

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト α -synuclein を発現するトランスジェニックマウスの作出と解析

氏名 若松正樹

パーキンソン病は、安静時振戦、無動、筋固縮等の運動障害を主症状とする神経変性疾患である。パーキンソン病患者の脳では、黒質緻密部のドーパミン神経細胞が選択的に脱落するために、その投射先である線条体でドーパミンが欠乏し、これが種々の症状の原因となっている。パーキンソン病の発症原因は不明であったが、家族性パーキンソン病患者の遺伝学的解析の結果、 α -synuclein が病因遺伝子の一つであることが明らかになった。一方、パーキンソン病の病理学的特徴の一つとして残存したドーパミン神経内にレビー小体と呼ばれる細胞質内封入体が発見されるが、その主要構成成分が、不溶性繊維を形成した α -synuclein 蛋白質であることも明らかになった。従って、 α -synuclein は、家族性パーキンソン病だけでなく、孤発性のパーキンソン病の発症にも深く関わっていると考えられる。

ところで、レビー小体に蓄積した α -synuclein の一部は、リン酸化や C 末端領域の切断等の修飾を受けていることが知られている。これらの翻訳後修飾を受けた α -synuclein は、修飾を受けていない α -synuclein に比べて、凝集性が高いと報告されており、このことがレビー小体の形成に深く関与している可能性がある。また、Ser129 位のリン酸化は α -synuclein の細胞毒性の発現に関わることで、C 末端領域が欠損した α -synuclein を高発現する培養神経細胞は酸化ストレスに対して脆弱であることが報告され、これらの翻訳後修飾がパーキンソン病の発症に関与しているのではないかと考えられている。しかし、これまでに、Ser129 位のリン酸化や C 末端領域の切断が、ドーパミン神経細胞に与える影響を *in vivo* で解析した

報告は少ない。

本研究で著者らは、 α -synuclein の翻訳後修飾とパーキンソン病発症の関係を明らかにするために、ドーパミン神経細胞で全鎖長、もしくは C 末端領域 10 残基が欠損したヒト α -synuclein を高発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作出し、生化学的、病理学的及び行動薬理的に解析した。

1. 全鎖長のヒト α -synuclein をドーパミン神経で発現するトランスジェニックマウス (Syn140m) の作出と解析

ラット・チロシンヒドロキシラーゼ (TH) プロモーターの制御下で Ala53Thr 変異を持つ全鎖長のヒト α -synuclein (ha-syn140m) を高発現する Tg マウス, Syn140m-01-1 を作出した。当該マウスの脳では、ha-syn140m が、中脳の黒質緻密部や腹側被蓋野、あるいは嗅球等におけるドーパミン神経の細胞体と軸索で発現しており、黒質緻密部と腹側被蓋野からそれぞれ入力を受ける線条体と側坐核にも輸送されていた。Syn140m-01-1 の中脳における ha-syn140m の量は、内在性 α -synuclein の約 42% と、比較的高い発現量であった。しかし、Syn140m-01-1 の脳にレビー小体やドーパミン神経細胞の脱落は認められず、また当該マウスに運動障害も認められなかった。従って、ha-syn140m がドーパミン神経細胞で高発現するだけでは、パーキンソン病の症状は惹起されないと推測された。

Ser129 位がリン酸化された α -synuclein が Syn140m-01-1 のドーパミン神経細胞でどのように蓄積しているか解析するために、当該修飾を特異的に検出する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、中脳では、ドーパミン神経細胞の約 3 分の 1 において、Ser129 位がリン酸化された ha-syn140m が検出された。また、核に局在する ha-syn140m が特に強くリン酸化されていた。リン酸化された α -synuclein が検出された細胞の割合が加齢に伴って変化しなかったことから、*in vivo* のドーパミン神経細胞では α -synuclein が恒常的なリン酸化/脱リン酸化を受けていると推測された。また、Ser129 位のリン酸化に関わると報告されている酵素のうち、カゼインキナーゼ 2 (CK-2) も核に多く局在していた。従って、中脳ではリン酸化された ha-syn140m と CK-2 が核に共局在していると考えられた。このことから、*in vivo* における Ser129 位のリン酸化には、CK-2 が関与していると推測された。

2. C 末端領域 10 残基が欠損したヒト α -synuclein をドーパミン神経で発現するトランスジェニックマウス (Syn130m) の作出と解析

α -synuclein の C 末端領域の切断が、ドーパミン神経細胞に与える影響を解析するために、ラット TH プロモーターの制御下で、Ala53Thr 変異を持ち、且つ C 末端領域 10 残基が欠損したヒト α -synuclein (ha-syn130m) を発現する Tg マウス, Syn130m を作出した。C 末端領域の欠損の長さは、*in vitro* の試験で C 末端領域 10 残基の欠損が α -synuclein の凝

集性を高めるのに十分であったことから、10 残基とした。

興味深いことに、高発現ラインである Syn130m-1702 と 2402 の中脳では、黒質緻密部の TH 陽性神経細胞数が、それぞれ野生型 (WT) マウスの約 55% と 80% に減少していた。細胞減少の程度は、ha-syn130m の発現量に相関していた。また、1) ニッスル染色やヘマトキシリン・エオジン染色でも神経細胞体の減少が認められたこと、2) ha-syn130m 発現細胞のほとんどが TH 陽性であったこと、3) 中脳でドーパミン神経細胞のマーカー遺伝子の発現が特異的に低下していたこと、から、この細胞減少は、単に TH 蛋白質の発現が低下した結果ではなく、ドーパミン神経細胞そのものが消失した結果であると考えられた。一方、全鎖長の α -synuclein を同量程度発現する Tg マウス (Syn140m-01-1 ホモマウス) では、このような病理学的変化は認められなかった。従って、この細胞消失には、 α -synuclein の C 末端領域 10 残基の欠損が原因的要因に関わっていると考えられた。このことから、 α -synuclein の C 末端領域の切断は、in vivo ではドーパミン神経細胞に対して障害的に作用することが示唆された。

黒質緻密部のドーパミン神経細胞とは対照的に、腹側被蓋野のドーパミン神経細胞に病理学的変化は認められなかった。このことから、黒質緻密部のドーパミン神経細胞は、腹側被蓋野のドーパミン神経細胞に比べて、ha-syn130m の「毒性」に対する感受性が高いと考えられた。また、黒質緻密部の病理学的変化と合致して、Syn130m-1702 の線条体では、ドーパミン神経軸索とその終末が減少していた。そして結果的に、ドーパミンとその代謝物の量が WT マウスの 50-60% にまで低下していた。一方で、Syn130m の脳にレビー小体様の構造物は認められなかった。従って、ha-syn130m は、凝集体形成を介することなくドーパミン神経細胞の消失に関わったと推測された。また、Syn130m-1702 では、加齢に伴うドーパミン神経細胞の進行性の脱落は認められず、その細胞消失は胎児期に始まると考えられた。さらに、Syn130m-1702 では、進行したパーキンソン病患者でみられるような、線条体のドーパミン D2 受容体 (DRD2) の発現増加は認められなかった。以上の結果から、Syn130m-1702 は、パーキンソン病の病態の一部を反映するものの、進行したパーキンソン病の病態を反映するには至っていないと考えられた。

3. C 末端領域 10 残基が欠損したヒト α -synuclein をドーパミン神経で発現するトランスジェニックマウス (Syn130m) の行動薬理学的解析

Syn130m-1702 が新たなパーキンソン病のモデル動物となる可能性について検討するために、当該マウスにドーパミンの低下に起因する運動障害あるいは行動障害が認められるか解析した。また、当該マウスに MPP⁺ を投与して、進行性の神経脱落や顕著な運動障害が認められないか解析した。

一連の運動機能試験の結果、Syn130m-1702 では、運動機能に顕著な異常は認められなかった。これは線条体のドーパミン量が低下していたものの、なお運動機能障害を惹起す

る閾値より高いためであると考えられた。その一方で、自発運動量や探索行動に異常が認められた。これらの行動障害は L-DOPA や既存のドーパミン受容体作動薬（クインピロール、タリペキソール、及びペルゴリド）の投与により回復したことから、線条体のドーパミン量の低下に起因していると考えられた。従って、Syn130m-1702 はパーキンソン病治療薬を開発する上でのモデルの一つになりうると考えられた。

WT マウスと Syn130m-1702 に MPP⁺を投与したところ、いずれも線条体の TH 蛋白質量が減少した。減少の程度は Syn130m-1702の方がやや高い傾向を示したが、統計的な有意差はなかった。このことから、hα-syn130m の発現が、ドーパミン神経細胞の MPP⁺に対する感受性を、必ずしも“大きく”変動させるわけではないと考えられた。それでも、MPP⁺を投与した Syn130m-1702 では、WT マウスに比べて、一部の運動機能に強い障害が認められた。また、アポモルヒネ誘発常同行動が亢進していたことから、線条体で DRD2 の発現増加が惹起される閾値以下にまで、ドーパミン量が低下していると推測された。これらの結果から、MPP⁺等の神経毒を Syn130m-1702 に投与することにより、運動機能障害を安定的に発現するモデル動物の作出が可能であると考えられた。

以上、本研究では、全鎖長もしくは C 末端領域 10 残基が欠損したヒト α-synuclein をドーパミン神経細胞で発現する Tg マウスを作出した。そして、α-synuclein の翻訳後修飾がパーキンソン病の発症にどのように関与するのか、その一端を明らかにすべく、これらの Tg マウスを生化学的及び病理学的に解析した。また、これらの Tg マウスを行動薬理的に解析し、パーキンソン病の治療薬の開発に利用しうることを明らかにした。今後は、これらの Tg マウスを用いて、α-synuclein の凝集体形成とドーパミン神経細胞の消失の関係についてさらに深く解析を行うとともに、当該マウスを新たなパーキンソン病治療薬の創出に活用したい。