

## 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 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590941

研究課題名（和文） 脳 GTP シクロヒドロラーゼ I の生化学的研究によるドーパ反応性ジストニーの病態解明

研究課題名（英文） Brain GTP cyclohydrolase I protein reduction in dopa-responsive dystonia: a clue to the pathogenesis.

研究代表者

古川 芳明（FURUKAWA YOSHIKI）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：10219107

研究成果の概要（和文）：ドーパ反応性ジストニー(DRD)症例の多くは GTP シクロヒドロラーゼ I (GTPCH) 遺伝子に変異を有しているが、ヒト脳内 GTPCH 蛋白質量の報告はなく DRD における病態も不明である。ヒト剖検脳を用いて世界で初めて GTPCH 蛋白質の定量を行い①線条体で発現が高いこと、②GTPCH 欠乏性 DRD 線条体における低下はパーキンソン病より著しく-60%以上に至ること、③この蛋白質は線条体にて生後 1 日目から 28 日目まで急激に増加し、その後プラトーとなり、17 歳から減少することを見出した。

研究成果の概要（英文）：Many patients with dopa-responsive dystonia (DRD) have shown mutations in the gene encoding GTP cyclohydrolase I (GTPCH). However, there have been no reports of GTPCH protein levels in the brain of human subjects and the actual status of striatal GTPCH in DRD is unknown. We measured GTPCH protein concentrations for the first time in the autopsied human brain and found the following; 1) the expression level of this protein was high in the striatum, 2) concentrations of GTPCH protein in the putamen were substantially decreased in patients with GTPCH-deficient DRD (-76% [mean]) and were significantly reduced in patients with Parkinson disease (-53%), and 3) GTPCH protein levels in the putamen increased in early postnatal period (1-28 days), reached a plateau in childhood, and decreased in adulthood (17-99 years).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：GTP シクロヒドロラーゼ I、テトラヒドロbiopterin、チロシン水酸化酵素、ドーパ反応性ジストニー、パーキンソン病、剖検脳、老化、神経化学

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

ドーパ反応性ジストニー (DRD) とは、比較的少量の L-dopa が著効し、その劇的な効果が副作用を呈することなく継続するジストニーであり、85%以上の家系で①テトラヒドロbiopterin (BH4) 生合成経路の GTP シクロヒドロラーゼ I (GTPCH) の遺伝子か、②BH4 を補酵素とするチロシン水酸化酵素 (TH) の遺伝子に変異がみいだされている。しかしながら主病型である優性遺伝の GTPCH 欠乏性 DRD において、遺伝子変異の浸透度が不完全で無症候性キャリアが存在する理由は未だに解明されていない。世界に3例しか存在していない、生化学的実験用に保存されている GTPCH 欠乏性 DRD 剖検脳の検索結果からは、被殻における TH 蛋白質量の減少幅と DRD 症候発現の有無が密接に関連していることが示されているが、ヒト脳内 GTPCH 蛋白質量の報告はなく、DRD における病態も不明な状況である。脳内 GTPCH は補酵素 BH4 を生成して TH やトリプトファン水酸化酵素に供給するだけと考えられてきたが、2008年にアラバマ大学より、GTPCH が TH と直接反応して相互に positive regulation を行うという新たな役割を有しているとの報告がなされて以来、今までに実施されたことのないヒト脳内 GTPCH 蛋白質の定量とバンドパターンの同定、特に線条体における GTPCH 欠乏性 DRD 発症例と無症候性キャリアの比較に世界の関心が集まっている。

## 2. 研究の目的

ヒト脳内 GTPCH 蛋白質量の報告はないため、まず、Western blot による定量法を開発し、正常剖検脳における GTPCH 蛋白質の分布を調べ、総biopterin (脳内では大半が BH4 として存在) の分布と比較する。次に、GTPCH が黒質線条体ドーパミンニューロン終末部の指標として適しているか否か、パーキンソン病及び TOR1A の遺伝子変異を確認した DYT1 ジストニー剖検脳を用いて検索し、またヒト脳の発達と老化が GTPCH に及ぼす影響を、生後1日目から99歳にまで至る正常剖検脳にて検討する。最終的には、GTPCH 欠乏性 DRD 発症者・無症候性キャリア・正常対照の線条体等において GTPCH 蛋白質の定量を行い、同部位ドーパミン系 (TH・ドーパ脱炭酸酵素・ドーパミントランスポーター・ドーパミンとその代謝産物・総biopterin・総ネオプテリン) の変化と比較し、発達・老化の影響も考慮した上で、GTPCH 欠乏性 DRD の発症機序を解明する。

## 3. 研究の方法

①まず、ヒト剖検脳から、アトラスに基づく Kish の方法 (Kish et al. N Eng J Med 1988) により、本研究に必要な 500 に及ぶ凍結脳組織切片の切出しを行い、これら全ての検体を突然の停電による解凍を回避すべく、病院の自家発電装置を有した大型フリーザーに保管した。Western blot に用いる抗体としては mouse anti-GTPCH Ab (ABNOVA) と horseradish peroxidase-linked goat anti-mouse IgG2a Ab を使い、厳密な測定を行うべく、ヒトの脳組織を用いて全 Slab gel にてスタンダードカーブを作成する方法 (Furukawa et al. Ann Neurol 2002a, b) を選択した。コントロールとして Neuron specific enolase も定量した。

②神経・精神的に問題なく、病理学的にも正常であったヒト剖検脳7例を用いて、黒質 (緻密層)・被殻・尾状核・淡蒼球 (内節)・淡蒼球 (外節)・赤核・扁桃核・海馬・視床・島皮質・他の皮質 (小脳皮質・前頭葉皮質・側頭葉皮質・頭頂葉皮質・後頭葉皮質) における GTPCH 蛋白質の定量を行い、その脳内分布を高速液体クロマトグラフィー・蛍光検出器を使用して Furukawa の方法 (Furukawa et al. Neurology 1999) で測定した総biopterin・総ネオプテリンの値と比較した。

③パーキンソン病7例と TOR1A の遺伝子変異陽性 DYT1 ジストニー1例 (10歳: Furukawa et al. Neurology 2000)、及びそれぞれ死亡年齢/剖検までの時間が一致している正常コントロール剖検脳の被殻・尾状核・前頭葉皮質を用いて GTPCH 蛋白質量を測定し、黒質線条体ドーパミンニューロン終末部の指標として適しているか否か、他の終末部の生化学的マーカー (TH・ドーパ脱炭酸酵素・ドーパミントランスポーター・vesicular monoamine transporter・ドーパミンとその代謝産物・総biopterin) の変化と比較して検討した。

④神経・精神的な異常が認められず病理学的にも正常であった、生後1日目から99歳に至る74例の剖検脳から得た被殻を用いて、ヒト脳の発達と老化が GTPCH 蛋白質量に及ぼす影響を検討し、この酵素の加齢による変化が GTPCH 欠乏性 DRD の発症に関与しているか考察した。また、生後1日目から103歳に至る56例の被殻を用いて、TH 蛋白質量の定量も行い、加齢による総biopterinの変化 (Furukawa & Kish. Neurology 1998) も含めて検討を行った。

⑤GTPCH の遺伝子変異または機能異常が確認された 3 例の GTPCH 欠乏性 DRD 剖検脳 (2 例の発症者 [19 歳, 68 歳] と 1 例の無症候性キャリア [55 歳]: Furukawa et al. Ann Neurol 1996, 2002a, 2004) と、これらの症例と死亡年齢/剖検までの時間が一致している正常コントロール剖検脳の線条体を用いて GTPCH 蛋白質の定量を行い、他の黒質線条体ドーパミンニューロン終末部マーカーの変化と比較検討した。

#### 4. 研究成果

①世界で初めて、ヒトの凍結剖検脳を用いて、GTPCH 蛋白質の Western blot による定量法を確立した。

②神経・精神的に正常なヒト剖検脳 7 例を用いて GTPCH の脳内分布を探索したところ、その蛋白質量は赤核で最も高く、赤核 > 黒質 (緻密層) > 淡蒼球 (内節・外節) > 被殻 > 尾状核 > 扁桃核 > 視床 > 海馬 > 島皮質 > 他の皮質 (小脳皮質・前頭葉皮質・側頭葉皮質・頭頂葉皮質・後頭葉皮質)、となっていることが明らかとなった。GTPCH は BH4 (ドーパミン合成系の TH 及びセロトニン合成系のトリプトファン水酸化酵素の補酵素) 生合成の律速酵素であるため、7 例中 5 例では脳内の主要部位における総ビオプテリンの値も高速液体クロマトグラフィー・蛍光検出器で測定したところ、赤核 > 淡蒼球 (内節・外節) > 被殻 > 尾状核 > 皮質 (小脳皮質・前頭葉皮質・後頭葉皮質)、と同様の脳内分布を呈していた。

③パーキンソン病 7 例と死亡年齢/剖検までの時間が一致している正常コントロール 8 例の比較では、GTPCH 蛋白質量はパーキンソン病の被殻と尾状核で有意に減少していた (-53% [p < 0.01]; -57% [p < 0.01]) が、前頭葉皮質では保たれていた。TOR1A の遺伝子変異が確認された DYT1 ジストニー症例と正常コントロール 5 例を比較したところ、DYT1 ジストニー症例の被殻では変化は認められなかった。

④ヒト脳の発達と老化が GTPCH 蛋白質量に及ぼす影響を検討した結果、被殻の GTPCH 蛋白質は、生後 1 日目から 28 日目まで急激に増加 (r = 0.91; p < 0.005) し、その後 14 歳までプラトーとなり、17 歳から明らかな減少 (r = -0.59; p < 0.001) を示した。一方被殻の TH 蛋白質は、生後 1 日目から 1 歳まで増加 (r = 0.86; p < 0.001) し、その後 14 歳までプラトーとなり、17 歳から比較的緩やかに減少 (r = -0.44; p < 0.05) した。この発達・老化に伴う増減パターンは、被殻の総ビオプテリン検索時に認められたものと同様であり (Furukawa & Kish. Neurology 1998)、TH と

総ビオプテリンの間には正の相関 (r = 0.61; p < 0.001) が認められた。

⑤19 歳の GTPCH 欠乏性 DRD 発症例では、死亡年齢/剖検までの時間が一致している正常コントロール 7 例との比較で、GTPCH 蛋白質量は被殻で -83%、尾状核で -66%、淡蒼球の外節で -73% と明らかに低下していた。68 歳の GTPCH 欠乏性 DRD 発症例を加えた 2 例の被殻における低下の平均は -76% に至っており、減少の程度はパーキンソン病で認められたものよりも著しかった。55 歳の GTPCH 欠乏性 DRD の無症候性キャリア被殻における GTPCH 蛋白質量の低下は、やはりパーキンソン病で認められた減少よりも著明で、2 例の GTPCH 欠乏性 DRD 発症例と同程度にまで至っていた。パーキンソン病とは異なり、GTPCH 欠乏性 DRD の被殻では、ドーパミンニューロン終末部のマーカーである、ドーパ脱炭酸酵素・vesicular monoamine transporter・ドーパミントランスポーターは正常に保たれており、よって GTPCH 欠乏性 DRD 症例で認められた線条体 GTPCH 蛋白質量の低下は、終末部の変性・脱落によるものとは思われなかった。

⑥GTPCH 欠乏性 DRD の発症者と無症候性キャリアにおける脳内 GTPCH 蛋白質量の低下は、正常コントロールと比較し -60% 以上にまで至っており、この常染色体優性遺伝を示す DRD では、transcriptional か translational レベルで dominant-negative 効果が存在している可能性が示唆された。

⑦GTPCH 欠乏性 DRD の発症には、その好発年齢 (1-14 歳) における黒質線条体ドーパミンニューロン終末部 TH の、正常な発達に伴う、急激で大幅な機能低下が関与すると以前より推測されてきたが、ヒト被殻の GTPCH 蛋白質・TH 蛋白質の検討からは否定的と思われた。GTPCH 欠乏性 DRD 家系で認められる成人発症パーキンソニズムに関しては、加齢に伴う線条体 GTPCH 蛋白質・総ビオプテリン減少による TH 蛋白質の量と活性の低下両者の関与が示唆された。

#### 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 1 件)

① Yoshiaki Furukawa. GTP cyclohydrolase 1-deficient dopa-responsive dystonia. GeneReviews (National Center for Biotechnology Information [Internet: www.ncbi.nlm.gov], NIH), 査読有, 2012.

〔学会発表〕(計4件)

①古川 芳明, Ali Rajput, 北見 真喜子, 大泉 英樹, Oleh Hornykiewicz, Stephen Kish. 第54回日本神経学会学術大会, ヒト線条体 GTPCH と TH の発達・老化に伴う変化とドーパ反応性ジストニア発症機序の関連. 2013年6月1日、国際フォーラム(東京).

②Yoshiaki Furukawa, Hornykiewicz Oleh, Makiko Kitami, Stephen J. Kish. 第27回日本大脳基底核研究会. Recent advances in the genetics and neurochemistry of dopa-responsive dystonia. 2012年7月1日、晴海グランドホテル(東京).

③古川 芳明, Ali Rajput, 北見 真喜子, 大泉 英樹, Oleh Hornykiewicz, Stephen Kish. 第53回日本神経学会学術大会, ドーパ反応性ジストニアとパーキンソン病における脳内 GTP cyclohydrolase I 蛋白質量の変化. 2012年5月23日、国際フォーラム(東京).

④Yoshiaki Furukawa, Hornykiewicz O, Kish S. XXth World Congress of Neurology: Recent advances in the neurochemistry of dopa-responsive dystonia. Nov.14, 2011, Marrakesh, Morocco.

〔図書〕(計1件)

① Yoshiaki Furukawa, Mark Guttman, Shinichiro Nakamura, Stephen J. Kish. Dopa-responsive dystonia. In: Frucht SJ, editor. Movement Disorder Emergencies: Diagnosis and Treatment. New York, Springer (Humana Press), 査読無, 2013. p. 319-340.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古川 芳明 (FURUKAWA YOSHIAKI)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：10219107

### (2) 研究分担者

志村 秀樹 (SHIMURA HIDEKI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50286746