

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790879

研究課題名(和文) 新しいシヌクレイン遺伝子導入マウスを用いたパーキンソン病発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Exploring the pathomechanism of Parkinson's disease by novel alpha-synuclein transgenic mice

研究代表者

山門 穂高 (YAMAKADO, HODAKA)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10378771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：-シヌクレイン(-syn)の遺伝子とその発現調整領域を含むBAC cloneを用いて、孤発性あるいはPARK4をモデルとするトランスジェニックマウス・ラットを作製した。-synの凝集性や発現量を増加させる目的で、A53T変異の導入やRep1領域の改変、PDにおけるリスク塩基変異(SNP)の導入を2か所に行い、BAC cloneを改変した。作製したモデルマウス・ラットを解析中であり、グルコセレブロシダーゼ(GBA)変異モデルとの交配モデルは、孤発性PDのよいモデルとなると期待される。

研究成果の概要(英文)：We created the alpha-synuclein BAC transgenic mice and rats harboring alpha-syn gene and its expression regulatory regions. To obtain symptomatic model, we introduced A53T mutation, risk SNPs and modified Rep1 region to alpha-syn BAC clone by Ret/ET recombination system. Now we are analyzing these transgenic animals, and speculate alpha-syn BAC Tg mice/rats crossed with glucocerebrosidase mutant are promising animal model for PD.

研究分野：医歯薬学

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

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) パーキンソン病(PD) と $\alpha$ -Syn

$\alpha$ -Syn は家族性 PD の責任遺伝子として同定されたが、その後点変異のみならず正常遺伝子の多重複でも孤発性 PD に非常に類似した家族性 PD を発症することが判明した。孤発性 PD においては、 $\alpha$ -Syn はレビー小体の主要構成成分であり、さらに最近のゲノムワイド関連解析(GWAS)においては、 $\alpha$ -Syn 遺伝子が最も影響力のある感受性遺伝子として同定された。このように、 $\alpha$ -Syn は変異や重複による質的・量的な変化を介してまれな家族性 PD の原因となるだけでなく、一塩基多型による発現量の軽微な増加を介して孤発性 PD の発症に重要な役割を果たしている事が証明されており、この点で最も重要な孤発性 PD 関連遺伝子といえる。

### (2) PD 脳における $\alpha$ -Syn 発現量の変化

$\alpha$ -Syn はレビー小体に蓄積してはいるが、 $\alpha$ -Syn の発現量が PD 発症に関連しているかについては議論があった。しかし最近ではマイクロダイセクションやリアルタイム PCR の結果などからは、PD 患者の中脳黒質ドパミン細胞では  $\alpha$ -Syn の蛋白量・mRNA とも増加しているという報告が多い。また他の炎症性神経疾患でも増加しているという報告がある。

$\alpha$ -Syn の蓄積は細胞死に至る過程ではあるが、タンパク質のみならず mRNA が増加しているという事実からは、 $\alpha$ -Syn 発現量の増加が封入体形成・細胞死に影響している可能性が想定される。

### (3) PD モデル動物と孤発性 PD 研究の現状

現在、これまで孤発性 PD マウスモデルとして様々な promoter を用いたトランスジェニック (Tg) マウスが作製された。Prion promoter モデルでは、脊髄に  $\alpha$ -syn の凝集や細胞死が生じ、運動ニューロン病の様な表現型が、Thy-1 promoter モデルでは、広範な

$\alpha$ -syn 凝集とともに認知症や末梢神経障害の様な表現型を認めている。いずれも、 $\alpha$ -syn の異所性強制高発現のため、 $\alpha$ -syn の凝集メカニズムの解明には一定の貢献があったが、カテコラミン細胞特異的な細胞死、 $\alpha$ -Syn を主成分とする Lewy 小体の存在、は再現できていない。この様にモデル動物がないことが、特に孤発性の PD 研究を推進する上で大きな障害となっていた。

## 2. 研究の目的

孤発性 PD あるいは PARK4 をモデルとする、 $\alpha$ -syn をベースとしたモデル動物を作製し、ドパミン細胞死や  $\alpha$ -syn 凝集の分子メカニズムの解明、あるいは将来的には新規薬剤投与の in vivo モデルとすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

$\alpha$ -syn の発現量を確保するために、Cre/loxP システムを使用した  $\alpha$ -syn/Cre BAC Tg マウスの作製を予定した。この手法においては、ヒト  $\alpha$ -syn BAC 内で、Ret/ET system を用いて、 $\alpha$ -syn 遺伝子の開始コドン以下を Cre recombinase cDNA に改変する。改変された Cre/BAC から Tg construct (約 190kb) を精製し、B6 マウスの受精卵への microinjection 法により、Tg マウスを作製する。Tg construct は巨大であり、かつ  $\alpha$ -syn 遺伝子発現制御領域を十分に含むため、このマウスでは Cre は transgene 挿入部位の周囲のゲノムの影響を受けず、 $\alpha$ -syn 発現部位に忠実に発現することが最大の利点である。

一方、BAC への Cre の挿入に技術的な困難さも想定され、その場合は他に  $\alpha$ -syn の発現や凝集性を亢進させる方法として、A53T 変異や孤発性 PD の GWAS で同定されたりスク SNP の導入も考慮した。

#### 4 . 研究成果

時間的・予算的な制限から、Cre/loxP システムを使用したモデル作製から、 $\alpha$ -syn BAC の改変を主としたモデル作製に計画を変更した。この際、孤発性 PD のリスク因子として同定された SNP は  $\alpha$ -syn の発現を増加させると考えられるが、我々の  $\alpha$ -syn BAC clone はリスクが減少する type の SNP を持っていることが判明した。このため、孤発性 PD のリスク因子として同定された二つの allele に対して、rs11931074(T G)と rs3857059 (G A)変異を Ret/ET 改変システムを用いて導入した。また、 $\alpha$ -syn 遺伝子上流約 10kb にある Rep 1 繰り返し配列に関する、リスク因子となる繰り返し配列数(Rep 259bp 261bp)を導入した。さらに、 $\alpha$ -syn の凝集性を高めるために、A53T 変異も同システムを用いて導入した。これらの改変 BAC clone を精製し、C57BL/6 マウス受精卵に injecton し、トランスジェニックマウスを作製した。さらに、BAC トランスジェニックモデルにおいては、マウスよりラットの方がより高コピー数の line を得られることが分かり、同コンストラクトを用いて、BAC トランスジェニックラットも同様に作製した。現在、作製したモデルマウス・ラットを解析中であり、グルコセレブロシダーゼ (GBA) 変異動物との交配モデルは、孤発性 PD のよいモデルとなると期待される。

#### 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 8 件)

(すべて査読有)

1. Exploring the Pathogenetic Mechanisms underlying Parkinson's Disease in

Medaka Fish. Matsui H, Uemura N, Yamakado H, Takeda S, Takahashi R. *J Parkinsons Dis.* Dec 23, 2013

2. The function of parkin: revisited. Yamakado H, Takahashi R. *Mov Disord.* 14:1936, 2013
3. Genetic correction will be a standard method for the patient-derived ips cell research? Takahashi R, Yamakado H. *Mov Disord.* 14:1935,2013
4. Minakawa EN, Yamakado H, Tanaka A, Uemura K, Takeda S, Takahashi R. Chicken DT40 cell line lacking DJ-1, the gene responsible for familial Parkinson's disease, displays mitochondrial dysfunction. *Neurosci Res.*, Sep 21, 2013
5. Ageta-Ishihara N, Yamakado H, Morita T, Hattori S, Takao K, Miyakawa T, Takahashi R, Kinoshita M. Chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice. *Mol Brain*, 6:35, 2013
6. Matsui H, Gavinio R, Asano T, Uemura N, Ito H, Taniguchi Y, Kobayashi Y, Maki T, Shen J, Takeda S, Uemura K, Yamakado H, Takahashi R. PINK1 and Parkin complementarily protect dopaminergic neurons in vertebrates. *Hum Mol Genet.*, 22:2423-34, 2013
7. Nuber S, Harmuth F, Kohl Z, Adame A, Trejo M, Schönig K, Zimmermann F,

Bauer C, Casadei N, Giel C, Calaminus C, Pichler BJ, Jensen PH, Müller CP, Amato D, Kornhuber J, Teismann P, Yamakado H, Takahashi R, Winkler J, Masliah E, Riess O. A progressive dopaminergic phenotype associated with neurotoxic conversion of  $\alpha$ -synuclein in BAC-transgenic rats. *Brain*, 136 :412-32, 2013

8. Yamakado H, Moriwaki Y, Yamasaki N, Miyakawa T, Kurisu J, Uemura K, Inoue H, Takahashi M, Takahashi R.  $\alpha$ -Synuclein BAC transgenic mice as a model for Parkinson's disease manifested decreased anxiety-like behavior and hyperlocomotion. *Neurosci Res.*, 73:173-7, 2012

[学会発表](計 2 1 件)

1. Takahashi, R., Yamakado, H., Gavinio, R. COGNITIVE AND PSYCHIATRIC FEATURES IN ANIMAL PD MODELS. 8<sup>th</sup>International Congress On Mental Dysfunction & Other Non-Motor Features In Parkinson's Disease and Related Disorders, Berlin, Germany. (2012.5.4)
2. Yamakado, H. Moriwaki, Y. Yamasaki, N. Miyakawa, T. Kurisu, J. Uemura, K. Inoue, H. Takahashi, M. Takahashi, R.:  $\alpha$ -synuclein BAC transgenic mice as a model for Parkinson's disease manifested decreased anxiety-like behavior. The MDS 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Dublin, Ireland (2012. 6.21)

3. 樽野 陽亮、松井秀彰、齊藤太郎、吉村 淳、森下真一、重信秀治、田中実、上村 紀仁、山門穂高、高橋良輔 : ATP13A2 (PARK9)変異メダカの解析、第 35 回日本神経科学大会、2012.9.20、名古屋
4. Gavinio, R. Matsui, H. Ito, H. Taniguchi, Y. Yamakado, H. Maki, T. Sawada, T. Takeda, S. Takahashi, R. : Compensational relationship between Parkin and PINK1、第 35 回日本神経科学大会、2012.9.20、名古屋
5. 上村紀仁、石川 藤原智子、山門穂高、植村健吾、藤堂剛、高橋良輔 : メダカを用いた GBA 変異とパーキンソン病の関連性の解析、日本神経科学大会、2012.9.20、名古屋
6. 上村紀仁、石川 藤原智子、山門穂高、植村健吾、藤堂剛、高橋良輔 : メダカを用いた GBA 変異とパーキンソン病の関連性の解析、第 6 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres( MDSJ)、2012.10.12、京都
7. 樽野陽亮、松井秀彰、上村紀仁、山門穂高、高橋良輔 : ATP13A2 (PARK9)変異メダカの解析、第 6 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、2012.10.13、京都
8. 浅野剛史、山門穂高、高橋良輔 : BAC テクノロジーを用いたパーキンソン病の治療薬候補の探索、第 6 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、2012.10.13、京都
9. Norihito Uemura, Tomoko Fujiwara-Ishikawa, Masato Kinoshita, Masato Koike, Hideaki Matsui, Hodaka Yamakado, Kengo Uemura, Yasuo Uchiyama, Takeshi Todo, Shun-ichi Takeda and Ryosuke Takahashi.:Viable Gaucher's disease model of medaka fish completely deficient in

- glucocerebrosidase activity developed alpha-synuclein aggregation in the brain. "Neuroscience 2013" San Diego (2013.11.10)
10. 上村紀仁、石川智子、木下政人、小池正人、松井秀彰、山門穂高、植村健吾、内山安男、藤堂剛、武田俊一、高橋良輔、GBA ノックアウトメダカは脳にアルファシヌクレイン凝集体を形成する、日本 Cell death 学会 京都 (2013.7.19)
  11. Norihito Uemura, Tomoko Fujiwara-Ishikawa, Masato Kinoshita, Masato Koike, Hideaki Matsui, Hodaka Yamakado, Kengo Uemura, Yasuo Uchiyama, Takeshi Todo, Shun-ichi Takeda and Ryosuke Takahashi.:Viable Gaucher's disease model of medaka fish completely deficient in glucocerebrosidase activity developed alpha-synuclein aggregation in the brain "17th international congress of Parkinson's disease and movement disorders" Sydney (2013.6.20)
  12. Norihito Uemura, Tomoko Fujiwara-Ishikawa, Masato Kinoshita, Masato Koike, Hideaki Matsui, Hodaka Yamakado, Kengo Uemura, Yasuo Uchiyama, Takeshi Todo, Shun-ichi Takeda and Ryosuke Takahashi.:Viable Gaucher's disease model of medaka fish completely deficient in glucocerebrosidase activity developed alpha-synuclein aggregation in the brain. "日本神経科学学会" 京都 (2013.6.22)
  13. Yamakado H, Asano T, Takahashi, R.:Therapeutic approach to Parkinson's disease by modifying -synuclein expression." The MDS 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders "Sydney (2013. 6.17)
  14. 上村紀仁、石川智子、木下政人、小池正人、松井秀彰、山門穂高、植村健吾、内山安男、藤堂剛、武田俊一、高橋良輔、メダカを用いた GBA 変異とパーキンソン病の関連性の解析、日本神経学会、東京 (2013.5.31)
  15. 浅野剛史、山門穂高、高橋良輔、-Synuclein の発現量の調節を標的とするパーキンソン病治療薬剤のスクリーニング、Neuro2013、京都 (2013.6.20)
  16. 小芝泰、森実飛鳥、山門穂高、菊地哲広、土井大輔、西村周泰、皆川栄子江川斉宏、近藤孝之、井上治久、高橋淳、高橋良輔、疾患特異的 iPS 細胞モデルによる遺伝性パーキンソン病の研究、第 3 6 回日本神経科学大会、京都 (2013.6.20-23)
  17. 浅野 剛史、松井 秀彰、Robert Gavinio、上村 紀人、伊東 秀文、谷口 善仁、Jie Shen、武田 俊一、植村 健吾、山門 穂高、高橋 良輔 PINK1 と Parkin は脊椎動物において相補的にミトコンドリアを保護する 第 2 2 回 日本 Cell Death 学会学術集会、京都 (2013.7.19)
  18. 小芝泰、森実飛鳥、山門穂高、菊地哲広、皆川栄子、土井大輔、西村周泰江川斉宏、井上治久、高橋淳、高橋良輔、疾患特異的 iPS 細胞モデルによる遺伝性パーキンソン病の研究、第 54 回日本神経学会学術総会、東京 (2013.5.29-6.1)
  19. 浅野剛史、山門穂高、高橋良輔、マウスを用いたゾニサミドの作用機序の解析、第 7 回 パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、東京 (2013.10.11)
  20. 小芝泰、森実飛鳥、山門穂高、陣上直人、

菊地哲広、土井大輔、皆川栄子、江川斉  
宏、井上治久、高橋淳、高橋良輔、疾患  
特異的 iPS 細胞モデルによる LRRK2 変異  
パーキンソン病の研究、第 7 回パーキン  
ソン病・運動障害疾患コンgres、東京  
(2013.10.10-12)

21. 浅野 剛史、松井 秀彰、Robert Gavinio、  
上村紀人、伊東秀文、谷口善仁、Jie Shen、  
武田 俊一、植村 健吾、山門 穂高、高  
橋 良輔 PINK1 と Parkin は脊椎動物に  
おいて相補的にミトコンドリアを保護  
する 第 36 回 日本分子生物学会、神  
戸 (2013.12.14)

〔図書〕(計 5 件)

山門穂高 他、心と体のクロストークから解  
く 精神・神経疾患 発症基盤・病態生理を  
担う分子カスケードから臨床応用まで、実験  
医学増刊、2012、30 巻 13 号 P2004-2007.

山門穂高 他、パーキンソン病動物モデル、  
神経内科、2012、80、P466-474.

山門穂高 他、パーキンソン病と運動異常  
Movement disorder の病因、アクトリアル  
脳神経疾患の臨床、2013、P39-43

山門穂高 他、孤発性パーキンソン病、日本  
臨床別冊 神経症候群第 2 版、2014、P65-68

山門穂高 他、パーキンソン病の薬物療法、  
今日の神経疾患治療指針 (第 2 版) 2013、  
P728-733

〔その他〕

ホームページ (京都大学神経内科)  
<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~neurology/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者 山門穂高  
(10378771)

研究者番号：

(2) 研究分担者  
( なし )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( なし )

研究者番号：