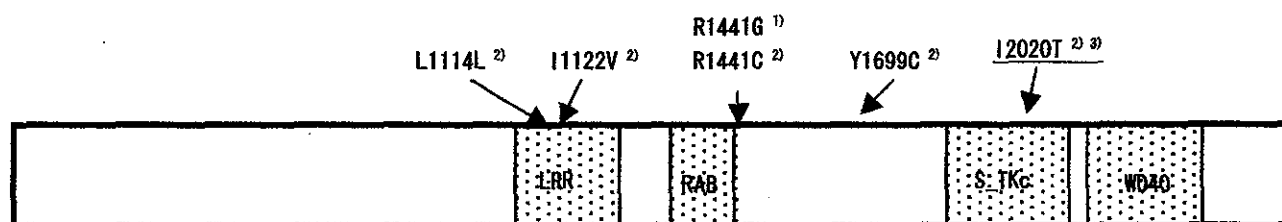


図3 LRRK2/DRDNにおける相模原家系の遺伝子変異



**LRRK2 (leucine rich repeat kinase 2) gene**

- 1) Paisan-Ruiz et al. *Neuron*. 2004 Nov 18;44(4):595-600.
- 2) Zimprich et al. *Neuron*. 2004 Nov 18;44(4):601-607.
- 3) 相模原家系

ンソニズムの病因遺伝子はLRRK2/DRDNであり、本家系の遺伝子変異はI2020Tであると結論できた。

**考察**

常染色体優性遺伝様式をとるパーキンソニズムの多くはレボドパに対する反応が良好であるが、PARK1,4,8は比較的臨床と病理が明らかにされているものの、詳細が不明の疾患が少なくない。PARK8パーキンソニズムはPARK1,4パーキンソニズムと異なり、あきらかな痴呆はなく、孤発性PDに極めて類似した臨床像を示す。今回、PARK8パーキンソニズムの病因遺伝子が同定されたが、これにより文献1)で報告した当時、取り扱いに苦慮した家系内患者で剖検により線条体黒質変性症と診断した一例、および最近剖検をする機会がありLewy小体を多発していた一例、ともに同一の点変異を示した。すなわち、一点変異であっても神経病理像は多彩であるという特徴を示す疾患群といえる。また、自検例と米国の剖検例が比較的多い家系<sup>5)</sup>とでは病理像が異なり、PARK8パーキンソニズムは今後の神経病理学的検討の蓄積が必要な疾患群であるといえる。さらに、Zimprichらの報告には我々と同様のI2020T変異の家系(family 32)があるが、この家系と相模原家系はきわめて類似しており、この家系の神経病理像には興味を惹かれる。

現時点ではLRRK2/DRDNの遺伝子機能は不明であるが、自検家系で得られた変異部位は動物種でも保存のよい部位である。この遺伝子は塩基配列からRAS/GTP superfamily, RAS/GTPase kinase

domain, TyrKC domain, およびWD40 domainが存在する。現時点では機能解析は端緒についたところであるが、ノーザンブロットによれば脳内での発現も確かめられており、新たなPDの発症機序の解明に寄与する可能性のある遺伝子である。今後、機能解析、局在について検討を進めていく予定である。

**結論**

相模原パーキンソニズムの病因遺伝子は他のPARK8連鎖家系同様、LRRK2/DRDNであった。本遺伝子の点変異は1遺伝子変異であっても、神経病理像が多彩であることなど、これまでの疾患概念と異なった病態であることが明らかとなった。このため、家族内PD発症陽性症例においてはPARK8遺伝子変異を確認する必要があるといえる。

**参考文献**

- 1) M Funayama et al. : A new locus for Parkinson's disease (Park8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* 51:296-301,2002.
- 2) Paisan-Ruiz C et al.: Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44:595-600,2004.
- 3) Zimprich A et al. : Mutation in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44:601-607,2004
- 4) Wszolek AK et al : Autosomal dominant parkinsonism associated with variable synuclein and tau pathology. *Neurology* 62:1619-1622,2004.

## 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<sup>1)</sup>、水田依久子<sup>1)</sup>、佐竹涉<sup>1)</sup>、百瀬義雄<sup>2)</sup>、

山本光利<sup>3)</sup>、服部信孝<sup>4)</sup>、村田美穂<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup> 大阪大学大学院医学系研究科ゲノム機能分野、<sup>2)</sup> 東京大学クリニカルバイオインフォマティクス研究ユニット、<sup>3)</sup> 香川県立中央病院神経内科、<sup>4)</sup> 順天堂大学脳神経内科、<sup>5)</sup> 国立精神・神経センター

### 研究趣旨

我々は孤発性パーキンソン病（PD）感受性遺伝子を明らかにするアプローチのひとつとして、多数の候補遺伝子上の SNP（一塩基多型）マーカーを用いた患者・対照関連解析を進めている。家族性 PD、ドーパミン、タンパク質分解などの候補遺伝子を 200 個余り選択した。そのうち 122 個の遺伝子上の計 267 個の SNPs について解析した。一次スクリーニングとして、文書によるインフォームドコンセントの得られた患者・対照各 190 人の SNP を Multiplex PCR, Invader 法を用いてタイピングし、カイニ乗検定を行った。その結果、16 個の遺伝子上の計 22 個の SNPs が p-value < 0.05 の有意な相関を示した。これらの SNPs について、二次スクリーニングとして、患者・対照各 900 人に検体数を増やして再現性を確かめていく。

### はじめに

孤発性パーキンソン病（PD）は多因子遺伝疾患のひとつと考えられている（図 1）。感受性遺伝子を明らかにするために、以前から多数の候補遺伝子関連解析の報告がある。しかしながら、同一遺伝子に関する結果が施設間で一致しないことが多く、真の感受性遺伝子同定に至っているとは言えない<sup>1)</sup>。この点を改良するために、我々は多数の検体、多数の候補遺伝子、多数の遺伝子マーカーを用いて関連解析を行うことにより、PD 感受性遺伝子の同定を目指している。

### 対象および方法

候補遺伝子は PD の発症に関する諸説（酸化

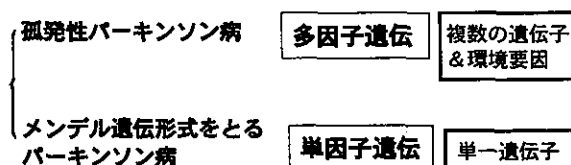
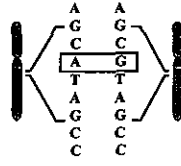


図 1 遺伝因子からみたパーキンソン病

ストレス、ミトコンドリア機能障害、神経毒、蛋白分解機構の破綻、神経栄養因子など）、病理、家族性 PD、疫学などに関する文献から幅広く選択した。遺伝子上の SNP（一塩基多型）の選択は JSNP<sup>2)</sup>、dbSNP<sup>3)</sup>、Celera<sup>4)</sup>などのデータベースから行った（図 2）。その際、アレル頻度や隣接 SNP との距離を考慮して、各遺伝子あたり 3 個の SNPs を目安にした。SNP タイピングは multiplex PCR 法、

**SNP (スニップ、一塩基多型)**  
single nucleotide polymorphism

- \*多型頻度：1%以上
- \*一部のSNPは疾患のリスクや薬剤の作用・副作用の個人差を反映
- \*全ゲノム30億 bp 中に~1000万個 (数百~1000 bp に1個)



WEBデータベース		
名称		登録SNP数*
JSNP	日本 (IMS, JST)	195,134
dbSNP	米 (NCBI)	10,079,771
CDS	米 (セレーラ社)	8,397,518

\*2004年12月現在

図2 SNPの概念とデータベース

インベーター法を用いて、効率良く行った(図3、4)。一次スクリーニングとして、患者対照各190人を用いた。統計解析は遺伝子型頻度、アレル頻度、優性遺伝モデル、劣性遺伝モデルの4種類の分割表を作成し、それぞれについてカイニ乗検定を行った。DNA収集のための研究協力者からの採血の際には「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日 文科省・厚生省・経産省告示第1号)」を遵守し、文書によるインフォームドコンセントを得た。

**結果**

家族性PD, ドーパミン、タンパク質分解などの候補遺伝子を200個余り選択した(表1)。そのうち122個の遺伝子上の計267

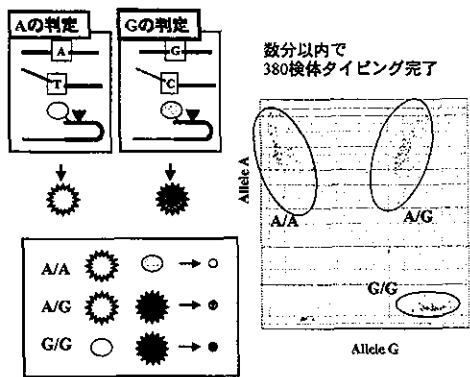


図3 Invader法によるSNPタイピング

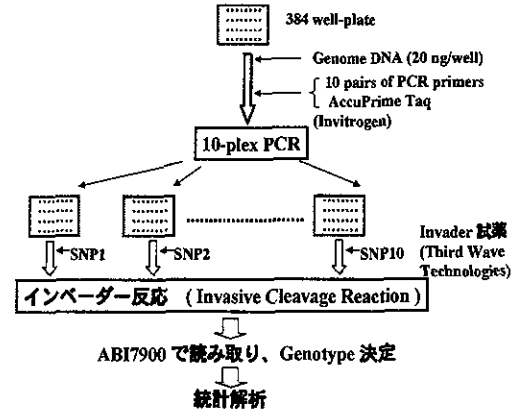


図4 多数SNPタイピングの流れ

個のSNPsを一次スクリーニングした結果、16個の遺伝子上の計22個のSNPsが残った(表2)。

**考察**

一次スクリーニングで16個の遺伝子上の計22個のSNPsが得られた。今後検体数を患者・対照それぞれ約900人を用いた二次スクリーニングを進め、再現性のあるSNPを選ぶ。二次で残るSNPsに関しては連鎖不平

- ドメイン関連 : AADC (2), MAOB, COMT (3), DBH (1), TH (2), SLC6A3 (1), SLC18A2 (3), DRD1 (1), DRD2 (3), DRD3 (3), DRD4 (1), DRD5 (2), GTPCH (2), Ankyrin2 (3), Phox2A (2), PACAP (2), VIP (3), VIPR (3), PACAPR1 (3), MAOA, PST, etc.
- 神経性PD, PD関連疾患, 動物モデル : SNCA (4), parkin (3), UCHL1 (4), DJ1 (5), PRK1, NR4A2 (2), tau (3), PRKCG (3), KCNJ5 (3), etc.
- Levey抗体関連 : NF, A2M (2), DYT1 (4), HDAC6, etc.
- 神経代謝・調節関連 : CYP2D6, CYP1A2 (1), CYP2E1 (1), CYP2C9 (1), PON1 (1), NAT2, STX8 (3), CAV1 (3), Rab6 (3), WDR1 (1), DIA4 (1), ABCB1 (4), SLC22A3 (3), SLC22A1 (3), SLC22A2 (3), SLC6A4 (1), etc.
- アポトーシス関連 : APAF1 (3), NAF1 (2), DAPI (3), BCL2 (3), CASP3 (1), CASP6 (3), CASP8 (3), CASP9 (3), AKT1 (3), Bax, HistoneH1.2, Bad, etc.
- ミトコンドリア関連 : NDUFV2 (7), OGDH (3), DLST (3), DLD (2), etc.
- サイトカイン関連 : IL-1B (1), IL-2 (1), IL-6, IL-4, TGF $\alpha$  (3), TGF $\beta$  (2), TNF (1), iNOS, CD23, CD21, ITGB2, B2M, etc.
- 神経発達因子関連 : BDNF (1), GDNF, CNTF (1), NGF (1), NTRK1 (1), midkine, FGF2 (2), CYP19A, NCAM (3), PTN (4), EGF, CREB1 (3), etc.
- 酸化ストレス関連 : SOD2 (1), catalase (3), MPO, GSTO1 (2), GSTP1 (2), GSTZ1 (2), MGST2 (3), NFE2L2 (3), HMOX1 (2), Thioredoxin reductase, etc.
- 中間発生・分化関連 : Lmx1b (3), Ptx3 (3), EN1 (2), EN2 (1), fezf, Pax2 (1), etc.
- 蛋白質分解関連  
プロテアソーム : UBE2L3 (1), UBB, GPR37 (4), SYPH1 (3), SUMO-1, SUMO-2 (1), SUMO-3, PIAS, HOIL-1, Dofin, LUP1, SHAH1, SHAH2 (1), CHIP, UR12, CDCrel-1, Ubc, etc.  
オートファジー : MAP1LC3B (1), GABARAPL2 (1), BECN1, CTSD (2), CTSB (3), CTSH (2), CTSL (1), CTSF (2), DPP7 (1).  
ERAD : HSP90 (1), Bip (2), SEC61A1 (1), SEC61A2 (3), SEC61G (1), SEC61B, VCP (1), HSPA8 (1), HSPA9B (2), CANX (2), P4HB (3), EDEM1 (2), DNAA1 (2), UGGGL1 (2), CALR (1), GRP78 (2), etc.
- その他  
SLC7A2, ARNT, PRK CZ (3), CYP2A6, CHRN2 (1), CHRNA4 (2), CHRNA7 (1), GRPR, FAAH (3), GLO1 (2), ALDR1 (2), NCAM (3), CDH2 (2), SCD (2), FADS1 (2), FADS2 (2), FADS3 (1), FABP7 (3), ACACA (4), FACL6 (3), GLO1 (3), ALDR1 (2), S-100 beta, GFAP, KCN3, etc.

表1 候補遺伝子リスト (括弧内は解析したSNP数)

衡マッピング、dens mapping により、遺伝統計学的に PD と関連のある SNP あるいはハプロタイプを同定していく。さらに SNP と遺伝子発現量や splicing との関係も調べ、真の PD 感受性遺伝子の同定をめざす。

表 2 一次スクリーニングで残った 22 SNPs (16 genes)

Gene	SNP No.	Genotype (n) P : N (homo1/hetero/homo2)	Chi-square p-value			
			genotype	allele	allele1	allele2
ABC81	SNP 01	53/82/30 : 86/76/19	0.0462	0.0116	0.0688	0.0277
BCL2	SNP 02	52/42/52 : 68/27/40	0.038	0.0136	0.2853	0.0049
CTSD	SNP 03	1/9/159 : 0/2/173	0.0513	0.0098	0.0158	0.639
CTSH	SNP 04	47/78/45 : 63/84/27	0.0301	0.01	0.0125	0.3249
DRD3	SNP 05	20/68/85 : 34/66/82	0.0997	0.0361	0.1899	0.0859
DYT1	SNP 06	68/40/6 : 67/31/15	0.082	0.3026	0.0373	0.9563
FGF2	SNP 07	2/34/148 : 8/43/129	0.052	0.0161	0.0495	0.1345
FGF2	SNP 08	140/37/3 : 123/44/10	0.0656	0.0217	0.0446	0.1304
HSPA8	SNP 09	27/67/62 : 24/55/85	0.0926	0.0504	0.0301	0.5137
NDUFV2	SNP 10	56/80/40 : 75/84/22	0.0182	0.006	0.0084	0.2423
NDUFV2	SNP 11	12/71/96 : 25/75/81	0.0514	0.0199	0.092	0.0629
NDUFV2	SNP 12	54/90/41 : 73/80/30	0.0771	0.0238	0.1609	0.045
NDUFV2	SNP 13	63/81/35 : 76/83/21	0.1119	0.0533	0.0441	0.2191
OGDH	SNP 14	24/71/88 : 28/91/64	0.0375	0.0314	0.0109	0.7538
OGDH	SNP 15	86/73/24 : 64/93/27	0.0547	0.0527	0.5659	0.0066
PACAP	SNP 16	18/84/77 : 46/73/55	0.0002	0.0002	0.0268	0.0002
SLC22A1	SNP 17	34/79/65 : 25/73/84	0.1361	0.0377	0.0634	0.426
SNCA	SNP 18	82/77/14 : 59/84/39	0.0004	0.0001	0.0004	0.0407
SNCA	SNP 19	122/11/0 : 104/21/1	0.0681	0.0219	0.3033	0.0266
tau	SNP 20	25/95/48 : 39/73/62	0.0221	0.9503	0.1623	0.0742
TGFA	SNP 21	99/66/17 : 119/58/6	0.0223	0.0076	0.0172	0.0384
UCHL1	SNP 22	40/119/71 : 65/122/61	0.0479	0.0195	0.1254	0.02

多数の候補遺伝子、SNP マーカーを用いた関連解析により、PD 感受性遺伝子の探索を行っている。一次スクリーニングで 16 個の遺伝子上の計 22 個の SNPs が候補として得られた。今後二次スクリーニング、連鎖不平衡解析、機能解析を進め、真の PD 感受性遺伝子の同定をめざす。

## 文献

- 1) Warner TT et al. : Ann Neurol 53 (suppl 3) , S16-S25.
- 2) <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>  
Hirakawa M et al. : Nucleic Acids Res, 30:158-162, 2002.
- 3) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
- 4) <http://www.celeradiscoveryssystem.com/index.cfm>

## まとめ

## 伴性劣性ジストニア・パーキンソニズム（DYT3）の遺伝子と病理

班員 梶 龍児<sup>1)</sup>

[共同研究者]

牧野悟士<sup>2)</sup> 安藤 覚<sup>2)</sup> 田宮 元<sup>2)</sup> 後藤 恵<sup>3)</sup> 遠山育夫<sup>4)</sup> L. V. Lee<sup>5)</sup> M. Dantes<sup>5)</sup> E. L. Munos<sup>5)</sup>

1) 徳島大学神経内科 2) 産業技術総合研究所 3) 熊本大学脳神経外科 4) 滋賀医科大学分子神経病理  
5) フィリピン国立小児病院

### 研究趣旨

伴性劣性ジストニア・パーキンソニズム（DYT3）はフィリピンのパナイ島を中心とする地域に多い遺伝性疾患であり、単一の遺伝子がジストニアとパーキンソン症候群を呈する疾患で両者の原因を考える上で極めて重要な疾患である。我々はこのたび本疾患の遺伝子を発見し、また症状を説明しうる特異な病理所見を得ることができた。本疾患は、フィリピン人の母親を持つ日本人にも発生する可能性があり、わが国の医療においても早晚関係重要になるものと考えられる。

### はじめに

伴性劣性ジストニア・パーキンソニズム（DYT3）はフィリピン・パナイ島を中心に高い有病率（パナイ島ロハス市では男子1000人あたり1人にも達する）をもつフィリピンの国民病である。また、働き盛りの男性に発症すること、自殺が第一の死因であることなどの点から非常に悲惨な病態である。我々は本疾患の第一報告者であるフィリピン小児病院の L. V. Lee 博士とともに遺伝子解析を行いその疾患遺伝子を発見した。また、病理標本の提供を受けその特徴的な病理所見をえることができた。

### 対象と方法

徳島大学・産総研およびフィリピン小児病院で倫理委員会の承認をえてパナイ島およびマニラ市在住の患者1

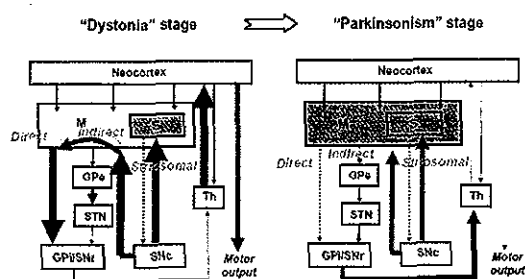
6名・その血縁者・非血縁者34名から十分な説明ののち同意を得て遺伝子の解析を行った。脳病理標本として4名のホルマリン固定標本1名の凍結標本を得た。方法として遺伝子解析は1名の患者からBACクローンを作成後ショットガン法を用いて疾患候補領域の全ゲノム配列を明らかにした。脳凍結標本を用いた *in situ hybridization* や免疫組織化学的な方法を用いて候補遺伝子の絞りこみを行った。

### 結果

遺伝子解析により、TAF1 遺伝子のイントロン上に疾患特異的な SVA トランスポゾン挿入を認め、脳凍結標本を用いた *in situ hybridization* や免疫組織化学的な方法で TAF1 の脳線条体ニューロンでの発現が著明に低下しており、また定量的 RTPCR 法を用いることによ

り TAF1 の脳特異的な isoform の 1 つで著明な発現量の減少が見られ、TAF1 遺伝子のトランスポゾンが本症の原因であることが証明された。また、その機序としてトランスポゾンおよびその近傍に DNA の異常なメチル化を認め、これが中枢神経特異的な isoform の発現に必要なエンハンサーやサブレッサーとの相互作用に障害を与えている可能性が示唆された。

その特徴的な病理像として線条体ニューロンのなかでも中型有棘ニューロン、とりわけ striosome ニューロンの選択的な脱落が初期のジストニア期におこり、晩期のパーキンソン症候群期には striosome および matrix 双方の細胞が脱落することがあきらかになった。Striosome は黒質のニューロンのドーパミン放出を抑制しており、その脱落により初期にドーパミンの過剰を来たすことによりジストニア説明することができる。晩期にはすべての細胞がなくなるためドーパミンのシナプス後細胞がなくなることによりパーキンソン症候群を生ずるものと考えられる。(下図)



### 考察

本研究で明らかになった TAF1 遺伝子は基本的な転写因子の 1 つであり、その機能は多岐にわたる。なぜその遺伝子変異が特定の神経細胞の脱落に関係するかについてはまだ十分に明らかではない。今回見つかった TAF1 の脳特異的な isoform の著明な発現の低下は、本症の場合のように intron に挿入された巨大なトランスポゾンが成人になり始めて発症する神経変性疾患をおこすにいたることを示したはじめての病態であり、おなじくトランスポゾンが関与する可能性が指摘されてい

る統合失調症などの病態解明を進めていく上でも極めて重要である。また、線条体の striosome 特異的な変性を認める上でも始めての病態であり、ジストニアやパーキンソン症候群の病因を考える上でも興味深い。

### まとめ

今回、ジストニアとパーキンソン症候群を同時に来たす XDP の疾患遺伝子を同定しジストニアとパーキンソン症候群の発症機序を説明しうる特異的な病理像を明らかにした。今後、疾患動物モデルの作成、治療法の開発が急務であり、他の非遺伝性神経変性症でも同様の機序が関与しているかを検索する必要がある。

### 文献

1. Kaji R et al. *Adv Neurol* 94: 11-7, 2004.
2. Murase N, et al. *Brain* 128: 104-15., 2005
3. Nishimura M et al. *Neurosci Lett* 374: 218-21, 2004.
4. Nishimura M et al. *Neurosci Lett* 368: 140-3.
5. Nodera H et al. *Brain* 127: 203-11, 2004.
6. Nodera H et al. *Muscle Nerve*. in press
7. Nodera H et al. *No To Shinkei* 56: 761-70, 2004.
8. Sakai, T et al. *J Biol Chem* 279: 41131-40, 2004.
9. Sung, JY et al. *Muscle Nerve* 29: 28-37, 2004.
10. Takeda E J. et al. *J Med Invest* 51: 139-45, 2004.
11. Nodera H, et al. *Neurology*, in press
12. Kaji R, et al. *Ann Neurol* [Editorial], in press
13. Goto S et al. *submitted*
14. Makino S et al. *submitted*

## パーキンソン病患者のレビー小体における Pael-R, Parkin および Glup の関与

村上哲郎、瓦林毅、松原悦朗、永田哲也、永野功、東海林幹夫、阿部康二  
岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学

### 研究要旨

パーキンソン病の病理学的特徴であるレビー小体形成および神経細胞死の機序を明らかにするために、パーキンソン病患者剖検脳における Pael-R, Parkin および Glup の局在を検討した。パーキンソン病患者脳ではほとんどのレビー小体に Pael-R, Parkin および Glup が局在してしており、これらの分子がユビキチン・プロテアソーム系を通じてレビー小体への蓄積や神経細胞死に関与している可能性が示唆された。一方、パーキンソン病と同じく  $\alpha$ -synuclein 陽性の封入体がグリア細胞に出現する多系統萎縮症の脳や正常対照脳にはこれらの蓄積は見られず、これらの分子の関与はパーキンソン病に特異的であると考えられ、パーキンソン病の機序解明に重要であると考えられた。

### はじめに

パーキンソン病は中脳黒質のドパミン含有神経細胞の変性およびレビー小体の出現を病理学的な特徴とする。 $\alpha$ -synuclein は常染色体優性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子でると同時にレビー小体の主要な構成成分でもある。Parkin は常染色体劣性遺伝性若年性パーキンソン病の原因遺伝子であり、ユビキチン・プロテアソーム系において  $\alpha$ -synuclein などの基質にユビキチンを結合させる E3 としての活性を有する。Pael-R は最近同定された Parkin の新しい基質であり、培養細胞に過剰発現させると小胞体ストレスを介した細胞死を惹起するが、Parkin および Parkin に隣接して存在する遺伝子である Glup タンパクによってユビキチン化されて細胞死が抑制されることが分かり、パーキンソン病への関与が示唆されている。

### 方法

パーキンソン病脳における Pael-R 蓄積と Glup のレビー小体形成への関与を明らかにするために、パーキンソン病 6 例、レビー小体型痴呆 3 例、多系統萎縮症 6 例および正常コントロール 6 例の剖検中脳を用いて免疫組織学的検討を行った。中脳はパラフィン封埋により固定した。Pael-R、

Parkin および Glup のそれぞれのリコンビナントタンパクに対するポリクローナル抗体を作成し、剖検中脳を用いて免疫染色を行った。また、 $\alpha$ -synuclein, ubiquitin に対する抗体も用いた。

### 結果

$\alpha$ -synuclein および ubiquitin に対する抗体を用いた染色ではほとんどすべてのレビー小体が濃染された（図 1）。特にレビー小体はほぼすべてにおいて周辺部 (halo) が染色された。抗 Pael-R 抗体では大多数のレビー小体に Pael-R の蓄積が確認され、そのほとんどすべてで中心部 (core) が濃染された（図 2）。抗 Parkin 抗体による染色では大多数のレビー小体が染色され、そのほとんどで周辺部 (halo) が染色された。さらに抗 Glup 抗体による染色ではほとんどのレビー小体が染色され、特に中心部 (core) が濃染された。一方正常対照脳では Pael-R, Parkin, Glup,  $\alpha$ -synuclein および ubiquitin のいずれの抗体でも染色性はほとんど認めなかった。また、多系統萎縮症脳の染色ではグリア細胞内封入体に  $\alpha$ -synuclein と ubiquitin は蓄積していることが確認できたが、Pael-R, Parkin および Glup に対する抗体ではほとんど染色性なかった。

### 考察

Pael-R、Parkin および Glup は免疫組織学的にレビー小体に局在することがわかり、これらの分子がレビー小体に蓄積していることが分かった。レビー小体は前述のようにパーキンソン病やレビー小体型痴呆において特徴的にみとめられる封入体であり、これらの結果から Pael-R、Parkin および Glup がレビー小体形成、ひいてはそれに引き続く神経細胞死に関与している可能性が示唆された。培養細胞系において過剰発現した Pael-R は小胞体ストレスを介した神経細胞死を惹起するが、Parkin は Pael-R をユビキチン化することによって神経細胞死を抑制する。また、Parkin 遺伝子がパーキンソン病原因として発見されたときに Parkin 遺伝子と一部プロモーターを共有して相補的 DNA にコードされている新規遺伝子として発見された Glup は、従来その役割は不明であったが最近になって Parkin と結合して Pael-R の凝集を促進し、その結果神経細胞死を抑制することがわかっている。今回の我々の検討ではヒト剖検脳でもこれらの分子が蓄積していることからヒトパーキンソン病でも同様の機序が存在する可能性が示唆された。一方、同じ  $\alpha$ -synuclein の蓄積を来す多系統萎縮症で認められるグリア細胞内封入体ではこれらのタンパクの蓄積はなく、これらの分子の関与はパーキンソン病により特異的である可能性が示唆された。

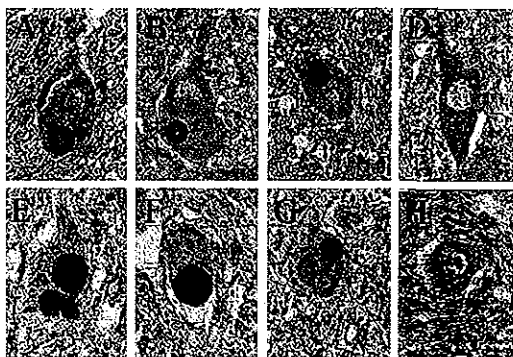


図1.  $\alpha$ -synuclein (A-D) および ubiquitin (E-H) に対する抗体を用いた免疫染色。A-C, E-G; パーキンソン病脳、D, H; 正常対照脳。パーキンソン病脳ではレビー小体の周辺部に  $\alpha$ -synuclein (A-C) および ubiquitin (E-G) の蓄積が認められるが、正常コントロール (D, H) では細胞質を含めて染色性は認められない。

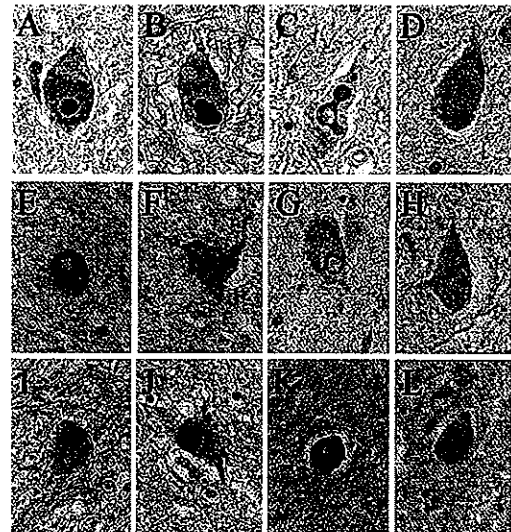


図2. Pael-R (A-D)、Parkin (E-H) および Glup (I-L) に対する抗体を用いた免疫染色。Pael-R は主にレビー小体の中心部 (A, B) に認められ、時に周辺部 (C) にも認められる。Parkin はほとんどがレビー小体の周辺部に認められ、細胞質にも蓄積が見られる (E-G)。Glup はその多くが中心部 (I, J) に認められるが時に周辺部 (K) にも認められる。正常対照脳 (D, H, L) ではいずれの抗体でも蓄積は認めない。

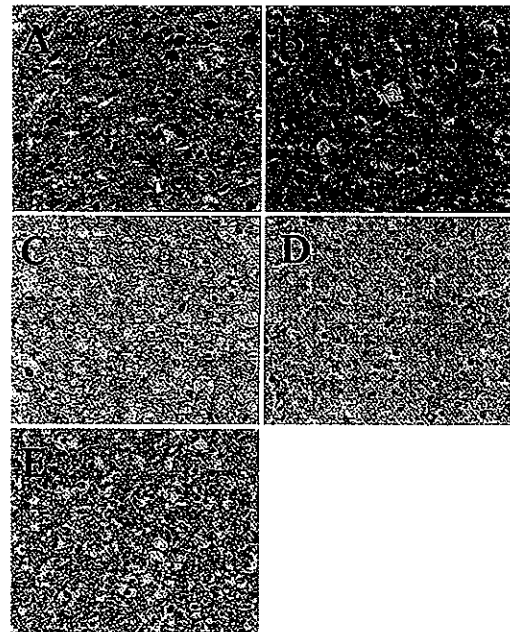


図3. 多系統萎縮症における  $\alpha$ -synuclein (A)、ubiquitin (B)、Pael-R (C)、Parkin (D) および Glup (E) に対する抗体による免疫染色。グリア細胞内封入体には  $\alpha$ -synuclein と ubiquitin の蓄積は認められる (A, B) が、Pael-R、Parkin および Glup の蓄積は認められない (C-E)。



### まとめ

パーキンソン病のレビー小体には Pael-R、Parkin および Glup が蓄積しており、レビー小体形成から神経細胞死にいたる機序に Pael-R の蓄積と、Parkin および Glup によるユビキチン化が関与している可能性が示唆された。

### 文献

1. Murakami T, et al. *Ann Neurol* 55:439-442, 2004.
2. Lotharius J, et al. *Nat Rev Neurosci* 3:932-942, 2002.
3. Polymeropoulos MH, et al. *Science* 276:2045-2047, 1997.
4. Krüger R, et al. *Nat Genet* 18:106-108, 1998.
5. Baba M, et al. *Am J Pathol* 152:879-884, 1998.
6. Fujiwara H, et al. *Nat Cell Biol* 4:160-164, 2002.
7. Kitada T, et al. *Nature* 392:605-608, 1998.
8. Shimura H, et al. *Nat Genet* 25:302-305, 2000.
9. Imai Y, et al. *Cell* 29:891-902, 2001.
10. Imai Y, et al. *J Biol Chem* 275:35661-35664, 2000.
11. Shoji M, et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68:605-608, 2000.

## パーキンソン病における macrophage migration inhibitory factor (MIF) の解析

報告者氏名 森若文雄<sup>1)</sup> 緒方昭彦<sup>2)</sup>、岸本利一郎<sup>2)</sup>

菊地誠志<sup>2)</sup>、佐々木秀直<sup>2)</sup>

浜上尚也<sup>3)</sup>、寺戸睦子<sup>3)</sup>、田代邦雄<sup>1)</sup>

所属<sup>1)</sup> 北海道医療大学心理科学部

所属<sup>2)</sup> 北海道大学神経内科

所属<sup>3)</sup> 北海道医療大学薬学部

### 研究趣旨

パーキンソン病(PD)の発症メカニズムとして oxidative stress や apoptosis が注目されているが、これらはサイトカインとの関連性が強い。PD患者において proinflammatory cytokine である MIF の髄液中の濃度を測定し、コントロールと比較した。PD 症例において髄液中の MIF 濃度が有意に上昇し、また、脳組織内においては病変部位に MIF mRNA の発現が顕著であった。これは MIF が PD の病態との関連性を示すと同時に PD の病因仮説としてサイトカインが影響している可能性を示唆するものである。

### はじめに

パーキンソン病(PD)の発症メカニズムとして oxidative stress や apoptosis が注目されているが、これらはサイトカインとの関連性が強い。PD患者において proinflammatory cytokine である MIF の髄液中の濃度を測定し、コントロールと比較した。また、PD 剖検脳における MIF の発現を調べ、PD の病態における MIF の関連性を検討した。

### 方法

PD6例とコントロール16例の髄液中 MIF 値を ELISA 法にて測定し、有意差があるか検定を行った。また、臨床的にも病理学的にも PD と確定診断された PD の剖検2例と中枢病変を有しないコントロール剖検2例について MIF の RNA probe を用い in situ

hybridization を行い、脳内における MIF mRNA の発現を調べた。

### 結果

髄液中の MIF 濃度平均値は、PD では 4.35ng/ml、コントロールでは 2.57ng/ml であった。PD ではコントロールに比べ有意差 ( $p < 0.05$ ) をもって上昇していた。In situ hybridization ではコントロールに比べ、PD 症例の中脳黒質において萎縮した神経細胞並びに周囲のグリア細胞に MIF が強く発現していた。

### 考察

免疫組織学的検討では PD 脳内に TNF- $\alpha$  や TGF- $\beta$  の増加が報告されているが、サイトカインの1つであり中枢神経内に大量に存在する MIF が PD ではさらに増加している所見から

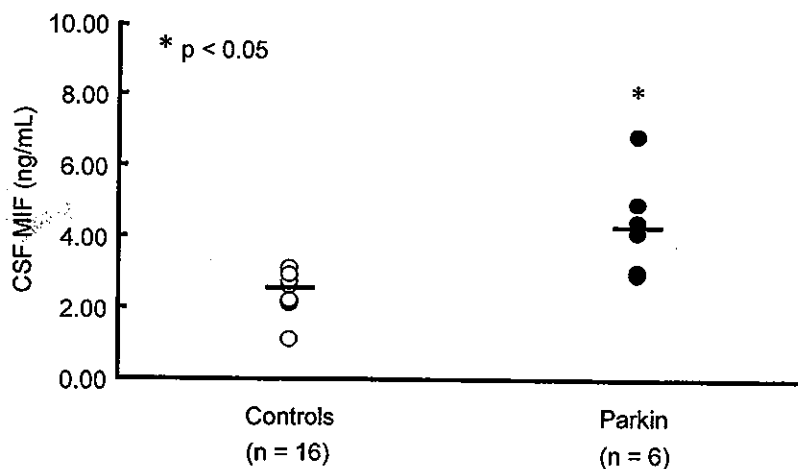
は PD の病態との関連性を示唆するものである。MIF は NO 活性と相関することを示す報告や TNF- $\alpha$  の刺激により誘導されることが見出されており、これらの影響も働いているかもしれない。

### まとめ

PD 症例において髄液中の MIF 濃度が有意に上昇し、また、脳組織内においては病変部位に MIF mRNA の発現が顕著であった。これは MIF が PD の病態との関連性を示すと同時に PD の病因仮説としてサイトカインが影響している可能性を指示するものであり、治療の方向性を示唆するものである。さらに多くの症例で検討する必要があると考えられる。

### 文献

- 1) Ogata A, Nishihira J, et al. Identification of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression in neural cells of the rat brain by in situ hybridization. *Neurosci Lett*;246:173-177. 1998
- 2) Suzuki T, Ogata A et al. Augmented expression of macrophage migration inhibitory factor in the telencephalon of the developing rat brain. *Brain Res* 1999;816:457-462.
- 3) Suzuki T, Ogata A et al. Japanese encephalitis virus up-regulates expression of macrophage migration inhibitory factor(MIF) mRNA in the mouse brain. *Biochim Biophys Acta* 2000;1517:100-106.



### 髄液中の MIF 濃度

髄液中の MIF 濃度平均値は、PD では 4.35ng/ml、コントロールでは 2.57ng/ml であった。PD ではコントロールに比べ有意差 ( $p < 0.05$ ) をもって上昇していた。

## プロテアソームとドーパミンニューロン死

下濱俊、澤田秀幸

京都大学・大学院医学研究科・臨床神経学

**研究要旨** 常染色体劣性遺伝形式をとる若年性パーキンソニズム (ARJP) では、原因遺伝子産物である *Parkin* のユビキチンリガーゼ E3 活性が喪失しており、ユビキチン・プロテアソーム障害がドーパミンニューロン死を引き起こしている。一方、孤発型パーキンソン病でもユビキチン・プロテアソーム不全がドーパミンニューロン死を引き起こすとする仮説があるが、我々の検討では、孤発型パーキンソン病の薬理的モデルである *MPP+* や *rotenone* 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る。本研究では、プロテアソームを阻害した場合にどのようにしてドーパミンニューロン死が拮抗されるかについて、主として分子シャペロンと小胞体ストレスとの関係に焦点を当て、検討した。プロテアソーム阻害薬である *lactacystin* により *heat shock protein 70 (HSP70)* のタンパク量は濃度および時間に依存して増大した。この *HSP70* タンパクの増大は細胞内カルシウムキレータ、また *HSP70* の誘導阻害薬により拮抗されたことから、*HSP70* の分解抑制によるものではなく、転写促進によると推定された。より高濃度 (10  $\mu\text{M}$  以上) の *lactacystin* は小胞体ストレスマーカーの *GRP78* を増大させ、神経細胞死を促進したが、0.1 ~ 1.0  $\mu\text{M}$  の *lactacystin* は *GRP78* タンパク量を変化させなかった。プロテアソーム阻害薬は高濃度では小胞体ストレスを引き起こし、神経細胞死を引き起こしうるが、小胞体ストレスを引き起こさない低濃度では神経保護的に作用し、*HSP70* の増大が神経保護を担っている可能性がある。

### はじめに

常染色体劣性遺伝形式をとる若年性パーキンソニズム (ARJP) の原因遺伝子 *Parkin* の機能はユビキチンリガーゼ E3 であり、ARJP 患者で見られる変異 *Parkin* ではユビキチンリガーゼ活性が失われていることから、ARJP ではユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク分解系の障害が病因となっていると考えられる<sup>1,2,3</sup>。孤発型パーキンソン病でも

ユビキチン・プロテアソーム系に障害があり、これが、*Lewy* 小体形成と選択的ドーパミンニューロン死に関与している可能性が指摘されている。しかし、孤発型パーキンソン病の薬理的モデルである *MPP+* あるいは *rotenone* 誘発ドーパミンニューロン死では、プロテアソーム活性を阻害した場合、 $\alpha$ -シヌクレイン陽性封入体が形成されるものの、ドーパミンニューロン死そのものは拮抗され、

プロテアソーム阻害はむしろ細胞保護的な作用を持つ<sup>4)</sup>。そこで、本研究ではプロテアソーム阻害による細胞保護の分子機構について、HSP70, XIAP に注目して検討した。

[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。培養 7 日目にプロテアソーム阻害薬である lactacystin を 24 時間投与し、TBS で 2 回洗浄後、細胞を回収し細胞溶解液中で溶解し、遠心によって得られた上清をタンパク定量後にイムノブロットを施行した。一次抗体として抗 HSP70 抗体、および抗 XIAP 抗体を用いた。得られたバンド濃度を、GAPDH をコントロールタ

ンパクとした相対値として評価した。また、小胞体ストレスのマーカーとして GRP78 (BiP)の検討も併せて行った。

[結果] lactacystin は  $0.1 \mu\text{M} \sim 1.0 \mu\text{M}$  でドーパミンニューロン死を拮抗し、この濃度でプロテアソーム活性が抑制された (図 1)。HSP70 は lactacystin の濃度および投与時間に依存して増大した (図 2, 3)。この HSP70 のタンパク量増大は、細胞内カルシウムキレータである BAPTA により拮抗され、細胞外カルシウムキレータである EGTA では拮抗されなかった。また、HSP70 の転写阻害薬である KNK437 により拮抗された (図 4)。

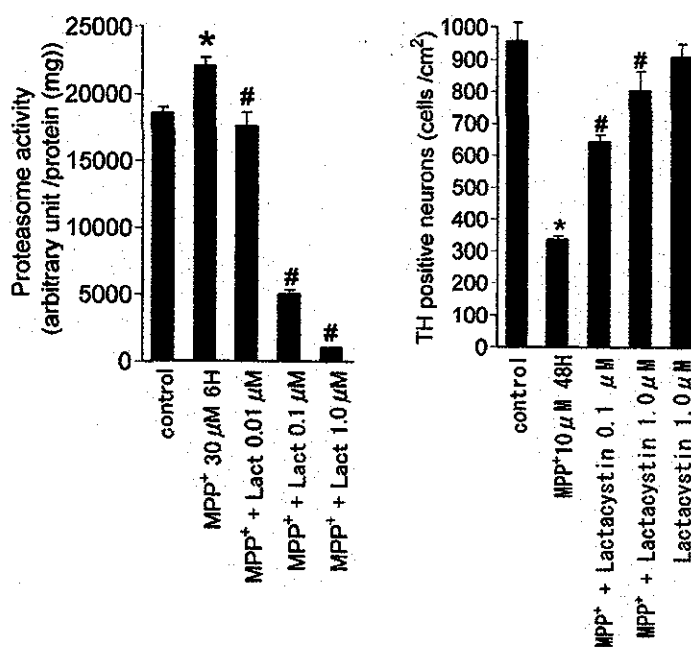


図 1 ラット中脳初代培養に MPP<sup>+</sup> を投与すると軽度だが、有意に proteasome 活性が増大した。この増大は、lactacystin を  $0.01 \mu\text{M} \sim 1.0 \mu\text{M}$  投与することにより抑制された (左)。一方、tyrosine hydroxylase (TH) 陽性のドーパミン神経の生存数は MPP<sup>+</sup> によって 30% 程度に減少したが、 $0.1 \mu\text{M} \sim 1.0 \mu\text{M}$  の lactacystin により有意に増加した (右)。

(Sawada et al., J. Biol. Chem 279: 10710-10719, 2004)

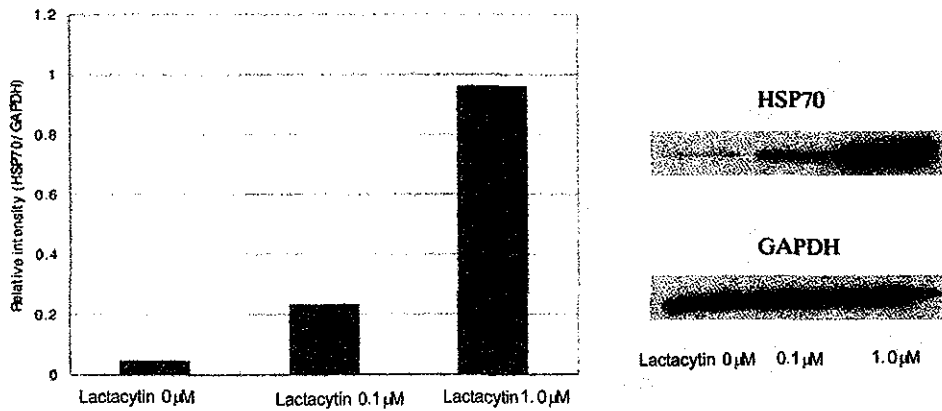


図2 lactacystin 0.1 μM~1.0 μM を投与すると濃度依存的に HSP70 のタンパク量が增大した。

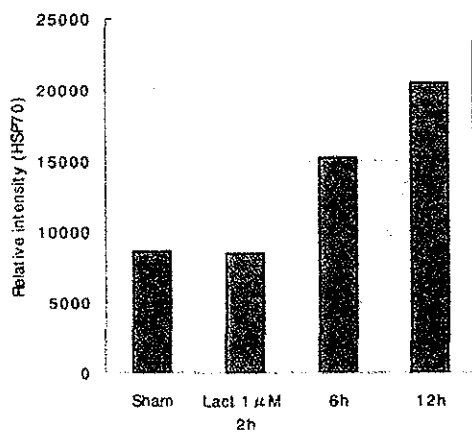


図3 lacytacytin 1.0 μM による HSP70 の増大は時間依存的に生じ、6 時間を超えると増大が見られた。

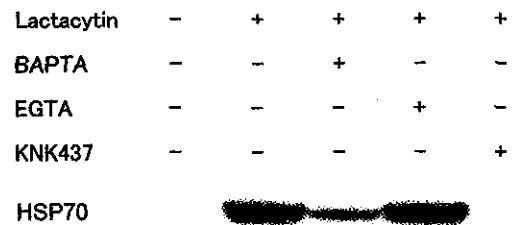


図4 Lactacystin による HSP70 の増大は EGTA によって拮抗されなかったが、BAPTA, KNK437 によって拮抗された。

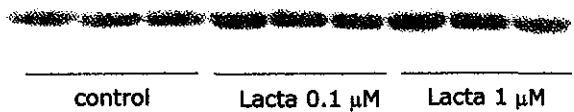
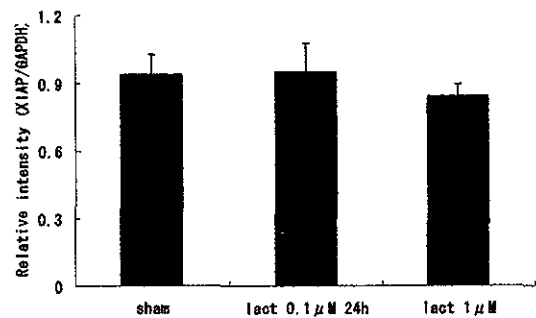


図5 lactacystin によって XIAP タンパク量に有意な変化は見られなかった。

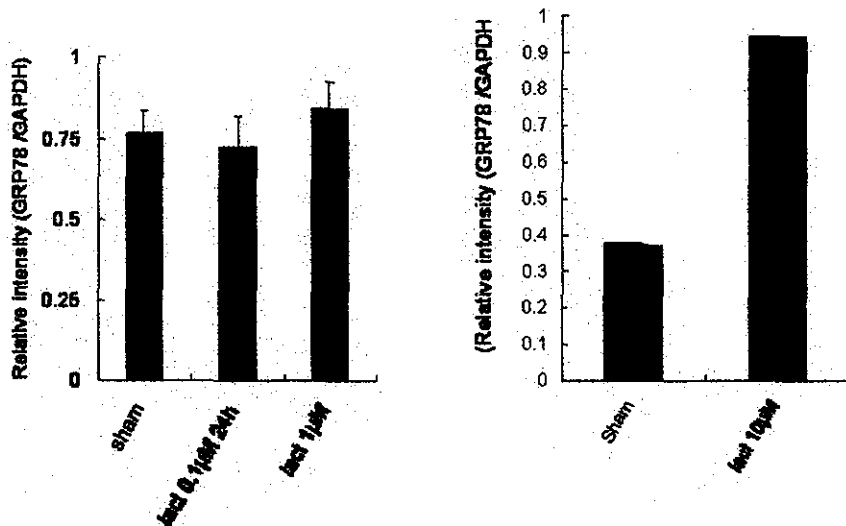


図6 小胞体ストレスマーカーである GRP78 のタンパク量は 0.1  $\mu\text{M}$ ~1.0  $\mu\text{M}$  の lactacystin では増大しなかった。一方単独で神経毒性を呈する 10  $\mu\text{M}$  の lactacystin では GRP78 タンパク量が増大し、小胞体ストレスがかかっていると考えられた。

一方、0.1  $\mu\text{M}$ ~1.0  $\mu\text{M}$  の lactacystin の投与では、XIAP には有意な増減はみられず (図5)、GRP78 の増大もみられなかった。Lactacystin は 10  $\mu\text{M}$  では単独毒性を呈したが、GRP78 も増大していた (図6)。

[考察] 本研究の結果からは、プロテアソーム阻害薬は高濃度では小胞体ストレスを生じ、神経毒性を有するが、より低濃度では、ドーパミンニューロン保護作用を持つと考えられる。小胞体ストレスを惹起しない低濃度のプロテアソーム阻害薬により HSP70 が増大した。 $\alpha$ -シヌクレイン過剰発現ショウジョウバエにおけるドーパミンニューロン死は、HSP70 を過剰発現させることにより、拮抗されることが示されており、プロテアソーム阻害薬によるドーパミンニューロン死拮抗作用に HSP70 の増大が関与している可能性が考

えられる。

[結論] プロテアソーム活性を部分的に阻害した場合は、小胞体ストレスマーカーの増大はみられず、HSP70 の増大が観察され、HSP70 の増大が神経細胞死抑制に関与している可能性が示唆された。

#### [文献]

- 1) Shimura H, et al. Nat. Genet. 25: 302-305, 2000
- 2) Imai Y, et al. J. Biol. Chem. 275: 35661-35664, 2000
- 3) Imai Y, et al. Cell 105: 891-902, 2001
- 4) Sawada H, et al. J. Biol. Chem. 279: 10710-10719, 2004
- 5) Auluck PK, et al. Science 295: 865-868, 2001

## L-dopa/dopamine は細胞内凝集体形成を促進する

中島健二<sup>1)</sup>，中曾一裕<sup>1)</sup>，吉本祐子<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 鳥取大学医学部脳神経内科

### 研究趣旨

パーキンソン病の病理形態学的特徴であるレビー小体形成メカニズムは依然不明の点が多い。この一端を明らかにすることを目的に、NGF で神経様に分化した PC12 細胞にプロテアソーム阻害薬を投与して凝集体モデルを作製し、L-ドパ/ドパミンの凝集体形成に関する作用を検討した。チロシン水酸化酵素 (TH) 阻害で凝集体形成は抑制されたが、他の酵素阻害薬では凝集体形成抑制は起きなかった。TH 阻害による凝集体形成抑制は、L-ドパ/ドパミンの外部からの添加で競合した。L-ドパ/ドパミンはプロテアソーム活性を低下させる作用があり、かつユビキチンを試験管内で非酵素的に重合化させる作用があることを示した。TH 阻害による凝集体形成の有無は細胞生存率に影響を与えなかった。ドパミン系細胞は潜在的に凝集体形成を来しやすく、凝集体形成そのものは toxic ではないと考えられた。

### はじめに

パーキンソン病の病理所見は、黒質ドパミン神経や橋青斑核などへのレビー小体出現と神経細胞脱落を特徴とする。しかし、レビー小体の形成機序やその存在意義についてはいまだ不明の点が多い。ドパミン細胞におけるレビー小体形成機序を理解する目的で、レビー小体構成蛋白であるユビキチン、 $\alpha$ シヌクレインなどの凝集とドパミン、L-ドパの相互関係を検討した。

### 方法

チロシン水酸化酵素 (TH) を有する PC12 細胞を用いたプロテアソーム阻害剤 MG132 (250nM) による凝集体モデルを用いて検討した。同様に、TH 遺伝子プロモーター領域を緑色蛍光蛋白遺伝子 EGFP 上流に挿入し、TH 転写活性を可視化した PC12 細胞でも同様の実験を行った。上記目的のため、①TH の競合的阻害薬である  $\alpha$ -methyltyrosine ( $\alpha$ MT)、

および DBH, AADC, チロシナーゼの各阻害薬である Benserazide, Fusaric acid, Kojic acid を用いて、細胞内代謝をコントロールした。

②L-ドパ、ドパミンと  $\alpha$ -methyltyrosine の共投与を試みた。①②に関する凝集体形成は顕微鏡下でのカウント、ポリユビキチン化現象はウエスタンブロットによって検討した、プロテアソーム活性、カテプシン活性は蛍光基質を用いて定量した。細胞の生存率は MTT 法により測定した。

また、in vitro でユビキチンと L-ドパ/ドパミンをインキュベートすることでユビキチン重合化に対する作用を検討した。

### 結果

MG132 投与 24-48 時間後に、神経様分化 PC12 細胞内にユビキチン、 $\alpha$ シヌクレイン陽性の凝集体が観察され、TH 転写活性可視化細胞では緑色蛍光の強い細胞に凝集体が多く観察された (図 1)。



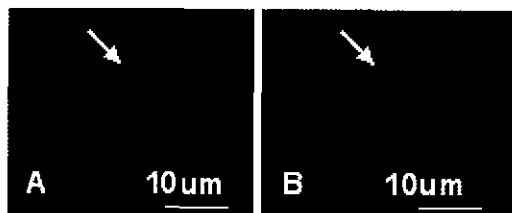


図1 MG132 添加時, TH 転写活性が強い細胞 (矢印) にユビキチン陽性の凝集体が多く認められる。

(A) TH プロモーター-EGFP で転写活性を可視化したもの。(B) ユビキチン抗体による染色。

TH の競合的阻害薬である  $\alpha$ MT を MG132 と併投与すると, 濃度依存的に凝集体形成が抑制された (図2)。他の酵素阻害薬では凝集体形成は起こらなかった。

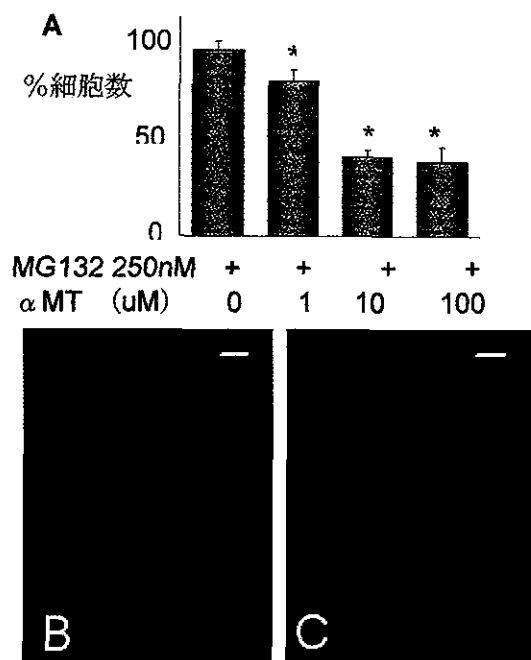


図2 (A)  $\alpha$ MT は濃度依存的に MG132 による凝集体形成を抑制する。\*:  $p < 0.05$ , vs  $\alpha$ MT, ANOVA. (B) 250nM MG132 投与によるユビキチン陽性凝集体 (矢頭)。 (C)  $\alpha$ MT (100 $\mu$ M) により凝集体数は激減する。Bar=10 $\mu$ m。

細胞内プロテアソーム活性に与える TH 阻害の影響を検討する為, 薬剤投与時のプロテアソーム活性を測定した。 $\alpha$ MT の単独投与は濃度依存的に PC12 細胞内プロテアソーム活性を上昇させたことから, L-ドパ, ドパミ

ンはプロテアソーム活性を低下させていることが示唆された。また, MG132 による同酵素活性低下も  $\alpha$ MT 共投与によりわずかながら上昇させた (図3)。MG132 投与下での  $\alpha$ MT によるプロテアソーム活性変化が軽度であることから, さらに他の要因で凝集体形成に影響を与えることが予測された。

試験管内において, pH7.9 の条件下でユビキチン蛋白と L-ドパ, ドパミンをインキュベートすると, エネルギー非依存的, 非酵素的にユビキチン重合化が認められた (図4)。フェニルアラニン, チロシンでは同様の現象は認められなかった。この電気泳動上の重合ユビキチンは, ポリユビキチンを認識する FK1 抗体で認識された。以上より, L-ドパ, ドパミンには, ①軽度ながらプロテアソーム活性を低下させる作用, ②ユビキチンを直接的に重合化させていく作用の両者があると考えられた。

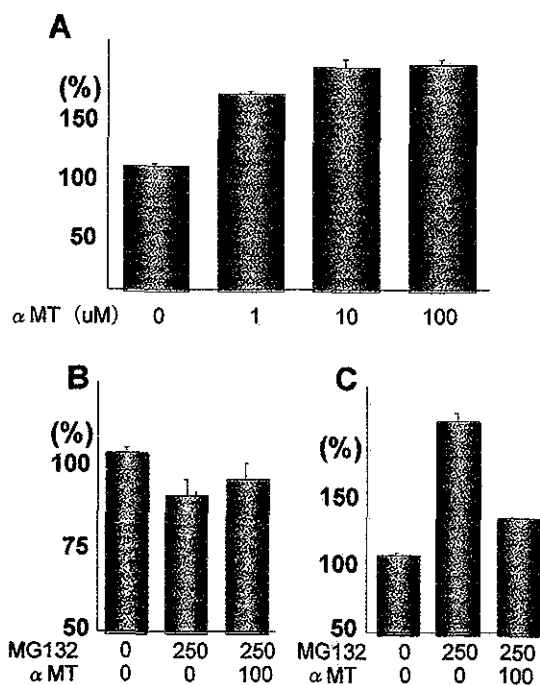


図3 (A)  $\alpha$ MT は濃度依存的にプロテアソーム活性を低下させる。(B)  $\alpha$ MT は MG132 により抑制されたプロテアソーム活性を上昇させる。(C) カテプシン活性。カテプシン活性はプロテアソーム活性と相反する挙動を示す。

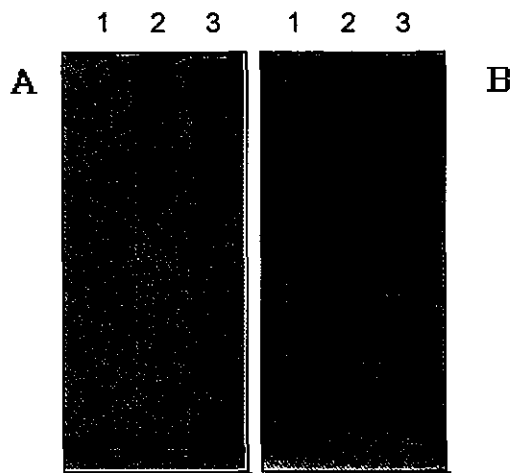


図4 (A) CBB 染色 (B) FK1 抗体 (ポリユビキチン). 1: ユビキチン, 2: ユビキチン+L-dopa, 3: ユビキチン+dopamine.

$\alpha$ MT による凝集体形成抑制が細胞の生存率にいかなる影響を与えるかを MTT 法により検討した. MG132 の各濃度において  $\alpha$ MT の共投与は生存率に有意な影響を与えなかった (図5).

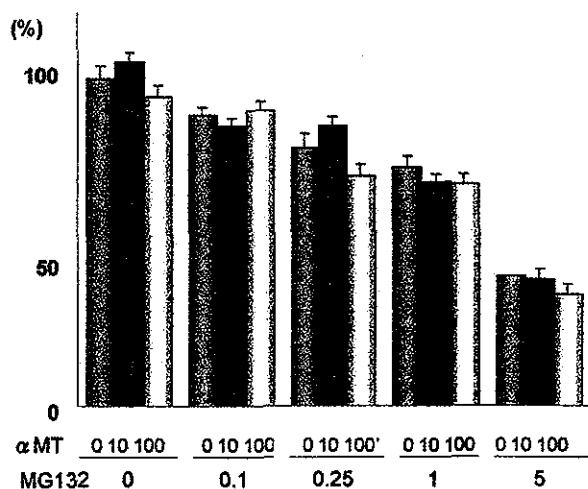


図5 MG132 各濃度において  $\alpha$ MT は生存率に影響を与えない. 縦軸は未処理細胞を 100%とした際の相対生存率. 横軸における薬品の濃度はいずれも  $\mu$ M.

### 考察

今回の研究結果より, ドパミン系細胞は潜在的に凝集体形成を来しやすい細胞であることが示唆された. その機序として, ①L-ドパ

ないしドパミンがプロテアソーム活性を低下させること, ②L-ドパ/ドパミンがエネルギー非依存的, 非酵素的にユビキチンを重合させる作用があること, の両者が関与していると考えられた. パーキンソン病におけるレビー小体形成の一部に同様のメカニズムが関与している可能性もあり, これらの知見はパーキンソン病の病態解明にも有用と考えられる. また, L-ドパ/ドパミンによる凝集体形成促進は細胞生存率には影響を与えなかったことから, 神経細胞内凝集体そのものが toxic ではないことを示唆するものと考えられた.

### まとめ

L-ドパ/ドパミンは凝集体形成を促進する作用があり, パーキンソン病脳におけるレビー小体形成にも同様の機序が関与している可能性がある.

### 文献

- Yohimoto-Y et al. FEBS Lett. In press
- Nakaso-K et al. Brain Res. 1012, 42-51, 2004.

## パーキン遺伝子によるパーキンソン病モデルの遺伝子治療に関する研究

水野 美邦、望月 秀樹、山田 正典

順天堂大学医学部脳神経内科

### 研究要旨

我々は昨年、アデノ随伴ウイルスベクター（rAAV）を用いたラット黒質での $\alpha$ -シヌクレイン過発現によるパーキンソン病モデルの作製、について報告した。本モデルは黒質ドーパミン神経細胞が脱落する際、 $\alpha$ -シヌクレインのリン酸化やカスパーゼ 9 活性化等、パーキンソン病患者脳で認められる病理学的特徴が再現されることより、実際の病態に比較的近いパーキンソン病モデルであると考えられる。今回我々は、本モデルを用いてパーキン遺伝子の治療効果について検討した。パーキン遺伝子発現は、(1)  $\alpha$ -シヌクレインによる黒質ドーパミン神経細胞脱落を有意に抑制し、(2) アポモルフィン誘発回転行動を有意に抑制した。また、(3) パーキン遺伝子発現自体には神経細胞毒性は認められなかった。以上の 3 つの結果は (1) 細胞死抑制、(2) 残存神経細胞の機能維持、(3) 低毒性、を示すものであり、従ってパーキン遺伝子によるパーキンソン病遺伝子治療は、病態の進展を抑制する新しい治療法となることが期待される。

### 【はじめに】

パーキンソン病は黒質から線条体に投射するドーパミン神経細胞が選択的に脱落した結果、脳内ドーパミン含量が低下することで発症する神経変性疾患である。黒質ドーパミン神経細胞が脱落する原因、メカニズムについては未だに十分に解明されておらず、従って病態進展を抑制する治療法がないのが現状である。黒質ドーパミン神経細胞が脱落する原因として、加齢、環境因子、遺伝、酸化ストレス、炎症、等の様々な因子が報告されていることから分かるように、パーキンソン病の発症要因は多様であると予想されている<sup>(1-4)</sup>。しかしながら近年の研究成果によると、 $\alpha$ -シヌクレインが有する神経細胞毒性は多くの発症メカニズムに関与していると考えられる。

パーキンソン病の大部分は孤発性であるが、5-10%は家族性に発症する。現在その原因遺伝子はいくつか同定されているが、最初に同定された遺伝子が $\alpha$ -シヌクレインである。孤発性パーキンソン病の最も特徴的な病理像は、残存した黒質ドーパミン神経細胞内に認めら

れる“レビー小体”と呼ばれる凝集体であるが、その主成分は $\alpha$ -シヌクレインである。また、レビー小体を構成している $\alpha$ -シヌクレインは 129 番目のセリン（Ser129）がリン酸化されていることが報告されている<sup>(5)</sup>。また、Ser129 リン酸化は *in vitro* において $\alpha$ -シヌクレインの凝集体形成を促進することも同時に報告された。通常、 $\alpha$ -シヌクレインの同部位はリン酸化されておらず、従ってヒト脳において、凝集体を形成しやすい異常な $\alpha$ -シヌクレインと正常な $\alpha$ -シヌクレインの最も大きな違いはリン酸化の有無であると考えられる。

パーキンはユビキチンリガーゼであるが<sup>(6)</sup>、 $\alpha$ -シヌクレインと同様に家族性パーキンソン病の原因遺伝子として単離された<sup>(7)</sup>。 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子変異によるパーキンソン病は優性遺伝であるが、パーキン遺伝子変異は劣性遺伝であることより、パーキンの細胞保護活性が変異により失活することでパーキンソン病が発症すると予想されている。実際、培養神経細胞を用いた検討により、小胞体ストレス、酸化ストレス等、様々な神経細胞死がパーキン遺伝子によって抑制されることが

明らかになっており、 $\alpha$ -シヌクレイン過発現による神経細胞死もパーキン遺伝子により抑制される<sup>(8-16)</sup>。従って、パーキン遺伝子によるパーキンソン病遺伝子治療は病態進展を抑制する新しい治療法となる可能性がある。

そこで我々は、パーキンソン病モデルにおけるパーキン遺伝子の治療効果を検討した。パーキンソン病モデルは、アデノ随伴ウイルスベクター (rAAV) を用いたラット黒質での $\alpha$ -シヌクレイン過発現により作製した。本モデルは黒質ドーパミン神経細胞が脱落する際、 $\alpha$ -シヌクレインのリン酸化やカスパーゼ9活性化等、パーキンソン病患者脳で認められる病理学的特徴が再現されることより、実際の病態に比較的近いパーキンソン病モデルであると考えられる<sup>(17)</sup>。

#### 【方法】

rAAV- $\alpha$ -synuclein、rAAV-parkin、rAAV-EGFPの作製

ヒト $\alpha$ -シヌクレイン、パーキン遺伝子をAAV用発現プラスミドに挿入し、rAAV作製用プラスミドとともに、それぞれ遺伝子に対するrAAVを作製した。rAAVの力価はPCRにて定量した ( $2.4 \sim 5.6 \times 10^{11}$  genomes/ml)。

rAAVのラット黒質への注入

10週齢雄性SDラットの左側黒質に3種類のrAAVのうち2種類を混ぜて注入した。従って、実験群は3群 (P+G群; rAAV-parkin + rAAV-EGFP、S+G群; rAAV- $\alpha$ -synuclein + rAAV-EGFP、S+P群; rAAV- $\alpha$ -synuclein + rAAV-parkin) となる。1種類につき1.5  $\mu$ l/ratを使用した。注入位置はブレグマから後方5.3 mm、左2.4 mm、脳表から下方7.4 mmとした。

免疫組織化学染色

rAAV注入13週間後に脳を採取し、20  $\mu$ m厚の切片を作製した。チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、GFP、 $\alpha$ -シヌクレイン、パーキンに対する免疫染色 (蛍光) の後、コンフォーカル顕微鏡にて観察、画像取り込みを行った。

アポモルフィン誘発回転行動観察

rAAV注入後4、8、12週間後にアポモルフィン誘発回転行動観察を行った。アポモルフィン (0.25 mg/kg) を皮下投与した後、直径30 cmの円形容器にラットを置き、投与10分後から40分後までの計30分間の非傷害側

への回転数を計測した。ラットが後右肢を軸に連続して270度以上回転した場合を1回転とした。

#### 【結果】

rAAV注入13週間後においてS+G群では黒質ドーパミン神経細胞が約50%脱落していたが、S+P群では脱落は約20%であり、S+G群に比べ残存している細胞数が有意に多かった ( $P < 0.01$ )。なお、P+G群では細胞数に変化は認められなかった。

免疫染色にて、S+G群、S+P群においてrAAV由来の $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子は同程度に発現していることが確認された。パーキン、EGFP遺伝子も各群で同様に発現していた。

アポモルフィン誘発回転行動は、4週間後では3群とも同レベルであった。8、12週間後ではS+G群では回転数が徐々に増加した。一方S+P群、P+G群では、回転数が8週間後では減少し、12週間後では完全に消失した。12週間後のS+G群の回転数、および回転を呈したラットの割合は他の群に比べ有意に高値であった ( $P < 0.05$ )。

#### 【考察】

S+P群での黒質ドーパミン神経細胞数はS+G群に比べ有意に多かったことは、パーキン遺伝子が $\alpha$ -シヌクレインによる神経細胞脱落を抑制したことを示している。またP+G群では細胞脱落が認められなかったことより、パーキン遺伝子自体は細胞毒性が低いと考えられる。

S+G群およびS+P群での $\alpha$ -シヌクレイン発現は同程度であったことから、S+P群での細胞死抑制は $\alpha$ -シヌクレイン発現低下によるものではないと考えられる。

アポモルフィン誘発回転行動は、4週間後では3群とも同レベルであったが、これは刺入による傷害の影響であると考えられる。8、12週間後ではS+G群では回転数が徐々に増加したが、これはS+G群では黒質ドーパミン神経細胞が徐々に脱落したことを示している。一方S+P群では12週間後において回転が完全に消失したことより、パーキン遺伝子により脱落を免れた神経細胞は機能を維持していることを示唆している。またP+G群もS+P群と同様に12週間後には回転が認められなくなったことより、パーキン遺伝子自体は神経細胞機能に重大な影響を与えないと考えられる。