

## ハンチントン病モデルマウスにおける伸長ポリグルタミンによる ナトリウムチャンネル $\beta 4$ サブユニットの転写抑制

貫名信行<sup>1)</sup>，小山文隆<sup>1)</sup>，宮崎晴子<sup>1)2)</sup>，岡村和政<sup>1)</sup>，町田陽子<sup>1)</sup>，金子貢巳<sup>1)</sup>  
黒沢大<sup>1)</sup>，玉岡晃<sup>2)</sup>，櫻井隆<sup>1)</sup>

- 1) 独立行政法人理化学研究所脳科学総合研究センター構造神経病理研究チーム
- 2) 筑波大学大学院医学系研究科神経内科学

**研究要旨** 我々はナトリウムチャンネル $\beta 4$ サブユニット( $\beta 4$ )をハンチントン病(Huntington disease; HD)トランスジェニックマウスの線条体で発現が顕著に低下する分子として同定した。本年度はHDの原因である伸長polyQと $\beta 4$ の転写の関係を検討した。HDモデルマウスの線条体の神経細胞にはユビキチン化された伸長polyQ凝集体が認められ、 $\beta 4$ はほとんど発現していなかった。他方、脊髄の神経細胞には核内凝集体がほとんど認められず、 $\beta 4$ の発現は低下しなかった。PC12細胞の核内で伸長polyQを発現すると凝集体が形成され、 $\beta 4$ プロモーターの転写活性は顕著に低下した。cAMP/PKA経路を活性化するforskolinは $\beta 4$ プロモーターの転写活性に影響しなかったことから、 $\beta 4$ はcAMPの経路に依存していない遺伝子であることがわかった。これらの結果は、HDの原因である伸長polyQが $\beta 4$ の発現を直接抑制し、ナトリウムチャンネルの機能障害と神経突起の変性をおこす可能性を強く示唆する。

### はじめに

ハンチントン病(Huntington disease; HD)はハンチンチンのN末端領域に存在するポリグルタミン(polyQ)の伸長が原因である<sup>1)</sup>。HDモデルマウスの神経細胞には伸長polyQの核内凝集体(neuronal intranuclear inclusions)が形成される<sup>2)</sup>。核内凝集体には伸長polyQと結合した転写因子が認められるので、伸長polyQが直接転写を攪乱している可能性が考えられる<sup>3)</sup>。我々はナトリウムチャンネル $\beta 4$ サブユニット( $\beta 4$ )をHDトランスジェニックマウスの線条体で発現が顕著に低下する分子として同定した<sup>4)5)</sup>。本年度は伸長polyQによる $\beta 4$ の転写抑制を検討した。

### 方法

#### HDモデルマウスの解析

大脳と脊髄より凍結切片を調製し、まず $\beta 4$ プロンプでin situハイブリダイゼーション、続いてNeuNあるいはユビキチン抗体で免疫染色した。

#### 培養細胞での解析

マウス $\beta 4$ プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子の上流に連結したレポーターコンストラクトを作製した。PC12細胞に伸長polyQ-EGFP-NLSと

$\beta 4$ レポーターコンストラクトを共発現し、 $\beta 4$ プロモーターの転写活性への伸長polyQの影響を調べた。

### 結果と考察

#### HDモデルマウスでは伸長polyQ凝集体形成が $\beta 4$ の転写抑制と相関している

HDモデルマウスの線条体の神経細胞にはユビキチン化された伸長polyQ凝集体が認められ、 $\beta 4$ はほとんど発現していなかった。他方、脊髄の神経細胞には核内凝集体がほとんど認められず、 $\beta 4$ の発現は低下しなかった。このことは核内凝集体の形成と $\beta 4$ 遺伝子の発現低下の間に関連性があること示す。

#### PC12細胞では伸長polyQが $\beta 4$ の発現を抑制する

上述のHDモデルマウスの解析の結果は線条体において伸長polyQが直接あるいは間接的に $\beta 4$ 遺伝子の転写を抑制している可能性を強く示唆する。そこで培養細胞を用いて伸長polyQによる $\beta 4$ の転写抑制のメカニズムを検討した。PC12細胞の核内で伸長polyQを発現すると凝集体が形成され、 $\beta 4$ プロモーターの転写活性は顕著に低下した。

cAMP/PKA 経路を活性化する forskolin は  $\beta 4$  プロモーターの転写活性に影響しなかった。このことは、 $\beta 4$  は cAMP の経路に依存していない遺伝子であることを示す。

#### 結論

HD の原因である伸長 polyQ が  $\beta 4$  の発現を直接抑制し、ナトリウムチャネルの機能障害と神経突起の変性をおこす可能性を強く示唆する。

#### 文献

- 1) The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971-983 (1993).
- 2) Davies S.W. et al. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90, 537-548 (1997).
- 3) Landles, C. and Bates, G.P. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series. *EMBO Rep.* 5, 958-963 (2004).
- 4) Kotliarova, S. et al. Decreased expression of hypothalamic neuropeptides in Huntington disease transgenic mice with expanded polyglutamine-EGFP fluorescent aggregates. *J. Neurochem.* 93, 641-653 (2005).
- 5) Wong, H.K. et al. beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* 280, 23009-23017 (2005).

## 鳥取県大山町，米子市におけるパーキンソン病の疫学

中島健二<sup>1)</sup>，楠見公義<sup>1)</sup>，涌谷陽介<sup>1)</sup>，太田久仁子<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>鳥取大学医学部脳神経内科

### 研究趣旨

鳥取県大山町および米子市におけるパーキンソン病の有病率を算出し，1992年，1980年に同地区で算出された有病率と比較検討を行った。大山町（人口 6,730 人）においては door-to-door 調査を行ない，米子市（人口 140,911 人）においては市内医療機関を対象に調査を行った。大山町での調査において 22 名（男 6 名，女 15 名）の患者を確認し，粗有病率は 326.9 人（男 188.4 人，女 451.4 人，人口 10 万対）であった。米子市での調査では 205 名（男 69 名，女 136 名）の患者を確認し，粗有病率は 145.5 人（男 102.9 人，女 184.2 人）であった。大山町は 1991 年，1979 年，米子市は 1992 年，1980 年の調査と比較すると粗有病率は増加していたが，訂正有病率は明らかな変化を認めなかった。パーキンソン病は人口高齢化に伴いますます患者数が増大していると考えられた。

### はじめに

パーキンソン病は，その多くが中年期以降に発症し，近年の人口高齢化とともに今後より一層の患者数の増大が予想されている。われわれは鳥取県大山町および米子市におけるパーキンソン病の有病率を算出し，1992 年，1980 年に同地区で算出された有病率と比較検討を行った。

### 方法

大山町（人口 6,730 人）においては door-to-door 調査を行ない，患者数を算出した。すなわち一時調査として定期的に行われている全町民に対する健康調査，町保健師による脳卒中調査，寝たきり老人調査，特殊疾患調査，介護保険調査，身体障害者調査などを行い，二次調査として神経内科医が在宅またはデイサービス施設などに直接訪問，診察を行い，診断を確定した。

2003 年 4 月 1 日時点での患者数，有病率を算出した。

1991 年，1979 年の同町での調査と粗有病率および 1980 年米子人口を標準人口とした訂正有病率を比較検討した。

米子市（人口 140,911 人）においては大学病院を含め神経内科のある市内総合病院は訪問して診断を確認した。さらに，市内開業医を含めた全医療機関にアンケートを送付後，PD が疑われた症例に関しては，主治医に電話インタビューあるいは直接訪問により診断を確認した。2004 年 4 月 1 日時点での患者数，粗有病率，平均罹患率を算出した。1992 年と 1980 年の同市での調査と粗有病率，罹患率および 2004 年全国人口を標準人口とした訂正有病率を比較検討した。

本調査は鳥取大学倫理委員会での承認後行

われた。

### 結果

大山町での調査において22名(男6名,女15名)の患者を確認し,粗有病率は326.9人(男188.4人,女451.4人,人口10万対)であった。1991年(患者数15名,粗有病率195.2人),1979年(患者数8名,粗有病率101.3人)の調査と比較すると粗有病率は増加していたが,1980年の米子市の人口を標準人口とした訂正有病率では2004年;97人,1991年;109.9人,1979年;64.7人,であった(図1)。

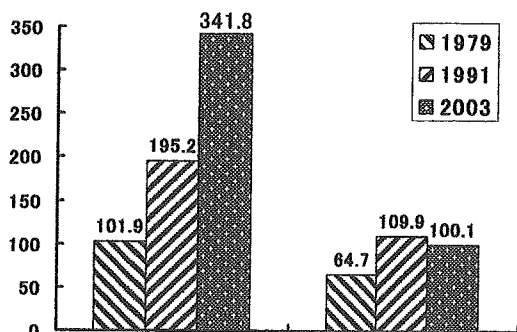


図1 大山町におけるパーキンソン病有病率と訂正有病率

1979年,1991年の同地区での調査と比較し,粗有病率は増加していたが訂正有病率は著変を認めなかった。(数字は人口10万対,1980年の米子市人口を標準人口として算出)

米子市での調査では205名(男69名,女136名)の患者を確認し,粗有病率は145.5人(男102.9人,女184.2人),平均年齢は75.8歳(男75.0歳,女76.2歳)であった(表1)。

表1.米子市におけるパーキンソン病患者数

患者数(男:女)	平均年齢(男:女)	粗有病率 (人口10万対)
205(69:136)	75.8(75.0:76.2)	145.5(102.9:184.1)

1992年(患者数156名,粗有病率117.9人),  
1980年(患者数101名,粗有病率80.6人)の

調査と比較すると年齢別の有病率の比較では80歳代以上の高齢者の有病率の増加が目立ったが,60歳代の有病率は逆に減少傾向を示した(図2)。訂正有病率の比較では,粗有病率は増加していたが,2004年全国人口を標準人口とした訂正有病率では2004年;135.6人,1992年;148.2人,1980年;147.5人であった(図3)。

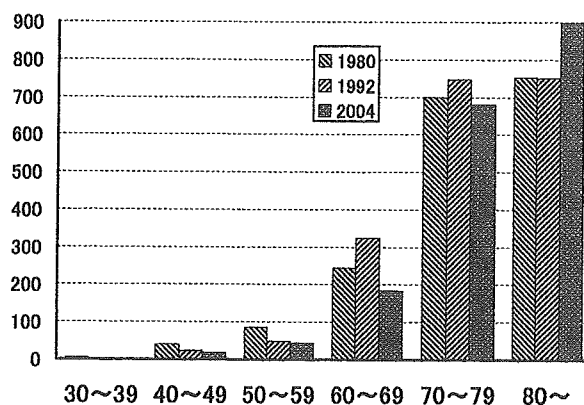


図2 米子市におけるパーキンソン病年齢別有病率比較

1980年,1992年の同地区での調査と年齢別の有病率を比較した。80歳代以降の高齢者での有病率の増加が顕著に認められた。(数字は人口10万対)

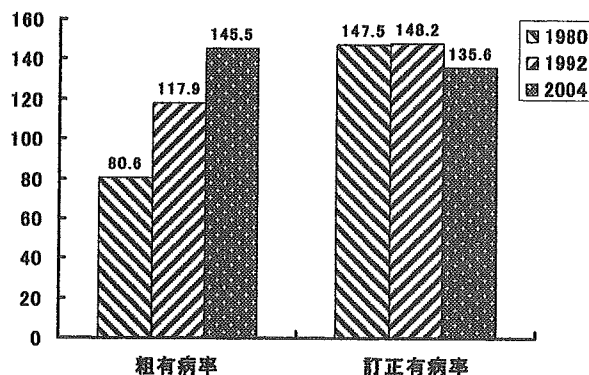


図3 米子市におけるパーキンソン病有病率と訂正有病率

1980年,1992年の同地区での調査と比較し,粗有病率は増加していたが訂正有病率は著変を認めなかった。(数字は人口10万対,2004年の全国人口を標準人口として算出)

2000年から2004年までの平均罹患率は11.3人(人口10万対/年)であった。平均発症年齢は69.2歳であった。1980年,1992年の調査と比較し,罹患率は明らかな変化は認められなかった。発症年齢は1980年の調査と比べ,

1992 年および今回の調査においてより高値を示した(図 4)。

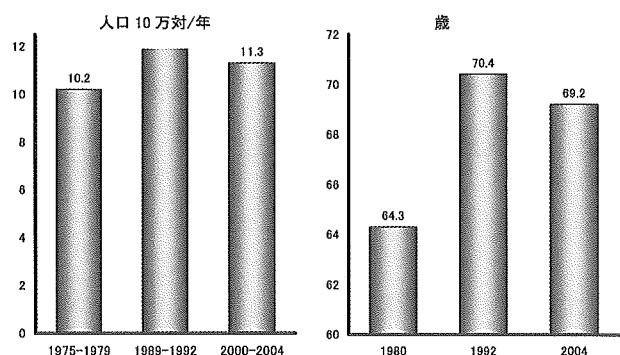


図 4 米子市におけるパーキンソン病罹患率と発症年齢の比較

1980 年, 1992 年の同地区での調査と比較し, 利管理は明らかな変化は認めなかった. 発症年齢は 1980 年の調査と比べ, 1992 年および今回の調査においてより高値を示した

#### 考察

今回の研究結果より, 大山町および米子市のパーキンソン病の患者数および有病率は 1979-1980 年, 1991-1992 年の調査と比較し, 粗有病率は各々調査年を追う事に増加を示していた. これまで欧米の報告と比べてやや有病率が低いと言われてきていたが, 今回の調査によりその差はほとんど認められなくなってきたと考えられる. また訂正有病率は著変を認めなかったことから, 有病率増加の主な原因としては人口形態の変動, すなわち人口の高齢化によるものが主として考えられた.

米子市の調査においては, 年齢別有病率の比較にて 80 歳代以降の有病率の増加が目立ち, 60 歳代以下の有病率の低下が認められた. 若年発症者の頻度が減少傾向にあることは, 遺伝的発症要因よりも加齢による要因が強くなってきている可能性が示唆される.

性差について, 欧米では男性の有病率が高い報告が多いがわが国においては他地域においても, 本研究のように同一地区での経時的調査においても女性の有病率が高い. この要因に関してはわが国と欧米でのライフスタイルの相違などが考えられるが, 今後他国との詳細な比較検討が必要であると考えられた.

なお, 米子市の調査に関しては, 今回は単回

の調査であり, 来年度以降, 同一方法での調査を行い, 2004 年の最終患者数の算出を予定している.

#### まとめ

パーキンソン病は人口高齢化に伴い, ますます患者数が増大していると考えられた

#### 謝辞

本研究にご協力いただきました各医療機関の先生方および鳥取県大山町保健師松南明美様, 藤田より子様, 石指智子様へ深謝いたします.

#### 文献

- Harada H et al. Arch Neurol. 40, 151-4, 1983.  
Kuaumi M et al. Neuroepidemiology. 15, 201-7, 1994.

## PARK8 原因遺伝子である LRRK2 の機能解析

長谷川 一子<sup>1)</sup>、一瀬 宏<sup>2)</sup>、鈴木 崇弘<sup>2)</sup>、柳館 大樹<sup>2)</sup>、有賀 雅裕<sup>2)</sup>、豊島 至<sup>3)</sup>、小幡 文弥<sup>4)</sup>

- 1) 国立病院機構・相模原病院、2) 東京工業大学・大学院生命理工学研究科、  
3) 秋田大学・医学部・内科学、4) 北里大学・医療衛生学部・免疫学

優性遺伝形質を示す遺伝性パーキンソン病 PARK8 の原因遺伝子として *leucine-rich repeat kinase 2* (*LRRK2*) が同定された。LRRK2 は C 末側に Ras ドメインと MAPKKK ドメインを有しており、何らかのシグナル伝達経路を担うと考えられるが、LRRK2 の機能は全く不明である。本研究では、LRRK2 の細胞内機能を解析することで、パーキンソン病の原因となるドーパミンニューロン特異的な細胞死との関連を探る。今回我々は、LRRK2 キナーゼドメイン(KD)の野生型および PARK8 において同定された I2020T 変異体を中心として培養細胞における解析を行い、LRRK2 KD I2020T 変異体がオートファジー様小胞や LRRK2 自身を含む凝集体の形成を促進することが示唆された。また、LRRK2 KD の相互作用分子として Hsp90 を同定した。今後は、さらに LRRK2 キナーゼドメインの解析を中心として、LRRK2 の制御する細胞内シグナルおよび LRRK2 タンパク質の分解・凝集性と、細胞死機構との関連を明らかにしていく。

### 【はじめに】

長谷川らは、優性遺伝形質を示す家族性パーキンソン病家系における連鎖解析を行い、原因遺伝子座を常染色体 12p11.2-q13.1 に絞り、これを新規遺伝性パーキンソン病 PARK8 として 2002 年に報告した (Funayama M. et al. *Ann Neurol* 51, 296-301, 2002)。PARK8 は、孤発性パーキンソン病とほぼ同様の症状を示した。

2004 年、2つの研究グループから、PARK8 原因遺伝子として、*leucine-rich repeat kinase 2* (*LRRK2*) が同定された (Paisan-Ruiz C. et al. *Neuron* 44, 595-600, 2004; Zimprich A. et al. *Neuron*, 44, 601-607, 2004)。LRRK2 は 280kDa の分子量の大きなタンパク質であり、アミノ酸配列上、C 末側に機能的と予測されるドメインが集中している (図 1)。LRRK2 は Ras small G タンパク質ドメインと MAPKKK ドメインを有するという特徴的な構造をしており、LRRK2 は何らかのシグナル伝達経路を担

っていると考えられる。長谷川らにより報告された相模原家系の変異は、MAPKKK ドメインにおける I2020T 変異であった (Funayama M. et al. *Ann Neurol* 57, 918-921, 2005)。しかしながら、LRRK2 の機能に関してはこれまで全く不明であった。LRRK2 の細胞内機能を明らかにすることは、パーキンソン病の原因となるドーパミンニューロン特異的な細胞死の解明に繋がると期待できる。特に、PARK8 にて同定された変異は、LRRK2 の Ras ドメインや MAPKKK ドメインなど C 末側の機能ドメインに集中していることから、PARK8 変異により LRRK2 の関わるシグナル伝達経路が異常をきたし、ドーパミン神経細胞死を引き起こすことが考えられる。その一方で、これまでに神経変性疾患に関わるタンパク質は、タンパク質凝集体やタンパク質分解系に関わることが知られており、LRRK2 タンパク質自体の性質も、凝集体形成等に関与する可能性も考えられる。

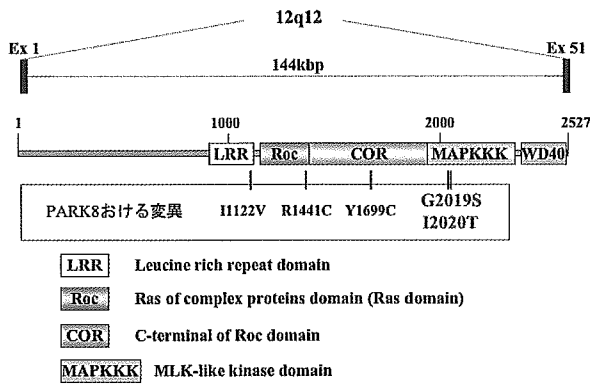


図1. LRRK2タンパク質の構造と家族性パーキンソン病(PARK8)に見つかる変異

本研究では、LRRK2の細胞内機能およびPARK8変異型LRRK2による細胞死の機構を解析することで、ドーパミンニューロン細胞死に至る機序を明らかにする。また、このLRRK2変異による細胞死と孤発性パーキンソン病におけるドーパミン神経細胞死との関連性を探り、パーキンソン病の原因の解明と治療法の開発の手がかりとする。

## [方法]

### 1) LRRK2 cDNAの単離

ヒト脳mRNA試料より、逆転写反応を行いcDNAライブラリを得る。これをテンプレートとしてPCRによる増幅を行い、ヒトLRRK2 cDNAを単離する。

### 2) LRRK2発現ベクターの構築

LRRK2の機能ドメインと考えられるLRRドメインよりC末側の領域(CTR)とMAPKKKキナーゼドメイン(KD)をFLAGおよびEGFPタグ付き哺乳類細胞用発現ベクターに組み込み、COS-1、PC12、SH-SY5Y細胞などでリポフェクション法により遺伝子導入を行い、発現させる。発現の確認は抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロット法により行う。

また、LRRK2のN末200アミノ酸残基およびKDをGST融合タンパク質として大腸菌用発現ベクターに組み込み、抗LRRK2抗体用の抗原とする。また、KDはキナーゼ活性の探索に用いる。

KDを含むそれぞれの発現ベクターにおいては、PARK8において同定されたG2019SおよびI2020Tの変異を導入し、野生型との比較を行う。

### 3) LRRK2発現細胞における細胞の形態観察とLRRK2の細胞内局在の観察

LRRK2のKDおよびCTRを一過性に発現させたCOS-1、CHO-K1、PC12細胞などにおいて細胞の形態の観察を、倒立型位相差顕微鏡を用いて行う。また、

EGFP発現ベクターとFLAG-LRRK2発現ベクターを共導入することで、蛍光観察を行い、遺伝子導入された細胞の形態を観察する。また、EGFP融合型LRRK2を導入した細胞の蛍光観察を行い、細胞の形態およびLRRK2の細胞内局在を調べる。さらに、LRRK2の細胞内局在に関しては、FLAG融合型LRRK2発現細胞における抗FLAG抗体による蛍光抗体染色も行う。画像は顕微鏡に備えたCCDカメラにより取得する。

### 4) LRRK2相互作用分子の探索

FLAG-LRRK2を発現させたCOS-1細胞より抗FLAG抗体を用いて調製した免疫沈降画分をSDS-PAGEにより分離し、ゲルを銀染色する。LRRK2発現細胞に特異的に検出されるバンドをLC/MS/MS解析することで、タンパク質を同定する。

## [結果]

### ・ LRRK2 cDNA単離と培養細胞系におけるLRRK2の発現

ヒト脳mRNAより逆転写反応を行って得たcDNAライブラリをテンプレートとして、PCR反応を行ってLRRK2 CTRのcDNAを単離した。単離したcDNAはGenBankに登録されている配列と比較して2ヶ所異なっていたが、いずれもアミノ酸が変化しないものであったことから、ポリモルフィズムと考えられた。

LRRK2 CTR、LRRK2 KDの野生型、G2019SおよびI2020T変異体をFLAG N末タグ用発現ベクター組換え、COS-1細胞にベクターをトランスフェクションし、細胞溶解液に対して抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロット法で解析したところ、LRRK2 CTR (170kDa)とKD (34kDa)に相当するバンドを検出した。特に、LRRK2 KDにおいては、野生型にくらべてI2020T変異体はバンドが薄く、発現量が少ないと考えられた。

### ・ 野生型およびPARK8変異LRRK2発現によるCOS-1細胞の形態変化

LRRK2 CTR (野生型)およびKD (野生型およびI2020T変異体)発現ベクターを一過性に発現させたCOS-1細胞において細胞の形態観察を行った。ベクター導入後18時間において、I2020T変異体を発現させた細胞では、CTR・KD野生型・空ベクターを導入した細胞と比較してオートファジー様の小胞の数が顕著に増大していた。ベクター導入後24時間では、LRRK2を発現させたすべての細胞で小胞が目立つようになり、48時間では、空ベクター導入細胞を含めたすべての細胞で過半数の細胞が死滅しており、トランスフェクション試薬による毒性の負荷がかかっている実験条件であることが示唆された。

PC12細胞では、LRRK2発現ベクターの導入によってCOS-1細胞のような顕著な形態変化は観察され

ず、また PC12 細胞は今回使用したトランスフェクション試薬による毒性が低い結果となったことから、LRRK2 一過性導入による形態変化には、細胞に対する負荷が必要であることが示唆された。

#### ・ LRRK2 の細胞内局在

COS-1 細胞において、FLAG-LRRK2 KD を発現させ、抗 FLAG 抗体と蛍光標識された抗マウス IgG 抗体による蛍光抗体染色を行ったところ、野生型・I2020T 変異体共に、オートファジー様小胞に隣接した場所で強いスポット状の像が観察された。オートファジー様小胞の周辺や小胞の一部は、リソソーム特異的な蛍光色素で標識された。これに対して、EGFP-LRRK2 KD を発現させた細胞の蛍光観察では、細胞質に広がる像となり、EGFP のみに対して、EGFP-LRRK2 KD 野生型および I2020T 変異体はオートファジー様小胞を保つ蛍光像が観察され、特に、I2020T 変異体において顕著であった。

一方、CHO-K1 細胞に EGFP-LRRK2 KD 発現ベクターを導入した際は、48 時間後に観察したところ、EGFP のみに対して、LRRK2 野生型および I2020T 変異体では、細胞質に発現が見られる一方で凝集体と考えられるスポット状の像を保つ細胞が多数観察された。また、オートファジー様小胞も COS-1 細胞よりも少ないながら観察された。特に、凝集体様スポットは I2020T 変異体で顕著であった。

#### ・ LRRK2 免疫沈降画分における相互作用分子の同定

LRRK2 CTR および KD 発現ベクターを一過性に発現させた COS-1 細胞において抗 FLAG 抗体アガロースを用いて免疫沈降画分を得た。この画分を SDS-PAGE で分離し、ゲルを銀染色したところ、LRRK2 CTR(野生型)と KD(野生型と I2020T 変異体)発現ベクターを導入した細胞では、LRRK2 由来と考えられるそれぞれ 170kDa と 34kDa のバンドを検出した。これらのバンドが LRRK2 由来のものであることを、LC/MS/MS 解析により確定した。LRRK2 KD においては、野生型に比較して、I2020T のバンドが薄く、免疫沈降の解析においても細胞溶解液のウェスタンブロットの解析と関連した結果となった。

空ベクターを導入した細胞と比較して、LRRK2 CTR および KD を発現させた細胞では、約 90kDa 付近に特異的な濃いバンドが検出された。また、50kDa 付近にも薄いバンドが検出された。90kDa 付近のバンドは、LC/MS/MS 解析により熱ショックタンパク質/シヤペロンタンパク質の 1 種である Hsp90 であることが確定した。

#### ・ 大腸菌発現系を利用した LRRK2 の精製

LRRK2 cDNA 全長を含むベクターを、ORIGENE 社より購入し、これをテンプレートとして N 末端 200

アミノ酸残基分(LRRK2 N200)の cDNA を PCR により増幅し、大腸菌用 GST 融合タンパク質発現ベクターに組換えた。グルタチオンセファロースを用いた精製を行い、GST-LRRK2 N200 タンパク質を SDS-PAGE/CBB 染色において単一バンドとなる精製標品を得た。これを抗原としてウサギに免疫し、抗血清を得た。この抗血清を用いたウェスタンブロットを行ったところ、抗原を 1 ng 程度まで検出できた。

また、抗体作成用の抗原およびキナーゼ活性の検出用として、上記と同様の方法で GST-LRRK2 KD 野生型および I2020T 変異体を SDS-PAGE/CBB 染色において単一バンドとなる精製標品を得た。

#### [考察]

本研究の結果から、LRRK2 KD I2020T 変異体は、細胞に負荷がかかる条件において、オートファジー様小胞の形成や LRRK2 KD 自身を含む凝集体の形成を促進することが示唆された。オートファジーやタンパク質凝集体を伴う神経細胞死は、パーキンソン病をはじめとしてアルツハイマー病やハンチントン病などのポリグルタミン病などの神経変性疾患に特徴的なものであり、LRRK2 のキナーゼドメインは、ドーパミン神経細胞死に深く関わると考えられる。

今回の結果から、LRRK2 KD I2020T 変異体は、活性の有無は別にして、異常タンパク質として凝集体形成やオートファジーによる分解を受け、これが細胞死に繋がる可能性が強く示唆されている。特に、Hsp90 は、タンパク質の品質管理と不良タンパク質のリソソームへの誘導の役割が報告されている。我々の LRRK2 KD と Hsp90 の相互作用の結果や、LRRK2 KD オートファジー様小胞やリソソームマーカーに隣接して観察されたことは、LRRK2 KD と Hsp90 の相互作用が、LRRK2 タンパク質の安定性維持に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。最近、LRRK2 全長を用いて、LRRK2 が凝集体形成および細胞死を促進することが報告された(Smith W. W. et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 18676-18681)。LRRK2 キナーゼドメインのみでも LRRK2 全長と同様の結果が得られたことは、LRRK2 変異によるドーパミン神経細胞死の機構に中心的な役割をキナーゼドメインが果たしている可能性が考えられた。

最近、LRRK2 全長において、G2019S および I2020T 変異体によるキナーゼ活性の亢進が報告された(West A. B., Proc Natl Acad Sci U S A, 102, 16842-16847, 2005; Gloeckner C. J., et al. Hum Mol Genet, in press, 2005)。LRRK2 のキナーゼ活性・シグナル伝達と LRRK2 タンパク質自体の凝集性の両方が、神経細胞死に関与する可能性がある。この点に関して、今後は、今回我々が用いたキナーゼドメインのみでキナーゼ活性が保持されるのか、さらに変異で活性が上昇するのか、またキナーゼの真の基質は何かを解析し、細胞死との関連性を探る。

LRRK2 相互作用分子に関しては、最近 KD に対して



Hsp90 および p50<sup>cdc37</sup> が報告されており (Gloeckner C. J., et al. *Hum Mol Genet*, in press, 2005)、我々の実験結果と一致している。このことから、我々が検出している 50kDa 付近の特異的相互作用分子は、p50<sup>cdc37</sup> であると考えられた。また、LRRK2 KD が最も相同性の高い Mixed lineage kinase (MLK) のタンパク質の量的な調節に、Hsp90 および p50<sup>cdc37</sup> との相互作用が必要であるとの報告もあり (Zhang H., et al. *J Biol Chem* 279, 19457-19463, 2004)、細胞内シグナルの維持および凝集体形成の両面において、LRRK2 に対する Hsp90 の役割が注目される。

LRRK2 CTR・KD の細胞内局在に関しては、強制発現系においては、細胞質全体に広がる像となったが、最近、全長 LRRK2 の解析において、強制発現系では細胞質に広がる一方で、内在性の LRRK2 は、核外膜画分にほとんどが存在することが示唆されている。強制発現系では生理的な局在性を示すための相互作用分子が量的に十分でない可能性が考えられることから、今後は、LRRK2 全長および CTR、KD を用いて細胞内での局在性に関与するような相互作用分子を探索し、LRRK2 の機能および細胞死誘導機構との関係を探る。

#### [まとめ]

今回我々は、LRRK2 キナーゼドメイン(KD)の野生型および PARK8 において同定された I2020T 変異体を中心として培養細胞における解析を行い、LRRK2 KD I2020T 変異体がオートファジー様小胞や LRRK2 自身を含む凝集体の形成を促進することが示唆された。また、LRRK2 KD の相互作用分子として Hsp90 を同定した。今後は、キナーゼドメインのみでの活性の有無、LRRK2 キナーゼの真の基質の同定、LRRK2 と Hsp90 の相互作用におけるオートファジー様小胞・凝集体形成の関わりを明らかにしていく。

#### [文献]

Funayama M. et al. *Ann Neurol*. 57, 918-921, 2005

## マイクロサテライト多型による 孤発性パーキンソン病のゲノムワイド関連解析

[分担研究者]

戸田達史<sup>1)</sup>

[研究協力者]

佐竹渉<sup>1),2)</sup>、廣田勇士<sup>1)</sup>、百瀬義雄<sup>3)</sup>、水田依久子<sup>1)</sup>、田宮元<sup>4)</sup>、  
猪子英俊<sup>4)</sup>、佐古田三郎<sup>2)</sup>、山本光利<sup>5)</sup>、服部信孝<sup>6)</sup>、村田美穂<sup>7)</sup>

<sup>1)</sup>大阪大学臨床遺伝学、<sup>2)</sup>大阪大学神経内科、<sup>3)</sup>東京大学 CBI、<sup>4)</sup>東海大学分子生命科学 2、  
<sup>5)</sup>香川県立中央病院神経内科、<sup>6)</sup>順天堂大学脳神経内科、<sup>7)</sup>国立精神神経センター

### 研究趣旨

孤発性パーキンソン病 (PD) は、遺伝要因と環境要因により発症する多因子遺伝性疾患である。我々は、孤発性 PD 感受性遺伝子の同定を目指し、関連解析を行った。遺伝マーカーとして、全ゲノム上に平均 100kb 間隔で分布する約 27,000 個のマイクロサテライト多型を利用することにより、関連解析のゲノムワイド化を実現した。また pooled DNA 法を採用し、タイピング操作を大幅に簡略化した。既に、約 27,000 個全てのマイクロサテライト多型に関して、患者対照各 624 人を用いた、3 段階の pooled DNA スクリーニングが終了し、 $p < 0.05$  の関連を示すマーカーを約 348 マーカーにまで絞り込んだ。1-3 次スクリーニングでの波形の再現性を考慮したうえで、71 マーカーを優先し、個別検体タイピングによる関連の検証を行ったところ、16 マーカーで  $p < 0.05$  の関連を認めた。また、この中には、 $p = 0.00067$  の関連を示すマーカーも含まれており、PD 感受性領域の候補と考えられた。

### はじめに

パーキンソン病 (PD) は、神経変性疾患の中ではアルツハイマー病について頻度が高く、本邦における有病率は、人口 10 万人あたり 100 人以上である。好発年齢は 60 歳前後であることから、人口の高齢化に伴い、患者数の増加が予測される。

少数の Mendel 遺伝性を示す家族性パーキンソニズムにおいては、 $\alpha$ -synuclein<sup>1)</sup> や parkin<sup>2)</sup>、UCH-L1<sup>3)</sup>、DJ-1<sup>4)</sup>、NR4A2<sup>5)</sup>、PINK1<sup>6)</sup>、

dardarin<sup>7)</sup>/LRRK2<sup>8)</sup> が同定された。家族性パーキンソニズムと孤発性 PD には、一部共通の発症メカニズムが存在すると考えられ、精力的に研究されている。

一方で、症例の大多数 (90%以上) をしめる孤発性 PD については、(a) 約 10% の PD 患者の近親者に PD 患者が存在する<sup>9)</sup>、(b) subclinical な症例も含んだ PET study の結果では、一卵性双生児の疾患一致率が約 60%あり二卵性の約 3 倍である<sup>10)</sup>、(c) アイスランド国民を対象とした大

規模な疫学調査で同胞罹患危険率が6.7である<sup>1)</sup>ことより、孤発性PDは遺伝要因と環境要因により発症する多因子遺伝性疾患と考えられている。そこで、我々は、2002年より、(a)マイクロサテライト多型によるゲノムワイド関連解析、(b)SNPによる多数の候補遺伝子の関連解析、(c)罹患同胞対法の3つのアプローチで、孤発性PDの感受性遺伝子の同定を目指して研究を進めている。さらに、遺伝子多型と、臨床像、抗パーキンソン病薬への反応性・副作用の関連を明らかにし、PDにおけるオーダーメイド治療法を確立することを目標としている(図1)。

本報告では、マイクロサテライト多型によるゲノムワイド関連解析について述べる。

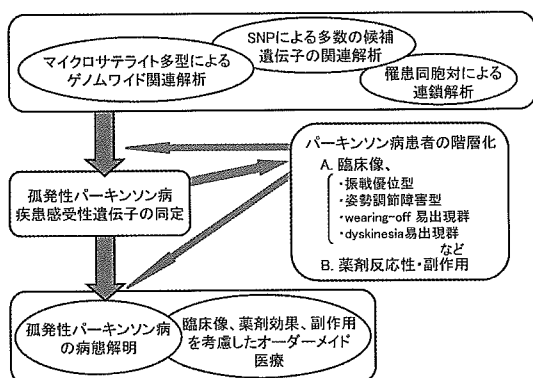


図1 アプローチの概念

### 方法・結果・考察

PD患者946人から採血した。尚、採血に際しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき、十分なインフォームドコンセントを行った。また、本研究は、大阪大学大学院医学系研究科、東京大学大学院医学系研究科、順天堂大学医学部、香川県立中央病院、東海大学医学部の各倫理委員会により承認を得て行った。

1次スクリーニング(Sc)用として患者対照各124人、2次Sc用として患者対照各250人、3次

Sc用として患者対照各250人、のゲノムDNAを厳密に定量した後、均等量混合してpooled DNAを作成した(図2)。

1次Sc用pooled DNAを鋳型とし、平均100kb間隔で分布する約27,000個の多型マイクロサテライトマーカー(図3)プライマーをもちいてPCR反応を行った。PCR産物をGeneScan™、pickpeak(東海大分子生命科学2が独自に開発)により解析し、患者対照間で統計学的検討(2×2、2×m Fisher's exact test)を行ったところ、6803マーカーで、 $p < 0.2$ の関連を認めた。

2次Scとして、この6803マーカーを、2次Sc用pooled DNAを用いて、同様に関連解析を行ったところ、 $p < 0.05$ の関連を示すマーカーを2041マーカー認めた。

さらに、3次Scとして、2041マーカーに関して、3次Sc用pooled DNAを用いて、関連解析を行い、 $p < 0.05$ の関連を示すマーカーを348マーカーにまで絞り込んだ(表1)。

#### 1. 個別検体DNAタイピング

検体1 → Microsatellite typing (PCR→GeneScan)  
 検体2 → Microsatellite typing (PCR→GeneScan)  
 検体3 → Microsatellite typing (PCR→GeneScan)  
 ……  
 検体X → Microsatellite typing (PCR→GeneScan)

→ 統計解析

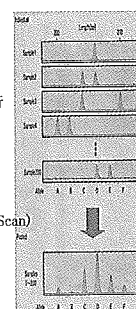
#### 2. Pooled DNA タイピング

検体1  
 検体2  
 検体3  
 ……  
 検体X

→ pooled DNA作成 → Microsatellite typing (PCR→GeneScan)

→ 統計解析

→ 大幅に、実験操作・費用を軽減



#### 図2 Pooled DNA法

検体のゲノムDNAを混合して、pooled DNAを作成する。pooled DNAをひとつの検体とみなしてタイピングを行うため、従来から一般的である個別検体タイピングに比し、時間・費用とも大幅に軽減することが可能である。

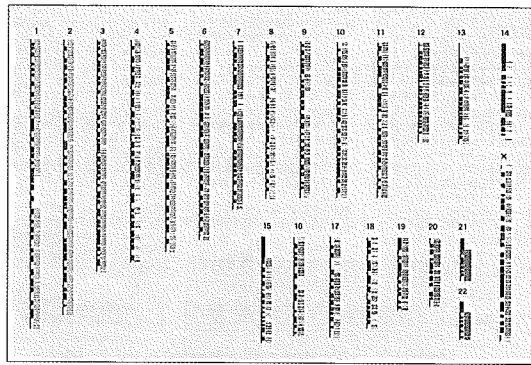


図3 約 27,000 個の多型マイクロサテライトマーカー

ゲノム上に高密度(平均約 100kb 間隔)に分布しているため、ゲノムワイドな関連解析が可能である。

(a) 1次Sc  $\xrightarrow{\substack{p < 0.2 \\ (2 \times 2 \text{ or } 2 \times m)}} 2次Sc \xrightarrow{\substack{p < 0.05 \\ (2 \times 2 \text{ or } 2 \times m)}} 3次Sc$   
 6803マーカー  $\xrightarrow{\hspace{10em}} 2041マーカー$

Chr	マーカー数	タイピング成功		3次スクリーニング	
		マーカー数	率(%)	$p < 0.05(2 \times 2)$	$p < 0.05(2 \times m)$
1	2241	2226	99.3	70	32
2	2373	2350	99.0	57	26
3	1991	1959	98.4	52	23
4	1740	1728	99.3	46	24
5	1733	1729	99.8	44	26
6	1619	1603	99.0	45	22
7	1999	1970	98.2	38	16
8	1273	1254	98.5	43	19
9	1101	1083	98.4	33	13
10	1281	1246	97.3	32	14
11	1303	1303	100.0	20	14
12	1260	1256	99.6	30	16
13	833	891	99.8	23	12
14	762	755	99.1	25	10
15	689	682	99.0	12	4
16	732	726	99.2	14	9
17	725	707	97.5	20	11
18	750	744	99.2	20	9
19	503	502	99.8	23	18
20	585	563	96.6	15	9
21	324	323	99.7	9	1
22	293	291	99.3	10	6
X	1187	1183	99.7	26	10
Y	118	118	99.2	9	4
	27158	26894	99.0	718	348

表1 1-3次 pooled DNA スクリーニング結果

これらマーカーは、pooled DNA 法による偽陽性を含むため、通常の個別検体タイピングによる関連の検証が必要である。1-3次 Sc の peak パターンの再現性など考慮して、71 マーカーを優先的に選択し、患者対照各 624 人の個別検体タイピングを行い、関連解析を行った。16 マーカーで、 $p < 0.05$  の関連を認め (表 2)、このなかには、 $p = 0.00067$  (アリル頻度差 6.9%) のマーカーも含まれており、PD 感受性領域の候補と考えられた。

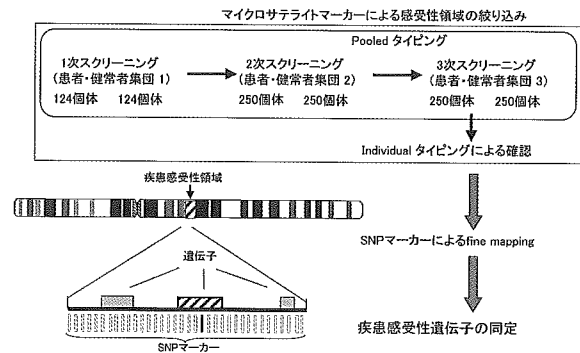
これら領域に関して、dense SNP mapping により、感受性多型を同定したい (図 5)。

染色体	関連マーカー数
1	0
2	2
3	1
4	2
5	1
6	1
7	1
8	1
9	0
10	1
11	1
12	0
13	1
14	1
15	0
16	0
17	0
18	0
19	1
20	1
21	0
22	0
X	1
Y	0
計	16

表2 個別検体タイピングによる関連の検証

71 マーカー に関して、患者対照各 624 人を用いて個別検体タイピングによる関連解析を行った。16 マーカーで  $p < 0.05$  の関連を認めた。

図5 疾患感受性遺伝子同定までの方針概略



まとめ

27,000 個のマイクロサテライトマーカーと pooled DNA 法を用いたゲノムワイド関連解析を行い、候補領域を 348 個所に絞り込んだ。

個別検体マイクロサテライトタイピングによる関連解析により、関連を検証中であり、71 マーカーが終了し、16 マーカーで  $p < 0.05$  の関連を認めた。このなかには、 $p = 0.00067$  (アリル頻度差 6.9%) のマーカー も含まれており、PD 感受性領域の候補と考えられた。

### 文献

- 1) Polymeropoulos MH et al: Science 276, 2045-2047, 1997.
- 2) Kitada T et al: Nature 392, 605-608, 1998.
- 3) Leroy E et al: Nature 396, 451-452, 1998.
- 4) Bonifati V et al: Science 299, 256-259, 2003.
- 5) Le W et al: Nat Genet 33, 85-89, 2003.
- 6) Valente EM et al: Science 304, 1158-1160, 2004.
- 7) Paisan-Ruiz C et al: Neuron 44, 595-600, 2004.
- 8) Zemprih A et al: Neuron 44, 601-607, 2004.
- 9) Elbaz A et al: Neurology 52, 1876-1882, 1999.
- 10) Piccini P et al: Ann Neurol 45, 577-582, 1999.
- 11) Sveinbjornsdottir S et al: N Engl J Med 343, 1765-1770, 2000.

## $\alpha$ -synuclein は孤発性パーキンソン病の感受性遺伝子である

戸田達史<sup>1)</sup>、水田依久子<sup>1)</sup>、佐竹渉<sup>1)</sup>、齊藤祐子<sup>2)</sup>、村山繁雄<sup>2)</sup>、岡晃<sup>3)</sup>、  
猪子英俊<sup>3)</sup>、山本光利<sup>4)</sup>、服部信孝<sup>5)</sup>、村田美穂<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup>大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学、<sup>2)</sup>東京都老人総合研究所脳ゲノム、<sup>3)</sup>東海大学分子生命科学2、  
<sup>4)</sup>香川県立中央病院神経内科、<sup>5)</sup>順天堂大学脳神経内科、<sup>6)</sup>国立精神・神経センター武蔵病院神経内科

### 研究趣旨

我々は多因子遺伝疾患である孤発性パーキンソン病 (PD) 感受性遺伝子を明らかにするために、候補遺伝子アプローチを進めてきた。一次スクリーニングとして患者・対照各 190 人を対象に、121 個の候補遺伝子上の計 268 個の SNPs を関連解析して  $p < 0.05$  の SNP を 22 個得た。二次スクリーニングとして、これらの 22 個の SNPs を患者 882 人対照 938 人増やして関連解析した結果、 $\alpha$ -synuclein (SNCA) 遺伝子の intron 4 上に存在する SNP0070 に  $p = 5.0 \times 10^{-10}$  という極めて強い関連を見出した。

SNCA は 4 番染色体上にあり、6 個の exon を持つ全長 117kb の遺伝子である。この SNP0070 の周辺で SNCA 遺伝子を含む約 420kb の領域を 29 個の SNPs を用いて連鎖不平衡解析を行うと、SNCA 遺伝子全域がひとつの LD block ( $D' > 0.9$ ) にのっていた。また、SNP0070 を含めて高い  $r^2$  値 ( $> 0.85$ ) をとる SNPs が intron 4, 3'UTR, 3'-flanking region に計 6 個あり、全て PD と強い関連 ( $p = 2.0 \times 10^{-9} - 1.7 \times 10^{-11}$ ) を示した。Haplotype 関連解析では単独の SNP を下回る p 値は見出せなかった。

SNCA 蛋白は PD の病理学的特徴である Lewy 小体の主要成分である。最近、正常な SNCA の triplication (PARK4), duplication も家族性 PD の原因となることが明らかになり、SNCA の発現量が孤発性 PD 発症にも影響すると考えられている。そこで、Real-time RT-PCR 法により SNCA 遺伝子発現レベルの SNP0070 (C/T, C が PD 関連アレル) の遺伝子型ごとの違いを解析した。剖検脳前頭葉での SNCA 発現レベルは CC > CT > TT の傾向がみられた。以上の結果から、SNCA は孤発性 PD の確実な感受性遺伝子であると結論づけられる。

### はじめに

孤発性パーキンソン病 (PD) は複数の遺伝子と環境要因によって発症する多因子遺伝疾患である。我々は多数の検体、多数の候補遺伝子、多数の遺伝子マーカーを用いて関連解析を行うことにより、PD 感受性遺伝子の同定を目指してきた。今回、確実な感受性遺伝子として、 $\alpha$ -synuclein (SNCA) を同定することができたので、

報告する。

### 対象および方法

全体の流れを図示した (図1)。候補遺伝子は PD の発症に関する諸説 (酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害、神経毒、蛋白分解機構の破綻、神経栄養因子など)、病理、家族性 PD、疫学などに関する文献から幅広く選択した。遺伝子上の SNP (一塩基多型) の選択は JSNP, dbSNP,

Celera などのデータベースから行った。SNP タイピングは multiplex PCR 法、インバーダー法を用いて、効率良く行った。一次スクリーニングとして、患者対照各 190 人を用いて関連解析を行い、 $P < 0.05$  の SNP について人数を患者 882 人対照 938 人に増やして二次スクリーニングを行った。統計解析は遺伝子型頻度、アレル頻度、優性遺伝モデル、劣性遺伝モデルの4種類の分割表を作成し、それぞれについてカイニ乗検定を行った。二次スクリーニングで残った  $\alpha$ -synuclein(SNCA)遺伝子の SNP については周辺 SNPs のさらなる typing により、連鎖不平衡解析を行った。また、遺伝子型による SNCA 発現レベルの違いを調べるために、Lewy body 群 21 例およびコントロール群 18 例の剖検脳(前頭葉)を用いて定量した。SNCA および Neurofilament L (NF)の発現量を SYBR Green real time RT-PCR を行い ABI 7900 で解析し、標準化した SNCA 発現レベルとして SNCA/NFを比較した。

DNA 収集のための研究協力者からの採血の際には「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年 3 月 29 日 文科省・厚労省・経産省告示第1号、平成 16 年 12 月 28 日改正)」を遵守し、文書によるインフォームドコンセントを得た。剖検脳は高齢者ブレインバンク(東京都老人医療センター/東京都老人総合研究所)および順天堂大学脳神経内科との共同研究による。

### 結果

一次スクリーニングで残った 22 個の SNPs を二次スクリーニングしたところ、SNCA 上の SNP0070 (C/T, C アレル頻度は患者:対照=0.67:0.57) で  $p=5.0 \times 10^{-10}$  という極めて強い関連を見出した。この SNP 周辺 430kb の領域内計 29 個の SNPs

をタイピングして連鎖不平衡解析を行い以下のことが分かった。1) SNCA 全体がひとつの連鎖不平衡(LD)ブロック上にある( $D' > 0.9$ )、すなわち祖先ゲノムからひとかたまりで受け継がれる領域内にある(図2)。2) SNCA のブロック上にある 19 個の SNPs のうち、SNP0070を含む計6個の SNPs が高い相関関係にあり( $r^2 > 0.85$ )、いずれもアレル頻度差が 10%あり、極めて強く PD に関連していた( $p=2.0 \times 10^{-9}$ - $1.7 \times 10^{-11}$ )(図2)。3)ハプロタイプ関連解析ではこれら6個の SNPs 単独の p 値を下回るものは無かった。すなわち、hidden SNPs は無く、ハプロタイプでは無く SNP が PD 感受性に効いていると考えられる。4) PD と強く関連する 6 個の SNPs は遺伝子型 ( $p=4.4 \times 10^{-9}$ - $5.9 \times 10^{-11}$ )、優性遺伝モデル ( $p=5.3 \times 10^{-4}$ - $1.8 \times 10^{-6}$ )、劣性遺伝モデル ( $p=1.0 \times 10^{-7}$ - $1.5 \times 10^{-10}$ )のいずれでも有意な関連を示し、関連アレルのホモと非関連アレルのホモとのオッズ比は 2.22-2.56 であった。

これら PD 関連アレルの機能解析のために、SNP0070 の遺伝子型ごとの SNCA 発現レベルを real time RT-PCR 法で定量比較した。Lewy body 群、コントロール群いずれにおいても CC>CT>TT の傾向がみられた。

### 考察

以前から多数の候補遺伝子関連解析の報告があるが、今回我々が見出した SNCA の SNP の p 値の低さはこれまでに類をみないものである<sup>1)</sup>。SNCA に関しては promoter 領域のリピート配列多型(Rep 1)に着目した関連解析が精力的に行われてきたが、統一見解は得られておらず、有意差があるとは結論しがたい<sup>2)</sup>。我々は SNCA 領域の連鎖不平衡解析により、Rep 1周辺の SNP に

は有意差を認めず、intron 4, 3' UTR, 3'-flanking の 6 個の SNPs に極めて強い関連を見出した。SNCA 蛋白は PD の病理学的特徴である Lewy 小体の主要成分である。最近、正常な SNCA の triplication (PARK4), duplication も家族性 PD の原因となることが明らかになり、SNCA の高発現が孤発性 PD 発症にも影響すると考えられている<sup>3),4)</sup>。そこで、Real-time RT-PCR 法により SNCA 遺伝子発現レベルの SNP0070(C/T, C が PD 関連アレル)の遺伝子型ごとの違いを解析した。剖検脳前頭葉での SNCA 発現レベルは CC>CT>TT の傾向、すなわち PD 関連アレルと正の相関傾向がみられた。これは従来説である「SNCA 高発現が PD 発症に關与する」と合致す

る結果である。

### まとめ

多数の候補遺伝子、SNP マーカーを用いた関連解析により、孤発性 PD の確実な感受性遺伝子として SNCA を同定することができた。PD 関連 SNPs は SNCA 高発現に關与すると考えられる。

### 文献

- 1) Warner TT et al. Ann Neurol 53 (suppl 3: S16-S25 (2003).
- 2) Farrer M et al. Hum Mol Genet 10: 1847-1851 (2001).
- 3) Singleton AB et al. Science 302: 841 (2003).
- 4) Miller DW et al. Neurology 62: 1835-1838 (2004).

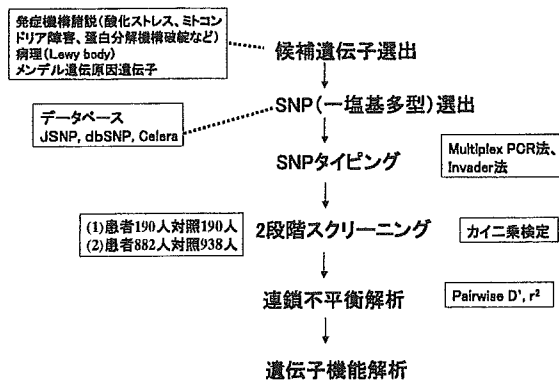


図1 候補遺伝子アプローチ

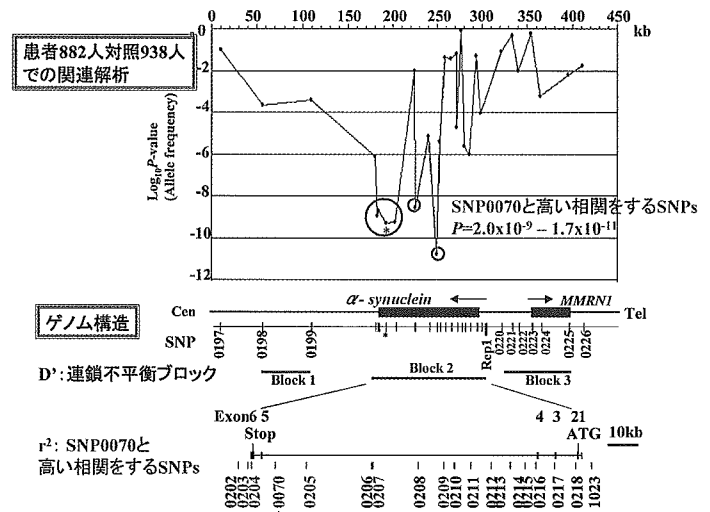


図2 PD感受性領域のゲノム構造と対象SNPsの関連解析の結果



## パーキンソン病患者における心臓弁膜異常の検討

久野貞子<sup>1)</sup>、大江田 知子<sup>2)</sup>、正木 元子<sup>3)</sup>、北川 尚之<sup>2)</sup>

水田 英二<sup>2)</sup>、澤田 秀幸<sup>2)</sup>

1) 国立精神・神経センター 武蔵病院

2) 独立行政法人国立病院機構 宇多野病院 臨床研究部・神経内科

3) 独立行政法人国立病院機構 宇多野病院 臨床研究部・循環器科

**研究趣旨** 近年、ドパミンアゴニストの副作用により心臓弁膜異常をきたすことが海外より報告され注目を集めている。我が国のパーキンソン病(PD)患者の心臓弁膜症の頻度を明らかにすることを目的に、心臓超音波検査を用いて PD 患者および病院コントロール(Non-PD)群における心臓弁膜異常をスクリーニングし、比較検討した。PD 群は Non-PD 群に比べ有意に心臓弁膜逆流の合併が多く、特に大動脈弁、僧帽弁で中等度以上の逆流を示す症例が有意に多かった。PD 群において過去3年間の麦角系ドパミンアゴニスト服薬履歴の有無を検討したところ、いずれかの弁膜逆流をきたす原因となる可能性が示唆された。3年間の累積投与量との相関は認めなかった。

### はじめに

ドパミンアゴニスト副作用としての心臓弁膜異常が注目されている<sup>1~3)</sup>ものの、パーキンソン病患者における心臓弁膜異常の発現頻度は不明である。今回我々は、パーキンソン病患者において心臓弁膜症の頻度を明らかにするため、心臓超音波検査上の弁膜異常の頻度を、PD 患者群、病院コントロール群と比較した。さらに、PD 群についてはドパミンアゴニスト服薬量との関係を検討した。

### 対象および方法

**対象**(表1): PD 群; 2003年12月から2005年10月までの期間、当院で加療中のパーキンソン病(PD)患者のうち、筆頭発表者の自験患者約80名のうち同意を得た55例。いずれの患者も息切れなど心不全を疑う臨床症状は認めなかった。Non-PD 群(病院コントロール群); 同時期に当院整形外科病棟に変形性脊椎症、膝関節症、腰痛症、骨折などで入院したパーキンソン症候を有さない患者60例。両群からリウマチ熱、虚血性心疾患の既往者およ

び90歳以上の高齢者は除いた。

**方法**: 経胸壁エコーは単独の循環器専門医によって評価され、大動脈弁逆流(AR)、僧帽弁逆流(MR)および三尖弁逆流(TR)を定性パラメータおよび定量パラメータを用いて5段階重症度(none~severe)に分類した。またPD 群では、各症例のカルテより過去3年間のドパミンアゴニストおよびL-dopa/DCI 総服用量を調べた。

### 結果

1. PD 群は Non-PD 群に比べ有意に心臓弁膜逆流の合併が多く、特に大動脈弁、僧帽弁で中等度以上の逆流を示す症例が有意に多かった(図1)。
2. 発生因子を検索するために、年齢・罹病期間・H & Y 重症度について検討したが、明らかな相関は認めなかった。
3. 過去3年間の麦角系ドパミンアゴニスト服薬履歴の有無は、いずれかの弁膜逆流をきたす原因となる可能性が示唆された(表2)。ただし、3年間の累積投与量との相関は認めなかった。
4. 過去3年間のL-DOPA/DCIの累積投与量と弁膜逆流との相関は認めなかった。

考察

今回の調査の結果、パーキンソン病が心臓弁膜逆流症をきたす危険因子である可能性が示唆された。しかし、疾患そのものがリスクであるのか、治療薬がそのリスクであるのかは十分に明らかではない。治療薬との関係を明らかにするためには、今後多数例の前方視的研究が必要である。今回、特に症状を示していないパーキンソン病患者において中等度～高度の心臓弁膜逆流が見出された経験より、パーキンソン病患者には定期的な心エコーの施行が望ましいと考える。

表2 過去3年間のドパミンアゴニスト服薬履歴の有無と弁膜逆流

	3弁の何れかが ≥ Moderate	3弁の何れかが Absent ~ Mild	χ <sup>2</sup> 検定 Yates補正後 P-value
Ergot derivatives +	17	18	p=0.0168*
Ergot derivatives -	2	16	
Non-ergot derivative +	5	15	p=0.3238
Non-ergot derivative -	14	19	

\* 有意差あり

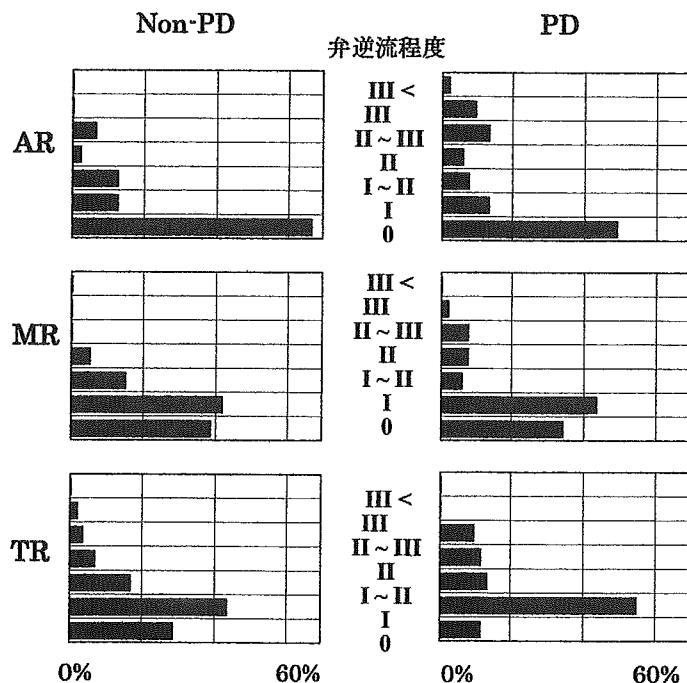
表1 各群プロフィール

	non-PD群	PD群
症例数	60例	55例
男:女 (男%)	25:35 (41.7%)	24:31 (43.6%)
年齢 歳 ±SD	70.5 ±13.8	67.0 ±9.5
Hoehn & Yahr重症度 ±SD	-	3.1 ±0.8
罹病期間 年 ±SD	-	9.2 ±7.4

文献

- 1) Van Camp G, et al. Neurology. 859-61, 2003
- 2) Van Camp G, et al. Lancet. 1179-83, 2004
- 3) Waller EA, et al. Mayo Clin Proc. 1016-20, 2005

図1 各群における弁膜逆流頻度ヒストグラム



Non-PD 群 vs. PD 群

	Tied-P values
total	0.0003*
AR	0.0022*
MR	0.3600
TR	0.1023

Mann-Whitney's U test

\* 有意差あり

## パーキンソン病患者におけるドパミンアゴニストと 心臓弁膜症との関連

野元 正弘<sup>1)</sup>，永井 将弘<sup>1)</sup>，矢部 勇人<sup>1)</sup>，西川 典子<sup>1)</sup>，  
中塚 晶子<sup>1)</sup>，森豊浩代子<sup>1)</sup>，森豊 隆志<sup>1)</sup>，重松裕二<sup>2)</sup>

1) 愛媛大学医学部臨床薬理学、創薬治療内科・神経内科、2) 同、循環器内科

**研究要旨** 麦角系ドパミンアゴニストと、その副作用としての心臓弁膜症合併についてパーキンソン病を対象に検討した。ペルゴリド使用群において心臓弁膜症合併頻度が高い傾向がみられたが、統計学的有意差は認められなかった。その要因として海外と比較して薬物使用量が少ないことがあげられたが、今後も症例数を増やして検討する必要がある。

### はじめに

麦角系ドパミンアゴニストはパーキンソン病治療薬として世界中で幅広く使用されており、本邦でもブロモクリプチン、ペルゴリド、カベルゴリンの3剤が使用されている。以前より胸膜線維症、間質性肺炎、後腹膜線維症などの副作用報告が散見されていたが、最近、海外より心臓弁膜症の報告が相次いでみられている<sup>1)2)</sup>。特にペルゴリドによる拘束性心臓弁膜症が注目を集めており、ペルゴリド使用患者の33%において拘束性心臓弁膜症がみとめられたとの報告もある<sup>1)</sup>。しかし、本邦での麦角系ドパミンアゴニスト関連心臓弁膜症の発症頻度に関する報告はなく正確な頻度は不明である。今回、我々は麦角系ドパミンアゴニスト使用パーキンソン病患者における心臓弁膜症の頻度を検討した。

### 方法

当科にて投薬治療中のパーキンソン病患者 35例を対象とし、下記の3群にわけて解析した。

- I 群：ペルゴリド使用群
- II 群：その他麦角系ドパミンアゴニスト使用群
- III 群：ドパミンアゴニスト非使用群

各群における患者背景は表1のとおりである。

表1. 患者背景

	症例数 (男：女)	年齢 (歳)	罹病期間 (年)	重症度 (H&Y)	L-ドパ (mg)
I 群	17 (8：9)	67.4	7.7	3.0	382
II 群	10 (6：4)	69.1	7.1	3.1	361
III 群	8 (5：3)	68.0	4.9	2.4	307

全症例心エコー検査により、心臓弁膜症の有無、程度を検討した。

心臓弁逆流症の重症度を、逆流の程度を用いて、下記のようにスコア化した。

Normal = 0  
Mild = 1  
Moderate = 2  
Severe = 3

大動脈弁、肺動脈弁、僧帽弁、三尖弁の各逆流スコアを合算して複合弁逆流スコアとした。

## 結果

海外より報告されているような拘束性心臓弁膜症は、全症例において認められなかった。また、全症例において心エコー上、心機能に大きな問題はなく、ドパミンアゴニストの減量、中止や治療が必要となった症例はなかった。

大動脈弁、肺動脈弁、僧帽弁、三尖弁四つの心臓弁いずれかにおいて中程度以上（2以上）の逆流症を認めた割合は、I群：6/17（35.3%）、II群2/10（20.0%）、III群：1/8（12.5%）とペルゴリド使用群において高い傾向にあったが、各群間で統計学的な明らかな有意差は認められず、I群とIII群間においても $p=0.24$ （Fisher's exact probability test）と有意差はなかった（図1）。

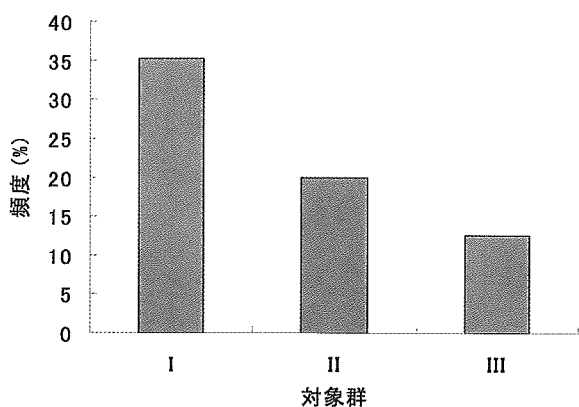


図1. 各対象群における中等度弁膜症合併頻度

四つの心臓弁における逆流症の程度を加算し、複合弁逆流スコアを対象群ごとに求めた。その結果、I群2.2点、II群1.5点、III群1.3点とペルゴリド使用群において高い傾向にあったが、統計学的有意差は認められなかった（ $p=0.30$ , Kruskal-Wallis test）（図2）。

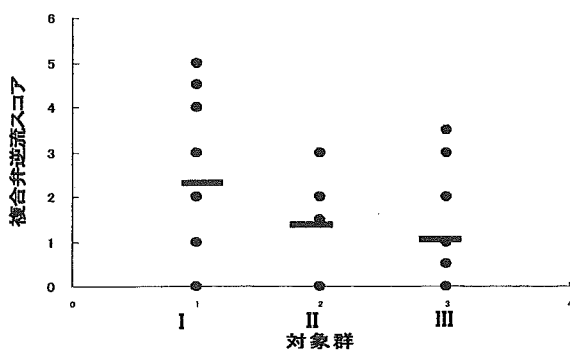


図2. 各対象群と複合弁逆流スコアとの関係

ペルゴリド使用群において、ペルゴリド一日服薬量と服薬日数からペルゴリド総（累積）使用量を計算し、複合弁逆流スコアと相関関係を求めた。

複合弁逆流スコアとペルゴリド累積使用量に弱い正の相関傾向がみられたが、統計学的有意差は認められなかった（Spearman's rank correlation）。

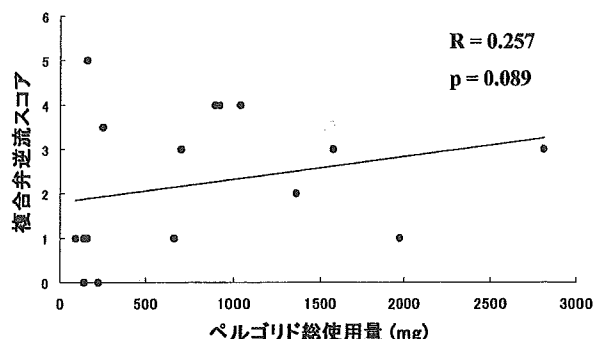


図3. ペルゴリド総使用量と複合弁逆流スコアとの相関関係

## 考察

心臓弁膜症は加齢、リウマチなどの炎症疾患、虚血性心疾患などの基礎疾患に合併することが多い。特に加齢による弁の石灰化や、弁のひ薄化にともなう弁逆流症は日常診療でもよく遭遇するところである。最近、海外よりドパミンアゴニストによる拘束性心臓弁膜症が報告されている。この弁膜症は通常認められる弁膜症とは異なり、弁膜が線維化に伴う形態異常を呈し、弁の閉鎖不全、逆流症を合併することが特徴である。この特徴的な病変はカルチノイド症候群、methysergideなどの麦角誘導体、fenfluramineなどの食欲抑制薬（本邦未発売）により引き起こされる心臓弁膜症と類似しており、セロトニン受容体（5-HT<sub>2B</sub>-R）の関与が推測されている<sup>3)</sup>。海外からの報告ではペルゴリド使用患者の33%に拘束性心臓弁膜症を認めているが、今回の検討では一例も認められなかった。今回、拘束性心臓弁膜症が認められなかった要因の一つとして、海外との麦角系ドパミンアゴニスト投与量の違いが推測された。実際、海外報告例でのペルゴリド平均累積使用量は3003mgと本研究でのペルゴリド平均累積使用量775mgと比較して約4倍の差が認められた。しかし、本研究においても図1、図2でみられるように、ペルゴリド使用群がドパミンアゴニスト非使用群に比較して心臓弁膜症の合併頻度、程度が高い傾向にあり、今後薬物使用量増加に伴い拘束性心臓弁膜症の合併が発生する可能性もあり、更な