

論文の内容の要旨

論文題目 α -シヌクレイン遺伝子メチル化の制御機構とシヌクレイノパチーの病態に関する研究

指導教員 辻 省次 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

住友（松本） ルミネ

要旨

パーキンソン病は、主に初老期以降に発症する神経変性疾患であり、65 歳以上の人口の 1%をしめる比較的高頻度の疾患である。約 1 割の遺伝性パーキンソン病を除いて、ほとんどが孤発性症例である。遺伝性パーキンソン病については分子生物学の進歩に伴い様々な細胞内経路に携わる遺伝子異常が発見されるようになり、孤発性パーキンソン病においても発症の原因として同様のメカニズムの関連が想定されているものの、未だ確定はしていない。孤発性パーキンソン病の発症の危険因子としては遺伝的素因のほか、環境要因の関与も考えられており、病態の中核である中脳黒質神経細胞死の原因仮説としては、ミトコンドリア障害、酸化ストレス、サイトカイン、ユビキチン・プロテアソームシステムの異常などが提案されているがどれも明らかな原因とするには根拠に乏しい部分が多い。

パーキンソン病 (PD) やレビー小体型認知症 (DLB) では神経細胞内にレビー小体 (LB) とよばれる封入体が形成されることが特徴であり、多系統萎縮症 (MSA) におけるグリア細胞封入体 (GCI) とともに α -シヌクレインが主要構成成分であることから、これらの疾患はシヌクレイノパチーと総称されている。 α -シヌクレインはその点変異によって家族性パーキンソン病の原因となることが報告されていること、また LB が α -シヌクレインから構成されることが、 α -シヌクレインの発現増加と関連するプロモーター領域の特定の SNP は疾患感受性に関与することが報告されている上、一部の遺伝性 PD においては α -シヌクレイ

ン遺伝子の重複が原因となっていることから、シヌクレイノパチーの発症には α -シヌクレイン遺伝子の発現増加が関与していることが示唆されている。しかしながら、剖検脳や末梢血での α -シヌクレイン発現量に関して孤発性 PD 群とコントロール群を比較した先行研究においては、増加・不変・減少いずれの報告もあり見解は一致していない。これは死後脳における mRNA は保存状態により変性をおこしやすく、これを用いて定量を行う方法論に問題がある可能性を示唆している。

遺伝子の塩基配列を変えずに DNA のメチル化やヒストンのアセチル化・メチル化などの修飾により遺伝子発現を調節する機構はエピジェネティックメカニズムと呼ばれており、主に腫瘍性病変の発症と関連した知見が蓄積されつつある。剖検脳を用いた解析でも DNA メチル化状態は死後の影響を受けにくいことが示されており、mRNA を用いた疾患研究よりも疾患の本体に迫れる可能性がある。最近では精神疾患やアルツハイマー病などの神経変性疾患についても、遺伝子 CpG アイランドのメチル化と病態への関与が示唆されるようになった。しかしながら、パーキンソン病と α -シヌクレイン遺伝子メチル化との関連を述べた報告は過去にはない。

そこで本研究では、シヌクレイノパチーの発症にエピジェネティックメカニズム、なかでも α -シヌクレイン遺伝子 CpG アイランドの DNA メチル化による発現増加が関与している可能性を考え、まず培養細胞において、 α -シヌクレインの発現を増加させる因子を検討し、次にその因子が DNA メチル化に対して与える影響を検討した。そして、 α -シヌクレイン遺伝子発現調節との関与が考えられた部位について、剖検脳の解析を行い、疾患との関連を検討した。DNA メチル化の解析には bisulfite sequencing 法および MIRA (Methylated-CpG Island Recovery Assay) 法を用いた。 α -シヌクレイン遺伝子の CpG アイランドはエクソン 1 の上流からイントロン 1 内にかけて存在する。近年、 α -シヌクレイン遺伝子イントロン 1 部分に、転写因子結合部位が次々と明らかになり、同部位が転写調節に関与している可能性が示唆されている。このため、本研究においてはエクソン 1 上流 (CpG1) に加え、イントロン 1 部分の CpG アイランド (CpG2) に注目し、DNA メチル化解析を行った。

先行研究で α -シヌクレインの発現を増加させるとされている薬剤 (Interleukin- β 、basic fibroblast growth factor (bFGF)、Lipopolysaccharide (LPS)、nerve growth factor (NGF)、ドパミン) を投与した培地中で 293 細胞を 48 時間培養した後細胞を回収し、定量的 RT-PCR 法による mRNA の測定を行ったところ、ドパミン投与により α -シヌクレイン遺伝子 mRNA 発現量が増加した。Bisulfite sequencing 法による DNA メチル化解析では、CpG1 は低メチル化状態であり、ドパミン投与によっても状態は変化しないが、CpG2 については、293 細胞では通常高メチル化状態であるが、ドパミン 50~100 μ M 投与下で濃度依存性に低メチル化状態となることが観察され、MIRA 法でも同様の結果を得た。また、mRNA に関してもドパミンが高濃度になるにつれ発現が上昇することが確認され、ドパミン 100~200 μ M 投与下では 3 倍に増加した。このことから、CpG2 領域のメチル化状態が、 α -シヌクレイン遺伝子発現調節に関与している可能性が示唆された。

このようなドパミンによる脱メチル化作用が、二次的な変化ではないことを確認するため、次にドパミンによる細胞障害性について MTS アッセイ法により検討した。十分に脱メチル化を生じるドパミン 100 μ M では細胞活性の低下はみられず、脱メチル化は細胞障害に

よる二次的な変化ではなく、直接的な作用であると考えられた。

次に、これが受容体を介した作用であるか否かを検討するため、ドパミン受容体の発現を、ドパミン作動性といわれる SH-SY5Y 細胞を陽性コントロールとして用い、定量的 RT-PCR 法により解析した。293 細胞ではドパミン受容体 D_1 、 D_2 ともに発現しており、特に D_1 受容体の発現は SH-SY5Y 細胞よりも強く認められた。以上より、受容体を介したメカニズムは重要な検討課題と考え、 D_2 受容体阻害薬である haloperidol 0.1~10 μ M をドパミンとともに投与し、上述と同様に 48 時間後の DNA メチル化状態を MIRA 法により観察したところ、ドパミンによる脱メチル化作用は阻害された。一方、 D_2 受容体作動薬である pergolide mesylate salt 0.01~100 μ M を投与してもドパミンと同様の脱メチル化作用はみとめられなかった。以上より、ドパミンの脱メチル化機序にはドパミン受容体の関与が考えられたが、 D_2 受容体単独刺激では同様の作用は認められず、 D_1 、 D_2 受容体の同時刺激が重要である可能性がある。

次に、シヌクレイノパチーの発症と α -シヌクレイン遺伝子 DNA メチル化の関与を検討するため、東京大学神経内科、筑波大学神経内科、国立病院機構東京病院神経内科から得られたヒト凍結保存脳（コントロール症例：7 例、シヌクレイノパチー症例：PD 11 例、DLB 1 例）の各部位（前部帯状回・被殻・黒質）について、前述の培養細胞の実験結果から発現調節への関与が示唆された α -シヌクレイン遺伝子 CpG2 領域について、bisulfite sequencing 法を用いてメチル化状態の解析を行った。各群の平均（ \pm SD）年齢はコントロール群：73.4（ \pm 9.3）歳、シヌクレイノパチー群：76.4（ \pm 6.1）歳であり、差はみとめられなかった。各部位のメチル化（%）（平均 \pm SD）は、コントロール群：前部帯状回 89.3 \pm 14.5、被殻 87.8 \pm 16.4、黒質 98.9 \pm 1.6、シヌクレイノパチー群：前部帯状回 91.7 \pm 15.1、被殻 92.3 \pm 7.5、黒質 24.4 \pm 46.9 であった。コントロール症例においても、DNA メチル化の程度にはばらつきが認められた。前部帯状回の検体において、コントロール群、シヌクレイノパチー群ともに死亡時年齢と DNA メチル化に関連はみとめられなかった。部位ごとに検討すると、前部帯状回、被殻についてはコントロール群・シヌクレイノパチー群間に差は認められなかったが、黒質では PD3 症例でコントロール群と比較して有意に低メチル化状態であった。シヌクレイノパチーのなかでも罹病期間が長い PD 2 例では低メチル化状態であったが、罹病期間が短い DLB においては高メチル化状態であった。このため、シヌクレイノパチーにおいて CpG2 領域の脱メチル化が特異的である可能性が示唆された。今後症例を増やした検討を重ねていく必要があると考えた。

本研究の限界としては、すりつぶし脳を用いているために、細胞脱落の顕著な部位では神経細胞の状態を反映できていない可能性がある。より詳細な検討のためには、単一神経細胞での DNA メチル化解析が必要である。また、本研究では検体数が少なく、十分な検討が不可能であった。少数の検体数の結果では疾患群とコントロール群での DNA メチル化状態の差が示唆されたが、シヌクレイノパチー群では全例ドパミン補充療法を行われており、疾患としての変化であるのか、または薬剤による影響を受けているかまでは検討が行えなかった。今後、薬剤投与を受けていないシヌクレイノパチー症例や incidental Lewy body disease などを含めた、より多数の検体での解析が行えれば、興味深い結果が得られるものと考えられる。