

では、Lewy 小体やタウ陽性封入体を伴わない黒質および青斑核の高度細胞脱落が示されていた。2008年に Winder らにより Perry 症候群における TDP-43 陽性封入体の出現が報告された⁷⁾。本例でもシヌクレインやタウ陽性の封入体は乏しく、リン酸化非依存性 TDP-43 免疫染色では陽性封入体を黒質、青斑核を中心とする主として錐体外路系と視床および脳幹被蓋部の変性部位に認めた。従って Winder らの報告のように Perry 症候群の病理像では Lewy 小体や tau の蓄積を伴わない黒質および青斑核の変性と、黒質、淡蒼球を中心とした TDP-43 陽性封入体の出現が確認された。さらに本研究ではリン酸化 TDP-43 の免疫染色を検討した結果、リン酸化 TDP-43 陽性封入体はリン酸化非依存性封入体とほぼ同様の形態と分布を示した。Perry 症候群においても ALS や FTLD-TDP と同様これらの TDP-43 陽性封入体はリン酸化を受けていることを確認した。

本例で最も特徴的な中枢性呼吸障害の責任病巣として neurokinin-1 receptors (NK-1R) で同定される延髄腹外側の pre-Bötzinger complex が呼吸のリズム形成を司る役割を果たし、呼吸の化学的感受性には延髄縫線核のセロトニン作働性ニューロンが関与するとされている⁸⁾。Perry 症候群の剖検例では延髄腹外側の NK-1R, tyrosine hydroxylase (TH)、tryptophan hydroxylase (TrOH) 陽性細胞が減少し、延髄縫線核と延髄腹側表層のセロトニン作働性ニューロンが減少していると報告されている。これらの部位は通常の HE 染色では変化が捉えがたいので、本例に関してもさらに検討が必要である。

本例では臨床的に起立性低血圧がみられ、脊髄中間質外側核の神経細胞は比較的よく残存する傾向を認めたが、TDP-43 陽性 NCI を認めた。MIBG 心筋シンチグラフィにて心筋への取り込み低下を認め心臓自律神経障害の存在が考えられたが、心臓交感神経の病理学的検索では有髄神経の脱落や tyrosin hydroxylase の染色性低下はみられず、またシヌクレインや TDP-43 陽性封入体は観察できなかったことから、パーキンソン

病や DLB でみられる心臓交感神経障害とは異なる機序が推測された。

パーキンソニズムに関連する病理所見として、Lewy 小体を伴わない黒質、青斑核の高度の細胞脱落を認めたが、黒質の細胞脱落の程度はパーキンソン病一般にみられるよりも高度で、細胞脱落の程度に比してグリオシスは軽い点は興味深く、数年という経過を考えるとその変化は特筆に値する。

Perry ら³⁾は、副腎腫瘍で死亡した未発症例の剖検例において黒質の細胞脱落を認めることを報告しており、症状出現前から黒質変性が始まっているか、生来細胞が少ないなどの可能性も考えられる。

2009年に Perry 症候群では *DCTN1* に code されている dynactin の CAP-Gly domain の 5 個の点変異が 8 家系で確認され、本家系では dynactin (*DCTN1*) G71A の変異が確認された⁹⁾。Farrer らは dynactin subunits p50, p62 の免疫染色は TDP-43 陽性封入体と同様の形態と分布を示すが、二重免疫染色では p50, p62 と TDP-43 の共存は 5% 以下、p50, p62 にのみ陽性を示し TDP-43 陽性を欠く封入体はきわめて少数であると報告した。TDP-43 陽性封入体は錐体外路系、脳幹被蓋などに変性部位に一致して分布し、臨床像と比較的対応しているが、*DCTN1* 遺伝子変異の症例に出現している点で、dynactin の変化に伴って TDP-43 の動態に変化が生じた二次的な変化を観察している可能性も否定できない。*DCTN1* 遺伝子変異は細胞内輸送にきわめて重要な GKNDG 結合モチーフ内あるいは近傍にあり、細胞内輸送障害がおきている可能性が指摘されている。

DCTN1 変異は著明な声帯麻痺きたす遺伝性家族性遠位型運動ニューロノパチーをきたす疾患で同定されている^{9,10)}。平均発症年齢は 34 歳、平均罹病期間は 17 年 (7-31 年) で、電気生理学的には運動ニューロンの脱神経所見を認め、1 例の剖検所見では腫大した神経細胞内に免疫組織学的に dynactin p50 subunit 陽性封入体の形成を認めている。*In vitro* では *DCTN1* 変異点変異は微小管結合能を減少させることから、軸索輸送

を障害することが示唆されている。この疾患の臨床病理像は Perry 症候群とは大きく異なるが、運動ニューロン疾患においても確認されている点で Perry 症候群にみられる TDP-43 の変性機序には運動ニューロン疾患と共通する軸索輸送を障害する基盤があることも推測される。

E. 結論

Perry 症候群はパーキンソニズム、うつ、体重減少、中枢性低換気を呈する常染色体優性遺伝性疾患である。DCTN1 変異を示す Perry 症候群の家系の 1 剖検例を報告した。病理学的には黒質、青斑核の高度な変性と、リン酸化非依存性およびリン酸化依存性 TDP-43 陽性神経細胞内封入体、変性神経突起、核内封入体を認め、TDP-43 変性機序の多様性が示唆された。TDP-43 と dynactin の関連性は、運動ニューロン疾患と共通する基盤があることも推測される。

F. 文献

- 1) Neumann M, et al: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130-133
- 2) Arai T et al: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *BBRC* 2006; 351: 602-611
- 3) Perry T et al: Hereditary mental depression and Parkinsonism with taurine deficiency. *Arch Neurol* 1975, 32: 108-113
- 4) Tsuboi Y et al: Japanese family with parkinsonism, depression, weight loss, and central hypoventilation. *Neurology* 2002, 58: 1025-1030
- 5) Hasegawa M et al: Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2008 64:60-70
- 6) Farrer MJ et al. *DCTN1* mutations in Perry syndrome. *Nature Genetics* 2009, 41 : 163-5
- 7) Wider C et al: Pallidonigral TDP-43 pathology in Perry syndrome. *Parkinsonism Relat Disord* 2009, 15: 281-6.
- 8) Tsuboi Y et al: Neurodegeneration involving putative respiratory neurons in Perry syndrome. *Acta Neuropathol* 2008, 115: 263-268
- 9) Puls I et al. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet.* 2003, 33:455-456.
- 10) Münch C et al: Point mutations of the p150 subunit of *dynactin (DCTN1)* gene in ALS. *Neurology* 2004, 63:724-726.

G. 研究発表

1. 論文発表

吉田眞理 FTL-D-U の病理. *Brain and Nerve* 61:1308-18,2009

2. 学会発表

渡邊はづき 他. 自律神経障害と著明な中枢性低換気を認めた Perry 症候群の一部検例. 第 50 回日本神経病理学会総会 2009 年 6 月 高松市

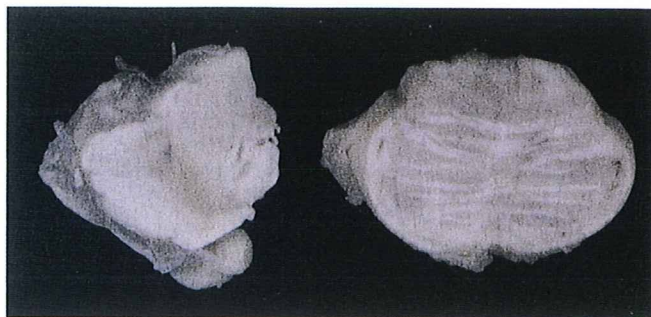


図1 肉眼的所見. 黒質、青斑核の高度褪色を認める.

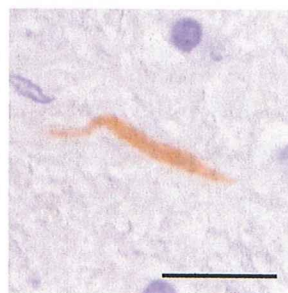


図4 延髄縫線核のリン酸化 TDP-43 陽性封入体. 抗リン酸化 TDP-43 免疫染色.

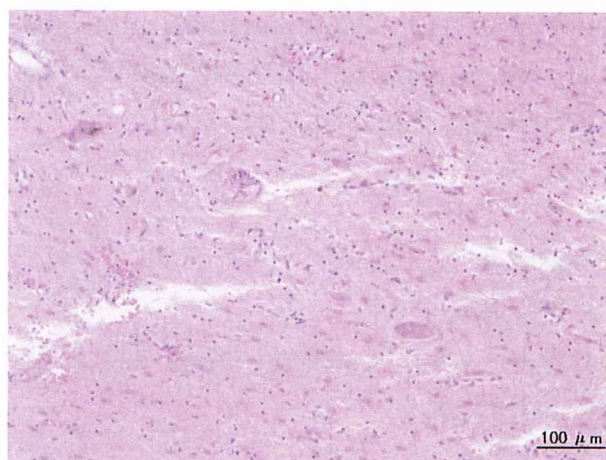


図2 黒質の高度な細胞脱落を認める. HE 染色

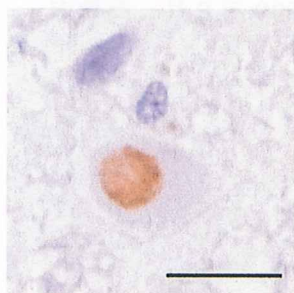


図3 延髄網様体リン酸化 TDP-43 陽性封入体. 抗リン酸化 TDP-43 免疫染色.

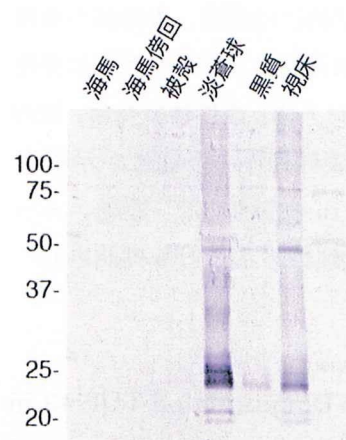


図5 凍結脳の抗リン酸化 S409/410 を用いたイムノブロット解析では淡蒼球、黒質、視床などに 45kDa のバンドと 18~26kDa の C 末端断片のバンドが検出されたが、海馬や海馬傍回、被殻では確認できなかった.

PARK8 における線条体の検討

研究協力者 望月秀樹¹⁾

梁 正淵¹⁾ 荻野 裕²⁾ 長谷川一子³⁾ 斎藤豊和⁴⁾

1) 北里大学医学部神経内科学, 2) 東芝林間病院神経内科,
3) 独立行政法人国立病院機構相模原病院神経内科, 4) 相模台病院神経内科

研究要旨

PARK8 Sagamihara 家系内で臨床的に多系統萎縮症と診断した症例を経験した。この症例には PARK8 Sagamihara 家系で報告されている LRRK2 I2020T の変異は認めなかったが、PARK8 Sagamihara 家系の 8 剖検例では 1 症例で神経病理学的に黒質線条体系とオリブ小脳系での神経細胞脱落やグリオーススを認め、 α -シヌクレイン陽性グリア細胞内封入体を確認し多系統萎縮症と診断した症例を報告しており、診療録で確認できた PARK8 症例で線条体病変を MRI にて再検討した。

A. 研究目的

PARK8 Sagamihara 家系は、額田ら（臨床神経 18 1978）の報告にはじまる、常染色体優生遺伝形式で、現在では 8 世代、約 30 人の発症者が確認されている。発症年齢や臨床症状は孤発性パーキンソン病 (PD) と類似し、レボドパの十分な効果を認め、神経病理学的には Lewy 小体 (LB) (α -シヌクレイン) 陰性が陽性症例より圧倒的に多く、病因遺伝子は船山らによって LRRK2 I2020T (Ann Neurol 51 2002, Ann Neurol 57 2005) の異常が報告された家族性パーキンソニスムである。この家系内で LRRK2 I2020T の変異は認めず、臨床的に多系統萎縮症 (MSA) と診断した症例を経験した。PARK8 Sagamihara 家系の 8 剖検例では 1 症例で神経病理学的に黒質線条体系とオリブ小脳系での神経細胞脱落やグリオーススを認め、 α -シヌクレイングリア細胞内封入体を確認し多系統萎縮症と診断した症例を報告しており、PARK8 Sagamihara 症例での線条体病変を MRI にて再検討した。

B. 研究方法

北里大学病院、および北里大学東病院の診療録で確認しえた PARK8 Sagamihara 家系 16 症例 (1 例は DBS 後で MRI 施行不能。女:男 8:8 症例、発

症年齢 39~61 歳 (平均 51.0 歳)、年齢 52~77 歳 2007 年 72 歳で突然死亡例 1 例を含む) 中、MRI を確認しえた 14 症例 (女:男 8:6 発症年齢 39~61 歳 (平均 50.8 歳) 検査施行時年齢 41~77 歳 (平均 60.3 歳) MRI 施行までの罹病期間 1~26 年 (平均 9.5 歳) Yahr II~V) で線条体病変の有無を再検討した。使用機器は GE Healthcare Japan Signa HDE 1.5T と東芝 EXCELART Vantage TM 1.5T を用い、条件は PDI・T1WI・T2WI を基本に、可能な限り FLAIR, DWI, T2* も施行した。

C. 研究結果

【臨床的に MSA-P と診断した症例 (PARK8 Sagamihara MSA-P2)】

現病歴 44 歳 左下肢の違和感・しびれ出現。45 歳 左下肢の痛みとなり歩きづらく、夏には立位保持困難となり、46 歳 当院神経内科受診。1. 左下肢の筋緊張亢進, 2. 左上肢、両側下肢深部腱反射亢進, 3. 左側 Hoffmann・Tromner (+) を認めた。47 歳 左下肢の動かしづらくなり、精査入院。1. 無動, 2. 姿勢保持障害, 3. 筋緊張亢進歯車様 (左側 下肢優位), 4. 左側優位姿勢・動作時不規則振戦, 5. 左側・下肢優位深部腱反射亢進, 6.

両側 Trömner (+), 7. Myerson (+) (UPDRS III 30).
起立性低血圧なし. 1-dopa の効果を認め退院.
(UPDRS III 20) 退院後約1年で, ウェアリング
オフ出現し 2009 年 10 月, 第 2 回目入院.
LRRK2 I2020T 遺伝子異常は認めなかった.

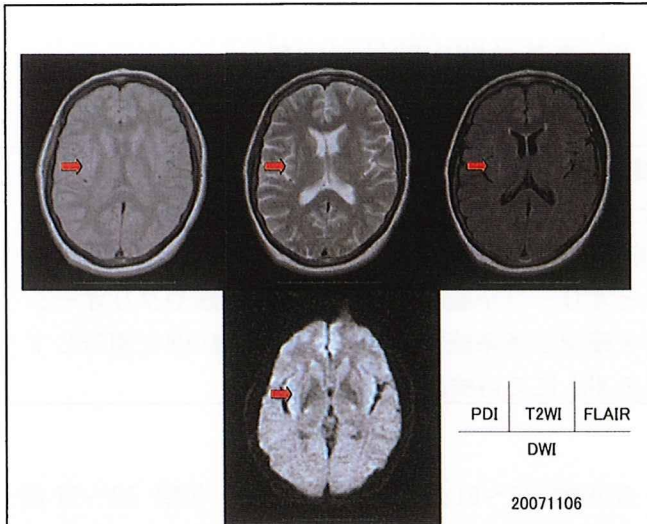


図 1 入院時頭部 MRI 画像 右被殻の萎縮と同部外側に T2WI と FLAIR で高信号, DWI は低信号のスリット状域を認める.

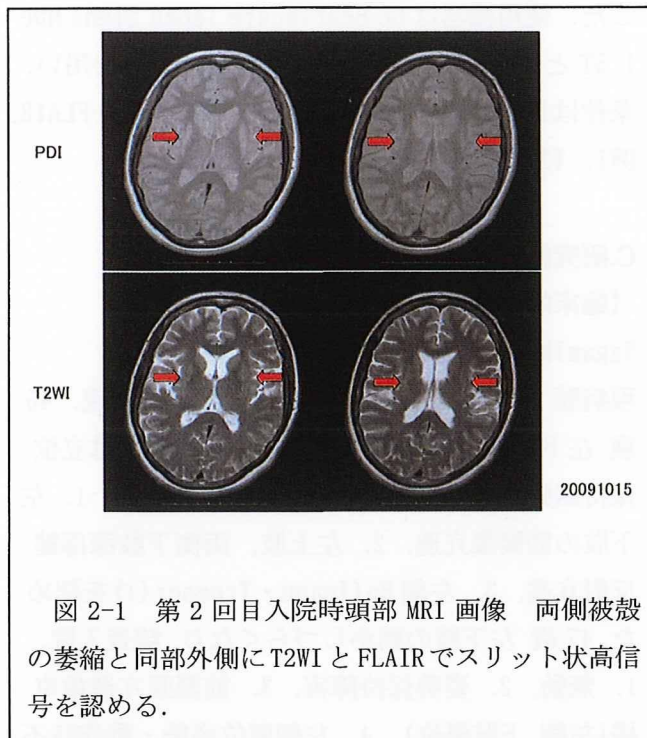


図 2-1 第 2 回目入院時頭部 MRI 画像 両側被殻の萎縮と同部外側に T2WI と FLAIR でスリット状高信号を認める.

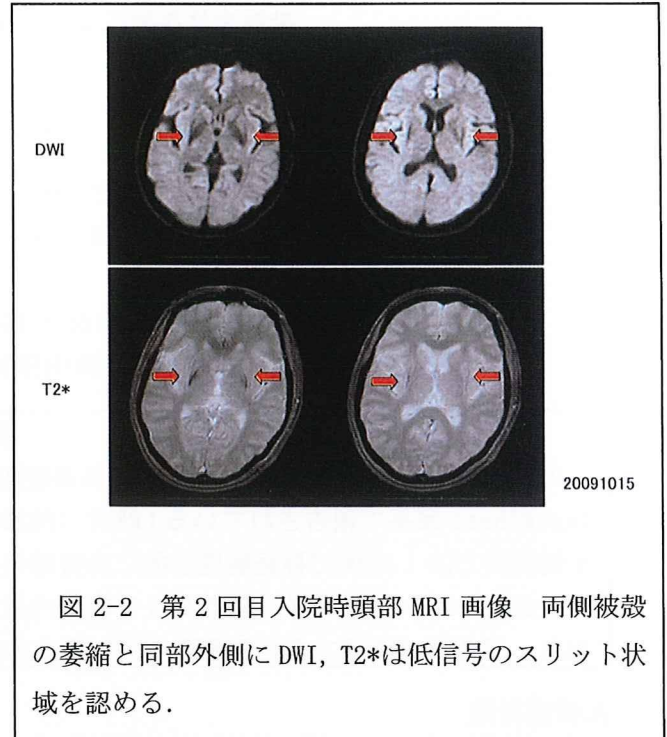


図 2-2 第 2 回目入院時頭部 MRI 画像 両側被殻の萎縮と同部外側に DWI, T2*は低信号のスリット状域を認める.

【神経病理学的に MSA と診断した症例 (PARK8 Sagamihara MSA-P1)】

現病歴 74 歳 左傾きを指摘される. 75 歳 左手
指安静時振戦と手の使いづらさを自覚し当院受
診. 安静時振戦, 固縮, 無動, 姿勢保持障害を認
めた. 76 歳時 16km/日散歩. 77 歳よりレボドバ開
始. 80 歳時でも 3km/日散歩していたが, 82 歳 脱
水・呼吸器感染症で入院. 死亡確認. LRRK2 I2020T
遺伝子異常あり.

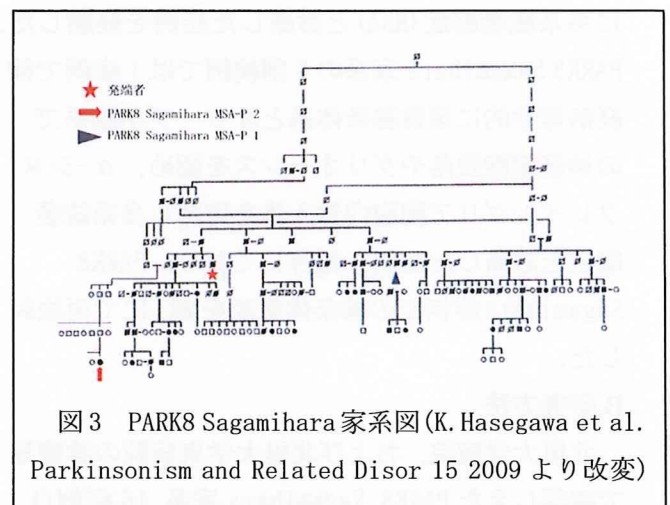


図 3 PARK8 Sagamihara 家系図 (K. Hasegawa et al. Parkinsonism and Related Disor 15 2009 より改変)

【結果】 今回再検討した PARK8 Sagamihara 14

症例にはMRI上、線条体病変は認めなかった。

D. 考察

現在まで報告されているLRRK2 parkinsonismはその臨床症状や神経病理所見、 α -synuclein陰性・陽性、Tau陰性・陽性など、様々な様相を呈し、そのpolymorphismが注目されている。このLRRK2の多様性からさまざまな横断的検討が報告されているが、parkinsonismを呈する様々な症例でのLRRK2変異の頻度はわずかである(E. K. Tan et al. *Mov Disord* 21 997-1001 2006, L. J. Ozelius et al. *Mov Disord* 22 546-549 2007, C. Gaig et al. *J Neurol Sci* 270 94-98 2008, J-W. Cho et al. *J Clin Neurol* 5 29-32 2009)。

MSAは、近年、Glial cytoplasmic inclusion (GCI), myelin sheath disruption, dystrophic axonなど、oligodendrogliaopathyという概念が提唱され、 α -synucleinやp25 α などの蛋白の蓄積が報告されている。Y. HuangらはMSA 12症例、PD 4症例、control 4症例でLRRK2 antibody (L955)で免疫染色をした結果、oligodendrogliaとGCIで染色性が確認され、dystrophic axonには染色されないことより、MSAでも変性早期にLRRK2の関与を示唆することを報告している(*Acta Neuropath* 116 639-646 2008)。

基本的にPARK8 Sagamihara家系では、現時点では α -シヌクレインの異常出現・蓄積は8剖検例中2症例のみで、神経病理学的に α -シヌクレインの異常出現・蓄積はco-incidentの可能性は否定できない。しかし、同家系内でLRRK2 I2020T異常のあるMSA-P症例の存在と、LRRK2 I2020T異常のないMSA-P症例の存在は興味深く、今後も本家系での臨床的・病理学的検討を展開したい。

E. 結論

今回検討したPARK8 Sagamihara家系で、MRI上、線条体病変は認めなかった。臨床で、MSA-Pと診断した症例はLRRK2 I2020Tの異常は認めず、本家系内での偶然の発症の可能性

は十分考えられる。

基本的にPARK8 Sagamihara家系では、神経病理学的に α -シヌクレインの異常出現・蓄積はco-incidentの可能性は否定できないが、同家系内でLRRK2 I2020T異常のあるMSA-P症例の存在と、LRRK2 I2020T異常のないMSA-P症例の存在は非常に興味深く、今後、さらなる臨床経過の追跡、臨床データの蓄積や神経病理学的検討などを計画している。

F. 健康危険情報

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

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

2. 実用新案登録

3. その他

ヒト髄液中の α -synuclein oligomer の検討

研究分担者 中川正法¹⁾

研究協力者 徳田隆彦¹⁾, 笠井高士¹⁾, 石神紀子¹⁾, Omar M.A. El-Agnaf²⁾

1) 京都府立医科大学大学院医学研究科神経内科学, 2) Department of Biochemistry, UAE 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 (PD) の発症機序においてきわめて重要な病的過程である。最近の研究結果からは、 α -synuclein の神経毒性の本体としてその可溶性 oligomer が注目されている。今年度は、ヒトの生体試料中の α -synuclein oligomer を定量する ELISA 系を開発し、その ELISA 系を用いて PD 患者及び対照患者の髄液中 α -synuclein oligomer を定量して比較検討した。また従来からの total α -synuclein を測定する ELISA 系を用いて同じサンプルで total α -synuclein 濃度も同時に測定した。PD 患者の髄液中では、対照患者と比較して、total α -synuclein 濃度は低下していたが、 α -synuclein oligomer および α -synuclein oligomer/ total 比が有意に増加していた。CSF α -synuclein oligomer および α -synuclein oligomer/ total 比による PD と対照患者の鑑別能力は、ROC 解析における AUC がそれぞれ 0.859 および 0.948 であった。髄液中の α -synuclein oligomer はパーキンソン病の診断バイオマーカーとして有用である可能性がある。

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り、 α -synuclein 遺伝子の重複変異を有する家系では、正常な 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 (1-3)。一方で、最近の研究により、 α -synuclein の神経細胞毒性は凝集した線維よりも pre-fibrillar な状態の α -synuclein oligomer に起因する可能性が高いことが報告されている (4)。さらに、Braak 仮説の提唱 (5) と昨年報告された PD 患者に移植された胎児由来の正常組織に 10 数年の経過で α -synuclein の異常蓄積による Lewy pathology が出現したこと (6, 7) からは、PD の病態

発症機序の重要な要素として prion-like な α -synuclein pathology の伝播現象が存在することが明らかにされており、細胞外の可溶性 α -synuclein oligomer はこのような伝播現象の分子的基盤としても注目されている (8)。我々は生体内での α -synuclein の量的変化と PD 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 total α -synuclein の定量系について報告してきた (9)。

今年度はヒトの生体試料中の α -synuclein oligomer を特異的に定量する ELISA 系を新規に開発し、その ELISA 系を用いて PD 患者及び対照患者の髄液中 α -synuclein oligomer を定量して比較検討した。

B. 研究方法

1) α -synuclein oligomer を特異的に定量する ELISA 系の開発

α -synuclein oligomer を測定する目的で、同じ抗ヒト α -synuclein monoclonal 抗体 (C211, SantaCruz) を capture と detection に用いる single-antibody sandwich ELISA (SAS-ELISA) 系を開発した (C211-C211 ELISA)。これは capture 抗体として C211 抗体を用いて、detection 抗体には biotin 化した C211 抗体を用いる ELISA である。この方法では、以下のような原理に基づいて α -synuclein monomer を検出せずに α -synuclein oligomer を検出している (図 1)。すなわち、 α -synuclein monomer が抗原の場合は C211 抗体に capture された段階で C211 抗体の α -synuclein 認識部位が占拠されてしまい、同じ C211 抗体による detection では capture された α -synuclein monomer を認識できない。一方、 α -synuclein oligomer の場合は、C211 capture 抗体によって占拠された抗原認識部位以外にも、分子の立体構造表面に同じ C211 抗体の抗原認識部位が出現する可能性があるため、そのような oligomer は C211 抗体による detection によっても検出される。

抗体が実際にヒト髄液中のどの様な分子量の α -synuclein species を検出するかについては、ヒトの髄液を Sephadex G-75 gel (GE, Pharmacia) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量に応じて分画した後に、各画分を C211-C211 ELISA に apply して得られる信号強度を解析した。

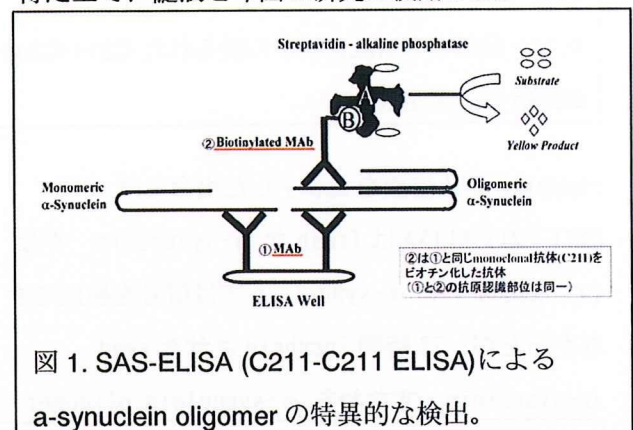
2) PD 患者および対照患者髄液中の α -synuclein の定量

1) で開発した C211-C211 ELISA 系を用いて、PD 患者 (32 名、43-83 (67.3 \pm 9.4) 歳、男性 18 名女性 14 名) および対照患者 (28 名、29-86 (64.0 \pm

13.9) 歳、男性 18 名女性 10 名) を対象として、髄液中の α -synuclein oligomer を定量し比較検討した。また同じ髄液サンプルを用いて、従来から用いている total α -synuclein (monomer + oligomer) を定量する ELISA 系 (C211-FL140 ELISA) により髄液中の total α -synuclein 濃度も同じサンプルで同時に測定した。

(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) α -synuclein oligomer を定量する ELISA 系
ゲルろ過クロマトグラフィーにより分画したヒト髄液画分では、C211-C211 ELISA は α -synuclein monomer が溶出される画分では信号を得られず、約 40kDa 以上の分子量を有する蛋白質分子が溶出される画分でのみ信号が検出された (図 2)。C211 抗体はヒト α -synuclein に特異性の高い monoclonal 抗体であり、以上から C211-C211 ELISA は、ヒト髄液中の α -synuclein monomer を検出せずに、特異的に α -synuclein oligomer を検出していると考えた。

また recombinant α -synuclein を濃度を変えて

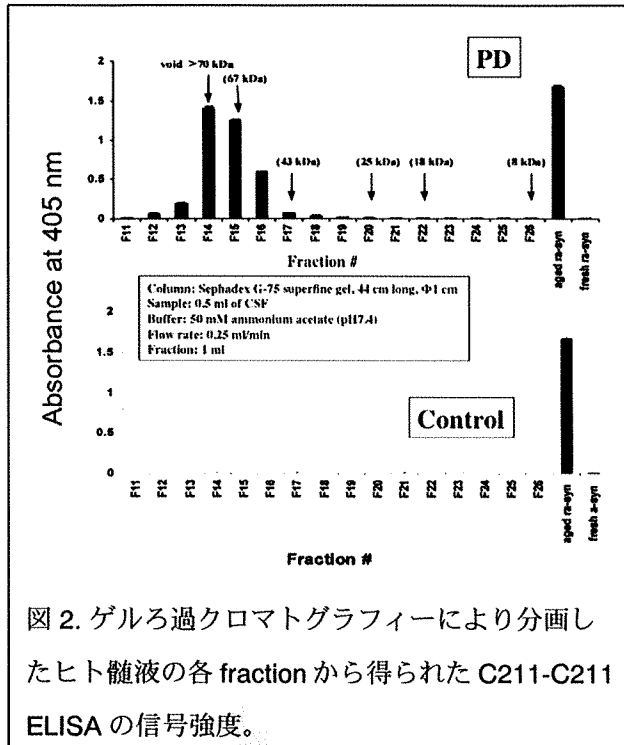


図 2. ゲルろ過クロマトグラフィーにより分画したヒト髄液の各 fraction から得られた C211-C211 ELISA の信号強度。

incubate した溶液を apply した場合には、C211-C211 ELISA は fresh な α -synuclein、すなわち monomeric α -synuclein では信号を検出できなかったが、72 時間 incubate させた aged α -synuclein、すなわち α -synuclein oligomer

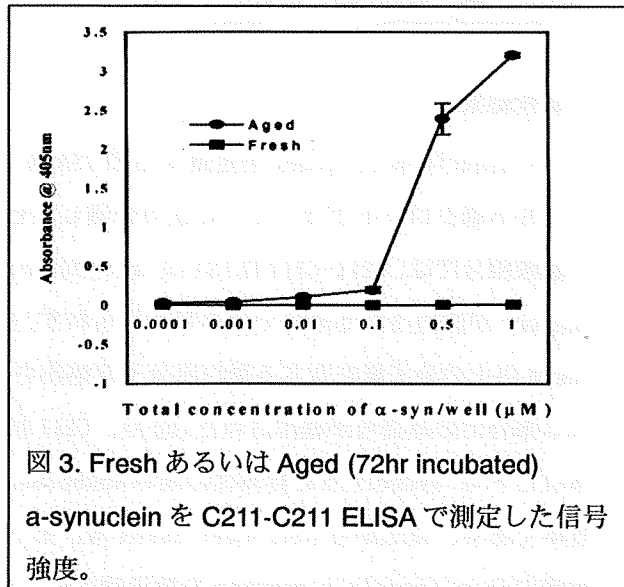


図 3. Fresh あるいは Aged (72hr incubated) α -synuclein を C211-C211 ELISA で測定した信号強度。

を含んだ溶液を apply した場合には信号を検出することができた(図 3)。この結果も C211-C211 ELISA が α -synuclein oligomer を特異的に認識していることを支持している。

2) PD 患者及び対照患者髄液中の α -synuclein の定量

我がが開発した C211-C211 ELISA および C211-FL140 ELISA による検討では、PD 患者の髄液中では、対照患者と比較して、total α -synuclein 濃度は低下していたが (PD vs. Control: 20.98 ± 0.76 vs. 24.40 ± 1.17 ng/ml, $p=0.0417$)、C211-C211 ELISA で測定される α -synuclein oligomer (PD vs. Control: $19,791 \pm 2,458$ vs. $9,569 \pm 1,037$ RLU/sec, $p<0.0001$) および α -synuclein oligomer/total 比 (PD vs. Control: 12.92 ± 1.08 vs. 4.58 ± 0.52 , $p<0.0001$) が有意に増加していた(図 4)。CSF α -synuclein oligomer および α -synuclein oligomer/total 比による PD と Control の鑑別能力は、ROC 解析における AUC がそれぞれ 0.859 および 0.948 であった。

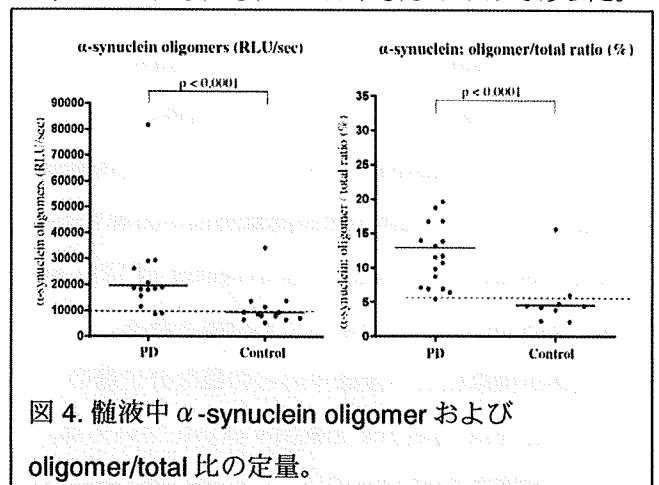


図 4. 髄液中 α -synuclein oligomer および oligomer/total 比の定量。

また、Hoehn-Yahr grade が 1, 2 度の軽症 PD 患者群および罹病期間が 24 ヶ月以内の発症早期の PD 患者群においても、髄液中 α -synuclein oligomer 濃度および α -synuclein oligomer/total 比は、対照群と比較して、有意に高値であった (Hoehn-Yahr grades 1 and 2, $n=8$, oligomer 濃度では $p = 0.0046$, oligomer/total 比では $p = 0.0002$; 発症 24M 以内の早期 PD, $n=12$, oligomer 濃度では $p = 0.0002$, oligomer/total

比では $p < 0.0001$).

D. 考察

我々は既にヒト髄液中の α -synuclein を特異的に測定できる ELISA 系 (C211-FL140 ELISA) を開発し、PD 患者の髄液中では α -synuclein 濃度が対照群と比較して低下していることを報告している (9)。我々の C211-FL140 ELISA は髄液中の α -synuclein については monomer 及び oligomer を含めた total の α -synuclein 量を測定していると考えられる。また、Mollenhauer らも彼らが独自に開発した ELISA 系により、同様の結果を報告しており (10)、PD 患者の髄液では total の α -synuclein 濃度が対照群と比較して減少していることについてはほぼ consensus が得られている。しかしながら、髄液中 total α -synuclein 濃度については、我々および Mollenhauer らによる検討ではともに、PD 患者群と対照群の間にかんがりの overlap が認められた。そのような状況で、近年、家族性パーキンソン病を発症する α -synuclein の遺伝子変異において全てに共通する表現型は α -synuclein oligomer の増加であって線維化の亢進ではないこと (11)、human fetal dopaminergic neuron の培養細胞系では、 α -synuclein 線維ではなく、54-83kDa の可溶性 α -synuclein complex に細胞毒性が認められること (4) などが報告され、アルツハイマー病における A β 蛋白と同様に、 α -synuclein の神経細胞毒性の発現には、沈着している成熟したアミロイド線維ではなく可溶性の α -synuclein oligomer が重要であるとする結果が集積されてきた。このような知見に基づいて、我々はヒト髄液中の α -synuclein oligomer を定量する ELISA 系を開発した。

今回我々が新規に開発した C211-C211 ELISA に

よる検討で、PD 患者群では、対照患者群と比較して、髄液中の α -synuclein oligomer および α -synuclein oligomer/ total 比が有意に増加していた。髄液中 α -synuclein oligomer および α -synuclein oligomer/ total 比によって、PD 群と対照群とは、ROC 解析における AUC がそれぞれ 0.859 および 0.948 と高い弁別能力により鑑別できた。従って、髄液中 α -synuclein oligomer 濃度および α -synuclein oligomer/ total 比は PD の診断バイオマーカーとして有用であると考えられた。また、髄液中 α -synuclein oligomer 濃度および α -synuclein oligomer/ total 比はいずれも、PD 患者の年齢、Hoehn-Yahr 分類による重症度および罹病期間との相関は認めなかった。従って、髄液中 α -synuclein oligomer 濃度および α -synuclein oligomer/ total 比は PD の発症早期から上昇していると考えられ、実際に、軽症 (Hoehn-Yahr grade 1, 2 度) および発症早期 (罹病期間が 24 ヶ月以内) の PD 症例においても、髄液中 α -synuclein oligomer 濃度および α -synuclein oligomer/ total 比は対照群と比較して有意に高値であった。Braak 仮説 (5) によれば、PD の運動症状が出現している時点では既に脳幹の α -synuclein pathology は stage 3 になっているとされており、今回検討した PD 患者群は当然のことながらすべて運動症状を発症しているため、軽症あるいは発症早期からすでに髄液中 α -synuclein oligomer が高値をとっていることも、Braak 仮説に基づいて考えれば了解が可能である。

今後、より多数の PD および他の変性疾患を有する患者、および PD の運動症状出現前の非運動症状を有する患者で髄液中の total α -synuclein および α -synuclein oligomer を検討する必要がある。

E. 結論

- 1) 髄液中の α -synuclein oligomer を特異的に測定する SAS-ELISA を新規に開発した。
- 2) PD 患者の髄液中では、対照患者と比較して、total α -synuclein 濃度は低下していたが、 α -synuclein oligomer レベルおよび α -synuclein oligomer / total 比が有意に増加していた。
- 3) 髄液中の α -synuclein oligomer レベルおよび α -synuclein oligomer / total 比を測定することにより、PD 患者群と対照患者群とを、高い弁別能力で鑑別できた。
- 4) 髄液中の α -synuclein oligomer は PD の診断バイオマーカーとして有用である可能性がある。

文献

1. A.B. Singleton, et al. Science, 302: 841, 2003.
2. M.C. Chartier-Harlin, et al. Lancet, 364: 1167-1169, 2004.
3. P. Ibanez, et al. Lancet, 364: 1169-1171, 2004.
4. J. Xu, et al. Nat Med, 8 : 564-565, 2002.
5. H. Braak, et al. Neurobiol Aging, 24: 197-211, 2003.
6. J-Y. Li et al. Nat Med, 14 : 501-503, 2008.
7. J.H. Kordower, et al. Nat Med, 14 : 504-506, 2008.
8. P. Desplats, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 106: 13010-13015, 2009.
9. T. Tokuda, et al. Biochem Biophys Res Commun, 349: 162-166, 2006.
10. B. Mollenhauer et al. Exp Neurol, 213: 315-325, 2008.

11. K.A. Conway, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 97: 571-576, 2000

F. 健康危惧情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kasai T, Tokuda T, Ishigami N, Sasayama H, Foulds P, Mitchell DJ, Mann DMA, Allsop D, Nakagawa M: Increased TDP-43 protein in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neuropathol 117(1): 55-62, 2009.
- 2) Noguchi-Shinohara M, Tokuda T, Yoshita M, Kasai T, Ono K, Nakagawa M, El-Agnaf OMA, Yamada M: CSF α -synuclein levels in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. Brain Res 1251: 1-6, 2009.

2. 学会発表

- 1) 徳田隆彦, 笠井高士, 石神紀子, 中川正法, D. Allsop: 筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者の髄液中 TDP-43 の定量. 日本神経学会総会(第 50 回), 仙台, 2009. 5. 20.
- 2) 笠井高士, 建部陽嗣, 徳田隆彦, 石神紀子, 水野敏樹, 中川正法, 渡邊義久, 田中雅: α -Synuclein 分解酵素である neurosin の細胞内動態の検討. 日本神経学会総会(第 50 回), 仙台, 2009. 5. 20.

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

α -Synuclein 分解酵素である neurosin の細胞内および細胞外における酵素活性の検討

研究分担者 中川正法¹⁾

研究協力者 建部陽嗣¹⁾, 笠井高士¹⁾, 徳田隆彦¹⁾, 田中雅樹²⁾, 渡邊義久²⁾

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

研究趣旨

α -Synuclein の異常凝集および蓄積は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。昨年度までの本会において我々は、 α -synuclein の分解活性を有する serine protease である neurosin に注目し、 α -synuclein に対する酵素的切断部位および neurosin の細胞内局在を検討してきた。これまでの検討から neurosin は α -synuclein の NAC domain を切断すること、細胞内では主として ER に存在し、培養上清中に分泌されることが明らかにしてきた。本年度は neurosin の細胞内および細胞外での protease 活性の有無を検討した。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、 α -synuclein 分解活性を有していた。一方で細胞内の neurosin には酵素活性は認められず、neurosin と α -synuclein を共発現させても cell lysate 中に α -synuclein の分解産物を検出することはできなかった。以上からは、neurosin は主として細胞外プロテアーゼとして機能している可能性が高いと考えられた。

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 α -synuclein の分解過程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 の役割を検討してきた(6)。

前年度までに neurosin が in vitro において α -synuclein の重合中心である NAC domain を切断すること、また培養細胞系において neurosin が主として ER に局在し、培養上清中に分泌されることを示してきた。今年度は neurosin の protease 活性および α -synuclein 分解活性が細胞内および細胞外のどちらで獲得されるのかを検討した。

B. 研究方法

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。Neurosin および neurosin-EGFP 発現ベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクトし免疫染色および蛍光顕微鏡によって neurosin の局在を観察した。さらに neurosin 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ウエスタンブロッティングで検討した。抗 neurosin 抗体は MAB2008 (B&D systems) を用いた。また、発現細胞の培養上清の serine protease 活性を定量する目的で、培養上清を *t*-Butyloxycarbonyl-L-Glutaminyl-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。培養上清中の neurosin による α -synuclein 分解過程は recombinant α -synuclein を上清中に添加し、ウエスタンブロッティングによって検証した。抗 α -synuclein 抗体は goat polyclonal anti- α/β synuclein antibody N-19 (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。細胞内 neurosin の酵素活性の有無は gelatin zymography によって評価した。細胞内 neurosin による α -synuclein 分解については、pre-pro-neurosin と α -synuclein を HEK293T 細胞に共発現させて、 α -synuclein の分解断片の有無をウエスタンブロッティングによって検討した。

C. 研究結果

Neurosin および neurosin-EGFP 発現細胞における neurosin の局在を蛍光顕微鏡によって観察したところ neurosin は ER マーカーと局在性が一致していたが、ミトコンドリアマーカーとは局在が一致しなかった。ライソソームマーカーと neurosin は一部で局在性の一致が認められた。

Neurosin 発現細胞の cell extract および無血清培養上清のウエスタンブロッティングを図 2 に示す。cell extract 中には neurosin の全長に相当するバンド(図 1, 矢印)が検出され、さらに neurosin が糖鎖修飾を受けたものと推測されるやや分子量の大きいバンドが検出された(図 1, 四角枠)。培養上清中では後者のバンドのみが検出された(図 1, 四角枠)。Cell extract 中には neurosin の分解産物と推測される neurosin 抗体陽性の断片ペプチドが検出された(図 1, アスタリスク)。以上の結果より、neurosin は細胞内では主として ER に局在し、細胞外に分泌されることが確認された。

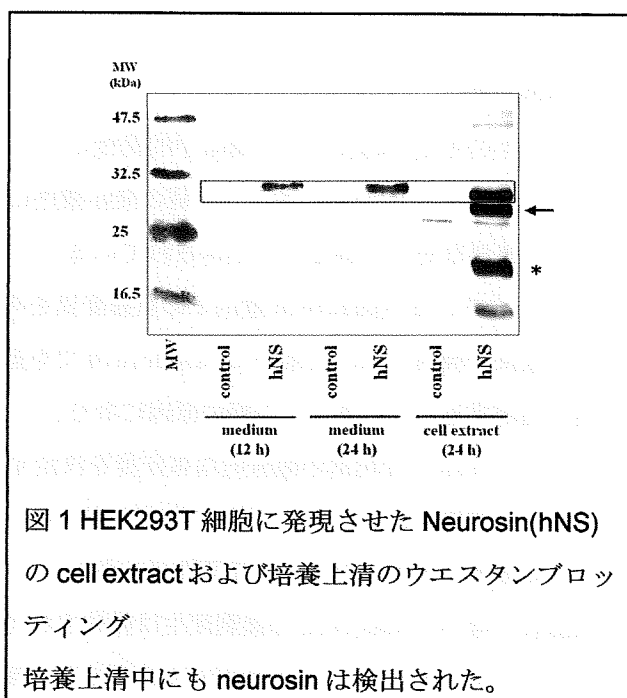


図 1 HEK293T 細胞に発現させた Neurosin(hNS) の cell extract および培養上清のウエスタンブロッティング
培養上清中にも neurosin は検出された。

培養上清における serine protease 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おいて protease 活性が検出された。Neurosin 発現細胞の培養上清中に添加した recombinant α -synuclein は経時的に減少した (図 2)。以上の結果より、細胞外に分泌された neurosin には serine protease 活性が存在し、 α -synuclein に対する分解活性を有していることが確認された。

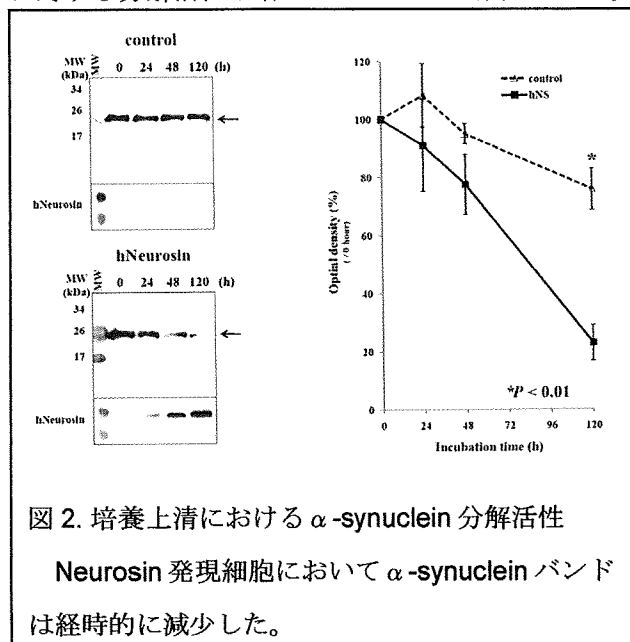


図 2. 培養上清における α -synuclein 分解活性
Neurosin 発現細胞において α -synuclein バンドは経時的に減少した。

細胞内 neurosin の protease 活性を検討する目的で行った gelatin zymography の結果を図 3 に示す。培養上清中の neurosin に相当するバンドにおいてゼラチンに対する分解が認められるのに対し、cell extract 中の neurosin にはゼラチンに対する分解反応は認められなかった。

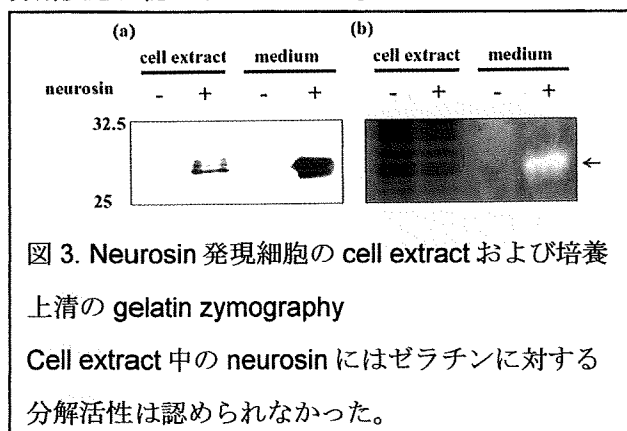


図 3. Neurosin 発現細胞の cell extract および培養上清の gelatin zymography
Cell extract 中の neurosin にはゼラチンに対する分解活性は認められなかった。

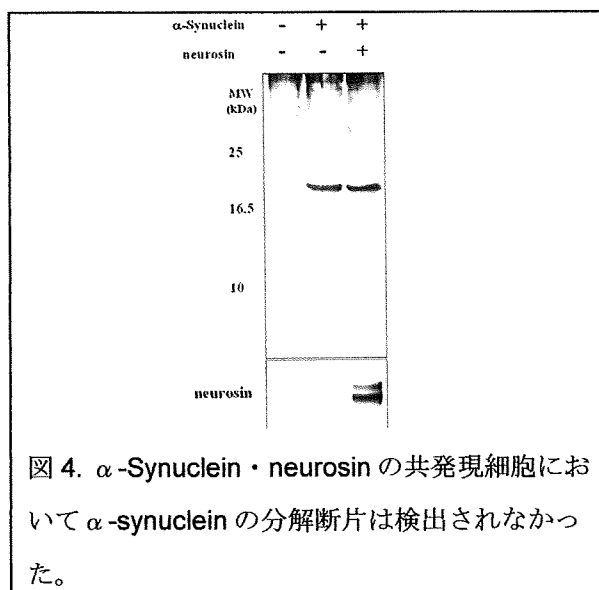


図 4. α -Synuclein・neurosin の共発現細胞において α -synuclein の分解断片は検出されなかった。

さらに、neurosin および α -synuclein を共発現させた HEK293T 細胞のウェスタンブロットティングによる検討 (図 4) においても、neurosin 発現細胞の cell extract 中に α -synuclein の分解産物は検出できなかった。以上から細胞内の neurosin には protease 活性はなく、 α -synuclein 分解活性も有していないと考えられた

D. 考察

今回の検討では細胞内の neurosin は、これまで報告されていたミトコンドリア (7) ではなく、ER に局在していた。また neurosin 発現細胞の cell extract および培養上清中に、neurosin が検出され、培養上清中の neurosin には serine protease 活性が確認された。以上の結果から、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ことが示唆された。細胞外に分泌された neurosin は培養上清中の α -synuclein 量を減少させたことから α -synuclein に対する分解活性を有していると考えられるが、細胞内の neurosin には protease 活性はなく、 α -synuclein に対する分解活性もないこ

とから neurosin は細胞外に分泌された後に protease 活性を獲得する可能性が高いと考えられた。

E. 結論

培養細胞に発現させた neurosin は ER に存在し、細胞外に分泌される細胞外 protease であることが示唆された。培養上清中でプロテアーゼ活性を獲得する可能性が高いと考えられた。

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. Kasai et al. Neurosci. Lett., 436: 52-56, 2008.
7. A. Iwata et al. Hum. Mol. Genet., 12: 2625-2635, 2003

F. 健康危惧情報：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) 笠井高士, 建部陽嗣, 徳田隆彦, 水野敏樹, 中川正法, 渡邊義久, 田中雅樹: α -synuclein 分解酵素である neurosin の細胞内動態の検討. 日本神経学会総会(第 50 回), 仙台, 2009. 5. 21.

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

AADC 遺伝子導入による L-dopa 反応性の変化

研究協力者 村松慎一

浅利さやか, 中村優子, 藤本健一, 中野今治

自治医科大学内科学講座神経内科学部門

研究要旨

パーキンソン病に対するアデノ随伴ウイルス (AAV)ベクターを使用した芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC)遺伝子治療の臨床研究において、遺伝子治療6か月後の評価でOff時の運動症状が改善していた。L-dopa 投与試験では運動症状の改善効果の持続時間は術前と有意差がなく3時間後には消失していた。AADC 遺伝子治療では、L-dopa に対する長期的な反応の改善効果が得られると考えられる。

A.研究目的

L-dopa をドパミンに変換する芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)の活性の大部分は、黒質緻密部から線条体に投射する神経細胞の軸索終末に存在する。進行したパーキンソン病では軸索終末の脱落に伴いAADC活性が著しく低下し、内服したL-dopa からドパミンへの変換が障害されていると考えられる。アデノ随伴ウイルス (AAV)ベクターを使用した AADC 遺伝子治療の臨床研究において、被殻の神経細胞に発現させたAADCにより、L-dopa に対する反応がどのように変化するかを検討する。

B.研究方法

「厚生省特定疾患：神経変性疾患調査研究班（1995年度）の診断基準」を満たす特発性パーキンソン病で初期にはL-dopa が有効であり、また他の神経変性疾患を示唆する所見を認めない 51～68歳の6名の患者を対象として、一人あたり総量 3×10^{10} vector genome (vg)のAADC 発現 AAV ベクター(AAV-hAADC-2)を定位脳手術により両側の被殻へ注入した。L-dopa 投与試験は、遺伝子導入前にも実施した3人について解析した。術前および術後6か月に各3回のL-dopa 投与試験を実施した。L-dopa 投与試験は、抗パーキンソン病薬を20時間中止した後、L-dopa 100 mg と Benserazide 25 mg の合剤を1錠経口投与し、投与前、投与30分、1時間、2時間、3時間、4時間後の各時点で

L-dopa の血中濃度を測定した。同時にUPDRSのPart IIIに準じて運動症状の程度を評価した。

(倫理面への配慮)

遺伝子治療の実施にあたっては、あらかじめ施設内倫理委員会および厚生科学審議会・科学技術部会の承認を得た。同時に遺伝子組換え研究として環境大臣の確認も得た。被験者には、検査の目的・危険性などについて十分な説明を行い、時間をおいて文書による同意を得た。

C.研究結果

L-dopa 投与試験を実施した3人の患者背景を表1に示した。

表1：対象患者の背景

患者	年齢	性別	罹病期間	L-dopa 服用年数	L-dopa 一日量 (mg)
A-4	58	男	11	11	700
A-5	68	女	18	15	1000
A-6	56	男	5	5	600

遺伝子治療6か月後の評価で、3人ともOff時の運動症状が改善していた。(図1) L-dopa 投与試験では、3人中2人で投与30分後のL-dopa 最大血中濃度の上昇が見られたが2時間以降の濃度は術前と変わらなかった。L-dopa 投与による運動症状の改善効果の持続時間は術前と有意差がなく、3人とも3時間後には消失していた。(図2)

図1. Off時のUPDRSの変化

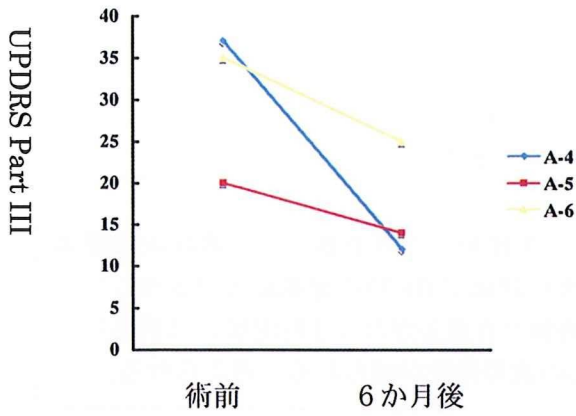
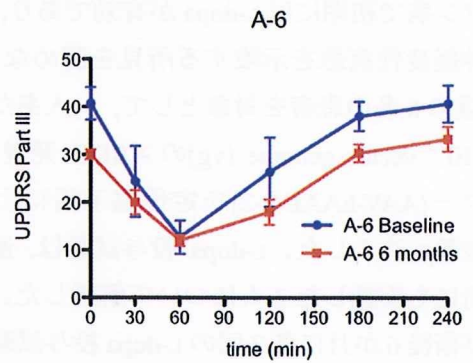
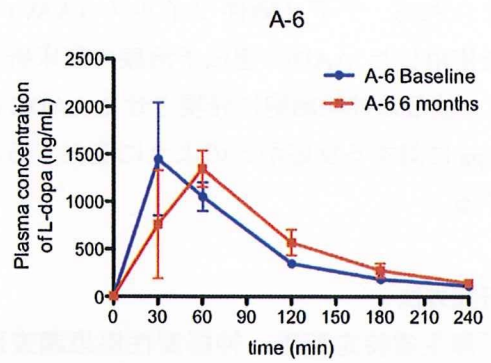
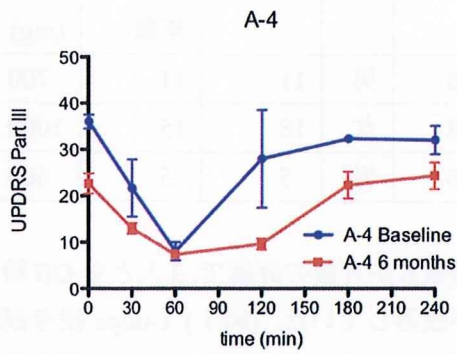
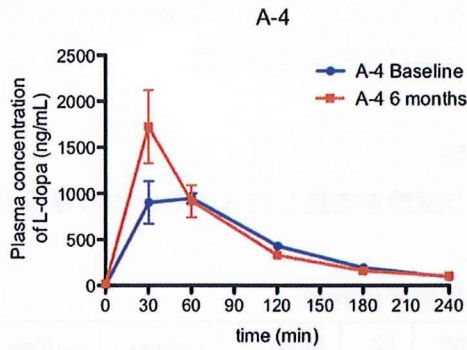
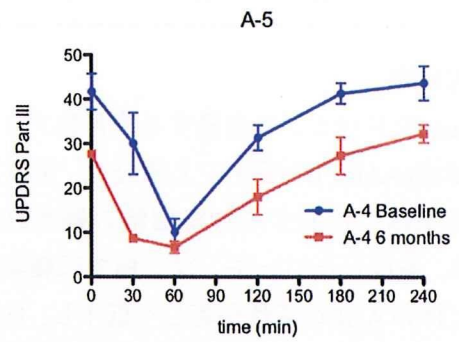
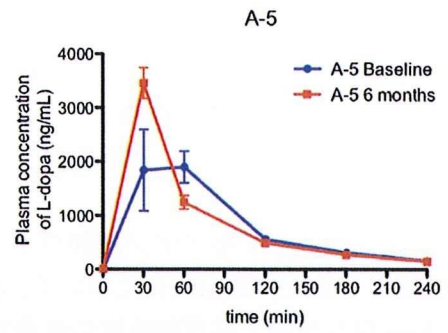


図2 L-dopa 負荷試験

上段：L-dopa 血中濃度
下段：UPDRS Part III



D. 考察

自治医科大学では、進行したパーキンソン病患者を対象として、AAV ベクターを応用し AADC 遺伝子を両側の被殻に導入する遺伝子治療の臨床研究を平成 19 年 5 月から開始した。当初の 3 人までの結果は昨年報告した。この遺伝子治療法では、パーキンソン病で脱落を免れた被殻の神経細胞に AADC 遺伝子を発現させる。本来ドパミンを受容する側の細胞でドパミンを産生することになる。

今回の L-dopa 試験の結果、遺伝子治療による運動症状の改善は、当初推察された短期的な L-dopa 反応の改善による On 時間の延長ではなく、長期的な反応 long duration response の改善効果によると考えられた。long duration response は、単回の L-dopa 投与量が多い方が少ない場合より大きくなることが報告されている(Zappia M, et al., Neurology 2000)。これまでのカニクイサルの MPTP モデルを使用した *in vivo* dialysis 実験で、AADC 遺伝子導入した被殻では L-dopa 投与後に細胞外のドパミン量も増加することが明らかになっている(Muramatsu et al., Hum Gene Ther 2002)。

E. 結論

AADC 遺伝子治療は、L-dopa の長期反応を改善する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Fukushima F, Nakao K, Shinoe T, Fukaya M, Muramatsu, S, Sakimura K, Kataoka H, Mori H, Watanabe M, Manabe M, Mishima M: Ablation of NMDA receptors enhances the excitability of hippocampal CA3 neurons. PLoS ONE, 4(1):e3993, 2009.
2. Kuratomi S, Ohmori Y, Ito M, Shimazaki K, Muramatsu, S, Mizukami H, Uosaki H, Yamashita JK, Arai Y, Kuwahara K, Takano M: The cardiac pacemaker-specific channel Hcn4 is a direct transcriptional target of MEF2. Cardiovasc Res, 83(4):682-687, 2009.
3. Muramatsu, S, Okuno T, Suzuki Y, Nakayama T, Kakiuchi T, Takino N, Iida A, Ono F, Terao K, Inoue N, Nakano I, Kondo Y and Tsukada H: Multi-tracer assessment of dopamine function after transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in a primate model of Parkinson's disease. Synapse, 63:541-548, 2009.
4. Tanaka Y, Ikeda T, Masuda S, Shibata H, Takeuchi K, Komura M, Iwanaka T, Muramatsu, S, Kondo Y, Takahashi K, Yamanaka S and Hanazono Y: ERas is expressed in primate embryonic stem cells but not related to tumorigenesis. Cell Transplant, 18(4):381-389, 2009.
5. Okuno T, Nakayama T, Konishi N, Michibata H, Wakimoto K, Suzuki Y, Nito S, Inaba T, Nakano I, Muramatsu, S, Takano M, Kondo Y, Inoue N: Self-contained induction of neurons from human embryonic stem cells. PLoS ONE, 4:e6318, 2009.
6. Ito T, Yamamoto S, Hayashi T, Kodera M, Mizukami H, Ozawa K, Muramatsu, S: A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of anti-adenovirus neutralising antibodies. Ann Clin Biochem, 46(Pt 6):508-510, 2009.
7. Noguchi A, Matsumura S, Dezawa M, Tada M, Yanazawa M, Ito A, Akioka M, Kikuchi S, Sto M, Ideno S, Noda M, Fukunari A, Muramatsu S, Itokazu Y, Sato K, Takahashi H, Teplow DB, Nabeshima Y, Kakita A, Imahori K, Hoshi M: Isolation and characterization of patient-derived,

toxic, high-mass amyloid b-protein (Ab) assembly from Alzheimer's disease brains. J Biol Chem, 284(47):32895-905, 2009.

8. Kadkhodaei B, Ito T, Joodmardi E, Mattsson B, Rouillard C, Carta M, Muramatsu S, Ichinose C, Nomura T, Chambon P, Metzger D, Larsson N, Lindqvist E, Olson L, Bjorklund A, Ichinose H, Perlmann T.: Nurr1 is Required for Maintenance of Maturing and Adult Midbrain Dopamine Neurons. J Neurosci, 29(50)15923-15932, 2009.

2.学会発表

1. 村松慎一：パーキンソン病の再生医学. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 2009 年 5 月 22 日. (プログラム p45)
2. 浅利さやか, 村松慎一：パーキンソン病の遺伝子治療の PET 解析. 第 50 回日本神経学会総会, 仙台, 2009 年 5 月 22 日. (プログラム p121)
3. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I : “Aromatic L-amino acid decarboxylase gene therapy for Parkinson’s disease: results from an open-label, phase I trial ”, The American society of gene therapy (ASGT)’s 12th annual meeting, San Diego, May 29, 2009.
4. 伊藤哲男, 林司, 古寺美加, 水上浩明, 小澤敬也, 三室淳, 坂田洋一, 村松慎一：中和抗体法と相関性のある抗 AAV2 抗体検出試薬の開発. 第 32 回日本血栓止血学会学術集会, 北九州, 2009 年 6 月 5 日. (日本血栓止血学会誌 20(2), p204)
5. Muramatsu S, Fujimoto K, Kato S, Asari S, Mizukami H, Ikeguchi K, Kawakami T, Urabe M, Kume A, Sato T, Watanabe E, Ozawa K and Nakano I : Phase I trial of AAV vector-mediated gene delivery of aromatic L-amino acid decarboxylase for parkinson’s disease. The Japan

society of gene therapy’s 15th annual meeting. Osaka, July 11, 2009.

6. 村松慎一, 一瀬宏：線条体のドパミン代謝：新たな視点と治療. 第 32 回日本神経科学大会, 名古屋, 2009 年 9 月 17 日. (プログラム p84)

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得：特になし
- 2.実用新案登録：特になし
- 3.その他：特になし

パーキンおよび関連蛋白によるアポトーシス制御

研究分担者 梶 龍児¹⁾

研究協力者 三ツ井貴夫¹⁾²⁾, 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

2) 徳島病院臨床研究部

研究趣旨

パーキンおよび関連蛋白である Klokin 1/ChPF ファミリーの抗アポトーシスについて検討した。培養細胞系における過剰発現・RNAi の成績から、Klokin 1/ChPF ファミリーは、パーキンと同様に抗アポトーシス作用を有することが明らかになった。さらにその作用はパーキン非存在下でも発揮されること、および Klokin 1/ChPF ファミリーはパーキン発現低下に伴うアポトーシスを抑制しうるということが示唆された。また、パーキン KO マウス黒質で Klokin 1/ChPF ファミリーの発現が著明に増加していた。すなわち Klokin 1/ChPF ファミリーはパーキンをミトコンドリアに運搬するのみならずミトコンドリア内で独自の抗アポトーシス作用を発揮し、その作用はパーキンの作用を代償しうるということが示唆された。

A. 研究目的

我々は家族性パーキン病 PARK2 に関する研究を行う中で、その原因遺伝子であるパーキンの転写産物はミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア遺伝子の転写・複製を促進することを明らかにした。さらに我々はパーキンに結合し、ミトコンドリアまで運搬する蛋白を探索し、新規の蛋白である Klokin1 を見出した。パーキン蛋白は抗アポトーシス作用、酸化ストレスからの防御など、ミトコンドリアと関連した機能が報告されている。本研究では、パーキンおよび関連蛋白である Klokin 1/ChPF ファミリーが神経細胞においてアポトーシスにどのように関連しているのか、ならびにパーキンと関連蛋白の機能連関について検討する。

B. 研究方法

培養細胞系：COS1 において siRNA を用いて Klokin 1 とパーキンの内因性蛋白を抑制し、あるいは Klokin 1 とパーキンの遺伝子導入を行い、ミトコンドリア

における両蛋白の局在を検討した。さらに、同細胞の Cell Viability を蛍光プレートリーダーで検討した。

パーキンノックアウト (KO) マウス：脳内の Klokin 1/ChPF ファミリーの発現を蛍光抗体法ならびに免疫ブロット法で検討した。

C. 研究結果

Klokin 1/ChPF ファミリーを過剰発現すると、ミトコンドリアにおけるパーキンの内因性発現は著明に増加し、RNAi により Klokin 1/ChPF ファミリーを抑制すると、ミトコンドリアのパーキン発現は低下した。パーキンあるいは Klokin 1/ChPF ファミリーを過剰発現すると、Cell Viability は増加した。また siRNA によりそれぞれの発現を抑制した場合には Cell Viability は低下した。さらに、パーキン発現を抑制しアポトーシスをきたした細胞に Klokin 1 を過剰発現させると Cell Viability は回復した。一方、Klokin 1 発現を抑制した細胞の Cell Viability