

# Parkinson 病の発症機序

—Up date

Etiology of Parkinson's disease

丸山和佳子 直井 信

Wakako MARUYAMA<sup>1</sup> and Makoto NAOI<sup>2</sup>国立療養所中部病院長寿医療研究センター老化機構研究部生化学・代謝研究室<sup>1</sup>, (財)岐阜国際バイオ研究所客員研究部門脳神経研究分野<sup>2</sup>

◎孤発性 Parkinson 病(PD)におけるドパミン神経選択的な細胞死の機序に関する最近の研究の進展について概説した。PD における細胞死の原因は、ドパミン神経選択的なミトコンドリア機能障害に起因する可能性がある。ミトコンドリアの慢性機能障害により不要蛋白分解の要であるプロテアソームの失活と酸化修飾蛋白の細胞内蓄積を伴う細胞死モデルが作製された。従来、PD 患者の剖検脳ではミトコンドリア機能障害、酸化修飾蛋白の増加、プロテアソームの活性低下が報告されており、本モデルで得られた所見と一致する。PD の原因には、ドパミンおよびドパミン由来の神経毒、そしてカテコールアミン神経細胞選択的に存在するミトコンドリアの A 型 MAO によるミトコンドリア障害が関与している可能性がある。



Key word: ミトコンドリア, プロテアソーム, 酸化修飾蛋白, ドパミン, モノアミン酸化酵素

Parkinson 病(PD)は加齢に伴う神経変性疾患であり、日本社会の急速な高齢化に伴い患者数が増加の一途をたどっている。現在のところ PD に対する治療法は、ドパミン神経細胞の変性により低下したドパミン神経伝達を補充する L-DOPA 製剤とドパミンアゴニストが主体であり、根治療法はない。したがって、疾病の進行に従いドパミン神経変性が進むと、薬効は徐々に弱くなるとともに患者の ADL は著明に低下する。PD の特徴は黒質ドパミン神経細胞の選択的な細胞死である。進行期の PD においては、他のモノアミン系神経細胞やアセチルコリン系神経細胞の変性も伴うものの、同じ神経変性疾患である Alzheimer 病と異なり、変性細胞の選択性は末期までかなりの程度保たれている。

本稿では PD の病因を考えるヒントとして、①老化による神経細胞傷害の原因、②ドパミン神経に選択的傷害を引き起こす要因、③孤発性 PD における神経細胞死の原因の 3 つの点に注目して議論を進める。それとともに、著者らの最近の研究成果を紹介し、今後の研究の発展について述べる。

## 老化による神経細胞傷害の原因——加齢と Parkinson 病の関係

神経細胞の大部分は分裂終了細胞であり、生後ネットワークが完成した後は神経細胞数の大幅な増減はないと考えられる。ヒトの神経細胞数がすべて加齢で減少するという確実な証拠はない。しかし、黒質ドパミン神経細胞は例外的に加齢に従いその数が減少することが証明されている<sup>1)</sup>。この原因には酸化的ストレスが大きな役割を果たしていると考えられる。老化の原因に関する仮説については、エラー説(環境)とプログラム説(遺伝)の 2 つに大別されるが、エラー説の中心的なものが 1956 年に Harman が唱えた“free radical theory of ageing”である<sup>2)</sup>。彼の説によると、好氣的エネルギー産生は生命の維持に必須であるが、それに伴う酸化ストレスが長い間の後に遺伝子である核酸、あるいは蛋白質、脂質などに傷害の蓄積を引き起こし、老化の原因となるとのことである。分裂終了細胞は細胞分裂の過程でこれらの傷害を修復することができないため、遺伝子変異や異常蛋白が蓄積する。事実、黒質線条体では DNA 酸化

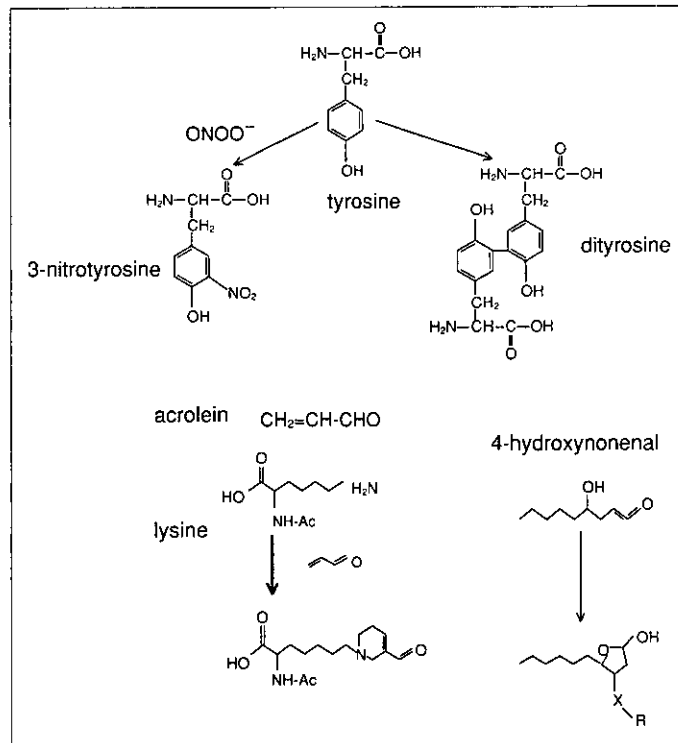


図 1 酸化修飾蛋白の化学構造式

チロシンなどの芳香族アミノ酸は peroxynitrite と縮合することによってニトロ化される。また、2 分子のチロシンの結合によりジチロシンが形成される。蛋白中あるいは蛋白間のチロシン架橋反応により蛋白の高次構造変化がおこる可能性がある。ヒドロキシノネナール、アクロレインなどの脂質アルデヒドは反応性が高く、アミノ酸を修飾する。

傷害のマーカーである 8-hydroxyguanosine が核、ミトコンドリアともに加齢に従い増加し、その増加率はミトコンドリア DNA でより高い。

また、リポフスチンとよばれる色素性顆粒は老化に伴い神経細胞内に蓄積する。著者らはリポフスチンを構成する蛋白が、ニトロチロシン、あるいはジチロシンといった酸化修飾蛋白を含有することを見出した<sup>3,4)</sup>。図 1 にヒト脳内で存在が確認されている酸化修飾蛋白の化学構造を示す。これらの酸化修飾蛋白は培養細胞にも認められ、正常の状況においても一定速度で生成されているが、分解酵素であるプロテアソームにより速やかに分解されており、蓄積は起こらない<sup>5)</sup>。黒質ドパミン神経細胞には正常でもニューロメラニンとよばれる黒色顆粒が存在する。ニューロメラニンはドパミンが酸化されて重合し polymerization を起こす

と同時に、蛋白、脂質などが巻き込まれて生成される。リポフスチン、ニューロメラニンともに加齢とともに神経細胞内に蓄積するが、これらには細胞毒性はないと考えられている。

一方、Lewy 小体とよばれる好酸性封入体の存在は PD に特徴的な病理所見であり、Lewy 小体の形成とドパミン神経細胞死には何らかの因果関係が存在することが想定されている。Lewy 小体の構成成分には、優性遺伝性 PD の病因遺伝子である  $\alpha$ -synuclein、劣性遺伝性 PD の病因遺伝子である parkin のほかに synphilin-1、プロテアソーム蛋白などがあることが報告されている。これらの Lewy 小体構成蛋白はユビキチン化、リン酸化、そして酸化による修飾を受けている<sup>6,7)</sup>。リン酸化、酸化などの蛋白の翻訳後修飾は Lewy 小体形成のきっかけとなる蛋白の高次構造変化と難分解性の

原因となっている可能性があり、異常蛋白を分解するためのシグナルとしてユビキチン化が起きているとも考えられる。

以上のように、酸化修飾蛋白の増加と蓄積は老化、PDのいずれでも増加するが、PDにおいてはLewy小体を形成するに至る疾患特異的な経路が活性化されていることが示唆されており、それがドパミン神経細胞死の原因となっている可能性がある。

### ドパミン神経に選択的傷害を引き起こす因子——ドパミン神経細胞の特徴

PDの病因研究においてもっとも重要な鍵となる事実は、ドパミン神経の選択的変性である。したがって、ドパミン神経細胞の特徴を明らかにすることで、細胞死の原因に迫る結果を得ることができる可能性がある。神経伝達物質であるドパミンはカテコール骨格をもつアミンであり、容易に自動酸化されるとともにモノアミン酸化酵素(MAO)により酸化される(図2)。ドパミンの自動酸化に伴いラジカルであるスーパーオキシド( $O_2^-$ )が生成されると同時に、反応性に富んだセミキノンやキノンが生成される。これらは、たがいに重合してドパクローム、さらにニューロメラニンへと変化する。スーパーオキシド自体は半減期が短く、反応性も強くはないが、鉄の存在下でFenton反応によりhydroxy radical( $\cdot OH$ )を生成したり、一酸化窒素(NO)と縮合してONOO<sup>-</sup>となり、これら強力なラジカルは細胞内の分子と反応し、ダメージを引き起こす。また、セミキノンやキノンが直接生体分子を修飾する可能性も示唆されている。PDの病理ではニューロメラニンの含有量が多いドパミン神経細胞ほど変性が進みやすいとの報告があり<sup>8)</sup>、ドパミンの酸化が細胞死と関連があることを示している。

一方、MAOにはA型とB型が存在し、それらの遺伝子はX染色体の隣接した遺伝子座にコードされている。ヒトの脳内アミン(ノルアドレナリン、アドレナリン、セロトニン)のほとんどはA型のMAOでのみ分解されるが、ドパミンはAおよびB型両方のMAOで分解される。脳内ではB型MAOはグリア細胞とセロトニン神経細胞にお

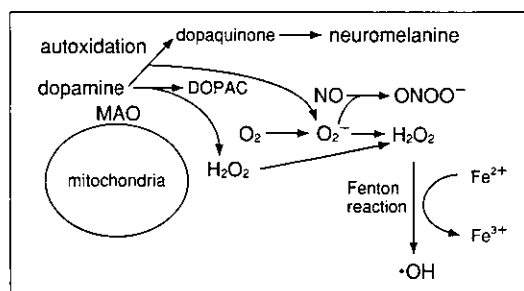


図2 ドパミン代謝と酸化ストレス

ドパミンは神経終末から放出された後、大部分はドパミントランスポーターによる取込みを受けて再利用される。取込みからのがれた一部のドパミンは、カテコールアミン-O-メチル転位酵素(COMT)、モノアミン酸化酵素(MAO)により分解される。MAOによる分解の際、 $H_2O_2$ が生成される。ドパミンの自動酸化により $O_2^-$ とキノンが生ずる。

もに存在するが、A型MAOはカテコールアミン(ドパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン)神経細胞に認められる。MAOはミトコンドリアの外膜に存在することから、本酵素はミトコンドリア機能に影響を与える可能性がある。ミトコンドリアはいうまでもなく細胞内酸化ストレスのおもな発生場であると同時に、アポトーシスシグナルの活性化を決定づける細胞内小器官である。最近著者らのグループは、MAO阻害剤のなかに神経細胞のアポトーシスを促進あるいは抑制するものがあることを見出した。A型MAOの阻害剤であるclorgylineや脳内に内在する神経毒N-methyl(R)salsolinolはそれ自体でドパミン神経芽細胞腫にアポトーシスを惹起した<sup>9)</sup>。逆に、B型MAOの阻害剤であるrasagilineは、酸化ストレスや神経毒、虚血によるアポトーシスを防御した<sup>10)</sup>。MAOにはドパミン代謝を制御し、細胞内酸化ストレスに関与するだけでなく、ミトコンドリアにおけるアポトーシスシグナルに直接影響を及ぼす可能性があるのかもしれない。

いずれにせよ、PDの中核をなすドパミン神経細胞の選択的細胞死にはドパミン代謝とミトコンドリアにおけるA型のMAOの存在が重要な役割を果たしている可能性がある。

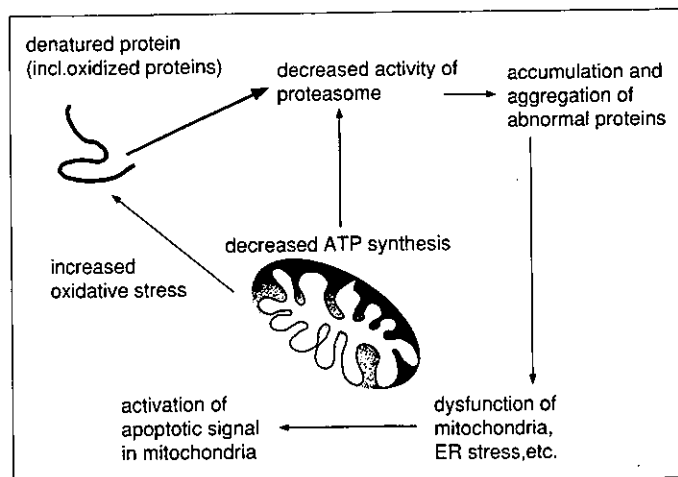


図3 ミトコンドリア機能障害による細胞死メカニズム

ミトコンドリア機能障害,特に酸化リン酸化にかかわる呼吸鎖酵素の障害によって細胞内ATPの低下と酸化ストレスの増加が起こる。ユビキチン-プロテアソーム系酵素は初期にはATP低下により,後期にはプロテアソーム蛋白自体の酸化,および酸化蛋白のプロテアソームへの結合阻害により酵素活性が低下する。プロテアソームの不活化により,遺伝性PDと同様な経路により細胞死が引き起こされる。

### 孤発性PDにおける神経細胞死の原因 — 家族性PDとの共通点と相違点

近年,遺伝子異常によるPDの報告があいついでおり,その病態を研究することにより孤発性PDの病因を解明することが期待されている。遺伝性PDの詳細については他稿を参照されたいが,そこにおけるドパミン神経細胞死には構造異常蛋白の蓄積が中心的な役割を果たしていると考えられる。 $\alpha$ -synucleinの点変異,あるいは遺伝子重複による発現量増加は蛋白の $\alpha$ ヘリックスから $\beta$ -sheetへの変換を促進し,不溶性fibril形成を経てLewy小体を生成させる。一方, parkin や UCH-L1, DJ-1 は細胞に不要あるいは有害となる蛋白の分解系であるユビキチン-プロテアソーム系にかかわる蛋白であり,劣性遺伝性PDを引き起こすことから,蛋白の機能不全(loss of function)が特定の蛋白蓄積を引き起こすことが想定される。現在,孤発性PDの危険因子となる遺伝子多型がゲノムワイドで検索されているが<sup>11)</sup>, Alzheimer病におけるアポE多型のように発症に強い影響を及ぼす分子は見出されていない。また,遺伝性PDの原因遺伝子にも孤発性PD

と強い相関をもつ多型は認められない。では, Lewy小体形成に至らしめる,いわば“病的”な蛋白蓄積がなぜ孤発性PDで引き起こされるのであろうか。

著者らはそれ単独では神経変性の原因とはならない軽微な遺伝子多型に老化が加わることによりミトコンドリア機能障害が引き起こされ,ドパミン神経細胞死の原因となっているのではないかと仮定を立てて研究を行った。その結果,ミトコンドリアの呼吸鎖酵素の活性低下が細胞内ATP低下によるユビキチン-プロテアソーム活性の低下を引き起こすこと,他方,ミトコンドリアからのラジカル漏出により酸化修飾蛋白生成が増加することが示された。酸化修飾蛋白はユビキチン依存性あるいは非依存性にプロテアソームにより分解を受ける。酸化修飾蛋白の生成増加と分解低下は異常蛋白の蓄積を引き起こす。さらに,慢性的なミトコンドリア機能障害によりプロテアソームの非可逆的な失活が引き起こされた。その機序としてプロテアソーム構成蛋白の酸化による失活だけでなく,酸化修飾蛋白がプロテアソーム酵素の活性部位に結合することにより酵素活性を阻害す

ることが示された<sup>12)</sup>。孤発性 PD の剖検脳ではミトコンドリア呼吸鎖酵素の活性および蛋白量の低下、酸化修飾蛋白増加、プロテアソーム酵素活性低下が報告されており、著者らのモデルと同様な状況が起こっている可能性がある(図 3)。プロテアソームの機能障害以降は遺伝性 PD と共通の経路で細胞死に至ると考えられる。

### おわりに

PD 患者のなかでも 95% を占める孤発性 PD の病因解明と治療法の開発は重要な課題である。本稿では PD における細胞死の原因がドパミン神経選択的なミトコンドリアに起因する可能性があることを示した。その原因は、ドパミンおよびドパミン由来の神経毒によるミトコンドリア傷害、そしてカテコールアミン神経細胞選択的に存在するミトコンドリアの A 型 MAO が関与している可能

性がある。今後の研究の発展が期待される。

### 文献

- 1) van Dyck, C. H. et al. : *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, **10** : 36-43, 2002.
- 2) Harman, D. : *J. Gerontol.*, **11** : 289-300, 1956.
- 3) Kato, Y. et al. : *FEBS Lett.*, **439** : 231-234, 1998.
- 4) Maruyama, W. et al. : *J. Am. Aging Assoc.*, **24** : 11-18, 2001.
- 5) Shringarpure, R. et al. : *J. Biol. Chem.*, **278** : 311-318, 2003.
- 6) Fujiwara, H. et al. : *Nat. Cell Biol.*, **4** : 160-164, 2002.
- 7) Giasson, B. I. et al. : *Science*, **290** : 985-989, 2000.
- 8) Damier, P. et al. : *Brain*, **122**(Part 8) : 1437-1448, 1999.
- 9) Maruyama, W. et al. : *J. Neurochem.*, **70** : 2510-2515, 1998.
- 10) Akao, Y. et al. : *J. Neurochem.*, **82** : 913-923, 2002.
- 11) Momose, Y. et al. : *Ann. Neurol.*, **51** : 133-136, 2002.
- 12) Shamoto-Nagai, M. : *J. Neurosci. Res.*, **74** : 589-597, 2003.

\* \* \*

第12回カテコールアミンと神経疾患研究会

孤発性パーキンソン病における  
ドパミン神経選択的細胞死の機序：  
酸化ストレスとプロテアソーム機能障害を結ぶもの

丸山和佳子 永井 雅代 直井 信

一般講演 11

## 孤発性パーキンソン病における ドパミン神経選択的細胞死の機序： 酸化ストレスとプロテアソーム機能障害を 結ぶもの

丸山和佳子 永井 雅代<sup>1)</sup> 直井 信<sup>2)</sup>

### はじめに

われわれは昨年, mitochondria complex I 阻害剤であるロテノンによるドパミン神経細胞死では, プロテアソーム活性が障害されること, その機序に酸化蛋白の生成が関与していることを報告しました。

そのときに, *in vivo*でロテノンを投与した場合, ドパミン神経だけが選択的に細胞死を来す原因は何か, またパーキンソン病が高齢者に起こるのはなぜか, との疑問が出されました。

その1つの答えとして, われわれはドパミン神経に何らかの異常な物質が選択的に蓄積することにより, プロテアソーム障害が起こるのではないかと考えています。そして, 1つの候補としてニューロメラニンを考えました。

われわれはドイツのRiederer教授らのグループと共同して, 加齢に伴って増加し蓄積していく中脳のニューロメラニンが, ドパミン神経にとって神経毒性をもつか, そしてubiquitin-proteasome systemを障害する可能性があるかについて実験を行いました。

### ニューロメラニンの蓄積と ドパミン神経への影響

ヒト神経芽細胞腫であるSH-SY5Y細胞に, 26Sプロテアソームに対する基質に蛍光基質を結合させたGFPアナログを付加した蛋白を発現した細胞を利用して, 26Sプロテアソーム活性を測定しました。ニューロメ

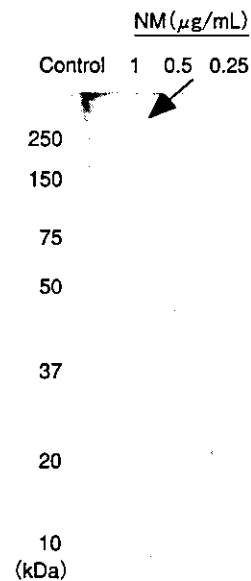


図1 ニューロメラニン存在下で培養したSH-SY5Y細胞におけるユビキチン化蛋白の蓄積

ラニンの添加によって26Sプロテアソーム活性が低下しますと, 細胞内に26Sプロテアソームの基質である蛍光蛋白の蓄積が認められるはずで, 実際, 細胞内の蛍光は添加ニューロメラニンに対し用量依存性, 時間依存性に増加します。すなわち, 可溶化したニューロメラニンが26Sプロテアソーム活性を*in situ*で阻害することが細胞実験で証明されました。そこで*in vitro*における酵素活性を測定するため, ユビキチン化したリソソームを基質として, 細胞のライセートから調整した酵素標品によるユビキチン化リソソームの分解を定量したところ, ニューロメラニンの用量依存性に活性が低下すること, すなわち分解活性が低下し, ユビキチン化リソソーム量の減少が阻害されることがわかりました。そして, ニューロメラニン存在下で培養した

1) W. Maruyama, M. Nagai: 国立長寿医療センター老化機構 研究部代謝研究室 2) M. Naoi: 岐阜県国際バイオ研究所客員研究部(脳神経研究分野)

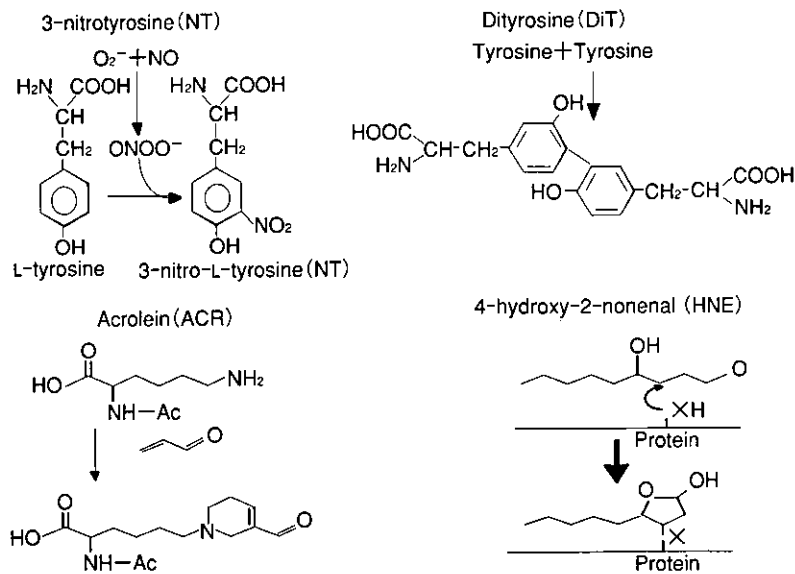


図2 各種蛋白の酸化修飾

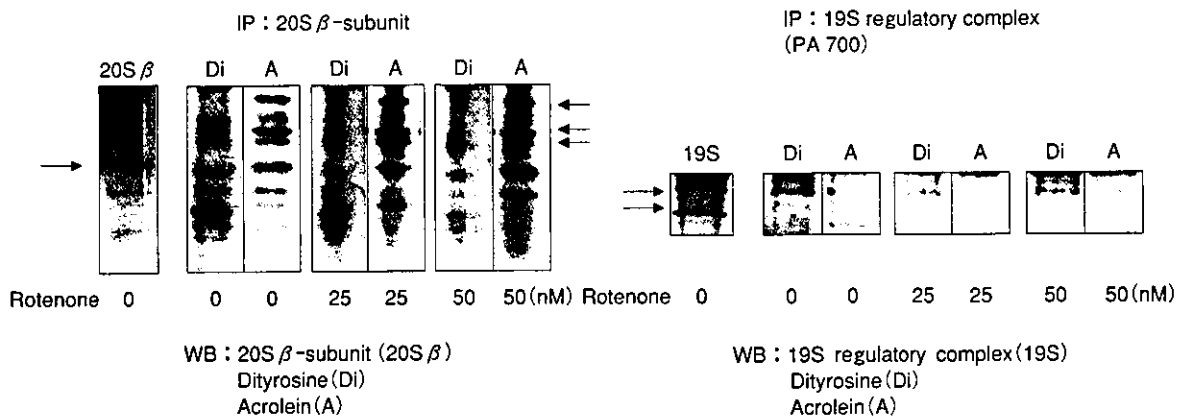


図3 プロテアソーム20S  $\beta$ サブユニットにおけるアクロレイン化蛋白の増加と酸化蛋白の沈降反応

細胞では、ユビキチン化蛋白の異常な蓄積が認められました(図1)。しかし、ニューロメラニン(ATP非依存的な20Sプロテアソーム活性に対しては全く影響を及ぼさないことがわかりました。

すなわち、ニューロメラニンは加齢とともに蓄積します。その可溶化した一部の構成部分がドパミン神経における26Sプロテアソーム、つまりubiquitin proteasome pathwayを障害し、これが異常蛋白の蓄積に対するドパミン神経の脆弱性を決定していると考えられたわけです。

### アクロレイン化蛋白の役割

では、なぜある人はパーキンソン病になり、ある人はならないのか、われわれが最近注目しているのは、脂質過酸化の結果作られる、アルデヒドであるアクロレ

インが付加した蛋白の蓄積です。

アクロレインはリジン、ヒスチジン、システインに結合し、水野先生のグループがパーキンソン病のドパミン神経内での増加を報告した4-hydroxy-2-nonenal (HNE)と類似した化合物です(図2)。アクロレインはHNEが付加した蛋白と違い、もう1つの蛋白中のアミノ酸と重合できます。つまり、アミノ酸あるいはペプチド間のクロスリンカーとして働き、この結合は共有結合です。すなわち、アクロレイン化は蛋白重合、あるいは非常に大きな蛋白のconformational changeを起こし得ると想像されます。

そこで、このアクロレインがパーキンソン病のドパミン神経で増加しているかを検討するため、抗アクロレイン抗体を用い組織染色を行いました。特に変性を来したパーキンソン病におけるドパミン神経のサイト



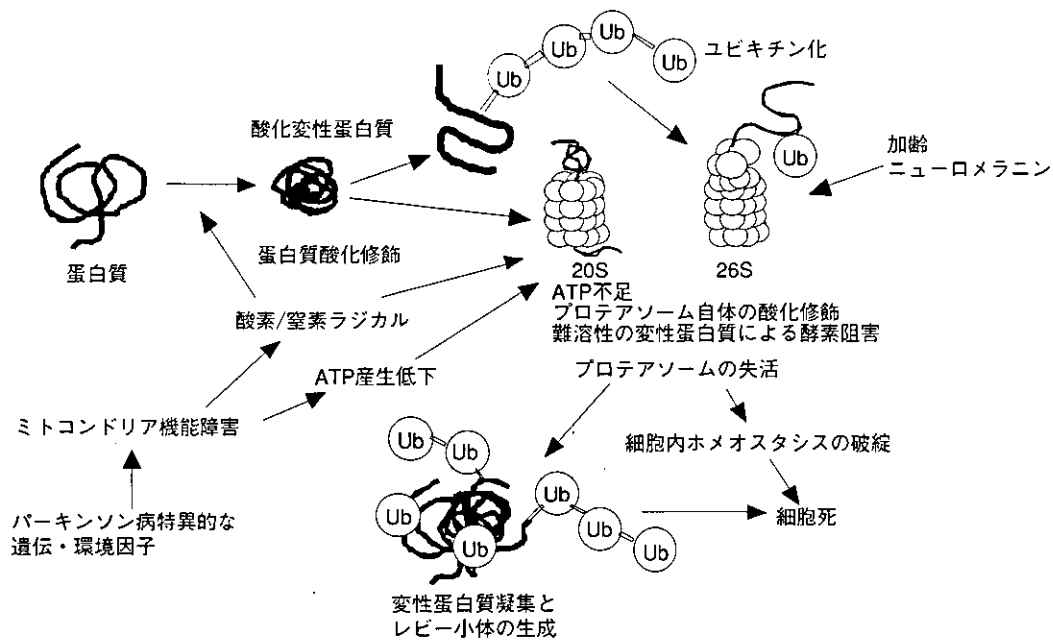


図5 パーキンソン病におけるドパミン神経細胞死の機序(仮説)

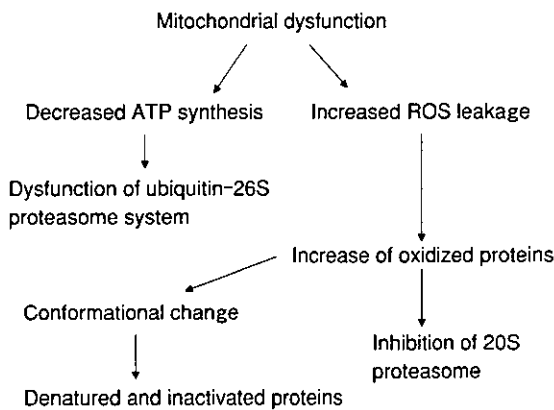


図4 ミトコンドリア機能障害の影響

ゾルにアクロレイン化蛋白が蓄積しています。

アクロレイン化蛋白は、ロテノンにより細胞死およびプロテアソーム活性の著明な低下を来した細胞でも増加が認められ、酵素の触媒活性部位である20Sβサブユニットがアクロレイン修飾を受けていること、さらに20Sβサブユニットに対して基質としてアクロレイン化蛋白が結合しており、これが酵素阻害を起している可能性が考えられました(図3)。

実際に、サイトゾル細胞のライセートから調整した酵素標品に対して、アクロレインは*in vitro*で顕著な活性低下を引き起こし、これは20Sプロテアソームの構造変化によるものと考えられました。

このような構造変化は、bovine serum albumin (BSA)をアクロレイン化することによっても認められ、調整したアクロレイン化BSAは20Sプロテアソーム活性を*in vitro*で阻害することもわかりました。

## 結 論

ミトコンドリア機能障害が起こりますと、ROS(reactive oxygen species)が増加しATPが低下するために、ubiquitin-26S proteasome systemの障害が起こります。そしてこれには、ドパミン神経の老化によるニューロメラニンの蓄積が関与している可能性があります。ROSの増加によって酸化蛋白が増加し、酸化蛋白はconformational changeを起し、アクロレイン化を受けた蛋白はクロスリンカーとして働き、細胞内で非常に重篤な障害を起します。そして、酸化蛋白が20Sプロテアソームを直接阻害し、あるいは20Sプロテアソームが酸化されることによって、プロテアソームの障害がさらに増強すると考えられます(図4)。全体として、老化によるニューロメラニン蓄積が26S、パーキンソン病特異的な遺伝・環境因子がミトコンドリア機能障害と蛋白の酸化を介し20Sのプロテアソームを障害し、最終的に変性蛋白の増加によってドパミン神経死を引き起こす可能性があると考えました(図5)。

	討 論	11
--	-----	----

座 長 小川 紀雄(岡山大学大学院医歯学総合研究科神経情報学)  
 演 者 丸山和佳子(国立長寿医療センター老化機構研究部代謝研究室)  
 発言者 服部 信孝(順天堂大学医学部脳神経内科)  
 澤田 秀幸(京都大学大学院医学研究科脳病態生理学臨床神経学)  
 武藤多津郎(藤田保健衛生大学医学部神経内科)

小川 ありがとうございます。ご質問に移る前に、抄録の中に酸化蛋白、変性蛋白、酸化修飾蛋白、修飾蛋白、異常蛋白と5種類の言葉が使い分けられていますが、これは特別な意図がありますか。

丸山 異常蛋白の中に酸化修飾蛋白は含まれます。

小川 特に使い分けを厳しくしているわけではないのですね。

丸山 はい。

小川 それでは、ご質問をお願いします。

服部 先生が示されたのは、神経変性のタイプによっては20Sと26Sの障害の仕方が異なるかもしれないというデータだと思うのです。パーキンソン病では、20Sプロテアソームの活性が低下しているというデータがあります。われわれのデータでは20Sプロテアソームの活性が低下していなかったのですが、パーキンソン病では26Sプロテアソームが低下していると、先生はお考えなのですね。

丸山 酸化修飾蛋白のようなものに対しては、20S蛋白が最初の段階では重要ですが、それが大きな構造変化を来すと、やはりユビキチン化しないと壊されないような形になってくる。それで最終的には26Sが非常に重要です。つまり、両方大事です。

服部 しかし、どちらかというところ、26Sが動かなくなって、その次に20Sが破綻するというのが自然のように思いますが。

丸山 そうですね。ATP dependentですし、系が複雑なので、26Sの方が脆弱だと思います。ただ、26Sプロテアソーム活性がパーキンソン病で低下しているかどうかの報告はきちんとしたものが出ていないので、測定してみようと思っています。

服部 どうもありがとうございました。

小川 ほかにご質問の方はいらっしゃいますか。

澤田 いま服部先生がいわれたパーキンソン病でプロテアソームが低下しているというデータは、多分『Neuroscience Letters』に出たMcNaughtらの論文だ

と思うのですが、もう1つ、『Annals of Neurology』に出た論文があります。ただ、その論文では黒質のデータはなく、線条体の活性化はむしろ亢進しているというデータが含まれていたと思うのです。

黒質のデータで公表されたものは、確かにMcNaughtらの「Neuro Report」だけだと思うのですが、1つの可能性としては、神経終末でカテコールアミンの代謝回転が頻回に起こって、カテコールアミンが関与するとすれば神経終末、線条体の方が変化があってもよい可能性があります。自分たちの実験結果との関係で、むしろ私たちはプロテアソーム活性が上がるのかもしれないと、希望的には考えているのです。

教えていただきたいのは、カテコールアミンの代謝物に注目されて、ニューロメラニンの関与をご検討になったと思うのですが、ドパミンキノンなどの方がずっと反応性が高く、ニューロメラニンはかなり安定な物質だと思います。ニューロメラニンに特に注目されたのは、実際の病理で蓄積しているという観点からでしょうか。

丸山 合成ニューロメラニンはドパミンやL-DOPAで作るわけですが、脳の中にあるニューロメラニンはもっと複雑で、蛋白やアミノ酸や脂質とドパミンキノンなどが重合したものです。したがって、酸化蛋白と同様に、ニューロメラニンもまたプロテアソーム系を阻害する可能性があると思いました。そして、ドパミン神経の特質、あるいは加齢の問題を考えるとドパミン神経で加齢とともに蓄積してくる物質に注目したわけです。

ただ、パーキンソン病特異的と考えますと、病理でお示しましたように、パーキンソン病では酸化蛋白が増加していますが、コントロールではニューロメラニンしか増加していない。ですから、プロテアソーム系なり、ラジカルの増加により細胞内のホメオスタシスが破綻した状態がパーキンソン病であり、背景にはニューロメラニンの蓄積がある可能性があります。

小川 ニューロメラニンに関しては昔から良い面、悪い面がいられていますよね。ですから、量や組成で働きが異なると思うのです。例えば、ニューロメラニンは鉄を3価から2価に変換してフェント反応を高めるとか、逆にある閾値を超えた量のニューロメラニンが金属をキレートして神経保護に働くとか、状況によって様々ははずです。ですから、一面だけではなかなか語れないと思うのです。

丸山 その点は先生の論文をたくさん読ませていただいて承知していますけれども、まずtoxicということで今回は報告させていただきましたし、プロテアソーム系に関して非常に限定されたところについて報告させていただきました。

澤田先生の最初のコメントについてですけれども、パーキンソン病で蓄積しているレビー小体にしても、ユビキチン化された蛋白が蓄積していることが多いので、26Sプロテアソームの重要性は、やはりあると思っています。

小川 では、最後にどうぞ。

武藤 ちょっと確認したいのですが、アクロレイン化された蛋白がユビキチン化されるのですか。

丸山 アクロレイン化された蛋白はそれだけではユビキチン化されないと思います。20Sプロテアソーム

で分解される程度のアクロレイン化であれば、ユビキチン化されなくてもプロテアソーム系で分解できます。ただ、共有結合を作って線維化しますと、20Sプロテアソームでは手に負えないので、ユビキチン化され26Sプロテアソームで解きほぐした後、分解される作用が必要になると思います。

武藤 最近、トリプレットリピート病でプロテアソームで分解されないというデータが出ているのですが、ポリグルタミンの場合の蛋白のconformationと、アクロレイン化された蛋白のconformationとの間にはあまり関係がないように思います。要するに、アクロレイン化されると詰まってしまうということですか。

丸山 構造が大きく変化して重合しますと、プロテアソームは蛋白が筒状となった形の酵素なので、蛋白が解きほぐされて1本鎖となり、ペプチドとして筒中に入るようにならないと消化できないわけです。ですから、凝集するとか、共有結合でいろいろなものが付着すると非常に入りにくくなって、多分、ATPを使ってそれを切るなりしなければいけないと思います。

小川 まだまだあると思いますけれども、時間がだいぶ過ぎてしまいましたので、申し訳ありませんが先に進ませていただきます。どうぞ、あとはフロアの方でディスカッションしていただければと思います。

## 実験用霊長類の心理的ストレスを評価する 免疫学的指標と飼育環境のエンリッチメント評価

寺尾 恵 治・小山 高 正・鈴木 樹 理

国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター

〒305-0843 つくば市八幡台1

日本女子大学・人間社会学部

〒214-8565 川崎市多摩区西生田1-1-1

京都大学・霊長類研究所

〒484-8506 犬山市官林

Immunological markers for evaluation of the stress in laboratory primates and assessment of environment enrichment.

Keiji TERAO, Takamasa KOYAMA and Juri SUZUKI

**Abstract** During the past two decades, a new research area has been developed to clarify the interaction or relationship between immune system and central nerves system (CNS). This scientific field needs interdisciplinary research and is designated as "Psychoneuro-immunology" or "Neuroimmunomodulation". Both the CNS and the immune system play an important role in maintaining normal physiological equilibrium or homeostatis and there are close interactions between them. The recent scientific interest in the relations between the CNS and the immune system focuses on the effects of psychological or psychosocial stress on immune functions in human. The relationship between bereavement and increase of mortality is well-known. However, given the methodological difficulties in quantifying stress and in its induction in humans, appropriate models is necessary to demonstrate how psychological factors

are translated into pathological change in the immune system. Nonhuman primates are thought to be the most suitable models in this research area, because they are the only species that show the same behavioral and endocrine response to social or psychological stress as human. For establishing nonhuman primate model in stress-immune study, the following problems must be previously clarified. That is [1] which procedure is the most effective in stress induction? and [2] which immune function is mostly affected by psychological stress?

The most important matter in the case of evaluation of well-being status is how to select the suitable parameter for assessment. We have been making efforts to establish the standard procedures of care and management to keep laboratory primates under well-being conditions. The standardized procedure assures the reliable and reproducible results from animal experiment since it has been well known that laboratory environment must affect the psychological and physiological condition of animals. The process of improvement of standard management procedure must be the process of establishment of well-being condition in laboratory animals. The current situation regarding nonhuman primates in biomedical research offers the promise of future progress under refined procedures and facilities.

Tsukuba Primate Center for Medical Science, National Institute of Infectious Diseases, Hachimandai-1, Tsukuba, Ibaragi, 305-0843 Japan

Department of Psychology, Japan Women's University, 1-1-1 Nishiikuta, Tama-ku, Kawasaki-shi, 214-8565 Japan

Primate Research Institute, Kyoto University, 41-2 Kanrin, Inuyama, Aichi, 484-8506

### はじめに

最近、気もち方や生き甲斐などの心理的・精神的要因がガンや成人病などの発症や治癒に大きく関わっていることを示す一般向け医療解説書が人気を呼んで

いるが、これらは「病は気から」の経験則を科学的に実証したここ10数年の研究成果が背景となっている。実験動物を含む大半の動物は変化する外部環境に対応して体内環境を一定に維持するための恒常性維持機構を備えている。生体の恒常性を維持するために様々な機構が存在するが、中でも神経系、内分泌系、免疫系は全身に機能的ネットワークを形成しているとともに、三者の密接な相互作用が恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。神経・内分泌・免疫相関(クロス・トーク)である。なかでも、恒常性の維持を外界からの防御機構としてとらえた場合には、神経系と免疫系のネットワークは最も重要なシステムとなる。しかしながら、神経系、免疫系ともにそれぞれが非常に複雑なシステムであり、両者の相互作用を科学的に解明するためには、優れた実験モデルや実験系の開発が必須である。恒常性維持に関わる二つのシステムの相互作用を解析する方法としては、恒常性を攪乱することにより変化する因子を明らかにする戦略が合理的である。神経・免疫相関を攪乱する要因として最もよく知られているのが心理的、社会的ストレスである。ストレスという言葉は複雑化する現代社会を象徴するキーワードとして日常的に用いられているが、「ストレス」を生体の恒常性維持に有害な刺激(ストレッサー)または有害刺激に対する生体反応(ストレス反応)と定義すれば、心理的、社会的ストレスの負荷実験は神経・免疫相関を解析する有用な実験系

となる。我々は、実験用サル類の特性を利用してこれまで心理的、社会的ストレス負荷に伴う行動、内分泌、免疫系の変化を解析してきた。サル類をモデルとした神経・免疫相関解析についてはすでに報告しているので、本稿ではこれまでの成果を概説し、心理的、社会的ストレス負荷にともない変化する免疫系、内分泌系、行動のそれぞれの指標を用いて実験用サル類の環境エンリッチメントまたは心理学的安寧を評価する試みを紹介する。

1. 心理的、社会的ストレス環境における生体反応

集団での生活が中心となる多くのサル類ではヒトと同様に他個体との関係調節が個体にとって必須の社会的行為であり、近親個体との離別や未知の他個体との遭遇は、著しい心理的、社会的ストレスとなる。このようなサル類の心理、行動学的特性を神経、免疫相関の解析に応用する試みとして、母子分離、同胞分離、社会的隔離、群形成、群導入、社会的順位、優劣関係、社会的競合等の様々な手続きが試みられている。なかでも、母子分離はいずれのサル種においても仔ザルに典型的なストレス反応を生じさせ、分離直後には異常な興奮状態を反映するとみられる種々のステレオタイプ行動が多発し、続いて極端な抑鬱状態におちいる。図1は母子分離(離乳)後のカニクイザル仔ザルの行動(抑鬱行動)、内分泌系(コルチゾル)、免疫系(NK細胞、U5陽性細胞)の変化を要約したものである。生後5～

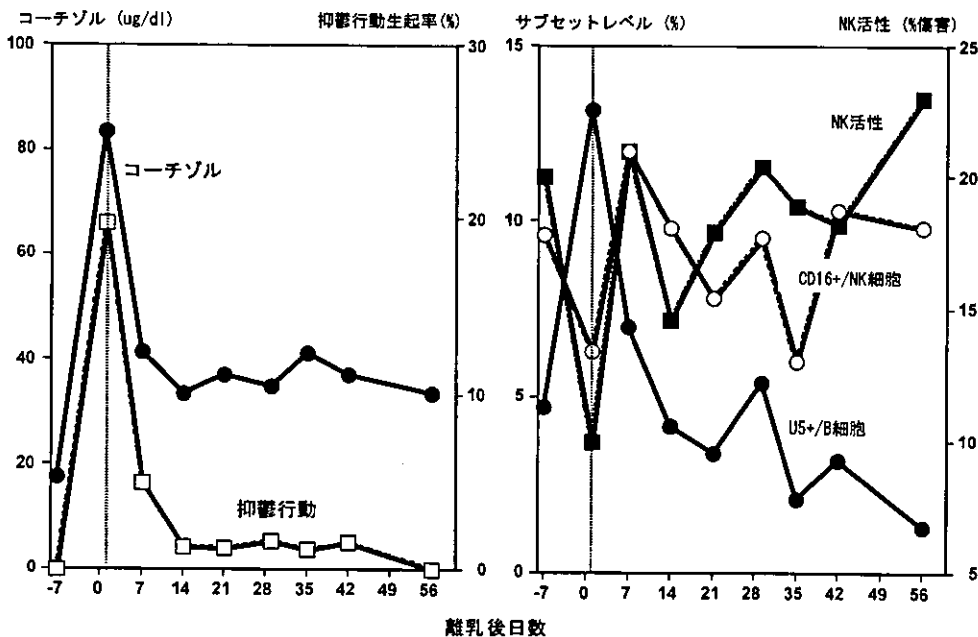


図1 離乳のストレスがカニクイザル仔ザルの行動、内分泌、免疫系に及ぼす影響

6ヶ月間実母により保育された仔ザルは、離乳後数頭の仔ザルと群飼育される。当然、離乳後1日目のストレスは大きく、抑鬱行動および血中コーチゾルレベルが著しく増加するとともに、CD16陽性のナチュラルキラー(NK)細胞が低下し、同時にNK活性が著しく低下する。これに対して、U5陽性のB細胞(U5+/B)レベルは著しく上昇する。詳述は避けるがU5+/B細胞は我々が新たに見いだしたストレス関連リンパ球であり、マカクザルおよびヒトで心理的ストレス負荷後に上昇することを明らかにしている。図1に示すようにすべての指標は離乳後一日目に著しい変化を示すが、一週後にはほぼ離乳前の値に回復する。すなわち、カニクイザルにおいては母子分離のストレスは高レベルではあるが一過性のストレスであり、離乳仔ザルは一週間程度で新しい環境に順応する。図1に示す項目はいずれもカニクイザルのストレス反応を評価する有用な指標であることが明らかとなった。これらのストレス評価指標は神経・内分泌・免疫相関を解析するマーカーであると同時に、実験用霊長類の飼育管理において要求される環境エンリッチメントや心理的安寧の実態を評価する指標として用いることも可能である。そこで、これらの指標を用いて飼育下にあるカニクイザルのストレスを評価し、ストレスを指標としてカニクイザルの飼育形態のありかたを検討してみた。

## 2. 複数飼育により実験用霊長類の飼育環境エンリッチメントと心理的安寧は保証されるか？

近年、欧米を中心にして動物実験における動物福祉、動物の権利に関する社会的関心が高まり、実験動物の飼育環境の適正化への対応が求められるようになってきた。特に大型で知能の発達しているサル類は実験動物の中でも特殊な動物であり、その飼育管理には特殊な施設、設備管理技術に加えて、動物福祉の立場から環境エンリッチメントや心理的安寧への配慮が要求される。欧米のガイドラインでは社会的動物であるサル類の行動特性に配慮して個別飼育を避け、複数での飼育環境が推奨されている。しかしながら、完全隔離されたサル類では異常行動や発達異常が生じることは周知の事実であるが、実験動物としてのサル類を管理する立場からすれば、集団飼育に比べ個別飼育の方が個体管理や感染症防御等の点で優れている。また、個体関係の調整という観点からは、限られたスペースでのケージ内飼育と野外での集団生活では著しく状況が異なっている。さらに、社会的動物であるサル類では集団飼育が推奨される一方で、個別飼育と集

団飼育で心理的ストレスの影響を比較した報告は少ない。個別飼育に順応したカニクイザルを集団飼育した場合のストレスを評価することは、飼育環境下における集団飼育の是非を議論する一助ともなる。そこで、筑波霊長類センターで個別飼育されてきた20歳以上の老齢カニクイザルと4～5歳の若齢カニクイザルとを同一のケージに同居させ、同居後のストレスを評価することにより集団飼育の必要性を評価してみた。幅120cm、高さ60cm、奥行き60cmの連結ケージにそれぞれ個別ケージで飼育されていた老齢雌ザルと若齢雌ザルをそれぞれ一頭ずつ同居させ、同居前、同居直後、1日、7日、14日後に先に示したストレス評価指標(行動、コーチゾル、CD16+/NK細胞、U5+/B細胞)の変化を調査した。

図2は同居前後での6種類の行動の生起率を老齢ザル、若齢ザルそれぞれ8頭で調査した結果を平均値で示す。ここに示す行動の中では「接触行動」だけが個体間で生じる行動であるが、同居直後に若齢ザルから老齢ザルに対する「接触行動」が増加しているのがわかる。図3は個体間の関係調節に関連する3種類の行動(グルーミング、威嚇行動、恐れ/回避行動)の生起率を示したものである。図2でみられた同居直後の「接触行動」はその大半が若齢ザルから老齢ザルへの「グルーミング(毛繕い)」であることがわかる。一方、老齢ザルは同居日数の増加に伴い大変奇妙な行動を示す。同居直後に若齢ザルからの「グルーミング」を受けながらも「恐れ/回避行動」がみられ、同居後7日目には「威嚇行動」が現れる。これに反応して若齢ザルでは同居7日後に「恐れ/回避行動」が増加するが、老齢ザルに対する「グルーミング」はみられない。同居後14日目では老齢ザルの「威嚇行動」がみられるものの、若齢ザルは「グルーミング」も「恐れ/回避行動」も示さない。逆に老齢ザルではふたたび「恐れ/回避行動」の生起率が増加する。同居14日目での老齢ザルは、若齢ザルを威嚇しながら恐れるという大変矛盾した(Ambivalent)な心理状態に陥ることが推測され、若齢ザルとの同居期間が長引くにつれて、次第に同居に伴う心理的負荷が増加してゆくことが示唆される。この状態を内分泌および免疫系の変化で見ると(図4)、老齢ザルが受けるストレスの大きさが反映されている。すなわち、若齢ザルでは同居後7日目まではコーチゾルレベルが上昇するが、14日目には低下を始めている。NK細胞レベルも同居直後に一過性に上昇するが14日目には同居前のレベルまでに低下する。若齢ザルでは同居後14日で同居の慣れが生じているのかもしれない。これに対して、老齢ザ

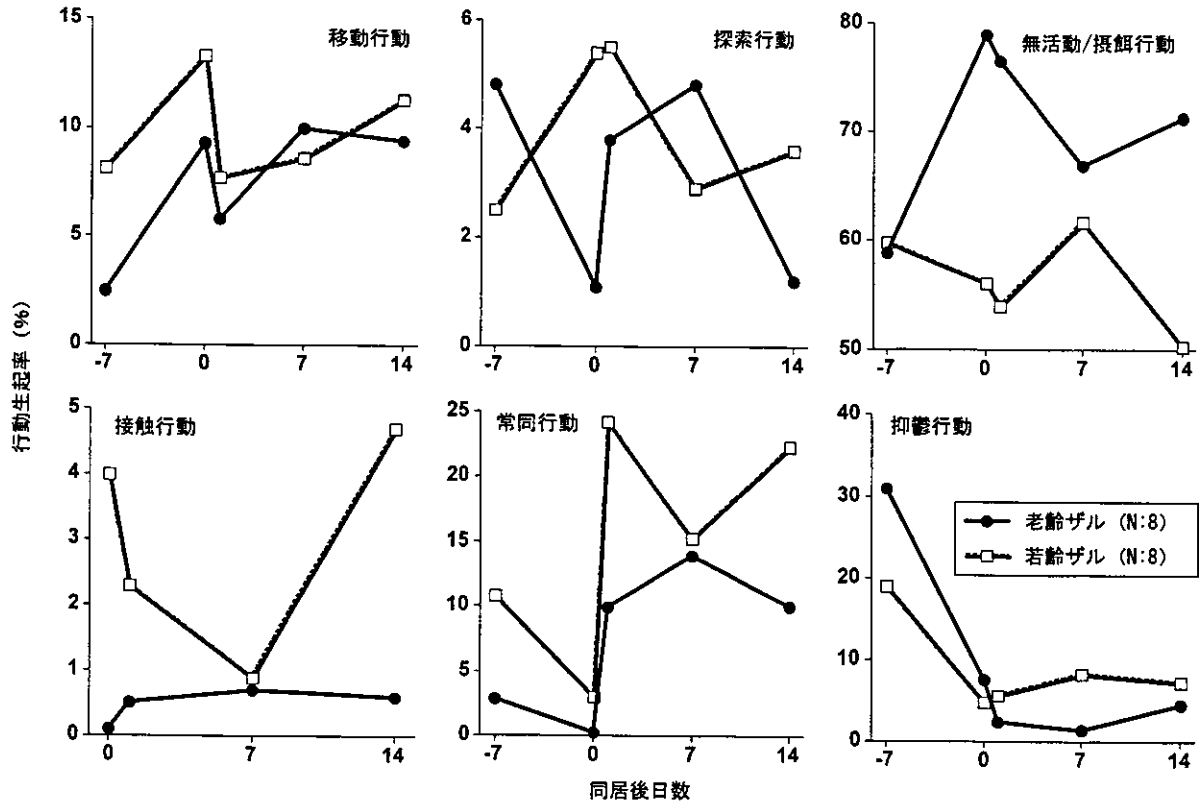


図2 同居のストレスが老齡ザルと若齡ザルの行動に及ぼす影響-1

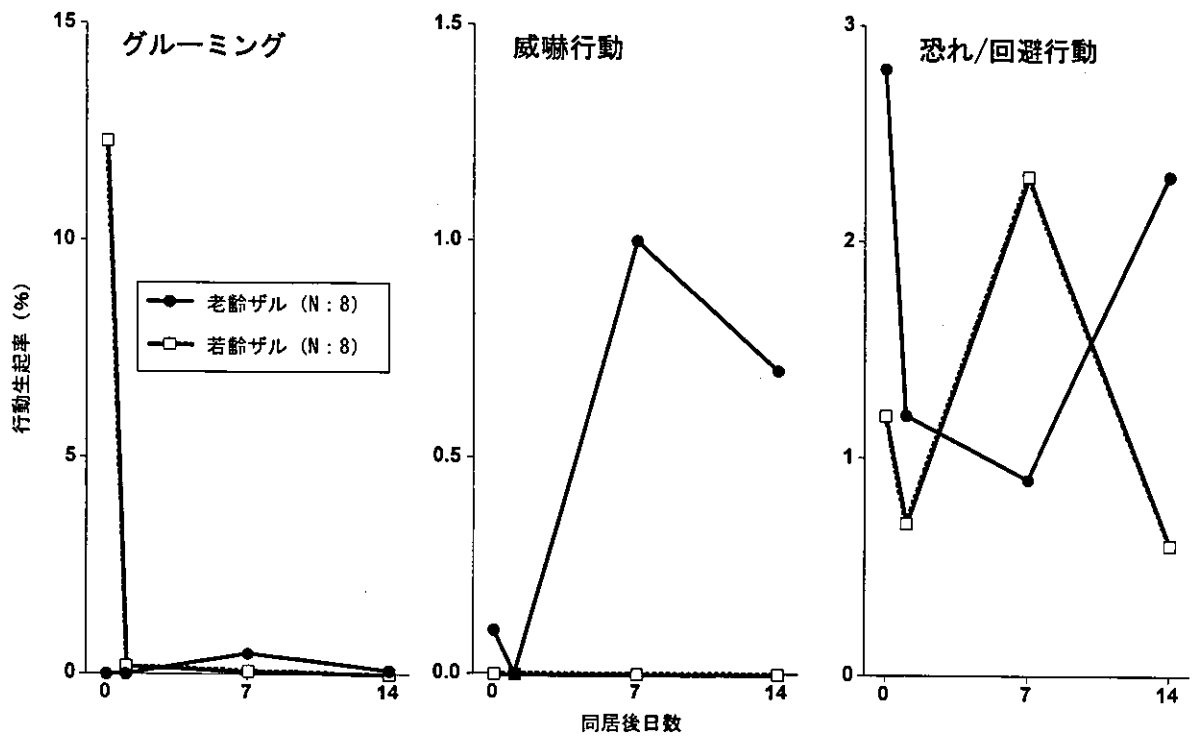


図3 同居のストレスが老齡ザルと若齡ザルの行動に及ぼす影響-2

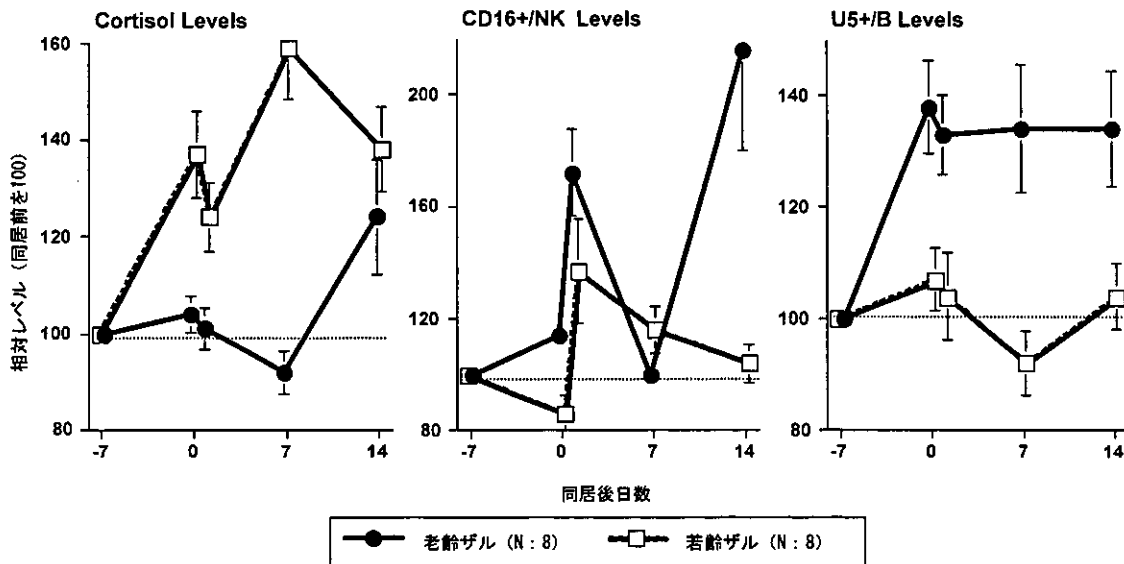


図4 同居のストレスが老齢ザルと若齢ザルのコーチゾルおよびリンパ球サブセットレベルに及ぼす影響

ルでは図3で示した同居後14日目のAmbivalentな心理状態を反映して、コーチゾルレベルもNK細胞レベルも急激に上昇している。これらの結果は、老齢ザルでは同居直後よりもむしろ同居期間が長引くにつれて個体関係の調整からくる心理的ストレスが増加していることを示唆している。興味あることは、老齢ザルの場合のみU5+/B細胞のレベルが同居直後に急増し同居期間中を通じて高いレベルを維持していることである。腎移植患者での調査結果からU5+/B細胞の増加は一過性のストレスよりも長期慢性ストレスを反映している可能性が考えられていたが、図4の結果から老齢ザルでは未知の他個体との同居が低レベルではあるが持続する慢性ストレスとなり、同居後に個体関係の調整に様々な努力をするものの、14日目に限界に近い状態になる可能性を示している。サル類が社会的動物であるが故に、突然の無差別な同居は特に高齢ザルにおいて持続する慢性ストレスとなる可能性が高い。ここに示す結果は、実験用サル類における飼育環境への環境エンリッチメントおよび心理的安寧の配慮では、無差別な集団飼育がもたらす負の影響について慎重な配慮が必要であることを示している。

### 3. 心理的ストレスを評価する二つの免疫学的指標は同一の神経支配を受けているか？

これまでに、ヒトを含めた霊長類の心理的、社会的ストレスを評価する免疫学的指標としてCD16+/NK細胞とU5+/B細胞の二種類のマーカーが有用である

ことを示してきた。一般にストレスに対する反応は、間脳-下垂体-副腎皮質を介した系と、自律神経-副腎髄質を介した系が存在することが知られている。二つの免疫学的指標、CD16+/NK細胞とU5+/B細胞がどちらのシステムに支配されているかは興味ある課題であるが、サル類で実証するためには様々な侵襲的処置が必要となり、実験処置そのものがストレスとなる可能性が高い。直接的証明はともかく、少なくとも両者が同一のシステムに支配されているか否かを明らかにしておく必要がある。我々是非侵襲的方法により両者の関係を解析する方法として、日内変動に着目して解析を行った。ストレス実験で最も問題になるのは採血時のストレスをどう回避するかであるが、末梢リンパ球サブセットレベルの日内変動調査では、無拘束連続採血装置(チター装置)による採血が必要である。図5は、7頭のアカゲザルと4頭のニホンザル、計11頭にチター装置を装着し、午後4時(16:00)から翌日の午後4時までの24時間で4時間置きに7回採血した。照明は午後7時消灯、翌日の午前7時点灯の12時間照明である。図5はスタート時のレベルを1としたコーチゾル、CD16+/NK細胞およびU5+/B細胞の相対的变化を11頭の平均値と標準誤差で示したものである。結果は省略するが、末梢血中のリンパ球数と顆粒球数には典型的な日内変動が認められ、夜間にリンパ球は上昇し顆粒球は減少する。また主要リンパ球サブセット(CD4+/T細胞、CD8+/T細胞、CD20+/B細胞、CD16+/NK)のレベルでは、図5に示すように



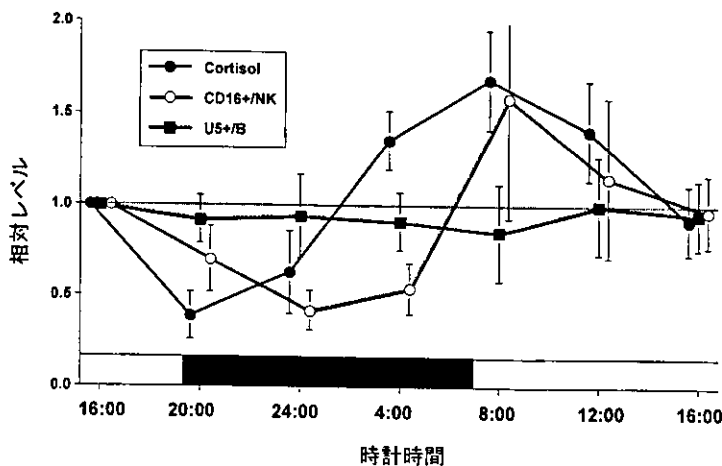


図5 ストレス関連指標の日内変動

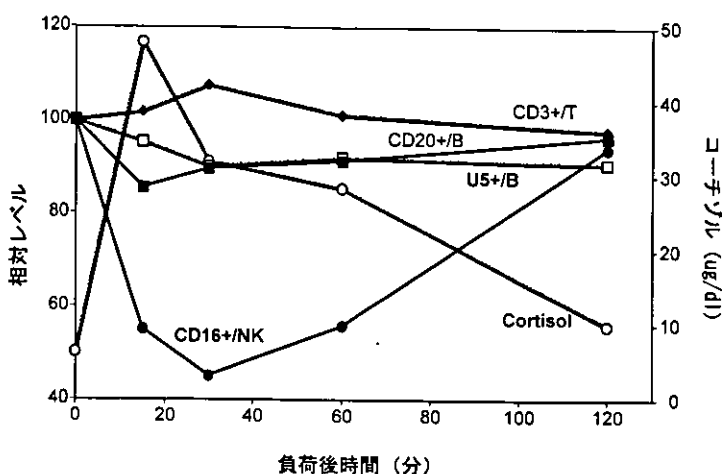


図6 コーチゾル負荷に伴う末梢リンパ球サブセットレベルの変化

CD16+/NK細胞だけが典型的な日内変動を示したが他の3種のサブセットレベルにはほとんど変化がみられなかった。図5に示すように、コーチゾルとCD16+/NK細胞レベルには典型的な日内リズムがあり、両者ともに消灯後に低下し、点灯前から翌朝にかけて増加する。この結果は、ヒトで報告されているコーチゾル及びリンパ球サブセットの日内変動とほぼ一致し、翌朝の活動開始に備えコーチゾルの増加とNK細胞の末梢血中への回帰が始まると考えられる。血中コーチゾルとCD16+/NK細胞の変化を比較すると、両者とも同一のパターンを描くが、CD16+/NK細胞の増加に先だってコーチゾルが増加していることがわかる。このことは、CD16+/NK細胞の増加は血中コーチゾルの増加により誘導される可能性を示している。すなわち、コーチゾルレベルがNK細胞レベルに影響を与えている可能性である。一方、U5+/B細胞

のレベルには24時間を通じてほとんど変化がみられないことから、CD16+/NK細胞とは異なる支配を受けていることが予想された。そこで、この仮説を証明するため、チター装置を用いてコーチゾル負荷実験を行った。3頭のニホンザルにチター装置を装着し、300ug/kgのコーチゾルもしくは生理食塩水を無拘束状態で静注し、投与前、投与後15、30、60、120分に採血し、コーチゾル負荷に伴う主要リンパ球サブセットレベルの変化を調査した。図6はその一例を示したものであるが、コーチゾル静注直後からCD16+/NK細胞のみが著しく低下するが、コーチゾルレベルの低下に伴い120分後には負荷前の値に回復した。一方、U5+/B細胞レベルはCD3+/T細胞、CD20+/B細胞レベルと同様に血中コーチゾルの増加の影響をほとんど受けなかった。このことから、主要リンパ球サブセットではCD16+/NK細胞のみがコーチゾルの影響を受けるこ

とが明らかとなったが、NK細胞の変化がコーチゾルの直接的影響によるものか、より高次の神経内分泌機構がCD16+/NK細胞レベルとコーチゾルレベルの両者を支配しているかはこの結果だけでは確言し得ない。

CD16+/NK細胞レベルの変化を図5と図6で比較すると、図5の結果ではコーチゾルレベルの上昇に伴いCD16+/NK細胞レベルも増加しているが、図6の結果ではコーチゾルレベルの増加に伴いCD16+/NK細胞レベルは低下している。図1の母子分離の結果では、図6と同様に分離一日目にコーチゾルレベルが上昇するとともにCD16+/NK細胞レベルは低下している。これまでの我々の調査結果ではストレス負荷後にコーチゾルは常に増加するが、CD16+/NK細胞レベルは増加する場合と低下する場合があることが明らかになっている。前者(NK細胞レベルの上昇)は群形成やケージ交換などの比較的lowレベルの持続性ストレス負荷時にみられ、後者は母子分離などの一過性の比較的高レベルのストレス反応時でみられる。これまでの結果を総合して、ストレス負荷後のNK細胞レベルの変化に関して次のような仮説を立てている。すなわち、ストレス反応として生じるコーチゾルレベルの増加の程度、換言すればストレスの程度により、CD16+/NK細胞レベルは少なくとも増加と、減少という全く異なった変化を示す。増加と減少のいずれかを決定するコーチゾルレベルの閾値が存在する可能性が高いが、閾値は個体によって異なる。この仮説を実証するため、コーチゾル濃度を変えて負荷試験を行ったが、低濃度のコーチゾル負荷ではNK細胞レベルは変化しないことから、CD16+/NK細胞レベルの増加は血中コーチゾルレベルの上昇が一定期間持続する必要があるのかもしれない。

#### おわりに

サル類の特性を利用してこれまでに取り組んできた神経・内分泌・免疫相関を解析するストレスモデルと、ストレスを評価する免疫学的指標について概説した。ここに示した結果はすべて複数の個体の平均値である。サル類を用いたこの種の実験では、平均値で傾向を示すよりも、個体毎のデータを比較しストレス反応の個体差を解析する方が有意義であるという気持ちをいつも持っている。個体レベルでのトータルな表現型の変化を解析する必要性である。ストレスで誘導される恒常性の攪乱は1対1の対応で判断できる単純なものではなく、いくつかの経路が複雑に関連している総

合的な制御系の変化であることから、従来の還元的解析法ではなく複雑系を解析する知恵が必要となる。その意味では、個体の特性を日常的に観察している実験動物技術者の21世紀の生命科学に果たす役割は大きい。ここで紹介したストレスモデルの実験結果は、動物福祉の観点から日常的にストレス軽減に頭を悩まされている技術者の方々が動物の反応性の多様性を認識される良いきっかけにもなる。単純系から複雑系解析に移行しつつある生命科学の分野において、個体の反応性がいくつかの制御系で統御されていることを身を持って体験されている実験動物技術者のセンスが21世紀の生命科学を支える基本であるという意を強くしている。

#### 文 献

- 1) Koyama T and Terao K.: Psychological stress of maternal separation in cynomolgus monkeys. The effects of housing with a nurse females. pp.101-113, in N.Itoigawa, Y.Sugiyama, G.P. Sackett and R.K.R.Thompson [eds], Topics in Primatology, Vol. 2: Behavior, Ecology and Conservation. Tokyo University Press, Tokyo, 1992.
- 2) Terao K, Murayama Y and Koyama T.: Psychological stress of maternal separation in cynomolgus monkeys. Effects on natural killer cells. pp.115-125, in N.Itoigawa, Y.Sugiyama, G.P. Sackett and R.K.R.Thompson [eds], Topics in Primatology, Vol.2: Behavior, Ecology and Conservation. Tokyo University Press, Tokyo, 1992.
- 3) 寺尾恵治: ストレス関連リンパ球としてのU5陽性細胞. 平成3年度ヒューマンサイエンス基礎研究事業, 官民共同プロジェクト第3分野研究成果報告, ヒューマンサイエンス振興財団, pp.299-316, 1993.
- 4) Nakamichi M, Kanazawa T and Terao K.: Behavior and serum cortisol in infant Japanese monkeys following maternal separation and grouping of infants. pp.257-263, in JJ Roeder, B Thierry, JR Anderson, and N Herrenschildt. [eds], Current Primatology (Selected Proceedings of the XIVth Congress of the International Primatological Society), Vol.II: Social Development, Learning and Bihaviour. Universite Louis Pasteur, Strasbourg; 1994.

- 5) Terao K, Hamano A and Koyama T : The repeated procedure of weaning and peer group formation causes accumulation of stress and changes of plasma cortisol levels and natural killer activity in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Primates*, 1995, 36 : 121-127.
- 6) Ikura S, Terao K, Takenaka O, Noguchi A and Murayama Y : Distribution of U5 antigen on lymphocyte subset in human and nonhuman primates. *Primates*, 1995, 38 : 185-192.
- 7) Terao K, Murayama Y and Koyama T : Non-human primate model in new field of immunology, psychoneuroimmunology. -Significance for assessment of environment enrichment and psychological well-being-. *Laboratory Animals and Environment*, 1997, 5 : 113-121.
- 8) 寺尾恵治 : サル類のストレスモデルと神経・免疫・内分泌相関, pp.36-48, in 日本実験動物協会編「教育セミナーフォーラム'97脳・神経系疾患と動物実験-臨床からのメッセージを踏まえて」, 1998
- 9) 小山高正, 寺尾恵治 : 老齢ザルの心理・社会的ストレスに対する反応特性, *霊長類研究*, 1998, 14 : 109-114.
- 10) Terao K, Suzuki J and Ohkura S : Circadian rhythm in circulating CD16-positive natural killer (NK) cells in macaque monkeys. Implication of plasma cortisol levels. *Primates*, 2002, 43 : 329-338.