

例の新規患者が同定された。

遺伝子発現に関しては、酸化ストレスの無い状態で、患者細胞では正常細胞に比べ、72 遺伝子の発現増加が、108 の発現低下が示唆された。酸化ストレス下では、55 遺伝子の発現増加が、74 遺伝子が発現低下していることが示唆された。詳細は後述の「AAA 症候群の分子遺伝学的研究」の項参照。

D. 考察

小児外科学分野において、食道アカラシアは全国でわずか 22 例とそれほど多くないことが判明した。特発性食道アカラシアの原因としては、AAA 症候群の関与は少ないとの報告もあるが (Dig Liver Dis. 2005;37:312.)、一方、初発症状は食道アカラシアに伴う嘔吐であり、発症時は副腎皮質機能不全や運動ニューロン障害を欠く場合も報告されている (Eur J Pediatr Surg. 2001;11:41)。また、致死的低血糖と関連する副腎皮質機能不全は、潜在的に存在している場合もあり、手術侵襲という身体的ストレスにより、顕在化する可能性もある。したがって、小児期の食道アカラシアでは、今後も AAA 症候群を念頭に入れる必要があると思われる。その意味で、本研究で全国的に疾患を啓発できたことは重要な意味をもつと考えられる。

E. 結論

小児外科学分野では、新たな遺伝子異例は見出されなかった。

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

1. Hirano M, Shima M, Nakajima Y, Fukui H, Hara Y, Ueno S. Japanese patients with triple A syndrome. International Society for Autonomic

Neuroscience 2009.

2. 平野牧人、福井 博、中島祥介、嶋 緑倫、原 嘉昭、上野 聡. 本邦における AAA(トリプル A)症候群の実態. 内科学会近畿地方会 2009.
3. 平野牧人、嶋 緑倫、福井 博、中島祥介、原 嘉昭、上野 聡. 本邦における AAA(トリプル A)症候群の臨床遺伝的検討. 日本神経学会近畿地方会 2009.
4. 平野牧人、嶋 緑倫、福井 博、中島祥介、原 嘉昭、上野 聡. AAA(トリプル A)症候群における小児期からの臨床経過. 小児科学会 奈良地方会 2009.
5. 町田洋太、平野牧人、嶋 緑倫、福井 博、中島祥介、原 嘉昭、國本雅也、上野 聡. 本邦における AAA(トリプル A)症候群の臨床的特徴. 日本内科学会関東地方会 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表. AAA症候群全国実態調査結果(小児外科学会)

対象施設数	回答率	AR	Ac	Al	Ad	Mo	Ac	Ac	Ac	Al	Al	Ad	Ac	Ac	Ac	Al	All	Gene	陽性
							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
北海道	2	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
青森県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
秋田県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
岩手県	2	50%	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
山形県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
宮城県	2	50%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
福島県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
栃木県	3	33%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
群馬県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
茨城県	2	50%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
埼玉県	4	100%	0	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
山梨県	2	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
千葉県	2	100%	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
東京都	15	80%	0	4	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
神奈川県	3	67%	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
新潟県	4	50%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
長野県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
静岡県	2	50%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
愛知県	4	50%	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
石川県	2	50%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
富山県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
福井県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
岐阜県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
三重県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
滋賀県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
京都府	2	50%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
奈良県	1	100%	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大阪府	6	67%	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
和歌山県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
兵庫県	3	33%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
岡山県	2	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
広島県	3	100%	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
鳥取県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
島根県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
山口県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
香川県	2	50%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
徳島県	1	0%	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
愛媛県	2	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
高知県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
福岡県	6	33%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
佐賀県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大分県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
長崎県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
宮崎県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
熊本県	2	50%	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
鹿児島県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
沖縄県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	92	63%	0	22	1	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

AR, 劣性遺伝; Ac, アカラシア; Al, 無涙症; Ad, 副腎不全; Mo, 運動ニューロン障害; X+Y, 2症状のみ合併; X+Y+Z, 3症状のみ合併; All, 4症状全て合併; Gene, 遺伝子検査施行数; 陽性, 遺伝子異常陽性

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「AAA 症候群の実態把握のための奨励研究」班
分担研究報告書

AAA 症候群の小児神経学分野における実態調査

研究分担者 嶋 緑倫 奈良県立医科大学 小児科学 教授

【研究要旨】

AAA症候群は食道アカラシア、無涙症、副腎皮質機能不全、筋萎縮・筋力低下が合併する常染色体劣性疾患である。原因遺伝子ALADINが同定されているが、原因不明例も多い。本疾患の発症年齢は0-35歳と広く分布するが、小児期での発症が特に多い。本研究では、AAA症候群を全国的に啓発し、その実態を把握するため、日本小児神経学会に属する230の専門医施設に啓発用文書と調査票を送付した。関連各科と協力し、本疾患が疑われる症例では、遺伝子検査を施行した。全国調査の結果、126施設から回答を得た（回収率45%）。運動ニューロン障害は489例見られたが、2症状以上を合併し、AAA症候群が疑われる症例はなかった。本疾患は、小児神経学分野において、まれな疾患であると考えられる。しかし、致死的低血糖を生じる副腎皮質機能不全の合併があるので、今後も早期診断・治療を行えるように疾患の啓発を続ける必要があると考えられる。

A. 研究目的

AAA症候群は食道アカラシア、無涙症、副腎皮質機能不全、筋萎縮・筋力低下が合併する常染色体劣性疾患である。原因遺伝子ALADINが同定されたが、1/3以上の例で遺伝子異常が検出されず、原因不明例が多い。副腎皮質機能不全のため致死的低血糖を生じる場合があり、正確な診断は重要である。本研究では、疾患を全国的に啓発し、正確な診断に基づく適切な治療・ケアを提供する目的や、基礎研究用のデータ収集のために、全国実態調査を施行した。

B. 研究方法

日本小児神経学会に属する230の専門医施設に啓発用文書と調査票を送付し、過去1年間に診療した食道アカラシア、無涙症、副腎皮質機能不全、筋萎縮・筋力低下（運動ニューロン障害）を有する患者数を調べた。

本学の神経内科学、小児科学、消化器・総合外科学教室と共同で、AAA症候群が疑

われた患者の遺伝子検査および患者線維芽細胞を用いて、ALADIN遺伝子異常に伴う、遺伝子発現変化について検討した（CodeLink Human Whole Genome Bioarray）。詳細は、「AAA症候群の分子遺伝学的研究」の項参照。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析については、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日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示1号）を遵守した。研究的遺伝子解析および患者線維芽細胞を用いた研究は、本学の倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

合計126施設から（回収率55%）、一次調査票の回答を得た（表）。2症状以上を合併した症例はなかった。小児神経学分野では、新たな遺伝子異常は検出されなかったが、神経内科学分野で2例の新規患者が同定された。また、以前に遺伝子異常なしと報告された症例についても（日本未熟児新生児学会雑誌 2007;2:49）、

関連施設のご協力の下 DNA を入手でき、エクソンの重複・欠失について再検査を行ったが、異常は見出せなかった。

遺伝子発現に関しては、酸化ストレスの無い状態で、患者細胞では正常細胞に比べ、72 遺伝子が有意に発現増加し、108 遺伝子の発現低下が示唆された。酸化ストレス下では、55 遺伝子が発現増加、74 遺伝子が発現低下していることが示唆された。詳細は後述の「AAA 症候群の分子遺伝学的研究」の項参照。

D. 考察

AAA 症候群における運動ニューロン障害が生じるのは 80% が 20 歳未満であり、小児神経学に携わる医療者が初めに診察する機会が多いと考えられる（「AAA 症候群の神経内科学分野における実態調査」 図参照）。今回の調査では、過去 1 年間には、本疾患の診療歴はなかったが、この一因として、既に報告された症例は成人に達していることも考えられた。このように本疾患はまれであると考えられたが、副腎皮質機能不全による致死的低血糖を生じる可能性があり、今後も、全国的な啓発は重要であると考えられる。

E. 結論

小児神経分野において、運動ニューロン障害は比較的多いが、AAA 症候群はまれである。

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

1. Hirano M, Shima M, Nakajima Y, Fukui H, Hara Y, Ueno S. Japanese patients with triple A syndrome. International Society for Autonomic Neuroscience 2009.

2. 平野牧人、福井 博、中島祥介、嶋 緑倫、原 嘉昭、上野 聡. 本邦に

おける AAA(トリプル A)症候群の実態. 内科学会近畿地方会 2009.

3. 平野牧人、嶋 緑倫、福井 博、中島祥介、原 嘉昭、上野 聡. 本邦における AAA(トリプル A)症候群の臨床遺伝的検討. 日本神経学会近畿地方会 2009.

4. 平野牧人、嶋 緑倫、福井 博、中島祥介、原 嘉昭、上野 聡. AAA(トリプル A)症候群における小児期からの臨床経過. 小児科学会 奈良地方会 2009.

5. 町田洋太、平野牧人、嶋 緑倫、福井 博、中島祥介、原 嘉昭、國本雅也、上野 聡. 本邦における AAA(トリプル A)症候群の臨床的特徴. 日本内科学会関東地方会 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表. AAA症候群全国実態調査結果(小児神経学会)

対象施設数	回答率	AR	Ac	Al	Ad	Mo	Ac	Ac	Ac	Al	Al	Ad	Ac	Ac	Ac	Al	All	Gene	陽性
							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
北海道	13	62%	0	2	0	1	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
青森県	2	100%	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
秋田県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
岩手県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
山形県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
宮城県	4	25%	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
福島県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
栃木県	7	43%	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
群馬県	2	100%	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
茨城県	4	100%	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
埼玉県	6	67%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
山梨県	4	50%	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
千葉県	9	56%	2	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
東京都	44	41%	0	0	0	2	307	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
神奈川県	12	42%	0	0	0	1	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
新潟県	3	100%	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
長野県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
静岡県	5	60%	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
愛知県	10	80%	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
石川県	2	50%	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
富山県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
福井県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
岐阜県	4	75%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
三重県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
滋賀県	3	67%	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
京都府	15	27%	0	3	0	10	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
奈良県	1	100%	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大阪府	16	56%	0	0	4	2	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
和歌山県	2	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
兵庫県	9	67%	0	1	1	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
岡山県	5	60%	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
広島県	2	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
鳥取県	5	80%	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
島根県	2	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
山口県	3	67%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
香川県	3	67%	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
徳島県	3	33%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
愛媛県	4	25%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
高知県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
福岡県	10	60%	0	0	0	2	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
佐賀県	1	100%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大分県	1	100%	0	0	0	2	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
長崎県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
宮崎県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
熊本県	3	67%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
鹿児島県	2	50%	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
沖縄県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	230	45%	2	7	5	27	489	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

AR, 劣性遺伝; Ac, アカラシア; Al, 無涙症; Ad, 副腎不全; Mo, 運動ニューロン障害; X+Y, 2症状のみ合併; X+Y+Z, 3症状のみ合併; All, 4症状全て合併; Gene, 遺伝子検査施行数; 陽性, 遺伝子異常陽性

AAA 症候群の眼科学分野における実態調査および

新しいドライアイの病態評価法の確立

研究分担者 原 嘉昭 奈良県立医科大学 眼科学教授

【研究要旨】

AAA症候群は食道アカラシア、無涙症、副腎皮質機能不全の3徴候に筋萎縮・筋力低下が合併する常染色体劣性疾患である。眼科学の分野においては、このうち無涙症（ドライアイ）が問題となる。本研究では、疾患を全国的に啓発し、実態を把握するために、全国調査を施行した。すなわち、日本角膜学会に属する232施設に啓発用文書と調査票を送付した。また、本邦にはこのように極めて多くのドライアイ患者がいるにもかかわらず、その病態の客観的評価法に乏しかった。ドライアイでは、角膜新生血管がしばしば生じ、角膜混濁を引き起こし視力低下の原因となる。ここでは、レーザースペックルフローグラフィを用いて新生血管の血流を測定することで、病勢を評価した。実態調査の結果、81施設より回答が得られ、ドライアイは約24,500例と、他の徴候に比べ圧倒的に多かった。しかし、2徴候以上を合併する例はわずか3例であり、新たにAAA症候群と診断される例はなかった。新生血管の血流評価では、ドライアイ患者における血管新生が適切に評価可能であることが判明した。

A. 研究目的

AAA症候群は食道アカラシア、無涙症（ドライアイ）、副腎皮質機能不全の3徴候に筋萎縮・筋力低下が合併する常染色体劣性疾患である。本疾患は稀な疾患と考えられるが、その一徴候であるドライアイは眼科学分野では日常的な疾患である。本研究では、AAA症候群を全国的に啓発し、その実態を把握するため、全国調査を施行した。

角膜は透明で、血管のない組織であるが、ドライアイにより、角膜上のムチン層が傷害されると、角膜の慢性的な酸素不足が生じる。これにより、結膜、強膜から血管が進入し、角膜中央に向かって進展する。この角膜新生血管は角膜混濁を引き起こし、重篤な視力障害を生じる。しかし、この病態についての客観的評価法は乏しかった。ここでは、レーザースペックルフローグラフィを用いた新しい病態評価方法の確立を目指した。

ファイを用いた新しい病態評価方法の確立を目指した。

B. 研究方法

日本角膜学会に属する232の専門医施設に啓発用文書と調査票を送付し、過去1年間に診療した食道アカラシア、無涙症、副腎皮質機能不全、筋萎縮・筋力低下を有する患者数を調べた。

角膜血管新生の評価について、まず、予備実験として、有色家兎(体重1.5から2.1 kg; 雄) 10羽10眼を用い、土至田宏の方法に従いドライアイ家兎を作成した(新しいドライアイモデルの評価: 副交感神経節前線維の除神経家兎モデル. *Frontiers in Dry Eye* 4: 42-46, 2009)。角膜輪部に新生血管が生じたことを手持ちスリットランプ(コーワSL-20, コーワ株式会社, 日本)で確認し、このときをベースラインとしてレーザースペックルフローグラフィ(LSFG-NAVI)を用いて血流

量を測定した(藤居仁, 小西直樹, 李 旻哲, レーザー散乱を利用した血流画像化装置開発の現況、応用物理, 75, no.6, 699-701, 2006)。その後、血管新生を抑制するため1日3回 0.05%抗VEGF剤の点眼を行った。得られたデータは血流値(MBR)として解析し同一例で、ベースライン、点眼1日後、1週間後、1ヵ月後とそれぞれ5回の安定したデータの平均を用いた。データの比較はt検定をもちいた。家兎の扱いについては Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Resolution on the Use of Animals in Vision and Ophthalmic Research の規約および「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)」を遵守した。

ドライアイの患者に対して同様のレーザースペックルフローグラフィを用いた血流評価を行った。対象は男性2人、女性2人(平均年齢35歳)で角膜に著明な新生血管のある症例。さらに、ドライアイの角結膜上皮障害の指標であるフルオレスセインのポイント数で評価した(島崎潤「2006年ドライアイ診断基準」『あたらしい眼科』2007年、24巻、p181-184)。なお患者における血流測定に関し、奈良県立医科大学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

合計 81 施設から(回収率 35%) 一次調査票の回答を得た(表)。このうち2症状以上の合併例を経験した2施設(当施設を除く)へ二次調査票を送付するも、明らかに異なる疾患であるとの回答が1施設よりあった。ドライアイの症例は合計約 24,500 例との回答を得られ、これは他の徴候に比べ圧倒的に多数であった。しかし、他の3徴候との合併は、ドライアイと運動ニューロン障害合併の2例のみであり、本学の症例以外に、新たな症例はなかった。

ベースラインの MBR 値は平均 12.0±4.8 であった。抗 VEGF 剤の点眼を行った1日後、1週間後、1ヵ月後の MBR 値はそれぞれ平均 13.0±6.2、10.9±4.2 そして

9.1±3.2 と有意に減少した。スリットランプでの確認でも角膜の新生血管の現象がみられ血流量の減少同時に起こっていた。そのため角膜の透明性は全例で維持されていた。VEGF の効果阻害により、本評価方法が妥当であることが証明された。ヒトにおいてもドライアイが改善する(フルオレスセインのポイント数が減る)と新生血管の血流量が減少した。今回は4例であるので統計学的には解析できなかったが相関関係が見られた。

D. 考察

眼科領域において、ドライアイは非常に日常的な疾患である。この中から、本疾患の様な特殊疾患を見出すのは困難が予想され、実際に2症状以上の合併例がわずかに3例であった。

家兎のドライアイ症例にともなう角膜新生血管は抗 VEGF 剤 (bevacizumab) にて有意に抑制され、新生血管の血流量も減少していた。そしてヒトでドライアイの改善に伴って血流量が減少することをレーザースペックルフローグラフィを用いて確認した。今後、本方法により、客観的に評価することが病態把握に有用であると考えられる。

E. 結論

ドライアイ症例は多かったが、AAA 症候群疑い例は少数に留まった。レーザースペックルフローグラフィは動物およびヒトでの角膜新生を評価できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1. Hirano M, Shima M, Nakajima Y, Fukui H, Hara Y, Ueno S. Japanese patients with triple A syndrome. International Society for Autonomic Neuroscience 2009.
2. 平野牧人、福井 博、中島祥介、嶋緑倫、原 嘉昭、上野 聡. 本邦における AAA(トリプル A)症候群の

実態. 内科学会近畿地方会 2009.

3. 平野牧人、嶋 緑倫、福井 博、中島祥介、原 嘉昭、上野 聡. 本邦における AAA(トリプル A)症候群の臨床遺伝的検討. 日本神経学会近畿地方会 2009.
4. 平野牧人、嶋 緑倫、福井 博、中島祥介、原 嘉昭、上野 聡. AAA(トリプル A)症候群における小児期からの臨床経過. 小児科学会 奈良地方会 2009.
5. 町田洋太、平野牧人、嶋 緑倫、福井 博、中島祥介、原 嘉昭、國本雅也、上野 聡. 本邦における AAA(トリプル A)症候群の臨床的特徴. 日本内科学会関東地方会 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表. AAA症候群全国実態調査結果(角膜学会)

対象施設数	回答率	AR	Ac	Al	Ad	Mo	Ac	Ac	Ac	Al	Al	Ad	Ac	Ac	Ac	Al	Gene	陽性
							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
北海道	7	43%	0	0	155	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
青森県	2	100%	0	0	1,300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
秋田県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
岩手県	5	60%	0	0	370	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
山形県	5	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
宮城県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
福島県	3	33%	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
栃木県	3	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
群馬県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
茨城県	6	50%	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
埼玉県	5	20%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
山梨県	1	100%	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
千葉県	4	100%	0	0	670	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
東京都	66	36%	0	0	9,082	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
神奈川県	8	25%	0	0	220	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
新潟県	2	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
長野県	2	50%	0	0	746	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
静岡県	3	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
愛知県	7	14%	0	0	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
石川県	3	33%	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
富山県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
福井県	2	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
岐阜県	2	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
三重県	1	100%	0	0	41	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
滋賀県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
京都府	10	50%	0	0	1,150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
奈良県	3	33%	1	1	35	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
大阪府	28	36%	0	0	8,560	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
和歌山県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
兵庫県	8	13%	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
岡山県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
広島県	3	33%	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
鳥取県	2	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
島根県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
山口県	6	17%	0	0	400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
香川県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
徳島県	4	50%	0	0	300	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
愛媛県	8	63%	0	0	400	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
高知県	1	100%	0	0	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
福岡県	6	33%	0	0	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
佐賀県	3	33%	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大分県	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
長崎県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
宮崎県	1	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
熊本県	3	67%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
鹿児島県	3	0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
沖縄県	1	100%	0	0	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	232	35%	1	1	24,574	3	5	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	1

AR, 劣性遺伝; Ac, アカランア; Al, 無涙症; Ad, 副腎不全; Mo, 運動ニューロン障害; X+Y, 2症状のみ合併; X+Y+Z, 3症状のみ合併; All, 4症状全て合併; Gene, 遺伝子検査施行数; 陽性, 遺伝子異常陽性; nd, 実数記載無し

AAA 症候群の分子遺伝学的研究

研究分担者 平野牧人 奈良県立医科大学 神経内科准教授

【研究要旨】

AAA症候群は、まれな常染色体劣性遺伝病であり、ALADINが原因遺伝子として同定されているが、いまだ原因不明例も多い。また、ALADIN異常による本疾患の発症機序も十分には解明されていない。本研究では、遺伝子異常に伴う蛋白の局在変化と遺伝子発現プロファイルの変化について検討した。その結果、GFP融合ALADIN蛋白は野生型では生理的局在部位の核膜孔に存在したが、変異型では大部分は細胞質にとどまった。臨床的に軽症のR155H変異では、核膜への部分移行がみられ、蛋白局在と臨床症状に一部関連が見られた。患者細胞における酸化ストレス下の遺伝子発現では、核膜移行蛋白の遺伝子発現変化がみられた。これら蛋白がALADINとの相互作用を介して、本疾患の病態に重要な役割を果たしていることが推定される。

A. 研究目的

AAA症候群は、2000年に原因遺伝子ALADINが同定されたが(Nat Genet 2000;26:332)、1/3以上の例で遺伝子異常が検出されず、未だ原因不明例が多い。また、ALADIN異常による発症機序についても、不明な点が多い。私たちがこれまで報告してきたように酸化ストレスとそれに伴うDNA損傷修復障害が重要な役割を果たすと考えられるが、その過程や関連する遺伝子について十分には解明されていない(Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:2298)。本研究では、遺伝子異常に伴う蛋白の局在変化および遺伝子発現変化について検討した。

B. 研究方法

ALADIN蛋白の局在については、GFP融合ALADIN蛋白を発現するプラスミドを作製し、培養HeLa細胞に発現させ、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。GFP-ALADINとしては、野生型および本邦の患者で見られたトランケーション変異(R119X, R194X,

Q237X, S172fs)とミスセンス変異(I482S, R155H)蛋白を用い、トランスフェクション48時間後、核膜孔マーカー蛋白の免疫染色を行い、同部位への局在を検討した。

遺伝子発現変化については、本学の小児科学、消化器・内分泌代謝内科、消化器・総合外科学教室と共同で、ALADIN遺伝子のミスセンス変異(I482S)を有する患者線維芽細胞を用いて、酸化ストレス下におけるmRNA発現変化(CodeLink Human Whole Genome Bioarray)を網羅的に解析した。患者および正常コントロール線維芽細胞を培養し、L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO)による酸化ストレスを負荷した。BSOは抗酸化物質グルタチオン産生を抑制し、内在性活性酸素の増加を生じることで、細胞に酸化ストレスを与える。遺伝子発現変化を患者、正常細胞、負荷の有無で比較した。発現変化が示唆された遺伝子のうち、構造遺伝子を除き、病態に関連すると考えられた遺伝子については、real-time RT-PCRにより、発現変化を確認した。

(倫理面の配慮)

患者線維芽細胞を用いた研究は奈良県立医科大学の倫理委員会で承認を受けている。

C. 研究結果

野生型 ALADIN 蛋白は生理的局在部位である核膜孔に存在したが、変異 ALADIN 蛋白では、一部核膜孔に局在したが、主として細胞質に存在した。R155H 変異では、核膜孔への局在が他の変異蛋白よりも多かった。

遺伝子発現に関しては、酸化ストレスの無い状態で、患者細胞では正常細胞に比べ、72 遺伝子の発現に 2 倍以上の増加が、108 遺伝子の発現に 1/2 以下の低下が示唆された。酸化ストレス下では、55 遺伝子の発現増加が、74 遺伝子の発現低下が示唆された。発現増加が示唆された遺伝子群のうち interferon alpha-inducible protein 27 (IFI27) 遺伝子、および減少が示唆された遺伝子のうち karyopherin alpha2 (KPNA2) については、real-time RT-PCR により、有意な発現変化を確認しえた。

D. 考察

ALADIN 遺伝子変異による、蛋白の機能異常については、未だ完全には解明されていない。しかし、核膜への局在は機能発現の重要な因子と考えられている。R155H 変異例は、高齢発症で、副腎機能不全を欠き、比較的軽症であるが（総括研究報告書 表 2）、核膜への移行が多い変異蛋白が、軽症例と関連することは、核膜への移行度が臨床症状に関連することを示唆する。

AAA 患者細胞で IFI27 は発現増加、KPNA2 は発現低下が示された。IFI27 の詳細な機能は不明であるが、ヒートショック蛋白の発現時に、クロマチンの再構成に関与していることが指摘されている (Nat Cell Biol. 2002;4:774, J Cell Biochem 2006;98:1528)。KPNA2 は、核内輸送の担体蛋白である。これら蛋白は、核膜への移行が知られており、ALADIN と相互作用を有している可能性が考えら

れる。したがって、本疾患の病態に重要な役割を果たしていることが推定される。

E. 結論

ALADIN の変異に伴う蛋白局在変化は、臨床症状に関連している可能性がある。

ALADIN 発現変化が示された遺伝子が、他の変異においても共通して変化するかを、今後検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asai H, Hirano M, Kiriya T, Ikeda M, Ueno S. Naturally- and experimentally-designed restorations of the Parkin gene deficit in autosomal recessive juvenile parkinsonism. Biochem Biophys Res Commun. 391,800-805, 2010.
2. Asai H, Hirano M, Shimada K, Kiriya T, Furiya Y, Ikeda M, Iwamoto T, Mori T, Nishinaka K, Konishi N, Udaka F, Ueno S. Protein kinase C gamma, a protein causative for dominant ataxia, negatively regulates nuclear import of recessive-ataxia-related aprataxin. Hum Mol Genet. 18. 3533-3543. 2009.
3. 平野牧人, 森 俊雄, 上野 聡. 神経疾患と塩基除去修復. 放射線生物研究. 44, 285~293, 2009. [総説]

2. 学会発表

1. Hirano M, Shima M, Nakajima Y, Fukui H, Hara Y, Ueno S. Japanese patients with triple A syndrome. International Society for Autonomic Neuroscience 2009.
2. Hirano M, Asai H, Kiriya T, Ikeda M, Furiya Y, Ueno S. Aggregate formation and activities of mutant protein kinase C gamma, a protein causative for

- spinocerebellar ataxia type 14. American Neurological Association 2009.
3. Asai H, Hirano M, Kiriya T, Ikeda M, Furiya Y, Ueno S. Kinase activities of mutant protein kinase C gamma, a protein causative for spinocerebellar ataxia type 14, and neuronal cell death under oxidative stress. American Neurological Association 2009.
 4. 桐山敬生, 平野牧人, 浅井宏英, 池田真徳, 降矢芳子, 上野 聡. DNA 修復蛋白 XRCC1 の核局在シグナルを用いた Aprataxin と SOD1 の核内輸送. 日本神経学会総会 2009.
 5. 平野牧人, 森 俊雄, 池田真徳, 浅井宏英, 桐山敬生, 降矢芳子, 上野 聡. DNA 単鎖切断修復蛋白アプラタキシンと神経疾患ー常染色体優性・劣性小脳失調症と AAA 症候群ー. 日本放射線影響学会総会 2009.
 6. 平野牧人, 福井 博, 中島祥介, 嶋 緑倫, 原 嘉昭, 上野 聡. 本邦における AAA(トリプル A)症候群の実態. 内科学会近畿地方会 2009.
 7. 平野牧人, 嶋 緑倫, 福井 博, 中島祥介, 原 嘉昭, 上野 聡. 本邦における AAA(トリプル A)症候群の臨床遺伝的検討. 日本神経学会近畿地方会 2009.
 8. 平野牧人, 嶋 緑倫, 福井 博, 中島祥介, 原 嘉昭, 上野 聡. AAA(トリプル A)症候群における小児期からの臨床経過. 小児科学会 奈良地方会 2009.
 9. 町田洋太, 平野牧人, 嶋 緑倫, 福井 博, 中島祥介, 原 嘉昭, 國本雅也, 上野 聡. 本邦における AAA(トリプル A)症候群の臨床的特徴. 日本内科学会関東地方会 2009
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍：該当なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Asai H, Hirano M, Kiriya T, Ikeda M, Ueno S.	Naturally- and experimentally-designed restorations of the Parkin gene deficit in autosomal recessive juvenile parkinsonism.	Biochem Biophys Res Commun	391	800～805	2010
Asai H, Hirano M, Shimada K, Kiriya T, Furiya Y, Ikeda M, Iwamoto T, Mori T, Nishinaka K, Konishi N, Udaka F, Ueno S.	Protein kinase C gamma, a protein causative for dominant ataxia, negatively regulates nuclear import of recessive-ataxia-related aprataxin.	Hum Mol Genet	18	3533～3543	2009
平野牧人, 森 俊雄, 上野 聡	神経疾患と塩基除去修復 [総説]	放射線生物研究	44	285～293	2009

IV. 研究成果の刊行物・別刷



Naturally- and experimentally-designed restorations of the *Parkin* gene deficit in autosomal recessive juvenile parkinsonism

Hirohide Asai, Makito Hirano, Takao Kiriya, Masanori Ikeda, Satoshi Ueno*

Department of Neurology, Faculty of Medicine, Nara Medical University School of Medicine, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 November 2009

Available online 27 November 2009

Keywords:

Parkinsonism

Parkin

Cyclin E

Antisense oligonucleotide

Exon skipping

ABSTRACT

Intranuclear events due to mutations in the *Parkin* gene remain elusive in autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP). We identified a mutant PARKIN protein in fibroblast cultures from a pair of siblings with ARJP who were homozygous for the exon 4-deleted *Parkin* gene. Disease was mild in one patient and debilitating in the other. The detected mutant, encoded by a transcript lacking exon 3 as well as exon 4, is an in-frame deletion that removes 121 aa, resulting in a 344-aa protein (PaDel3,4). Cell culture and transfection studies revealed negative correlations between expression levels of PaDel3,4 and those of cell cycle proteins, including cyclin E, CDK2, ppRb, and E2F-1, and demonstrated that GFP-PaDel3,4 entered nucleus and ubiquitinated cyclin E as a part of SCF^{hsc1-10} ligase complex in the patient cells. In addition, nuclear localization signal-tagged PaDel3,4 expressed in the transfected patient cells most effectively ubiquitinated cyclin E and reduced DNA damage, protecting cells from oxidative stress. Antisense-oligonucleotide treatment promoted skipping of exon 3 and thus generated PaDel3,4, increasing cell survival. Collectively, we propose that naturally- and experimentally-induced exon skipping at least partly restores the mutant *Parkin* gene deficit, providing a molecular basis for the development of therapeutic exon skipping.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP) is caused by mutations in the gene encoding the E3 ubiquitin ligase PARKIN [1]. Mutated PARKIN fails to label substrates with ubiquitin chains for proteasomal degradation, leading to their toxic accumulation. This theory is based primarily on the results of molecular studies focusing on processes in cytoplasm, a major territory for PARKIN [2,3], while intranuclear events due to *Parkin* mutations have received little attention. The critical role played by oxidative stress in neurodegeneration in ARJP was initially suggested by the finding that patients with this disease had iron accumulation in the substantia nigra (SN), an important indicator of oxidative damage [4]. A growing body of evidence has further indicated that oxidative stress promotes cell cycle activation, leading to neuron death [5–7]. Consistent with this notion, cell cycle proteins are detectable in the SN of patients with Parkinson's disease (PD) [8,9]. Cyclin E deserves

particular attention because it accumulates in ARJP brain, and most importantly, is a putative substrate of PARKIN [10]. Interest has focused on possible interactions between intranuclear mutant PARKIN and cyclin E to better understand the pathomechanisms of ARJP. New therapies are clearly needed for this disease. Conventional dopamine replacement therapy alleviates symptoms only transiently; its usefulness wanes over time and unacceptable adverse effects often develop, particularly problematic in ARJP [1].

In this study, we assessed the influence of oxidative stress on cell death by analyzing interactions between mutant PARKIN and cyclin E in cultured fibroblasts from a pair of siblings with ARJP. The patients provided an experimental cell model to study intranuclear mechanisms by which ARJP cells protest against oxidative stress. Our results may provide a molecular basis for the development of antisense-oligonucleotide (AON)-mediated therapeutic interventions in ARJP.

Materials and methods

Patients and analyses of the *Parkin* gene in fibroblast cultures. A 75-year-old Japanese man had a 48-year history of parkinsonism. Despite undergoing a thalamotomy when he was 37 years old, current symptoms were debilitating, estimated as 90/260 on the Movement Disorder Society-sponsored revision of the United Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS) [11]. His 72-year-old

Abbreviations: ARJP, autosomal recessive juvenile parkinsonism; AON, antisense oligonucleotide; BSO, buthionine-(S,R)-sulfoximine; GSH, glutathione; LMB, leptomycin B; NLS, nuclear localization signal; NES, nuclear export signal; 8-oxoG, 8-hydroxyl-deoxyguanine; SCF, Skp1/cullin/F-box.

* Corresponding author. Address: Department of Neurology, Faculty of Medicine, Nara Medical University School of Medicine, 840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8522, Japan. Fax: +81 744 24 6065.

E-mail address: sueno@naramed-u.ac.jp (S. Ueno).

sister had an 8-year history of slow gait with a MDS-UPDRS score of 12/260. Both patients provided written informed consent to this study. Fibroblasts were obtained by skin biopsy from the patients and age-matched controls and were cultured [12]. The sequence of the *Parkin* gene was analyzed, and deletion breakpoints were identified as described previously [13]. The primary fibroblast culture from the sibling with mild parkinsonism was termed mPDfib, and that from the sibling with severely debilitating parkinsonism was termed sPDfib. The materials used in this study and the methods for quantitative analyses of gene and mRNA, cell survival assay under oxidative stress (buthionine-(S,R)-sulfoximine [BSO] treatment), immunoblot, and immunocytochemical studies are described in detail in Supplementary materials and methods.

Vector construction and transfection. cDNAs encoding wild type (WT)-PARKIN and all mutants (PARKIN^{T415N}, PaDel3,4, and PaDel3,4^{T415N}) were synthesized by normal and mutagenic PCR and were inserted into pEGFP-C1 (Clontech Laboratory, Inc., Mountain View, CA) and pCold (Takara Bio, Inc., Shiga, Japan). Nuclear localization signal (NLS) and REV nuclear export signal (NES) were used for specific subcellular targeting [12,14]. Cyclin E cDNA was inserted into pGEX-6P-2 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ). Hemagglutinin (HA)-ubiquitin and *myc*-hSel-10 cDNAs were provided by Drs. Tanaka and Vogelstein, respectively. Cells were transfected with plasmid DNAs using Lipofectamine 2000.

Ubiquitination assay in vivo and in vitro. For *in vivo* ubiquitination analysis of endogenous cyclin E, fibroblasts (4×10^4 cells/well) were transfected with 2 μ g of HA-ubiquitin and 2 μ g of various *Parkin* plasmids or AON. Transfected-cell lysates were immunoprecipitated with anti-cyclin E and analyzed by immunoblotting with anti-HA. In reciprocal experiments, lysates were immunoprecipitated with anti-HA and immunoblotted with anti-cyclin E. For *in vitro* ubiquitination assay, 50 μ l of a mixture containing 10 μ g of ubiquitin, 100 μ g of E1, 200 μ g of Ubch7, GST-column (Amersham) purified recombinant cyclin E, and Ni-column (Qiagen) purified recombinant PARKIN or PaDel3,4 was incubated for 2 h at 37 °C. Immunoprecipitated *myc*-tagged hSel-10 (from lysates of sPDfib transfected with *myc*-hSel-10) was also added. An equal volume of 2 \times SDS sample buffer was added to terminate the reaction. Proteins were resolved on 5–20% SDS-PAGE gels and analyzed by Western blotting technique.

Antisense treatment. A target sequence for AON (PASex3: 5'-CAUUUCUUGACCUUUUCUCC-3') was set on a potential splicing enhancer sequence (a polypurine region) in exon 3 of the *Parkin* gene (cDNA nucleotides 221–240; A of the first ATG counted as 1) [15]. A scramble oligonucleotide (SC1: 5'-CCUUCUUCGUCCUUCUAAU-3') was used as control. The oligonucleotides contained a 5'-fluorescein group, a full-length phosphorothioate backbone, and 2'-O-methyl modified ribose molecules (Biologica, Inc., Nagoya, Japan). Fibroblasts were transfected separately with these oligonucleotides using Lipofectamin 2000 and subjected to protein analyses.

Results

Frame-restoring exon skipping results in PaDel3,4 in ARJP fibroblasts

The ARJP siblings were homozygous for the mutant *Parkin* gene with exon 4-deletion, and the 11 remaining exons had normal sequences. A breakpoint was located 25,481 base pairs (bp) upstream and 56,137 bp downstream of exon 4 in both alleles of the patients' *Parkin* genes. With the primers flanking exons 1–12 cDNA, RT-PCR analyses of normal controls amplified a transcript of an expected size (1521 bp), whereas analyses of the patients' genes produced a single short transcript (1158 bp) lacking exon 3 as well as exon 4. This was an in-frame deletion that removed 121 amino acids (aa) (58–178 aa), resulting in the 344-aa mutant PARKIN, PaDel3,4 (Fig. 1A). PaDel3,4 may represent 75% of the ubiquitin-like domain

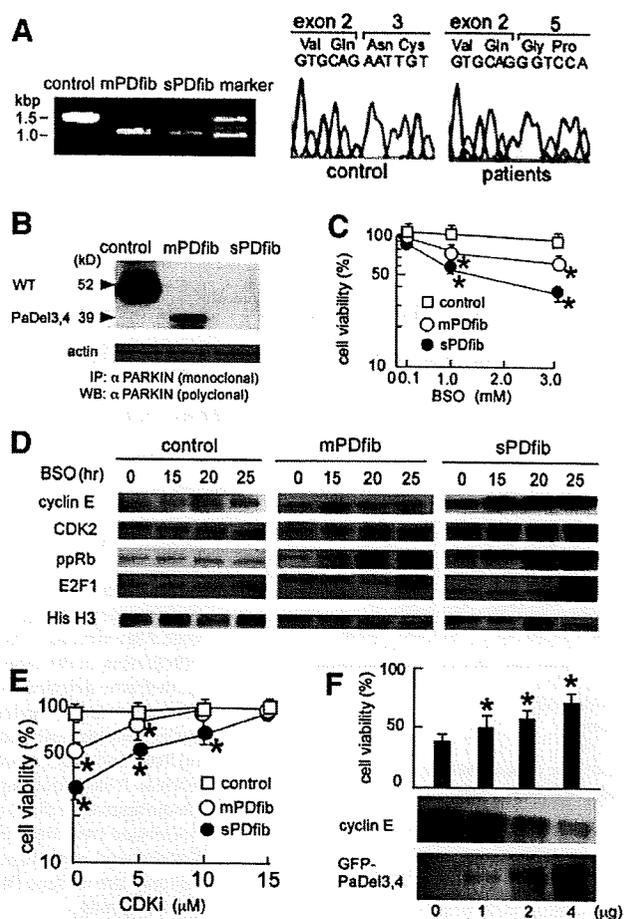


Fig. 1. PaDel3,4 identification and cell cycle proteins in ARJP fibroblasts. (A) RT-PCR and sequence analyses showed WT-*Parkin* transcript in control cells, and a short PaDel3,4 transcript lacking exons 3 and 4 in patient cells (mPDfib and sPDfib). (B) Identification of endogenous WT-PARKIN (52 kDa) in control, and PaDel3,4 (39 kDa) in mPDfib, but not in sPDfib. Immunoprecipitated (IP) cell lysates with anti-PARKIN monoclonal antibody were analyzed by Western blotting (WB) using anti-PARKIN polyclonal antibody. (C) Survival of control and patient cells under oxidative conditions. Fibroblasts were treated with 0–3 mM BSO for 48 h and subjected to cell viability assay. $P < 0.01$, Mann-Whitney *U* test as compared with control cells. (D) Time-dependent increases of cell cycle proteins in nuclear lysates from 3 mM BSO-treated cells. His H3 represents a nuclear fraction marker. (E) CVT-313 (CDKi) dose-dependently protected patient cells from BSO. (F) Exogenous PaDel3,4 dose-dependently protected sPDfib from BSO, accompanied by a reduction in endogenous cyclin E. sPDfib was transfected with 0–4 μ g of GFP-PaDel3,4 vector and incubated in 3 mM BSO-containing medium for 25 h (WB) and 48 h (cell survival assay). The bar represents the means \pm SD from five independent experiments. $P < 0.01$, Mann-Whitney *U* test as compared with mock-transfection sample.

and an entire RING box, presumably retaining E3 ubiquitin ligase activity [1–3]. Real-time quantitative RT-PCR revealed that the PaDel3,4 mRNA level in mPDfib was significantly (about 4 times) higher than that in sPDfib (Supplementary Fig. 1). Consistent with the higher level of mRNA, the corresponding protein (39 kDa) was readily detectable in mPDfib by immunoprecipitation-Western blotting technique. Highly sensitive, short-range (exons 3–5) but not long-range RT-PCR (exons 1–12) detected the transcript lacking exon 4 only in the patients at a very low level on quantitative analysis (not shown), possibly because this truncated transcript carries a premature termination codon, which may be subjected to “nonsense-mediated mRNA decay”. Despite the low level, identification of this transcript may be important, since it might support expression of the transcript (or pre-mRNA) retaining exon 3 and may exclude inversion of this exon. It was particularly

important that sPDFib (from the patient with severe ARJP) had no PARKIN-relevant proteins and thus represented a spontaneously occurring model of PARKIN-deficient cells (Fig. 1B).

Susceptibility of ARJP fibroblasts to oxidative stress is related to PaDel3,4

To test whether the *Parkin* gene mutation sensitizes ARJP fibroblasts to oxidative stress, we added BSO to the culture medium. BSO is a highly selective inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase, which effectively arrests glutathione (GSH) synthesis when added to culture medium. In this model of oxidative stress, the endogenous formation of reactive oxygen species is largely unopposed, consequently resulting in oxidative cell damage [12]. Cell survival assay and Western blot analysis of nuclear lysates revealed that the patient cells had increased sensitivity to BSO and higher expression levels of cyclin E, CDK2, ppRb, and E2F-1, more prominently in sPDFib than in mPDFib, leading to cell death (Fig. 1C and D). CDKi suppressed BSO-induced ARJP cell death (Fig. 1E). Furthermore, transfection of sPDFib with PaDel3,4 vector dose-dependently restored tolerability to BSO, accompanied by a reduction in endogenous cyclin E (Fig. 1F). Collectively, we suggest that PaDel3,4 modifies susceptibility of patient cells to oxidative stress by suppressing oxidative-stress-induced accumulation of cell cycle proteins.

PaDel3,4 ubiquitinates cyclin E *in vivo* and *in vitro*

We examined whether endogenous PaDel3,4 could ubiquitinate cyclin E in ARJP fibroblasts cultured in BSO-free medium. *In vivo* ubiquitination assay followed by Western blotting revealed that control and mPDFib showed significant anti-HA and anti-cyclin E immunoreactivity in the form of smear, a characteristic of polyubiquitinated protein, suggesting that PaDel3,4 ubiquitinated cyclin E. This ubiquitination was confirmed by reciprocal experiments. As expected, sPDFib displayed cyclin E accumulation but no smear, confirming that sPDFib represents a PARKIN-deficient cell model (Fig. 2A). PARKIN functions as a part of SCF (Skp1/cullin/F-box) ligase complexes, and hSel-10 (an F-box/WD protein) targets the ubiquitin ligase activity to cyclin E [10]. Consistent with this notion, immunoprecipitation of cell lysates with anti-PARKIN antibody coimmunoprecipitated both hSel-10 and cyclin E in normal cells and mPDFib (Fig. 2B, left). To demonstrate that hSel-10 is essential for cyclin E ubiquitination by PaDel3,4, we performed an *in vitro* ubiquitination assay. Reaction mixtures containing recombinant forms of WT-PARKIN or PaDel3,4, cyclin E, ubiquitin, E1, and E2 (UbcH7) were incubated in the presence or absence of immunopurified myc-hSel-10. Western blotting with anti-cyclin E and anti-ubiquitin antibodies showed high molecular weight smear in control and mPDFib only in the presence of hSel-10 (Fig. 2B, right). All together, our results suggested that PaDel3,4 as well as WT-PARKIN function as components for SCF^{hSel-10} complex in cyclin E ubiquitination. The deduced amino acid sequence indicated that PaDel3,4 lost 121 aa (58–178 aa) corresponding to part of the membrane-binding domain at the 77–178 aa moiety, no longer localized to cytoplasm [16]. In fact, fluorescent imaging and immunostaining showed that PaDel3,4 predominantly localized to the nucleus, whereas hSel-10 resided throughout the cytoplasm and nucleus, supporting intranuclear interactions between the two proteins (Fig. 2C).

Nuclear localized PaDel3,4 ubiquitinates cyclin E and reduces DNA damage, contributing to cell survival

To directly verify that PaDel3,4 functions as an E3 ubiquitin ligase within nucleus of ARJP fibroblasts, we constructed GFP-PaDel3,4 expression vector carrying NLS. The specific signal mstNLS, corresponding to 239–276 aa of X-ray repair cross-complementing

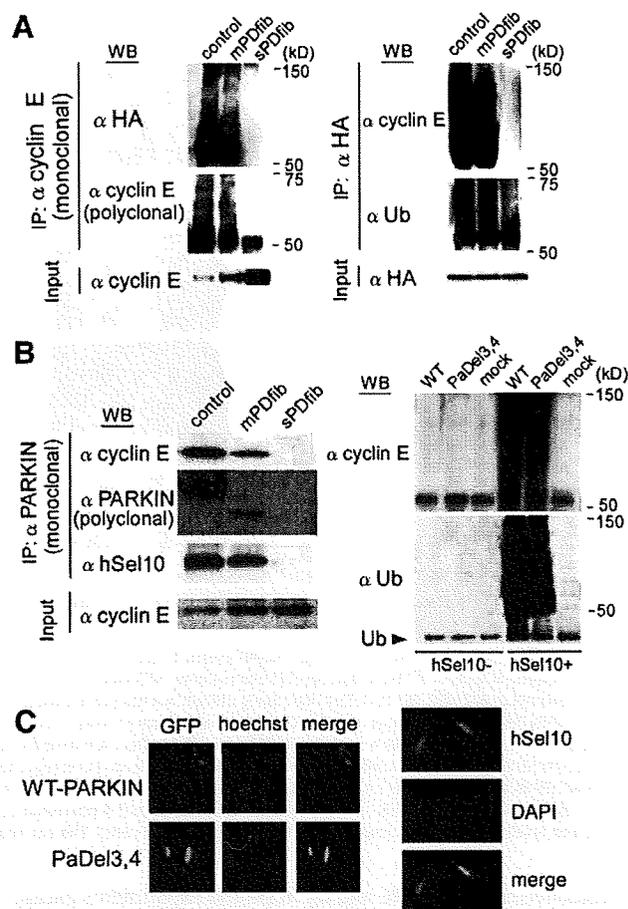


Fig. 2. WT-PARKIN and PaDel3,4 ubiquitinated cyclin E. (A) *In vivo* ubiquitination of cyclin E in control and ARJP fibroblasts transfected with HA-ubiquitin expression vector. Immunoprecipitated (IP) cell lysates with anti-cyclin E were analyzed by Western blotting (WB) using anti-HA and cyclin E antibodies (left), as confirmed by immunoprecipitation of the same cell lysates with anti-HA antibody, followed by blotting with anti-cyclin E and anti-ubiquitin antibodies (right). Note that sPDFib can be a PARKIN-deficient cell model. (B) Cyclin E is a candidate substrate of the WT-PARKIN- and PaDel3,4-SCF^{hSel-10} complex. On immunoprecipitation of cell lysates with anti-PARKIN monoclonal antibody, both cyclin E and hSel-10 were contained in control fibroblasts and mPDFib, but not in sPDFib (left). *In vitro* ubiquitination of cyclin E by WT-PARKIN and PaDel3,4 only in the presence of hSel-10 (right). (C) Subcellular localization of GFP-WT-PARKIN and GFP-PaDel3,4 in PARKIN-deficient sPDFib (left). Myc-tagged hSel-10 was localized in the nucleus and cytoplasm (right).

group 1 (XRCC1), comes from the extension of the classical NLS for the *karyopherin*-mediated nuclear import of cargo proteins [12,14]. With this vector, we concentrated PaDel3,4 within the nucleus, as evidenced by colocalization of GFP signal with Hoechst33258-stained nuclear DNA in sPDFib (Fig. 3A). The nuclear lysates prepared from sPDFib overexpressed with NLS-tagged PaDel3,4 along with HA-ubiquitin were immunoprecipitated with monoclonal anti-cyclin E antibody. Endogenous cyclin E is ubiquitinated by PaDel3,4, as shown by the anti-HA immunoreactivity in the form of smear, suggesting that PaDel3,4 ubiquitinated cyclin E within nucleus, as confirmed by reciprocal experiments (Fig. 3B, lane 4). These results were consistent with those of parallel experiments using mstNLS-tagged PaDel3,4^{T415N} vector. T415N located within RING box abolished E3 ligase activity (Fig. 3B, lane 6). Cell survival assay showed that mstNLS-tagged PaDel3,4 protected sPDFib from BSO stress, accompanied by reduced DNA damage as demonstrated by staining with 8-oxoG in the 4',6-diamino-2-phenylindole-stained nucleus. mstNLS-PaDel3,4^{T415N} vector abolished the

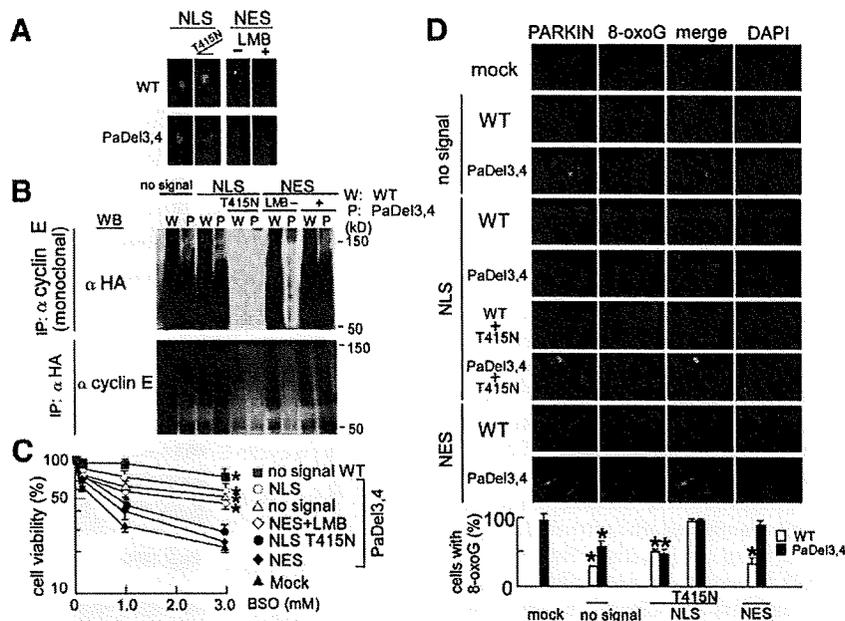


Fig. 3. Nuclear localized PaDel3,4 ubiquitinated cyclin E and reduced DNA damage, improving sPDFib survival. (A) mstNLS-GFP-tagged WT-PARKIN, WT-PARKIN^{T415N}, PaDel3,4, and PaDel3,4^{T415N} were localized in the nucleus. NES-GFP-tagged PARKIN and PaDe3,4 were localized in the cytoplasm, and PaDel3,4 was localized in the nucleus with leptomycin B (LMB). (B) PaDel3,4 effectively ubiquitinated cyclin E within nucleus (upper and lower panels, lane 4), whereas NLS-tagged PaDel3,4^{T415N} did not (lane 6). NES-GFP-PaDel3,4 vector reduced cyclin E ubiquitination, which was restored by leptomycin B (lanes 8 and 10). (C) sPDFib was transfected with different signal-tagged PaDel3,4 and incubated for 48 h in 0–3 mM BSO. mstNLS-PaDel3,4 markedly improved sPDFib survival, whereas mstNLS-PaDel3,4^{T415N} and NES-PaDel3,4 did not. The bar represents SD from five independent experiments. $P < 0.01$, Mann–Whitney U test as compared with mock-transfected cells. (D) Immunocytochemistry of sPDFib expressing GFP-WT-PARKIN or GFP-PaDel3,4 (green) tagged with mstNLS or NES. Cells were incubated for 10 h in 1.5 mM BSO medium. 8-oxoG was stained with Alexa 594 (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Nuclear import of PaDel3,4 protected cells from oxidative stress, whereas cytoplasmic targeting showed no such effects ($P < 0.05$, unpaired Student's t test as compared with mock-transfected cells). The bar represents the means \pm SD from five independent experiments (lower panel).

protective effects (Fig. 3C and D). In similar experiments except for a use of NES-tagged PaDel3,4, cytoplasmic targeting of PaDel3,4 hardly ubiquitinated cyclin E (Fig. 3B, lane 8) and failed to protect the patient cells from oxidative stress (Fig. 3C and D). Taken together, this study uncovered the intranuclear mechanism by which patient cells were protected against oxidative stress via PaDel3,4-mediated regulation of the cell cycle and DNA damage.

AON PASex3-induced PaDel3,4 contributes to ARJP cell survival

PaDel3,4, which partially protects ARJP fibroblasts from oxidative stress, is a potential target for therapeutic interventions. We synthesized the AON complementary to a 20-nucleotide sequence of exonic splicing enhancer on exon 3 of the *Parkin* gene. This antisense protein, termed PASex3, inhibited exon 3 inclusion in an out-of-frame transcript lacking exon 4, leading to an in-frame transcript in sPDFib. PASex3 considerably increased PaDel3,4 protein in the patient cells (Fig. 4A). Lysates from PASex3-treated sPDFib were immunoprecipitated with anti-cyclin E monoclonal antibody and analyzed by Western blotting using polyclonal antibodies to HA and cyclin E. The loss of cyclin E and simultaneous gain of high molecular anti-HA reactive smear indicated that these species represent ubiquitinated forms of cyclin E in the patient cells. This ubiquitination was further confirmed by reciprocal experiments (Fig. 4B). PASex3 promoted increased cell viability against BSO-induced oxidative stress (Fig. 4C).

Discussion

In this study, we identified and characterized mutant PARKIN, termed PaDel3,4, which contributed to delaying the death of ARJP fibroblasts exposed to oxidative stress. Cell cultures can thus be a robust disease model for the development of therapeutic exon skipping procedures.

Spontaneous exon skipping leads to restoration of the tolerability of ARJP fibroblasts to oxidative stress

Previously identified pathogenic mutations of the *Parkin* gene do not systematically abrogate E3 ubiquitin ligase activity, suggesting that various molecular mechanisms underlie neuronal

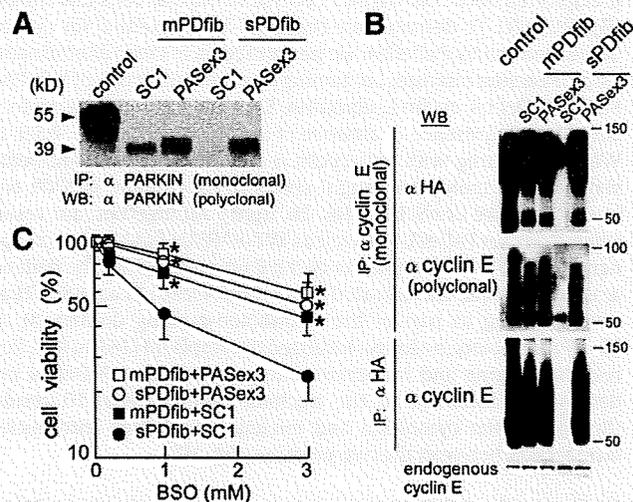


Fig. 4. AON PASex3 increases endogenous PaDel3,4, protecting patient cells from oxidative stress. (A) PASex3 increased PaDel3,4 in the patient cells. Control scrambled oligonucleotide (SC1) failed to do so. (B) Polyubiquitination of cyclin E in the patient cells treated with PASex3. (C) PASex3 increased viability of the patient cells during 48 h incubation with BSO. The bar represents the SD from five independent experiments. $P < 0.01$, Mann–Whitney U test as compared with SC1-transfected sPDFib.

degeneration in ARJP [17–20]. Cell survival studies and time course analyses of cell cycle proteins have shown that susceptibility of patient cells to oxidative stress partially depends on endogenous PaDel3,4. We further assumed that PaDel3,4 ubiquitinated cyclin E for degradation, thereby activating G1/S checkpoints to delay cell cycle progression and allow repair of DNA damage. This hypothesis is supported by our finding that PaDel3,4 experimentally concentrated in the nucleus most effectively ubiquitinated cyclin E and reduced DNA damage, contributing to cell survival under oxidative conditions. In contrast, cytoplasmic targeting of PaDel3,4 had virtually no beneficial effect on ARJP cell survival. Overexpression of Del3–4 (the same mutant as PaDel3,4) has been reported to weakly, but significantly increase survival of transfected SH-5YSY cells after UV-induced DNA damage [21]. Available evidence suggests that PaDel3,4 promotes DNA repair and protects cells against oxidative stress and indicates that DNA damage is an important pathogenic mechanism in ARJP.

PaDel3,4 is translated from aberrantly spliced transcripts in which frame-restoring exon skipping occurred during pre-mRNA splicing. We suggest that splicing efficacy responsible for PaDel3,4 production may account for the differences in the clinical phenotypes of the two sibling patients. This proposal is supported by an analogous system in Duchene's muscular dystrophy (DMD); the frame-shifting mutations that abrogate dystrophin synthesis cause severely debilitating DMD, whereas in-frame mutations in the same gene lead to milder Becker's muscular dystrophy [22]. Taken together, our results may provide a basis for potential therapeutic strategies based on exon skipping.

Experimental exon skipping restores the tolerability of ARJP fibroblasts to oxidative stress

Antisense PAsEx3 treatment of ARJP fibroblasts successfully promoted skipping of exon 3 to correct a disrupted reading-frame of the mutant *Parkin*. Thus, the produced PaDel3,4 significantly increased E3 ubiquitin ligase activity to save patient cells exposed to oxidative stress. Small increases in normal (near normal) mRNA can result in significant phenotypic improvement, and intramuscular injections of specific AON successfully induce dystrophin expression in patients with DMD [23–25]. Collectively, our results suggest that genetic-based therapy for ARJP can be developed on the basis of AON PAsEx3-mediated exon skipping.

The extent to which fibroblasts reflect neurons in the patient brain remains unknown. Increasing evidence supports the notion that oxidative stress and cell cycle processes may be intertwined at the molecular level in the brain of patients with ARJP. A previous postmortem examination has demonstrated abnormal accumulation of iron in SN of the patients, implying involvement of oxidative stress in the pathomechanism of ARJP [4]. In addition, cyclin E accumulates in patients' SN [10], and neurons exhibit aberrant cell cycle activation in neurodegenerative disorders [5–7]. Here we clearly showed the association between oxidative stress and the cell cycle in the present experiment; BSO-treated fibroblasts up-regulated cell cycle proteins, more prominently in patients with ARJP than in controls, leading to cell death. Available evidence thus strongly suggests that fibroblasts reflect neurons in the brain of patients with ARJP. Another important puzzle is the mechanism for choosing between out-of-frame and in-frame splicing. Environmental elements are unlikely to be involved, because all tested cells in our study were exposed to identical culture conditions. Identical breakpoints localized at the deletion hot spot in the *Parkin* genes from the two sibling patients provided no clues as to other factors potentially related to the type of splicing [26]. This issue must await further extensive investigations.

In summary, our study has uncovered the nuclear pathway by which the PARKIN mutant PaDel3,4 ubiquitinates cyclin E and

may thus control the cell cycle, contributing to cell survival. Our observations may provide a molecular basis for the development of an antisense-mediated therapeutic procedure that would be specific, rational, and genetically based.

Acknowledgments

The authors thank Drs. Hattori (Juntendo University, Tokyo, Japan), Vogelstein (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD), and Tanaka (The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo) for the gifts of plasmid vectors. This study was partly supported by Health and Labour Sciences Research Grants (Research in Intractable Diseases) and Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (to Drs. Hirano and Ueno).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.141.

References

- [1] T. Kitada, S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno, N. Shimizu, Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism, *Nature* 392 (1998) 605–608.
- [2] S. Gandhi, N.W. Wood, Molecular pathogenesis of Parkinson's disease, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 2749–2755.
- [3] B. Thomas, M.F. Beal, Parkinson's disease, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2007) 183–194.
- [4] M. Takanashi, H. Mochizuki, K. Yokomizo, N. Hattori, H. Mori, Y. Yamamura, Y. Mizuno, Iron accumulation in the substantia nigra of autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP), *Parkinsonism Relat. Disord.* 7 (2001) 311–314.
- [5] I.I. Kruman, R.P. Wersto, F. Cardozo-Pelaez, L. Smilenov, S.L. Chan, F.J. Chrest, R. Emokpae Jr., M. Gorospe, M.P. Mattson, Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage, *Neuron* 41 (2004) 549–561.
- [6] J.A. Klein, S.L. Ackerman, Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 785–793.
- [7] K. Herrup, R. Nev, S.L. Ackerman, A. Copani, Divide and die: cell cycle events as triggers of nerve cell death, *J. Neurosci.* 24 (2004) 9232–9239.
- [8] K.L. Jordan-Sciutto, R. Dorsey, E.M. Chalovich, R.R. Hammond, C.L. Achim, Expression patterns of retinoblastoma protein in Parkinson disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62 (2003) 68–74.
- [9] G.U. Hoglinger, J.J. Breunig, C. Depboylu, C. Rouaux, P.P. Michel, D. Alvarez-Fischer, A.L. Boutillier, J. Degregori, W.H. Oertel, P. Rakic, E.C. Hirsch, S. Hunot, The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 3585–3590.
- [10] J.F. Staropoli, C. McDermott, C. Martinat, B. Schulman, E. Demireva, A. Abeliovich, Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity, *Neuron* 37 (2003) 735–749.
- [11] C.G. Goetz, B.C. Tilley, S.R. Shaftman, G.T. Stebbins, S. Fahn, P. Martinez-Martin, W. Poewe, C. Sampaio, M.B. Stern, R. Dodel, B. Dubois, R. Holloway, J. Jankovic, J. Kulisevsky, A.E. Lang, A. Lees, S. Leurgans, P.A. LeWitt, D. Nyenhuis, C.W. Olanow, O. Rascol, A. Schrag, J.A. Teresi, J.J. van Hilten, N. LaPelle, Movement disorder society-sponsored revision of the unified Parkinson's disease rating scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results, *Mov. Disord.* 23 (2008) 2129–2170.
- [12] M. Hirano, Y. Furiya, H. Asai, A. Yasui, S. Ueno, ALADIN¹⁴⁸²⁵ causes selective failure of nuclear protein import and hypersensitivity to oxidative stress in triple A syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 2298–2303.
- [13] J. Clarimon, J. Johnson, O. Dogu, W. Horta, N. Khan, A.J. Lees, J. Hardy, A. Singleton, Defining the ends of parkin exon 4 deletions in two different families with Parkinson's disease, *Am. J. Med. Genet. B: Neuropsychiatr. Genet.* 133 (2005) 120–123.
- [14] T. Kiriya, M. Hirano, H. Asai, M. Ikeda, Y. Furiya, S. Ueno, Restoration of nuclear-import failure caused by triple A syndrome and oxidative stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374 (2008) 631–634.
- [15] Y. Takeshima, M. Yagi, H. Wada, K. Ishibashi, A. Nishiyama, M. Kakumoto, T. Sakaeda, R. Saura, K. Okumura, M. Matsuo, Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy, *Pediatr. Res.* 59 (2006) 690–694.
- [16] S. Kubo, T. Kitami, S. Noda, H. Shimura, Y. Uchiyama, S. Asakawa, S. Minoshima, N. Shimizu, Y. Mizuno, N. Hattori, Parkin is associated with cellular vesicles, *J. Neurochem.* 78 (2001) 42–54.
- [17] K.K. Chung, Y. Zhang, K.L. Lim, Y. Tanaka, H. Huang, J. Gao, C.A. Ross, V.L. Dawson, T.M. Dawson, Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease, *Nat. Med.* 7 (2001) 1144–1150.