

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860678

研究課題名(和文)Perry症候群の病態解明研究

研究課題名(英文)A pathogenesis study of Perry syndrome

研究代表者

三嶋 崇靖(Mishima, Takayasu)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：00600602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：【臨床研究】Perry症候群の詳細な臨床症状について報告した。また、Perry症候群の国際診断基準を作成した。

【基礎研究】臨床病理学的検討により、Perry症候群が新たなTDP-43プロテインopathyであることを示した。また、Perry症候群患者由来iPS細胞からTH陽性細胞を分化誘導した。ダイナクチン蛋白凝集体を検出し、病態の一部再現に成功した。さらにPerry症候群トランスジェニックマウスを作製し、アパシーやパーキンソン症候群の一部再現に成功した。

研究成果の概要(英文)：【Clinical study】We reported clinical features of patients with Perry syndrome. We established international diagnostic criteria for Perry syndrome.

【Basic study】We showed that Perry syndrome is a distinctive type of TDP-43 proteinopathy. We generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a Perry syndrome patient and differentiated iPSCs into tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons. TH-positive neurons from a patient with Perry syndrome had dynactin aggregations in cytoplasm. Patient TH-positive neurons recapitulated an aspect of the disease phenotype of Perry syndrome. We generated DCTN1 G71A transgenic mice. These mice showed decreased exploratory activity and impaired motor coordination. These behavioral defects paralleled apathy-like symptoms and parkinsonism encountered in Perry syndrome.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：Perry症候群 DCTN1 TDP-43 モデルマウス iPS細胞 診断基準

1. 研究開始当初の背景

(1) Perry 症候群はパーキンソニズム、うつ・アパシー、体重減少、中枢性低換気をきたす予後不良の常染色体優性遺伝の神経変性疾患である。坪井らにより本邦の家系の存在が確認され、2009年に *DCTN1* 遺伝子変異が原因であることが判明した (Farrer MJ, et al. Nat Genet. 2009)。さらなる調査で本邦に4家系が存在することが判明したが、詳細な臨床症状や経過については不明であった。

(2) 病理学的には TDP-43 蛋白凝集体が特徴であることも明らかになったが (Wider C, et al. Parkinsonism Relat Disord. 2009)、詳細な TDP-43 病理についてその他の TDP-43 プロテノパチーとの比較はなされていなかった。

(3) Perry 症候群の遺伝子変異を導入した細胞でダイナクチン蛋白凝集体がみられることは報告されていたが、詳細な機能解析は行われていなかった。

2. 研究の目的

(1) 臨床疫学的調査を行い、本邦の Perry 症候群の臨床症状の特徴を明らかにする。

(2) Perry 症候群剖検脳を用い、前頭側頭葉変性症 (FTLD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と TDP-43 凝集体の特徴や凝集体の分布などについて比較検討を行う。

(3) Perry 症候群の遺伝子変異を導入した細胞における TDP-43 蛋白やダイナクチン蛋白凝集体の有無や分布、細胞死、ミトコンドリア機能異常、酸化ストレス、小胞体ストレス、ユビキチン-プロテアソーム系、オートファジー系の異常について検討する。

3. 研究の方法

(1) 家系調査を行い、本邦の4家系 (FUK-1、FUK-4、OMT、MZK) の臨床症状を明らかにする。発症者に関して臨床症状、画像、生理検査、病理を詳細に検討し、臨床表現型の特徴を集約する。また、新規家系の発掘も行う。

(2) Perry 症候群や ALS、FTLD の剖検脳を用いて抗 TDP-43 抗体、抗ユビキチン抗体、及びダイナクチンタンパク質複合体の主要なサブユニットである p150^{glued}、p50、dynein などに対する抗体を用い、免疫染色法にて構成蛋白の検出を行う。また凍結脳では部位別に細胞質抽出液と核抽出液を分離し、それぞれに Western blotting にて評価を行う。

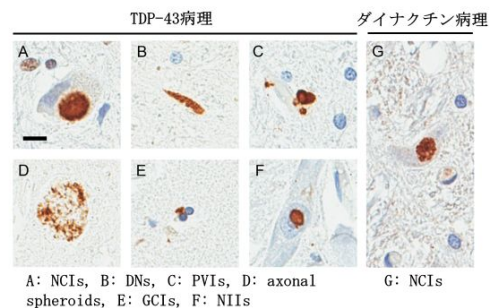
(3) 剖検脳と同様、TDP-43 と p150^{glued} の抗体を用いて *DCTN1* 遺伝子変異を導入した細胞内の分布と凝集体の有無、構成成分を検討する。Western blotting で TDP-43 と p150^{glued} 抗体を用いた細胞内局在の検討を行い、変異によるダイナクチン蛋白機能異常が TDP-43 細胞分布の変化を招くかどうかの検討を行う。また、ミトコンドリア機能異常、酸化ストレス、小胞体ストレス、ユビキチン-プロテアソーム系、オートファジー系の異常等の有無についても検討する。

4. 研究成果

(1) 我々は、FUK-1 家系の Perry 症候群で運動制御障害や punding がみられることを報告した (Mishima T, et al. Parkinsonism Relat Disord. 2015)。また、OMT 家系で孤発性パーキンソン病に類似したパーキンソニズムを呈し、脳ドパミントランスポーターシンチグラフィの取り込み低下がみられることを報告した (Mishima T, et al. Parkinsonism Relat Disord. 2016)。FUK-1 および OMT 家系については、嚥下障害の報告も行った (Uemoto G, et al. Case Rep Neurol. 2017)。さらに国際共同研究により Perry 症候群の国際診断基準を作成し、Perry 症候群から Perry 病への名称変更を提唱した (Mishima T, et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2018)。

(2) Department of Neuroscience Mayo Clinic Jacksonville の Dickson 研究室との国際共同研究により Perry 症候群の臨床病理学的検討が可能となった。ALS や運動ニューロン疾患を伴う前頭側頭型認知症 (FTLD-MND)、hippocampal sclerosis、*DCTN1* 遺伝子変異を伴う運動ニューロン病 (HMN7B) で TDP-43 蛋白凝集体の有無や分布、ダイナクチン蛋白凝集体の有無について検討した。TDP-43 凝集体は、neuronal cytoplasmic inclusions (NCIs)、neuronal intranuclear inclusions (NIIs)、dystrophic neurites (DNs)、axonal spheroids、oligodendroglial cytoplasmic inclusions (GCIs)、perivascular astrocytic inclusions (PVI) に分類され、それぞれの凝集体の分布について検討した。Perry 症候群は脳幹や基底核優位の TDP-43 病理がみられ、NCIs や DNs だけでなく PVI もみられことを示した。また、Perry 症候群の TDP-43 の電子顕微鏡像はアルツハイマー病に類似していることも明らかにした。Perry 症候群ではダイナクチン凝集体がみられるが ALS や FTLD-MND ではみられず、HMN7B では TDP-43 病理はみられないことが明らかになり、Perry 症候群は、新たな TDP-43 プロテノパチーであることを見出した (Mishima et al. J Neuropathol Exp Neurol. 2017)。

Perry 症候群の TDP-43 およびダイナクチン病理

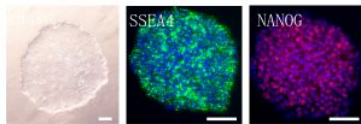


また、Perry 症候群の睡眠障害に関しても検討を行った。FTLD-MND、多系統萎縮症(MSA) コントロール群でマイネルト基底核のオレキシンの染色性について比較検討した。Perry 症候群は MSA と同様にコントロール群と比較して有意にオレキシンの染色性の低下がみられることを報告した (Mishima T, et al. Parkinsonism Relat Disord. 2017)。

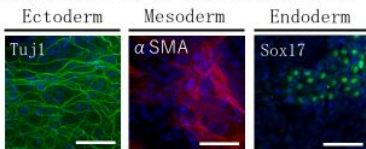
(3) F52L 変異 (OMT 家系) のプラスミドを培養細胞に遺伝子導入し、細胞質内にダイナクチン蛋白凝集体を確認した。また、OMT 家系患者から iPS 細胞を樹立し、tyrosine hydroxylase (TH) 陽性細胞に分化誘導した。患者由来 TH 陽性細胞でダイナクチン蛋白凝集体を検出し、病態の一部再現に成功した。Perry 症候群の病理学的特徴である TDP-43 凝集体を検出することはできず、TDP-43 凝集体の再現や細胞死のメカニズムに関する検討は今後の課題である (Mishima et al. Parkinsonism Relat Disord. 2016)。

Perry症候群患者由来iPS細胞

Generation of iPSCs

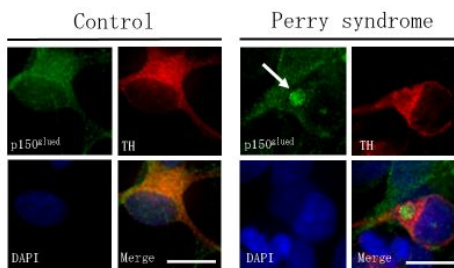


Immunocytochemistry of three germ layers



Mishima et al. Parkinsonism Relat Disord. 2016

TH陽性細胞におけるp150^{glued}凝集体

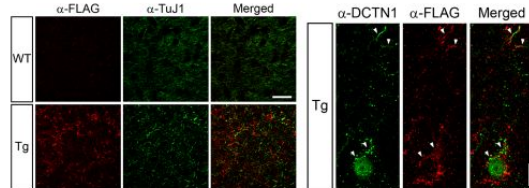


Mishima et al. Parkinsonism Relat Disord. 2016

さらに我々は、Perry 症候群のモデルマウス作製も行った。Perry 症候群 G71A 変異トランスジェニックマウスを作製し、野生型と G71A 変異マウスを用い、病理学的解析および行動解析を行った。Thy-1 プロモーターを用い、トランスジェニックマウスを作製し、PCR やウエスタンブロッティング、免疫染色でダイナクチンの発現量の検討を行った。病理学

的解析では TDP-43 およびダイナクチン凝集体の有無について検討した。行動解析は、オープンフィールドテスト、ロータロッドテスト、トラクションメーターを用い、マウスの自発性や協調運動、筋力について評価した。G71A 変異マウスで、TDP-43 やダイナクチン凝集体はみられなかったが、6 カ月齢変異マウスで探索行動減少を認め、16 カ月齢変異マウスでは協調運動障害がみられた。我々は、G71A 変異トランスジェニックマウスを用い、Perry 症候群の症状であるアパシーやパーキンソニズムの一部再現に成功した (Mishima et al. Neuroscience Letters. 2018)。

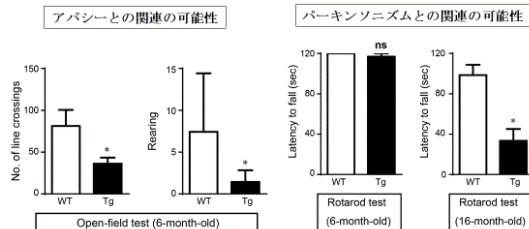
DCTN1 G71A変異Perry症候群トランスジェニックマウスのダイナクチン染色



Cerebral cortex of 16-month-old mice

Mishima et al. Neuroscience Letters. 2018

行動解析



Asterisks indicate P < 0.05; Mann-Whitney test

Mishima et al. Neuroscience Letters. 2018

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計8件)

Perry 症候群. 三嶋崇靖, 坪井義夫. - Frontiers in Parkinson Disease. 2018, 11: 28-31 (査読無し)

Behavioral defects in a DCTN1G71A transgenic mouse model of Perry syndrome. Mishima, T., Deshimaru, M., Watanabe, T., Kubota, K., Kinoshita-Kawada, M., Yuasa-Kawada, J., Takasaki, K., Uehara, Y., Jinno, S., Iwasaki, K., Tsuboi, Y. - Neurosci Lett. 2018, 666: 98-103 (査読有り) doi: 10.1016/j.neulet.2017

Establishing diagnostic criteria for Perry syndrome. Mishima, T., Fujioka, S., Tomiyama, H., Yabe, I., Kurisaki, R., Fujii, N., Neshige, R., Ross, OA., Farrer, MJ., Dickson, DW., Wszolek, ZK., Hattori, N., Tsuboi, Y. - J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2018, 89:

482-487 (査読有り) doi:
10.1136/jnnp-2017-316864
Perry Syndrome: A Distinctive Type of
TDP-43 Proteinopathy. Mishima, T.,
Koga, S., Lin, WL., Kasanuki, K.,
Castanedes-Casey, M., Wszolek, ZK., Oh,
SJ., Tsuboi, Y., Dickson, DW. - J
Neuropathol Exp Neurol. 2017, 76:
676-682 (査読有り) doi:
10.1093/jnen/nlx049
Dysphagia in Perry syndrome:
pharyngeal pressure in two cases.
Umemoto, G., Tsuboi, Y., Furuya, H.,
Mishima, T., Fujioka, S., Fujii, N.,
Arahata, H., Sugahara, M., Sakai, M. -
Case Rep Neurol. 2017, 9:161-167 (査
読有り) doi: 10.1159/000457900
Reduced orexin immunoreactivity in
Perry syndrome and multiple system
atrophy. Mishima, T., Kasanuki, K.,
Koga, S., Castanedes-Casey, M.,
Wszolek, ZK., Tsuboi, Y., Dickson, DW.
- Parkinsonism Relat Disord. 2017, 42:
85-89 (査読有り) doi:
10.1016/j.parkreldis.2017.06.003
Cytoplasmic aggregates of dynactin in
iPSC-derived tyrosine hydroxylase
-positive neurons from a patient with
Perry syndrome. Mishima, T., Ishikawa,
T., Imamura, K., Kondo, T., Koshihara, Y.,
Takahashi, R., Takahashi, J., Watanabe,
A., Fujii, N., Tsuboi, Y., Inoue, H. -
Parkinsonism Relat Disord. 2016, 30:
67-72 (査読有り) doi:
10.1016/j.parkreldis.2016.06.007
Impulse control disorders and punding
in Perry syndrome. Mishima, T.,
Fujioka, S., Kurisaki, R., Yanamoto,
S., Higuchi, MA., Tsugawa, J., Fukae,
J., Neshige, R., Tsuboi Y.-
Parkinsonism Relat Disord. 2015, 21:
1381-1382 (査読有り) doi:
10.1016/j.parkreldis.2015.09.037

[学会発表](計6件)

Perry 症候群におけるマイネルト基底核
のオレキシン染色性の低下. 三嶋崇靖,
他 - 第 11 回パーキンソン病運動障害疾
患コンgres 2017 年

Disease modeling for Perry syndrome
using patient induced pluripotent stem
cells. Mishima, T. et al. - 21th
International Congress of Parkinson's
Disease and Movement Disorders 2017
Human iPSC disease modeling of Perry
syndrome. Mishima, T. et al. - XXIII
World Congress of Neurology 2017

Perry syndrome is a distinctive type of
TDP-43 proteinopathy. Mishima, T. et
al. - XXIII World Congress of Neurology
2017

A cellular model for Perry syndrome
using patient iPSCs. Mishima, T. et al.
第 57 回日本神経学術大会 2016
Impulse control disorders and punding
in Perry syndrome. Mishima, T. et al.
- XXI World Congress on Parkinson's
disease and Related Disorders 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三嶋 崇靖 (Mishima Takayasu)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号: 00600602