

こと、(5) CUG リピートに特異的に結合する EXP 蛋白の遺伝子をノックアウトしたマウスで、白内障やミオトニア現象が起こることが確認されたことなどから、mRNA の核・細胞質移送に異常が起こり、延長した CTG(CUG)を含む mRNA が核内にとどまることで toxic RNA 効果を発揮し、cis-効果や細胞死とともに、種々の同時に発現する遺伝子の alternative splicing のパターンに変化を及ぼし、それが tau 遺伝子に起こることで、tauopathy が起こると考えられた。

数種類の bioflavonoid は、この mRNA の核・細胞質輸送を促進し、リピートを含む mRNA を核外に出すことで、リピートの cis-効果を改善する可能性が高いと考えられた。

このシステムでは容易にリピートの cis-効果、cytotoxicity を測定することが出来るので、DM1 における tauopathy 治療薬のスクリーニングにも有用であることが明らかとなった。

E. 結論

CTG リピートが延長した mRNA を恒常的に発現する神経系細胞(CTG-250)を作成した。この細胞は分化誘導を行うと、DM1 患者同様に tau 遺伝子の alternative splicing の異常が起こり、DM1 に見られる tauopathy のモデル細胞として、治療薬のスクリーニングなどに用いることが可能であると考えられた。

F. 文献

1. Amack J *et al.* Hum Mol Genet 8 :1975-1984, 1999
2. Davis BM, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 94 :7388-7393, 1997
3. Day JW, *et al.* Neurology 25 :60 :657-664, 2003
4. Dixon RA, Ferreira D. Genistein. Phytochemistry. 60: 205-211, 2002
5. Fardaei M, *et al.* Hum Mol Genet. 11: 805-814, 2002
6. Fu YH, *et al.* Science 255:1256-1258, 1992
7. Fu YH, *et al.* Science 260:235-238, 1993
8. Furuya H, *et al.* Ann Neurol 48: 441. (Abstr.), 2000
9. Goedert M, *et al.* Trends Neurosci. 14: 193-199, 1991
10. Harper PS. Myotonic Dystrophy. 3rd ed. London: WB Saunders, London. 2000.
11. Kandina RN *et al.*, Science 302; 1978-1980, 2003
12. Knowles LM, *et al.* Nutr Cancer. 38: 116-122, 2000
13. Liquori CL, *et al.* Science 293: 864-867, 2001
14. Mankodi A *et al.* Science ;289: 1769-1773, 2000
15. Mankodi A, *et al.* Curr Opin Neurol. 15: 545-552, 2002
16. Miller JW, *et al.* EMBO 19: 4439-4448, 2000
17. Niwa H, *et al.* Gene 108, 193-200, 1991
18. Quintero-Mora ML, *et al.* Biochem Biophys Res Commun 295: 289-294, 2002
19. Reddy S, *et al.* Nat Genet. 13: 325-335, 1996
20. Sasaki N, *et al.* Chem Biol Interact 145: 101-116, 2003
21. Sergeant N, *et al.* Hum Mol Genet 10: 2143-2155, 2001
22. Seznec H, *et al.* Hum Mol Genet 10: 2717-2726, 2001
23. Sugino M, *et al.* Neurology 51: 586-589, 1998

24. Takahashi N, *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 277: 518-523, 2000
25. Takahashi N, *et al.* J Biochem (Tokyo) 130: 581-587, 2001
26. Tapscott SJ, *et al.* Science 293:816-817, 2001
27. Timchenko LT. Am J Hum Genet 64: 360-364, 1999
28. Tsuji K, *et al.* Life Sci 65: 17-26, 1999
29. Usuki F, *et al.* Biochem Biophys Res Commun 267: 739-743, 2000

G. 研究発表

1. 論文発表

論文投稿中

2. 学会発表

- 1) Furuya H *et al.*, cis-effect and cytotoxicity of a reporter gene containing an expanded CTG repeat in a stable transfectant of PC12 neuronal cell. 4th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting (IDMC-4). Apr. 10-12, Glasgow University, Glasgow, Scotland, UK
- 2) Furuya H *et al.*, Some flavonoids prevent cytotoxicity and cis-effect of expanded CTG repeats in stable transformant of PC12 neuronal cell. 128th Annual Meeting of American Neurological Association. Oct. 19-22, 2003, San Francisco Marriott Hotel, San Francisco, CA, USA.
- 3) 古谷博和 他. 延長した CTG リピートを発現する PC12 細胞の示す細胞死に対する bioflavonoid の効果. 第 26 回日本分子生物学会年会. 2003 年 12 月 10 日~13 日. 神戸ポートアイランド. 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 (出願中)

細胞死を阻害する薬剤のスクリーニング方法 (特願 2003-134759) (平成 15 年 5 月 13 日出願)

厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患研究事業)
神経変性疾患に関する研究班 研究報告書

進行性核上性麻痺とタウ遺伝子領域の関連

高野弘基¹⁾, 西澤正豊¹⁾, 高橋均²⁾, 柿田明美³⁾, 小野寺理³⁾

- 1) 新潟大学 脳研究所 神経内科、新潟大学医歯学総合病院 神経内科,
2) 新潟大学 脳研究所 病理学, 3) 新潟大学 脳研究所 リソース解析センター

研究要旨 孤発性純粋タウオパチーの一つである進行性核上性麻痺 (Progressive supranuclear palsy, PSP) においては、タウ (microtubule-associated protein tau, MAPT) 遺伝子との相関が白人において報告されてきている。MAPT 遺伝子における TG 二塩基繰り返し配列多型 (A0~4) の A0 とその基盤となる H1 ハプロタイプが PSP と関連している。しかしながら、以前の我々の解析では、日本人においては PSP 及び正常対照においても全例で A0 のホモ接合であり、相関解析は不可能であった。本研究では、日本人において H1 H2 ハプロタイプに関連する多型及びその他の多型を解析することにより、日本人において MAPT 遺伝子と PSP との相関を検討することを目的とする。日本人は全例 H1 ハプロタイプと考えられたが、エクソン 6 C139T, イントロン 9 C-47A 多型で比較的高い多型性 (それぞれヘテロ頻度 0.39 と 0.36) を認めた。しかしながら、これらのゲノタイプを用いての相関解析で、PSP 群と対照群とで有意差は認められなかった。

はじめに

進行性核上性麻痺 (Progressive supranuclear palsy, PSP) は、50~60 歳代に発症する孤発性の神経変性疾患であり、パーキンソニズムと核上性眼筋麻痺及び前頭葉性と表現される痴呆を特徴とする。PSP の病理学的特徴は神経細胞及びグリア細胞において異常リン酸化タウ蛋白の凝集体 (タウ病理) がみられることである。タウ病理は、皮質基底核変性症 (Corticobasal degeneration, CBD) や Pick 病 (PiD)、前頭側頭葉型痴呆 (Frontotemporal dementia, FTD) などの孤発性の神経変性疾患においてもみられ、これらの疾患は孤発性の純粋タウオパチーとして分類されている。これら

の純粋タウオパチーは、タウ病理を唯一の所見とする点で、アルツハイマー病や Familial British dementia などの二次性タウオパチーとは異なり、タウ蛋白または 17 番染色体上に存在するタウ (microtubule-associated protein tau, MAPT) 遺伝子が一次的に神経変性に関わっていると考えられている。

タウ蛋白は、微小管関連蛋白の一つであり、微小管の形成や安定化に関与することが指摘されてきているが、核内にも存在するという指摘もあり、不明な点も少なくない。MAPT 遺伝子が、直接的に神経変性やタウ病理に関わりうることは、遺伝性タウオパチーの一つである Frontotemporal dementia and parkinsonism

linked to chromosome 17 (FTDP-17) で MAPT 遺伝子の変異が発見されたことで、証明された。また、それ以前より、PSP の疾患感受性に MAPT 遺伝子領域が関与していることが示唆されてきている。PSP 患者では MAPT 遺伝子イントロン 9 の TG リピート多型 genotype A0~4 (A0=11リピート, A1=12リピート, A2=13リピート, A3=14リピート, A3=15リピート) で A0 が有意に多いことが確認されている¹⁾。MAPT 遺伝子領域の 8 個のから成るハプロタイプは H1 または H2 に分けられ、H1 ハプロタイプが PSP と関連する²⁾。その他の一塩基多型を用いての解析により、HapA ハプロタイプや MAPT プロモーター領域ハプロタイプと PSP の関連も報告されている³⁻⁶⁾。近年、MAPT 遺伝子内に sitohin (STH) 遺伝子の存在が明らかとされ⁷⁾、STH 遺伝子の A20G (Q7R) 多型と PSP との関連も報告されている^{8, 9)}。これらの多型やハプロタイプと PSP の関連は基本的に H1 ハプロタイプと PSP の関連に基づく現象として理解しうるが、関連を決定付ける DNA 変化は同定されていない(H1 に連鎖する何らかの DNA 変化を想定している)。

しかしながら、我々及び他の研究から日本人は genotype A0 のアレル頻度は 99% 以上と推定され、PSP との関連は確認できない^{10, 11)}。また、日本人の MAPT 遺伝子領域のハプロタイプ構造は不明である。

目的

日本人において、MAPT 遺伝子領域の多型構造を明らかとし、PSP と MAPT 遺伝子の関連を解析することを目的とする。

方法

PSP 27 人、CBD 9 人、PiD または FTD 11 人、

正常対照 (controls) 24 人の末梢血液白血球より標準的方法で抽出したゲノム DNA を用いた。PSP は NINDS-SPSP の臨床診断基準¹²⁾、CBD は Gibbs の診断基準¹³⁾、ピックまたは FTD は Lund-Manchester の診断基準に従った¹⁴⁾。MAPT 遺伝子エクソン 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 をそれらを挟むイントロン約 100bp とともに PCR にて増幅し、塩基配列を決定した。イントロン 9 の 238bp の挿入欠失多型は、同部位を挟むプライマーにて PCR を行い、PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動した。STH 遺伝子についても同様に塩基配列を決定した。PCR 産物はアガロースゲルにて電気泳動し、該当する PCR 産物を含むゲル部分を切り出し、DNA を抽出し、サイクルシーケンスにて塩基配列を決定した。

結果

H1 H2 ハプロタイプを構成する 9 個の多型の中の 4 個 (エクソン 9 A125G, エクソン 9 T209C, エクソン 9 G254A, イントロン 13 T+34C) については、全例で H1 ハプロタイプを規定する多型のホモ接合であった。H1 ハプロタイプと完全な連鎖不平衡にあることが報告されているイントロン 9 の 238bp 挿入欠失多型¹⁾についても全例で、H1 ハプロタイプに連鎖する挿入型のホモ接合であった。同様に、H1 ハプロタイプに連鎖する STH 遺伝子の A20G 多型とエクソン 7 の G33/A も全例がそれぞれ A/A genotype, G/G genotype であった。HapA HapC ハプロタイプに関連する 5 個の多型の中の 1 つであるエクソン 8 T5G 多型は、HapA ハプロタイプを規定する T アレルのホモ接合が全例でみられた。したがって、以前の A0~4 多型の解析結果と合わせて、日本人はほぼ全例で H1 ハプロタイプを持つと推

定され、本ハプロタイプを用いてのPSPとMAPT遺伝子の相関解析は不可能であった。

その他の既報の多型としては、エクソン 6 C139T, エクソン 6 T157C, エクソン 7 G33A, イントロン 9 G-58A, イントロン 9 C-47A, イントロン 10 G+29A, エクソン 13 T120C を検討した。エクソン 6 C139T については、T アレルの頻度は 0.31 であった。したがって、日本人の H1 ハプロタイプは、本多型により 2 種類に分けられることになる。T アレルの頻度は白人では 0.18 と報告されているが¹⁵⁾、H1 H2 ハプロタイプとの関連は不明であり興味を持たれる(白人においても本多型により H1 ハプロタイプは 2 分される可能性がある)。エクソン 6 T157C では、白人で C アレルの頻度は 0.19 と報告されているが、日本人における本解析では 0 であった。本多型も白人で H1 H2 ハプロタイプの関連は不明である(白人において C アレルが H2 ハプロタイプに関連していれば、妥当な結果といえる)。エクソン 7 G33A は日本人の正常対照者 1 人にヘテロ接合でみられたものであり、稀なものと考えられる。イントロン 9 G-58A, イントロン 10 G+29A, エクソン 13 T120C は、白人において稀なものとして報告されたもので、本解析では見いだされなかった。イントロン 9 C-47A については、A アレルの頻度は 0.29 であり、日本人における既報の報告は 0.44 である。本アレル頻度は白人では 0.009 であり、日本人に特徴的な多型と考えられた¹⁶⁾。この点からも日本人の H1 ハプロタイプは幾つかのサブタイプに分けられると考えられ、日本人における MAPT 遺伝子領域の多型構造は白人とは異なると推定される。

日本人における本解析で多型アレル頻度の高いエクソン 6 C139T, イントロン 9 C-47A 多型を用いて、PSP との相関解析を行っ

た。エクソン 6 C139T では、対照でゲノタイプ C/C 4人 0.27, C/T 5人 0.33, T/T 6人 0.40、PSP でゲノタイプ C/C 10人 0.40, C/T 10人 0.40, T/T 5人 0.20 であり、カイニ乗検定で有意差なし (P=0.377) であった。イントロン 9 C-47A では、対照でゲノタイプ C/C 13人 0.54, C/A 9人 0.38, A/A 2人 0.08、PSP でゲノタイプ C/C 15人 0.51, C/A 10人 0.34, A/A 4人 0.14 であり、カイニ乗検定で有意差なし (P=0.821) であった。

考察

白人においてみられる H1 H2 ハプロタイプという分類に従えば、日本人においては MAPT 遺伝子領域は H1 ハプロタイプであるといえる。しかしながら、イントロン 9 C-47A のように、明らかに白人とは異なる多型が日本人においてみられることから、日本人の MAPT 遺伝子領域を単純に H1 ハプロタイプとすることはできない。今後、本遺伝子領域を詳細に検討することで日本人の MAPT 遺伝子の多型構造を明らかとし、PSP や関連のタウオパチーとの相関を明らかにできると考える。

結論

日本人 MAPT 遺伝子の H1, H2 ハプロタイプに関連した多型は exon7~13 においては全て H1 型であった。日本人 MAPT 遺伝子領域にも、エクソン 6 C139T, イントロン 9 C-47A のような頻度の高い多型が存在する。これらの多型を用いての PSP との相関解析では、有意差はみられなかった。

文献

- 1) Conrad C, et al. Genetic evidence for the involvement of tau in progressive

- supranuclear palsy. *Ann Neurol.* 41:277-281, 1997.
- 2) Baker M, et al. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet.* 8:711-715, 1999
 - 3) Higgins JJ, et al. An extended 5'-tau susceptibility haplotype in progressive supranuclear palsy. *Neurology.* 55:1364-7, 2000
 - 4) Ezquerra M, et al. Identification of a novel polymorphism in the promoter region of the tau gene highly associated to progressive supranuclear palsy in humans. *Neurosci Lett.* 275:183-186, 1999
 - 5) Pastor P, et al. Further extension of the H1 haplotype associated with progressive supranuclear palsy. *Mov Disord.* 17:550-556, 2002
 - 6) de Silva R, et al. Strong association of a novel Tau promoter haplotype in progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett.* 311:145-148, 2001
 - 7) Conrad C, et al. A polymorphic gene nested within an intron of the tau gene: implications for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:7751-7756, 2002
 - 8) Ezquerra M, et al. Sequence analysis of tau 3' untranslated region and saitojin gene in sporadic progressive supranuclear palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 75:155-157, 2004
 - 9) de Silva R, et al. Strong association of the Saitohin gene Q7 variant with progressive supranuclear palsy. *Neurology.* 61:407-9, 2003
 - 10) Okuizumi K, et al. Genetic polymorphism of the tau gene and neurodegenerative diseases with tau pathology among Japanese. *Ann Neurol.* 44:707-708, 1998
 - 11) Conrad C, et al. Differences in a dinucleotide repeat polymorphism in the tau gene between Caucasian and Japanese populations: implication for progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett.* 250:135-137, 1998
 - 12) Litvan I, et al. Clinical research criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome): report of the NINDS-SPSP international workshop. *Neurology.* 47:1-9, 1996
 - 13) Gibb WR, et al. Clinical and pathological features of corticobasal degeneration. *Adv Neurol.* 53:51-54, 1990
 - 14) Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. The Lund and Manchester Groups. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 57:416-418, 1994.
 - 15) Poorkaj P, et al. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol.* 43:815-825, 1998
 - 16) Kobayashi T, et al. Contrasting genotypes of the tau gene in two phenotypically distinct patients with P301L mutation of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *J Neurol.* 249:669-675, 2002

孤発性パーキンソン病における

マイクロサテライト多型を基盤としたゲノムワイド関連解析

戸田達史¹⁾、佐竹渉¹⁾²⁾、廣田勇士¹⁾、百瀬義雄³⁾、水田依久子¹⁾、
田宮元⁴⁾、佐古田三郎²⁾、猪子英俊⁴⁾、山本光利⁵⁾、服部信孝⁶⁾、
水野美邦⁶⁾、村田美穂⁷⁾、金澤一郎⁷⁾

- 1) 大阪大学ゲノム機能分野、2) 大阪大学神経内科、3) 東京大学 CBI、
4) 東海大学分子生命科学2、5) 香川県立中央病院神経内科、
6) 順天堂大学神経内科、7) 国立精神・神経センター

研究要旨 孤発性パーキンソン病は遺伝要因と環境要因により発症する多因子遺伝性疾患である。我々は、孤発性パーキンソン病の疾患感受性遺伝子の同定を目指し、関連解析を行っている。遺伝マーカーとして全ゲノム上に平均 100kb 間隔で分布する約 27,000 個のマイクロサテライト多型を利用することにより、関連解析のゲノムワイド化を実現した。また pooled DNA 法を採用し、タイピング操作を大幅に簡略化した。既に、約 27,000 個全てのマイクロサテライト多型に関して 1 次スクリーニングが終了し、各染色体において 5-12%のマイクロサテライト多型で $p < 0.05$ を認めた。また、他施設より連鎖領域として既報告である第 1 染色体上の領域に位置するマーカーは、 $p = 3.9 \times 10^{-6}$ であり、これらと連鎖不平衡にある遺伝子が孤発性パーキンソン病の発症に関与している可能性がある。引き続き、体系的網羅的に関連解析を遂行する。また、患者検体として、薬剤への反応性・副作用などを含む詳細な臨床データを有するパーキンソン病患者のゲノム DNA を用いているため、患者群を臨床像から階層化し、患者階層と遺伝子多型の関連を見出すことにより、パーキンソン病におけるオーダーメイド治療法を確立することを目標としている。

はじめに

パーキンソン病は、神経変性疾患の中ではアルツハイマー病について頻度が高く、本邦における有病率は人口 10 万人あたり 100 人以上である。好発年齢は 60 歳前後であることから、人口の高齢化に伴い患者数の増加が予測される。

少数のメンデル遺伝性を示す家族性パーキンソンニズムにおいては、 α -synuclein¹⁾や parkin²⁾、

UCH-L1³⁾、DJ-1⁴⁾、NR4A2⁵⁾が同定された。家族性パーキンソンニズムと孤発性パーキンソン病には一部共通の発症メカニズムが存在すると考えられ、精力的に研究されている。

一方で、症例の大多数(90%以上)をしめる孤発性パーキンソン病については、(a)約 10%の PD 患者の近親者に PD 患者が存在する⁶⁾、(b) subclinical な症例も含んだ PET study の結果で

は、一卵性双生児の疾患一致率が約60%あり二卵性の約3倍である⁷⁾、(c)アイスランド国民を対象とした大規模な疫学調査で同胞罹患危険率が6.7である⁸⁾ことより、孤発性パーキンソン病は遺伝要因と環境要因により発症する多因子遺伝性疾患と考えられている。孤発性パーキンソン病の疾患感受性遺伝子に関しては、日本、米国、アイスランドの教施設が同定すべくしのぎを削っており、2001年秋より海外教施設から罹患同胞対法による連鎖領域の報告が相次いでいる⁹⁻¹⁵⁾ものの、例えばアルツハイマー病におけるApoE多型のような、確実な疾患感受性遺伝子の報告は、未だない。そこで、我々は、2002年より、(a)マイクロサテライト多型によるゲノムワイド関連解析、(b)SNPによる多数の候補遺伝子の関連解析、(c)罹患同胞対法の3つのアプローチで、孤発性パーキンソン病の疾患感受性遺伝子の同定、病態解明を目指して研究を進めている。さらに、遺伝子多型と、臨床像、抗パーキンソン病薬への反応性・副作用の関連を明らかにし、パーキンソン病におけるオーダーメイド治療法を確立することを目標としている(図1)。

本報告では、マイクロサテライト多型によるゲノムワイド関連解析について、詳説する。

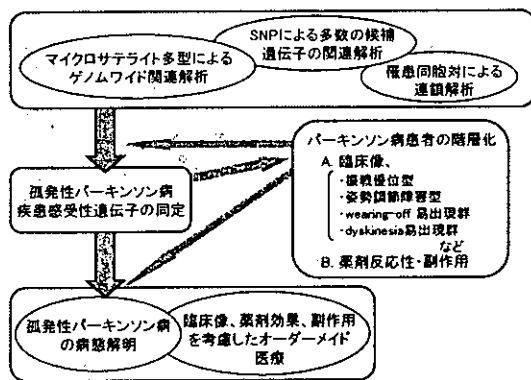


図1 アプローチの概念

対象および方法

日本神経学会専門医が、Calneの診断基準¹⁶⁾で definite と臨床診断したパーキンソン病患者946人から採血した。臨床分類、臨床評価シート作成、UPDRS score 化、薬剤反応性、薬剤副作用など、詳細に臨床データを収集し、臨床像からの階層化を可能にした。尚、採血に際しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき、十分なインフォームドコンセントを行った。また、本研究は、大阪大学大学院医学系研究科、東京大学大学院医学系研究科、順天堂大学医学部、香川県立中央病院、東海大学医学部の各倫理委員会により承認を得て行った。

一次スクリーニングとして、(a)患者124人(男性54.8%、発症年齢 54.3 ± 10.5 歳、採血時年齢 63.3 ± 9.5 歳、経過年数 9.04 ± 5.46 年)と、性別をマッチさせた対照124人のゲノムDNAを厳密に定量した後、均等量混合して pooled DNA を作成した(図2)。(b) pooled DNA を鋳型とし、平均100kb 間隔で分布する約27,000個の多型マイクロサテライトマーカー(図3)プライマーをもちいてPCR反応を行った。(c) PCR産物を GeneScanTM、pickpeak(東海大分子生命科学2が独自に開発)により解析し、患者対照間で統計学的検討(2×2, 2Xm Fisher's exact probability test)を行った。

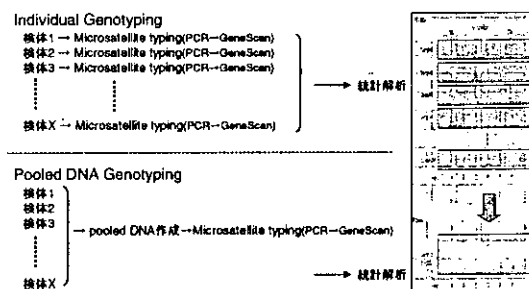


図2 Pooled DNA法: 検体のゲノムDNAを混合して pooled DNA を作成する。pooled DNA をひとつの検体とみなしてタイピングを行うため、従来から一般的で

ある個別タイピングに比し、時間・費用とも大幅に軽減することが可能である。

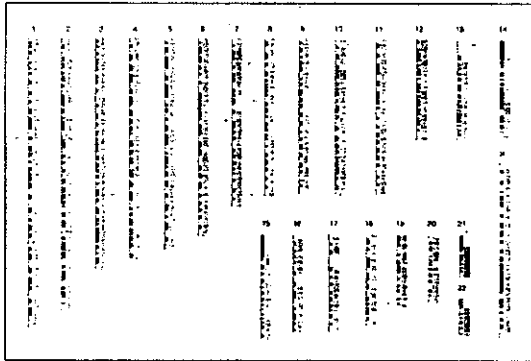


図3 約27,000個の多型マイクロサテライトマーカー：ゲノム上に高密度(平均約100kb間隔)に分布しているため、ゲノムワイドな関連解析が可能である。

結果および考察

全染色体上の約27,000個の多型マイクロサテライトマーカーに関して一次スクリーニングが終了し、各染色体において5%-12%のマーカーで $p < 0.05$ を認めた(表1)。

染色体	マーカー数	ピークを取得した		$p < 0.05$ の	
		マーカー数	マーカー率 (%)	マーカー数	マーカー率 (%)
1	1615	1509	93.5	147	9.7
2	1894	1855	97.4	115	6.9
3	1522	1368	89.9	91	6.7
4	1184	899	75.9	101	11.2
5	1219	972	79.7	95	9.8
6	1265	956	75.6	83	8.7
7	1288	962	74.7	79	8.2
8	926	731	78.9	57	7.8
9	852	598	70.2	47	7.9
10	924	639	69.2	60	9.4
11	942	747	79.3	46	6.2
12	699	577	82.5	55	9.5
13	622	458	73.6	26	5.7
14	575	437	76	42	9.6
15	468	447	95.5	31	6.9
16	513	436	85	30	6.9
17	513	467	91	46	9.9
18	550	509	92.5	47	9.2
19	370	268	72.4	30	11.2
20	438	376	85.8	38	10.1
21	268	238	88.8	24	10.1
22	233	190	81.5	13	6.8
X	774	623	80.5	36	5.8
Y	15	13	86.7	1	7.7
Total	19669	16075	81.7	1340	6.3

表1 各染色体の1次スクリーニング結果(表1では全マーカー数は19669マーカーであるが、既に27,158マーカー全てに関して、1次スクリーニングを完了している)

また、他施設より連鎖領域として既報告である第1染色体上の領域⁹⁾に位置するマーカーは、 p

$= 3.9 \times 10^{-6}$ であり、これらと連鎖不平衡にある遺伝子が孤発性パーキンソン病発症に関与している可能性がある(図4)。

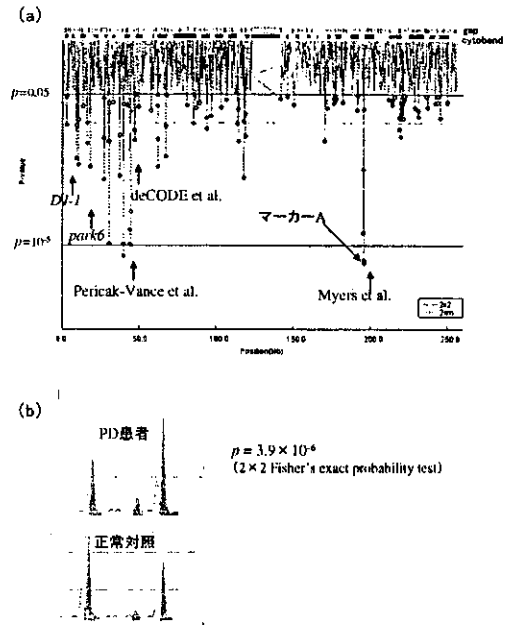


図4 (a) 第1染色体上のマーカーの関連解析結果：横軸に染色体上のマーカーの位置、縦軸に p 値(2x2, 2Xm Fisher's exact probability test)を示す。Pericak-Vance et al は、既報告の連鎖領域を示す。(b) マーカーAにおける、患者・対照の pickpeak 波形。2x2 Fisher's exact probability test で、 $p = 3.9 \times 10^{-6}$ であった。

今後、これらのマーカーに対して、さらに他の集団により作成した pooled DNA を用いて、体系的網羅的に、二次、三次スクリーニングを行い候補領域を絞り込む。候補領域内で SNP を用いた連鎖不平衡マッピングを行い、孤発性パーキンソン病の疾患感受性遺伝子を同定し、病態解明を目指す。

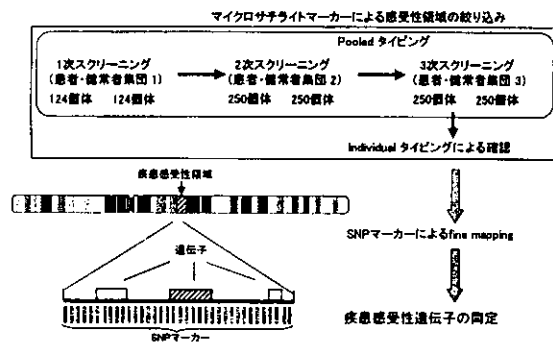


図5 疾患感受性遺伝子同定までの方針概略

また、患者検体収集に際し、詳細な臨床データを収集しているため、患者群を臨床像から階層化することが可能である。関連解析により同定した遺伝子多型と患者階層をリンクさせることにより、遺伝子多型と、臨床像・抗パーキンソン病薬への反応性・副作用の関連を明らかにし、パーキンソン病におけるオーダーメイド治療法を確立することを目標としている。

結論

- 1) 全染色体における約 27,000 個のマイクロサテライト多型に関して 1 次スクリーニングが終了し、各染色体上の 5-12% のマーカーで $p < 0.05$ を認めた。
- 2) 他施設より連鎖領域として既報告である第 1 染色体上の領域⁹⁾に位置するマーカーは、 $p = 3.9 \times 10^{-6}$ であり、これらと連鎖不平衡にある遺伝子が孤発性パーキンソン病の発症に関与している可能性がある。
- 3) 引き続き、体系的網羅的に、関連解析を遂行する。

文献

- 1) Polymeropoulos MH et al. Science, 276: 2045-2047, 1997.
- 2) Kitada T et al. Nature, 392: 605-608, 1998.

- 3) Leroy E et al. Nature, 396: 451-452, 1998.
- 4) Bonifati V et al. Science, 299: 256-259, 2003.
- 5) Le W et al. Nat Genet, 33: 85-89, 2003.
- 6) Elbaz A et al. Neurology, 52: 1876-1882, 1999.
- 7) Piccini P et al. Ann Neurol, 45: 577-582, 1999.
- 8) Sveinbjornsdottir S et al. N Engl J Med, 343: 1765-1770, 2000.
- 9) DeStefano AL et al. Neurology, 57: 1124-1126, 2001.
- 10) Scott WK et al. JAMA, 286: 2239-2244, 2001.
- 11) Li YJ et al. Am J Hum Genet, 70: 985-993, 2002.
- 12) Hicks AA et al. Ann Neurol, 52: 549-555, 2002.
- 13) Pankratz N et al. Am J Hum Genet, 71: 124-135, 2002.
- 14) Pankratz N et al. Am J Hum Genet, 72: 1053-1057, 2003.
- 15) Pankratz N et al. Hum Mol Genet, 12: 2599-2608, 2003.
- 16) Calne DB et al. Ann Neurol, 32: S125-127, 1992.

多数の候補遺伝子 SNP タイピングによる 孤発性パーキンソン病の関連解析

戸田達史¹⁾、水田依久子¹⁾、百瀬義雄²⁾、廣田勇士¹⁾、佐竹涉¹⁾、
山本光利³⁾、服部信孝⁴⁾、水野美邦⁴⁾、村田美穂⁵⁾、金澤一郎⁵⁾

1) 大阪大学ゲノム機能分野、2) 東京大学 CBI、3) 香川県立中央病院神経内科、
4) 順天堂大学神経内科、5) 国立精神・神経センター

研究要旨 孤発性パーキンソン病 (PD) の感受性遺伝子同定を目指して、既に我々はマイクロサテライト多型を基盤としたゲノムワイド関連解析を行っている。今回新たなアプローチとして、数百個の候補遺伝子上 SNP (一塩基多型) マーカーを用いた患者・対照関連解析を開始した。まず各群 95 人を対象とした一次スクリーニングを行った。現在までに、家族性 PD, ドーパミン、タンパク質分解などに関連する 57 個の候補遺伝子上の計 115 SNPs を解析終了した。その結果、アレル頻度カイニ乗検定で $p < 0.05$ の SNP は、UCH-L1、PRKCG、parkin、SYPH1、LMX1B の 5 つの遺伝子上にみられた。これらは検体数を増やして二次スクリーニングを行うとともに、さらに多数の遺伝子・SNP を解析していく。

はじめに

孤発性パーキンソン病 (PD) は多因子遺伝性疾患と考えられている。その疾患感受性遺伝子を明らかにするために、我々は 3 つのアプローチを進めている (本報告書「孤発性パーキンソン病におけるマイクロサテライト多型を基盤としたゲノムワイド関連解析」参照)。本報告では、そのうち「SNP による多数の候補遺伝子の関連解析」について述べる。SNP (single nucleotide polymorphism) とはいわばゲノム配列の一塩基違いの個人差である。通常多型頻度が 1% 以上のものを指す。全ゲノム上に 1000 万個近く存在すると言われている。現在 500 万以上の SNP がインターネットのデータベースに登録されている。一部の SNP には疾患のリスクや薬剤の作用・副作用を反映するという意義がある (図 1)。本研究では遺伝子マーカーとして候補遺伝子上の SNP を用いた患者対照関連解析を行った。

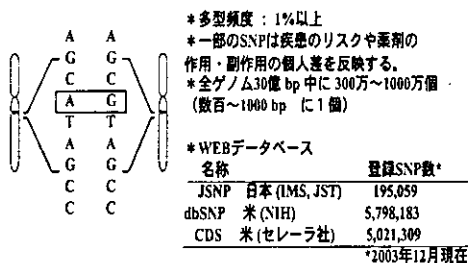


図1 SNP の概念

対象および方法

患者・対照関連解析の全体の流れのうち現在一次スクリーニングまで進行している (表 1)。候補遺伝子は文献など過去の知見から選出した。各遺伝子上の SNP を JSNP¹⁾、dbSNP²⁾、セレーラ³⁾などのデータベースから選んだ。その際、多型頻度 (minor allele が 10-20%以上)、隣の SNP との間隔 (5kb 以上) を参考に各遺伝子 3 SNPs を目安にした。

1. 候補遺伝子の選出：文献等から、数百個。
2. SNPの選出：データベース (JSNP, dbSNP, セレーラ等) から、各遺伝子3個。
3. SNPタイピング：Multiplex-PCR法、インベーター法、各検体。
4. 一次スクリーニング：PD95人対照95人で有意差のあるSNPを残す。
5. 二次スクリーニング：一次で残ったSNPを検体数を増やして (~900人) 再現性のあるものを絞り込む。
6. 連鎖不平衡マッピング：二次で残ったSNPの周辺で疾患と関連する領域 (ハプロタイプブロック) を同定する。
7. 疾患感受性遺伝子変異の同定：ハプロタイプブロック内で探す。

表1 SNP を用いた患者・対照関連解析の流れ

ゲノム DNA から multiplex PCR により 10 箇所 SNP 領域を同時に増幅し、Invader 法⁴⁾により SNP タイピングを行った (図 2、図 3)。統計解析はカイニ乗解析を Allele 頻度、Genotype 頻度、ハプロタイプ頻度で行った。一次スクリーニングとして患者 95 人・対照 95 人を対象にして allele

頻度で $p < 0.2$ のものを残すことにした。なお、採血の際にはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき、文書によるインフォームドコンセントを得た。また、本研究は大阪大学大学院医学系研究科、東京大学大学院医学系研究科、順天堂大学医学部、香川県立中央病院の各倫理委員会の承認を得ている。

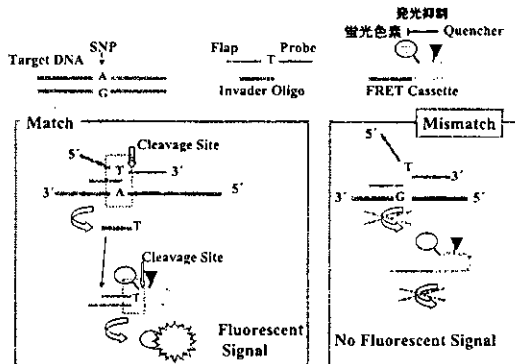


図2 インバーダー法の原理

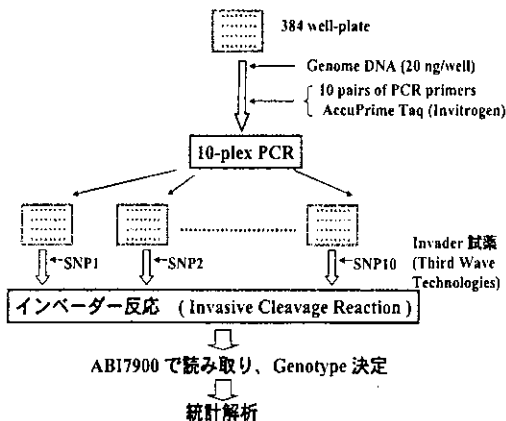


図3 多数 SNP タイピングの流れ

結果および考察

候補遺伝子はドパミン関連、家族性 PD 関連、蛋白分解（プロテアソーム、オートファジー）など 12 項目にわけて、現在 150 個あまりリストアップしている（表 2）。これまでに 57 個の候補遺伝子上の計 115 SNPs のうち、 $p < 0.2$ は 17 SNPs あった。そのうち以下の 5 つの遺伝子上 SNP に $p < 0.05$ の有意差がみられた（表 3）：UCH-L1⁵⁾ ($p=0.020$)、PRKCG⁶⁾ ($p=0.0178$)、parkin⁷⁾ ($p=0.0493$)、SYPH1⁸⁾ ($p=0.0487$)、LMX1B⁹⁾ ($p=0.0359$)。

今回有意差のみられた SNPs に関しては、検体数を増やして再現性を確かめる必要がある。同時

にさらに多数の候補遺伝子・SNPs について一次スクリーニングを続けていく。

1. ドパミン関連：AADC (2), MAOB, COMT (3), DBH (1), TH, DAT, SLC6A3 (1), DRD1 (1), DRD2 (3), DRD3 (1), DRD4, DRD5 (1), GTPCH, etc.
2. 家族性 PD, PD 関連疾患、動物モデル：SNCA (3), parkin (2), GPR37 (1), UCHL1 (1), DJI (2), NR4A2 (2), DYT1 (1), UBE2L3 (1), tau (3), PRKCG (3), KCNU6 (3), etc.
3. Lewy 小体関連：ubiquitin, NF, A2M (2), etc.
4. 毒物代謝・薬物送達関連：CYP2D6, CYP1A2 (1), CYP2E1 (1), CYP2C9 (1), PON1 (1), NAT2, STX8 (3), CAV1 (3), Rab6 (3), MTHFR (1), DAA4 (1), ABCB1 (4), etc.
5. アポトーシス関連：bcl-2, APAF1 (3), NAF1 (2), DAPI (3), caspases, etc.
6. ミトコンドリア関連：NDUFV2 (3), KGDHC (OGDH, DLST, DLD), etc.
7. サイトカイン関連：IL-1B (1), IL-2 (1), IL-6, TGF α (3), TGF β (2), TNF (1) etc.
8. 神経栄養因子関連：BDNF (1), GDNF, CNTF (1), NGF β (1), NTRK1 (1), midkine, bFGF, etc.
9. 酸化ストレス関連：SOD2 (1), catalase (3), MPO, glutathioneS-transferase, HMOX1 (2), Thioredoxine reductase, etc.
10. 中脳発生・分化関連：Lmx1b (3), Pitx3 (3), engrailed1, engrailed2, fezl, etc.
11. プロテアソーム・オートファジー関連：SYPH1 (3), SUMO, PIAS, Ubc, HOIL-1, Dorfin, CHIP, CDCrel-1, Beclin-1, cathepsin, GABARAP, etc.
12. その他：PRKC2 (3), CYP2A6, CHRN2 (1), CHRNA4 (2), CHRNA7 (1), GRPR, FAAH (3), GLO1 (2), ALDR1 (2), NCAM (3), CDH2 (2), etc.

表 2 PD 候補遺伝子リストアップ（括弧内は解析 SNP 数）

	P			N			p value (chi-square statistics)			
	MM	Mm	mm	MM	Mm	mm	genotype	allele	MM/Mm vs mm	mm/Mm vs MM
parkin (familial PD)										
IMS-JST072672	67	28	3	40	28	6	0.139	0.158	0.05	0.342
IMS-JST043796	61	24	0	53	26	4	0.0361	0.0493	0.0124	0.1917
IMS-JST16011	55	29	6	47	35	6	0.5578	0.3965	0.9678	0.299
PRKCG (protein kinase C-γ, model rat)										
IMS-JST096857	44	27	8	43	39	4	0.1983	0.9821	0.1761	0.6641
IMS-JST014392	55	27	3	39	30	9	0.0611	0.0178	0.0505	0.6577
IMS-JST014391	63	10	0	73	8	0	0.7621	0.4753	1	0.461
NDUFV2 (mitochondria complex I)										
rs10002648	27	38	12	41	37	7	0.1918	0.0927	0.0858	0.2578
IMS-JST072515	37	37	18	44	34	9	0.1678	0.0627	0.8743	0.2123
IMS-JST27957	45	27	10	51	33	4	0.1884	0.2592	0.0698	0.686
SYPH1 (syphilin1, α-syn interacting protein)										
IMS-JST014366	37	43	9	43	38	8	0.6645	0.4276	0.7987	0.366
IMS-JST043187	36	45	11	48	40	5	0.1192	0.0487	0.1114	0.0882
IMS-JST101501	39	41	11	44	38	18	0.7956	0.5293	0.796	0.4996
LMX1B (homeobox gene, development of DA neuron)										
IMS-JST174367	33	43	13	29	48	16	0.6854	0.4181	0.6322	0.4815
IMS-JST073995	35	42	15	23	46	23	0.1337	0.0359	0.1451	0.0569
IMS-JST081987	34	43	10	48	37	7	0.1986	0.0848	0.3755	0.0789
UCH-L1 (familial PD) C53A (Ser187) ²⁾							P: N=261/199 : 244/252	0.0200		

表 3 関連解析結果（一部）：例として 6 つの遺伝子を挙げた。各 SNP の MM (major allele homo), Mm (hetero), mm (minor allele homo) の人数とカイニ乗検定 p 値を示す。下線部は allele 頻度で $p < 0.05$ のもの。

結論

1) Multiplex PCR, Invader 法により、多数検体、

多数 SNP タイピングシステムを構築して、候補遺伝子上 SNP の PD・対照関連解析を行った。

2) 一次スクリーニングの結果 115SNPs のうち 22SNPs が残っている。

3) これらの SNPs については検体数を数百以上に増やして再現性を確認する。

4) さらに多数の候補遺伝子・SNP をリストアップして本解析を進めていく。

文献

1) <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/> Hirakawa M et al., *Nucleic Acids Res*, 30:158-162, 2002.

2) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

3) <http://www.celeradiscoverysystem.com/index.cfm>

4) Lyamichev V et al., *Nat Biotech*, 17:292-296, 1999.

5) Leroy E et al., *Nature*, 395:451-452, 1998.

6) Craig NJ et al., *Nat Neurosci*, 4:1061-1062, 2001.

7) Kitada T et al., *Nature*, 392:605-608, 1998.

8) Engelender S et al., *Nat Gene*, 22:110-114, 1999.

9) Smidt MP et al., *Nat Neurosci*, 3:337-341, 2000.

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患事業）
神経変性疾患に関する研究班
（分担）研究報告書

相模原地区における家族性パーキンソニズムの原因遺伝子の探索

分担研究者 長谷川一子 （国立相模原病院神経内科）

研究協力者 船山 学¹⁾，太田悦朗¹⁾，古和久幸²⁾，辻 省次³⁾，小幡文弥⁴⁾

1) 北里大学医療系大学院

2) 北里学園

3) 東京大学医学部神経内科

4) 北里大学医療衛生学部

研究要旨 神奈川県相模原市在住の常染色体優性遺伝様式をとるパーキンソニズムの原因遺伝子の探索を行ってきた。本家系は臨床的には孤発性パーキンソン病ときわめて類似するが、病理学的には Lewy 小体を認めないなどの特徴を有する。現在までに、他の家族性パーキンソニズムの原因遺伝子として報告された遺伝子は自験家系の原因遺伝子ではないことを示し、ゲノムワイドの探索を開始した。前年度までには自験家系の原因遺伝子が 12p11.2-q13.1 に存在することを示し、原因遺伝子座を *PARK 8* として登録した。ヒトゲノムプロジェクトにより 12p11.2-q13.1 には、機能や局在が既知、あるいは未知の遺伝子が約 60 個マップされており、さらにこの領域内のいずれかの場所と相同配列を持つ Expressed Sequence Tag (EST) が無数報告されている。*Park 8* の遺伝子本体を特定するために、これらの遺伝子や EST について、家系内患者/健常者のゲノム塩基配列を比較し、疾患と関連する変異を網羅的に探索する作業を昨年引き続き行い、エクソン部分について 86% 終了した。現在、疾患と関連する遺伝子変異を見出し、確認作業中にある。また、候補領域を狭める目的で *PARK8* に連鎖する家系の発掘を行い、相模原家系 2 を見出し、候補領域を狭めることができた。

はじめに

相模原地区のパーキンソニズム家系は常染色体優性遺伝様式をとる。発症年齢は 38-74 歳(平均 51±6 歳)で、臨床的には片側発症でパーキンソン病の主要 4 症候を示し、L-DOPA への反応は良好で、臨床経過に於いても通常のパーキンソン病と明らかな差異は認めない。しかし、神経病理学的にはパーキンソン病の診断根拠とされる Lewy 小体を認めず、神経細胞脱落が黒質に限局性であり、青斑核は著変を認めないなど、孤発性パーキンソン病とは病理学的には異なっている。この家系について原因遺伝子を探索することを目的として、検討を開始した。

これまでに α -Synuclein, Parkin, Tau, UCH-L1 について、相模原家系における遺伝子変異の有無を調べた結果、報告されている変異は検出されなかった。さらに、これら 4 遺伝子の近傍に位置する microsatellite marker を用いた連鎖解析を行ったが、相模原家系における発症とこれらの遺伝子の近傍遺伝子についても連鎖が否定されている。

平成 14 年度にはゲノムワイドに microsatellite marker を用いた検討結果、この家系の原因遺伝子の locus を特定し、原因遺伝子を *Park 8*(12p11.2-q13.1) として登録した¹⁾。平成 15 年度からは、相模原パーキンソニズム家系の原因遺伝子同定について個別の遺伝子について探索を開始し、候補遺伝子を数

個見出したので中間報告をする。

また、候補領域を狭まる目的で他の家系や孤発性パーキンソニズムを用い、*PARK8* に連鎖する家系の探索も行った。これらの調査には国立相模原病院倫理委員会の承認を得て行った。

方法

図 1 に相模原パーキンソニズム家系の家系図を示す。

遺伝子検索の対象者は相模原家系患者 15 名、家系内非/未発症者 12 名、配偶者 4 名であった。対照としては 48 名の健常者、合計 79 名について検討を行った。採血はインフォームドコンセント後に行い、実際に採血した症例は図 1 星印で示す。

前年度までに 2 点解析、LINKMAP program で行った多点解析より得られた 12p11.23-q13.11 に相模原家系の遺伝子座が存在することが明らかとなった(図 2)。

ヒトゲノムプロジェクトにより 12p11.2-q13.1 には、機能・発現部位等が既知あるいは未知の遺伝子が約 60 個マップされており、さらにこの領域内のいずれかの場所と相同配列を持つ Expressed Sequence Tag (EST) が無数報告されている。この部位について昨年度に引き続いて相模原家系の発症者、および未発症キャリアに特異的な遺伝子変異を網羅的に探索した。

また、この前年度までの解析により、相模原家系に強

図1. 相模原家系 ☆は採血の同意が得られた構成員.

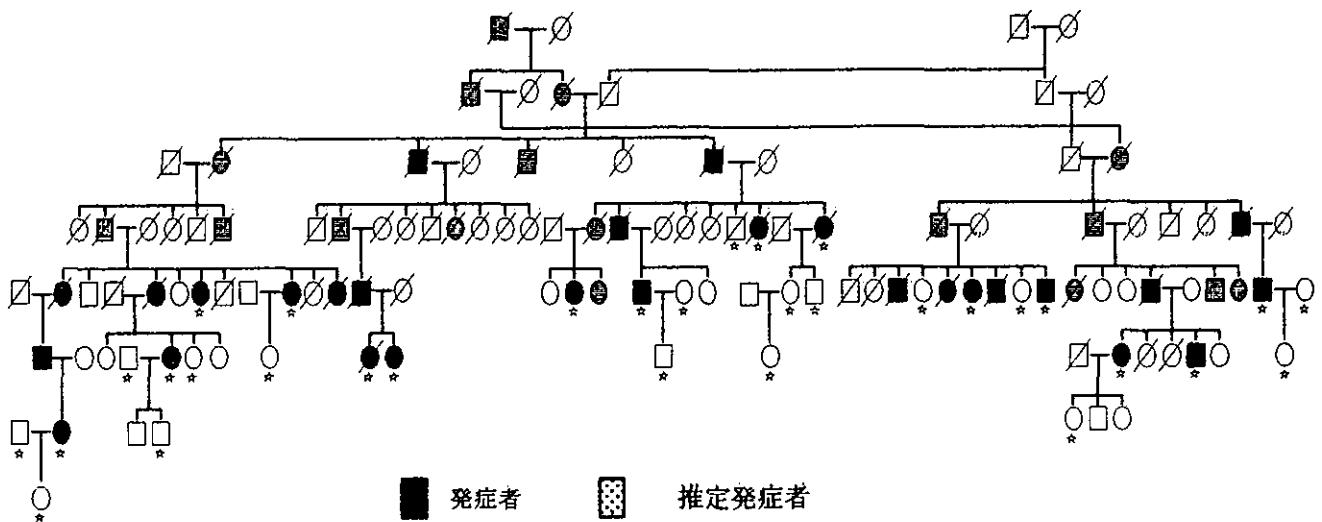
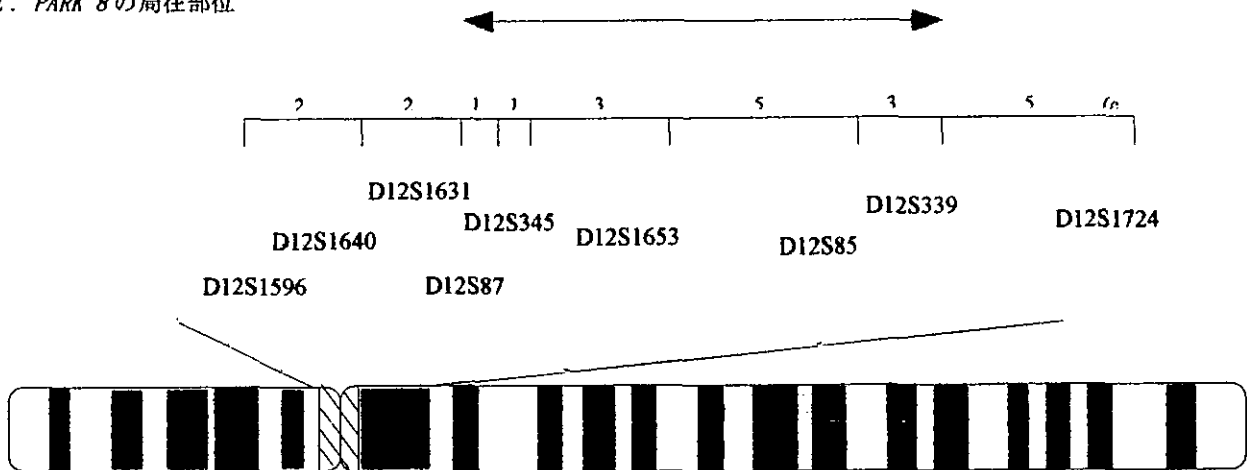


図2. PARK 8 の局在部位



く連鎖している microsatellite marker である D12S345, allele230 を用いて自験パーキンソン病 80 名について検討を行った。D12S345, allele230 は自験家系では全例で認められるが, normal frequency は 0.01 で, 極めて自験家系に特異性の高い microsatellite marker である。これが検出された患者および, 家系構成員についてハプロタイプ解析を行った。

結果

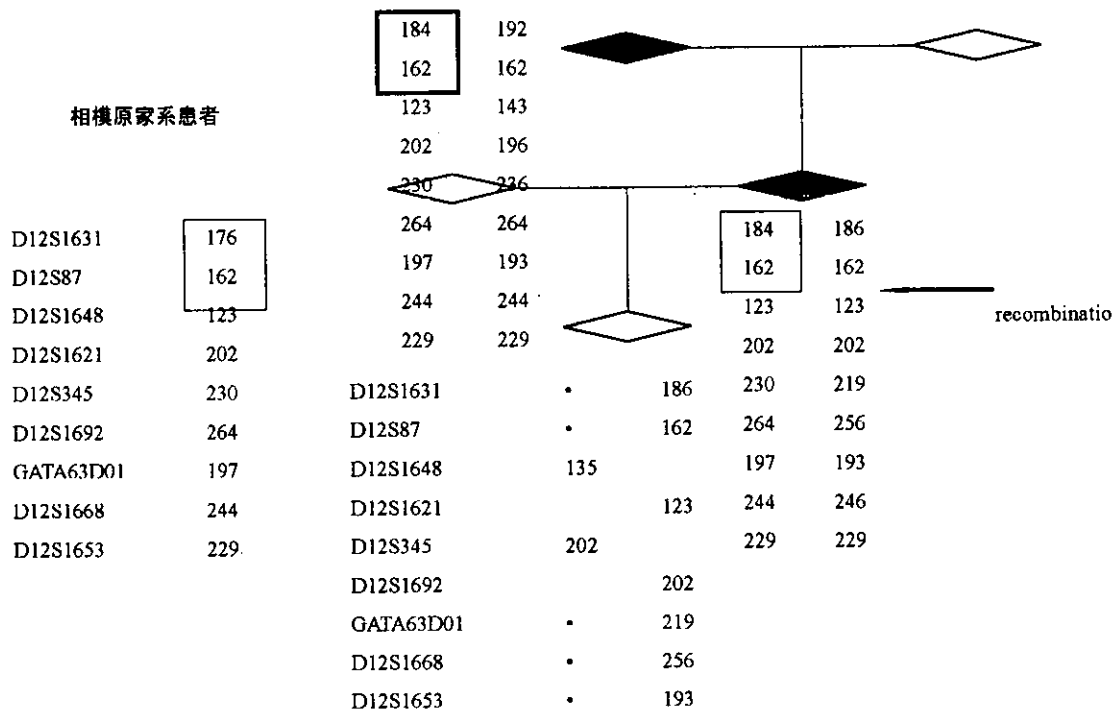
相模原家系における原因遺伝子を昨年までに第 12 番染色体 12p11.2-q13.1 の約 13 CM の領域内にマップした。この位置は既報のいずれのパーキンソニズム遺伝子座とも異なっており, 新規の遺伝子座 Park 8 として登録した。12p11.2-q13.1 には約 60 の遺伝子の存在が知られており, 現在, これらの遺

伝子のエクソンについて, 家系内患者/健常者のゲノム塩基配列を比較し, 疾患と関連する変異を網羅的に探索することにより, 原因遺伝子同定の作業を行っている。

現在, 解析予定遺伝子数 79 のうち 46 遺伝子について解析を終了した。主としてコーディングレジョンを中心に網羅的に探索しているが, エクソン数で示すと対象とする 864 エクソン中, 740 エクソンについては解析を終了した。つまり, 現時点では 86% 終了している。これまでの検討で数箇所の疾患と関連した変異が見出されており, 現在確認作業に入っている。

また, PARK8 に連鎖する家系の探索に於いては 1 症例, および家族性発症例 1 例が allele230 を有していた。この 2 症例について他の microsatellite

図3. 相模原2家系のハプロタイプ解析結果



marker についてハプロタイプ解析を行ったところ、*PARK8* に連鎖する家系である可能性が示された。この症例については親の世代での発症が認められ、優性遺伝様式をとることが確認された。この家系は相模原在住であるが、我々の相模原パーキンソニズム家系との血縁関係は、戸籍や過去帳では明らかではなかった。この家系についてさらに検討を加えたところ、親世代で剖検が得られており、再度神経病理学的検索を行ったところ、Lewy 小体が認められず、青斑核にも異常が見られず、純粹黒質変性像を示し、相模原家系と同様の病理像を示した。この家系のハプロタイプ解析を図3に示す。図3に示す結果を得、自験例の相模原大家系と数世代前に分かれた家系である可能性がハプロタイプ解析結果からは得られた。このため、この家系を相模原パーキンソニズム家系2として、今後他の家系内構成員についても検索を進めることとした。

この相模原家系2を得ることができ組み替えの存在から、*PARK8* の候補領域は 13cM から 10cM に狭めることができた。

考察

Park 8 (12p11.2-q13.1) の遺伝子本体を特定するために、この領域内の遺伝子のエクソンを中心に検討を行っている。この網羅的作業と同時に、同様の臨床像、神経病理所見を示す家系を発掘し、*PARK 8*

の候補領域を狭める作業を続ける予定にある。

現在、網羅的なコーデイングレジョンについての検索の結果、家系と関連する遺伝子変異を数箇所見出し、現在確認作業を行っている。また同時に、EST についても検討を広げていく予定としているが、これらの遺伝子や EST について、患者一家系内健常者—正常コントロールの比較により、正常多型でないことの確認などが必要である。

結論

相模原パーキンソニズムの原因遺伝子同定について、現在検索中である。本年度はコーデイングレジョンについては 86%まで終了し、有力な候補遺伝子について確認作業中である。

相模原パーキンソニズム家系2を見出し、候補領域を 13cM から 10cM に狭めることができた。

F. 参考文献

- 1) M Funayama, K Hasegawa, H Kowa, M Saito, S Tsuji, F Obata: A new locus for Parkinson's disease (Park8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* 51:296-301,2002.

「パーキンソン病モデルにおける黒質神経細胞死メカニズム の検討」に関する研究

水野 美邦¹⁾, 望月 秀樹¹⁾, 山田 正典¹⁾

1) 順天堂大学医学部脳神経内科

研究要旨

パーキンソン病(PD)における黒質神経細胞死での α -synuclein の機能を解析するため、アデノ随伴ウィルスベクター(rAAV)を用いてヒト α -synuclein, EGFP をラット黒質に過剰発現させた。rAAV 感染 13 週間後には、EGFP 群では黒質神経細胞脱落が認められなかったが、 α -synuclein 群では約 50%の黒質神経細胞脱落が認められた。同時に α -synuclein 群では、 α -synuclein のリン酸化(phospho- α -synuclein), 及び caspase-9 の活性化が起きていた。また、同様の実験を大脳皮質にて行った結果、phospho- α -synuclein 及び活性化型 caspase-9 は黒質同様に認められた。これらの現象は PD, DLB 患者脳でも認められており、従って本系は病態を反映し、メカニズム解析に適した in vivo モデルであると考えられた。

はじめに

パーキンソン病(PD)は黒質、青斑核の選択的神経細胞死により特徴づけられる原因不明の神経変性疾患である。しかしながら、その神経細胞死には α -synucleinが関与していると考えられている(1)。

α -synucleinによる神経細胞死メカニズム解析は主にin vitro系にて行われ、 α -synucleinのオリゴマー化、ミトコンドリア障害などが細胞死に重要であることが示されている(1)。

in vivoでの解析はまず α -synucleinトランスジェニックマウスにて行われてきたが、今までに報告されているものは黒質神経細胞の脱落が弱いため、メカニズム解明には至っていない。次に、 α -synucleinをウィルスベクターにて黒質に発現させる系が構築された。この系では黒質神経細胞の脱落は顕著に認められているが、そのメカニズムは不明である。

著者らは、アデノ随伴ウィルスベクター(rAAV)を用いて α -synuclein, EGFPをラット黒質に発現させ、 α -synuclein誘発性の黒質神経細胞死メカニズムを免疫組織化学的に解析した。また、DLBでの神経細胞死を解析するため、大脳皮質でも同様の実験を行った。

方法

・rAAV- α -synuclein, rAAV-EGFP の作製
ヒト α -synuclein 遺伝子を pAAV-MCS(rAAV 作製のプラスミド)にクローニングし、pAAV-

α -synuclein を作製した。次に、pAAV- α -synuclein 及び pAAV-iresEGFP を用いて、常法に従い rAAV- α -synuclein(4.2×10^{11} genomes/ml) 及び rAAV-EGFP(5.6×10^{11} genomes/ml)を作製した。力価(genomes/ml)は PCR にて半定量的に測定した。

・ラット黒質、大脳皮質への rAAV 注入
10 週齢 SD ラットを用い、黒質には $3 \mu\text{l}$, 大脳皮質には $2 \mu\text{l}$ のウィルス液を注入した。注入位置は黒質(後方 5.3mm, 左側 2.4mm, 深さ 7.4mm, 数値はブレグマを基準。)及び大脳皮質(後方 1.0mm, 左側 5.0mm, 深さ 3.0mm)とした。

・免疫組織化学染色
rAAV 注入 13 週間後に断頭にて脳組織を採取し、4%パラホルムアルデヒド中に 4°C で 2 日間保存した。その後 30%シュウクロース中に 2 日間保存した後、クリオスタットにて $20 \mu\text{m}$ 厚切片を作製し、30%シュウクロース中で保存した。PBS 洗浄、各種動物血清によるブロッキング後、 4°C にて一次抗体と反応させた。一次抗体には anti-TH (rabbit, calbiochem), anti-GFP (mouse, Sigma), anti- α -synuclein (mouse, ZYMED), anti-phospho- α -synuclein (rabbit, 東京大学 岩坪 威先生より供与), anti-cleaved caspase-9 (rabbit, Cell Signaling Technology) を使用した。FITC 又は Alexa594 標識された二次抗体を室温で 1 時間反応させた後、封入、観察した。

・黒質神経細胞数計測

TH 陽性細胞を免疫染色にて可視化した後、黒質の染色像を画像に取り込んだ。左右それぞれの黒質 TH 陽性細胞数を画像上にて計測し、正常側に対する rAAV 注入側の割合(%)にて神経細胞障害性を評価した。

結果

rAAV-EGFP を黒質に注入すると、注入 2, 8, 13 週間で、EGFP 発現が徐々に増加していくことが確認できた。また、13 週後の黒質内の EGFP 発現は、ブレグマから後方 5.4mm の位置で EGFP 陽性細胞数がピーク（ドーパミン神経細胞の約 80% に EGFP 遺伝子発現を誘導）であった。従って、13 週間後の 5.4mm 後方の黒質が rAAV による遺伝子発現の影響を最も反映すると考えられ、以降の実験はこの条件で解析した。

rAAV- α -synuclein 注入 13 週間後では、正常反対側に対し約 50% の黒質神経細胞が脱落していたが rAAV-EGFP での脱落は認められなかった。また、 α -synuclein は細胞膜に局在する傾向が認められた。

α -synuclein 陽性細胞では α -synuclein のリン酸化 (phospho- α -synuclein), phospho- α -synuclein 陽性の小型の凝集体形成、及び caspase-9 活性化が認められた。これらの現象は rAAV-EGFP 群では全く観察されなかった。また、phospho- α -synuclein は核に集積する傾向が認められたが、細胞膜には局在していなかった。

rAAV- α -synuclein を注入した大脳皮質も 13 週間後に解析した結果、黒質と同様に phospho- α -synuclein, 及び活性化型 caspase-9 が認められた。また、同切片において線条体にも α -synuclein 陽性細胞が少数ながら観察された。線条体の α -synuclein 陽性細胞でも活性化型 caspase-9 が観察されたが、phospho- α -synuclein は観察されなかった。

考察

rAAV により α -synuclein をラット黒質に発現させることにより黒質神経細胞脱落を誘発することに成功した。rAAV を用いた同様の結果は既に報告されており(2), その研究では 3-5 週間で有意な黒質神経細胞脱落を認めている。黒質神経細胞脱落に要する時間が異なる理由は α -synuclein 遺伝子発現を調節しているプロ

モーター活性の差であると考えられる。文献(2)では CBA プロモーターを用いているが、本研究では CMV プロモーターを用いており、CBA が CMV より活性が 20 倍高いことが知られている(3)。しかしながら、rAAV-EGFP による EGFP 陽性細胞数、つまり rAAV の感染能は両研究でほぼ同じである。従って、本系は進行が遅い PD モデルであると考えられる。PD は何十年もの時間をかけて徐々に進行する疾患であるため、モデル系も神経細胞死進行が遅い方が病態を反映していると考えられる。実際、PD 脳で認められている現象 (phospho- α -synuclein, 活性化 caspase-9) は本研究で初めて確認された。

α -synuclein の細胞膜への局在が観察されたが、これは α -synuclein の細胞膜との高親和性が原因であると考えられる。phospho- α -synuclein には細胞膜局在が観察されなかったが、 α -synuclein はリン酸化されると膜との親和性が低下することが *in vitro* 系で示されている(4)。従って、 α -synuclein がリン酸化されると細胞質内の α -synuclein 量が増加することが予想される。

α -synuclein, 特に phospho- α -synuclein の核移行が観察された。正常脳では、 α -synuclein は細胞質及び神経終末に多く分布し、核には局在していないことが知られている。しかしながら、paraquat 投与によるマウス PD モデルでは α -synuclein は核に移行し、Histone と結合し、多量体を形成することが示されている(5)。従って、 α -synuclein の核移行は、細胞死を促進することが予想される。

α -synuclein はリン酸化やニトロ化等の修飾によりオリゴマー形成が促進されることが *in vitro* 系で示されている(6-8)。また、レビー小体の様な巨大構造物ではなくオリゴマー程度の小型の構造物が細胞毒性の本体であると予想されている(9)。本研究でも phospho- α -synuclein は小型の凝集体を形成していたが、レビー小体を思わせる様な巨大な構造物は観察されなかった。

本系では caspase-9 の活性化が認められた。caspase-9 はミトコンドリア障害後に活性化されることが知られており、従って、 α -synuclein は何らかのメカニズムでミトコンドリアを障害していると予想される。PD 黒質神経細胞ではミトコンドリアが障害されていること(10)、caspase-9 が活性化されていること(11)

が示されており, *in vitro* 系においても α -synuclein がミトコンドリア障害を誘発することが示されている。従って, 本研究での PD モデルは *in vitro* 系の知見を再現し, 且つ病態を反映した *in vivo* 系であると考えられる。

大脳皮質においても黒質と同様な α -synucleinopathy が認められたことより, DLB モデル構築の可能性が示唆された。phospho- α -synuclein は PD, 及び DLB 脳では高頻度にリン酸化され, レビー小体の構成要素となっている(8)。一方で, 線条体では caspase-9 の活性化は認められたが, α -synuclein のリン酸化は認められなかった。このことより, α -synuclein が十分量発現していれば α -synuclein のリン酸化は神経細胞死誘発には必須ではないことが考えられた。

結論

本系で α -synuclein リン酸化, caspase-9 活性化等, 病態を反映した現象が再現された。従って, 本系は PD での黒質神経細胞死メカニズ

ムを解析する有効な *in vivo* モデル系であると思われる。

文献

- (1) Maries, E., et al. *Nat Rev Neurosci*, 727-738, 2003
- (2) Kirik, D., et al. *J Neurosci*, 2780-2791, 2002
- (3) Raisler, B. J., et al. *PNAS*, 8909-8914, 2002
- (4) Pronin, A. N., et al. *J Biol Chem*, 26515-26522, 2000
- (5) Goers, J., et al. *Biochemistry*, 8465-8471, 2003
- (6) Norris, E. H., et al. *J Biol Chem*, 27230-27240, 2003
- (7) Giasson, B. I, et al. *Science*, 985-989, 2000
- (8) Fujiwara, H., et al. *Nat Cell Biol*, 160-164, 2002
- (9) Goldberg, M. S., et al. *Nat Cell Biol*, E115-E119, 2000
- (10) Hattori, N., et al. *Ann Neurol*, 563-571, 1991
- (11) Viswanath, V., et al. *J Neurosci*, 9519-9528, 20

プロテアソーム活性からみた α シヌクレイン封入体と

ドーパミンニューロン死

下濱 俊¹⁾、澤田秀幸¹⁾、北村佳久²⁾、谷口隆之²⁾

1) 京都大学・大学院医学研究科・臨床神経学

2) 京都薬科大学・病態生理学

研究要旨 パーキンソン病は、ドーパミンニューロン死と Lewy 小体の出現によって特徴づけられるが、両者の関係は不明である。ラット中脳の初代培養ドーパミンニューロンに MPP⁺を投与して検討したところ、ドーパミンニューロン死に伴って、一過性のタンパクのユビキチン化、プロテアソーム活性の増大、mitogen activator protein kinase である p42/p44-MAPK の脱リン酸化が観察された。プロテアソーム阻害薬を投与するとドーパミンニューロン内に α シヌクレイン陽性封入体が形成されたが、ドーパミンニューロン死は拮抗された。さらにラット in vivo モデルでも MPP⁺誘発ドーパミンニューロン死はプロテアソーム阻害薬により拮抗された。プロテアソームを阻害すると p42/p44-MAPK の脱リン酸化は拮抗され、プロテアソーム阻害薬による神経保護作用は p42/p44-MAPK の上流キナーゼである MEK 阻害薬により拮抗された。これらの結果は、MPP⁺誘発ドーパミンニューロン死にはプロテアソーム活性が重要な役割を果たしており、活性が抑制された場合、 α シヌクレイン陽性封入体が形成されるが、ドーパミンニューロン死は回避されることを示しており、ドーパミンニューロン死と封入体形成がプロテアソーム活性の点からは対極に位置している可能性を示唆する。

はじめに

パーキンソン病は進行性のドーパミンニューロン死と α シヌクレインを主要構成成分とする Lewy 小体の形成を特徴としている。ドーパミンニューロン死には不溶化したタンパクの蓄積が関与している可能性が指摘されており、不溶タンパク蓄積の結果である Lewy 小体はドーパミンニューロン死と平行しているとの考えがある。しかし、常染色体劣性若年性パーキンソニズムではドーパミンニューロン死は早期より始まるにもかかわらず Lewy 小体は観察されず、封入体形成とドーパミンニューロン死は必ずしも平行しない^{1,2)}。孤発例のパーキンソン病の原因は不明であるがミトコンドリア複合体 I の部分的活性低下が報告されている^{3,4)}。本研究では、ミトコンドリア複合体 I 阻害作用を持つ methylphenylpyridinium ion (MPP⁺)を用いたドーパミンニューロン死において封入体形成とドーパミンニューロン死がどのような関

係にあるかを検討した。

方法

胎生 16 日齢のラット中脳腹側より単離した細胞をポリエチレンイミンでコートしたカバースリップ上に培養した。MPP⁺ (10・100 μ M, 24・72 時間)を投与し、処置後、抗 tyrosine hydroxylase 抗体を用いた免疫染色により生存ドーパミンニューロンを同定し、ドーパミンニューロンの生存数を検討した。プロテアソーム活性は回収した細胞ホモジェネートを AMC 標識 Suc-Leu-Leu-Val-Tyr とともに 37 度 120 分間、インキューベートし、切り出された AMC を蛍光プレートリーダーで測定した。プロテアソーム阻害薬として、lactacystin, MG-132 および PSI を用いた。また、 α -シヌクレイン陽性封入体の形成についても抗 α -シヌクレイン抗体を用いて検索した。

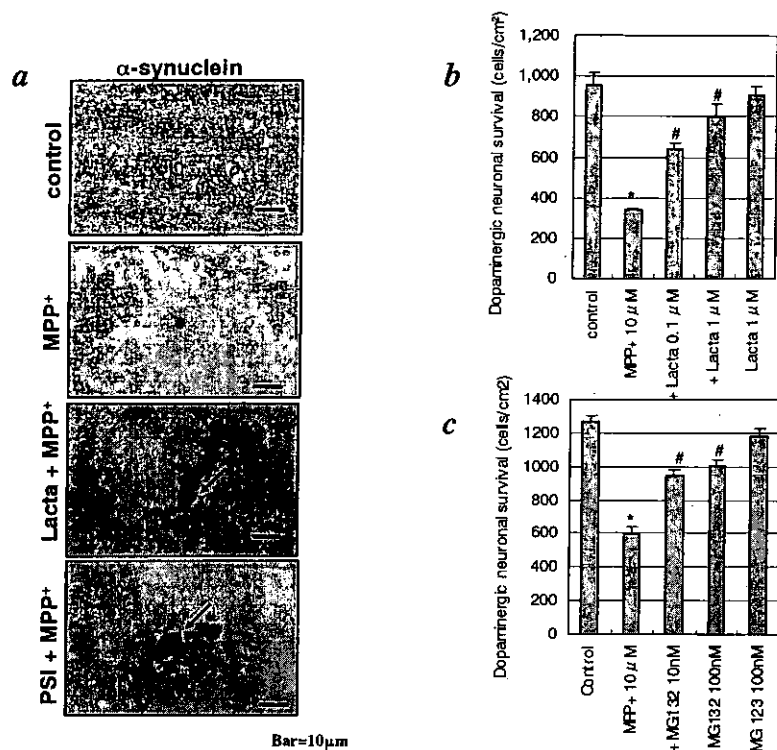


図1 a.中脳初代培養を抗 α -synuclein抗体で染色した。MPP+と lactacystin (Lacta)あるいはMPP+と PSI とを同時に処置したものでは細胞質内に比較的大きな封入体形成が観察された(矢印)。b. 抗 tyrosine hydroxylase 染色により生存ドーパミン数を検討すると、MPP+により生存ドーパミンニューロン数は有意に減少したが(* $p < 0.001$, ANOVA)、lactacystinを同時に投与した場合 MPP+誘発ドーパミンニューロン死は拮抗された(# $p < 0.001$, ANOVA)。c. 同様にMG-132を投与した場合もドーパミンニューロン死は拮抗された。

結果

MPP+投与により、時間依存的にドーパミンニューロン死が生じ、その際、一過性にユビキチン陽性顆粒が出現し、プロテアソーム活性はMPP+の投与時間により増大した。Lactacystin 0.01-1.0 μ M, PSI 0.01-0.1 μ M、および MG-132 100nM によりプロテアソーム活性は有意に低下した。また、ドーパミンニューロン生存数は、MPP+(30 μ M, 48時間)によって30%程度に減少したが、このドーパミンニューロン死は Lactacystin 0.01-1.0 μ M, PSI 0.01-0.1 μ M, MG-132 100nM の同時投与により有意に拮抗された。これらのプロテアソーム阻害薬を MPP+と同時に投与した場合、少ない割合であったが、一部のドーパミンニューロンに α シヌクレイン陽性封入体が観察された(図1)。ついで、MPP+を中脳

腹側へ microinjection した in vivo モデルにおいて検討したところ、lactacystin, MG-132 のいずれもがドーパミンニューロン死を拮抗した(図2)。

さらに、中脳初代培養性を処置後に回収した細胞をホモジェネートしてイムノプロットして検討したところ、MPP+処置により mitogen activator protein kinase である p42/p44-MAPK が脱リン酸化されること、プロテアソーム阻害薬を投与することにより、p42/p44-MAPK の脱リン酸化が拮抗することが示された。また、p42/p44-MAPK の上流に位置するキナーゼである MEK を阻害する PD98059 を投与することによりプロテアソーム阻害薬によるドーパミンニューロン保護作用は消失した。