

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659462

研究課題名（和文） ゴーシェ病遺伝子変異によるパーキンソン病促進のメカニズム

研究課題名（英文） Mechanism by which the pathogenesis of Parkinson's disease is stimulated by Gaucher's mutation.

研究代表者

橋本 款 (HASHIMOTO MAKOTO)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・感覚システム研究分野・副参事研究員

研究者番号：50189502

研究成果の概要（和文）：

我々は、 α -シヌクレイン tg マウスと P123H β -シヌクレイン tg マウスの両者において神経軸索腫脹を観察し。これらを電子顕微鏡などで形態的に比較解析した。その結果、いずれにおいてもリソソーム系の病変を認めたが、ニトロ化、リン酸化といった変化は後者に較べて前者により強く認められ、ミトコンドリア及び LRRK2 の発現は前者のみに認められた。これらの結果より、2つのタイプの神経軸索腫脹は似て非なるものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We observed that axonal globules are formed in both α S- and P123H β Synuclein (β S) transgenic mice. Lysosomal pathology was similarly observed for both α S- and P123H β S-globules, while oxidative stress was associated with the α S-globules, and to a lesser extent with the P123H β S-globules. Other pathologies, such as mitochondrial alteration and LRRK2 accumulation, were exclusively detected for α S-globules. Collectively, both α S- and P123H β S-globules were formed through similar but distinct pathogenic mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：挑戦的萌芽研究

キーワード：シヌクレイン、パーキンソン病、ゴーシェ病、リソソーム、オートファゴソーム

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は、安静時振戦、筋強剛、寡動及び姿勢反射障害などの運動機能障害、自律神経障害、認知症などを呈する難知性の神経変性疾患である。近年の分子遺伝学の発展により、 α -シヌクレイン(α syn), Parkin, をはじめ多くの家族性 PD の原因遺伝子が同

定され、PD の病態に関して多くの知見が得られてきた。

このような状況で弧発性の PD や DLB においてゴーシェ病の原因遺伝子グルコセレブロシダーゼ (GBA) の変異が有意に高いこと、すなわち変異型 GBA が弧発性シヌクレイノバ

チーの危険因子として作用することが確立されたことは非常に重要である。ゴーシェ病は GBA 遺伝子の変異が原因で、GBA 活性が低下し、細胞内に糖脂質が大量に蓄積する常染色体劣性遺伝の代謝異常症である。臨床的には肝脾腫、貧血、易骨折性などを主な特徴とし、さらに、けいれん、斜視、開口困難などの神経障害を呈する。ゴーシェ病にリンクした変異型 GBA がシヌクレイノパチーを促進する機序は不明である。しかしながら、GBA 変異のヘテロ接合性により、PD に罹患しやすくなること(ref)、GBA の変異をともなう PD 患者の剖検脳のレビー小体において GBA の免疫原性が観察されること(Goker-Alpan et al. *Acta Neuropathol.* 2010)などを考慮すれば、ゴーシェ病などのリソソーム蓄積病とシヌクレイノパチーの間には、オートファジー・リソソーム系を介した共通病理が存在すると思われる。

2. 研究の目的

当初の申請においては脳に過剰発現した変異型 GBA トランスジェニック (tg) マウスを作製・解析する予定であったが、本申請の採択後類似した論文がいくつか発表されたため同様の内容の課題遂行に関しては、断念した。我々は高齢期の α synTg マウスの脳に神経軸索腫脹(globule 構造)が形成されることを形態的なアプローチにより観察していたが、この中にガングリオシドーシス特有の病変を思わせるような多重膜構造物(MCB:membranous cytoplasmic bodies)を見いだしていた(図 2b)。さらに、オートファゴソームの蓄積やグリオーシスの他、GM3 ガングリオシドーシスの患者脳に報告された特徴的なミエリン梢の断裂像も認めていた。したがって、本申請課題においては α syn tg マウスと P123H β -シヌクレイン (β syn) tg マウスの両者において観察していた神経軸索腫脹を電子顕微鏡などを中心に形態学的に比較解析し、興味深い知見を得たので報告する。

3. 研究の方法

誕生した Tg マウスは、genotyping の後、活動量、食事量、水分摂取量、体重、及び、生存率について定期的にチェックしながら、維持する。成年期(4-6 ヶ月)から老齢期のマウス(12-18 ヶ月)に対して、ホームケージテスト、ロタロッドテスト、水迷路テストなどの行動試験をおこなった後に麻酔、直ちに 4%パラホルムアルデヒドなどで灌流固定する。脳、脊髄組織などを採取後、病理組織切片を作製する。生化学的解析を考慮する場合は、片半球は病理組織学的実験(切片作成)に使用し、他側は、生化学的実験に使用する。

これらの標本に対して、組織学的には、HE, PAS などの一般染色に加えて免疫染色(DAB、及び、蛍光)により、大脳皮質、海馬、大脳基底核などにおける神経細胞の変化やグリア系の活性化を分析する。まず、抗 GBA 抗体、抗 α syn 抗体による染色をおこない、GBA や内因性 α syn の細胞内集積を、特にリソソームの形態変化に焦点を当てて観察する。また、シナプスの形態に関しては、 α syn とシナプトファイシンの二重染色により、ドーパミン系神経に対しては、 α syn とチロシン水解酵素 (TH) の二重染色により観察する。さらに電子顕微鏡によって、ミトコンドリア形態異常、オートファゴソームやリソソームの構造に注意を払って観察する。生化学的には、オートファジーの機能を、LC-3, beclin-1, ATG5 の発現量をウェスタンブロットにより評価する。さらに、チロシン水解酵素の活性、各種カテコラミン分泌量の測定をおこない、リソソーム活性をカテプシン B,D,L の活性を蛍光基質を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 家族性及び孤発性の DLB の症例において、変異型 β syn (V70M, P123H)が報告され、 β syn の変異は病的な機能変化を引き起こし、神経変性を促進する可能性が推定された。これらをふまえ、本研究では、変異型 β syn(P123H)に着目し、変異型 β synP123H 過剰発現型 tg マウスを作製し、免疫組織化学により解析したところ、複数のラインにお

いて、1 年 齢マウスの大 脳基 底核に β synP123H/ α -syn 陽性封入体形成が認められた。封入体は GAD65/67、GABA、に陽性を示したことから、GABA 神経に形成されていると考えられた。電子顕微鏡像では、封入体は神経軸索終末端が肥大し、シナプス小胞が蓄積した構造を呈し、多胞体やオートファゴソーム構造が観察され、オートファジー・リソソーム系異常の関与が推察された。この結果は PD とゴーシェ病などのリソソーム蓄積病において一部共通する病理像がみられるという最近の知見に一致するものであり、さらなる研究を推進している。生化学的には、Tg マウス脳において β synP123H/ α syn 蛋白の可溶性の低下、行動解析では、若齢（6-7 ヶ月）から自発運動量の減少が認められ、高齢（14-15 ヶ月）では、平衡運動能力の顕著な低下もみられた。これらの結果より、変異型 β syn は大 脳基 底核 GABA 神経系の軸索病変を特徴とした病理作用（オートファジー・リソソーム系異常など）を呈し、 α syn とは異なる機構で神経変性に寄与することを示唆するものである。

(2) P123H β syntg マウスはここに紹介します通り、神経細胞の軸索やその終末が膨れてそこに α syn や変異型の β syn が蓄積します。このような神経軸索終末の腫脹、いわゆるグロ ーブル形成は形態的に興味深く、また、PD やレビー小体型認知症 (DLB) などの神経変性においても重要であると考えらるので、これに焦点を当てて解析した。

P123H β syntg マウスと同様に α -syntg マウスにおいてもグロ ーブル形成が観察された。月齢に依存して高齢のマウスにおいて顕著に認められた。二重染色において α -syn とキネシンが共存する像が得られたので軸索由来であると判断できた。ニューロフィラメントは陰性でしたので軸索機能はないと思

われた。

これらのグロ ーブル形成は線条体や視床において顕著に観察された。それでは α syntg マウスのグロ ーブルはどのタイプの神経由来かということになるが、多くの分子を調べた結果、GABA、GAD、VGAT などに陽性となったので、GABA 神経に由来すると思われた。さらにこれらのグロ ーブルはカルビンジンに高率に陽性であることがわかった。また、P123H β syntg マウスのグロ ーブルも線条体淡窓級などの GABA 神経に由来することがわかった。 α syntg マウスのグロ ーブルを免疫電顕で調べたところ、オートファゴソームや空胞が充満しているような像、すなわちオートファジー、リソソーム病変が多く観察された。また、彎曲線状小体や指紋上構造に似たような特徴的な形態変化が観察された。これらの形態はリソソーム蓄積病様で報告されている。実際、 α syntg マウスのグロ ーブルは各種ガングリオシドに対する抗体で陽性に染色されたのでガングリオシドの蓄積が推定された。

さらに α syntg マウスグロ ーブルの免疫電顕ではミトコンドリアの腫脹、及び、増生が観察されたが、それ以上の、例えば、歪曲化、空胞化といった形態変化は認められなかった。一つの解釈は、これらのミトコンドリアの増加はリソソーム蛋白分解系の機能低下をエネルギー供給により補うために反応的に増加したものではないかと考えられた。対照的に P123H β syntg マウスのグロ ーブルはミトコンドリア陰性であった。

(3) 次にグロ ーブルにおけるミトコンドリアマーカーを調べたところ α syntg マウスでは Cyto C、VDAC1、HSP60 などが陽性に認められた。COX IV は陰性だったが、これはミトコンドリアのゲノムが欠損しておりヒトの PD 脳においてもしばしば欠損しているとい

う事実一致していた。免疫電顕の結果に一致して P123H β syntg マウスではミトコンドリアマーカーのマーカーは陰性であった。

α syntg マウスのグローブルは P123H β syntg マウスに較べてより強い酸化ストレスの所見が認められたので、これらの差にはミトコンドリアの有無が関与しているのではないかと考えられた。また、グローブルに蓄積した α -シヌクレインは翻訳後修飾であるリン酸化やニトロ化を受けていることがわかったが、これらに関しても α syntg マウスのグローブルのほうが P123H β syntg マウスのグローブルよりも高度に認められた。

(4) さて、近年、PD の患者さんの一割近くが家族性であり、何らかの遺伝子の変異が関与していることがわかってきました。 α syn の他に優性あるいは劣性遺伝を示すものはいくつか同定されましたが、中でも LRRK2 の変異を持った PD の病理像は、孤発性 PD のそれにもっとも近いことが言われている。また、ゲノムワイドの遺伝子解析においても LRRK2 が孤発性にリンクすることがわかった。そこでこれらの家族性 PD 遺伝子産物を調べたところ、 α syntg マウスのグローブルにおいては、LRRK2 が高率に陽性となりました。他の分子である PARKIN、PINK1、DJ-1 などは陰性であった。 α syn と、LRRK2 が協調してグローブルの形成に関与している可能性が考えられました。分子的なメカニズムは今後の課題にしたい。

(5). 以上をまとめると、i) α syntg マウスと P123H β syntg マウスの両者において神経軸索腫脹、いわゆるグローブルが形成され、いずれにおいてもリソソーム系の病変を認めました。ii)酸化ストレスやニトロ化、リン酸化といった α syn の変化は P123H β syntg マウスに較べて α -シヌクレイン tg マウスのグローブルにより強く認められました。iii) ミ

トコンドリア及び LRRK2 の発現は α syntg マウスのグローブルのみに認められた。

これらの結果より、2つのタイプの神経軸索腫脹は似て異なるものであると考えられる。

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 3 件)

1. Sekigawa A, Sekiyama K, Takamatsu Y, Fujita M, *Hashimoto M. Dual effects of β -synuclein on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2013 *in press* (査読有)
2. Sekigawa A, Takamatsu Y, Sekiyama K, Takenouchi T, Sugama S, Waragai M, Fujita M, *Hashimoto M. Diversity of mitochondrial pathology in a mouse model of axonal degeneration in synucleinopathies. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:817807. (査読有)
3. Sekigawa A, Fujita M, Sekiyama K, Takamatsu Y, Hatano T, Rockenstein E, La Spada AR, Masliah E, *Hashimoto M. Distinct mechanisms of axonal globule formation in mice expressing human wild type α -synuclein or dementia with Lewy bodies-linked P123H β -synuclein. *Mol Brain.* 2012;5:34. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. 関川明生 関山一成、藤田雅代、高松芳樹、橋本款 “Mechanism of axonal globule formation in a mouse model of α -synucleinopathy is distinct from that in a mouse model of β -synucleinopathy” 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会 2012 年 06 月 30 日 新潟
2. 橋本款 エルドバ誘発性ジスキネジアと大脳基底核におけるシヌクレイン病理の関連性 第 54 回日本老年医学会学術集会 (招待講演) (招待講演) 2012 年 06 月 29 日 東京

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称: 変異型 β シヌクレイントランスジェニック非ヒト動物

発明者: 橋本 款、藤田 雅代、中井 雅晶、井上 聡、津久井 通

権利者: 公益財団法人東京都医学総合研究所

種類: 特許 5150876

番号: 特願 2006-329803

取得年月日: 2012/12/14

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 欸 (HASHIMOTO MAKOTO)

公益財団法人東京都医学総合研究所・運動・
感覚システム研究分野・副参事研究員

研究者番号：50189502