

鏡と Western blot で Venus を発現するラインを選別した。トランスジーンが発現は定量 RT-PCR および *in situ* ハイブリダイゼーションで解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子組み換え、実験動物を用いる実験に該当する。独立行政法人理化学研究所の遺伝子組み換えおよび動物実験計画の承認を受け、研究所の実験動物指針に基づいてできるだけ限り実験動物に苦痛を与えないように配慮した。

C. 研究結果

約 20 匹のファウンダーマウスから脳で Venus を発現する 6 ラインを同定した。それらは Venus を線条体で強く発現する、皮質で強く発現する、および線条体および皮質で強い発現を示すラインに大別できた。このことから、脳において $\beta 4$ プロモーター制御下で Venus を発現する TG を確立できたと考えた。線条体で強い発現を示す TG (図 2A) を HD モデルマウスと交配し double TG を作製した。Single TG、double TG の線条体より RNA を調製し、定量 PCR で解析した。このマウスの線条体では Venus の発現が強く抑制された (図 2B)。

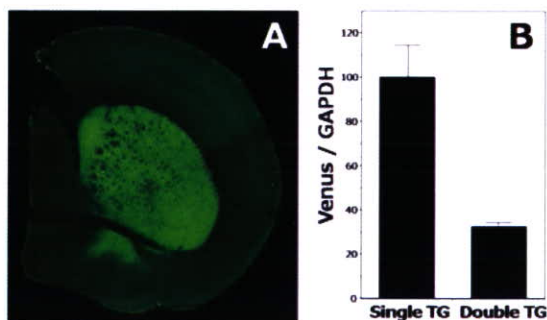


図2. $\beta 4$ プロモーター制御下で Venus を線条体で強く発現するTG (A)。この TG を HD TG と交配して得られる double TG では Venus の発現が顕著に低下した(B)。

D. 考察

HD モデルマウスにおける $\beta 4$ の発現は転写レベル、転写後の RNA 修飾および分解のレベルで抑制される可能性が考えられる。ここで用いたトランスジーンは $\beta 4$ 遺伝子の代わりに Venus が挿入され、 $\beta 4$ プ

ロモーターで制御されている。Double TG での Venus の発現抑制は、伸長 polyQ による発現抑制が $\beta 4$ プロモーターに依存している、ことを示す。

E. 結論

伸長 polyQ による $\beta 4$ 遺伝子発現抑制は $\beta 4$ プロモーターに依存している。

F. 文献

1. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72, 971-83 (1993).
2. Kotliarova, S. et al. *J Neurochem* 93, 641-53, (2005).
3. Oyama et al. *J Neurochem* 98, 519-29 (2006).

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chen, C., Dickendesher, T.L., Oyama, F., Miyazaki, H., Nukina, N. & Isom, L.L. Floxed allele for conditional inactivation of the voltage-gated sodium channel beta1 subunit Scn1b. *Genesis* 45, 547-53 (2007).
- 2) Miyazaki, H., Oyama, F., Wong, H.K., Kaneko, K., Sakurai, T., Tamaoka, A. & Nukina, N. BACE1 modulates filopodia-like protrusions induced by sodium channel beta4 subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 43-8 (2007).
- 3) Fei, E., Jia, N., Zhang, T., Ma, X., Wang, H., Liu, C., Zhang, W., Ding, L., Nukina, N. & Wang, G. Phosphorylation of ataxin-3 by glycogen synthase kinase 3beta at serine 256 regulates the aggregation of ataxin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 487-92 (2007).
- 4) Liu, C., Fei, E., Jia, N., Wang, H., Tao, R., Iwata, A., Nukina, N., Zhou, J. & Wang, G. Assembly of lysine 63-linked ubiquitin conjugates by phosphorylated

alpha-synuclein implies Lewy body biogenesis. *J Biol Chem* **282**, 14558-66 (2007).

- 5) Wang, H., Jia, N., Fei, E., Wang, Z., Liu, C., Zhang, T., Fan, J., Wu, M., Chen, L., Nukina, N., Zhou, J. & Wang, G. p45, an ATPase subunit of the 19S proteasome, targets the polyglutamine disease protein ataxin-3 to the proteasome. *J Neurochem* **101**, 1651-61 (2007).

2.学会発表

- 1) Wong, H. K., Kurosawa, M., Bauer, P. O., Washizu, C., Machida, Y., Tosaki, A., Nakamura, T. & Nukina, N. Amiloride and its derivative ameliorate Huntington's disease pathological processes via an ubiquitin proteasome system-dependent mechanism. *37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience2007)*, San Diego, USA (November 3-7).
- 2) Bauer, P. O., Furukawa, Y., Wong, H. K. & Nukina, N. Chaperone-mediated autophagy as a potential strategy to ameliorate pathological processes related to Huntington disease. *37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Neuroscience2007)*, San Diego, USA (November 3-7).
- 3) Oyama, F., Miyazaki, H., Kurosawa, M., Kaneko, K. & Nukina, N. Dysregulation of sodium channel beta4 expression in the striatum of Huntington disease transgenic mice. *The 57th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics*, San Diego, USA (October 23-27 2007).
- 4) Doumanis, J., Wada, K., Moore, A. W. & Nukina, N. High-throughput RNAi screening for modifiers of mutant huntingtin aggregation in *Drosophila melanogaster*. *7th IBRO World Congress of Neuroscience*, Melbourne, Australia (July 12-17 2007).
- 5) Nukina, N., Khan L. A. & Yamanaka T. Involvement of ubiquitin proteasome system and autophagy in polyglutamine disease. *7th IBRO World Congress of*

Neuroscience, Melbourne, Australia (July 12-17 2007).

I.知的所有権の取得状況

β4 プロモーターで蛍光タンパク質を発現する TG を用いて HD の治療薬の評価をする (特許出願予定)

パーキンソン病の感受性遺伝子探索 — *FGF20* とゲノムワイド関連解析 —

[班員] 氏名: 戸田 達史 所属: 大阪大学臨床遺伝

[共同研究者] 氏名: 佐竹 渉^{1,2)} 水田依久子¹⁾ 渡邊雅彦³⁾ 武田 篤⁴⁾ 長谷川一子⁵⁾ 中島健二⁶⁾

佐古田三郎²⁾ 山本光利⁷⁾ 服部信孝⁸⁾ 村田美穂⁹⁾

所属:¹⁾ 大阪大学臨床遺伝 ²⁾ 大阪大学神経内科 ³⁾ 筑波大学神経内科 ⁴⁾ 東北大学神経内科

⁵⁾ 国立病院機構相模原病院神経内科 ⁶⁾ 鳥取大学脳神経内科 ⁷⁾ 香川県立中央病院神経内科

⁸⁾ 順天堂大学脳神経内科 ⁹⁾ 国立精神神経センター武蔵病院神経内科

研究要旨 孤発性パーキンソン病 (PD) は、遺伝要因と環境要因により発症する多因子疾患であり、感受性遺伝子の探索が盛んに行われている。我々は、PD 感受性遺伝子の同定を目的に、以下 (A) (B)を行った。(A) *Fibroblast growth factor 20 (FGF20)* はアメリカ人集団で、PD 発症との関連が報告された (van der Walt ら) が、フィンランド人、ギリシャ人集団では、関連は見出されなかった (Clarimon J ら)。我々は、日本人の大集団 (PD 1388 人・対照 1891) を用いた関連解析を行い、*FGF20* 領域に位置する rs1721100 と、PD 発症との関連を示した ($P = 0.0053$)。また、(B) 全ゲノムに分布する、27,158 個のマイクロサテライトマーカーと、pooled DNA (患者対照各 624 人) を組み合わせた 3 段階の関連解析を行い、 $P < 0.001$ の関連を示す MS マーカーを 7 個同定した ($P < 0.0001$ 1 個, $P < 0.001$ 6 個, $P < 0.01$ 17 個)。このうちの 1 つである MS 7010 は、患者 865 人・対照 857 人を用いた関連解析では、 $P = 1.58 \times 10^{-4}$ の関連を示した。さらに tag-SNP を用いた解析では、tag-SNP 14 で、 $P = 5.7 \times 10^{-8}$ の非常に強い関連を認めた (PD 1362 人・対照 1911 人)。MS7010・tag-SNP 14 周辺は、3 個の遺伝子を含む約 120 kb の領域が、連鎖不平衡を保っており、この領域を PDSR 1 (PD Susceptibility Region 1) と名付け、ゲノムワイド関連解析の基準を満たす、極めて強い PD 感受性領域と考えた。

(A) 日本人集団における、パーキンソン病 (PD) と *Fibroblast growth factor 20 (FGF20)* の関連

A. 研究目的

孤発性パーキンソン病 (PD) は、双生児研究や大規模疫学研究から、複数の遺伝要因と環境要因が絡み合って発症に至る多因子疾患であると考えられ、PD の感受性遺伝子の探索が盛んに行われている。

アメリカ人の多発小家系を用いたノンパラメトリック連鎖解析により、染色体 8p に、PD との連鎖 (LOD 2.2) が報告された¹⁾。同領域に位置する *Fibroblast growth factor 20 (FGF20)* は、黒質で発現する神経栄養因

子で、ドパミン神経細胞の生存に関与していることが報告されており、機能的な候補遺伝子として注目された。アメリカ人集団の 644 小家系を用いた pedigree disequilibrium 解析により、*FGF20* 内の一塩基多型 (SNP) と PD 発症に強い関連があることが示唆された²⁾。一方で、フィンランド人、ギリシャ人での、case-control 関連解析では、小集団ながら、関連は見出されなかった³⁾。我々は、日本人の大集団を用いた、case-control 関連解析を行い、PD 発症と

*FGF20*の関連を検証した。

B. 研究方法

日本人のPD患者1388人(年齢65.7±9.8; 男/女0.84), 対照1891人(年齢48.5歳±17.6; 男/女1.08)の血液から抽出したゲノムDNAを用いた。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・遺伝子解析に関する倫理指針(平成17年6月29日一部改正)」を遵守し, 文書によるインフォームドコンセントを得た。なお, 本研究は大阪大学倫理委員会の承認を得ている。

*FGF20*領域の5つのSNP(rs12718379, rs1989756, rs1989754, rs1721100, rs12720208)を, TaqMan法で遺伝子型判定した。統計解析には, SNPALYZEソフトウェア(Dynacom)を用いた。Hardy-Weinberg平衡は, χ^2 検定にて評価した。case-control関連解析の統計的有意水準は, χ^2 検定にて評価し, Odds Ratioと95% confidence intervals(CI)は, Bootstrap法にて計算した。連鎖不平衡(LD)は, D' と r^2 値を用いて評価した。ハプロタイプ解析は, expectation-maximizationアルゴリズムを使用し, 10,000回の反復によるpermutation法にて, 有意差を検定した。

図1 SNPの遺伝子上の位置



C. 研究結果

5 SNPのうち, 2つ(rs1989756とrs12720208)では, 日本人では多型を認めず, 以後の解析から除外した。3 SNP(rs1989754, rs1721100, rs12720208)は, 国際HapMap計画のデータベースに含まれていた。rs12720208は, HapMapのJPT(Japanese in Tokyo)検体でも, 多型が検出されなかった。HapMapデータ

ベースの情報を, Taggerソフトウェアを用いて解析したところ, rs1989754とrs1721100は, HapMapに用いた*FGF20*領域のマイナーアレル頻度が0.1以上のSNPを, $r^2 > 0.8$ で代表したため, 2つのtag SNP(rs1989754とrs1721100)とrs12718379は, *FGF20*とPDの関連を評価するのに適切であると判断した。

rs1721100は, アレル1対2(アレル1頻度; 患者43%/対照46%, $P = 0.0089$, Odds Ratio 1.14 (95% CI 1.03-1.26)), 遺伝子型11+12対22($P = 0.0053$, Odds Ratio 1.24 (95% CI 1.06-1.43))において有意であった(図1・表1)。この関連は, Bonferroni補正後も維持された($P < 0.05/3$)。

3 SNPのLD解析を行ったところ, 3 SNPは単一のLDブロック($D' > 0.8$)に存在していたため, ハプロタイプ関連解析を行った。2つのハプロタイプの頻度が, 集団のハプロタイプの90%以上を占めていた。ハプロタイプ2(A-G-C)が, 患者群で対照群より有意に少なく(患者38%, 対照41%, permutation- $P = 0.075$), ハプロタイプ2が, PD発症に対して保護的なハプロタイプであることが示唆された(表2)。

D. 考察・E. 結論

我々およびvan der Waltらの結果に反して, Clarimon Jらによる, ギリシャ人(患者151人, 対照186人), フィンランド人(患者144人, 対照135人)を用いた関連解析では, *FGF20*とPDの関連は見出されなかった。しかし, 彼らのサンプルサイズは, 我々と比べて非常に小さく, 統計学的に, 80%の検出力しで検出できるのは, Odds Ratio 1.6以上の非常に強い関連のみである。*FGF20*のOdds Ratioは1.2程度であるので, 彼らの解析では検出できる可能性は低い(偽陰性)と考えられる。

我々の結果は, van der Waltらの結果とあわせ, 異なる2人種で, *FGF20*がPDの感受性遺伝子であることを示唆した。

表1 FGF20 遺伝子領域の 3 SNP の関連解析結果

| SNP ID | Alleles | | Genotype | | | | | | | | Allele 1 versus Allele 2 | | Genotype 11 versus 12+22 | | Genotype 11+12 versus 22 | | | |
|------------|---------|---------|----------|-----|-----|-------|-------------------|-----|-----|-----|--------------------------|---------|--------------------------|---------|--------------------------|---------|------------------|-------------------|
| | 1_2 | Strand | Patient | | | | Control | | | | Odds ratio (95% CI) | P-value | Odds ratio (95% CI) | P-value | Odds ratio (95% CI) | P-value | | |
| | | | 1/1 | 1/2 | 2/2 | Total | Freq. of allele 1 | 1/1 | 1/2 | 2/2 | | | | | | | Total | Freq. of allele 1 |
| rs12718379 | A_G | Reverse | 249 | 641 | 481 | 1371 | 0.42 | 375 | 902 | 597 | 1874 | 0.44 | 1.11 (1.01-1.23) | 0.041 | 1.13 (0.95-1.34) | 0.19 | 1.16 (1.00-1.34) | 0.054 |
| rs1989754 | G_C | Forward | 261 | 628 | 477 | 1366 | 0.42 | 381 | 895 | 586 | 1862 | 0.44 | 1.10 (1.00-1.22) | 0.055 | 1.09 (0.92-1.28) | 0.34 | 1.17 (1.01-1.35) | 0.040 |
| rs1721100 | C_G | Forward | 270 | 639 | 458 | 1367 | 0.43 | 407 | 925 | 542 | 1874 | 0.46 | 1.14 (1.03-1.26) | 0.0089 | 1.13 (0.94-1.36) | 0.17 | 1.24 (1.06-1.43) | 0.0053 |

^a relative to the transcriptional direction. CI, confidence intervals.

表2 連鎖不平衡解析 (D' , r^2)

| SNP ID | rs12718379 | rs1989754 | rs1721100 |
|------------|------------|-----------|-----------|
| rs12718379 | - | 0.94 | 0.68 |
| rs1989754 | 0.98 | - | 0.72 |
| rs1721100 | 0.86 | 0.88 | - |

表3 ハプロタイプ解析

| Haplotype ID | Base at SNP | | | Haplotype frequency | | P-value |
|--------------|-------------|-----------|-----------|---------------------|---------|---------|
| | rs12718379 | rs1989754 | rs1721100 | Patient | Control | |
| Haplotype 1 | G | C | G | 0.53 | 0.50 | 0.054 |
| Haplotype 2 | A | G | C | 0.38 | 0.41 | 0.0075 |
| Haplotype 3 | G | C | C | 0.045 | 0.047 | 0.75 |
| Haplotype 4 | A | G | G | 0.035 | 0.028 | 0.11 |

(B) 27,158 個のマイクロサテライトマーカーによる、パーキンソン病 (PD) の新規感受性遺伝子の同定

A. 研究目的

全く新規のパーキンソン病 (PD) 感受性遺伝子を同定する。

B. 研究方法

pooled DNA 法を用い、27,158 個のマイクロサテライト (MS) マーカーを利用した 3 段階 (1-3 次) のゲノムワイド関連解析を行った。

1 次スクリーニング (Sc) 用として患者対照各 124 人、2 次 Sc 用として各 250 人、3 次 Sc 用として各 250 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。

1 次 Sc 用 pooled DNA を鋳型とし、平均 100 kb 間隔で分布する 27,158 個の MS プライマーを用いて、PCR 反応を行った。PCR 産物を、ABI 3730xL シークエンサーで泳動後、GeneScan, pickpeak ソフトウェアで解析し、患者対照間で統計学的検討を行ったところ、6,803 個のマーカーで $P < 0.2$ の関連を認めた。2 次 Sc として、この 6,803 個のマーカーを 2 次 Sc 用 pooled DNA を用いて、同様に関連解析を行ったところ、 $P < 0.05$ の関連を示すマーカーを 2,041 個認めた。さらに 3 次 Sc として、2,041 個のマーカーに関して、3 次 Sc 用 pooled DNA を用いて、関連解析を行い、 $P < 0.05$ の関連を示す MS マーカーを 280 個に絞り込んだ。

これら MS マーカーは、pooled DNA 法による偽陽性

を含むため、通常の個別検体タイピングによる関連の検証が必要である。患者 865 検体、対照 857 検体を用いた個別検体タイピングによる関連解析を行い、 $P < 0.001$ の関連を示す MS マーカーを 7 個同定した ($P < 0.0001$ 1 個, $P < 0.0016$ 6 個, $P < 0.0117$ 7 個)。

このうちの 1 つである MS7010 は、患者 865 人、対照 857 人を用いた関連解析では、 $P = 1.58 \times 10^{-1}$ の関連を示した。国際 HapMap 計画 (Phase II (JPT)) の遺伝子型判定データを利用し、haploview ソフトウェアを用いて、MS7010 周辺の連鎖不平衡解析を行った。MS7010 周辺は、3 個の遺伝子を含む約 120 kb の領域が、連鎖不平衡を保っていると考えられ、この領域を PDSR1 (PD Susceptibility Region 1) と名付けた。PDSR1 内に、HapMap Phase II (JPT) データをもとに、tag SNP ($r^2 > 0.8$, $MAF > 0.2$) を 19 個選択し、患者 824 検体、対照 924 検体の関連解析を行った。tag SNP 11, 14, 17 で、 $P < 0.01$ の関連を示し、tag SNP 14 で最も有意な関連 ($P = 6.4 \times 10^{-5}$) を認めた。さらに、tag SNP 11, 14, 17 に関して、患者 521 人、対照 987 人を追加して関連解析を行ったところ、同傾向の有意な関連を認め、全検体をあわせた解析では、tag SNP 14 で $P = 5.7 \times 10^{-8}$ の非常に強い関連を認めた。

D. 考察

E. 結論

PDSR1 と PD の関連は、極めて厳しいゲノムワイド関連解析の有意水準とされる $P < 10^{-7}$ を満たすものであり、PD では、 α -synuclein 遺伝子以外に報告がな

い。PDSR1 領域内に位置する 3 つの遺伝子のいずれかが、PD の発症に関与していると考えられた。

図1 PD発症と強い関連 ($P=5.7 \times 10^{-8}$) を示す領域を同定

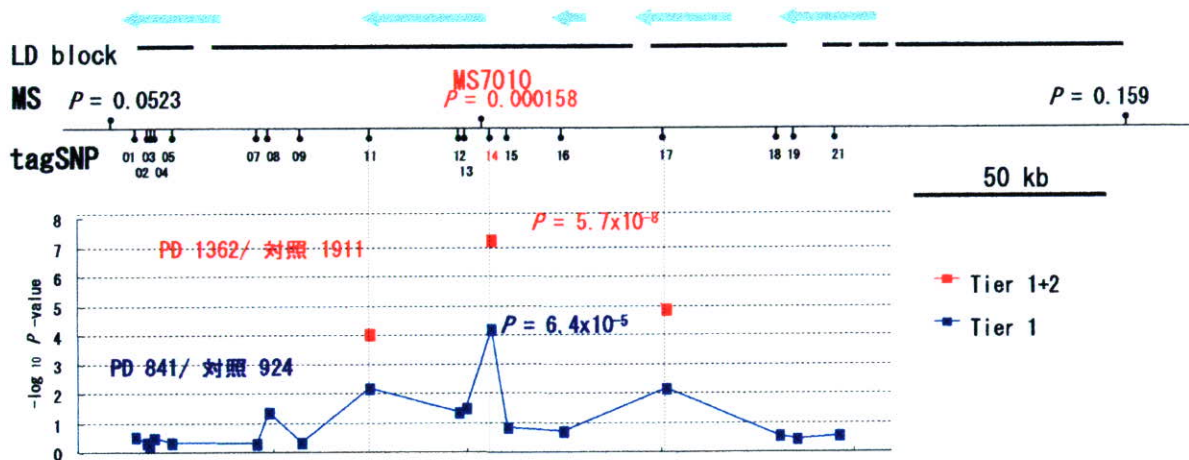


表4 tag SNP 14の関連解析結果

| | Genotype | | | | | | | | | | P-value | | |
|---------------------------|----------|-----|-----|-------|-------------------|---------|-----|-----|-------|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Patient | | | | | Control | | | | | Allele 1 Versus 2 | Genotype 11 versus 12+22 | Genotype 11+12 versus 22 |
| | 1/1 | 1/2 | 2/2 | Total | Freq. of allele 1 | 1/1 | 1/2 | 2/2 | Total | Freq. of allele 1 | | | |
| Tier 1 (PD 841人・対照 924人) | 256 | 409 | 145 | 810 | 0.569 | 211 | 467 | 211 | 889 | 0.5 | 0.000064 | 0.00028 | 0.0032 |
| Tier 2 (PD 521人・対照 987人) | 172 | 238 | 95 | 505 | 0.576 | 261 | 453 | 252 | 966 | 0.505 | 0.00022 | 0.0049 | 0.0018 |
| Total (PD 1362人・対照 1911人) | 428 | 647 | 240 | 1315 | 0.571 | 472 | 920 | 463 | 1855 | 0.502 | 0.00000057 | 0.000012 | 0.0000075 |

F. 文献

- 1) Scott WK et al, JAMA, 286, 2239-2244, 2001
- 2) Van der Walt JM et al, Am J Hum Genet, 74, 1121-1127, 2004
- 3) Clarimon J et al, BMC Neurol, 5, 11, 2005

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satake W et al, Fibroblast growth factor 20 gene and Parkinson's disease in the Japanese population; NeuroReport 11, 937-940, 2007
- 2) Mizuta I et al, Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease; Hum Mol Genet 15, 1151-1158, 2006.

2. 学会発表

- 1) 日本人類遺伝学会第52回大会
- 2) The American Society of Human Genetics 57th Annual Meeting
- 3) 11th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders

I. 知的所有権の取得状況

なし

多数の候補遺伝子上の SNP を用いた関連解析による パーキンソン病感受性遺伝子 *calbindin1* の同定および α -*synuclein*, *FGF20* との統計学的相互作用解析

戸田達史¹⁾、水田依久子¹⁾、佐竹渉¹⁾、角田達彦²⁾、渡邊雅彦³⁾、武田篤⁴⁾、
長谷川一子⁵⁾、中島健二⁶⁾、山本光利⁷⁾、服部信孝⁸⁾、村田美穂⁹⁾

- 1) 大阪大学院臨床遺伝、2) 理研遺伝子多型解析センター、3) 筑波大学神経内科
4) 東北大学神経内科、5) 国立病院機構相模原病院神経内科、6) 鳥取大学脳神経内科
7) 香川県立中央病院神経内科、8) 順天堂大学脳神経内科、
9) 国立精神・神経センター武蔵病院神経内科

研究要旨

孤発性パーキンソン病(PD)の発症には、複数の遺伝子および環境因子が関与すると考えられている。我々はこれまでに 121 個の候補遺伝子上の 268 個の SNPs を用いた大規模な関連解析により、 α -*synuclein* を確実なパーキンソン病(PD)感受性遺伝子として同定し、報告した。また、白人で PD との関連が報告されていた *FGF20* の日本人での再現性も確認した(別演題)。今回、さらに候補遺伝子を増やして新たな PD 遺伝子 *calbindin1* を同定した ($P = 7.1 \times 10^{-5}$, オッズ比 1.34)。さらに、 α -*synuclein* ($P = 5.1 \times 10^{-14}$, オッズ比 2.23), *calbindin1*, *FGF20* ($P = 0.0053$, オッズ比 1.24)のうち、最も強く PD と関連する α -*synuclein* を中心にして、これらの遺伝子の組み合わせ解析を行った。*calbindin1* は α -*synuclein* のリスクを持たない群で PD と強く相関し(オッズ比 1.70)、逆に *FGF20* は α -*synuclein* のリスクアレルを持つ群で PD とより強く関連した(オッズ比 1.76)。以上のことから、*calbindin1* は α -*synuclein* とは独立に、一方、*FGF20* は α -*synuclein* と相乗的に、PD 発症に関与していることが示唆される。

A.研究目的

孤発性パーキンソン病 (PD) 感受性遺伝子を同定し、既に報告した α -*synuclein*¹⁾, *FGF20*²⁾ とともに統計学的相互作用を解析する。

B.研究方法

遺伝子型タイピングは患者 1403 人、対照 1938 人を対象に TaqMan 法で行った。以前の候補遺伝子関連解析に 34SNPs を追加した。統計解析

には SNPalyze, 及び R を用いた。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・厚労省・経産省告示第 1 号、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 17 年 6 月 29 日一部改正)」を遵守し、文書によるインフォームドコンセントを得た。なお、本研究は大阪大学倫理委員会の承認を得ている。

C.研究結果

合計 137 個の候補遺伝子上の 302 個の SNPs の関連解析、および連鎖不平衡解析 (図 1) により、*α-synuclein* に続く第 2 の PD 遺伝子として、*calbindin1* を同定した ($P = 7.1 \times 10^{-5}$, オッズ比 1.34)。さらに、*α-synuclein* ($P = 5.1 \times 10^{-14}$, オッズ比 2.23), *calbindin1*, *FGF20* ($P = 0.0053$, オッズ比 1.24)のうち、最も強く PD と関連する *α-synuclein* を中心にして、これらの遺伝子の組み合わせ解析を行った。*α-synuclein* のリスクアレルを 2 つ持つ群では *calbindin1* と PD との関連の有意差は見られなくなったが、*FGF20* と PD との関連はより強くなった ($P = 5.9 \times 10^{-6}$, オッズ比 1.76)。これに対して、*α-synuclein* のリスクアレルを持たない群では、*calbindin1* と PD との関連はより強くなり(オッズ比 1.70), *FGF20* と PD との関連は有意差が無くなった (図 2)。ステップワイズロジスティック回帰解析では、*α-synuclein*, *FGF20* の相互作用の項は有意であったが、*α-synuclein*, *calbindin1* の相互作用の項は有意ではなかった。

D.考察

今回同定した新規の PD 感受性遺伝子 *calbindin1* はカルシウム結合蛋白をコードしている。PD 患者の黒質で *calbindin1* 陰性神経の脱落が陽性神経の脱落よりも強いことから、この蛋白は神経保護作用を持つと考えられている^{3) 4)}。統計学的には、*calbindin1* と *α-synuclein*、*FGF20* と *α-synuclein* との間に興味深い関係が見られた。生物学的にこれらの蛋白の相互作用を示した例は数少なく⁵⁾、統計学的に得られた結果とどう対応づけて考えるかは、今後の課題である。

E.結論

多数の候補遺伝子アプローチにより、新規の PD 感受性遺伝子 *calbindin1* を同定した。統計学的組み合わせ解析から、*calbindin1* は *α-synuclein* とは独立に、一方、*FGF20* は *α-synuclein* と相

乗的に、PD 発症に関与していることが示唆される。

F.文献

- 1) Mizuta I et al., Hum Mol Genet 15:1151-1158, 2006.
- 2) Satake W et al., Neuroreport 18:9317-940, 2007.
- 3) Yamada T et al., Brain Res 526:303-307, 1990.
- 4) Damier P et al., Brain 122:1437-1448, 1999.
- 5) Murase S et al., J Neurosci 26:9750-9760, 2006.

G.健康危険情報

無し

H.研究発表

1.論文発表

- Mizuta I et al., Hum Mol Genet 15:1151-1158, 2006.
Satake W et al., Neuroreport 18:9317-940, 2007.

2.学会発表

- 日本人類遺伝学会第 5 2 回大会
The American Society of Human Genetics 57th
Annual Meeting
11th International Congress of Parkinson's
Disease and Movement Disorders

I.知的所有権の取得状況

- 1.特許取得 無し
- 2.実用新案登録 無し
- 3.その他 無し

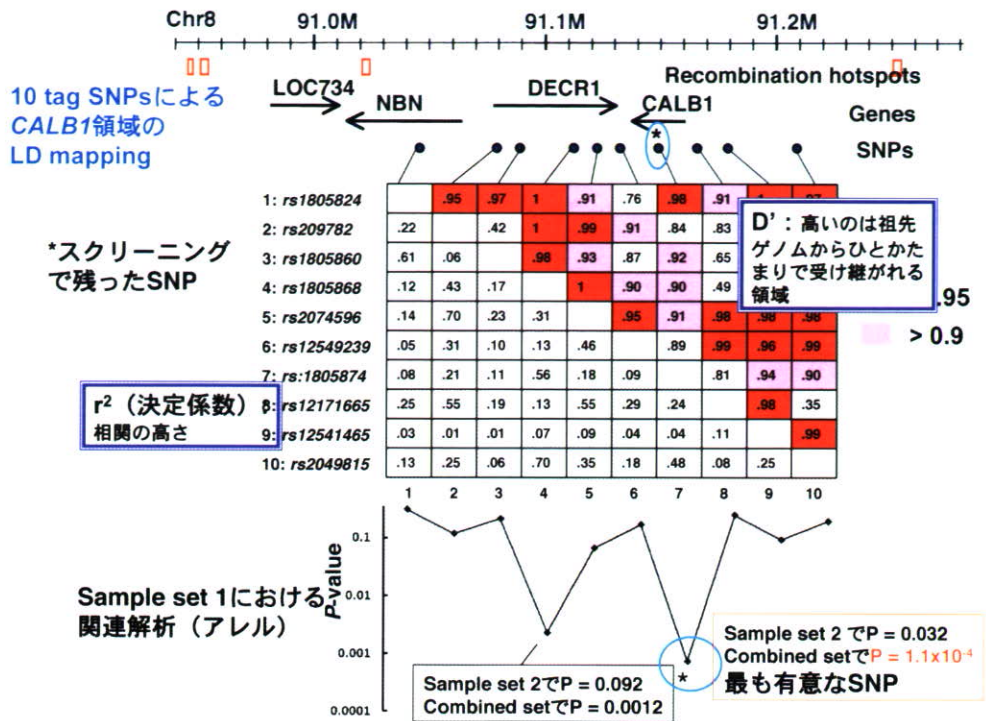


図1 CALB1の連鎖不平衡解

SNCAで階層化したCALB1, FGF20のカイ二乗解析

CALB1: SNCAのリスクが少ない場合に強く関連する

| | Case | Control | | OR (95% CI) | p | |
|--------------|------|---------|-----|-------------|-----|---------------------------------------|
| CALB1 | | | | | | |
| | AA | AC+CC | AA | AC+CC | | |
| SNCA | CC | 381 | 205 | 381 | 227 | 1.11 (0.87-1.40) 0.4 |
| | CT | 393 | 203 | 531 | 386 | 1.41 (1.14-1.74) 0.0017 |
| | TT | 102 | 44 | 201 | 147 | 1.70 (1.12-2.56) 0.012 |
| FGF20 | | | | | | |
| | GG | GC+CC | GG | GC+CC | | |
| SNCA | CC | 225 | 360 | 159 | 448 | 1.76 (1.38-2.25) 5.9x10 ⁻⁶ |
| | CT | 178 | 429 | 281 | 629 | 0.93 (0.74-1.16) 0.52 |
| | TT | 51 | 98 | 96 | 247 | 1.34 (0.89-2.02) 0.16 |

リスクアレル: C (SNCA), A (CALB1), G (FGF20)

FGF20: SNCAのリスクが強い場合にのみ、より強く関連する (相乗効果)

図2 SNCA, CALB1, FGF20 の統計学的組み合わせ解析

プレセニン1 遺伝子変異による難溶性 α シヌクレイン蓄積 の分子機序の検討

高野弘基¹⁾，池内 健²⁾，金子博之^{1,2)}，柿田明美^{2,3)}，石川 厚⁴⁾，
高橋 均³⁾，小野寺理²⁾，西澤正豊¹⁾

¹⁾新潟大学脳研究所神経内科，²⁾同 生命科学リソース研究センター，³⁾同 病理学，
⁴⁾阿賀野病院神経内科

研究要旨

家族性アルツハイマー病関連プレセニン1 遺伝子変異を有する患者脳には、 α シヌクレインの蓄積が高率に合併することが知られている。我々は、病理学的にびまん性のレビー小体の蓄積と cotton-wool 型のアミロイド斑を認めた家族性症例に、PS1 遺伝子変異： Δ T440 を見いだした。本研究は、PS1 変異 Δ T440 が α シヌクレイン蓄積をおこす分子機序を明らかにすることを目的に、患者剖検脳および神経系神経培養細胞の難溶性分画における α シヌクレインの動態について生化学的に解析した。その結果、剖検脳・サルコシル不溶化 urea 可溶性分画において、 α シヌクレインが患者剖検脳において過剰に蓄積しており、その蓄積した α シヌクレインは高度にリン酸化されていた。また培養細胞に PS1 Δ T440 を安定発現させた細胞株では、野生型と比べ難溶性分画（2%SDS）におけるリン酸化 α シヌクレインが上昇していた。以上より、PS1 Δ T440 変異体の発現により、難溶性 α シヌクレイン蓄積が生じることが示唆された。

A.研究目的

家族性アルツハイマー病関連プレセニン1 (PS1) 遺伝子変異を伴う患者脳には、 α シヌクレインの蓄積が高率に認められる¹⁾。我々は、病理学的にびまん性のレビー小体の蓄積と cotton-wool 型のアミロイド斑を認めた家族性症例において、PS1 遺伝子の440番目の1アミノ酸欠失(Δ T440)を同定した²⁾。本研究では、PS1 変異 Δ T440 の発現と α シヌクレイン蓄積の関連性を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

患者凍結剖検脳より異なる界面活性剤を用い、Tris 分画、1% Triton X-100 分画、1% Sarkosyl 分

画、8M urea 分画として各分画を順次回収した。また神経系(Neuro2a) およびグリア系 (C6) 培養細胞に PS1 野生型および変異体を安定発現させ、Tris 分画と 2%SDS 分画にわけ回収した。各々の分画における α シヌクレイン (Synuclein-1, LB509) およびそのリン酸化フォーム (pSyn#64) を特異抗体により解析した^{3,4)}。

C.研究結果

PS1 変異 Δ T440 を有する患者脳と脳疾患を有さないコントロール脳の Tris 分画および Triton X-100 分画では α シヌクレインの発現レベルは差異を認めなかった。しかしながら、PS1 変異 Δ T440 を有する患者脳においては、sarkosyl 不溶性 urea 可溶性分画

において α シヌクレインの過剰蓄積を認め、その蓄積した α シヌクレインは高度にリン酸化されていた。

培養細胞の解析では、N2a 細胞および C6 細胞とも、Tris 分画では PS1 Δ T440 変異発現細胞と野生型発現細胞における α シヌクレインのタンパクレベルに違いはなかった。一方、2% SDS 分画においては、PS1 Δ T440 変異発現細胞では α シヌクレイン蓄積の上昇を認め、特にリン酸化 α シヌクレインは野生型と比較して有意に増加していた。

更に培養細胞における β -amyloid ($A\beta$)産生を検討したところ、PS1 Δ T440 変異発現細胞においては、 $A\beta$ 42/40 産生比率が野生型と比較して約 9 倍と著明に増加していた。

D. 考察

α シヌクレインは Lewy 小体を構成する主要分子であり、特に不溶性分画に蓄積する高度にリン酸化された α シヌクレインが病態機序に重要な役割を果たすことが明らかにされてきている^{3,5)}。 α シヌクレインの主要なリン酸化部位は 129 番目のセリンとされている³⁾。このリン酸化に関与するキナーゼ候補としては、casein kinase I および II、また G タンパク共役型受容体キナーゼなどが知られている^{6,7)}。これらのキナーゼ活性と PS1 分子との相互作用については未だ明らかでない。一方、ある種の PS1 変異は GSK3 活性を増加させると報告されており⁸⁾、PS1 Δ T440 変異においても同様の効果があるかについては興味あるところである。

α シヌクレインと $A\beta$ の関連についてはいくつかの知見が知られている。例えば、 α シヌクレインとアミロイド前駆体タンパク (APP) を共発現させたトランスジェニックマウスでは、 α シヌクレイン単独発現の個体よりも、 α シヌクレイン陽性封入体の増加が示されている⁹⁾。PS1 Δ T440 変異発現細胞では、特に $A\beta$ 42/40 産生比率が著しく上昇しており、この病的効果は何らかの細胞ストレスを生じ α シヌクレイン蓄積を増強させた可能性も考えられる¹⁰⁾。

詳細なメカニズムは不明なところもあるが、本研究により、PS1 Δ T440 変異により $A\beta$ 42/40 産生比

率の上昇とリン酸化 α シヌクレインの蓄積が明らかとなり、 α シヌクレインの蓄積機序の解明が進むことが期待される。

E. 結論

PS1 変異体 Δ T440 の発現により、培養細胞および剖検脳の難溶性分画のリン酸化 α シヌクレイン蓄積が生じる。

F. 文献

- 1) Leverenz AJ, et al. Arch Neurol 63:370-376, 2006
- 2) Ishikawa A, et al. Ann Neurol 57:429-434, 2005
- 3) Fujiwara H, et al. Nat Cell Biol 4:160-164, 2002
- 4) Ikeuchi T, et al. Arch Neurol (in press)
- 5) Anderson JP, et al. J Biol Chem 281:29739-29752, 2006
- 6) Okochi M, et al. J Biol Chem 275:390-397, 2000
- 7) Arawaka S, et al. J Neurosci 26:9227-9238, 2006
- 8) Takashima A, et al. Proc Natl Acad Sci USA 95:9637-9641, 1998
- 9) Masliah E, et al. Proc Natl Acad Sci USA 98:12245-12250, 2001
- 10) Kaneko H, et al. J Neurosci 28:13092-13097, 2007

G. 健康危険情報：該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

Kaneko H, Kakita A, Kasuga K, Nozaki H, Ishikawa A, Miyashita A, Kuwano R, Ito G, Iwatsubo T, Takahashi H, Nishizawa M, Onodera O, Sisodia SS, Ikeuchi T.

Enhanced accumulation of phosphorylated α -synuclein and elevated $A\beta$ 42/40 ratio caused by expression of the presenilin-1 Δ T440 mutant associated with familial Lewy body disease and variant Alzheimer disease.

Journal of Neuroscience 28:13092-13097, 2007

Ikeuchi T, Kakita A, Shiga A, Kasuga K, Kaneko H, Tan C-F, Idezuka J, Wakabayashi K, Onodera O, Iwatsubo T, Nishizawa M, Takahashi H, Ishikawa A. Homozygous and heterozygous patients for *SNCA* duplication in family with parkinsonism and dementia. *Archives of Neurology* (in press)

2.学会発表

Kaneko H, Kakita A, Ishikawa A, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Sisodia SS, Ikeuchi T. A Presenilin-1 Mutant, $\Delta T440$, Enhances Accumulation of Phosphorylated α -Synuclein in Culture Cells and Autopsied Brain. 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2007.11.6

I.知的所有権の取得状況：該当なし

α -synuclein 分解酵素 neurosin 及び髄液中 α -synuclein oligomer の検討

徳田隆彦¹⁾、笠井高士¹⁾、水野敏樹¹⁾、山口希²⁾、渡邊義久²⁾、亀谷富由樹³⁾、Omar MA El-Agnaf⁴⁾、中川正法¹⁾

¹⁾京都府立医科大学大学院医学研究科神経内科学、²⁾京都府立医科大学細胞生物学、

³⁾東京都精神医学総合研究所分子神経生物学、⁴⁾ Dept. of Biochemistry, United Arab Emirates University

研究趣旨

α -synuclein の異常凝集および蓄積がパーキンソン病の発症機序においてきわめて重要な病的過程であることが明らかになっている。今回我々は 1) 前年度に引き続いて α -synuclein 分解酵素である neurosin について検討を行い、リン酸化 α -synuclein は非リン酸化 α -synuclein よりも neurosin の分解活性に対して抵抗性であることを報告した。2) またヒト髄液中の α -synuclein oligomer を測定できる ELISA 系を開発し、パーキンソン病患者群、他の神経変性疾患患者群及び対照患者群とで髄液中 α -synuclein oligomer を定量して比較検討した。パーキンソン病患者群では、対照患者群と比較して、髄液中で α -synuclein oligomer が有意に増加していた。

A. 研究目的

近年の生化学的及び分子遺伝学的研究によって、 α -synuclein が Lewy 小体の主たる構成成分であること(1)、および α -synuclein 遺伝子の点突然変異は家族性パーキンソン病の原因になることが明らかにされている(2-4)。これらの事実は、 α -synuclein がパーキンソン病の発症機序において重要な分子であることを示している。また最近、 α -synuclein 遺伝子の triplication の家系では早期発症で重症のパーキンソン症状を呈すること(5)、一方 α -synuclein 遺伝子の duplication の家系は高齢発症で特発性パーキンソン病に類似した臨床症状を呈すること(6,7)が明らかにされている。このことは、正常の α -synuclein でも過剰に発現するとパーキンソン病の原因になり、また α -synuclein の発現量が遺伝性パーキンソン病家系の患者における臨床的な重症度を決定することを示唆している。一方で、パーキンソン病患者の大部分を占める孤発性

パーキンソン病患者では α -synuclein の過剰産生は報告されておらず、その発症には α -synuclein の産生と分解の imbalance が関与していると考えられる。

我々は前述のような生体内での α -synuclein の量的変化とパーキンソン病の発症との関連に注目し、従来から本研究班において、ヒトの髄液中での α -synuclein の定量および α -synuclein の分解系の候補となるセリンプロテアーゼである neurosin について報告してきた(8)。

今年度は我々は、以下の2項目について検討した。1) 前年度に引き続いて、neurosin の α -synuclein 分解活性を検討した。特にレビー小体中に沈着している α -synuclein の殆どがリン酸化を受けていることから(9)、リン酸化及び非リン酸化 α -synuclein の neurosin による分解の相違を検討した。また、2) 近年、パーキンソン病の発症においては、アルツハイマー病などの異常凝集蛋白質

によって発症するその他の神経変性疾患と同様に、 α -synuclein の monomer あるいは線維化した α -synuclein よりも α -synuclein oligomer が神経細胞毒性を発現することが報告されている(10)。我々は、ヒト髄液中の α -synuclein oligomer を特異的に測定できる画期的な enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)系を開発した。この新規に開発した ELISA 系を用いて、パーキンソン病患者、他の神経変性疾患患者及び対照患者で髄液中 α -synuclein oligomer の定量を行い、その定量がパーキンソン病の臨床診断に有用であるか否かを検討した。

B.研究方法

1) neurosin によるリン酸化および非リン酸化 α -synuclein の分解

α -synuclein ペプチド(rPeptide)1.6mg を 20mM tris-HCl, 50mM KCl, 10mM MgCl₂, pH7.5 buffer 内で casein kinase 2 (CK2, New England Biolabs, USA) 2,500U および 2mM ATP(Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, USA)でリン酸化して、MonoQ PC 1.6/5 column を装着した HPLC システム(SMART system)で精製した。得られたリン酸化 α -synuclein (250 μ g/ml)と非リン酸化 α -synuclein (250 μ g/ml)を neurosin(5 μ g/ml)と co-incubate(37 $^{\circ}$ C, 24h)して、分解されて得られた α -synuclein の断片ペプチドを tris-tricine SDS-PAGE で分析し、CBB 染色で得られた全長 α -synuclein のバンドを densitometry で定量し、両者を比較した。

2) ヒト髄液中の α -synuclein oligomer の定量

孤発性の特発性パーキンソン病(PD)患者 25 名、アルツハイマー病(AD)患者 35 名、進行性核上性麻痺(PSP)患者 18 名および脳病変を有さない対照患

者 43 名を対象として、今回我々が新たに開発した α -synuclein oligomer を特異的に定量する ELISA 系を用いて対象者の髄液中 α -synuclein oligomer を定量して比較した。我々が用いた ELISA 系は、ヒト α -synuclein の 121-125 残基を抗原とする抗ヒト α -synuclein モノクローナル抗体 (C211, Santa Cruz Biotech.) を capture antibody に、またこの同じ抗体をビオチン化したモノクローナル抗体を reporter antibody に用いており、この ELISA 系は α -synuclein oligomer を特異的に検出することを確認している(11)。

(倫理面への配慮)

対象とした患者全員からは京都府立医科大学倫理委員会で承認された方法により informed consent を得た上で、髄液を今回の研究に使用した。

C.研究結果

1) neurosin によるリン酸化および非リン酸化 α -synuclein の分解

CK2 でリン酸化した α -synuclein を HPLC で精製して得られたリン酸化 α -synuclein は、レビー小体中に存在する α -synuclein のリン酸化部位である Ser129 がリン酸化された α -synuclein に対する特異的なモノクローナル抗体(pSyn#64, Wako Chemicals USA, Richmond, VA)によって、Ser129-リン酸化 α -synuclein であることを確認した。

neurosin と co-incubate した場合に、非リン酸化 α -synuclein と比較して、リン酸化 α -synuclein は neurosin による酵素的分解に有意に抵抗性が高かった(Mann-Whitney U-test, $P < 0.01$ at 24-hr incubation, $P < 0.001$ at 48, 72, and 96-hr incubations)。リン酸化 α -synuclein を neurosin で分解することによって生成された α -synuclein

fragment は、非リン酸化 α -synuclein の neurosin 分解による fragment と同様の fragment から構成されていた。

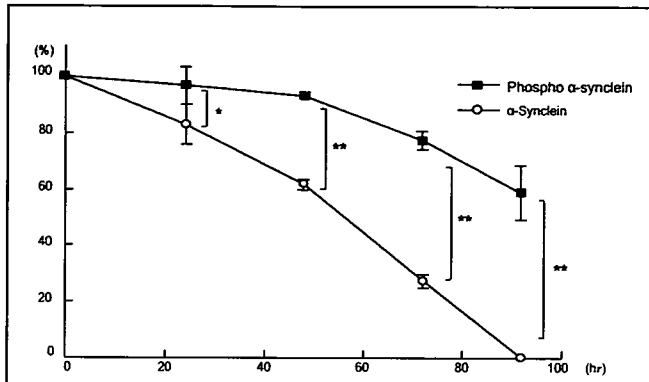


図 1. Neurosin によるリン酸化および非リン酸化 α -synuclein 分解活性の比較 (n=3)
リン酸化 α -synuclein は、非リン酸化 α -synuclein よりも neurosin による分解に抵抗性であった。

2) ヒト髄液中の α -synuclein oligomer の定量

我々が新たに開発した α -synuclein oligomer を定量することが可能な ELISA 系を用いた今回の検討では、PD 患者(n=25)においては、AD 患者(p<0.001,

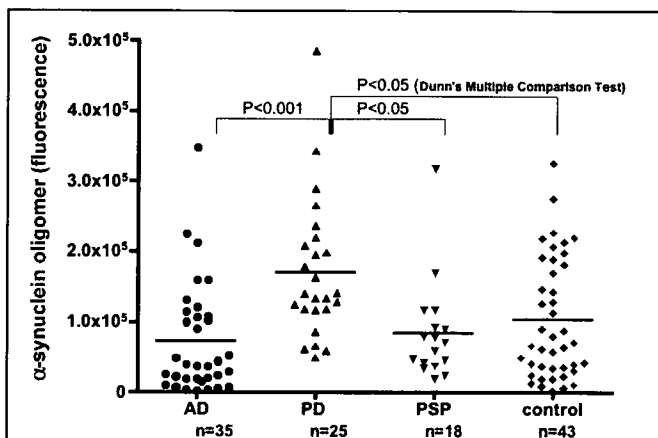


図 2. 髄液中 α -synuclein oligomer の定量
PD 患者では、AD 患者、PSP 患者および対照患者と比較して、 α -synuclein oligomer が有意に増加していた。

Dunn's multiple comparison test, n=35)、PSP 患者 (p<0.05, n=18)および対照患者(p<0.05, n=43)のいずれと比較しても、髄液中の α -synuclein oligomer が有意に増加していた。

D. 考察

1) neurosin によるリン酸化および非リン酸化 α -synuclein の分解

Ser129-リン酸化 α -synuclein は非リン酸化 α -synuclein よりも neurosin による分解に抵抗性を示した。このことは、レビー小体中に存在する α -synuclein の殆どがリン酸化されていることから、細胞内でリン酸化された α -synuclein は、その分解系酵素に対して抵抗性を獲得することによってより凝集・沈着しやすくなる可能性があることを示唆している。また、パーキンソン病の病態と関連する α -synuclein のリン酸化が neurosin による α -synuclein 分解活性に影響を与えることは、neurosin がパーキンソン病の発症機序に関与することを支持する知見であると考えられる。

2) ヒト髄液中の α -synuclein oligomer の定量

パーキンソン病患者群で、他の神経変性疾患患者および対照患者と比較して、髄液中の α -synuclein oligomer が増加していたことは、髄液中の α -synuclein oligomer 濃度はパーキンソン病の新たな診断マーカーとして利用できる可能性を示唆している。また平成 17 年度に我々が報告した髄液中の total α -synuclein を定量する ELISA 系を用いた測定では、対照患者と比較して、パーキンソン病患者群では髄液中の total α -synuclein 濃度が低下していた、従って今回の検討とあわせて、髄液中の α -synuclein oligomer/ total α -synuclein 比をとることによって、パーキンソン病患者を対照

群からより明確に分離できると考えられる。今後の検討として、多施設の共同研究によってより大規模な症例数でのヒト髄液中の α -synuclein oligomer および total α -synuclein 濃度の検討が必要である。

E. 結論

- 1) Ser129-リン酸化 α -synuclein は、非リン酸化 α -synuclein と比較して、neurosin によるその分解に対して抵抗性を示した。このことはレビー小体中に存在するリン酸化 α -synuclein はその分解酵素に対して抵抗性である可能性を示した。
- 2) 今回、少数例での検討ながら、パーキンソン病患者群では、髄液中の α -synuclein oligomer 濃度が有意に増加しており、髄液中の α -synuclein oligomer の定量はパーキンソン病の診断マーカーとして有用である可能性がある。

F. 文献

1. M.G. Spillantini, et al. Nature, 839-840, 1997.
2. M.H. Polymeropoulos, et al. Science, 2045-2047, 1997.
3. R. Kruger, et al. Nat. Genet., 106-108, 1998.
4. J.J. Zarranz, et al. Ann. Neurol., 164-173, 2004.
5. A.B. Singleton, et al. Science, 841, 2003.
6. M.C. Chartier-Harlin, et al. Lancet, 1167-1169, 2004.
7. P. Ibanez, et al. Lancet, 1169-1171, 2004.
8. T. Tokuda, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 162-6, 2006.
9. H. Fujiwara, et al. Nat. Cell Biol., 160-164, 2002.
10. I.F. Tsigelny, et al. FEBS J, 17: 1862-1877, 2007.
11. O.M.A. El-Agnaf, et al. FASEB J, 419-425,

2006.

G. 健康危険情報：なし

H. 研究発表

1. 論文発表：

- 1 Morovvati S, Nakagawa N, Osame M, et al. Analysis of CCG repeats in Huntingtin gene among HD patients and normal populations of Japan. Arch Med Res 39:131-133, 2008
- 2 Ohnari K, Yamano M, Nakagawa M, et al. An adult form of Alexander disease: a new mutation in Glial Fibrillary Acidic Protein. J Neurol 254:1390-1394, 2007
- 3 Yoshida T, Tomozawa Y, Nakagawa M, et al. The functional alteration of mutant GFAP depends on the located domain: Morphological and functional studies using astrocytoma-derived cells. J Hum Genet 52:362-369, 2007

2. 学会発表

- 1) 徳田隆彦, 笠井高士, 中川正法, El-Agnaf OMA: α -synuclein を定量するハイスループット ELISA 法の開発. 日本神経学会総会(第 48 回), 名古屋, 2007. 5. 16.
- 2) Tokuda T, Kasai T, Mizuno T, Watanabe Y, Yamaguchi N, Kametani F, Nakagawa M: Neurosin cleaves the NAC region of α -synuclein. The 3rd International Symposium on Dopaminergic and Nondopaminergic Mechanisms in Parkinson's Disease, Osaka, Japan, 2007. 11. 23.

I. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

「MPTP誘発パーキンソン病モデルマウスにおける rhG-CSFの 神経保護作用」に関する研究

望月 秀樹^{1), 2)}, 曹 旭晴¹⁾²⁾, 安田徹²⁾, 水野 美邦^{1), 2)}, 服部信孝¹⁾
1) 順天堂大学医学部脳神経内科、2) 老人性疾患病態治療研究センター

研究要旨

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)は顆粒球系前駆細胞の顆粒球への分化促進、増殖刺激作用および成熟好中球の機能亢進作用等を有する。我々は、MPTP 慢性投与(30mg/kg/day 5days 連続腹腔投与) PD モデルマウスにおけるG-CSF のDA神経細胞保護作用について検討した。C57BL/6 マウス(8-10 weeks)にMPTP 慢性投与し、rhG-CSF(200mg/kg/day)連続7日間腹腔注射して、モデルを作成した。MPTPにG-CSFを併用投与することにより、黒質ドパミン神経細胞数の脱落を抑制できた。さらに今回の検討では、G-CSFを併用投与する事により通常MPTP投与2日目に認められるBaxの上昇やBcl-2の減少を制御することを確認した(Cao XQ 2006 et al.)。本研究で、G-CSFが黒質Bcl-2を増加させ、Baxの発現を減少させることにより、マウスMPTP誘発DA細胞死を軽減することを確認した。G-CSFは、パーキンソン病の進行を抑制する可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

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。また、現在においても、進行を制御する薬剤は報告されていない。

Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)は顆粒球系前駆細胞の顆粒球への分化促進、増殖刺激作用および成熟好中球の機能亢進作用等を有する。近年、G-CSFの神経細胞保護作用が指摘されている。我々やいくつかのグループにおいて、すでに虚血動物においてG-CSFの保護作用について報告されている(Komine-Kobayashi M. et al. 2006, Zhao LR, et al. 2007)。今回は、MPTP投与によるPDモデルマウスにおけるG-CSFのDA神経細胞保護作用について検討した。

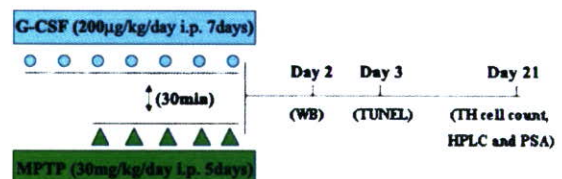
B. 研究方法

C57BL/6 マウスにMPTPを投与し、rhG-CSF(200mg/kg/day)連続7日間腹腔注射して、モデルを作成した。モデル作成後、western blotting, TUNEL、Staining, HPLCと免疫組織化学を用いてDA神経細胞障害の程度及びbcl-2, baxの発現について検討した。

- 慢性PDモデルの作製, C57BL/6マウス(8-10 weeks)にMPTP慢性投与し、慢性PDモデルを作製する。MPTP投与法は、30mg/kg/day

を5日間連続腹腔投与する。

- PDモデルマウスにおけるG-CSFのDA神経細胞保護作用。C57BL/6マウス(8-10 weeks)にMPTP慢性投与し、rhG-CSF(200mg/kg/day)連続7日間腹腔注射した。



Mouse: C57BL/6 male

Groups:

- 1 saline/saline
- 2 saline/MPTP
- 3 G-CSF/MPTP

Experimental schedule of MPTP and G-CSF treatment. G-CSF (blue) was administered at 200 µg/kg daily for seven consecutive days. MPTP (green) was administered at 30 mg/kg daily for five consecutive days, and the last dose was administered at the same day as the last G-CSF injection. Western blotting was conducted at day 2 after the last injection, and TUNEL staining at day 3, TH cell count and HPLC at day 21 after the last injection.

免疫組織化学染色

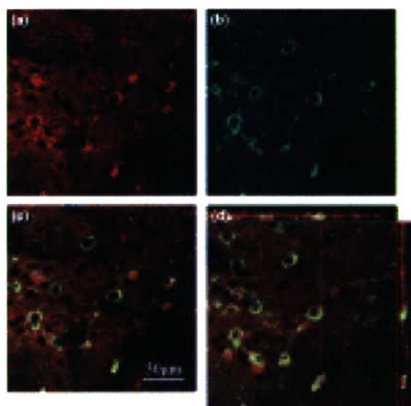
それぞれの群で、投与終了後に断頭にて脳組織を採取し、4%パラホルムアルデヒド中に4℃で2日間保存した。その後30%シュークロス中に2日間保存した後、クリオスタットにて20μm厚切片を作製し、30%シュークロス中で保存した。PBS洗浄、各種動物血清によるブロッキング後、4℃にて一次抗体と反応させた。一次抗体には anti-TH (rabbit, calbiochem), rabbit polyclonal anti-G-CSF receptor (anti-G-CSFR; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). を使用した。FITC 又は Alexa594 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。

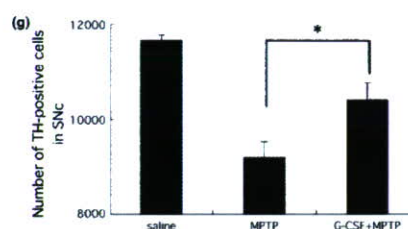
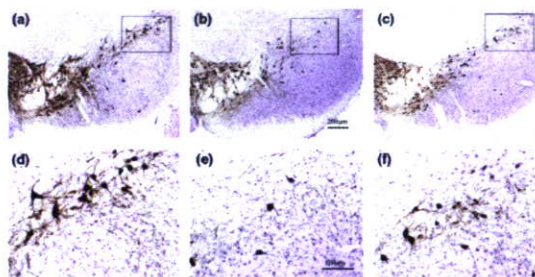
C. 研究結果

control マウスの黒質、海馬、皮質、線条体にG-CSFのレセプターの発現を確認した。



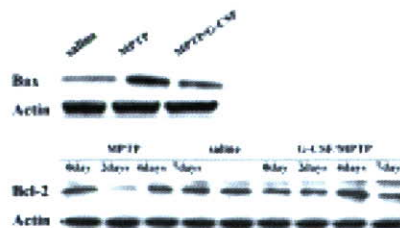
Immunoreactive TH and G-CSFR neurons in normal mice. (a) TH-positive cells; (b) G-CSFR-positive cells; (c) yellow develops when green (TH) and red (G-CSFR) structures are superimposed; (d) comparison of two labeling methods.

MPTPでTH陽性細胞数が減少していた。MPTPにG-CSFを併用投与することにより細胞数の減少を抑制された。



G-CSF prevents the loss of TH-positive cells in the SN at day 21 after the last MPTP injection in C57BL/6 mice. (a) Saline-injected mice; (b) MPTP-injected mice; (c) G-CSF pretreated mice injected with MPTP; (d, e, f) large magnifications of squares in sections (a), (b) and (c), respectively. (g) The number of TH-positive cells in the SN at day 21 after the last injection of saline-treated, MPTP-treated or G-CSF++MPTP-treated mice. Each value represents the mean ± SEM; * $p < 0.05$ (Fisher test, $n = 5$ mice per group).

MPTPで線条体DA量が減少し、G-CSFを併用投与する事によりDAの増加傾向を示された。



Effects of G-CSF on the Bcl-2 and Bax expression in the ventral midbrain. Western blotting analysis of the effects of G-CSF on Bcl-2 and Bax expression levels in the ventral midbrain. G-CSF increased Bcl-2 expression at day 4 and decreased Bax expression level at day 2 after the last injection in the ventral midbrain in MPTP-treated mice. The data are representative of three experiments.

MPTPによりBaxが上昇、Bcl-2が減少する事が知られているが、今回の実験で投与2日目にBaxの上昇、Bcl-2の減少を確認した、さらに、G-CSFを併用投与する事によりこの変化を抑制する事を示唆された(Cao XQ 2006 et al.).

D. 考察

今回の実験でG-CSFがBcl-2を増加させ、Baxの発現を減少させることにより、マウスMPTP誘発DA細胞死を軽減することを確認した。G-CSFはMPTP神経毒に対するDA神経細胞保護作用が示唆された。

近年、我々の報告以外にも、パーキンソン病動物モデルを用いて、G-CSF投与による治療効果を示す報告が相次いでいる(Meuer K, et al. 2006, Huang HY, et al. 2007)。また、アルツハイマー病のモデルマウスにおいても、同様の治療効果が確認されている(Tsai KJ, et al. 2007)。また、その治療効果の理由として幹細胞を活性化している可能性が指摘されており注目されている。田中らは、ALS患者髄液のG-CSFの上昇を報告している(Tanaka M, et al. 2006)。このように多くの変性疾患にG-CSFが関与している可能性がある。疾患特異性がなく、変性疾患に共通の治療効果を認める可能性も否定はできず、G-CSFが将来的な難病変性疾患の治療薬としての可能性が期待される。

E. 結論

本研究では、Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)が、パーキンソン病の進行を抑制する可能性について報告した。今後は、臨床応用を含め大型動物での有用性を検討すべきである。

F. 文献

- (1) Komine-Kobayashi Met sl. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 26, 402- 413. 2006
- (2) Zhao LR, et al. *Stroke.* Oct;38(10):2804-IT. 2007
- (3) Cao XQ et al, *J Neurochem.* 2006
- (4) Meuer K, et asl. *J Neurochem.* 2006
- (5) Huang HY, et al. *Neurobiol Aging.* 2007
- (6) Tsai KJ, et al. *J Exp Med.* 2007
- (7) Tanaka M, *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006

G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

曹旭晴、パーキンソン病モデルマウスにおけるrhG-CSFの神経保護作用、第47回日本神経学会総会、2006年5月11日

1. 論文発表

1. Komine-Kobayashi M, Zhang N, Liu M, Tanaka R, Hara H, Osaka A, Mochizuki H, Mizuno Y, Urabe T. Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006 Mar;26(3):402-13.

2. Cao XQ, Arai H, Ren YR, Oizumi H, Zhang N, Seike S, Furuya T, Yasuda T, Mizuno Y, Mochizuki H. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor protects against MPTP-induced dopaminergic cell death in mice by altering Bcl-2/Bax expression levels. *J Neurochem.* 2006 Nov;99(3):861-7.

2. 学会発表

・発行誌名巻号・ページ・発行年等も記入

I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得:特になし
2. 実用新案登録:特になし
3. その他

抗 LRRK2 抗体作製の試み-(2)

長谷川 一子¹⁾、一瀬 宏²⁾、豊島 至³⁾、柳下 三郎¹⁾

¹⁾国立病院機構・相模原病院、²⁾東京工業大学・大学院生命理工学研究科、
³⁾秋田大学、医学教育センター

研究要旨

優性遺伝形質を示す遺伝性パーキンソン病 PARK8 の原因遺伝子である *leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)* の生理的機能は未だに明らかとなっていない。本研究では、LRRK2 の細胞内局在や脳内分布を明らかにして LRRK2 の機能と、LRRK2 機能異常により引き起こされる神経細胞死との関連を解明するために、特異抗体の作製を行っている。現在キナーゼドメインに対する新たなモノクローナル抗体をクローニング中である。また、ポリクローナル抗体を用いてマウス脳の発達過程における LRRK2 免疫反応の変化を調べた。その結果、胎仔期から生後発達の段階で脳内 LRRK2 陽性細胞の免疫反応性が変化していくことが観察された。また、ウェスタンブロットティングによる解析から、全長 LRRK2 以外に低分子量の位置にもバンドが観察され、脳の発達につれて低分子量バンドが減少していくことがわかった。以上の結果は LRRK2 が脳の発達段階において何らかの役割を担っていること、LRRK2 が限定分解を受けて作用している可能性のあることを示唆した。

A. 研究目的

優性遺伝形質を示す家族性パーキンソン病家系 PARK8 は、孤発性パーキンソン病と同様の症状を示すことから、孤発性パーキンソン病の原因解明にもつながることが期待され活発に研究されている (1,2)。

しかしながら、LRRK2 の機能に関しては未だにほとんどわかっていない。その理由の一つとして LRRK2 が全長 280kDa におよぶ巨大なタンパク質であるため細胞へのトランスフェクションや過剰発現などが困難であること、また、既にいくつかの抗体が市販され組織分布や細胞内分布

について報告されているが、それらは同一の結果を示していない(3-5)。これは、これまでに作製されている抗体が十分 LRRK2 特異的なものでないことが原因と考えられる。

本研究では、LRRK2 に特異的なポリクローナル抗体・モノクローナル抗体を作製し、脳内分布や細胞内局在、さらに脳発達過程における変化などを解析して LRRK2 の生理的機能とパーキンソン病におけるドーパミンニューロン選択的細胞死との関連を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

LRRK2 のキナーゼドメインを構成している