

1838番から2134番目までの297アミノ酸をグルタチオンSトランスフェラーゼとの融合タンパク質として大腸菌で発現させた。発現タンパク質をグルタチオンセファロースによるアフィニティクロマトグラフィにより均一に精製した。精製したタンパク質をウサギ二羽に免疫することによりポリクローナル抗体を作製した。また、同一の抗原をマウスに免疫し、免疫したマウスの脾臓をミエローマ細胞と融合させることによりモノクローナル抗体の作製も進行中である。

COS細胞への全長LRRK2cDNAのトランスフェクションは、FuGene6を用いたリポフェクション法により定法通り行った。マウス脳抽出液を用いたウエスタンブロッティング、および、マウス脳やヒト剖検脳に対する免疫組織化学は通常の方法により行った。

(倫理面への配慮)

ヒト剖検脳の使用に際しては、国立病院機構相模原病院の倫理委員会規定に則り、研究目的での臓器利用に関する同意の得られているものを用いた。

C. 研究結果

今回我々が作製したポリクローナル抗体の特異性を、市販抗体の一つとウエスタンブロッティングにより比較した。その結果を図1に示す。

図1の左側がC社製市販抗体、右側が自家製抗体の結果を示す。

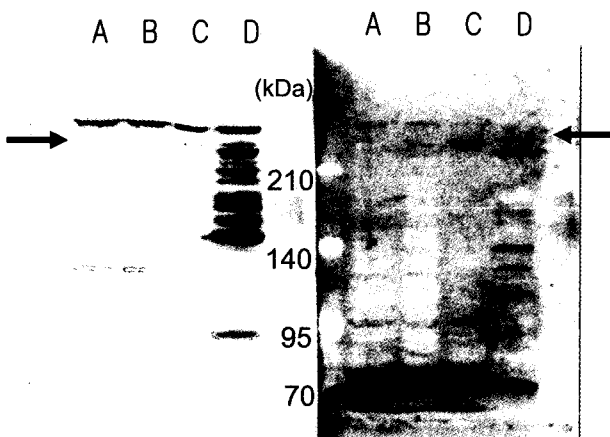


図1,市販抗体と自家製抗体の特異性の比較

A: COS細胞抽出液、BおよびC: LRRK2全長をトランスフェクトしたCOS細胞(BとCではトランスフェクションの条件が異なり、Cの方がトランスフェクションの効率が高かったと考えられる)、D: マウス全脳抽出液。右側に示した自家製抗体では、矢印で示しているようにCのレーンにおいて210kDaを超える大きさのバンドが検出され、全長LRRK2を認識していると考えられた。左側に示した市販抗体においても、トランスフェクションした細胞(レーンC)で自家製抗体と同様な位置にバンドが検出されたが、それより若干大きな位置に強いバンドが検出された。このバンドが内在LRRK2を認識している可能性もあるが、トランスフェクションしたLRRK2を認識できる自家製抗体がこのバンドを認識していないことを考えると、LRRK2ではないと考えられた。

レーンDで示したマウス脳抽出液において、市販抗体では140kDa付近のバンドを強く認識しさらにその他にも多数のバンドが認識された。図の右側の自家製抗体では、マウス脳抽出液のレーンDでLRRK2と考えられる矢印近傍のバンドも検出されたが、およそ70kDaのバンドを強く認識した。また、図には示していないが低分子量のタンパク質についても解析すると、40kDa付近のバンドも自家製抗体で認識された。

次に、これらの40kDaおよび70kDaのバンドが、LRRK2の限定分解産物であるか、あるいは抗体の交差反応性によるものであるかについてさらに検討するために、それぞれのバンドをカラムクロマトグラフィにより分離精製していくこととした。生化学的な細胞分画法により70kDaのバンドは主にミトコンドリア画分に、40kDaのバンドは主に核画分に存在することが判明した。そこで、それぞれの分画をDEAE-陰イオンカラムクロマトグラフィにより分離濃縮した。現時点において、ウエスタンブロッティングで検出されるそれぞれのバンドの構造決定に十分な精製度が得られていない。今後さらに精製度を高めて質量分析計によりタンパク質の構造を決定してい

く予定である。

一方、今回作製した自家製抗 LRRK2 抗体を用いて、マウス脳発達過程における LRRK2 抗体に対する免疫反応性の変化を検討した。これは、本 LRRK2 抗体に対する免疫反応性が脳の部位によって異なる結果が得られていたこと、ラット大脳皮質初代培養細胞において培養日数の変化とともに免疫反応性が変化する結果が得られていたことから、LRRK2 がニューロンの分化や発達段階に応じて細胞内局在や発現量が変化している可能性が考えられたためである。

17 日齢胎仔 (E17), 出生後 6 日 (P6), 出生後 14 日 (P14), 成獣という発達段階を異にする 4 段階のマウスにおいて、嗅球、線条体、大脳皮質、中脳黒質などの脳部位の LRRK2 免疫反応性を調べた。その結果、どの部位においても E17, P6 など発達が未熟な段階では核あるいは核周囲に強い免疫反応性が見られ、細胞質は相対的に弱い反応しか示さなかった。発達が進むにつれて免疫反応性は徐々に核から細胞質全体および神経突起へと広がっていく様子が観察された。

中脳黒質周辺において LRRK2 免疫反応性は、ドーパミンニューロンと考えられるチロシン水酸化酵素 (TH) 陽性ニューロンにも観察されたが、TH 陰性ニューロンにも観察され、LRRK2 が必ずしもドーパミンニューロンに局在していないことを示唆した。

発達に伴う核および核周囲の免疫反応性の低下を確認するために、発達段階の異なるマウス脳抽出液を用いてウエスタンブロッティングでも解析した。その結果、主に核画分に存在する 40kDa のバンドが発達に伴い減少していく様子が観察された。これらの結果は、LRRK2 抗体と反応する 40kDa のタンパク質が、ニューロンの発達につれて徐々に相対的な存在量を低下させていくこと、それにつれて細胞質やミトコンドリアに存在する LRRK2 免疫陽性タンパク質の割合が増加していくことを示唆した。

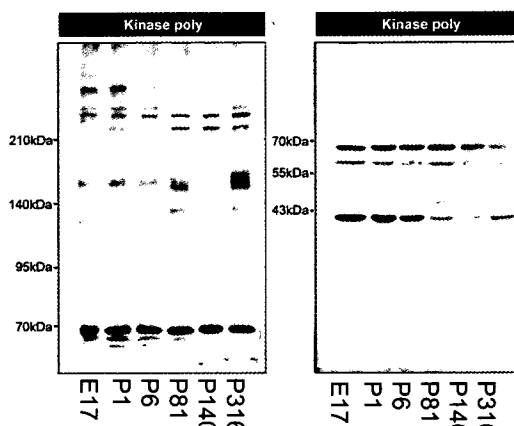


図 2. 発達過程に伴う LRRK2 免疫反応性の変化

また、LRRK2 キナーゼドメインに対するモノクローナル抗体を現在作製中である。複数個の陽性クローンについて、ウエスタンブロッティングにより特異性を検証しながらクローニングを進めている。

D. 考察

今回の結果から、我々はトランスフェクションした LRRK2 を認識する特異性の高いポリクローナル抗体を作製することに成功したと考えている。しかし、40kDa, 70kDa に現れる低分子量のバンドについて、LRRK2 の分解産物であることを確かめるためにさらに精製し、免疫陽性となっているタンパク質の本体についての解析が必要である。また、マウス脳の発達に伴い LRRK2 免疫反応性が変化していくことは、LRRK2 がニューロンの分化や発達の際に重要な働きをしていることを示唆した。

これまでに LRRK2 の細胞内局在や脳内分布についての論文がいくつか報告されているが、一定の結果が得られていない(3-5)。これは用いられている LRRK2 抗体の特異性が十分に高くないためであると考えられる。今後、LRRK2 ノックアウトマウスなどを用いて十分特異性の確認された抗体を用いて、LRRK2 の分布や細胞内局在を検証していくことにより、LRRK2 の生理機能の解明と、パーキンソン病発症機構との関係を明らかにしていく必要がある。

E. 結論

トランスフェクションした LRRK2 を認識する特異性の高いポリクローナル抗体の作製に成功した。本抗体を用いた免疫組織化学およびウエスタンブロッティングによる解析から、LRRK2 の細胞内局在が脳の発達過程に伴い変化していく様子が観察され、LRRK2 がニューロンの発達に重要な働きをしていることが示唆された。

F. 文献

1. Funayama M. et al.: Ann Neurol 51, 296-301, 2002
2. Funayama M. et al.: Ann Neurol 57, 918-921, 2005
3. Giasson BI et al.: Ann Neurol 59, 315-322, 2006
4. Higashi S et al.: J Neurochem 100, 368-381, 2007
5. Biskup S et al.: Ann. Neurol 60, 557-569, 2006

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

Ohta E. et al.: Neurosci Lett, 417, 21-23, 2007

2. 学会発表

1. 太田悦朗, 片山ゆり, 長谷川一子, 前川達則, 小幡文弥: 優性遺伝パーキンソニズムの原因分子 LRRK2 の細胞内発現量および局在の解析. 第 48 回日本神経学会総会 05-18-2007 名古屋
2. 長谷川一子, 一瀬宏, 豊島至, 田所悦子, 柳下三郎: 抗 LRRK2 抗体作成のこころみ-1. 第 48 回日本神経学会総会 05-18-2007 名古屋
3. S. Ujiie, Y. Ogino, M. Ogino, T. Uchihara, S. Yagishita, K. Hasegawa, H. Kowa, F. Sakai: Neuropathological characteristics of Parkinson's disease associated with LRRK2 I2020T (Sagamihara Family). 11th International

Congress of Parkinson's disease and Movement Disorders. Istanbul Jun 3-7, 2007.

4. K. Hasegawa, H. Ichinose, I. Toyoshima, S. Yagishita: Intracellular presentation of LRRK2 -examined by our LRRK2 antibodies-. 11th International Congress of Parkinson's disease and Movement Disorders. Istanbul Jun 3-7, 2007.

I. 知的所有権の取得状況

該当なし

PARK9 の臨床的特徴とその遺伝子産物の機能解析

服部信孝¹⁾

久保紳一郎¹⁾、里史明²⁾、今井哲司²⁾、富山弘幸¹⁾、船山学²⁾、佐藤栄人¹⁾

¹⁾ 順天堂大学 脳神経内科、²⁾ 順天堂大学 老人性疾患研究センター

研究要旨

本邦の若年性パーキンソンニズムにおいて Kufor-Rakeb disease (KRD; PARK9) の原因遺伝子である *ATP13A2* の変異解析およびその臨床的特徴、さらに *ATP13A2* タンパクの細胞内局在を検討した。一例において *ATP13A2* 遺伝子に新規の変異 (F182L (c.546C>A)) を確認した。発症年齢は 22 歳、レボドーパ反応性のパーキンソンニズム、認知機能障害、錐体路障害、核上性眼球運動障害、顔面、舌、手指のミニミオクロヌスを認めた。変異 *ATP13A2* タンパクは小胞体に、野生型 *ATP13A2* タンパクはライソソームに局在した。

A. 研究目的

本邦の若年性パーキンソンニズムにおいて Kufor-Rakeb disease (KRD; PARK9) の原因遺伝子である *ATP13A2* の変異解析およびその臨床的特徴を検討する。さらに *ATP13A2* タンパクの機能解析に向け、その野生型および変異型タンパクの細胞内局在を検討する。

B. 研究方法

若年発症のパーキンソンニズム 117 例につき末梢白血球よりゲノム DNA を抽出しハプロタイプ解析を行い、*PARK9* に連鎖する患者につき *ATP13A2* 遺伝子の翻訳領域およびエクソン-イントロン境界領域の塩基配列を決定した。連鎖しない患者についてはこれまでに変異が報告されているエクソンの塩基配列を決定した。*ATP13A2* タンパクの細胞内局在を解析するために、同タンパクの N 末端に V5 エピトープまたは GFP を付加した野生型 (nV5-WT, GFP-WT)、F182L 変異体 (nV5-F182L, GFP-F182L) および G504R 変異体 (nV5-G504R, GFP-G504R) をヒト胎児腎細胞 (HEK293)、またはヒト神経芽細胞 (SH-SY5Y) に強制発現させ、

Percoll による細胞画分さらに各オルガネラマーカーを用いた蛍光免疫染色を行った。

C. 研究結果

本邦患者一例において *ATP13A2* 遺伝子に新規の変異 (F182L (c.546C>A)) を確認した。本変異は正常対照 150 例において認められなかった。本患者の発症年齢は 22 歳、レボドーパ反応性のパーキンソンニズム、軽度の認知機能障害、錐体路障害、核上性眼球運動障害に加え、顔面、舌、手指のミニミオクロヌス、レボドーパ誘発性の精神症状を認めた。進行は比較的緩徐であった。本患者に認められた F182L およびブラジルの患者で報告された G504R 変異 *ATP13A2* タンパクはいずれも Percoll を用いた生化学的解析、さらに免疫細胞化学的解析にて小胞体に局在した。一方、野生型 *ATP13A2* タンパクはライソソームに局在した。

D. 考察

本患者に認められた新規の *ATP13A2* 遺伝子変異はその遺伝子産物の局在が野生型と異なっていることから病的変異であると考えられた。またこの局在パターンの差異及び KRD が常染色体劣

性遺伝形式を呈することより ATP13A2 タンパクはライソソームにおいて機能するタンパクであると推測された。

E. 結論

本患者の発症年齢はこれまでの報告例（12-15歳）より高く、また発症様式および進行も緩徐であり、KRD の臨床診断に際し、その表現系の heterogeneity に留意する必要があると考えられた。今後の症例の蓄積により遺伝子型-表現型の関連を明らかにし、さらには ATP13A2 タンパクの機能解析が期待される。

F. 文献

- ・ Ramirez A, et al.: Nature Genet, 1184-1191, 2006
- ・ Di Fonzo A, et al.: Neurology, 1557-1562, 2007
- ・ Hampshire DJ, et al.: J Med Genet, 680-682, 2001
- ・ Williams DR, et al.: Mov Disord, 1264-1271, 2005

G. 健康危険情報

H. 研究発表

1. 論文発表

1. Ning Y, et al., PARK9-linked parkinsonism in Eastern Asia: Mutation detection in ATP13A2 and clinical phenotype. Neurology (in press).

2. 学会発表

1. 李元哲, ほか, ATP13A2 (PARK9) の新規遺伝子変異の同定. 第 48 回日本神経学会総会 (2007.5.18.名古屋) .
2. 李元哲, ほか, ATP13A2 (PARK9) の新規遺伝子変異の同定. 第 1 回 Movement Disorder Society, Japan 学術集会(2007.10.5.東京) 抄録集 p48.

3. 里史明, ほか, ATP13A2 の細胞内局在. 第 1 回 Movement Disorder Society, Japan 学術集会(2007.10.5.東京) 抄録集 p49.

I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

新規パーキン結合蛋白におけるミトコンドリア関連機能の検討

（分担）研究者氏名 梶 龍兒¹⁾

共同研究者氏名 三ツ井貴夫¹⁾、黒田 由紀子¹⁾

1) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部感覚情報医学講座神経情報医学分野

研究趣旨

新規パーキン結合蛋白 KI-42 によるミトコンドリア関連機能に関する影響を検討した。KI-42 は細胞分画においてはミトコンドリアに一致し、特にミトコンドリア内膜の内部に局在していた。精製 KI-42 蛋白は単独でもミトコンドリアへの良好な移行能を有していた。一方、パーキンは単独ではわずかな移行能を示したのみであったが、精製 KI-42 蛋白をパーキンと共に添加するとその移行能は著明に増加した。ノザンブロットティング法による解析では KI-42 を培養細胞に過剰発現させると、ミトコンドリア由来の RNA の増加が認められた。以上より、KI-42 はパーキンと結合することでパーキンをミトコンドリアまで運搬すること、KI-42 はパーキン協調的に作用し、ミトコンドリア転写を促進しうることが示唆された。

A. 研究目的

我々はこれまでに、パーキンがミトコンドリアの biogenesis を促進することを報告してきた。本研究では、我々が新たに見出した、パーキンに結合しミトコンドリアまで運搬するパーキン結合蛋白のミトコンドリア関連機能について検討した。

B. 研究方法

我々は新規パーキン結合蛋白を KI-42 と命名した。まず KI-42 を培養細胞に過剰発現した後、ミトコンドリア分画を単離し、プロテナーゼ K で部分消化し、ミトコンドリア内局在を検討した。次に KI-42、およびパーキンを大腸菌に導入することで精製し、培養筋細胞から単離したミトコンドリアに対する移行性について検討した。また KI-42 遺伝子を導入した培養細胞に CCCP (10 μ M) を添加したのち、ミトコンドリア、細胞質分画を分離し、それぞれの分画における KI-42、パーキンおよびチトクローム c の局在を検討した。さらに KI-42 を過剰発現させた細胞におけるミトコンドリア遺伝子の

発現をノザンブロットティング法で解析した。

C. 研究結果

KI-42 を GFP 変異体として COS-1 細胞に導入すると、ミトコンドリアのプロープである Mitotracker に一致した局在パターンが観察された。KI-42 のミトコンドリア内局在は、パーキンと同様に、内膜のマーカーである ANT1 と同じパターンを示した。精製 KI-42 蛋白は単独でもミトコンドリアへの良好な移行能を有していた。一方、パーキンは単独ではわずかな移行能を示したのみであったが、精製 KI-42 蛋白をパーキンと共に添加するとその移行能は著明に増加した。細胞分画法による検討では、パーキンおよびチトクローム c は当初ミトコンドリア分画に検出されたが、CCCP 添加後には細胞質分画に遊離していた。一方、KI-42 は CCCP 添加の有無に関わらず、ミトコンドリア分画でのみ検出された (図 1)。ノザンブロットティング法による解析では KI-42 を培養細胞 (RD) に過剰発現させると、ミトコンドリア由来の RNA の増加が認められた。

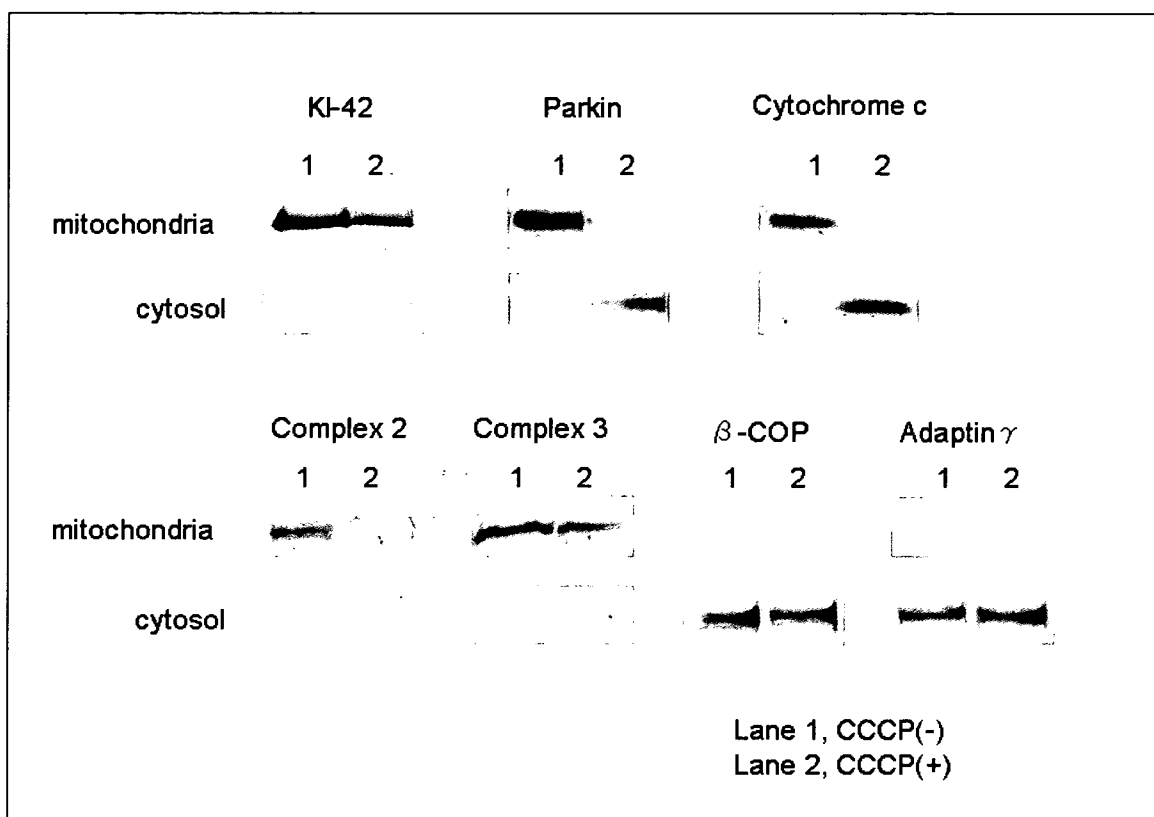


図 1 細胞分画法による KI-42、パーキン、チトクローム c の細胞内局在。KI-42 を培養細胞に導入し、ミトコンドリア(mitochondria)および細胞質(cytosol)分画においてそれぞれの発現が CCCP 添加の有無でどのように変化するかをイムノブロット法で検討した。パーキンおよびチトクローム c は当初ミトコンドリア分画に検出されたが (レーン 1)、CCCP(10 μM) 添加後には細胞質分画に遊離していた (レーン 2)。一方、KI-42 は CCCP 添加の有無に関わらず、ミトコンドリア分画でのみ検出された。ミトコンドリア電子伝達系複合体 2 および 3 はミトコンドリア分画のみで、β-COP, Adaptin γ は細胞質分画のみでそれぞれ検出された。

D. 考察

KI-42 はミトコンドリア移行シグナル(MTS)を有するため、単独でもミトコンドリア内膜内に移行することが可能であるが、パーキンは MTS を欠いており、KI-42 と結合することでミトコンドリア内に移行することが可能になるものと考えられた。すなわち、KI-42 はパーキンのミトコンドリア内移行を促進することで、ミトコンドリア転写を促進することが示唆された。

E. 結論

KI-42 はパーキンと結合することでパーキンをミトコンドリアまで運搬すること、KI-42 はパーキン協調的に作用し、ミトコンドリア転写を促進しうることが示唆された。

F. 健康危険情報

本研究は組換え DNA 実験を含んでいるが、これに対する安全対策として、「大学等における組み換え

DNA 実験指針」および「徳島大学遺伝子組換え DNA

実験安全管理規則」に基づき、承認を受けた後に専用施設内にて研究を実施した。

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1.論文発表

1. Kuroda Y et al. Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. Hum Mol Genet. 15(6):883-95, 2006.
2. Kuroda Y et al. Parkin affects mitochondrial function and apoptosis in neuronal and myogenic cells. Biochem Biophys Res Commun. 348(3):787-93, 2006.

2.学会発表

1. 黒田由紀子, 三ツ井貴夫, 梶 龍児: パーキンと chondroitin polymerizing factor との関連. 第 48 回日本神経学会総会、2007 年 5 月
2. 三ツ井貴夫, 黒田由紀子, 梶 龍児: パーキン蛋白のグリコシル化の検討. 第 48 回日本神経学会総会、2007 年 5 月

H.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1.特許取得 (出願中) 新規なパーキン結合タンパクとその用途 (平成 16 年 9 月 22 日出願、整理番号 P04015)
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

神経変性とプロテアソーム阻害

澤田秀幸¹⁾、山本憲幸²⁾、山川健太郎¹⁾、泉安彦²⁾、赤池昭紀²⁾、
山本兼司¹⁾、大江田知子¹⁾、下濱俊³⁾

- 1) 国立病院機構宇多野病院臨床研究部
- 2) 京都大学大学院薬学研究科薬品作用解析学
- 3) 札幌医科大学神経内科

研究要旨

パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患では選択的な神経細胞死と神経細胞内の封入体形成の出現により特徴づけられるが、私たちはプロテアソーム活性の点からは両者が相反する現象である可能性を指摘してきた。本研究では、プロテアソーム阻害により p-38 MAPK および Nrf2 の核内移行を介して γ glutamylcystein synthetase が増大し、細胞内グルタチオンが増大すること、その結果、酸化ストレス誘発細胞死が拮抗されることを示した。

A. 研究目的

パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患では選択的細胞死と細胞内の封入体形成を特徴とするが、両者の関係についてはわかっていない。私たちは、プロテアソームを阻害し、細胞内封入体形成を促進させると細胞死はむしろ拮抗されることから、封入体形成は細胞死を免れるための代償的反応である可能性を指摘してきた^{1,2)}。パーキンソン病のヒト脳では鉄の蓄積、脂質酸化、タンパク酸化、DNA 酸化などが報告されており、酸化ストレスにさらされていると考えられる。そこで、本研究では酸化ストレス細胞死モデルにおいてプロテアソーム阻害により細胞死がどのような影響を受けるかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ラット褐色細胞腫由来の PC12 細胞を用いて、6-hydroxydopamine(6-OHDA)による酸化ストレス誘発細胞死のモデルを作成した。細胞の生存率は MTT assay により測定した。酸素ラジカル

(ROC) の生成は DCF-DA による蛍光強度により、細胞内グルタチオンは DTNB により酸化させ比色定量法により測定した。グルタチオン合成の律速酵素である γ -glutamylcystein synthetase (GLCLC) は RT-PCR により、また核分画から Nrf2 の核内移行を検討した。プロテアソーム活性は Leu-Leu-Val-Tyr-7AMC の切断による蛍光強度により測定した。

C. 研究結果

PC12 細胞に対する hydrogen peroxide (H₂O₂)ならびに 6-OHDA 誘発細胞死の結果を図 1 に示す。プロテアソーム活性が部分的に抑制された状態では 6-OHDA による細胞死がほぼ完全に拮抗された (図 1)。また、この条件では細胞内グルタチオン量が有意に増大し、ROC 産生が有意に拮抗されていた (図 2 および 3)。経時的に解析を行うと、プロテアソーム阻害処置 12 時間後からグルタチオン量は有意に増大し、24 時間でピークを迎え、36 時間まで増大していた (図 4)。GLCLC 合成に関与する転写因子 Nrf2 の核内移行につい

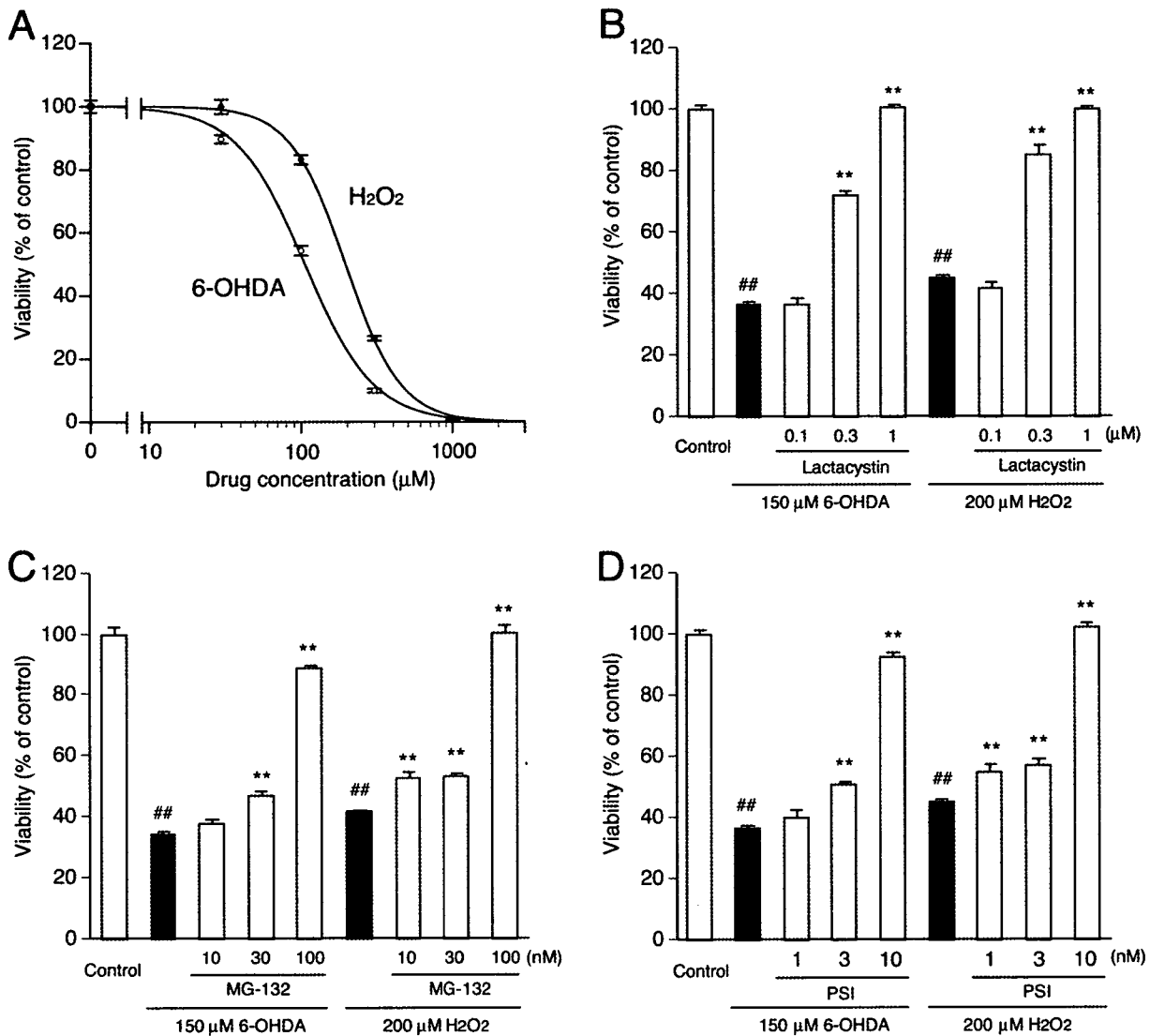


図1 A. PC12細胞における hydrogen peroxide (H₂O₂)および 6-OHDA による細胞死の用量反応曲線。これらの結果より以下の実験では hydrogen peroxide 200μM および 6-OHDA 150 μM を実験に用いた。**B, C, D.** 6-OHDA 誘発細胞死に対する 3 種類のプロテアソーム阻害薬 (lactacystin (**B**), MG-132 (**C**), および PSI (**D**)) の影響を示す。いずれのプロテアソーム阻害薬も酸化ストレス誘発細胞死をほぼ完全に拮抗した。

て解析するとプロテアソーム阻害 6 時間で核内移行することが示された。また、GLCLC の mRNA はプロテアソーム阻害により増大し、この増大は p38 mitogen activator protein kinase (MAPK) の阻害薬である SB203580 により拮抗された (図 5)。またプロテアソーム阻害によるグルタチオン量の増大は cycloheximide および SB203580 により拮抗されたが、PKC 阻害薬や PI3K 阻害薬の影響を受けなかった。

D. 考察

パーキンソン病におけるドパミンニューロンには酸化ストレスの関与が大きいことが、ヒト病理組織の検討からも示されている。本研究からは、プロテアソーム活性が阻害された場合には細胞なグルタチオンが増大し、酸化ストレスに抵抗性を獲得する可能性が示された。このグルタチオンの増大には p38 MAP kinase の関与と GLCLC の転写因子である Nrf2 の核内移行が重要であると考えられた。パーキンソン病では、残存ドパミンニューロン内に凝集タンパクからなる封入体で

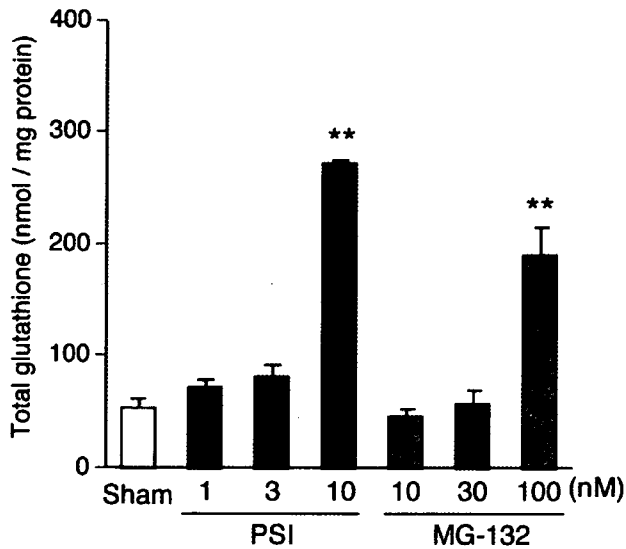


図2 細胞内グルタチオン量に対するプロテアソーム阻害薬の影響. PSI (10nM)、MG-132 (100nM)により細胞内グルタチオン量が有意に増大した。

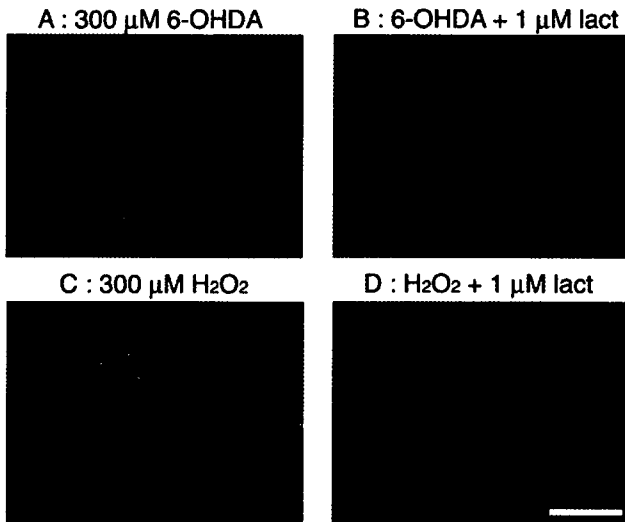


図3 DCF-DAによる細胞内ROC産生. 6-OHDAおよびH₂O₂によるROC産生はプロテアソーム阻害薬 lactacystin (lact)により阻害された。

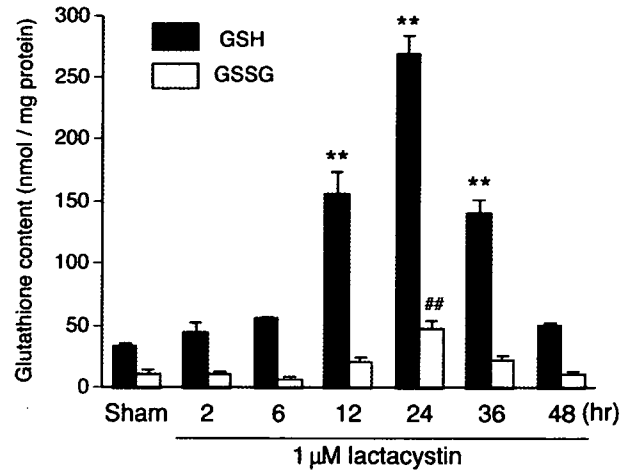


図4 細胞内グルタチオン(GSH)および還元型グルタチオン GSSG の lactacystin 投与後の経時的変化. GSH は lactacystin 投与後 12 時間で増大し、24 時間でピークを示した。

ある Lewy 小体が観察される。Lewy 小体は aggresome の一形態である可能性が示唆されているが、aggresome 形成にはプロテアソーム活性低下が必要である。これらのことから、Lewy 小体形成が促進される状況は、細胞内グルタチオンの増大など酸化ストレスに有利に作用している可能性が考えられる。

E. 結論

プロテアソーム活性の部分的な抑制はグルタチオンの増大を介して酸化ストレス誘発細胞死を拮抗する作用があった。

F. 文献

- 1) Sawada H. et al. J. Biol. Chem 279: 10710-9, 2004
- 2) Inden M. et al. J. Pharmacol. Sci. 97: 203-11, 2005.

G. 健康危険情報

なし

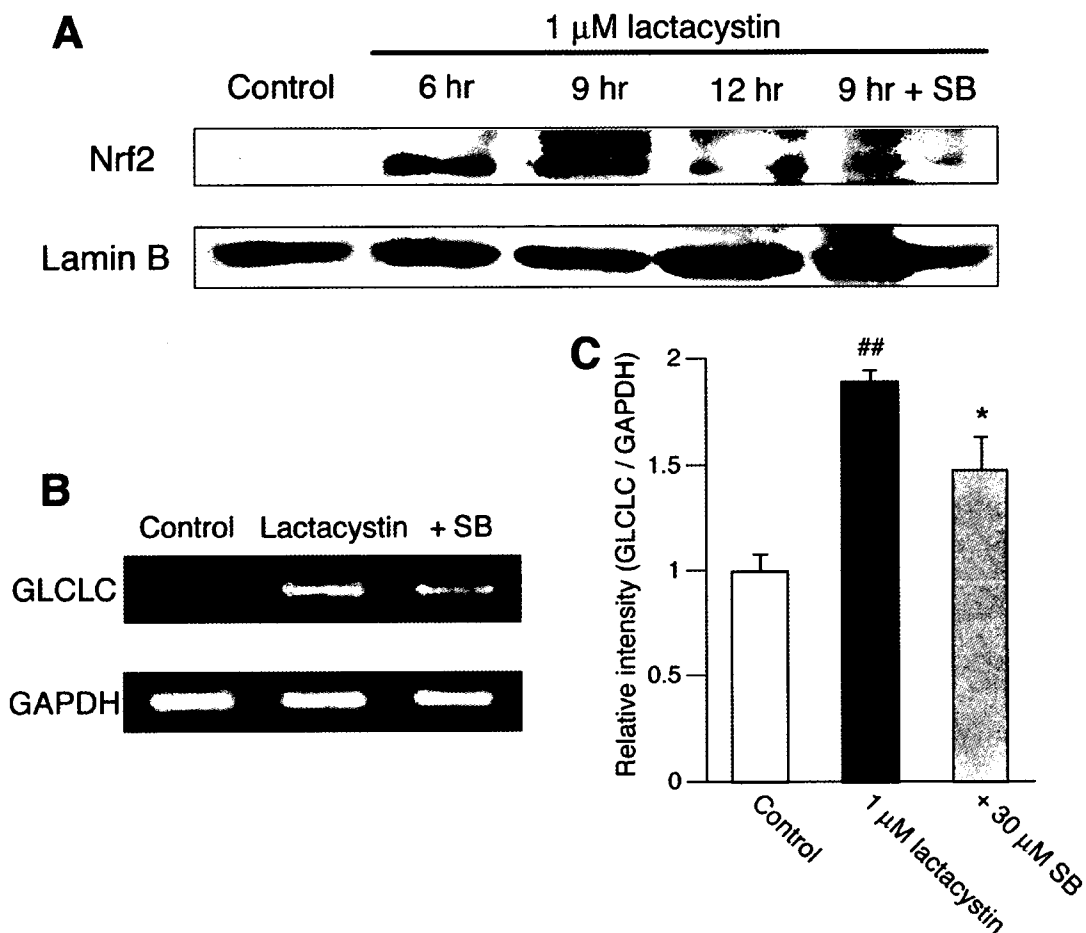


図5A. 核分画に検出される Nrf2 の経時的変化. lactacystin 投与 6 時間で Nrf2 の核内以降が見られた. B, C. GLCLC の RT-PCR では GLCLC mRNA は lactacystin 投与により増大し、この増大は、p38-MAPK の阻害薬 (SB) により拮抗された。

H. 研究発表

1. 論文発表

Yamamoto N, et al. J. Biol. Chem 282: 4364-72, 2007

Izumi Y. et al. Eur. J. Pharmacol. 557: 132-40, 2007

Izumi Y. et al. Eur. J. Pharmacol. (in press)

2. 学会発表

Yamamoto N. et al. XVII WFN world congress on Parkinson's disease and Related Disorders, Amsterdam (2007)

Sawada H. et al. XVII WFN world congress on Parkinson's disease and Related Disorders, Amsterdam (2007)

Oeda T. et al. XVII WFN world congress on Parkinson's disease and Related Disorders, Amsterdam (2007)

Takeuchi H. et al. XVII WFN world congress on Parkinson's disease and Related Disorders, Amsterdam (2007)

I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

工業所有権：「パーキンソン病診断キットおよびパーキンソン病診断方法」(特願 2003-405942, 平成 15 年 12 月 4 日出願)

2. 実用新案登録

なし

ロテノン負荷セルロプラスミン欠損マウスにおける運動障害と 脳病理・生化学的変化に関する検討

分担研究者 池田修一¹⁾
研究協力者 兼子一真¹⁾，日根野晃代¹⁾，吉田邦広¹⁾
信州大学医学部内科（脳神経内科，リウマチ・膠原病内科）¹⁾

研究要旨

セルロプラスミン(Cp)は鉄代謝に関連する重要な蛋白である。Cpの遺伝的欠損症である無セルロプラスミン血症では、脳組織に鉄が過剰に沈着し、これに伴い酸化ストレスが著しく亢進することが知られている。今回作成したロテノン負荷 Cp 欠損マウスでは、運動機能の低下と、脳組織での酸化ストレス亢進に加え、ドパミン合成低下、 α -synuclein 凝集亢進といったパーキンソン病に類似する所見が、コントロールに比し顕著であった。即ち、ロテノンにより惹起されるパーキンソン病類似病態が、Cp 欠損により増強されることを示唆するものである。

A.研究目的

多くの神経変性疾患において、銅あるいはその担体であるセルロプラスミン(Cp)が神経細胞障害に影響を与えていることが示唆されている。また、Cpの遺伝的欠損症である無セルロプラスミン血症(ACP)患者は錐体外路症状、小脳失調、認知症など多彩な神経症状を呈し、脳病理学的には過剰な鉄沈着と著しい神経細胞脱落が見られる¹⁾。生化学的には脳内過酸化脂質が増加し、鉄沈着による酸化ストレスが亢進していると考えられている²⁾³⁾。我々は、中枢神経変性に与える Cp 欠損の影響を評価するため、独自に作製した Cp 欠損マウス⁴⁾に対し、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 阻害剤であるロテノンを投与し、運動機能および脳病理学的・生化学的な解析を行った。

B.研究方法

対象動物として C57/BL10 マウスを用いた。野生型(Cp⁺)、Cp 欠損型(Cp⁻)の各々でロテノン投与

(R⁺)/非投与(R⁻)の2系統マウスを作製した。ロテノンは皮下埋め込み型浸透圧ポンプを用い、10mg/kg/day/4週間投与した。投与中、体重、直線歩行時の歩幅を経時的に測定。投与終了後、安楽死の上、脳を摘出。形態学的に評価した後、脂質過酸化物、抗酸化物、Tyrosine hydroxylase (TH)、 α -synuclein(α Sy)の各々の蛋白について、免疫組織化学的、生化学的に評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、信州大学動物実験等実施規定（平成19年7月1日施行）に則り、関連法規制等及び倫理上の問題なく実施された。

C.研究結果

Cp-R⁺マウスでは投与後2週間で、体重補正後の有意な歩幅の短縮を認めた。組織学的には明らかな脳細胞脱落所見や細胞内封入体様構造物は認めなかったが、Cp⁻マウスで脂質過酸化物(Acrolein:ACR)の発現亢進、金属依存性抗酸化物

(metallothionein1,2:MT)の発現低下を認め、特に Cp-R+で顕著であった(図1)。

また、Cp-R+マウスで TH 陽性細胞が減少し、リン酸化 α Sy 発現が亢進する所見が認められた(図2)。ウェスタンブロッティングによる解析でも、Cp-R+マウスで TH が減少し、 α Sy 増加に加え、 α Sy 寡量体が認められた。(図3)

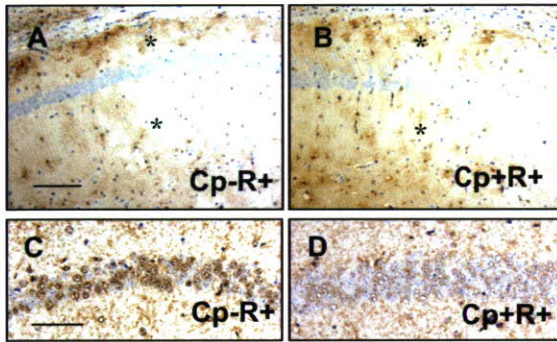


図1 アンモン角免疫組織化学像。A,B: 抗 MT 抗体による染色。Bar=100 μ m。C,D: 抗 ACR 抗体による染色。Bar=50 μ m。MT では、Cp-R+マウスでグリア細胞領域(*)での発現低下が目立つ。反対に ACR では神経細胞での発現亢進を認める。

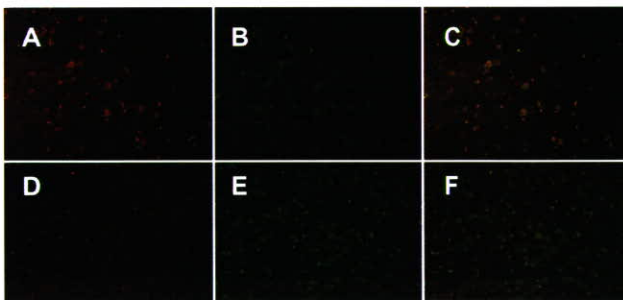


図2 嗅内野免疫組織化学像。A-C: Cp+R+マウス。D-F: Cp-R+マウス。A,D: 抗 TH 抗体による染色。B,E: 抗リン酸化 α Sy 抗体による染色。C,F: それぞれ A・B、D・E の融合像。A-F すべて倍率 200 倍。Cp-マウスではロテノン負荷により TH 陽性細胞が減少し、リン酸化 α Sy の発現が増加している

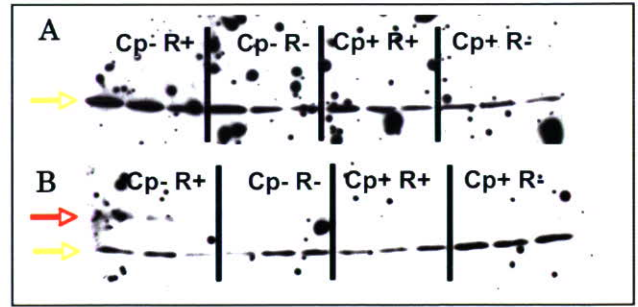


図3 aSy ウェスタンブロット解析(マウス全脳)。A: High-salt 可溶性分画。Cp-R+マウスで α Sy の発現亢進を認める(黄矢印)。B: 1% Triton-X100 可溶性分画。Cp-R+マウスで単量体 α Sy(黄矢印)に加え、2量体と考えられるバンド(赤矢印)を認める。

D.考察

今回作成したロテノン負荷 Cp 欠損マウスでは、野生型マウスはもとより、Cp 欠損のみ、あるいはロテノン負荷のみのマウスに比し、酸化ストレス亢進、ドパミン合成低下、 α Sy リン酸化・凝集亢進が著しい所見が得られた。即ち、Cp 欠損状態がロテノン負荷により惹起されるパーキンソン病類似病態を増強する可能性が示唆された。

E.結論

ロテノン負荷 Cp 欠損マウスは、パーキンソン病モデル動物として利用できる可能性がある。

F.文献

- 1) Morita H, et al. Ann Neurol 37: 646-656,1995
- 2) Kaneko K, et al. Free Radic Res 36: 303-306,2002
- 3) Kaneko K, et al. J Neuropathol Exp Neurol. 61:1069-77, 2002
- 4) Yamamoto K, et al. Biochim Biophys Acta 1588:195-202, 2002

G.健康危険情報

なし

H.研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

I.知的所有権の取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

ドーパミンニューロンに対するニコチンの神経保護作用： ロテノンによるパーキンソン病モデルマウスでの解析

下濱 俊¹⁾、久原 真¹⁾、竹内啓喜²⁾、澤田秀幸³⁾、
赤池昭紀⁴⁾、北村佳久⁵⁾、谷口隆之⁵⁾

1)札幌医科大学医学部神経内科学 2)京都大学大学院医学研究科臨床神経学 3)国立病院機構宇多野病院臨床研究部
4) 京都大学大学院薬学研究科薬品作用解析学 5)京都薬科大学病態生理学

研究要旨

ラット中脳黒質由来初代培養ニューロンを用いたロテノン誘発ドーパミン神経細胞死に対して、ニコチンは神経保護効果を示し、その作用の一部は $\alpha 4\beta 2$ および $\alpha 7$ ニコチン受容体を介し、PI3 kinase/Akt 活性化の関与が示唆された。ロテノンを用いたパーキンソン病モデルマウスを作製し、その特性について解析した。このモデルを用いて *in vivo* におけるニコチンの神経保護効果について検討し、ドーパミンニューロンの保護作用および運動機能の低下の改善において、ニコチン投与が有効であることが示された。

A.研究目的

孤発性パーキンソン病の有病率と喫煙との間には負の相関が認められ¹⁾、ニコチンによる神経保護作用の可能性が指摘されているが²⁾、その機序についてはよくわかっていない。一方、我々はこれまでにラット大脳皮質ニューロン初代培養系において、ニコチンが、ニコチン性受容体を介して、グルタミン酸神経毒性やベータアミロイド毒性を抑制することを明らかにしてきた³⁾⁴⁾⁵⁾。今回、ニコチンがドーパミンニューロンに対して保護作用を有するか否かについて検討した。

B.研究方法

ラット中脳黒質由来の初代培養ニューロンを用い、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I の阻害薬であるロテノンのドーパミンニューロンに対する毒性に対してニコチンが保護作用を持つか否かについて検討した。ニコチンやニコチン性受容体拮抗薬はロテノンと同時に 48 時間投与を行い、生存率は免疫染色により、神経細胞は Microtubule Associated Protein 2 (MAP2)、ドーパミン神経細胞は Tyrosine Hydroxylase (TH) 陽性となった細胞数の割合で評価

した。また、ロテノンを用いたパーキンソン病モデルマウスの作製を行ったが、これまでの報告⁶⁾⁷⁾とは異なり経口で 28 日間投与を行った。運動機能の評価は Rotarod による転落時間で行った。

(倫理面への配慮)

実験動物の扱いは米国 NIH の *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* に従い、研究は事前に本学医学部動物実験委員会の認可を得た方法で行った。

C.研究結果

中脳初代培養細胞において、ロテノンはドーパミンニューロンに対して選択的に毒性を示し、ロテノン毒性に対してニコチンは容量依存性に保護効果を示した。この保護作用は $\alpha 7$ ニコチン性受容体、 $\alpha 4\beta 2$ ニコチン性受容体それぞれの拮抗薬で阻害された。さらに、PI3K 阻害剤である LY294002、Akt 阻害剤である Triciribine により阻害された (図 1)。また、ニコチン投与により活性化型である Akt のリン酸化が見られ、アポトーシス抑制タンパク質である Bcl-2 および Bcl-x のタンパクレベルの増大が認められた

(図2)。ロテノン経口投与マウスモデルでは運動機能の低下と中脳黒質ドーパミンニューロン数の減少がみられ、これらはニコチンの同時皮下投与により改善した(図3、図4)。ニコチン性受容体刺激はロテノン毒性に対し *in vitro* と *in vivo* の両方でドーパミンニューロンに対し保護的に働くと考えられた。

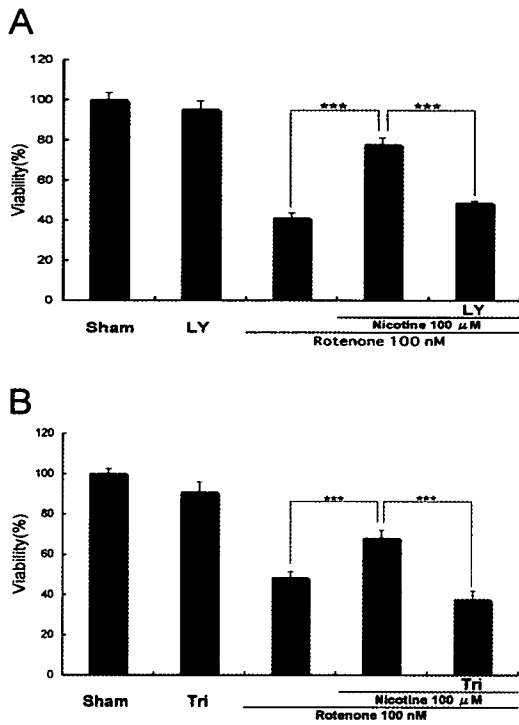
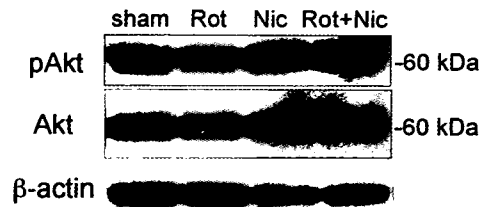


図1 ラット中脳黒質初代培養系でのロテノン毒性とニコチンの神経保護効果。ロテノンによるTH陽性ドーパミンニューロン死は、PI3K阻害剤であるLY294002 (A)、Akt阻害剤であるTriciribine (B)により阻害された。

D. 考察

ニコチンはすでに知られているシナプス前からのドーパミン放出促進作用⁸⁾に加えて、ドーパミンニューロンに対してニコチン性受容体を介しPI3 kinase系の活性化により神経保護作用を発揮することが示唆された。PI3K/Aktの活性化による抗アポトーシスタンパク質の増大がロテノン毒性に対する神経保護機構の一つと考えられた。また、ニコチンによるドーパミン放出促進は $\alpha 4 \beta 2$ 受容体を介していることが知られており⁹⁾、ドーパミンとニコチ

A



B

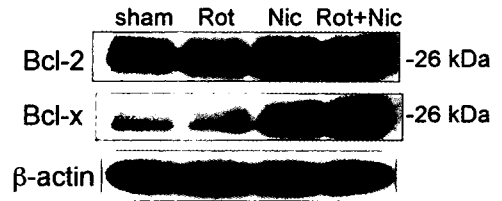


図2 ラット中脳黒質初代培養系でのロテノン毒性とニコチンの神経保護効果。ニコチン投与により活性化型であるAktのリン酸化が見られ(A)、アポトーシス抑制タンパク質であるBcl-2およびBcl-xのタンパクレベルの増大が認められた(B)。

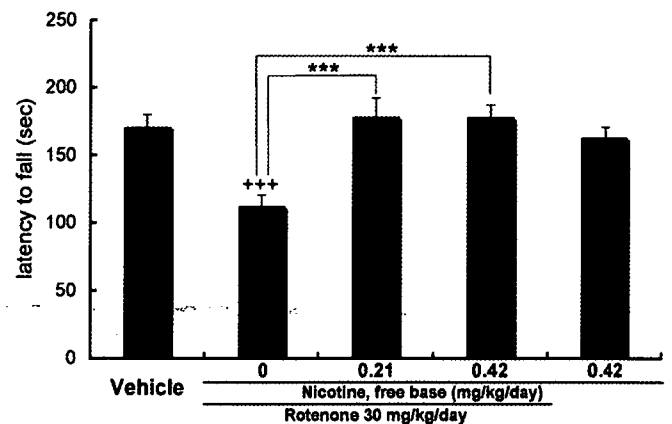


図3 ロテノンによるマウスでのRotarodテスト。ロテノンによる機能障害はニコチンにより回復した。

ンによる神経保護作用が何らかの関連を持っているかもしれない。また、ロテノンによるモデルマウスはこれまでの報告と異なり線条体での神経終末よりも黒質での細胞体脱落が優位であり、より孤発性パーキンソン病の病理組織に近い病理像が得られ、妥当なモデルであると思われる¹⁰⁾。また *in vivo* PDモデルマウスでニコチンは運動機能の低下の改善を

示し、また、中脳黒質ドーパミンニューロンに対する保護作用を示し、*in vivo*でのニコチンの神経保護作用が検証された。

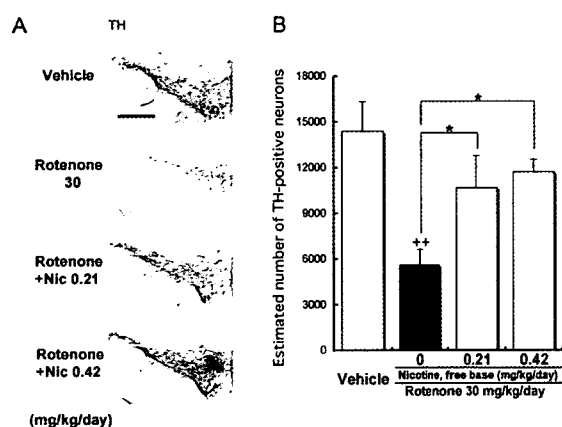


図3 ロテノンマウスでのドーパミンニューロン死に対するニコチンの作用。ニコチンはロテノン誘発ドーパミンニューロン死を抑制した。

E. 結論

ニコチンによる中脳ドーパミンニューロン保護には少なくとも $\alpha 7$ および $\alpha 4\beta 2$ ニコチン性受容体を介したPI3 kinase系細胞生存シグナル伝達経路の活性化の関与が示唆され、パーキンソン病の動物モデルにおいて有効であることが示された。パーキンソン病に対するニコチン性受容体作動薬の臨床応用が期待される。

F. 文献

- Wirdefeldt K et al: Ann Neurol 57:27-33 2005
- Morens M et al: Neurology 45:1041-1051 1995
- Akaike A et al: Brain Res 644: 181-187 1994
- Kihara T et al: Ann Neurol 42:159-163 1997
- Kihara T et al: J Biol Chem 276:13541-13546 2001
- Betarbet R et al: Nat Med 12 :1301-1306 2000
- Sherer TB et al: J Neurosci 23:10756-10764, 2003
- Barochovsky et al: J Neurochem 48 :798-803 1987

9) Champtiaux N et al: J Neurosci 23:7820-7829 2003

10) Inden M et al: J Neurochem 101:1491-1504, 2007

G. 健康危険情報

ロテノンは元来農薬や有害魚駆除に用いられる毒物である。皮膚への曝露でも毒性を発揮するため、取り扱い時には手袋を着用、また溶液調製時に粉末を吸い込まないようにマスクを着用することが必要である。また、ロテノン自体は自然界由来の物質であるが環境汚染物質とされており（農薬取締法第12条の2第1項の水質汚濁性農薬に指定）、ロテノンを含んだ廃液は紙に吸わせるなどしてそのまま下水へ流さないよう注意が必要である。

H. 研究発表

1. 論文発表

Inden M, Kitamura Y, Takeuchi H, Yanagida T, Takata K, Kobayashi Y, Taniguchi T, Yoshimoto K, Kaneko M, Okuma Y, Taira T, Agata H, Shimohama S. Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone. J Neurochem 101:1491-1504, 2007

2. 学会発表

- 竹内啓喜、青柳信寿、山川健太郎、植村健吾、下濱俊、高橋良輔、赤池昭紀、澤田秀幸、北村佳久、谷口隆之：ニコチンによるドーパミン神経保護、第48回日本神経学会総会、名古屋、平成19年5月
- 竹内啓喜、青柳信寿、山川健太郎、高橋良輔、下濱俊、赤池昭紀、澤田秀幸、北村佳久、谷口隆之：ニコチン受容体刺激によるドーパミン作動性神経保護、第30回日本神経科学大会、横浜、平成19年9月

I. 知的所有権の取得状況

- 特許取得：なし
- 実用新案登録：なし
- その他：なし

ホモシステイン毒性に対するドパミン神経細胞の脆弱性

中島健二¹⁾，今村恵子¹⁾，竹島多賀夫¹⁾，中曾一裕¹⁾

1) 鳥取大学脳神経内科

研究要旨

【目的】パーキンソン病患者ではL-DOPA内服に関連して血中ホモシステイン値が上昇することが知られている。初代中脳ドパミン神経細胞におけるホモシステイン毒性とその選択性について検討した。

【方法】胎生14日ラット中脳神経細胞の培養を行い、培養5日目にホモシステインを加え、24時間後にTHおよびMAP-2による免疫染色を行い、細胞毒性を評価した。またホモシステインとドパミンの関係、MPP+との関係について検討した。

【結果】ホモシステインは濃度依存性にTH陽性細胞およびMAP-2陽性細胞の生存率を低下させた。TH陽性細胞はMAP-2陽性細胞に比してホモシステイン暴露に対する脆弱性を認めた。またドパミン及びMPP+はホモシステイン毒性を増強した。

【結論】ドパミン神経細胞はホモシステイン毒性に対して脆弱であり、高ホモシステイン血症の是正はパーキンソン病進行抑制に関与する可能性がある。

A.研究目的

近年、含硫アミノ酸のひとつであるホモシステインの細胞毒性が注目され、高ホモシステイン血症が虚血性心疾患や脳血管障害、アルツハイマー病などの認知症の発症リスクを上昇させることが報告されている。我々は、パーキンソン病患者に高ホモシステイン血症を有する症例が存在しL-DOPA治療とMTHFR遺伝子多型が関与していることを報告し、高ホモシステイン血症がパーキンソン病の進行に関与している可能性を検討してきた。今回、培養細胞を用いてドパミン神経細胞のホモシステイン毒性に対する脆弱性を検討したので報告する。

B.研究方法

胎生14日ラット由来初代中脳神経培養を用いて検討を行なった。培養細胞にホモシステインを投与し、24時間後にTH(tyrosine hydroxylase)およびMAP2(microtubule associated protein 2)の二重免疫染色を行い生存神経細胞の評価を行った。またチロシン水酸化酵素阻害薬である α メチルチロシン及びVMAT阻害薬であるレセルピンを投与し、ホモシステイン毒性と細胞内ドパミンとの関係を検討した。さらにホモシステイン毒性とMPP+毒性との相互作用を検討した。

C. 研究結果

ホモシステインは濃度依存性に TH 陽性細胞, MAP2 陽性細胞の生存を減少させた (Figure 1). TH 陽性細胞は MAP2 陽性細胞に比して, ホモシステイン毒性に対して脆弱であった.

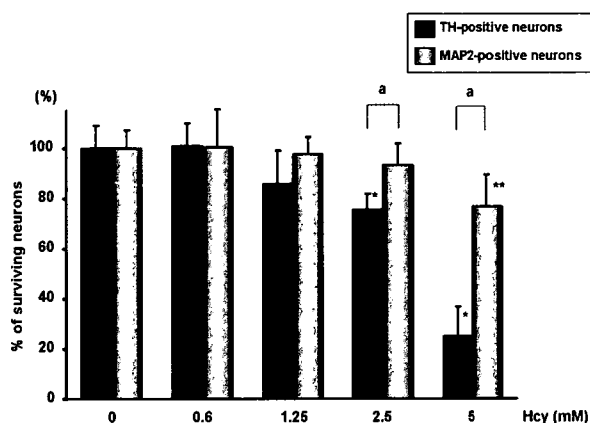


Figure 1.

また α メチルチロシンはホモシステイン毒性を減弱させ, 一方レセルピンはホモシステイン毒性を増強した (Figure 2). 以上から, 細胞内ドパミンはホモシステイン毒性を増強することが示唆された. またホモシステインは MPP⁺毒性を増強した (Figure 3).

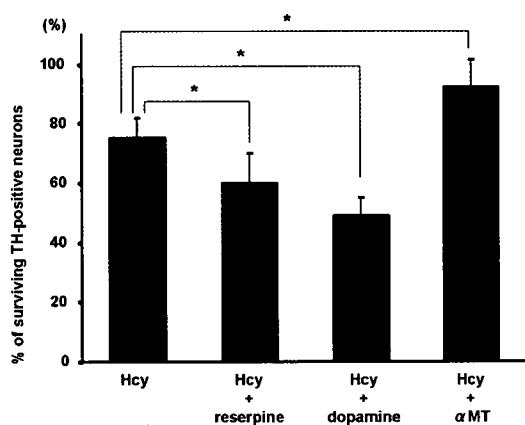


Figure 2.

D. 考察

細胞内ドパミンはホモシステイン毒性を増強することが示唆された. またホモシステインは

MPP⁺毒性を増強し, ホモシステイン毒性の一部は酸化ストレスと関連していることが示唆された.

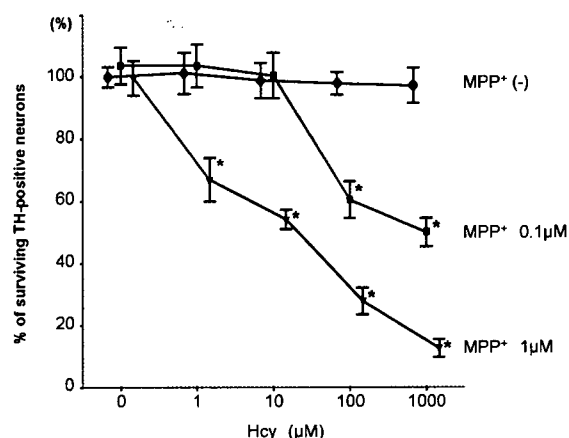


Figure.3

E. 結論

ドパミン神経細胞はホモシステイン毒性に対して脆弱である. 高ホモシステイン血症の是正はパーキンソン病進行抑制に関与する可能性がある.

F. 文献

Yasui K, et al. Acta Neurol Scand 2003; 108: 66-67.

G. 健康危険情報

特記事項なし

H. 研究発表

1. 論文発表

Imamura K. et al. Neuroreport 2007; 18: 1319-22.

2. 学会発表

第 48 回日本神経学会総会

初代中脳ドパミン神経細胞におけるホモシステイン毒性. 今村恵子, 他