

症、末梢神経障害など多彩な病型が知られている。これらの病型がミトコンドリア修復障害とどのように関与しているかについては、現時点で不明である。加えて *POLG1* 変異とパーキンソンニズムの因果関係について過去に複数の報告があるが、まだ確定的な結論は得られていない。これらにつき、今後の検討が必要である。

## E. 結論

1. 進行性外眼筋麻痺を伴うパーキンソンニズムの 2 家系 2 症例を呈示した。
2. 本邦の進行性外眼筋麻痺を伴うパーキンソンニズムには複数の遺伝的背景が関与しており、1 例は *POLG1* 遺伝子変異に起因していた。これは本邦初の報告例である。
3. 残る 1 例は既知の候補核遺伝子に変異を認めないにも関わらず mtDNA 欠失を認め、未知の原因による mtDNA 修復機能の障害により発症している進行性外眼筋麻痺を伴うパーキンソンニズムであると推定された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tsuji-Akimoto S et al: Writing errors as a result of frontal dysfunction in Japanese patients with amyotrophic

lateral sclerosis. J Neurol [Epub ahead of print]

### 2. 学会発表

- 1) 秋本幸子ら；筋委縮性側索硬化症における書字障害の検討. 第 51 回日本神経学会総会，東京，2010
- 2) 大槻美佳ら；進行性非流暢性失語：臨床症候と予後，病理所見. 第 51 回日本神経学会総会，東京，2010

## H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## パーキンソンニズム患者の脳脊髄液プロテオーム解析

研究分担者 中川正法<sup>1)</sup>

研究協力者 徳田隆彦<sup>1)</sup>、石神紀子<sup>1)</sup>、池川雅哉<sup>2)</sup>、近藤誉之<sup>3)</sup>、小森美華<sup>4)</sup>

1)京都府立医科大学大学院医学研究科神経内科学, 2)同ゲノム医科学,  
3)北野病院神経内科, 4)京都大学医学研究科臨床神経学

### 研究趣旨

パーキンソン病(PD)および多系統萎縮症(MSA)の診断に有用な生化学的なバイオマーカーの臨床的な有用性は高いと考えられるが、パーキンソンニズム患者を単独のバイオマーカーによって鑑別する方法は現時点では確立されていない。今回は、Magnetic beads/ MALDI-TOF Mass spectrometry (MS)システム (ClinProt システム)によるプロテオーム解析の PD 群、MSA 群、対照群の鑑別診断における有用性を検討した。MSA 群と対照群および PD 群と MSA 群は、ClinProt システムを用いた CSF 蛋白のプロテオーム解析により、十分な弁別力によって分離することができた。従って、ClinProt システムによる CSF 蛋白のプロテオーム解析は、MSA と PD を鑑別する補助的手段となる可能性がある。

### A.研究目的

パーキンソン病(PD)を始めとするパーキンソンニズムの診断は、現時点では臨床症状の組合せと画像診断によってなされているが、とくに発症早期においては、PD と多系統萎縮症 (MSA)の鑑別が難しい場合がある。血液あるいは髄液中の特定の分子をバイオマーカーとして用いることにより、パーキンソンニズム、とくに発症早期の患者の鑑別が可能になれば臨床的にもその有用性は高いと考えられる。研究協力者の徳田は、PD の診断バイオマーカーとしての、髄液中  $\alpha$ -シヌクレインおよび  $\alpha$ -シヌクレイン・オリゴマーの有用性を報告してきた(1-3)。このような検討と同様に、パーキンソンニズムを含む種々の神経変性疾患で、病態に関連の深いと考えられる候補蛋白を CSF 中から検出し、診

断バイオマーカーとして用いる試みは多くなされてきた。しかし、これまでパーキンソンニズム患者を単独のバイオマーカーによって鑑別する方法は現時点では確立されていない。また、2500 種を超える CSF 蛋白プロフィールから診断に有用な候補蛋白を適切に選別し、かつそれらを個別に ELISA 法などの従来の測定法によって検討することは極めて煩雑である。これに対し、プロテオミクス的手法は、CSF 蛋白を網羅的にスクリーニングし、統計学的な解析により抽出した蛋白セットによって、疾患の診断・鑑別診断を行うという手法である。これは、新規のバイオマーカーの探索法としてだけでなく、単独のバイオマーカーによる診断が困難である場合の代替アプローチとしても注目されている(4)。今回の研究では、PD 患者、多系統

萎縮症 (MSA) 患者および、対照患者の CSF を用いて、Magnetic beads/ MALDI-TOF Mass spectrometry (MS) システムによるプロテオーム解析(5)がこれらの患者群を効果的に弁別可能であるか否かを検討した。

## B. 研究方法

### 1) 対象

2002年から2009年に京都府立医科大学神経内科を受診した以下の3群の患者より採取したCSFを使用した。各群は年齢を一致させた。対象としたPD群は23例(平均67.1歳(range 43-79)、男性13人、女性11人)、MSA群は23例(平均63.2歳(range 51-74)、男性17人、女性7人)、および対照患者群は27例(平均62.8歳(range 37-87)、男性14人、女性13人)からなっていた。対照群は中枢神経疾患を除外した神経疾患患者および鑑別診断目的でCSFを採取した患者であった。

### 2) 方法

使用したCSFサンプルは、蛋白濃度が高値のサンプルはあらかじめ除外し、また前もってSDS-PAGE/CBB染色を行い、Hb(~16kD)の混在したサンプルを除外した。その上で、1)で示した3群の対象者から採取したCSFを用いて、Magnetic beads / MALDI-TOF MS (ClinProt システム、Bruker Bruker Daltonics)によるプロテオーム解析を行った。具体的には、10ulのCSFサンプルから疎水性ビーズ(C8ビーズ)に結合するペプチドをcaptureして、ビーズをマグネットを用いて分離した。ビーズを洗浄した後にcaptureされたCSF蛋白を質量分析用の酸性溶液で溶出した。溶出したCSF蛋白溶液を質量分析用プレートにターゲットし、MALDI-TOF型質量分析計(Autoflex-II)により解析した。患者ご

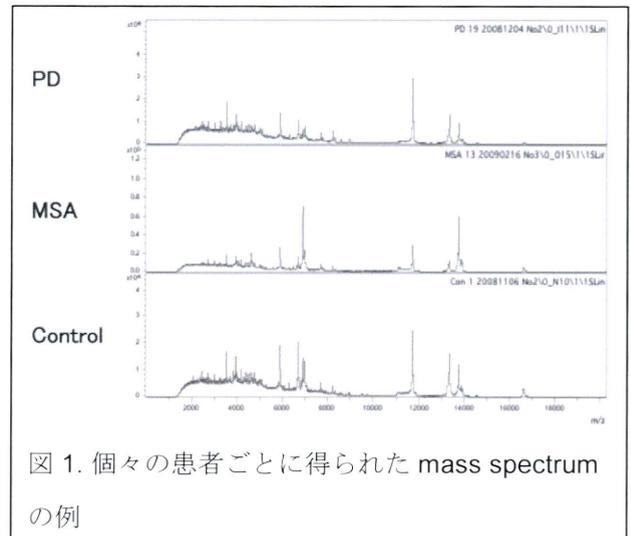


図 1. 個々の患者ごとに得られた mass spectrum の例

とに得られた mass spectrum を多数の患者で集積して(図1)、解析ソフトウェア(ClinproTools, Bruker)を用いて統計学的に解析した。

(倫理面への配慮)

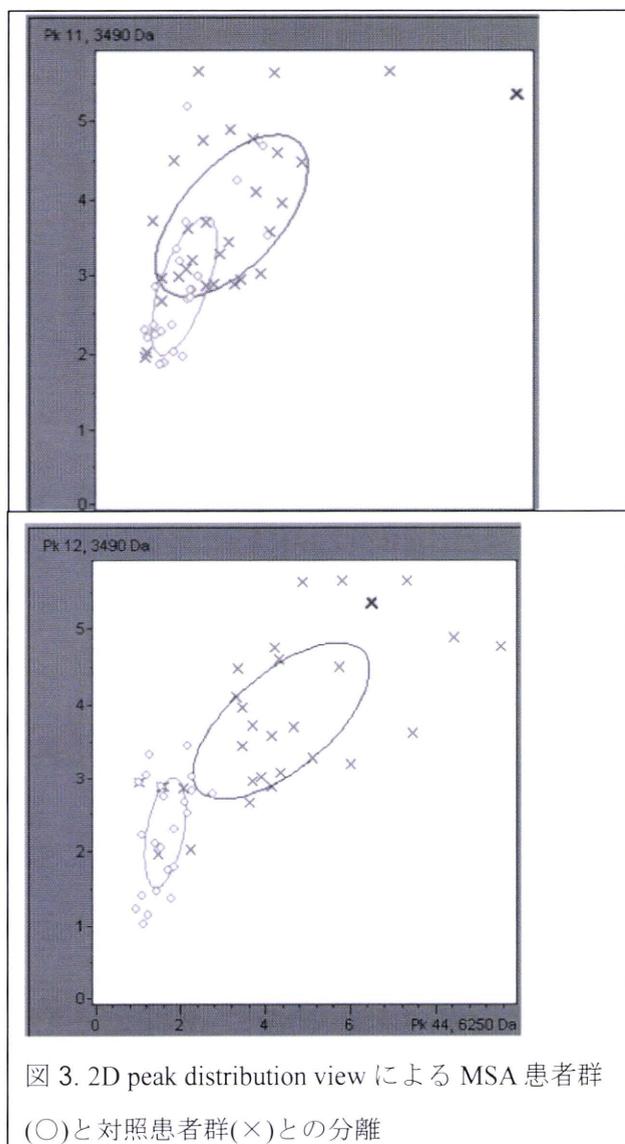
対象とした患者からは、京都府立医科大学倫理委員会にて承認された方法により informed consent を得た上で、髄液を今回の研究に使用した。

## C. 研究結果

### 1) PD 群と対照患者群とのプロテオーム解析による弁別

PD 群と対照患者群の個々の患者から得られた mass spectra を集積して、統計学的な解析を行った。集積した mass spectra からこの2群を弁別するのに最も寄与した2つのピークを選別し、そのピーク強度をそれぞれ x 軸、y 軸にとって、個々の患者を二次元に配置(2D peak distribution view)すると(図2)、この散布図からは対照患者群のばらつきが大きいことが解った。この結果から、Neural network algorithm を用いて計算した Cross validation 値(CV 値)は 68.97%であった。この cross validation 値とは選択されたピークを使用し、どの程度の強度で対

象とする2群が分離できるかを示す指標であり、比較的新しい統計手法であるため確立されたものではないが、70%以上あれば2群を分離できる可能性があると解釈されている。従ってこの2群に関しては、今回の ClinProt システムによるプロテオーム解析では、両群の弁別は不十分であった。



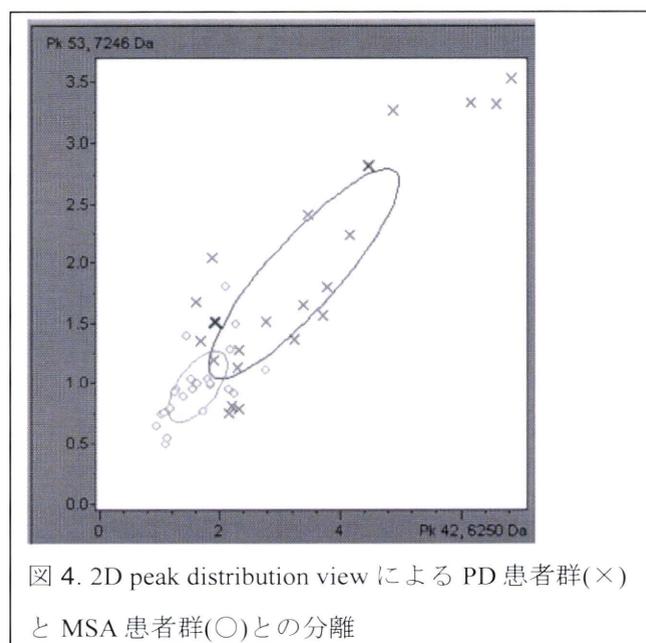
## 2) MSA 群と対照患者群との鑑別

1)と同様にして、MSA 群と対照患者群の個々の患者から得られた mass spectra を統計学的に解析した (図 3)。散布図からは、対照患者群のばらつきは 1)の場合と同様に大きい、MSA 群は比較的均一

なピーク強度のパターンを有する患者で構成されていた。この2群を分離した場合の CV 値は 84.96% であり、この2群は ClinProt システムを用いたプロテオーム解析により良好に弁別できた。

## 3) PD 群と MSA 群との鑑別

1)、2)と同様にして、MSA 群と PD 群の弁別が可能かを検討した (図 4)。この2群を分離した場合の CV 値は 81.55% であり、この2群は ClinProt システムを用いたプロテオーム解析により良好鑑別できた。



## D. 考察

今回我々は、Magnetic beads によるペプチドの分離、MALDI-TOF MS による mass spectra の解析および得られた spectra を統計学的なアルゴリズムによって解析するという 3 段階を組み合わせた ClinProt システムを用いた CSF 蛋白のプロテオーム解析が、PD 群、MSA 群、対照群の鑑別診断に有用であるか否かを検討した。得られた mass spectra 上の複数のピーク強度によって 2 群を弁別するアルゴリズムを用いた場合に、2 群の弁別強度を表す

CV 値からは、この ClinProt 解析により、PD 群と対照群とを鑑別するには不十分であったが、MSA 群と対照群、および PD 群と MSA 群を鑑別するには十分な弁別力があつた。PD と MSA の鑑別は、特に病初期には難しい場合があり、診断に補助的な情報を与えるバイオマーカーの有用性が期待できる。MIBG 心筋シンチグラフィはこの両者の鑑別に有用であるが、PD 群でも Yahr I 度の時期には MIBG の取り込みが低下しない場合もある。また、これまで PD と MSA を鑑別できる髄液あるいは血液バイオマーカーは確立されていない。今回の検討により、ClinProt システムを用いた CSF プロテオーム解析が、MSA と PD を鑑別する補助的手段となり得ることが示された。今後は、別のコホートを用いた更なる validation および個々の症例の診断に応用できるような判別関数をもとめるアルゴリズムの確立などが必要である。ClinProt システムによる CSF プロテオーム解析は、CSF 蛋白の新しい網羅的な解析法であり、今後の神経変性疾患への応用が期待される。

## E. 結論

- 1) ClinProt システムを用いた CSF 蛋白のプロテオーム解析の PD 群、MSA 群、対照群の鑑別診断における有用性を検討した。
- 2) MSA 群と対照群を分離した場合の CV 値は 84.96%、PD 群と MSA 群との CV 値は 81.55% であり、MSA 群と対照群および PD 群と MSA 群は ClinProt システムを用いた CSF 蛋白のプロテオーム解析により弁別が可能であった。
- 3) ClinProt システムによる CSF 蛋白のプロテオーム解析は、MSA と PD を鑑別する補助的手段となる可能性がある。

## 文献

1. T. Tokuda, et al. Biochem Biophys Res Commun, 349: 162-166, 2006.
2. M. Noguchi-Shinohara, et al. Brain Res, 1251: 1-6, 2009.
3. T. Tokuda, et al. Neurology, 75: 1766-1770, 2010.
4. G. Srivastava et al. Expert Rev Proteomics, 7: 127-139, 2010.
5. R. Ketterlinus, et al. Biotechniques, Suppl: 37-40, 2005.

## F. 健康危機情報：なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tatebe H, Nakagawa M, Tokuda T. et al. Extracellular neurosin degrades  $\alpha$ -synuclein in cultured cells. Neurosci Res. 67: 341-6, 2010.
- 2) Tokuda T, Qureshi MM, Nakagawa M, et al. Detection of Elevated Levels of  $\alpha$ -Synuclein Oligomers in CSF from Parkinson's Disease Patients. Neurology 75: 1766-70, 2010.

### 2. 学会発表

- 1) 徳田隆彦, 笠井高士, 石神紀子, 中川正法, 玉岡晃: ヒト髄液中の  $\alpha$ -synuclein oligomer の検討. 日本神経学会総会(第 51 回), 東京, 2010. 5. 22.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## PARK8 (I2020T) 患者脳脊髄液中ビオプテリン・モノアミン代謝物の測定

研究分担者 長谷川一子<sup>1)</sup>

研究協力者 一瀬 宏<sup>2)</sup>, 小柴梢子<sup>2)</sup>, 徳岡宏文<sup>2)</sup>, 横山照夫<sup>1)</sup>, 堀内恵美子<sup>1)</sup>

1) 国立病院機構相模原病院神経内科,

2) 東京工業大学大学院生命理工学研究科

### 研究要旨

PARK8 は家族性パーキンソン病の一つであるが、特発性パーキンソン病 (sPD) 患者とよく似た臨床症状を示すことから、PARK8 発症機構の解明は特発性パーキンソン病の発症機構の解明につながる事が期待されている。我々は、LRRK2 の I2020T 変異をもつ PARK8 患者と 2 人の無症候性キャリア、および、特発性パーキンソン病 (sPD) 患者の脳脊髄液 (CSF) を用いてビオプテリン、および、ドーパミン代謝物であるホモバニリン酸 (HVA) およびセロトニン代謝物である 5 ヒドロキシインドール酢酸 (5HIAA) を測定した。sPD 患者ではビオプテリンは低値を示したが、PARK8 患者ではほぼ正常値を示し sPD 群と PARK8 群で有意な差が認められた。ビオプテリンの低下は主にドーパミンニューロンの変性によると考えられるので、PARK8 では sPD 患者に比べてドーパミンニューロンの変性がマイルドであることが示唆された。このことは、PARK8 患者におけるドーパミンニューロンの機能障害は、主として神経変性以外の要因（ドーパミン分泌障害など）で引き起こされることを示唆した。

### A. 研究目的

PARK8 は日本の相模原地方の家系で初めて原因遺伝子の染色体位置が決定された優性遺伝性パーキンソン病であり、Leucine-rich repeat kinase (LRRK2) が原因遺伝子であることが 2004 年に解明された。その後の研究から、PARK8 が孤発性パーキンソン病 (sporadic Parkinson's disease; sPD) と臨床症状に多くの共通点があること、sPD 患者の中に LRRK2 変異を有している患者が数%いること、など PARK8 発症機構の解明が sPD 解明の鍵になると考えられ注目を集めている。

テトラヒドロビオプテリンは、ドーパミン生合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素の補酵素としてドーパミンニューロンで生合成されている。脳脊髄液中のビオプテリン量は、約 80% が黒質線条体系ドーパミンニューロンに由来するとされており、ドーパミンニューロンの変性状態を知る指標の一つとして重要である。

本研究では PARK8 患者、LRRK2 変異を持つが発症していない 2 人の無症候性キャリア、および、sPD 患者の脳脊髄液中のビオプテリン、ドーパミン代謝物のホモバニリン酸 (HVA)、セロトニン代謝物の 5 ヒドロキシインドール酢酸 (5HIAA) を測定した。

### B. 研究方法

ビオプテリン、HVA、5HIAA の生化学的測定は、高速液体クロマトグラフィ蛍光検出法、および、高速液体クロマトグラフィ電気化学検出法により行った。有意差の検定には Mann-Whitney's U-test を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立病院機構相模原病院および東京工業大学の倫理委員会の承認のもとに行った。CSF 採取に当たっては、書面による本人の同意を得て行った。

### C. 研究結果

7名の PARK8 患者 (LRRK2 の I2020T 変異を有する)、2名の無症候性キャリア (I2020T 変異を持つが未発症)、21名の sPD 患者の髄液について分析した。

PARK8 患者群と sPD 患者群で重症度に差がないかを、On 時と Off 時に分けて Hoehn-Yahr の重症度分類のステージを点数化して検討した。

Off 時の PARK8 患者スコアは 4.0、sPD 患者スコアは 3.9 であり両群間に有意差はなかった。On 時のスコアは sPD 患者では 3.6 であるのに対し、PARK8 患者では 2.9 で薬物応答性は PARK8 患者の方が良好であったが、有意な差ではなかった。

髄液中ビオプテリン量は、sPD 患者では正常値 (20-30 pmol/ml) より低い値を示したが、PARK8 患者では正常値と同程度の値を示し、sPD 群と PARK8 群とで有意な差が認められた (図 1)。2 人の無症候性キャリアのビオプテリン量は正常範囲であった。

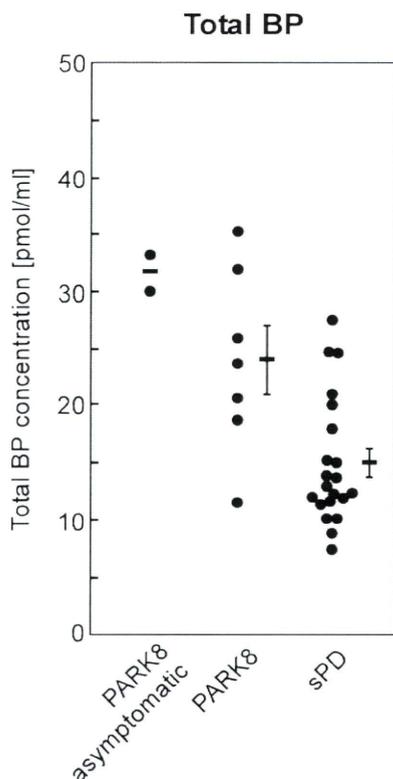


図 1. Biotpterin concentration in CSF.

ネオプテリンはビオプテリン生合成の中間代謝産物であるが、細胞性免疫の活性化やミクログリア活性化に伴い、ビオプテリンに対するネオプテリンの比が上昇することが知られている。sPD 患者のネオプテリン/ビオプテリン値は上昇傾向を示したが、PARK8 患者ではそれほど顕著な傾向は見られなかった (図 2)。正常者では、ネオプテリン/ビオプテリンは 1 前後の値を示す。

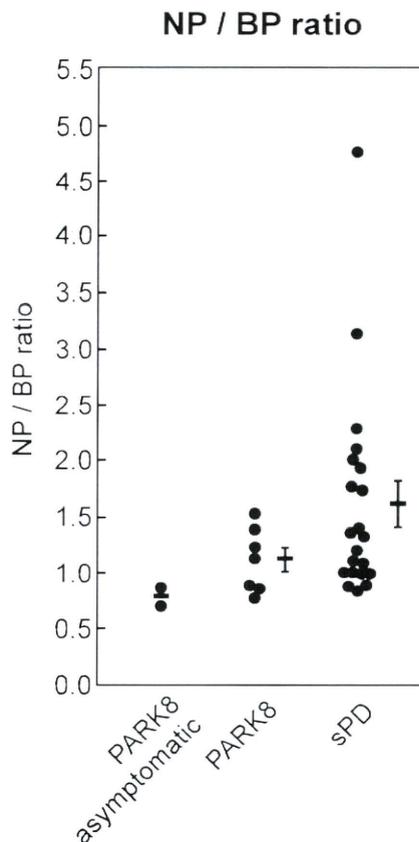


図 2. Neopterin/biopterin ratio in CSF.

二人の無症候性キャリアの HVA の値は、97 と 145 pmol/ml であった。これらの値は、正常下限を下回っており、無症候性キャリアで発症前からドーパミン代謝が低下していることがわかった。

セロトニン代謝物である 5HIAA の値は、sPD 患者では正常より低い値を示し、セロトニンニューロン機能も低下していることを示唆した。しかし、PARK8 患者では正常よりやや高い値を示し、sPD 群と有意に高い値を示した。

## D. 考察

sPD 患者における脳脊髄液中バイオプテリンの低下は、これまでも複数の報告があり、バイオプテリン減少は黒質ドーパミンニューロンの変性の結果と考えられている。今回、我々も sPD 患者でのバイオプテリン減少を確認することができた。しかし、PARK8 患者ではバイオプテリンの低下は軽度あるいはほとんど見られず、sPD 患者群より有意に高いバイオプテリン値を示した。このことは、PARK8 患者ではドーパミンニューロンの変性が sPD 群よりマイルドであることを示唆した。一方、PARK8 患者でも明らかなパーキンソン病の臨床症状を示している。2 人の無症候性キャリアが、バイオプテリン値は正常範囲であるにもかかわらず、ドーパミン代謝物である HVA は低値であったことも重要な知見である。これらの結果を総合的に考えると、PARK8 患者ではドーパミンニューロンの変性が sPD 患者ほど進行していない段階でドーパミンニューロンの機能低下からパーキンソン病症状を示すと考えられる。

脳内ドーパミンニューロンの機能低下がどのような機構で生じるかは明らかでないが、ドーパミン分泌量の低下などが考えられる。変異 LRRK2 を導入したトランスジェニックマウスを用いた報告でも、ドーパミンニューロンの変性はみられないが線条体でのドーパミン放出量が減少することが示されている。これらの報告も、LRRK2 がドーパミン分泌に重要な役割を果たしていること、LRRK2 変異が神経変性そのものではなくドーパミンニューロンの機能障害を引き起こすことを支持していると考えられる。

## E. 結論

PARK8 患者では、sPD 患者より有意に高い髄液中バイオプテリン値を示した。PARK8 患者では、ドーパミンニューロンの変性が sPD 患者よりマイルドであることを示唆した。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

### 1. 論文発表

Koshiba S, Tokuoka H, Yokoyama T, Horiuchi E, Ichinose H, Hasegawa K. Biopterin levels in the cerebrospinal fluid of patients with PARK8 (I2020T). *J. Neural Transm* [submitted]

### 2. 学会発表

Koshiba S, Tokuoka H, Yokoyama T, Horiuchi E, Ichinose H, Hasegawa K. Marked differences in biopterin metabolism between PARK8 and sporadic Parkinson's disease. ADPD2011, Barcelona (Spain) March 9-13, 2011.

## H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

## 遺伝性、孤発性パーキンソン病の治療研究

研究協力者 望月秀樹<sup>1)</sup>

安田徹<sup>1)</sup>，水野美邦<sup>2)</sup>

1) 北里大学医学部神経内科学，2) 北里大学医学部神経再生医療学

### 研究要旨

遺伝性および孤発性パーキンソン病の原因究明、治療法の創出を目的として研究を行った。LRRK2 遺伝子変異により発症する PARK8 相模原家系における症例の検討、さらに孤発性パーキンソン病のモデルである 6OHDA 投与マウス、慢性 MPTP 投与マウスにおいて、それぞれ G-CSF、パーキン遺伝子導入による神経保護効果、分子メカニズムの検討を行った。

### A.研究目的

遺伝性および孤発性パーキンソン病の原因究明、治療法の創出を目的とした。

### B.研究方法

PARK8 相模原家系における症例の検討、孤発型パーキンソン病モデルマウスにおける薬剤治療、遺伝子治療の効果を検証した。

### (倫理面への配慮)

パーキンソン病患者および家族へは症例検討についての理解を得ており、また発表に際して個人が特定できないよう配慮した。

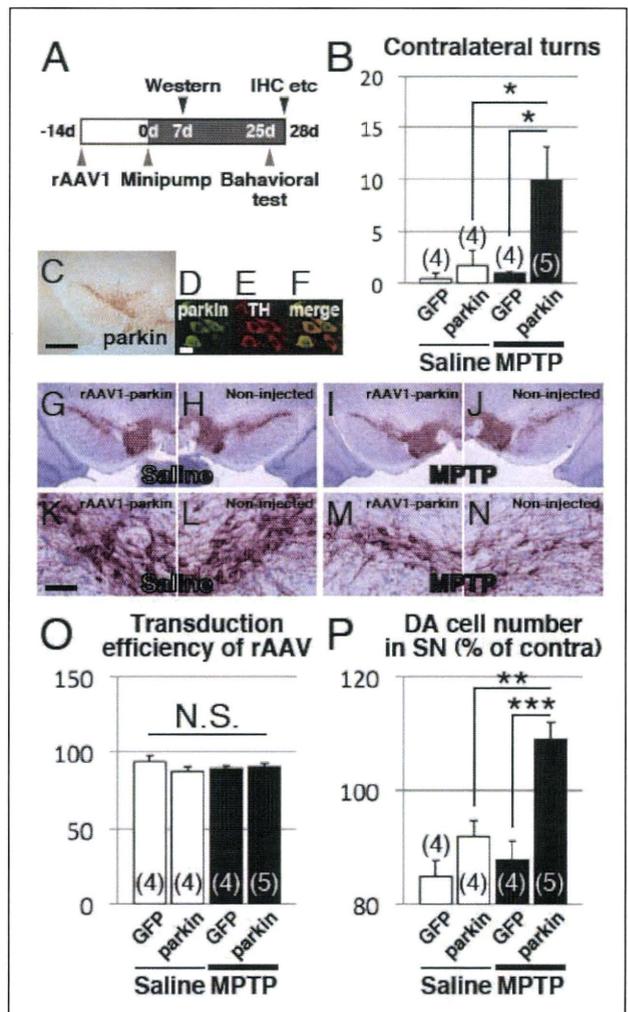
### C.研究結果

PARK8 相模原家系において、MRI による線条体異常は検知できなかった。家系内に MSA-P の併発例を確認した。

孤発性パーキンソン病モデルである 6OHDA 脳内投与マウスにおいて、浸透圧ポンプを用いた G-CSF の脳内局所持続投与が神経保護効果を及ぼす事を確認した。

また浸透圧ポンプを用いて MPTP を腹腔投与する事により作成した孤発性パーキンソン病モデルにおいて、アデノ随伴ウイルスによるパーキン遺伝子導

入が神経保護作用、行動異常の抑制効果を示す事を確認した (図)。



パーキン導入の効果として、リン酸化 $\alpha$ シヌクレインの蓄積の増加、神経保護的な Akt 活性の維持が関

わる事を見出した。一方で導入パーキンのミトコンドリア機能維持作用は抑制を受けている可能性が考えられた。

#### D. 考察

PARK8 相模原家系内に MSA-P の併発例もあることから、他の遺伝子要因が発症、病態に影響を及ぼす可能性が考えられた。

すでに臨床応用されている G-CSF を用いた孤発型パーキンソン病治療の可能性が考えられた。

パーキンソン病の遺伝子治療に用いられているアデノ随伴ウイルスを利用し、パーキン遺伝子を導入する事による遺伝子治療が有効である可能性が考えられた。

#### E. 結論

今後、遺伝性および孤発性パーキンソン病について臨床症例を検討する事により、またモデル動物を用いて基礎的研究を行う事により、神経変性の原因究明、治療法の創出が可能になると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yasuda T, Mochizuki H. Use of growth factors for the treatment of Parkinson's disease. Expert Rev Neurother. 2010 Jun;10(6):915-24.
2. Yasuda T, Mochizuki H. The regulatory role of alpha-synuclein and parkin in neuronal cell apoptosis; possible implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. Apoptosis. 2010 Nov;15(11):1312-21.
3. Yasuda T, Mochizuki H. Recent advances in cell and gene therapies for Parkinson's disease. Nippon Rinsho. 2009 Jul;67(7):1429-38.

##### 2. 学会発表

1. Yasuda T, Mochizuki H. PARKIN GENE THERAPY IN A LONG-TERM MPTP-MINIPUMP MOUSE MODEL OF PARKINSON'S DISEASE; A SECOND REPORT. 第16回日本遺伝子治療学会学術集会, 2010年7月
2. 安田徹、早川英規、仁平友子、服部信孝、水野美邦、望月秀樹 浸透圧ポンプを用いた MPTP マウスモデルにおける AAV-parkin 遺伝子治療 第4回 MDSJ 学術集会, 2010年10月

#### H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特記事項なし

## パーキンとパーキン関連蛋白の機能連関

研究分担者 梶 龍兒<sup>1)</sup>

研究協力者 三ツ井貴夫<sup>2)</sup>，牧(黒田)由紀子<sup>2)</sup>，藤本美希<sup>2)</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，

2) 徳島病院臨床研究部

### 研究趣旨

パーキンおよび関連蛋白である Kloklin 1/ChPF ファミリーの機能連関について検討した。培養細胞系においてパーキンならびに Kloklin 1/ChPF ファミリーを過剰発現あるいは RNAi により発現を抑制し、cell viability を検討した。Kloklin 1/ChPF ファミリーは、過剰発現をおこなうことでパーキンと同様に抗アポトーシス作用が認められた。さらにパーキンパーキン発現を抑制した細胞でも抗アポトーシス作用が認められた。Kloklin 1/ChPF ファミリーはパーキン発現低下に伴うアポトーシスを有意に抑制した。パーキンノックアウトマウスの mouse embryonic fibroblast (MEF) を用いた cell viability assay でも野生型では RNAi によりパーキンならびに kloklin 1 の発現を抑制すると cell viability は有意に減少し、両者の発現を同時に抑制した場合には cell viability は更に減少した。また、パーキン KO マウス黒質で Kloklin 1/ChPF ファミリーの発現が著明に増加していた。すなわち Kloklin 1/ChPF ファミリーはパーキンをミトコンドリアに運搬するのみならずミトコンドリア内で独自の抗アポトーシス作用を発揮することが示唆された。さらに、パーキン欠損マウスでは、Kloklin 1/ChPF ファミリーの発現が代償的に増加している可能性が考えられた。

### A. 研究目的

我々は家族性パーキン病 PARK2 に関する研究を行う中で、その原因遺伝子であるパーキンの転写産物はミトコンドリアに局在し、ミトコンドリア遺伝子の転写・複製を促進することを明らかにした。パーキン遺伝子の欠損あるいは発現の低下に伴い、神経細胞はアポトーシスをきたすことが知られている。我々はパーキンと結合しミトコンドリアまで誘導する新規の蛋白 Kloklin 1 を見出した。本研究では、神経細胞においてこれらの蛋白の発現の抑制より誘発されたアポトーシスの際に、パーキンおよび Kloklin 1 とそのスプライシング変異体である chondroitin polymerizing factor (ChPF) がどのように関連しているかについて検討する。

### B. 研究方法

培養細胞系：COS1 において siRNA を用いて Kloklin 1 とパーキンの内因性蛋白を抑制し、あるいは Kloklin 1 とパーキンの遺伝子導入を行い、ミトコンドリアにおける両蛋白の局在を検討した。さらに、同細胞の Cell Viability を蛍光プレートリーダーで検討した。

Mouse Embryonic Fibroblast (MEF)：野性型 (Parkin<sup>+/+</sup>) およびパーキンノックアウトマウス (Parkin<sup>-/-</sup>) の mouse embryonic fibroblast (MEF) を用いて、Kloklin 1 とパーキンの内因性蛋白を抑制し、あるいは Kloklin 1 とパーキンの遺伝子導入を行い、cell viability assay で解析した。

パーキンノックアウト (KO) マウス：脳内の Kloklin 1/ChPF ファミリーの発現をイムノブロット法で検討した。さらに蛍光抗体法で神経細胞ない局在を野

生型とパーキン KO マウスでどのように異なるのかを検討した。

ヒト末梢血リンパ球：パーキン遺伝子欠損症患者（2名）および健常対照の末梢血リンパ球における Klokin 1/ChPF ファミリーの発現をイムノブロット法で検討した

### C. 研究結果

パーキンあるいは Klokin 1/ChPF ファミリーを過剰発現すると、Cell Viability は有意に増加した ( $p < 0.01$ )。また siRNA によりそれぞれの発現を抑制した場合には Cell Viability は有意に低下した ( $p < 0.01$ )。さらに、パーキン発現を抑制しアポトーシスをきたした細胞に Klokin 1 を過剰発現させると Cell Viability は明らかに回復した ( $p < 0.01$ )。一方、Klokin 1 発現を抑制した細胞の Cell Viability はパーキンを過剰発現させてもそれを回復させることはできなかった。

野生型 (Parkin<sup>+/+</sup>) およびパーキンノックアウトマウス (Parkin<sup>-/-</sup>) の mouse embryonic fibroblast

(MEF) を用いた cell viability assay。野生型では RNAi によりパーキンならびに klokin 1 の発現を抑制すると cell viability は有意に減少し、両者の発現を同時に抑制した場合には cell viability は更に減少した ( $P < 0.01$ )。パーキン KO マウスにおいては klokin 1 の発現を抑制すると cell viability は有意に減少した ( $P < 0.01$ ) が、パーキンの発現を抑制しても cell viability には有意な変動は見られなかった (図 1)。

パーキン KO マウスではコントロールマウスに比べ、脳および骨格近組織における Klokin 1/ChPF ファミリーの発現は著明に増加していた。

ヒト末梢血リンパ球においてはパーキン遺伝子欠損症患者（2名）および健常対照の末梢血リンパ球における Klokin 1/ChPF ファミリーの発現には明らかな差は見られなかった。

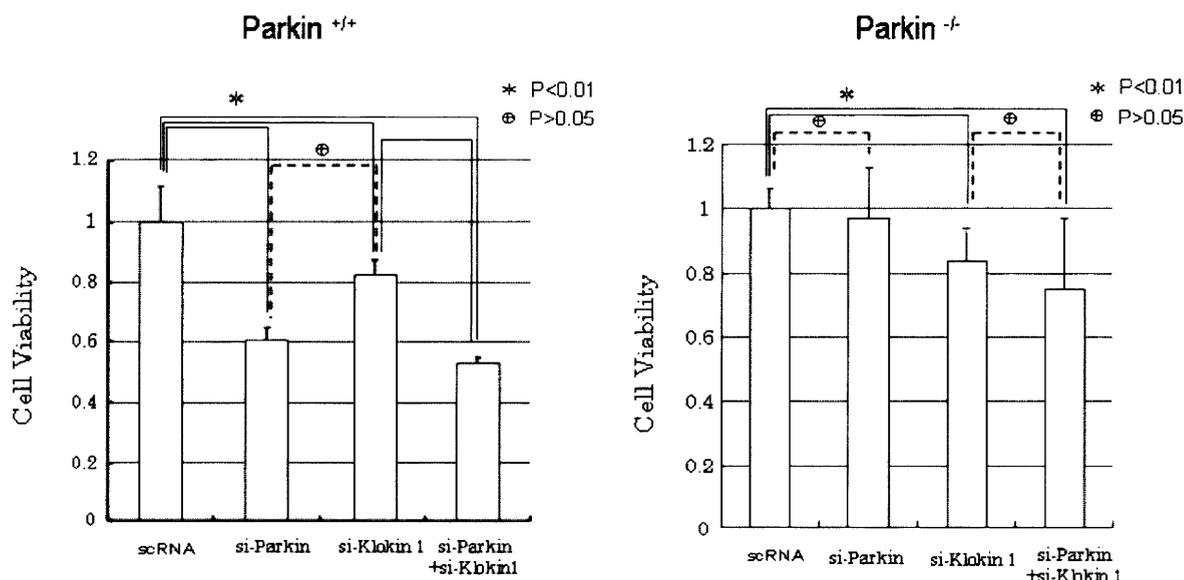


図 1 野生型 (Parkin<sup>+/+</sup>) およびパーキンノックアウトマウス (Parkin<sup>-/-</sup>) の mouse embryonic fibroblast (MEF) を用いた cell viability assay。野生型では RNAi によりパーキンならびに klokin 1 の発現を抑制すると cell viability は有意に減少し、両者の発現を同時に抑制した場合には cell viability は更に減少した ( $P < 0.01$ )。パーキンノックアウトマウスにおいては klokin 1 の発現を抑制すると cell viability は有意に減少した ( $P < 0.01$ ) が、パーキンの発現を抑制しても cell viability には有意な変動は見られなかった。

## D. 考察

培養細胞系における過剰発現・RNAi の成績から、Klokin 1/ChPF ファミリーは、パーキンと同様に抗アポトーシス作用を有することが明らかになった。さらにその作用はパーキン非存在下でも発揮されること、および Klokin 1/ChPF ファミリーはパーキン発現低下に伴うアポトーシスを抑制しうることが示唆された。また、パーキン KO マウス黒質で Klokin 1/ChPF ファミリーの発現が著明に増加していたことから、Klokin 1/ChPF ファミリーはパーキンの機能を代償しているものと考えられた。

一方、ヒト末梢血リンパ球においてはパーキン遺伝子欠損症患者（2名）および健常対照の末梢血リンパ球における Klokin 1/ChPF ファミリーの発現には明らかな差は見られなかったことから、ヒトにおいてはマウスのようなパーキン遺伝子欠損状態での Klokin 1/ChPF ファミリーの代償的な発現増加が見られなかったことが考えられる。このことは、ヒトではパーキン遺伝子欠損によりパーキンソニズムが発症するのに対し、マウスでは明らかなパーキンソニズムはきたさないことと関連している可能性がある。

## E. 結論

Klokin 1/ChPF ファミリーはパーキンをミトコンドリアに運搬するのみならずミトコンドリア内で独自の抗アポトーシス作用を発揮し、その作用はパーキンの作用を代償しうることが示唆された。

## F. 健康危険情報

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。

## G. 研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

### 1. 論文発表

1. Mitsui T, Kuroda Y, Adachi K, Kaji R. Effect of oxidative stress on splicing of parkin gene. *J Tokushima Natl Hosp* 1: 41-44, 2010
2. Mitsui T, Kuroda Y, Adachi K, Kaji R. Statin therapy in myopathic patients with hyperlipidemia. *J Tokushima Natl Hosp* 1:6-10, 2010.
3. Matsui N, Mitsui T, Ohshima Y, Yokoi Y, Kunishige M, Yagi F, Vernino S, Matsumoto T, Kaji R. Anti-neuronal antibodies in acute pandysautonomia. *Intern Med* 49(1):73-77, 2010.
4. Matsui N, Nakane S, Saito F, Ohigashi I, Nakagawa Y, Kurobe H, Takizawa H, Mitsui T, Kondo K, Kitagawa T, Takahama Y, Kaji R. Undiminished regulatory T cells in the thymus of patients with myasthenia gravis. *Neurology* 74(10): 816-820, 2010
5. Mitsui T, Kunishige M, Kuroda Y, Kaji R. Heterogeneous Muscular Involvement in Inclusion Body Myositis. *Lab Medicine* 41:393-396, 2010
6. Kuroda Y et al. Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Hum Mol Genet.* 15(6):883-95, 2006.
7. Kuroda Y et al. Parkin affects mitochondrial function and apoptosis in neuronal and myogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 348(3):787-93, 2006.

### 2. 学会発表

1. 三ツ井貴夫、牧(黒田)由紀子、丸西啓太、乾俊夫、足立克仁、宮崎 由道、梶 龍児：パーキン結合蛋白の酸化ストレス・ミトコンドリアトキシンに対する防御作用の検討。第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月
2. 牧(黒田)由紀子、三ツ井貴夫、梶 龍児：パーキンおよび結合蛋白の機能相関。第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得（出願中）

① 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 パーキン蛋白の新規糖化因子。発明者：三ツ井貴夫、黒田 由紀子。（平成20年3月28日出願、出願番号：特願2008-087534。）

### 2. 実用新案登録 なし

### 3. その他 なし

## 国際共同試験における治療環境の検討

### －日本と欧米における使用治療薬の比較－

研究分担者 野元正弘<sup>1)</sup>

研究協力者 永井将弘<sup>1)</sup>，西川典子<sup>1)</sup>，田邊奈千<sup>1)</sup>，辻井智明<sup>1)</sup>

1) 愛媛大学大学院医学系研究科病態治療内科

#### 研究要旨

日本で承認された抗パーキンソン病薬を対象に、日本、米国、欧州の維持量、最高投与量を調査した。また、臨床試験における実態用量、薬物動態を検討した。パーキンソン病治療薬において本邦の承認用量は、欧米と比べ概して少なく、また、L-dopaの実態用量は欧米に比べて本邦は約半分であった。L-dopa、ドパミンアゴニスト薬物動態は日本人、白人でほぼ同等であった。本邦でのリスク/ベネフィットに対する価値観が欧米と異なることが用量の違いに影響を及ぼしていると考えられる。

#### A.研究目的

日本と欧米の医薬品承認用量を比較すると、概して本邦の薬剤のほうが、用量が低く設定されている。薬物の血中・臓器内濃度には、体重、代謝酵素の違いなどが影響するが、多くの薬物の用量設定の地域差は、これらの因子のみでは説明できない。民族間における薬剤に対する要求度（有効性、忍容性のどちらに重きをおいているか等）の違いも、用量設定に影響を及ぼしている。近年アジア諸国も参加した国際共同試験が増えてきており、薬剤承認用量、使用量の国際比較を行うことは、適切な使用量を判断する上でも重要である。今回、パーキンソン病治療薬の使用量の国際的相違について検討した。

#### B.研究方法

日本で承認された抗パーキンソン病薬を対象に、日本、米国、欧州（英国）の維持量を調査した。また、現在まで報告されているまた、臨床試験における実態用量、薬物動態を検討した。

#### C.研究結果

パーキンソン病治療薬（ドパミンアゴニストを除く）の日米欧の承認用量を表1に示す。用量として維持用量、また括弧内には最高投与量が示されている。

図1 パーキンソン病治療薬承認用量の国際比較

	Japan	USA	EU (UK)
L-dopa/DCI	～ (1500)	～	～
Selegiline	～7.5 (10.0)	10.0	10.0
Entacapone	～ (1600)	～ (1600)	～ (2000)
Amantadine	～200 (300)	～ (400)	～ (400)
Trihexyphenidyl	6.0～10.0	6.0～15.0	～ (20.0)
Biperiden	3.0～6.0	～ (16.0)	—

L-dopa は本邦で一部の薬剤に最高投与量が記載されているが、多くは用量が設定されていない。Selegiline、entacapone の最高用量に大きな相違は認められないが、amantadine や抗コリン薬（trihexyphenidyl、biperiden）など比較的古い薬剤の本邦での承認用量が欧米と比べて低い。

表2にはドパミン受容体刺激薬（ドパミンアゴニスト）承認用量の国際比較が示されている。

表2 ドパミンアゴニスト承認用量の国際比較

	Japan	USA	EU (UK)
Bromocriptine	15.0～ 22.5	～ (100)	10.0～ 40.0
Pergolide	0.75～ 1.25	～ (5.0)	～ (6.0)
Cabergoline	2～4	—	2～4 (6)
Pramipexole	1.5～ (4.5)	1.5～ (4.5)	～ (4.5)
Ropinirole	3.0～9.0 (15.0)	～ (24.0)	～ (24.0)
Talipexole	1.2～3.6	—	—

ドパミンアゴニストは麦角系 (bromocriptine、pergolide、cabergoline) と非麦角系 (pramipexole、ropinirol、talipexole) に分類される。上市は麦角系ドパミンアゴニストのほうが麦角系ドパミンアゴニストより早い。全ての麦角系ドパミンアゴニストの本邦での承認用量は欧米に比較して低かった。しかし、麦角系ドパミンアゴニストによる心臓弁膜症の副作用が問題となり、pergolideは米国市場から撤退し、欧州では最高投与量が3mgに引き下げられた。また、cabergolineの最高投与量も日本、欧州とも3mgに引き下げられている。Ropiniroleも本邦での最高投与量が欧米より低かったが、同じ非麦角系ドパミンアゴニストであってもpramipexoleの承認用量は日欧米で同じであった。

上記のような承認用量の違いが薬物動態の違いにもとづくものかを検討した。表4～7に日本人と白人におけるドパミンアゴニスト薬物動態の比較を示す。日本人、白人健康成人における薬剤単回投与時のデータを製薬企業資料や論文を基に比較した。各表には最高血中濃度 (Cmax)、濃

度時間曲線下面積 (AUC)、各パラメータの日本人/白人のratioが示されている。

表4 Bromocriptine 薬物動態の比較

	Japanese	Caucasian	Ratio (J/C)
Cmax (pg/mL)	250.4± 23.6	345	0.73
AUC (pg·h/mL)	1630.9± 138.8	1844	0.88

表5 Cabergoline 薬物動態の比較

	Japanese	Caucasian	Ratio (J/C)
Cmax (pg/mL)	39.2±8.8	54.2±40.3	0.72
AUC (pg·h/mL)	624.0± 162.6	514.5± 335.1	1.21

表6 Pramipexole 薬物動態の比較

	Japanese	Caucasian	Ratio (J/C)
Cmax (ng/mL)	0.29±0.04	0.27±0.06	1.07
AUC (ng·h/mL)	3.14±0.55	2.57±0.52	1.22

表7 Ropinirole 薬物動態の比較

	Japanese	Caucasian	Ratio (J/C)
Cmax (ng/mL)	1.36±0.76	1.16±0.49	1.17
AUC (ng·h/mL)	2.80±1.56	3.19±1.53	0.88

Bromocriptine、cabergoline、pramipexole、ropinirolともCmax、AUC比に大きな違いは認

められず、日本人と白人のドパミンアゴニスト薬物動態はほぼ同等と考えられた。白人健常成人における pergolide 薬物動態の結果は、対象者数が少なく今回の解析には用いなかった。

ほとんどの薬剤の実態用量は把握が困難であるが、L-dopa 製剤は多くの臨床試験においてその使用量が記載されている。進行期パーキンソン病患者における L-dopa/DCI 製剤の使用量は本邦で約 400mg、欧米で 700～800mg と日本での使用量は欧米の約半分であった。しかし、L-dopa の薬物動態は日本人と白人において大きな相違は認められなかった（表 8）。

表 8 L-dopa 薬物動態の比較

	Japanese	Caucasian	Ratio (J/C)
Cmax (pg/mL)	250.4 ±23.6	345	0.73
AUC (pg · h/mL)	1630.9 ±138.8	1844	0.88

#### D. 考察

パーキンソン病治療薬においても概して本邦の承認用量は欧米と比べて低く設定されている。国際間の薬物用量相違に及ぼす影響として、体重、薬物代謝酵素、食生活、感受性、対象疾患重症度の違いがあげられる。L-dopa、ドパミンアゴニストの薬物動態は日本人と欧米人でほぼ同等であり、体重差も 20～30%と承認用量の違いを説明できる因子ではない。また、L-dopa、ドパミンアゴニストに対する反応性、疾患重症度も大きな違いがあるとは考えられない。承認用量の決定には、薬物動態の違いよりも、各国で行われた用量設定試験で得られた実際の有効性や安全性などの要素が重視されている。したがって、日本での患者、医師、製薬会社、規制当局が求めるリスク/ベネフィットが欧米と異なることが承認用量、実態用量の違いに大きく影響している。今後、国際共同治

験を実施するにあたり、用量試験が課題となる。

#### E. 結論

パーキンソン病治療薬の用量は、欧米と比較して日本では概して少ない。しかし、薬物動態はほぼ同等であり、本邦でのリスク/ベネフィットに対する価値観が欧米と異なることが用量決定に影響を及ぼしていると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

第 31 回日本臨床薬理学会年会（2010）京都

#### H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

## パーキンソン病における運転技術の評価

### - ドライビング・シミュレーターによる検討 -

研究分担者 野元正弘<sup>1) 2)</sup>

研究協力者 チョウ ウィン ティリー<sup>1)</sup>、西川典子<sup>1) 2)</sup>、辻井智明<sup>1) 2)</sup>、  
田邊奈千<sup>1) 2)</sup>、永井将弘<sup>1) 2)</sup>

1) 愛媛大学大学院 病態治療内科 2) 附属病院 薬物療法・神経内科

#### 研究要旨

目的：ドライビング・シミュレーターを用いてパーキンソン病患者の運転能力を評価し、診療で用いる症状の評価方法や罹病期間、年齢、服薬等との関係を比較検討する。

方法：現在、週に1回以上運転しているパーキンソン病患者 42 例を対象として、ドライビング・シミュレーターにより N 式運転適正検査ソフトを用いて運転能力を検討した。結果：パーキンソン病患者において、運転能力には健常人データと差は見られなかったが、両者とも加齢により低下する傾向が見られた。UPDRS スコアは罹病期間と正の相関が見られ、ハンドル誤操作数とも相関が見られた。しかし、ブレーキ反応時間や安全運転の指標とされる総合評点との相関はなかった。

結論：現在、運転を継続している症例について検討したところ、運転評価は健常人データとの差は見られなかった。UPDRS スコアとの比較では、罹病期間とハンドル誤操作回数と正の相関が見られたが、しかし、ブレーキ操作には UPDRS スコアとの相関は見られなかった。また、安全運転の指標とされる総合評価は UPDRS と相関は見られなかった。以上から運転についてのアドバイスを行うには、UPDRS スコアによる評価では充分でなく、他の方法を含めた総合的な評価が必要である。

#### A.研究目的

パーキンソン病患者では運転能力が低下し、特に若年者で事故の頻度が高くなることが指摘されている (Meindorfner C, Movement Disorders 20:832-842, 2005)。また、日常診療で運転継続の可否についてアドバイスを求められることが少なくない (Zesiewicz TA Neurology 59:1787-1788, 2002)。このためドライビング・シミュレーターを用いてパーキンソン病患者の運転能力を検討し、日常診療で用いている UPDRS の評価と比較検討した。

#### B.研究方法

運転免許を保有し現在、週に1回以上運転しているパーキンソン病患者 42 例 (男性 31 例、女性 11 例)、平均年齢 64.5 歳 (49~78 歳)、H-Y II ~III 度、を対象とした。また、認知機能障害の有無を MMSE で確認し 25 点以上の場合を対象とした。ドライビング・シミュレーターは Safety Master NT-932 を使い、評価には N 式運転適正検査ソフトを用いて運転能力を検討した。シミュレーターによる運転能力の評価は、信号に対するブレーキ反応時間 (単純と複雑)、ハンドル誤操作回数 (単純と複雑) を UPDRS (総点)、罹病期間、年齢等とを比較検討した。

この研究は愛媛大学病院臨床研究倫理委員会に申請し承認を受けて実施した。

Fig 1 UPDRS と罹病期間

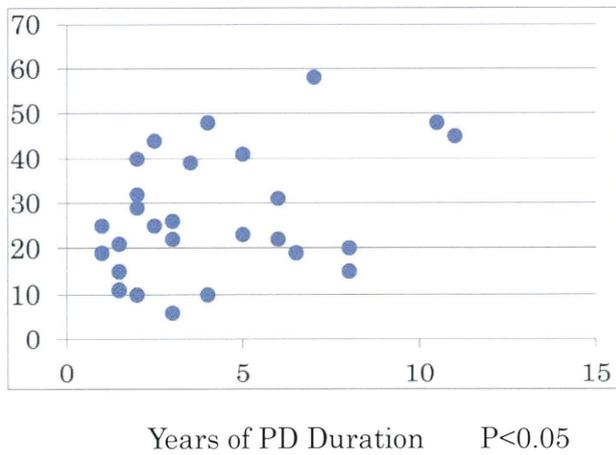


Fig 2 UPDRS とハンドル誤操作数

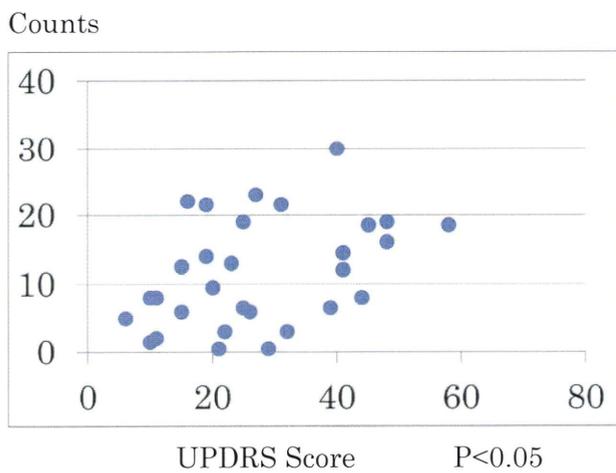


Fig 3 UPDRS とブレーキ反応時間

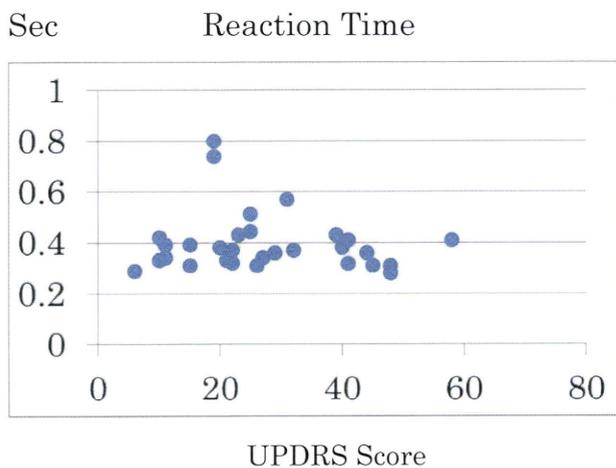


Fig 4 UPDRS と総合評価 (安全運転)

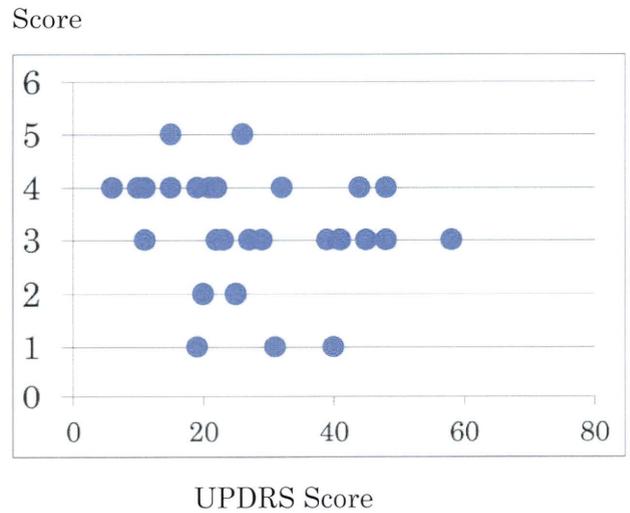
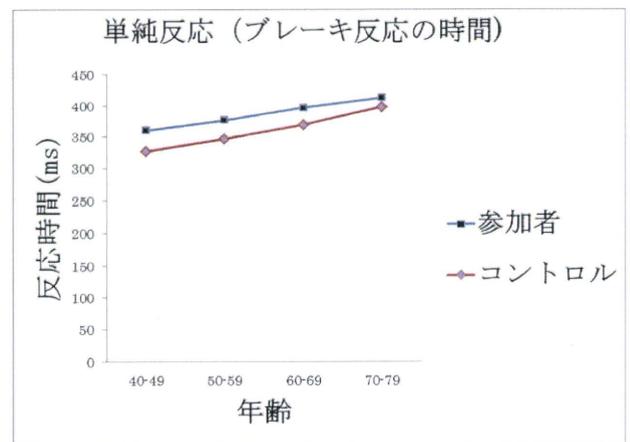
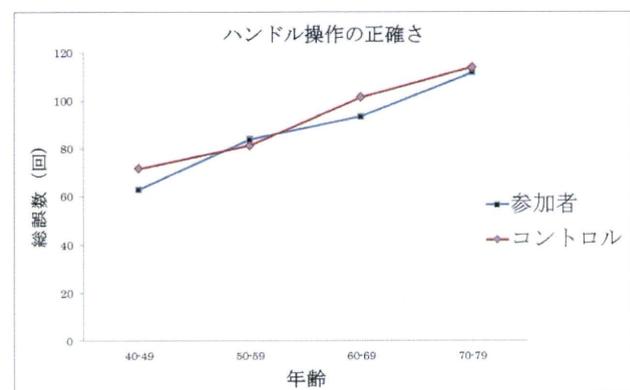


Fig 5 健常人データとの比較



単純ハンドル操作誤数



### C. 研究結果

今回検討したパーキンソン病患者では、健常データと比べて、ブレーキ反応時間、ハンドル誤操作数について差は見られなかった。また両者とも加齢によりブレーキ反応時間とハンドル誤操作

数は増加する傾向が見られた。

UPDRS はパーキンソン病の罹病期間と正の相関が見られ、罹病期間の長期化によりパーキンソン病症状は悪化することが示された (Fig 1)。UPDRS とハンドル誤操作回数には相関が見られ、パーキンソン病の悪化に伴いハンドルの誤操作回数が増加した ( $p < 0.05$ ) (Fig 2)。しかし、ブレーキ反応時間には相関がなく、UPDRS が高値であってもブレーキの反応時間は保たれていた (Fig 3)。またブレーキの反応時間やハンドルの誤操作、反応のムラなどの全体を評価し、運転の安全性を示す安全運転評価点は UPDRS のスコアとは相関がなかった (Fig 4)。

#### D. 考察

パーキンソン病患者において UPDRS と自動車運転の適正検査結果を比較したところ、現在運転を継続し、今回の検討に参加した症例においては健常データとの間に差を認めなかった。UPDRS のスコアについては罹病期間やハンドル操作とは相関が見られたが、適正なブレーキングとは相関せず、また安全運転の総合判定とも相関しなかった。従来からの患者の症状や ADL を評価する方法である。このことはパーキンソン病症状に日常診療で用いる UPDRS では、患者の自動車運転技術を判断するには十分でないことが示された。

#### E. 結論

運転能力を数値化して評価するドライビング・シミュレーターの成績と日常診療で用いる UPDRS のスコアは一致しなかった。自動車運転の継続の可否について相談を受けることが多いが、UPDRS のスコアでは十分な評価はできないこと示された。運転の可否は本人の QOL に重大な関与があるが、一方、運転の継続は交通事故の大きなリスクである。運転の評価には、UPDRS 以外の評価も用いて総合的な評価が必要である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

野元正弘、チョウ・ウイン・ティリー、他. ドライビングシミュレーターによる自動車運転技術と神経症状の評価—パーキンソン病における検討— 神経治療学 27:439-439, 2010.

##### 2. 学会発表

1. 野元正弘、チョウ・ウイン・ティリー、他. ドライビングシミュレーターによる自動車運転技術と神経症状の評価—パーキンソン病における検討— 第 28 回 日本神経治療学会総会 2010 年 7 月 15-16 日, 横浜.

2. Win Thiri Kyaw, Masahiro Nomoto, et al. Evaluation of Driving capacity of Patients with Parkinson's disease using Driving Simulator -Comparison with Neurological Signs-, 29<sup>th</sup> International Congress of Clinical Neurophysiology 2010 Oct 29 - Nov1, Kobe.

3. チョウ・ウイン・ティリー、野元正弘、他. 中枢神経作用薬の注意力、運動操作に対する作用の検討—ドライビング・シミュレーターによる検討—、第 31 回日本臨床薬理学会年会 2010 年 12 月 1 日 - 3 日、京都.

#### H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

特になし