

平成11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

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
総括研究報告書

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

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に基づくアポトーシスによる神経細胞死であることを支持する死後脳の成績として、神経栄養因子の BDNF と NGF が黒質線条体部位に特異的に、著明に減少していることを見出した。また炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ の受容体 TNF-receptor 1 が増加していることを示した。さらに apoptosis 経路の下流に存在する apoptosis 実行酵素である caspase 1 と caspase 3 の活性が有意に増加していることを見出した。apoptosis 経路の上流に存在するミトコンドリアにおける酸化的ストレスの亢進については、パーキンソン病死後脳黒質において DNA の酸化的障害で生じる 8-oxo-deoxyguanine (8-oxo-dG)を取り除く酵素である 8-oxo-dGTPase が著明に増加していることを免疫組織化学で立証した。常染色体劣性・若年性パーキンソン病(ARJP)の原因遺伝子 *parkin* を発見したが、遺伝子産物 Parkin タンパク質が、孤発性パーキンソン病及び対照患者の黒質線条体で発現が高く、細胞質と Golgi 装置に発現しており、Parkin タンパク質が軸索輸送に関与するタンパク質で、その欠損が黒質の変性に深く関わっていることが示唆された。神経細胞を保護する根本的治療法の開発の研究として、ドーパミン受容体アゴニストのパーキンソン病治療薬 apomorphine が、アストログリアの培養細胞系で、上記のようにパーキンソン病死後脳の黒質で著明に減少することを認めた神経栄養因子である NGF と BDNF の mRNA とタンパク質とを著明に増加させること、従って神経保護作用の可能性を見出した。また、神経保護修復薬の候補薬のイムノフィリンリガンドである FK506 および GPI1046 は酸化的ストレスと apoptosis をおこす過酸化水素による細胞死を有意に阻害することを示した。これらの成績は、パーキンソン病における神経細胞死を防ぐ治療として、apoptosis 経路を阻害するドーパミン受容体アゴニストやイムノフィリンリガンドが有効であり神経保護作用によって病気の進行を阻止する可能性を示す。

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

鈴木崇弘

稲垣秀人

大江瑞恵

茂木真希雄（愛知学院大学歯学部）

戸苅彰史

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、高齢者に多発するアルツハイマー病について多い神経変性疾患であり、本邦における患者数は約 12 万と推定されさらに増加していくことが予測される。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選択的変性によりおこる。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、欠乏している神経伝達物質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、年余にわたる長期療法では約半数の患者で薬物効果不安定、異常不随意運動（ジスキネシア）、精神症状（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。このために、L-DOPA 療法に代わる根本的治療法を開発することは、高齢者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予防阻止し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大きいメリットを生ずることが期待される。

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発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、1994 年より世界で最初にパーキンソン病患者の死後脳と脳室—脊椎—脳脊髄液で、

サイトカイン類(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, EGF), apoptosis 関連タンパク質 (bcl-2, soluble Fas)の増加を見出し、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続いておこる apoptosis が関連する可能性を報告してきた(Nagatsu T and Mogi M, Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Plenum Press, New York: pp. 407-412, 1998)。平成 10 年度の研究で実験動物パーキンソン病モデルである 6-OH-ドーパミン半側パーキンソン病ラットと 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)パーキンソン病マウスで、黒質線条体部位に炎症性サイトカインの TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ が増加し、神経栄養因子の nerve growth factor (NGF)が減少することを見出した(Mogi M et al, Neurosci Lett 250: 25-28, 1998; Mogi M et al, Neurosci Lett 268: 101-104, 1999)。

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 Press, New York: pp. 393-399, 1998)。平成 10 年度の研究で、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I のサブユニット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、また常染色体劣性遺伝の家族性パーキンソン病の遺伝子 *parkin* を発見した(Kitada T et al, Nature 392: 605-608, 1998)。

小川グループ（岡山大学医学部）は、パーキンソン病モデル動物、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、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 A が阻止することを初めて報告した(Matsuura K et al, Neurol 146: 526-535, 1997)。平成 10 年度の研究で、免疫抑制薬 FK506 やサイクロスポリン A は、酸化的ストレスをおこす過酸化水素によ

る細胞死を有意に抑制することを示した。

久野グループ（国立療養所宇多野病院）は、神経栄養因子である、glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF)の剖検脳での変化と神経保護作用への臨床応用を研究してきた。平成10年度の研究で、ドーパミン神経毒 MPTP によるパーキンソン病サルで、黒質のドーパミン神経における GDNF の免疫染色が、細胞死を示すチロシン水酸化酵素の染色より早期に低下し、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 が低下することを示唆した。

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・免疫フイリン結合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と確立をめざして研究を進めている。

## 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）はパーキンソン病死後脳について、神経栄養因子 BDNF と NGF、および apoptosis 経路上流の TNF- $\alpha$  receptor 1 (TNF-R1, p55)量と apoptosis 経路の下流の caspase 1 と caspase 3 の活性を測定した。

パーキンソン病死後脳は、従来の研究では、主にドイツ Würzburg University の Dr. Peter Riederer の Brain Bank の材料を使用してきた。本研究では、水野グループおよび久野グループと共同して集めた神経疾患が全くない対照（14例）、パーキンソン病（15例）の剖検材料を使用した。対照例は男性6例、女性8例で、平均年齢60.8（24-82）年、パーキンソン病例は男性12例、女性3例で、平均年齢69.7（51-84）年で罹患期間は16.9（5-29）年であった。Postmortem time は、対照例9.5（3-18）時間、パーキンソン病例6.5（4-13）時間であった。脳は5mmの前頭断切片として、黒質、尾状核、被殻、小脳、前頭葉を切り出し-80℃に凍結した。脳組織は0.32 M sucrose/100  $\mu$ M phenylmethylsulfonylfluoride

(PMSF)/ leupeptin, pepstatin, antipain 各 50  $\mu$ g/ml でホモジネートとした。さらに lysis buffer (0.5 % Nonidet P-40, 0.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 2 mM PMSF, 10 mM N-2-hydroxyethylpiperidine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES·pH 7.5)で可溶化した。我々の確立した高感度酵素免疫測定法によって BDNF, NGF および TNF-R1 を測定した(Mogi M et al, Anal Biochem 138: 125-132, 1984)。Caspase 1 および caspase 3 の酵素活性は、100  $\mu$ g タンパク質を含む脳抽出液を酵素材料として、caspase 1 活性は acetyl-Tyr-Val-Ala-Asp- $\alpha$ -(4-methylcoumaryl-7-amide) (Ac-YVAD-MCA)を基質として用い、caspase 3 活性は acetyl-Asp-Glu-Val-Asp- $\alpha$ -(4-methylcoumaryl-7-amide) (Ac-DEVD-MCA)を基質として用いて、酵素反応によって遊離する 7-amino-4-methyl-coumarin (MCA)を、380 nm 励起/460 nm 蛍光で蛍光分光光度計により測定した。1  $\mu$ mol AMC/hr (37℃)を遊離する活性を1 unit とした。

2) 水野グループ（順天堂大学医学部）は、平成10年度の研究で劣性遺伝・家族性パーキンソン病の原因遺伝子 *parkin* の産物 Parkin タンパク質に対する抗体を作製して免疫組織化学で死後脳の Parkin タンパク質の存在を検索した。対象症例は、パーキンソン病15例、*parkin* 遺伝子に変異を有する若年性パーキンソン病3例、対照疾患8例である。前頭葉、線条体、中脳の切片をアビジンビオチン法により免疫組織化学で検索した。Western blotting は、対照脳の前頭葉・線条体・黒質のホモジネート、および前頭葉の可溶性画分・Golgi 画分・ミトコンドリア画分・マイクロソーム画分・核画分について、文献に報告した方法(Ann Neurol 45: 668-672, 1999)で行った。8-oxo-dGTPase および 8-oxo-dG の免疫組織化学的検索は、パーキンソン病6例、対照4例、多系統萎縮症3例について、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いて、diaminobenzidine 染色法で行った。

3) 小川グループ（岡山大学医学部）は、NG108-

15 細胞株を用いた過酸化水素による酸化ストレスによる神経細胞死評価法を確立してイムノフィリンリガンドの細胞死抑制効果を検索した。第2の方法として、6-OH-ドーパミン(60 µg/2 µl)をICR系雄性マウスの右側脳室内に単回投与して、酸化ストレスに基づく細胞障害の指標として、過酸化脂質量(TBA-RS)量、ドーパミンとその代謝物質を測定した。脳内酸化ストレス消去系の指標として、superoxide dismutase (SOD)とcatalaseの活性およびglutathione量を測定した。

4) 久野グループ(国立療養所宇多野病院)は神経細胞の保護に働くアストログリア細胞からの神経栄養因子の分泌を検索した。アストログリア細胞を古川らの方法(Furukawa et al, Biochem Biophys Res Commun 136: 57-63, 1986)で培養し、培養上清中のNGF, BDNF, GDNFを酵素免疫測定法で測定し、細胞の総RNAをNorthern blottingと半定量的RT-PCR法で半定量した。MPTPパーキンソン病サルでの神経細胞死と神経栄養因子GDNFの関係を検索するために、MPTPを静脈内注射して、6日、10日、20日、96日、130日目の脳のGDNFとチロシン水酸化酵素の免疫陽性神経細胞の数を計測した。

## C. 研究結果

1) 永津グループは、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)。それ以来IL-1β, IL-6等の炎症性サイトカインの増加を、パーキンソン病患者の死後脳や脳脊髄液、MPTPパーキンソン病マウスや6-OH-ドーパミン半側パーキンソン病ラットの動物モデルで立証した。これらの成績より、パーキンソン病は、素因遺伝子に神経毒など酸化ストレスをおこす環境因子が重なって部位特異的な炎症反応をおこし、apoptosis経路を活性化して、神経細胞死に至る、とのパーキンソン病のapoptosis仮説を提唱して研究を進めている。

ApoptosisはTNF-αなどの炎症性サイトカイン

の増量と共に、神経栄養因子の減少によっておこることが知られている。我々は、平成10年度の研究でパーキンソン病モデル動物であるMPTPパーキンソン病マウスの線条体で神経栄養因子NGFが高度に減少することを見出した(Mogi M et al, Neurosci Lett 268: 101-104, 1999)。そこで永津グループは、水野グループおよび久野グループと共同して、臨床的に十分に検討されたパーキンソン病死後脳と対照脳の供与をうけて、パーキンソン病死後脳で神経栄養因子の変化を検討した。その結果、パーキンソン病死後脳で黒質線条体部位に特異的にBDNFとNGFが著明に減少することを見出した。BDNFはヒト脳で濃度が高く、ng/mg proteinのレベルであった。正常対照脳でのBDNFの脳内分布は、尾状核>被殻>黒質>小脳≒大脳の順であり、線条体(尾状核と被殻)・黒質において濃度が高かった。BDNFはパーキンソン病線条体(尾状核、被殻)と黒質で、対照脳の20~50%のレベルまで著明に減少した。しかし大脳と小脳ではBDNF濃度の有意な変化は認められなかった。対照脳でNGFは濃度が低くpg/mg proteinのレベルであった。黒質での濃度は大脳より低かったが、パーキンソン病の黒質でNGF濃度が対照脳の約3%まで高度に減少することを見出した。BDNFやNGFなどの神経栄養因子の減少は酸化ストレスに対する抵抗性を減少させapoptosisを促進する。

これまでの研究で報告してきたパーキンソン病死後脳とパーキンソン病モデル動物の線条体部位におけるTNF-αやIL-1βの炎症性サイトカインの増加と共に、平成11年度の研究で明らかになった、パーキンソン病死後脳の黒質線条体部位における神経栄養因子BDNF・NGFの減少の成績はapoptosis経路の活性化による神経細胞死の可能性を示唆する。次に、apoptosis経路の最初に位置するTNF-R1(p55)量をパーキンソン病死後脳で酵素免疫測定法により定量した。対照脳ではTNF-R1は脳の各部位で等しく分布しており、約100 pg/mg proteinであった。TNF-R1はパーキンソン病死後脳の黒質、被殻、尾状核

において、部位特異的に対照脳の約 2 倍に増加していた。

ついで apoptosis 経路の下流に位置する caspase 1 と caspase 3 の活性をパーキンソン病死後脳で測定した。両酵素ともに対照脳で脳内分布はほぼ等しく、約 2  $\mu\text{mol AMC/hr/mg protein}$  (37°C) であった。Caspase 1 活性は黒質で平均 152% と有意に増加していた。Caspase 3 活性は黒質で 185% と caspase 1 よりもさらに著明に増加していた。さらに caspase 3 活性は、尾状核と被殻でも増加の傾向が認められた。Caspase 3 は apoptosis の最終段階と推定されている。

2) 水野グループ (順天堂大学医学部) は、平成 10 年度の研究で発見した、劣性遺伝・家族性パーキンソン病の原因遺伝子 *parkin* の産物である Parkin タンパク質の脳内分布を孤発型パーキンソン病脳と対照脳について、免疫組織化学により検索した。前頭葉、線条体、中脳の全ての神経細胞で免疫反応が認められたが、グリア細胞での発現は低かった。パーキンソン病で変性をおこす黒質緻密部有メラニン色素神経細胞での発現が最も強かった。細胞体と突起が染色されたが、核は染色されなかった。パーキンソン病黒質の Lewy 小体も染色されるものがあり、ユビキチン及び  $\alpha$ -synuclein との共存が二重染色で示された。

Western blotting で対照脳前頭葉では、Parkin タンパク質は Golgi 装置と可溶性画分に存在し、核とミトコンドリア画分には存在しなかった。対照患者では黒質に最も発現が多かった。*parkin* 遺伝子に変異を有する家族性パーキンソン病では Parkin タンパク質の発現がないことが免疫染色と Western blotting で確認された。孤発型パーキンソン病の黒質では、対照に比べて Parkin タンパク質が減少していたが、神経細胞の数の減少を反映している可能性がある。

孤発型パーキンソン病脳では、8-oxo-dGTPase 及び 8-oxo-dG の免疫染色は大部分の黒質ニューロメラニン含有細胞が陽性であったが、対照脳では陽性細胞は 10% 以下であった。また 8-oxo-

dG は核は染色されず、細胞質が染色されたので、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る。対照脳、多系統萎縮脳では、8-oxo-dGTPase 及び 8-oxo-dG は免疫染色でも Western blotting でも増加が認められなかった。従って黒質神経細胞のミトコンドリア DNA の酸化障害はパーキンソン病に特異的と考えられる。

3) 小川グループ (岡山大学医学部) は、NG108-15 細胞株を用いた  $\text{H}_2\text{O}_2$  による酸化的ストレスによる神経細胞死評価系を確立して、イムノフィリンリガンドの神経保護効果をしらべた。 $\text{H}_2\text{O}_2$  の添加により、細胞生存率は濃度依存的に低下し、 $\text{IC}_{50}$  は 500  $\mu\text{M}$  であった。イムノフィリンリガンドの FK506 も GPI1046 も、あらかじめ添加して培養した後に  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加して培養すると 30-300 nM で細胞生存率を有意に改善した。

6-OH-ドーパミン脳室内投与による脳内酸化ストレス消去系の変化を、脂質過酸化反応の指標である TBA-RS 量、glutathione 含量、catalase 活性、SOD 活性の変化によって検索した。Glutathione 量は脳室内投与後 3-14 日後有意に低下し、28 日には一過性に上昇し、56 日に正常レベルにもどった。Catalase 活性と SOD 活性はそれぞれ 28 日後と 7 日後に一過性の上昇を示した。イムノフィリンリガンドの FK506 または GPI1046 の連続投与で線条体 glutathione 量は用量依存的に増加した。6-OH-ドーパミン脳室内投与による *in vivo* パーキンソン病モデルで FK506 も GPI1046 も線条体におけるドーパミン量の減少を有意に改善した。

4) 久野グループ (国立療養所宇多野病院) は、平成 10 年度の研究において、ドーパミン神経細胞死を抑制し、その保護治療に効果的と考えられる神経栄養因子 GDNF の抗体を作製し、高感度免疫酵素測定法を確立して、パーキンソン病患者の脳脊髄液と血液の GDNF 濃度を測定したが、非パーキンソン病患者と対比して特異的な変化は検出できなかった。そこで、平成 11 年度

は、MPTP パーキンソン病サルで、黒質におけるチロシン水酸化酵素陽性ドーパミン神経細胞数と GDNF 陽性神経細胞数の変化を、経時的にしらべた。MPTP 注射後 10 日目では GDNF 陽性細胞は 62% 減少していたが、チロシン水酸化酵素陽性細胞は 16% の減少に留まっていた。20 日目では GDNF 陽性細胞は検出されず、チロシン水酸化酵素陽性細胞は 6% 残存していた。96 日目、136 日目は GDNF もチロシン水酸化酵素も検出されなかった。この成績は、MPTP パーキンソン病サルにおける黒質神経細胞死の機序には GDNF の減少が先行関与していることを示唆した。

ついで、パーキンソン病治療薬であるドーパミンアゴニスト apomorphine の神経細胞保護効果を培養アストログリア細胞を用いて検討した。Apomorphine (88  $\mu$ M) は、培養アストログリア細胞で NGF の分泌量を 122 倍に、GDNF の分泌量を 1.8 倍に増加させた。さらに細胞内の NGF mRNA と GDNF mRNA も有意に増加した。この成績は apomorphine はドーパミン欠乏の補充と共に神経栄養因子の NGF・GDNF を増加させて神経保護効果をもつことを示した。

#### D. 考察

永津グループ（藤田保健衛生大学総合医科学研究所）は、これまでにパーキンソン病死後脳とパーキンソン病モデル動物でサイトカインと神経栄養因子の変化を探索して以下の成績を報告した。(1) パーキンソン病剖検脳（線条体）と脳室-脊椎-脳脊髄液のサイトカイン類(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1)が增加すること(Mogi M et al, Neurosci Lett 165:208-210, 1994; Nagatsu T, Mogi M, Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases, Plenum, New York: pp. 407-412, 1998)、(2) パーキンソン病剖検脳（線条体）apoptosis 関連タンパク質の bcl-2, soluble Fas (sFas)が増加すること(Mogi M et al, Neurosci Lett 215: 137-139, 1996; Mogi M et al, Neurosci Lett 220: 195-198, 1996)、(3) パーキンソン病剖検脳（線条体）で、MHC-I の軽鎖である

$\beta$ 2-microglobulin が増加し、免疫反応が示唆されること(Mogi M et al, J Neural Transm [P-D Sect] 9: 87-92, 1995)、(4)MPTP パーキンソン病マウス及び 6-OH-ドーパミン半側パーキンソン病ラットの線条体で IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ が増加し、神経栄養因子の NGF が減少すること(Mogi M et al, Neurosci Lett, 250: 25-28, 1998; Mogi M et al, Neurosci Lett, 268: 101-104, 1999)。我々の以上の一連の研究は、パーキンソン病脳の黒質線条体部位で TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインが増加して、apoptosis 経路が活性化されて apoptosis により黒質線条体ドーパミンニューロンの死を起こす可能性を示唆する(Nagatsu T et al, Neurosci News, 2: 88-90, 1999)。

平成 11 年度の研究で、パーキンソン病死後脳（黒質線条体）で神経栄養因子 BDNF と NGF が著明に減少していることを見出した(Mogi M et al, Neurosci Lett 270: 45-48, 1999)。神経栄養因子の減少は apoptosis をひき起こす。この死後脳の成績と一致して、久野グループは、MPTP パーキンソン病サルで、平成 10 年度及び 11 年度の研究で、黒質ドーパミン神経のチロシン水酸化酵素免疫陽性細胞の減少で示される神経細胞死に先行して、神経栄養因子の GDNF が減少することを示した。さらに久野グループは、培養アストログリア細胞で、ドーパミン受容体アゴニストでありパーキンソン病治療薬である apomorphine が、apoptosis を防止する神経栄養因子である NGF と BDNF の量と mRNA 量を著明に増加させ、従って apomorphine は、不足しているドーパミンを補充するのみならず、神経栄養因子の NGF や BDNF を増加させる神経保護作用もあることを立証した。神経栄養因子はペプチドであり血液脳関門を通過して脳へ移行しないから、apomorphine のように低分子化合物で末梢から投与すると脳へ移行して脳内の神経栄養因子を増加させる、apomorphine よりさらに強力な神経保護作用をもつ新しい薬剤の開発が期待される。

永津グループは、さらにパーキンソン病黒質線条体で、apoptosis 経路の下流に位置して、

apoptosis の実行因子と考えられる酵素である caspase 1 と caspase 3 の活性が著明に増加しており、また TNF- $\alpha$  の増量に対応して、TNF- $\alpha$  receptor 1 (TNF-R1) が増加していることを示した (Mogi M et al, J Neural Transm, 107: 335-341, 2000)。これらの成績はパーキンソン病における黒質ドーパミン神経細胞死の apoptosis 仮説を支持する。Caspase 3 は apoptosis 実行の重要な因子と推定されており、caspase 阻害薬がパーキンソン病の進行を阻止する可能性が示唆される。

以上のすべての成績は、パーキンソン病の黒質線条体部位に部位特異的に “proapoptotic environment” のあることを立証しているが、さらに追求すべき問題として、apoptosis を最初におこす細胞は、グリア細胞なのか、神経細胞なのかの問題がある。この細胞特異性の問題は、サイトカインの増加や神経栄養因子の減少が、まずグリア細胞でおこるのかあるいは神経細胞でおこるのか、神経細胞死が最終的に apoptosis であるとしても、サイトカインや神経栄養因子の変化が原因なのか、それとも神経細胞死を防ぐ代償機構による結果なのかの疑問点とも関連する。この問題の解決には、酵素免疫測定法の生化学的定量法と共に、組織細胞化学的方法が必要である。

## E. 結論

永津グループは 1994 年以来、パーキンソン病剖検脳とパーキンソン病モデル動物 (MPTP パーキンソン病マウスや 6-OH-ドーパミン半側パーキンソン病ラット) の脳 (線条体) で、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインの増加、神経栄養因子 NGF の減少を証明して、パーキンソン病における黒質線条体ドーパミン神経細胞死は apoptosis ではないかとの仮説を提出してきた。平成 11 年度の研究で、この apoptosis 仮説を支持する成績として、パーキンソン剖検脳黒質線条体での TNF 受容体 TNF-R1 の増加、神経栄養因子 BDNF と NGF の減少、caspase 1 と caspase 3 の活性の増加など apoptosis 経路の上流より下流に至る因子の変化を立証した。

水野グループは、劣性遺伝家族性パーキンソン病の原因遺伝子として発見した *parkin* の産物 Parkin タンパク質は、軸索輸送に関与するタンパク質で、その欠損が黒質の選択的変性に深く関わっている成績を得た。また 8-oxo-dGTPase のパーキンソン病黒質細胞体における特異的増加を見出し、ミトコンドリアにおける酸化ストレスが孤発性パーキンソン病の神経細胞死と関わっていることを見出した。

小川グループは 6-OH-ドーパミン脳室内投与マウスで酸化ストレスによって脂質過酸化反応が亢進しており、glutathione 系の持続的な低下が重要であることを示した。また、パーキンソン病に対する神経保護修復薬の候補薬剤として、免疫抑制薬であるイムノフィリンリガンドの FK506 が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の酸化ストレスによる細胞死を抑制することを見出した。他方、免疫抑制作用のないイムノフィリンリガンドである GPI1046 (免疫抑制作用を持たない FK506 誘導体) も、線条体ドーパミン神経障害の保護作用のあることを明らかにした。免疫抑制薬はパーキンソン病の進行を防ぐと考えられるが、イムノフィリンリガンド薬剤は免疫抑制作用によらないドーパミン神経保護作用をもつ可能性があり、その機序の解明を進めている。

久野グループはドーパミン受容体アゴニストのパーキンソン病治療薬 apomorphine がグリア細胞での NGF と BDNF の生産を著明に増加することを見出し、神経保護作用のあることを示唆した。また平成 10 年度の研究に続いて MPTP パーキンソン病サルで黒質ドーパミン神経の細胞死に先行して神経栄養因子 GDNF が減少することを定量的に示した。

パーキンソン病の黒質線条体ドーパミンニューロンの神経細胞死の apoptosis 仮説を立証する成績が明らかになってきているので、この発症機序をさらに詳細に解明すると同時に、apomorphine のような神経栄養因子を増加させる薬剤、イムノフィリンリガンド、caspase 阻害薬など、apoptosis 経路を阻害して、神経保護修復作用のある薬剤の開発の研究を進めていく。



## 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

- Nagatsu, T., Ichinose, H. (1999). Molecular biology of catecholamine-related enzymes in relation to Parkinson's disease. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 19, 57-66.
- Kobayashi, K., Nagatsu, T. (1999). Mice lacking tyrosine hydroxylase gene and transcomplementation with the human genome : ongoing prospects for human gene therapy. *Biogenic Amines*, 15, 1-20.
- Ichinose, H., Ohye, T., Suzuki, T., Sumi-Ichinose, C., Nomura, T., Hagino, Y., and Nagatsu, T. (1999). Molecular cloning of the human *Nurr1* gene — Characterization of the human gene and cDNAs. *Gene*, 230, 233-239.
- Nagatsu, T., Ichinose, H. (1999). Regulation of pteridine-requiring enzymes by the cofactor tetrahydrobiopterin. *Mol. Neurobiol.*, 19, 79-96.
- Nagatsu, T., Ichinose, H., Mogi, M., and Togari, A. (1999). Neopterin and cytokines in hereditary dystonia and Parkinson's disease. *Pteridines*, 10, 5-13.
- Sawada, M., Suzumura, A., Hosoya, H., Marunouchi, T., and Nagatsu, T. (1999). IL-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. *J. Neurochem.*, 72, 1466-1471.
- Nakashima, A., Mori, K., Suzuki, T., Nagatsu T., and Ota, A. (1999). Dopamine inhibition of human tyrosine hydroxylase type 1 is controlled by the specific portion in the N-terminus of the enzyme. *J. Neurochem.*, 72, 2145-2153.
- Mogi, M., Togari, A., Tanaka, K., Ogawa, N., Ichinose, H., and Nagatsu, T. (1999). Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF- $\alpha$  induction. *Neurosci. Lett.*, 268, 101-104.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., and Nagatsu, T. (1999). Brain derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 270, 45-48.
- Nagatsu, I., Ikemoto, K., Kitahama, K., Nishimura, A., Ichinose, H., and Nagatsu, T. (1999). Specific localization of the guanosine triphosphate (GTP) cyclohydrolase-I immunolocalization in the human brain. *J. Neural Transm.*, 106, 607-617.
- Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., Togari, A., and Riederer, P. (1999). Cytokines in Parkinson's disease. *Neuroscience News*, 2, 88-90.
- Inagaki, H., Ohye, T., Suzuki, T., Segawa, M., Nomura, Y., Nagatsu, T., and Ichinose H. (1999). Decrease in GTP cyclohydrolase I gene expression caused by inactivation of one allele in hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 260, 747-751.
- Suzuki, T., Ohye, T., Inagaki, H., Nagatsu, T., and Ichinose, H. (1999). Characterization of wild-type and mutants of recombinant human GTP cyclohydrolase I: Relationship to etiology of dopa-responsive dystonia. *J. Neurochem.*, 73, 2510-2516.
- Ichinose, H., Suzuki, T., Inagaki, H., Ohye, T., and Nagatsu, T. (1999). Molecular genetics of dopa-responsive dystonia. *Biol. Chem.*, 380, 1355-1364.
- Mogi, M., Nagatsu, T. (1999). Neurotrophins and cytokines in Parkinson's disease. In : *Advances in Neurology*, Vol. 80. Parkinson's Disease, G.M. Stern (Eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp.135-139.
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., Ichinose, H., Nagatsu, T. (2000) Caspase activities and tumor necrosis

factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from Parkinsonian brain. *J. Neural Transm.*, 107, 335-341.

## 2. 学会発表

- Nagatsu, T. (1999). Cytokines in Parkinson's Disease. 7th International Winter Conference on Neurodegeneration and Neuroinflammation. Karuizawa, Japan, January 20-22.
- Ichinose, H., Ohye, T., Suzuki, T., Inagaki, S., Katoh, S., Nagatsu, T. (1999). Structure of the human sepiapterin reductase gene. 18th International Winter-Workshop. Chemical, Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines & 11th International Conference on Pteridines and Related Biogenic Amines. Arlberg, Austria, March 6-13.
- Fujimoto, K., Inaba, A., Tomomura, A., Ichinose, H., Nagatsu, T., Katoh, S. (1999). Role of Tyr171 and Ser158 in the catalytic reaction of sepiapterin reductase as evidenced by site-directed mutagenesis. 18th International Winter-Workshop. Chemical, Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines & 11th International Conference on Pteridines and Related Biogenic Amines. Arlberg, Austria, March 6-13.
- Nagatsu, T., Ichinose, H. (1999). Molecular genetics of hereditary dystonia. The 50th Mosbach Kolloquium. Molecular Mechanisms in Nervous System Disorders. Mosbach, Germany, April 15-17.
- Ohtsuki, M., Kuroda, R., Tazawa, M., Nomura, H., Sumi-Ichinose, C., Nagatsu, T., Hagino, Y., Nomura, T. (1999). Cytokine-induced biosynthesis and release of tetrahydrobiopterin in human umbilical vein endothelial cells. International Symposium on New Developments in Smooth Muscle and Endothelial Cell Signaling. Nagoya, Japan, May, 16-19.
- Ichinose, H., Nagatsu, T. (1999). Gene of tetrahydrobiopterin-synthesizing enzymes in relation to stress. Seventh Symposium on Catecholamines Other Neurotransmitters in Stress. Smolenice Castle. Bratislava, Slovakia, June, 28-July, 3.
- Nagatsu, T. (1999). Dopa Responsive Dystonia. 13th International Congress on Parkinson's Disease. Vancouver, Canada, July, 25-28.
- Nagatsu, T. (1999). Isoquinoline neurotoxins. Neurotoxic Factors in Parkinson's Disease and Related Disorders. Ulm, Germany, August, 5-8.
- Nagatsu, T. (1999). Molecular genetics of catecholaminergic system. 10th International Symposium on Chromaffin Cell Biology. Bergen, Norway, August, 22-27.
- Ishiguro, H., Yamada, K., Ichino, N., Sawada, H., Nishii, H., Kurosawa, Y., Matsushita, N., Kobayashi, K., Goto, J., Kanazawa, I., Nagatsu, T. (1999). Tissue-specific and age-dependent occurrence of somatic mosaicism in expanded CAG in mice carrying the mutated Huntington's disease gene. International Conference on Huntington's Disease. Haag, The Netherlands, August 29-September 1.
- Ichinose, H., Ohye, T., Suzuki, T., Sumi-Ichinose, C., Nomura, T., Hagino, Y., Nagatsu, T. (1999). Molecular cloning of the human Nurr1 gene—Structure of the genomic DNA and finding of a new splicing variant. European Retinoid Research Group (ERRG) Conference Retinoids and Nuclear Receptors 1999. Strasburg, France, September 26-30.
- Nakashima, A., Mori, K., Kaneko, Y., Nagatsu, T., Ota, A. (1999). Effects of dopamine on N-terminus-deleted human tyrosine hydroxylase type 1. Society for Neurosciences 1999 Annual Meeting, Florida, October, 23-28.
- Nagatsu, T., Ichinose, H. (1999). Molecular biology of catecholamines and tetrahydropterin cofactor. 17th International Pigment Cell Conference. Nagoya, Japan, October, 31.

## 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、家族性及び孤発性パーキンソン病について研究を行った。家族性パーキンソン病では、常染色体性劣性遺伝の若年性パーキンソン病（ARJP）の原因蛋白であるParkin蛋白に対する抗体を作成し、免疫組織で解析し、本症患者においては、Parkin蛋白が全く発現していないことが分かった。孤発性パーキンソン病及び対照患者でParkin蛋白は、黒質線条体系に発現が高かった。細胞分画とWestern blottingによる分析で、Parkin蛋白は細胞質とGolgi装置に発現していた。以上よりParkin蛋白は、軸索輸送に関与する蛋白で、その欠損が黒質の選択的変性に深く関わっていることが予想された。

孤発性パーキンソン病については、酸化ストレスと神経細胞死の関連について解析を行い、DNAの酸化的障害で生じる8-oxodeoxyguanine(8-oxo-dG)を取り除く酵素である8-oxo-dGTPaseを免疫組織にて分析し、パーキンソン病黒質において本酵素が著明に増加しており、その増加は胞体において著明で、ミトコンドリアにおける酸化的ストレスの亢進が示唆された。多系統萎縮症や対照脳では、本酵素の増加はなく、ミトコンドリアにおける酸化的ストレスは、パーキンソン病の特異的神経細胞死の機構であることが示唆された。

### A. 研究目的

パーキンソン病における家族性パーキンソン病の割合は、5～10%に過ぎないが、家族性パーキンソン病においては、分子レベルで黒質変性機序を解析できる可能性が高く、その研究は重要である。特に近年臨床症候の異なる家族性パーキンソン病が多数報告され、黒質神経細胞の選択的細胞死を惹起する原因蛋白は相当数あるものと予想されている。これらの遺伝子を順次同定し、その遺伝子産物の機能解析を行うことは、家族性のみならず孤発性パーキンソン病の黒質変性機序解明のためにも重要である。

家族性パーキンソン病の原因遺伝子としては、現在 $\alpha$ -synuclein, parkin, tauの3つが知られているが、その中ではparkin遺伝子に変異による症例が最も多く、世界的分布が知られている。本症は、若年発症で常染色体性劣性遺伝のパーキンソン病（ARJP）を起こすことで知られている。我々はARJPの遺伝子クローニングに成功し、現在Parkin蛋白の機能解析を進めている。本研究で、Parkin蛋白に対する抗体を作成し、その細胞内分布を検索し、機能解析につながる知見を得たので報告する。

一方孤発型パーキンソン病においては、酸化ス

トレス、ミトコンドリア呼吸障害、アポトーシスが最も有力な神経細胞死の機序をと推定されている。酸化ストレスを解析する方法に、DNAの酸化的障害の解析がある。即ちヒドロキシラジカルのアタックにより生じる8-oxo-deoxyguanine (8-oxo-dG)を取り除く酵素である8-hydroxyguanosine-triphosphatase (8-oxo-dGTPase)を分析する方法である。尚本研究は、昨年度一部報告したが、本年度雑誌に掲載されたので（Ann Neurol 1999; 46: 920-924）、簡潔に報告する。

### B. 研究方法

パーキンソン病蛋白に対する抗体の作成は、parkin遺伝子の配列をもとに、エクソン3 (His 124-Pro137)及びエクソン9 (Cys293-Ile306)を認識するポリクローナル抗体を作成し、特異性を確認して使用した。

対象症例は、parkin15例、parkin遺伝子変異を有する若年性Parkin例、対照疾患8例である。Parkin遺伝子変異を有する症例は、2例は同胞でエクソン4の欠失を有し、3例目はエクソン3の欠失を有し、いずれも短くなった転写産物が予想される。

検索に供した組織は、パラフィン包埋前頭葉、線条体、中脳切片で、標準的アビジンビオチン法によった。Western blottingは、対照脳前頭葉、線条体、黒質のホモジェネート、及び前頭葉の細胞分画を行い、可溶分画、Golgi分画、ミトコンドリア分画、マイクロソーム分画、核分画についても行った。方法の詳細は既報の通りである（Ann Neurol 1999; 45: 668-672）。

8-oxo-dGTPase及び8-oxo-dGの分析は、PD 6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。

#### C. 研究結果

Parkin蛋白に対する免疫染色の結果は、前頭葉、線条体、中脳切片において全ての神経細胞に程度の差はあるが、Parkin蛋白に対する免疫反応が見られた。グリア細胞での発現は低い。部位別にみると黒質緻密部色素細胞の免疫染色が最も強く、胞体及び突起が顆粒状ないし万遍なく染色された。核は染色されなかった。孤発型パーキンソン病黒質のLewy小体も染色されるものがあり、ユビキチンとの二重染色で、その共存が示された。また $\alpha$ -synuclein抗体との二重染色でも、Lewy小体での共存が示された。

対照脳前頭葉の細胞分画とWestern blottingによる解析では、Parkin蛋白は、Golgi装置と可溶性分画に存在し、核及びミトコンドリア分画には存在しなかった。マイクロソーム分画には少量存在した。また部位別に発現を検索すると、対照患者では、黒質に最も発現が多く、前頭葉と線条体はほぼ同じであった。孤発型パーキンソン病の黒質では、対照に比し発現量が減少していたが、これは神経細胞の数の減少を反映している可能性がある。

次に、parkin遺伝子に変異を有する症例では、Parkin蛋白に対する免疫染色は、全くみられず、この所見は、Western blottingにても確認できた。

孤発型パーキンソン病における8-oxo-dGTPase及び8-oxo-dGの免疫染色の検討結果は、パーキンソン病では、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。これ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。対照患者脳、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。

#### D. 考察

Parkin蛋白は、分子量約5万の蛋白で、N末にユビキチンとの部分的ホモロジー、C端に2個のRING-finger like motifをもつユニークな蛋白であり、常染色体性劣性遺伝の家族性パーキンソン病（ARJP）の原因遺伝子、parkin遺伝子の転写産物である。ARJPの患者では、様々な変異が本症患者に発見されている。Parkin遺伝子のメッセンジャーは、一般臓器を含め広範に発現しており、脳でも広く発現しているが、本遺伝子の変異で変性を受けるのは、黒質と青斑核に限られ、現在Parkin蛋白の機能及びその異常による黒質神経細胞の選択的変性の機序が多くの研究者の興味を引いている。本研究は、この線にそった研究の第一歩である。

本研究によると、Parkin蛋白は、広く発現しているものの、黒質線条体系での発現が高く、ARJP脳では、本蛋白が発現しておらず、本蛋白の欠失で、黒質神経細胞の選択的細胞死が起きることを確認した。但し、parkin遺伝子には、点変異を含め多数の変異が現在確認されているので、本症全ての患者で変異Parkin蛋白が発現していないのかどうかについては今後の研究が重要である。点変異の症例では、発症年齢が遅くなる傾向があり、変異蛋白が発現している可能性は充分考えられる。

今回の分析で、Parkin蛋白は、黒質神経細胞の終末が存在する線条体にも強く発現していることが分かり、軸索輸送を受ける蛋白であることが示唆された。細胞分画による分析でもGolgi装置に強く発現しており、軸索輸送にのることが示唆される。何故ならば殆どのfast axonal transportに乗る蛋白は、Golgi装置を通るからである。まだ未発表であるが、本研究班の研究としてParkin蛋白を培養細胞に強制発現させてその細胞内分布を解析しているが、現在の所やはりGolgi装置と細胞質に分布し、また神経突起に沿っても累々とParkin蛋白陽性の免疫組織産物の存在を確認できた。このことからParkin蛋白の1つの機能として、神経終末に運ばれて、シナプス伝

厚生省科学研究費補助金（脳研究事業）  
分担研究報告書

達になんらかの形で関与している蛋白らしいことが推定できた。現在免疫組織電顕にて、シナプス終末におけるParkin蛋白の存在部位の確認を行っている。

一方Parkin蛋白は、ユビキチン様の構造を持ち、2つのRING-finger like motifをもつという極めてユニークな構造をしている。このことからユビキチン代謝経路への関与が示唆され、まだ未発表ではあるが、ubiquitin-ligaseの一種らしいデータを得ている。軸索輸送とubiquitin-ligaseとしての機能が今後どのように関連しているかを分析することがParkin蛋白の機能解析に重要であり、本蛋白の機能が解明できれば、黒質の選択的変性機序の少なくとも1つは解明が可能と考えられる。家族性パーキンソン病におけるこのようなデータの蓄積が、孤発型パーキンソン病の発症機序解明や、未だ遺伝子の同定されていない他の家族性パーキンソン病の遺伝子クローニングにも重要な手がかりを与えるものと期待できる。

昨年度の研究として発表したparkin遺伝子の遺伝子多型の検索も可能となり、弱い因子ではあるが、parkin遺伝子多型の1つが黒質に対する神経細胞保護因子の1つらしい所見を得ている（Ann Neurol 1999; 45: 668-772）。これは、家族性パーキンソン病の研究が孤発型パーキンソン病の研究に寄与できる1例と考えられる。

次に、8-oxo-dGTPase及び8-oxo-dGを解析結果であるが、8-oxo-dGは、deoxyguanineの8位の炭素がhydroxyl radical( $\cdot\text{OH}$ )の攻撃を受けて生じる。DNAに対する酸化侵襲の指標として使用されている。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を取り除く作用を有し、DNAの修復酵素として重要である。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に対する酸化障害が亢進していることが示された。8-oxo-dGの免疫染色は、核内には確認されず、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。

未発表データではあるが、本年度ARJP脳においても酸化ストレスの有無を検討した。即ち3価鉄を染めるPerl-DBA染色を、parkin遺伝子に変異の存在するARJP患者3名の剖検脳に施行した。その結果、黒質に極めて強い鉄の沈着が見られ、ARJPにおいても、酸化ストレスの存在が示唆された。即ち酸化障害は、パーキンソン病に共通して見られる病的プロセスであることが示唆される。今後Parkin蛋白と鉄との相互作用有無の解析が重要と考えられた。

#### E. 結論

以上、家族性パーキンソン病の原因蛋白の1つであるParkin蛋白の脳内分布、細胞内分布を解析し、軸索輸送に関与する蛋白の可能性が高いことを示した。またARJP患者剖検脳では、Parkin蛋白の発現が全く見られないことを3例の剖検例について示し、本蛋白の欠失が黒質の選択的神経細胞死を起こすことを立証した。更に今後Parkin蛋白のユニークな構造であるユビキチンとの部分的ホモロジーと2つのRING-finger like motifを持つことから、どのような機能が本蛋白に予想されるかの解析が重要と考えられた。

一方孤発型パーキンソン病においては、ミトコンドリアDNAに対する酸化障害の亢進を確認し、酸化ストレスの重要性を確認した。酸化ストレスは、アポトーシス誘導の協力的なシグナルであり、パーキンソン病における神経細胞死がアポトーシスによることを示唆している。このことはアポトーシスカスケードをブロックすることにより、パーキンソン病の進展を予防することが可能であることを示しており、事実そのような研究が多く研究室で進行している。本研究は、パーキンソン病の発症機序と治療法の確立のため、このような研究アプローチが適切であることを支持している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Yoshikawa M, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Minoshima S, Yamamura Y, Shimizu N, Mizuno Y: Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin: †Absence of protein in AR-JP Patients. *Ann Neurol* 45:655-658, 1999
- Wang M, Hattori N, Matsumine H, Kobayashi T, Yoshino H, Morioka A, Kitada T, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y: Polymorphism in the parkin gene among sporadic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 45:668-672, 1999
- Nisipeanu P, Inzelberg R, Blumen SC, Carasso RL, Hattori N, Matsumine H, Mizuno Y: Autosomal-recessive juvenile parkinsonism in a Jewish Yemenite kindred: mutation of Parkin gene. *Neurology*. 1999;53:1602-4.
- Shimura-Miura H, Hattori N, Kang D, Miyako K, Nakabeppu Y, Mizuno Y: Increased 8-oxo-dGTPase in the mitochondria of substantia nigral neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 46: 920-924, 1999
- Oya T, Hattori N, Mizuno Y, Miyata S, Maeda S, Osawa T, Uchida K: Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *J Biol Chem* 274:18492-18502, 1999
- Narabayashi H, Yamaguchi T, Sugi K, Mitamura H, Mizuno Y, Nakashima M. Safety study of lazabemide (Ro19-6327), a new Mao-B inhibitor, on cardiac arrhythmias and blood pressure of patients with Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*. 22:340-346, 1999
- Miwa H, Yoritaka A, Mizuno Y. Hemifacial spasm in Parkinson's disease. *Mov Disord* 14: 358-359, 1999
- Okuma Y, Ohi K, Lee RG, Mizuno Y. Effects of test H-reflex size on reciprocal inhibition in forearm muscles. *Clin Neurophys* 110: 2194-2196, 1999
- Yoritaka A, Nakagawa-Hattori Y, Hattori N, Kitagawa A, Mizuno Y: A large Japanese family with MAchado-aJoseph disease: clinical and genetic analysis. *Acta Neurol Scand* 99: 241-244, 1999
- Machida Y, Tsuchiya K, Anno M, Haga C, Ito T, Shimo T, Wakeshima T, Iritani S, Ikeda KAF Sporadic amyotrophic lateral sclerosis with multiple system degeneration: a report of an autopsy case without respirator administration. *Acta Neuropathol*. 98:512-515, 1999
- Mizuno Y, Hattori N, Mori H. Genetics of Parkinson's disease. *Biomed & Pharmacother* 53: 109-116, 1999
- Matsumine H, Saito M, Ishikawa A, Yokochi M, Yamamura Y, Tsuji S, Mizuno Y: Dopamine cell death by a single genetic mechanism: phenotypic analysis and linkage study of autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Adv Neurol* 80:187-94, 1999
- Mizuno Y, Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Morikawa N, Hattori N, Kondo T: Genetic and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 80:171-9, 1999
- Kitada T, Asakawa S, Matsumine H, Hattori N, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y. Positional cloning of the autosomal recessive juvenile parkinsonism (AR-JP) gene and its diversity in deletion mutations. *Parkinsonism & Related Disord* 5: 163-168, 1999
- Mizuno Y, Hattori N, Kitada T, Asakawa S, Mori H, Minoshima N, Shimizu N. Genetic aspects in Parkinson's disease. In: *Mental Dysfunction in Parkinson's Disease II*, Wolters ECh, Scheltens Ph, Berendse HW, eds, Academic Pharmaceutical Productions bv, Utrecht, The Netherlands, 1999, pp 49-61

厚生省科学研究費補助金（脳研究事業）  
分担研究報告書

2. 学会発表

- Mizuno Y. Parkin and alpha synuclein. XIII International congress on Parkinson's Disease, Vancouver, Canada, July 24-28, 1999
- Calne DB, Mizuno Y. Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. Fourth International Symposium on the Treatment of Parkinson's Disease, Kobe, September 25-26, 1999
- Mizuno Y. Genetic aspects in Parkinson's disease. 2nd International Congress On Mental Dysfunction in Parkinson's Disease, Amsterdam, The Netherlands, October 20-23, 1999
- Mizuno Y, Hattori N, Kitada T, Asakawa S, Mori H, Minoshima S, Shimizu N. Molecular and clinical genetics of familial Parkinson's disease. The Fourth Japanese-Polish Seminar on Biotechnology "Advances in Biochemical Assay for Diagnostic Medicine", Gifu, October 26, 1999
- Mizuno Y. Recent advances in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. 2nd Symposium of World Association of Chinese Epileptologists (WACE), 12th Annual Scientific Meeting of The Hong Kong Neurological Society, Hong Kong, China, December 4-5, 1999
- Shinotoh H, Hattori N, Mizuno Y, Hattori T. Clinical and genetic analysis of five patients with autosomal recessive-Juvenile parkinsonism in Chiba, Japan. International congress on PD, Vancouver, Canada, July
- Elibol B, Hattori N, Matsumine H, Mizuno Y. Clinical feature of Turkish patients with parkin mutations. XIII International congress on Parkinson's disease, July 24-28, 1999, Vancouver, Canada.
- Hattori N, Elibol B, Shimizu N, Mizuno Y. Point mutations in the parkin gene. XIII International congress on Parkinson's disease, July 24-28, 1999, Vancouver, Canada.
- Shinotoh H, Hattori N, Mizuno Y, Hattori T. Clinical and genetic analysis of five patients with autosomal recessive juvenile parkinsonism in Chiba, Japan. XIII International congress on Parkinson's disease, July 24-28, 1999, Vancouver, Canada.
- Shimura H, Hattori N, Kang D, Mizuno Y. Increase of 8-oxo-dGTPase (hMTH1) in mitochondria of nigrostriatum of parkinsonian brain. XIII International congress on Parkinson's disease, July 24-28, 1999, Vancouver, Canada.
- Mochizuki H, Migita M, Tsuganezawa T, Takahashi K, Sakuragawa N, Shimada T, Mizuno Y. Cell therapy for Parkinson's disease using genetically modified amniotic epithelial cells. 2nd American Society of Gene Therapy, June 8-13, 1998 Washington DC
- Mochizuki H, Tsuganezawa T, Mizuno Y. Comparative study of various viral vector for gene expression in neurons. XIII International Congress on Parkinson's disease. July, 24-28
- Kobayashi T, Matsumine H, Kondo T, Mizuno Y: Parkin gene mutations in sporadic Parkinson's disease. 13 th International Congress on Parkinson's Disease, Vancouver, Canada, July 24-28, 1999
- Mori H, Kobayashi T, Takanashi M, Ohta S, Mizuno Y: Pallidolnigrouysian atrophy with tauopathy. 13 th International Congress on Parkinson's Disease, Vancouver, Canada, July 24-28, 1999
- Kubo S, Hattori N, Shimura H, Mizuno Y: Parkin protein is associated with the golgi complex. XIII International Congress on Parkinson's Disease, Vancouver, Canada, July 24-28, 1999

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

パーキンソン病に対する神経保護修復薬の候補薬剤としてのイムノフィリンリガンドについて、*in vitro* および *in vivo* 両系を用いてその作用機構を検討し、以下の結果を得た。

1) NG108-15 細胞株を用いた検討で、イムノフィリンリガンドである FK506 および GPI1046 (免疫抑制作用を持たない FK506 誘導体) は過酸化水素による細胞死を有意に抑制し、その力価は同程度であった。また、イムノフィリンリガンドは細胞傷害後の添加で有効であったことから、保護効果だけでなく、修復効果も有する可能性を明らかにした。

2) イムノフィリンリガンドの *in vivo* での有効性を証明するために、ドパミン (DA) 神経毒である 6-OHDA 脳室内投与マウスの脳内生化学的変化を経時的に検討した。その結果、脂質過酸化反応の亢進と脳内酸化ストレス消去系、特にグルタチオン系の持続的な低下が連動していることを示した。

3) 免疫抑制作用の有無に関係無く、イムノフィリンリガンドは連続投与により、脳内グルタチオン増強効果を示すことをはじめ明らかにした。また、6-OHDA 脳室内投与マウスにおける線条体 DA 神経傷害に対する保護効果を *in vivo* レベルでも示すとともに、イムノフィリンリガンドの保護修復作用の分子機序に免疫抑制作用が重要ではないことを見出した。

A. 研究目的

L-DOPA 内服療法の導入により、パーキンソン病治療は劇的な進歩を遂げたが、病気の進行は抑えられず、その上、L-DOPA の服用が大量かつ長期におよぶことで問題症状が認められるようになる。そのため、L-DOPA 投与量の減量は重要であり、ドパミン (DA) アゴニストなどの導入が最近の主流となりつつある。しかし、DA アゴニストについても、一部の薬剤で神経保護作用が報告されているものの、長期にわたる病気の進行を臨床的に抑制するか否かについては結論が出ていない。したがって、病気の進行を抑制し得る根本的な治療薬の開発は、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薬剤 (イムノフィリンリガンド) に着目して、神経変性に対する保護修復作用について検討を進めた。

すでに我々はイムノフィリンリガンド cyclosporin

A (CsA) や tacrolimus (FK506) 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。しかもこれらの結果から、CsA や FK506 の作用は従来報告されていた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に基づく可能性を指摘した。実際、免疫抑制作用を持たない FK506 や CsA の誘導体がいくつかの病態モデルに対して、保護作用を示すことが報告されつつある。そこで FK506 に加えて、免疫抑制作用を持たない FK506 誘導体である GPI1046 を合成して検討を行なった。昨年度の検討により、FK506 や CsA が酸化ストレス拮抗作用を有する可能性を示したことから、今年度は、(1) 培養細胞を用いた過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) による細胞死評価系と (2) 6-OHDA 脳室内投与による *in vivo* 病態モデルを用いて検討を行なった。

B. 研究方法



1. NG108-15 細胞株を用いた過酸化水素による神経細胞死評価系の確立とイムノフィリンリガンドの効果

(1) NG108-15 細胞株を用いた  $H_2O_2$  による細胞死評価系の確立: 10% FBS-DMEM/HAT 培地の入った 96 well プレートに 1,250 cell/well となるように細胞をまき, 37°C, 5%  $CO_2$ -95% air の条件下で 4 日間培養した. 薬剤処置は  $H_2O_2$  (最終濃度: 30, 100, 300, 500, 1000  $\mu M$ ) 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た. WST-1 assay は 1well あたり WST-1 を 10 $\mu l$  添加し,  $CO_2$  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)  $H_2O_2$  による細胞傷害に対するイムノフィリンリガンドの保護効果: NG108-15 細胞株を上記の条件で 4 日間培養した後, 実験に供した. 実験は 1) FK506/GPI1046 (最終濃度: 30, 100, 300nM; 以下すべて同じ濃度) を各々培地に添加し, 24 時間培養した後, 培養液を代えて,  $H_2O_2$  (最終濃度: 500  $\mu M$ ; 以下すべて同じ濃度) を 24 時間暴露したもの, 2) FK506/GPI1046 を各々培地に添加し, 48 時間培養した後, 培養液を代えて,  $H_2O_2$  を 24 時間暴露したもの, 3) 予め  $H_2O_2$  を 24 時間暴露したうえで, 培養液を代えて, FK506/GPI を各々培地に添加し, 24 時間培養したもの, 4) 予め  $H_2O_2$  を 24 時間暴露したうえで, 培養液を代えて, FK506/GPI を各々培地に添加し, 48 時間培養する, 4つのスケジュールで行なった. 細胞の生存率は, 添加実験終了後速やかに WST-1 assay により測定した.

2. 6-OHDA 脳室内投与による脳内酸化ストレス除去系の変化

6-OHDA (60 $\mu g/2\mu l$ ) を, ICR 系雄性マウス (7 週齢) の右側脳室内に単回投与した. 脳内除去系に対する影響は, superoxide dismutase (SOD) と catalase (Cat) の活性ならびに glutathione (GSH) 含量を指標とした. また, 酸化ストレスに基づく細胞傷害は過酸化脂質 (TBA-RS) 量, DA 神経傷害は DA とその代謝産物の含量を各々指標とした. 測定方法は, 1) TBA-RS 量: 2-thiobarbituric acid 法, 2) GSH 含量: DTNB 法, 3) Cat 活性:  $H_2O_2$  の減衰を直接測

定する方法, 4) SOD 活性: xanthine/xanthine oxidase-NBT 法, 5) DA および代謝産物: HPLC-ECD 法, をそれぞれ用いた. 各指標の測定には, 6-OHDA 脳室内投与 1, 3, 7, 14, 28, 56 日後の各時点で取り出した右側線条体を用いた. なお, 何も投与していない同時期に購入したマウスを「6-OHDA 投与前」として位置付け, 対照とした.

3. in vivo パーキンソン病モデルに対するイムノフィリンリガンドの効果

(1) ICR 系雄性マウス (7 週齢) に, FK506 (0.05, 0.1, 0.5 mg/kg), または, GPI1046 (1, 10 mg/kg) の各用量と対象として FK506, GPI1046 の各々に対応する vehicle を, 1日1回, 7日間皮下投与した. 最終投与 1 時間後に線条体を取り出し, GSH 含量を DTNB 法にて測定した.

(2) ICR 系雄性マウス (7 週齢) に, FK506 (0.5 mg/kg), または, GPI1046 (10 mg/kg) と各々に対応する vehicle を, 1日1回, 7日間皮下投与した. 最終投与 1 時間後に 6-OHDA (60 $\mu g/2\mu l$ ) を右側脳室内に単回投与することで, パーキンソン病モデルを作成した. 6-OHDA 脳室内投与 7 日後に右側線条体を取り出し, DA とその代謝産物濃度を HPLC を用いて測定した.

(倫理面への配慮)

実験動物はヘルシンキ宣言に則り, 実験に関しては岡山大学の動物実験指針に準拠して行なった.

### C. 研究結果

1. NG108-15 細胞株を用いた過酸化水素による神経細胞死評価系の確立とイムノフィリンリガンドの効果

NG108-15 細胞株での  $H_2O_2$  添加後の細胞生存率は, 濃度依存的に低下し,  $IC_{50}$  は約 500 $\mu M$  であった. したがって, NG108-15 細胞株を用いた以下の検討は  $H_2O_2$  の最終濃度を 500 $\mu M$  として行なった (図 1 A). NG108-15 細胞株をイムノフィリンリガンド含有培地で 24 時間培養した後,  $H_2O_2$  を 24 時間添加した場合,  $H_2O_2$  による細胞毒性を今回検討した全ての群で細胞生存率を有意に改善した (図 1 B). この保護効果の効力は FK506 と GPI1046 では同程度であった (図 1 B). なお, イムノフィリンリガンドを 48

時間添加した場合も、若干ばらつきが見られたものの、24時間添加の結果と同じ傾向を示した。一方、予めH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を暴露した後でGPI1046 (100nM)を24時間添加しても、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の細胞毒性を有意に改善した(図

1C)。また、イムノフィリンリガンドの添加時間を48時間に延ばすことで、GPI1046だけでなく、FK506も保護効果を有する可能性が示された。

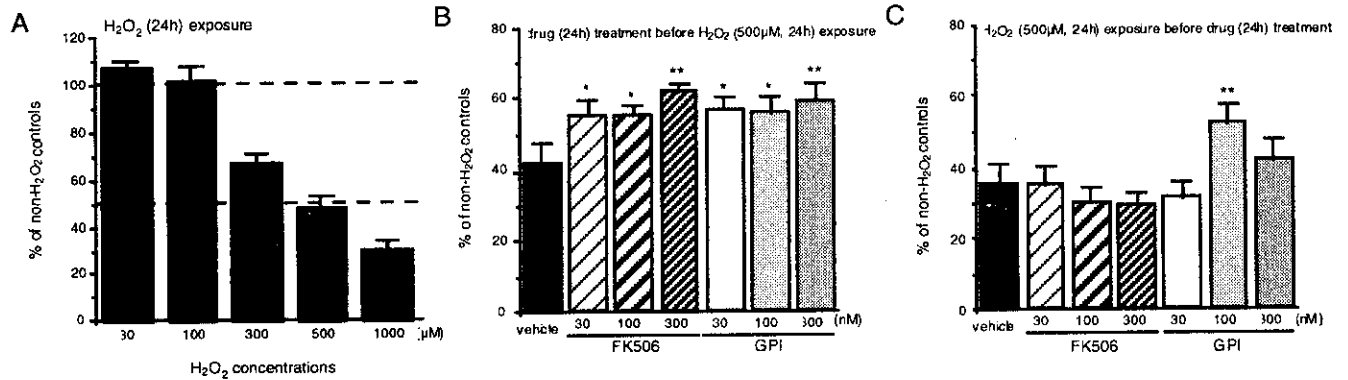


図1 NG108-15細胞株を用いたH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>暴露に対するイムノフィリンリガンドの効果

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs vehicle group.

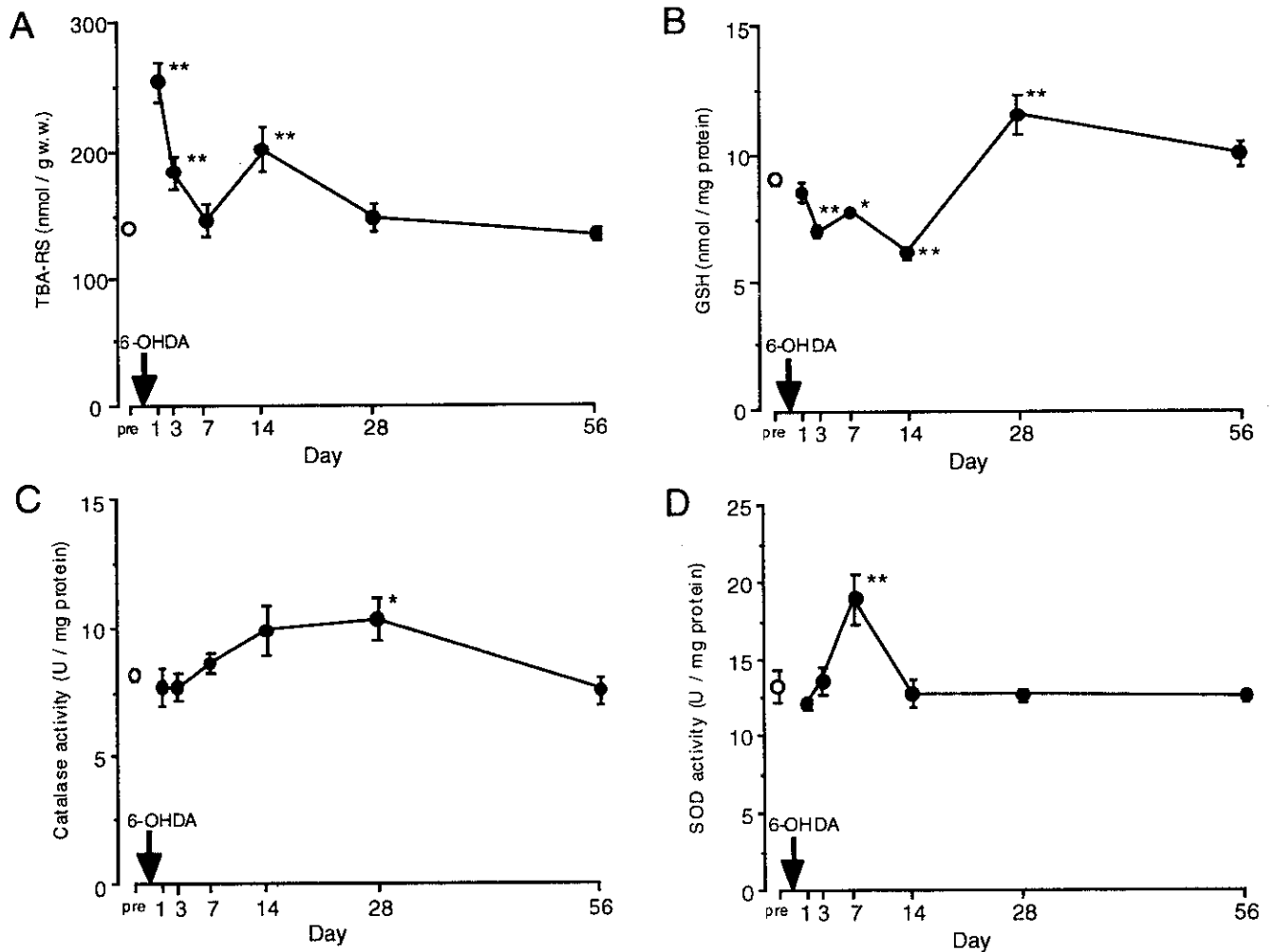


図2 6-OHDA脳室内投与による線条体の脂質過酸化反応と抗酸化ストレス消去系の変化

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs relative placebo or vehicle group.

## 2. 6-OHDA 脳室内投与による脳内酸化ストレス消去系の変化

脂質過酸化反応の指標である TBA-RS 量は投与 1 日および 3 日後の時点で有意な増加を示したものの、7 日後の時点では 6-OHDA 投与前のレベルに一旦復した。ところが、投与 14 日後には再び増加したが、28 日後には正常なレベルに戻り、以後変化しなかった (図 2A)。一方、酸化ストレス消去系のうち、線条体 GSH 含量は脳室内投与 3 日後より有意に低下し、14 日後の時点まで低値を持続した。ところが、28 日後には一過性に上昇し 56 日後には正常レベルに戻った (図 2B)。

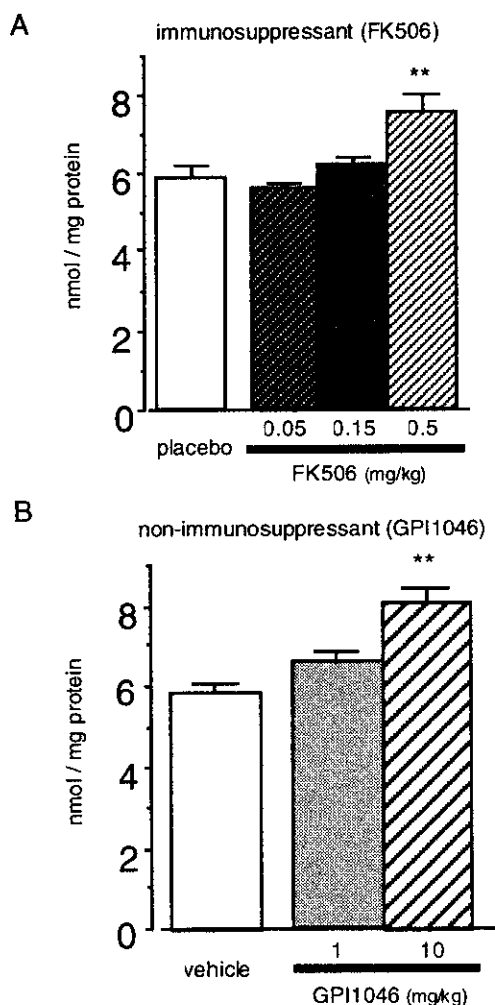


図 3 イムノフィリンリガンド連続投与による線条体グルタチオン濃度の増強効果  
\*\* $P < 0.01$  vs relative placebo or vehicle group.

これに対して、Cat と SOD の活性は一過性的の変化を示した。すなわち、Cat 活性は 6-OHDA 投与 28 日

の時点、SOD 活性は投与 7 日後の時点でのみ、それぞれ有意に上昇した (図 2C, D)。

なお、DA 神経系の指標として、線条体 DA 濃度およびその代謝産物濃度を併せて測定したが、DA 濃度は、6-OHDA 投与 3 日後より有意に減少したものの、投与 14 日後の時点では、投与前のレベルに回復した。また、代謝産物である DOPAC と HVA 含量の合計を DA 含量で割って ratio を求め、DA 代謝回転の指標としたが、同様に投与 1 日後から 7 日後まで DA 代謝回転の亢進が認められた。

## 3. in vivo パーキンソン病モデルに対するイムノフィリンリガンドの効果

FK506 は 7 日間の連続投与により、線条体 GSH 含量を vehicle 投与に比べて用量依存的に増加した (図 3)。一方、GPI1046 についても同様の効果が用量依存的に認められた (図 3)。また、FK506 と GPI1046 それぞれについて、GSH 増強効果が認められた用量を用いて、6-OHDA 脳室内投与による DA 神経傷害に対する保護効果を確認したところ、有意な改善効果が認められた (表 1)。特に、6-OHDA 投与により減少した線条体 DA 濃度は、FK506、GPI1046 の投与により、有意に回復した (表 1)。また、DA 代謝回転については、GPI1046 投与により、DA 代謝回転の亢進が有意に抑制された (表 1)。

## D. 考察

NG108-15 細胞株は過酸化水素に対し用量依存的に細胞死を引き起こしたが、 $IC_{50}$  は約  $500\mu M$  と他の細胞と比べ若干高かった。これは、NG108-15 細胞株が神経細胞とグリア細胞の両方の性質を有することから、純粋な神経系の細胞に比べ、酸化ストレスに対する抵抗性が高いものと考えられた。一方、イムノフィリンリガンドである FK506 と GPI1046 は同程度の細胞保護効果を示したことから、少なくとも今回の実験系で認められたイムノフィリンリガンドの保護効果の作用機序において免疫抑制作用は重要ではないことが明らかとなった。また、予め  $H_2O_2$  を暴露した系でも有意な改善効果を示したことから、GPI1046 は細胞保護効果に加えて、細胞修復効果も有する可能性を見出した。

表1 6-OHDA脳室内投与マウス線条体におけるDA神経傷害に対するイムノフィリンリガンドの効果

	DA (ng/mg protein)	DOPAC (ng/mg protein)	HVA (ng/mg protein)	DOPAC+HVA/DA
<b>FK506 (0.5 mg/kg, i.p. x 7 days)</b>				
sham + placebo	108.522 ± 7.708	7.324 ± 0.647	7.885 ± 0.812	0.140 ± 0.008
6-OHDA + placebo	50.912 ± 3.282**	4.165 ± 0.381**	5.927 ± 1.022	0.195 ± 0.015*
6-OHDA + FK506	87.058 ± 6.245*,†	6.033 ± 0.378†	10.655 ± 1.284†	0.195 ± 0.017*
<b>GPI1046 (10 mg/kg, i.p. x 7 days)</b>				
sham + vehicle	116.479 ± 6.531	8.113 ± 0.754	8.579 ± 0.979	0.142 ± 0.008
6-OHDA + vehicle	56.566 ± 3.357**	5.108 ± 0.361*	6.085 ± 0.493*	0.197 ± 0.006**
6-OHDA + GPI1046	90.932 ± 13.645†	6.231 ± 0.898	5.555 ± 0.458**	0.140 ± 0.012††

Values are the mean ± SEM of 5-7 ICR mice.

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs relative sham-operated mice. †P < 0.05, ††P < 0.01 vs relative 6-OHDA-control mice.

この効果はFK506についても、薬剤の添加時間を48時間に延ばすことで、一部の用量で認められた。しかし、実験時間の延長により、実験系自体のばらつきが大きくなるため、安定した結果は得られなかった。したがって、この点については、別の細胞株を用いるなどして、さらに検討する必要があると思われる。

6-OHDA投与後の脳内酸化ストレス消去系の変化は各々異なったが、線条体においてGSH含量は特に顕著な変化を示した。すなわち、GSH含量は6-OHDA脳室内投与3日後以降、持続的な減少を示し、14日後の時点まで継続した。これに対して、酸化ストレスによる細胞傷害の指標である脂質過酸化反応は、投与7日後を除いて、投与前よりも亢進した状態が継続したことから、線条体における脂質過酸化反応の亢進は主にGSHの減少によるものと考えられた。また、7日後と28日後におけるTBA-RS量の正常レベルへの回復は、前者がSOD活性の亢進、後者がGSH含量の増加とCat活性の亢進によるものと考えられた。したがって、6-OHDA脳室内投与によって引き起こされるGSHの減少は、6-OHDAの細胞毒性発現機序におけるキーファクターであることが確認できた。また、GSHと異なり一過性の変化を示したCatとSODについても、反応する時間帯が異なることを明らかにした。これらの結果を基礎にさらに詳細な検討を行なうこと

で、酸化ストレスに対する脳内消去系の作用機序解明に寄与することが期待される。

以上の6-OHDA脳室内投与マウスの基礎検討を踏まえて、イムノフィリンリガンドの保護効果について、in vivoのレベルでも検討したところ、6-OHDA脳室内投与によるDA神経傷害に対して、有意な保護効果を示すとともに、この作用がGSH増強効果を基盤としている可能性をはじめて見出した。特に、免疫抑制作用を持たないGPI1046が培養細胞での実験結果と同様に母体化合物であるFK506よりも強力な細胞保護修復作用を有する可能性を明らかにしたことは、イムノフィリンリガンドの臨床応用に道を開くものとする。この点については、別の指標や評価モデルを用いてさらに詳細に検討し、基盤となる作用機序の分子機構を明らかにする予定である。

#### E. 結論

免疫抑制性および非免疫抑制性の2種類のイムノフィリンリガンドを用いた今回の検討により、細胞保護修復作用の分子機序において、免疫抑制作用は重要ではないことを明確にした。このことは、免疫抑制作用を持たないイムノフィリンリガンドが、免疫不全という重大な副作用のない新しいタイプの神経保護修復薬となる可能性を強く示唆するものである。さらに、従