

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤（C）

研究期間：平成 22 年度～平成 24 年度

課題番号：22590930

研究課題名（和文）パーキンソン病患者のミトコンドリア異常における Omi/HtrA2 の役割の解明

研究課題名（英文）Research on the role of Omi/HtrA2 in the abnormal mitochondria in patients with Parkinson's disease

研究代表者

河本 恭裕（KAWAMOTO YASUHIRO）

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：40335253

研究成果の概要（和文）：Omi/HtrA2 の標的蛋白質である XIAP の免疫活性が、パーキンソン病患者脳内の Lewy 小体に存在し、Omi/HtrA2 と共存していることを確認した。さらにパーキンソン病患者脳内における apoptosome 関連蛋白質の免疫組織化学的検討にて、cytochrome c、Apaf-1、caspase-9 が Lewy 小体に存在し、パーキンソン病患者脳内で caspase-9 が切断され、活性化していることを発見した。

研究成果の概要（英文）：We confirmed that Lewy bodies were immunoreactive for XIAP, which is negatively regulated by Omi/HtrA2, and that XIAP and Omi/HtrA2 immunoreactivity were co-localized to Lewy bodies. Our research focused on apoptosome-related proteins demonstrated the immunohistochemical localization of cytochrome c, Apaf-1 and caspase-9 in Lewy bodies. We also found that cleaved caspase-9 immunoreactivity was localized to Lewy bodies, suggesting that caspase-9 may be activated in brains from patients with Parkinson's disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
24 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：神経科学

キーワード：Omi/HtrA2、パーキンソン病、ミトコンドリア、アポトーシス、XIAP

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経変性疾患は、特定の神経細胞が緩徐進行性に変性・脱落していく未だ原因不明の神経難病である。パーキンソン病は、中脳黒質のドーパミン作動性ニューロンの選択的な脱落と残存神経細胞内に形成される封入体（Lewy 小体）を特徴とし、アルツハイマー病と並ぶ代表的な神経変性疾患である。パーキンソン病は、特有の運動障害に加え、認

知機能低下や自立神経障害など多彩な症状を呈し、有病率も比較的高いために、高齢化社会を迎えたわが国において、その病態解明と根本的治療法の確立は焦眉の急な課題となっている。

(2) Omi/HtrA2 の 399 番目のアミノ酸の点変異が孤発性パーキンソン病の一部の患者で観察され、141 番目の多型がパーキンソン病発

症のリスク因子であることが確認され (Strauss KM, et al. *Hum Mol Genet* 14:2099-2011; 2005)、Omi/HtrA2 は、パーキンソン病の 13 番目の原因遺伝子 (PARK13) として注目されている。パーキンソン病類似の症状を呈する自然発症マウス *mnd2* が、Omi/HtrA2 の蛋白分解活性を喪失する点変異によることが判明し (Jones JM, et al. *Nature* 425:721-727; 2003)、さらに Omi/HtrA2 ノックアウトマウスにおいて、線条体ニューロンの特異的な変性を生じ、パーキンソン症状を呈して死亡することが確認された。(Martins LM, et al. *Mol Cell Biol* 24:9848-9862; 2004) これらの事実から、Omi/HtrA2 は、ミトコンドリア外では細胞死を誘導するが、ミトコンドリア内では細胞の生存維持に必要な蛋白質であり、パーキンソン病脳内においては、Omi/HtrA2 の機能異常が生じているものと推測されているが、不明な点が多い。我々は、Omi/HtrA2 に特異的な抗血清を用いた免疫組織化学的解析にて、パーキンソン病患者剖検脳の残存神経細胞内の Lewy 小体における Omi/HtrA2 の強い免疫活性の存在を確認した。(Kawamoto Y, et al. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:984-993; 2008) これはパーキンソン病脳内の重要な封入体に Omi/HtrA2 が異常に蓄積していることを意味し、Omi/HtrA2 がパーキンソン病の病態に重要な関わりを持っていることを示唆する実験結果である。

(3) 以前我々の研究グループは、パーキンソン病や Lewy 小体型認知症の Lewy 小体に 14-3-3 蛋白が存在することを免疫組織化学的に発見し、その後の研究にて、他施設の研究結果も含まれるが、14-3-3 蛋白が家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物である α -synuclein (PARK1) と Parkin (PARK2) の両方に結合し、両者を機能的に結び付ける重要なシャペロン蛋白であるという事実の解明にまで発展することができた。今回は、Lewy 小体に存在することが明らかとなった Omi/HtrA2 に注目し、Omi/HtrA2 のパーキンソン病における役割を明らかにするために、研究計画を立案した。

2. 研究の目的

(1) パーキンソン病以外にも、Lewy 小体型認知症や多系統萎縮症のニューロンおよびオリゴデンドロサイトの封入体に広範囲に α -synuclein が蓄積している。我々は、これらの封入体に Omi/HtrA2 が集積し、 α -synuclein と共存していることを免疫組織化学的に確認した。この結果より、ミトコンドリアの機能異常が生じ、ミトコンドリアから細胞質に放出された Omi/HtrA2 が、 α -synuclein に結合して、その凝集を促進し、封入体形成に関与している可能性がある。Omi/HtrA2 は、アポト

ーシス阻害蛋白質を基質として切断する機能も報告されているので、 α -synuclein に単に結合するだけではなく、切断する可能性もある。この場合は、Omi/HtrA2 によって切断された α -synuclein の凝集性が亢進し、オリゴマーとして集積し、その結果として Lewy 小体形成が促進しているという仮説も考えられる。これらの仮説を立証するために、パーキンソン病患者剖検脳、 α -synuclein 発現培養細胞、 α -synuclein トランスジェニックマウスを用いて、 α -synuclein と Omi/HtrA2 の相互作用に関して、免疫組織化学的および生化学的に解析することを計画した。

(2) 家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物である PINK (PARK6) の存在下で、Omi/HtrA2 がリン酸化されることが報告され、PINK1 が Omi/HtrA2 の上流に位置することが示唆されている。(Plun-Favreau H, et al. *Nature Cell Biol* 9:1243-1252; 2007) 一方、PINK1 は、Parkin の上流に位置していることも示され (Park J et al. *Nature* 441:1157-1161; 2006, Clark IE, et al. *Nature* 441:1162-1166; 2006)、最近では、Omi/HtrA2 が Parkin の E3 ユビキチンリガーゼ活性を不活化することも報告されている。(Park HM, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 387:537-542; 2009) これらの結果より、パーキンソン病脳内で機能異常を生じたミトコンドリアより細胞質に放出された Omi/HtrA2 が、Parkin のユビキチンリガーゼ活性を阻害し、異常蛋白質の蓄積を促進している可能性がある。この仮説を立証するために、パーキンソン病患者剖検脳における両蛋白質の局在、Parkin ノックアウトマウス脳における Omi/HtrA2 の変化、Parkin の基質である Pael 受容体過剰発現培養細胞における Parkin と Omi/HtrA2 の共発現の影響を免疫組織化学的および生化学的に検討することを計画した。

(3) 細胞質内で産生された Omi/HtrA2 はミトコンドリア内に転送されるが、Hax1 と Parl がミトコンドリア内で共同して、Omi/HtrA2 の活性化に関与していることと、Omi/HtrA2 が正常に活性化されなければ、ミトコンドリア外膜に Bax が蓄積し、アポトーシスによる細胞死が誘導されることが報告されている。(Chao JR, et al. *Nature* 452:98-102; 2008) これらの事実より、パーキンソン病患者脳内では、ミトコンドリア異常により、Omi/HtrA2 がミトコンドリア内で Hax1 と Parl により正常に活性化されず、アポトーシスによる神経細胞死が生じている可能性がある。この仮説を立証するために、パーキンソン病患者剖検脳における Hax1 や Parl と Omi/HtrA2 の位置的關係や Omi/HtrA2 ノックアウトマウス脳内における Hax1 や Parl および Bax など他のアポトーシス関連蛋白質の局在と変化を免疫組織

化学的および生化学的に解析することを計画した。

3. 研究の方法

パーキンソン病脳内でミトコンドリアの機能障害が生じ、(1)ミトコンドリアから過剰に放出された Omi/HtrA2 が α -synuclein の凝集と蓄積および Lewy 小体の形成に関与しているという仮説、(2)ミトコンドリアから過剰に放出された Omi/HtrA2 が Parkin のユビキチンリガーゼ活性を阻害し、異常蛋白質の蓄積を促進させ、神経細胞死を誘発しているという仮説、(3)ミトコンドリア内で Omi/HtrA2 が Hax1 と Parl により正常に活性化されず、ミトコンドリア外膜における Bax の蓄積を生じ、アポトーシスによる神経細胞死を誘発しているという3種類の仮説を立て、ヒト剖検脳・培養細胞・モデルマウスを用いて、免疫組織化学的および生化学的に解析を進めていくことを計画した。

(1) α -synuclein と Omi/HtrA2 に関する研究

我々は、パーキンソン病患者剖検脳内の Lewy 小体における α -synuclein と Omi/HtrA2 の共存を、免疫組織化学的に蛍光二重標識法にてすでに確認しているが、さらに免疫電顕法を用いて解析を進めていく。この手法を用いて、Omi/HtrA2 が、Lewy 小体のどの部分に存在し、Lewy 小体内において α -synuclein とどのような位置関係になっているのかを、超微形態的に明らかにする。次に、標識した α -synuclein と Omi/HtrA2 を培養細胞に発現させて、細胞内における両者の局在の相違や封入体様の構造物の形成の有無を、蛍光標識した抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡下で観察する。そして、培養細胞における両蛋白質の結合の有無を、免疫沈降法にて確認する。さらに、野生型および A53T 変異型 α -synuclein を過剰発現させたトランスジェニックマウス脳内の Omi/HtrA2 の変化を、免疫組織化学的手法を用いて解析する。マウス脳内において、 α -synuclein が蓄積している構造物に、内在性のマウス Omi/HtrA2 が共存しているかどうか注目しながら、症状発症前の早期から発症後の末期まで継時的に検討していく予定である。

(2) Parkin と Omi/HtrA2 に関する研究

すでに Parkin が Lewy 小体に存在することは報告されているが、パーキンソン病脳内における Parkin と Omi/HtrA2 の解剖学的な位置関係は不明である。蛍光二重標識法にて、パーキンソン病患者剖検脳の中脳と線条体における両者の局在を、免疫組織化学的に比較検討する。次に、Parkin ノックアウトマウス脳における Omi/HtrA2 の局在と変化を免疫組織染色法にて検討し、量的な継時的変化を

Western blot 法にて解析する。ユビキチンリガーゼである Parkin の基質蛋白質の一つにパエル受容体があり、パエル受容体を過剰発現させた培養細胞の細胞死が、Parkin の過剰発現で抑制されることが報告されている。このような培養細胞に、Omi/HtrA2 をさらに過剰発現させて、パエル受容体の蓄積を伴う小胞体ストレスによる細胞死が誘導されるどうかとも検討する

(3) Hax1 や Parl と Omi/HtrA2 に関する研究

パーキンソン病患者脳における Hax1 と Parl の局在と変化に関しては今のところ報告がない。パーキンソン病患者剖検脳の中脳と線条体における Hax1 と Parl の免疫組織化学的局在を、正常例と比較して検討する。そして、同部位での Hax1・Parl と Omi/HtrA2 との関係を蛍光二重標識法にて解析する。さらに、Omi/HtrA2 ノックアウトマウス脳内における Hax1 と Parl の局在と変化を免疫組織染色にて検討し、量的な継時的変化を Western blot 法にて解析する。

(4) その他の研究

神経変性疾患脳内に形成される封入体は、異常な蛋白質を閉じ込めることによって、細胞に対して防御的に働いているという考え方もある。ミトコンドリアから細胞質に放出された Omi/HtrA2 は、アポトーシスの進行を促進するので、Lewy 小体が積極的に Omi/HtrA2 を取り込んで、細胞死を防いでいるという可能性も考えられる。この場合は、Omi/HtrA2 と同様に、ミトコンドリアから放出されるアポトーシス誘導因子である Smac/DIABLO も取り込まれている可能性が高く、Lewy 小体における存在の有無をパーキンソン病患者の剖検脳を用いて、免疫組織化学的に検討する。そして、これらのアポトーシス誘導因子の標的となる XIAP などのアポトーシス阻害蛋白質および細胞死の実行に関わる cytochrome c, Apaf-1, caspase-9 など apoptosome の構成成分やその下流の caspase 経路の変化を、パーキンソン病患者剖検脳を用いて免疫組織化学的に解析する。さらにパーキンソン病患者剖検脳のコホモジェネートを用いて、これらのアポトーシス関連蛋白質の量的な変化を、Western blot 法で検討する。

4 研究成果

(1) 我々は、パーキンソン病・Lewy小体型認知症・多系統萎縮症の患者脳で、 α -synuclein 陽性の封入体に Omi/HtrA2 が存在していることを確認したが、Omi/HtrA2 と α -synuclein の相互作用に関しては今のところ不明である。Omi/HtrA2 と parkin との関係も新たな知見は今のところ得られていない。A53T 変異型 α -synuclein トランスジェニックマウスや parkin

ノックアウトマウスの脳内のOmi/HtrA2の変化の解析は継続中である。

(2) 次に我々は、Omi/HtrA2の標的蛋白質であるXIAPに注目し、パーキンソン病患者脳内におけるXIAPの局在を免疫組織化学的に解析し、Lewy小体においてOmi/HtrA2とXIAPが共存していることを確認した。XIAPがOmi/HtrA2とともにLewy小体に取り込まれることにより、XIAPの抗アポトーシス作用が抑制されているという仮説を立てた。

(3) この仮説を立証するために、cytochrome c、Apaf-1、caspase-9に対する各種抗体を用いて、パーキンソン病患者脳内のカスパーゼ依存性アポトーシスの変化を免疫組織化学的に検討した。抗cytochrome c抗体、抗Apaf-1抗体、抗caspase-9抗体でパーキンソン病患者の中脳黒質のLewy小体が強く染色された。Apaf-1とcaspase-9の免疫活性は主としてhaloに、cytochrome cの免疫活性は主としてcoreあるいはその周辺部に観察された。2種類の抗体を用いて、cleaved caspase-9免疫反応もLewy小体に存在することを確認した。さらにパーキンソン病患者の中脳において、cleaved caspase-9免疫活性は、CD68陽性のミクログリアにも存在することも確認した。活性化されたcaspase-9は、下流のエフェクターであるcaspase-3やcaspase-7を活性化し、アポトーシスを促進することが知られている。パーキンソン病患者の中脳黒質では、イニシエーターであるcaspase-9がニューロンやミクログリアで活性化され、ドパミン作動性ニューロンの細胞死に関与している可能性がある。

(4) 正常例とパーキンソン病患者の中脳黒質におけるHax-1やParlの免疫活性に相違ははっきりせず、現在解析を継続中である。

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 18 件)

(1) Kawamoto Y, Ito H, Ihara M, Takahashi R. XIAP immunoreactivity in glial and neuronal cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Clinical Neuropathology* (in press) (査読有)

(2) Kawamoto Y, Ito H, Ihara M, Takahashi R. Immunohistochemical localization of X-linked inhibitor of apoptosis protein in brainstem-type and cortical Lewy bodies. *NeuroReport* 2012;23:162-167 (査読有)
DOI: 10.1097/WNR.0b013e32834f4066.

(3) Okamoto Y, Ihara M, Urushitani M, Yamashita H, Kondo T, Tanigaki A, Oono M, Kawamata J, Ikemoto A, Kawamoto Y, Takahashi R, Ito H. An autopsy case of SOD1-related ALS with TDP-43 positive inclusions. *Neurology* 2011;77:1993-1995 (査読有)
DOI: 10.1212/WNL.0b013e31823a0cfc.

(4) Okamoto Y, Shirakashi Y, Ihara M, Urushitani M, Oono M, Kawamoto Y, Yamashita H, Shimohama S, Kato S, Hirano A, Tomimoto H, Ito H, Takahashi R. Colocalization of 14-3-3 proteins with SOD1 in Lewy body-like hyaline inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis cases and the animal model. *PLoS One* 2011;6:e20427 (査読有)
DOI: 10.1371/journal.pone.0020427.

(5) Kawamoto Y, Ito H, Kobayashi Y, Suzuki Y, Takahashi R. Localization of HtrA2/Omi immunoreactivity in brains affected by Alzheimer's disease. *NeuroReport* 2010;21:1121-1125 (査読有)
DOI: 10.1097/WNR.0b013e328340a731.

(6) Kawamoto Y, Ito H, Kobayashi Y, Suzuki Y, Akiguchi I, Fujimura H, Sakoda S, Kusaka H, Hirano A, Takahashi R. HtrA2/Omi immunoreactive neuronal inclusions in the anterior horn of patients with sporadic and Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) mutant amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2010;36:331-344 (査読有)
DOI: 10.1111/j.1365-2990.2010.01075.x.

[学会発表] (計 5 件)

(1) 河本恭裕、パーキンソン病患者の中脳黒質のLewy小体におけるapoptosome関連タンパク質の集積、第54回日本神経学会学術大会、平成25年6月1日、東京

(2) 河本恭裕、多系統萎縮症患者脳内の封入体におけるXIAPの蓄積、第53回日本神経学会学術大会、平成24年5月25日、東京

(3) 河本恭裕、Alzheimer病患者脳内におけるHtrA2/Omiの免疫組織化学的検討、第52回日本神経病理学会総会学術研究会、平成23年6月4日、京都

(4) 河本恭裕、脳幹型および皮質型Lewy小体におけるXIAPとHtrA2/Omiの共存、第52回日本神経学会学術大会、平成23年5月18日、名古屋

(5) 河本恭裕、Alzheimer病患者脳内における

HtrA2/Omi の免疫組織化学的検討、第 51 回日本神経学会総会、平成 22 年 5 月 22 日、東京

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河本 恭裕

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：40335223

(2) 研究分担者

伊東 秀文 (ITO HIDEFUMI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20250061

高橋 良輔 (TAKAHASHI RYOSUKE)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90216771

(3) 連携研究者

なし