京都大学	博士（医学）	氏　名	松井　秀彰
論文題目	Medaka models of Parkinson's disease （**パーキンソン病のメダカモデル**）		

（論文内容の要旨）

【背景】パーキンソン病（PD）は我が国の患者数15万人と推定される、アルツハイマーに次いで頻度の高い神経変性疾患である。PDは臨床的には進行性の運動障害を、病理学的には黒質のドパミン神経の変性脱落を主徴とする。PDの病態および原因を解明するため、PDの臨床症状と病理所見を忠実に再現するモデルの樹立が望まれているが、マウスとショウジョウバエを中心としたこれまでの研究では適切なモデル作製の成功に至っていない。

【目的】最近、新たなモデル動物として注目されている小型魚類のメダカは、純系が存在し、全ゲノムが解読されているため遺伝子の豊富なデータベースが利用でき、遺伝学的改変や薬剤への暴露が可能であり、飼育が容易で、そのコストも比較的安価であることなど実験動物としての数多くの利点を有する。本研究では、メダカにおいて、（1）ヒトその他の哺乳類などで選択的ドパミン神経細胞死をおこす毒物MPTPへの暴露、（2）家族性PD遺伝子PINK1の改変、により、これまでにない有用なPDモデル作製を目指す。

【方法・結果】はじめにメダカの脳においてチロシンハイドロキシラーゼ（TH）陽性のドパミンおよびノルアドレナリン神経を免疫組織化学的に同定した。メダカでは他の魚類と同様、主として間脳にドパミン神経が分布していた。さらに間脳の吻側、中央、尾側にそれぞれ異なる形態のドパミン神経が存在した。

次にメダカをドパミン神経毒であるMPTPに暴露した。成魚の段階で一ヶ月間MPTPを含んだ水に暴露してもドパミン神経の減少はみられなかったが、稚魚の段階の暴露ではドパミン細胞群の中でも、特に間脳の中央に位置する脳質周囲の細胞群の減少が観察された。この細胞群はヒトの黒質線条体系のドパミン神経に相当する。また独自に確立したメダカの運動機能アッセイにより、自発水泳行動の減少が観察された。MPTPに暴露したこれらの稚魚は、その後MPTPを含まない通常の環境で成魚まで飼育してもドパミン神経の減少と脳全体のドパミン含有量の減少は回復しなかった。

さらに常染色体劣性遺伝性の家族性PD、PARK6の病因遺伝子であるPINK1の変異メダカの解析を行った。TILLING（Targeting Induced Local Lesions In Genomes）法によって作製された精子ゲノムのライブラリーにPINK1の機能喪失型遺伝子変異を持つものが存在した。人工受精により変異をヘテロで持つ個体を得、数回のバッククロスの後に、ヘテロ変異同士の交配でホモ変異の個体を得た。in situ hybridizationで野生型ではPINK1 mRNAのシグナルが神経細胞全般に検出されたのに対し、ホモ変異個体ではシグナルが見られなかった。ホモ変異の個体では老齢（18 ヵ月齢）でもドパミン神経の脱落は認めなかったが、これらの個体では12ヵ月齢から自発行動の減少と体重増加の抑制が観察された。また4ヵ月齢において脳のドパミン含有量はむしろ増加していた。

【考察】メダカではMPTP含有水への暴露という簡便な方法で、哺乳類と同様にPDの臨床症状・病理所見を再現する毒物モデルが作製できることが判明した。またPINK1変異メダカの解析から、PINK1はドパミン神経の脱落以前からドパミン神経の正常な機能の維持や行動の制御に関与していることが示唆された。MPTPおよびPINK1遺伝子改変メダカは、多重変異や薬物処理を加えることで、PD研究にさらに役立つものと思われる。

【結論】毒物暴露及び遺伝子改変により、メダカのPDモデル作製に初めて成功した。

（論文審査の結果の要旨）

本研究は小型魚類であるメダカを用いて、パーキンソン病のモデルが作製可能であることを明らかにした。

メダカ稚魚をMPTPに暴露することで、コントロール群と比しドパミン神経の減少、脳ドパミン量の減少、自発水泳運動の減少を来たす事を示した。またMPTP暴露後三ヶ月経過してもドパミン神経の減少、脳ドパミン量の減少が持続することを明らかにした。

また常染色体劣性遺伝形式をとる家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つであるPINK1の機能喪失型変異を作成した。PINK1のホモ変異体は正常に発育するものの、コントロール群に比し十二ヶ月齢から体重の減少と自発運動の減少を来たすというパーキンソン病に類似した表現型を呈することを示した。この時にドパミン神経の減少は認められず、また四ヶ月齢からドパミンおよびドパミン代謝物の異常を認めることから、PINK1の機能喪失はドパミン神経減少を伴わず、運動機能およびドパミン代謝の異常を引き起こすことを示した。

本研究はパーキンソン病の病態の解明と治療法の確立に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものとみとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成21年1月12日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降