

血中動態の多様性からみた L-dopa 至適投与量

千原 典夫

近土 善行, 古澤 嘉彦, 村田 佳子, 村田 美穂, 久野 貞子

国立精神神経センター病院 神経内科

研究要旨

Parkinson 病(PD)患者の L-dopa 投与は治療戦略の基軸となる。その吸収量は患者毎に異なると予想されるが、投与の際にそれが考慮されることは少ない。2006 年 10 月～2008 年 10 月まで L-dopa 投与後の血中濃度と症状の変化を追った PD 症例において、L-dopa 吸収量と症状の関連を検討した。吸収量が過量のものでは biphasic dyskinesia を伴うなど投与量の減量が考慮された。一方で吸収量が不十分のものでは一回投与量を増やして初めて症状改善がみられるものがあった。PD 治療において L-dopa の吸収量を考慮した薬剤投与が望まれる。

A. 研究目的

PD 患者における L-dopa 薬物動態と Wearing-off を中心とした症状との比較により、患者ごとの L-dopa の至適投与量を考察する

B. 研究方法

当院において 2006 年 10 月～2008 年 10 月にかけて L-dopa 治療に関して何らかの問題があり、L-dopa 投与後の血中濃度と臨床症状を評価(以下 L-dopa test と称する)した連続症例 138 例の観察研究を行った(PD 127 例, MSA-P 8 例, CBD 2 例, pure-akinesia 1 例)。内、臨床的に PD と診断されている患者で空腹時に L-dopa test を行った 81 例について血中濃度動態と患者背景や症状を比較した。空腹時に行った理由は、L-dopa が LNAA システム(Large neutral amino acid system)と呼ばれるアミノ酸トランスポーターを介して吸収されるので、L-dopa 吸収は食事により影響を受けることが知られているからである。また、L-dopa の血中動態は中枢のドパミン動態とよく相関することが動物実験で証明されており²⁾、中枢のドパミン動態を推定しようと考えた。L-dopa 治療が長期になると血中動態が変化することから³⁾、L-dopa 治療期間 5 年未満 (n=31) と 5 年以上(n=40)に分けて解析した(投与期間が明らかでないものと脳深部刺激療法施行例は除いた)。検査結果は患者治療に還元し、本研究での解析には個人を特定できる情報を除いた。

C. 研究結果

観察対象は平均発症年齢 54 才(23～76 才)、平均罹患期間 9 年(1～33 年)、ADL は H-Y 分類で平均 3 程度であった。L-dopa 合剤(carbidopa10mg または benserazide25mg+L-dopa100mg)服用で血中濃度の最大値 Cmax は 2.18～21.7 nmol/ml、L-dopa 吸収量の指標として L-dopa test 中の血中濃度曲線による面積から算出される AUC は 2.7～22.8 nmol/ml・hr と血中濃度動態は極めて多様であった。L-dopa 治療期間が 5 年以上の群では平均発症年齢は 53 才(23～76 才)、平均罹患期間 11 年(1～33 年)、ADL は H-Y 分類で平均 3 程度であった。Wearing-off (W-O)症状を 65%に、dyskinesia を 52%に認めた。AUC は平均 11.0 nmol/ml・hr (4.24～22.8)と幅広かったがほぼ正規分布を取った(図 1)。そこで平均値±SD の標準群とそれ以外の非標準群(高 AUC, 低 AUC 群)に分けて検討した。標準群では血中濃度の最大値である Cmax やそれを得るまでの時間である Tmax の分布においても平均値±SD の範囲内に 97.5%以上が含まれていた。標準群では W-O 症状の有無によって二群に分けて検討したところ、AUC や Cmax, Tmax には大きな差はなかったが、W-O 症状を有する群では L-dopa 治療期間が平均 10 年(5～30 年)と有さない群の平均 6 年(5～8 年)と比して長かった。一方で、L-dopa による症状の改善の程度は様々であった。Rigidity は両群とも経時的に一定の改善を示した。振戦も改善を示したが、その程度

は少なかった。Akinesiaの指標である臥位から立位までの起き上がり時間や5mを往復する歩行時間はW-O症状を有するものでは、投与前の動作が遅く、L-dopaの投与によって劇的にその時間が短縮する傾向にあった。W-O症状を有しないものでは、L-dopa投与前後でその動作時間は変化なかった。W-O症状を有する群ではL-dopa濃度変動に伴い症状が変動し、W-O症状を有さない群ではL-dopa濃度の変動にも関わらず、一定の症状を維持できている事実は、W-O症状の出現には中枢でのドパミンの保持能力の有無がもっとも重要であることを示していると考えられた。

一方非標準群における検討では高AUC群において必要以上に高いCmax値となっており、低AUC群では濃度上昇が不十分であるために症状改善が得られていないものがあつた。以下に症例ごとに記載する。

症例1. 74歳女性(高AUC例): 図2

L-dopa投与歴は13年。L-dopaの血中濃度は15分でCmax(21.65nmol/ml)に達し、患者は劇的な症状の改善を感じている。しかし、その後dyskinesiaが出現した。最も症状が改善した状態を得るための血中濃度をその効果発現時間から推測すると、効果出現閾値は3.85nmol/mlで、5倍以上の血中濃度上昇を得ていたことになる。

症例2. 64歳男性(低AUC例): 図3

L-dopa投与歴は9年。外来ではL-dopa合剤を1回量100mgの食後投与で十分な効果が得られずL-dopa testを食前200mg投与で行った。200mg投与では標準群で見られる程度のCmax(8nmol/ml)を得、症状改善が見られたが、その改善から推測する効果発現のための閾値は4nmol/ml程度で、100mg投与では症状改善が得られないと推測された。

最後にL-dopa投与期間が5年未満の例について検討した。この群においても吸収が不十分であるために症状改善が得られていないものがあつた。以下にその例を示す

症例3. 68歳女性: 図4

L-dopa投与歴は3年。症例2と同じように外来ではL-dopa合剤を1回量100mgの食後投与を行われていたが十分な効果を認めなかった。入院して空腹時にL-dopa合剤200mg投与を行い、標準的な血中濃度を得た。症状の一つとして指タップの改善が持続する時間を血中濃度の変化に外挿すると100mg投与では効果

がみられなかったと推察された。

D. 考察

L-dopaはPD治療の主軸となるが、その投与量に関して、吸収量が考慮されることは少ない。今回、食事の影響を排除するために、食前にL-dopa testを行ったが、その血中濃度の変化は千差万別であつた。

L-dopa投与が5年を過ぎるとW-O症状やdyskinesiaの頻度が増すが、L-dopa過量投与によってもその頻度が増すことが知られている⁹⁾。吸収量に関しても同様であると予想されるが、AUC値の分布によって標準群とした平均値±SDの群においては、W-O症状の出現の有無はL-dopa投与期間(ほぼ罹患期間に相関する)の影響が大きかった。

一方、吸収量が他とは大きく異なる非標準群においては、当然のことながら臨床効果に大きな影響を与えていた。高AUC群ではCmaxの著明高値を示しており、食前のL-dopaによって15分で症状が改善し、dyskinesiaが出現しやすく中にはbiphasicになるものもあつた。吸収量が大きくなる原因として、若年発症で急峻な吸収パターン(Cmaxが高く、Tmaxが短くなる)をとるもの⁹⁾や体重が30kg台と極端に低いものが挙げられる。このような場合は高濃度L-dopaの刺激によるdyskinesiaの出現、W-O症状の増悪を防ぐためCmaxを下げる必要がある。

一方低AUC群では血中濃度が十分上昇しないために症状の改善が見られず、一回投与量を増やすことで、患者がその効果を実感できた。吸収量が小さくなる原因として、体重が90kg台と極端に重い、胃瘻の手術で胃を切除している、制酸剤を用いているなどが挙げられる。まして外来では100mgが食後投与されていたのでさらにCmaxが低かったと予想される。このような患者では一回投与量を増量することで初めて改善がみられる。L-dopa内服開始後間もない患者でも低AUCを示す患者がおり、MSA等との鑑別が問題になったが、食前投与、1回量増量により、効果を確認することができた。

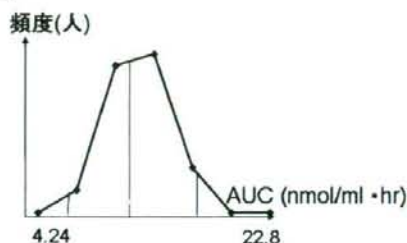
E. 結論

L-dopa血中動態は個人差が大きく、同量のL-dopa合剤服用でもAUC(吸収量)は大きく異なる。

L-dopa長期投与例においてはL-dopa有効例の中には、Cmaxが非常に高い例があり、過剰投与に注意する必要がある。吸収障害のためAUCが低く、効果不十分な

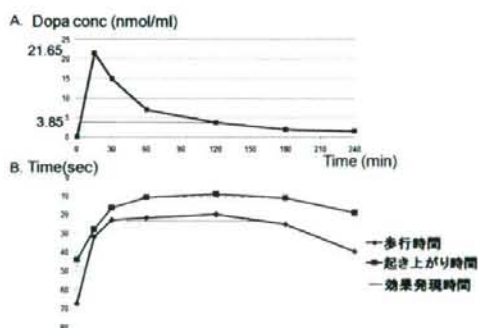
場合は一回投与量を増やすことで症状が改善する例がある。初期のPDでもL-dopa 合剤 100mg 投与で効果が得られない場合があり、食前投与は1回投与量の増量によりL-dopa の効果を確認することは他のパーキンソニズムを呈する疾患との鑑別に有用である。

図 1.



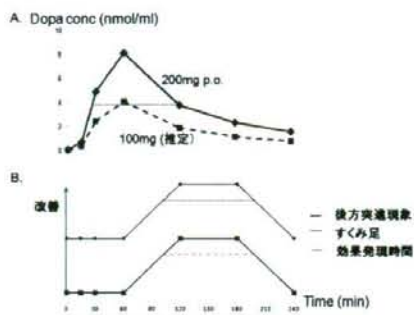
AUC 値は 4.24~22.8nmol/ml*hr と様々であったが、ほぼ正規分布を取り、平均±SD(両矢印間)を標準群とした。

図 2



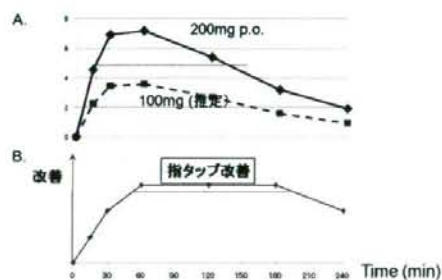
上図 A. は L-dopa 血中動態で X 軸は L-dopa 服用後の時間、Y 軸は血中濃度を示す、下図 B. の Y 軸は症状改善の程度を示す、血中濃度は C_{max} 21.65nmol/ml, T_{max} 15 分で、血中濃度変動に少し遅れて症状の改善が見られている。最も症状が改善している時間を効果発現時間とし、その時間を血中濃度曲線に外挿して得られる L-dopa 効果出現閾値は 3.85nmol/ml となる。

図 3



上図 A. は血中濃度、下図 B. は症状改善の推移を示している。200mg 投与によって標準的な血中濃度上昇が見られ、症状が改善している。しかし、その効果発現時間から推測した症状改善のための L-dopa 効果閾値は 4nmol/ml となり、100mg 投与では効果が得られなかったと推測される。

図 4



上図 A. は血中濃度、下図 B. は症状改善の推移を示している。200mg 投与では改善が見られるが、100mg では効果出現閾値に達せず、効果が得られなかったと考えられた。

参考文献

- 1) Contin M, Riva R, Albani F, et.al: Pharmacokinetic optimization in the treatment of Parkinson's disease. Clin Pharmacokinet. 1996 ; 30(6) : 463-481
- 2) Murata. M, Kanazawa I: Repeated L-dopa administration reduced the ability of dopamine storage and abolishes the supersensitivity of dopamine receptors in the striatum of intact rat.

Neurosci Res 1993; 16: 15-23

3) Murata M, Kanazawa I: Effects of chronic levodopa therapy on dopa pharmacokinetics. Eur Neurol 1997; 38(suppl2)50-55

4) The Parkinson Study Group: Levodopa and the progression of Parkinson's disease. NEJM 2004 ; 351 : 2498-2508

5) Murata M, Mizusawa H, Yamanouchi H, et.al : Chronic levodopa therapy enhances dopa absorption: contribution to wearing off. J Neural transm 1996 ; 103 : 1177-1185

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

日本神経学会総会にて発表(予定)

H.知的所有権の取得状況

なし

パーキンソン病の日常診療における L-dopa の血中動態

研究分担者氏名：野元正弘¹⁾

研究協力者氏名：永井将弘¹⁾、久保 円¹⁾、矢部勇人¹⁾

西川典子¹⁾、森豊浩代子¹⁾、森豊隆志¹⁾

¹⁾ 愛媛大学大学院医学系研究科病態治療内科学

研究要旨（10 ポイント程度）

日常診療中の L-dopa 血中濃度の測定結果を解析した。今回 1 日 3 回毎食後に L-dopa/DCI 合剤を服用したパーキンソン病症例を対象とした。L-dopa 血中動態は毎食後遅延なく吸収されている症例が半数あり、残りの半数は予想と異なるパターンを示した。毎食後 3 回の L-dopa 最高血中濃度には有意な違いは認められなかった。抗コリン薬服用者の L-dopa 血中動態は、非服用者と比べて低値であった。

A. 研究目的

L-dopa 製剤は現在もおパーキンソン病治療薬の gold standard として幅広く使用されているが、半減期が短く、また吸収が不安定で食事等の影響をうけることが欠点としてあげられる。また、進行期 PD 患者においては L-dopa 長期治療に伴い wearing-off 現象やジスキネジアなどの運動合併症が発現してくる。このため日常診療において L-dopa 製剤の投与量、投与時間の調整が必要となる場面が多々ある。L-dopa 調整時において患者各個人の L-dopa 薬物動態を知ることは合理的薬物治療の面からも大切であり、当教室は外部施設から依頼された L-dopa の血中濃度測定も行なっている。本研究はこれらのデータを基に日常診療における L-dopa 血中動態を解析することにより、今後の L-dopa 治療の向上を目的とするものである。

B. 研究方法

日常診療中の L-dopa 血中濃度の結果を解析した。今回は 1 日 3 回毎食後に L-dopa/ドパ脱炭酸酵素阻害薬（DCI）合剤を服用し、また、朝から夕まで経時的に複数回採血された 76 症例を解析の対

象とした（食前投与や 4 回以上投与された症例は今回の解析には含まれていない）。L-dopa 血中濃度は HPLC を用い測定した。

C. 研究結果

1) L-dopa 血中濃度検査実績

当教室における、外部施設からの L-dopa 血中濃度測定依頼は年々増加し、2008 年は 10 月末の時点でおよそ 1000 検体となった。

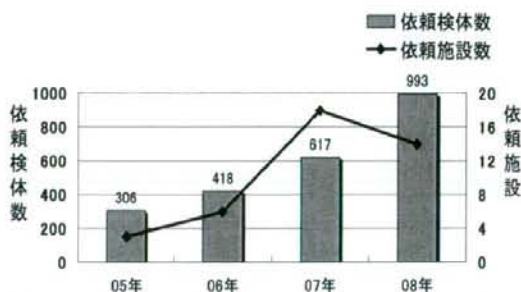


図 1. L-dopa 血中濃度測定の年間依頼検体数と年間依頼施設数の変化

2) 患者背景

対象 76 症例の内訳は女性 44 例、男性 32 例、平均年齢 71.8 歳、平均罹病期間 8.8 年であった。

採血間隔は1時間毎が13症例、2時間毎が61症例、3時間毎が2症例であった。

3) L-dopa/DCI 合剤使用状況

L-dopa/DCI 合剤平均投与量は、朝食後 107.2mg、昼食後 106.6mg、夕食後 102.6mg と夕食後の用量が若干少なかったが、有意な差ではなかった。

L-dopa/DCI 合剤一回投与量は 100mg 使用が 85.9%と 大多数を占めていた。ついで 150mg (7.9%)、50mg (3.1%)、200mg (3.1%)であった。DCI 種類別の使用頻度はカルビドパが 69 例 (91%)、ベンセラジド 7 例 (9%)であった。

4) 毎食後服用における平均 L-dopa 血中濃度

76 症例のうち、L-dopa/DCI 合剤 1 回量 100mg を 1 日 3 回服用している 63 例の毎食後 L-dopa 血中濃度を検討した。朝食後投与から昼までの平均最高血中濃度は 5.4 μ M で、昼食後、夕食後投与では 7.1 μ M であった。しかし、1.14 μ M から 22.13 μ M と L-dopa の吸収には大きな個人差が認められた (表 1)。

表 1. 平均 L-dopa 最高血中濃度

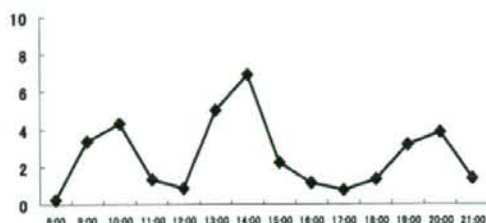
	朝～昼	昼～夕	夕～夜
最高血中濃度(μ M)	5.4 \pm 2.6	7.1 \pm 3.3	7.1 \pm 4.3
(1.45~15.76)	(2.28~18.24)	(1.14~22.13)	

5) L-dopa 血中濃度日内変動のパターン

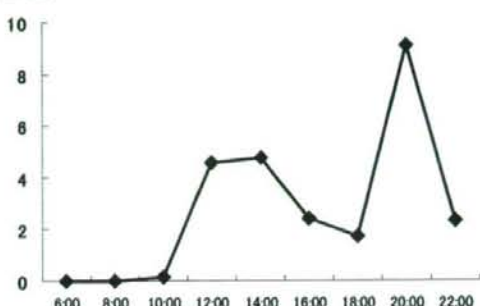
76 症例の L-dopa 血中濃度を下記の 5 型に分類し検討した (図 2)。

(A 型) L-dopa が毎食後遅延なく吸収されているタイプ、(B 型) 朝食後 L-dopa の吸収遅延タイプ、(C 型) L-dopa 血中濃度が徐々に増加してくるタイプ、(D 型) L-dopa 血中濃度が低濃度で一定なタイプ、(E 型) その他。A 型が一番多く全体の 51% を占めていた。引き続き B 型 20%、C 型 12%、D 型 8%、E 型 9%であった。

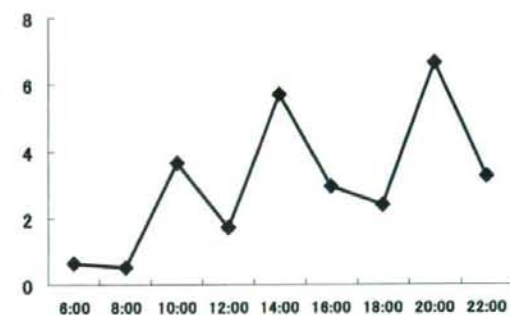
A 型



B 型



C 型



D 型

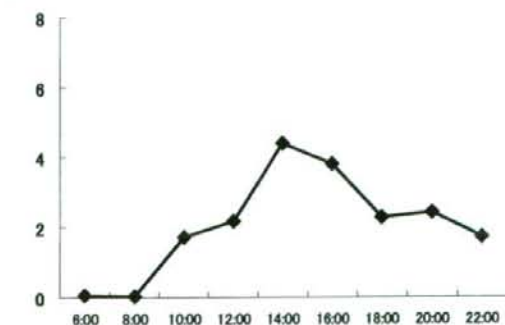


図 2. L-dopa 血中濃度のパターンによる分類 A 型から D 型までの典型例を示す。グラフの横軸は採血時間、縦軸は L-dopa 血中濃度 (μ M) を示している。

6) 抗コリン薬併用による L-dopa 血中動態の違い

L-dopa/DCI 合剤 1 回量 100mg を 1 日 3 回服用している 63 例中、抗コリン薬を併用している 8 例と抗コリン薬を併用していない 48 例（残り 7 例は抗コリン薬の使用の有無が不明）の L-dopa 血中動態を検討した。

抗コリン薬併用患者の朝食後平均 L-dopa 血中濃度は $3.6\mu\text{M}$ と、抗コリン薬を併用していない患者 $5.8\mu\text{M}$ と比較して有意に低下していた。昼食後、夕食後投与時も低下傾向にあったが有意差は認められなかった。

表 2 抗コリン薬併用による平均 L-dopa 最高血中濃度の変化

最高血中濃度 (μM)	朝～昼	昼～夕	夕～夜
抗コリンあり (n=8)	$3.6\pm 1.2\ddagger$ (1.96~5.36)	5.9 ± 2.2 (3.25~9.47)	6.1 ± 2.0 (2.81~8.77)
抗コリンなし (n=48)	5.8 ± 2.7 (1.46~15.76)	7.5 ± 3.5 (2.28~18.24)	7.7 ± 4.5 (2.28~22.13)

$\ddagger P < 0.05$ Mann-Whitney U test

D. 考察

パーキンソン病患者の L-dopa 血中動態を測定することにより 1) 運動合併症に対する合理的な薬物調整が可能になる、2) 症状改善効果がみられないとき L-dopa 血中濃度に起因するものかどうか知ることができる、3) 医師が実際の L-dopa 薬物動態を知ることにより、薬物調整（さじ加減）のイメージがわかりやすくなる、4) 患者の薬物治療に対する理解を深める手助けになる、5) エンタカポンなど L-dopa 血中濃度に及ぼす薬物の効果的使用に役立つ。上記利点の普及のため当教室は外部施設からの L-dopa 血中濃度測定依頼を受けている。

L-dopa 薬物動態を考慮して、L-dopa 血中濃度測定のための採血ポイントは、1 時間ごとを当教室

では推奨している。しかし、施設ごとの実施上の制約等で今回は 2 時間ごとの採血症例が多かった。したがって、本研究で示している L-dopa 最高血中濃度より、実際の L-dopa 最高血中濃度は高いものと推測されこの点は留意しておく必要がある。本研究の結果 1 日 3 回毎食後 L-dopa 服用患者における平均 L-dopa 血中動態は類似していた。朝食後の L-dopa 血中濃度より昼食後の血中濃度が高いのは、朝食後の L-dopa が血中に残っている上に、昼食後の L-dopa が上乘せされた結果と思われる。しかし、個々の症例では L-dopa 血中動態は変化に富んだものであり、種々のパターンがみられた。毎食後 L-dopa が遅延なく吸収されている例は半数に過ぎなかった。C 型は L-dopa/DCI 合剤を 1 回 150mg 以上もしくはエンタカポン併用患者に多くみられ、L-dopa 最高血中濃度の上昇もしくは半減期の延長に起因するものと思われる。Wearing-off 現象がみられるパーキンソン病患者の日常診療において、午後服用の L-dopa の効きが悪いのをしばしば経験するが、午前中の吸収が悪い B 型が 20% をしめることは予想外であった。L-dopa の効果が午後低下する要因には薬物動態以外の因子が関与することが予想される。また、Wearing-off 現象が発現している患者は、4 回以上 L-dopa を服用していることが多いが、本研究では 1 日 3 回 L-dopa 服用患者のみを対象としている。このことが臨床経験と今回の結果が乖離した要因の一つであるとも考えられ、今後頻回投与症例における、L-dopa 血中動態を検討してみる必要がある。

抗コリン薬は消化管運動を低下させるため、抗コリン薬併用により L-dopa 最高血中濃度が低下したことは矛盾しない。今後症例数を増やして多数例での確認が必要である。

E. 結論

L-dopa 血中動態は毎食後遅延なく吸収されている症例が半数あり、残りの半数は予想と異なるパターンを示した。毎食後 3 回の L-dopa 最高血中

濃度には有意な違いは認められなかったが、10倍以上の個体差を認めた。抗コリン薬服用者のL-dopa 血中動態は、非服用者と比べて低値であった。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得 なし

2.実用新案登録 なし

3.その他

八升豆に含有される L-dopa と血中動態

研究分担者氏名：野元正弘¹⁾

研究協力者氏名：永井将弘¹⁾、久保 円¹⁾、矢部勇人¹⁾、西川典子¹⁾

¹⁾ 愛媛大学大学院医学系研究科病態治療内科学

研究要旨（10 ポイント程度）

八升豆（ムクナ）に含まれる L-dopa 含有量とその調理法による変化、健常成人およびパーキンソン病患者に八升豆を投与した時の L-dopa 血中動態、パーキンソン病症状改善効果を検討した。八升豆は約 5% の L-dopa を含んでおり 10 分以上の加熱により含有量は低下した。八升豆粉末を服用した場合 L-dopa / benserazide 合剤と比べて、ドパミンおよびその代謝物は増加し L-dopa 単剤と同様であった。八升豆服用によりパーキンソン病症状の改善効果を認めた。

A. 研究目的

ムクナ (*mucuna*) は熱帯地方（インド、ネパールなど）に生息する蔓性の豆であり、インドの民間療法では薬草として古くより使用されてきた。日本においては、八升豆と呼ばれ江戸時代に食用にされていたが、現在においては食用として用いられることはほとんどない。空気中の窒素を固定し、雑草の発育を抑える働きがあるため、現在では緑肥としてトウモロコシなどの農作物と栽培されている。日本での栽培限界区域は関東地方であり、日本で栽培可能なムクナは、日本在来品種である八升豆とアメリカ改良品種であるフロリダベルベットピーン(Fvb)である。ムクナの葉と実には L-dopa が含まれることが知られているが、調理法による L-dopa 含有量の変化と服用時の L-dopa 薬物動態に関する情報は少ない。我々は治療に八升豆を食している患者、およびサプリメントとして八升豆の粉を用いている患者の担当医師から成分について相談を受けた。昨今の健康食品ブームで一部のパーキンソン病患者は八升豆を服用している。そのため、パーキンソン病を診察している医師や薬剤師にとって八升豆に関する情報は今後の臨床応用、副作用回避の面から

も必要である。本研究では八升豆に含まれる L-dopa 量の調理時における変化と、八升豆服用時の L-dopa 血中動態を検討した。

B. 研究方法

1) 八升豆に含まれる L-dopa 量の検討

八升豆を粉末にし、0.1%アスコルビン酸含有 50% エタノールにて一晩浸透させた後上清を採取、HPLC を用い L-dopa 量を測定した。

2) 調理による L-dopa 含有量の変化

フライパンにて八升豆を 5~40 分中火で炒り、粉末にした後 L-dopa 量を測定した。

3) 健常成人男性における L-dopa 血中動態の検討

健常成人男性 6 名を対象とした。5 分間炒った八升豆を粉末にし、八升豆粉末 8g (L-dopa を 500mg 含有) を水 200mL で投与した。その後 240 分まで経時的に採血し、L-dopa と代謝物の血中濃度を測定した。得られた L-dopa 薬物動態は、健常人における L-dopa/benserazide (100/25mg) 製剤服用時の薬物動態と比較検討した。

4) パーキンソン病患者における八升豆の効果

Wearing-off 現象の見られるパーキンソン病患者 1 例(59 歳女性)に対して、八升豆粉末 1.6g を投与、

L-dopa 血中濃度と臨床症状の変化を検討した。本研究は愛媛大学医学部臨床研究倫理審査専門委員会にて承認を得た後実施した。また、被験者より文書にて同意を得た。

C. 研究結果

- 1) 八升豆 1 個の平均重量は 1.1g であり L-dopa を 4.4% 含有していた。アメリカ改良種である Fvb1 個の平均重量は 1.5g であり L-dopa 含有量は 6.2% であった。
- 2) 八升豆の L-dopa 含有量は、5 分間の炒り時間では低下しなかったが、10 分以上の加熱により、八升豆中の L-dopa 含有量は低下し始め、30 分の調理で約 1/4 に低下した。(表 1)。

表 1. 加熱時間による L-dopa 含有量の変化

炒り時間 (分)	L-dopa 含有量 (%)
生豆	4.4
5	5.3
10	3.9
20	3.4
30	1.1
40	1.3

- 3) 八升豆に含まれる L-dopa は健康成人男性中の血液にも検出され、L-dopa 血中動態は C_{max} 22.4, AUC_{0-4h} 19.0 μM hr, T_{max} 27.5min, $T_{1/2}$ 35.1min であった。L-dopa 合剤時の血中動態と比較して、 C_{max} 、 AUC は増加し、 T_{max} 、 $T_{1/2}$ は短縮した (図 1)。

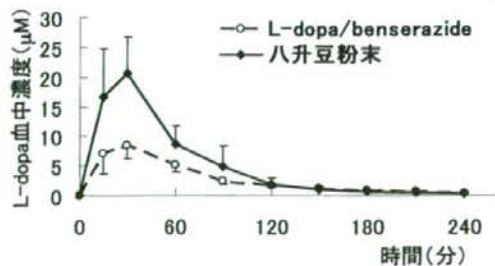


図 1. 健康成人における L-dopa 血中濃度
L-dopa 代謝物であるドパミン、HVA 濃度は、L-dopa 合剤服用時と比べて上昇していたが、3-OMD 濃度は逆に低下した (図 2)。

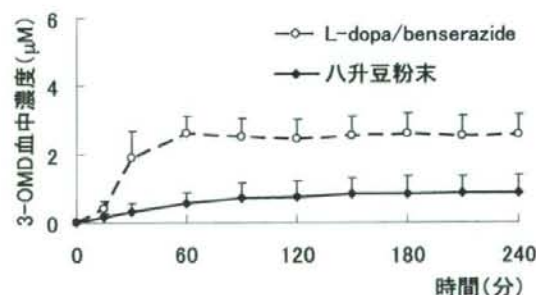
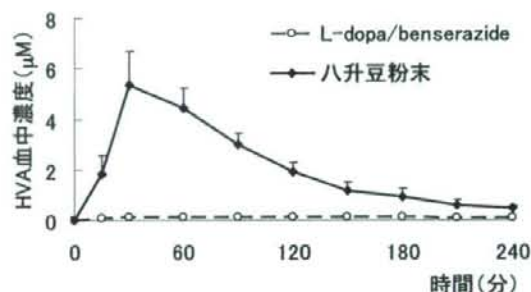
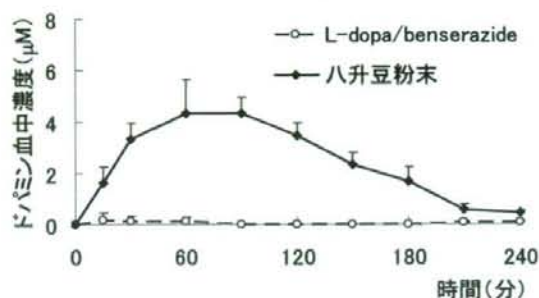


図 2. 健康成人における L-dopa 代謝物血中濃度

- 4) L-dopa/carbidopa 合剤 700mg 7x で服用しているパーキンソン病患者の off 時間に八升豆粉末を投与した。L-dopa 血中濃度は約 4 μM 増加し、UPDRS partIII も 22 点から 11 点に改善した。

有害事象の発現は八升豆を服用した被験者全てにおいて認められなかった。

D.考察

八升豆1個の重量が1.1g、L-dopa含有量が4.4～5.3%より、八升豆1個は40～48mgのL-dopaを含有している。健常成人L-dopa薬物動態の比較によりL-dopa合剤100mgと八升豆4gがほぼ等価であると推計された。今回、八升豆服用によりパーキンソン病患者の運動症状が改善したことより、八升豆に含まれる物質（HPLCにてL-dopaと同じ保持時間に検出されたピーク）は、実際にL-dopaであり、抗パーキンソン病作用を有することが確認された。

八升豆のL-dopa血中動態がL-dopa錠剤と比較して急峻なのは、粉末が錠剤よりも吸収が良好であった結果と思われる。この利点をいかしてL-dopa製剤の吸収が不良なdelayed on、no-on症例に試してみる価値はあると思われる。しかし、急峻なL-dopa血中動態に基づくドパミン受容体刺激はジスキネジアなどの誘因となりえる。今後、八升豆を煮てそのまま服用するなど、調理法により緩徐なL-dopa血中動態が得られるかの検討も必要である。

L-dopaは末梢でドパ脱炭酸酵素によりドパミン、HVAに代謝される。しかし、benserazideなどのドパ脱炭酸酵素阻害薬を併用するとL-dopa代謝はCOMTを介する代謝系にシフトし代謝物である3-OMDが増加し、ドパミン、HVAは低下する。八升豆服用によりドパミン、HVAは増加し、3-OMDは低下したことより、八升豆はドパ脱炭酸阻害作用を有しないことが推測された。通常、L-dopa単剤服用時には、ドパミン増加に伴い嘔気が有害事象として発現することが多い。今回、健常人6名とも、血中のドパミン濃度が上昇したにもかかわらず嘔気等の有害事象を認めなかった。被験者数が少なく偶然の結果とも考えられるが、八升豆に嘔気発現を抑制する物質が含まれている可能性もある。

近年、ムクナを含んだ健康食品が多くでまわっておりインターネットを利用して購入も可能である。しかし、薬物動態、薬効、副作用に関する情

報はほとんどない。今後パーキンソン病に対する八升豆の適切な臨床応用に向けて、本研究をさらに発展させて検討する必要がある。

E.結論

八升豆に含まれるL-dopa量は調理によって変化した。八升豆粉末服用によりL-dopaは体内に吸収され、抗パーキンソン病作用を示した。

F.健康危険情報

八升豆服用による有害事象は認められなかった

G.研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

第2回MDSJ学術集会(2008)京都

12th MDS annual meeting (2008) Chicago, USA

H.知的所有権の取得状況(予定を含む)

1.特許取得 なし

2.実用新案登録 なし

3.その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
神経変性疾患に関する調査研究班（分担）研究報告書

カテコラミン系細胞における α -synuclein の毒性機序と抑制剤の探索

中島健二，中曾一裕，伊藤悟，今村恵子，竹島多賀夫
鳥取大学医学部脳神経内科

研究要旨

パーキンソン病(PD)はドパミン系神経細胞死と Lewy 小体出現を特徴とし、本疾患の病態解明にはドパミン神経の選択的脆弱性機序を明らかにすることが重要と考えられる。我々は、Tet 調節系 α -synuclein(α syn)発現 PC12 細胞、同様に Y125D, S129A 変異体、 β -synuclein 発現細胞を構築し、Tet-OFF(α syn 誘導)状態においてカテコラミン(CA)と α syn の相互作用につき細胞毒性、可溶性オリゴマー形成の観点から検討した。Tet-OFF, NGF 存在下 5 日間培養で野生型 α syn 発現細胞では 35.0%の生存率低下がみられた。Y125D 細胞, S129A 細胞, β -synuclein 細胞での生存率低下は軽度にとどまった。PBA-アガロースビーズを用いた検討で CA と α syn の結合が示唆されること、 α -メチルチロシンにより α syn 毒性、重合化が抑制されることからこれらの現象に α syn-CA 結合が重要と考えられた。結合部位候補 125YEMPS129 を含むペプチドを作成し投与したところ生存率低下が抑制され、*in vitro* での可溶性オリゴマー形成も抑制された。これらの現象には CA 酸化産物であるキノン体の関与が考えられ、キノン体消去作用が報告されている薬剤(ゾニサミド)で細胞死抑制作用を認めた。PD の病態において細胞死と Lewy 小体形成両者に CA と α syn(C 末側)との共作用が重要と考えられ、更なる病態解明や治療薬の検索に重要な知見と考えられた。

A. 研究目的

パーキンソン病(PD)はドパミン系神経における細胞死と Lewy 小体出現を特徴とする神経変性疾患である。 α -synuclein(α syn)は Lewy 小体の主要構成成分のひとつであり、家族性パーキンソン病 PARK1, PARK4 の原因遺伝子産物でもある。PDにおいて、なぜドパミン系神経細胞に選択的細胞死が生じるのか、またなぜドパミン系神経細胞において Lewy 小体が形成されやすいのかを解明することが、PD の病態解明、疾患克服に必要不可欠であると考えられる。

内外の報告によると、 α syn は可溶性オリゴマーの状態では毒性に作用するが、細胞内ではドパミン系細胞(あるいはカテコラミン系細胞全般)においては毒性に作用し、非ドパミン系細胞においては細胞保護的に作用する。その理由に関しては不明の点が未だ多く残されている。

今回我々は、内在的にカテコラミン代謝を持つ PC12 細胞を用い、ヒト α syn およびその変異体を過剰発現させることで、カテコラミン- α syn の共作用による細胞毒性モデルを構築し、その毒性機序を明らかにすることを試みた。また、その知見とを元にして、PC12 細胞における α syn の細胞毒性を軽減する薬剤の検索を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) PC12細胞を用いたヒト α syn発現細胞の構築

PC12細胞を用いてヒト α syn (野生型, Y125D, S129A) および β -synuclein (β syn) 発現を薬剤により調節できる系を作製した (Tet-OFF: 実際にはドキシサイクリン(Dox) off で発現誘導)。

2) α syn発現細胞を用いた細胞生存率の検討

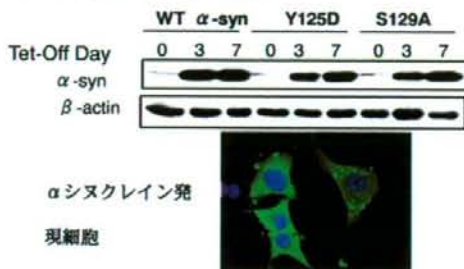
Tet-OFF により α syn, β syn を発現させ、生存率の変化を MTT 法で検討した。また、カテコラミン代謝を抑制するため、チロシン水酸化酵素の競合的阻害剤 α -メチルチロシン (α MT) 100 μ M 投与で生存率の変化を同様に検討した。各種薬剤の保護効果に関しても同様に MTT 法で検討した。

3) ペプチドおよび各種薬剤を用いた α syn-カテコラミン作用部位の同定

α syn の内部配列を利用したペプチドを作製し、*in vitro* oligomerization の検討およびキノン消去能の検討から、 α syn 重合化および細胞毒性に重要と考えられる配列の同定を行った。また、その配列を利用したペプチドを競合的に用いることによる細胞保護効果の検討を行った (MTT 法)。さらに、既存の抗パーキンソン病薬における細胞保護効果を、キノン消去能の観点から検討した。

C. 研究結果

1) α syn 発現細胞の構築



PC12-TetOFF 細胞株を用い、ヒト α syn 発現をテトラサイクリン (実際には Dox: ドキシサイクリン) を使用し、濃度により調節できる細胞株を確立した。この細胞株では、TetOFF 後 2~3 日より α syn の発現が認められ、7 日まで経時的に発現量が増加した。同様に、Y125D, S129A の各変異体、 β syn 発現細胞も確立した。

2) α syn 発現細胞を用いた細胞生存率と α syn 重合化の検討

Tet-Off (発現誘導条件)、NGF 存在下 5, 7 日間培養で野生型 α syn 発現細胞では発現非誘導条件に比べて生存率がそれぞれ 65.0%, 28.4% まで低下した。一方、 α MT (100 μ M) によりカテコラミン代謝を抑制すると、7 日時点で 71.5% までの生存率低下にとどまった。Y125D 細胞、S129A 細胞、 β syn 発現細胞での生存率低下は野生型に比して軽度だった。

α syn 発現 PC12 細胞では、 α syn 非誘導時に比べ、ミトコンドリア毒性 (rotenone), ER ストレス (lapsigargin, 2-ME, tunicamycin), genotoxin (etoposide) に顕著な脆弱性を示した。この細胞外からの毒性物質による脆弱性は α MT 投与により軽減された。

また、 α MT (100 μ M) 投与は α syn 発現 PC12 細胞内における α syn 重合化を抑制した。

In vitro 実験より、 α syn とカテコラミンないしその酸化産物が直接結合する可能性が示唆された。さらにキノン消去能のあるシスチンが α syn 重合化を抑制することから、ドパミンやドパの酸化産物であるキノン体が深く重合に関わっていると予想された。

3) ペプチドおよび各種薬剤を用いた α syn-カテコラミン作用部位の同定

Y125D, S129A 変異体発現細胞では細胞生存率低下が認められにくいことから、キノン体の作用部位を α syn の C 末端付近と仮定した。C 末端配列を元に、人工的にペプチドを作製し、キノン結合能の指標としてキノン最終代謝産物クロム体量を検討したと

ころ、125YEMPS129 付近のペプチドに結合能を認めた。125YEMPS129 が最もキノン結合能に優れていたが、不完全な配列でもある程度の結合能があることから、配列特異性は低いと考えられた。

125YEMPS129 ペプチドは in vitro において DOPA 存在下 (アルカリ条件 pH によりキノン体に変換されることが予想される) の α syn 重合化を抑制することを SDS-PAGE 上で確認した。

α syn 過剰発現 PC12 細胞に蛍光ラベルした YEMPS ペプチド投与したところ、わずかながら細胞内に取り込まれることが確認され、Tet-OFF 6.5 日時点での細胞生存率が 53.7% から 75.0% まで上昇させた。

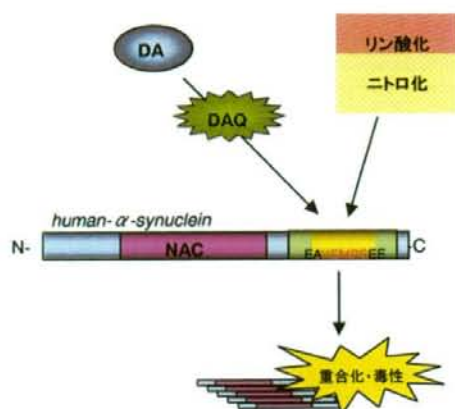
既存の抗パーキンソン薬に同様の機能が有るか否か検討した。ゾニサミド、プラミベキソール、カベルゴリンを用いた in vitro でのキノン結合能検討では、ゾニサミドに軽度の消去能が認められた。1 μ M, 10 μ M, 100 μ M のゾニサミド投与は Tet-OFF 5 日時点での細胞生存率が 74.6% からそれぞれ 89.9%, 89.5%, 88.3% まで上昇させた。

D. 考察

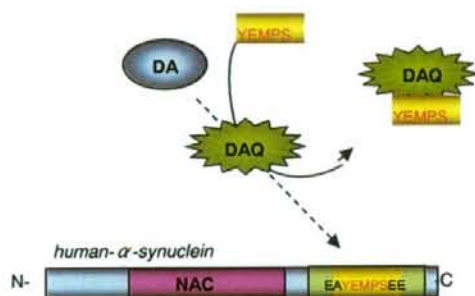
PD, ことに孤発性 PD において、なぜドパミン神経に代表されるカテコラミン系神経が障害され、またなぜ同細胞に Lewy 小体が形成されやすいのかを理解することが、疾患克服に重要と考えられる。今回我々は元来よりカテコラミン代謝を有する PC12 細胞に条件依存的に発現量を調節できる α syn 発現細胞株を確立し、カテコラミン- α syn の共作用を細胞生存率と α syn 重合化の観点から検討した。

PC12 細胞内に α syn を過剰発現させると、そのみで細胞の生存率が低下し、 α MT によりカテコラミン代謝を抑制することで生存率低下が抑制されることから、 α syn とカテコラミンがなんらかの共作用をすることが細胞脆弱性に関係していると考えられた。これは、「 α syn はドパミン神経では細胞毒性に、非ドパミン神経では細胞保護的に作用する」という過去の報告に矛盾しない。

さらにドパキノン、ドパミンキノンなど、カテコラミンの酸化産物が α syn に作用すること、またその作用部位として α syn の C 末端側が重要であることを示した。125YEMPS129 付近が最もキノン体への作用が顕著であったが、周辺配列が有れば程度は低下するものの、キノン結合能はある程度保たれることから、配列特異性は低いと考えられた。キノン体が同部に作用することがなぜ細胞脆弱性に関与するかについては不明な点が多いが、元来同部は 129Ser リン酸化や 125Tyr ニトロ化によって、細胞毒性ならびに α syn 重合化が多く報告されていることから、C 末端側のキノン体修飾による細胞脆弱性、 α syn 重合化促進にも同様の機序が存在する可能性がある。



125YEMPS129 ペプチドやゾニサミドが細胞毒性を軽減させる機序のひとつとして、下図のような、キノン体との結合により、結果的にスカベンジャーとして作用した可能性が考えられる。 α syn の C 末端側への修飾が抑制されたため、毒性が予想される可溶性オリゴマー形成減少、結果的に細胞生存率上昇へと繋がると考えられる。



これらの結果から、 α syn によるドパミン神経(あるいは広義のカテコラミン神経)における毒性はキノン消去・結合能を有する薬剤や、NQO-1 など内在性キノン消去酵素の発現を誘導する薬剤により抑制される可能性が示唆された。PD における細胞保

護療法を考える上で有用な知見が得られたと考えられる。

今後はキノン消去能を有し、 α syn の重合化を抑制する作用を持つ薬剤、化学物質、ペプチド試薬を検索していく予定である。

E. 結論

1. カテコラミンはキノン体となって α syn の C 末端 125YEMPS129 付近に結合し、 α syn の重合化とカテコラミン系神経の脆弱性に関与する。
2. カテコラミン- α syn およびそれに起因する細胞毒性は 125YEMPS129 で抑制された。
3. ゾニサミドなど、キノン消去能を有する薬剤がカテコラミン- α syn 毒性を軽減する可能性があり、今後の治療開発に応用可能である。

F. 文献

- 1) Xu-J, et al. Nat Med 2002; 127: 232-244.
- 2) Conway-KA, et al. Science 2001; 277: 2000-2002.
- 3) Mazzulli-JR, et al. J Biol Chem 2007; 282:31621-31630.

G. 健康危険情報

なし

H. 学会発表

第 49 回日本神経学会総会 (2008.5. 横浜)
北米神経科学会 SFN2008(2008.11. Washington DC)
BMB2008 (2008.12. 神戸)

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

α -synuclein 分解酵素 neurosin の検討及び α -synuclein 定量系の臨床応用

徳田隆彦¹⁾、笠井高士¹⁾、建部陽嗣¹⁾、田中雅樹²⁾、渡邊義久²⁾、中川正法¹⁾

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

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。今年度は、1) α -synuclein の分解活性を有するセリンプロテアーゼである neurosin の細胞内局在および細胞内での動態を培養細胞系を用いて検討した。neurosin 発現細胞から細胞外に分泌された neurosin には、intact なプロテアーゼ活性が認められた。また、細胞内に存在した neurosin はミトコンドリアではなく ER に局在していた。以上からは、neurosin が細胞外でプロテアーゼとして機能する可能性が考えられた。2) また、従来から報告している α -synuclein を定量する ELISA 系を用いて、Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) 患者髄液中の α -synuclein を定量した。CJD 患者髄液中では、対照群と比較して α -synuclein の N 末断片が軽度増加していた。我々の ELISA 系は、 α -synuclein oligomer に対する感度は低く主として α -synuclein monomer を定量すると考えられた。

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が示されている(1, 2)。また、 α -synuclein 遺伝子の重複変異を有する家系の検討では、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、 α -synuclein の発現量が臨床的な重症度を決定することが報告されている(3-5)。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、 α -synuclein の分解活性を有するセリンプロテアーゼである neurosin およびヒトの髄液中での α -synuclein の定量系について報告してきた(6, 7)。

今年度は、以下の2項目について検討した。1) 前年度までは neurosin の α -synuclein 分解活性について試験管内で検討した結果を報告してきたが、今年度は neurosin の細胞内局在および細胞内での動態を培養細胞系を用いて検討した。また、我々は世界に先駆けてヒト髄液中の α -synuclein を特異的に測定できる enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を開発し、本研究班においても、パーキンソン病患者では対照患者よ

りも髄液中 α -synuclein が低下していることを報告した(6)。2) 今年度は、この ELISA 系を用いて、対照患者と Creutzfeldt-Jakob 病 (CJD) 患者の髄液中の α -synuclein の定量と両者の比較を行い、我々の ELISA 系が検出する α -synuclein の分子種についても検討した。

B. 研究方法

1) 培養細胞系における neurosin の細胞内局在および細胞内での動態の検討

Pre-pro-neurosin および pre-pro-neurosin と EGFP の融合蛋白質発現ベクター、さらに α -synuclein 発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクトして、neurosin および neurosin-EGFP 発現細胞の cell extract および 12 時間後、24 時間後の無血清培養上清を抗 neurosin 抗体 (MAB2008, Becton Dickinson) によるウエスタンブロッティングで検討した。また、発現細胞の培養上清のセリンプロテアーゼ活性を定量する目的で、培養上清を *t*-Butyloxycarbonyl-L-Glutaminy-L-Alanyl-L-Arginine 4-Methyl-Coumaryl-7-Amide (Boc-Gln-Ala-Arg-MCA, ペプチド研究所) と反応させ、酵素反応によって遊離した

7-amino-4-methylcoumarin (AMC) を蛍光分光光度計を用いて励起波長 380nm、蛍光波長 440nm で測定した。neurosin-EGFP 融合蛋白質を発現させた HEK293T cell では、neurosin の細胞内局在部位を蛍光顕微鏡で観察して解析した。さらに、pre-pro-neurosin と α -synuclein を HEK293T 細胞に共発現させて、neurosin による細胞内での α -synuclein のプロセッシングを検討した。

2) CJD 患者髄液中の α -synuclein の定量

CJD 患者 24 名および脳病変を有さない対照患者 24 名を対象として、我々が開発した α -synuclein を特異的に定量する ELISA 系を用いて対象者の髄液中 α -synuclein を定量して比較した。我々が用いた ELISA 系は、ヒト α -synuclein の 5-19 残基および 121-125 残基を抗原とする抗ヒト

α -synuclein 抗体 (それぞれ N19 ポリクローナル抗体および C211 モノクローナル抗体、ともに Santa Cruz Biotech.) を capture antibody に、全長のヒト α -synuclein を抗原とするポリクローナル抗体 (FL140, Santa Cruz Biotech.) を reporter antibody に用いている。N19-FL140 ELISA 系は全長 α -synuclein を含む α -synuclein の N 末断片を、C211-FL140 ELISA 系は全長の α -synuclein のみを特異的に検出する。

(倫理面への配慮)

対象とした患者からは、京都府立医科大学倫理委員会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) 培養細胞系における neurosin の細胞内局在および細胞内での動態の検討

Neurosin および neurosin-EGFP 発現細胞の cell extract および培養上清のウエスタンブロッティング (図 1) では、intact な neurosin (図 1, 四角枠) および EGFP 融合 neurosin (図 1, 楕円枠) はともに細胞内に検出され、かつ両者とも細胞外に分泌されることを確認した (図 1)。Neurosin 発現細胞では、全長 neurosin よりも分子量の小さい、抗 neurosin 抗体陽性の断片ペプチドが細胞内に存在した (図 1, アスタリスク)。

Neurosin 発現細胞の培養上清中のセリンプロテアーゼ活性の検討では、neurosin をトランスフェクトした細胞の培養上清中にはプロテアーゼ活性が検出された。一方、neurosin-EGFP をトランスフェクトした細胞では培養上清中にプロテアーゼ活性が検出できなかった。

Neurosin-EGFP 融合蛋白質を発現させた HEK293T 細胞の細胞内では、neurosin は ER マーカーの ER-Tracker とは局在性が一致していたが、ミトコンドリアマーカーの Mito-Tracker とは局在が一致しなかった。

さらに、 α -synuclein および neurosin を共発現

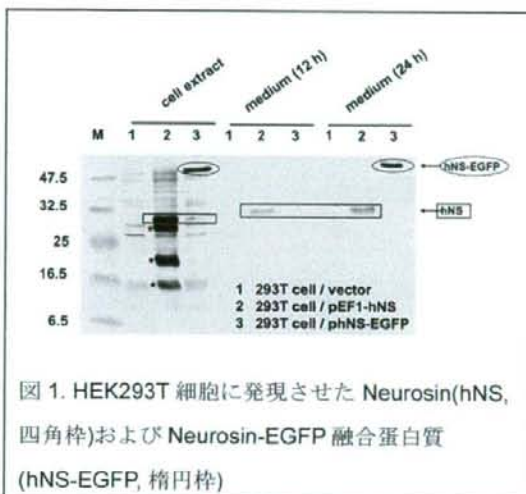


図 1. HEK293T 細胞に発現させた Neurosin(hNS, 四角枠)および Neurosin-EGFP 融合蛋白質 (hNS-EGFP, 楕円枠)

させた HEK293T 細胞のウエスタンブロッティングによる検討(図 2)では、3 種類の α -synuclein 抗

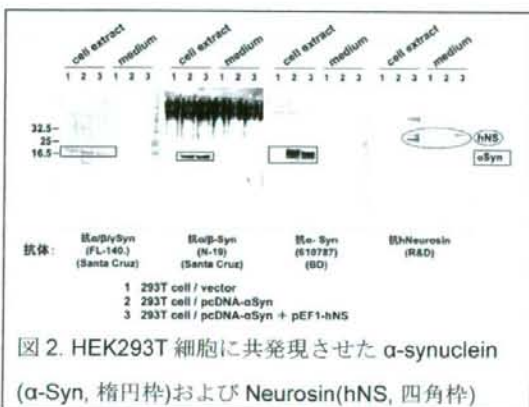


図 2. HEK293T 細胞に共発現させた α -synuclein (α -Syn, 楕円枠)および Neurosin(hNS, 四角枠)

体により、cell lysate 中の α -synuclein の検出が可能であった(図 2, 四角枠)。従って、今回作成した vector により、細胞内で α -synuclein を発現していることが確認された。一方で neurosin(図 2, 楕円枠)を共発現させても細胞内における α -synuclein の分解産物は検出できなかった。また、今回の実験では、培養上清中には α -synuclein およびその断片ペプチドは検出できなかった。

2) CJD 患者髄液中の α -synuclein の定量

CJD 患者(n=24)においては、対照患者(n=24)と比較して、C 末端が truncate された α -synuclein の N 末断片が平均値で約 1.6 倍に増加していた(CJD 群: 106.3 \pm 47.2 ng/ml, 対照群: 66.4 \pm 26.8 ng/ml, 図 3)。しかし、免疫沈降した髄液中 α -synuclein をウエスタンブロッティングで検出した場合には、CJD 患者髄液中の α -synuclein 量は対照患者の約 10 倍に増加しており(図 4)、ELISA 系で定量した髄液中 α -synuclein 量の結果とは解離があった。

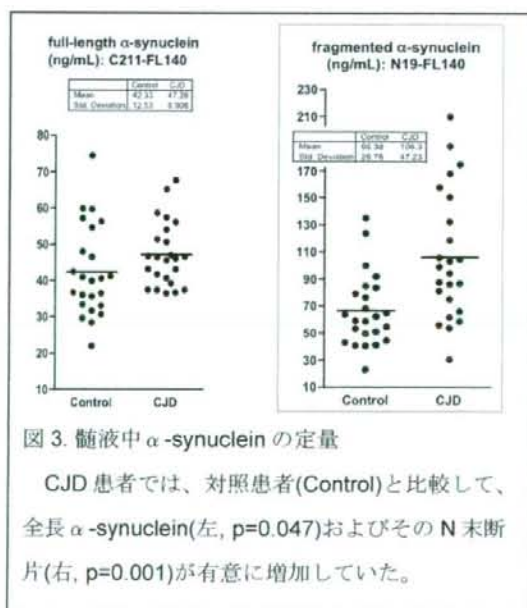


図 3. 髄液中 α -synuclein の定量

CJD 患者では、対照患者(Control)と比較して、全長 α -synuclein(左, $p=0.047$)およびその N 末断片(右, $p=0.001$)が有意に増加していた。

D. 考察

1) 培養細胞系における neurosin の細胞内局在および細胞内での動態の検討

Neurosin および neurosin-EGFP 発現細胞の cell extract および培養上清中に、それぞれ intact な全長の neurosin および EGFP 融合 Neurosin を検出し、neurosin が細胞外に分泌されることを確認した。この培養上清中の neurosin には試験管内で確

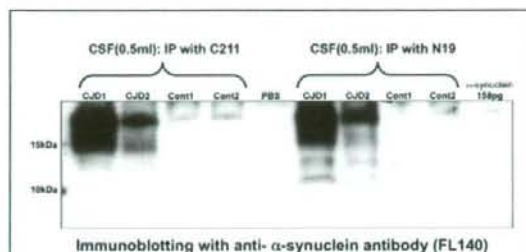


図 4. CJD 患者および対照患者(Control)の髄液中から免疫沈降(IP)させた α -synuclein およびその断片ペプチドの immunoblotting

認したのと同様のセリンプロテアーゼ活性を認めた。Neurosin 発現細胞の細胞内には、全長 neurosin よりも分子量の小さい抗 neurosin 抗体陽性の断片ペプチドが細胞内に存在したが、これらの断片ペプチドの一次構造は今後明らかにする必要がある。さらに、Neurosin-EGFP 発現細胞の検討では、細胞内の neurosin は、これまでに報告されていたミトコンドリア(8)ではなく、ER に局在していた。以上の結果からは、neurosin は ER から分泌経路によって細胞外に分泌され、細胞外でプロテアーゼとして機能する可能性があると考えられた。

2) CJD 患者髄液中の α -synuclein の定量

Mollenhauer らは、CJD 患者の髄液中では α -synuclein が対照患者の約 40 倍に増加していることを報告している(9)。今回の我々の検討でも、

CJD 患者の髄液中では、特に α -synuclein の N 末断片が増加していた。CJD 患者髄液中では α -synuclein が増加していることの病的機序としては、シナプス構造および神経細胞体の破壊による髄液中への漏出によると考えられた。また、今回の我々の ELISA 系による検討では、CJD 患者における α -synuclein の N 末断片の増加の程度は、対照患者の約 1.6 倍にとどまっていた。CJD 患者の髄液中の α -synuclein 関連蛋白の増加の程度が、今回の結果と先行論文の結果との間で著しく異なっていたために、髄液中の α -synuclein 関連蛋白を免疫沈降(IP)して immunoblotting(IB)で検討した。この IP-IB 法による検討では、CJD 患者髄液中の α -synuclein は、対照患者の約 10 倍に増加していた。このように、ELISA 法と IP-IB 法で検出される髄液中 α -synuclein 量に大きな差があることに関して、その理由を考察する必要がある。従来の報告では α -synuclein oligomer は SDS に unstable である(10)ことと併せて考えると、我々の ELISA 系は α -synuclein oligomer に対する検出感度が低く主として α -synuclein monomer を検出しているのに対して、IP-IB 法では α -synuclein monomer に加えて SDS-unstable oligomer も 15kDa 付近のバンドとして捉えていると仮定すれば、両者の違いが説明されると考えた。先行論文の結果と我々の結果との相違も、同様に、両者が使用している ELISA 系の抗 α -synuclein 抗体が異なっているために、それぞれの α -synuclein oligomer に対する感度が異なると考えれば説明が可能である。

E. 結論

1) 培養細胞に発現させた neurosin は ER に存在し、細胞外に分泌され、培養上清中でプロテアーゼ活

性を有していることから、neurosin は細胞外プロテアーゼとして機能している可能性が考えられた。

2) CJD 患者髄液中では、全長の α -synuclein および α -synuclein の N 末断片が増加していた。

3) 我々の α -synuclein 定量 ELISA 系は主として α -synuclein monomer を検出していると考えられた。

文献

1. M.G. Spillantini, et al. *Nature*, 388: 839-840, 1997.
2. M.H. Polymeropoulos, et al. *Science*, 276: 2045-2047, 1997.
3. A.B. Singleton, et al. *Science*, 302: 841, 2003.
4. M.C. Chartier-Harlin, et al. *Lancet*, 364: 1167-1169, 2004.
5. P. Ibanez, et al. *Lancet*, 364: 1169-1171, 2004.
6. T. Tokuda, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 349: 162-166, 2006.
7. T. Kasai et al. *Neurosci. Lett.*, 436: 52-56, 2008.
8. A. Iwata et al. *Hum. Mol. Genet.*, 12: 2625-2635, 2003
9. B. Mollenhauer et al. *Exp. Neurol.* 213: 315-325, 2008
10. T.F. Outeiro et al. *PLoS ONE* 3: e1867, 2008.

F. 健康危機情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kasai T, Tokuda T, Yamaguchi N, Watanabe Y,

Kametani F, Nakagawa M, Mizuno T: Cleavage of normal and pathological forms of alpha-synuclein by neurosin in vitro. *Neurosci Lett* 436: 52-56, 2008.

2. 学会発表

- 1) 徳田隆彦, 笠井高士, 石神紀子, 中川正法, 坪井義夫: CJD 患者髄液中では α -synuclein の断片ペプチドが増加している. 日本神経学会総会 (第 49 回), 横浜, 2008. 5. 15.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表題 ATP13A2 タンパクの細胞内局在と機能に関する検討

報告者氏名 久保紳一郎¹⁾、里史明²⁾、今井哲司²⁾、波田野琢¹⁾、
佐藤栄人¹⁾、水野 美邦²⁾、服部 信孝¹⁾

¹⁾ 順天堂大学脳神経内科

²⁾ 順天堂大学老人性疾患病態治療研究センター

研究要旨

ATP13A2 は常染色体劣性遺伝性パーキンソン病の原因蛋白の一つであり、この局在と機能を解析することで、パーキンソン病の病態解明につながる事が期待されるが詳細は不明である。今回、我々は ATP13A2 の細胞内局在を生化学的、並びに免疫細胞学的染色法で検討し ATP13A2 がリソソーム膜に局在することを明らかとした。また遺伝子抑制により細胞死が誘導され、Cathepsin D の遊離及び細胞内における異常構造物の蓄積を認めたことからリソソーム機能異常が細胞死の原因である可能性であると考えられた。

A. 研究目的

ATP13A2 は認知機能障害、ドーパ反応性パーキンソニズムをきたす常染色体劣性遺伝を呈する変性疾患である Kufor-Rakeb disease (KRD; PARK9) の原因遺伝子として同定された。ATP13A2 は広範囲の組織でその発現が認められ、特に脳では中脳における発現が高いことが報告されている。その遺伝子産物は(ATP13A2 タンパク)はアミノ酸配列の相同性から P 型 ATPase に属す 10 回貫通型の膜タンパクであると推測されており、リソソームに局在することが報告されている。しかしながら詳細な細胞内局在に関する報告はない。さらにその機能については未知である。近年、パーキンソン病をはじめとした神経変性疾患はタンパク質分解系の破綻が原因であると推測されており、タンパク質分解の主要小器官であるリソソーム分解系が特に注目されている。そこでリソソームにおける ATP13A2 の詳細な局在及び、リソソームにおけるその機能を検討した。

B. 研究方法

V5 エピトープまたは GFP を付加した野生型 ATP13A2 (WT) 及び病原変異体 (F182L、G504R) を作製し、SH-SY5Y 及び HEK293 細胞を用い安定発現細胞株を作製した。生化学的分画法にて作製した細胞の分画を行った。それぞれの画分を用いウェ

スタンプロッティング法にて局在の検討を行った。

さらに免疫組織学的細胞染色を行い、細胞内局在の検討を行った。ATP13A2 の遺伝子発現を抑制は RNAi 法を用いた。遺伝子抑制下における継続的な細胞活性の測定、及びリソソーム関連タンパクの挙動をウェスタンプロッティング法並びに免疫組織学的細胞染色を用い検討した。また電子顕微鏡を用いて遺伝子抑制下の細胞形態変化を観察した。

C. 研究結果

細胞分画による結果、WT は小胞体画分及びリソソーム画分に多く局在した。しかしながら病原変異体である F182L 及び G504R は小胞体のみ局在し、リソソームへの局在は認められなかった。さらに免疫細胞学的染色法では、WT は顆粒状またはリング状に染色され、リソソーム膜タンパクである Lamp1 及び Lamp2 と完全に一致した。また一部、ゴルジ装置、LC3 及び Rab7 との共局在が認められた。さらに GFP を付加した WT を安定発現させた SH-SY5Y を用い免疫電顕を行った結果、GFP の免疫活性がリソソーム膜上に観察された。一方、病原変異体は顆粒状には染色されず小胞体マーカーとのみ一致した。これらのことから KRD:PARK9 の病態発症に ATP13A2 のリソソームへの局在異常が関与していることが予想されたため RNAi 法を用いた遺