

「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく診断・治療に向けた新技術の創出」

平成 19 年度採択研究代表者

高橋 良輔

京都大学大学院医学研究科・教授

## パーキンソン病遺伝子ネットワーク解明と新規治療戦略

### §1. 研究実施の概要

パーキンソン病の成因には小胞体ストレス、酸化ストレス、ミトコンドリア機能低下、タンパク質分解系(ユビキチン・プロテアソーム系、オートファジー・リソソーム系)障害、細胞骨格の異常等が複雑に絡み合っていると考えられる。当チームの目標は家族性パーキンソン病の病因遺伝子および関連遺伝子に多重変異を持つマウス、メダカ、ニワトリBリンパ球細胞株 DT40 を作製してパーキンソン病の複合病態をもたらす遺伝子ネットワークを解明するとともに、作製したモデルをツールとして新規治療法開発のシーズを見出すことである。本年度はパーキンソン病 (PD) と小胞体ストレスシグナル伝達系の解析に有用な毒物 (MPTP, タンパク分解酵素阻害薬) 誘発性パーキンソン病動物・細胞モデルや遺伝子改変メダカ (PINK1, NURR1, ATF6 $\alpha$ 、ATF6 $\beta$ 、PERK、IRE1 $\alpha$ ) の作成と解析を行い、小胞体ストレス制御に基づく新規治療薬候補を見出した。

研究代表者高橋はチーム全体を統括するとともに、自らの研究グループを率いて MPTP によるドパミン神経細胞死においてリン酸化 ATF6 $\alpha$  が神経保護的に働くことを見出した。また、プロテアソーム阻害、リソソーム阻害によるパーキンソン病モデルメダカを確立した。

武田グループはニワトリBリンパ球細胞株 DT40 を用いて、常染色体劣性パーキンソン病の原因遺伝子 DJ-1 および PINK1 を破壊した細胞を作製した。DJ-1 欠損 DT40 細胞ではミトコンドリアの膜電位が低下しており、DT40 がモデル細胞として有用であることが示唆された。

森グループは、メダカおよびニワトリ DT40 細胞でも、小胞体シャペロンの転写誘導が ATF6 によって制御されていることを明らかにし、これらがパーキンソン病発症機構の解析において極めて有用なモデルとなることを示した。

服部グループは新規家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物 ATP13A2 がリソソーム機能に重要な分子であることを見出し、パーキンソン病の病態におけるタンパク分解異常の新たな機構を提唱した。

木下グループは凝集体形成の病態メカニズムを探索した。細胞骨格蛋白質セプチンの過剰発

現マウスと欠損マウスを用いて、セプチンの過剰が凝集や神経毒性をもたらすのではなく、サブユニット間の量的不均衡が凝集体を形成させることを示すデータを得た。

堀グループは ATF6 および PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 経路を活性化するタンゲレチンのほか、PERK-ATF4 経路の選択的活性化薬であるサルブリナールもドパミン細胞死抑制効果を有することを明らかにした。更に Herp ノックアウト細胞及びノックアウトマウスの解析から、Herp の欠損が  $\alpha$ -synuclein や MPTP に対して神経保護的に作用すること、その際、PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 経路の系が重要な役割を果すことを明らかにした。

## § 2. 研究実施体制

### (1)「高橋」グループ

① 研究分担グループ長: 高橋良輔 (京都大学大学院医学研究科、教授)

② 研究項目

・家族性パーキンソン病多重遺伝子変異モデルの作製と解析

### (2)「武田」グループ

① 研究分担グループ長: 武田 俊一 (京都大学大学院医学研究科、教授)

② 研究項目

・メダカでの遺伝性パーキンソン病モデルの樹立

・遺伝子破壊が確実にできるニワトリ B リンパ細胞株 DT40 を使った小胞体ストレス応答機構の解析

### (3)「森」グループ

① 研究分担グループ長: 森 和俊 (京都大学大学院理学研究科、教授)

② 研究項目

・小胞体ストレス応答欠損個体・細胞を活用したパーキンソン病発症機構の解析

### (4)「木下」グループ

① 研究分担グループ長: 木下 専 (名古屋大学大学院理学研究科、教授)

② 研究項目

・モデルマウスを用いたシヌクレインおよびタウによる神経変性機構と抑制系の解析

### (5)「堀」グループ

① 研究分担グループ長: 堀 修 (金沢大学医薬保健研究域 医学系、教授)

② 研究項目

・小胞体理論に基づく新規リード化合物のスクリーニング

### §3. 研究実施内容

#### A. 高橋グループ

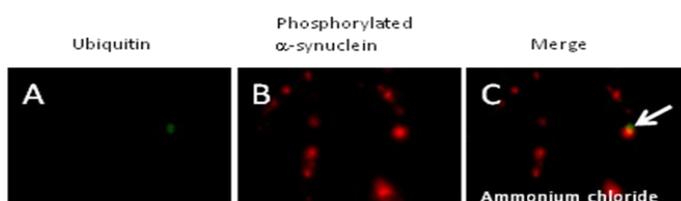
「家族性パーキンソン病多重遺伝子変異モデルの作製と解析」に関して下記を行った

##### a) ATF6 $\alpha$ -KO マウスを用いた毒物誘発性パーキンソン病への小胞体ストレスの検討

1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)は酸化的ストレスによってドパミン神経細胞死を引き起こす。MPTP 誘発性パーキンソン病モデルでは p38MAPK を介して小胞体ストレスセンサーATF6 $\alpha$  が細胞保護的な役割を担っている可能性を示した<sup>A-4</sup>。

##### a) 毒物誘発性・家族性パーキンソン病モデル動物の作製と解析

メダカ脳を様々な種類の薬物に暴露し、プロテアソーム阻害剤(ラクタシスチンおよびエポクソマイシン)、糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシン、オートファジー・リソソーム系の阻害剤であるアンモニウムクロライドがユビキチン陽性の封入体形成を伴う選択的なドパミン神経細胞死を起こすことを明らかにした<sup>A-1,A-2</sup>。また、PINK1, Parkin, ATP13A2 欠損メダカ樹立した。更に共同研究ベースで行った PINK1 欠損ショウジョウバエモデルの解析で進展がみられた<sup>A-3</sup>。



**図 1** : 塩酸アンモニアによるメダカ脳ドパミン神経の封入体形成  
投与 3 日後に少数のユビキチン陽性封入体 (A) と多数のリン酸化シヌクレイン陽性封入体 (B) がみられる。  
(Matsui H, et al. J Neurochem, 2010b)

#### B. 武田グループ

研究目的: メダカおよびニワトリ細胞株 (DT40) を用いた家族性パーキンソン病 (PD) のモデルを作製して病態を解析し、治療薬のシーズ化学物質をスクリーニングするアッセイを樹立する。

方法: 本年は家族性 PD の原因遺伝子を破壊した DT40 細胞を作製し、表現型を解析する。常染色体劣性 PD の原因遺伝子 Parkin、PINK1、DJ-1 の相互作用が近年報告され、さらなる機解析には多重遺伝子破壊が必須である。ニワトリ B リンパ細胞株 DT40 は、多重遺伝子破壊が確実にできる唯一の細胞株である (Buerstedde, J-M., and Takeda, S., *Cell* 67:179-88, 1991)。

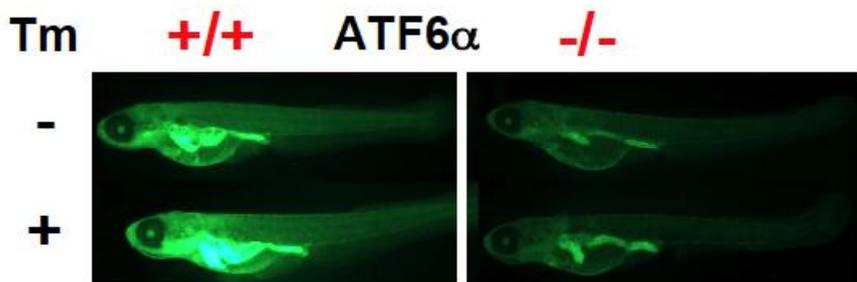
結論: DJ-1、PINK1 を各々破壊した細胞が本年完成した。これらの表現型を解析するために、DT40 細胞でのミトコンドリア形態評価法、ミトコンドリアの単離法と生化学的評価法、ミトコンドリア機能評価法を樹立した。これらの手法を用いて、DJ-1 欠損 DT40 細胞でミトコンドリアの膜電位が低下していることを見いだした。現在ミトコンドリアに関連するその他の表現型や、PD との関連が示唆される各種ストレスへの耐性などを解析している。また、ミトコンドリアの膜電位低下に関連した Parkin・PINK1 の挙動も解析している。

#### C. 森グループ

脊椎動物では、小胞体ストレス応答は 3 つの経路 (IRE1-XBP1、PERK-ATF4、ATF6) によって制御されていると考えられている。これらの小胞体ストレス応答発動因子を破壊したメダカおよびニ

ワトリBリンパ細胞株 DT40 を作製した。また、小胞体シャペロン BiP の第一エクソンを EGFP 遺伝子で置換し、EGFP の発現が BiP プロモーターで制御されるようにした fosmid ベクターを卵に打ち、トランスジェニックメダカを作出したところ、全身が緑に光り、特に肝臓と消化管で強い蛍光を発するメダカが得られた(肝臓と消化管では生理的な小胞体ストレスが誘起されていると考えられる)。さらに水槽にツニカマイシンを添加すると、蛍光が強くなり、このレポーターが小胞体ストレスにตอบสนองすることが示された。

PBiP-EGFP レポータートランスジェニックメダカとノックアウトメダカを交配した。ATF6  $\alpha$  ノックアウトメダカでは、肝臓や消化管における常時の蛍光が弱くなり、ツニカマイシン添加後の蛍光の増強も見られなかった。一方、IRE1  $\alpha$  ノックアウトメダカや PERK ノックアウトメダカでは、野生型の場合とほとんど変化が見られなかった。以上の結果から、メダカでも哺乳類と同様に、ATF6  $\alpha$  が小胞体シャペロンの制御に中心的役割を果たしていると考えられた。ドパミン神経の脆弱性が確認された ATF6  $\alpha$  ノックアウトマウス(Egawa, et al. 2010)において脂肪代謝の異常が起りやすいことを見出した(Yamamoto K, et la. 2010)。



#### D. 服部グループ

パーキンソン病は多因子遺伝性疾患と言われており、遺伝的素因と環境要因が複雑に絡み合って発症する疾患である。当グループは孤発性パーキンソン病における遺伝的リスク・病態の分子遺伝学的検討を多施設との共同研究で行っている D2,D7,D8。遺伝性パーキンソン病に関しては PARK1 と FTDP-17 の症例を報告した D6,D10。また国内で初めて park9 の家系を見出し報告した(Ning et. al. Neurology 2008)。Park9 の患者は常染色体劣性の遺伝形式を呈し、若年発症のパーキンソニスムに錐体路障害、認知機能障害を合併する。ATP13A2 遺伝子の多型変異が孤発性パーキンソン病のリスクファクターとなるか検討し D5、新規遺伝子である PLA2G6 についての臨床病型についても報告した D4,D11。原因遺伝子 ATP13A2 がコードするタンパク質に着目し、その局在やタンパク質の機能について検討したところ、リソソームの機能異常ならびにタンパク分解異常をきたすことが推測された。今年度までの研究により ATP13A2 はリソソームの機能に重要な分子であることが推測され、パーキンソン病の病態におけるタンパク分解異常の新たな機構を見出した。高橋グループと共同で Parkin ノックアウトマウスの行動評価方法を確立し D1、ドパミン分泌障害を見出した D3。また新規パーキンソン病治療薬 zonisamide の抗アポトーシス効果を明らかにした D9。

#### E. 木下グループ

パーキンソン病を特徴付けるレヴィ小体に凝集するセプチン Sept4 が神経毒性を持つ可能性を海外の複数のグループが提唱したが、Sept4 の慢性的蓄積のみではドパミン神経の機能障害や変性は起きないことを Sept4 過剰発現マウスで示した。また、Sept4 をシヌクレインと共凝集させるメカニズムは不明であったが、Sept7 欠損マウス脳において Sept4 凝集体が多発することから、セプチン・サブユニットの量的不均衡が重要であることが示唆された。作製中のドパミン神経特異的 Sept7 欠損マウスにおいてもシヌクレインを巻き込んだ凝集体が多発すれば有用なパーキンソン病モデルマウスになるものと期待される。

#### F. 堀グループ

まず、比較的ヒトのパーキンソン病の病態に近いと考えられている MPTP/プロベネシド慢性投与モデルにおける小胞体ストレス応答(UPR)を評価した。その結果、UPR の主要3経路のうち、Ire1-XBP1 経路は MPTP/プロベネシド投与後に活性化を認めなかったものの、ATF6 及び PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 経路は活性化されることが明らかになった。

続いて、UPR 活性化物質タンゲレチンが同モデルにおいて神経保護作用を示すメカニズムについて検討した。マウスにタンゲレチンを単独投与した所、中脳腹側部において ATF6 及び PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 経路の活性化を認めたが、XBP1 経路の明らかな活性化は認めなかった。一方、グリア細胞のマーカーGFAP 及び Iba1 の発現量には変化を認めなかったことから、タンゲレチンはグリア細胞の活性化を伴うことなく、脳内の UPR、特に PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 及び ATF6 経路を活性化する可能性が示唆された。また、PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 の活性化剤であるサルブリナールも培養細胞系において MPP+誘導性細胞死を抑制した。

更に Herp ノックアウト細胞及びノックアウトマウスの解析から、Herp の欠損が $\alpha$ -synuclein や MPTP に対して神経保護的に作用すること、その際、PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 経路の系が重要な役割を果たすことが明らかになった<sup>F-1</sup>。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

- A-1. Matsui, H., Ito, H., Inoue, H., Taniguchi, Y., Takeda, S., Takahashi, R. (2010)  
Proteasome inhibition in medaka brain induces the features of Parkinson disease.  
**J Neurochem.**, 115:178-87. (doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06918.x.)
- A-2. Matsui, H., Ito, H., Taniguchi, Y., Takeda, S., Takahashi, R. (2010) Ammonium chloride and tunicamycin are novel toxins for dopaminergic neurons and induced Parkinson's disease-like phenotypes in medaka fish. **J Neurochem**, 115:1150-60.

( doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07012.x.)

- A-3. Imai, Y., Kanao, T., Sawada T, Kobayashi, Y., Moriwaki, Y., Ishida, Takeda, K., Ichijo, H., Lu, B., Takahashi, R. The loss of PGAM5 suppresses the mitochondrial degeneration caused by inactivation of PINK1 in *Drosophila*. **Plos Genetics**, Dec 2;6(12):e1001229.
- A-4. Egawa N, Yamamoto K, Inoue H, Hikawa R, Nishi K, Mori K, Takahashi R. (2011) The endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6 $\alpha$ , protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. **J Biol Chem** 286:7947-57
- C-1. K. Yamamoto, K. Takahara, S. Oyadomari, T. Okada, T. Sato, A. Harada and K. Mori, Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6 $\alpha$ -knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress. **Mol. Biol. Cell**, 21, 2975-2986, 2010. (DOI:10.1091)
- D-1. Shiotsuki H, Yoshimi K, Shimo Y, Funayama M, Takamatsu Y, Ikeda K, Takahashi R, Kitazawa S, Hattori N: A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **J Neurosci Methods**. 189:180-185, 2010.
- D-2. Li L, Funayama M, Tomiyama H, Li Y, Yoshino H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Mizuno Y, Hattori N: No evidence for pathogenic role of GIGYF2 mutation in Parkinson disease in Japanese patients. **Neurosci Lett**. 479:245-248, 2010.
- D-3. Oyama G, Yoshimi K, Natori S, Chikaoka Y, Ren YR, Funayama M, Shimo Y, Takahashi R, Nakazato N, Kitazawa S, Hattori N: Impaired in vivo dopamine release in parkin knockout mice. **Brain Research** 1352:214-222, 2010.
- D-4. Yoshino H, Tomiyama H, Tachibana N, Ogaki K, Li Y, Funayama M, Hashimoto T, Takashima S, Hattori N: Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. **Neurology** 75:1356-1361, 2010.
- D-5. Funayama M, Tomiyama H, Wu RM, Ogaki K, Yoshino H, Mizuno Y, Hattori N: Rapid screening of ATP13A2 variant with high-resolution melting analysis. **Mov Disord**. 25:2434-2437, 2010.
- D-6. Sekine T, Kagata H, Funayama M, Li Y, Yoshino H, Tomiyama H, Hattori N: Clinical course of the first Asian family with parkinsonism related to SNCA triplication. **Mov Disord**. 25:2871-2875, 2010.
- D-7. Lesage S, Patin E, Condroyer C, Leutenegger AL, Lohmann E, Giladi N, Bar-Shira A, Belarbi S, Hecham N, Pollak P, Ouvrard-Hernandez AM, Bardien S, Carr J, Benhassine T, Tomiyama H, Pirkevi C, Hamadouche T, Cazeneuve C, Basak AN, Hattori N, Dürr A, Tazir M, Orr-Urtreger A, Quintana-Murci L, Brice A. Parkinson's disease-related LRRK2 G2019S mutation results from independent mutational events in humans. **Hum Mol Genet** 19:1998-2004, 2010

- D-8. Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Tomiyama H, Ishikawa S, Yoshino H, Minami N, Smith DI, Lesage S, Aburatani H, Nishino I, Brice A, Hattori N, Tsuji S. Mechanisms of genomic instabilities underlying two common fragile-site-associated loci, PARK2 and DMD, in germ cell and cancer cell lines. **Am J Hum Genet** 87:75-89, 2010
- D-9. Kawajiri S, Machida Y, Saiki S, Sato S, Hattori N. Zonisamide reduces cell death in SH-SY5Y cells via an anti-apoptotic effect and by upregulating MnSOD. **Neurosci Lett.** 481:88-91, 2010
- D-10. Ogaki K, Motoi Y, Li Y, Tomiyama H, Shimizu N, Takanashi M, Nakanishi A, Yokoyama K, Hattori N. Visual grasping in FTDP-17 (MAPT) - A comparison of 123I-IMP brain perfusion SPECT analysis with PSP - **Mov Disord** 2011(in press)
- D-11. Tomiyama H, Yoshino H, Ogaki K, Li L, Yamashita C, Li Y, Funayama M, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Hattori N. PLA2G6 variant in Parkinson's disease. **J Hum Genet** 2011 (in press).
- F-1. Miura H, Hashida K, Sudo H, Awa Y, Takarada-Iemata M, Kokame K, Takahashi T, Matsumoto M, Kitao Y, Hori O. Deletion of Herp facilitates degradation of cytosolic proteins. **Genes Cells.** 15(8):843-53, 2010 (doi: 10.1111)

#### (4-2) 知財出願

- ①平成22年度特許出願件数(国内 0 件)
- ②CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)