

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591295

研究課題名(和文) 家族性パーキンソン病モデルマウスにおけるミトコンドリア異常と錐体外路系変性の関係

研究課題名(英文) Neuroaxonal dystrophy and mitochondrial injury in dopaminergic neurons of PLAN.

研究代表者

隅 寿恵 (Sumi-Akamaru, Hisae)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30403059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前に、家族性パーキンソン病であるPLA2G6関連神経変性症(PLAN)の疾患モデルとなるPLA2G6ノックアウトマウスでは神経細胞のミトコンドリア傷害が軸索変性を引き起こすことを示した。今回の研究によってPLANモデルであるPLA2G6ノックアウトマウス錐体外路系におけるドパミン分泌細胞が特徴的な軸索変性を生じること、内因性のシヌクレインが傷害ミトコンドリアに蓄積することを示した。さらに、患者脳におけるレヴィ小体にミトコンドリア膜蛋白が高度に発現していることを見出し、シヌクレインの蓄積がミトコンドリア膜変性に関連する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We previously found that injured mitochondria in motoneurons occur neuroaxonal dystrophy in PLA2G6 knockout mice, which is an excellent model of familial parkinson disease (PARK14). In this research, we demonstrated neuroaxonal dystrophy occurs also in dopaminergic neurons of PLA2G6 knockout mice. More, endogenous alpha-synuclein accumulated to injured mitochondria of motoneurons in PLA2G6 knockout mice. In patient's brain, lewy bodies contained much component of mitochondrial membranes. These suggests that the mitochondrial membranes would be associated with alpha-synucleinopathy.

研究分野：神経内科

キーワード：PLA2G6 ミトコンドリア シヌクレイン レヴィ小体 家族性パーキンソン病

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病はアルツハイマー病に次いで頻度の多い神経変性疾患であり、その神経変性の原因は不明である。慢性進行性に経過し最終的には多くの患者が嚥下困難・寝たきりとなるため、今後の超高齢化社会では医学的、社会的に問題は大きい。

レヴィ小体(シヌクレインの細胞内蓄積)は、パーキンソン病のバイオマーカーで黒質などの患部位に疾患特異的に存在するため、パーキンソン病の病態を明らかにするための鍵と考えられてきている。パーキンソン病の原因として、シヌクレインの異常凝集による小胞や膜輸送の傷害やミトコンドリア傷害が古くから注目されているが、パーキンソン病の十分な疾患モデルが存在しない現状から、今なお病態に関する十分な証拠が得られにくい。

PLA2G6 関連神経変性症 (PLAN) は慢性進行性の神経変性疾患であり、乳児軸索ジストロフィーや成人発症の家族性パーキンソン病など臨床症候の異なる疾患が含まれる。一方で、その病理像は共通して、軸索ジストロフィーとシヌクレイノパチーであることが知られる。我々は、PLA2G6 遺伝子ノックアウトマウスが PLAN の優れた疾患モデルであること、その脊髄神経細胞において早期からミトコンドリア内膜が選択的に変性することをこれまで明らかとしてきた (Shinzwa et al 2008, Beck et al 2011, Sumi-Akamaru et al 2015)。

## 2. 研究の目的

PLA2G6 遺伝子ノックアウトマウスの黒質・線条体を含む錐体外路系の神経変性の病態について、さらにミトコンドリア傷害によってシヌクレインの分布が変化するかどうかについて病理学的に明らかとする。PLAN 脳の神経病理学的特徴であるシヌクレイノパチー(レヴィ小体の形成)と軸索ジストロフィーがミトコンドリア傷害とどう関係するかを明らかとする。

## 3. 研究の方法

PLA2G6 遺伝子ノックアウト(KO)マウス(15週令、1年令、2年令)の脳パラフィンブロックから4 $\mu$ m厚さの切片を作成した。一次抗体として TOM20(ミトコンドリア外膜蛋白)、チトクロム c オキシダーゼ(CCO, ミトコンドリア内膜蛋白)、シヌクレイン、リン酸化シヌクレイン、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、4-ヒドロキシ-2-ノネナール(4-HNE)、グルタミン酸トランスポーター(VGlut1)に対する免疫組織学的染色を施行し、黒質・線条体の染色性を野生型マウスと比較した。二次抗体として Goat anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulins conjugated to peroxidase-labeled dextran polymer (Dako Envision+)を用い、DAB で発色した。軸索ジストロフィーの特徴であるスフェロイドを明瞭に検出する Periodic Acid Schiff(PAS)

染色を重染色し比較した。傷害された軸索の形態を3次的に解析するために20-40 $\mu$ m厚さの凍結切片を作成し TH に対する免疫染色を施行した。

KO マウス脊髄におけるシヌクレイン、リン酸化シヌクレイン、ユビキチンの発現を経時的に解析した。二重染色を用いてそれぞれの関係性を解析した。二重染色の際、2回目免疫反応の二次抗体には VECTASTAIN ABC-AP kit を用いた。

愛知医大加齢医科学研究所との共同研究により PLAN 症例(死亡時20歳、罹病期間17年)の脳を神経病理学的に解析した。中脳・上部橋・上部延髄におけるパラフィンブロックから6 $\mu$ m厚さの切片を作成し、シヌクレイン、リン酸化シヌクレイン、TOM20, CCO に対する免疫組織学的染色を施行し、パーキンソン病(n=5、死亡時74 $\pm$ 10歳、罹病期間13 $\pm$ 10年)と比較した。シヌクレイン、リン酸化シヌクレイン陽性のレヴィ小体とミトコンドリア膜蛋白の発現との関係を解析した。

## 4. 研究成果

KO マウス(15週令、1年令)の黒質では神経細胞が TH 陽性となり、その免疫反応性は野生型と明らかな違いを認めなかった。野生型マウス線条体ではニューロピルが TH 陽性の顆粒状から微小な空胞状、びまん性に陽性となったが、KO マウス線条体ではその染色パターンが不均一となって大型の TH 強陽性の空胞が多数認められた。KO マウス(2年令)線条体における TH 染色、Periodic Acid Schiff(PAS)染色の重染色では、TH 陽性構造物は PAS 陽性異常構造物とはほとんど一致しなかったが、一部では一塊となってスフェロイドを形成した。あるいは TH 陽性構造物の辺縁部が PAS 陽性となった。シヌクレイン、TOM20, CCO に対する免疫組織学的染色では、いずれも TH 強陽性の円状構造物へ共局在する凝集物は認められなかった。

凍結切片において、TH 陽性の腫大した遠位軸索(スフェロイド)を認めた。

VGlut1 に対する染色性は KO マウスにおいて中等度発現が低下していた。脳梁など白質に VGlut1 陽性のスフェロイドを多数認めた。黒質から線条体へ投射する軸索において 4-HNE が高発現していた

以上の結果から、KO マウスの錐体外路系においてドパミン分泌神経細胞に選択的に軸索ジストロフィーの病理変化が生じ、非常に特異的であるものの、ミトコンドリア傷害にとの直接的な関連性は明らかでなかった。しかしながら、KO マウスの黒質から線条体へ投射する軸索において 4-HNE が高発現していたことから、ミトコンドリア機能不全がこの軸索障害に二次的に関連する可能性が示唆され

た。TH 強陽性の異常構造物は、その形態および分布から、遠位軸索の腫大(スフェロイド)そのものであると考えられ、錐体外路系における PLAN の神経軸索ジストロフィーの病理学的指標となる可能性が示唆された。

マウス脊髄に対する シヌクレイン染色では、野生型に比較して K0 マウスではニューロピルにより高発現していた。リン酸化 シヌクレインに対する免疫染色では、野生型マウスでは全く染まらなかったが、K0 マウスでは、以前報告した、内膜が選択的に傷害される異常ミトコンドリアに一致して、リン酸化 シヌクレイン陽性の小胞を非常に多数、観察された。これらは非リン酸化 シヌクレインに陰性から弱陽性、かつユビキチンに陰性であった。TOM20 と二重染色することにより、リン酸化 シヌクレイン陽性の小胞の一部は TOM20 と共局在することが明らかとなり、変性ミトコンドリア内にリン酸化 シヌクレインが蓄積することが示唆された。このリン酸化 シヌクレイン陽性構造物は錐体外路系には明らかでなかった。以上のことから、リン酸化 シヌクレインの蓄積は神経変性というよりもミトコンドリア傷害に対して生じる事象である可能性が考えられた。

PLAN では非常に多数のレヴィ小体をびまん性脳全体、広範囲に観察された。PLAN 症例の黒質、青斑核、迷走神経背側核では、レヴィ小体の TOM20 の発現が、パーキンソン病におけるレヴィ小体よりも強くかった。PLAN におけるレヴィ小体の形成にはミトコンドリア膜の異常が関連する可能性が示唆された。

今回の研究全体として、PLAN モデルである K0 マウスの錐体外路系においてドパミン分泌神経細胞が選択的に傷害されること、PLA2G6 遺伝子機能不全による軸索ジストロフィーの機序としてミトコンドリア傷害とシヌクレインの蓄積が関与することが、K0 マウスと患者脳において示された。

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hisae Sumi-Akamaru, Goichi Beck, Shinsuke Kato, Hideki Mochizuki. Neuroaxonal dystrophy in PLA2G6 knockout mice. *Neuropathology* 2015 May 6. doi: 10.1111/neup.12202.

隅寿恵. NBIA とパーキンソン病の鑑別 *Frontiers in Parkinson disease*.2015.5 8(2);32-36

## 〔学会発表〕(計 12 件)

Hisae Sumi-Akamaru, Goichi Beck, Hideki Mochizuki. Neuroaxonal dystrophy in

PLA2G6 gene knockout mice. 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会 Symposium1 Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation 平成 27 年 6 月 7 日 東京

隅寿恵、別宮豪一、伊藤朝子、新沢康英、加藤信介、辻本賀英、佐古田三郎、望月秀樹 PLA2G6 遺伝子欠損マウスの線条体における変性軸索の形態学的解析 第 55 回日本神経学会学術大会 平成 26 年 5 月 24 日 福岡

別宮豪一、隅寿恵、新沢康英、早川英規、辻本賀英、望月秀樹 PLA2G6 遺伝子ノックダウンによる シヌクレインの細胞内動態 第 55 回日本神経学会学術大会 平成 26 年 5 月 23 日 福岡

隅寿恵、別宮豪一、伊藤朝子、新沢康英、加藤信介、辻本賀英、佐古田三郎、望月秀樹 PLA2G6 遺伝子欠損マウスのドパミン作動性神経系における神経軸索ジストロフィー 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会 平成 26 年 6 月 6 日 東京

隅寿恵、別宮豪一、新沢康英、加藤信介、佐古田三郎、辻本賀英、望月秀樹 PLA2G6 遺伝子欠損マウス脊髄神経細胞における異常ミトコンドリアとユビキチン陽性の変性軸索の関係 第 54 回日本神経病理学術研究会 平成 25 年 4 月 25 日 東京

別宮豪一、隅寿恵、新沢康英、安田徹、辻本賀英、佐古田三郎、望月秀樹、PLA2G6 遺伝子欠損マウス脳におけるチロシンヒドロキシラーゼ陽性異常構造物の経時的増加と広がり 第 54 回日本神経学会学術大会 平成 25 年 5 月 29 日 東京

隅寿恵、別宮豪一、新沢康英、加藤信介、佐古田三郎、辻本賀英、望月秀樹 PLA2G6 遺伝子欠損マウス脊髄におけるユビキチン陽性構造物と軸索変性、第 54 回日本神経学会学術大会 平成 25 年 5 月 29 日 東京

別宮豪一、隅寿恵、白井 良樹、安田 徹、新沢康英、辻本賀英、望月秀樹 iPLA<sub>2</sub> 遺伝子欠損マウス脳における鉄沈着および軸索変性との関連性の検討 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会 平成 24 年 6 月 30 日 新潟

隅寿恵、別宮豪一、新沢康英、加藤信介、辻本賀英、佐古田三郎、望月秀樹 PLA2G6 ノックアウトマウス脊髄では早期から LC3 が小胞に高発現する 第 8 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres 平成 26 年 10 月 4 日 京都

別宮豪一、隅寿恵、新沢康英、加藤信介、安

田徹、辻本賀英、佐古田三郎、望月秀樹  
PLA2G6 遺伝子欠損マウスにおけるドパミン  
作動性神経系の変性 第 6 回パーキンソン  
病・運動障害疾患コンgres 平成 24 年 10  
月 京都

隅寿恵、別宮豪一、加藤信介、新沢康英、安  
田徹、辻本賀英、望月秀樹 PLA2G6 遺伝子欠  
損マウス脊髄におけるリン酸化 シヌクレ  
インの蓄積 第 53 回日本神経学会学術大会  
平成 24 年 5 月 25 日 東京

隅寿恵、別宮豪一、新沢康英、加藤信介、安  
田徹、辻本賀英、佐古田三郎、望月秀樹  
PLA2G6 遺伝子欠損マウスにおけるリン酸化  
シヌクレインの神経細胞内蓄積と軸索内  
輸送 第 6 回パーキンソン病・運動障害疾患  
コンgres 平成 24 年 10 月 京都

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 隅寿恵 (SUMI, Hisae)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：3 0 4 0 3 0 5 9

(2) 研究分担者 別宮豪一 (BECK, Goichi)

大阪大学・大学院医学系研究科・医員

研究者番号：2 0 6 2 6 3 5 3

(3) 連携研究者 なし