

[別紙2]

審査の結果の要旨

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出現するが、その主要構成成分が、不溶性線維を形成した α -synuclein 蛋白質であることも明らかになった。従って、 α -synuclein は、パーキンソン病の発症に深く関わる分子と考えられている。

最近になり、レビー小体に蓄積した α -synuclein の一部は、燐酸化や C 末端領域の切断等の修飾を受けていることが明らかにされた。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いる。また、Ser129 位の燐酸化は 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。

本研究で若松は、 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。

まず、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。Ser129 位が燐酸化された α -synuclein を特異的に検出する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、中脳では、ドーパミン神経細胞の約 3 分の 1 が当該抗体に陽性であった。燐酸化された 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 が恒常的な燐酸化/脱燐酸化を受けていると推測された。また、Ser129 位の燐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) が燐酸化 ha-syn140m と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

の磷酸化には、CK-2 が関与していると推測された。

次に、 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。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。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。また、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。

若松は、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いものの、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思われた。また、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、ha-syn130m の発現が、ドーパミン神経細胞の MPP⁺に対する感受性を、顕著に変動させるわけではないと考えられた。しかしながら、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。

以上のように、若松は、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、in vivo のドーパミン神経細胞で α -synuclein の Ser129 位が恒常的にリン酸化/脱リン酸化されていること、 α -synuclein の C 末端領域の欠損が in vivo のドーパミン神経細胞に対して障害的に作用することを示した。これらは、 α -synuclein の翻訳後修飾とパーキンソン病発症の関係の一端を明らかにするものであり、今後の治療を考える上で有益な情報を与えるものである。また、作出した Tg マウスは、黒質-線条体系に明らかな機能障害を認める、初めての α -synuclein Tg マウスであり、パーキンソン病治療薬の開発などに貢献しうると考えられる。よって、本研究を行った若松正樹は、博士（薬学）の学位に相応しいと判断した。