

Table 1. Sequences of Primer and TaqMan Probes Used in the This Study

		Forward Primer	Reverse Primer
$\beta$ -globin	—	5'-TGGGCAACCCTAAGGTGAAG-3'	5'-GTGAGCCAGGCCATCACTAAA-3'
ABCG2	Exon 1	5'-GGAAGGTCCGGGTGACTCA-3'	5'-GGAGGCAGCGCTTTAACAAT-3'
—	Exon 2	5'-GTGTCACAAGGAAACACCAATGG-3'	5'-AGCTCCTTCAGTAAATGCCTTCAG-3'
DFKZ	Exon 7	5'-CTGGACCACCTTACTGGTGAAAGC-3'	5'-CACTGTGCCTGGCCAAAT-3'
FAM13A1	Exon 12	5'-GAAGAGGACCTAACTCCCAGGAT-3'	5'-TTCTCAAGTTGGGAACCAAACTCT-3'
LOC345278	Exon 8	5'-GTTGGCTGGGCCAATCTCT-3'	5'-TGGTCTTAGCTGAAGGCCAGTT-3'
SNCA	Exon s1/2	5'-CCTCAAGCCTTCTGCCTTTC-3'	5'-CGAATGGCCACTCCCAGTT-3'
—	Exon 3	5'-TTCCAGTGTGGTGTAAGAAATTCAT-3'	5'-CCTTGGCCTTTGAAAGTCCCTT-3'
—	Exon 4	5'-CAGCAATTTAAGGCTAGCTTGAGACT-3'	5'-CCACTCCCTCCTTGGT'TTTG-3'
—	Exon 6	5'-TATGCCCTGTGGATCCTGACAAT-3'	5'-TCAGCTTGGACTCCTACCTCAGA-3'
—	Exon 7	5'-TCTTTGCTCCAGTTTCTTGAGA-3'	5'-TGGAACTGAGCACTTGTACAGGAT-3'
MMRN1	Exon 1	5'-ATCAAACCTCACATCCAC-3'	5'-CACCTGCTGAGGGTGTGAGA-3'
—	Exon 5	5'-CAGGCAATGAACTGACTCTTCTG-3'	5'-CTTCTAGGGAGGAGTAAGTGTTCCT-3'
—	Exon 6	5'-GTTTTCAATAGCAGCCCAGCAAAA-3'	5'-CAGTCAAAGTGGGCCGATTCT-3'
—	Exon 8	5'-GCTTCATATACCCCAAGAACTGGAA-3'	5'-GCACTAAATGACTCGATGGTGTACT-3'
KIAA1680	Exon 1	5'-TTAAATAACGCAGCTGGACTCTGT-3'	5'-TTAAATAACGCAGCTGGACTCTGT-3'
—	Exon 2	5'-GGCCACAATGATTTCTACCTCTCA-3'	5'-CCGTAAGTTCTGTTGTTGTCTTTGT-3'
—	Exon 3	5'-AGCTCAGGTAGCACAGGTAAACG-3'	5'-TGGTGGAAAGCTAATGGAAGGA-3'
—	Exon 4	5'-CCATTTCTGTAAGGAAGATTTATAGAG-3'	5'-TCCCTGCAGTGCCTTCTGA-3'
		MGB probe	
$\beta$ -globin	—	5'-CTCATGGCAAGAAAAGTGTCTCGGTGC-3'	
ABCG2	Exon 1	5'-CCCAACATTTACATCCTT-3'	
—	Exon 2	5'-CCGCGACAGCTTCCAA-3'	
DFKZ	Exon 7	5'-ACCATGCAAAGAAAAT-3'	
FAM13A1	Exon 12	5'-AAGCAACACACTCCCC-3'	
LOC345278	Exon 8	5'-CAGAAGCTGACTCTCA -3'	
SNCA	Exons 1/2	5'-ACCCCTCGTGAGCGGA-3'	
—	Exon 3	5'-AGCCATGGATGTATTC-3'	
—	Exon 4	5'-TGTCCTGAATTTGTTT'TGTAGGC-3'	
—	Exon 6	5'-AGGCTTATGAAATGCC-3'	
—	Exon 7	5'-TGCTGACAGATGTTC-3'	
MMRN1	Exon 1	5'-ACTTGACCACCTCCTTCTGCTTTCT-3'	
—	Exon 5	5'-CACAGTCAAAGAAAATATTG-3'	
—	Exon 6	5'-CTTGCACCAAAAACAAAC-3'	
—	Exon 8	5'-TCCAAGATACGGAATTCTA-3'	
KIAA1680	Exon 1	5'-TCCCCCTCTCGGCTGTTG-3'	
—	Exon 2	5'-ATGTCCCCTCAATTCCTG-3'	
—	Exon 3	5'-AGGAGCATATTCCG-3'	
—	Exon 4	5'-AGACTGCGATCCTC-3'	

and denatured at 75°C for 8 minutes. After 40-minute preincubation at 42°C, the mixture was applied to array slides and incubated at 50°C for 10 minutes, 46°C for 10 minutes, and 43°C for 60 hours in a hybridization machine, GeneTAC (Harvard Bioscience, Holliston, MA). After hybridization, the slides were washed once in a solution of 50% formamide, 2 × SSC (pH 7.0) for 10 minutes at 50°C and 1 × SSC for 10 minutes at 42°C, respectively, and then scanned with a GenePix 4000B (Axon Instruments, Foster City, CA). The acquired images were analyzed with GenePix Pro 4.1 imaging software (Axon Instruments). Fluorescence ratios were normalized so that the mean of the middle third of log<sub>2</sub> ratios across the array was zero. The average values for each clone were within the thresholds of 0.2 and -0.2 (log<sub>2</sub>ratio), and the mean ± 2 SD values of all clones were within the range of 0.4 and -0.4 (log<sub>2</sub>ratio). The thresholds for copy number gain and loss were set at log<sub>2</sub> ratios of 0.4 and -0.4, respectively.

We picked up the locus region between *ABCG* and *KIAA1680* of approximately 1.6 to 2.0 Mb. To identify the

region of duplication spanning *SNCA*, we performed semi-quantitative PCR on target genes including *ABCG*, *DFKZ*, *FAM13A1*, *LOC345278*, *MMRN*, and *KIAA1680* using the same methods. The sequences of all primer and probe sets are shown in Table 1.

#### Haplotype Analysis

To determine whether the same haplotype was shared between our probands with *SNCA* multiplication, we performed haplotype analysis in patients with *SNCA* duplication from unrelated families. We used four microsatellite markers including *D4S2361*, *D4S2505E* (located within *SNCA*), *D4S2380*, *D4S1647*, and *D4S421*.

#### Results

##### Gene Dosage Analysis for $\alpha$ -Synuclein

Using semiquantitative PCR to detect gene dosage, we did not find patients harboring *SNCA* multiplication

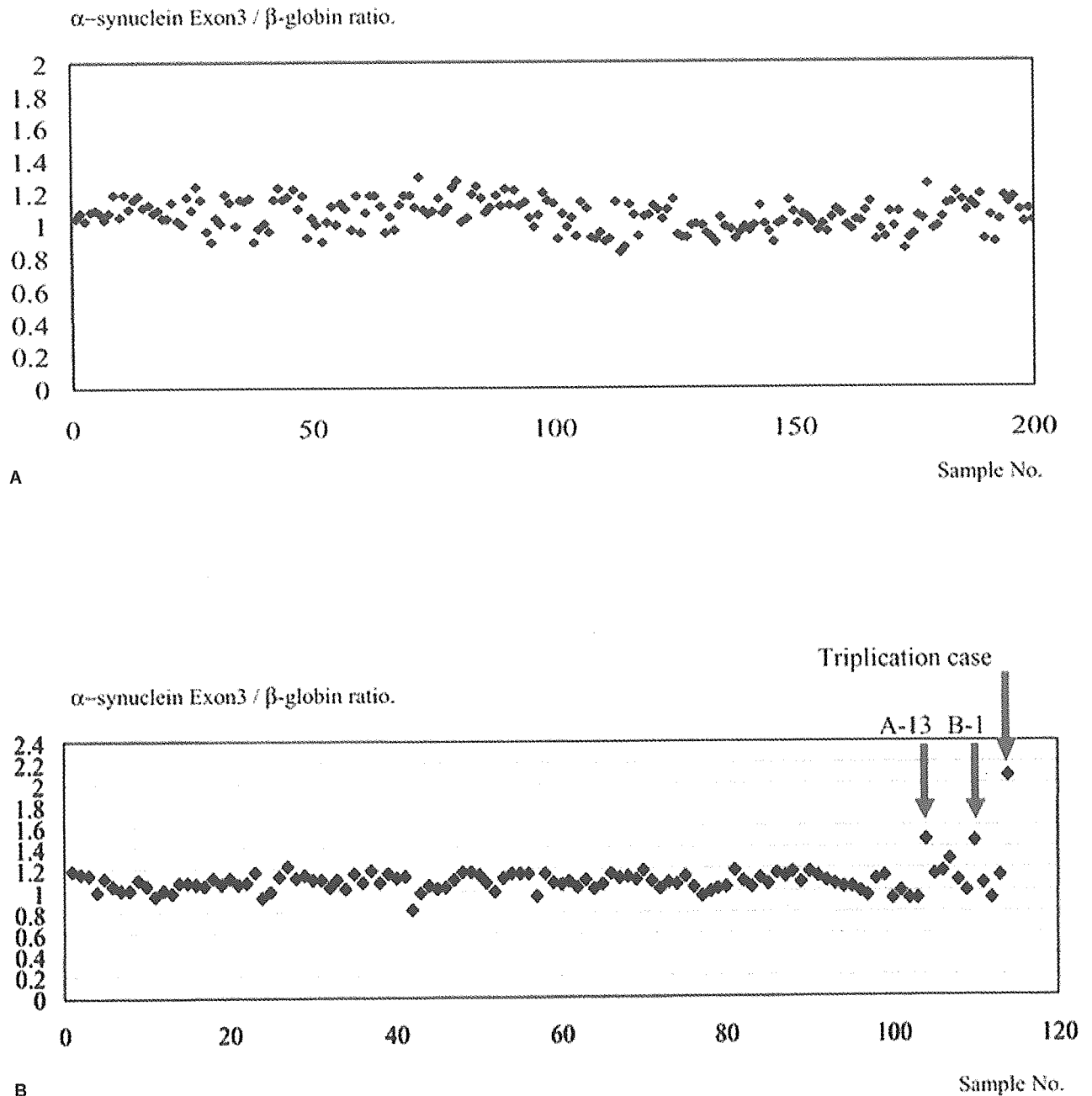


Fig 1. The ratio of  $\alpha$ -synuclein exon 3, used as a target gene, to  $\beta$ -globin, used as a reference gene, as determined by semiquantitative real-time polymerase chain reaction in: (A) 200 patients with sporadic PD (the ratio ranged from 0.8 to 1.3, suggesting that single SNCA copy exists in one allele, and (B) 113 patients with autosomal dominant hereditary Parkinson's disease. Note the two cases of duplication ratio (the ratio is 1.46 in one patient and 1.48 in the other), and the single Iowa family triplication case with a ratio of 2.07.

among 200 sporadic cases (Fig 1A) but detected two index patients (A-13 and B-1) with potential SNCA duplications among 113 autosomal dominant pedigrees using exon 3 of SNCA (Fig 1B). To confirm the entire region of the  $\alpha$ -synuclein gene was multiplied, we performed the exon dosage analysis including exons 1/2, 4, 6, and 7. We confirmed duplication of this gene in two patients. Thus, we were able to confirm that two

families (Families A and B) were ADPD with SNCA duplication. In Family A, two patients with duplication had typical PD whereas five carriers were asymptomatic (Fig 2A). In Family B, one patient had duplication of the SNCA gene; two members were carriers (see Fig 2B).

FISH analysis also confirmed the SNCA duplication in the two index patients (Fig 3A, B). Figure 3 shows

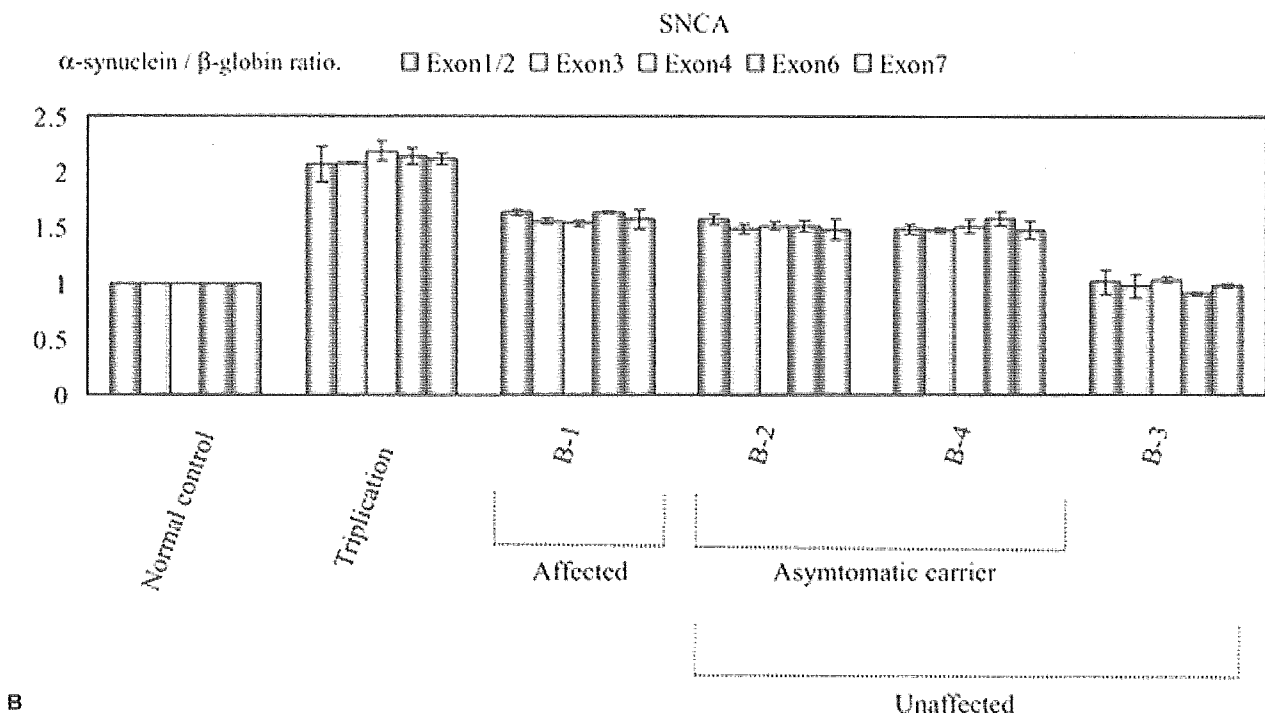
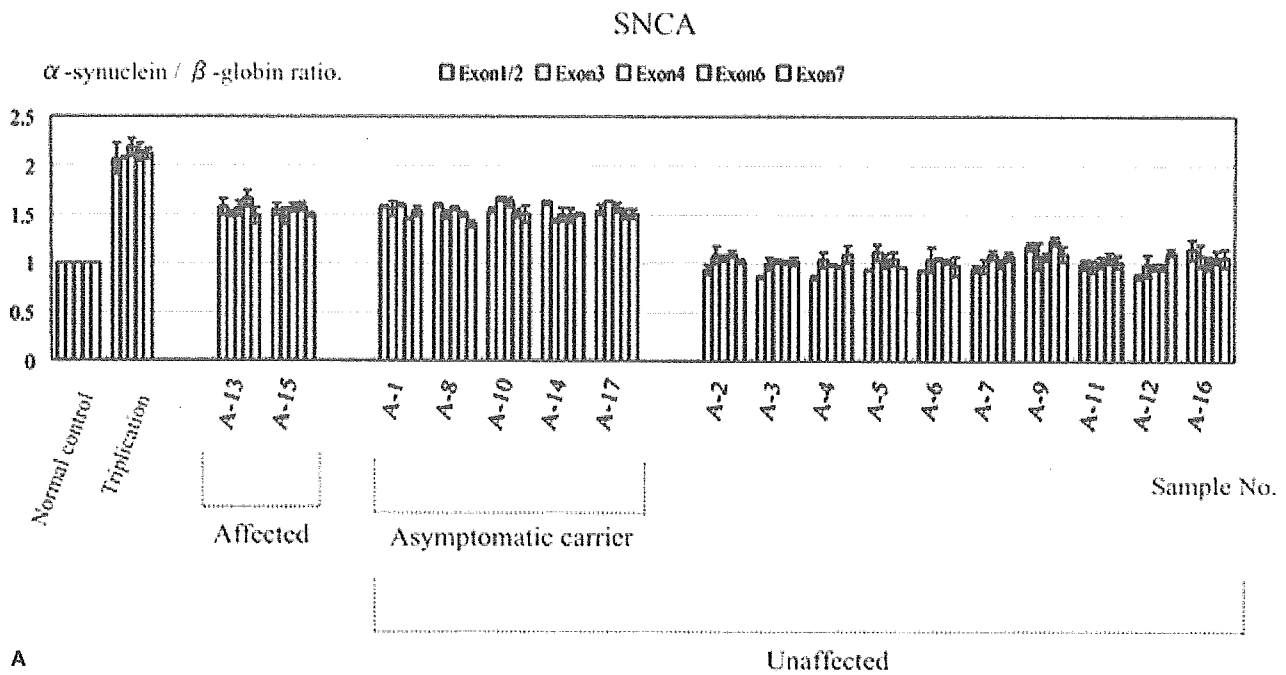


Fig 2. Results of screening for SNCA multiplications for exons 1 to 7 in Family A (A). We detected two patients with SNCA duplication and five asymptomatic carriers in this family (a penetrance ratio of 33.3%) and (B) Family B. We detected three patients with SNCA duplication in four family members.

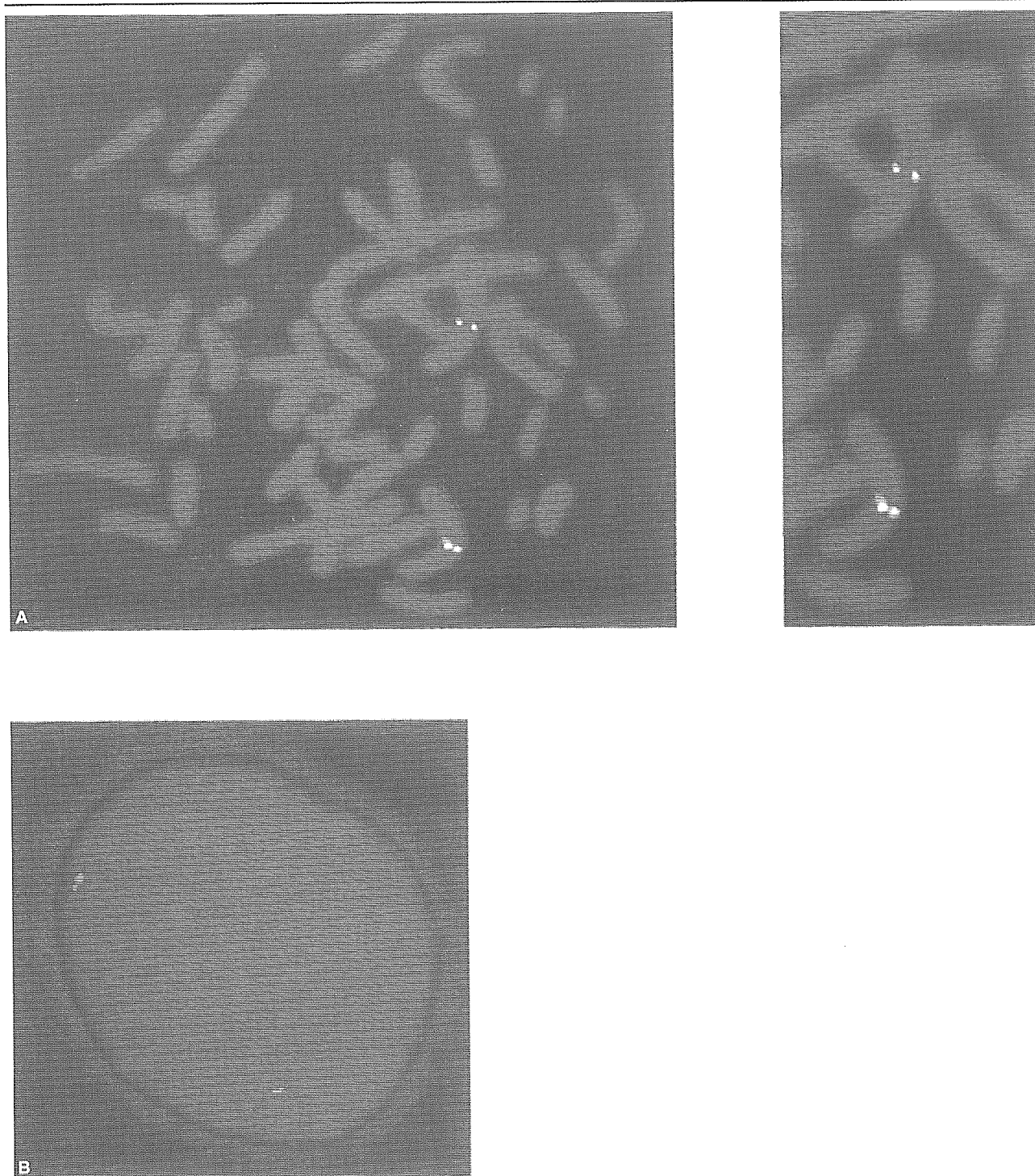


Fig 3. (A) Schematic representation of fluorescence in situ hybridization assay of metaphase chromosomes from Epstein-Barr virus (EBV)-transformed lymphocytes derived from Patients A-13 and B-1. We used BACs RP11-17p8 for normal control sample (shown in green and located 1.4Mb centromeric to SNCA, left panel) and RP11-61407, which included the SNCA shown in red on chromosome region 4q21-22 (right panel). These pictures show clearly disproportional segregations compared with the normal control. (B) Standard one-color FISH of the interphase, using BACs RP11-61407. Note the two disproportional signals.

the representative results of FISH analysis of interphase and metaphase chromosomes from EBV-transformed lymphocytes derived from Patients A-13 and B-1. We

detected tight apposition of the metaphase chromatids compared with signals of BAC RP11-17P8 located 1.4Mb centromeric to SNCA. The intensity of the sig-

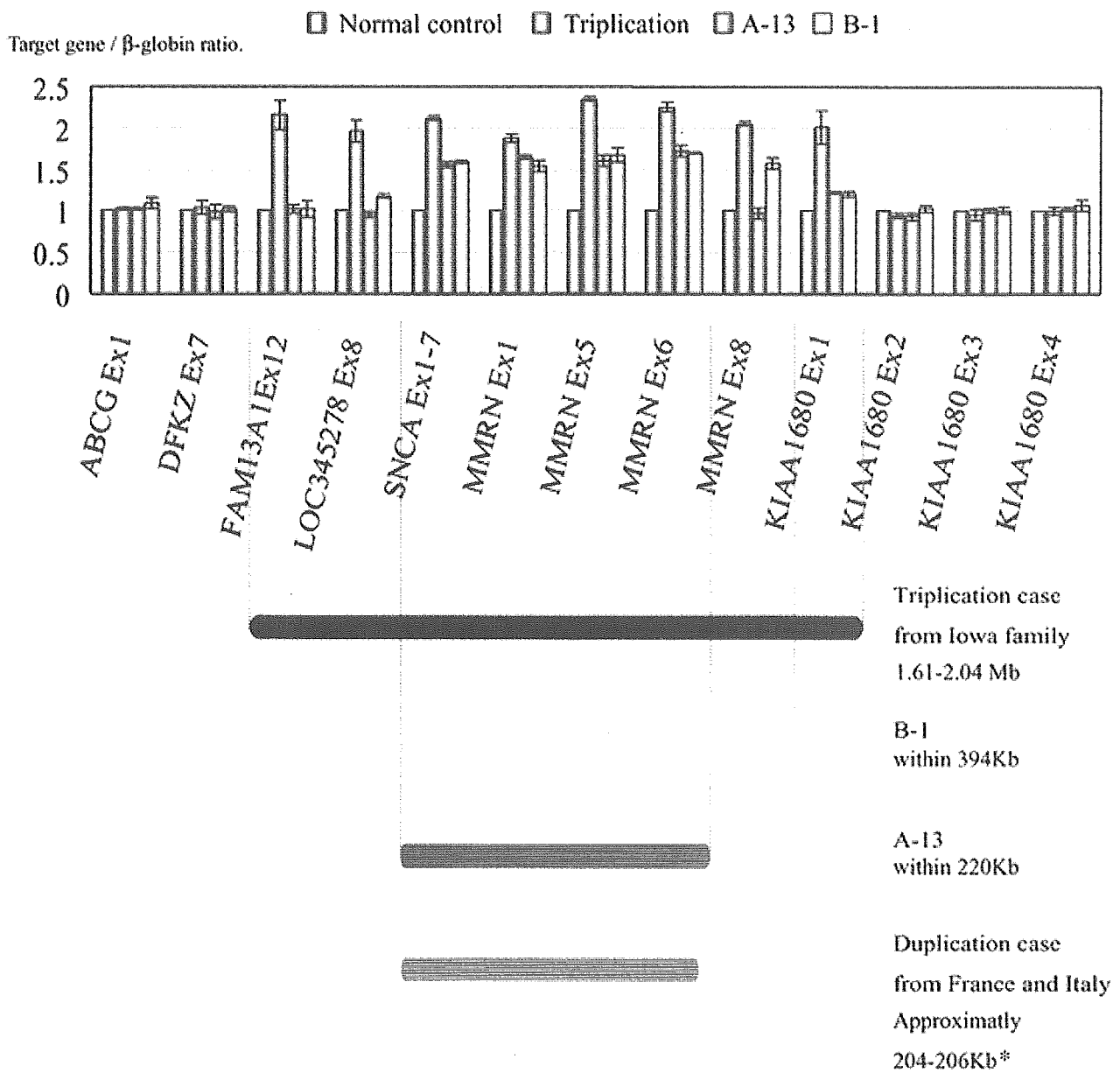


Fig 4. Identification of the region of SNCA duplication between ABCG to KIAA1680 by using real-time semiquantitative polymerase chain reaction method. The different duplication region appears on MMRN1 Exon 8. \*Duplication case as reported in Ibanez et al.<sup>13</sup>

nal suggests SNCA duplication in these two patients. When considered together with the results of gene dosage analysis, we were able to confirm SNCA duplication. We did not observe two separate signals between BACs RP11-17P8 and PR11-61407, suggesting that the size of the duplication region is less than 1.4Mb. CGH array analysis showed that the specific elevation ratio could not be detected because the SNCA region could not be directly included in BAC probes used in MCG Whole Genome Array-4500. However, this BAC-based array contains BACs RP11-49M7 and RP11-17p8 that are close to 5' or 3' sites of SNCA,

respectively. Alternatively, this finding indicates that the SNCA duplication region is less than 0.7Mb based on information archived by the database of UCSC (<http://genome.ucsc.edu>) and NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Although MCG Whole Genome Array-4500 covers the entire genome, no specific multiplication or deletions existed in other regions apart from 4q21-22. Identification of the SNCA duplication region was carefully assessed by gene dosage analysis for flanking genes around SNCA (Fig 4). The length of SNCA duplication of Patient A-13 spanned all of SNCA and part of MMRN1 such as exons 1 to 6. In

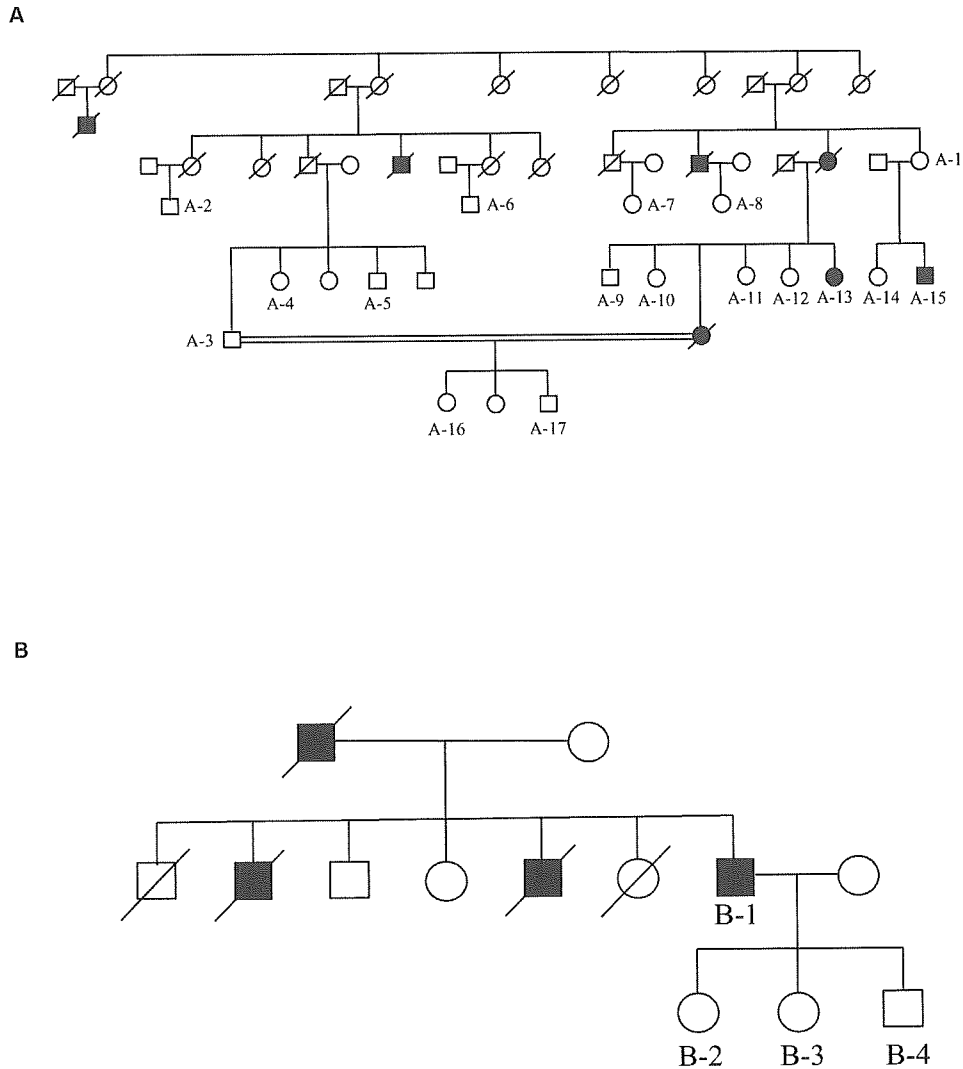


Fig 5. (A) Pedigrees of Patient A-1 with Parkinson's disease (PD) showing four generations. Black boxes represent affected patients. Symbols with numbers represent family members who were examined clinically by neurologists and from whom blood samples were collected. In 17 members, two patients were affected and five members (A-1, A-8, A-10, A-14, A-17) were carriers. Among seven carriers with SNCA duplication, the ages of all carriers except for A-17 were beyond the mean age at onset of patients with SNCA duplication. Thus, the penetrance ratio was 33.3% (two patients/six asymptomatic carriers). (B) Pedigree of Patient B-1 with PD showing three generations. Symbols are as for Figure 6A. In four members, one patient was affected, and two members were carriers.

contrast, the duplication region of Patient B-1 spanned all of *SNCA* and *MMRN1*. In addition, the regions of both patients did not span *LOC345278* and in Patient B-1, no duplication of *KIAA1680* was observed. Thus, the length of the duplication of Patient A-13 was shorter than that of Patient B-1, suggesting that the different lengths of the duplications differ by approximately 100 to 200kb. Furthermore, these two families have different allele sizes in microsatellite markers, suggesting that SNCA duplication is also de novo (data not shown). Clinical data, including the results of neuroimaging such as magnetic resonance imaging (MRI) and single-photon emission computed tomography

(SPECT) and [ $^{123}\text{I}$ ] meta-iodobenzylguanidine (MIBG) myocardial scintigraphy, are described below.

#### Family A

We collected DNA samples from 17 members of this family, including three affected and 14 unaffected members (Fig 5A). Among the three affected members, one patient (A-2) had no *SNCA* duplication. In addition, the age at onset of parkinsonism was 74 years. Moreover, L-dopa responsiveness was not excellent. Although MRI examination was not available, we considered that the cause of PD in this patient was not duplication but rather vascular parkinsonism based on

neurological findings. The mean age at onset of the disease was 43 years. The parents of A-16 and A-17 were close relatives. Five asymptomatic carriers were recognized by genomic analysis. No parkinsonism was observed in these asymptomatic carriers based on clinical neurological examination by two expert neurologists (K.N. and N.H.). The youngest age at onset was 38 years including the deceased patient (50 years old at onset). Thus, age 43 years was the cutoff age in this family. Considering this point, the penetrance ratio was 33.3% (2/6).

#### *Patient A-13*

The age of onset was 48 years. The initial symptom in Patient A-13 was rigidity and bradykinesia. She responded well to L-dopa. Six years after commencement of treatment with L-dopa, she developed drug-induced dyskinesia, which subsequently showed marked resolution. No tremor at rest has yet been noted. During the day, clinical assessment indicated Hohen and Yahr stage III. No dementia has developed yet and she has no symptoms related to autonomic nervous system dysfunction. Brain MRI study showed no abnormal mass or ischemic changes (Fig 6A) and  $^{123}\text{I}$ -IMP SPECT study showed no evidence of hypoperfusion. However, the H/M ratio of MIBG myocardial scintigraphy was less than that of the normal control (A-13; early: 1.4, late: 1.24; see Fig 6D, E).

#### *Patient A-15*

The age at onset was 38 years. This patient was the cousin of Patient A-13. The initial symptom was gait disturbance with frequent falls. Tremor and autonomic nervous dysfunction were not seen. He was diagnosed with depression during the course of the disease, but neither dementia nor cognitive deterioration was prominent. The clinical course of this patient was similar to that of Patient A-13. Although this patient responded to L-dopa, he showed excellent response to anticholinergic agents such as trihexyphenidyl hydrochloride rather than L-dopa. In addition, the patient developed psychosis at 43 years of age.

#### *Family B*

DNA samples were collected from four members of Family B (see Fig 5B). Among the two generations, the number of affected member was four including three deceased members, and the unaffected members were three including two carriers with *SNCA* duplication. The age of asymptomatic carriers (B-2, B-3, and B-4) was younger than 35 years at the time of collection of DNA samples. Thus, it is difficult to speculate whether these carriers will develop PD in the future.

#### *Patient B-1*

The age at onset was 47 years. In the early stage, he responded to L-dopa; however, at 58 years of age, the disease was evaluated as stage III. Moreover, the gait disturbance and bradykinesia worsened and he suffered from cognitive dysfunction a few years later. Since 61 years of age, he has found it difficult to communicate with others and started gradually to develop abnormal behavior. Mini-Mental State Examination score was 17/30 at 61 years of age. At 62 years, his gait disturbance and hallucination worsened. At 64 years, he spent most of the day on the bed and required tracheostomy because of repeated episodes of aspiration pneumonia. Brain MRI showed moderate dilation of Sylvian fissure and atrophic changes in the temporal lobe on both sides. There was no evidence of ischemic changes or abnormal mass (see Fig 6B). A  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD SPECT study showed hypoperfusion predominantly on both frontotemporal lobes (see Fig 6C). The H/M ratio of MIBG myocardial scintigraphy was reduced (B-1; early: 1.40, late: 1.24).

#### *Subject B-4*

Subject B-4 was mentally retarded and had autism and generalized seizure. Since 1 year of age, he could not speak and was diagnosed with mental retardation by a pediatrician. At 12 years of age, he started to speak a few words and was sometimes observed to have sudden outburst of rage. At 15 years, he developed generalized seizure. EEG showed spiking waves predominantly localized to the right frontal lobe. Brain computed tomography scan showed no abnormal densities or other signs. No parkinsonism has been noted so far.

Table 2 summarizes the clinical features of these cases, including the results of neuroimaging and MIBG scintigraphy.

#### **Discussion**

Several recent studies suggest *SNCA* multiplications are a rare cause of PD, PDD, and DLBD.<sup>22,28,29</sup> In this study, we detected *SNCA* duplication in PD patients from 2 of 113 unrelated Japanese families with autosomal dominant parkinsonism. Thus, the incidence of *SNCA* multiplication may be more frequent than previously estimated. To our knowledge, the Iowa family and a single family of Swedish-American descent have been reported previously to have *SNCA* triplication.<sup>11,19</sup> In addition, two French families and one Italian family with *SNCA* duplication have been reported.<sup>12,13</sup> Taken together with this study, a total of seven families with *SNCA* multiplication, including triple and double *SNCA* copies, have been reported worldwide.

For all patients with *SNCA* duplication reported here, including patients of Family A, the phenotype was indistinguishable from idiopathic PD and no other

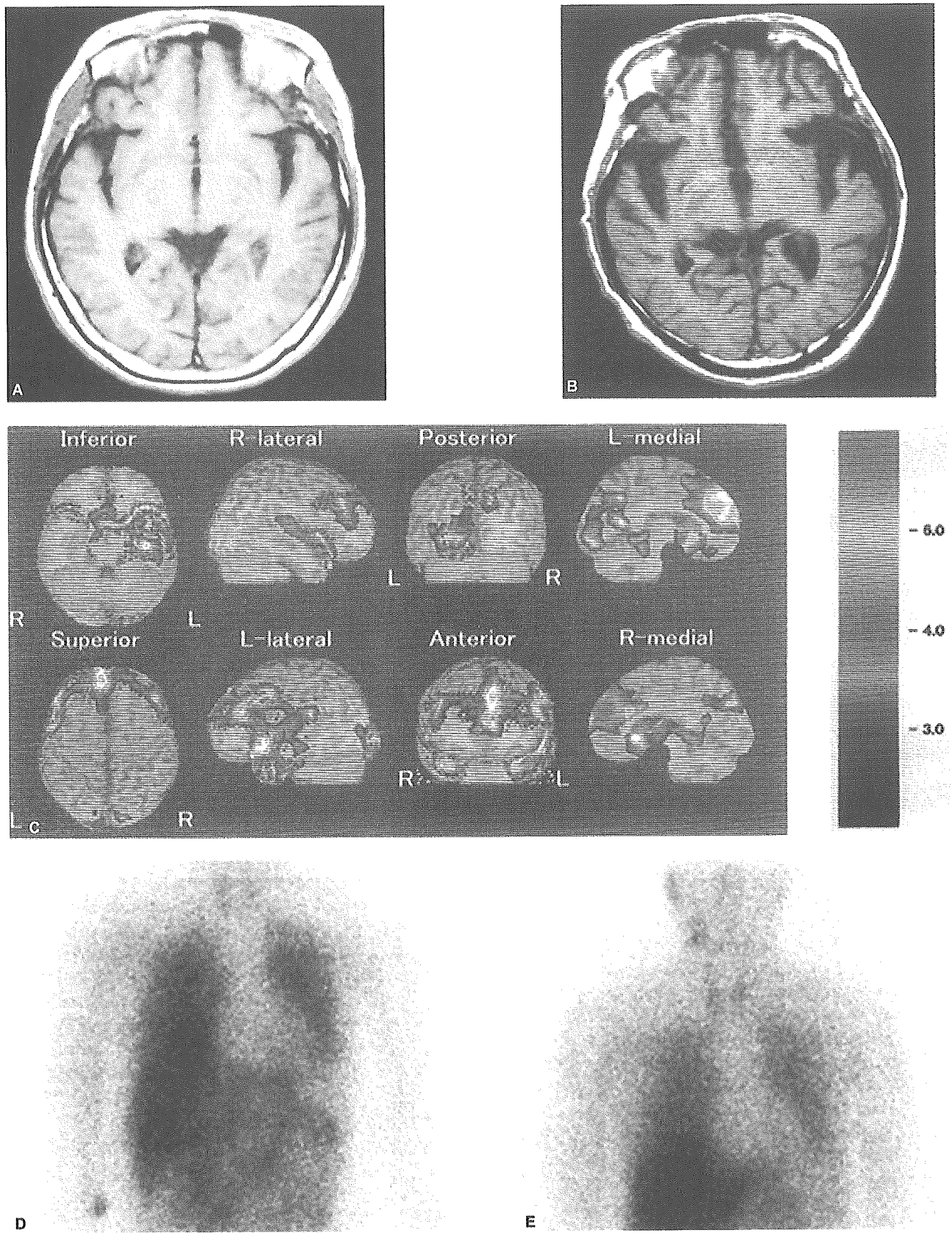


Fig 6. (A) Brain magnetic resonance imaging (MRI) T1 wedge study of Patient A-13. No abnormal masses or ischemic changes were evident. (B) Brain MRI T1 wedge study of Patient B-1. Note the dilation of Sylvian fissure and atrophic changes in both temporal lobes. (C)  $^{123}\text{I}$ -IMP SPECT study of Patient B-1. Note the hypoperfusion of both frontotemporal lobes and medial-occipital lobes. (D, E)  $^{125}\text{I}$ meta-iodobenzylguanidine (MIBG) myocardial scintigraphy (D; early, E; late) of Patient A-13. The HIM ratio was reduced in this patient.



Table 2. Clinical Features of Four Affected Patients in Two Unrelated Pedigrees

Feature	A Family			B Family
	A-13	A-15	A-2	B-1
Age (yr)	57	43	77	65
Age at onset (yr)	48	38	74	47
Disease duration (yr)	10	6	4	19
Initial symptom	Rigidity	Rigidity	Bradykinesia	Bradykinesia
Bradykinesia	+	+++	++	+++
Rigidity	+++	+++	++	+++
Resting tremor	—	—	—	—
Postural instability	—	+	+	—
UPDRS	10/108	32/108	27/108	—
MMSE	30/30	30/30	17/30	17/30
L-Dopa response	+++	+	—	+
SNCA duplication	+	+	—	+

UPDRS = Unified Parkinson's disease rating scale; MMSE = Mini-Mental Status Examination.

clinical features such as dementia were present, in contrast with families with *SNCA* triplication. Notably, dementia was observed in one patient of Family B. Therefore, it is important to screen PDD or DLB for *SNCA* multiplications. However, the age of onset of PD in the patient with dementia was older than that of Iowa patients ( $36.0 \pm 10.5$  years) and the patient of Swedish-American family (31 years).<sup>19</sup> Moreover, the age at onset of Japanese patients was similar to those of other families with *SNCA* duplication ( $48.4 \pm 15.0$  years). In addition, the asymptomatic carrier, B-2, had epilepsy, which has been reported in one French PD patient.<sup>13</sup> In addition, autism was observed in the same patient, although no clear parkinsonism was evident. Patient B-1 had dementia, in contrast with previously reported cases with *SNCA* duplication, although the duration of the disease was longer (18 years) compared with reported cases of *SNCA* duplication. In addition, dementia only appeared after 14 years of diagnosis of parkinsonism. Therefore, *SNCA* duplication may be a risk factor for development of dementia.

Within each kindred the *SNCA* multiplication is a de novo mutation. The 4q21 genomic duplication in Patient B-1 included all of *SNCA* and *MMRN1*, whereas the duplicated region in Patient A-13 contained all of *SNCA* but only part of *MMRN1*. The *SNCA* triplication in the Iowa family also contains *MMRN1*, suggesting that overexpression of *MMRN1* plays a role in cognitive deficit.

However, northern blotting analysis indicates a paucity of expression for *MMRN1* in neurons.<sup>30</sup> It therefore is unlikely that the effects of *MMRN1* are related to the development of dementia. *MMRN1* more likely plays a role in hemostasis and if vasogenic factors, including platelets and endothelial cells, are involved in dementia, *MMRN1* overexpression may still contribute to the dementia phenotype.

Previous studies reported the association of cardiac

denervation and parkinsonism caused by *SNCA* gene triplication.<sup>31</sup> Low H/M ratios by [<sup>123</sup>I]MIBG myocardial scintigraphy were reported in patients with sporadic PD.<sup>32,33</sup> In contrast, the H/M ratio was not decreased in patients with *parkin* mutations who lacked LBs in the autopsied brains.<sup>34</sup> In this regard, this finding is similar in patients with *SNCA* multiplication.

This study showed that the disease penetrance of Family A was 33.3%. The current ages of the asymptomatic carriers in this family are beyond the mean age at onset of patients. Thus, the difference may be caused by the *SNCA* expression levels between patients and asymptomatic carriers. Considering the multiple copies of *SNCA*, the expression level could be important. Indeed, double expression level of this protein compared with the normal brain was identified in Iowa family with *SNCA* triplication.<sup>19</sup> In addition, several haplotypes in the promoter region of *SNCA* including the sequence repeat element Rep1 were shown to associate with increased risk for sporadic PD.<sup>35,36</sup> However, whether the promoter alleles are risk factors for the development of PD is currently controversial.

Recently, Mueller and colleagues reported that single nucleotide polymorphisms located within the 3' side of exons 5 and 6, but not promoter polymorphism, correlated significantly with PD.<sup>35</sup> However, the functional association between PD and the associated region of *SNCA* remains unclear. In our study, the presence of asymptomatic carriers indicated that not only *SNCA* dosage but also another genetic variability in *SNCA* may be a risk factor for the development of PD.

## References

1. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003;21:256–259.

2. Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, et al. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* 1998;18:262–265.
3. Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, et al. A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2002; 52:549–555.
4. Leroy E, Boyer R, Auburger G, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998;395:451–452.
5. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al., Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998;392:605–608.
6. Le WD, Xu P, Jankovic J, et al. Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet* 2003;33: 85–89.
7. Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004;44:595–600.
8. Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, et al. Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36–37. *Am J Hum Genet* 2003;72:1053–1057.
9. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276: 2045–2047.
10. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004;21:1158–1160.
11. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al.  $\alpha$ -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003;302: 841.
12. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, et al.  $\alpha$ -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004;364:1167–1169.
13. Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, et al., Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004;25:1169–1171.
14. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004;44:601–607.
15. Kruger R, Kuhn W, Leenders KL, et al. Familial parkinsonism with synuclein pathology: clinical and PET studies of A30P mutation carriers. *Neurology* 2001;22:1355–1362.
16. Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, et al. The new mutation, E46K, of  $\alpha$ -synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004;55:164–173.
17. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, et al.  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;28:839–840.
18. Vaughan J, Durr A, Tassin J, et al. The alpha-synuclein Ala53Thr mutation is not a common cause of familial Parkinson's disease: a study of 230 European cases. European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Ann Neurol* 1998;44:270–273.
19. Farrer M, Kachergus J, Forno L, et al. Comparison of kindreds with parkinsonism and  $\alpha$ -synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol* 2004;55:174–179.
20. Muentert MD, Forno LS, Hornykiewicz O, et al. Hereditary form of parkinsonism-dementia. *Ann Neurol* 1998;43:768–781
21. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, et al. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinicopathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55: 181–184.
22. Johnson J, Hague SM, Hanson M, et al. SNCA multiplication is not a common cause of Parkinson disease or dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2004;63:554–556.
23. Ariyama T, Inazawa J, Uemura Y, et al. Clonal origin of Philadelphia chromosome negative cells with trisomy 8 appearing during the course of alpha-interferon therapy for Ph positive chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 81:2023.
24. Saito-Ohara F, Fukuda Y, Ito M, et al. The Xq22 inversion breakpoint interrupted a novel ras-like GTPase gene in a patient with Duchenne muscular dystrophy and profound mental retardation. *Am J Hum Genet* 2002;71:637–645.
25. Inazawa J, Inoue J, Imoto I. Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci* 2004;95:559–563.
26. Sonoda I, Imoto I, Inoue J, et al. Frequent silencing of low density lipoprotein receptor-related protein 1B (LRP1B) expression by genetic and epigenetic mechanisms in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2004;64:3741–3747.
27. Takada H, Imoto I, Tsuda H, et al. Screening of DNA copy-number aberrations in gastric cancer cell lines by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci* 2005;96: 100–110.
28. Gispert S, Trenkwalder C, Mota-Vieira L, et al. Failure to find alpha-synuclein gene dosage changes in 190 patients with familial Parkinson disease. *Arch Neurol* 2005;62:96–98.
29. Lockhart PJ, Kachergus J, Lincoln S, et al. Multiplication of the alpha-synuclein gene is not a common disease mechanism in Lewy body disease. *J Mol Neurosci* 2004;24:337–342.
30. Hayward CP, Hassell JA, Denomme GA, et al. The cDNA sequence of human endothelial cell multimerin. A unique protein with RGDS, coiled-coil, and epidermal growth factor-like domains and a carboxyl terminus similar to the globular domain of complement C1q and collagens type VIII and X. *J Biol Chem* 1995;270:18246–18251.
31. Singleton A, Gwinn-Hardy K, Sharabi Y, et al. Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication. *Brain* 2004;127:768–772.
32. Nagayama H, Hamamoto M, Ueda M, et al. Reliability of MIBG myocardial scintigraphy in the diagnosis of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:249–251.
33. Orimo S, Ozawa E, Nakade S, et al. [<sup>123</sup>I] metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy differentiates corticobasal degeneration from Parkinson's disease. *Intern Med* 2003;42:127–128.
34. Suzuki M, Hattori N, Orimo S, et al. Preserved myocardial [<sup>123</sup>I]metaiodobenzylguanidine uptake in autosomal recessive juvenile parkinsonism: first case report. *Mov Disord* 2005;20: 634–636.
35. Mueller JC, Fuchs J, Hofer A, et al. Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005;57:535–541.
36. Pals P, Lincoln S, Manning J, et al.  $\alpha$ -Synuclein promoter confers susceptibility to Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004;56: 591–595.

## パーキンソン病の遺伝子異常

波田野靖子 李 暁冰 服部 信孝 水野 美邦

### 要 旨

家族性パーキンソニズムではPARK1-11までの遺伝子座がマップされ、そのうち $\alpha$ -synuclein, parkin, UCH-L1, DJ-1, Nurr1, LRRK2/dardarinの原因遺伝子が同定された。そして現在その遺伝子産物の機能解析が進められている。最近になり常染色体劣性遺伝性パーキンソニズム (ARPD) の新たな原因遺伝子としてPINK1が報告された。PINK1遺伝子変異は日本とイタリアを中心に報告されているが、parkin遺伝子変異に次いで頻度の高い遺伝子異常であることが指摘されている。その臨床型は、発症年齢は平均32歳、発症時のジストニアや睡眠効果などPARK2に見られる特徴的な臨床症状は目立たず、むしろ孤発型パーキンソン病 (PD) との類似性が指摘されている。PINK1の機能は未だ不明だが、ミトコンドリア機能異常との関連が指摘されている。孤発型PDには、ミトコンドリア電子伝達系の機能低下が重要な病態であるとする多くの確証が存在する。このことは遺伝性と孤発型が共通したメカニズムによって惹起されることを意味している。まだ報告例は少ないが、PINK1遺伝子の同定によりパーキンソン病の分子遺伝学的研究はさらなる展開を迎えた。 [日内会誌 94:775~781, 2005]

**Key words** : 若年性パーキンソン病, parkin, pink1

### はじめに

孤発性パーキンソン病 (PD) は遺伝的素因、環境素因の関与する多因子疾患と考えられている。これまでに酸化ストレスやミトコンドリア機能障害の関与などが指摘されているが、依然一次的要因の解明には至っていない。一方で遺伝性パーキンソン病 (FPD) における研究には、めざましいものがある。PDの多くは孤発性であるが、5~10%が家族内発症の認める遺伝性である。孤発性、家族性いずれにおいても黒質神経細胞の変性をきたす点は共通しており、FPDの原因遺伝子の同定そしてその機能解明が、孤発性PDへの病態解明の手がかりとなり得よう。本稿では、最近報告されたPINK1遺伝子異常を

含め原因遺伝子の明らかとなっているFPDを中心に解説したい。

### 1. 家族性パーキンソン病の分類と臨床型

現在のところPARK1~11まで遺伝子座がマップされ、そのうち6つの原因遺伝子が同定されている。常染色体優性遺伝性パーキンソン病 (ADPD) では、SNCA, UCHL-1, Nurr1, LRRK2/dardarinが、常染色体劣性遺伝性パーキンソン病 (ARPD) では、parkin, DJ-1, また最近になり新たにPINK1が同定された (表1)。PARK10はPDの疾患感受性遺伝子としてマップされている。

上記の遺伝子のうち、日本人PD患者ではparkin遺伝子変異のみが報告されていたが、最近になりPINK1遺伝子異常をもつ日本人ARPD患者が存在することが判明した。日本は島国であり近

はたの やすこ, り ぎょうひょう, はっとり のぶたか,  
みずの よしくに: 順天堂大学脳神経内科

表 1. 家族性パーキンソン病の分類

遺伝子シンボル	座位	遺伝形式	原因遺伝子	Lewy小体	発症年齢	臨床的特徴
SNCA	4q21	優性	<i>α synuclein</i>	+	46 ± 13	一部に痴呆を認める
PARK2	6q25.2-27	劣性	<i>parkin</i>	-	40 <	本文参照
PARK3	2p13	優性	?	+	36 ~ 89	一部に痴呆, 姿勢時振戦を認める
PARK4	4q21-22	優性	<i>α synuclein</i>	+	24 ~ 48 歳	痴呆, 本態性振戦, 前頭葉徴候
UCHL1	4p14	優性	<i>UCH-L1</i>	?	50 歳前後	孤発型に似る
PARK6	1p35-36	劣性	<i>PINK1</i>	?	32 ± 7	本文参照
PARK7	1p36	劣性	<i>DJ-1</i>	?	27 ~ 40	本文参照
PARK8	12p11.2-q13.1	優性	<i>LRRK2/dardarin</i>	±	56 ~ 62 歳	孤発型に似る
PARK9	1p36	劣性	?	?	11 ~ 16 歳	痴呆, 錐体路症状, 眼球運動障害
PARK10	1p32	感受性遺伝子	?	?	65.8 歳	孤発型パーキンソン病
NR4A2	2q22-23	優性	<i>Nurr1</i>	?	45 ~ 67 歳	孤発型に似る
PARK11	2q36-37	優性	?	?	58 歳	孤発型に似る

親婚が多かったという地理的歴史的背景もあり、常染色体劣性若年性パーキンソニズム (ARPD) が多い。第二次世界大戦以後、人口の移動に伴い近親婚率は減少しているが、日常外来で ARPD に遭遇することは決して稀ではないと思われる。後述するが、*parkin* 遺伝子変異の家系が最も頻度的に多いことは世界的規模においても間違いのない。一方、原因遺伝子が不明な家系が少なからず存在することも事実であり、更に原因遺伝子が増えると予想される。単一遺伝子異常で発症する FPD が、最低でも 11 型存在することは黒質神経細胞死の機序は、より複雑であり、孤発型の臨床症状の多彩から予想しても PD は多様性の高い疾患群であると言える。

#### 1) SNCA

1997 年から 1998 年にかけてヨーロッパの AD の家系において A53T, A30P の 2 つの点変異が報告された。A53T はイタリア, ドイツ, ギリシアの数家系において認めており、共通の祖先から生じる創始者効果が示唆される。臨床症状はやや経過が早く一部に痴呆を認める。その後スペインの家系において新たな点変異 E46K が認められ、さらに PARK4 としてマップされていた Iowa 家系にて triplication による変異が報告された。剖検脳において mRNA レベルでの過剰発現

が示され、遺伝子の高発現がその病態に関わっていることが証明されている<sup>1)</sup>。Multiplication については追試により 4 例報告があるが、痴呆を伴わず孤発型と類似した臨床症状を呈する症例もあり興味深い<sup>2)</sup>。これまで日本を含めアジアからの報告はなく、ヨーロッパに局限した比較的頻度の少ない変異である可能性があるが、multiplication の発生機序がランダムであることから、世界中に分布している可能性がある。 $\alpha$ -シヌクレインは Lewy 小体の主要構成成分であり、PD における Lewy 小体形成や選択的細胞変性にどのように関与しているかメカニズムの解明の糸口となり得る重要な蛋白質である。

#### 2) parkin

1973 年に Yamamura らによりその臨床型が発表され、その後連鎖解析により 6q25.2-27 に遺伝子座が決定され、1998 年我々と慶応大清水教授との共同研究により遺伝子単離に至った<sup>3)</sup>。一連を世界に先がけて本邦が報告したものであり、本邦に比較的多い病型である。マイクロサテライトマーカを含む広範囲な欠失が遺伝子を単離する糸口となったが、欠失は本邦にて多い。外国ではミスセンス変異及び microdeletion が多い。後述する特徴的臨床症状の他に多彩な表現型の報告があり、遺伝子異常のタイプと表現型

との相関ははっきりしない。*parkin* 遺伝子異常のみが民族を越えて世界に幅広く認められ、その頻度はARPDの約50%と報告されている<sup>4,5)</sup>。

病状の発症は40歳以下が多いが6~72歳と幅がある。ARの家族歴をもつ家系が多いが、家族歴のない早期発症例の報告も少なくない。孤発性PDの特徴に加え、症状の日内変動、下肢優位のジストニア、L-dopa開始後早期のジスキネジア (peak dose of dyskinesia)、睡眠効果、深部腱反射亢進などの特徴を有する。痴呆はない。出現頻度は自律神経症状60%、経過中のジストニア78%、精神症状56%、睡眠効果63%とする報告がある<sup>6)</sup>。10歳以下の発症で、ジストニアを呈する症例は瀬川病(dopa responsive dystonia; DRD)との鑑別が重要である。ジストニアが初発である場合整形外科を受診するケースも多い。経過は数十年と長いにもかかわらず、onの時Yahr3、offの時Yahr4を越えるような重症例は少ない<sup>6)</sup>。精神症状に関してはパーキンソニズムの発症前に精神症状が先行しているケースもある<sup>6)</sup>。精神症状としては、うつ病が多いが、パラノイア、不安神経症、神経性食欲不振症の報告もある。キャリア(ヘテロ接合体で*parkin* 遺伝子異常を認めるがパーキンソニズムは認めない)において精神症状がでやすいとする報告がある<sup>6)</sup>。

*parkin* は単離されて以来、精力的にその機能解明が追究されてきた。異なる民族を共通して高頻度に認めておりPDの発症メカニズムを解明する際の中核となる蛋白といえる。その実体はubiquitin-proteasome system (UPS) で働くE3であり、Loss-of-function効果で*parkin* の基質にポリユビキチン鎖が付加されないために、プロテアソームにより分解されないことが予想される。これまでに基質候補としてCDCrel-1, Pael-receptor,  $\alpha$ -glycosylated  $\alpha$ -synucleinなど10種類の分子が基質候補としてあげられている。若年発症でありながら、その長期予後はYahr4を一般に越えないという比較的良性的経過を辿る。細胞変性をきたすメカニズムにおいてどの

ような中心的役割をなしているのか非常に興味深い蛋白である。また神経病理学的にレビー小体が一般に存在しないことから、その形成機序に必要な役割をなしている可能性があり、今後の更なる追究が期待される。

### 3) *DJ-1*

ヨーロッパのARの家系を対象とした連鎖解析により1p36にマップされ、2002年Bonifatiらにより原因遺伝子として*DJ-1* 遺伝子が同定された<sup>7)</sup>。オランダの家系においてexon1から5にまたがる2,000bpの広範な欠失が見いだされ、イタリアの家系にてL166Pの点変異が認められた。*DJ-1* 遺伝子は全長23.5Kb、189のアミノ酸から構成され、脳も含め体内の各組織にユビキタスに発現している。RNA binding proteinの調節因子、さまざまな転写因子を調節するSUMO-1 ligaseとの結合、さらに酸化ストレスに対する防御的作用などが指摘されているが全貌は明らかでない。

追試により、海外で点変異5例、欠失2例を認めているが、大規模調査にても陰性例が多く、稀な変異である可能性が示唆されている<sup>8)</sup>。当研究室においてもアジアのARPDを対象にハプロタイプ解析を施行し、PARK7に連鎖している家系を6家系見いだしたが*DJ-1* 遺伝子変異は認めていない(論文投稿中)。*DJ-1* 遺伝子変異の患者は、発症は平均 $34.6 \pm 9.2$ 歳でPARK2に類似した臨床症状を呈する。神経症や精神症状(不安神経症、パニック発作、幻覚)を伴うことが報告されているが、症例数が少なく今後の検討が必要である。

### 4) *PINK1*

#### (1) *PINK1* 遺伝子異常の発見

シシリア島のARの家系を対象とした連鎖解析により1p35-36にLocusが絞られ、候補遺伝子の変異解析により*PINK1* (PTEN Induced Putative Kinase 1) 遺伝子異常が2004年4月に報告された<sup>9)</sup>。イタリアの2家系にノンセンス変異W437X、スペインの1家系にG309Dが認められた。我々も

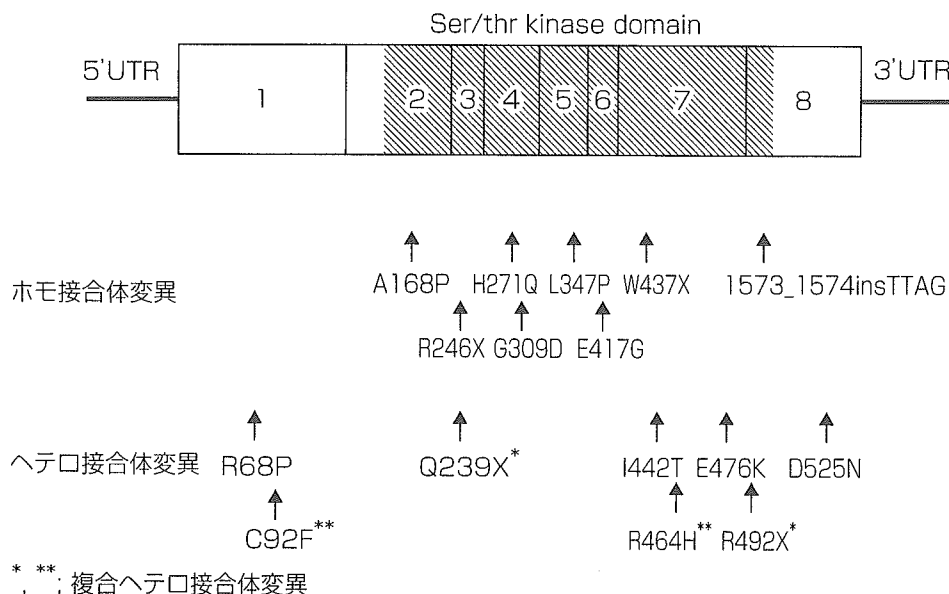


図 1. PINK1 遺伝子変異

アジアのARPDの家系を対象にハプロタイプ解析を施行し，1p35-36に連鎖する家系を8家系認め<sup>10)</sup>，そのLOD scoreが9.88と高く濃厚な連鎖が示唆された．その原因遺伝子同定のためその領域に存在する候補遺伝子のスクリーニングを行い，イタリアの研究室に先手を越されたが別にPINK1が原因遺伝子であることを突き止めた．8家系のうち6家系（日本R246X，H271Q，E417G，イスラエルR246X，フィリピンL347P，台湾Q239X/R492X）にPINK1の病的変異を見いだした<sup>11)</sup>．

点変異が主体であり，挿入の報告は一例，欠失は今のところない（図1）．また日本とイスラエルにて同様の変異（R246X）を認め，ハプロタイプ解析にても創始者効果は否定的であり，変異のホットスポットである可能性がある<sup>11)</sup>．変異の多くはセリン/トレオニンキナーゼドメインに集中して存在する．また，ホモ接合体ミスセンス変異の箇所は，機能ドメインを推測する上で重要な箇所であると予想される．早期発症の孤発型（50歳以下）においてはヘテロ接合体での変異も報告されている<sup>12)</sup>．報告された症例数は約20例と未だ少ないが，報告されたなかでは，変異のタイプと臨床症状の重症度との相関ははっ

きりしない．今後プロモーター，イントロンの解析，exon rearrangementの定量などの追究が期待される．

PINK1はUnokiらにより癌関連遺伝子であるPTENを活性化した際に高発現する遺伝子として単離された．PINK1遺伝子は581のアミノ酸からなり，マウスと95%の相同性をもつことから種間を共通して保存されている重要な蛋白であると予想される．構造上，最初の34のアミノ酸残基にミトコンドリア移行シグナルをもち，後半の大部分をカルモジュリンファミリーのセリン/トレオニンキナーゼドメインが占める．全長1.4Mbの巨大なparkin遺伝子に比し，PINK1遺伝子は18kbである．これまでにミトコンドリアへの局在，及びストレスにより引き起こされるミトコンドリアの機能障害とアポトーシスの誘導に対して保護的に働いていることが実験的に示されているが，詳細な機能は未だ不明である<sup>9)</sup>．

## (2) PINK1 遺伝子異常をもつ若年性パーキンソニズム

これまでにイタリア5家系，日本3家系，スペイン，フィリピン，台湾，イスラエルそれぞれ1家系ずつの報告がある．まだ症例数が少なく，人種間における差異，頻度など明確な点は

表 2. ARPD の臨床的特徴

原因遺伝子	<i>parkin</i>	<i>DJ-1</i>	<i>PINK1</i>
発症年齢	40 歳以下が多い	27 ~ 40 歳	18 ~ 48 歳
報告数	多数	7 例	20 例
遺伝形式	AR	AR	AR
臨床的特徴			
睡眠効果	+	-	-
ジストニア	+	+	-
腱反射亢進	+	-	-
日内変動	+	-	-
痴呆	-	-	-
レボドパの有効性	+	+	+
蛋白の機能	ユビキチンリガーゼ	抗酸化作用?	キナーゼ?

表 3. *PINK1* 遺伝子変異をもつ ARPD の臨床的特徴

発症年齢 (歳)	31.7 ± 7.96 (18 ~ 48)	(n = 19)
罹患年数 (年)	17.1 ± 6.84 (2 ~ 29)	(n = 18)
性差	男 : 女 = 8 : 11	(n = 19)
臨床症状		
安静時振戦	77.7%	(n = 18)
固縮	94.1%	(n = 17)
無動	100%	(n = 18)
姿勢反射障害	58.8%	(n = 17)
l-dopa への反応性	100%	(n = 18)
発症時の症状の左右差	76.4%	(n = 17)
ジスキネジア	83.30%	(n = 18)
睡眠効果	35.20%	(n = 17)
発症時のジストニア	16.60%	(n = 18)
腱反射亢進	35.2%	(n = 17)
精神症状	23.5%	(n = 17)
痴呆	5.5%	(n = 18)

不明であるが、アジアを中心に変異を認めているのは事実である。日本では *parkin* について多い遺伝子異常である可能性がある。*parkin* 遺伝子異常を認めない ARPD のうち、約 3~4% が *PINK1* 遺伝子異常をもつと考えられる。その臨床型は、発症年齢は平均  $32 \pm 7.87$  歳、罹患期間平均 17.5 年、l-dopa が奏功し、Park2 に比し発症時のジストニア、睡眠効果、日内変動、腱反射亢進を呈する症例は少ない傾向がある (表 2, 3)。自律神経症状、痴呆は稀である。眼球運動障害、病的反射、小脳失調の合併はない。精神症状は稀ではあるが、一部の患者に発症前に統合失調症様

症状、うつ状態を認めている。若年の発症で孤発型に類似した臨床症状であれば *PINK1* 遺伝子異常を検索する必要があると思われる。イタリアのホモ接合体変異の家系において  $^{18}\text{F}$ -dopa の線条体での取り込み低下が認められている<sup>12)</sup>。心筋シンチ、SPECT の報告は未だない。剖検例もなく、Lewy 小体が存在するかどうかは不明である。

#### 5) ヘテロ接合体変異の意義

*parkin*, *DJ-1*, *PINK1* いずれにおいても家族歴のない早期発症の PD においてヘテロ接合体変異をもつ患者が存在する。変異を一方のアレルにしか持たないことの意義は、変異アレルのドミ

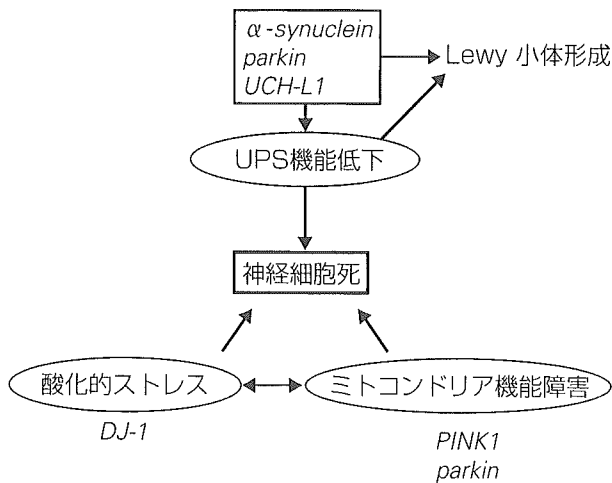


図2. 家族性パーキンソニズムの発症機序

ナントネガティブ効果かハプロ不全が、その機序として推定される。ARPD家系のキャリアにおいて軽症ではあるもののparkinsonismや精神症状を認める例が存在すること、*parkin*、*PINK1* 遺伝子変異のキャリアでの<sup>18</sup>F-dopaの線条体での取り込み低下を認めていることなどより、PD発症のrisk factorであろうと考えられている<sup>12)</sup>。環境要因や他の遺伝学的要因が重なり発症に結びつくのであろう。ヘテロ接合体でも発症することは、ARPDの家族への遺伝的カウンセリングにおいて慎重に対応すべき点である。

#### 6) その他の遺伝子異常

ADの家系において認められた原因遺伝子に *UCH-L1* と *Nurr1* があるが、追試の報告はなく、非常に稀な変異である可能性がある。*UCH-L1* はユビキチンリガーゼ活性を持つとの報告もありUPSでの機能解明が期待される。家族性パーキンソニズムの原因遺伝子産物は酸化ストレス、UPS機能低下、ミトコンドリア機能低下との関連性が指摘されている(図2)<sup>5)</sup>。これらは同時にPD発症の誘因としても注目されており、遺伝性と孤発型が共通したカスケードを持つことが示された。

その他、2004年11月にPARK8の原因遺伝子として*LRRK2/dardarin*が報告された<sup>13,14)</sup>。アメリカ、ヨーロッパの11家系にてミスセンス変異を

認め、その後の追試にて孤発例においても認めており、頻度の高い遺伝子変異である可能性がある。日本を始め今後の検討が期待される。

#### 7) 治療薬の開発

原因遺伝子に対応した治療方針は今のところ確立されておらず、一般的に発症年齢、生活背景、副作用を考慮しレボドパ、アゴニスト、アママンタジン、ドロキシドパ、セレギリンを使い分けるのが主流である。FPDは若年発症例が多く、レボドパの長期副作用を避けるためにアゴニスト単剤で治療するケースが多いと思われる。*Parkin*や*PINK1* 遺伝子異常をもつARPDではパーキンソニズム発症前に精神症状を認めている症例もあり、抗精神病薬の投与により薬剤性パーキンソニズムとして診断・治療されている可能性があり注意を要する。何れにしろ若年発症のパーキンソニズムでは、家族歴がなくとも遺伝子検索をすることが望ましい。

若年発症ということ考慮した場合、根本治療の開発が重要である。1つの治療選択として遺伝子を補充するreplacement therapyがあげられよう。ARPDであることよりこのreplacement therapyは実現性の高い治療と言える。一方で、*PINK1* を焦点にあてればミトコンドリア保護剤の開発、*DJ-1* については抗酸化剤、*Parkin*では、ユビキチン・プロテアソーム系関連剤と個々遺伝子の持つ機能から治療薬開発の戦略が考えられる。

#### おわりに

上記の既存の遺伝子異常を認めない家族性パーキンソン病の患者も数多く存在する。ゲノムワイドな連鎖解析、その候補領域の検討も行われており、新規遺伝子座の発見も待たれる。またSNPによる薬剤の個体での反応の差異、原因遺伝子に対応した薬剤の選択法など、遺伝子レベルでのオーダーメイド医療に基づく治療方針の確立も近い将来に可能になると推定される。今後



さらに飛躍的に進歩しPD発症の病態解明, 治療へと結びつくことを期待する。

追記) 本稿の執筆中にノーベル化学賞の発表があった。本年度はユビキチンの発見が受賞対象となり, アーロン・チカノバー(イスラエル), アブラム・ハーシュコ(イスラエル), アーウィン・ローズ(アメリカ)が受賞した。Parkinは, まさしくユビキチン・プロテアソーム系のユビキチンリガーゼであり, 神経変性疾患において初めてこの系が直接的に関与していると証明された遺伝子産物である。多くの変性疾患でユビキチン陽性封入体が観察されることから, この系の重要性が推測される。

謝辞 遺伝子診断にご協力下さった患者さんとそのご家族, 並びにDNA及び臨床情報をご提供いただいた山村安弘先生(広島大学脳神経内科), 朝比奈正人先生(千葉大学神経内科), 篠遠仁先生(旭神経内科病院), 小林奏先生(北野病院), Dr. Arlene NG(鹿児島大学第三内科), Dr. Rosales RL(Santo Tomas University), Dr. Lu CS(Chang Gung Memorial Hospital), Dr. Hassin S(Chaim Sheba Medical Center)に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) Farrer M, et al: Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol* 55: 174-179, 2004.
- 2) Ibanez P, et al: Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 364 (9440): 1169-1171, 2004.
- 3) Kitada T, et al: Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605-608, 1998.
- 4) Lücking CB, et al: Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the *parkin* gene. *N Engl J Med* 342: 1560-1567, 2000.
- 5) Hattori N, Mizuno Y: Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. *Lancet* 364(9435): 722-724, 2004.
- 6) Khan NL, et al: Parkin disease: a phenotypic study of a large case series. *Brain* 126 (Pt 6): 1279-1292, 2003.
- 7) Bonifati V, et al: Mutations in the *DJ-1* gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299: 256-259, 2003.
- 8) Hedrich K, et al: *DJ-1* (*PARK7*) mutations are less frequent than *Parkin* (*PARK2*) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology* 62: 389-394, 2004.
- 9) Valente EM, et al: Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in *PINK1*. *Science* 304: 1158-1160, 2004.
- 10) Hatano Y, et al: PARK6-linked Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism in Asian Populations. *Neurology* 63: 1482-1485, 2004.
- 11) Hatano Y, et al: Novel *PINK1* Mutations in Early-Onset Parkinsonism. *Ann Neurol* 56 (3): 424-427, 2004.
- 12) Valente EM, et al: *PINK1* mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 56 (3): 336-341, 2004.
- 13) Zimprich A, et al: Mutations in *LRRK2* cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44 (4): 601-607, 2004.
- 14) Paisan-Ruiz C, et al: Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44 (4): 595-600, 2004.

＜シンポジウム 5—4＞パーキンソン病の病態と治療

パーキンソン病の発症機序：parkin と  $\alpha$ -synuclein の  
共通カスケードと新規 Lewy 小体構成蛋白

服部 信孝 町田 裕 野田 和幸

(臨床神経, 45 : 905—907, 2005)

Key words : パーキン,  $\alpha$ -シヌクレイン, ドーパ・ドパミンキノン, リン酸化, IkappB

はじめに

パーキンソン病 (PD) のほとんどは遺伝性のない孤発型であるが、一部家族内発症をみとめる遺伝性 PD (FPD) が存在する。単一遺伝子異常で選択的黑質神経細胞死が惹起されるため、その病態解明は孤発型 PD の病態解明にも繋がると思われる。現在もっともホットな研究領域となっている。FPD は現在のところ SNCA (Park1)-Park11 までマップが決まっており、そのうち Park1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 の原因遺伝子が同定されている。興味深いことに FPD の病理像が多彩であり、Lewy 小体がみとめられたり存在しなかったり、あるいはタウオパチーの病理像をも兼ね備えているタイプもあり、単一遺伝子異常とはいっても、単にドパミン神経細胞死のみならず Lewy 小体形成の発生機序やタウ蛋白の蓄積まで多くの情報を提供してくれる。本稿では、Park2 の病態から選択的ドパミン細胞死について焦点を当て、更には Lewy 小体存在する新規蛋白の解析からその形成メカニズムまでを解説したい。

1. Park2

Park2 の特徴的な臨床症状としては、1) 日内変動をみとめるパーキンソニズム 2) levodopa の反応が著効 3) 睡眠効果 4) 薬物療法早期からのジスキネジア 5) 痴呆をみとめない 6) 自律神経症状をみとめない 7) 下肢優位のジストニア 8) 腱反射の亢進 (早期) を特徴とし、神経病理学的には黒質の選択的変性が主体で、青斑核の変性はあっても軽い。特筆すべき点は、Lewy 小体のみとめないことである。つまり選択的ドパミン神経細胞死解明のモデルとして有効であると考えられており、遺伝子産物である parkin の機能解明がその鍵を握っていると推定されている<sup>1)</sup>。また一般に Lewy 小体が観察されないことから、parkin が Lewy 小体形成上必須因子であるともいえる。Parkin の機能解析は、i) 選択的ドパミン神経細胞死、ii) Lewy 小体形成のメカニズムに大きな情報を与えてくれるものと信じている。

2. 選択的ドパミン神経細胞死のメカニズム

Parkin の機能については、ユビキチンリガーゼであることがわかっており<sup>2)</sup>、loss-of-function 型変異効果でリガーゼ活性が低下することで parkin の基質が蓄積して細胞死が惹起されると推定されている。ユビキチン化には、48 番目のリジンにポリユビキチン鎖が付加されるばあいと 63 番目のリジンに付加されるばあいが parkin で報告されている<sup>3)</sup>。48 番目のリジンが付加サイトになるばあいは蛋白分解系に関与し、63 番目の付加サイトのばあいは、endocytosis や DNA 修復などその機能については不明なことが多い。Parkin の基質は多数報告されており、しかも同じ基質であっても 48 番目と 63 番目のリジン残基にポリユビキチン鎖の付加が報告されており、詳細な機能については依然不明である。

Park2 の病態を考えるばあい、同定されている基質から推定するのが妥当であろう。Parkin の基質からその病態として想定されていることは、ER ストレス、exocytosis の低下、 $\alpha$ -synuclein の関与から Lewy 小体形成との関連が指摘されている<sup>4)</sup>。蛋白分解系からのアプローチが盛んにおこなわれたが、候補となっている基質のヒト剖検脳内における蓄積は確認されていない。つまり単に基質候補を中心とした生化学的・分子生物学的アプローチでは真の原因究明には限界がある。更に parkin ノックアウトマウスの解析では、細胞脱落が生じないこと行動異常を観察しないことよりマウスを使った解析でも限界がある<sup>5)</sup>。

そこで in vitro で parkin 蛋白をノックダウンすることで Park2 の病態を検討した。ノックダウンには、RNAi、アンチセンス strand を使った方法があるが、神経細胞が分裂終了細胞であることより、parkin アンチセンス strand を組み込んだアデノウイルスベクターをもちい検討を加えた<sup>6)</sup>。まず神経細胞腫でありドパミン神経様特徴を持ち合わせる SH-SY5Y 細胞を使い、titer 依存性に細胞死が誘導されることを確認し、次にこのアンチセンス strand の効果が細胞特異性があるか検討した。その結果、このアンチセンス効果は、SH-SY5Y 細胞に細胞死は誘導できたものの、同じくヒト由来子宮頸ガ

ン由来 HeLa 細胞には細胞死を誘導できなかった。このことはアンチセンス効果が神経特異的であることが予想された。マウス由来の細胞では、よりドパミン神経様特徴を持った細胞の方がアンチセンスによる細胞死が誘導されやすいことがわかった。SH-SY5Y 細胞は、レチノイン酸で神経細胞様に分化するが、レチノイン酸による分化誘導の有無では、神経細胞様に分化させた方が、よりアンチセンス strand による細胞死効果が強く出現した。またアンチセンスを加えた後にセンス strand を加えると細胞死の誘導は抑制された。つまりアンチセンスの効果は、parkin 遺伝子発現に特異的におこっているといえる<sup>6)</sup>。

なぜドパミン神経細胞様特徴を持つ SH-SY5Y 細胞に神経細胞死が誘導されたのか? Park2 には一般に Lewy 小体形成が観察されない。この Lewy 小体形成には  $\alpha$ -synuclein の関与が推定されており、その形成にドーパ・ドパミンキノン (Dopa/DA-quinone) の関与が指摘されていた。ドパミン神経細胞死も説明する上でもドーパ・ドパミンキノンの関与を想定することが大事であると考えた。ドーパ・ドパミンキノンは、ドパミンから自動酸化によりセミンキノン・キノンが産生される。このキノンに注目して parkin アンチセンスの効果は、このキノン体増加にあることをみいだした。キノン体はとも不安定な分子であるため安定分子であるドーパ・ドパミンクロムを測定し、アンチセンス効果がこのキノン体増加にともなうものであることがわかった<sup>9)</sup>。

興味深いことに野性型  $\alpha$ -synuclein を組み込んだアデノウイルスベクターを感染させることよりアンチセンスによる細胞死が抑制された。この抑制効果は、変異型  $\alpha$ -synuclein では、観察されなかった。SH-SY5Y 細胞は、内在性  $\alpha$ -synuclein がきわめて少なくノックダウンされている状態といえる。これら実験成果は、Park1, 4 が蛋白分解の低下か蛋白の発現レベル増加が発症において重要な因子であることと併せて、 $\alpha$ -synuclein が dual function を示すことが考えられる。つまり  $\alpha$ -synuclein は濃度が高くても低くても細胞毒性を示すことが仮説として考えられる。ここで強調したいのはドパミン神経細胞死にドパミンの自動酸化により産生されるドーパ・ドパミンキノン体が細胞死の実行分子であったこと、そして Park1 と Park2 の遺伝子産物が同じカスケードを共有していたことである<sup>9)</sup>。

### 3. Lewy 小体形成のメカニズム

PD を理解する上でこの封入体形成のメカニズムは重要なヒントになる。Park2 では一般に Lewy 小体形成をみとめない。孤発型 PD と同じ選択的ドパミン細胞死でありながら、形成をみとめないのを特徴とする。つまりドパミン神経細胞死は封入体形成をともなわなくともおこりうるということが確認されたといえる。現在この封入体形成については細胞毒性であるとする仮説があるものの神経保護的に作用するとする仮説が有力である。では本当に封入体は細胞保護に作用するのか?

われわれは、ヒト PD 剖検脳で新規 Lewy 小体に存在する

I $\kappa$ B $\alpha$  をみいだした。この分子は neuroinflammation に関与しており、I $\kappa$ B $\alpha$  と結合する分子 NF- $\kappa$ B が PD では核移行すると報告されている<sup>7)</sup>。しかもこの分子はリン酸化されることでポリユビキチン化され、その結果プロテアソームですみやかに分解される。Parkin の発見により、プロテアソームの関与が、 $\alpha$ -synuclein のリン酸化の関与で細胞死とリン酸化の問題が注目されており<sup>8)</sup>、両因子に関与する分子 I $\kappa$ B $\alpha$  が Lewy 小体に局在していたことは興味深い。I $\kappa$ B $\alpha$  に関与する分子として Cullin-1, SCF complex, ROC1 も Lewy 小体に存在していた<sup>9)</sup>。SH-SY5Y 細胞にプロテアソーム阻害剤を加えると細胞内封入体形成が観察されるが、この時の封入体構成成分にも I $\kappa$ B $\alpha$  をはじめとする先にあげた関連分子すべての分子が存在していた。I $\kappa$ B $\alpha$  はリン酸化されることでポリユビキチン化され分解されるが、このリン酸化酵素である I $\kappa$ B kinase (IKK) を阻害するペプチドを作製し、IKK を抑制した<sup>10)</sup>。IKK を阻害することで確かに封入体形成は抑制されたが、細胞死にはほとんど影響を与えなかった。少なくとも ubiquitin 陽性かつ I $\kappa$ B $\alpha$  陽性封入体は減じたが細胞死には影響を与えなかった。ここで特筆すべき点として I $\kappa$ B $\alpha$  と  $\alpha$ -synuclein の動向は必ずしも並行しなかったことである。このことは  $\alpha$ -synuclein の封入体への局在はプロテアソーム阻害だけではおきないのかもしれない。

### おわりに

FPD の病態は孤発型を反映していることはまちがいないであろう。今後も新規遺伝子が単離・同定されるであろうが、おそらく同じカスケードを形成しているものと考えている。FPD が示唆してくれるものを究明すれば必ずや FPD のみならず孤発型 PD の解明もそう遠くない将来に現実的となろう。

### 文 献

- 1) Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al: Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 605—608
- 2) Shimura H, Hattori N, Kubo S, et al: Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; 25: 302—305
- 3) Lim KL, Chew KC, Tan JM, et al: Parkin mediates non-classical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: implications for Lewy body formation. *J Neurosci* 2005; 25: 2002—2009
- 4) Hattori N, Mizuno Y: Pathogenetic mechanisms of parkin in Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 364: 722—724
- 5) Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, et al: Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 2003; 278: 43628—43635

- 6) Machida Y, Chiba T, Takayanagi A, et al : Common anti-apoptotic roles of parkin and alpha-synuclein in human dopaminergic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 332 : 233—240
- 7) Hunot S, Brugg B, Ricard D, et al : Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 ; 94 : 7531—7536
- 8) Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, et al : alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 2002 ; 4 : 160—164
- 9) Noda K, Kitami T, Gai WP, et al : Phosphorylated Ikap-alpha is a component of Lewy body of Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 331 : 309—317
- 10) May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, et al : Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex. *Science* 2000 ; 289 : 1550—1554

### Abstract

#### Pathogenesis of Parkinson's disease : a common pathway between $\alpha$ -synuclein and parkin and the mechanism of Lewy bodies formation

Nobutaka Hattori, M.D., Yutaka Machida, M.D. and Kazuyuki Noda, M.D.  
Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine

Parkin, a product of Park2 gene, is an important player in the pathogenic process of Parkinson's disease (PD). Despite numerous studies including search for the substrate of parkin, the mechanism by which loss-of-function of parkin induces selective dopaminergic neuronal death remains unclear. Here we show that antisense knockdown of parkin causes apoptotic cell death of human dopaminergic SH-SY5Y cells associated with caspase activation and accompanied by accumulation of oxidative dopamine (DA) metabolites due to auto-oxidation of DOPA and DA. Forced expression of  $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -SN), another familial PD gene product, prevented accumulation of oxidative DOPA/DA metabolites and cell death caused by parkin loss. Our findings indicate that both parkin and  $\alpha$ -SN share a common pathway in DA metabolism whose abnormality leads to accumulation of oxidative DA metabolites and subsequent cell death.

In addition, we identified a phosphorylated form of I $\kappa$ B $\alpha$  (pI $\kappa$ B $\alpha$ ), an inhibitor of the NF- $\kappa$ B signaling pathway, and the components of the SCF<sup>B-TrCP</sup>, ubiquitin ligase of pI $\kappa$ B $\alpha$ , are novel protein components in LBs. Subsequently, we showed those proteins are included in the ubiquitin-LB-like inclusions generated by treatment of a proteasome inhibitor. Furthermore, the generation of the inclusions are independent on cell death due to impairment of the proteasome.

(*Clin Neurol*, 45 : 905—907, 2005)

**Key words** : parkin,  $\alpha$ -synuclein, dopa · dopamin quinone, phosphorylation, I $\kappa$ B