

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 16 日現在

機関番号：32620
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390272
 研究課題名（和文）パーキンソン病遺伝子改変モデルの解析及びモデル作成
 研究課題名（英文）Generation of pathological models for Parkinson's disease
 研究代表者
 服部信孝（HATTORI NOBUTAKA）
 順天堂大学・医学部・教授
 研究者番号：80218510

研究成果の概要（和文）：パーキンソン病の病態を解析するためにはパーキンソン病の症状を忠実に再現するモデルマウスの作製は不可欠である。しかし、これまでパーキンソン病の遺伝子改変マウスにはそのようなモデルは存在していない。本研究期間で新たに作製したミトコンドリア呼吸酵素のNDUFV2欠損マウスと家族性パーキンソン病の原因遺伝子PINK1欠損マウスはミトコンドリアの機能障害を呈しパーキンソン病モデル動物として今後の研究に有用である。

研究成果の概要（英文）：To understand the pathology of Parkinson's disease, mouse models that replicate Parkinson's disease symptoms are indispensable. However, currently none of the models are able to meet the pathological demands. The present study will attempt to create a novel NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2,24kDa (NDUFV2) knockout mouse and familial Parkinson's disease causative gene PINK1 knockout mouse that presents mitochondrial dysfunction, based on the cause of Parkinson's disease, which will be useful for future studies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、神経内科学

キーワード：パーキンソン病、モデルマウス、ミトコンドリア、ミトファジー, Parkin, PINK1, NDUFV2, MPTP

1. 研究開始当初の背景

家族性パーキンソン病の中にあつて Parkin と PINK1 を原因遺伝子とする若年発症パーキンソン病はミトコンドリア機能異常がその病態の中核をなす疾患として注目されている。このような家族性パーキンソン病の遺伝子産物は共通の分子作用機序をなす可能性が高く、これまでの研究により Parkin と PINK1 はミトコンドリア近傍で作用し、膜電位の低下した不良ミトコンドリアの除去(ミ

トファジー)に関与することが判明した。これまでも孤発性パーキンソン病の病態としてミトコンドリアの機能低下が指摘されていたが、このような事実が判明するにつれミトコンドリア機能障害仮説は再び注目される研究領域となりつつある。そこで我々はミトコンドリア機能に関連した遺伝子や家族性パーキンソン病の原因遺伝子 PINK1 ノックアウトマウスを作製し、パーキンソン病におけるミトコンドリア機能障害の詳細を明

らかにすることにより神経細胞死の機構を明らかにすることをねらいとする。

2. 研究の目的

ミトコンドリア電子伝達系複合体の機能不全は様々な疾患の原因となることが知られている。パーキンソン病では複合体 I の活性低下が報告されており、複合体 I の機能低下が重要な発症要因になると考えられている。Hattori らは複合体 I 遺伝子の一つである NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa (NDUFV2) がパーキンソン病の危険因子になることを見いだしている。一方、1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) は、複合体 I に作用しミトコンドリア機能障害を引き起こすと考えられており、NDUFV2 の機能を解析することはパーキンソン病の病態の解明につながると考えられる。そこで、NDUFV2 のノックアウトマウスを作製し、NDUFV2 の機能とパーキンソン病発症の関係を明らかにする。その一方で、家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物 PINK 1 はミトコンドリアに局在することが分かっている。しかしながら PINK1 自身がミトコンドリア機能にいかに関与しているかは未だ不明な点が多い。そこで我々は PINK1 ノックアウトマウスから採取した MEF 細胞を用いて呼吸鎖や膜電位への影響を詳細に検討しミトコンドリア障害を有するパーキンソン病モデルマウスと細胞を作製することを目的とする。

さらに我々は MPTP マウスにおける運動学習障害検出法を検討した。これまで、ロタロッド試験は運動機能障害を検出する方法として、げっ歯類を用いた実験に数多く用いられてきたが、MPTP (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydroxypyridine) 投与によるパーキンソン病モデルマウスにロタロッド試験を用いた試験では、運動機能障害は一過性にしか検出ができなかった。そこで従来のロタロッド試験を改変し、パーキンソン病モデルマウスの運動学習機能障害が検出できるかを検討した。

3. 研究の方法

1) NDUFV2 マウス

遺伝子トラップ法によって NDUFV2 遺伝子破壊ヘテロマウスを得た。NDUFV2 発現量の検討はリアルタイム RT-PCR 法およびウエスタンブロット法をもちいた。MPTP は 15mg/kg を 2 時間おきに 4 回腹腔内投与し、最終投与 24, 48, 72 時間後および 7 日後にロタロッドテストおよび自発運動量の測定を行った。さらに最終投与 48 時間後と 7 日後に線条体および中脳を摘出し tyrosine hydroxylase (TH) および dopamine transporter (DAT) のタンパク量をウエスタンブロット法で検討し、免

疫染色で形態観察を行った。

2) PINK1 ノックアウト MEF

PINK1 ノックアウトマウス胎児由来の MEF 細胞を不死化し、PINK1 ノックアウト株と野生株をグルコース培地とガラクトース培地で培養することによりミトコンドリア呼吸依存的な増殖率を比較検討した。さらにミトコンドリアを抽出し Oxygen Meter と Mitocell MT 2000 により単位細胞当たりの酸素消費を定量することにより呼吸能を比較した。MEF からミトコンドリア分画を抽出し単位ミトコンドリア当たりの呼吸機能を Modular Kinetic Analysis により測定した。MEF の単位細胞あたりの ROS の産生とプロトンリークを測定し比較した。また免疫染色によるミトコンドリアの形態や膜電位の変化を観察した。

3) MPTP マウスにおける運動学習障害検出法の検討

23 匹の MPTP を皮下投与した C57 BL/6J マウスを用いた (control 群 30 匹)。従来のロタロッド試験は直径 2.5 cm 程度の rod を用いて回転速度は 12 rpm であったが、我々の実験では直径 9 cm の rod を使用し、回転速度を 10 rpm とした。

4. 研究成果

1) NDUFV2 マウス

NDUFV2 ノックアウトマウスは胎生 10.5 日後に致死となることが明らかとなった。このことから、NDUFV2 は胎児の発生初期段階において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。MPTP 処置群では、投与 48, 72 時間後においてヘテロマウスで運動協調性ならびに自発運動量の有意な低下が認められた。MPTP 処置群のマウス脳内における TH および DAT の発現量は未処置群と比較して著明かつ有意に減少したが、MPTP 処置群の野生型とヘテロマウスでは同程度の減少であった。残念ながら NDUFV2 のホモノックアウトではミトコンドリア障害が強いためか胎生致死となってしまうがヘテロマウスでは優位な運動障害を呈するモデルとして今後の病態研究に有用である。

2) PINK1 ノックアウト MEF

PINK1 ノックアウト MEF はガラクトース培地中で明らかに増殖率が低下する。ガラクトース培地中ではミトコンドリア呼吸依存的な呼吸が必要になってくるため、このような結果は PINK1 ノックアウト MEF がミトコンドリア呼吸能に障害をもつことを示唆している。実際に細胞当たりの呼吸能を詳細に検討すると基質酸化能の低下が認められるために二次的に膜電位が低下していることが考えられた。このような膜電位の低下した異常ミ

トコンドリアは本来であればミトファジーによって除去される運命にある。その結果として細胞内環境が健全に保たれるはずであるが、PINK1 自身の機能が十分でない場合はミトファジーを誘導できなくなるため、異常なミトコンドリアを除去できずに結果として細胞内に蓄積する。この悪循環による異常ミトコンドリアの蓄積が若年発症の原因の一因であると推測される。

3) MPTP マウスにおける運動学習障害検出法の検討

Control 群では初日から 4 日目にかけて急峻な時間依存性の運動学習の獲得(学習能力曲線の増加)が得られたのに対し MPTP マウスでは control 群に比べ学習曲線の低下が認められた(p=0.009 two-way ANOVA)。従来の運動機能を主に評価する方法と異なり、今回用いた新たなロタロッド試験では運動学習の獲得が要求される方法であったため、MPTP マウスで差が見られたと考えられる。この新たな学習運動障害の検出法は表現系のないモデルであってもドパミン欠乏に依存すると考えられる。よって表現系のないパーキンソン病モデルにおいてシナプス間隙におけるドパミン欠乏を検出する方法として他のパーキンソン病モデルマウスへの応用が可能である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 87 件)

1. Tanaka R, Sasaki-Ikesawa K, Shimura H, Nishioka K, Hattori N, Tanaka S. Methotrexate leukoencephalopathy mimics acute progressive stroke. *J Neurol*. 2011. 258(11). 2083-5
2. Sharma M, Maraganore DM, Ioannidis JP, Riess O, Aasly JO, Annesi G, Abahuni N, Bentivoglio AR, Brice A, Van Broeckhoven C, Chartier-Harlin MC, Destée A, Djarmati A, Elbaz A, Farrer M, Ferrarese C, Gibson JM, Gispert S, Hattori N, Jasinska-Myga B, Klein C, Lesage S, Lynch T, Lichtner P, Lambert JC, Lang AE, Mellick GD, De Nigris F, Opala G, Quattrone A, Riva C, Rogaeva E, Ross OA, Satake W, Silburn PA, Theuns J, Toda T, Tomiyama H, Uitti RJ, Wirdefeldt K, Wszolek Z, Gasser T, Krüger R; Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease Consortium. Role of sepiapterin reductase gene at the PARK3 locus in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2011. 32(11). 2108.e1-5
3. Shimura H, Tanaka R, Urabe T, Tanaka

S, Hattori N. Art and Parkinson's disease: a dramatic change in an artist's style as an initial symptom. *J Neurol*. 2011. In Press

4. Ross OA, Soto-Ortolaza AI, Heckman MG, Aasly JO, Abahuni N, Annesi G, Bacon JA, Bardien S, Bozi M, Brice A, Brighina L, Van Broeckhoven C, Carr J, Chartier-Harlin MC, Dardiotis E, Dickson DW, Diehl NN, Elbaz A, Ferrarese C, Ferraris A, Fiske B, Gibson JM, Gibson R, Hadjigeorgiou GM, Hattori N, Ioannidis JP, Jasinska-Myga B, Jeon BS, Kim YJ, Klein C, Kruger R, Kyrtzi E, Lesage S, Lin CH, Lynch T, Maraganore DM, Mellick GD, Mutez E, Nilsson C, Opala G, Park SS, Puschmann A, Quattrone A, Sharma M, Silburn PA, Sohn YH, Stefanis L, Tadic V, Theuns J, Tomiyama H, Uitti RJ, Valente EM, van de Loo S, Vassilatis DK, Vilarinho-Güell C, White LR, Wirdefeldt K, Wszolek ZK, Wu RM, Farrer MJ; Genetic Epidemiology Of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium. Association of LRRK2 exonic variants with susceptibility to Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*. 2011. 10(10) 898-908
5. Kawajiri S, Saiki S, Sato S, Hattori N. Genetic mutations and functions of PINK1. *Trends Pharmacol Sci*. 2011. 32(10). 573-80
6. Miyamoto N, Tanaka Y, Ueno Y, Kawamura M, Shimada Y, Tanaka R, Hattori N, Urabe T. Demographic, Clinical, and Radiologic Predictors of Neurologic Deterioration in Patients with Acute Ischemic Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2011. In Press
7. Yamashiro K, Furuya T, Noda K, Urabe T, Hattori N, Okuma Y. Convulsive movements in bilateral paramedian thalamic and midbrain infarction. *Case Rep Neurol*. 2011. 3(3). 289-93
8. Seki N, Takahashi Y, Tomiyama H, Rogaeva E, Murayama S, Mizuno Y, Hattori N, Marras C, Lang AE, George-Hyslop PS, Goto J, Tsuji S. Comprehensive mutational analysis of LRRK2 reveals variants supporting association with autosomal dominant Parkinson's disease. *J Hum Genet*. 2011. 56(9). 671-5
9. Usami Y, Hatano T, Imai S, Kubo S, Sato S, Saiki S, Fujioka Y, Ohba Y, Sato F, Funayama M, Eguchi H, Shiba K, Ariga H, Shen J, Hattori N. DJ-1 associates with synaptic membranes. *Neurobiol Dis*. 2011. 43(3).

10. Usui C, Hatta K, Doi N, Kubo S, Kamigaichi R, Nakanishi A, Nakamura H, Hattori N, Arai H. Improvements in both psychosis and motor signs in Parkinson's disease, and changes in regional cerebral blood flow after electroconvulsive therapy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011. 35(7). 1704-8
11. Teramoto S, Miyamoto N, Yatomi K, Tanaka Y, Oishi H, Arai H, Hattori N, Urabe T. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, provides neuroprotection in mice transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011. 31(8). 1696-705
12. Yasuda T, Hayakawa H, Nihira T, Ren YR, Nakata Y, Nagai M, Hattori N, Miyake K, Takada M, Shimada T, Mizuno Y, Mochizuki H. Parkin-mediated protection of dopaminergic neurons in a chronic MPTP-minipump mouse model of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011. 70(8). 686-97
13. Takeichi T, Takarada-Iemata M, Hashida K, Sudo H, Okuda T, Kokame K, Hatano T, Takanashi M, Funabe S, Hattori N, Kitamura O, Kitao Y, Hori O. The effect of Ndr2 expression on astroglial activation. *Neurochem Int*. 2011. 59(1)
14. Tomiyama H, Yoshino H, Hattori N. Analysis of PLA2G6 in patients with frontotemporal type of dementia. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011. 17(6). 493-4
15. Kambe T, Motoi Y, Inoue R, Kojima N, Tada N, Kimura T, Sahara N, Yamashita S, Mizoroki T, Takashima A, Shimada K, Ishiguro K, Mizuma H, Onoe H, Mizuno Y, Hattori N. Differential regional distribution of phosphorylated tau and synapse loss in the nucleus accumbens in tauopathy model mice. *Neurobiol Dis*. 2011. 42(3). 404-14
16. 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. 56(5) 401-3
17. Kamagata K, Motoi Y, Hori M, Suzuki M, Nakanishi A, Shimoji K, Kyougoku S, Kuwatsuru R, Sasai K, Abe O, Mizuno Y, Aoki S, Hattori N. Posterior hypoperfusion in Parkinson's disease with and without dementia measured with arterial spin labeling MRI. *J Magn Reson Imaging*. 2011. 33(4). 803-7
18. Hassin-Baer S, Hattori N, Cohen OS, Massarwa M, Israeli-Korn SD, Inzelberg R. Phenotype of the 202 adenine deletion in the parkin gene: 40 years of follow-up. *Mov Disord*. 2011. 26(4). 719-22
19. Krüger R, Sharma M, Riess O, Gasser T, Van Broeckhoven C, Theuns J, Aasly J, Annesi G, Bentivoglio AR, Brice A, Djarmati A, Elbaz A, Farrer M, Ferrarese C, Gibson JM, Hadjigeorgiou GM, Hattori N, Ioannidis JP, Jasinska-Myga B, Klein C, Lambert JC, Lesage S, Lin JJ, Lynch T, Mellick GD, de Nigris F, Opala G, Prigione A, Quattrone A, Ross OA, Satake W, Silburn PA, Tan EK, Toda T, Tomiyama H, Wirdefeldt K, Wszolek Z, Xiromerisiou G, Maraganore DM; Genetic Epidemiology of Parkinson's disease consortium. A large-scale genetic association study to evaluate the contribution of Omi/HtrA2 (PARK13) to Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2011. 32(3). 548.e9-18
20. Oyama G, Shimo Y, Natori S, Nakajima M, Ishii H, Arai H, Hattori N. Acute effects of bilateral subthalamic stimulation on decision-making in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011. 17(3). 189-93.

[学会発表] (計 27 件)

1. 服部信孝, 遺伝性パーキンソン病の共通分子基盤の解明, 仙台神経変性疾患検討会, 仙台, 平成 23 年 12 月 8 日
2. 服部信孝, パーキンソン病, 第 38 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「難病創薬のビジネスモデルと可能性—神経変性疾患を中心—」に係る講師の依頼について, 平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金 政策創薬総合研究事業, 立がん研究センター内 国際研究交流会館 (東京), 平成 23 年 10 月 3 日 国
3. 服部信孝, Neurodegeneration-Prevention-Regeneration. Academic Session: Preventive and Translational Medicine – Perspectives for 21 Centuries. Joint Japanese – German Symposium. Juntendo University, 平成 23 年 9 月 27 日

4. 服部信孝, 加齢と神経変性疾, ベーシックサイエンス企画シンポジウム2, 「加齢性疾患とエピジェネティクス」, 第11回日本抗加齢医学会総会, 日国立京都国会館, 平成23年5月27
5. 下 泰司. パーキンソン病治療における脳深部刺激療法の役割パーキンソン病のMoto/Non-Motorに対する電気刺激治療の試み. 第52回日本神経学会学術大会. 平成23年5月19日. 名古屋国際会議場
6. 服部信孝. 神経変性をどう考えるか? 病態理解に至る最近の進歩. シンポジウム14 「若年性パーキンソン病の病態解明: インスリン開口機構からその病因に迫る」. 第52回日本神経学会学術大会. 平成23年5月19日. 名古屋国際会議場
7. 佐藤 栄人. 家族性パーキンソン病とミトコンドリア品質管理の異常. 第52回日本神経学会学術大会. 平成23年5月18日. 名古屋国際会議場
8. 服部信孝. The Pathogenesis of Parkinson's Disease: A Hint of Insights from Monogenic Form of Parkinson's Disease. Quadricentennial Neuroscience Summit 2011, University of Santo Tomas, 平成23年1月2日. Philippines
9. 服部信孝. Symposium IV: MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION. Functional Genomics of Parkinson's Disease. 平成22年11月19日. Tubingen
10. 船山学, 関根威, 加賀谷肇, 李元哲, 吉野浩代, 富山弘幸, 服部信孝; アジア初の α -synuclein遺伝子三重複変異. 日本人類遺伝学会 第55回大会 (2010.10.29. 大宮).
11. 服部信孝. New Strategies for Neurotherapeutic Intervention of Neurodegenerative Disorders: A Hint From Monogenic of Familial Parkinson's Disease. Joint German-Japanese Symposium (Juntendo University & Charite University, Berlin. 平成22年10月13日. Charite University, Berlin
12. 船山学, 関根威, 加賀谷肇, 李元哲, 吉野浩代, 富山弘幸, 服部信孝; SNCA三重複変異の同定. 第4回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (2010.10.8. 京都).
13. 服部信孝. 黒質神経細胞死のメカニズムに迫る: 家族性パーキンソン病からヒントを得て. 第53回神経内科懇話会. 平成22年
- 8月7日. 東京ステーションコンファレンス
14. 服部信孝. パーキンソン病の治療: 私の処方. ランチョンセミナー5. 第28回日本神経治療学会総会平成22年7月15日. 横浜.
15. 下 泰司. DBSへの神経内科医師の関わり方 第51回日本神経学会総会 平成22年5月22日 東京
16. 服部信孝. パーキンソン病の分子病態機序のブレイクスルー. 第51回日本神経学会総会シンポジウム4. 平成22年5月21日. 東京国際フォーラム
17. 船山学, 吉野 浩代, 今道 洋子, 李 元哲, 松浦 英治, 有村 公良, 高嶋 博, 野元 三治, 富山 弘幸, 水野 美邦, 服部 信孝; SNP chipによる家族性パーキンソン病のlinkage解析 (続報). 第51回日本神経学会総会 (2010.5.20. 東京) .
18. 服部信孝. 演者. Parkinson's complex: パーキンソン病を one of neuropsychiatric disorderとして捉まえる. 第51回日本神経病理学会・ランチェンセミナー3. 平成22年4月24日. シェーンバツハ・サボー東京
19. 服部信孝. The Pathogenesis of Parkinson's Disease: From Insights of Monogenic Familial Parkinson's Disease. Session 5-3: MAbs for Parkinson and Epilepsy Diseases. BIT Life Sciences'2nd Annual International Congress of Antibodies. 22年3月25日. 中国
20. 服部信孝. ポスターセッションディスカッサ. 第32回日本分子物学会. 2009年12月10日. 名古屋大学
- 〔図書〕 (計1件)
1. Hattori N, Hatano T, Machida Y, Sato S, Kubo S. PARK 2: Parkin Mutations Responsible for Familial Parkinson's Disease. Movement Disorders 4. Saunders ELSEVIER. 2010
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 服部信孝 (HATTORI NOBUTAKA)
- 順天堂大学・医学部・教授
- 研究者番号: 80218510

(2)研究分担者

佐藤栄人 (SATO SHIGETO)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：00445537

下泰司 (SHIMO YASUSHI)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号:70286714

船山学 (FUNAYAMA MANABU)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号:70468578