

201231096B

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～24年度 総合研究報告書

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25(2013)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～24年度 総合研究報告書

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25（2013）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)症候群における病態の in vivo, in vitro 解析 ..... 7  
佐藤 栄人
3. Perry(ペリー)症候群の臨床遺伝学的検討および診断基準の作成について ..... 10  
富山 弘幸
4. Perry(ペリー)症候群の病態における p150<sup>glued</sup> の役割に関する検討 ..... 14  
斉木 臣二
5. Perry(ペリー) 症候群の細胞内局在およびミトコンドリア機能への影響に  
関する研究 ..... 17  
波田野 琢

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 21

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 27

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総合研究報告書

## 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国内および国際学会会で発表した，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．

2年目は機能解析，モデル動物の作製も進み，病態解明にその成果が得られた．実際野生型 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，オルガネラ（特にリソソーム）の分布を変化させ，内因性経路活性化によるアポトーシス，オートファジー不全状態を誘導することがわかった．

すなわち，2年間の研究で，Perry 症候群の疫学研究から新規変異の同定，臨床像の検討から国際診断基準の策定，さらには細胞実験やモデル動物の作製から凝集物形成やアポトーシス，オートファジー不全など神経変性疾患の病態解明に繋がる知見も得ることができてきた．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．

以上のように本研究は，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独創的で意義深いものとしてできてきた．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ることができてきた．今後も本研究で得られた成果を生かし，発展させることで，パーキンソニズム，ALS，TDP-43 プロテノパチーの病態解明，治療法の開発から難治性神経変性疾患に苦しむ人々の福利に繋がることが期待される．

研究代表者  
服部信孝

分担研究者  
坪井義夫<sup>1)</sup>，佐藤栄人<sup>2)</sup>，富山弘幸<sup>2)</sup>，斉木臣二<sup>2)</sup>，波田野琢<sup>2)</sup>  
福岡大学神経内科<sup>1)</sup>，順天堂大学脳神経内科<sup>2)</sup>

## 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.

最長寿命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し, 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.

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, 初年度に同定した変異型p150glued強制発現によって誘導されたアポトーシスの性質について分子病態を検討した. 凝集体形成とアポトーシス誘導との関係を詳細に解明すべく, 変異型p150gluedが十分に発現した細胞のみを評価する必要があるため, 全ての実験はフローサイトメーターを用いて評価した.

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. 各試料はランダム化し, 研究者は個人の人の特定ができないように配慮するとともに,

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

### 1. 新規変異, 新規家系を複数同定し, 世界の中で本邦での疫学を明らかにした.

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きた. 新規変異も2家系で同定できた. さらには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. 世界の9家系中5家系が本研究によるものであり, 本研究の国際的成果, 影響力も大きなものであった.

### 2. 国際臨床診断基準を作成, 公表した.

この結果が得られたことにより, 臨床像の評価に基づき, 国際臨床診断基準を作成し公表することができた (国内外の7つの学会). 今後も, 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.

### 3. 細胞実験により変異型dynactin細胞質内凝集体形成からアポトーシス, 細胞死に至る機序を確認した.

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が検討できた. 変異型dynactin細胞質内凝集体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体が, 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.

### 4. ショウジョウバエモデル動物を作製し, 解析を開始できた.

トランスジェニック (Tg) ショウジョウバエの検討については, 野生型・変異型dynactinをショウジョウバエに打ち込み, 各lineの樹立, モデルの作成を完了した. 今年度までには終了できなかったが, 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・病理学的異常を詳細に検討中であり, 来年度以降に結果がでるものと期待された.

総じて研究結果は研究計画に沿って予定通り出てきたといえる.

ただし診療指針の作製、治療法開発に至るまでの成果は本研究期間では達成できなかったため、今後解決されるべき大きな課題として残った。

## D. 考察

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たことは、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、 $\alpha$ -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開催し、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ことができた。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だことを示している。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。

国際臨床診断基準については、国際学会を含む7つの学会、会議で発表したが、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を続けていく予定である。

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をショウジョウバエに打ち込み、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晚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・ショウジョウバエ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た。

また、それらの知見の臨床応用から、診療指針の確立、国内さらには世界の患者の福利に役立てていくことを目指して研究を継続できた。このように医療費、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も広げてきており、遺伝診療、遺伝カウンセリング、病名告知、人工呼吸器装着から入院・介護など診療指針の検討・策定による行政政策への提言を可能なものとしてきている。

## E. 結論

DCTN1変異例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、動物モデルを含むDCTN1の機能解析は封入体形成機構、神経変性機構を明らかに出来る可能性を秘めている。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して独創的で意義深い成果を生むことができてきた。

本研究から得られた多くのdataに基づき、今後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国際臨床診断基準、さらには診療指針の確立を目指すとともに、難治性疾患、神経変性疾患の病態解明、克服にむけて研究がさらに推進されることが期待される。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G.研究発表

### 1.論文発表

- 1) 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) Omoto M, Suzuki S, Ikeuchi T, Ishihara T, Kobayashi T, Tsuboi Y, Ogasawara J, Koga M, Kawai M, Iwaki T, Kanda T.(2012). Autosomal dominant tauopathy with parkinsonism and central hypoventilation. Neurology.2012;6:78:762-764.
- 3) Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa K, Kobayashi T, Nonaka T, Hasegawa M, Kishi M, Yoshino H, Funayama M, Tsukamoto T, Shioya K, Yokochi M, Imai H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Motoi Y, Tomiyama H, Hattori N. Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTL, PSP and CBS. Parkinsonism Relat Disord.2013;19:15-20
- 4) Ogaki K, Li Y, Atsuta N, Tomiyama H, Funayama M, Watanabe H, Nakamura R, Yoshino H, Yato S, Tamura A, Naito Y, Taniguchi A, Fujita K, Izumi Y, Kaji R, Hattori N, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS). Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Aging. 2012. 33:2527.e11-6.
- 5) 富山弘幸. パーキンソン病の発症に遺伝子の関与はあるのか? : あなたも名医! パーキンソン病Q&A version 2. 日本医事新報 jmed mook第23号 2012;23:17-24.
- 6) Tomiyama H. Axon guidance pathway genes and Parkinson's disease (Commentary). J Hum Genet 2011;56:102-3.
- 7) Tomiyama H, Yoshino H, Hattori N. Analysis of *PLA2G6* in patients with frontotemporal type of dementia. Parkinsonism Relat Disord 2011;56:102-3.
- 8) Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Hatano T, Tomiyama H, Hattori N. VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson's disease. Mov Disord. 2012. 27:1413-7.
- 9) Korolchuk V, Saiki S, Lichtenberg M, Siddiqi F, Roberts EA, Imarisio S, Jahreiss L, Sarkar S, Futter M, O'Kane CJ, Deretic V and Rubinsztein DC. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. Nat Cell Biol 2011; 13:453-60.
- 10) Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, Kobayashi H, Sato F, Kei-Ichi Ishikawa, Sato S, Imoto M, Hattori N. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. Autophagy;2011; 7:176-87

## 2.学会発表

- 1) Nobutaka Hattori, MD, PhD, Neurology Dept. Juntendo University School of Medicine, Familial Parkinsonism(FPD): Its Pathogenesis Provides a Hint for Elucidating the Pathogenesis for Nigral Neurodegeneration, 2012 Mackey International Symposium: Mitochondrial Dysfunction and Aging-related Disease, New Taipei City, Taiwan, July 8, 2012
- 2) Nobutaka Hattori, MD, PhD, Dept of Neurol. Juntendo University School of Medicine, Lecture, Annual meeting 2012 GEO-PD, Oct 8, 2012, Seoul, Korea
- 3) 富山弘幸, 李林, 中尾紘一, 京楽格, 栗崎玲一, 李元哲, 舩山学, 吉野浩代, 音成龍司, 藤井直樹, 坪井義夫, 服部信孝. 稀少性疾患Perry症候群における遺伝カウンセリング-遺伝性パーキンソン病と比較して- (2012.11月, 日本人類遺伝学会総会. 東京)
- 4) 富山弘幸, 李林, 中尾紘一, 京楽格, 栗崎玲一, 李元哲, 舩山学, 吉野浩代, 音成龍司, 藤井直樹, 坪井義夫, 服部信孝. Perry症候群の診断基準案作成および疫学調査について (2012.5月, 第53回日本神経学会総会. 横浜)
- 5) 服部信孝 (順天堂大学脳神経内科). ランチョンセミナーLS(1)-1 1、第53回日本神経学会学術大会、東京、2012年5月23日
- 6) 服部信孝. (順天堂大学脳神経内科) オープニングセミナー6「CDD」、CDDの実際、第6回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS、京都、2012年10月10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

Perry（ペリー）症候群の臨床遺伝学的検討および  
診断基準の作成について

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 症候群は常染色体優性遺伝でパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたす予後不良の疾患である。2002 年に従来の本邦で最初の報告がなされた後、2009 年に DCTN1 遺伝子内に変異が発見された。

さらに病理学的に TDP-43 蛋白の凝集がみられ、従来の Lewy 小体パーキンソン病とは異なる病態のパーキンソン病と考えられる。稀な疾患と考えられていたが、本邦を含む世界で、新たな家系が発見されている。この研究の目的は、新たな家系の発見、臨床症候の特徴から診断基準の作成、さらに治療薬の開発を含めた基礎研究にある。

現時点で、現在本邦に 4 家系存在し、その臨床病理学的特徴がより明らかになっている。OMT 家系は孤発性パーキンソン病と臨床上区別できない症例も存在した。睡眠ポリグラフ検査では検討した全例に睡眠時の不規則呼吸や呼吸停止がみられ、診断基準における大切な検査と考えられた。診断基準案が作成され、今後早期診断と治療指針の確立を目指す。

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，進行の速い予後不良の遺伝性疾患である。2002 年に初めて本邦にその存在が明らかにされ（FUK-1 家系：Tsuboi et al. Neurology 2002）、2009 年に我々と Mayo Clinic の共同研究で DCTN1 遺伝子内に変異が発見された（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、報告した（Wider C, et al. Parkinsonism Relat Disord. 2009）。本邦で FUK-1 以外にも 3 家系が発見され臨床的に 12 例からその詳細が明らかになった。また検査所見も含めて、本疾患の臨床診断基準の作成を行い、さらにこの疾患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

本邦の Perry 症候群 4 家系の臨床症状、検査所

見、病理所見の詳細を収集し分先する。臨床症状、画像、生理検査、経過をから感度、特異度の高い診断基準の作成し、さらに標準的治療指針を確立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

疫学的には本邦の同疾患家系は 4 家系（FUK-1、FUK-4、OMT、MZK）で、このうち FUK-1 家系は最大で 30 人の家族で 14 人の発症者、10 名の発症リスク家族が存在することが明らかになった。



本邦では全4家系で、24人の発症者が存在し、臨床詳細はそのうち14例で収集可能で、現在5例が生存中である。本邦家系症例の特徴は、平均発症年齢が49歳（範囲：35-70歳）、平均罹病期間が5.7年（範囲2-14年）となり、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1～2年以内に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が多くみられた。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は検査を行った6例全例に中枢性の呼吸異常が認められた。死因は突然死あるいは呼吸不全が5例と最も多く、肺炎等の合併症や自殺で封入体はパーキンソン病関連疾患としては初めてのTDP-43プロテノパチーで、他の神経変性疾患であるFTLD-UやALSと病態を共有する可能性を示唆しており、今回の新たな家系の発掘と診断基準の作成により、今後さらにPerry症候群の存在を発掘し、病態解明および治療ガイドラインの確立を目指す。

## 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。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

- 1) Tomiyama H, Tsuboi Y, Li L, Nakao K, Kyoraku I, Kurisaki R, Naoki F, Neshige R, Funayama M, Yoshino H, Ross O, Farrer M, Dickson D, Wszolek ZK, Hattori N. International diagnostic criteria for Perry syndrome based on all current analyses. (In preparation)
- 2) Araki E, Tsuboi Y, Daechsel J, Milnerwood A, Vilarino-Guell C, Fujii N, Mishima T, Oka T, Hara H, Farrer MJ. A novel *DCTN1* mutation extending the Perry syndrome phenotype. (Submitted)
- 3) Ishikawa K, Saiki S, Furuya N, Yamada D, Imamichi Y, Li Y, Kawajiri S, Tsuboi T, Hattori N.

Mutant p150<sup>glued</sup> causes apoptosis by insufficient mitochondrial clearance via autophagy. (Submitted)  
4) 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

## 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）症候群における病態の in vivo, in vitro 解析

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

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 p150glued とされる。本分担研究では変異型 p150glued 強制発現による凝集体の超微形態の検討と、他のオルガネラの細胞内分布について検討した。

我々は初年度にあらゆる病因変異型 p150glued 強制発現によって免疫組織化学的に細胞質内凝集体が生じることを確認したが、超微形態については検討していなかった。そのため病因変異 p150glued 強制発現によって生じた細胞質内凝集体を電子顕微鏡で評価したところ、内部構造均一な凝集体が特に核周囲に存在することを確認した。さらに免疫電子顕微鏡（抗 GFP 抗体による）を併せて行い、GFP 陽性の細胞質内凝集体の存在を確認した。また変異型 p150glued 強制発現細胞におけるゴルジ装置、早期エンドソーム、オートファゴソーム及びリソソームの形態・分布を免疫組織学的に検討したところ、ゴルジ装置・早期エンドソーム・リソソームが細胞膜直下にて観察され、オートファゴソームも核周囲から細胞質内全体に分布を変え、オートリソソーム形成が低下していた。以上の所見から変異型 p150glued は、凝集体形成を形成すると同時にオルガネラの分布にも影響することが確認され、オートファジー阻害作用を持つことが確認された。

### 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 (p150glued) の遺伝子変異による凝集体の性状を超微形態で評価し、細胞内オルガネラの分布への影響を評価すること。

### 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 (p150glued) 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. 細胞質内凝集体超微形態評価（電顕による）  
HeLa 細胞に、Lipofectamine 2000® (Invitrogen 社製) を用いて、dynactin(p150glued)-GFP 野生型・変異型を夫々強制発現し、24 時間後にグルタルアルデヒドおよび酸化オスミウムにて固定し、電子顕微鏡にて評価した

3. 細胞内オルガネラの分布変化の評価

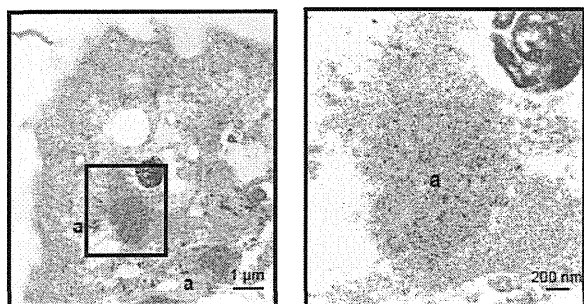
HeLa 細胞に、Lipofectamine 2000® (Invitrogen 社製) を用いて、dynactin(p150glued)-GFP 野生型・変異型を夫々強制発現し、24 時間後に 4%パラホルムアルデヒドにて固定し、各種細胞内オルガネラと GFP との 2 重染色を行い、凝集体陽性細胞におけるオルガネラ分布の変化を評価した。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

### C. 研究結果

結果 1 : 野生型強制発現細胞では凝集体形成を認めなかったが、変異型 p150glued 強制発現細胞では電子顕微鏡にて内部構造均一で主に核周囲に存在する凝集体を認めた。抗 GFP 抗体を用いた免疫電子顕微鏡にても同構造物は内部構造均一な傾向を示した。下図参照。

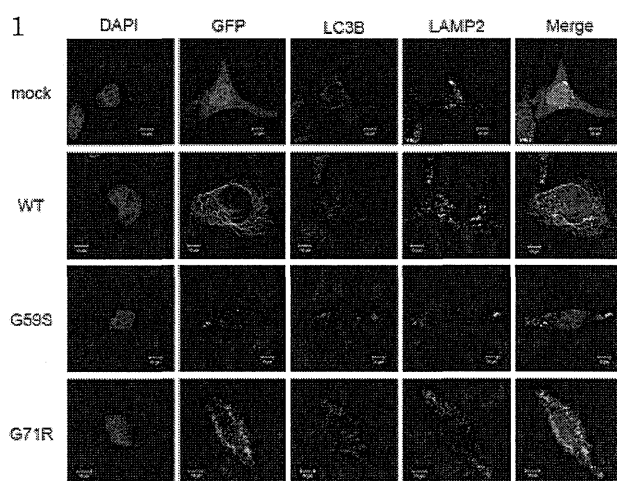


結果 2 : 変異型 p150glued の強制発現により、細胞質内凝集体を形成する細胞では、リソソーム (右図 1) 及びゴルジ装置 (右図 2) および早期エンドソーム (右図 3) の細胞内分布が変化し、より細胞膜に近い状態で存在していた。オートファゴソームも microtubule organizing center に集積せず、細胞質全体に分布を変える傾向にあった。

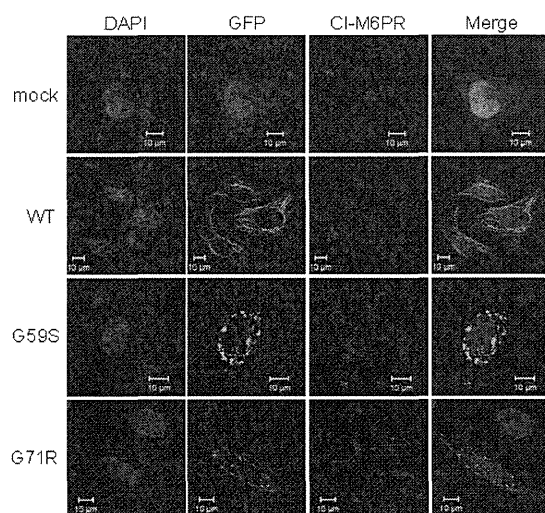
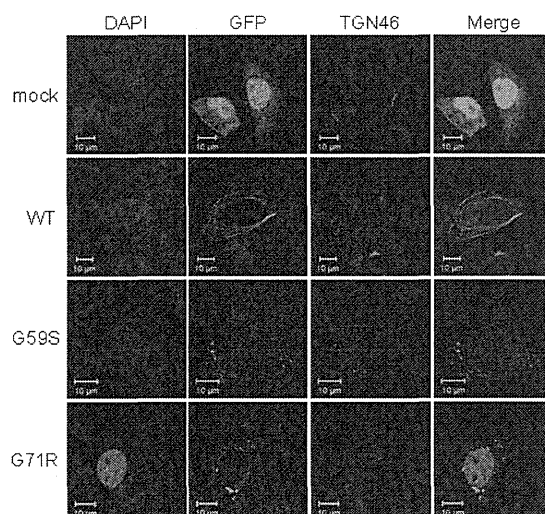
以上からオートファゴソームとリソソームの融合が不全状態にあると考えられた。

### D. 考察

初年度の検討により変異型 dynactin(p150glued)強制発現により免疫組織化学にて細胞質内凝集体が



形成されることを確認していたが、電顕的にも確認ができた。さらに凝集体形成細胞では、細胞内



オルガネラの分布が著しく変化しており、同現象によりオートファジー不全が生じ、異常ミトコンドリア蓄積 (マイトファジー不全状態、分担研究者波田野の項参照) を詳細するものと推察された。

## E. 結論

変異型 dynactin の強制発現は dynactin 凝集物を細胞質内に形成させ、オルガネラ（特にリソソーム）の分布を変化させ、オートファジー不全状態を誘導する。

## 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

Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S, Hattori N. PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain

primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. Sci Rep. 2:1002:2012

### 2. 学会発表（国内学会 1 件）

「家族性パーキンソン病の分子病態を基盤としたバイオマーカーの検討」佐藤栄人 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）症候群の臨床遺伝学的検討および 診断基準の作成について

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3000例を超える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978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．本年度までに，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，臨床像のまとめを行ってきている．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，論文を修正投稿予定である．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，これまで7つの国内外の学会，国際会議で発表したが，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．また，本年度は Perry 症候群の遺伝カウンセリングにも焦点を当てて学会発表を行った．

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．その際，遺伝カウンセリングの果たす役割が大変大きなものであり，診断および治療の選択においても大変重要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．最近，新規変異家系が同定されてきており，臨床診断基準から病理学的診断基準，さらには診療指針の策定に繋がっていくことが期待された．また，細胞実験に加え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た．

以上のように本研究は，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独創的で意義深いものとしてできてきた．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ることができてきた．今後も本研究で得られた成果を生かし，発展させることで，パーキンソニズム，ALS，TDP-43 プロテノパチーの病態解明，治療法の開発から難治性神経変性疾患に苦しむ人々の福利に繋がることが期待される．

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 (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し，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，DNAバンク症例中，家族歴や臨床像を考慮し，日本の978例に対して *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。

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。各試料はランダム化し，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 (H22.2.1承認，第21081号)。

## C. 研究結果

*DCTN1* の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家系の情報を収集することができた (論文投稿中) 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よう，診断基準に関する論文を修正中である。

### 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。

## D. 考察

これまでの日本人978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,  $\alpha$ -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, 国際診断基準を作成し, 国内外の学会などを通じて発表することができてきた。今後論文を通じて発表の予定である。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ニズムで発症し, 数年から5年くらい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。その際, 遺伝カウンセリングの果たす役割が大

変大きなものであり, 診断および治療の選択においても大変重要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。したがってその機能解析は広く封入体形成機構, 神経変性機序を明らかに出来る可能性を秘めている。

## E. 結論

DCTN1変異例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, 動物モデルを含むDCTN1の機能解析は封入体形成機構, 神経変性機構を明らかに出来る可能性を秘めている。したがって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本研究は, 疾患に対する臨床的, 分子遺伝学的観点から独創的で意義深い成果を生むことができてきている。

これまでに本研究から得られた多くのdataに基づき, 今後も遺伝子解析による診断のみならず蛋白質機能解析, 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国際臨床診断基準, さらには診療指針の確立を目指すとともに, 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く必要がある。

## 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 Relat Disord 2011;56:102-3.
- 2) 松山学, 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).
- 4) Tomiyama H, Tsuboi Y, Li L, Nakao K, Kyoraku I, Kurisaki R, Fujii N, Neshige R, Funayama M, Yoshino H, Ross O, Farrer M, Dickson D, Wszolek ZK, Hattori N. International diagnostic criteria for Perry syndrome based on all current analyses. (In preparation)
- 5)  Ogaki K, Li Y, Atsuta N, Tomiyama H, Funayama M, Watanabe H, Nakamura R,

Yoshino H, Yato S, Tamura A, Naito Y, Taniguchi A, Fujita K, Izumi Y, Kaji R, Hattori N, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS). Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2012;33:2527.e11-6.

6) Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa K, Kobayashi T, Nonaka T, Hasegawa M, Kishi M, Yoshino H, Funayama M, Tsukamoto T, Shioya K, Yokochi M, Imai H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Tomiyama H, Hattori N. Analyses of the *MAPT*, *PGRN*, and *C9orf72* mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19:15-20.

7) Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Hatano T, Tomiyama H, Hattori N.

*VPS35* mutation in Japanese patients with typical Parkinson disease. *Mov Disord* 2012;27:1413-7.

## 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)

6) 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, 藤井直樹, 坪井義夫, 服部信孝. Perry症候群の診断基準案作

成および疫学調査について. (2012.5月, 第53回日本神経学会総会. 東京)

7) H. Tomiyama, M. Ando, K. Ogaki, Y. Li, M. Funayama, H. Yoshino, N. Hattori.

Genetic Analysis for Parkinson's Disease in Juntendo University, Tokyo, Japan. (8 Oct, 2012. 7th GEO-PD meeting. Seoul, Korea).

8) 富山弘幸, 栗崎玲一, 中尾絃一, 京楽格, 吉野浩代, 音成龍司, 藤井直樹, 坪井義夫, 服部信孝. 稀少性疾患Perry症候群における遺伝カウンセリング—遺伝性パーキンソン病と比較して— (2012.11.26. 日本人類遺伝学会総会. 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



ペリー一症候群の病態における p150<sup>glued</sup> の役割に関する検討

研究分担者： 斉木臣二 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 p150<sup>glued</sup> 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。

まず分担研究者らは平成 23 年度に同定した変異型 p150<sup>glued</sup> 強制発現によって誘導されたアポトーシスの性質について分子病態を平成 24 年度に検討した。凝集体形成とアポトーシス誘導との関係を詳細に解明すべく、変異型 p150<sup>glued</sup> が十分に発現した細胞のみを評価する必要があるため、全ての実験はフローサイトメーターを用いて評価した。同アポトーシスは pan-caspase 阻害薬 zVAD-fmk 投与によって抑制された。また siRNA ノックダウンによる p150<sup>glued</sup> 発現量を抑制することにより、オートファジーはブロックされるが異常ミトコンドリアの蓄積・アポトーシス誘導を認めなかった。siRNA ノックダウンに p150<sup>glued</sup> 変異型をさらに強制発現することにより更なるアポトーシスの活性化を認めたことから、アポトーシス誘導には gain-of-toxic function が重要であることを確認した。

### 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 (p150<sup>glued</sup>) 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 (p150<sup>glued</sup>) 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. siRNA ノックダウン

Fas ligand を介する外因性アポトーシス経路の関与を検討するため、Caspase-8 の siRNA (smartPool siRNA against caspase-8, Thermo Scientific 社製)、を Lipofectamine 2000 を用いて通常のトランスフェクション方法にて導入した。ノックダウン効果を anti-caspase-8 抗体 (Cell Signaling Technology 社製) を使用し評価した。

#### 3. 細胞死検討

HeLa 細胞に、Lipofectamine 2000® (Invitrogen 社製) を用いて、dynactin(p150<sup>glued</sup>) 野生型・変異型を夫々

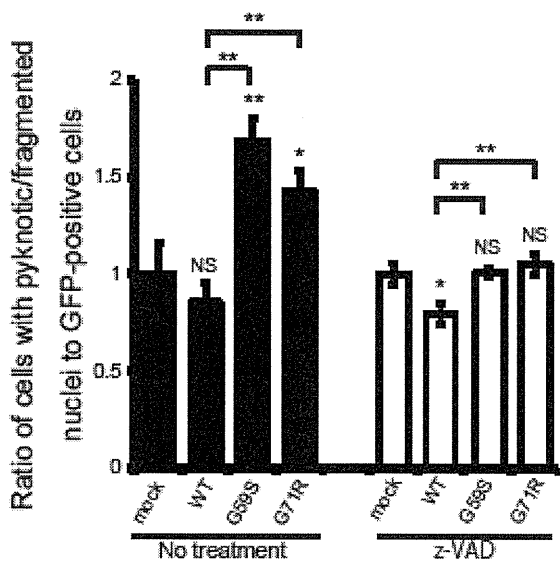
強制発現し細胞死を Annexin V -Alexa488 によって染色し、フローサイトメーター(FACS Fortessa, BD Biosciences)を用いて評価した。

(倫理面への配慮)

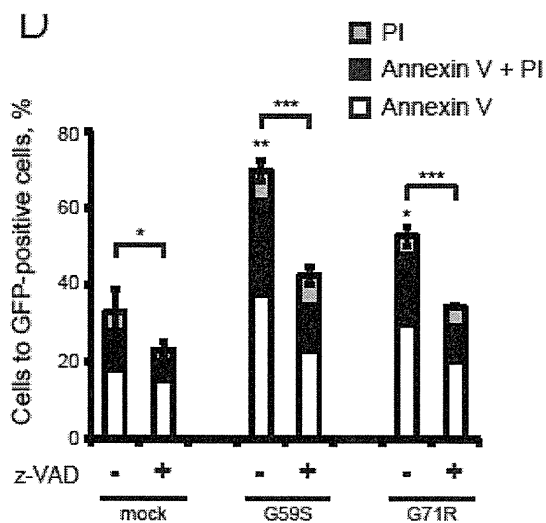
特記すべきことなし。

### C. 研究結果

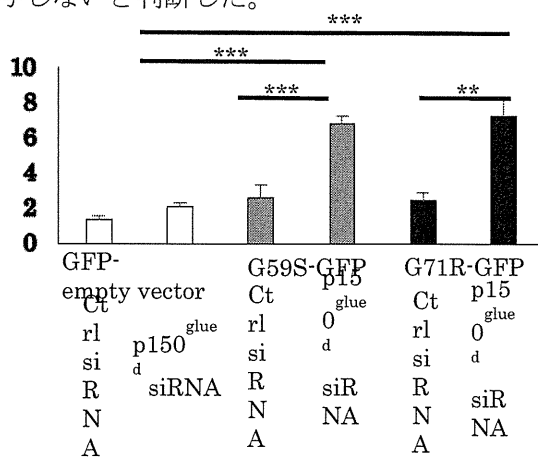
結果1: GFP-dynactin 陽性細胞全体の中で、細胞死を評価したところ、変異型細胞過剰発現 (G59S、G71R) では、細胞死の有意な増加を認めた(下図)。同細胞死はまた、caspase 阻害薬 zVAD にて顕著に抑制された。



結果2: 変異型 p150<sup>glued</sup> の強制発現により、右図のように、Annexin V (Alexa488)陽性細胞がコントロールに比し著明に増加しており、アポトーシスが誘導されることを確認した。同現象は、pan-caspase 阻害薬 zVAD-fmk 添加によって著明に抑制されたことから、同細胞死がアポトーシスであることを確認できた。



結果3: 変異型 p150<sup>glued</sup> 強制発現によるアポトーシスが、外因系経路を介さないことを caspase-8 siRNA ノックダウンを施行することにより確認した。図に示すように、caspase-8 が十分にノックダウンされた条件下にて、annexin V (Alexa488)陽性細胞は全く変化を認めなかったことから、同経路は関与しないと判断した。



結果4: 上図のように control siRNA または p150<sup>glued</sup> siRNA を強制発現し 48 時間後に GFP でタグした control vector または変異型 p150<sup>glued</sup> を強制発現し、その 24 時間後に Annexin V 陽性細胞率を検討すると、p150<sup>glued</sup> をノックダウンをした細胞では顕著に細胞死が増大した。

### D. 考察

初年度の検討により変異型 dynactin(p150<sup>glued</sup>)強制発現により細胞質内凝集物が形成されることを

確認した。同凝集物と細胞死との関連を解明すべく、凝集体形成細胞（強い変異型 p150<sup>glued</sup> 発現量を持つ）をフローサイトメーターによって選出し、同細胞群にて細胞死を評価する方法を試みた。誘導された細胞死がアポトーシスの性格を持ち、さらに内因性経路の活性化を認めることを併せ、異常ミトコンドリア蓄積（分担研究者波田野、佐藤の項を参照）を認めることを鑑み、内因性経路活性化によるアポトーシスと結論した。

#### 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、内因性経路活性化による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（国内学会 1 件）

「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、齊木臣二、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。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総合研究報告書

Perry（ペリー）症候群の細胞内局在およびミトコンドリア機能への影響に関する研究

研究分担者：波田野琢（順天堂大学脳神経内科教授）

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①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、②変異型 p150glued 強制発現によるミトコンドリア形態およびミトコンドリア膜電位を評価し、凝集体形成とミトコンドリアとの関連を検討した。結果として正常型 dynactin は  $\alpha$ -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) は局在していなかった。次に野生型及び病因変異 p150glued 強制発現細胞を夫々固定し、電子顕微鏡にて評価したところ、変異型 p150glued 強制発現細胞においては核周囲に内部構造が破壊され、膨化した異常な形態を持つミトコンドリアを多数認めたが、コントロールでは同所見を認めなかった。さらに変異型 p150glued 強制発現細胞におけるミトコンドリア膜電位を MitoTracker-RedCMXRos によってフローサイトメーターを用いて検討したところ、強制発現細胞において膜電位の低下したミトコンドリア量が増大していることを確認した。以上の所見から変異型 p150glued は、凝集体形成を形成すると同時に異常ミトコンドリア集積を招来することを確認した。