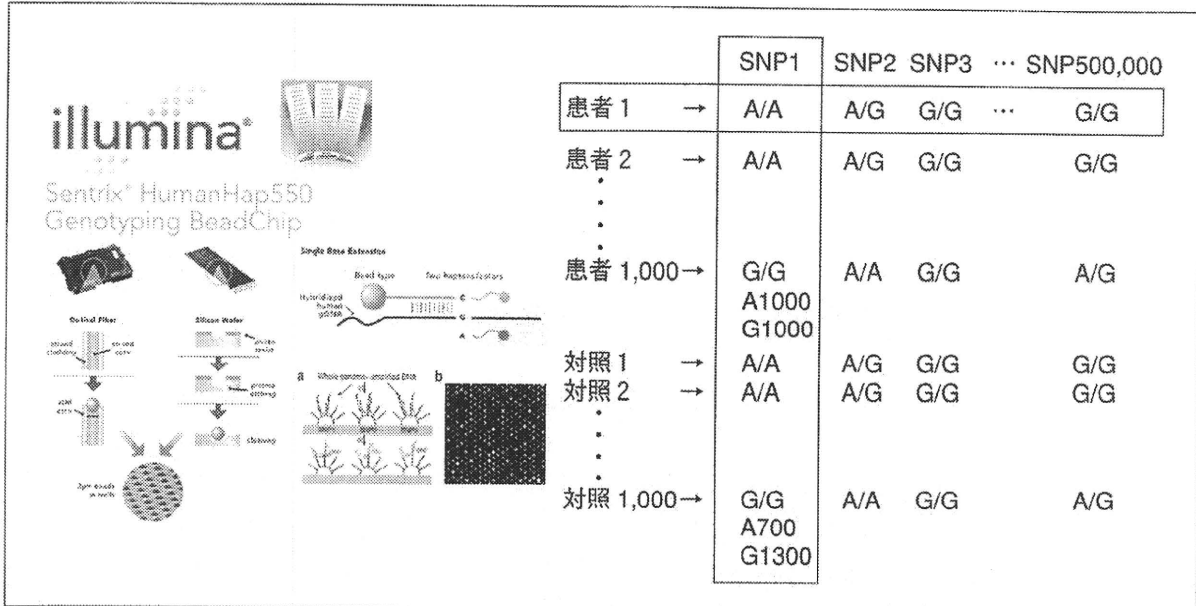


図1 SNP チップと SNP チップによるゲノムワイド関連解析 (GWAS) の原理



Illumina 社の BeadChip では、断片化したゲノム DNA を SNP 部分を 3' 末端に持つビーズにハイブリダイズさせ、さらに 1 塩基伸長反応が起きると蛍光を発する。例えば患者 1,000 人、対照 1,000 人、計 2,000 人各人の 50 万個の SNP の遺伝子型を決定する。すなわち SNP チップとして 2,000 枚の実験を行う (各 1 枚は横四角に相当)。それぞれ SNP1, SNP2, ..., ずつ、患者、対照におけるそれぞれのアレルの出現頻度を合計し (縦四角に相当)、偏りがないかどうかの検定を行う。SNP1 の患者で有意に A アレルが多い。

きたが、アルツハイマー病における ApoE4 多型のような確実に発症リスクを高める遺伝因子はなかなか確認されていなかった。ゲノムワイド有意水準 ($p < 5 \times 10^{-7}$) を満たす確実なもの、 α -synuclein の 3' 非翻訳領域 (2006 年筆者ら²⁾、Gasser ら³⁾ が同定) とゴーシェ病遺伝子 GBA (後述) の 2 つの遺伝子のみであった。

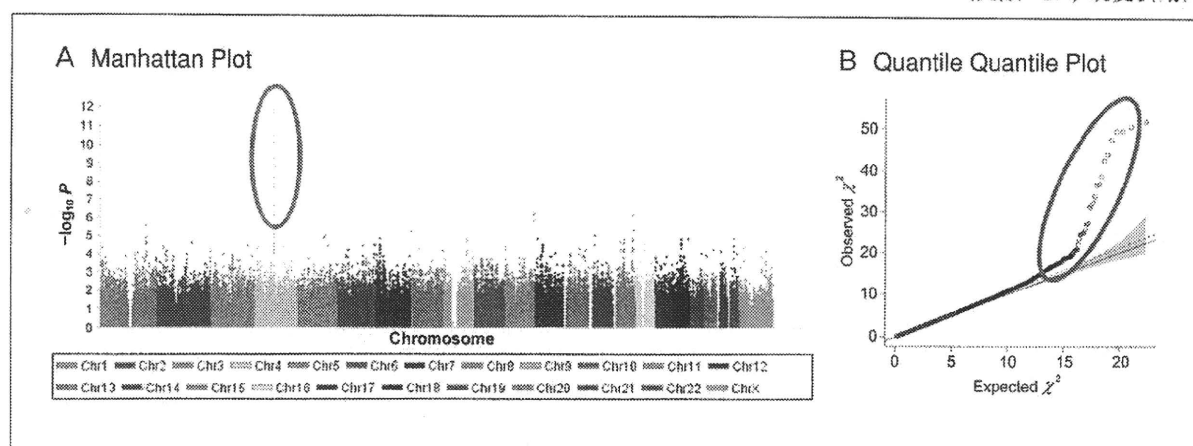
ゲノムワイド関連解析とは

各人種の 1 塩基多型 (SNP) に基づく多様性を調べる「国際 HapMap 計画」によると、日本人と白人は約 25~30 万個のタグ SNP (これを調べれば連鎖不平衡で結ばれた近傍の多くの SNP の代表になるもの) でほぼ全ゲノムの遺伝子がカバーされる⁴⁾。つまり約 30 万個のタグ SNP を患者と対照で調べれば、ほぼ全ゲノムの遺伝子を調べたことになる。技術の進歩は急速であり、1 枚の DNA チップに 50~100 万個の SNP を搭載した

SNP チップも登場し、ハイブリダイゼーションベースの実験で、1 人の 50 万個の SNP の遺伝子型が 2 日で決定できるようになった (Illumina 社、Affymetrix 社など) (図 1)。これらのチップは HapMap SNP の約 90% をカバーしている。この SNP チップを用いてゲノムワイド関連解析 (genome wide association study: GWAS, ドイツ語風にジーバスと発音する) を行うのである。

具体的には、例えば患者 1,000 人、対照 1,000 人、計 2,000 人各人の 50 万個の SNP の遺伝子型を決定する。すなわち SNP チップとして 2,000 枚の実験を行う。それぞれ SNP1, SNP2, ..., ずつ、患者、対照におけるそれぞれのアレルの出現頻度を合計し、偏りがないかどうかの検定を行うのである (図 1)。現在、この SNP チップを使った各疾患の GWAS が続々と報告されている。パーキンソン病に関しても 30~50 万 SNP チップの GWAS が数個論文報告されているが、

図2 ゲノムワイド関連解析 (GWAS) ステージ —患者 988 検体, 対照 2,521 検体の測定結果—

(文献⁶⁾より改変引用)

A : Manhattan Plot. 横軸が染色体物理距離, 縦軸が $-\log P$ (上へ行くほど関連が強い). 1つの点が1つの SNP を示す.

B : Quantile Quantile Plot. 横軸が帰無仮説下での予想 χ^2 値, 縦軸が観察 χ^2 値で, 各 SNP を散布プロットしたもの.

少~中人数の解析であり, これらの論文では確実なことは言えなかった⁵⁻⁷⁾.

パーキンソン病の大規模 GWAS

そこで我々は, 世界最大規模の患者対照集団と 56 万個の SNP を搭載した Illumina Hap550 アレイを用いて, GWAS と2つの独立な再現研究を行い, パーキンソン病の遺伝危険因子を明らかにしようとした. 患者検体は 11 施設より提供され, 総数としては患者 2,011 検体, 対照 18,381 検体を用いた. まず GWAS ステージとして, 患者 1,078 検体, 対照 2,628 検体について, それぞれ 56 万個の SNP 型を決定した (図2)⁸⁾.

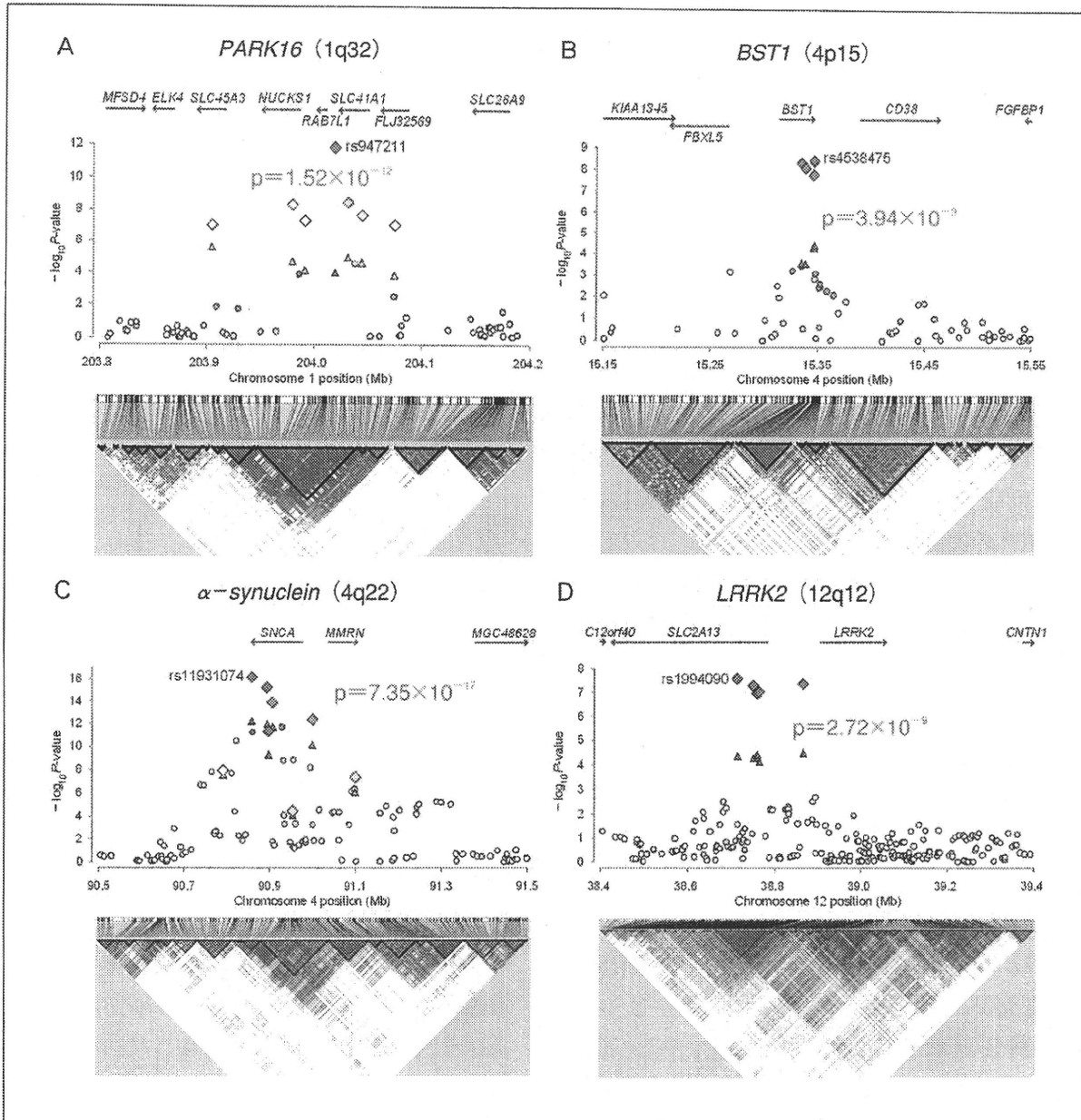
検体および SNP について, 厳格な品質管理 (IBS 検定による非日本人・隠れた血縁者の抽出, SNP や検体のジェノタイプ成功率・マイナーアレル頻度・Hardy-Weinberg 平衡の検討) を行った. これらの品質管理フィルターを通過した高品質な患者 988 検体, 対照 2,521 検体の 435,470 SNP のジェノタイプを用いて, 自由度 1 の Cochran-Armitage trend 検定を行った. GWAS ステージの検

定では, $p < 5 \times 10^{-7}$ のゲノムワイド有意水準を超える遺伝子は α -synuclein のみであった (図2A) もの, その一方で Quantile-Quantile 解析からは, α -synuclein 以外の領域の SNP においても, 帰無仮説のもとで予想される χ^2 統計量分布からの有意かつ強力なインフレーションを観察した (図2B). このことは, これらインフレートした SNP の中に真なる感受性遺伝子座が存在していることを意味している.

そこで, GWAS ステージで関連を認めた p 値上位から 337 SNP それぞれが, 2つの独立した患者・対照検体セットでも有意か否かを検証する再現研究を行った. さらに, 全検体 (パーキンソン病 2,011 検体, 対照 18,381 検体) のジェノタイプデータを用いて, Cochran-Mantel-Haenszel 検定によるメタ解析を行ったところ, 絶対的な有意水準 $p < 5 \times 10^{-8}$ をクリアする4つのパーキンソン病感受性遺伝子座がハイライトされた (図3)⁸⁾.

我々は, 2つの新しいパーキンソン病感受性遺伝子座を, 1q32 (*PARK16* と命名, $p =$

図3 日本人パーキンソン病患者 2,011 検体, 対照 18,381 検体を解析し, 同定された4つのパーキンソン病遺伝子座 (文献³⁰より改変引用)



このうち2つ (A, B) は全く新規の領域であった。特にAは非常に強い関連を示し、白人集団でも関連が再現されたことから、*PARK16*と名づけた。また残りの2つは、常染色体優性遺伝性パーキンソニズムの原因遺伝子 *α-synuclein* (C) と *LRRK2* (D) を含む領域が同定された。縦軸は $-\log P$ 、すなわち上に行くほど関連が強い。

1.52×10^{-12} , 図3 A) と 4p15 ($p = 3.94 \times 10^{-9}$, 図3 B) に発見した。1q32 領域は、3つの遺伝子 (*NUCKS1*, *RAB7L1*, *SLC41A1*) を含む連鎖不平衡ブロックであるが、発現量的形質座 (eQTL) 解析から *NUCKS1* が最も有力な責任遺伝子であると考えた。また、

4p15 領域は *BST1* のみを含んでいた。さらに、常染色体優性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子である *α-synuclein* (4q22, $p = 7.35 \times 10^{-17}$, 図3 C) と *LRRK2* (12q12, $p = 2.72 \times 10^{-8}$, 図3 D) の領域を同定した。*α-synuclein* は、我々も以前報告した確実な

パーキンソン病感受性遺伝子である。また本研究で初めて、*LRRK2* 領域のありふれた多型がゲノムワイド水準でパーキンソン病と関連することが示された。これら4座位 (1q32, 4p15, 4q22, 12q12) の人口リスク寄与度は、それぞれ 13%, 8%, 18%, 3%と見積もられた⁸⁾。

次に我々は、我々と並行してヨーロッパ起源の集団のパーキンソン病の GWAS 研究を行っていたグループとデータを交換した。彼らの研究では、*α-synuclein* 領域、*Tau* 領域のみに強い関連が検出されていた⁹⁾。そこで我々の発見した *PARK16*, *BST1*, *LRRK2* の再現研究を依頼したところ、*PARK16* と *LRRK2* の関連は強く再現されたが、*BST1* は再現されなかった⁹⁾。逆に、我々は彼らの検出した *Tau* の関連の再現を試みたが、我々の検体セットでは再現されなかった。よって、*α-synuclein*, *PARK16*, *LRRK2* は2人種に共通のパーキンソン病リスクであり、*Tau*, *BST1* のリスク多型の影響は人種特異的であると考えた⁸⁾。

新規感受性遺伝子について

PARK16 領域には3つの遺伝子が存在するが、eQTL 解析から、*NUCKS1* が最も有力な責任遺伝子であると考えた。*NUCKS1* は、リン酸化部位を含む核タンパク質であるが、神経系における機能は未知であり、新たなパーキンソン病発症の経路を開拓する可能性がある¹⁰⁾。

BST1 は、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵からの Ca^{2+} 放出を誘発するサイクリック ADP リボースの形成を触媒する酵素であり¹¹⁾、最近提唱されているドパミン細胞死の Ca^{2+} ストレス説を想起させ、興味深い¹²⁾。これらは従来のパーキンソン病病態説からは全く新規な遺伝子であり、従来説にとらわれず新規なものを同定できるところに GWAS の強みがある。

図4 ゴーシェ病変異とパーキンソン病

	GBA 変異		計
	+	-	
パーキンソン病	50 (9.4%)	484	534
対照	2 (0.37%)	542	544

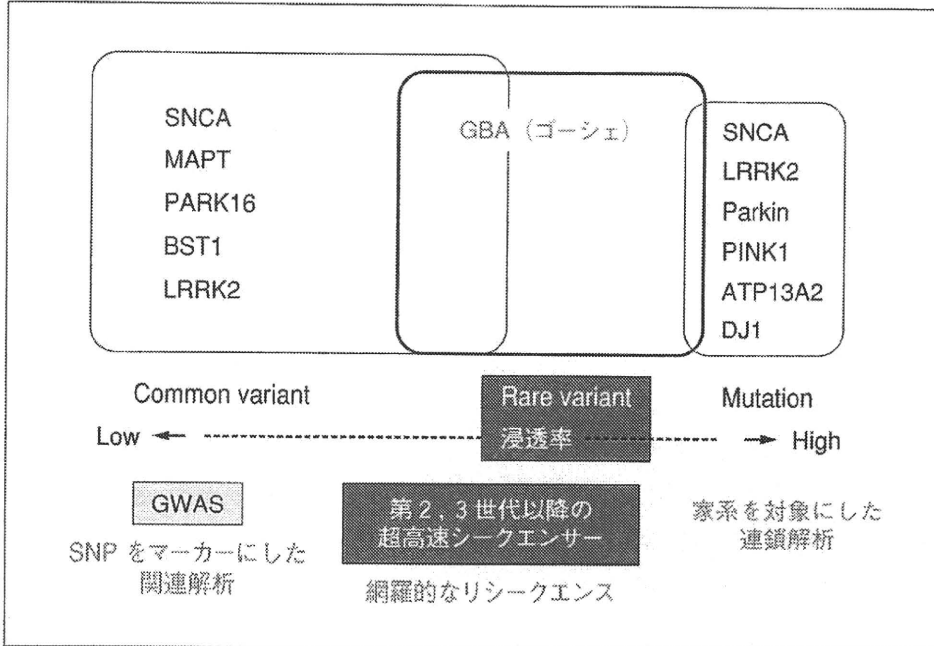
$p=6.9 \times 10^{-14}$
OR=28.0 (7.3~238.3)

GBA 遺伝子変異をヘテロで持つ保因者はパーキンソン病患者 534 人中 50 人 (9.4%)、対照 544 人中 2 人 (0.37%) であり、パーキンソン病と GBA 変異は強く関連していた ($p=6.9 \times 10^{-14}$, オッズ比 28.0)¹³⁾。

LRRK2 の関連のピークは上流領域であるので、プロモーター活性に影響を及ぼしているかもしれない。これらは、新たな治療ターゲットとしても注目される。*Tau* 領域で観察されたパーキンソン病リスクの人種差は、ヨーロッパではほぼ選択的に広がった H2 ハプロタイプに起因する。H2 はパーキンソン病保護ハプロタイプと考えられるが、我々日本人は H2 を持たない (つまり、リスクしかない)¹³⁾。

我々のデータは、孤発性パーキンソン病の発症に常染色体優性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子が密に関係していることを明示した。原因変異により常染色体優性遺伝性パーキンソン病を引き起こす遺伝子が、そのありふれた多型を通して典型的パーキンソン病の遺伝リスクとなったことは興味深い。このような関係は、パーキンソン病を越えて他の疾患に対しても当てはまるのかもしれない⁸⁾。

図5 パーキンソン病の原因遺伝子



メンデル遺伝性変異以外に, common variant として α -synuclein (SNCA), PARK16, BST1, LRRK2, rare variant としてゴーシェ病遺伝子 (GBA) が重要.

まれな多型 (rare variant) とゴーシェ病

SNP をマーカーに連鎖不平衡を利用して行われる GWAS は, common disease-common variants 仮説に基づくが, 頻度が非常に低くしかも多数の変異が疾患と関連する場合, そのような遺伝因子は多型との連鎖不平衡による検出が難しく, GWAS ではつかまえない. このような考えを common disease-multiple rare variants 仮説と呼ぶ.

リピドーシスの常染色体劣性遺伝のユダヤ人ゴーシェ病家系内にパーキンソン病患者が多いことから, パーキンソン病では GBA (glucocerebrosidase, 1q21) 変異のヘテロ保因者が有意に多いことが報告された¹⁴⁾. その後, パーキンソン病における GBA 遺伝子変異の保因者頻度を調べた研究が世界中で行われている. 東京大学神経内科 辻 省次教授らと筆者らの共同研究グループは, GBA 遺伝子の全 11 エキソンとその近傍をパーキンソン病患者 534 人, 対照 544 人リシーケ

ンスして塩基配列変化の有無を調べ, 11 種類の疾患原性点変異が同定された. ヘテロで持つ保因者はパーキンソン病患者 534 人中 50 人 (9.4%), 対照 544 人中 2 人 (0.37%) であり, パーキンソン病と GBA 変異は強く関連していた ($p=6.9 \times 10^{-14}$, オッズ比 28.0) (図4)¹⁵⁾.

パーキンソン病患者で同定された変異は, 日本人ゴーシェ病で見られる変異の分布とはかなり異なっていた. GBA 変異を持つパーキンソン病患者の発症年齢 (52.5 ± 7.4) は, 変異を持たないパーキンソン病患者の発症年齢 (58.8 ± 10.7) よりも有意に低かった ($p < 0.001$). 親子または同胞でパーキンソン病を発症している 34 家系について GBA 変異を調べたところ, 5 家系 (14.7%) において家系内の患者で共通の変異が見られた¹⁵⁾.

さらに, 全世界でのアメリカ人, フランス人, ポルトガル人, 台湾人など計約 10,000 人の患者対照集団とのメタ解析により, どの人種にても GBA 遺伝子はリスクとなり平均

オッズ比は5であった¹⁰⁾。GBA 変異は確実なパーキンソン病危険因子であり、common disease-multiple rare variant 仮説によるものである。すなわち、頻度は低いが発症への effect size が大きい (図5)。リスクとなる原因は不明であるが、単なる酵素活性低下ではなく、変異 GBA のタンパク質分解機構への負担によることも推定されている。

おわりに

おそらく数十個あるパーキンソン病の疾患感受性遺伝子としては、 α -synuclein, GBA, 今回の PARK16, BST1, LRRK2 以外に確立されたものは少ないのが現状であり、今後の GWAS からさらなる遺伝子の解明、そこから新たな疾患経路とそこからの治療薬開発が期待される (図5)。

しかし現在の SNP チップによる GWAS では、アレル頻度の低いものは同定不可能であり (搭載されていない)、GBA などの rare variant は見過ごされてしまう。エキソキャプチャー、次世代シーケンサーによるエキソームリシーケンスが行われだしており、期待される。また近年、自閉症、統合失調症¹⁷⁾などが、ゲノム中にたくさん存在するコピー数多型 (CNV) と関連するとする報告があり、精神神経疾患には SNP 以外にある程度の割合で multiple rare variant, CNV が関連している可能性も考えられる。

さらに、SNP チップやリシーケンスにより全ゲノム的に薬剤効果に関与する多型が数多く同定され、それらをミックスで搭載したカスタムの薬剤効果判定チップの臨床応用が期待される。

文 献

- 1) Sveinbjornsdottir S, et al: Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med* 343: 1765-1770, 2000.
- 2) Mizuta I, et al: Multiple candidate gene analysis identifies α -synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 15: 1151-1158, 2006.
- 3) Mueller JC, et al: Multiple regions of α -synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 57: 535-541, 2005.
- 4) International HapMap Consortium: A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449: 851-861, 2007.
- 5) Maraganore DM, et al: High-resolution whole-genome association study of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 77: 685-693, 2005.
- 6) Fung HC, et al: Genome-wide genotyping in Parkinson's disease and neurologically normal controls: first stage analysis and public release of data. *Lancet Neurol* 5: 911-916, 2006.
- 7) Pankratz N, et al: Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Hum Genet* 72: 593-605, 2009.
- 8) Satake W, et al: Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 41: 1303-1307, 2009.
- 9) Simón-Sánchez J, et al: Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* 41: 1308-1312, 2009.
- 10) Ostvold AC, et al: Molecular cloning of a mammalian nuclear phosphoprotein NUCKS, which serves as a substrate for Cdk1 *in vivo*. *Eur J Biochem* 268: 2430-2440, 2001.
- 11) Yamamoto-Katayama S, et al: Crystallographic studies on human BST-1/CD157 with ADP-ribosyl cyclase and NAD glycohydrolase activities. *J Mol Biol* 316: 711-723, 2002.
- 12) Surmeier DJ: Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 6: 933-938, 2007.
- 13) Zody MC, et al: Evolutionary toggling of the MAPT 17q21.31 inversion region. *Nat Genet* 40: 1076-1083, 2008.
- 14) Aharon-Peretz J, et al: Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease

- in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 351: 1972-1977, 2004.
- 15) Mitsui J, et al: Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 66: 571-576, 2009.
- 16) Sidransky E, et al: Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 361: 1651-1661, 2009.
- 17) Stefansson H, et al: Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* 455: 232-236, 2008.
-

Susceptibility Genes for Sporadic Parkinson's Disease

Tatsushi Toda, Wataru Satake

Division of Neurology/Molecular Brain Science,
Kobe University Graduate School of Medicine

楯 林 賞

新しい抗パーキンソン病薬ゾニサミドの発見

村田 美穂*

要旨：偶然の臨床経験をきっかけに抗てんかん薬ゾニサミドの抗パーキンソン効果を発見した。ゾニサミドは抗てんかん薬としての常用量よりもきわめて少ない、25mg 1日1回投与で進行期パーキンソン病患者の運動症状を著明に改善し、長期的にも効果を維持することが可能であり、2009年1月ついに抗パーキンソン病薬として認可された。抗パーキンソン作用の出現機序としては、現時点までにチロシン水酸化酵素 mRNA 発現増加をともなうドパミン合成亢進と中等度のモノアミン酸化酵素阻害作用を明らかにし、T型Caチャネル阻害作用の関与が推定された。さらにゾニサミドは各種パーキンソンモデルで神経保護効果を示した。ゾニサミドは強力にドパミンキノン生成を抑制するが、これはS100β分泌を介した非活性型グリア増殖作用、およびグリアのシスチン・グルタミン酸トランスporter発現増加作用を介してグルタチオン増加を示すことによることを明らかにした。さらに、ゾニサミドは強力な抗apoptosis作用を示した。今後、ゾニサミドの神経保護作用について臨床的に検証すること、SNP検索などをもちいて抗パーキンソン効果の個人差の機序を明らかにしていく必要がある。

(臨床神経 2010;50:67-73)

Key words：ゾニサミド、パーキンソン病、ドパミン合成、神経保護作用

はじめに

ゾニサミド（以下ZNS）はわが国で開発された抗てんかん薬で、わが国ではすでに20年以上の使用経験があり、近年は難治性てんかんに対し欧米、韓国など広く世界中で使用されている。筆者は2000年にてんかん発作を併発したパーキンソン病（以下PD）患者で抗てんかん薬ZNSがパーキンソン症状を著明に改善することを経験したことをきっかけに、臨床試験、作用機序の解明を進め、ZNSは2009年ようやく抗パーキンソン病薬（トレリーフ®）として認可された。PDは症状や薬の効果がわかりやすく、アマンタジンに先例があるように、日々の臨床の中での観察が新たな薬物の開発につながることに遭遇しやすい疾患であるともいえる。本研究はまさに日常臨床のなかの小さな発見が新たな薬物の開発につながったもので、ここではこれまでの研究の流れと今後の展望について述べる。

ZNSのパーキンソン症状改善効果の発見

1990年代後半はL-dopa長期治療による問題点に対し、わが国でも複数のドパミン受容体刺激薬が使用可能となり、予後は改善しつつあった。しかし筆者は、ドパミン受容体刺激薬の薬価が海外に比較しても非常に高額であること、欧米に比較してわが国にこれらの薬剤が導入されるのに非常に時間が

かかることなどが大きな問題であり、薬価が安くしかもL-dopa長期治療の問題点を改善できるような薬剤をわが国から発信することができないかと、常に考えていた。

そのようなおり、48歳発症経過9年で前傾姿勢、無動がめだつPDの男性患者がてんかん発作を併発した。バルプロ酸600mgでコントロール不十分であったため、ある程度長期にわたり十分な抗てんかん薬でコントロールする必要があると考え、神経保護作用が報告されていたZNSを試すことにした。2000年2月からバルプロ酸から徐々にZNSに変更したところ、ZNS100mgで姿勢、筋強剛が改善、1カ月後200mgにて入浴、トイレもほぼ自立、さらに300mgに増量したところ、日常生活動作は完全に自立となった。その後やや眠気があったため、ZNS200mgに減量したが、ADLは自立、筋強剛、無動、歩行障害とも改善は持続した¹⁾。この間にバルプロ酸は漸減中止したが、ZNS開始以後てんかん発作は消失した。

症状の改善が著明でしかも持続したこと、ZNSは海馬、線条体でドパミン量を増加させることが報告されていた²⁾こと、血液脳関門の通過がきわめて良好で、半減期が約60時間と長い薬剤である³⁾ことから、L-dopaの効果が明らかでかつwearing-off症状のある患者を対象とすることがこの薬剤の抗PD効果をもっとも評価しやすいと考え、当時、筆者が在籍していた東京大学医学部の倫理委員会承認のもと、平均発症年齢57.0歳、平均罹患期間9.7年、平均ヤール重症度on時2.3度、off時3.6度の9例（うち7例にwearing-offあり）のPD患者を対象にオープン試験をおこなった¹⁾。ZNSはそれまで

*Corresponding author: 国立精神・神経センター病院神経内科〔〒187-8511 東京都小平市小川東町4-1-1〕

国立精神・神経センター病院神経内科

(受付日：2009年11月26日)

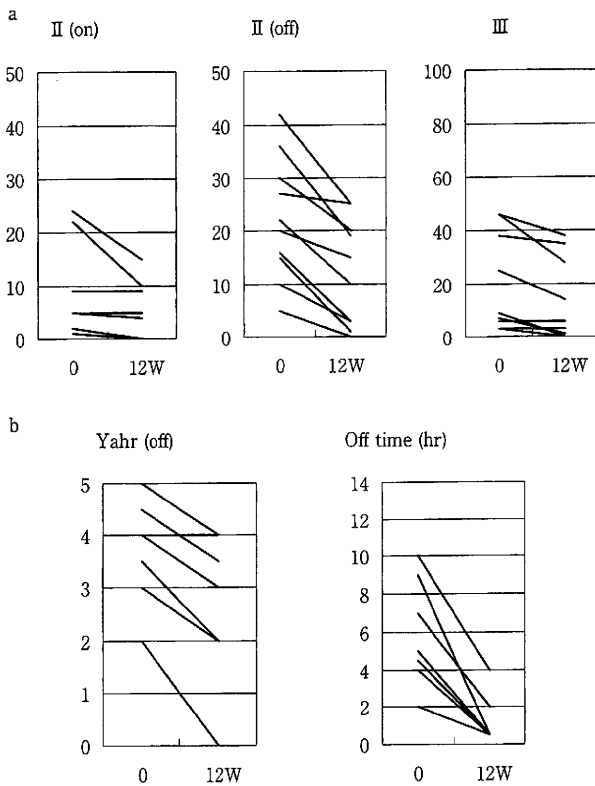


Fig. 1 Zonisamide effects on patients with Parkinson disease; an open trial.

Effects were evaluated at 0 and 12 weeks after zonisamide administration was begun.

a: Effects of UPDRS (II (on), II (off) and III (on))

b: Effects of Yahr staging (off) and Off time per day

の抗PD薬に追加するかたちで50~200mg/日(50mg:2例, 100mg:5例, 200mg:2例)投与した。その結果, Fig. 1a,bに示すように, とくにオフ時のADLおよびYahr重症度, オフ時間の著明な改善をみとめた。オン時の運動症状改善もみとめたが, 元々他の薬剤でオン時はかなりよくしている患者が多かったために, むしろオフ時の改善がめだったものと考えた。副作用は軽度の不随意運動の増加と口渇のみであった。この結果をもとに, 製薬元製薬企業に働きかけ, 以下の臨床治験を進めた。

ZNSの抗PD効果

1) 二重盲検試験

L-dopa服用中にwearing-off現象や効果の減弱などの問題が出現している進行期PD患者を対象にすでに投与されている抗PD薬にZNSを加えるかたちで, 3本のプラセボ対象二重盲検試験をおこなった。

探索的試験はZNS 50mg, 100mg, 200mgと偽薬群の4群比較で合計136人と小規模でおこなった⁵⁾。平均年齢62.9歳, 平均罹患期間10.0年, 平均ヤール重症度on時2.5, off時3.6であった。ZNS 50mg群ではUPDRS IIIの有意な改善をみとめ

た。200mg群では眠気, 幻覚などが偽薬群より有意に頻度が高かったが, 50mg, 100mgでは有意差はなかった。探索的試験の結果は非常に良かったが, 偽薬効果も高かったため, これ以後の臨床試験はすべて二重盲検試験である上に患者には試験期間中のどこかに2週間, 全員必ず偽薬期間があると説明し, 実際には最初の2週間に単盲検の偽薬期間をつくるという非常に厳しい形式を採用することにした。

探索的試験の結果を受けて, ZNS 25mg, 50mg, 100mgと偽薬の4群比較試験を合計347人の大規模二重盲検試験をおこなった⁵⁾。この結果, 平均年齢64.4歳, 平均罹患期間8.6年, 平均ヤール重症度on時2.5, off時3.5の進行期パーキンソン病患者で, ZNSを加えることにより, UPDRS IIIは25, 50mg群で有意に改善(placebo: -2.0 ± 0.8 , 25mg: -6.3 ± 0.8 , 50mg: -5.8 ± 0.8 , 100mg: -4.6 ± 0.8), wearing-offのoff時間は50, 100mg群(placebo: -0.2 時間, 25mg: -0.22 時間, 50mg: -1.30 時間, 100mg: -1.63 時間)で有意な改善をみとめた⁵⁾。一方で不随意運動, 幻覚など副作用の発現率は25, 50mg群では偽薬群と有意差はなく, 眠気などがやや多い程度であった。

さらに当局の指導によりL-dopa製剤の効果が減弱してきた患者で, かつ, L-dopa製剤に加えもう1剤抗PD薬を服用している患者185名を対象にZNS 25mg, 50mg, 偽薬の3群比較の二重盲検試験をおこなった。患者は平均年齢64.8歳, 平均罹患期間7.5年, 平均ヤール重症度on時2.7, off時3.5で, 90%がL-dopa製剤にドパミン受容体刺激薬を併用していた。UPDRS IIIが30%以上改善した患者の割合であるresponder rateは前回試験と同様に50mg群がもっとも高かったが, UPDRS IIIの変化の平均値は, 治験完了例では25mg, 50mg群ともほぼ同程度で偽薬群に比較して有意な改善であったが, 50mg群は脱落例がややめだち, ITT (intention to treat) 解析では50mg群は有意差をみとめることができなかった($p=0.073$)ため, 25mg ($p=0.029$)のみが承認となった。なお, 第III相では, 承認申請のための時間的制約から, 患者日誌によるoff時間の改善効果については評価できなかったが, 25mg群でoff時のADLの有意な改善をみとめた⁶⁾。

これらの3本の臨床試験の結果はいずれも平均罹患期間8年前後で, L-dopa製剤に, ドパミン受容体刺激薬(約90%), MAOB阻害薬(約50%)を併用しているにもかかわらずコントロール不十分の進行期の患者にZNS 25~50mgを1日1回追加投与することで運動症状が改善することを示している。さらにwearing-off現象については1日1回50~100mg投与で, これらの患者に安全かつ有意にoff時間を短縮させることができることが示された。しかも, 進行期にもかかわらず著明な運動症状の改善に比較して, 不随意運動や幻覚の出現がさわめて低く, 不随意運動改善例も少なくなかったことは特筆すべきと考えられる。

2) 長期効果

平均罹患期間8.7年, 平均年齢64.3歳, 全例L-dopaを服用中でさらに90%以上にドパミン受容体刺激薬が併用されて

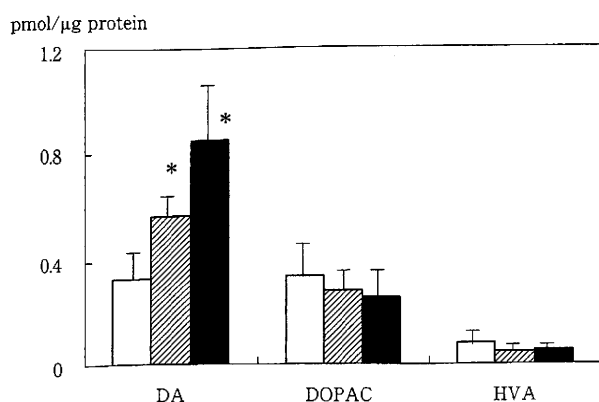


Fig. 2 Effects of the levels of dopamine and its metabolites in rat striatum.

Vehicle (□) (n=4), zonisamide treatment of 20 mg/kg/day (▨) (n=3), or 50 mg/kg/day (■) (n=5) to rats for 14 days resulted in significant dose-dependent elevation of the levels of dopamine in the striatum. There were no significant differences in the DOPAC or HVA level.

*: p < 0.05 compared with vehicle. Values are mean + SD.

いる、二重盲検試験とはほぼ同様の患者を対象になされた1年間のオープン試験(長期試験)では、ZNSはUPDRS II(on), II(off), III, I-IVの総合スコアとも4週間後から有意に改善し、経過とともに52週間後までさらに改善する傾向にあった。Yahr重症度も16週から有意に改善し、52週までさらに改善する傾向にあった⁷⁾。進行性の変性疾患であるPDにおいて平均罹患期間約9年と進行期の患者で、1年間にわたり症状がより改善する傾向にあったことは高く評価できよう。

さらに、著者が初期から経過観察してきた患者では、進行期でも65%は3年以上にわたり投与開始前よりも良い状態を維持できていた⁸⁾。ZNSを5年以上投与した8例(平均ZNS投与期間7.3年、平均罹患期間14.5年)でもZNS追加後3年目以降、他の抗PD薬の追加、増量はあるものの、観察期間中にon時のYahr重症度がZNS投与前より悪化した症例は1例のみであった。一方、体重減少の副作用をうたがひ、ZNS投与開始4年目に一時中止した症例では明らかな症状悪化をみとめ、再開にて改善したことから、ZNSの抗PD作用は進行期であっても、比較的長期間効果は持続すると考えられた。

作用機序

作用機序を明らかにするために、正常ラットにZNS 20, 50 mg/kg/day 2週間経口投与し、最終投与2時間後に断頭、線条体を摘出し、1) HPLC-ECDにてドパおよび代謝産物の定量、2) Hendry & Iverson法⁹⁾によりチロシン水酸化酵素(tyrosine hydroxylase; TH)活性測定、3) western blot法によりTH蛋白量定量をおこなった。さらに、SH-SY5Y細胞をもちい、 1×10^6 /wellの通常培養後、培養液中にZNS 0, 20μMを添加し、3, 6, 12, 24時間後にTH、ドパ脱炭酸酵素(dopa dehydroxylase; DDC)蛋白量定量(western blot法)および、

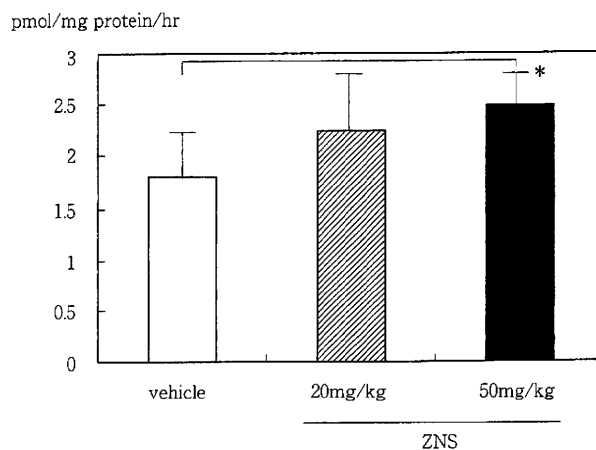


Fig. 3 Effects of zonisamide on TH activity.

Zonisamide treatment (50 mg/kg/day) resulted in a significant increase in TH activity. (n=4, each group)

*: p < 0.05 compared with vehicle. Values are mean + SD.

THmRNA定量(real time PCR法)をおこなった。さらに、T型Caチャンネル阻害作用との関連を明らかにするために、T型Caチャンネル阻害剤であるNiCl₂ 100μMおよびT型CaチャンネルとリンクするSKチャンネル阻害薬のapamin 300nMをもちいて同様の実験をおこなった。

線条体内ドパミン濃度は20mg/kg、50mg/kg両群で有意に増加したが、DOPAC、HVAは有意な変化はなかった(Fig. 2)。一方TH活性(対照群; 1.81 ± 0.45 , 20mg/kg; 2.24 ± 0.62 , 50mg/kg; 2.49 ± 0.37 pmol/mg protein/hours, Fig. 3)およびTH蛋白量(129%, p<0.05)はZNS 50mg/kg群で有意に増加した。SH-SY5Y細胞での検討では、TH蛋白量は24時間後にZNS群で有意に増加し(129%, p<0.05)、THmRNA/GAPDHmRNAはこれに先行して12時間後にZNS群で有意に増加した。さらに、NiCl₂およびapaminも同様の時間経過で有意にTHmRNAおよびTH蛋白量の増加を示した¹⁰⁾(Fig. 4, 5)。一方、DDC蛋白量には変化はなかった。

なお、ZNSの半減期はヒトでは60~90時間と長いがラットでは6時間と短い³⁾。ラットでの50mg/kg/d投与では最高血中濃度(投与後2時間後)は平均30.0μg/mlで、24時間後は約4.0μg/mlと推定された。PD患者での50mg 1日1回服用で定常状態での血中濃度は 3.5 ± 1.4 μg/mlであったため、SH-SY5Y細胞をもちいた実験ではより低めの20μM(4.2μg/ml相当)でおこなったが、ラットでの結果と同様、明らかにTH蛋白量、THmRNA量などの増加をみとめた。

一方、ZNSは、ドパミン受容体(D1, D2S, D2L, D3, D4.2, D4, 7, D5)、セロトニン受容体(5HT1, 2, 3, 4, 5A, 6, 7)、アドレナリン受容体(α1, α2, β)、アデノシン受容体(A1, A2A, A2B)、グルタミン酸受容体(AMPA, kainate, NMDA)への親和性はみとめなかった¹⁰⁾。また、MAO活性に対するIC₅₀はラットでは肝臓マイクロゾーム分画では200μMであるが、線条体では27μMと中枢と末梢で著明な差があり、しかも、カンクイザルの線条体分画では、ドパミンを基質とすると、10μM

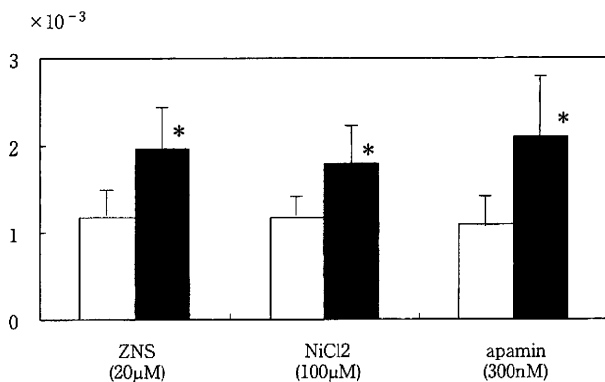


Fig. 4 Effects of zonisamide, NiCl₂ and apamin on the TH mRNA/GAPDH mRNA ratio in SH-SY5Y cells. Treatments of SH-SY5Y cells with zonisamide (20µM), NiCl₂ (100µM) and apamin (300nM) caused a significant increase in the TH mRNA/GAPDH mRNA ratio at 12 hours after zonisamide administration. (n=6, each group)
*: p < 0.05 compared to control. Values are mean + SD.

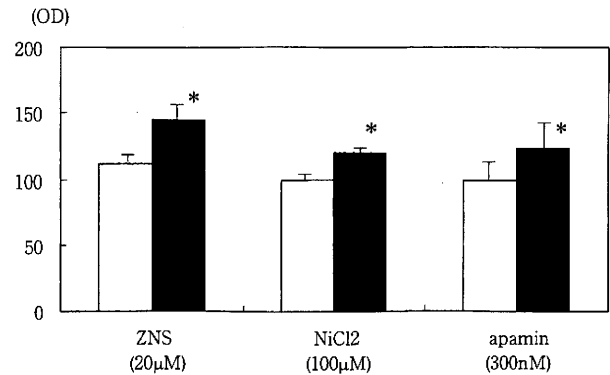


Fig. 5 Effects of zonisamide, NiCl₂ and apamin on the levels of TH protein in SH-SY5Y cells. Treatments of SH-SY5Y cells with zonisamide (20µM), NiCl₂ (100µM) and apamin (300nM) caused a significant increase in TH immunoreactivity at 24 hours after zonisamide administration. (n=3, each group)
*: p < 0.05 compared to control. Values are mean + SD.

と、PD患者での投与量で中等度のMAO阻害作用を示すと考えられた。

ZNSはNaチャンネル阻害作用、T型Caチャンネル阻害作用および、間接的なグルタミン酸受容体阻害やGABA受容体刺激作用を持つ¹⁰⁾。T型Caチャンネル阻害剤であるNiCl₂およびリンクするSKチャンネル阻害薬であるapaminがZNSと同様な時間経過でTHmRNA/GAPDHmRNAおよびTH蛋白質量を増加させたことから、ZNSによるドパミン合成亢進作用はT型Caチャンネルを介してTHmRNA発現亢進が関与すると考えた。

以上より、ZNSはTHmRNA発現増加を介してドパミン合成亢進作用を示し、また中等度のMAOB阻害作用を持つことが明らかとなり、これがZNSの抗PD作用の作用機序の一つと考えられた。ZNSのもつ間接的なグルタミン酸受容体阻害作用は運動症状の改善に比較してdyskinesiaの出現が少ないことに関与している可能性がある。また、T型Caチャンネル阻害作用は黒質ドパミンニューロンのバースト発火をふやす¹¹⁾¹²⁾ことから、フィードバックによりドパミン合成を亢進している可能性がある。さらにZNSはL-dopa不応性の振戦にも効果がある¹³⁾が、三輪らはZNSの抗振戦作用はドパミン受容体遮断薬には影響されないことを報告¹⁴⁾している。T型Caチャンネル阻害剤が振戦を改善することが報告されており¹⁵⁾ZNSの抗振戦作用にはT型Caチャンネル阻害作用が関与している可能性が高い。

さらに、2003年からの厚生労働科学研究費難治性疾患克服研究事業「日本発の新しい抗パーキンソン作用薬ゾニサミドの臨床研究」の共同研究のなかで、野元らは線条体でのドパミン量は細胞内のみならず、細胞外液中でも増加することをマイクロダイアリス法をもちいて確認した¹⁶⁾。また、南部らはMPTPによるPDモデルサルにおいて、ZNSがPDでみとめる淡蒼球、視床下核の異常発火パターンの正常化作用をもつ

こと、スライス実験および、線条体、淡蒼球へのZNSの直接投与実験の結果から、ZNSの作用点は黒質および、線条体と考えられることを明らかにした¹⁷⁾。

最近、てんかんとパーキンソン病におけるZNSの効果出現濃度の違いに注目し、ドパミン放出増加がおきない低濃度ZNSの線条体灌流により、淡蒼球でのGABA低下、視床下核でのGABA増加、黒質網状層でのグルタミン酸増加など、エンケファリン受容体のδ1 agonistと同様の作用をえられることから、ZNSはδ1 agonistとして作用し、これが抗パーキンソン効果の作用機序の一つである可能性が報告されている¹⁸⁾。δ1も作用点の一つであることは、ZNSが運動症状改善効果に比較して同様にドパミン系刺激によると考えられる不随意運動や幻覚が少ないことを説明する仮説として魅力的といえる。

ZNSの神経保護作用

ZNSの神経保護作用は1980年代から報告されており、90年代にはてんかんモデルや脳虚血モデルにおける抗酸化作用、ラジカスカルベンジャー作用について多数報告¹⁰⁾され、筆者が第1例目にZNSを投与するきっかけともなったが、ドパミンニューロンに関する神経保護作用については知られていなかった。これについては厚生労働科学研究費難治性疾患克服研究事業「新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの神経保護作用に関する臨床研究」の共同研究のなかで、様々な新たな知見がえられた。まず、6OHDA、MPTPによるPDモデルマウス¹⁹⁾、マーモセット¹⁶⁾および、PD自然発症マウスとされるEngrailed-1 (+/-)、Engrailed-2 (-/-)のダブルミュータントマウス²⁰⁾において、ZNSはin vivoで明らかなドパミン細胞死を抑制する作用を示した。マウス線条体に6OHDAを投与3週後にZNS (50mg/kg, i.p.)を1週間投与したところ、

ZNSは有意にドパミン神経障害に対し保護作用を示した¹⁹⁾。この神経保護作用の機序として、ZNSはグリアを介して線条体のグルタチオンを著明に増加させ、さらにこれによりL-dopa誘発性キノン体生成をほぼ完全に抑制することを明らかにした¹⁹⁾²¹⁾。これはZNSを併用することで、PD治療中のL-dopa毒性に対する懸念を払拭できることを示唆している。ZNSのグルタチオン増加作用は神経細胞の単独培養ではみとめられないにもかかわらず、*in vivo*で明らかであった。これをきっかけにZNSがS100β分泌を介して非活性型グリアの増殖作用を示すこと、およびグリアのシスチン・グルタミン酸トランスポーター(xCT)の発現増加を介してアストログリアでのグルタチオン合成基質であるシスチンとりこみを増加させその結果、ニューロンでのグルタチオンを増加させることがわかった¹⁹⁾。

南部らが示したEngrailedダブルミュータントマウスにおけるZNSのドパミン神経保護作用はapoptosis抑制作用によると考えられるが、服部らはSH-SY5Y細胞をもちいて、ZNSが高濃度ドパミンやMPP+毒性に対し、強い神経保護作用を示し、その機序として、PI3K/Akt系を介して著明なMnSOD増加作用を示すことを明らかにした²²⁾。これに関連してごく最近Costaらは、ZNSが線条体神経細胞に対し16~30μMレベルでは興奮抑制作用を、1~10μMレベルではミトコンドリア complex Iの障害に対して保護作用を示すことを報告している²³⁾。

今後の展望

ZNSは多機能製剤で、抗PD効果出現の機序としてもTH合成亢進作用、MAO阻害作用、T型Caチャンネル阻害作用など複数の作用が関与しているが、神経保護効果についても様々な段階で作用を示すことがみえてきた。まだまだ未知の作用機序があることも考えられ、抗PD薬として認可され、今後使用頻度が増える中で、詳細に検討していく必要がある。抗PD効果、神経保護効果については、臨床の中でどのような患者にもっとも効果が出やすいかをみきわめていく必要がある。また抗PD効果については、治験のIIb/IIIで50~100mgでの明らかなoff時間短縮効果をえられたにもかかわらず、現在25mgのみが承認されていることから、より高用量でのZNSのwearing offに対する効果を明らかにする必要がある。さらに、ZNSは進行期でありながら驚くほど高い効果を示す患者がいる一方で、明らかな効果をえられない患者も少数ながらおり、この薬物反応性の個体差を明らかにする必要がある。すでに、班研究のなかで、戸田らはSNP解析により薬物反応性に関与すると考えられる候補遺伝子を複数みだしており²⁰⁾、今後患者数を増やして検討を進めたい。

神経保護効果については、国際的にもPDにおける神経保護効果の評価法が確立していないことが大きな問題点である。今後この評価方法を確立し、PD患者におけるZNSの神経保護効果について明らかにしていきたい。また、これまでの研究結果からZNSの神経保護作用はドパミン神経以外への

効果も示唆され、他の神経変性疾患への応用も可能と考えている。

おわりに

新たな薬剤の開発には莫大な費用がかかる。基礎研究の中で発見された薬剤は動物実験で高い効果をえられても、治験に持ち込むためには高度な毒性実験が不可欠でこれのみで数億円を要する。一方、他の疾患のために開発された薬剤の新たな適応をみいだす方法は、すでに安全性が確認されていることもあり比較的廉価で、しかも日々の臨床の中での発見が薬剤開発に生かせるという点で臨床家にとってはきわめて醍醐味が大きい。ある薬物の効果はその作用に注目しての評価により明らかにされているだけで、注目されていなかった別な作用を持つことは充分ありえ、これが副作用にもまた新たな薬物としての開発の手がかりにもなりえる。神経疾患の多くは症状が誰の眼にも明らかであることが多いので、別な疾患の治療中に神経疾患の症状が良くなったことに本人や家族が気付くことはありえることで、PDのみならず神経疾患は一般に臨床での経験が新たな薬剤開発につながりやすい疾患といえよう。ZNSが抗PD作用をもつことを発見したのはまったくの偶然であった。しかし、このような「発見」は実は身近にあるのに気がついていないだけかもしれない。注意深い臨床的な観察と事実を科学的、論理的に分析すること、それに少しの思い込みにより、誰にも新たな「発見」のチャンスはあるものと思われる。本稿が今、目の前にあるかもしれないその新たな発見の気づきに少しでも役立てれば幸いである。

謝辞：本研究はまず患者さんとそのご家族からの情報により始めることができました。患者さんはじめ、治験や研究にご参加いただいた先生方その他多くの皆様のご指導、ご協力でこれらの成果を挙げることができたことをこの場をお借りして深く感謝いたします。とくに終始ご指導いただいた国立精神・神経センター名誉総長金澤一郎先生、大学院生として初期の基礎実験と一緒に進めてくれた現国立病院機構相模原病院神経内科堀内恵美子博士に深謝いたします。本研究は2003年より6年間の厚生労働科学研究費難治性疾患克服研究事業「日本発の新しい抗パーキンソン作用薬ゾニサミドの臨床研究」「新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの神経保護作用に関する臨床研究」の成果です。班員の岡山大学浅沼幹人准教授、和歌山県立医科大学近藤智善教授、大阪大学(現神戸大学)戸田達史教授、生理学研究所南部篤教授、愛媛大学野元正弘教授、国立病院機構相模原病院長谷川一子医長、順天堂大学服部信孝教授に深謝いたします。

1997年より榊林神経科クリニックで晩年の榊林博太郎先生にご指導いただいた者として、今回の榊林賞の受賞は望外の喜びです。ドブスの生みの親である榊林先生にZNSが抗PD薬として世に出たことをお伝えできたらどんなにか喜んでくださることだろうと思います。この受賞を機に、パーキンソン病患者さんのために今後一層臨床、研究に精進することを誓い、稿を終わらせていただきます。

文 献

- 1) Murata M, Horiuchi E, Kanazawa I. Zonisamide has beneficial effects on Parkinson's disease patients. *Neurosci Res* 2001;41:397-399.
- 2) Okada M, Kaneko S, Hirano T, et al. Effects of zonisamide on dopaminergic system. *Epilepsy Res* 1995;22:193-205.
- 3) Matsumoto K, Miyazaki H, Fujii T, et al. Absorption, distribution and excretion of 3-(sulfamoyl [14C] methyl)-1, 2-benzisoxazole (AD-810) in rats, dogs and monkeys and of AD-810 in Men. *Arzneimittelforschung* 1983;33:961-968.
- 4) Murata M, Hasegawa K, Kanazawa I. Randomized, double-blind study of zonisamide with placebo in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord* 2004;19(Suppl 9): S198.
- 5) Murata M, Hasegawa K, Kanazawa I, The Japan Zonisamide on PD Study Group. Zonisamide improves motor function in Parkinson disease. A randomized, double-blind study. *Neurology* 2007;68:45-50.
- 6) Murata M. Pharmacologic treatment of Parkinson disease. *Brain Nerve* 2009;61:464-472.
- 7) Murata M, Hasegawa K, Kanazawa I, et al. Long-term efficacy and safety of zonisamide in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord* 2007;22(Suppl 16):S240.
- 8) Murata M, Kanazawa I. Long-term efficacy and safety of zonisamide on Parkinson's disease: up to 9 years. *Mov Disord* 2009;24(Suppl 1):S271.
- 9) Hendry IA, Iversen LL. Effect of nerve growth factor and its anti serum on tyrosine hydroxylase activity in mouse superior cervical sympathetic ganglion. *Brain Res* 1971; 29:159-162.
- 10) Murata M. Novel therapeutic effects of the anti-convulsant, zonisamide, on Parkinson's disease. *Curr Pharmaceu Design* 2004;10:687-693.
- 11) Wolfart J, Neuhoff H, Franz O, et al. Differential expression of the small-conductance, calcium activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neuron. *J Neurosci* 2001;21:3443-3456.
- 12) Wolfart J, Roeper J. Selective coupling of T-type calcium channels to SK potassium channels prevents intrinsic bursting in dopaminergic midbrain neuron. *J Neurosci* 2002;22:3404-3413.
- 13) Nakanishi I, Kohmoto J, Miwa H, et al. Effect of zonisamide on resting tremor resistant to antiparkinsonian medication. *Brain Nerve* 2003;55:685-689.
- 14) Miwa H, Hama K, Kajimoto Y, et al. Effects of zonisamide on experimental tremors in rats. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14:33-36.
- 15) Yang Z, Barrow JC, Shipe WD, et al. Discovery of 1, 4-substituted piperidines as potent and selective inhibitors of T-type calcium channels. *J Med Chem* 2008;51:6471-6477.
- 16) Yabe H, Choudhury ME, Kubo M, et al. Zonisamide increases dopamine turnover in the striatum of mice and common marmosets treated with MPTP. *J Pharmacol Sci* 2009;110:64-68.
- 17) 村田美穂. 日本発の新しい抗パーキンソン作用薬ゾニサミドの臨床研究班. 平成 15-17 年度総合研究報告書. 2006 年 3 月.
- 18) Yamamura S, Ohoyama K, Nagase H, et al. Zonisamide enhances delta receptor-associated neurotransmitter release in striato-pallidal pathway. *Neuropharmacology* 2009;57:322-331.
- 19) Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, et al. Neuroprotective effects of zonisamide target astrocyte. *Ann Neurol* in press.
- 20) 村田美穂. 新規抗パーキンソン病薬ゾニサミドの神経保護作用に関する臨床研究班. 平成 18-20 年度 総合研究報告書. 2009 年 3 月.
- 21) Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, et al. Preventing effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinone formation. *Neurosci Res* 2008;60: 106-113.
- 22) Machida Y, Hattori N, Mizuno Y, et al. A novel function of anti-epileptic drug, Zonisamide on Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006;21(supple 15):S612.
- 23) Costa C, Tozzi A, Luchetti E, et al. Electrophysiological actions of zonisamide on striatal neurons: Selective neuroprotection against complex I mitochondrial dysfunction. *Exp Neurol*. Epub 2009 Nov 11.

Abstract**The discovery of an antiparkinsonian drug, zonisamide**

Miho Murata, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, National Center Hospital of Neurology & Psychiatry

We serendipitously found that zonisamide (ZNS), an antiepileptic agent, has beneficial effects on Parkinson disease. A 25 mg once a day of ZNS (200-600 mg/day for epilepsy), significantly improves motor function of advanced patients with Parkinson disease. Its effects maintained at least one year even in patients with advanced stage.

It was finally approved as an anti parkinsonian agent in Japan on January 2009. As the mechanism of anti-parkinsonian effects of ZNS, we showed that ZNS increases dopamine contents in the striatum by activating dopamine synthesis through increasing the levels of tyrosine hydroxylase (TH) mRNA and TH protein. It moderately inhibits monoamine oxydase (MAO) activity. ZNS shows significant inhibition on T-type Ca^{++} channel. It may also affect the beneficial effects of ZNS on Parkinson disease. ZNS also showed neuroprotective effects on several parkinsonian models. It markedly inhibited quinoprotein formation and increased the level of glutathione by enhancing the astroglial cystine transport system and/or astroglial proliferation through S100 β . We will verify the neuroprotective effects of ZNS on patients with Parkinson disease and study the factors responsible for the individual difference of the effects of ZNS by using genome wide association study (GWAS) in the near future.

(Clin Neurol 2010;50:67-73)

Key words: Zonisamide, Parkinson disease, dopamine synthesis, neuroprotection

<教育講演 3>

ここまでわかったパーキンソン病 (PD) の成因 — 遺伝性 PD の病態からわかったこと

服部 信孝 久保紳一郎

要旨：パーキンソン病 (PD) のほとんどは、遺伝歴のない孤発型が主体となっている。しかしながら、近年の分子生物学の進歩により単一遺伝子異常にともなう遺伝性 PD (FPD) が存在することがわかり、現在では単一遺伝子異常にともなう FPD の遺伝子産物の機能解析から孤発型 PD の病態解明へ繋げようとする戦略が盛んにおこなわれるようになった。1983 年の 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) によるパーキンソニズムの報告以来、PD の病態解明は加速的に進んでいる。一方で、依然真の要因については解明にいたっていないといわざるをえない。しかしながら、FPD の研究から Lewy 小体の主要構成成分である α -synuclein 分子の発見、parkin 分子の発見により ubiquitin-proteasome pathway の関与、更には Park9 の ATP13A2 の発見で autophagy-lysosomal pathway も黒質ドパミン神経変性に関与していることがわかった。少なくとも二大蛋白分解系が神経変性に重要な役割をなしていることが推定される。更に劣性遺伝性 FPD の遺伝子産物 PINK1、DJ-1 はミトコンドリア機能にかかわっていることが推定されており、parkin もふくめて神経変性の機序にミトコンドリア機能が関与していることが考えられている。おそらく FPD の遺伝子産物は、共通カスケードを形成していると推定される。黒質神経変性の機序は、まさしく FPD の機能解明から今解き明かされようとしている。

(臨床神経, 47: 774-778, 2007)

Key words: ユビキチン・プロテアソーム系, オートファジー・リソソーム系, レビー小体, 遺伝性パーキンソン病, 遺伝子産物機能

はじめに

パーキンソン病 (PD) は、アルツハイマー病 (AD) に次いで頻度の高い神経変性疾患である。1817 年に James Parkinson が、その著書「Shaking Palsy」の中ですでに PD の臨床症状のほとんどを詳細に記載している。しかしながら、最近の臨床研究では、少なからずの PD 患者が認知症を合併することが明らかにされ、単にドーパミン神経のみならずセロトニンやコリン作動性神経にも病変の広がりがあることがわかった。現在では、単に movement disorders の疾患とせず neuropsychiatric disorders と捉える必要が強調されている。PD のほとんどは遺伝歴のない孤発型とされてきた。ところが最近のデータでは、環境因子と遺伝的素因の相互作用により発症することが推定されており、遺伝子の関与は少ないことが予想されている。また、疫学調査によれば、全年齢過程を考慮すると同胞発症者がいれば更に発症者が出現するリスクは 1.7 倍といわれている。66 歳以下にすると 2.6 倍にリスクが増えるとの報告がある¹⁾。FPD の最新のデータでは、13 の遺伝子座、そして 7 つの原因遺伝子が単離・同定されている (Table 1)。この FPD の遺伝子産物の機能から、黒質神経脱落の共通機序が明らかにされようとしている。本稿では、FPD の機能解明から推定される神経変性の機序について解説したい。

1. 封入体形成について：優性遺伝性パーキンソン病を中心に (α -シヌクレインと LRRK2)

優性遺伝性パーキンソン病 (ADFPD)、代表的な原因遺伝子として α -シヌクレインや LRRK2 (leucine-rich repeat kinase²⁾ が上げられる。現在では、PD に特徴的な病理所見である Lewy 小体の主要成分として α -シヌクレイン蛋白が同定され、以後、 α -シヌクレインに関する知見は大幅に前進を遂げ、遺伝子変異や遺伝子コピー数が増えた multiplication の機序により α -シヌクレイン蛋白の異常凝集が³⁾ おこり、PD が発症することが証明されている。この遺伝子変異による病理所見は、脳内に広範囲に Lewy 小体が出現し、認知症を呈し若年発症で急激に進行するケースもみとめられる。その臨床症状は孤発型よりも、より重篤な⁴⁾ あいがある。点変異型は、きわめてまれな変異であるが、多重遺伝子コピー数による FPD は、わが国でもその存在が確認された⁵⁾。おそらく世界的に分布していると考えられる。この遺伝子コピー数の増えたタイプは、遺伝子の高発現が、発症の鍵となる⁶⁾ が推定される。更に病理学的検討もなされ、グリア細胞にも α -シヌクレイン陽性の封入体の存在が確認されている。これら所見は、multiple system atrophy (MSA) の病態にも α -シヌクレインの過剰発現が関与している可能性を示している。更に 2006 年、

Table 1 遺伝性パーキンソン病の一覧

Genetic Symbol	Mode of Inheritance	Chromosomal Location	Gene Name	Frequency of Familial PD	Frequency of Sporadic PD
SNCA (PARK1, PARK4)	AD	4q	SNCA	< 0.5%	—
PARK2	AR	6q	Parkin	10-20%	Rare
PARK3	AD	2p	?	?	—
PARK5	AD	4p	UCHL-1	Rare	—
PARK6	AR	1p	PINK1	2-7%	Rare
PARK7	AR	1p	DJ1	1-2%	Rare
PARK8	AD	12p-q	LRRK2	5-10%	2%
PARK9	AR	1p	ATP13A2	?	—
PARK10	Susceptible gene	1p	?	?	—
PARK11	AD	2q	?	?	—
PARK12	Susceptible gene	Xq21-25	?	—	—
PARK13	AD	2p	NRAT2	Rare	—

Mizutaらより、日本人孤発型PDEの大規模SNPs解析がおこなわれ、 α -シヌクレイン蛋白をコードする遺伝子領域SNCAのintron 4に、 $p=5.0 \times 10^{-10}$ という統計学的有意差をもって危険因子となる遺伝子多型が同定された³⁾。この報告からも、 α -シヌクレインは家族性パーキンソン病のみならず、孤発型においても何らかの有力な発病因子となっている可能性が推測できる。そしてこのSNPを持つとmRNAの発現が増加することが確認されている。 α -シヌクレイン遺伝子の発現増加が、発症の危険因子となることが孤発型でも証明されたことになる。

LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) 遺伝子変異は、我が国の常染色体優生遺伝性パーキンソン病の大家系(相模原家系)により候補領域が絞りこまれ、近年二つのグループから原因遺伝子が同定された。LRRK2遺伝子は51のexonをふくみ、2,527個のアミノ酸からなるLRRK2蛋白をコードする。発現はubiquitousであるが、その量は脳よりも心臓、肝臓、肺で比較的多い。われわれの最新のデータでは、脂質ラフトに局在していることが判明しており、変異型の局在は正常型と変化がないことから、gain-of-function型効果が発症にかかわっていることが想定される⁴⁾。機能面から考えると、キナーゼ活性の関与が注目される。現在では世界中の多くの家系で20種類以上の変異型が確認されており、高齢発症のFPDにおいてもっとも多い変異である。代表的な変異としては、MAPKKKドメイン内にG2019S、I2020Tが存在する。G2019S変異は、家族性パーキンソン病の中で3~40%程度の頻度でみとめている。LRRK2遺伝子変異による臨床症状は、L-Dopaに対する反応性の良好な典型的なパーキンソン症状を呈し、経過は比較的緩徐であり、孤発性PDとの区別が困難であるばあいも多い。特徴的な病理所見として、臨床像は比較的均一であるにもかかわらず、多様な病理像を呈することが上げられる。孤発

型PDでもみとめられる中脳黒質の神経細胞脱落に加え、Lewy小体のみとめないものから広範囲にみとめられるものまでその出現は多様である。さらにADや進行性核上性麻痺などでみとめられるタウ蛋白の異常沈着もみとめられる症例もあり、種々の神経疾患の病理像が混在した所見を呈している。このため、LRRK2はシヌクレインパチーに加え、タウオパチーにおいても重要な蛋白であることが推測され、PDをふくめた神経変性疾患全般の病態を解明する上で重要な蛋白である。

最近、アジア人(台湾人、中国漢民族、日本人)のみでLRRK2のexon48内に孤発型PDの危険因子となるG2385RというSNPが報告されている。 $p=1.24 \times 10^{-4}$ という有意差で、危険因子としては変異型が同定されている。このSNPを所有したばあい、約2.6倍の危険率で発症しやすくなる⁵⁾。未だ、LRRK2遺伝子変異やSNPがPDの発症過程においてどのように関与するのかわからないが、LRRK2遺伝子の臨床および基礎的研究がFPDのみならず、孤発型パーキンソン病の発症メカニズムの解明、治療の開発につながる可能性を示唆している。

2. 黒質神経脱落における蛋白分解系の関与 —劣性遺伝性PDを中心に

優性遺伝性PDでは、遺伝子産物が封入体形成に直接的に関与していることが推定されている。一方、parkinを代表とする劣性型PDでは封入体形成が一般にみとめられないことが報告されている。そしてそのparkinは、蛋白分解系の一反応系ユビキチン・プロテアソーム系に関与していることがわかっている。蛋白分解系のユビキチン化にはリジン48番、63番そしてモノユビキチン化がある (Fig.1)。最近のデータで

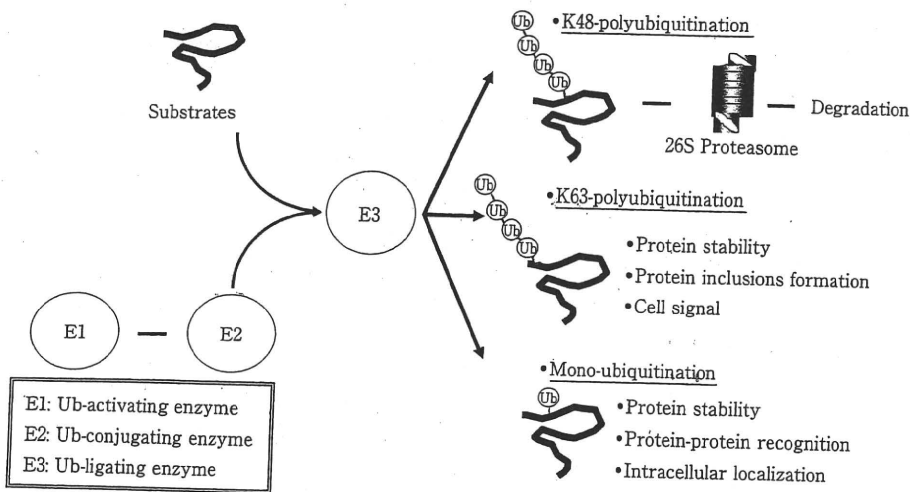


Fig. 1 蛋白分解系には、ユビキチンのリジン残基 48 番, 63 番, モノユビキチン化の三種類が存在する。48 番目のリジン残基のポリユビキチン化は、蛋白分解系のシグナルになる。一方, 63 番のポリユビキチン化は、封入体形成に関与している可能性が指摘されている。そしてモノユビキチン化は、細胞内局在にかかわっている可能性が指摘されている。Parkin は、すべてのユビキチン化機能を持つとされている。

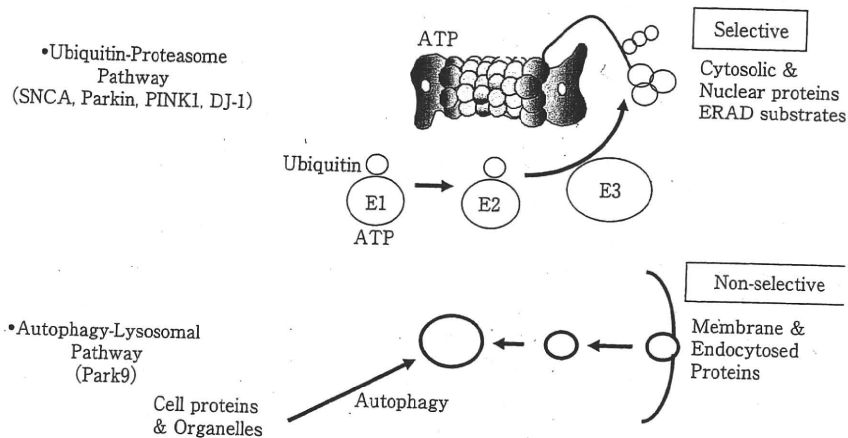


Fig. 2 2大蛋白分解系。ユビキチン・プロテアソーム系とリソソーム・オートファジー系が存在する。この蛋白分解系は、相互に作用していることが推定されている。

は、parkin は、蛋白分解系のシグナルだけでなく、リジン残基 63 番目にもポリユビキチン鎖が付加されることが報告されている。K63 のポリユビキチン鎖は、蛋白分解系のシグナルには成りえず、レビー小体形成にかかわっていることが推定されている⁶⁷⁾。更に細胞内局在の変化や蛋白安定性にかかわっているとされているモノユビキチン化の作用も parkin は、保持しているとされている⁶⁾。またリガーゼ活性に関しては、すべての変異型で消失しているわけではなく⁶⁾、parkin 変異型のもたらすメカニズムについては、依然不明な点が多い。

一方で、parkin と他の劣性遺伝性 PD の遺伝子産物の結合が報告されている。Parkin は変異型 DJ-1 と結合することが報告されている⁶⁾。Parkin は、DJ-1 と結合してその安定性に影

響を与えている可能性が指摘されている。興味深いことに、その結合は酸化ストレスにより誘導されることである。

蛋白分解系には、大きくオートファジー・リソソーム系と parkin が関与しているユビキチン・プロテアソーム系が存在する (Fig. 2)。蛋白分解系を考えたばあい、オートファジー系も神経変性で重要な機能をなしていることが報告された。臨床研の田中、水嶋の両グループは、別々のオートファジーの分子を潰した遺伝子改変マウスモデルを作製した。その結果、オートファジーのノックアウトマウスは、ユビキチン陽性の封入体を細胞内に形成することがわかった。更にこのノックアウトマウスの解析では、封入体形成の多い部位では神経脱落が少なく、封入体形成の少ない部位では、細胞死の脱落が多

Table 2 わが国でみだされた Park9 の症例、既報との比較

	日本人系	Chilean II : 8	Chilean II : 9	Chilean II : 10	Chilean II : 11	Jordanian V44	Jordanian V48	Jordanian V49	Jordanian V53
発症年齢 (years)	22	18	17	15	12	12	15	13	12
罹病期間 (year)	23	23	20	22	22	24	19	18	11
初発症状	E	A, B	A, C	A, B	D	A, BC	A, C	B, C	A, C
臨床症状									
健反射亢進	++	+++	+	+++	+++	++	++	+++	+++
Babinski's sign	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Palmomental reflex	+	+	-	+	+	/	/	/	/
振戦	+	+	+	+++	+	-	-	-	-
筋固縮	++	++	+	+++	+	++	+++	+++	+++
無動	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
核上性眼球運動障害	+	+	-	+	+	++	+++	++	++
FFF-mini-myoclonus	+	+	-	+	+	++	++	+++	+
幻覚	+	++	+++	-	-	++	+	++	+
認知症 (MMSE)	15/30	N/A	19/30	15/30	9/28	14/30	2/30	13/30	2/30
Response to anti-PD drugs									
Trihexyphenidyl	N/A	++	++	+	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
levodopa	++	N/A	N/A	N/A	N/A	++	+++	+++	+++
Diffuse atrophy of brain (MRI)	++	N/A	N/A	N/A	N/A	++	++	++	++

Homo : Homozygous, Comp hetero : Compound heterozygous, Hetero : Heterozygous, B : Bradykinesia, M : Mental retardation, R : Rigidity, D : Developmental disturbance, G : Gait disturbance, FFF mini-myoclonus : facial-faucial-finger mini-myoclonus, MMSE : Mini Mental State Examination, PD : Parkinson disease, - : absent, + : present, N/A : not assessed.

いとしている。このことから封入体形成は神経保護的に作用している可能性が高い。

黒質神経変性におけるオートファジーの関与については、昨年 Park9 (Kufor-Raked syndrome) の原因遺伝子 ATP13A2 が単離されたことでその変性にもオートファジー・リソソーム系の関与が推定される¹⁰⁾。Park9 は痙性歩行と認知症がめだつ症候群で家族性進行性核上性麻痺のような病態をとる。この遺伝子は P-type の lysosome に関与していることがわかっている。この Park9 の変異型はプロテアソーム系で分解されている。このことは、先の 2 つの分解系が相互に作用していることが推定される。そしてこの変異を持つ日本人系系の存在も確認された (Ning et al. in press)。臨床症状のサマリーを Table 2 に示す。

おわりに

現在、単一遺伝子異常にともなう FPD の研究は、孤発型 PD の病態に大きく貢献しているといえる。現在、神経変性の多くが部位特異的に封入体を形成することから conformational diseases の概念が広がっている。そして 2 つの蛋白分解系の関与が封入体形成に関与しているとされており、そし

て封入体形成部位により核内と細胞質内封入体に大きく分けられる。この蛋白分解系にかかわる分子が、FPD の発症に関与していることより、FPD の研究は他の神経変性疾患の病態解明、特に封入体形成のメカニズムに大きなヒントをもたらすことが予想される。

文 献

- 1) Rocca WA, McDonnell SK, Strain KJ, et al: Familial aggregation of Parkinson's disease: The Mayo Clinic family study. *Ann Neurol* 2004; 56: 495—502
- 2) Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, et al: Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2006; 59: 298—309
- 3) Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, et al: Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 1151—1158
- 4) Hatano T, Kubo S, Imai S, et al: Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 678—690
- 5) Funayama M, Li Y, Tomiyama H, et al: Leucine-rich re-

- peat kinase 2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population. *Neuroreport* 2007; 18: 273—275
- 6) Lim KL, Dawson VL, Dawson TM: Parkin-mediated lysine 63-linked polyubiquitination: a link to protein inclusions formation in Parkinson's and other conformational diseases? *Neurobiol Aging* 2006; 27: 524—529
 - 7) 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
 - 8) Matsuda N, Kitami T, Suzuki T, et al: Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro. *J Biol Chem* 2006; 281: 3204—3209
 - 9) Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, et al: Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 71—84
 - 10) Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, et al: Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006; 38: 1184—1191
 - 11) Ning Y, Kanai K, Tomiyama H, et al: PARK9-linked parkinsonism in Eastern Asia: Mutation detection in ATP13A2 and clinical phenotype *Neurology*. (in press)

Abstract

The pathogenesis of Parkinson's disease: A hint from insights of familial Parkinson's disease

Nobutaka Hattori, M.D. and Shin-ichiro Kubo, M.D.

Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine

Parkinson's disease (PD) is a progressive movement disorder characterized by resting tremor, rigidity, akinesia, and postural instability. In addition, PD is characterized by the appearance of Lewy bodies in the remaining neurons. The exact etiology for this disease is still unknown. However, genetic-environmental interaction could contribute the pathomechanisms of PD. Indeed, totally seven causative genes responsible for familial PD have been identified. Since discovery of familial PD (FPD), genetic PD models have been developed. Thus, we think that the research field of FPD provides us a good hint for the pathogenesis of nigral degeneration in not only familial but also sporadic form of PD.

(*Clin Neurol*, 47: 774—778, 2007)

Key words: ubiquitin-proteasome system, autophagy-lysosomal system, Lewy body, familial Parkinson's disease, PD gene product function

