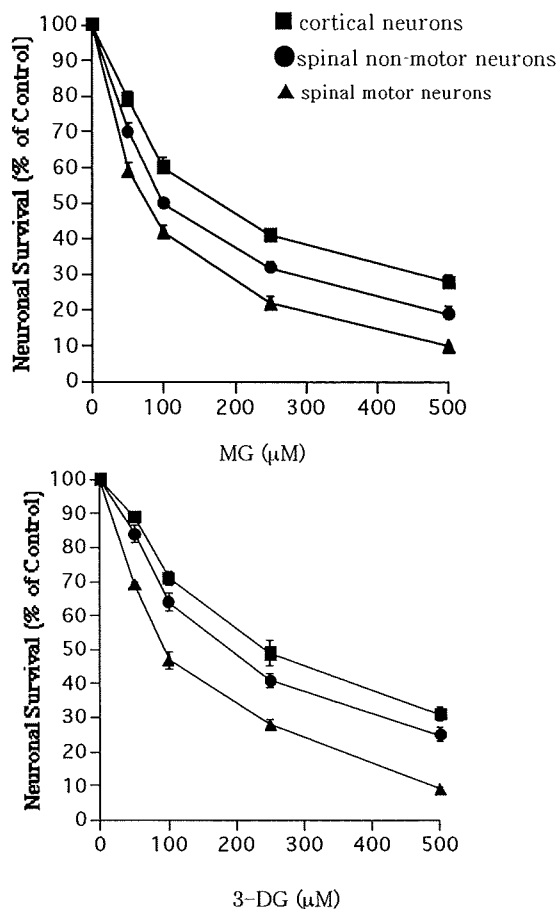


図1 Neurotoxicity of MG and 3-DG on cultured spinal cord neurons.

MG、3DG ともに用量依存性に神経毒性を認めた (図 1)。

大脳皮質 neuron、脊髄 non-motor neuron に比較して脊髄 motor neuron は有意に生存率が減少していた。抗酸化剤として NAC 10 mM 24 時間前処置により有意に生存率が高くなっており神経保護作用を認めた (図 2)。

Motor neuron の NAC による保護率が non-motor neuron の保護率より高くなっていた (図 3)。

Glutathione depleting agent である BSO 10 μM 前処置により、MG 毒性に対する motor neuron の生存率が有意に減少した。

AGE 生成阻害剤として知られている AG は同時投与により生存率の改善を認めた。前処置では保護作用を認めなかった。

脊髄培養細胞にMG 100 μM を24時間暴露し、抗CML抗体及びCML, pentosidine, pyrraline, 1-HLを認識しない抗non-CML抗体で染色した。暴露量は50%細胞障害濃度に近く、neuron細胞体の膨化、神経突起の短縮、

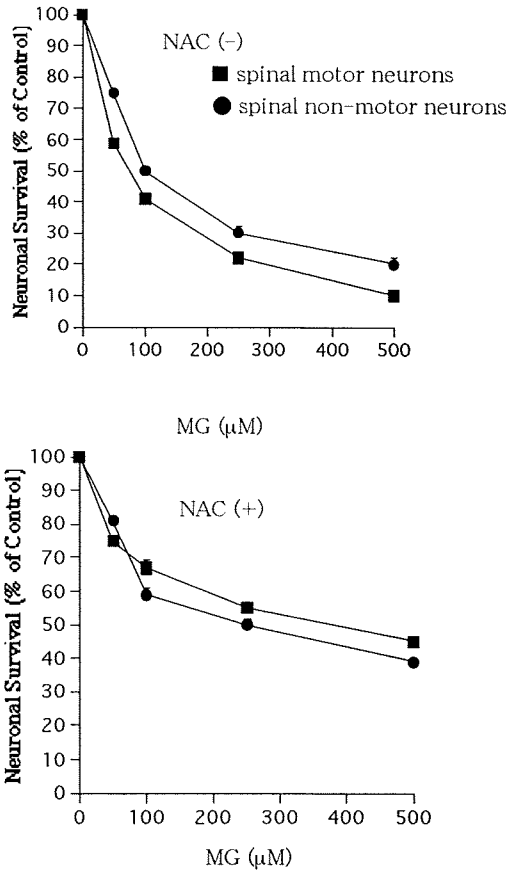


図2 Protective effect of NAC against MG neurotoxicity on cultured spinal cord neurons.

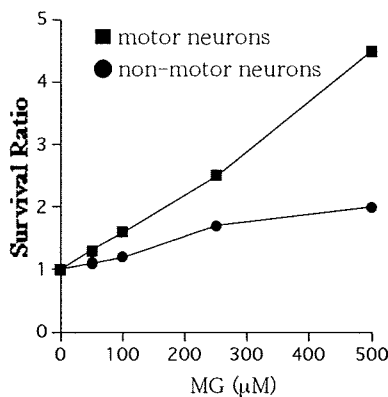


図3 Survival ratio by NAC against MG neurotoxicity on cultured spinal motor neurons.

断裂、消失を認め、その障害されたneuron細胞体に、顆粒状の染色を認めた。

孤発性ALSの剖検脊髄ではGlycation初期産物を反映する抗1-HL抗体ではaxonal spheroidに著明な染色性を認めた。抗CML抗体では、残存萎縮motor neuronとgliaに染色性を認めた。抗non-CML抗体ではspheroidとmotor neuron胞体が染色された。

一方、培養中脳neuronにおいてMGおよび3-DGはdopaminergic neuron, non-dopaminergic neuronに差なく神経毒性を示した(図4)。NAC前処置及びAG共処置は両neuron groupとも同程度の保護作用を示した。BSO

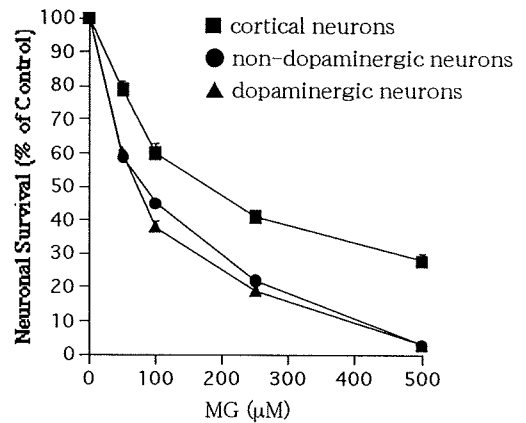


図4 Neurotoxicity of MG on cultured mesencephalic neurons.

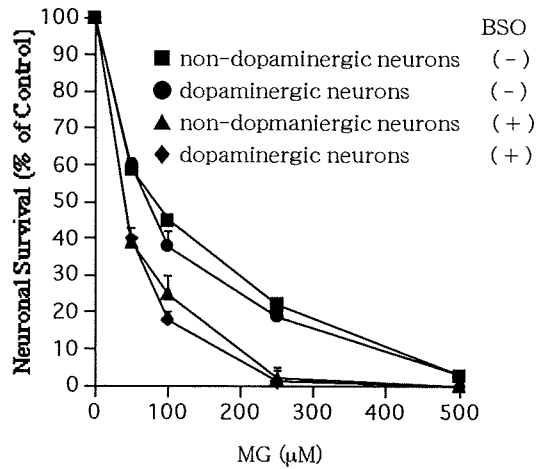


図5 Effect of BSO in MG neurotoxicity on cultured mesencephalic neurons.

前処置も同様に両 neuron group に差なく MG、3DG の毒性を増強していた (図5)。

Parkinson 病剖検脳における抗 non-CML 抗体染色では Lewy body を観察したが、染色性が一定せず今回の検討からは、はっきりした結論は導き出せなかった。

考 察

MG、3-DG は培養脊髄、中脳ニューロンに毒性を示した。脊髄 motor neuron にその感度が高く、NAC は運動 neuron 保護作用が著明であり、glutathione depleting agent でさらに感受性が増加することより抗酸化機序としての glutathione system が motor neuron では脆弱であることを示唆していると考えられた。AG は同時投与で保護作用を示し、前処置では保護作用が観察されなかったことから、MG、3-DG に対する直接作用が考えられた。

中脳 neuron では dopaminergic, non-dopaminergic neuron の間に毒性差を認めず、また glutathione depleting agent にても差なく感受性増加を認めた。Dopaminergic

neuron の特異性はなかったが glutathione system の重要性を示唆していた。

孤発性 ALS 剖検脊髄による検討では、CML は主に motor neuron 胞体と glia に存在していた。CML は lipid peroxidation を強く反映していると考えられ、これだけからは glycation の直接関与は結論できず、以下の2種類の抗体の検討が重要だった。Glycation 初期生成物である 1-HL は主に spheroid に染色性を認めており、持続的かつ常時新しい glycation が起こっている可能性が示唆された。それに引き続き AGEs 化が進んでおり、non-CML AGE の存在が確認された。また抗 non-CML 抗体では motor neuron 胞体にも染色性を認めていた。Motor neuron 胞体は初期生成物では染色性を認めていなかった。この所見の理由は、抗体の感度の問題もあると考えられるが、胞体内に存在する target 蛋白が glycation を受けると初期生成物に止まらず、すぐ AGE 形成に移行する、spheroid におけるのとは別の蛋白である可能性も考えられた。

Parkinson 病剖検脳では、Lewy body の染色性は一定せず、今回の検討のみでは結論することができなかった。

家族性パーキンソン病の変異解析

服部信孝¹, 北田 徹¹, 志村秀樹¹,
久保紳一郎¹, 浅川修一², 蓑島伸生², 清水信義², 水野美邦¹

目 的

孤発型パーキンソン病 (PD) の原因は未だ明らかにされていないが、酸化ストレス、ミトコンドリア機能異常など変性の課程で起こっていることは、明らかにされつつある。PDにおける遺伝的素因の関与は、明らかにされていないが、家族性PDの遺伝子座の同定や原因遺伝子が単離され、遺伝的素因の関与がクローズアップされている。単一遺伝子異常で黒質神経細胞死が生じることは、明らかであり、機序の解明は直接孤発型孤発型PDの原因解明に繋がる可能性が高い。現在明らかにされているのは常染色体優性遺伝形式をとる家族性PDは、常染色体2番短腕(1), 4番短腕(2), 長腕(3, 4), そして6番長腕(5)である。原因遺伝子が解っているのは、Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase 1 (UCH-L1) (2), alpha-synuclein (2, 3)そして我々が慶應義塾大学分子生物学教室清水教授との共同研究にて単離に成功したparkinである(6)。常染色体劣性遺伝形式を呈する若年性パーキンソンニズム (AR-JP) は、40歳以前に発症し、日内変動や睡眠効果が認められ、Levodopaに良好な反応を示し、ジストニアを呈し、dopa induced dyskinesiaを生じやすく、腱反射亢進を認め痴呆や自律神経症状を認めない独立疾患である(7)。parkin geneは、エクソン12個よりなるアミノ酸465個の新規蛋白である。また機能については全く何も解っていない。したがって変異解析を行い機能ドメインを推定していくことが重要である。我々は、まずエクソン-イントロン境界部分の塩基配列を基に臨床AR-JPと思われる日本人18家系とトルコ2家系について遺伝子変異解析を行った。更にペプチドに対する抗体を作製し、AR-JP患者と孤発型パーキンソン病剖検脳におけるパーキン蛋白の発現を検討した。変異解析の結果及び蛋白発現の分布について報告する。

方 法

臨床AR-JPと診断された18家系について変異解析を行った。症例は全て染色体6番長腕にマップされている(5, 8)。臨床症状的にはAR-JPとして何ら矛盾は認めていない。既に報告されているイントロン-エクソン境界の塩基配列を基にリンパ球より抽出したgenomic DNAをtemplateにPCR法にてdeletionの有無を検討した。deletionの存在しない症例についてはPCR産物を直接塩

1) 順天堂大学医学部脳神経内科,

2) 慶應義塾大学医学部分子生物

基決定法にてpoint mutation, insertion, small deletionの有無を検討した。更にethnic backgroundの違いを検討するため常染色体6番長腕にマップされたトルコ家系2家系について変異解析を行った。抗体の作製についてはアミノ酸番号124-137 (M-73) と293-306 (M-74) の二カ所について合成ペプチドに対し、ポリクローナル抗体を作製し、変異解析でAR-JPと診断できた2症例について免疫組織化学的及びWestern blotにて検討をした。また細胞内局在を検討するためfractionationを行い、その分布を検討した。孤発型パーキンソン病で認められるLewy小体については、抗alpha-synuclein抗体、抗ユビキチン抗体を用いてパーキン蛋白とのcolocalizationの有無を検討した。

結 果

10家系にexonic deletionを認めた。exonic deletionの分布はexon 3-5に集中していた。exon 3のみが2家系、exons 3-4が3家系、exon 4のみが3家系、exon 5のみが2家系であった。mutation効果としては、out of frameshift及びin-frame shiftを認めた。またexon 5及びintron 4の境界にacceptor site乃至グリシンコドンのGGTからguanineが一個deletionしているone-base deletionを2家系に認めた。このone-base deletionは、out of frame shiftを示していた。このためearly premature stopコドンが、出現しパーキン蛋白質のほぼ半分ができないことが推測された。残り6家系については、homozygousなmutationを認めなかった。compound heterozygotesの可能性が考えられた。トルコ家系については、missense or nonsense mutationsをexon 6及びexon 8内に認めた。パーキン蛋白の検討であるが、peptide抗体の特性をまず、Western blotで確認した。Western blotでは52 kDaに一致してsingle bandを認めた。40 kDa付近にも弱いbandを認めており、パーキン蛋白がprocessingされる可能性考えられた。AR-JP患者では52-kDa bandを認めなかった。fractionationでは、Golgi, cytosol fractionにbandを認め、Golgiとcytosolに分布する蛋白であることが解った。またregionごとの検討では、正常対照では、黒質に最も強く蛋白発現を認めた。免疫組織化学的検討では、黒質、線条体、大脳皮質の切片をABC法にてdiaminobenzidineで発色した。正常対照と孤発型パーキンソン病では、黒質神経細胞に最も強く染色性を認めた。線条体、皮質神経細胞は、染色されるが、明らかに黒質メラニン含有神経細胞と比して、

染色性が弱かった。組織化学的検討も、Western blotの結果をサポートしており、パーキン蛋白はGolgi及びcytosolに分布する蛋白であることが考えられた。Lewy小体の検討では、抗alpha-synuclein抗体ほど強く染色されないが、一部のLewy小体では、パーキン蛋白が陽性であった。

考察

18家系の変異解析では、多くの症例でexonic deletionを認めた(9)。またdeletionの分布は、exons 3-5に集中していた。更に症例を増やしていけば、変異の多様性が認められる可能性はあるが、この領域にHot spotが存在することが推測される。exonic deletion以外では、intron 4 or exon 5の境界にone-base deletionを認めた(9)。この変異効果はframeshift mutationであり、premature stop codon が出現することが予想され、パーキン蛋白のほぼ半分が合成されないことが考えられる。解析した家系のうち6家系についてはhomozygousな変異を認めていない。この6家系も常染色体6番の長腕にマップされており、変異が存在しなかった説明としてcompound heterozygotesが考えられる。パーキン遺伝子は巨大遺伝子であり、全長恐らく最低でも1 Mbはあると考えられる。したがってexonic deletionが別々のアレルに存在した場合、それを判定するのは困難である。更にcompound heterozygoteを示唆するデータとしてパーキン遺伝子近傍のmicrosatellite markerを用いたhaplotype analysisでも、compound heterozygotesを示唆する結果が得られており、若年発症の血縁結婚を認めていない家系などではcompound heterozygotesである可能性があり、これを決定する方法の開発が望まれる。現在我々の研究室では、ABI 7700でTaqMan probeを持ちたPCR産物を定量することでhemizygotesを決定する方法を検討しており、一部の患者でcompound heterozygotesであることを確認している。トルコ家系でmissense及びnonsense mutationsを認めた。nonsense mutationの存在は、パーキン遺伝子が巨大遺伝子であるが故にイントロン内に別の遺伝子が挿入されている可能性を完全に否定するものである。またmissense mutationについては、exon 6のmissense mutationはcasein kinase 2のリン酸化サイトに位置しており、パーキン蛋白がリン酸化蛋白の可能性が考えられた(10)。computer analysisを行うとcasein kinase 2のみならず様々なリン酸化酵素によってリン酸化されるconsensus sequenceを認めている。もしリン酸化されるのであれば、このサイトは有力な部位であり、point mutationによってリン酸化されなくなる可能性が推測された。今後の検討が必要である。missense mutationは、パーキン蛋白の機能を考える上で、重要な情報を提供している。日本人患者においてもmissense mutationの存在

は確認しており、今後、変異と臨床症状の関連を検討していくことで機能解析に繋げていく必要がある。

パーキン蛋白の機能解析をする上で抗体の作製は重要である。我々はアミノ酸配列を基にペプチド抗体を作製し、特異性を検討した。特にM-74抗体は、前頭葉より抽出したsampleを用いたWestern blotで、52-kDa bandを認めている(11)。40-kDa bandも認めているが、その意義については不明である。パーキン蛋白がprocessingされるか否かは、不明である。今後更に複数のペプチド抗体を作製し、検討する必要がある。Western blotでは、AR-JP患者では、bandを確認できていない。これは蛋白が欠損していることを示している。但し、我々が用いたsampleはexon 4のdeletionであり、frameshift mutationであることよりunstable proteinになっている可能性がある。in-frameshift mutationを呈しているsampleについてはパーキン蛋白が存在しているのか否かは不明である。またmissense mutationの患者についても、その点については解らない。muscle biopsyを考慮する必要があると考える。細胞内分布では、Golgiとcytosolに存在していたことよりvesicular transport systemに関与している可能性が高い(11)。Golgiに存在していることより細胞内輸送に関与している蛋白と推測するのが妥当と考える。我々の行ったfractionationが間違っていないことを証明するためgamma-adaptinをGolgi markerとしてWestern blotを行い確かにfractionationでGolgi分画がとれていることは確認している。免疫組織化学では、黒質メラニン含有細胞に極めて多く存在しているのを確認した。一方、線条体、皮質神経細胞では弱く染色された。これら所見はAR-JP患者の病理学的特徴と一致している。AR-JPでは黒質、青斑核に変性が限局しており、パーキン蛋白が黒質で最も強く発現していることは説明が可能になる。しかしながら、mRNAレベルでは、ubiquitousで発現を認めており、またWestern blotでも前頭葉のsampleでパーキン蛋白の発現を認めている。蛋白レベルにおいても黒質のみに発現していると結論づけることはできない。では何故黒質神経細胞に多いのか？正常対照のsampleを黒質、線条体、皮質をWestern blotで、その発現を確認した。やはり黒質で最も多く発現していた。孤発型パーキンソン病では、むしろ黒質で最も発現が少なかった。但しパーキンソン病では神経細胞数の減少は著しく、そのため薄いbandとして観察されたものとする。実際パーキンソン病の剖検脳を用いた組織化学的検討では正常対照と差異なく黒質神経細胞が最も強く染色されている。黒質に発現が多い理由としては、パーキン蛋白と特異的に反応するunknown proteinが存在し、そのinteractionする蛋白が黒質に存在しているか黒質では安定性が高いことが仮説として考えられる。更に検討を加えていく必要がある。現在two hybridにてinteractionする蛋白を検索している。

免疫組織化学的検討で特筆すべきことは、パーキン蛋白もLewy小体のcomponentの一つであることを示したことである。alpha-synucleinとは違いその染まりかたはvariationが存在するが(12)、抗ユビキチン抗体で確かにcolocalizationすることが確認できた。AR-JPでは、Lewy小体は存在しないので(13)、パーキン蛋白はその形成において必須な蛋白であることが考えられる。事実パーキン蛋白がLewy小体のcomponentであることは、それを示している。今後の課題としては、どのようなLewy小体が染まるのか検討を加えていく必要がある。細胞内局在からパーキン蛋白の機能を推測しているが、組織学検討では限界がある。我々の研究室ではGreen fluorescent protein (GFP)をtagとしてcell biologyを用い機能解析を行っている。内在性パーキン蛋白をもつcell lineも確認しており、パーキン-GFP fusion proteinを用い misense mutationやdeletional mutationをもったmutant proteinを作製し、wild typeとの機能の違いを検討している。loss-of-functionのパーキン蛋白の機能解明は、AR-JP患者のみならず孤発型パーキンソン病の治療応用できる可能性が大であると考えられる。loss-of-functionであるパーキン蛋白は、神経細胞特にドパミン神経細胞の維持に何らかの機能を持っていることが考えられる。したがってAR-JPのみならず孤発型パーキンソン病の遺伝子治療のターゲットとして格好の候補遺伝子である。AR-JPの患者は少ないがreplacement therapyを含めた治療の確立が必要である。更に孤発型パーキンソン病との関連が明らかになれば黒質神経細胞の神経保護作用を目指した治療への応用も十分視野に入れていくことができる。パーキン蛋白の機能解析は極めて重要な課題である。

文献

- 1) Gasser T, et al. Nat Genet 18: 262-265,1998
- 2) Leroy E, et al: Nature 395:451-452, 1998
- 3) Polymeropoulos MH, et al: Science 276:2045-2047,1997
- 4) Krüger R, et al: Nature Genet 18:106-108, 1998
- 5) Matsumine H, et al: Am J Hum Genet 60:588-596, 1997
- 6) Kitada T, et al: Nature 392:605-608, 1998
- 7) Yamamura Y, et al: Neurology 23:239-244, 1973
- 8) Matsumine H, et al: Neurology 50:1340-1345, 1998
- 9) Hattori N, et al: Ann Neurol 44:935-941,1998
- 10) Hattori N, et al: Biochem Biophys Res Commun 249:754-758, 1998.
- 11) Shimura H, et al: Ann Neurol 1999 (inpress)
- 13) Spillantini MG, et al: Nature 1997;388:839-840
- 13) Takahashi H, et al: Neurology 44:437-441, 1994