

を ADPD と孤発性 PD 多数例で検索した結果、p. D620N 変異が ADPD で 1.0 %、孤発性 PD で 0.23 %に認められた。その臨床像は振戦優位、L-DOPA 反応性の典型的なパーキンソニズムであり、特発性 PD の中に紛れている可能性が有る。

## 2) $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -syn)

(1)  $\alpha$ -syn 凝集:SNARE 複合体は神経伝達物質の開口放出に必要な構造で、SNAP25、syntaxin-1、VAMP-2 などの蛋白質から成る。線条体での  $\alpha$ -syn の蓄積に伴い SNARE 複合体の局在が変化し、ドパミン放出が低下することが報告されている。リン酸化されない *Snap25*<sup>S187A/S187A</sup> 変異マウスの線条体で、SNARE 複合体の機能異常が  $\alpha$ -syn の存在様式に及ぼす影響を検索した結果、老齢マウスでシナプスでの局在が変化しており、 $\alpha$ -syn が蓄積していた。 $\alpha$ -syn の蓄積には SNARE 複合体の機能異常など、シナプスでの変化が関与している可能性が示された。

(2) autophagy による  $\alpha$ -syn 封入体の処理:HEK293 細胞に線維化した  $\alpha$ -syn を導入すると  $\alpha$ -syn 封入体が形成される。この封入体は、p62 の介在のもと autophagy 処理される可能性が示され、autophagy の活性化は PD 治療のターゲットになると考えられた。

## 3) ミトコンドリア

(1) 上の 1) - (2) の研究に於いて  $\alpha$ -syn 封入体が存在しても、障害されたミトコンドリアの処理 (ミトファジー) は阻害されないことが分かった。

(2) パーキンと ChPF ファミリー:ミトファジーはパーキンがミトコンドリアに移動することで促進され、Klokin 1 はパーキンをミトコンドリアに誘導する。一方、Klokin 1 は chondroitin polymerizing factor (ChPF) のスプライシング変異体であることから、パーキンと ChPF との機能連関を培養細胞を用いて検討した結果、Klokin 1/ChPF ファミリーはミトコンドリア内で抗アポトーシス作用を発揮し、cell viability を高めることが示唆された。

## 4) Park 8

(1) drosophila モデル:LRRK2 は転写因子 Fox0 をリン酸化することでドパミン神経を変性させる。今回、Fox0 の非リン酸化変異体 Tg drosophila を用いて検索した結果、nitric oxide (NO)→cGMP-dependent kinase (cGK)系が、LRRK2 とは独立に Fox0 の同じアミノ酸をリン酸化することを見出し、この系も中枢ドパミン神経の生存に影響する可能性が示された。

(2) Park 8 患者脳脊髄液中 (CSF) のビオプテリン (BP) 量:Park 8 患者の CSF では、孤発性 PD と同じく BP 量が低下しており、相模原家系での結果をも勘案すると、CSF 中の BP 量はドパミンニューロン変性を示す良質のマーカーとなる可能性が考えられた。

## 5) バイオマーカー

(1) PD:PD の CSF の LC-MS/MS の結果、neuregulin-1 (NRG1) SMDF がバイオマーカー候補となる可能性が高いと考えられ、その血中の濃度を調べた。PD の重症度とは関連しなか

ったものの、PD では対照群、疾患コントロール群に比して有意に低値を示し、診断マーカーとして有用な可能性が示された。

- (2) レビー小体型認知症 (DLB) : SELDI-TOF-MS にて対照例と DLB 少数例の血液蛋白質の網羅的解析を行い、4つの候補蛋白を同定した。ついで対照 46名、Alzheimer 病 52名、PD 78名、DLB 22名の保存血清を ELISA kit にて測定した結果、thymosin  $\beta$ 4 と retinol binding protein 4 が DLB 診断バイオマーカーになる可能性が示された。

## 2. 臨床

- 1) 姿勢異常: PD 患者の首下がり、腰曲がりの定量的解析を行い、一般住民と比較した結果、首下がりと腰曲がりはいずれも PD 患者の方が有意に強いことが示された。
- 2) PSP と CBD の臨床像: 剖検された PSP14 例と CBD6 例の臨床像を後方視的に解析した結果、垂直性核上性注視麻痺、体軸性固縮、姿勢反射異常、前頭葉徴候、錐体路徴候、開口、まっすぐな姿勢が両者に共通して感度の高い所見であった。特異度の高いのは、PSP では振戦発症、小脳性運動失調、軟口蓋ミオクローヌス、顔に触る、嗄声であり、CBD では、性格変化・異常行動・運転障害での発症、異常言動、突進歩行であった。両者の鑑別に役立つ可能性が有る。通念と異なり、左右差は感度・特異度ともに高くなかった。

## 3) 自律神経障害

- (1) 胃電図: 未治療 PD 患者 38 例と健常対照 7 例で胃電図を実施し、原波形、主要周波数 (DF)、主要周波数変動係数 (ICDF) を算出した。PD では発症早期から ICDF が有意に高値で、胃電図の感度は MIBG 心筋シンチと同等であった。MIBG 心筋シンチが正常でも胃電図の異常例が有り、両者の組み合わせで診断感度が上がるものと思われた。
- (2) 皮膚交感神経活動: PD 患者 14 例で皮膚交感神経活動 (SSNA)、交感神経皮膚反応 (SSR)、皮膚血流現象反応 (SVR) を調べ、発汗異常との関連を見た。発汗異常群では SSNA、SSR、SVR および暗算負荷たいする SSNA と SSR が有意に低下しており、中枢性・末梢性両者の自律神経障害の関与が考えられた。

## 4) 治療、副作用

- (1) STN-DBS の構音に対する副作用: DBS 後の PD 患者 72 例の発語状態を検索した結果、運動低下性群、失調群、生体・呼吸障害群、吃音・反復性発話異常群、痙性群の 5 群に分類可能で、頻度は順に 35%、26%、17%、14%、8%であった。各群の病態は異なっていることが考えられ、各々に応じた治療の重要性が示された。
- (2) 遅延聴覚フィードバック (DAF) 法: 吃音治療に用いる DAF 法を、運動低下性構音障害群と失調性構音障害を呈する神経変性疾患患者に適用した結果、声量の増加、発話速度の緩徐化、発話明瞭度の改善をもたらし、本法は構音障害の治療に有用であると考えられた。
- (3) 尿酸とドパミン神経保護: 体内最大の抗酸化物質である尿酸の前駆体イノシンの神経保護作用をマウスで検討した。MPTP (15mg/ or 60mg/個体) 投与前にイノシンを投与す

ると、MPTP 低用量投与群の線条体において dopamine 含有量が保持されることが分かり、イノシンの適量投与はドパミン神経細胞を保護する可能性が示された。

- (4) L-DOPA、アゴニストの血中動態：消化管運動を抑制する抗コリン薬服用の PD 患者では L-DOPA の動態が延長していた。また、ドパミンアゴニストでは 3 回/日投与で血中濃度はほぼ一定に保たれていた。L-DOPA、アゴニスト両者とも個体間差が大きく、PD 患者毎に投与量、投与法の調整が必要であることが示された。
- (5) PD 遺伝子治療の長期経過：AADC 遺伝子搭載 AAV ベクターを両側線条体に投与された PD 6 例の長期予後と導入遺伝子の長期発現を調査し、3 年 5 ヶ月後に剖検となった 1 症例の脳も検索した。3-5 年後でも運動症状はほぼ全例で改善しており、2 例では 5 年後の FMT-PET で遺伝子発現が確認され、剖検例では被殻のベクター注入部に AADC 抗体陽性の細胞が多数認められ、本治療法の有用性が示唆された。
- 5) 予後:Lewy 小体病 (PD 115 例、PDD 109 例、DLB 35 例) の機能予後と生命予後を検討した。Lewy 小体病全体の 50% 生存期間は 20.5 年で女性の方が有意に長かった。また、病型別では DLB の 50% 生存期間は 8.5 年で、他の 2 型より有意に短かった。男性、高齢発症、認知症有りが生命予後と機能予後との悪化因子であった。

## 6) 神経病理

- (1) 外科材料での Lewy 小体病 (LBD) 診断:臨床的 LBD で過去に消化器系外科手術を受けた 8 例の切除消化管パラフィン包埋切片を各種抗体で免疫染色したところ、75% で  $\alpha$ -シヌクレイン抗体陽性所見が観察され、本手法は LBD 臨床診断の補助となり得ると考えられた。
- (2) PSP-PNLA (pallido-nigral-luysian atrophy) : PSP の稀な一型と考えられている  
PSP-PNLA の 3 剖検例の脳病理、生化学的検索を行った結果、前頭葉、脳幹被蓋および淡蒼球の高度萎縮と黒質の高度脱色素、黒質・淡蒼球・視床下核の高度の細胞脱落、変性部位への  $\tau$  陽性 NFT と coiled body 出現が共通に認められた。Western blotting では PSP のバンドパターンが観察されたが、tuft-shaped astrocyte は非典型的であり、独自の 4-repeat tauopathy である可能性が有る。
- (3) CBD の側頭葉病変 : CBD 35 剖検例で側頭葉病変を検索したところ、嗜銀性顆粒が全例で認められ、その分布は嗜銀性顆粒病よりも広範であった。CBD では海馬歯状回にも嗜銀性顆粒が認められ、嗜銀性顆粒病との鑑別に役立つと考えられた。

## 【II】運動ニューロン疾患

今年度は、全く異なる考え方と手法による 2 つの ALS 治療研究が注目される。一つは、変異 *SOD1* を発現する培養系を確立し、その転写を抑制する低分子化合物・既存薬を探る研究である。9,600 種類の低分子化合物の中からヒット化合物を見出し、その一つと類似構造を有する既存薬を変異 *SOD1* Tg マウスに投与したところ、脊髄内 *SOD1* 量が低下し、

生存期間が有意に延長したとの研究である。この方法の応用範囲は広いと思われる。もう一つは、詳細な臨床観察と電気生理学的解析から、持続性 Na 電流の増加に伴う運動ニューロンの軸索興奮性の増大が運動ニューロン変性をもたらすとの知見を得、それに基づいて企画されて現在進行中の塩酸メキシレチン（持続性 Na チャネルを抑制）を用いての医師主導治験である。地道な臨床観察が治験に結びつく好例であると思われる。

## 1. 基礎

- 1) ALSにおけるU small nuclear RNAs (U snRNAs) : mRNA の splicing に重要な RNA の一群である U snRNAs は、TDP-43 発現低下培養細胞及び ALS 神経組織に於いて減少していることが見出された。U snRNAs の成熟には SMN とそれを含む GEM 小体が必要である。TDP-43 発現低下培養細胞及び ALS 神経組織では、GEM 小体数の減少が見出された。これは U snRNAs が減少して splicing 異常が生じる可能性を示している。
- 2) ALS 脳脊髄液 miRNA プロファイリング : miRNA は遺伝子発現に重要な役割を果たしており、種々の疾患で発現パターンが変化する。ALS 脳脊髄液で miRNA array 解析を行った結果、ALS の診断に有望な miRNA が同定された。
- 3) HMSN-P 遺伝子 *TFG* の機能 : hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement (HMSN-P) の原因遺伝子 *TFG* の変異 p. P285L を培養細胞で発現させたところ、細胞質内に TDP-43 の凝集体が出現し、ALS と共通する代謝異常が存在する可能性が考えられた。
- 4) VEGF の転写因子 hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) の核細胞間輸送 : HIF-1 $\alpha$  と、神経保護作用を有する VEGF との発現変化を ALS および SOD1<sup>G93A</sup> マウスで免疫組織学的に検索し、HIF-1 $\alpha$  の核細胞間輸送担体 karyopherin  $\beta$ 、核膜孔構成タンパク Nup62 の発現変化も調べた。ALS 前角細胞では HIF-1 $\alpha$  が細胞質内で発現亢進、VEGF が核内で発現低下しており、マウスでは発症前から同じ変化が見られた。マウスでは HIF-1 $\alpha$  と karyoperin  $\beta$ 、Nup62 とは共局在し、Nup62 の不連続性が見られた。ALS 運動ニューロンでは HIF-1 $\alpha$  の核細胞間輸送障害が核内 VEGF 産生を抑制し、細胞死を惹起することが示唆された。
- 5) ALS-FUS モデル drosophila の解析 : ヒト *FUS* のホモログである *Cabeza* をノックダウン (*Cabeza*-KD) した drosophila において、複眼原基特異的に *Cabeza* を KD したところ、rough eye 表現形が得られた。第3染色体のゲノム中で、欠失によりこの表現形が増強する領域と抑制される領域を各々複数見出したので、今後運動症状などとの関連解析を進める。
- 6) 治療研究
  - (1) 転写を標的とした家族性 ALS の新規治療法開発 : 変異 *SOD1* を発現する培養系に於いて、その転写を抑制する低分子化合物・既存薬を探索した。9,600 種類の低分子化合物を試み、ヒット化合物と類似構造を有する既存薬を見出した。後者を変異 *SOD1* Tg マウスに投与したところ、脊髄内 SOD1 量が低下し、生存期間が有意に延長した。

(2) 骨髄間葉系幹細胞と人工染色体による栄養因子デリバリー：人工染色体 (HAC) 技術を用いて、GDNF、IGF-1、HGF を同時発現する骨髄間葉系神経細胞を樹立し、移植治療に最適と考えられるクローン hiMSC (4PACG) 3-31 を得た。

## 2. 臨床

### 1) 遺伝子

(1) Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement

(HMSN-P) の原因遺伝子 *TFG* の同定：本症の 4 家系に於いて、DNA microarray などを用いて解析した結果、TRK-fused gene (*TFG*) の p. P285L 変異を同定した。この変異は発症者全員で見出され、日本人対照者には存在しないこと、ハプロタイプ解析から独立した創始者 2 人が想定されたことから、*TFG* が HMSN-P の原因遺伝子と考えられた。

(2) 家族性 ALS 遺伝子解析：家族性 ALS 104 家系の遺伝子解析の結果、*SOD1* 変異が 26 家系、*FUS/TLS* 変異が 10 家系で認められた。一方、*TDP43* 変異、*VCP* 変異、*C9orf72* 変異、*PFN1* 変異は見出されず、日本人では希と考えられた。

(3) 成人発症 MSA (MSA IV 型) の *SMN* コピー数解析：SMA IV 型と *SMN* との関連には議論のあるところである。SMA IV 型患者で *SMN* コピー数を解析したところ、一部の症例で *SMN1* のコピー数の増加が観察されたが、対照に比して有意差は見られなかった。今後、症例と対照を増やして検索を進める。

2) 疫学：直近 5 年間の ALS の臨床調査個人票 (個票) のうち、最も回収率が高かった (92.1%) 2009 年のデータを用いて、有病率、栄養・呼吸管理の実態調査を行った結果、個票のデータが得られた患者は 7,461 人であり、経鼻胃管、胃ろう・腸瘻、経静脈栄養、NIPPV、TPPV 使用の割合 (%) は順に 5.2、33.1、3.1、10.3、27.8 であった。個票の回収率が完全ではないこと、未登録の症例もあることから、全体の患者数はもっと多いものと考えられる。

### 3) 臨床像

(1) SCA36 (Asidan) の嚥下評価：SCA36 では小脳変性に加えて舌萎縮を含めて運動ニューロン障害が出現する。SCA36 の嚥下機能評価を行ったところ、舌圧は保たれ、嚥下造影でも障害頻度は 1/3 と低く、嚥下機能は客観的評価でも保たれる傾向が示された。

(2) 進行期 ALS に於ける意思伝達障害予測因子：侵襲的人工呼吸器下にある ALS 症例を後方視的に調査し、意思伝達障害を予測させる因子を探った。呼吸器装着、経管栄養、眼球運動障害出現、四肢完全麻痺にいたる期間が短いほど、意思伝達障害が強く認められた。

### 4) 電気生理

(1) 小指球 motor unit number estimation (MUNE) への遠隔電場混入：MUNE は運動単位数を定量的に評価できる手法であるが、表面筋電図を用いた定量評価法より感度が低かった。球脊髄性筋萎縮症症例に於いて、遠隔電位電と近接電場電位を分離記録して解析した結果、小指球 MUNE には小指外転筋以外の筋に由来する表面運動単位電位が健常者よりも多

く混入するためと判明した。

- (2) 小指球 MUNE の surface motor unit potential (SMUP) の起源: 運動単位数を定量的に計測するために汎用されている MUNE での多点刺激法に於いて記録される SMUP の起源の同定を試みた。その過半数は非小指外転筋であり、通常の誘導では小指外転筋由来のものとの区別は困難であることが判明した。
- (3) ALS に於ける fasciculation potential (FP) : ALS の電気診断に重要な FP の本症に於ける出現頻度、分布、形態を調べ、進行速度と生命予後との関連を検討した結果、上肢筋で出現しやすく、筋力低下の程度とは無関係に高頻度で出現した。5 相以上の複雑型 FP の数が多いほど生命予後が不良であった。
- (4) ALS の軸索イオンチャンネル機能: ALS を特徴付ける所見である fasciculation (FP) は軸索興奮性の高まりに由来し、その背景にはイオンチャンネルの異常が存在すると考えられている。ALS では、①持続性 Na 電流増大と K 電流低下、②持続性 Na 電流が生理的に大きい運動ニューロンが有意に障害 (split hand)、③持続性 Na 電流の大きさは生存期間と逆相関、が見出され、Na 電流を抑制する塩酸メキシレチンによる医師主導治験を開始した。

## 5) 病理

- (1) ALS と前頭側頭葉変性症 (FTLD) に於ける脊髄病変の連続性: TDP-43 病理の確認された FTLD 多数例の脊髄を検索した結果、運動ニューロン症候を欠く症例でも pTDP-43 陽性封入体が認められ、Bunina 小体やマクロファージも高頻度に観察されて、FTLD と ALS 病理との連続性が示された。
- (2) ALS-FUS 症例脊髄の免疫染色: FUS, TDP-43, ADAR2 各々に対する抗体で、*FUS/TLS* の p. P525L 変異剖検例脊髄の免疫染色を行った。ADAR2 陽性運動ニューロンと陰性運動ニューロンとが認められたが、その陰陽は好塩基性封入体の有無とは無関係であった。ALS-FUS 前角細胞は編集型 GluA2 のみの細胞と未編集型 GluA2 を発現する細胞があり、ALS-FUS の運動ニューロン死は好塩基性封入体とは関連がない可能性が示された。
- (3) 原発性側索硬化症 PLS: 臨床病理学的に PLS の特徴を備えた 2 剖検例で pTDP-43 病理を調べたところ、中心前回以外にも前頭側頭葉皮質、扁桃核、線条体に pTDP-43 陽性封入体が観察された。両例とも大脳皮質の pTDP-43 イムノブロットパターンは ALS とは異なっており、PLS は FTLD-TDP の 1 型である可能性が示された。
- (4) ALS に於ける BTBD10 蛋白発現: 細胞の生存に必要なシグナルを伝達する役を担う BTBD10 に対する抗体で ALS と対照例の脊髄を免疫染色したところ、BTBD10 は ALS 症例で有意に減少しており、現象細胞の多くは Golgi 装置の微細化や pTDP-43 異常凝集を呈していたことから、BTBD10 発現低下は神経変性に関連していると推測された。

### 【III】 舞蹈運動

1. Huntington 病の自然歴:19 家系 23 例の経過を追った結果、発症年齢は 32 歳から 57 歳、罹病期間は最長で 25 年であった。自殺企図も高率に認められた。巧緻運動障害と不随意運動とは解雇の原因となった。最も問題となる精神症状は暴力行為、暴言である。生命予後には嚥下障害が関連した。
2. 有棘赤血球舞蹈病 (ChAc) の神経変性機構:本症の病因は *VPS13A* 変異であり、遺伝子産物 chorein の欠損で発症するが、その機能は不明である。Chorein を強制発現させた培養細胞での研究から、chorein は飢餓で誘発される autophagy 誘導性細胞死の抑制に関わっていることが示唆された。

【IV】 ALS 分科班: 独自に班会議とワークショップを開催して活発に活動していることが示された。詳細は分科班の実績報告書を参照されたい。

## $\alpha$ -synuclein 3' -flanking SNP の孤発性パーキンソン病感受性への 機序に関する研究

研究分担者 戸田達史<sup>1)</sup>

研究協力者 水田依久子<sup>1),2)</sup>, 佐竹 渉<sup>1)</sup>, 村山繁雄<sup>3)</sup>, 金川 基<sup>1)</sup>, 小林千浩<sup>1)</sup>, 高藤和輝<sup>4)</sup>,  
永森收志<sup>4)</sup>, 山本光利<sup>5)</sup>, 服部信孝<sup>6)</sup>, 村田美穂<sup>7)</sup>, 金井好克<sup>4)</sup>, 中川正法<sup>2)</sup>

1) 神戸大学大学院医学研究科神経内科学／分子脳科学, 2) 京都府立医科大学神経内科, 3) 東京都健康長寿医療センター研究所神経病理学, 4) 大阪大学生体システム薬理学, 5) 香川県立中央病院神経内科, 6) 順天堂大学脳神経内科, 7) 国立精神・神経医療研究センター病院神経内科

### 研究要旨

$\alpha$ -synuclein(SNCA)は孤発性パーキンソン病(PD)の感受性遺伝子であるが、多型が疾患感受性に関与する機序については未だに解明されていない。我々は、SNCA 3' -flanking SNP rs356219 において、in vitro で allele 特異的な効果を見だし、protective allele に結合する転写因子を同定した（平成22年度本班会議）。本研究では、この転写因子を SH-SY5Y 細胞に強制発現して SNCA および SNCA 下流に存在する antisense noncoding RNA (ncRNA) の発現を real-time RT-PCR で解析した。その結果、SNCA 発現レベルはほとんど変化しないが、ncRNA 発現レベルは数十倍に上昇した。さらに剖検脳（前頭葉：Lewy body 群 21 例、対照群 18 例）における SNCA、ncRNA の発現レベルと rs356219 genotype との関連を調べた。rs356219 の disease allele が増えるほど SNCA 発現レベルは上昇する傾向を示したが、ncRNA については allele との関連性は殆ど見られなかった。SNCA と ncRNA の coexpression は、両者の間に機能的関連があることを示唆するが、さらなる実験による解明が必要である。

### A. 研究目的

$\alpha$ -synuclein(SNCA)は孤発性パーキンソン病(PD)の確実な感受性遺伝子であるが（Mizuta et al., Hum Mol Genet, 2006; Satake et al., Nat Genet, 2009; 表1）、多型が疾患感受性に関与する機序については未だに解明されていない。我々は、SNCA 3' -flanking SNP rs356219 において、ルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイで allele 特異的な効果を見だし、protective allele に結合する転写因子を同定した（平成22年度本班会議）。本研究は、我々の得た新しい知見をもとに、rs356219 の PD 感受性への機序を解明することを目的とする。

### B. 研究方法

rs356219 に結合する転写因子を SH-SY5Y 細胞に強制発現して SNCA mRNA の発現を定量する。なお、rs356219 の位置は、最近データベースに登録された antisense noncoding RNA の intron にも相当するので、この ncRNA についても同様の解析を行った。剖検脳（前頭葉：Lewy body 群 21 例、対照群 18 例）における SNCA、ncRNA の発現レベルを real-time RT-PCR で定量し、rs356219 の genotype との関連を調べた。剖検脳は匿名化し、その研究使用に関しては、神戸大学大学院および東京都健康長寿医療センター研究所の倫理委員会の承認を得ている。



## C. 研究結果

我々が同定した s356219 結合転写因子の強制発現により、SH-SY5Y における *SNCA* 発現レベルはほとんど変化しなかったが、*SNCA* 下流の ncRNA 発現レベルは数十倍に上昇した (図 1)。剖検脳においては、rs356219 の disease allele が 増えるほど *SNCA* 発現レベルは上昇する傾向を示したが、ncRNA については allele との関連性は殆ど見られなかった。しかしながら、*SNCA* と ncRNA の発現レベルは強い正の相関を示した (図 2)。

## D. 考察

SH-SY5Y の実験結果と、既報告のルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイの結果を合わせると、転写因子が rs356219 の protective allele に結合して ncRNA の発現を刺激したと推測される。剖検脳において ncRNA 発現レベルと genotype との関連性が見いだせなかった点については、剖検脳では転写因子を強制発現するような動的な変化を調べるのが困難であり、そのため allele との関連性が検出できない可能性があると考えられる。antisense ncRNA に関する最近の知見によると (Nat Rev Mol Cell Biol 10:637;2009)、今回解析対象とした ncRNA が *SNCA* 発現に何らかの影響を及ぼす可能性は十分にある。剖検脳における *SNCA* と ncRNA の coexpression は、両者の間に機能的関連があることを示唆するが、さらなる実験による解明が必要である。

## E. 結論

rs356219 は ncRNA/*SNCA* の発現調節を介して PD 感受性に関与する可能性がある。

## F. 健康危険情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Sharma M, Hattori N, Murata M, Toda T et al (GEOPD consortium). A multi-centre clinico-genetic analysis of the VPS35 gene in Parkinson disease indicates reduced penetrance for disease-associated variants. J Med Genet. 49:721-6;2012.

Sharma M, Toda T et al (GEOPD consortium). Large-scale replication and heterogeneity in Parkinson disease genetic loci. Neurology 79:659-667;2012.

Lill CM, Satake W, Toda T et al., Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. PLoS Genet 8:e1002548;2012.

### 2. 学会発表

佐竹渉、山本光利、村田美穂、服部信孝、戸田達史、他 候補遺伝子とエクソームシーケンスによるパーキンソン病の rare variant リスクの探索 日本人類遺伝学会第 57 回大会 2012 年、東京

## H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し

表1 *SNCA*はPDの確実な感受性遺伝子である

複数のゲノムワイド関連解析で同定されたPD感受性遺伝子領域 (Kumar et al., Curr Opin Neurol, 2012から)

	Satake et al., Nat Genet, 2009	Simon-Sanchez et al., Nat Genet, 2009	Edwards et al., Ann Hum Genet, 2010	Hamza et al., Nat Genet, 2010	Do et al., Plos Genet, 2011	Spencer et al., Hum Mol Genet, 2011	Saad et al., Hum Mol Genet, 2011
人種	日本	欧	欧	米/欧	米	英/仏	欧
<i>SNCA</i> (4q22)							
SNP	rs11931074	rs2736990	rs2736990	rs356220	rs356220	rs2736990	rs356220
OR	1.37	1.23	1.30	1.38	1.29	1.23	1.37
P	$7.35 \times 10^{-17}$	$2.24 \times 10^{-16}$	$6.7 \times 10^{-8}$	$3.4 \times 10^{-11}$	$2.3 \times 10^{-19}$	$1.36 \times 10^{-7}$	$2.82 \times 10^{-6}$
<i>MAPT</i> (17q21)	<i>SNCA</i> は全ての報告でPDと極めて強く関連						
SNP		rs393152	rs11012	rs199533	rs1876828	rs393152	rs17690703
OR	有意差なし	0.77	0.71	0.74	0.76	1.31	1.34
P		$1.95 \times 10^{-16}$	$5.6 \times 10^{-8}$	$1.3 \times 10^{-6}$	$1.1 \times 10^{-14}$	$4.75 \times 10^{-8}$	$3.94 \times 10^{-6}$
<i>PARK16</i> (1q32)							
SNP	rs947211	rs823128			rs823156		
OR	1.30	0.66	有意差なし	有意差なし	0.83	有意差なし	
P	$1.52 \times 10^{-12}$	$7.29 \times 10^{-8}$			$1.3 \times 10^{-7}$		0.03
<i>LRRK2</i> (12q12)							
SNP	rs1994090	rs141923	rs1907632	rs2708453	rs1491942		
OR	1.39	1.14	1.15	1.15	1.17	有意差なし	
P	$2.72 \times 10^{-9}$	$1.55 \times 10^{-3}$	0.032	0.03	$1.6 \times 10^{-4}$		0.04
<i>BST1</i> (4p15-16)							
SNP	rs4538475			rs11248051	rs11248060	rs1564282	rs4698412
OR	1.24	有意差なし	有意差なし	1.46	1.20	1.17	1.28
P	$3.94 \times 10^{-9}$			$3.2 \times 10^{-9}$	$2.7 \times 10^{-6}$	0.016	$6.88 \times 10^{-6}$
<i>HLA-DRA</i> (6p21.3)							
SNP				rs3129882	rs3129882		
OR				1.26	1.07		
P				$1.9 \times 10^{-10}$	0.02		

図1 SH-SY5Yに転写因子を強制発現(黒)するとncRNA発現が強く刺激される

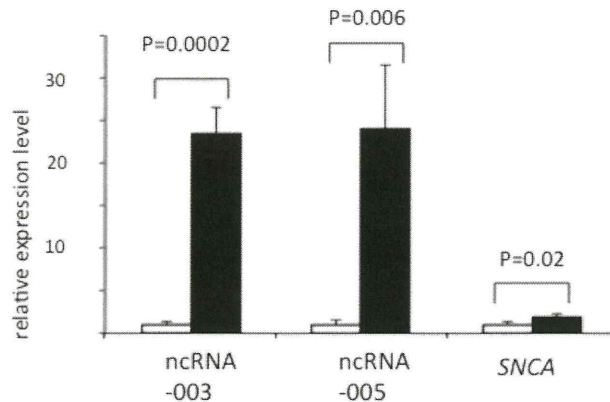
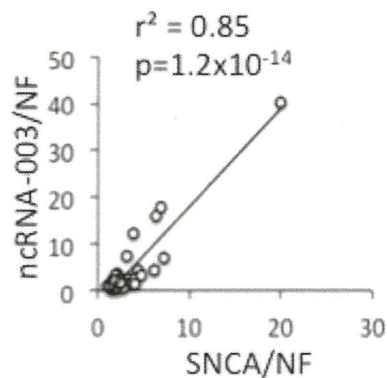


図2 剖検脳における*SNCA*とncRNA発現レベルの相関



## $\alpha$ -synuclein の凝集機構の解析

研究分担者 望月秀樹<sup>1, 2, 3)</sup>

研究協力者 仲田康人<sup>3)</sup>, 安田 徹<sup>1, 3)</sup>, 高橋正身<sup>4)</sup>, 阪上洋行<sup>5)</sup>, 水野美邦<sup>3)</sup>

- 1) 大阪大学大学院医学系研究科神経内科学, 2) 北里大学医学部神経内科学,  
3) 北里大学医学部神経再生医療学講座, 4) 北里大学医学部生化学教室,  
5) 北里大学医学部解剖学教室

### 研究要旨

SNARE 複合体の機能異常が $\alpha$ Syn の存在様式に影響を及ぼす可能性について、*Snap25*<sup>S187A/S187A</sup> マウス線条体を用いて検討を行った結果、VGLUT1 陽性の神経終末部において $\alpha$ Syn の集積がみられた。しかしながら、黒質線条体系に対する異常は認められなかった。このことから、SNARE 複合体の機能障害が $\alpha$ Syn の集積・凝集に関与すること、ならびに本所見の発現は神経細胞の種類によって異なることが示唆された。

### A. 研究目的

レビー小体型認知症 (DLB) の病理学的特徴は、 $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ Syn) を含む凝集体形成とされている。近年、DLB 患者剖検脳を用いた検討において、凝集体の 90%以上が大型のレビー小体とは異なる、小型の凝集体としてシナプス前部に存在することが報告されている。このことから、DLB の初期病変としてシナプスレベルでの異常が示唆されている。

シナプス前部では、synaptosomal-associated protein of 25 KDa (SNAP-25)、vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP-2)、Syntaxin などの分子から構成される soluble -ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) 複合体によって、神経伝達物質を含む小胞とシナプス前膜との融合が起こり、神経伝達物質が放出される。本過程の促進には、SNAP-25 の Ser187 に対するプロテインキナーゼ C (PKC) によるリン酸化が重要とされている。また、 $\alpha$ Syn が SNARE 複合体の形成制御に関与することが報告されている。

$\alpha$ Syn 過剰発現マウス線条体では、 $\alpha$ Syn の蓄積、SNAP-25、VAMP-2 及び syntaxin-1 の局在変化並びにドーパミン放出量の低下が観察されている。更に、パーキンソン病患者の剖検脳において SNARE 蛋白の凝集が報告されている。

これらのことから、SNARE 複合体の機能異常が $\alpha$ Syn の存在様式に影響を及ぼす可能性について検討した。

### B. 研究方法

本研究では PKC によるリン酸化を受けない *Snap25*<sup>S187A/S187A</sup> マウス (変異マウス) の線条体を用いて、免疫組織化学的及び生化学的解析を行い、SNARE 複合体の機能異常が $\alpha$ Syn の存在様式に影響を及ぼす可能性について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は北里大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

### C. 研究結果

11 及び 60 週齢のマウス線条体を対象として、

$\alpha$ Syn の免疫染色を実施した結果、変異マウスではいずれの週齢においても $\alpha$ Syn 陽性顆粒の出現が観察された。このことから、変異マウス線条体での $\alpha$ Syn の集積が示唆された。本所見は 11 週齢に比べて 60 週齢で顕著であったことから、加齢に伴い増悪する変化と考えられた。本結果を踏まえ、以降の検討では老齢 (60~61 週齢) マウスを使用した。

$\alpha$ Syn の集積部位を特定するために、シナプス前部マーカーである synaptophysin との共染色を実施した結果、 $\alpha$ Syn 陽性顆粒との共局在がみられたことから、 $\alpha$ Syn の集積はシナプス前部での所見と考えられた。Ser129 リン酸化シヌクレイン (p- $\alpha$ Syn) の出現は DLB をはじめとするシヌクレイノパチーの病理学的特徴とされている。そこで、p- $\alpha$ Syn との共染色を実施した結果、集積した $\alpha$ Syn の一部がリン酸化されていることが明らかとなった。

変異マウスの線条体組織抽出液を用いたウェスタンブロッティングでは、 $\alpha$ Syn 及び p- $\alpha$ Syn の発現量の増加がみられた。また、SNAP-25 の発現量の著しい低下がみられた。そこで、SNARE 複合体形成能を評価した結果、複合体形成により高分子量にシフトする SNAP-25 陽性バンドの減弱がみられたことから、SNARE 複合体形成能の低下が確認された。

電子顕微鏡による観察では、興奮性シナプス前部において、シナプス小胞の集積並びに $\alpha$ Syn の細胞内局在変化が観察された。線条体に投射する興奮性神経としては皮質及び視床由来の神経があるが、 $\alpha$ Syn 陽性顆粒は皮質由来神経マーカーである vesicular glutamate transporter (VGLUT) 1 とのみ共局在を示した。このことから、 $\alpha$ Syn の集積は皮質から線条体へ投射する神経終末部での所見と考えられた。また、VGLUT1 陽性神経終末部の著しい大型化がみられた。

次に、黒質線条体系に対する影響を評価した。黒質由来神経マーカーである tyrosine hydroxylase (TH) 又は dopamine transporter (DAT) との共染

色を実施した結果、 $\alpha$ Syn 陽性顆粒は両分子ともほとんど共局在せず、電子顕微鏡による観察でも DAT 陽性終末部に形態的異常並びに $\alpha$ Syn の細胞内局在変化は認められなかった。また、黒質緻密部 TH 陽性細胞数並びに線条体ドーパミン及び代謝物含量に変化はみられず、黒質線条体系に対する異常は認められなかった。

#### D. 考察

$\alpha$ シヌクレイノパチーの病理学的な特徴は $\alpha$ Syn の集積・凝集形成であることから、これまでその原因を解明するために  $\alpha$ Syn の発現量あるいは特性の変化に焦点を当てた多くの研究が実施されてきた。しかしながら、正常の内発性 $\alpha$ Syn の集積・凝集を引き起こす因子に関する報告は限られている。今回の発見は、そのメカニズムに SNARE 複合体の機能異常が関与することを示唆する新たな知見と考えられる。

興味深いことに、本所見の発現の有無は神経細胞の種類によって異なっており、パーキンソン病で障害を受ける黒質由来のドーパミン作動性の神経終末部ではみられず、大脳皮質から投射したグルタミン酸作動性の神経終末部で観察された。このことは、同じように  $\alpha$ Syn の集積・凝集が原因と考えられる疾患においても、各々で病態発現メカニズムに違いがある可能性を示唆するものと考えられる。

#### E. 結論

マウスの線条体において、SNAP-25 の変異に起因した SNARE 複合体の機能障害により、VGLUT1 陽性の神経終末部において $\alpha$ Syn の集積がみられた。その一部はリン酸化を受けており、これらの蛋白の発現量の増加もみられた。 $\alpha$ Syn の集積は DLB の初期病変として示唆されている神経終末部での $\alpha$ Syn 集積に SNARE 複合体の機能異常が関与する可能性を示唆するものであり、病態形成機序を考える上で新たな知見を提示するものと考えられた。

また、 $\alpha$ Syn の集積は黒質由来のドーパミン作動性の神経終末部ではみられず、神経細胞の種類によってその発現の有無が異なっていたことから、 $\alpha$ Syn の集積・凝集が原因と考えられる疾患においても病態発現メカニズムが異なる可能性が考えられた。

## F.健康危険情報

## G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

### 1. 論文発表

Nakata Y, Yasuda T, Fukaya M, Yamamori S, Itakura M, Nihira T, Hayakawa H, Kawanami A, Kataoka M, Nagai M, Sakagami H, Takahashi M, Mizuno Y, Mochizuki H. Accumulation of  $\alpha$ -synuclein triggered by presynaptic dysfunction. J Neurosci. 2012;32(48):17186-96.

### 2. 学会発表 なし

### 3. その他

2012年12月7日日本経済産業新聞

本内容について掲載

## 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

## p62/SQSTM1 依存的な $\alpha$ -シヌクレイン封入体のオートファジークリアランス

研究分担者 徳田隆彦<sup>1)</sup>

研究協力者 渡邊義久<sup>2)</sup>， 建部陽嗣<sup>3)</sup>， 水野敏樹<sup>3)</sup>， 田中雅樹<sup>2)</sup>， 中川正法<sup>3)</sup>

1) 京都府立医科大学分子脳病態解析学(神経内科併任)， 2) 京都府立医科大学基礎老化学，  
3) 京都府立医科大学神経内科学

### 研究要旨

パーキンソン病 (PD) の培養細胞モデルを用い、 $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -Syn) 凝集体のオートファジーによる分解を解析した。オートファジー活性の抑制により凝集体のオートファゴソーム内への取り込みおよび分解が阻害された。また、ノックダウン解析から、この分解にはオートファジーアダプター蛋白質 p62/SQSTM1 が必要であることが分かった。 $\alpha$ -Syn 凝集体の除去という観点から、PD 患者の神経細胞におけるオートファジーの活性化は PD の有効な治療法になる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

パーキンソン病 (PD) で障害される中脳黒質のドパミン細胞内には、Lewy 小体と呼ばれる細胞内封入体が蓄積する。この Lewy 小体は  $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -Syn) を構成成分とし、それが不溶性構造に変化することで形成される。 $\alpha$ -Syn は様々な分解機構により代謝され、ユビキチン・プロテアソーム系やオートファジー・リソソーム系の破綻により  $\alpha$ -Syn は蓄積し凝集体を形成する。しかし、これらの分解系が  $\alpha$ -Syn のどのような分子種 (monomer、oligomer や fibril) を分解し得るのかは分かってない。そこで、本研究では培養細胞モデルを利用して、 $\alpha$ -Syn 凝集体のオートファジー・リソソーム系での分解を解析した。

### B. 研究方法

#### ① $\alpha$ -Syn 凝集体形成モデル細胞の作製

培養細胞で  $\alpha$ -Syn 凝集体を効率良く形成させるために、2 週間の攪拌により *in vitro* で作製した  $\alpha$ -Syn fibril を Lipofectamine 試薬と混合し、HEK293 細胞へ添加した。 $\alpha$ -Syn fibril の導入から 30 分後、通常の培地に戻し、4~24 時間の培養後に免疫染色を行った。

#### ②免疫細胞化学

$\alpha$ -Syn fibril を導入した細胞は、抗リン酸化  $\alpha$ -Syn (S129)、抗 LC3、抗ユビキチン(Ub)、抗 p62 抗体を使用し免疫染色を行った。

#### ③EGFP-parkin 発現細胞の作製とミトコンドリア障害

pEGFP-C1 の *HindIII-BamHI* へ parkin (human) 遺伝子を挿入し、EGFP-parkin 融合蛋白質発現ベクター(pEGFP-parkin)を作製した。このベクターを HEK293 細胞へトランスフェクションし、50 $\mu$ g/ml G418 で選別を行うことで EGFP-parkin 安定発現株を作製した。そして、この細胞を 10 $\mu$ M CCCP で処理することによりミトコンドリア障害を起こさせた。障害ミトコンドリアのオートファジーによる分解を観察するために、抗 Tom20 および抗リン酸化  $\alpha$ -Syn 抗体で免疫染色を行った。

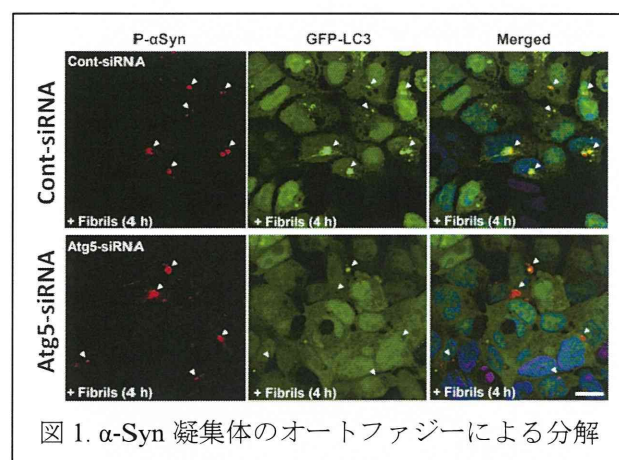
### C. 研究結果

#### ① $\alpha$ -Syn 凝集体のオートファジーによる分解

HEK293 細胞に  $\alpha$ -Syn 凝集体を形成させ、4 時間後に  $\alpha$ -Syn 凝集体(P- $\alpha$ Syn)とオートファゴソームマーカーLC3 の局在性を調べた (図 1)。コントロール細胞では P- $\alpha$ Syn 陽性凝集体と GFP-LC3 は



共局在を示した (図 1、Cont-siRNA)。一方、オートファジー活性を抑制した細胞では、GFP-LC3 の共局在は観察できなかった (図 1、Atg5-siRNA)。また、これらの細胞における 24 時間後の  $\alpha$ -Syn 凝集体の残存率を調べたところ、コントロール細胞では約 80% の凝集体が分解されていたが、Atg5 ノックダウン細胞では 40% の凝集体しか分解されていなかった。さらに、リソソーム阻害剤 Bafilomycin A1 で処理したときも同様の結果を得た。一方、ラパマイシン処理によりオートファジーを活性化すると凝集体の分解が促進された。これらの結果から、 $\alpha$ -Syn 凝集体はオートファジー分解のターゲットとなり得ることが分かった。



## ② $\alpha$ -Syn 凝集体の p62/SQSTM1 依存的分解

異常蛋白質のオートファジーによる選択的分解にオートファジーアダプター蛋白質の 1 つ p62 が必要である。そこで、 $\alpha$ -Syn 凝集体のオートファジー分解における p62 の必要性を調べた。p62 を siRNA でノックダウンした後、 $\alpha$ -Syn fibril を細胞内へ導入し、実験①と同様に GFP-LC3 との共局在と 24 時間後の凝集体の蓄積を解析した。

p62 ノックダウン細胞では、 $\alpha$ -Syn 凝集体形成はコントロール細胞同様に起きるが、GFP-LC3 との共局在は示さなくなった。そして、24 時間後の  $\alpha$ -Syn 凝集体の蓄積を調べたところ、コントロール細胞では 80% の凝集体が分解されていたが、p62 ノックダウン細胞では 20% しか分解されていなかった (図 2)。

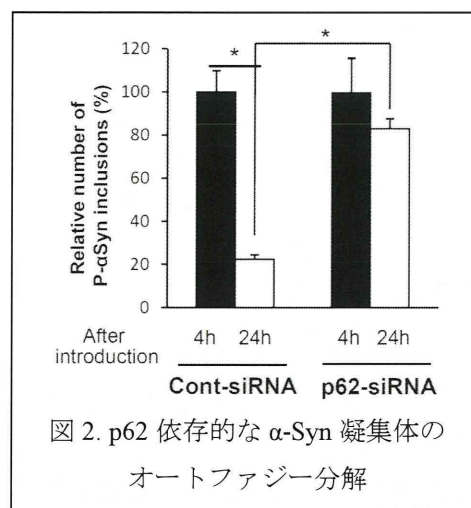


図 2. p62 依存的な  $\alpha$ -Syn 凝集体のオートファジー分解

## ③ 異常ミトコンドリア分解における $\alpha$ -Syn 凝集体形成の影響

Parkin や Pink1 など他の PD 関連遺伝子の解析から、PD 発症に異常ミトコンドリアのオートファジーによる分解 (Mitophagy) 障害が関与していることが示唆されている。そこで、 $\alpha$ -Syn 凝集体を形成した細胞における Mitophagy 活性を調べた。Mitophagy 活性を測定するために、EGFP-parkin を安定発現する細胞を作製した。そして、この細胞をミトコンドリア脱共役剤 (CCCp) で処理した後、細胞内に残存するミトコンドリアを抗 Tom20 抗体で調べた。

図 3A で示すように、 $\alpha$ -Syn 凝集体を形成していない EGFP-parkin 発現細胞では (コントロール)、CCCp 処理 4 時間後には EGFP-parkin は異常ミトコンドリアへリクルートされ、16 時間後には細胞内の Tom20 陽性ミトコンドリアは全て分解されていた。次に、 $\alpha$ -Syn fibril を導入した細胞でも同様の解析を行った (図 3B)。 $\alpha$ -Syn fibril を導入し 1 時間後に CCCp 処理を開始した。上述のコントロール細胞と同様に、4 時間後に EGFP-parkin のリクルートは認められ、16 時間後には大半のミトコンドリアは分解されていた。

これらの結果から、少なくとも本研究で使用した HEK293 細胞において、 $\alpha$ -Syn 凝集体の存在自体は Mitophagy 活性に影響を与えないことが示された。

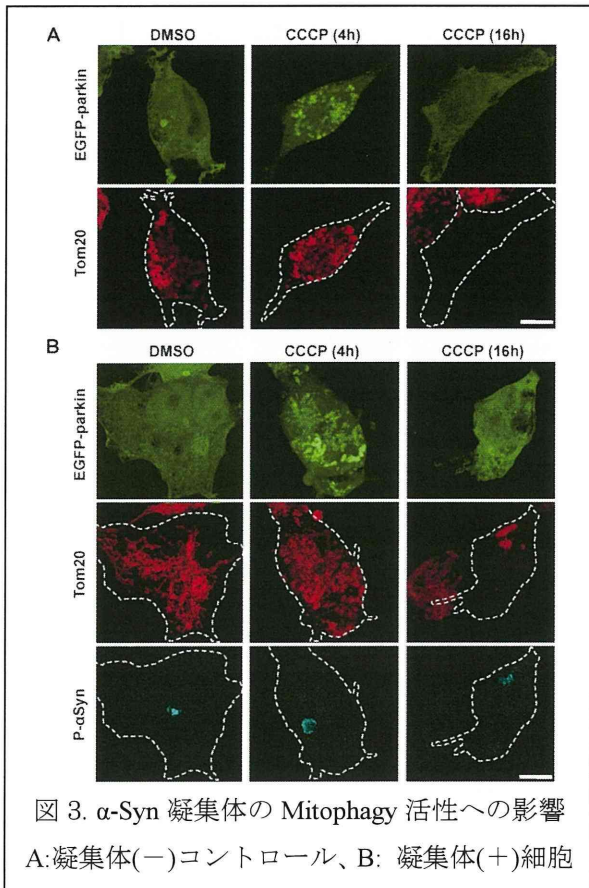


図 3.  $\alpha$ -Syn 凝集体の Mitophagy 活性への影響  
A: 凝集体(-)コントロール、B: 凝集体(+)細胞

#### D. 考察

ノックアウトマウスの解析やリソソーム阻害実験などの結果から、オートファジー・リソソーム系の抑制により  $\alpha$ -Syn 凝集体が蓄積することが明らかにされていた。しかし、オートファジーがどのような  $\alpha$ -Syn 分子種を分解ターゲットにしているのかは謎のままであった。本研究では、 $\alpha$ -Syn 凝集の細胞モデル系を用い、fibril 分子などを含む  $\alpha$ -Syn 凝集体がオートファジーにより分解されることを証明した。そして、この分解過程にオートファジーアダプター蛋白質である p62 が必要であることも明らかにした。これらの結果から、細胞内に蓄積した  $\alpha$ -Syn 凝集体は p62 と結合することでオートファゴソーム内にリクルートされ、最終的にリソソームで分解されることが示唆された。

$\alpha$ -Syn 凝集体の Mitophagy へ及ぼす影響を解析した。HEK293 細胞では、 $\alpha$ -Syn 凝集体は Mitophagy 活性を阻害することはなく、異常ミトコンドリアは完全にクリアランスされた。しかし、本研究ではオートファジー活性の高い HEK293 細胞を用い

検討したので、今後神経細胞などで比較的オートファジー活性の低い細胞内で同様の解析を行う必要がある。

#### E. 結論

本研究では  $\alpha$ -Syn 凝集体のオートファジーによる分解を PD 細胞モデルを用い明らかにした。この結果から、PD 患者の神経細胞のオートファジー活性を亢進できれば、脳内  $\alpha$ -Syn 凝集体を減少できる可能性がある。今後、PD モデルマウスなども利用し、オートファジー活性化による  $\alpha$ -Syn 凝集体分解を *in vivo* でも実証する必要がある。また、PD 治療を目的としたオートファジー誘導剤の開発において、本細胞アッセイ系はハイスループットスクリーニング系として利用できる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Watanabe, Y., Tatebe, H., Taguchi, K., Endo, Y., Tokuda, T., Mizuno, T., Nakagawa, M., Tanaka, M. (2012) p62/SQSTM1-dependent autophagy of Lewy body-like  $\alpha$ -synuclein inclusions. PLoS One, *in press*.

##### 2. 学会発表

- 1) Watanabe Y, Tatebe H, Taguchi K, Endo Y, Tokuda T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M. p62/SQSTM1-dependent autophagic clearance of Lewy body-like  $\alpha$ -synuclein inclusions. 42th annual meeting of the Society for Neuroscience 2012. Oct 13-17, 2012; New Orleans.
- 2) Watanabe Y, Tatebe H, Taguchi K, Endo Y, Tokuda T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M. p62/SQSTM1-dependent autophagy of Lewy body-like  $\alpha$ -synuclein inclusions. 14th International Congress of Histochemistry and



Cytochemistry. Aug 26-29, 2012; Kyoto, Japan.

- 3) 渡邊義久、建部陽嗣、田口勝敏、遠藤泰久、徳田隆彦、水野敏樹、中川正法、田中雅樹. オートファジーによる  $\alpha$ -synuclein 凝集体と障害ミトコンドリアの分解. 第 35 回日本神経科学会. 2012 年 9 月 20 日 名古屋.

#### 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

## パーキンと ChPF ファミリーの機能連関

研究分担者 梶 龍兒<sup>1)</sup>

共同研究者 三ツ井貴夫<sup>2)</sup>、牧(黒田)由紀子<sup>2)</sup>、十河正子<sup>2)</sup>、藤本美希<sup>2)</sup>、川村和之<sup>3)</sup>

1) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部感覚情報医学講座神経情報医学分野

2) 独立行政法人国立病院機構徳島病院 臨床研究部

3) 独立行政法人国立病院機構徳島病院 神経内科

### 研究趣旨

神経細胞においてパーキンと ChPF ファミリーの機能連関について、培養神経細胞を用いて検討した。Klokin 1/ChPF ファミリーの過剰発現でミトコンドリアのパーキン発現は著明に増加した。パーキンあるいは Klokin 1/ChPF ファミリーの過剰発現で Cell Viability は増加し、siRNA では逆に低下した。さらに、パーキン発現を抑制した細胞に Klokin 1 を過剰発現させると Cell Viability は回復したが、Klokin 1 発現を抑制した細胞の Cell Viability はパーキンを過剰発現させても回復させることはできなかった。また ChPF をノックダウンした細胞で、さらにパーキンをノックダウンした場合には Cell viability は変化しなかった。この変化は MPP 処理を加えた細胞においても同様に観察された。以上の成績から、パーキンは単独で細胞死抑制作用を増強し、ChPF の存在下で作用は増強されること、ChPF はパーキンの存在下で初めて細胞死抑制作用を発揮することが示唆された。すなわち、Klokin 1/ChPF ファミリーはパーキンのミトコンドリア移行を促進し、細胞死の抑制に貢献するものと考えられた。

### A. 研究目的

パーキンは遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子であり、その転写産物であるパーキン蛋白の機能として、ミトコンドリアのオートファジーが注目されている。すなわち、細胞内において細胞質に存在するパーキンは、膜電位の低下したミトコンドリアに集積し、ユビキチン・プロテオゾームシステムを介し、そのミトコンドリアを処理することが報告されている。一方、我々はパーキンが細胞内ミトコンドリアに存在しその biogenesis を促進すること、パーキンと結合しミトコンドリアまで誘導する新規の蛋白 Klokin 1 が存在することを見出した。Klokin 1 は chondroitin polymerizing factor (ChPF) のスプライシング変異体であることから、本研究では、神経細胞にお

いてパーキンと ChPF ファミリーの機能連関について、培養神経細胞を用いて検討した。

### B. 研究方法

PC12 細胞および SH-SY5Y 細胞において、パーキンおよび Klokin 1/ChPF をノックダウンした培養細胞で、あるいはこれらを overexpression させた細胞で cell viability がどのように変化するかを蛍光プレートリーダーを用いて検討した。さらに MPP (1 mM) を添加した細胞についても、同様の検討を行った。

### C. 研究結果

Klokin 1/ChPF ファミリーの過剰発現でミトコンドリアのパーキン発現は著明に増加した。パーキ

ンあるいはKlokin 1/ChPF ファミリーの過剰発現で Cell Viability は増加し、siRNA では逆に低下した。さらに、パーキン発現を抑制した細胞に Klokin 1 を過剰発現させると Cell Viability は回復したが、Klokin 1 発現を抑制した細胞の Cell Viability はパーキンを過剰発現させても回復さ

せることはできなかつた。また ChPF をノックダウンした細胞で、さらにパーキンをノックダウンした場合には Cell viability は変化しなかつた。この変化はMPP<sup>+</sup> 処理を加えた細胞においても同様に観察された。

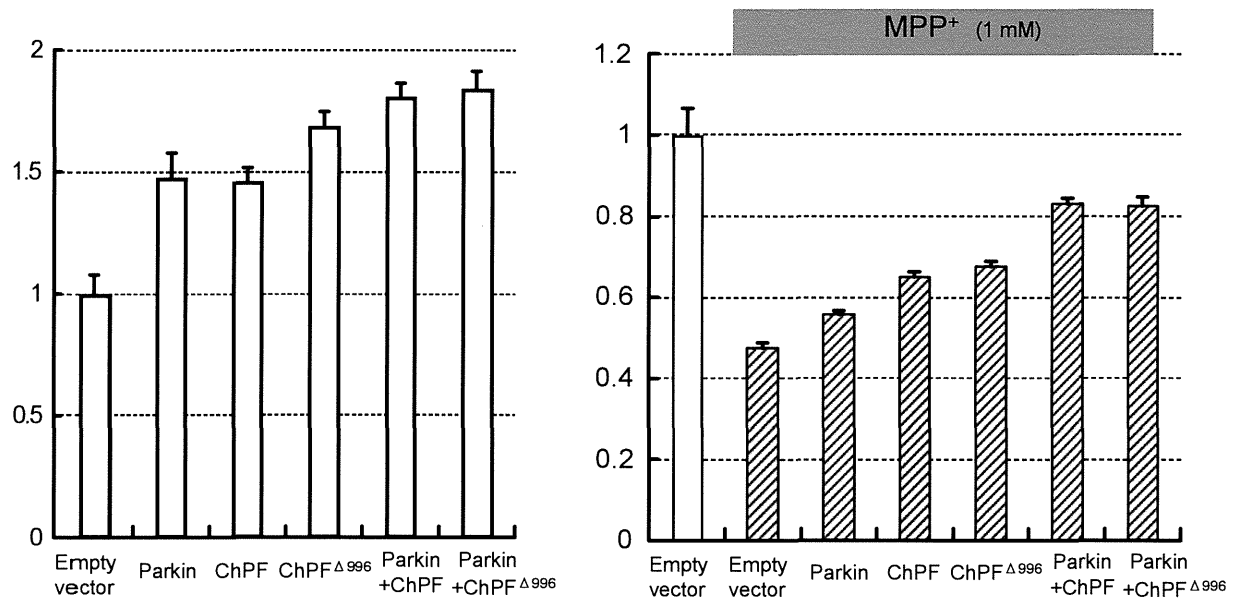


図1 PC12 細胞にパーキン、ChPF ファミリーを導入し、マイクロプレートリーダーで cell viability を測定した。パーキンならびに ChPF/ChPF<sup>Δ996</sup> を過剰発現すると cell viability は増加し、パーキンに ChPF/ChPF<sup>Δ996</sup> を共発現させるとさらに cell viability は増加した。MPP<sup>+</sup> (1mM, 16 hr) 処理で cell viability は低下したが、パーキンならびに ChPF/ChPF<sup>Δ996</sup> を過剰発現すると cell viability はやはり増加し、パーキンに ChPF/ChPF<sup>Δ996</sup> を共発現させるとさらに cell viability は増加した。

#### D. 考察

本研究結果から、パーキンは単独で細胞死抑制作用を増強し、ChPF の存在下でその作用はさらに増強されることが明らかとなった。ChPF は単独では細胞死抑制作用は認められなかつたが、パーキンの存在下では細胞死抑制作用を発揮することが示唆された。一方、Klokin 1 に関しては、我々は、既に Klokin 1 はパーキンの非存在下において、細胞死抑制作用を有することを報告している。す

なわちミトコンドリアへのターゲット・シグナルを有する Klokin 1 は、ミトコンドリアにおいて、直接的な抗アポトーシス作用を有すると考えられた。ChPF は大部分ミトコンドリア外に局在していることとも併せて、ChPF のミトコンドリアに関連した細胞死抑制作用はパーキンを介した間接的なものであることが示唆された。以上のことから、Klokin 1/ChPF ファミリーはパーキンのミトコンドリア移行を促進し、細胞死の抑制に貢献す

るものと考えられた。

## E. 結論

Klokin 1/ChPF ファミリーはパーキンをミトコンドリアに運搬するのみならずミトコンドリア内で独自の抗アポトーシス作用を発揮し、その作用はパーキンの作用を代償しうることもまた、パーキンの抗アポトーシス作用には Klokin 1/ChPF ファミリーの存在が必要であることが示唆された。

## F. 健康危険情報

本研究は組換え DNA 実験を含んでいるが、これに対する安全対策として、「大学等における組み換え DNA 実験指針」および「徳島病院遺伝子組換え DNA 実験安全管理規則」に基づき、承認を受けた後に専用施設内にて研究を実施した。

## G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

### 1. 論文発表

1. Kuroda Y, Sako W, Goto S, Sawada T, Uchida D, Izumi Y, Takahashi T, Kagawa N, Matsumoto M, Matsumoto M, Takahashi R, Kaji R, Mitsui T. Parkin interacts with Klokin1 for mitochondrial import and maintenance of membrane potential. *Hum Mol Genet.* 2012; 21:991-1003.
2. Takao Mitsui, Yukiko Kuroda, Shu-ichi Ueno, Ryuji Kaji. The effects of FK506 on refractory inflammatory myopathies. *Acta Neurol. Belg.* 2011; 111, 188-194
3. Arii Y, Inui T, Asanuma K, Izumi Y, Kaji R, Mitsui T. A new rehabilitation strategy for patients with Parkinson disease: a proposal of mentality-orientated rehabilitation. *Brain Nerve.* 2011 Aug;63(8):878-83.
4. Kuroda Y et al. Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Hum Mol*

*Genet.* 15(6):883-95, 2006.

5. Kuroda Y et al. Parkin affects mitochondrial function and apoptosis in neuronal and myogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 348(3):787-93, 2006.

## 2. 学会発表

1. 三ツ井貴夫、牧(黒田)由紀子、乾俊夫、梶 龍児：パーキンの糖化に対する ChPE の関与。第 53 回日本神経学会総会、2012 年 5 月
2. 牧(黒田)由紀子、藤本美希、川村和之、三ツ井貴夫、梶龍児：パーキンのミトコンドリア膜電位に対する関連蛋白の関与。第 53 回日本神経学会総会、2012 年 5 月

## 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