

## 研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： パーキンソン病遺伝子ネットワーク解明と新規治療戦略
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）：

研究代表者

高橋 良輔（京都大学大学院医学研究科 教授）

主たる共同研究者

森 和俊（京都大学大学院 教授）

服部 信孝（順天堂大学 教授）

武田 俊一（京都大学大学院 教授）

木下 専（名古屋大学 教授）

堀 修（金沢大学 教授）

3. 研究実施概要

パーキンソン病（PD）の成因には、遺伝要因と環境要因を介して、小胞体ストレス、酸化的ストレス、ミトコンドリア障害、タンパク質分解異常、細胞骨格の障害等が、複雑に絡み合っていると考えられる。このようなPDの複合病態を解明するため、本研究では、ニワトリBリンパ球細胞株DT40、メダカ、マウス、において、PDの病因関連遺伝子、およびパーキンソン病発症への関与が示唆される小胞体ストレス関連遺伝子に変異を加えた多重遺伝子変異および毒物誘発性モデルによってパーキンソン病を引き起こす様々な遺伝子間のネットワークおよび遺伝要因と環境要因との相関を明らかにすることを目的とした。さらに得られたモデルを治療法開発に役立てることをめざして研究が推進された。

MPTP 誘発性パーキンソニズムの急性および慢性モデルにおいて小胞体ストレス応答が保護的に作用することを見出した。急性モデルで、小胞体ストレス応答のマスター制御因子であるATF6αがp38MAPKによってリン酸化され、活性化することを明らかにした。慢性モデルでATF6αがアストログリアの神経栄養因子や抗酸化因子産生を増加させること、さらに低分子スクリーニングで見出した小胞体ストレス応答活性化因子のタンゲレチンがニューロン・アストロサイト双方に働いて細胞保護効果を示すことを解明した。

また、DT40 およびメダカにおいて毒物誘発性および遺伝性PDモデルの開発を行い、DT40では相同組み換えが起こりやすい特質を利用して常染色体劣性遺伝性PD（AR-PD）の原因遺伝子DJ-1を欠損するモデルを作製し、ミトコンドリア機能低下を生じることを見出した。メダカでは古典的ドパミン神経毒であるMPTPに加え、プロテアソーム阻害薬、リソソーム阻害薬、小胞体ストレス誘発薬を脳脊髄液腔に投与し、ドパミン神経変性、異常凝集形成、運動機能低下といったPD類似の表現型を呈し、タンパク分解系障害や小胞体ストレスのPDの病因への関与を示唆する結果を得た。

さらにメダカではTILLING法を利用して、AR-PDの原因遺伝子であるPINK1、Parkin、DJ-1ノックアウト（KO）メダカ、ATP13A2、さらに孤発性PDの強力な遺伝的リスクであるglucocerebrosidase（GBA）遺伝子の変異メダカを作製した。PiNK1, Parkinは単独では神経変性を生じないが、ダブルノックアウト(dKO)にすると、ドパミン・ノルアドレナリン神経変性および運

動障害が生じることが判明した。この dKO メダカではミトコンドリア機能低下と形態変化が観察された。また ATP13A2 については、ATP13A2 のノックダウン哺乳類細胞と ATP13A-KO メダカで、ともにリソソーム蓄積病でもられるような **fingerprint profile** が観察され、**アプシ D** の活性も低下していた。さらに KO メダカではドパミン・ノルアドレナリン神経特異的変性がみられ、ATP13A2 変異に起因するリソソーム機能低下が PD の原因になることを示唆する結果をえた。GBA-KO メダカは 2 か月齢で左右に不規則に回旋する異常運動を呈し、3 か月で骨格異常を呈して死亡する表現型を示した。脳内では **glucocerebroside** と思われる蓄積物を有するマクロファージの集簇と、ドパミン・ノルアドレナリン神経を含む多くの神経細胞が  $\alpha$ -シヌクレイン陽性の凝集体を形成しつつ変性・脱落する所見が得られた。さらに GBA のヘテロ接合型変異でも、12 か月齢で、カテコールアミン神経特異的に  $\alpha$ -シヌクレインが蓄積する興味深い所見が観察された。以上より、GBA 変異メダカはヒトの孤発性 PD の臨床・病理所見の一部を再現するこれまでにない優れたモデルになる可能性があると考えられた。

哺乳類の主要な小胞体ストレス応答 3 大経路のセンサー分子である ATF6 $\alpha$ ・ $\beta$ 、IRE-1 $\alpha$ ・ $\beta$ 、PERK の KO メダカ、および小胞体ストレスで蛍光を発する小胞体ストレスセンサーメダカを作製・解析し、メダカの小胞体ストレス応答のマスター制御分子は ATF6 であることを明らかにした。さらに ATF6 $\alpha$ ・ $\beta$ -KO メダカが発生過程で死に至る原因の解析から、脊索の形成に小胞体ストレス応答が必須であることを示した。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果（論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む）

メダカを疾患モデルとするユニークな研究であり、メダカの利点を生かした新しい PD モデルは大きなインパクトを持つと考える。また、MPTP 誘発性のドーパミン神経細胞死への小胞体ストレス応答遺伝子の関与を解明し、PERK-eIF2 $\gamma$ -AFT4 を活性化するタンゲレチン、サルブリナールのドーパミン細胞死防御効果の発見は科学的に重要である。ただ、治療のターゲットとなる分子メカニズムを絞り込むところまでには至っておらず、多彩な PD の病態、病因をそのまま再現するモデルを求めると焦点が定まらなくなる可能性があるため、今後、さらに研究を展開するにあたっては治療のターゲットとなる分子メカニズムを絞り込むことが必要であろう。

メダカの有用性を示し、これを用いた PD のモデルを確立した点は戦略目標の達成に貢献したと評価できるが、基礎的な研究段階にとどまっており、ヒトの病態治療に向けた戦略の提示という点では、今後の展開に期待するものである。

顕著な成果を 3 点に絞って以下に記す。

##### (1) メダカによる遺伝性パーキンソン病 (PD) モデルの確立

PARK9 の原因遺伝子 ATP13A2 のノックアウトメダカでリソソーム異常、孤発性 PD の遺伝的リスクである GBA 変異メダカで  $\alpha$ -シヌクレイン蓄積を伴うドーパミン神経細胞死が観察された。今後、これらのモデルを薬物スクリーニングに使用できるよう実用化を推進することが期待される。

##### (2) MPTP 誘発性実験的パーキンソニズムにおける小胞体ストレス応答の保護効果の発見

ATF6 $\alpha$  が、MPTP 急性モデルではリン酸化に基づく転写活性亢進、慢性モデルではアストログリア活性化により細胞保護効果を有することを見出し、さらに MPTP モデルで小胞体ストレス活性化因子のタンゲレチンの細胞保護効果を見出し、新規治療薬候補と考えられた。

### (3) 小胞体ストレスが脊索形成に必須であることの発見

メダカの胞体ストレス応答のマスター制御分子は **ATF6** であることを明らかにした。さらに **ATF6 $\alpha$ · $\beta$ -KO** メダカが発生過程で死に至る原因の解析から、脊索の形成に胞体ストレス応答が必須であることを示した。

## 4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

本課題で期待された最終ゴールはパーキンソン病の病態の解明とこれに基づく新規治療法の開発につながる知見を得ることであり、社会への還元がすなわち新規治療法の開発につながる知見であると考えれば、胞体ストレス応答がPDにおいて果たす役割を **MPTP** モデルを用いて明らかにし、胞体ストレス応答活性化因子(タンゲレチン)が細胞保護作用を示し、抗PD薬の候補になることを示したこと、メダカを用いて遺伝子変異モデル(**G B A**変異モデルなど)の作成に成功したことは、今後治療薬を開発する上で有用であり、成果は評価できる。ただし、現時点では例えば胞体ストレス制御化合物が妥当な方向に向かった薬剤選択であるかどうかは明らかでなく、さらなる検討が必要と思われる。

メダカモデルの開発は、このモデルにおいては遺伝子改変が他に比して比較的容易であることや薬剤負荷が容易である点などから、PDモデル動物として有用であり、今後、薬剤スクリーニングに応用されれば新規パーキンソン病薬の早期開発に有用であると思われる。

$\alpha$ -シヌクレイン **BAC** トランスジェニックマウスは  $\alpha$ -シヌクレイン発現量を指標とする創薬のモデルとして有用である。

家族性パーキンソン病多重遺伝子変異モデルメダカにおいて神経細胞死の機序としてリソソーム系の関与が明らかにされたが、これらの結果は孤発性パーキンソン病の病態解明に応用できることが期待される。

## 4-3. 総合的評価

パーキンソン動物モデルを作成し、これを基に遺伝子間ネットワークや遺伝子・環境相互作用の解明から治療法開発のシーズを得ることを目的に研究が進められた。

このうち動物モデルについては、これまで困難とされたPD動物モデルをメダカで成功し、これを用いて研究を進展させたことは評価できる。しかし、メダカ以外の哺乳類との関係すなわち種間での表現型の相違やヒトにおける病態との対比など、まだ解決しなければならない課題も残されている。

パーキンソン病モデルの作成に成功し、病態の基礎となる数多くの成果を挙げたが、新規の治療薬の開発のためには、やはりマウス、ラット、霊長類モデルが必要である。今後、メダカモデルを基盤にして、より高位の動物モデルを完成することを期待する。