

今後、本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の強いRare variantリスク発見を目ざす。さらにこれまで蓄積した一塩基多型によるゲノムワイド関連解析データや、家族歴をもつPD患者データと比較することにより、孤発性PDの遺伝背景を解明する。

F. 健康危険情報

なし

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. Mizuta I *et al*, YY1 binds to α -synuclein 3'-flanking region SNP and stimulates antisense noncoding RNA expression. *J Hum Genet* 58, 711-719, 2013.
2. Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med* 369, 233-244, 2013.

2. 学会発表

1. Satake W *et al*, Exome sequencing of Parkinson's disease in order to identify genetic variants with high disease-risk. American society of human genetics, 2013, Boston, USA.
2. Satake W *et al*, Search for rare-variant risks of Parkinson's disease by sequencing of candidate genes and exome sequencing. Movement disorder society, 2013, Sydney, Australia.

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

PARK9(ATP13A2)の分子病態とリソソームの障害

研究分担者 服部信孝
研究協力者 佐藤栄人

順天堂大学脳神経内科

研究要旨

PARK9 は若年発症パーキンソニスムに認知症、錐体外路症状、ミオクロヌスを伴う原因不明の疾患群であるが、その原因遺伝子として ATP13A2 が同定された。しかしながらその機能については不明な点が多い。PARK9 の家系は本邦にも存在し、その変異を含めた機能解析から ATP13A2 の病的変異はリソソームの機能障害を引き起こすことが判明した。若年発症遺伝性パーキンソン病の病態の一端としてリソソームの障害が示唆された。

A.研究目的

若年発症遺伝性パーキンソン病の病態としてオートファジーリソソーム系の関与が有力であり、PINK1/Parkin の機能不全によるミトコンドリア品質管理の破綻もその一端である。一方で、我々は本邦における若年発症遺伝性パーキンソン病 PARK9(ATP13A2 の F182L 変異)の家系を見出してきた(Ning et. al. Neurology 2008, Kanai K, et al. Mov Disord 2009)。その原因遺伝子産物 ATP13A2 がリソソームに局在することから、同様にタンパク分解系の異常が関与しているであろうとの仮説のもと若年発症遺伝性パーキンソン病に共通の病態を明らかにする。

B.研究方法

培養細胞に ATP13A2 変異体を一過性に発現させることにより局在の変化を観察した。さらには安定抑制細胞を採取し、リソソームの機能を生化学的に評価するとともに、電顕により微細構造物の蓄積を検討した。さらに ATP13A2 コンディショナルノックアウトマウスにて同様な解析を行った。

C.研究結果

ATP13A2 の病的変異体を細胞に過剰発現すると本来局在すべきリソソームではなく、小胞体に局在した。一方、ATP13A2 遺伝子発現を抑制することにより、神経系細胞(SH-SY5Y)特異的に細胞死を誘発することが明らかとなった。ノックダウン細胞には膜様構造物や異常なリソソームが多数存在し、カテプシン D 活性が有意に低下した。同様な膜様構造物はノックダウンメダカやマウスにも観察された。これらの現象はリソソームの機能不全による二次的な変化と考えられた。

D.考察

ATP13A2 は本来リソソームに局在するが、変異タンパク質は小胞体からリソソームに輸送されないことによりリソソームの機能障害をきたすことが推測された。ATP13A2 の詳細な機能については未だ不明な点もあるが、SH-SY5Y 細胞、メダカ、マウスにて ATP13A2 を欠損させると同様な結果が観察されることから、神経細胞において ATP13A2 はリソソームの機能に重要な因子であることが推測された。

E.結論

若年発症遺伝性パーキンソン病の病態としてオートファジーリソソーム系の異常が示唆された。

F.健康危険情報

該当なし

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

Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. **FEBS Lett.** 587:1316-25. 2013

2. 学会発表

佐藤栄人、服部信孝

『若年発症パーキンソン病原因遺伝子産物 ATP13A2 の機能解析』

第 54 回日本神経学会学術大会

平成 25 年 5 月 31 日、東京国際フォーラム

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得 該当なし

2.実用新案登録 該当なし

3.その他

メダカを用いた GBA 変異とパーキンソン病の関連性の解析

研究分担者 高橋良輔¹

研究協力者 上村紀仁¹、石川智子²、木下政人³、小池正人⁶、松井秀彰⁵、
山門穂高¹、植村健吾¹、内山安男⁶、藤堂剛²、武田俊一⁴

- 1) 京都大学大学院医学研究科臨床神経学、2) 大阪大学大学院医学研究科放射線基礎医学、
- 3) 京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻海洋生物機能学分野、
- 4) 京都大学大学院医学研究科放射線遺伝学、5) 宮崎大学医学部機能制御学講座統合生理学分野、
- 6) 順天堂大学大学院医学研究科神経機能構造学

研究要旨

glucocerebrosidase (GBA) はゴーシェ病の原因遺伝子であるが、近年疫学研究から同遺伝子のヘテロ接合型変異がパーキンソン病 (PD) の強い危険因子であると報告された。しかし GBA 変異が PD を引き起す機序は明らかでない。我々は TILLING (targeted induced local lesions in genomes) 法にて GBA ナンセンス変異メダカを作製し解析を行なった。同変異ホモ接合体は *glucocerebrosidase (GCCase)* 酵素活性を完全に欠損していた。ヒトやマウスにおいて GCCase 酵素活性を欠損していると出生後間もなく致死性となるが、同変異メダカは月単位で生存し病態の進行を解析することが可能であった。同変異体の病理学的解析により、脳内に炎症を伴い、ライソソームの形態異常と軸索内に多数のオートファゴソームの蓄積を伴うスフェロイドの形成が見られ、同部位に α -シヌクレイン (α -syn) の蓄積を認めた。GBA 変異に伴う α -syn の蓄積の機序としてオートファジー・ライソソーム系の異常を考え、同機序が PD 発症に繋がっていると考えた。

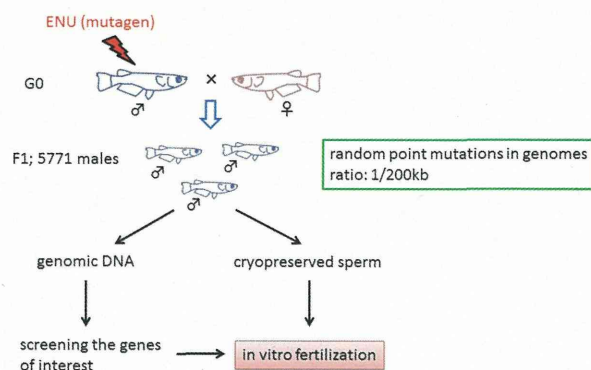
A. 研究目的

パーキンソン病 (PD) は運動障害を主徴とする進行性の神経変性疾患であり、病理学的には α -シヌクレイン (α -syn) の凝集体である Lewy body 形成を伴うドパミン神経細胞死を特徴とする。我が国の患者数は15万人以上であり、病態解明・治療法開発は急務である。最近、ライソソーム蓄積病であるゴーシェ病の病因遺伝子である *glucocerebrosidase (GBA)* のヘテロ接合型変異が、オッズ比約28倍の強力な孤発性PDの危険因子となることが判明した。しかし GBA 変異が PD を引き起す機序は不明な点が多く、この解明が PD の病態解明と治療法開発に大きく寄与すると考え、我々はメダカをモデル動物とし解明を試みた。

B. 研究方法

モデル動物としてメダカ近交系 Cab を用いた。

TILLING (targeted induced local lesions in genomes) 法 (下図) にて GBA 変異メダカを作成し、その表現型を解析した。また、神経細胞特異的 Growth-associated protein 43 (GAP-43) プロモーター下に GBA を発現するトランスジェニックメダカを作製し、レスキュー実験を行った。



(倫理面への配慮)

京都大学における動物実験の実施に関する規定に準じて対策・措置を講じた。

C. 研究結果

TILLING ライブラリーをスクリーニングすることにより、メダカ GBA (全 522 アミノ酸) のうち 337 番目のアミノ酸がストップコドンに変異したナンセンス変異体が見つかり、人工授精にて同変異体を作製した。同変異ホモ接合体($GBA^{-/-}$)の脳の glucocerebrosidase (GCase) 酵素活性は完全に欠損していた (図 1)。 $GBA^{-/-}$ は月単位で生存し、受精後 2 か月で行動異常を示し、5 か月までに死亡した (図 1)。3 か月の時点で脳を用いて GBA の基質である glucocerebroside の定量解析を行ったところ、 $GBA^{-/-}$ で著明に蓄積していたのに対し、異性体である galactocerebroside には変化を認めなかった。3 か月の時点での病理学的解析では、著明なミクログリアの増生を認め、細胞死を散見した。同時点でドパミン、ノルアドレナリン、セロトニン神経細胞を数えたが、これら全てにおいて神経細胞脱落を認め、非特異的な神経細胞死を起こしていると考えた。

我々はメダカ α -syn に対する特異性の高い抗体の作出に成功した。同抗体を用いた免疫組織染色では α -syn の凝集体を散見した (図 2)。透過型電子顕微鏡による観察で、多数のオートファゴソームの蓄積を伴う軸索の腫脹 (スフェロイド) を認め、メダカ α -syn 抗体による免疫電顕にて同部位に α -syn の蓄積を認めた (図 2)。このスフェロイドは LC3 抗体による染色でも強陽性部位として確認され、蛍光二重染色で α -syn と共局在することが確認できた。さらに、免疫組織染色による解析で、オートファジーの基質である p62 陽性の凝集体を認め、Cathepsin D 抗体による染色性の低下とライソソーム形態異常を認めた (図 3)。このライソソーム形態異常は透過型電子顕微鏡による観察でも確認され、内部に繊維状構造物の蓄積を認めた (図 4)。この繊維状構造物はヒト剖検例との類似性から、GBA の基質である

glucocerebroside の蓄積をみているものと考えた。なお蛍光二重染色では、LC3 抗体で強陽性となるスフェロイドと p62 陽性凝集体は共局在しなかった。ユビキチンと p62 は共局在した。

最後に、神経細胞特異的 GAP-43 promoter による GBA 発現トランスジェニックラインとの掛け合わせによるレスキュー実験を行ったところ、 $GBA^{-/-}$ で観察された行動異常と病理学的異常は改善し、これら異常が GBA 変異由来であることが確認できた。

Medaka_GBA 522 aa
DNA sequence ...GCCGTCCACTG(G>A)TACATGGAC...
Amino acid 334... A V H W>stop Y M D ...340

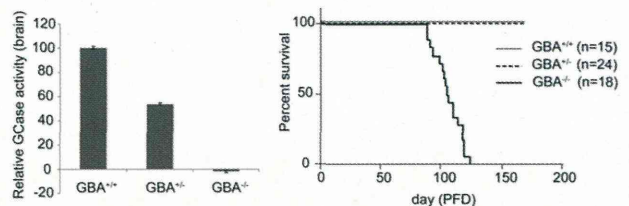


図 1

上：TILLING ライブラリーから見つかった GBA ナンセンス変異。
左下：3 か月の脳 GCase 酵素活性測定結果。
右下：生存曲線。

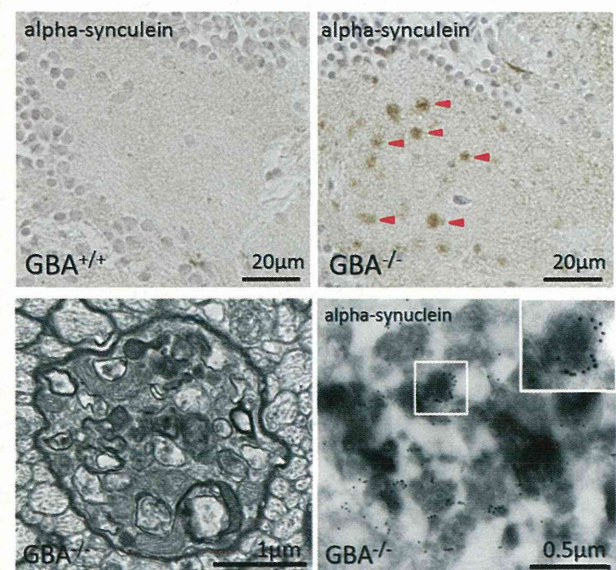


図 2

上：3 か月での α -syn 免疫染色。 $GBA^{-/-}$ において α -syn 陽性の凝集体を認めた。

左下：透過型電子顕微鏡像。軸索の腫脹（スフェロイド）と、その内部にオートファゴソームの蓄積を認めた。

右下：メダカ α -syn 抗体による免疫電顕。スフェロイド内に α -syn の蓄積を認めた。

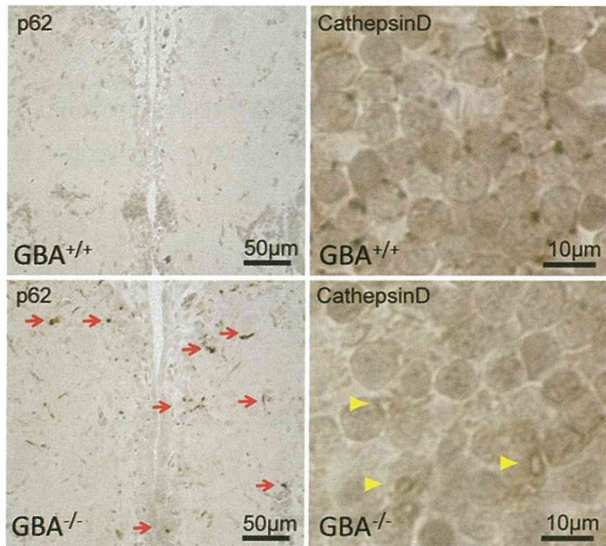


図 3

左：3 か月での p62 免疫染色。GBA^{-/-}において p62 陽性の凝集体を認めた。

右：Cathepsin D 免疫染色。GBA^{-/-}において染色性の低下とライソソーム形態異常を認めた。

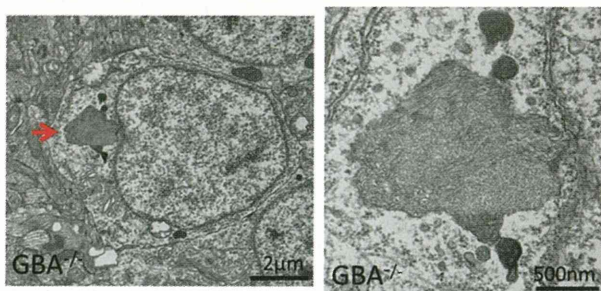


図 4

GBA^{-/-} 神経細胞の透過型電子顕微鏡像。ライソソームに繊維状構造物の蓄積を認めた。

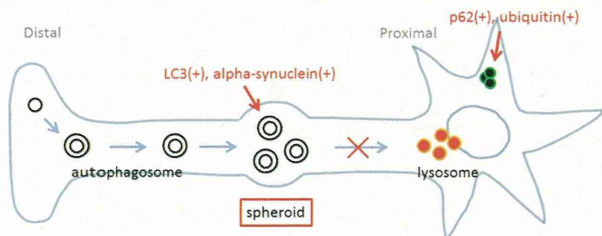
D. 考察

今回我々が作製した GBA ナンセンス変異メダカは GCcase 酵素活性を欠損しているにも関わらず月単位で生存し、病態の進行を観察することが可能であった。GBA ノックアウトマウスは皮膚からの水

分漏出などにより出生後間もなく致死となる。我々は出生直後の同変異マウス脳の病理学的解析を行ったが、 α -syn の蓄積は確認できなかった。GBA^{-/-}メダカにおいて α -syn 凝集体形成は受精後 2 か月以降で観察され、変異体の生存期間が影響していると考えている。

前述したパーキンソン病の危険因子としての疫学研究結果は GBA ヘテロ接合型変異のものであり、我々は GBA^{+/-}メダカの解析も行ったが、明確な表現型は見出せなかった。しかし、GBA ホモ接合型変異（ゴーシェ病）は GBA ヘテロ接合型変異よりさらにパーキンソン病罹患率が増加するという報告がある。また既報にて、GCcase 酵素活性は α -syn 存在下で低下し、GCcase 酵素活性低下がさらに α -syn の蓄積を促すというポジティブフィードバックの病態機序が提唱されている。GBA ヘテロ接合型変異を持つと、元々 GCcase 酵素活性が低い状態からこのポジティブフィードバックの機序でさらに活性が低下し、GBA ホモ接合型変異の状態に近づくとも考えられる。GBA^{-/-}メダカで見出された結果はこれを反映していると考えている。透過型電子顕微鏡と免疫電顕による解析により、GBA^{-/-}メダカの α -syn 凝集体は、オートファゴソームが蓄積し腫脹した軸索（スフェロイド）に存在することを確認した。また、Cathepsin D 免疫染色と透過型電子顕微鏡による観察でライソソームの異常を認めた。マウス初代培養神経細胞の解析において、神経細胞の軸索におけるオートファジーは遠位側より開始され、近位側に輸送される (retrograde transport) ことが報告されている。さらに、ライソソーム阻害薬の処理により、この過程が阻害され、オートファゴソームが軸索内に蓄積することが報告されている。今回の GBA 変異メダカの解析結果をこれら既報を踏まえて解釈すると、GBA 変異により一次的にライソソーム障害が起こり、その結果として軸索内にオートファゴソームと α -syn の蓄積が起こっている可能性が考えられる (下図)。 α -syn の分解経路に関しては、プロテアソーム系、オートファジー/エン

ドソーム・ライソソーム系のいずれの系も重要と考えられている。しかし、 α -syn は presynapse に主に存在するとされているが、その軸索輸送を含めた分解経路は明確には分かっていない。今回の結果からは、 α -syn がオートファゴソームにより retrograde transport を受け、ライソソームで分解されている可能性が考えられる。また、p62 陽性凝集体がスフェロイドに認めなかったことから、この系が p62 非依存的に起こっている可能性も考えられる。ただし、これらの可能性は今後の研究によって検証が必要である。PD 患者剖検脳の解析でも Lewy body と Lewy neurite が LC3 陽性となることが示されており、これら α -syn 凝集体の形成にオートファジーが関与している可能性が示されている。今後さらなる病態機序の解明と検証を行い、これらを修飾する治療法の開発を進める必要がある。



E. 結論

ホモ接合型 GBA ナンセンスメダカは月単位で生存し、当研究目的に対するモデル動物として有用であると考えた。同変異体における α -シヌクレイン蓄積の一因としてオートファジー・ライソソーム経路の障害が挙げられ、この病態機序が GBA 変異とパーキンソン病の関連性において重要であると考えた。

F. 健康危険情報 なし

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 なし

2. 学会発表

- ・上村紀仁、石川智子、木下政人、小池正人、松井秀彰、山門穂高、植村健吾、内山安男、藤堂

剛、武田俊一、高橋良輔：メダカを用いた GBA 変異とパーキンソン病の関連性の解析。第 54 回日本神経学会学術大会、東京 (2013. 5. 31)

・Uemura N, Fujiwara-Ishikawa T, Kinoshita M, Koike M, Matsui H, Yamakado H, Uemura K, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Takahashi R. Viable Gaucher's disease model of medaka fish completely deficient in glucocerebrosidase activity developed alpha-synuclein aggregation in the brain. 17th international congress of Parkinson's disease and movement disorders, Sydney, Austraria (2013. 6. 20)

・Uemura N, Fujiwara-Ishikawa T, Kinoshita M, Koike M, Matsui H, Yamakado H, Uemura K, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Takahashi R. Viable Gaucher's disease model of medaka fish completely deficient in glucocerebrosidase activity developed alpha-synuclein aggregation in the brain. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kyoto, Japan (2013. 6. 22)

・上村紀仁、石川智子、木下政人、小池正人、松井秀彰、山門穂高、植村健吾、内山安男、藤堂剛、武田俊一、高橋良輔：GBA ノックアウトメダカは脳にアルファシヌクレイン凝集体を形成する。第 22 回日本 Cell death 学会、京都 (2013. 7. 19)

・Uemura N, Fujiwara-Ishikawa T, Kinoshita M, Koike M, Matsui H, Yamakado H, Uemura K, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Takahashi R. Viable Gaucher's disease model of medaka fish completely deficient in glucocerebrosidase activity developed alpha-synuclein aggregation in the brain. Neuroscience 2013, SanDiego, USA (2013. 11. 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 なし

セピアプテリン還元酵素 KO マウスにおける運動障害の解析

研究分担者 長谷川 一子¹⁾

研究協力者 一瀬 宏²⁾、本間大悟²⁾、久保田光²⁾、高草木薫³⁾

1) 国立病院機構相模原病院神経内科 2) 東京工業大学大学院生命理工学研究科
3) 旭川医科大学・脳機能医工学研究センター

研究要旨

セピアプテリン還元酵素（SPR）は、ドーパミン生合成に必須なテトラヒドロbioプテリン（BH4）の生合成酵素の一つである。ヒト *SPR* 欠損症は脳内のドーパミン欠乏ばかりでなく認知機能障害が現れる点で、BH4 生合成律速酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I（*GCH*）遺伝子の変異により生じる *DYT5* とは異なる。また、ヒト *SPR* 遺伝子の染色体位置は、遺伝性パーキンソン病 *Park3* の遺伝子座と一致している。我々は *Spr-KO* マウスの遺伝的背景を変えることにより、成獣になるまで生存できる *Spr-KO* マウスの作製に成功した。このマウスは、胸椎の屈曲、眼瞼下垂などの表現型を示した。さらに、上腕二頭筋と上腕三頭筋の筋電図を記録することから、拮抗筋の同期した収縮が起きていることが判明した。この同期した収縮は L-ドーパの投与により速やかに消失した。これらの結果は、*Spr-KO* マウスがこれまでのパーキンソン病マウスモデルより多くの症状を再現する、優れたモデルマウスとなり得ることを示唆した。

A. 研究目的

テトラヒドロbioプテリン（BH4）は、チロシン水酸化酵素やトリプトファン水酸化酵素の補酵素としてドーパミン・ノルアドレナリン・セロトニンなどのモノアミン系神経伝達物質の生合成に必須な化合物である。脳内で必要とされるbioプテリンはグアノシン三リン酸（GTP）から脳内で3つの生合成酵素の作用により生合成されている。*DYT5* の原因遺伝子である GTP シクロヒドロラーゼ I（*GCH*）は BH4 生合成の第一段階に働き、セピアプテリン還元酵素（SPR）は BH4 生合成の第三段階に働く。

我々は *Spr-KO* マウスの解析をこれまで行ってきた。*Spr-KO* マウスでは前肢の震えや寡動が認められた。前肢の震えがパーキンソン病で見られる振戦と同様であるか解析するために、*Spr-KO* マウスの筋電図の解析を行った。

B. 研究方法

Spr-KO マウスをネンブタールまたはイソフルランによる麻酔下に、一部の皮膚を切開して上腕二頭筋および上腕三頭筋に針電極を刺入した。マウスが麻酔から覚醒後に、無拘束の状態です筋電図を計測した。

また、筋電図にドーパ投与の与える影響を解析するために、50 mg/kg の L-DOPA をマウス腹腔に投与して 10 分後における筋電図の変化を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究で行う動物実験は、東京工業大学の動物実験に関わる倫理委員会に申請し、委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

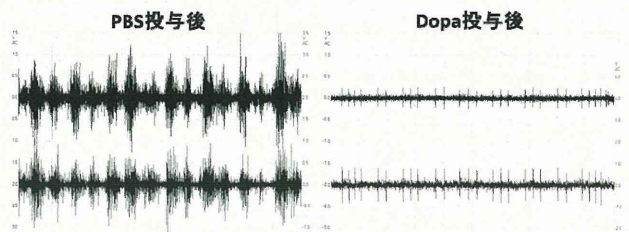
これまで、*Spr-KO* マウスは生後 3 週齢前後で多くのマウスが死んでしまうことがわかっていました。*Spr-KO* マウスの生存期間を延長させるために、マウスの遺伝的背景を C57Black/6 から Balb/C 系に変えたところ、顕著に生存期間が延長し半数近くのマウスが生後 8 週齢を超えて生存させることができました。さらに、C57Black/6 と Balb/C の F1 世代のマウスを調べたところ、3 ヶ月 (12 週齢) での生存率が約 60% にまで増加し、12 ヶ月齢でも生存しているマウスを得ることができました。

成獣となった *Spr-KO* マウスには、いくつかの特徴的なフェノタイプが認められた。一つは胸椎の前屈である。すべての成獣 *Spr-KO* マウスで認められパーキンソン病患者や高齢者で見られる背骨の屈曲と関連があるように思われた。また、眼瞼下垂が認められ、目がほとんど開かない状態であった。さらに、餌を手で抱え込むようにしてずっと食べ続ける異常な食行動がみられた (図 1)。ずっと食べ続けているにもかかわらず、*Spr-KO* マウスの身体は小さくやせこけている。解剖してみると胃の中が餌でいっぱいとなっていたが、胃内に滞留しており胃が膨れた状態となっていた。BH4 を補酵素として要求する一酸化窒素合成酵素の KO マウスでは、肥厚性幽門狭窄 hypertrophic pyloric stenosis が報告されており、*Spr-KO* マウスでも幽門狭窄が起きている可能性が考えられた。



図 1. 成獣 *Spr-KO* マウスの写真
胸椎の屈曲、眼瞼下垂、異常な食行動が認められる

次に成獣 *Spr-KO* マウスに、麻酔下で上腕二頭筋と上腕三頭筋に電極を刺入し、覚醒後に電気信号を記録した。その結果、*Spr-KO* マウスでは動いていないときにも phasic な上腕二頭筋と上腕三頭筋の同期した収縮が観察された。このような同期した収縮は、野生型マウスでは観察されなかった。さらに、L-Dopa 投与の影響を検討したところ、L-Dopa 投与により拮抗筋の同期した収縮が消失することが判明した (図 2)。この顕著な拮抗筋の同期した収縮がパーキンソン病の固縮を反映するものであるか、今後さらに解析を進めていく。



上段：上腕二頭筋、下段：上腕三頭筋、1 sec/div

図 1. *Spr-KO* マウスから記録された筋電図の 1 例

D. 考察

2001 年に初めてヒト SPR 欠損症の患者が報告された。SPR 欠損症患者は、筋緊張低下、ジストニア、認知機能障害などを示し、運動障害はドーパ投与により劇的に改善した。一方、肝臓でのフェニアラニン代謝障害はみられず、血中フェニアラニン値は高値を示さなかった。患者脳脊髄液の分析では、ドーパミン代謝産物の HVA とセロトニン代謝産物の 5HIAA が低値で、脳内モノアミンが欠乏していると考えられる。

我々は、ビオプテリン部分欠乏マウスモデルとして *Spr-KO* マウスの解析を行ってきた。これまでに、*Spr-KO* マウスではビオプテリン量が野生型のおよそ 4 分の 1 に低下していること、脳内ドーパミンは、新生仔の段階では野生型の約 50% であるが、生後 3 週頃まで野生型で見られるドーパミンとチロシン水酸化酵素 (TH) タンパク質の

急激な増加が *Spr-KO* マウスでは起こらず、生後 3 週齢では *KO* マウスのドーパミン量は野生型の 20%程度にとどまることを報告した。

ビオプテリン生合成 2 番目の酵素（ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素；PTS）の *KO* マウスは生後 2 日以内に死んでしまうが、ノルアドレナリンニューロン特異的に *Pts* を発現させることにより生存させることができる *DPS-Pts-KO* マウスでは、Beam テストで四肢協調運動の障害が観察され、線条体ではストリオゾーム優位の TH タンパク質量の減少が認められた。一方、*Spr-KO* マウスでは *DPS-Pts-KO* マウスのようなストリオゾーム優位な TH タンパク質の減少は観察されず、顕著な運動量の低下と、前肢の震えが観察された。今回観察された拮抗筋の同期した収縮が、固縮を示すものであるかを判断するためには、多面的に慎重に解析する必要がある。

今後さらに解析を行っていき、*Spr-KO* マウスとパーキンソン病との類似点・相違点について解析し、*Spr-KO* マウスが新たなパーキンソン病マウスモデルとしての有用性について確立していくと共に、*Spr-KO* マウスを用いてパーキンソン病の発症機構についてのさらなる解析、新規治療法開発への応用について検討する。

E. 結論

Spr-KO マウスは新たなパーキンソン病マウスモデルとなる可能性があり、今後さらにこのマウスの有用性と応用について研究を進めていく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Homma D, Katoh S, Tokuoka H, Ichinose H (2013) The role of tetrahydrobiopterin and catecholamines in the developmental regulation of tyrosine hydroxylase level in the

brain.

J Neurochem 126(1): 70-81.

2. 学会発表

本間大悟、久保田光、高草木薫、一瀬宏「セピアプテリン還元酵素欠損による運動機能障害の解析」第 28 回日本大脳基底核研究会、2013 年 7 月 20-21 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 なし

パーキンの糖化に対するパーキン関連蛋白の関与

研究分担者 梶 龍児¹⁾

共同研究者 牧(黒田)由紀子²⁾、三ツ井貴夫^{2) 3)}、十河正子²⁾、藤本美希²⁾、川村和之³⁾

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

研究要旨

私達はパーキンと結合しミトコンドリアまで運搬する新規蛋白 Kloklin 1 を見出し分子メカニズムについて報告した。さらに Kloklin 1 は Chondroitin Polymerizing Factor (ChPF) のスプライシング変異体であり ChPF によりパーキンの糖化が促進されることも見出した。本研究では、糖化パーキン蛋白の細胞内局在と機能解析について検討した。His パーキンを培養細胞に導入し、Ni キレートカラム、Q-セファロースカラムで精製した。また、パーキンの E3 活性を検討した。Q-セファロースカラムにより His パーキンは 52KDa と 58KDa の 2 つの分子量を有しており、58KDa パーキンはレクチンが染色され糖化していた。また 58kDa パーキンの E3 活性は 52KDa に比べて低下していた。パーキンは ChPF により糖鎖が付加され、Kloklin 1 と結合してミトコンドリアまで運搬されていることが示唆された。さらに糖化されたパーキンは E3 活性が抑制されていることが示唆された。

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、私達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 Kloklin 1 が存在することを見出した。Kloklin 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、糖化パーキン蛋白の細胞内局在と機能解析について検討した。

B. 研究方法

His パーキンを培養細胞に導入し、Ni キレートカラム、Q-セファロースカラムで精製した。また、His パーキンを導入した細胞からミトコンドリア分画を単離し、トリプシン処理を行い、ミトコンドリア内の細胞内局在を検討した。さらに、パー

キンの E3 活性を in vitro ならびに in vivo において検討した。

C. 研究結果

Q-セファロースカラムにより His パーキンは 52KDa と 58KDa の 2 つの分子量を有していた。また、58KDa パーキンはレクチンが染色され糖化していることが明らかとなった。そしてこの蛋白は抗 O-GlcNAc 抗体で検出された。次に 58KDa パーキンの局在はミトコンドリア内膜のマーカーである ANT1 と同じ挙動でありミトコンドリア内膜に局在することが明らかとなった。さらに 58KDa パーキンの E3 活性は in vivo の系で ChPF を過剰発現させると抑制され、in vitro の系で E3 活性は 52KDa に比べて 58KDa パーキンのほうが低下していた。

図 1

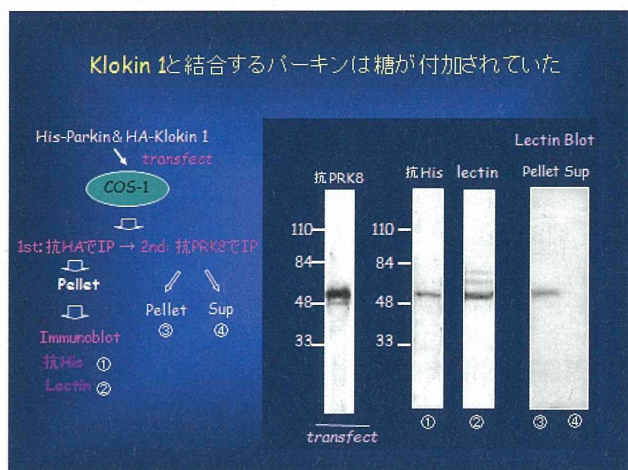


図 1 His-パーキンと HA- Klokin 1 を COS-1 細胞に導入し、まず HA で免疫沈降を行った。その結果、抗 His 抗体で染まる 58KDa のバンドがレクチンで検出された。次に免疫沈降物をグリシン HCl で一度遊離させ抗 PRK8 で免疫沈降すると Klokin 1 と結合しているのは糖化された 58kDa パーキンであった。

D. 考察

本研究結果から、His パーキンは 52KDa と 58KDa の 2 つの分子量を有し、58KDa パーキンはレクチンが染色され糖化していることが明らかとなった。そしてこの蛋白は抗 O-GlcNAc 抗体で検出されたことから O 型糖鎖であると考えられた。次に 58KDa パーキンの局在はミトコンドリア内膜のマーカーである ANT1 と同じ挙動でありミトコンドリア内膜に局在することが明らかとなった。このことからパーキンは ChPF により糖鎖が付加され、Klokin 1 と結合してミトコンドリアまで運搬されていることが示唆された。さらに 58KDa パーキンの E3 活性は *in vivo* の系で ChPF を過剰発現させると抑制され、*in vitro* の系で E3 活性は 52KDa に比べて 58KDa パーキンのほうが低下していた。これらのことから、糖化されたパーキンは E3 活性が抑制されていることが示唆された。

E. 結論

パーキンは ChPF により糖鎖が付加され、Klokin 1 と結合してミトコンドリア内膜まで運搬されていることが示唆された。さらに糖化されたパーキンは E3 活性が抑制されてい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

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. 牧(黒田)由紀子、三ッ井貴夫、藤本美希、十河正子、川村和之、梶龍児：Klokin 1 ファミリーならびにパーキンの細胞死抑制作用 第 54 回日本神経学会総会、2013 年 5 月
2. 三ッ井貴夫、牧(黒田)由紀子、十河正子、藤

本美希、川村和之、乾俊夫、梶龍兒：糖化パーキンソン蛋白の機能解析 第 54 回日本神経学会総会、
2013 年 5 月

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

パーキンソン病における黒質超音波、嗅覚機能検査および

MIBG 心筋シンチグラフィの診断的意義

研究分担者 三輪 英人¹⁾

研究協力者 井澤 真沙江²⁾、梶本 賀義²⁾

1) 順天堂大学医学部附属練馬病院脳神経内科 2) 和歌山県立医科大学神経内科

研究要旨

黒質超音波検査における黒質高輝度変化、嗅覚機能低下、さらに MIBG 心筋シンチグラフィにおける心筋 MIBG 取り込み低下 (H/M 比低下) は、いずれもパーキンソン病 (PD) の早期診断に有用であることが明らかにされている。当該研究では、それらの検査を複数を組み合わせて行うことによりパーキンソン病診断精度が向上し得るかについての検討を行った。PD と診断された患者および健常対照者を対象に黒質超音波検査、嗅覚機能低下、さらに MIBG 心筋シンチグラフィを施行し、それらの検査結果間の関連性について解析した。PD 患者 11 人 (25%) および健常者 4 人 (11%) で黒質の観察不能であった。黒質高輝度陽性は PD 患者 79% および健常者 6.3% で認められ、嗅覚低下は PD 患者 85%、健常者 22% で認められた。MIBG 心筋シンチ H/M 比低下は PD 患者 61% で認められた。3 つの検査間では、嗅覚低下と H/M 比低下の間のみ有意な相関が認められた。黒質高輝度と嗅覚低下を組み合わせると感度および陰性的中率ともに 100% に達し、PD 患者に診断に大きく寄与し得ることが明らかとなった。

A. 研究目的

パーキンソン病におけるレビー小体病理は運動症状が出現する前に脳内のさまざまな部位にすでに進展していることが明らかとなってきた (いわゆる Braak 仮説)。生化学的には、脳内のドパミン含量が健常時の 20% 以下になって始めて運動症状が出現し、この時点で黒質ドパミン神経細胞数は 50% 未満に低下していると推定されている。今後、疾患の進行を遅くする治療 (disease-modifying therapy) または発症を予防する治療方法が実臨床に応用される場合、かなり早期に診断できないと有効性を発揮できない可能性が高い。したがって、発症早期診断または発症前診断に役立つ診断方法の確立は重要な臨床的課題であるといえる。

黒質超音波検査における黒質高輝度変化、嗅覚機能低下、さらに MIBG 心筋シンチグラフィに

における心筋における MIBG 取り込み低下 (心臓/縦隔比 (H/M 比) の低下) などの所見は、いずれもパーキンソン病 (PD) の早期診断に有用であることがこれまでの研究から明らかにされている。当該研究では、それらの検査をそれぞれ単独で行った場合と比較して、複数を組み合わせて行った場合にパーキンソン病の診断精度の向上がもたらされるかどうかについての検討を行うものである。

B. 研究方法

対象は臨床的にパーキンソン病と診断された患者 (N=44、平均年齢 64.9 歳、性別 F/M=27/17) および健常対照者 (N=36、平均年齢 58.4 歳、性別 F/M=19/17)。

黒質超音波検査は臥位にて 2.0MHz の低周波プローブを用いて側頭骨窓より中脳を同定し、黒質

の観察を行なった。当院における施設基準に基づき黒質高輝度面積 $\geq 0.16 \text{ cm}^2$ の場合に黒質高輝度陽性と判定した。中脳全体を明瞭に観察できない場合には黒質の同定は困難であるため、この場合には検査不能と判定した。

嗅覚機能はスティック型簡易嗅覚機能検査 (OSIT-J) を用いて評価を行った。OSIT-J スコア ≤ 8 点の場合に、嗅覚機能低下と判定した。

MIBG 心筋シンチグラフィは施設基準をもとに、H/M 比 ≤ 1.66 を有意な MIBG 取り込み低下と判定した (MIBG 心筋シンチグラフィ検査は当該研究における健常対象者においては施行せず、当院においてこれまでに蓄積された正常値を用いた)。

これらのデータ、および患者プロフィール (年齢、罹病期間、パーキンソン病運動症状重症度など) との間の関係性について統計学的な解析を行った。

当該研究は大学における倫理委員会の承認を取得した後、さらに被験者より文書による同意を得て実施された。

C. 研究結果

パーキンソン病患者 11 人 (25%) および健常者 4 人 (11%) で黒質の観察不能であった。これらの観察不能者を除外し、最終的にパーキンソン病患者 (N=33、平均年齢 64.8 歳、性別 F/M=16/17) および健常対照者 (N=32、平均年齢 57.3 歳、性別 F/M=15/17) において、すべての検査を実施完了できた。

(1) 黒質超音波検査

黒質高輝度面積は、パーキンソン病患者で $0.21 \pm 0.07 \text{ cm}^2$ 、健常対照者で $0.08 \pm 0.06 \text{ cm}^2$ で、パーキンソン病患者において有意な増加が認められた (図 1)。黒質高輝度陽性は PD 患者 26 人 (79%) および健常者 2 人 (6.3%) で認められた。高輝度面積と罹病機関、パーキンソン病の運動症状重症度と有意な相関が認められなかった。

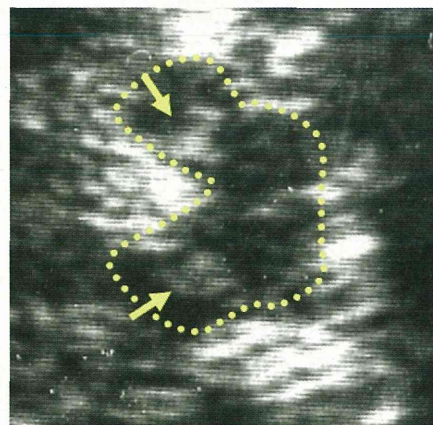


図 1 超音波で観察されたパーキンソン病患者における黒質高輝度 (矢印)。中脳の輪郭を点線で表示している。

(2) 嗅覚機能検査

OSIT-J スコアはパーキンソン病患者で 4.7 ± 3.4 、健常対照者で 10.1 ± 2.6 と有意にパーキンソン病患者で低下していた。有意な嗅覚低下はパーキンソン病患者 28 人 (85%)、健常者 7 人 (22%) で認められた。OSIT-J スコアと罹病期間や運動症状の重症度との間に有意な関連性は見いだされなかった。

(3) MIBG 心筋シンチグラフィ

H/M 比はパーキンソン病患者で 1.67 ± 0.37 、健常対照者で 2.10 ± 0.22 と、パーキンソン病患者で有意に低下していた。有意な H/M 比低下はパーキンソン病患者 20 人 (61%) で認められた。H/M 比の低下と運動症状の重症度との間に関連性は見いだされなかった。

(4) 各検査間の相関

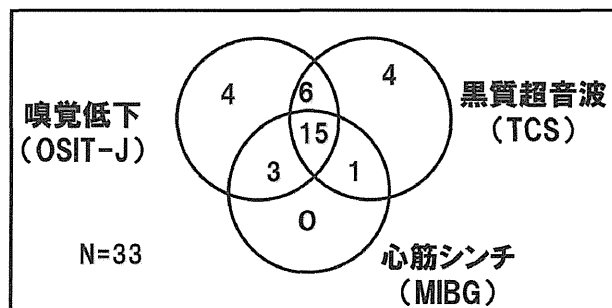
黒質高輝度と OSIT-J または H/M 比の間に有意な相関は認められなかった。OSIT-J と H/M 比の間には緩やかな、しかし有意な相関が認められた。

3 つの検査間では、嗅覚低下と H/M 比低下の間のみ有意な相関が認められた。黒質高輝度と嗅覚低下を組み合わせると感度および陰性的中率ともに 100% に達し、パーキンソン病患者に診断に大きく寄与し得ることが明らかとなった。

図 2 にパーキンソン病 33 症例における各検査の陽性分布を表示した (図 2)。33 例中 15 例に

において、嗅覚低下、黒質高輝度、および MIBG 取り込み低下のすべてが陽性であった。心筋 MIBG 取り込み低下のみを呈した患者はいなかった。一方で全例において嗅覚低下または黒質高輝度が認められており、これらの 2 検査を組み合わせると感度は 100%に到達した。

図 2



D. 考察

本研究の結果、嗅覚機能検査および黒質超音波検査を組み合わせることで、パーキンソン病患者における診断感度がきわめて高くなることが明らかとなった。

病理学的背景を考えた場合、嗅覚低下は嗅球における神経変性が主たる要因であり、心筋 MIBG 取り込み低下は心臓交感神経線維終末の変性によるものと考えられている。いずれもレビー小体病理の進展に伴って生じる非運動系バイオマーカーと位置づけられる。嗅球の変性がレビー小体病理の最初期病理変化であるとする Braak 仮説をもとにするならば、嗅覚低下の陽性率が極めて高いことも矛盾ないものと考えられる。一方、黒質高輝度変化の原因はいまだ不明である。これまでの研究報告からはドパミン神経の変性の結果を反映したものではない、と考えられている。さらに機能画像研究よりドパミン神経の変性と無関係であることもわかってきた。パーキンソン病の重症度や罹病期間とも相関せず、黒質高輝度は経年的に変化しないことも報告されている。いまだ仮説の域を出ないものの、黒質高輝度変化は、体質的な鉄沈着（背景には何らかの鉄代謝の異常

が想定されている。たとえばセルロプラスミンも一つの候補として注目されている) と関連したドパミン神経細胞の脆弱性を示すマーカーであると位置づけられている。したがって、レビー小体病理のマーカーと鉄代謝異常のマーカーという二つの異なるマーカーを合わせ検討することで診断感度が向上したという本研究結果は容易に受け入れやすいと言えよう。

パーキンソン病の進行抑制をめざした治療が開発されつつある現在、同病を早期診断すること、または発症リスクが極めて高い潜在発症者を見出す戦略として、これらの二つの検査は実践的有用性があるといえるかもしれない。

E. 結論

黒質超音波検査と嗅覚機能検査はパーキンソン病患者の診断に相補的役割を有する。黒質超音波検査が実施可能な例においては、両者の組み合わせが診断精度向上に、さらに早期診断に寄与するものと期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Izawa MO, Miwa H, Kajimoto Y, Kondo T. Combination of transcranial sonography, olfactory testing, and MIBG myocardial scintigraphy as a diagnostic indicator for Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 2012; 19 (3): 411-416.

井澤真沙江、三輪英人、近藤智善：パーキンソン病における系頭蓋黒質超音波検査. *神経内科* 74: 310-318, 2011

井澤真沙江、三輪英人：パーキンソン病と中脳エコーの変化. *Brain & Nerve* 65: 413-422, 2012

2. 学会発表

三輪英人：パーキンソン病の経頭蓋超音波診断. シンポジウム：パーキンソン病の初期診断、第 54

回日本神経学会学術大会、東京、5月、2013

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得
- 2.実用新案登録
- 3.その他

パーキンソン病におけるレム期睡眠行動異常症

研究分担者 中島 健二
研究協力者 野村 哲志¹⁾

1) 鳥取大学医学部脳神経医科学講座脳神経内科分野

研究要旨

レム期睡眠行動異常症(RBD)のパーキンソン病(PD)における意義を検討する為、82人のPD患者をRBD症状、RWAの有無により三群に分けて臨床症状を比較した。PD with clinical RBD 27人、PD with subclinical RBD 23人、PD with normal REM sleep 32人に分けられたが、PD with clinical RBDはPD症状が重症で、内服レボドパ換算量が多く、起立性低血圧を有する例が多かった。多変量解析ではRBDに内服レボドパ換算量と起立性低血圧が関連する因子であった。認知症への進展は Kaplan-Meier 生存曲線にて PD with clinical RBD が PD with normal REM sleep より有位に高く、RBDの存在が認知症への優位な関連因子となった。RBDはPDの病前症状だけでなく、病状進展促進因子の可能性も考えられた。

A.研究目的

レム期睡眠行動異常症(RBD)は神経変性疾患での合併が多く、シヌクレイノパチーへの前駆症状とも考えられている。パーキンソン病(PD)患者におけるRBDによる運動症状、自律神経症状、認知機能障害等の臨床症状を比較し、認知症への進展に関してフォローアップ調査を行った。

B.研究方法

82人のPD患者(男性36人、女性46人、74.3±7.2歳、罹病期間7.1±7.0年、Hohen&Yahr 2.6±0.8)にRBD症状に関する質問とPSGを施行し、RWAの有無を確認した。RWAがありRBD症状を有する例をclinical RBD、RWAはあるが、RBD症状がない例をsubclinical RBD、RWAのない例をnormal REM sleepとしてPDを三群(PD with clinical RBDとPD with subclinical RBDとRBD with normal REM sleep)に分けて臨床症状の比較を行った。その後認知症進展に関してフォロー調査も施行した。

C.研究結果

PD with clinical RBD 27人、PD with subclinical RBD 23人、PD with normal REM sleep 32人に分けられたが、三群間で年齢、性別、PD罹病期間、パーキンソン病の病型(振戦型、非振戦型)、認知機能に差はなかったが、PD with clinical RBDはPD症状が重症で、内服レボドパ換算量が多く、起立性低血圧を有する例が多かった。多変量解析による検討ではRBDに内服レボドパ換算量と起立性低血圧が関連する因子であった。21.4±10.8カ月後のフォロー期間にて死亡率には差はなかったが、認知症への進展は Kaplan-Meier 生存曲線にて PD with clinical RBD が PD with normal REM sleep より有位に高かった(p=0.013)。さらに、コックスハザード回帰分析ではRBDの存在が認知症への優位な関連因子となった。RBDの発症時期はPD発症後4.1±8.7年であり、PD発症前が8人、PD発症後が22人であった。PD発症前と発症後にRBD出現例の臨床背景を比較すると、PD発症後RBD出現例が

PD 罹病期間が長く、重症が高く、薬剤内服量が多い傾向にあった。また、起立性低血圧や認知症を有している例も多い傾向にあった。

D.考察

PD 患者においても RBD はパーキンソン症状の増悪因子であると共に PDD への進展のリスクとなっていた。RBD はシヌクレイノパチーの病前症状だけでなく、病状進展促進因子の可能性も考えられた。PD 発症後に RBD 出現例の方が運動症状、自律神経症状、認知機能が増悪する傾向にあり、出現時期により RBD の出現時期も重要である可能性が示唆された。

E.結論

PD において RBD は病状進展因子の可能性があり、RBD 症状出現が PD 発症前後の相違で PD 症状進展に相違があるかもしれない。

F.健康危険情報

特になし。

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

Nomura T, Inoue Y, Kagmiura T, Nakashima K.
Clinical significance of REM sleep behavior disorder in Parkinson's disease. Sleep Med 2013; 14: 131-5.

2. 学会発表

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

パーキンソン病患者における血中ビタミン濃度について

研究分担者 野元 正弘¹⁾

研究協力者 辻井智明¹⁾, 岩城寛尚¹⁾, 西川典子¹⁾, 永井将弘¹⁾, 菅能麻梨子¹⁾, 久保円¹⁾,

1) 愛媛大学大学院医学系研究科 薬物療法・神経内科

研究要旨

パーキンソン病 (PD) 患者は、健常人に比べ、末梢神経障害を有意に合併しているという報告がある。その原因として、血中ビタミン B12 (VB12) 値の低下が考えられている。今回我々は、当科入院患者において、血中 VB12 値を測定し、L-dopa 投与量や年齢、腎機能等との関連について検討した。2011/5～2013/10 までの当科入院患者を対象とし、PD 群 25 名、非 PD 群 86 名を検討した。L-dopa 投与量が多くなるに連れて血中 VB12 値は低下し、Hcy 値は上昇していた。しかし PD 群において、大球性貧血やニューロパチーは見られなかった。非 PD 群においては、血中 Hcy 値と VB12 値、葉酸値との間に負の相関が認められたが、PD 群においては血中 VB12 値、Hcy 値、葉酸値、VB1 値の間に相関を認められず、PD の病態や L-dopa 投与との関連が推測された。

A. 研究目的

パーキンソン病 (PD) 患者は、健常人に比べ、末梢神経障害を有意に合併しているという報告がある。その原因として、血中ビタミン B12 (VB12) 値の低下が考えられている。

今回我々は、当科入院患者において、血中 VB12 値を測定し、L-dopa 投与量や年齢、腎機能等との関連について検討した。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

2011/5～2013/10 までの当科入院患者を対象とした。血中 VB12 値、VB1 値、homocysteine (Hcy) 値、葉酸値を測定し、PD 群と非 PD 群とに分けて検討した。PD 群においては、L-dopa 投与量、年齢、BMI、アルブミン、総コレステロール、クレアチニンなども検討した。また、入院前の全身状態が不良の患者や脚気など低栄養による神経障害を発症した患者、ビタミン剤を内服又は点滴

人であった。平均年齢は 57.4 歳で、PD 群は 63 歳、非 PD 群 55.9 歳であった。男女比は男性 46 人と女性 65 人で、PD 群では 10 人 : 15 人、非 PD 群 36 人 : 50 人であった。

PD 群において、L-dopa 投与量は平均 408mg で、0～800mg と、denovo 患者を含んでおり、罹病期間は平均 8.2 年 (0.7～18.4 年) であった。

C. 研究結果

①血中 VB12 値、Hcy 値、VB1 値、葉酸値において、PD 群と非 PD 群とで群間比較を行ったが、いずれにおいても Mann-Whitney の U 検定では優位差を認めなかった。VB12 のみ PD 群で低値となる傾向が見られた。(表 1)

②PD 群において L-dopa 投与量と血中 VB12 値、Hcy 値、VB1 値、葉酸値との関係を検討した。L-dopa 投与量が増加するに連れて、VB12 値は低下し ($R^2=0.3985$, $p<0.001$)、Hcy 値は上昇して