

Perry（ペリー）症候群の実態、病因・病態の解明と治療法開発研究

研究分担者 今居 譲

順天堂大学大学院医学研究科神経変性疾患病態治療探索講座 先任准教授

研究要旨

モデル動物を用いて DCTN1 の疾患型変異による神経変性病態機序の解明を行うことを目的とする。DCTN1 は逆行性微小管輸送を制御するダイニンモーター複合体の一つであるが、Perry 症候群の変異により微小管との結合能が失われる。すなわち、逆行性微小管輸送の機能異常が、本疾患の病態の原因となると考えられる。ショウジョウバエモデルによる本疾患の病態の再現と、病態の緩和を目的とした遺伝子操作を試み、神経機能への影響を行動解析と組織化学的解析により検討した。

A．研究目的

これまでにドーパミン神経特異的に Perry 症候群の病因変異体 DCTN1 を発現するトランスジェニックショウジョウバエおよび DCTN1 のノックダウンバエを作製し、活動リズムの異常、入眠障害を検出していた。この観察は、DCTN1 の病因変異体がドーパミン神経機能に影響を及ぼすことにより生じると考えられた。

病因変異体 DCTN1 が神経機能に及ぼす影響を行動レベル、分子レベルで明らかにするために、睡眠覚醒リズムの測定、幼虫運動神経の神経軸索および神経筋接合部位を用いての神経終末の形態変化、オルガネラ、神経分泌顆粒の分布の変化を明らかにすることを目的とした。

さらに TDP-43 の蓄積が神経変性の本態であるかどうかを遺伝学的に解明することを目指した。

B．研究方法

ヒトおよびバエ DCTN1 の野生型および病因変異体のトランスジェニックショウジョウバエを作製した。ヒト DCTN1 がバエで生理的に機能するかどうかは、DCTN1 のノックアウトバエにヒト DCTN1 を導入し、その致死表現型を抑制するかどうかで評価した。

ショウジョウバエの活動リズムは、Drosophila activity monitoring system を用いて、3 日分の平均値として計測した。

ショウジョウバエ三齢幼虫の神経筋接合部位の免疫組織学的解析により、病因変異発現バエのミトコンドリア、エンドソーム、リソソームの局在変化の有無を観察した。

C．研究結果

バエに導入したヒト DCTN1 は、DCTN1 ノックアウトバエの致死性を抑圧できなかったことから、生理的に機能しない可能性が考えられた。そこで、以降はバエの DCTN1 オルソログ Glued とその病因変異体を用いて病態機序の解明を行った。

DCTN1 の病的変異により DCTN1 の微小管結合能が喪失するため、本疾患はハプロ不全に起因する可能性が考えられ、ノックダウンショウジョウバエの解析も同時に進めた。その結果、ドーパミン神経特異的に Glued をノックダウンしたバエは睡眠覚醒リズムに異常が見られた。すなわち、夜間の活動量が増加し、睡眠量が減る傾向にあった（図 1）。バエ TDP-43 ホモログ TBPH をドーパミン神経特異的にノックダウンしたバエにおいても日中の活動量が増加した（図 2）。また、ドーパミン神経特異的に DCTN1 の野生型、Perry 型変異（G50R）、MND 型変異（G38S）を発現したバエにおいても、日中の活動量が増加した（図 2）。TBPH のドーパミン神経特異的な強制発現は致死となった。

Glued Perry 型変異体、野生型 TBPH を強制発現した神経筋接合部位において、神経終末の肥大・ボタンの数の増加、ミトコンドリア分布の異常を認めた（図 3）。これは、正常な神経軸索輸送が阻害されたためと考えられ、正常な神経伝達が行われていない可能性が組織学的にも明らかとなった。また、Glued G50R が内在性の Glued を阻害するドミナントネガティブ変異体としても、病態機序に關与する可能性が示唆された。

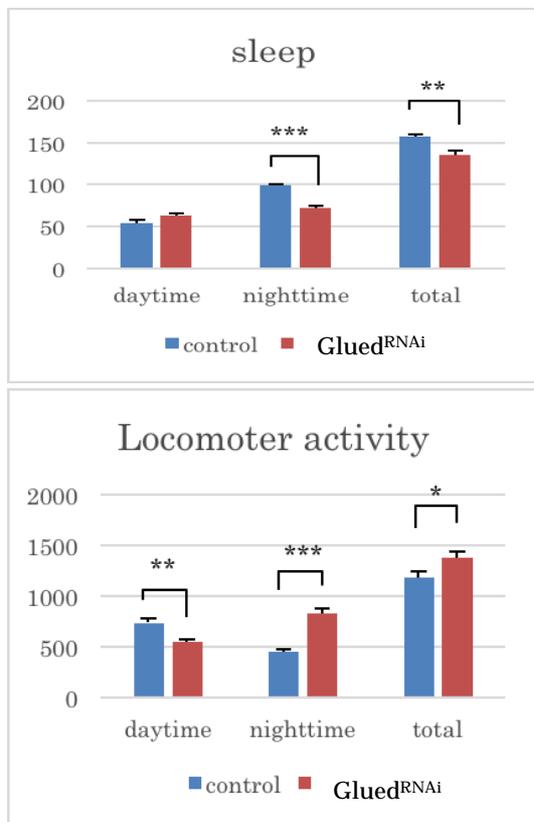


図1. DCTN1のハエホモログであるGluedのドーパミン神経特異的なノックダウンは、睡眠の低下および活動量の増加を導く。上段：5分以上活動がない状態を睡眠と定義しその総時間を縦軸として示す。下段：測定容器内の赤外線を横切る回数を活動量とし、縦軸に示す。***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

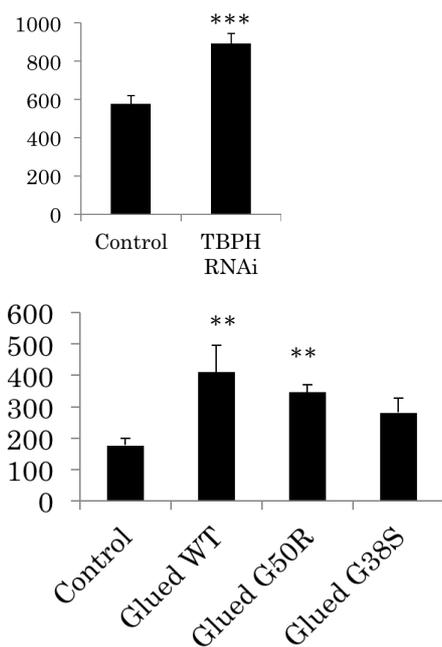


図2. ハエTDP-43ホモログTBPHノックダウンおよび野生型および疾患型Gluedのドーパミン神経特

異的な発現による明期の活動量の変化
測定容器内の赤外線を横切る回数を活動量とし、縦軸に示す。***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$ vs. Control.

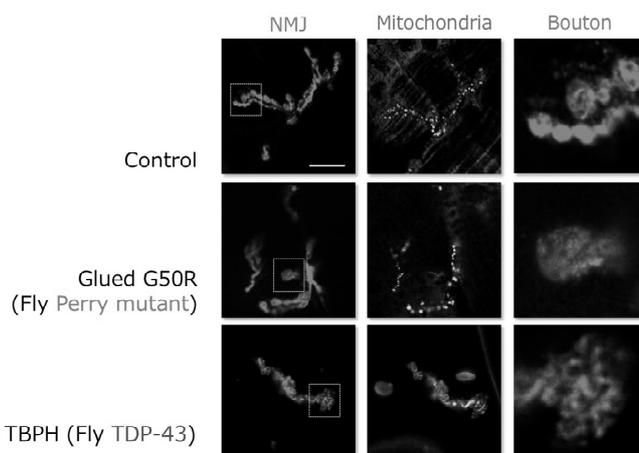


図3. 神経筋接合部位 (NMJ) における神経終末ボタンの形態とミトコンドリアの分布
ハエDCTN1病変変異体 (Glued G50R) およびハエTDP-43 (TBPH) の強制発現により、ボタンの肥大 (Glued G50R) およびボタンの異常増殖 (TBPH) が観察された。ボタンの形態異常とともにミトコンドリアの分布異常も観察された。

(倫理面への配慮)

本研究ではモデル動物としてハエを作製したが、動物実験計画、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、P1A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オートクレーブ処分し拡散の防止に努めた。

D. 考察

ショウジョウバエモデルを解析することにより、培養細胞だけでは明らかにすることが困難であった、行動解析、神経組織学的、遺伝学的解析が可能となった。DCTN1 病変変異体を導入した培養細胞の結果から、神経軸索輸送の障害は、ミトコンドリアのみならずリソソーム、後期エンドソームの分布異常とオートファジー不全を引き起こす可能性が考えられる。現在、この可能性を検討するためにリソソーム、後期エンドソームの分布とオートファジー異常、TDP-43の蓄積との関係性に関して、ショウジョウバエモデルの神経組織学的、分子遺伝学的解析を進めている。

E. 結論

ハエDCTN1病変変異体を導入したハエにより、行動異常、神経機能異常など病態を反映する表現型を観察した。ハエTDP-43オルソログは、遺伝子の発現を増大・減少、いずれの場合も神経機能に重篤な影響を及ぼすことが明らかとなった。遺伝学的にTDP-43がDCTN1と相互作用をするかどうか、相互作用する場合は遺伝学的な位置関係を明らかにする必要はある。

F . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) 今居 讓 . パーキンソン病up date モデルショウジョウバエを用いた遺伝性若年性パーキンソン病の研究、自律神経 50: 13-15, 2013
- 2) 澤田知世, 今居 讓, 高橋 良輔. 特集2、細胞内小器官と神経難病 -ミトコンドリア病としてのパーキンソン病, 脳21 16: 65-70, 2013
- 3) Kahori Shiba-Fukushima, Tsuyoshi Inoshita, Nobutaka Hattori, Yuzuru Imai: PINK1-mediated phosphorylation of Parkin boosts Parkin activity in *Drosophila*. *PLoS Genet.* in press.

2 . 学会発表

- 1) Umezaki Y, Yoshii T, Helfrich-Förster C, Tomioka K, Hattori N, Imai Y: Analysis of rest-activity rhythms of aged flies and Parkinson's disease model. Neuro2013. Kyoto, 22nd Jun. 2013
- 2) 梅崎勇次郎、吉井大志、今居 讓、Charlotte Helfrich-Förster、富岡憲治、服部信孝: パーキンソン病モデルショウジョウバエの睡眠覚醒リズム異常の検討. 第 54 回日本神経学会学術大会 ポスター 東京、2013 年 5 月 29 日

G . 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
今居 譲	パーキンソン病update モデルショウジョウバエを用いた遺伝性若年性パーキンソン病の研究	自律神経	50	13-15	2013
澤田知世, 今居 譲, 高橋 良輔	特集2、細胞内小器官と神経難病 -ミトコンドリア病としてのパーキンソン病	脳21	16	65-70	2013
Kahori Shiba-Fukushima, Tsuyoshi Inoshita, Nobutaka Hattori, Yuzuru Imai	PINK1-mediated phosphorylation of Parkin boosts Parkin activity in <i>Drosophila</i> .	<i>PLoS Genetics</i>			印刷中