

2005

4. Marshall V, et al. *Mov Disord.*  
18(12):1415-1423, 2003
5. Braak H, et al. *Neurobiol Aging.*  
24(2):197-211, 2003
6. Orimo S, et al. *J Neurol Neurosurg  
Psychiatry.* 67(2):189-194, 1999
7. Takatsu H, et al. *JAMA.*; 284(1):44-45,  
2000
8. Hamada K, et al. *J Neurol Neurosurg  
Psychiatry.* 74(4):423-426, 2003
9. Nagayama H, et al. *J Neurol Neurosurg  
Psychiatry.*76(2):249-251, 2005
10. Orimo S, et al. *Acta Neuropathol  
(Berl).*:109(6):583-588, 2005
11. Double KL, et al. *Arch  
Neurol.*60(4):545-549, 2003
12. Sawada H, et al. *JAMA.* 293(8):932-934,  
2005

#### G.健康危険情報

#### H.学会発表

澤田秀幸ほか、パーキンソン病診断における  
MIBG 心筋シンチグラムの意義. 第 59 回日本自  
律神経学会総会

#### I.知的所有権の取得状況

##### 1.特許取得

工業所有権：「パーキンソン病診断キットおよびパー  
キンソン病診断方法」(特願 2003-405942, 平成 15 年  
12 月 4 日出願)

##### 2.実用新案登録

なし

##### 3.その他

## 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症／パーキンソン痴呆複合における MIBG 心筋シンチの検討

小久保康昌<sup>1)</sup>、野村新之<sup>2)</sup>、葛原茂樹<sup>1)</sup>

三重大学神経内科<sup>1)</sup>、三重県立志摩病院放射線科<sup>2)</sup>

**研究要旨** 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症／パーキンソン痴呆複合症例に MIBG 心筋シンチグラフィを施行し、心臓交感神経障害の有無を検討した。対象は、紀伊半島の多発地区出身の ALS 1 例と PDC 7 例。内訳は、男性 4 例、女性 4 例、平均年齢は、66.4 歳で、検査施行時までの罹病期間は、4 年 1 ヶ月。111 MBq の <sup>123</sup>I-MIBG 静注後、15 分後に早期像、3 時間後に後期像を撮影した。<sup>123</sup>I-MIBG の取り込みの評価には、心縦隔比(H/M 比)を用いた。8 例中 4 例で H/M 比の低下を認めた。H/M 比低下群 (L 群) は全例 PDC 症例で、H/M 比の平均値は、早期像 1.44、後期像 1.27 であった。H/M 比正常群 (N 群) における H/M 比の平均値は、早期像 2.36、後期像 2.38 であった。H/M 比の低下は、Hoehn-Yahr stage と相関していた。以上の結果から、紀伊 PDC における心臓交感神経節後線維の障害が示唆された。

### はじめに

近年、パーキンソン病を初めとしたレヴィ小体病の診断マーカーとして MIBG 心筋シンチグラフィの有用性が報告されている。<sup>1,2</sup> 今回、紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症 (Kii ALS) とパーキンソン痴呆複合 (Kii PDC) 患者に MIBG 心筋シンチグラフィを施行し、心臓交感神経障害の有無を検討したので、報告する。

### 対象および方法

対象：紀伊半島の多発地区出身の ALS 1 例と PDC 7 例。内訳は、男性 4 例、女性 4 例、平均年齢は、66.4 歳で、検査施行時までの罹病期間は、4 年 1 ヶ月。8 例中 6 例に ALS/PDC

の家族歴あり。全例、MIBG 心筋シンチグラフィに影響する薬剤の内服や糖尿病、心疾患なし。方法：SPECT 撮影装置は、東芝 (GCA-901A) で、111 MBq の <sup>123</sup>I-MIBG 静注後、15 分後に早期像、3 時間後に後期像を撮影した。<sup>123</sup>I-MIBG の取り込みの評価には、心縦隔比 (H/M 比)を用いた。

### 結果 (表 1) (図 1A, B)

8 例中 4 例で H/M 比の低下を認めた。H/M 比低下群 (L 群) は全例 PDC 症例で、H/M 比の平均値は、早期像 1.44、後期像 1.27 であった。H/M 比正常群 (N 群) における H/M 比の平均値は、早期像 2.36、後期像 2.38 であった。N

群 4 例中 3 例は、PDC 症例でこの 3 例の Hoehn-Yahr stage は、0~1 であった。残りの 1 例は ALS 例で、MIBG の取り込みは正常であった (図 1A)。L 群 4 例中 3 例の Hoehn-Yahr stage は、3~3.5 であった。このうち高度のパーキンソニズムを伴った 2 例の PDC 症例では、取り込みが欠損していた (図 1B)。L 群の残りの 1 例は、認知症と高度の ALS 症状を呈し、パーキンソニズムは評価できなかった。

### 考察

MIBG の取り込みは、中枢神経系に Lewy body pathology をともなう疾患で低下すると報告されている。我々は、リン酸化  $\alpha$  シヌクレイン抗体を用いた検討で、紀伊 PDC 4 例 2 例の脳幹に Lewy body pathology を認めており (unpublished data)、MIBG 低下との関連が示唆された。今回の検討から、紀伊 PDC では、心臓交感神経節後線維の障害が存在することが判明した。H/M 比の低下は、Hoehn-Yahr stage と相関していた。今後、心臓交感神経の病理学的検索が必要である。

### 文献

- 1) Yoshita M, et al: Neurology 2006; 66:1850-1854.
- 2) Orimo S, et al: Parkinsonism Relat Disord. 2006; 12 (suppl 2):S99-S105.

### 図の説明

図 1. A. Kii ALS 症例では、H/M 比は正常であった。B. Kii PDC 症例では、H/M 比が著明に低下していた。

表 1. Kii ALS/PDC 8 例の臨床像と H/M 比のまとめ。Hoehn-Yahr stage と H/M 比低下との相関が示唆された。

図 1A

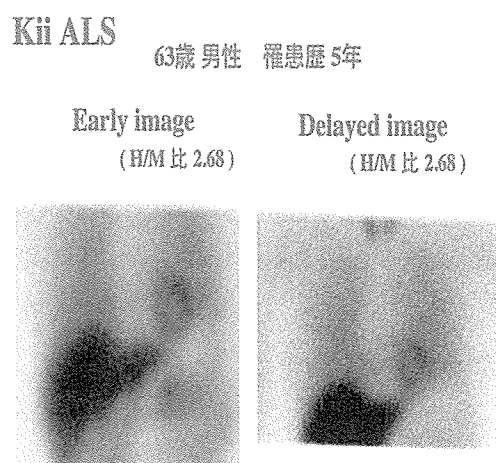


図 1B

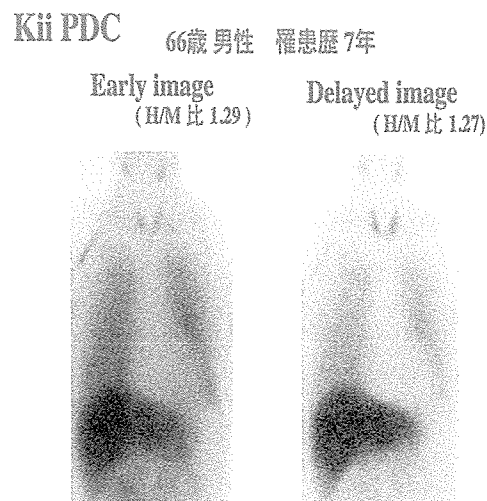


Table. Clinical features and H/M ratios of cardiac MIBG scintigram in Kii ALS/PDC patients

Kii ALS-PDC	Age	Sex	Clinical diagnosis	Duration of the illness	Motor neuron signs	Dementia	Parkinsonism	Modified H-Y	Autonomic dysfunction	H/M ratio (early/delay)
#1	63 y	Female	ALS	5 y	BP, PTS, MA	None	None	-	None	2.68/2.68
#2	72 y	Male	PDC	8 y 6m	MA (small hand muscles)	MD, DO	None	0	None	2.20/2.49
#3	64 y	Male	PDC with ALS	1 y	BP, PTS, MA	MD	None	0	None	2.18/2.35
#4	75 y	Female	PDC	1 y 6 m	PTS	MD	Rgt	1	constipation	2.36/2.01
#5	62 y	Male	PDC with ALS	2 y	BP, PTS, MA	MD, DO, Hypp	Unknown	Unknown	constipation	1.49/1.41
#6	65 y	Female	PDC	3 y	PTS, MA	MD, DO	Rgt, BK, GD	3	constipation	1.47/1.0
#7	65 y	Female	PDC	5 y	PTS, MA	MD	Rgt, BK, GD	3.5	constipation	1.51/1.39
#8	66 y	Male	PDC	7 y	PTS, MA (small hand muscles)	MD	Rgt, BK, GD	3.5	OHT	1.29/1.27

H/M ratios were generally correlated with the modified Hoehn-Yahr staging of each patient. Parkinsonism of the patient #5 that showed severe ALS symptoms at the terminal stage was not evaluated. BP; bulbar palsy, PTS; pyramidal tract signs, MA; muscle atrophy, MD; memory disturbance, DO; disorientation, Hypp; hypobulia, Rgt; rigidity, BK; bradykinesia, GD; gait disturbance, OHT; orthostatic hypotension

y; year(s), m; months

H-Y; Hoehn & Yahr

## 紀伊 ALS/パーキンソン痴呆複合の神経病理学的所見 NFT 分布様式 と TDP-43 免疫組織化学

葛原茂樹<sup>1)</sup>、小久保康昌<sup>1)</sup>、村山繁雄<sup>2)</sup>、斉藤祐子<sup>3)</sup>、長谷川成人<sup>4)</sup>、新井哲昭<sup>4)</sup>

- 1) 三重大学大学院医学系研究科神経病態内科学分野  
2) 東京都老人総合研究所高齢者ブレインバンク・高齢者ゲノム解析  
3) 東京都老人医療センター剖検病理科  
4) 東京都精神医学研究所

**研究要旨：** 紀伊半島集積地の ALS・パーキンソン痴呆複合(ALS/PDC)の家族性発症 12 剖検例(ALS 単独型 4 例、ALS-Dementia 型 4 例、PDC 型 2 例、PDC-ALS 型 2 例)を、神経病理学的・免疫組織化学的に検討した。臨床表現型に関係なく病理学的所見は共通しており、アルツハイマー神経原線維変化(NFT)と ALS 病変が認められたが、ALS 単独例では NFT の出現量は少なかった。NFT の分布は、海馬、海馬傍回、側頭極、辺縁系、脳幹諸核に最も高度で、基底核、他の大脳皮質、脊髄にも認められた。 $\alpha$ -Synuclein 陽性レビー小体は 4 例に認められたが、アミロイド  $\beta$  陽性老人斑が認められたのは 1 例に過ぎなかった。最近、ALS と前頭側頭葉変性症に高率に出現が確認されている TDP-43 陽性封入体は、検査した 6 例の海馬歯状回と脊髄に認められた。また、新鮮凍結脳のウェスタンブロットティングでも、TDP-43 陽性バンドを認めた。これらの所見は、本疾患の中核を成す ALS - parkinsonism-dementia が一連の連続スペクトルの上にあることを示唆し、TDP-43 は、本症の ALS と前頭側頭葉萎縮を関連付ける所見として注目される。

### A. 研究目的

紀伊半島筋萎縮性側索硬化症(ALS)集積地の ALS・パーキンソン痴呆複合(ALS/PDC)の大部分は家族性に発症し、臨床病型としては ALS 単独型、PDC 型、ALS-Dementia 型、PDC-ALS 型があるが、同一患者および同一家系内にこれらの病型が重なって出現するので、単一疾患の臨床表現型の違いと推定される<sup>1)2)</sup>。神経病理学的には、臨床病型に関係なく、広範な NFT 出現と ALS 病変が認められる<sup>3)</sup>。これらを多数例で再検討すると共に、2006 年に家族性前頭側頭型認知症(frontotemporal dementia: FTD)と ALS の一部に特異的に出現することが報告された TDP-43<sup>4)5)</sup>の免疫組織化学的検討を行った。

### B. 研究方法

**対象症例：** ALS 集積地で ALS/PDC と臨床診断され、剖検で診断確定された 7 家系(Table 1 の A-G) 12 例で、すべて家族内に同疾患の発生を認めている。臨床病型は、ALS 単独型 4 例、ALS-Dementia 型(ALS と認知症がほぼ同時に出現) 4 例、PDC 型(パーキンソニズムと認知症がほぼ同時に出現) 2 例、PDC-ALS 型(PDC の経過中に ALS 症状が出現) 2 例である。

**病理学的・免疫組織化学的染色：** 脳と脊髄について、通常で神経病理組織学染色、NFT 検討のために Gallyas 染色、免疫組織化学はタウタンパク、アミロイド  $\beta$  タンパク(A $\beta$ )、 $\alpha$ -synuclein、TDP-43<sup>4)5)</sup>について実施した。

**生化学的解析：** PDC 例の側頭葉の新鮮凍結保存材料を用いて、ウェスタンブロットティングにより TDP-43 陽

性バンドの有無を検討した<sup>4)5)</sup>。

### C. 研究結果

神経病理学的所見と免疫組織化学的所見の一覧を Table1 に示す。出身家系 (A-G) と臨床病型に関係なく、ALS 病変 (上位 / 下位運動ニューロン病変) と広範な NFT 出現が認められた。NFT の分布は、海馬、海馬傍回、側頭極、辺縁系、脳幹諸核に最も高度で、基底核、他の大脳皮質、脊髄にも認められた。臨床的に PDC 型、ALS-Dementia 型、PDC-ALS 型では、肉眼的脳萎縮と脳重減少がほとんどの症例で認められ、多数の NFT が出現していた。一方、ALS 単独型では肉眼的に脳萎縮や脳重量減少が認められないことが共通しており、NFT については、分布様式は同じであったが出現量については多い例から少ない例まで様々であった<sup>3)</sup>。NFT は脊髄灰白質の小型神経細胞にも認められた<sup>1) - 3)</sup>。 $\alpha$ -Synuclein 陽性レビー小体は 4 例に認められたが、アミロイド  $\beta$  陽性老人斑が認められたのは 1 例に過ぎなかった。TDP-43 陽性封入体は、検査した 6 例全例の海馬歯状回と脊髄に認められた (Fig 1)。

新鮮凍結脳のウェスタンブロッティング<sup>5)</sup>でも、紀伊症例の多くに TDP-43 陽性バンドを認めた (Fig 2)。

### D. 考察

異なった 7 家系出身の臨床病型の異なる 12 症例について、脳と脊髄を神経病理学的・免疫組織学的に検討した。どの症例にも、臨床病型や家系に関係なく、ALS 病変と共通の分布パターンで多数の NFT 出現を認めたが、ALS 単独病型では NFT 出現量が他の病型に比較して少ないものがあつた。これらの所見は、ALS - 認知症 - パーキンソニズムの三徴候の一つ以上を備える異なる臨床表現型である ALS/PDC が、共通の神経病理学的病変を基盤に出現するとする仮説を支持する<sup>3)6)</sup>。また、1 例を除いて A $\beta$  陽性老人斑がまったく認められなかったことは、本症の NFT 形成過程がアルツハイマー病とはまったく異なることを示唆する<sup>7)</sup>。 $\alpha$ -Synuclein 陽性レビー小体が相当数に認められたことは、偶発所見か本質的病変の一部であるかは検討する必要がある<sup>8)</sup>。

従来報告されていない新知見は、2006 年に報告された TDP-43 陽性封入体<sup>4)5)</sup>が、検索した 6 例全例の脳と脊髄に認められたことである。これまで、frontotemporal

dementia with parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) の tau 遺伝子変異のない家系 (新しい原因遺伝子 progranulin が 2006 年に発見された)<sup>9)10)</sup>、孤発性の FTD 症例および ALS 症例の一部には、ユビキチン (Ub) 陽性封入体 (motor neuron disease inclusion と呼ばれる) が出現することが知られていた<sup>11)</sup>。TDP43 陽性封入体は、これらの症例に Ub 封入体よりも高感度の特異的に認められることが、2006 年に米国<sup>4)</sup>と本邦<sup>5)</sup>から相次いで報告され、これらの疾患の病態と密接に関連した封入体として大きな注目を浴びている。グアムと紀伊の ALS/PDC では、NFT 病変以外に ALS 病変と前頭側頭葉萎縮が出現するのが特徴であるが、TDP-43 は、これらの病変と密接な関連がある可能性があり、病態生化学的には tauopathy and TDP-43 abnormalities complex (Fig 3) とみなすことが可能かもしれない。

### E. 結論

紀伊半島 ALS 集積地の ALS/PDC は、同一家系、同一患者に、ALS、パーキンソニズム、認知症が様々な組み合わせで重なって出現するだけでなく、病理学的には ALS 病変と共通の分布様式で NFT が出現すること、更に TDP-43 陽性細胞が高頻度に認められることから、ALS - parkinsonism - dementia は一連の連続スペクトルの上にあることが示唆される。生化学的には、タウタンパクと TDP-43 の 2 つの代謝異常を背景にして成立している疾患の可能性が示唆される。

### F. 文献

- 1) Kuzuhara S, et al: Ann Neurol, 49: 501-511, 2001.
- 2) Kuzuhara S, et al: Mov Disord, 20(suppl.12), s108-S113, 2005.
- 3) Mimuro M, et al: Acta Neuropathol. (in press, 2007)
- 4) Neumann M, et al: Science, 314: 130-133, 2006.
- 5) Arai T, et al: Biochem Biophys Res Commun, 351: 602-611, 2006.
- 6) Hirano A, et al: Arch Neurol, 15: 35-51, 1966.
- 7) Winton MJ, et al: Acta Neuropathol, 111: 401-412, 2006.
- 8) 谷口 彰, ほか: 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 神経変性疾患に関する調査研究班 (主任研究者・葛原茂樹) 2005 年度研究報告書: p128-131, 2006.

- 9) Baker M, et al: Nature, 442: 916-919, 2006.
- 10) Cruts M., et al: Nature, 442: 920-924, 2006.
- 11) Sampathu DM, et al: Am J Pathol: 169: 1343-1352, 2006.

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mimuro M, Kokubo Y, Kuzuhara S: Similar topographical distribution of neurofibrillary tangles in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex in people living in the Kii peninsula of Japan suggests a single tauopathy. Acta Neuropathol, in press, 2007.
- 2) Kuzuhara S: Overview of ALS variants in the Kii peninsula of Japan: epidemiological, genetic and clinicopathological observations in relation to ALS-Parkinsonism-dementia complex (17th International symposium on ALS/MND Joint opening session). Amyotrophic Lateral Sclerosis, 7(Suppl 1):8, 2006.
- 3) 谷口 彰, 小久保康昌, 葛原茂樹, 村山繁雄: 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン痴呆複合症例脳の $\alpha$ -synuclein 陽性構造の免疫組織学的検討. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 神経変性疾患に関する調査研究班(主任研究者・葛原茂樹)2005年度研究報告: p128-131, 2006.
- 4) 葛原茂樹: 運動ニューロン疾患を伴う痴呆症 紀伊半島のALS/PDC. Clinical Neuroscience, 23:317-319, 2005.
- 5) 葛原茂樹: 筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン痴呆複合(ALS/PDC)の臨床遺伝学と病理. Cognition and Dementia, 4:274-281, 2005.

2. 学会発表

学会発表

- 1) Kuzuhara S, et al: Marked increase of parkinsonism-dementia (P-D) phenotypes in the high incidence amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

focus in the Kii peninsula of Japan, 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Madrid. (2006.7.15-20)

2) Kokubo Y, et al: Immunohistochemical study on the isoform of tau protein in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan, 10th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Kyoto. (2006.10.28-11.2)

3) Kuzuhara S: Clinical aspects of DLB and PDD: a review of autopsy-verified cases in Japan, The 4th International Workshop on DLB and PDD, Yokohama. (2006.11.2-4)

4) Kuzuhara S: Overview of ALS variants in the Kii peninsula of Japan: epidemiological, genetic and clinicopathological observations in relation to ALS-parkinsonism-dementia complex, 17th International Symposium on ALS/MND, Yokohama, (2006.11.30-12.2)

I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

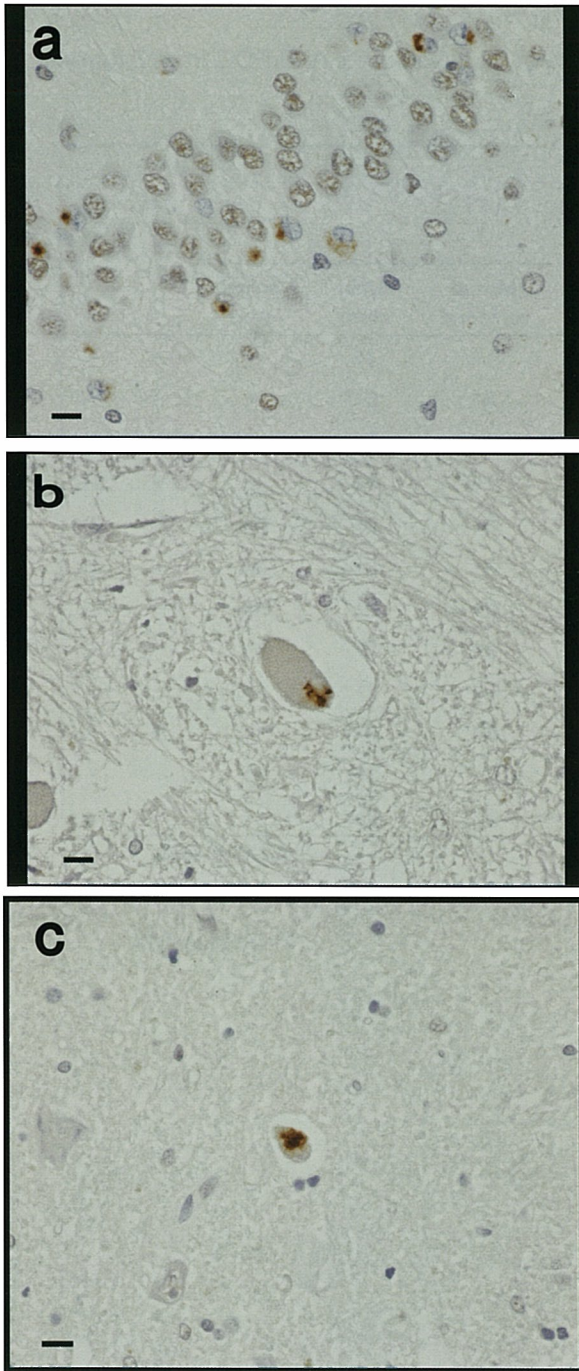


Fig 1 TDP-43 Immunohistochemistry of the dentate gyrus of the Ammon's horn (a) and anterior horn of the spinal cord ( b and c) of a case of Kii PDC. Roud, granular or skein-like structures are positive for TDP-43. Bar=10  $\mu$  m

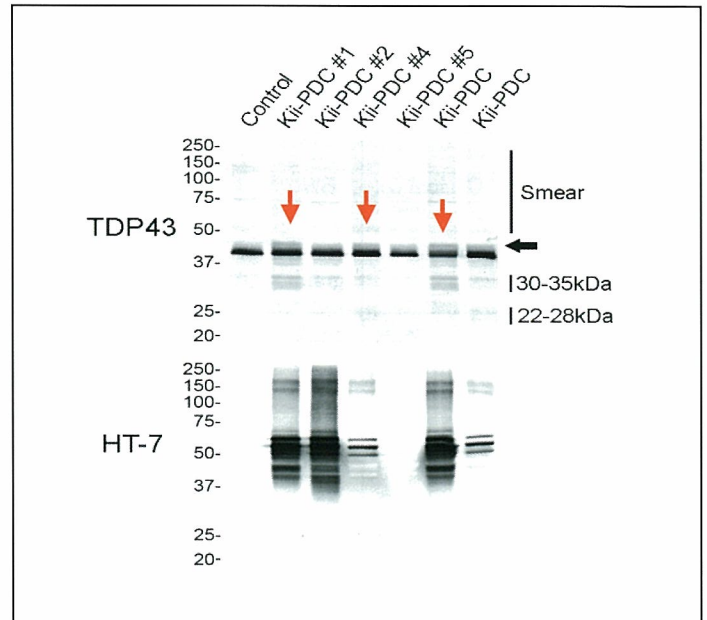


Fig 2 Westernblotting of fresh frozen specimens from 6 Kii PDC brains The arrows indicate the bands corresponding to TDP-43

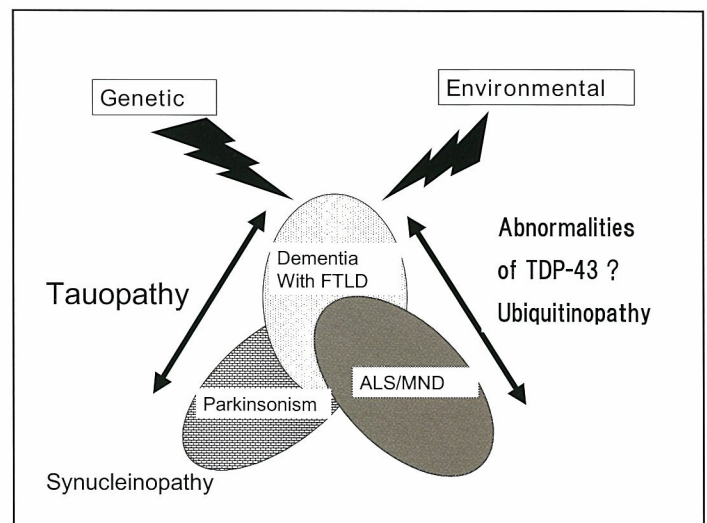


Fig 3 A new hypothesis of pathogenesis and molecular pathology of Kii ALS/PDC



Table 1 Clinical Phenotype and Neuropathological Findings of 12 cases of Kii ALS/PDC from 7 families (A-G are names of the families)

Family Name	Clinical Dx	BW gram	ALS Pathology			NFT			SP	LB
			UMN	LMN	Bunina	Mesial temporal	Brain stem	Spinal cord		
A1	ALS	1190	1+	3+	-	1+	1+	-	-	-
B1	ALS	1275	1+	3+	1+	3+	3+	-	-	-
D1	ALS	1140	1+	2+		1+	1+	-	-	-
G1	ALS	1190	3+	3+	2+	1+	2+	-	-	2+
C2	ALS-D	ND		NA	NA	3+	2+	NA	2+	2+
B2	ALS-D	1210	1+	3+ (XII)	NA	3+	2+	NA	-	2+
C3	ALS-D	1320	1+	NA	NA	2+	2+	NA	-	1+
G4	ALS-D	1300	-	2+	2+	3+	3+	1+	-	-
A2	PDC	935	1+	2+		3+	2+	1+	-	-
E1	PDC	1085	1+	2+		3+	3+	1+	-	-
C1	PDC-ALS	960	3+	2+	+	3+	3+	1+	-	-
F1	PDC-ALS	875	3+	1+	1+	3+	3+	-	-	-

D: demented

F: frontal

T: temporal

NA: not available

ND: not described

BW: brain weight

LB: Lewy body

SP: senile plaque

BG: basal ganglia

## 高齢者ブレインバンクにおけるパーキンソン病 / 認知症を伴うパーキンソン病 / Lewy 小体型認知症の年次変化：34 年間での検討

仙石 鍊平<sup>1) 2)</sup>、齊藤 祐子<sup>1) 3)</sup>、池村 雅子<sup>1)</sup>、村山 繁雄<sup>1)</sup>

1) 東京都老人総合研究所 老年病のゲノム解析・高齢者ブレインバンク

2) 東京慈恵会医科大学 神経内科

3) 東京都老人医療センター 剖検病理科

### 研究要旨

パーキンソン病（PD）の生命予後改善の有無を、1972 年当施設開設以来の高齢者連続開頭剖検例（現時点で 6,847 例）よりなる、高齢者ブレインバンクを用い検討した。臨床的に PD と診断された初期 40 例と最近 40 例について、病歴の後方視的検討と、免疫組織化学的再評価を行い、24 例、27 例のレヴィー小体病をそれぞれ分離した。死亡年齢の上昇が、最近例の辺縁型病理群で明かであったが、人口全体の平均寿命の上昇効果の影響の可能性が、除外できなかった。

### A. 研究目的

1970 年代にパーキンソン病（PD）の治療薬として L-dopa が登場したが、画像診断技術はいまだ未熟で、大脳皮質基底核変性症（CBD）、Lewy 小体型認知症（DLB）の疾患概念は確立されていなかった。この時期と最近の Lewy 小体病（LBD、PD/ 認知症を伴う PD/ DLB の総称）の生命予後に改善を認めるかどうかを臨床病理学的に検討した。

### B. 研究方法

対象は、1972～1981 年までの高齢者ブレインバンク連続剖検例 2351 例（男性 1182：女性 1169、平均死亡年齢 77.2±9.1 歳）中、臨床的に PD と診断された連続剖検 40 例（1.7%、男性 24：女性 16 例、平均死亡年齢 76.3±7.2 歳）と、1997 年～2006 年にかけての連続剖検例 1470 例（男性 793：女性 617、平均死亡年齢 80.1±8.8 歳）中、臨床的に PD と診断された 40 例（2.8%、男性 25：女性 15、

平均死亡年齢 80.7±7.1 歳）。

方法：1970 年代の各症例については、下記再評価を行った。

①臨床病歴、②肉眼写真、③通常染色（HE 染色、Kluver-Barrera（髄鞘）染色）、④新たに鍍銀染色（Gallyas-Braak、改良メセナミン銀、Bielschowsky 染色）、免疫組織化学（抗リン酸化  $\alpha$  シヌクレイン：psyn#64、抗リン酸化タウ：AT8、抗アミロイド  $\beta$ ：12B2、抗  $\alpha$  シヌクレイン抗体）を加えた。

なお、延髄の psyn#64 免疫染色、中脳黒質の細胞脱落と AT8 による免疫染色で一次スクリーニングを行い、いずれかに陽性所見が得られた場合、標本を新たに作り直すかたちで系統的に検索した。

最近例については、ブレインカッティング時に、UK ブレインバンク PD 診断基準を用いてパーキンソン症状を、また CDR も決定した。全例を、高感度鍍銀染色、免疫組織化学染色によりスクリーニングし、PD/ PDD/

DLB/ Lewy 小体型純粋自律神経不全 (LB-PAF) 症例は、DLB コンセンサスガイドライン (1)、Braak Lewy Stage (2) を網羅した、高齢者脳バンクプロトコール (3) で検索した。Lewy 小体の広がりについては Lewy 小体スコアに従って、脳幹型 (Brainstem)、移行型 (Transitional)、新皮質型 (Neocortical) に分類した。

### C. 研究結果

1970 年代 40 例中、

- ・レヴィー小体病 (LBD) 25 例 (62.5%)
  - 合併例 +PSP 2 例
  - +CBD 1 例
- ・黒質に局限した変性 (Park2/ 8 疑い)
  - (1 例は著明な左右差) 5 例 (12.5%)
- ・進行性核上性麻痺 (PSP) 2 例 (5%)
- ・大脳皮質基底核変性症 (CBD) 1 例 (2.5%)
- ・血管障害性パーキンソニズム (疑)
  - 3 例 (7.5%)
- ・パーキンソニズムの責任病理が同定できず
  - 4 例 (10%)

であった。

Lewy 小体を認めず黒質に局限した変性をもつ 5 例について表 1 にまとめた。5 例中、黒質に局限した変性に著明な左右差を認めた例を 1 例確認した。以下に簡単に呈示する。

【症例】死亡時 73 歳、男性、右利き

【臨床病歴】30 歳代より特に誘因なく左手に振戦出現、左下肢を引きずる。1971 年 (69 歳時) 歩幅が小さくなり、歩き出すと止まらなくなる。1972 年 3 月、発語なく、見当識障害を認め、脳軟化症と診断され、その後症状は改善した。1972 年 9 月、当院神経内科初診：左に強い筋固縮、左上肢の振戦より、hemiparkinsonism の診断。1973 年、無動が強くなり見当識障害が出現。同年 3 月、L-dopa、trihexyphenidyl の投与が開始される。1974 年 1 月、傾眠傾向、発語がなくなり入院、右顔面を含む右片麻痺を認めた。同年

3 月、一時中止していた L-dopa の再開で左振戦が消失した。1976 年 1 月より誤嚥性肺炎を繰り返し、3 月に永眠された。

【既往歴】40 歳代より高血圧、コントロール不良、陳旧性肺結核症

【家族歴】父・兄が脳卒中で死亡

【嗜好品】タバコ 10 本/日、アルコールなし

【病理学的所見】死後時間 5 時間 56 分で解剖。脳重量は 1360g。肉眼的所見は、両側黒質の萎縮 (右側優位) (Fig. 1、2) を認めた。組織学的には、両側黒質のメラニン含有細胞減少 (右側優位) (Fig. 3)、黒質腹外側に強いグリオシス (右側優位)、残存メラニン含有細胞のメラニン含有量低下、メラニン貪食を両側とも認めるが、左側に強い。レヴィー小体や神経原線維変化は一切認めなかった (Fig. 4)。青斑核・迷走神経背側運動核は両側とも保存されていた。他の診断としては、多発性陳旧性脳血管障害 (陳旧性線状出血 (左上側頭回から基底核に至る)、多発性陳旧性脳梗塞 (左前頭葉白質、左視床、右小脳歯状核門)) を認めた。

1970 年代症例と最近例との比較 (Table 2)。1970 年代に認めた黒質に局限した変性をもつ症例群が最近例では皆無であった。LBD を認めた率、CBD 例、にはあまり変化は認められなかった。PSP 例と血管障害性パーキンソニズム例が最近症例群において、軽度増加していた。

LBD 症例における 1970 年代と最近例との比較 (Table 3)。1970 年代、最近例とも背景症例の男女比に比して、LBD では男性の方が優位であった。LBD の平均死亡年齢は、1970 年代に比して、最近例において 4.1 歳の上昇を認めた。背景症例においても、この 30 年間で平均死亡年齢が約 3 年の上昇を認めている。LBD を神経病理学的に脳幹型 (Brainstem)、移行型 (Transitional)、新皮質型 (Neocortical) に分類すると、脳幹型において平均罹病期間が 6.7 年から 15.5 年と著

しく延長していた。また、移行型の平均死亡年齢が 76.4 歳から 83.8 歳と 7.4 歳上昇していた。一方、新皮質型では、平均死亡年齢、平均罹病期間とも有意な著変は認めなかった。

#### D. 考察

1. レヴィー小体病の予後が改善したかどうかについては、移行型の平均死亡年齢が 76 歳から 83 歳に上昇した点は、予後の改善を示唆しているのか、高齢化を反映しているだけなのか、さらに検討が必要である。

脳幹型は、罹病期間は増加しているが、死亡時年齢が上昇していない理由は、早期に診断されるようになったこと、脳幹型、移行型、新皮質型の伸展が年齢に規定されていることを示唆している。

新皮質型の死亡年齢が変化していない点は、治療法が限られる点と関係する可能性がある。

2. PSP の率が臨床統計より高い原因としては、剖検で確認している要素が高いと考えられる。  
3. 正診率が上昇していない点については、PD と他院で診断され、Yahr IV 度以上で在宅介護のため紹介された例が多いことに起因する他に、パーキンソン症候群の鑑別診断が、依然として困難であることを反映している。

#### E. 結論

Lewy 小体病の中で移行型の死亡時年齢が 7.4 年上昇しているが、平均寿命の延長によるものか、治療効果かは更なる検討が必要である。

パーキンソン病、またはその類似疾患と一度診断がついた患者が通院先を変更したりすると、とかく外来医（一般内科医であればなおさら）は、新たな検索や評価はせずに、治療薬の継続投与をしがちである。

今回、1970 年代という古い時代の症例を一

部まとめたが、上記のような状況下であると、現代であっても画像検索が CT のみであったり、皆無である場合も生じうる。

したがって、今回行った検索は、現代においても有効な手法であり、得られた結果は臨床医にとって、変性疾患患者にどのようにアプローチしていくか、フォローアップしていくかの一助となりうる。今後多数例での検討が必要である。

#### F. 文献

1. McKeith I.G., et al., *Neurology*, p. 1113-1124, 1996
2. Braak H., et al., *Neurobiol Aging*, p. 197-211, 2003
3. Saito Y., et al., *J Neuropathol Exp Neurol*, p. 742-749, 2004
4. Hattori N, et al. *Neuropathology*, p. S85-90. 2000.
5. Yamamura Y, et al. *Neurology*, p. 239-44. 1973.
6. 山村安弘ほか, *臨床神経学*, p. 491-6. 1993.
7. Mori H, et al. *Neurology*, p. 890-2. 1998.

#### G. 健康危険情報

なし

#### H. 学会発表

1. 仙石鍊平、ほか：第 47 回日本神経病理学会、岡山、2006
2. 仙石鍊平、ほか：第 47 回日本神経学会総会、東京、2006

#### I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

Table 1 : LB を認めず黒質に局限した変性をもつ 5 例

症例	年齢	性	付随病変	経過年数	発症年齢	Parkinsonism	L-dopa	その他
1	61	M	脳幹中心の軽微なタウ病変	26年	35歳	手指振戦	未使用	44歳時 Stereotaxic surgery
3	82	M	なし	不詳	不詳	不詳	使用したが効果の記載なし	
13	87	F	なし	不詳	不詳	不詳	不詳	
19	73	M	黒質の変性に左右差あり	約40年	30歳代	左手振戦	有効	
20	66	M	脳幹中心の軽微なタウ病変	2年	64歳	左上下肢筋強剛	未使用	

Table 2 : 1970 年代症例と最近症例との神経病理診断結果の比較

	1972年～1981年	最近例
	症例数(%)	症例数(%)
<b>Lewy小体病 (PD/ PDD/ DLB/ LB-PAF)</b>	25 (62.5)	27 (67.5)
合併例 +PSP	2	1
+ CBD	1	0
<b>黒質に局限した変性(Park2/8疑い)</b>	5 (12.5)	0
Lewy小体・タウ沈着なし	3	
脳幹中心の軽微なタウ病変	2	
<b>進行性核上性麻痺 (PSP)</b>	2 (5)	5 (12.5)
<b>大脳皮質基底核変性症 (CBD)</b>	1 (2.5)	1 (2.5)
<b>血管障害性パーキンソニズム</b>	3 (7.5)	5 (12.5)
<b>薬剤性パーキンソニズム</b>	4 (10)	1 (2.5)
<b>軽度アルツハイマー病</b>		1 (2.5)
	計40	計40

Table 3 : Lewy 小体病における 1970 年代症例と最近症例との比較

	1972—1981年 25例	1997—2006年 27例
女性:男性	9: 16	10: 17
平均死亡年齢	76.3±6.3 歳	80.4±6.4 歳
年齢幅	62-92 歳	65-92 歳
背景症例	(連続 2351例)	(連続 1410 例)
女性:男性	1169:1182	617:793
平均死亡年齢	77.2±9.1 歳	80.1±8.8 歳
Brainstem	7 例	4 例
平均死亡年齢	76.4±8.5 歳	74±6.2 歳
平均罹病期間	6.7±5.9 年	15.5±12.7 年
Transitional	12 例	10 例
平均死亡年齢	76.4±8.5 歳	83.8±3.4 歳
平均罹病期間	9.3±8.8 年	11±6.2 年
Neocortical	5 例	13 例
平均死亡年齢	79.6±9.9 歳	79.8±6.3 歳
平均罹病期間	6.5±3.3 年	10.1±4.2 年

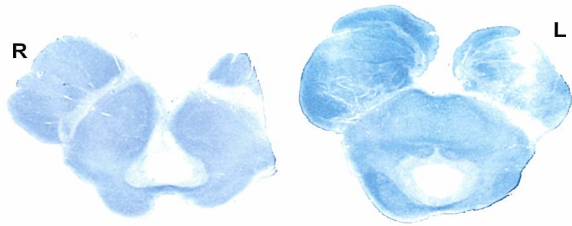


Fig. 1 : 中脳、KB 染色。

左：赤核レベル、右：滑車神経核レベル。

右側の黒質が萎縮している。

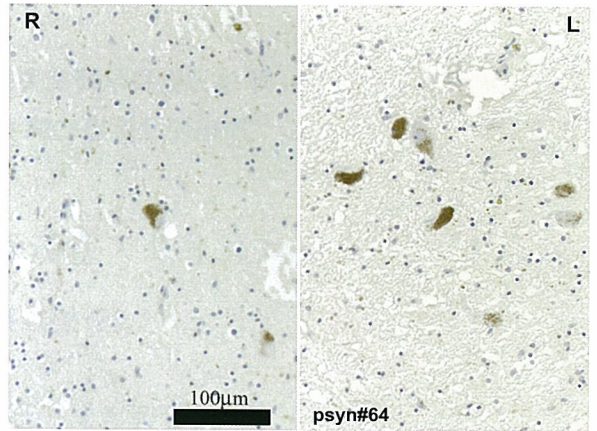


Fig. 4 : 黒質、抗リン酸化 $\alpha$ シヌクレイン抗体免疫染色。

両側とも、抗リン酸化 $\alpha$ シヌクレイン抗体免疫染色陽性の構造物を認めない。

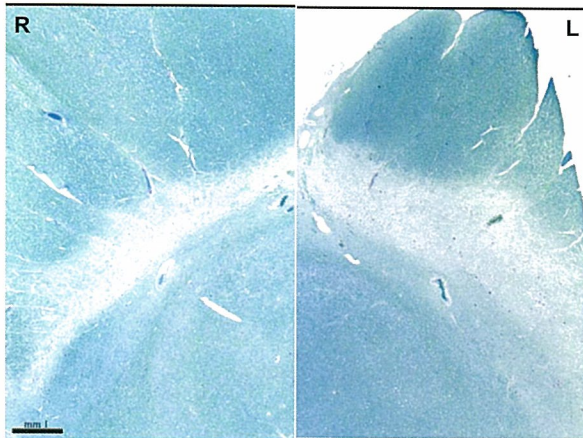


Fig. 2 : KB 染色。Fig. 1 左の標本の拡大図。両側ともに黒質のメラニン含有細胞は著明に減少している。

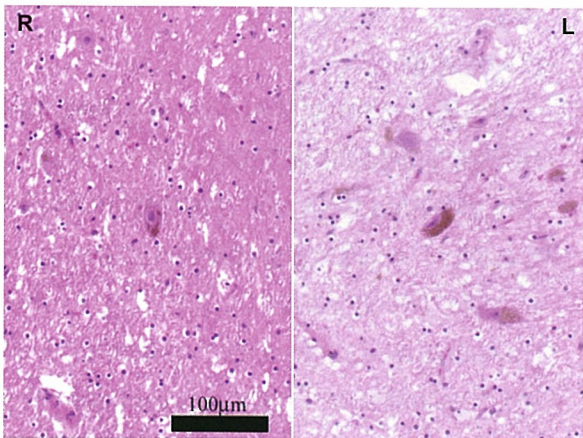


Fig. 3 : 黒質、HE 染色。

両側ともメラニン含有細胞数の減少を認めるが、特に右側において優位に減少。レヴィー小体は全く認められない。

## ミトコンドリア遺伝子の発現に対するパーキンの役割

（分担）研究者 梶 龍児<sup>1)</sup>

〔共同研究者〕 三ツ井貴夫<sup>1)</sup>、黒田 由紀子<sup>1)</sup>

1) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部感覚情報医学講座  
神経情報医学分野

### 研究要旨

パーキンの、ミトコンドリア遺伝子転写および転写後修飾に関する影響を検討した。野生型パーキンを神経系培養細胞に過剰発現させると、ミトコンドリア遺伝子の転写・複製が増加していた。パーキンは単独では転写因子としては機能しないが、mitochondrial transcription factor A (TFAM)と協調することで、その転写を促進し、さらに転写産物のポリアデニル化を促進した。以上のことから、パーキンはミトコンドリア遺伝子の転写および転写後修飾を介して、電子伝達系の機能を促進しうることが強く示唆された。

#### A.研究目的

我々はこれまでに、パーキンがミトコンドリアの biogenesis を促進することを報告してきた。本研究では、パーキンがミトコンドリア遺伝子の発現に対し、どのような作用を有するか、特に転写調節および転写後修飾に関する検討を行った。

#### B.研究方法

野生型パーキン遺伝子を培養細胞（COS-1, SH-SY5Y, RD）に過剰発現させ、ミトコンドリア遺伝子の発現をサザンおよびノザンブロットイング法で解析した。さらに、in vitro transcription 法により、パーキンがミトコンドリア遺伝子に対する転写因子として機能するか否かを検討した。また、パーキンはミトコンドリア遺伝子の転写産物に対し、転写後修飾をおこしうるか否かについても検討した。

#### （倫理面への配慮）

本研究は組換え DNA 実験を含んでいるが、これに

対する安全対策として、「大学等における組み換え DNA 実験指針」および「徳島大学遺伝子組換え DNA 実験安全管理規則」に基づき、承認を受けた後に専用施設内にて研究を実施した。

#### C.研究結果

野生型パーキンをドーパミン産生細胞である SH-SY5Y 細胞に過剰発現させると、ミトコンドリア由来の RNA, DNA および構成蛋白の増加が認められた。一方、他の培養細胞系の COS-1 では、いずれも明らかな変化は見られなかった。in vitro transcription 法ではパーキンは単独では転写因子としては機能しないものの、mitochondrial transcription factor A (TFAM)と協調することで、ミトコンドリア遺伝子の転写を促進した。さらに、精製パーキン分画はミトコンドリア遺伝子の転写産物に対し、ADP 存在下ではポリアデニル化をきたした。

#### D.考察

パーキンは TFAM の存在下ではミトコンドリア



遺伝子の転写を促進し、さらに転写産物に対し、これをポリアデニル化することで安定化させていることが示唆された。

#### E. 結論

パーキンはミトコンドリア遺伝子の転写および転写後修飾を介して、電子伝達系の機能を促進しうることが明らかとなった。

#### F. 文献

1. Kuroda Y et al. Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. Hum Mol Genet. 15(6):883-95, 2006.
2. Kuroda Y et al. Parkin affects mitochondrial function and apoptosis in neuronal and myogenic cells. Biochem Biophys Res Commun. 348(3):787-93, 2006.

#### G. 健康危険情報

該当せず

#### H. 学会発表

1. 黒田由紀子, 三ツ井貴夫, 國重 誠, 赤池雅史, 東博之, 松本俊夫: 新規パーキン結合蛋白のミトコンドリアへの移行能の検討。第47回日本神経学会総会、2006年5月
2. 三ツ井貴夫, 黒田由紀子, 國重誠, 松本俊夫: パーキンと Polynucleotide Phosphorylase との関連。第47回日本神経学会総会、2006年5月

#### I. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 出願中：新規なパーキン結合タンパクとその用途（平成16年9月22日出願、整理番号P04015）
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



## LRRK2 の機能解析

波田野 琢<sup>1)</sup>, 久保 紳一郎<sup>1)</sup>, 水野 美邦<sup>2)</sup>, 服部 信孝<sup>1,2)</sup>

### 研究要旨

常染色体優性型家族性パーキンソン病の原因遺伝子である *Leucine-Rich Repeat kinase 2 (LRRK2)* がコードする蛋白の細胞内局在と機能を解析した。免疫学的細胞染色と生化学的細胞分画法により LRRK2 はゴルジ装置, 分泌小胞などの細胞内小器官の膜に存在することを確認した。さらに膜に局在する LRRK2 は脂質ラフトと呼ばれる膜機能ドメインに結合している事を明らかにした。さらに病的変異型の局在は野生型と比較して局在を変える事は無いがエクソサイトーシスに影響を及ぼす事が示唆された。

### A. 研究目的

常染色体優性遺伝型パーキンソン病(ADPD)の一つである PARK8 の原因遺伝子として *Leucine-Rich Repeat Kinase 2(LRRK2)* が同定された<sup>1),2)</sup>。LRRK2 は ROCO family に属し約 280 kDa の巨大な蛋白で Rab like GTPase ドメイン, MAPKKK ドメインなど複数の機能ドメインが存在しているが局在, 機能に関してはほとんど知られていない<sup>3)</sup>。さらに PARK8 は家族性 PD の中で頻度が高く弧発型 PD に良く似た描像を示す。しかしながら一部の家系では同一内で多様な神経変性疾患の病理像を示すことも知られており LRRK2 蛋白の機能を明らかにすることで神経変性疾患の発症病態を解明する手がかりとなると期待されている<sup>2)</sup>。そのため, 今回われわれは LRRK2 の機能と細胞内局在を検討した。

### B. 研究方法

LRRK2 蛋白の C 末端 18 アミノ酸ペプチドをウサギに免疫させポリクローナル抗体を作成した。培養細胞と神経初代培養を用いて免疫細胞二重染色を行い共焦点蛍光顕微鏡で LRRK2 の細胞内局在を解析した。さらに, 培養細胞を当張バッファー内で sonication し

生化学的分画法を用い, 膜と細胞質に分画し western blot を行い内在性 LRRK2 の局在を検討した。さらに界面活性剤を含む脂質ラフトバッファーにマウス脳シナプトソームもしくは培養細胞を homogenate しシヨ糖勾配法を用いて脂質ラフトを分画し western blot で検討した。最後に LRRK2 の野生株と病的変異株を過剰発現系について免疫学的細胞染色と上記分画法で局在を検討し, HIT-T15 細胞にヒト成長ホルモンと LRRK2 の野生株もしくは G2019S と I2020T の病的変異株を同時に強制発現させ高カリウムバッファーによる刺激を加え, 分泌された成長ホルモンと細胞内の成長ホルモン量を ELISA で測定しその比率を解析しエクソサイトーシス機能を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験については順天堂大学動物実験倫理委員会の指針に沿って行なった。

### C. 研究結果

吸収試験による検討の結果, 今回作成した LRRK2 抗体は western blot, 免疫染色の両方で特異的に内

在性 LRRK2 を認識していることを確認した。COS-1 細胞, SH-SY5Y 細胞の免疫染色の結果 LRRK2 はゴルジ装置, 分泌小胞, 初期エンドソームなど膜構造を持つ細胞内小器官に多く存在していることが示唆された。生化学的分画法においても細胞質と膜の両方に分画された。なかでも膜分画に存在する LRRK2 は高濃度の塩では可溶化されるが, 界面活性剤により不溶性でありさらにショ糖勾配により分画したところ脂質ラフトに存在していることが示された。さらに, マウス脳により検討したところシナプトソームの細胞膜とシナプス顆粒に存在しさらに, 脂質ラフトに多量に存在していた。FLAG-tag を持つ LRRK2 の過剰発現系でも内在性の LRRK2 と同様に局在する事を確認し, さらに野生型と病的変異型の両方を比較した。病的変異型は野生型と同様に局在し, 脂質ラフトへの結合にも差は認めなかった。しかし, HIT-T15 によるエクソサイトosis アッセイでは野生型はエクソサイトosis の機能を抑制する一方で病的変異型はその機能を持たないことが確認された。

#### D. 考察

本研究より LRRK2 は脂質ラフトに存在しエクソサイトosis に関与している可能性があることが解明された。さらに病的変異型は局在は野生型と同じであるがエクソサイトosis の抑制機能を持たないことで LRRK2 関連家族性パーキンソン病の発症に関与していることが示唆された。LRRK2 は現在までの報告でやはり膜構造を持つ細胞内小器官に存在すると報告されており<sup>4), 5)</sup>, 病的変異型は LRRK2 内のキナーゼ活性が亢進し発症に関連していると報告されている<sup>4), 6)</sup>。LRRK2 は Rab like domain を持つ事を考えると膜輸送に関連している可能性が考えられる。さらに脂質ラフトはシグナル伝達や膜輸送に関連する膜機能ドメインとして注目を集めており<sup>7)</sup>, LRRK2 は脂質ラフトに結合する事で膜輸送などの機能に係わっている可能性がある。興味深い事にシナプトソームにおける脂質ラ

フトはエクソサイトosis, エンドサイトosis などに関連する蛋白が多く局在していることが報告されており<sup>8)</sup>, 我々の検討でも LRRK2 を過剰発現する事でエクソサイトosis に影響を与えていた。病的変異型は野生型と局在に変化は認めず脂質ラフトへの結合にも変化は無かった。しかしエクソサイトosis の抑制作用は認めず, gain-of-function による機能異常が神経変性に関連している可能性が考えられた。

#### E. 結論

脂質ラフトはアルツハイマー病やプリオン病など神経変性疾患に関連しているとされており<sup>9)</sup>,  $\alpha$ -シヌクレイン<sup>10), 11)</sup>, parkin<sup>12)</sup> が脂質ラフトに結合する事が知られている。今後脂質ラフトとパーキンソン病関連蛋白との相互作用を検討することでパーキンソン病の病態解明につながると思われる。

#### F. 文献

- 1) Paisan-Ruiz, C., *et al.* (2004) *Neuron*, 44, 595-600.
- 2) Zimprich, A., *et al.* (2004) *Neuron*, 44, 601-607.
- 3) Mata, I.F., *et al.* (2006) *Trends. Neurosci.*, 29, 286-293.
- 4) Gloeckner, C.J., *et al.* (2006) *Hum. Mol. Genet.*, 15, 223-232.
- 5) Biskup, S., *et al.* (2006) *Ann. Neurol.*, 60, 557-569.
- 6) Smith, W.W., *et al.* (2006) *Nat. Neurosci.*, 9, 1231-1233.
- 7) Brown, D.A. *et al.* (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14, 111-136.
- 8) Gil, C., *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 329, 117-124.
- 9) Simons, K., *et al.* (2002) *J. Clin. Invest.*, 110, 597-603

- 10) Fortin, D.L., *et al.* (2004) *J. Neurosci.*, **24**, 6715-6723.
- 11) Kubo, S.I., *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 31664-31672.
- 12) Fallon, L., *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 486-491.

#### G.健康危険情報

特になし

#### H.学会発表

波田野 琢ら. LRRK2 の細胞内局在に関する検討.  
第 47 回日本神経学会総会, 東京, 5 月 11 日-13 日,  
2006 年

Hatano, T., *et al.* LRRK2 binds cellular  
membranes. 10<sup>th</sup> International Congress of  
Parkinson's disease and movement disorders,  
Kyoto, 30 Oct. – 2 Nov. 2006

#### I.知的所有権の取得状況

特になし

## 抗 LRRK2 抗体作製の試み

長谷川 一子<sup>1)</sup>、一瀬 宏<sup>2)</sup>、豊島 至<sup>3)</sup>、柳下 三郎<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>国立病院機構・相模原病院、<sup>2)</sup>東京工業大学・大学院生命理工学研究科、  
<sup>3)</sup>秋田大学 医学教育センター

### 研究要旨

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機能は不明である。本研究では、LRRK2 の脳内分布、および、細胞内局在を明らかにするために抗 LRRK2 抗体の作製を行った。抗原としては LRRK2 のキナーゼドメインを用いた。得られた抗体はマウス脳抽出液に対するウエスタンブロッティングで全長の LRRK2 を認識した。マウス脳やヒト剖検脳に対して免疫組織化学的解析をおこなったところ、LRRK2 免疫反応性はドーパミンニューロンに限らず広く脳全体に分布していた。また、LRRK2 は細胞内において核や核周囲およびミトコンドリアなどに分布していることが明らかとなった。

### A. 研究目的

分担研究者の長谷川らは、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 12q11.2-q13.1 に絞り、2002 年に Park8 として認定された (1)。PARK8 は、孤発性パーキンソン病とほぼ同様の症状を示すことから、孤発性パーキンソン病の原因解明にもつながることが期待されている。

2004 年、2つの研究グループから、PARK8 の原因遺伝子として、*leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)* が同定された (2,3)。LRRK2 は 280kDa の分子量の大きなタンパク質であった。アミノ酸配列上、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 (4)。

しかしながら、LRRK2 の機能に関しては未だにほとんどわかっていない。LRRK2 の特異的抗体は LRRK2 の機能を解析するための有力なツールとなり、抗体を用いた脳内分布や細胞内局在の解析から、LRRK2 の機能に関する情報が得られると考えられる。今回われわれは、LRRK2 に対する特異的抗体の作製を行い、免疫組織化学的解析を行った。

### B. 研究方法

LRRK2 のキナーゼドメインを構成している 1838 番から 2134 番目までの 297 アミノ酸をグル