

### 研究要旨

本分担研究では、運動神経細胞及びドパミン神経細胞の選択的な細胞死を呈するペリー症候群の分子病態を解明するため、2種類の培養細胞ライン（HeLa細胞、SH-SY5Y細胞）へのペリー症候群責任遺伝子産物 p150glued の細胞死への影響を検討した。

まず、ペリー症候群責任遺伝子 p150glued をコードした野生型及び変異型プラスミド DNA（哺乳類細胞発現ベクター使用）を作製し、培養細胞に導入し、核形態およびトリパンブルー exclusion 試験により細胞死を検討し、ウェスタンブロッティングにて各種アポトーシス関連蛋白の活性化を評価した。同様の実験を p150glued siRNA ノックダウン条件下でも施行した。以上の実験から、変異型 p150glued 強制発現では、caspase-9/caspase-3 の活性化および Annexin V/propidium iodide 陽性細胞の増加を認めたことから、内因性カスケードの活性化によるアポトーシス誘導を確認した。また p150glued siRNA ノックダウンでは、caspase-8 の活性化を認め、同現象は pan caspase inhibitor である zVAD および caspase-8 inhibitor にて著明に抑制されたことから、外因性アポトーシス経路の活性化が示唆された。さらに同条件を同時に施行したところ、変異型 p150glued の単独過剰発現に比し、更なるアポトーシスの増加を認めたことから本疾患では gain-of-toxic function および loss-of-function の両者が関与していることが示唆された。

#### A．研究目的

p150glued の野生型、変異型遺伝子をコードするプラスミドを培養細胞に導入し、細胞死を評価することにより、ペリー症候群の病態生理を明らかにすることを目的とする。

#### B．研究方法

##### I. 蛍光顕微鏡観察による細胞死評価

変異型 GFP-p150glued construct を作製し、HeLa 細胞への導入を行う。細胞死は下記に示す様々な方法で行った。まず、野生型 p150glued、変異型 p150glued (G59S、G71R) を 6-well plate に播いた HeLa 細胞に、lipofectamine 2000 (1 ul/1ug plasmid DNA) を用いて遺伝子導入した。

24 時間後にトリプシン処理し、トリパンブルー染色を施行しトリパンブルー陽性細胞を細胞死陽性とカウントした。さらに GFP 陽性細胞の中で、核型の変化により細胞死を評価した。

##### II．フローサイトメーターによる細胞死評価

GFP でタグされた変異型 p150glued を HeLa 細胞に導入し、24 時間後に Annexin V/PI 染色を用いてアポトーシスの評価を行った。

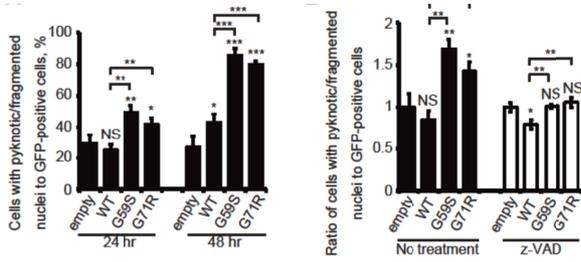
##### III.

（倫理面への配慮）

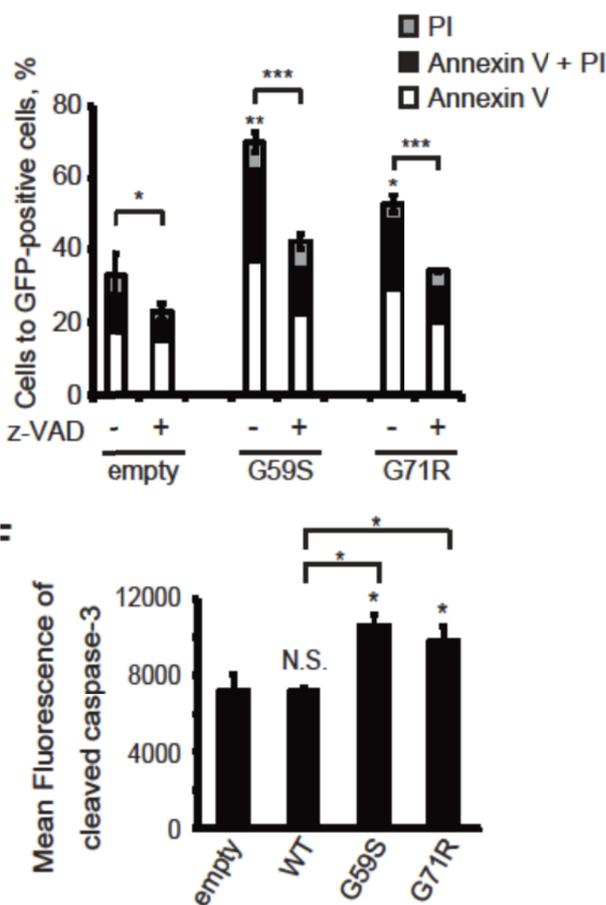
遺伝子組み換え実験については順天堂大学倫理委員会より承認を得、行った。

C. 研究結果

結果 1 :



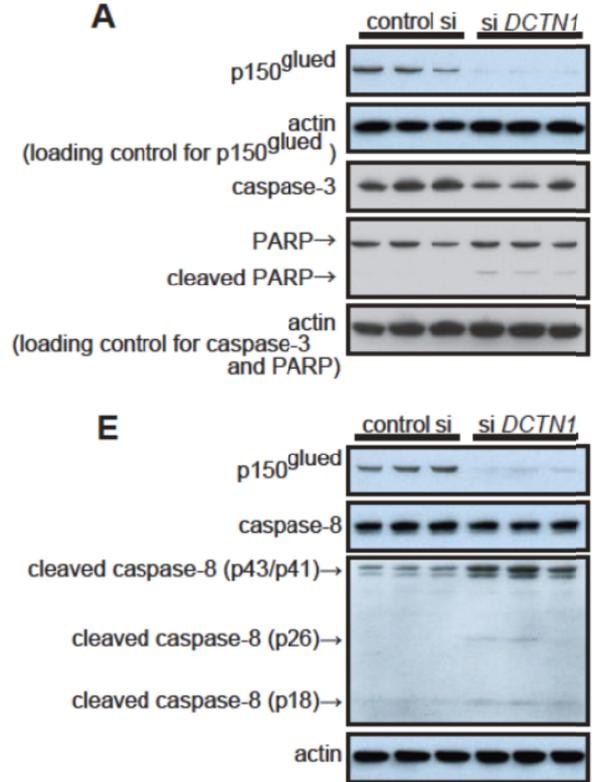
上図 A のように変異型 p150glued 過剰発現により、24 時間後の細胞核の変形に基く細胞死の著



明な増加を認める。

フローサイトメーターによる評価。上図は Annexin V/PI 染色結果であり、G59S または G71R の強制発現により著明なアポトーシス陽性細胞を認めるが、zVAD 投与により有意に抑制される。さらにアポトーシスの有無を確認するため、cleaved caspase-3-Alexa594 染色を行い、GFP 陽性細胞での cleaved caspase-3 の平均蛍

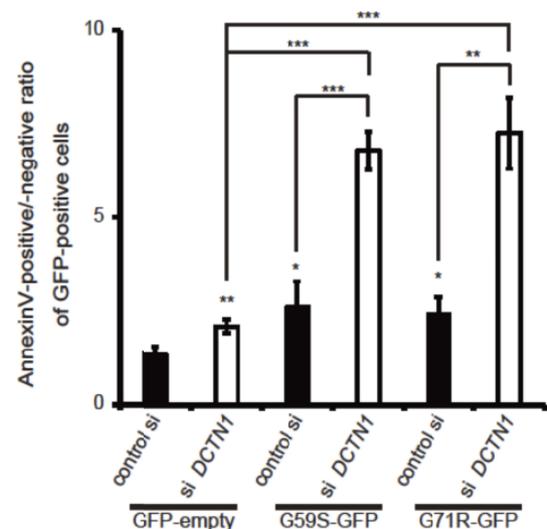
光強度を測定したところ、変異型 p150glued 導入細胞にて有意な上昇を認めた。



結果 2 :

上図は p150glued siRNA ノックダウンによるアポトーシス関連蛋白の活性化を評価したもの。siDCTN1(p150glued)により有意に caspase-3 level が減少し、cleaved PARP が上昇している。さらに cleaved caspase-8 level が著明に上昇している。

結果 3 :



図のように siRNA と p150glued 強制発現を同時に施行した場合、siDCTN1 条件下での G59S または G71R の強制発現により、Annexin V/PI 陽性細胞数が著明に増加した。

#### D. 考察

変異型 p150glued 強制発現により内因性アポトーシス経路の活性化が確認された。過去の報告では変異型 p150glued 強制発現により生じた凝集物が、ミトコンドリアを巻き込んで存在するという報告もあり、本研究でも膜電位の低下したミトコンドリアの増加を認めたことから、同現象に続く内因性経路の活性化が示唆された。さらに p150glued siRNA ノックダウンにより、caspase-8 を含む外因性経路の活性化も確認されたため、本疾患分子病態において、両者が併存してアポトーシスを誘導している可能性が考えられた。

#### E. 結論

ペリー症候群分子病態において、gain-of-function および loss-of-function 両者のアポトーシスへの関与が示唆された。

#### 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

1) Hatano T, Hattori N, Kawanabe T, Terayama Y, Suzuki N, Iwasaki Y, Fujioka T; Yokukansan Parkinson's Disease Study Group. An exploratory study of the efficacy and safety of yokukansan for neuropsychiatric symptoms in patients with

Parkinson's disease. J Neural Transm. 2014 Mar;121(3):275-81.

2) Kamagata K, Tomiyama H, Hatano T, Motoi Y, Abe O, Shimoji K, Kamiya K, Suzuki M, Hori M, Yoshida M, Hattori N, Aoki S. A preliminary diffusional kurtosis imaging study of Parkinson disease: comparison with conventional diffusion tensor imaging. Neuroradiology. 2014 Mar;56(3):251-8.

3) Yoritaka A, Shimo Y, Takanashi M, Fukae J, Hatano T, Nakahara T, Miyamoto N, Urabe T, Mori H, Hattori N. Motor and non-motor symptoms of 1453 patients with Parkinson's disease: prevalence and risks. Parkinsonism Relat Disord. 2013 Aug;19(8):725-31.

#### 2. 学会発表

1) 波田野琢 .徐放薬剤を用いたパーキンソン病の治療戦略、ランチョンセミナー LS(3)-3, 第 54 回日本神経学会学術大会、2013 年 5 月 31 日、東京

2) Hatano T, Kubo SI, Nijima-Ishii Y, Sugita H, Hattori N. Levodopa-responsive Parkinsonism following bilateral putaminal hemorrhages, MDS 17<sup>th</sup> International Congress, June 16-20, 2013, Sydney, Australia

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

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（波田野 琢）

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
Hatano T, Hattori N, Kawanabe T, Terayama Y, Suzuki N, Iwasaki Y, Fujioka T, Yokukansan Parkinson's Disease Study Group.	An exploratory study of the efficacy and safety of yokukansan for neuropsychiatric symptoms in patients with Parkinson's disease	J Neural Transm.	121	275-81	2014
Kamagata K, Tomiyama H, Hatano T, Motoi Y, Abe O, Shimoji K, Kamiya K, Suzuki M, Hori M, Yoshida M, Hattori N, Aoki S.	A preliminary diffusional kurtosis imaging study of Parkinson disease: comparison with conventional diffusion tensor imaging	Neuroradiology	56	251-8	2014
Yoritaka A, Shimo Y, Takanashi M, Fukae J, Hatano T, Nakahara T, Miyamoto N, Urabe T, Mori H, Hattori N	Motor and non-motor symptoms of 1453 patients with Parkinson's disease: prevalence and risks.	Parkinsonism Relat Disord.	19	725-31	2013