

厚生労働省科学研究費補助金（難病性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

アイカルディ・ゴーティエ症候群等のビオプテリン代謝異常を伴う疾患の診断方法確立および治療法開発のための横断的研究

研究分担者 南部 篤 自然科学研究機構生理学研究所

研究要旨

ビオプテリン代謝異常に伴う神経症状を解析することを目的として、モデルマウスの神経活動記録を行った。その結果、淡蒼球外節において、バースト発射の増加、皮質由来の抑制と遅い興奮の増強が見られた。

A. 研究目的

ビオプテリン代謝異常には、ドーパ反応性ジストニア（瀬川病）とビオプテリン代謝酵素欠損症があり、両疾患ともにアミノ酸代謝異常から脳内ドーパミンやセロトニンの欠乏をきたす。これらは、大脳基底核での情報処理過程に変化をもたらし、ジストニアやパーキンソン病症状を引き起こすと考えられるが、症状発現のメカニズムなど不明な点が多い。本研究では、モデル動物から神経活動を記録することにより、これらの疾患の病態について解析を行う。

B. 研究方法

神経疾患、とくに大脳基底核を中心とした運動機能に障害を示す疾患の病態を明らかにするためには、疾患モデル動物から神経活動を記録し正常と比較・検討することが重要である。このような神経活動記録は、通常、麻酔下にて行われる事が多いが、全身麻酔は神経活動を下げ、また発射パターンも変えてしまう。そこで、本研究では覚醒下で記録する方法を用いた。

マウス頭蓋骨に記録と固定用のチェーンバーを、麻酔下において固定する。また、大脳皮質の一次運動野に刺激電極を埋め込んでおく。手術から回復後、覚醒

下で無痛的に頭部をステレオ装置に固定する。次に記録用金属電極を大脳基底核に刺入し、神経活動の記録を行う。

本動物実験は、自然科学研究機構岡崎3機関動物実験委員会で承認され、「自然科学研究機構岡崎3機関における動物実験に関する指針」に従って行われた。また、遺伝子改変動物に関しては、自然科学研究機構生理学研究所組換えDNA実験安全委員会で承認された。

C. 研究結果

ビオプテリン代謝障害を有する遺伝子改変マウスを、藤田保健衛生大学の一瀬千穂先生の研究室から生理学研究所に移送し、クリーニング後、神経活動の記録に供した。本モデルマウスは、ジストニア様肢位および四肢協調運動の障害を示す。本年度は、大脳基底核のうち淡蒼球外節から覚醒下で神経活動の記録を行い、正常マウスと比較検討した。

正常マウスにおいては、淡蒼球外節は50 Hz前後の高頻度で、ランダムに発射している。また、大脳皮質を電気刺激すると、早い興奮・抑制・遅い興奮の3相性の応答が記録できる。一方、疾患モデルマウスにおいては、発射頻度は変わらないものの、バースト発射を示していた。また、大脳皮質刺激では、3相性の反応のうち、抑制と遅い興奮が増強していた。

D. 考察

ビオプテリン代謝障害を有するマウスの淡蒼球外節から神経活動を記録したところ、正常と比べて発射頻度は変わらないものの、バースト発射をしたり、また皮質刺激で惹起される3相性の応答のうち、抑制と遅い興奮が増強していた。このような反応はパーキンソン病モデルで見られる反応と似ており、本マウスがドーパミン欠乏を来しているのと合致する。今後は、淡蒼球外節ばかりでなく、他の大脳基底核からも神経活動の記録を行い、本疾患がジストニア症状を示すメカニズムなどを明らかにしたい。

E. 結論

ビオプテリン代謝異常に伴う神経症状を解析することを目的として、モデルマウスの神経活動記録を行った。その結果、淡蒼球外節において、バースト発射の増加、皮質由来の抑制と遅い興奮の増強が見られた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hashimoto M, Takahara D, Hirata Y, Inoue KI, Miyachi S, Nambu A, Tanji J, Takada M, Hoshi E, Motor and non-motor projections from the cerebellum to

- rostrocaudally distinct sectors of the dorsal premotor cortex in macaques. *Eur J Neurosci* 31: 1402-1413, (2010)
2. Saga Y, Hirata Y, Takahara D, Inoue K, Miyachi S, Nambu A, Tanji J, Takada M, Hoshi E, Origins of multisynaptic projections from the basal ganglia to rostrocaudally distinct sectors of the dorsal premotor area in macaques. *Eur J Neurosci* 33: 285-297, (2011)
 3. Nishibayashi H, Ogura M, Kakishita K, Tanaka S, Tachibana Y, Nambu A, Kita K, Itakura T, Cortically evoked responses of human pallidal neurons recorded during stereotactic neurosurgery. *Mov Disord* (in press), (2011)
 4. 南部 篤, 線条体における運動手続き記憶. *Clinical Neuroscience* 29: 172-176, (2011)
 5. 南部 篤, 臨床に役立つ大脳基底核の解剖と生理. *神経治療学* 28: 19-23, (2011)
2. 学会発表
 1. Nambu A, Cortico-basal ganglia loop and movement disorders. 20th Annual Meeting, Society for the Neural Control of Movement (Naples, USA), (2010)
 2. 南部 篤, 情報の表現から情報の流れへ. *Motor Control 研究会* (岡崎), (2010)
 3. Nambu A, Reduced pallidal output causes dystonia. 10th Triennial Meeting of the International Basal Ganglia Society (Long Branch, USA), (2010)
 4. Iwamuro H, Saito N, Nambu A, Organization of motor cortical and pallidal inputs to the pedunculopontine tegmental nucleus in monkeys. 10th Triennial Meeting of the International Basal Ganglia Society (Long Branch, USA), (2010)
 5. 南部 篤, 臨床に役立つ大脳基底核の解剖と生理. 第 28 回日本神経治療学会 (横浜), (2010)
 6. 知見聡美、太田力、佐藤朝子、笹岡俊邦、勝木元也、黒川信、南部篤、大脳基底核内情報伝達におけるドーパミン D1 および D2 受容体の機能. 日本比較生理生化学会第 32 回大会 (福岡), (2010)
 7. 佐野裕美、知見聡美、加藤成樹、小林和人、南部篤、光遺伝学を利用した大脳基底核神経回路の調節機構の解明. 包括脳ネットワーク夏のワークショップ (札幌), (2010)
 8. 知見聡美、太田力、佐藤朝子、笹岡俊邦、勝木元也、黒川信、南部篤、大脳基底核内情報伝達におけるドーパミン D1 および D2 受容体の機能—遺伝子改変マウスにおける覚醒下神経活動の解析— 第 25 回日本大脳基底核研究会 (福島)
 9. 佐野裕美、村田美穂、南部篤、中脳ドーパミンニューロンに対するゾニサミ

- ドの神経保護作用. 第25回日本大脳基底核研究会 (福島)、(2010)
10. 佐賀洋介、平田快洋、高原大輔、井上謙一、宮地重弘、南部篤、丹治順、高田昌彦、星英司、大脳基底核と大脳皮質運動前野が形成するネットワークはパラレルループだけでは説明できない：狂犬病ウイルスを使った経シナプスとレーシング法による新知見. 第25回日本大脳基底核研究会 (福島)、(2010)
 11. 佐藤澄人、知見聡美、藤井清孝、南部篤、サル辺縁皮質電気刺激に対する視床下核のニューロン応答. 第25回日本大脳基底核研究会 (福島)、(2010)
 12. 知見聡美、Pullanipally Shashidharan、南部篤、覚醒下モデルマウスの神経活動を記録し、ジストニアの病態を解明する。名大・生理研合同シンポジウム (岡崎)、(2010)
 13. Nambu A, Pathophysiology of dystonia: neural recording from a mouse model. Neuro 2010 (神戸)、(2010)
 14. Kinoshita M, Kaneda K, Kasahara H, Hatanaka N, Matsui R, Chiken S, Isa K, Mizukami H, Ozawa K, Watanabe D, Nambu A, Isa T, Optogenetically induced suppression of neural activity in the macaque motor cortex. Neuro 2010 (神戸)、(2010)
 15. Sano H, Murata M, Nambu A, Zonisamide prevents cell death in mesencephalic dopaminergic neurons through BDNF signaling. Neuro 2010 (神戸)、(2010)
 16. Hoshi E, Saga Y, Takahara D, Hirata Y, Inoue K, Miyachi S, Nambu A, Tanji J, Takada M, Multisynaptic inputs from the basal ganglia (BG) to rostrocaudally distinct sectors of the dorsal premotor cortex (PMd) in macaques. Neuro 2010 (神戸)、(2010)
 17. Takara S, Hatanaka N, Takada M, Nambu A, Movement-related activity of striatal interneurons receiving inputs from cortical motor areas in monkeys. Neuro 2010 (神戸)、(2010)
 18. Chiken S, Ohta C, Sato A, Sasaoka T, Katsuki M, Kurokawa M, Nambu A, Functional role of dopamine D1 receptors in information processing through the basal ganglia analyzed by neuronal recording from transgenic mice in awake state. Neuro 2010 (神戸)、(2010)
 19. Takahara D, Hirata Y, Inoue K, Miyachi S, Nambu A, Takada M, Hoshi E, Multisynaptic inputs from the ventral prefrontal cortex (PFv) to the dorsal premotor cortex (PMd) in macaques. Neuro 2010 (神戸)、(2010)
 20. Nambu A, Cortico-basal ganglia loop and movement disorders. The 7th Asia Pacific Symposium on Neural Regeneration (Seoul, Korea)、(2010)

21. 南部 篤, 大脳基底核による運動制御とその異常. 青雲会病院脳生理研修会 (始良、鹿児島)、(2010)
22. 南部 篤 (2010.10) 大脳基底核の解剖と生理 第7回、宮崎パーキンソン病懇話会 (宮崎)、(2010)
23. 南部 篤、大脳皮質—大脳基底核ループとパーキンソン病. 第6回錐体外路フォーラム (下野、栃木)、(2010)
24. Nambu A, Cortical inputs to the subthalamic nucleus. 29th International Congress of Clinical Neurophysiology (神戸)、(2010)
25. 南部 篤 (2010.11) 大脳皮質—大脳基底核 25 核ループと大脳基底核疾患. 第12回北里機能的脳神経外科研究会 (相模原)
26. Kinoshita M, Kaneda K, Kasahara H, Hatanaka N, Matsui R, Chiken S, Isa K, Mizukami H, Ozawa K, Watanabe D, Nambu A, Isa T, Optogenetically induced suppression of neural activity in the macaque primary motor cortex. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA)
27. Nambu A, Takara S, Hatanaka N, Glutamatergic and GABAergic control of pallidal activity in behaving monkeys. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA)
28. Iwamuro H, Takakusaki K, Saito N, Nambu A, Input organization to the pedunculo-pontine tegmental nucleus from the motor cortex and the basal ganglia in monkeys. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA)
29. Takahara D, Inoue K, Hirata Y, Miyachi S, Nambu A, Takada M, Hoshi E, Multisynaptic inputs from the temporal cortex to the dorsal premotor cortex in macaques. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA)
30. Nambu A, Reduced pallidal output causes dystonia. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego, USA)
31. Nambu A, Dynamics of the basal ganglia in movement disorders. 5th Congress of FAONS (Lucknow, India)
32. Nambu A, Cortico-basal ganglia loop and movement disorders. 41th NIPS/Sokendai International Symposium. New Frontiers in Brain Science: Towards Systematic Understanding of Human Beings (岡崎)、(2010)
33. Hatanaka N, Takara S, Takada M, Nambu A, GABAergic modulation of striatal neuron activity in behaving monkeys. 41th NIPS/Sokendai International Symposium. New Frontiers in Brain Science: Towards Systematic Understanding of Human Beings (岡崎)
34. Kouketsu D, Nambu A,

- Neurophysiological mapping of motor-related areas in awake common marmoset. 41th NIPS/Sokendai International Symposium. New Frontiers in Brain Science: Towards Systematic Understanding of Human Beings (岡崎)、(2010)
35. Sano H, Chiken S, Kobayashi K, Nambu A, The physiological role of striatopallidal neurons on motor function. 41th NIPS/Sokendai International Symposium. New Frontiers in Brain Science: Towards Systematic Understanding of Human Beings (岡崎)
36. Takara S, Hatanaka N, Takada M, Nambu A, Movement-related activity of striatal interneurons receiving inputs from cortical motor areas in monkeys. 41th NIPS/Sokendai International Symposium. New Frontiers in Brain Science: Towards Systematic Understanding of Human Beings (岡崎)、(2010)
37. Kaneko N, Hatanaka N, Takara S, Takada M, Nambu A, Glutamatergic and GABAergic modulation of monkey pallidal neuron activity in relation to motor task. 41th NIPS/Sokendai International Symposium. New Frontiers in Brain Science: Towards Systematic Understanding of Human Beings (岡崎)、(2010)
38. Chiken S, Ohta C, Sato A, Sasaoka T, Katsuki M, Kurokawa M, Nambu A, Functional role of dopamine D1 and D2 receptors in information processing through the basal ganglia. 41th NIPS/Sokendai International Symposium. New Frontiers in Brain Science: Towards Systematic Understanding of Human Beings (岡崎)、(2010)
39. 南部 篤、大脳皮質大脳基底核ループの機能と病態：今後の研究戦略. 生理学研究所研究会「行動制御における脳領域間の機能連関」(岡崎)、(2011)
40. 南部 篤、モデルマウスから神経活動を記録することによりジストニアの発症機構を解析する. シンポジウム「難病・希少疾患を理解し克服する」(東京) (2011)
- H. 知的所有権の出願・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
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

アイカルディ・ゴーティエ症候群等のビオプテリン代謝異常を伴う疾患の診断方法確立および治療法開発のための横断的研究

研究分担者 高田昌彦 京都大学霊長類研究所 教授

研究要旨

本研究では、パーキンソン病の発症過程におけるビオプテリンおよびその代謝産物の量的変化を解析することにより、黒質ドーパミン細胞死とビオプテリン代謝の相互関係を明らかにすることが目的である。具体的には、MPTP 投与によって作製したパーキンソン病モデルザルから、運動障害の発現をモニターしつつ、経時的に脳脊髄液を採取し、ビオプテリン等の含有量とドーパミン細胞の変性・脱落の程度を調べる。

A. 研究目的

GTPから3段階の酵素反応によって生成されるテトラヒドロビオプテリン(BH4)は、ドーパミンやノルアドレナリン、セロトニンなどの神経伝達物質を合成する際の律速酵素であるフェニルアラニン水酸化酵素(PAH)、チロシン水酸化酵素(TH)、トリプトファン水酸化酵素(TPH)の補酵素として働く。また、BH4はグリセリルエーテルモノオキシゲナーゼによる酵素反応の補酵素として、脂質合成にも関与している。他方、BH4がこれらの補酵素として働くと、BH4はBH4-4 α -カルビノールアミンに酸化され、続いてプテリンカルビノールアミンデヒドラターゼ(PCD)による脱水反応を介してキノノイド型のBH2(q-BH2)が生成

され、さらにジヒドロプテリジン還元酵素(DPR)によるNADHの還元力を利用してBH4が再合成される。これらのことから、BH4はGTPからのde novo合成経路と、PCDとDPRの酵素反応によるrecycle経路を介して、合成が行われると考えられている。以上のように、BH4は脳内でカテコールアミンやセロトニンの合成に寄与しており、また、肝臓などの末梢臓器においてはフェニルアラニン水酸化酵素の必須補酵素として、フェニルアラニンからチロシンへの水酸化反応を正常に行うことにより、神経毒性のあるフェニルアラニン代謝産物が体内に蓄積しないようにしている。これまでの報告によれば、パーキンソン病(PD)患者において、脳脊髄液(CSF)中

のビオプテリン含有量の顕著な低下 (control 群の約 50%) が観察されている。特に、還元型のビオプテリンである BH4 の含有量は検出限界以下であった。また、マウスに PD 様運動障害を引き起こす化学物質として知られている MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) を全身投与した場合、投与後、短時間 (1 時間程度) では、線条体における TH の蛋白質量が変化しないにもかかわらず、TH の活性は低下し、繰り返し (8 日間) 投与すると蛋白質量と活性が共に低下するという報告がある。脳内の BH4 含有量は、de novo の合成経路と酸化型の BH2 からの再合成経路によって維持されているが、再合成経路における DPR の働きを MPTP が阻害するという報告があり、MPTP 投与直後に TH 活性が低下する原因として、TH の補酵素であるビオプテリン、特に BH4 の含有量が MPTP の影響により減少していることが関与している可能性がある。

これらのことを検証するため、本研究では、ヒトに近縁のサルを用いて、MPTP 投与による PD 様運動症状の発症・進行の過程と、ビオプテリン (酸化型・還元型) およびモノアミンなどの関連物質の含有量の変化を経時的に調べることにより、両者の相関性を解析することを目的とした。

B. 研究方法

2頭のニホンザル (9-11 kg) に静脈を介して MPTP を定期的に全身投与し (1 週あ

たり 0.4 mg/kg)、PD 様運動症状を発現させた。その際、CSF を経時的に採取し (500 μ l/回、2 回/週)、生化学的解析により、CSF 中のビオプテリンおよび関連物質の含有量を測定した。また、これらのサルに運動課題を遂行させて、ビデオ解析により運動症状の発現レベルをスコア化した。

CSF は採取後速やかに還元剤であるジチオエリスリトール (DTE) を最終濃度が 0.1 % (w/v) となるように添加し、-80 $^{\circ}$ C で保管した。測定を行った物質は以下のとおりである。

- BH4 とその酸化体である BH2 および BP (ビオプテリン)
- BH4 の生合成過程で副産物として生じる物質であり、脳内の炎症反応の指標の一つである NPH2 (ジヒドロネオプテリン) とその酸化体である NP (ネオプテリン)
- ドーパおよびドーパミンの最終代謝産物であるホモバニール酸 (HVA)
- セロトニンの主要代謝物である 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA)

測定の際には、CSF を氷上で融解した。CSF 200 μ l に除タンパク質を目的として 4 N の過塩素酸 10 μ l を混合して 20 分間氷上に静置し、遠心分離 (20400 x g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C) を行った。この上清 (約 200 μ l) をフィルターろ過逆相 HPLC (移動相 : 0.1 M Na-P buffer, pH 3.0 ; Post-column method) により分離後に蛍光検出した (Ex 375 nm, Em

465 nm)。

サル PD 様運動症状が顕著になった段階で、ペントバルビタールナトリウムの静脈内投与による深麻酔下で生理食塩水を用いて経心的灌流を行い、それに続いて、4%パラホルムアルデヒドで固定した。その後、脳を取り出し、同じ組成の固定液で後固定を行った。その後、固定した脳にシュークロース溶液を十分浸透させて、凍結マイクロトームで 60 μm 厚に薄切した線条体の切片を用いて、TH 免疫組織化学染色を行った。まず切片を PBS で 3 回洗浄し、0.3%過酸化水素で 30 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、1%スキムミルクを用いて常温で 1 時間ブロッキングした。続いて、2% normal goat serum を含む一次抗体溶液で 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 晩反応させた。反応後、PBS で 3 回洗浄した後、ビオチン標識の二次抗体溶液を加えて、常温で 2 時間反応させた。反応後、PBS で 3 回洗浄した後、ABC kit (Vector) を常温で 90 分間反応させた。反応後、PBS で 3 回洗浄し、0.2 mg/ml ジアミノベンチジン、0.04%ニッケルクロライドと 0.04%過酸化水素で発色させた。反応停止後、切片をスライドガラスにマウントし、キシレンで脱脂した後、封入し、顕微鏡で観察した。

(倫理面への配慮)

特になし

C. 研究結果

まずニホンザルから CSF を安定して経時的に採取する腰椎穿刺法を習得し、ビオプテリンおよび関連物質の含有量を測定する実験系を確立した。

運動課題を訓練したニホンザルに静脈を介して MPTP を全身投与し、投与量に応じて経時的に PD 様運動症状の増悪が観察された。また、灌流固定した脳から得られた線条体標本を用いた TH 免疫組織化学染色により、線条体における TH 活性の顕著な低下が観察された。これらのことから、MPTP 投与によりニホンザルの PD モデルが適切に作出されたと考えられた。

このようなサルにおいて、ビオプテリンおよび関連物質の含有量を経時的に解析したところ、HVA および 5-HIAA のモノアミン代謝産物が MPTP 投与開始後、直ちに低下し始めたのに対して、BH4 の低下は HVA より遅れていることを示す所見が得られた。また、炎症やミクログリア活性化の指標と考えられている NP 値の変化についても、HVA の低下より遅い傾向がみとめられた。また、これらの濃度変化は運動症状が顕著に発現するタイミングより先に起こっていることも確認された。他方、BH4 の酸化体である BH2 および BP (ビオプテリン) の含有量の変化は、今回の条件ではほとんど観察されなかった。その結果、BH2/BH4 比は運動症状の出現前に増加する傾向がみとめられた。

D.E. 考察および結論

本研究計画はまだ開始されたばかりであり、現在、測定精度を向上させるため、CSF採取時の麻酔方法や採取量、採取間隔、あるいは解析手法について更なる検討を行っており、至適条件が得られ次第、追加実験を行う予定である。PD様運動症状の発症過程において、モノアミン生合成過程の必須補酵素であるBH4の低下が線条体におけるドーパミン含有量低下の原因であるか、また、PDの病因である黒質ドーパミン細胞の酸化ストレスの亢進により、還元型ビオプテリンであるBH4の酸化が進行した結果、BH4の低下を引き起こすか、といったドーパミン細胞死とビオプテリン代謝の相互関係に関わる本質的な問題を明らかにしたい。

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
なし

ビオプテリン代謝異常マウスの解析

研究分担者 一瀬 千穂 藤田保健衛生大学医学部准教授

研究要旨

テトラヒドロビオプテリン(BH4)欠損が神経系におよぼす影響を明らかにするため、ドパミンニューロンで BH4 を不足したまま長期生存する DPS-Pts^{-/-}マウスの脳について、P(Postnatal)0 から P28 までの生後発達にともなう生化学的な変化を調べた。P0 での野生型マウス脳のビオプテリン含量は 6.4 ± 0.6 pmol/mg protein で、経時的に減少した。P0 での DPS-Pts^{+/+}マウス脳のビオプテリン量は野生型の 36%で、以後も増加しなかった。野生型マウス脳のチロシン水酸化酵素(TH)のタンパク質量は経時的に増加した。P0 での DPS-Pts^{+/+}マウス脳の TH のタンパク質量は野生型の 78%であるが、その後増加せず P28 の時点では野生型の 29%であった。P0 での野生型マウス脳のドパミン含量は 4.1 ± 0.7 pmol/mg protein で、経時的に増加した。P0 での DPS-Pts^{+/+}マウス脳のドパミン含量は野生型の 53%で、その後も増加が見られなかった。P0 での野生型マウス脳のセロトニン含量は 5.6 ± 1.4 pmol/mg protein で、P28 まで有意な差はなかった。DPS-Pts^{+/+}マウス脳のセロトニン含量は P0 では野生型と有意な差がなかったが、P7 までの間に急激に減少し、野生型の 24%に低下した。DPS-Pts^{+/+}マウスの脳内フェニルアラニン量は P0 から P7 の間に急激に増加し、野生型の 26 倍(26.7 ± 3.4 nmol/ mg protein)に達した。DPS-Pts^{+/+}マウスでは TH タンパク質量が増加せず、BH4 不足・アミノ酸代謝異常とともに、モノアミン合成の低下を引き起こすと考えられた。

A. 研究目的

テトラヒドロビオプテリン(BH4)は、チロシン水酸化酵素(TH)、トリプトファン水酸化酵素(TPH)、フェニルアラニン水酸化酵素、および一酸化酵素(NO)合成酵素のコファクターとして重要な分子である。BH4 の完全

あるいは部分的な欠損により、ヒトでは悪性高フェニルアラニン血症、ドパ反応性ジストニア(DYT5、瀬川病)がおきる。またアイカルディ・ゴータイエ症候群(Aicardi-Goutières syndrome; AGS)では先天的な酵素欠損によって核酸の分解が障害さ

れ、異常な免疫反応が誘発されると推測されるが、脳脊髄液でプテリン化合物が高値を示す。稀少疾患ではヒトの症例を解析するとともに、動物モデルを作成することが非常に有用である。我々の研究グループではBH4生合成酵素の遺伝子改変マウスを作成し、これまでの研究でBH4が不足するとドパミン神経終末でTHのタンパク質量が減少することを見出した。この現象はDYT5と同じメカニズムで生じていると考えられる。BH4の不足によって生じるモノアミン神経系の機能異常は、パーキンソニズムや感情障害・統合失調症などの神経・精神疾患にも関与する可能性がある。このように多数の疾患の病態にビオプテリン代謝がかかわっていることから、分担研究ではビオプテリン代謝異常マウスの解析を通じてジストニアおよびAGSの発症機構を解析し、より有効な治療法の開発を目指して研究をおこなっている。

B. 研究方法

BH4生合成の第2段階を触媒する6-ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素(PTS)の遺伝子ノックアウトマウス(Pts^{-/-})に、ドパミンβ-水酸化酵素(DBH)のプロモーターを用いてヒトPTS cDNA (DPS)を発現させたマウス(DPS-Pts^{-/-})は成獣まで生存できるが、生後12日目(P (postnatal)11)ごろから尾懸垂時にself claspung様の異常姿勢をとる。また成獣ではbeam testでbarの横断に時間がかかり、後肢のスリップ数も多い。

DPS-Pts⁺マウスではDBHプロモーターによってノルアドレナリン神経や副腎髄質ではPTSを発現してBH4が生合成されるが、ドパミン神経系や肝臓ではBH4は不足したままとなる。成獣マウスの解析では、高フェニルアラニン血症、ビオプテリン・ドパミン・セロトニンが低値であること、この変化がドパミンニューロンの細胞体の分布する中脳よりも、神経終末が分布する線条体で大きいことがわかっている。組織化学的な解析ではカテコラミン生合成の律速酵素であるTHの免疫活性がSubstantia Nigra、Ventral tegmental areaの細胞体およびNucleus Accumbensでは比較的保たれているのに対し、線条体(Caudate-putamen)の外側後方で大きく低下していた(Sumi-Ichinose C. et al. (2005) J. Neurochem. 95:703-714.)。THの免疫活性の低下は線条体のMatrixに比べ、Striosomeでより大きく低下していた。野生型マウスの線条体では、P0の時点でTH陽性の神経線維の中に抗TH抗体で強く染まるStriosomeが観察され、P7からP14にかけてStriosomeのTHの免疫染色性が低下すると同時にMatrixでP0からP28にかけてTHの免疫染色性が増加していく。一方ドパミンニューロンでBH4が不足しているDPS-Pts^{-/-}マウスではP0の線条体は野生型と類似しているが、P7からP14にかけてStriosomeのTHの免疫染色性が急激に低下し、一方MatrixのTHの免疫染色性が増加しない(Sato K. et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 12551-12556.)。Substantia Nigra

から Matrix に投射するドパミンニューロンは、直接路・間接路の出力である GABA ニューロンを制御しているのに対し、Striosome に投射するドパミンニューロンは Substantia Nigra の活動をフィードバック抑制する GABA ニューロンに接続する。DPS-Pts⁺マウスの異常症状が出現する時期は Striosome の TH の免疫染色性が大きく低下する時期に一致し、Matrix と Striosome に機能的なインバランスが生じることと関連している可能性が高い。ヒトのドパ反応性ジストニア発症の経過においても神経系の発達は重要な因子であると推察され、その分子メカニズムについての情報を得るため、本年度は DPS-Pts⁺マウス脳の生後発達による生化学的な変化を経時的に解析した。P0, P7, P14, P21, P28 齢の野生型マウスおよび DPS-Pts^{-/-}各 3 匹と、P0 齢の Pts^{+/+}3 匹を使用した。また P0, P14, P28 齢の野生型マウスおよび DPS トランスジェニックマウス各 3 匹を用いて、生化学的な差異を検討した。全脳ホモジネートのタンパク定量は Bradford の方法で行った。BH4、ジヒドロピオプテリン等の酸化体である総ピオプテリン量は、ホモジネートを除タンパク後酸性条件化でヨウ素酸化し、アスコルビン酸添加し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)-蛍光検出器法で定量した。TH のタンパク質量は抗 TH 抗体を用いてウエスタンブロット法によりおこない、 β -actin をコントロールとして相対化した。ドパミン、セロトニン、およびその代謝物の量は、除タンパク液を

HPLC-電気化学検出器法で定量した。脳内フェニルアラニン・チロシン含量は、除タンパク液を日立 L-8500 アミノ酸分析装置で分析した。

(倫理面への配慮および関連法規の遵守)
マウスの飼育および使用は本学の動物実験管理委員会の規定および審査にしたがっておこない (M2001)、遺伝子組み換え動物の使用は藤田保健衛生大学組み換え DNA 実験委員会への届出(No. 126)と第 2 種使用の規定を遵守して行った。

C. 研究結果

P0 での野生型マウス全脳ホモジネートのピオプテリン含量は 6.4 ± 0.6 pmol/mg protein で、P0 から P28 (3.0 ± 0.1 pmol/mg protein)にかけて経時的に減少した。P0 での DPS-Pts⁺マウス脳のピオプテリン量は野生型の 36% (2.3 ± 0.4 pmol/mg protein)で以後も増加せず、P28 の時点では野生型の 38% (1.2 ± 0.1 pmol/mg protein)であった。野生型マウス脳の TH のタンパク質量は P0 から経時的に増加し、P28 では P0 の 5.2 倍に達した。P0 での DPS-Pts⁺マウス脳の TH のタンパク質量は野生型の 78%であるが、その後増加せず、P28 の時点では野生型の 29%であった。P0 での野生型マウス脳のドパミン含量は 4.1 ± 0.7 pmol/ng protein で、P21 (21 ± 0.2 pmol/mg protein)まで経時的に増加した。P0 での DPS-Pts⁺マウス脳のドパミン含量は野生型の 53% (2.2 ± 0.7 pmol/mg protein)で、その後も増加が見られず、P28 では野生型の

19%になった。P0 での野生型マウス脳のセロトニン含量は 5.6 ± 1.4 pmol/mg protein で、P28 まで有意な変化はなかった。DPS-Pts^{-/-}マウス脳のセロトニン含量は P0 では 5.2 ± 0.5 pmol/mg protein で野生型と差がなかったが、P7 (1.4 ± 0.7 pmol/mg protein)までの間に急激に減少し、P28 では野生型の 14%であった。野生型マウスの脳内フェニルアラニン含量は P0 では 2.6 ± 1.2 nmol/mg protein で、その後も有意な変化はなかった。DPS-Pts^{-/-}マウスの脳内フェニルアラニン量は P0 (5.1 ± 0.8 nmol/mg protein)から P7 (26.7 ± 3.4 nmol/mg protein)の間に急激に増加し、野生型の 26 倍に達した。DPS-Pts^{-/-}マウスの脳内フェニルアラニン量は P21 以降有意に減少し、P28 (8.1 ± 0.9 nmol/mg protein)では野生型(0.6 ± 0.2 nmol/mg protein)の 14.8 倍となった。野生型マウスの脳内チロシン含量は P0 では 2.2 ± 0.6 nmol/mg protein で、P0 から P28 (0.9 ± 0.2 nmol/mg protein)にかけて経時的に減少した。P0 での DPS-Pts^{-/-}マウスの脳内チロシン量は 1.2 ± 0.0 nmol/mg protein で P7 (0.6 ± 0.1 nmol/mg protein)および P14 (0.3 ± 0.0 nmol/mg protein)では野生型 (P7; 2.6 ± 0.4 nmol/mg protein, P14; 1.8 ± 0.1 nmol/mg protein)に比較して有意に低値であった。P0、P14、P28 におけるビオプテリン含量、ドパミン量、セロトニン量について、野生型マウスと DPS トランスジェニックマウスの間には有意な差がなかった。

D. 考察

野生型マウス脳ホモジネートのビオプテリン含量が経時的に低下するのは、BH4 がモノアミンニューロンに局在し、発達にともなって脳全体の体積が大きくなっていくため相対的に小さくなると考えられる。正常な状態ではモノアミンニューロンにおける TH のタンパク質量は増加するが、DPS-Pts^{-/-}マウスでは増加しない。今回の研究では中脳と線条体を区別して採取していないため、ドパミンニューロンの細胞体と神経終末で TH のタンパク質量の変化に差があるかどうかは検討できなかった。抗 TH 抗体を用いた免疫組織学的な研究では DPS-Pts^{-/-}マウス線条体の TH の免疫染色性は P0 では野生型と類似しているが、P7 から P14 にかけて Striosome の TH の免疫染色性が急激に低下し、一方 Matrix の TH の免疫染色性が増加しないことがわかっている。脳内のビオプテリン量、TH のタンパク質量、ドパミン量は非常に強く相関している。BH4 によって TH のタンパク質量が制御されるメカニズムについては、さらに詳細に検討する必要がある。一方セロトニンについては P0 では DPS-Pts^{-/-}マウスと野生型マウスとで差が無いが、P7 までに急激に減少する点が特徴的である。これまでの研究から、BH4 をほぼ完全に欠損する PTS^{-/-}マウス(新生仔)でも、全脳ホモジネートの TPH のタンパク質量は減少していないことがわかっている。脳内フェニルアラニンはミルクの摂取によって生後早期に急激に増加し、P7 までにプラト

一に達することから、TPH の活性が高濃度のフェニルアラニンによって非常に強く阻害されることが考えられる。

E. 結論

BH4 を部分欠損する DPS-Pts⁺ マウスでは生後のモノアミンの合成と TH タンパク質の正常な増加が阻害され、異常姿勢や運動症状の出現にいたると考えられる。BH4 不足による直接的な影響に加え、生後高フェニルアラニン血症によって脳内へのチロシン・トリプトファン⁺の輸送が阻害されること、また高濃度のフェニルアラニンによって TH および TPH の活性が阻害されることも、脳内ドパミン、セロトニンの低下の原因であると推測される。BH4 によるシナプス終末部の TH の制御メカニズムを検討するためにはモデルマウス個体への BH4 の補充、L-DOPA あるいはドパミンアゴニストの投与などによって TH のタンパク質量やリン酸化の状態が変化する条件を探し、発現や分布の変化する分子を探索することが必要である。同時に条件設定の容易な培養細胞系を確立するなど、総合的なアプローチが必要である。また脳内で産生される NO やスーパーオキシドがモノアミン神経系の

発達や成熟、あるいは可塑性におよぼす影響についても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

Chiho Sumi-Ichinose, Hiroshi Ichinose, Kazuhisa Ikemoto, Takahide Nomura, and Kazunao Kondo (2010). Regulation of dopaminergic neural transmission by tyrosine hydroxylase protein at nerve terminals. *J Pharmacol Sci* 114: 17 - 24.

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

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S. Koshiba, H. Tokuoka, T. Yokoyama, E. Horiuchi, H. Ichinose, K. Hasegawa ,	Biopterin levels in the cerebrospinal fluid of patients with PARK8 (I2020T)	Neural Transm	in press		2011
D. Homma, C. Sumi-Ichinose, H. Tokuoka, K. Ikemoto, Y. Nomura, K. Kondo, S. Katoh and H. Ichinose.	Partial Biopterin Deficiency Disturbs Postnatal Development of the Dopaminergic System in the Brain	The Journal of Biological Chemistry	286	1445-1452	2011
H. Nishibayashi, M. Ogura, K. Kakishita, S. Tanaka, Y. Tachibana, A. Nambu, K. Kita, T. Itakura	Cortically evoked responses of human pallidal neurons recorded during stereotactic neurosurgery.	Mov Disord	in press		2011
Y. Saga, Hirata, D. Takahara, K. Inoue, S. Miyachi, A. Nambu, J. Tanji, M. Takada, E. Hoshi	Origins of multisynaptic projections from the basal ganglia to rostrocaudally distinct sectors of the dorsal premotor area in macaques.	Eur J Neurosci	33	285-297	2011
M. Hashimoto, D. Takahara, Y. Hirata, K. Inoue, S. Miyachi, A. Nambu, J. Tanji, M. Takada, E. Hoshi	Motor and non-motor projections from the cerebellum to rostrocaudally distinct sectors of the dorsal premotor cortex in macaques.	Eur J Neurosci	31	1402-1413	2010
M. Kubo, Y. Kamiya, R. Nagashima, T. Maekawa, K. Eshima, Ohta E, F. Obata	LRRK2 is expressed in B-2 but not in B-1 B cells, and downregulated by cellular activation.	J. Neuroimmunol	229 (1-2)	123-128	2010
E. Ohta, M. Kubo., F. Obata	Prevention of intracellular degradation of I2020T mutant LRRK2 restores its protectivity against apoptosis.	Biochem Biophys Res Commu	391 (1)	242-247	2010
T. Maekawa, M. Kubo, I. Yokoyama, E. Ohta, F. Obata	Age-dependent and cell-population-restricted LRRK2 expression in normal mouse spleen.	Biochem Biophys Res Commu	392 (3)	431-435	2010
C. Sumi-Ichinose, H. Ichinose, K. Ikemoto, T. Nomura, K. Kondo	Regulation of dopaminergic neural transmission by tyrosine hydroxylase protein at nerve terminals.	J. Pharmacol. Sci.	114	17-24	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
南部 篤	臨床に役立つ大脳基底核の解剖と生理.	神経治療学	28	19-23	2011
南部 篤	線条体における運動手続き記憶.	Clinical Neuroscience	29	172-176	2011
平田 幸一、長谷川 一子、渡邊 雅彦、Claudia Trenkwalder	レストレスレッグス症候群の鑑別診断と治療	日本医学会雑誌	138	RLS13-16	2010
長谷川 一子	パーキンソン病治療の動向	最新医学	65	861-870	2010
長谷川 一子	Huntington病統一スケール(UHDRS)	神経内科	73	597-605	2010
長谷川 一子	ジストニアとは	Clinical Neuroscience 別冊	28	742-745	2010
水野 未邦、山本 光利、久野 貞子、長谷川 一子、服部 信孝	パーキンソン病治療における徐放性製剤の意義	新薬と臨牀	59	1820-1833	2010
長谷川 一子	パーキンソン病の臨床診断および鑑別診断—臨床症状から	総合臨牀	59	2404-2411	2010

[IV] 研究成果の刊行物・別刷

Biopterin levels in the cerebrospinal fluid of patients with PARK8 (I2020T)

Shoko Koshiba · Hirofumi Tokuoka ·
Teruo Yokoyama · Emiko Horiuchi ·
Hiroshi Ichinose · Kazuko Hasegawa

Received: 19 November 2010 / Accepted: 16 January 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract PARK8 is the most common form of familial Parkinson's disease (PD). We measured biopterin and monoamine metabolite levels in the cerebrospinal fluids of 7 PARK8 patients (I2020T mutation in leucine-rich repeat kinase 2), 2 asymptomatic mutation carriers, and 21 sporadic PD patients. The biopterin levels in PARK8 patients were significantly higher than those in sporadic PD patients, although the symptoms were comparable in both groups, suggesting that PARK8 patients exhibit parkinsonian symptoms with higher biopterin levels than sporadic PD patients.

Keywords Parkinson's disease · PARK8 · Biopterin · Cerebrospinal fluid · Dopamine · Leucine-rich repeat kinase 2

Introduction

LRRK2, which encodes leucine-rich repeat kinase 2, was identified as a causative gene for PARK8, an autosomal

dominant familial Parkinson's disease (PD) (Funayama et al. 2002; Paisan-Ruiz et al. 2004; Zimprich et al. 2004). *LRRK2* mutations are the most common form of dominantly inherited familial PD (5–13%) and are also found in sporadic PD patients (1–5%). Clinical features of patients with *LRRK2* mutations are similar to sporadic PD patients, but their neuropathological features are diverse with respect to neuronal cell loss in the substantia nigra (SN) and the formation of intracellular inclusions (Lewy bodies, tau tangles, and ubiquitin inclusions) (Hasegawa et al. 2009; Wszolek et al. 2004; Zimprich et al. 2004).

Tetrahydrobiopterin is a cofactor for tyrosine hydroxylase, which catalyzes the first step in the biosynthesis of dopamine (DA). The measurement of biopterin (BP) and its related metabolites in biological fluids is of significance for the diagnosis and/or investigation of various diseases. In sporadic PD patients, BP levels in the cerebrospinal fluid (CSF) are reduced (Fujishiro et al. 1990; Lovenberg et al. 1979). Because the BP in the CSF is mostly derived from nigrostriatal dopaminergic neurons, the decreased CSF BP levels in sporadic PD patients are likely a result of the degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons (Levine et al. 1981).

The pathogenic roles of *LRRK2* mutations in the etiology of PARK8 are poorly understood. To gain more insight into the PARK8 etiology, we measured BP levels in the CSF from PARK8 (I2020T) patients and asymptomatic mutation carriers and compared them with the levels in sporadic PD patients.

Subjects and methods

This study was approved by the ethics committees of the Sagami National Hospital and the Tokyo Institute of

S. Koshiba
Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of
Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology,
4259-B7 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan

H. Tokuoka · H. Ichinose (✉)
Department of Life Science, Graduate School of Bioscience
and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology,
4259-B7 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan
e-mail: hichinos@bio.titech.ac.jp

T. Yokoyama · E. Horiuchi · K. Hasegawa
Division of Neurology, National Hospital Organization
Sagamihara National Hospital, 18-1 Sakuradai,
Minami-ku, Sagami 252-0392, Japan