

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

Perry(ペリー)症候群の診断および治療方法の
更なる推進に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者：
服部信孝

分担研究者：
坪井義夫
佐藤栄人
富山弘幸
斉木臣二
波田野琢

平成24(2012)年 5月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

Perry（ペリー）症候群の診断および治療方法の
更なる推進に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者：

服部信孝

分担研究者：

坪井義夫

佐藤栄人

富山弘幸

斉木臣二

波田野琢

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

- Perry(ペリー) 症候群の診断および治療方法の更なる推進に関する研究 …………… 1
服部 信孝

II. 分担研究報告

1. Perry(ペリー)症候群の診断および治療方法の更なる推進に関する研究 …………… 5
坪井 義夫
2. Perry(ペリー)症候群の診断および治療方法の更なる推進に関する研究 …………… 7
佐藤 栄人
3. Perry(ペリー)症候群の診断および治療方法の更なる推進に関する研究 …………… 9
富山 弘幸
4. Perry(ペリー)症候群の診断および治療方法の更なる推進に関する研究 …………… 13
斉木 臣二
5. Perry(ペリー)症候群の診断および治療方法の更なる推進に関する研究 …………… 16
波田野 琢

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 19

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 25

Perry（ペリー）症候群の診断および治療方法の 更なる推進に関する研究

研究代表者：服部信孝（順天堂大学脳神経内科教授）

研究要旨

Perry 症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたす予後不良の遺伝性疾患であり，2009 年に *DCTN1* が原因遺伝子として報告されたが，世界で 9 家系のみ報告と極めて稀な疾患である。本疾患の分布や頻度，臨床像は明らかにされておらず，L-Dopa 反応性の症例もあり，パーキンソン病との異同が問題となる。そこで本研究は，本症候群を臨床疫学的，分子遺伝学的に明らかにし，臨床診断基準を作成することを目的とする。研究代表者の施設にはパーキンソニズムを中心とした国内外からの約 3000 例の DNA バンクが確立できており，大規模解析により変異頻度を明らかにし，早晚疫学調査に繋げ得る点で意義がある。

1 年目に，日本人パーキンソニズム 973 例中 5 家系 24 人と，日本にも少なからず症例が存在することが判明した。新規変異も 2 つ同定した。家系は九州に集中しており，地域性，創始者効果が存在することが確認できた。今年度は，さらに未報告の新規変異をもつ九州地方の 1 家系の情報を得ることができたため，患者群の検査所見，臨床像の評価からの成果を加えて，近々論文を投稿予定である。患者群の情報をもとに世界の研究者と共に国際会議を開催，本邦のみならず国際的な臨床診断基準を作成し，日本神経学会年次大会で発表したが，今後も講演，学会誌上，インターネットなどを通じ広く公表していく予定である。

Perry 症候群は低換気を呈するとともに TDP-43 の蓄積を示し，*DCTN1* 変異は TDP-43 プロテノパチーとしての筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こすことも知られ，その機能解析は封入体形成機構を明らかに出来る可能性を秘めている。今年度はモデル動物の作製もできてきており，病態解明にその成果が期待される。このように本研究は，特殊と考えられている疾患の研究から広く主要な神経変性疾患の根本的病態解明に繋げることを究極の目標とする極めて独創的で意義深いものとなってきている。また医療費，制度等に関し，厚生労働行政の課題の解決の一助になる可能性を広げてきている。

尚，本解析は順天堂大学倫理委員会の承認に基づき行った。

研究代表者
服部信孝

分担研究者

坪井義夫¹⁾，佐藤栄人²⁾，富山弘幸²⁾，斉木臣二²⁾，波田野琢²⁾
福岡大学神経内科¹⁾，順天堂大学脳神経内科²⁾

A. 研究目的

Perry症候群はパーキンソニズム, うつ, 体重減少, 低換気をきたす予後不良の稀な遺伝性疾患とされる. 2009年坪井らのグループにより *DCTN1* が原因遺伝子として報告された (Farrer et al. Nat Gene) が, 本邦2家系を含む世界で9家系のみでの報告で, 分布や頻度, 臨床像は明らかでない. L-Dopa反応性の症例もあり, パーキンソン病との異同が問題である.

このような背景の中, その診断基準を作成し, 世界及び本邦での疾患の分布, 頻度およびその実態を明らかにすることを本研究の主目的とした.

最長寿国である日本においては, 高齢化社会のなか医療費公費負担も年々増加していくものと予想される. また介護保険制度改革の中, 介護の人材不足とともに介護保険もますます負担が増えるものと予想され, さらにALSにおいては医療費公費負担とともに, 24時間体制で介護が必要なことも多く, 人工呼吸器管理患者の療養先, 高額医療がますます問題となると予想される.

そのため本研究は難病の医療費公費負担, 介護保険制度, 療養型病床の利用など医療と介護の制度につき, より広く発展した形で社会的成果をもたらす, 厚生労働行政の課題の解決の一助になる可能性を十分に秘めている. このように本研究は, 医学の向上から, 間接的には行政及び国民の保健・医療・福祉の向上等社会へ貢献することを究極の目的とした.

B. 研究方法

研究目的の達成のため, 約3000例のDNAバンク症例中, 日本の973例に対し, *DCTN1* の変異解析を行った. 正常対照の解析も行い, 解析可能な家系では家系内での変異の共分離も確認し, 病的変異としての意義を確認した. 変異陽性家系については同意を得た上で実地診療に赴き, 変異陽性患者を実際に診察の上, 検査所見を検討, 解析した.

その情報に基づき, 臨床診断基準 (案) を世界のPerry症候群患者の担当医, 世界のPerry症候群患者の研究者とともに作成した.

また, 機能解析は細胞をもちいた実験でdynactinの凝集の確認, dynactin凝集体の局在の確認, 免疫組織化学・生化学的検討を行った. 野生型・変異型dynactinをDrosophilaに打ち込み, 各lineの樹立を行った.

業務は研究分担者が分担し遂行した.

(倫理面への配慮)

本研究では個人の遺伝情報を取り扱うので, DNA, RNA検体採取にあたっては研究対象者, 研究協力者の不利益・危険性が排除されるよう十分な説明と同意を得た. 各試料はランダムマイズし, 研究者は個人の特長ができないように配慮するとともに, 得られた個人情報については人権擁護のため法令等を遵守のうえ厳重に管理し, 漏洩等のないように十分注意して研究を遂行した. 遺伝子解析については順天堂大学倫理委員会の承認に基づいた.

本研究ではモデル動物として, ハエの作製を行ったが, 動物実験計画をとともに動物愛護上の配慮に基づき研究を進めた. 動物の取り扱いについては学内倫理委員会の承認を得て, SPF内でP2レベルの安

全管理のもとに実験を行い, 実験が終了した動物は速やかに焼却処分し拡散の防止に努めた.

C. 研究結果

日本に少なくとも5家系24人の患者が存在することが明らかとなり, 地域特異性, 創始者効果の有無, 有病率, 分布など疫学調査を進めることができています. 新規変異も2家系で同定できた. 今年度は, さらに未報告の新規変異をもつ九州地方の1家系の情報を得ることができ, 臨床dataの蓄積もできてきた.

この結果が得られたことにより, 臨床像の評価に基づき, 臨床診断基準を作成を行った. 今後は, 日本人のみならず人種を超えた多数例での臨床症状, MRI, SPECT, MIBG心筋シンチ, 電気生理学的所見, 認知機能やうつ病スケールなどの検査所見, 経過などに基づき, 診断基準の改定を繰り返し, よりよいものにupdateしていく必要がある.

今年度の機能解析研究では運動神経細胞死・黒質神経細胞死の共通メカニズムを解明すべく, 病因変異を持ったdynactinの強制発現による細胞死への影響を検討した. 変異型dynactin細胞質内凝集物を形成した細胞では細胞死が有意に高頻度で惹起されており, cleaved caspase3陽性, 核濃縮・核断片化が進行しており, アポトーシスが誘導されていると考えられた. 同アポトーシスはcaspase阻害薬にて抑制された. 以上の結果より細胞質内凝集物が, 細胞死に対して重要な役割を果たすことが示唆され, 誘導される細胞死はアポトーシスであることから, アポトーシス阻害 (caspase-9, caspase-3のノックダウン, 抗アポトーシス剤の添加) などが有力な細胞死抑制手段として候補に挙げると考えられた.

トランスジェニック (Tg) ドロゾフィラの検討については, 野生型・変異型dynactinをDrosophilaに打ち込み, 各lineの樹立, モデルの作成を完了した. 同モデルの行動学的解析 (主にclimbing testなどの運動機能) および形態的異常・病理学的異常の詳細な検討を進行中である.

D. 考察

1年目の日本人973例の解析で, 本邦に少なくとも5家系24人の患者の存在が確認され, 地域特異性, 創始者効果の有無, 有病率, 分布など疫学調査を進めることができてきていることは, これまで世界で他に7家系だったことを考えると大きな進歩である. 新規変異も2家系で同定できていることは, 変異例ごとの臨床像の違いを検討しつつ, 機能解析へ応用することにおいても重要な意義をもたらしている. 得られたdataをもとに日本人での臨床症状, MRI, SPECT, MIBG心筋シンチ, 電気生理学的所見, 認知機能やうつ病スケールなどの検査所見, 経過など臨床像の評価も進んできており, その知見に基づき, 臨床診断基準を作成することができてきている. 2010年, 坪井らは起立性低血圧, 自律神経機能異常を呈し, MIBG心筋シンチの取り込み低下をきたす症例が存在したことをParkinsonism Relat Disord誌に初めて報告したが, この知見によりPerry症候群とPDとの類似点がさらに示された. このように当初の計画通りに順調に研究は進み, 実績が残せてきている一方, PDとの異同, 鑑別がますます重要になり, 今後の研究の重要性が増してきている.

これまでMIBG心筋シンチでの心筋への取り込み低下の結果は、synucleinopathyのスペクトラムとしてLewy小体、 α -synucleinの蓄積の広がりやを反映しているとも考えられてきたため、本年度以降、病理像も得られるようであれば、臨床病理学的診断基準も付帯することも重要事項と考えられる。研究代表者のグループの施設では海外からの症例も豊富であるため、日本人以外の症例の解析を進め、全世界的規模でPerry症候群の実態を明らかにしていく予定である。

当初の研究計画にはなかったことだが、平成23年度2月22-23日東京において開催された国際シンポジウムInternational Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome in Tokyoでの診断基準作成のための国際会議を通じて、本邦を含めた国際的な診断基準を作成し、論文、日本神経学会、ホームページなどを通じて広く発表していく計画を組むことができてきた。この国際会議では、一緒にNature Genet誌にPerry症候群の最初の変異家系群を発表したMayo Clinicのグループをはじめとした世界の最先端の研究者や臨床家が来日し、ALS/Motor Neuron DiseaseとPerry症候群に共通な分子メカニズムであるTDP-43プロテノパチーの最先端の研究者とともに、遺伝子、分子レベルの発症機序の解明から、本邦発のiPSを用いた治療の開発戦略にまで焦点をあてて議論し、本研究の成果を確認するとともに、今後の方向性を協議することができた。このことは研究計画以上に本研究が進んでいることを示している。今後も世界最先端の連携体制の中で情報交換を続けながら、Perry症候群、ALS/Motor Neuron DiseaseそしてPD、パーキンソン症候群といった神経変性疾患に対しての広い視点で、研究を進めていく体制をさらに確立していくことは大変重要なことと考えられた。

機能解析において、これまでの培養細胞の実験では、Perry症候群の変異をもつp150蛋白はtubulinとの親和性がより低下することが判明しており、これら変異をもつ動物モデルの作製は病態の解明に必須である。これらの作製は容易であり、また中枢神経に病変を持つモデル動物が生まれる可能性も高いと思われ、今後の研究の成果が期待される。野生型・変異型dynactinをDrosophilaに打ち込み、すでに各lineの樹立を完了したことは、本研究において同モデルの行動学的解析（主にclimbing testなどの運動機能）および形態的異常・病理学的異常の詳細な検討を早晩可能にできてきている。このことは、モデル動物を用いたdynactinの機能解析として極めて重要な結果をもたらすものと考えられ、各種運動機能評価や免疫組織化学による凝集体の形成やドパミン細胞死の有無の検討、さらにはp150と相互作用する蛋白質の網羅的な解析等を行うこととしている。PDにしてもよいモデルマウスが存在しない現在、Perry症候群の変異を持つTgマウス・ドロゾフィラは本疾患に限らず広く神経変性疾患の凝集体形成やドパミン神経細胞死の病態解析に有益となると予測される。同モデルの行動学的解析（主にclimbing testなどの運動機能）および形態的異常・病理学的異常の詳細な検討を継続していくことが必要であり、その結果が期待される。

E. 結論

以上のようにDCTN1変異はパーキンソン病との異同が問題になる臨床症候を呈するとともに、TDP-43プロテノパチーとしての筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こすことも知られ、その機能解析は封入体形成機構を明らかに出来る可能性を秘めており、本研究は、特殊と考えられている疾患の研究から広く主要な神経変性疾患の根本的病態解明に繋げることを究極の目標とする極めて独創的で意義深いものである。今年度の本研究から得られた多くのdataに基づき、本年度以降も、遺伝子解析による診断のみならず蛋白機能解析、免疫組織学的解析も並行し、分子遺伝学の知見、病理学的知見も反映したより集学的に完成された形での診断基準作成を目指すとともに、難治性疾患、神経変性疾患の病態解明、克服にむけて研究をさらに進めていきたいと考えている。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

研究代表者 服部信孝

1) Tomiyama H, Yoshino H, Hattori N. Analysis of *PLA2G6* in patients with frontotemporal type of dementia. *Parkinsonism Relat Disord* 2011;56:102-3.

2. 学会発表

研究代表者 服部信孝

- 1) 富山弘幸, 李林, 中尾絃一, 京楽格, 栗崎玲一, 李元哲, 船山学, 吉野浩代, 音成龍司, 坪井義夫, 服部信孝. 日本人パーキンソニズムにおけるDCTN1変異解析—Perry症候群について. (2011.5月, 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋)
- 2) 富山弘幸, 李林, 中尾絃一, 京楽格, 栗崎玲一, 李元哲, 船山学, 吉野浩代, 音成龍司, 坪井義夫, 服部信孝. パーキンソニズムにおけるDCTN1解析—Perry症候群とパーキンソン病の異同について. (2011.10月, 第5回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres. 東京)
- 3) H. Tomiyama, H. Yoshino, K. Ogaki, L. Li, C. Yamashita, Y. Li, M. Funayama, R. Sasaki, Y. Kokubo, S. Kuzuhara, and N. Hattori. *PLA2G6* in patients with Parkinson's disease / frontotemporal type of dementia. (2011.10.14. The 12th International Congress of Human Genetics, ICHG and the American Society of Human Genetics, ASHG 61st Annual Meeting. Montreal, Canada)
- 4) 富山弘幸, 李林, 中尾絃一, 京楽格, 栗崎玲一, 李元哲, 船山学, 吉野浩代, 音成龍司, 坪井義夫, 服部信孝. 日本人パーキンソニズム症例におけるDCTN1解析. (2011.11月, 日本人類遺伝学会総会. 東京)

5) 富山弘幸, 李林, 中尾紘一, 京楽格, 栗崎玲一, 李元哲, 船山学, 吉野浩代, 音成龍司, 坪井義夫, 服部信孝. Perry症候群の診断基準案作成と疫学調査について. (2011.12月, 平成23年度 神経変性疾患に関する調査研究班. 東京)

6) Shinji Saiki, Yukiko Sasazawa, Jacobus P. Petzer, Emi Kawauchi, Daisuke Yamada, Takahiro Fujimaki, Hiroki Kobayashi, Kei-Ichi Ishikawa, Miwako Kawamura, Yoko Imamichi, Masaya Imoto, Nobutaka Hattori. "EFFECTS OF CAFFEINE AND CAFFEINE ANALOGUES ON AUTOPHAGY IN CULTURED CELLS" Autophagy in health and disease. 30 October - 4 November, 2011, In Ma'ale Hachamisha, Israel

7) Kei-Ichi Ishikawa, Shinji Saiki, Yoko Imamichi, Shigeto Sato, Yuanzhe Li, Sumihiro Kawajiri, Nobutaka Hattori. EFFECTS OF DYNACTIN WITH A PATHOGENIC MUTATION FOR PERRY SYNDROME ON AUTOPHAGY. Autophagy in health and disease. 30 October - 4 November, 2011, In Ma'ale Hachamisha, Israel

8) 「Perry症候群の原因遺伝子産物ダイナクチンの機能解析」

石川景一、河尻澄宏、斉木臣二、佐藤栄人、李元哲、今道洋子、Matthew J.Farrer、服部信孝
第52回日本神経学会（名古屋）平成23年5月18-20日

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：特になし

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

Perry（ペリー）症候群の診断基準等の作成のための奨励研究

分担研究者：坪井 義夫 福岡大学医学部神経内科学・教授

研究要旨

Perry 症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたす予後不良の稀な常染色体優性遺伝疾患であり，2009 年に DCTN1 が原因遺伝子として報告、さらに病理学的に TDP-43 蛋白異常が認められた。その後本邦でも新しい患者、家系が発見された。新しい家系が発見されるにつれこの疾患の臨床的多様性が明らかになってきた。孤発性パーキンソン病と臨床区別できない症例もあり、睡眠障害、精神症状もみられることも判明した。本研究は、本症候群における臨床像を明確にして、その臨床診断基準，指針を作成し確立することを目的とする。

A. 研究目的

Perry 症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたし，生命予後 10 年以内の予後不良の稀な遺伝性疾患で、我々のグループにより DCTN1 が原因遺伝子として報告された(Farrer et al. Nat Genet 2009)。さらに病理学的に Lewy 小体は認めず、TDP-43 蛋白凝集が認められた(Wider C, et al. Parkinsonism Relat Disord. 2009)。本疾患は最近まで本邦の 2 家系を含む世界で 9 家系の報告があったがその後報告が徐々にではあるが増えている。それに伴い臨床像の多様性も明らかになり、今後、本疾患の臨床診断基準の作成が急務であり、それをもとに更なる家系の発見と家系の分布，頻度を明らかにすることが本研究の目的となる。

B. 研究方法

今回新たに発見された 2 家系と、最初に報告された家系(FUK-1)がさらに広がり、Perry 症候群最大の家系となった。新たに確

認された発症者に関して、臨床症状、画像、生理検査、経過を詳細に検討し、臨床表現型の特徴を集約し、感度、特異度の高い診断基準の作成することを目的とする。

（倫理面の配慮）

本研究の対象患者および患者家族に対して十分に説明を行い、理解を得た上で同意された患者にのみ本治療研究は実施された。本治療研究に対して同意を得る場合は人権保護の立場から慎重に検討し、安全の確保に充分配慮し、対象患者のプライバシー保護には十全の配慮を行われた。同意が得られない場合でも何ら差別なく疾患に対して必要な治療を行うことを原則とし、患者の個人情報については慎重に対応した。

C. 研究結果

新たに発見された家系は 4 家系（FUK-4,KUM, OMT, MZK）であった。このうち KUM 家系は FUK-1 家系とつながりが確認され、1 つの大きな家系となった。

本邦では 4 家系 24 人の発症者が存在し 6 例が生存することが判明した。

その中で本邦家系症例の特徴は、平均発症年齢が 48 歳（範囲：35-70 歳）、平均罹病期間が 5 年（範囲 2-12 年）で孤発性パーキンソン病より若年発症で経過が速い。L-DOPA 治療効果はほぼ全例でみられ、早期の運動合併症が見られる症例が散見された。体重は半年単位で 10kg 以上の減少がみられる例が多く、左右対称性の筋固縮、動作緩慢、姿勢反射障害がみられた。不眠、中途覚醒は多くの頻度でみられ、精神症状としては衝動性制御障害と *punding* がみられた。検査所見では頭部 MRI は前頭萎縮を示すものと正常なものがあり、脳血流 SPECT 検査では前頭葉における血流低下が特徴であった。肺活量、胸部 CT などの異常は見られず、夜間に呼吸不全に陥る症例が多く、夜間睡眠ポリグラフで中枢性低換気が認められた。死亡原因は突然死が最も多く、その他では呼吸不全、肺炎、自殺の順に多かった。診断基準の草案として主要徴候 a. 左右対称性の L-DOPA 反応性パーキンソン症候群、b. 無気力あるいはうつ病の合併、c. 睡眠障害、d. 体重減少の 4 項目で、支持症候として、a. 家族歴、b. 進行の早いパーキンソン症候 c. 50 歳未満の発症、d. 夜間の呼吸困難あるいは無呼吸の存在、e. 日中の過眠、f. 自殺企図、g. 自律神経障害 h. 睡眠ポリグラフにおける中枢性低換気及び睡眠ステージ 3、4、REM 睡眠潜時の著しい低下、ドパミン系治療により時に誘発される衝動制御障害も特徴と考えられた。

D. 考察

Perry 症候群はまれな疾患であるが、DCTN1 遺伝子変異の発見は、パーキンソン病における神経変性の選択性、特に黒質に強い障害をもたらす機序を解明するための

新たな材料を与えた。またこの疾患の脳病理において TDP-43 病理を認める点は他の TDP-43 プロテノパチーである FTL-D 或 ALS などの変性疾患と病態を共有する可能性を示唆しており、さらに DCTN1 変異でみられる家族性球脊髄萎縮症との比較検討を行うことで、神経細胞障害の選択性に新たな知見が得られると思われる今回の新たな家系の発掘と診断基準の作成は、今後さらに Perry 症候群の認知を高め、新たな患者の発掘に寄与すると共に今後の病態解明につながるものと考えられる。

E. 結論

Perry 症候群の新たな家系の発見と、臨床特徴、検査所見の検討とこれらに基づく基準草案の作成を行った。

G. 研究発表

1) Perry syndrome in Japan. ・Tsuboi Y, Yamada T, Oshima S, Watanabe H, Yoshida M, Neshige R, Kurisaki R, Kyoraku I, Araki E, Fujii N, Nanri Y, Oka T, Hara H, Tomiyama H, Hattori N. Perry (ペリー) 症候群の診断基準等作成のための奨励研究 International symposium on motor neuron disease and Perry syndrome in Tokyo.. pp.10-11

Perry（ペリー）症候群の診断および治療方法の更なる推進に関する研究

研究分担者： 佐藤栄人 順天堂大学医学部神経学 准教授

研究要旨

Dynactin 遺伝子(DCTN1)は ALS の原因遺伝子(G59S)として知られているが、パーキンソニズム、うつ、体重減少、低換気をきたす予後不良な遺伝性疾患である Perry 症候群の原因遺伝子(G71A, G71E, G71R, G71V, T72P, Q74P)としても同定された。両者の変異は異なるものであり遺伝学的解析から DCTN1 の変異によって異なる病態を示す可能性を示唆している。Dynactin は軸索輸送に関わる重要なタンパク質であるがその機能はいまだ不明な点が多い。そこで本研究は、DCTN1 の *in vivo* での機能を明らかにするために各変異体を過剰発現するショウジョウバエモデルを作製し DCTN1 が関与する病態機序を明らかにする。すでにショウジョウバエは誕生し一部解析を行った。

A. 研究目的

Perry 症候群はパーキンソニズム、うつ、体重減少、低換気をきたし、DCTN1 が原因遺伝子として報告された。これまでに DCTN1 の変異については ALS 患者から報告された G59S 変異が知られていた。NIH の Fischbeck らは dynactin (p150 glued) に G59S mutation を持つ ALS モデルマウスの表現型・病理を検討しており、G59S 変異の motor neuron (脳幹・脊髄) は細胞体の膨化・核融解・核の偏在化を呈し、ubiquitin 陽性顆粒を細胞質内に認める。さらに axon は膨化し、リン酸化されていない neurofilament が多数認められる。G59S 変異の cytoplasmic inclusion を持つ neuron を電顕で観察すると、autophagosome らしい 2 重膜構造が多数認められ、同時期に神経細胞の減少が認められる。今回 G59S 変異ならびに Perry 症候群で指摘されている DCTN1 の変異体を過剰に発現するショウジョウバ

エモデルを作製ならびに解析を行うことにより、ALS と Perry 症候群の病態の違いを明らかにする。

B. 研究方法

Gal4-UAS システムによる Perry 症候群ショウジョウバエモデルを作製する。Perry 症候群患者は神経変性疾患を呈することから、Gal4 の発現を調整するエンハンサーとして、末梢および中枢神経系の神経細胞特異的な発現を促す *elav*、複眼特異的な発現を促す *GMR*、およびドーパミン作動性ニューロン特異的な発現を促す *TH* をドライバー系統として用意する。エフェクター系統として UAS-DCTN1 システムを作製する。まず、Gal4 ターゲット配列となる UAS 配列下流にヒト DCTN1 遺伝子を組み込んだプラスミドを作製し、これを産卵 30 分以内の卵の極細胞に注入する。その後羽化した成虫からオスを選抜し balancer 系統のメスと交配し、F1 から赤眼のオスを選抜し再度 balancer

系統のメスと交配し系統化させる。本研究では DCTN1 WT、G59S、G71A、G71E、G71R、T72P、Q74PcDNA を導入した7種類の UAS-DCTN1 系統を作製し、組織特異的に DCTN1 を過剰発現させてその表現型を免疫組織科学的手法により観察する。

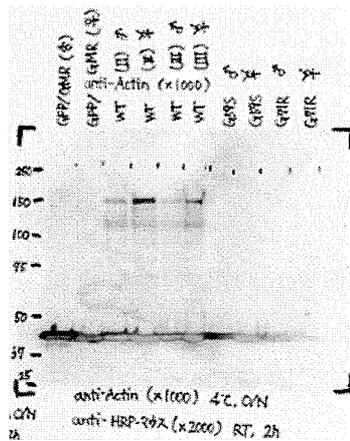
(倫理面への配慮)
特記すべきことなし。

C. 研究結果

インジェクションした卵から羽化した成虫からオスを選抜し、バランス系統のメスと交配している。系統の樹立後 DCTN1 の野生型、各変異体の発現量をウエスタンによって確認した。

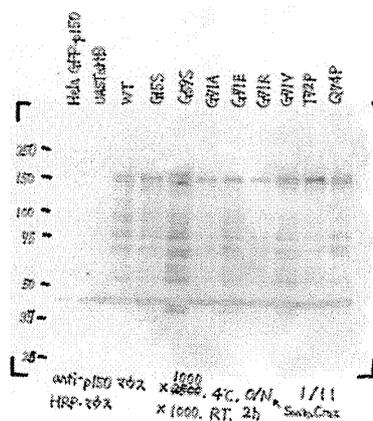
(Fig. 1)

成虫(UAST-DCTN1 WT/GMR-Gal4)での DCTN1 発現をウエスタンブロットによる確認



(Fig. 2)

インジェクションしたコンストラクトが細胞内で発現することを確認



同時にショウジョウバエ複眼神経を免疫染色により観察したが、明らかな変性は確認できなかった。

D. 考察

ショウジョウバエでの DCTN1 の発現を確認したところ WT のみ発現がみられた。変異体については DCTN1 が不安定化し分解が亢進した可能性が考えられるが更なる検討が必要である。

E. 結論

DCTN1 変異体を発現するショウジョウバエは樹立できていない。

F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表 (国際学会 0 件、国内学会 0 件)
なし。

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。

Perry（ペリー）症候群の診断および治療方法の 更なる推進に関する研究

研究分担者：富山弘幸

（順天堂大学脳神経内科/神経変性疾患病態治療探索講座 准教授）

研究要旨

Perry 症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたす予後不良の遺伝性疾患であり，2009 年に *DCTN1* が原因遺伝子として報告されたが，世界で 9 家系のみ報告と極めて稀な疾患である．本疾患の分布や頻度，臨床像は明らかにされておらず，L-Dopa 反応性の症例もあり，パーキンソン病との異同が問題となる．そこで本研究は，本症候群を臨床疫学的，分子遺伝学的に明らかにし，臨床診断基準を作成することを目的とした．研究代表者の施設にはパーキンソニズムを中心とした国内外からの約 3000 例の DNA バンクが確立できており，大規模解析により変異頻度を明らかにし，早晚疫学調査に繋げ得る点で意義があると考えられた．

これまでの研究で，日本人パーキンソニズム 973 例中 5 家系 24 人と，日本にも少なからず症例が存在することが判明した．新規変異も 2 つ同定した．今年度は，さらに未報告の新規変異をもつ九州地方の 1 家系の情報を得ることができたが，これまでの Perry 症候群の臨床像と若干異なる部分もあり，診断基準に反映していく予定である．家系は九州に集中しており，地域性，創始者効果が存在することが確認できた．今年度は，さらに未報告の新規変異をもつ九州地方の 1 家系の情報を得ることができたため，患者群の検査所見，臨床像の評価からの成果を加えて，近々論文を投稿予定である．世界の研究者と共に国際会議を開催，本邦のみならず国際的な臨床診断基準を作成できてきており，平成 23 年度日本神経学会学術大会など複数の学会で発表したが，今後も講演，学会誌上，インターネットなどを通じ広く公表していく予定である．

Perry 症候群は，うつや L-dopa の反応性のパーキンソニズムで発症し，数年から 5 年前後のうちにも急激に低換気となり突然死に至る臨床経過から，その診断，治療法の確立のための研究の意義は極めて高い．これまで同定された Perry 症候群の数十症例の検討から，30-50 歳くらいの比較的若年発症で，パーキンソン病と同様の症状を呈しながら，短い経過の中で認知症も合併しにくい中，突然呼吸障害から突然死に至ることがわかったので，臨床診断基準に基づき早期診断をし，ALS と同様，病名告知をして人工呼吸管理をするか否か選択していく必要性も考慮されるべきであると考えられた．

Perry 症候群は低換気を呈するとともに TDP-43 の蓄積を示し，その凝集蓄積機構からも新しい TDP-43 プロテノパチーであるという概念が示唆されてきている．*DCTN1* 変異はパーキンソン病と似た Perry 症候群とともに，TDP-43 プロテノパチーとしての筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こすことも報告されているため，その機能解析から封入体形成機構，神経変性機序を明らかに出来る可能性がある．今年度の進捗としてモデル動物の作製もできてきており，病態解明にその成果が期待される．このように本研究は，特殊と考えられている疾患の研究から広く主要な神経変性疾患の根本的病態解明に繋げることを究極の目標とする極めて独創的で意義深いものとなってきている．また医療費，制度等に関し，厚生労働行政の課題の解決の一助になる可能性を広げてきている．

尚，本解析は順天堂大学倫理委員会の承認に基づき行った．

A. 研究目的

Perry症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたす予後不良の稀な遺伝性疾患とされる。2009年坪井らのグループにより *DCTN1* が原因遺伝子として報告された (Farrer et al. Nat Genet) が，本邦2家系を含む世界で9家系のみで報告され，分布や頻度，臨床像は明らかでない。L-Dopa反応性の症例もあり，パーキンソン病 (PD) との異同が問題である。*DCTN1* は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子であることも報告されていた。

このような背景の中，その診断基準を作成し，世界及び本邦での疾患の分布，頻度およびその実態を明らかにすることを本研究の主目的とした。

最長寿国である日本においては，高齢化社会のなか医療費公費負担も年々増加していくものと予想される。また介護保険制度改革の中，介護の人材不足とともに介護保険もますます負担が増えるものと予想され，さらにALSにおいては医療費公費負担とともに，24時間体制で介護が必要なことも多く，人工呼吸器管理患者の療養先，高額医療がますます問題となると予想される。

そのため本研究は難病の医療費公費負担，介護保険制度，療養型病床の利用など医療と介護の制度につき，より広く発展した形で社会的成果をもたらす，厚生労働行政の課題の解決の一助になる可能性を秘めている。このように本研究は，医学の向上から，間接的には行政及び国民の保健・医療・福祉の向上等社会へ貢献することを究極の目的とした。

B. 研究方法

研究目的の達成のため，昨年度までのDNAバンク症例中，日本の973例に対し，*DCTN1* の変異解析を行った。正常対照の解析も行い，解析可能な家系では家系内での変異の共分離も確認し，病的変異としての意義を確認した。変異陽性家系については同意を得た上で実地診療に赴き，変異陽性患者を実際に診察の上，検査所見を検討，解析した。G71A変異についてはジェノタイプングを行い推定ハプロタイプから創始者効果の有無を検証した。

その情報に基づき，国際臨床診断基準 (案) を世界のPerry症候群患者の担当医，世界のPerry症候群患者の研究者とともに作成した。

また，機能解析は細胞をもちいた実験でdynactinの凝集の確認，dynactin凝集体の局在の確認，免疫組織化学・生化学的検討を行った。野生型・変異型dynactinを *Drosophila* に打ち込み，各lineの樹立を行った。

業務は研究分担者が分担し遂行した。

(倫理面への配慮)

本研究では個人の遺伝情報を取り扱うので，DNA，RNA検体採取にあたっては研究対象者，研究協力者の不利益・危険性が排除されるよう十分な説明と同意を得た。各試料はランダムイズし，研究者は個人の特長ができないように配慮するとともに，得られた個人情報については人権擁護のため法令等を遵守のうえ厳重に管理し，漏洩等のないように十分注意して研究を遂行した。遺伝子解析については順天堂大学倫理委員会の承認に基づいた。

本研究ではモデル動物として，ハエの作製を行ったが，動物実験計画をとともに動物愛護上の配慮に基づき研究を進めた。動物の取り扱いについては学内倫理委員会の承認を得て，SPF内でP2レベルの安全管理のもとに実験を行い，実験が終了した動物は速やかに焼却処分し拡散の防止に努めた。

C. 研究結果

*DCTN1*のさんが直接シーケンス解析結果により日本に少なくとも5家系24人の患者が存在することが明らかとなり，地域特異性，創始者効果の有無，有病率，分布など疫学調査を進めることができています。新規変異も2家系で同定できた。5家系とも九州に存在したが，G71A変異についてはジェノタイプング，推定ハプロタイプの解析により共通祖先からの創始者効果であることが推定された。実地診療に基づく臨床dataの蓄積もできてきた。

これらの結果が得られたことにより，臨床像の評価に基づき，臨床診断基準の作成・再検討を行った。

また，今年度は，さらに未報告の新規変異をもつ九州地方の1家系の情報を得ることができたが，これまでのPerry症候群の臨床像と若干異なる部分もあり，診断基準に反映していく予定である。

国際臨床診断基準としては，

4主要徴候：

- A). L-dopa反応性のparkinsonism (対称性の固縮，無動など)
- B). うつ，Apathy
- C). 中枢性低換気
- D). 体重減少

に加え，

支持項目：

- a). 家族歴 (パーキンソニズム，うつ，突然死)
- b). 急激な進行
- c). 50歳以前の若年発症
- d). 夜間呼吸困難/無呼吸
- e). 日中の過度な眠気
- f). 自殺年慮，企図
- g). 自律神経障害
- h). ポリソムノグラフィ:中枢性無呼吸/低換気，stage 3/4 とREM睡眠の減少

を加え，

確実： A) の他に2つの主要症状，および2つ以上の支持項目に加え，遺伝子診断もしくは病理診断がされていること

疑い： A) の他に2つの主要症状，および2つ以上の支持項目

可能性あり： A) の他に1つの主要症状，および3つ以上の支持項目を満たすこととしている。

ただし，Perry症候群の症例数はまだまだ少ないと言え，今後は，日本人のみならず人種を超えた多数例での臨床症状，MRI，SPECT，MIBG心筋シンチ，電気生理学的所見，認知機能やうつ病スケールなどの検査所見，経過などに基づき，診断基準の改定を繰り返し，よりよいものにupdateしていく必要がある。

細胞レベルにおける変異型dynactinの機能解析も順調に進んでおり、Wszolekらの報告(Nat Gene t 2009;41:163)のようにPerry症候群の病因変異を持つdynactinの強制発現により、核周囲に2-5 μ m程度の均一なdynactin凝集物を形成することを確認した。さらに6病因変異全てに同様の評価を行い、変異毎に凝集物形成比率・細胞死誘導比率が大きく異なることを新たに確認しており、論文発表を準備中である。

トランスジェニック(Tg)ドロゾフィラの検討については、野生型・変異型dynactinをDrosophilaに打ち込み、各lineの樹立、モデルの作成を完了した。同モデルの行動学的解析(主にclimbing testなどの運動機能)および形態的異常・病理学的異常の詳細な検討は残念ながら1年の研究期間内には完結不能であった。

D. 考察

これまでの日本人973例の解析で、本邦に少なくとも5家系24人の患者の存在が確認され、地域特異性、創始者効果の存在、有病率、分布など疫学調査を進めることができてきていることは、これまで世界で他に7家系だったことを考えると大きな進歩である。G71A変異については、これまでハワイの日系人からも同定されているが、おそらく同じ創始者効果である可能性が考えられる。新規変異も2家系で同定できていることは、変異例ごとの臨床像の違いを検討しつつ、機能解析へ応用することにおいても重要な意義をもたらしている。得られたdataをもとに日本人での臨床症状、MRI、SPECT、MIBG心筋シンチグラフィ、電気生理学的所見、認知機能やうつ病スケールなどの検査所見、経過など臨床像の評価も進んできており、その知見に基づき、臨床診断基準を作成することができてきている。2010年、坪井らは起立性低血圧、自律神経機能異常を呈し、MIBG心筋シンチの取り込み低下をきたす症例が存在したことをParkinsonism Relat Disord誌に初めて報告したが、この知見によりPerry症候群とPDとの類似点がさらに示された。このように当初の計画通りに順調に研究は進み、実績が残せてきている一方、PDとの異同、鑑別がますます重要になり、今後の研究の重要性が増してきている。これまでMIBG心筋シンチでの心筋への取り込み低下の結果は、synucleinopathyのスペクトラムとしてLewy小体、 α -synucleinの蓄積の広がりやを反映しているとも考えられてきたため、本年度以降、病理像も得られるようであれば、臨床病理学的診断基準も付帯することも重要事項と考えられる。研究代表者のグループの施設では海外からの症例も豊富であるため、日本人以外の症例の解析を進め、全世界的規模でPerry症候群の実態を明らかにしていく予定である。同時に、その臨床的特徴や診断基準に沿って全国の医療機関にどれだけ患者が存在しているのか関連施設の実地調査が可能になることが望ましい。

当初の研究計画にはなかったことだが、平成23年度2月22-23日東京において開催された国際シンポジウムInternational Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome in Tokyoでの診断基準作成のための国際会議を通じて、本邦を含めた国際的な診断基準を作成し、論文、日本神経学会、ホームページなどを通じて広く発表していく計画を組むことができてきた。この国際会議で

は、一緒にNature Genet誌にPerry症候群の最初の変異家系群を発表したMayo Clinicのグループをはじめとした世界の最先端の研究者や臨床家が来日し、ALS/Motor Neuron DiseaseとPerry症候群に共通な分子メカニズムであるTDP-43プロテノパチーの最先端の研究者とともに、遺伝子、分子レベルの発症機序の解明から、本邦発のiPSを用いた治療の開発戦略にまで焦点をあてて議論し、本研究の成果を確認するとともに、今後の方向性を協議することができた。このことは研究計画以上に本研究が進んでいることを示している。今後も世界最先端の連携体制の中で情報交換を続けながら、Perry症候群、ALS/Motor Neuron DiseaseそしてPD、パーキンソン症候群といった神経変性疾患に対しての広い視点で研究を進めていく体制をさらに確立することは大変重要なことと考えられた。

Perry症候群は、うつやL-dopaの反応性のパーキンソンニズムで発症し、数年から5年前後のうちにも急激に低換気となり突然死に至る臨床経過から、その診断、治療法の確立のための研究の意義は極めて高い。これまで同定されたPerry症候群の数十症例の検討から、30-50歳くらいの比較的若年発症で、PDと同様の症状を呈しながら、短い経過の中で認知症も合併しにくい中、突然呼吸障害から突然死に至ることがわかったので、早期診断し、ALSと同様、病名告知をして人工呼吸管理をするか否か選択していく必要性も考慮されるべきであると考えられた。

Perry症候群は低換気を呈するとともにTDP-43の蓄積を示し、その凝集蓄積機構からも新しいTDP-43プロテノパチーであるという概念が示唆されてきている。DCTN1変異はPDと似たPerry症候群とともに、TDP-43プロテノパチーとしての筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こすことも報告されている。従ってその機能解析は封入体形成機構、神経変性機序を明らかに出来る可能性を秘めている。

機能解析において、これまでの培養細胞の実験では、Perry症候群の変異をもつp150蛋白はtubulinとの親和性がより低下することが判明しており、これら変異をもつ動物モデルの作製は病態の解明に必須である。これらの作製は容易であり、また中枢神経に病変を持つモデル動物が生まれる可能性も高いと思われ、今後の研究の成果が期待される。野生型・変異型dynactinをDrosophilaに打ち込み、すでに各lineの樹立を完了したことは、本研究において同モデルの行動学的解析(主にclimbing testなどの運動機能)および形態的異常・病理学的異常の詳細な検討を早晩可能にできてきている。このことは、モデル動物を用いたdynactinの機能解析として極めて重要な結果をもたらすものと考えられ、各種運動機能評価や免疫組織化学による凝集体の形成やドパミン細胞死の有無の検討、さらにはp150と相互作用する蛋白質の網羅的な解析等を行うこととしている。PDにしてもよいモデルマウスが存在しない現在、Perry症候群の変異を持つTgマウス・ドロゾフィラは本疾患に限らず広く神経変性疾患の凝集体形成やドパミン神経細胞死の病態解析に有益となると予測される。同モデルの行動学的解析(主にclimbing testなどの運動機能)および形態的異常・病理学的異常の詳細な検討を継続していくことが必要であり、その結果が期待される。

E. 結論

以上のようにDCTN1変異はパーキンソン病との異同が問題になる臨床症候を呈するとともに、TD P-43プロテインパチーとしての筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こすことも知られ、その機能解析は封入体形成機構を明らかに出来る可能性を秘めており、本研究は、特殊と考えられている疾患の研究から広く主要な神経変性疾患の根本的病態解明に繋げることを究極の目標とする極めて独創的で意義深いものである。今年度に本研究から得られた多くのdataに基づき、今年度以降も、遺伝子解析による診断のみならず蛋白機能解析、免疫組織学的解析も並行し、分子遺伝学の知見、病理学的知見も反映したより集学的に完成された形での診断基準作成を目指すとともに、難治性疾患、神経変性疾患の病態解明、克服にむけて研究をさらに進めていきたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

研究分担者 富山弘幸

1. Tomiyama H, Yoshino H, Hattori N. Analysis of *PLA2G6* in patients with frontotemporal type of dementia. *Parkinsonism Related Disord* 2011;56:102-3.
2. 船山学, 富山弘幸. パーキンソン病の基礎研究最前線：実地医家のための minimum requirement. *Modern Physician 新興医学出版社*. 2012;32(2):201-5.
3. 富山弘幸. Perry 症候群と *DCTN1* 遺伝子変異. *Medical Science Digest (MSD) ニューサイエンス社*. 2012;38(4):2-4(138-140).

2. 学会発表

研究分担者 富山弘幸

- 1) 富山弘幸, 李林, 中尾絃一, 京楽格, 栗崎玲一, 李元哲, 船山学, 吉野浩代, 音成龍司, 坪井義夫, 服部信孝. 日本人パーキンソニズムにおける *DCTN1* 変異解析—Perry 症候群について. (2011.5月, 第52回日本神経学会学術大会. 名古屋)
- 2) 富山弘幸, 李林, 中尾絃一, 京楽格, 栗崎玲一, 李元哲, 船山学, 吉野浩代, 音成龍司, 坪井義夫, 服部信孝. パーキンソニズムにおける *DCTN1* 解析—Perry 症候群とパーキンソン病の異同について. (2011.10月, 第5回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS. 東京)
- 3) H. Tomiyama, H. Yoshino, K. Ogaki, L. Li, C. Yamashita, Y. Li, M. Funayama, R. Sasaki, Y. Kokubo, S. Kuzuhara, and N. Hattori. *PLA2G6* in patients with Parkinson's disease / frontotemporal type of dementia. (2011.10.14. The 12th International Congress of Human Genetics, ICHG and the American Society of Human Genetics, ASHG 61st Annual Meeting. Montreal, Canada)
- 4) 富山弘幸, 李林, 中尾絃一, 京楽格, 栗崎玲一,

李元哲, 船山学, 吉野浩代, 音成龍司, 坪井義夫, 服部信孝. 日本人パーキンソニズム症例における *DCTN1* 解析. (2011.11月, 日本人類遺伝学会総会. 東京)

5) 富山弘幸, 李林, 中尾絃一, 京楽格, 栗崎玲一, 李元哲, 船山学, 吉野浩代, 音成龍司, 坪井義夫, 服部信孝. Perry 症候群の診断基準案作成と疫学調査について. (2011.12月, 平成23年度 神経変性疾患に関する調査研究班. 東京)

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：特になし

Perry（ペリー）症候群の診断および治療方法の更なる推進に関する研究

研究分担者： 齊木臣二 順天堂大学医学部神経学 准教授

研究要旨

Perry 症候群は常染色体優性遺伝を呈する神経変性疾患で、原因遺伝子は dynactin であり、運動ニューロン障害・パーキンソニズムなどを呈する複合システムの障害を呈するが、希少疾患であり病態解明・治療法開発に繋がり得る知見は殆どないのが現状であった。

本分担研究では運動神経細胞死・黒質神経細胞死の共通メカニズムを解明すべく、病因変異を持った dynactin の強制発現による細胞死への影響を検討した。変異型 dynactin 細胞質内凝集物を形成した細胞では細胞死が有意に高頻度で惹起されており、cleaved caspase3 陽性、核濃縮・核断片化が進行しており、アポトーシスが誘導されていると考えられた。同アポトーシスは caspase 阻害薬にて抑制された。以上の結果より細胞質内凝集物が、細胞死に対して重要な役割を果たすことが示唆され、誘導される細胞死はアポトーシスであることから、アポトーシス阻害（caspase-9、caspase-3 のノックダウン、抗アポトーシス剤の添加）などが有力な細胞死抑制手段として候補に挙がると考えられた。

A. 研究目的

神経難病である Perry 症候群における原因遺伝子 dynactin の遺伝子変異によって惹起される細胞死を評価し、新規治療法に繋がる知見を得ること。

B. 研究方法

本研究では主に培養細胞（HeLa 細胞）を用いた。以下にそれぞれの実験の詳細を述べる。

1. プラスミド DNA

Dynactin 野生型に FLAG および EGFP をタグしたプラスミド DNA を作製し、Mutagenesis® (Stratagene 社製)を用いて、病因変異を挿入した変異型 dynactin (G59S、G71A、G71E、G71V、T72P、Q74P) を作製した。

2. 細胞死検討

HeLa 細胞に、Lipofectamine 2000® (Invitrogen 社製)を用いて、dynactin 野生型・変異型を夫々強制発現し、24 時間後、48 時間後、72 時間後に各種抗体を用いて免疫細胞染色を行い、24 時間後に最も dynactin の発現が高いことを確認し、同条件下にて、cleaved caspase3-Alexa488 抗体にて免疫細胞染色を行った。さらに Trypan blue exclusion test、Nuclear morphological change による細胞死評価を、夫々 Saiki ら(Saiki et al.), Webb ら(Webb et al., 2003)と同様な手法により評価した。

Saiki, S. et al. Autophagy 7, 176-187.

Webb, J.L. et al. J Biol Chem 278, 25009-25013.

3. オートファジー活性の評価

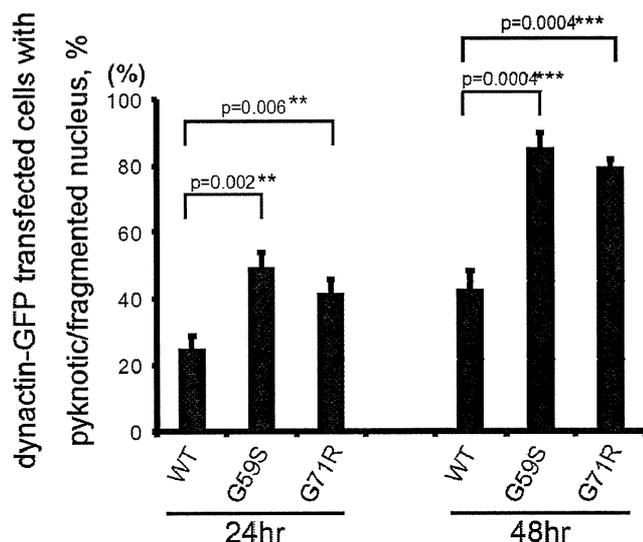
HeLa 細胞に Lipofectamine 2000® (Invitrogen 社製) を用いて、dynactin 野生型・変異型を夫々強制発現し、24 時間後に細胞を回収し、LC3 および actin の発現量をウェスタンブロッティングによって定量した。

(倫理面への配慮)

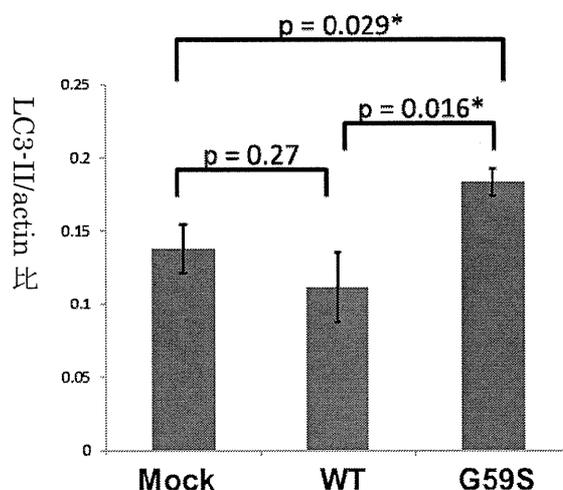
特記すべきことなし。

C. 研究結果

結果 1 : GFP-dynactin 陽性細胞全体の中で、細胞死を評価したところ、変異型細胞過剰発現では、細胞死の有意な増加を認めた (下図)。また同核変化を呈する細胞は、cleaved-caspase3 でも陽性を呈したため、アポトーシスが誘導されていると考えられた。同細胞死はまた、caspase 阻害薬 zVAD にて顕著に抑制された。



結果 2 : G59S 変異導入 dynactin の強制発現により、下図のようにコントロールに比し、LC3/actin 比が有意に上昇しており、オートファジー活性が増加またはブロックされている可能性が考えられた。さらに p62 の発現レベルを評価したところ、変異型 dynactin 導入細胞では、顕著に増加していることが確認されたため、オートファジーはブロックされていることが確認できた。



D. 考察

変異型 dynactin の過剰発現は細胞質内凝集物を形成し、さらにアポトーシスを誘導した。オートファジーはブロックされており、cleaved caspase-3 が活性化されていることから、オートファジーを上流とするアポトーシスが強く関与すると考えられた。また、同細胞死が、caspase 阻害薬 zVAD にて強く抑制されることも確認済みである。

E. 結論

野生型 dynactin は alpha-tubulin と共局在し、微小管輸送に関与するが、変異型 dynactin の強制発現は dynactin 凝集物を細胞質内に形成させ、アポトーシスを誘導する。

F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表 (国際学会 2 件、国内学会 1 件)
 1. [Shinji Saiki](#), Yukiko Sasazawa, Jacobus P. Petzer, Emi Kawauchi, Daisuke Yamada, Takahiro Fujimaki,

Hiroki Kobayashi, Kei-Ichi Ishikawa, Miwako Kawamura, Yoko Imamichi, Masaya Imoto, Nobutaka Hattori. "EFFECTS OF CAFFEINE AND CAFFEINE ANALOGUES ON AUTOPHAGY IN CULTURED CELLS" Autophagy in health and disease. 30 October - 4 November, 2011, In Ma'ale Hachamisha, Israel

2. Kei-Ichi Ishikawa, Shinji Saiki, Yoko Imamichi, Shigeto Sato, Yuanzhe Li, Sumihiro Kawajiri, Nobutaka Hattori. EFFECTS OF DYNACTIN WITH A PATHOGENIC MUTATION FOR PERRY SYNDROME ON AUTOPHAGY. Autophagy in health and disease. 30 October - 4 November, 2011, In Ma'ale Hachamisha, Israel

3. 「Perry 症候群の原因遺伝子産物ダイナクチンの機能解析」

石川景一、河尻澄宏、斉木臣二、佐藤栄人、李元哲、今道洋子、Matthew J.Farrer、服部信孝

第 52 回日本神経学会（名古屋） 平成 23 年 5 月
18-20 日

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。

Perry（ペリー）症候群の診断および治療方法の更なる推進に関する研究

研究分担者： 波田野 琢 順天堂大学医学部神経学 准教授

研究要旨

Perry 症候群は dynactin 変異により発症する常染色体優性遺伝を呈する神経変性疾患であり、運動ニューロン障害・パーキンソニズムなどを呈する複合システムの障害を呈する。そのため、本疾患の病態をあきらかにすることは、神経変性疾患全般の発症メカニズムを解明する一助になる。

本分担研究では運動神経細胞死・黒質神経細胞死の共通メカニズムを解明すべく、病因変異を持った dynactin の局在を検討した。正常型 dynactin は α -tubulin と共局在しているが、G59S, G71R 変異型 dynactin は細胞質内に凝集物を形成し、神経変性疾患における凝集体形成に関わることが示唆された。また、神経細胞内において dynactin の機能は retrograde の軸索輸送に関わるとされている。そのためパーキンソン病における Lewy 小体の形成において、retrograde trafficking により輸送される retromer が関わる可能性を考えた。しかしながら、Lewy 小体に retromer の marker である SNX-2 および mannose 6-phosphate receptor (M6PR) は局在しておらず、さらなる検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

神経難病である Perry 症候群における原因遺伝子である dynactin の局在変化を検討し、凝集体形成メカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

本研究では主に培養細胞（HeLa 細胞）を用いた。以下にそれぞれの実験の詳細を述べる。

1. プラスミド DNA

Dynactin 野生型に EGFP をタグしたプラスミド DNA を作製し、病因変異を挿入した変異型 dynactin (G59S, G71R) を作製した。

2. 局在検討

HeLa 細胞に、Lipofectamine 2000®を用いて、dynactin 野生型・変異型を夫々強制発現し、24 時間後、48 時間後、72 時間後に各種抗体を用いて免疫細胞染色を行い、24 時間後に最も dynactin の発現が高いことを確認し、 α -tubulin 抗体および GFP 抗体で染色し、共焦点顕微鏡を用いて細胞内局在を検討した。

3. Lewy 小体における retromer 局在検討。

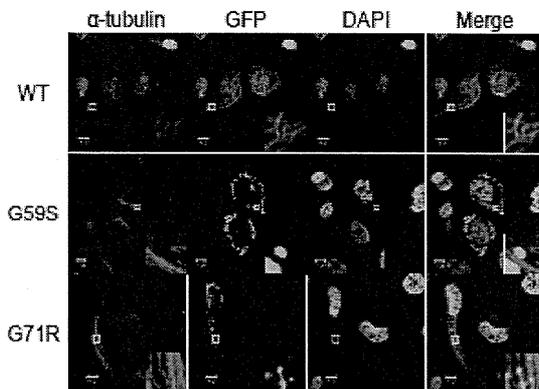
臨床的および病理学的にパーキンソン病の診断がついた 3 症例の皮質および脳幹の組織切片を用いた。抗体は Ser129 リン酸化 α -synuclein 抗体, M6PR 抗体, SNX-2 抗体を用い DAB 法で皮質型 Lewy 小体および脳幹型 Lewy 小体を染色し構成成分として局在するか検討した。

(倫理面への配慮)

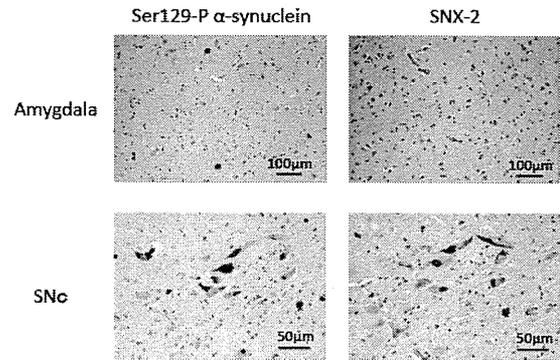
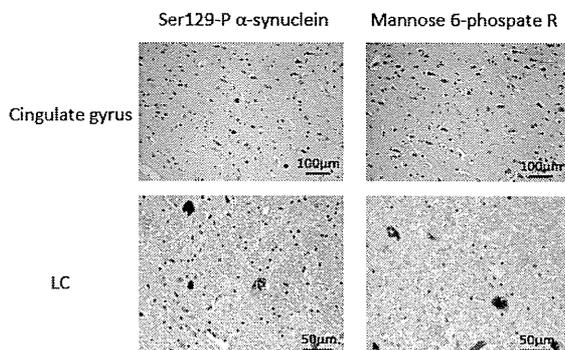
剖検脳を用いて検討する事に関しては遺族に同意を得ており、順天堂大学倫理委員会の承認を受けて実施しており、倫理面に関する問題は無い。

C. 研究結果

結果1：正常型 GFP-dynactin は α -tubulin と merge しており、従来報告されているように軸索輸送に関わる機能が推定された。一方で G59S および G71R 変異型 dynactin は凝集体を形成する傾向にあった。



結果2：Retromer のマーカーである SNX2 および M6PR は皮質型 Lewy 小体および脳幹型 Lewy 小体のいずれにも局在しなかった。



D. 考察

G59S, G71R 変異型 dynactin の過剰発現は細胞質内凝集体を形成する。つまり dynactin の異常により retrograde の膜輸送が障害されることが示唆され、Lewy 小体をはじめとした神経変性疾患における凝集体形成に関係することが示唆された。しかし、SNX-2 および M6PR が Lewy 小体に含まれることはなく、retromer が Lewy 小体に含有される可能性は低いと考えられた。

E. 結論

病的変異型 dynactin は retrograde の膜輸送が障害されて細胞内凝集体を形成する可能性がある。しかし、パーキンソン病における Lewy 小体の構成成分について retromer は含まれていなかった。今後、dynactin の病的変異による retrograde の膜輸送障害と凝集体形成のメカニズムを明らかにすることで Lewy 小体をはじめとした神経変性疾患の凝集体形成メカニズムが明らかに出来る可能性がありさらなる検討を進める。

F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要なし。