

## 幻覚のメカニズム

柏原健一<sup>1)</sup>

1) 岡山旭東病院神経内科

### 研究要旨

パーキンソン病患者に見られる幻覚、妄想の発現危険因子、メカニズムを調べる目的で外来患者を対象に症候別の発現頻度を運動症状の重症度と併せ検討した。また、その頻度、危険因子、機序に関する報告を文献的に検討した。結果であるが、症候としては幻覚、特に幻視が多い。幻聴や妄想は精神症状重症化時に幻視とともに出現し、単独で生じることは少ない。危険因子には運動症状重症化、認知機能低下などが挙げられる。発現機序として中枢神経系、特に前頭葉、扁桃体のレビー小体出現を伴う神経系の変性、脱落の影響が大きいと考えられた。これに重複するが、中枢コリン系ニューロンの障害と薬剤によるドパミン系過剰刺激のアンバランス説が症状発現、治療を考える上で有用と考えられた。

### A. 研究目的

パーキンソン病（PD）患者は経過中、高頻度うつ、不安、幻覚、妄想、行動障害などの精神症状を呈する。幻覚、妄想は、うつや運動障害重症度とともに QOL 障害の主要因となる<sup>1)</sup>。また、患者の死や、介護施設入所、認知症増悪を促す<sup>2,3)</sup>。一方、介護者にとっては易興奮と並ぶ主要ストレス因となる<sup>4)</sup>。その機序解明、適切な対応法の開発は患者、家族、介護者の生活の質を高める点で重要である。本研究では PD 患者における幻覚、妄想の頻度、危険因子を検討し、関連文献の検討と併せ PD 幻覚、妄想の発現機序を考察する。

### B. 研究方法

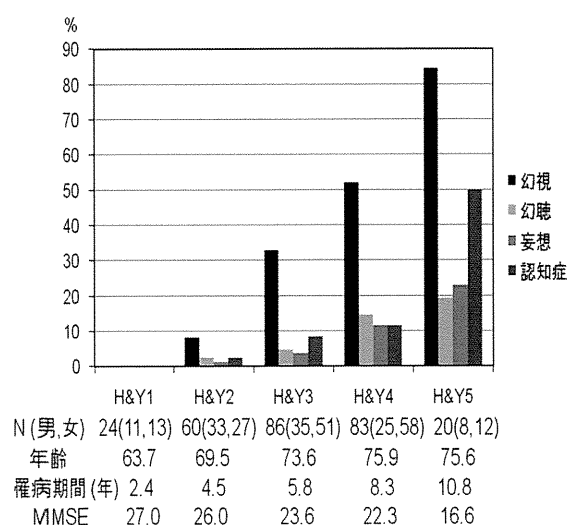
1. 当院外来を 2008 年 1 月から 3 月の 3 か月間に受診した PD 患者連続 273 例につき、Hoehn

& Yahr 重症度、幻視、幻聴、妄想、認知症の有無を調べた。認知症診断は DMS-IV-TR に拠った。

2. PD 患者における幻覚、妄想の発現頻度、危険因子、発現機序に関する文献を検索し、重要と思われるものをまとめ、検討材料とした。

### C. 研究結果

1. PD 外来患者にみられた幻覚、妄想の頻度  
当院通院中の外来 PD 患者における幻視、幻聴、妄想、認知症の有無を Hoehn & Yahr ステージ別に図 1 にまとめた。幻視はステージ 3 から増加し、ステージ 5 では 85%の症例に認められた。認知症はステージ 5 で増加し、約 50%であった。幻視、幻聴、妄想別に調べた結果を図 2 に示した。幻視単独出現が 76 例（27.8%）であるのに対し、幻聴のみは 2 例（1.5%）、妄想のみは 1 例（0.7%）と例外的であった（図 2）。



	H&Y1	H&Y2	H&Y3	H&Y4	H&Y5
N(男,女)	24(11,13)	60(33,27)	86(35,51)	83(25,58)	20(8,12)
年齢	63.7	69.5	73.6	75.9	75.6
罹病期間(年)	2.4	4.5	5.8	8.3	10.8
MMSE	27.0	26.0	23.6	22.3	16.6

図 1. ヤール重症度別幻視、幻聴、妄想の頻度

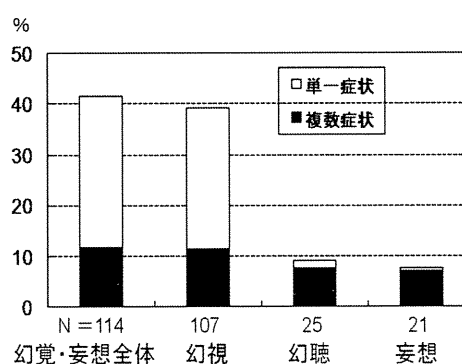


図 2. 幻視、幻聴、妄想の単独、合併出現患者別頻度

表 1. PD 患者の幻覚、妄想に関して報告された主要発現危険因子

報告	患者数	対照者数	危険因子					
			年齢	罹病期間	抗パ薬	認知機能障害	運動障害	うつ
Fernandez et al, 1992	30	20	+	-	-	+	-	-
Haeske-Dewick 1995	16	20	+	-	-	+	+	-
Klein et al 1997	29	58			-	-	+	-
Sanchez-Ramos et al 1996	55	214	+	-	+	+	+	+
Graham et al 1998	32	97			+	+	+	-
Inzelberg et al 1998	35	76	-	-	+	+	-	+
Aarsland et al 1999	23	212	+	-	-	+	+	+
Fénelon et al 2000	86	109	+	+	±	+	+	+
柏原ら 2005	43	21	-	-	-	+	+	-
Biglan et al 2007	34	267	+	-	-	+	+	
Wada-Isoe et al, 2008	14	27	-	-	-	+	+	

+ ; 有意な相関あり、- ; 相関なし、± ; 相関傾向

## 2. 報告されたPD幻覚、妄想の頻度

一般人口を対象とした Aarsland ら<sup>4)</sup>の検討ではPD精神病の頻度は245例中6%である。通院中のPD患者の幻覚、妄想はそれぞれ27、16%<sup>5)</sup>、認知症を伴うPD患者では44、25%に増加する<sup>6)</sup>。これら精神症状はしばしば認知症やうつと

併存する<sup>7)</sup>。剖検による診断確定例での検討<sup>8)</sup>によると、幻覚はPD 445例中221例(50%)、レビー小体型認知症(DLB) 44例中32例(73%)であった。多系統萎縮症や進行性核上性麻痺では255例中18例(7%)と低頻度であり、錐体外路疾患での幻覚発現はPD、DLBを示唆する<sup>8)</sup>。

Fénelon ら<sup>9)</sup>はPD 罹病期間別に幻覚、妄想出現頻度を調べた。5年未満、5～10年、10年以上でそれぞれ27.7、34.6、56.2%であり、罹病期間延長とともに頻度は増加した。症状別では幻聴が20%未満、幻視が72%未満、妄想は5%程度である<sup>10)</sup>。振戦非優位型のPD患者は認知機能低下、うつ、幻覚を生じ易い<sup>11)</sup>。

#### 4. PD患者における幻覚・妄想の危険因子

幻覚、妄想の危険因子として年齢、罹病期間、運動症状の重症度、認知機能低下、抗パーキンソン病薬、うつなどが検討されてきた。報告例を表1にまとめが、一致するのは運動症状重症化と認知機能障害である。抗PD薬は追加、増量を機に精神病状態が出現、増悪する例がある。しかし、統計的には有意でない。嗅覚障害、日中過眠、白内障などによる視力障害、REM睡眠行動異常症も危険因子に数えられる<sup>1,9,12,13)</sup>。

#### 5. PD患者幻覚、妄想の発現機序に関する検討

##### 1) 歴史的研究

PD幻覚、妄想の多くは抗PD薬が惹起すると考えられる時代があった。しかし、L-dopa等のドパミン補充療法導入以前から30-40%に精神病状態が認められている<sup>14)</sup>。初期の報告では幻覚や妄想をPD病態由来と考えず、合併する脳血管障害やうつが原因と考えられた。しかし、運動障害や認知機能障害の進行と平行して出現しやすくなり、抗PD薬量とは必ずしも関連しないなどの点から、PD病理の進行、すなわち内因が主要因と考えられる。一方で、薬剤追加、増量時の悪化もある。薬剤性に惹起される外因優位例、感染症などの身体合併症や入院時の環境変化など、促進因子誘発例もある。以下に幻覚、妄想メカニズムの検討報告を示す。

##### 2) 脳萎縮

Ibarretxe-Bilbao ら<sup>15)</sup>はMRIを用いてPD患者脳を25カ月間フォローし、幻視のある例

で辺縁系、傍辺縁系、前頭葉皮質の萎縮が有意に進行していると指摘した。同様に、Sanchez-Castaneda ら<sup>16)</sup>は幻視と前頭葉、視覚連合野（楔前部、前頭葉下面）萎縮との関連を指摘した。

##### 3) 脳血流、糖代謝

幻視は右上、中側頭回の血流増加、右紡錘状回の血流低下<sup>17)</sup>、幻聴は両側前頭前野、右上側頭回の血流低下<sup>18)</sup>と関連する。PETを用いた糖代謝の検討では視覚刺激時に後頭葉、側頭一後頭移行部、頭頂部で活動性低下、前頭葉上部で活動性が亢進する<sup>19)</sup>。

##### 4) 電気生理学的検討

幻視を呈するPD,DLB患者ではアルツハイマー患者と比べ視覚誘発電位の潜時が遅延、聴覚潜時には有意差がない<sup>20)</sup>。

##### 5) 病理学的検討

PD患者側頭葉へのLB出現は認知機能低下でなく、早期からの幻視と関連する<sup>21)</sup>。Papapetropoulos ら<sup>22)</sup>は部位別に検討し、前頭葉、側頭葉、頭頂葉、扁桃体いずれの部位でも幻覚を呈する患者でLBがより多く出現している事を報告した。Kalaitzakis ら<sup>23)</sup>は認知機能低下が前部帯状回、上前頭回、側頭葉、梨状葉、扁桃体、海馬への $\alpha$ シヌクレイン沈着と関連、一方で幻覚が扁桃体への $\alpha$ シヌクレイン沈着と関連する事を報告した。

##### 6) 神経生化学：中枢コリン系

Short-latency afferent inhibition (SAI) techniqueを用いると、運動皮質におけるinhibitory cholinergic circuitの機能が評価できる。PD患者ではSAIが低下する<sup>24)</sup>が幻覚を呈する患者でより顕著である。

##### 7) 神経生化学：中枢ドパミン系

FP-CIT-SPECTを用いた検討において、DLBでは精神症状が強い例ほど尾状核ドパミントラ

ンスポーターが減少している<sup>25)</sup>。幻覚は認知機能低下でなく、うつ、アパシーと相関し、中脳皮質系ドパミンニューロン障害との関係が示唆される。

#### 8) 神経生化学：中枢セロトニン系

幻視を呈する PD 患者では前頭葉背外側、前頭眼窩面内側、島、腹側 visual pathway においてセロトニン 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の結合親和性増加が報告されている<sup>26)</sup>。抗精神病薬の効果からは 5-HT<sub>2A</sub><sup>27)</sup>や 5-HT<sub>3</sub><sup>28)</sup>受容体過剰刺激が幻視を惹起する可能性も指摘されている。

#### 9) 遺伝的要因

認知症の家族歴は幻視出現と関連する。ドパミントランスポーターや 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の伝子多型が検討されたが、報告者間で一致しない。

### D. 考察

PD 患者の幻覚、妄想は幻視が主であり、幻聴、妄想を主とする統合失調症とは質的に異なる。危険因子として PD 重症化、認知機能障害の進行が重要と考えられる。画像、病理的報告では前頭葉、側頭葉、扁桃体のレビー小体発現を伴う変性との相関が指摘されている。PD や DLB では後頭葉血流低下が知られるが、幻視に対応する病態には前頭葉、側頭葉、辺縁系障害の影響がより大きいと考えられる。

以上から、PD 幻覚、妄想の発現要因として生化学的には中枢コリン系の機能障害が重要と考えられる。一部の患者ではドパミン補充療法薬によるドパミン系、セロトニン系の刺激も精神症状発現を促す。治療としてコリン系機能障害には抗コリン薬中止やコリンエステラーゼ阻害薬に改善効果が期待できる。ドパミン系、セロトニン系の過剰刺激には薬物の変更、減量や非定型抗精神病薬が奏効し得る。

なお、ヒトの主要中枢ドパミン系には黒質線

条体路、中脳辺縁系路、中脳皮質路が知られる。黒質線条体路の変性、脱落は運動障害、中脳辺縁系路は報酬や情動に関与する。PD 患者のドパミン系変性は黒質線条体路が他の経路に先行する<sup>29)</sup>ため、運動障害改善目的で処方されたドパミン補充療法薬は、中脳辺縁系路には過剰に作用する結果となる。一方、ドパミン補充療法薬によるドパミン系の間欠的刺激はシナプス後ドパミン D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> 受容体の感受性を亢進させる<sup>30)</sup>。このドパミン系の過敏反応性形成も幻覚、妄想誘発の一因となる<sup>31)</sup>。なお、Witjas ら<sup>32)</sup>はドパミン系の活動性が薬物によって高められている on 時と、薬効枯渇状況にある off 時の幻覚出現頻度の違いを検討し、on 時の幻覚、妄想出現例が 50%、off 時の出現が 25%、両状態を通しての出現が 25%と報告した。ジスキネジアは薬効が強い on 時に出現するが、幻覚、妄想は off 時に優位な出現例もあり、必ずしもドパミン系の過活動が幻覚、妄想を引き起こす訳ではない。Fénelon ら<sup>14)</sup>はこのコリン系の障害と、ドパミン系の過剰刺激で生じたコリン系—ドパミン系機能のバランス不均衡が幻覚発現に重要と指摘している。幻視が主であればコリン系賦活、妄想が主であれば、ドパミン系の抑制といった症状による対応の選択が有効かどうかは、今後の検討に待たれる。

PD の進行を止める薬物が利用できない現状では、より有効で副作用の少ない対症的治療が求められる。詳細なメカニズムの解明により、より選択的な幻覚、妄想抑制が可能となり、患者、介護者の QOL 改善に結びつくこと期待される。

### E. 結論

PD 患者では幻覚、妄想出現のメカニズムには内因としてコリン系の変性脱落を含む中枢神経病変が重要であり、一部薬剤性誘発がある。

各要因の関与度合は症例ごとに異なると考えられる。臨床症状、経過、認知機能障害度、使

用薬剤の種類等に配慮した治療的対応が望まれる。

#### F. 文献

1. Global Parkinson's Disease Survey Steering Committee. *Mov Disord* 17:60-67, 2002.
2. Goetz CG, et al. *Neurology* 45: 669-671, 1995.
3. Factor SA, et al. *Neurology* 60: 1756-1761, 2003.
4. Aarsland D, et al. *Arch Neurol* 56: 595-601, 1999.
5. Aarsland D, et al. *JNNP* 67: 492-496, 1999.
6. Aarsland D, et al. *JNNP* 78: 36-42, 2007.
7. Aarsland D, et al. *Curr Psychiatry Rep* 1: 61-68, 1999.
8. Williams DR, et al. *Lancet Neurol* 4: 605-610, 2005.
9. Fénelon G, et al. *Brain* 123 (Pt 4): 733-745, 2000.
10. Fénelon G, et al. *J Neurol Sci* 289:12-17, 2010.
11. Reijnders JS, et al. *Parkinsonism Relat Disord* 15:379-382, 2009
12. Matsui H, et al. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 19: 36-40, 2006.
13. Fénelon G. *CNS Spectr* 13(3 Suppl 4):18-25, 2008.
14. Fénelon G, et al. *Neurology* 66: 93-98, 2006.
15. Ibarretxe-Bilbao N, et al. *JNNP* 81:650-657, 2010.
16. Sanchez-Castaneda C, et al. *Mov Disord* 25:615-622, 2010.
17. Oishi N, et al. *Neurology* 65:1708-1715, 2005.
18. Matsui H, et al. *Mov Disord* 21:2140-2144, 2006.
19. Diederich NJ, et al. *Nat Rev Neurol* 5:331-342, 2009.
20. Kurita A, et al. *Mov Disord* 25:167-171, 2010.
21. Harding AJ, et al. *Brain* 125(Pt 2):391-403, 2002.
22. Papapetropoulos S, et al. *Parkinsonism Relat Disord* 12:253-256, 2006.
23. Kalaitzakis ME, et al. *Parkinsonism Relat Disord* 15:196-204, 2009.
24. Manganelli F, et al. *Brain* 132(Pt 9):2350-2355, 2009.
25. Roselli F, et al. *Mov Disord* 24:2097-2103, 2009.
26. Ballanger B, et al. *Arch Neurol* 67:416-421, 2010.
27. Wolters EC. *J Neurol* 248 Suppl 3: III22-III27, 2001.
28. Zoldan J, et al. *Lancet* 341: 562-563, 1993.
29. Halliday GM, et al. *Brain* 128(Pt 11):2654-2664, 2005.
30. Bordet R, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3363-3367, 1997.
31. Moskowitz C, et al. *Am J Psychiatry* 135: 669-675, 1978.
32. Witjas T, et al. *Neurology* 59: 408-413, 2002.

## パーキンソニズムの幻覚：幻覚の薬物治療—非定型抗精神病薬

中島健二<sup>1)</sup>，和田健二<sup>2)</sup>

1) 鳥取大学医学部脳神経医科学講座脳神経内科学分野

2) 鳥取大学医学部附属病院神経内科

### 研究要旨

パーキンソン病において幻覚はしばしば経験され、その治療は重要である。非定型抗精神病薬は定型抗精神病薬に比較してドパミン系への抑制作用が少なく、パーキンソン病患者においても使用しやすい。しかし、高齢認知症患者での使用は死亡率を高めるとの指摘もあり、有害事象に注意する必要がある。また、本邦では幻覚における使用は保険で認可されていない。さらに、幻覚治療における非定型抗精神病薬の有効性に関するエビデンスは十分とはいえない。一方、5HT<sub>2A</sub>拮抗薬も開発されているが、その有効性はまだ明らかでない。パーキンソニズムの幻覚に対する治療における課題は多い。

### A. 研究目的

パーキンソン病 (PD) 患者において幻覚はしばしば経験する。その治療についても多くの検討がなされてきている。パーキンソン病治療ガイドライン 2011<sup>1)</sup>では、日常生活に悪影響を及ぼすようになった時点で治療を開始することを推奨している<sup>1)</sup>。一方、軽度の幻覚を示す PD 患者において、抗精神病薬による治療は非治療群に比してその後の進行を抑制するとの指摘もあり<sup>2)</sup>、幻覚の治療は PD の診療において重要である。非定型抗精神病薬も臨床現場において使用されてきているが、問題点も指摘されている。本検討においては、パーキンソニズムの幻覚における非定型抗精神病薬治療の課題を明らかにする。

### B. 研究方法

パーキンソニズムにおける幻覚治療における非定型抗精神病薬に関する文献的検討を行なう。

(倫理面への配慮)

本検討では主として文献的検討を行なうところから、倫理的問題は生じないものとする。

### C. 研究結果と考察

#### 1. 認知症を伴うパーキンソン病 (PDD) とレビー小体型認知症 (DLB)

認知症疾患治療ガイドライン 2010 では、“臨床病名として、認知症症状が錐体外路症状に先行して発症している場合は DLB、確固とした PD の経過中に認知症症状が起こってきた場合に PDD という用語を用いる”、“両者の間に本質的な違いがあるという証拠はない。DLB と PDD は、1つの疾患スペクトラムの中での認知障害や運動障害の時間的な出現順序や程度の違い、すなわち、同じ疾患の表現型のバリエーションと理解しうる”と記載<sup>3)</sup>されており、本稿においても、この立場で PD、PDD、DLB における幻覚について述べる。

#### 2. 非定型抗精神病薬

精神病治療薬として開発された定型抗精神病薬はドパミン系の抑制作用を有し、有害事象として錐体外路症状やプロラクチン上昇を来す。それに対し、非定型抗精神病薬はセロトニン系に作用すると共にドパミン系には軽度の抑制作用を有し、中脳辺縁系

を抑制して幻覚を改善し、黒質一線状体ドパミン系への抑制は少ないところから、体外路系症状を生じにくい特徴を有す。このような特徴から、PDの幻覚治療に適している可能性が示唆される。

一方、高齢認知症患者において非定型抗精神病薬による死亡率増加の可能性が指摘され、その使用には注意も必要である。高齢認知症患者における非定型抗精神病薬の使用にあたっては、①非薬物療法や非定型抗精神病薬以外の治療に関する十分な検討し、②心機能、呼吸器機能、脳血管障害などのリスク評価し、③FDAの警告や死亡率増加の可能性や合併症、保険非適応などを患者・家族へ十分に説明するよう推奨されている<sup>4)</sup>。また、その使用時には、①少量から開始し、②可能な範囲で短期間のみ投与し、③短期間で評価を行ない、有効性及有害事象の出現をチェックし、投薬を見直すことが重要である<sup>3)</sup>。

### 3. PDの幻覚治療における非定型抗精神病薬

パーキンソン病治療ガイドライン2011<sup>1)</sup>では、非定型抗精神病薬はグレードC1で推奨され、クエチアピンを第一に試みるべき抗精神病薬としている。

海外からの報告<sup>5,7)</sup>でも、ほぼ同様な意見が示されている。非定型抗精神病薬に関するエビデンスレベルの高い報告は少ないが、クロザピンは比較的エビデンスレベルの高い報告がある。しかし、クロザピンは有害事象などの点から臨床的に使用しにくい欠点がある。

クエチアピンは、Open label trialsで有効性が示されているが、double blind placebo controlled trial (DBPCT)では安全性は確認されているが有効性が証明されていない。しかし、クロザピンとの比較試験で有効性に差がみられず、クロザピンに必要な血液検査監視を要せず使いやすいところから、非定型抗精神病薬のなかでは第一選択薬とみなされるとの意見が多い<sup>1,5-7)</sup>。

### 4. PDの幻覚におけるセロトニン系の関与

前述のごとく、セロトニン・ドパミン系に作用する非定型抗精神病薬が治療に使用されるが、定型抗

精神病薬に比較すれば少ないとはいえ、投与量が多くなれば錐体外路症状が出現することが指摘されている<sup>3)</sup>。そこで、ドパミン系への作用がなく、セロトニン系への作用のみを有す薬剤の開発も期待されている。

幻覚を示すPDには、ドパミン系が関与するが、5HT<sub>2A</sub>受容体も関与している可能性がある。例えば、催幻覚薬である hallucinogenic lysergic acid diethylamide (LSD)は5HT<sub>2A</sub>受容体を介して作用する。またし、クロザピンやクエチアピンなどの非定型抗精神病薬は、5HT<sub>2A</sub> and 2C受容体拮抗薬であり、その抗幻覚作用は統合失調症で使用する10分の一以下程度の低用量で作用し、このような低用量の場合には5HT<sub>2A</sub>受容体には高結合するがドパミン受容体には低結合するのみである<sup>8)</sup>。そこで、Ballanger B et al. (2010)は、選択的に5HT<sub>2A</sub>受容体リガンドである setoperone F18を用いたPET studyにより、年齢をマッチさせた幻覚を有すPD患者と有しないPD患者について検討した<sup>8)</sup>。それによると、幻覚を有すPD患者では、両側下後頭回、右紡錘状回、下側頭野を含む腹側視覚経路、両側背側前頭前野、内側眼窩前頭野、島への結合が増加していた。以上のごとく、5HT<sub>2A</sub>受容体が腹側視覚経路を介して幻覚に関与している可能性を指摘し、5HT<sub>2A</sub>受容体拮抗薬の開発への期待を示した<sup>8)</sup>。

### 5. セロトニン (5HT<sub>2A</sub>) 拮抗薬 : Pimavanserin

純粋な5HT<sub>2A</sub>拮抗薬である pimavanserinは、ドパミン受容体への活性を欠き、抗ドパミン作用が極めて低く、主として5HT<sub>2A</sub>を通して作用する<sup>9)</sup>。

Pimavanserinのphase II trialでは、運動症状の増悪はなく安全性が確認され、精神症状に対する有効性及幻覚・精神症状の有意な改善が示唆されたが、全評価項目が改善した訳ではなく、多くは統計学的に有意ではなかったが悪化したものはなかった、との結果であった<sup>9,10)</sup>。

phase III trialでは、予想以上に placebo群において高反応であったため、精神症状、睡眠、介護者負担などの評価において改善がみられたが統計学的

には有意ではなかった。また、placebo に比較して運動症状を含めて悪化はなく、安全性は高かった<sup>9)</sup>。

以上のごとく、Pimavanserin の PD における幻覚に対する有用性は、まだ明らかとは言い難い。さらなる検討が必要と考える。

#### D. 結論

パーキンソニズムの幻覚治療における非定型抗精神病薬については、エビデンスレベルの高い報告は少ない。さらに大規模な DBPCT が必要であり、薬剤の使い分けなどを含め、より安全な使用法が明らかにされていくことを期待したい。

#### E. 文献

- 1) 日本神経学会 “パーキンソン病治療ガイドライン” 作成委員会編 パーキンソン病治療ガイドライン 2011、医学書院、東京、2011
- 2) Goetz CG, et al. *Mov Disord* 23: 1541-1545, 2008.
- 3) 日本神経学会 “認知症疾患治療ガイドライン” 作成合同委員会編 認知症疾患治療ガイドライン 2010、医学書院、東京、2010
- 4) 工藤喬: 認知症テキストブック (日本認知症学会編) 中外医学社、東京、2008、pp171-173.
- 5) Miyasaki JM, et al. *Neurology* 66: 996-1002, 2006.
- 6) Eng ML, et al. *Am J Geriatr Pharmacother* 8: 316-330, 2010.
- 7) Friedman JH. *Parkinsonism Relat Disord* 16: 553-560, 2010.
- 8) Ballanger B, et al. *Arch Neurol* 67: 416-421, 2011.
- 9) Friedman JH. *Parkinsonism Relat Disord* 16: 553-560, 2010.
- 10) Meltzer HY, et al. *Neuropsychopharmacol* 35: 881-892, 2010.



## パーキンソン病のバイオマーカー：現状と展望

徳田隆彦<sup>1)</sup>, 笠井高士<sup>1)</sup>, 石神紀子<sup>1)</sup>, 中川正法<sup>1)</sup>, Omar M.A. El-Agnaf<sup>2)</sup>

1) 京都府立医科大学大学院医学研究科神経内科学, 2) Department of Biochemistry, UAE University

### 研究要旨

パーキンソン病(PD)の診断・鑑別診断・重症度の判定などに有用なバイオマーカーの確立が望まれている。PDの発症機序における $\alpha$ -synucleinおよびその可溶性 oligomerの重要性が指摘されており、 $\alpha$ -synucleinについては我々を含めた国内外の研究グループによりPDのバイオマーカーとしての有用性が検討されている。我々はさらに、ヒトの髄液・血漿中の $\alpha$ -synuclein oligomerを定量するELISA系を新規に開発し、そのELISA系を用いてPD患者及び対照患者の髄液中 $\alpha$ -synuclein oligomerを定量して比較検討した。

### A. 研究目的

パーキンソン病(PD)の診断は、通常はその特徴的な臨床症状の組合せ、画像診断による鑑別診断およびlevodopaに対する反応性の判定により行われているが、発症早期の診断はしばしば難しく、その病理変化を反映するバイオマーカー（サロゲートマーカー）の開発が求められている。さらに、近年の病理学的・免疫組織学的検討により、孤発性PDにおける脳病理とくに $\alpha$ -synuclein ( $\alpha$ -syn)の異常蓄積は運動障害の出現以前に始まっていることが明らかにされており<sup>1)</sup>、このような発症前段階の病理変化をとらえられるバイオマーカーが開発されれば、PDの発症前診断とより早期の治療的介入も可能になると考えられ、臨床的な意義は大きい。

現在、PDのバイオマーカーとして最も期待されている候補蛋白は $\alpha$ -synである。 $\alpha$ -synはPDの特徴的な病理変化であるレビー小体の主成分であり、 $\alpha$ -syn遺伝子(SNCA)の重複変異を有する家系では、正常な $\alpha$ -synの発現量が臨床的な重症度を決定することが報告されている (gene dosage effect)。一方で、最近の研究により、 $\alpha$ -synの神経細胞毒性は凝集した線維よりもpre-fibrillarな状態の $\alpha$ -syn oligomerに起因する可能性が高いことが報告されている<sup>2)</sup>。また近年の研究により、 $\alpha$ -syn蓄積病理はPDの運動症状発現以前にすでに下部脳幹に存在し、それがシナプスを

介して中枢神経系内を進展していくこと<sup>1)</sup>が示され、このような神経毒性およびその「伝播」機序の責任分子として細胞外の $\alpha$ -syn、とくにその可溶性 oligomerが重要視されている<sup>3)</sup>。以上のように、 $\alpha$ -synの発現量および細胞外液に存在する $\alpha$ -synはPDの発症および進展に重要であり、髄液 $\alpha$ -synはPDの診断バイオマーカーとして期待されている。また上記のような「伝播」機序が存在するならば、 $\alpha$ -syn oligomerはPDの運動症状発症前診断のバイオマーカーとなる可能性もある。

我々は生体内での $\alpha$ -synの量的変化とPDの発症との関連に注目し、従来からヒトの髄液中でのtotal  $\alpha$ -synの定量系について報告してきた<sup>4)</sup>。さらに我々は、従来は定量が不可能であった髄液中の $\alpha$ -syn oligomerを特異的に定量するELISA系を新規に開発し、そのELISA系を用いてPD患者及び対照患者の髄液中 $\alpha$ -syn oligomerを定量し、そのPDバイオマーカーとしての有用性を検討した<sup>5)</sup>。

### B. 研究方法

#### 1) $\alpha$ -syn oligomerに特異的なELISA系の開発

$\alpha$ -syn oligomerを定量する目的で、同一の抗ヒト $\alpha$ -syn monoclonal抗体(C211, SantaCruz)をcaptureとdetectionに用いるsingle-antibody sandwich ELISA (SAS-ELISA)系を開発した(C211-C211 ELISA)。これ

は capture 抗体として C211 抗体を用いて、detection 抗体には biotin 化した C211 抗体を用いる ELISA である(図 1)。抗体が実際にヒト髄液中のどの様な分子量の  $\alpha$ -synuclein species を検出するかについては、ヒトの髄液を Sephadex G-75 gel (GE, Pharmacia)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより分子量に応じて分画した後に、各画分を C211-C211 ELISA に apply して得られる信号強度を解析した。

## 2) PD 患者および対照患者髄液中の $\alpha$ -syn の定量

1)で開発した C211-C211 ELISA 系を用いて、PD 患者(32 名、43-83(67.3  $\pm$  9.4)歳、男性 18 名女性 14 名)および対照患者(28 名、29-86(64.0  $\pm$  13.9)歳、男性 18 名女性 10 名)を対象として、髄液中の  $\alpha$ -syn oligomer を定量し比較検討した。また同じ髄液サンプルを用いて、従来から用いている total  $\alpha$ -syn (monomer + oligomer)を定量する ELISA 系 (C211-FL140 ELISA)により髄液中の total  $\alpha$ -syn 濃度も同じサンプルで同時に測定した。

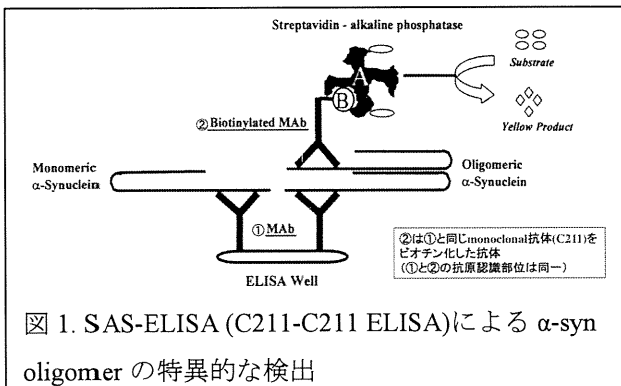


図 1. SAS-ELISA (C211-C211 ELISA)による  $\alpha$ -syn oligomer の特異的な検出

(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) $\alpha$ -syn oligomer を定量する ELISA 系

ゲルろ過クロマトグラフィーにより分画したヒト髄液画分では、C211-C211 ELISA は  $\alpha$ -syn monomer が溶出される画分では信号を得られず、約 40kDa 以上の分子量を有する蛋白質分子が溶出される画分

のみ信号が検出された(図 2)。C211 抗体はヒト  $\alpha$ -syn に特異性の高い monoclonal 抗体であり、以上から C211-C211 ELISA は、ヒト髄液中の  $\alpha$ -syn monomer を検出せずに、特異的に  $\alpha$ -syn oligomer を検出していると考えた。

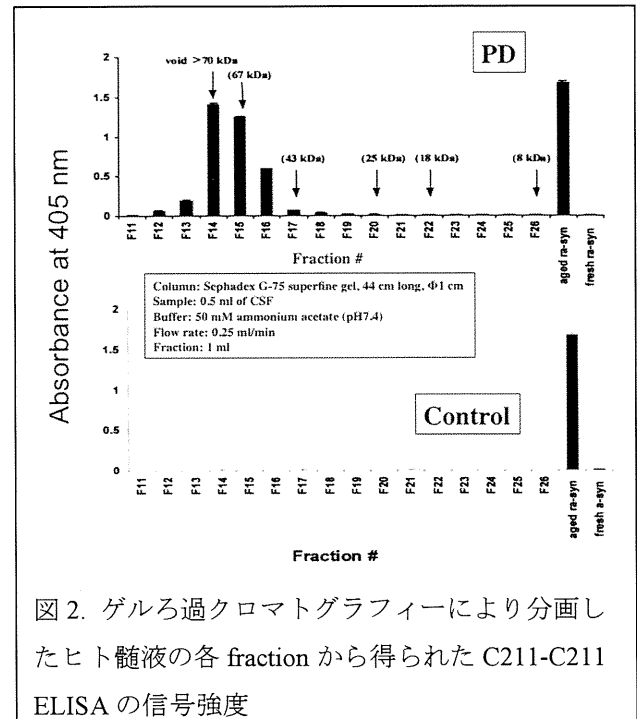


図 2. ゲルろ過クロマトグラフィーにより分画したヒト髄液の各 fraction から得られた C211-C211 ELISA の信号強度

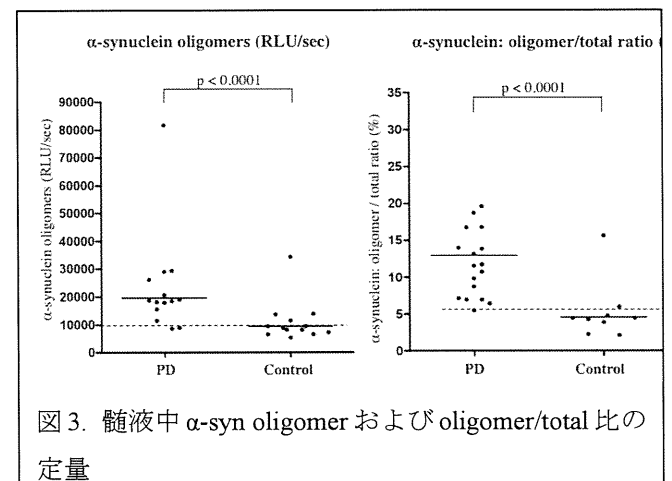


図 3. 髄液中  $\alpha$ -syn oligomer および oligomer/total 比の定量

### 2) PD 患者及び対照患者髄液中の $\alpha$ -syn の定量

我がが開発した C211-C211 ELISA および C211-FL140 ELISA による検討では、PD 患者の髄液中では、対照患者と比較して、total  $\alpha$ -syn 濃度は低下していたが (PD vs. Control: 20.98  $\pm$  0.76 vs. 24.40  $\pm$  1.17 ng/ml,  $p=0.0417$ )、C211-C211 ELISA で測定され

る  $\alpha$ -syn oligomer 濃度(PD vs. Control:  $19,791 \pm 2,458$  vs.  $9,569 \pm 1,037$  RLU/sec,  $p < 0.0001$ ) および  $\alpha$ -syn oligomer/ total 比 (PD vs. Control:  $12.92 \pm 1.08$  vs.  $4.58 \pm 0.52$ ,  $p < 0.0001$ )が有意に増加していた(図 3)。CSF  $\alpha$ -syn oligomer および  $\alpha$ -syn oligomer/ total 比による PD と Control の鑑別能力は、ROC 解析における AUC がそれぞれ 0.859 および 0.948 であった。

#### D. 考察

ヒト髄液中  $\alpha$ -syn の ELISA による定量は、2006 年に著者らが行った報告が最初であり、対照群と比較して、PD 患者では髄液  $\alpha$ -syn 濃度が低下し、重症度が増すに従ってさらに低下することを示した<sup>4)</sup>。PD で髄液  $\alpha$ -syn が低下する病的機序としては脳実質への沈着が free の可溶性  $\alpha$ -syn を低下させていることが主因であると考えた。その後、より大規模な検討でも、対照患者/AD 群と比較した PD/DLB (レビー小体型認知症) 患者群<sup>6)</sup> で髄液  $\alpha$ -syn が低値であることが示されたが、PD 群と正常対照群で差がなかったとする結果<sup>7)</sup> も報告された。このような報告間の不一致と PD 群と対照群の間にかかなりの overlap があることから、現時点では、髄液  $\alpha$ -syn は PD の診断バイオマーカーとしては未だ不十分であると考えられている。2010 年の報告では、 $\alpha$ -syn は赤血球中に大量に含まれており、その髄液濃度は、採取時の血液の混入によって大きく増加することが示された。この報告では、髄液  $\alpha$ -syn 濃度は、全サンプルの比較では正常対照群と PD 群で有意差はなかったが、ヘモグロビン濃度の高かったサンプルを除去すると PD 群では正常対照群よりも有意に低値であった<sup>8)</sup>。従ってこれまでの髄液  $\alpha$ -syn を定量した報告の結果が一致しなかったのは、血液のコンタミネーションが原因である可能性がある。

また、 $\alpha$ -syn oligomer が PD 患者脳における神経細胞毒性にとって重要であるという最近の知見からは、 $\alpha$ -syn oligomer は PD の病態発現により特異的なバイオマーカーとなるはずである。我々もこのような発想のもとに、 $\alpha$ -syn オリゴマーを定量する

ELISA 系を世界に先駆けて開発した<sup>5)</sup>。この C211-C211 ELISA による検討で、PD 患者群では、対照患者群と比較して、髄液中の  $\alpha$ -syn oligomer および  $\alpha$ -syn oligomer/ total 比が有意に増加していた。髄液中  $\alpha$ -syn oligomer および  $\alpha$ -syn oligomer/ total 比によって、PD 群と対照群とは、ROC 解析における AUC がそれぞれ 0.859 および 0.948 と高い弁別能力により鑑別できたことから、髄液中  $\alpha$ -syn oligomer 濃度 および  $\alpha$ -syn oligomer/ total 比は PD の診断バイオマーカーとして有用であると考えられた。我々の報告は少数例による preliminary な報告であり、今後の大規模研究による validation が必要であるが、髄液  $\alpha$ -syn oligomer が PD のバイオマーカーとしてきわめて有用性が高い可能性を実際に示したことの意義は大きい。

#### E. 結論

- 1) PD 患者の髄液中では、対照患者と比較して、total  $\alpha$ -syn 濃度は低下することが我々の検討および他のグループの検討から明らかになっている。
- 2) PD 患者の髄液中では、 $\alpha$ -syn oligomer レベルおよび  $\alpha$ -syn oligomer / total 比が有意に増加していた。
- 3) 髄液中の  $\alpha$ -syn oligomer レベルおよび  $\alpha$ -syn oligomer / total 比を測定することにより、PD 患者群と対照患者群とを、高い弁別能力で鑑別できた。
- 4) 髄液中の  $\alpha$ -syn oligomer は PD の診断バイオマーカーとして有用である可能性がある。

#### F. 文献

- 1) Braak H, et al. *Neurobiol Aging*. 197-211, 2003.
- 2) Xu J, et al. *Nat Med*. 564-565, 2002.
- 3) Desplats P, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 13010-13015, 2009.
- 4) Tokuda T, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 162-166, 2006.
- 5) Tokuda T, et al. *Neurology* 1766-1772, 2010.
- 6) Mollenhauer B, et al. *Exp Neurol*. 315-325, 2008.
- 7) Ohrfelt A, et al. *Neurosci Lett*. 332-335, 2009.
- 8) Hong Z, et al. *Brain* 713-726, 2010.

## 筋萎縮性側索硬化症のバイオマーカー：現状と展望

桑原 聡

千葉大学大学院医学研究院・神経内科学

### 要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）のバイオマーカーとして求められるものは、早期診断において高い感度・特異度を有すること（診断マーカー）、疾患進行を鋭敏に反映すること（surrogate marker）、予後の予測因子（予後マーカー）としての意義を持つことの 3 点が挙げられる。これまでに血清、髄液、神経画像、電気生理の各方面から多くの検討が行われている。中でも孤発性 ALS の病態に関わるとされる TAR DNA-binding protein 43 kDa（TDP-43）を核としたバイオマーカー探索がなされている。現時点において確立されているバイオマーカーはないが、今後有望な診断マーカーとして髄液 TDP-43、予後マーカーとして髄液 TDP-43 と軸索持続性 Na 電流、錐体路変性・組織破壊のマーカーとして髄液 neurofilament と MRI 拡散テンソル画像が挙げられる。

### A. はじめに

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は進行性に上位および下位運動ニューロン系統変性を来たす代表的な神経難病である。2006 年に孤発性 ALS の運動ニューロンにおける TAR DNA-binding protein 43 kDa（TDP-43）の核から細胞質への異常局在と凝集が報告されて以来、TDP-43 を中心とした分子病態の解析が進められている。

一方、バイオマーカーとは英国 Medical Research Council よると「その疾患における病態を反映し、治療介入に際して疾患進行の surrogate marker となる評価法」として定義されている。ALS のバイオマーカーとして求められるものは、早期診断法として高い感度・特異度を有すること（診断マーカー）、疾患進行を鋭敏に反映すること（surrogate marker）、予後の予測因子（予後マーカー）としての意義を持つこと挙げられる<sup>1)</sup>。本稿では血清、髄液、神経画像、電気生理の面から ALS のバイオマーカーの現状と展望を概説する。特に髄液 TDP-43 は有力な早期診断マーカーの候補であると考えられるため、中心

述べる。

### B. 血清バイオマーカー

1970 年代から ALS 患者血清中で正常者と有意差があるマーカーとしてアミノ酸分画（チロシン、バリン、セリン、グルタミン酸の上昇）、フィブロンネクチン（低下）、ヒアルロン酸（上昇）、IL-6（上昇）、アンギオゲニン（上昇）などが報告されてきたが、追試はなされておらず、現時点で有力な血清診断マーカーは存在しない。

血清 TDP-43 に関する論文は ALS を対象とした報告はなく、前頭側頭葉変性症において正常対照より有意な高値であったとの報告があるが、かなり両群における overlap があり、診断マーカーとしての有用性は確認されていない<sup>2)</sup>。

### C. 髄液バイオマーカー

ALS 髄液バイオマーカーとして、アミノ酸分画、neurofilament、erythropoietin などが報告されているが、この中で 3 つ以上の研究で髄液

neurofilament の上昇が示されている<sup>1)</sup>。髄液 neurofilament の上昇は ALS に特異的ではないが、神経組織破壊を反映していると考えられ、ALS においても組織障害のマーカーとして有用である可能性がある。

2008 年以降に 3 つの報告において ALS 患者髄液の TDP-43 の上昇を示す報告がなされた<sup>3)5)</sup>。Steinacker ら<sup>3)</sup>は、ALS 患者 60 名と正常対照 28 名において immunoblot で髄液 TDP-43 を測定し、ALS 群で有意な上昇を報告した。しかし ALS 群と正常群における overlap はかなり大きく、方法論としても immunoblot の intensity 測定は正確性を欠くと言わざるを得ない。

2009 年に Kasai ら<sup>4)</sup>は、ALS30 名と疾患対照 29 名において髄液 TDP-43 を ELISA 法で測定し、ALS 患者の 23% で異常高値を示すこと、発症から 10 カ月以内で高値をとる傾向があることを報告した。この研究では ALS 患者の中に髄液 TDP-43 高値を呈する患者が実際に存在すること、発症早期に上昇しやすい可能性を示した点で意義がある。

2011 年 Noto ら<sup>5)</sup>は、27 名の ALS 患者と 50 名の疾患対照において髄液 TDP-43 の上昇は ALS に特異的にみられること、ROC 解析を用いて感度が 59%、特異度が 96%であることを示した。この報告では罹病期間と髄液 TDP-43 値の関連はみられなかったが、髄液 TDP-43 高値群で有意に生存期間が長いことを示している。髄液 TDP-43 高値群では TDP-43 を細胞内から髄液中へ排出する代償機構が保たれている可能性が示されており、非常に興味深い。これらの結果は ELISA による髄液 TDP-43 測定が ALS の診断マーカーおよび予後マーカーとして有用である可能性を示しており、今後の研究発展が期待される。

#### D. 神経画像

これまでに 80 編以上の MRI を用いた報告がなされている。診断マーカーとして MR-Spectroscopy、拡散テンソル画像、voxel-based morphometry の

3 つの報告が特に多い<sup>1)</sup>。中でも拡散テンソル画像における錐体路の fraction anisotropy 値は経過とともに低下していくことが示されており、錐体路変性を反映するバイオマーカーとして有用な可能性がある。Voxel-based morphometry による一次運動野容積低下は、感度、特異度が十分に検証されているとはいえない。

#### E. 電気生理

ALS において短母指外転筋・第一背側骨間筋が小指外転筋に比べて有意に筋萎縮が高度であることが報告されており、split hand と呼ばれている。この現象を複合筋活動電位で定量すると感度 71%、特異度 89%であり、ALS の診断マーカーと成り得ることが示されている。また ALS の運動軸索における持続性 Na 電流の増大と、この電流と生存期間との相関が示唆されており、予後マーカーとして応用できる可能性がある。

#### F. 結論

ALS において現在確立されている血清、髄液、神経画像、電気生理のバイオマーカーはないが、今後有望な診断マーカーとして髄液 TDP-43、予後マーカーとして髄液 TDP-43 と軸索持続性 Na 電流、錐体路変性・組織破壊のマーカーとして髄液 neurofilament と MRI 拡散テンソル画像が挙げられる。

#### G. 文献

- 1) Turner MR, et al. Lancet Neurol 2009;8:94-109.
- 2) Fould P et al. Acta Neuropathologica 2008;116:141-146.
- 3) Steinacker P et al. Arch Neurol 2008;65:1481-1487.
- 4) Kasai T, et al. Acta Neuropathol 2009;117:55-62.
- 5) Noto Y et al. Amyotroph Lateral Scler 2011;12:140-143.

## RNA 代謝異常の観点から

### TDP-43 の自己調節機能の観点からの ALS の病態機序の考察

小野寺理<sup>1)</sup>

横関明男<sup>2)</sup>, 有泉優子<sup>2)</sup>, 佐藤達哉<sup>2)</sup>, 近藤千草<sup>2)</sup>, 石原智彦<sup>2)</sup>, 桑原美咲<sup>2)</sup>,  
今野拓也<sup>2)</sup>, 加藤泰介<sup>2)</sup>, 西澤正豊<sup>2)</sup>, 小山哲秀<sup>5)</sup>, 志賀篤<sup>2)</sup>, 譚春風<sup>3)</sup>,  
豊島靖子<sup>3)</sup>, 高橋均<sup>3)</sup>, 廣川祥子<sup>4)</sup>, 佐藤俊哉<sup>4)</sup>, 横山峰介<sup>4)</sup>

1) 新潟大学脳研究所 分子神経疾患資源解析, 2) 同 神経内科, 3) 同 病理,  
4) 同 動物実験, 5) 新潟大学超域研究機構

#### 研究要旨

TDP-43 の蓄積と、その遺伝子変異が ALS 患者で認められたことから、TDP-43 は ALS の病態に本質的に関与すると考えられている。しかし、TDP-43 による病態機序は不明である。TDP-43 はスプライシングに関与する因子と考えられているが、一般にスプライシング関連因子は、自己の選択的スプライシングによりナンセンス依存性 mRNA 分解機構により、mRNA 量を調節して、その発現量を調節している。このことから、我々は、本症の病態の背景に TDP-43 の量的異常がある可能性を考えた。我々は TDP-43 がエクソン 6 内での 2 カ所のスプライシングにより、その発現量を調節していることを見いだした。その結果から、TDP-43 の自己発現調節機能が、本症の病態機序の背景にある可能性について論じる。

#### A. 研究目的

TDP-43 の過剰発現モデルでは、野生型でも、変異型でも神経細胞死を引き起こす。この事実は、TDP-43 の量的異常が病態に関与している可能性を示唆する。

一方、TDP-43 の欠損ヘテロマウスでは、TDP-43 蛋白量の減少を認めない。さらに、mRNA 量も正常の 7 割と、想定される 5 割より多く存在した。この事実から、我々は、TDP-43 が自己の蛋白質依存性に自己の mRNA の量を調節している可能性を考えた。

このような自己発現調節機能の存在は、多くのスプライシング関連因子で知られており、自己のスプライシングを制御し、ナンセンス依存性 mRNA 分解機構 (Nonsense Mediate mRNA Decay:

NMD) を惹起して行っていることが知られていた。

NMD は mRNA の質の維持機構で有り、かつ量の調節機構として働いている。この機構は終止コドンが最終エクソン・エクソン結合部位より 50 塩基以上上流に存在すると、その mRNA を分解する機構である。本来終止コドンは最終エクソンに存在するため、この基準を満たさない。しかし、変異や、読み間違いなどで、新たな未成熟終止コドンが出来た場合、それ由来の産産物を作らないための、mRNA の質の管理機構である。

スプライシング関連因子は、最終エクソン内で選択的スプライシングを行うことで、最終エクソン・エクソン結合部位を新たにつくり、NMD 機構により分解させる。この機構は、原則的に自己の蛋

白質により制御されている。スプライシング因子の量は、細胞機能の維持に重要と考えられ、その量を厳格に維持する機構として、巧みなシステムといえる。

TDP-43 はもともと RNA 関連蛋白であり、スプライシングへの関与が示唆されていることから、これらスプライシング関連因子と同様の自己発現調節機構が存在することを推定した。

本 WS では、この TDP-43 の発現調節機構への NMD の関与について述べる。

## B.研究方法

細胞培養：HeLa 細胞は通常の方法で培養し、200 ng/μl の cycloheximide にて 6 時間処理した。

安定発現細胞の作製：Flp-In™ T-REx™ システムにてテトラサイクリン誘導型の TDP-43 の安定発現細胞を作製した。

RNA 調整法：RNA は mirVana mRNA isolation kit(Ambion)により調節し、cDNA は SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)にて作製した

定量 PCR：SYBR Premix Ex Taq™(Takara)を用い Thermal Cycler Dice® Real Time System(Takara)にて増幅，検出を行った。内在性コントロールは Human Housekeeping Gene Primer Set (Takara) を用い GeNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>)にて解析し，選択した。定量 PCR の統計解析は REST. (<http://www.gene quantification.de/rest-2009.html>)を用いた。

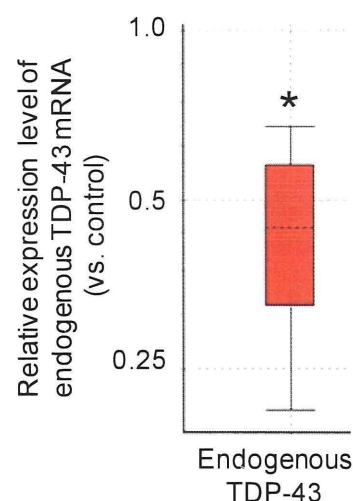
## C.研究結果

テトラサイクリン添加により TDP-43 は良好に誘導された。一方内在性の TDP-43 は減少し，この結果から TDP-43 の増加が，TDP-43 の発現量の down regulation を引き起こすことが示された (図 1, 2)。



図 1 外来性 TDP-43 発現細胞 (2 段目) では内在性 TDP-43 (左図) の発現低下を認める。上段は全長型 TDP-43, 下段は C 末欠損型 TDP-43. C 末欠損型では内在性の低下は認めない。

図 2 内在性 TDP-43 mRNA の定量  
外来性 TDP-43 の発現により内在性 TDP-43 の発現量は有意に低下する。  
P<0.05



次に，この減少が mRNA の NMD 機構を介した量の調節によることを示すために，HeLa 細胞に NMD 阻害剤である Cycloheximide (CHX) 存在，非存在下で RT-PCR 法を用いてエクソン 6 領域を増幅した。

その結果，CHX 処理群で約 600bp の増幅産物を検出した。塩基配列解析の結果，同産物はエクソン 6 内の 2 カ所でスプライシングを受ける事が判明した。我々はこの 2 カ所のエクソン内イントロンのうち 5'側をイントロン e6-1, 3'側をイントロン e6-2 と命名した。CHX 処理にて増大した産物はイントロン e6-1, e6-2 共にスプライシングを受

けており、通常の終止コドンを使い、新たな終止コドンを作り出す。この産物は NMD の条件を満たす。定量 PCR によっても、CHX 処理にて TDP-43 の mRNA 量は約 1.6 倍に増加した。さらに、e6-2 をスプライスアウトした産物を選択的に定量するプライマーで検討したところ、イントロン e6-2 をスプライスアウトした産物が CHX 処理にて 3.4 倍と著明に増加していた (図 3)。

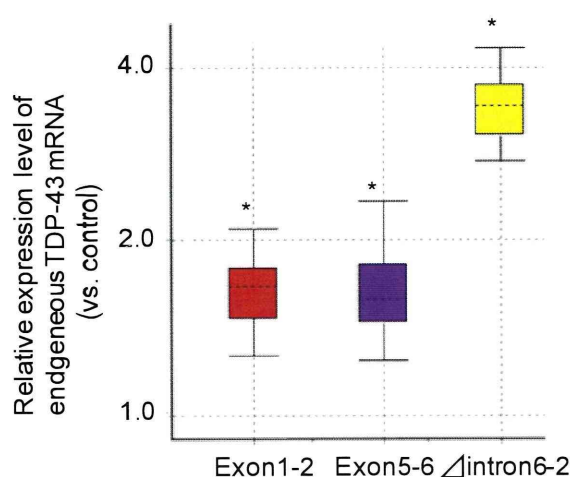


図 3 CHX 処理による TDP-43 mRNA 量の検討

#### D. 考察

TDP-43 はエクソン 6 内にイントロンを 2 カ所もつ。TDP-43 の増加は両者のスプライシングを促進し、NMD を惹起することにより、TDP-43 の mRNA 量を減少させることを明らかにした。

興味深いことに、今まで報告された TDP-43 の疾患関連変異の多くはこのエクソン 6 内イントロンに集中している。

今後、これらの変異が TDP-43 のエクソン 6 内のスプライシングにどのような影響を与えるか検討を加える必要がある。

我々は、作業仮説として、次の様な仮説を提唱する。TDP-43 は自己発現調節のためエクソン内の 2 カ所のイントロンをスプライシングにより除去する必要がある。疾患関連変異があると、このス

プライシングがうまく進行せず、自己調節機構が働かず TDP-43 の量的異常が引き起こされる可能性を考えた (図 4)。

この検証のためには ALS 罹患組織における TDP-43 量の変化の有無を詳細に検討する必要があると考えた。

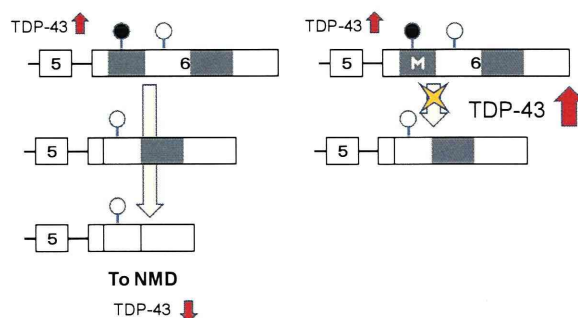


図 4 疾患関連 TDP-43 変異による病態機序仮説。左は正常な TDP-43, 右は変異 (M) をもつ TDP-43。黒丸は正常な終止コドン。白丸はスプライシングにより新たに形成される終止コドン。箱はエクソン。数字はエクソンのナンバーを示す。線はイントロン。灰色の箱はエクソン 6 内のイントロンを示す。M は変異をもつイントロン。TDP-43 が上昇すると、通常は左側の経路でイントロンが除去され NMD により分解され TDP-43 の減少を来す。変異があると、このイントロンの除去が進まず自己調節機能が働かず TDP-43 の量的異常を引き起こす。

#### E. 結論

TDP-43 の自己発現調節機能を検討し、疾患関連変異型 TDP-43 の病態機序に、この自己発現調節機構が関わる可能性について考察した。

#### F. 文献

本研究内容は未発表データである



## TARDBP/PGRN/VCP と TDP-43: TDP-43 発見から 5 年を経て

### 2) 蛋白化学の立場から

長谷川成人<sup>1)</sup>

辻浩史<sup>1,2)</sup>, 山下万貴子<sup>1)</sup>, 野中 隆<sup>1)</sup>, 新井哲明<sup>3)</sup>, 吉田眞理<sup>4)</sup>, 村山繁雄<sup>5)</sup>,  
齊藤祐子<sup>6)</sup>, 玉岡晃<sup>2)</sup>, David Mann<sup>7)</sup>, 秋山治彦<sup>1)</sup>

- 1) 東京都医学総合研究所, 2) 筑波大学神経内科, 3) 筑波大学精神科, 4) 愛知医科大学  
加齢医科学研究所, 5) 東京都健康長寿医療センター, 6) 国立精神神経センター,  
7) University of Manchester

#### 研究要旨

TDP-43 の発見から 5 年を経て、TDP-43 の異常分子病態が整理されてきた。患者脳に蓄積する異常 TDP-43 は、疾患によりその重合構造が異なり、TDP-43 proteinopathy の臨床病理型を決定している可能性が考えられる。TDP-43 異常を引き起こす遺伝子変異が同定され、PGRN 変異は Type A、TARDBP 変異は Type B、VCP 変異は Type D あるいは B の TDP-43 病変を誘導する。それぞれ、炎症、蛋白自体の構造変化、プロテアソーム系障害など、異なる系を介した TDP-43 蓄積機構が考えられる。

#### A. 研究目的

TDP-43 の異常病変は、大脳では、神経細胞内に細胞内封入体(NCI)として、核内に核内封入体(NII)として、突起内に突起内封入体(DN)としてみられ、ALS の脊髄では、スケイン様封入体、円形封入体、あるいはグリア内封入体などとして観察される<sup>1,2)</sup>。このように、TDP の蓄積形態や蓄積部位は様々であるが、病理型によって大まかに 4 つに分類されること、またその病理と臨床像に相関が認められることが示されている<sup>3,4,5)</sup>。

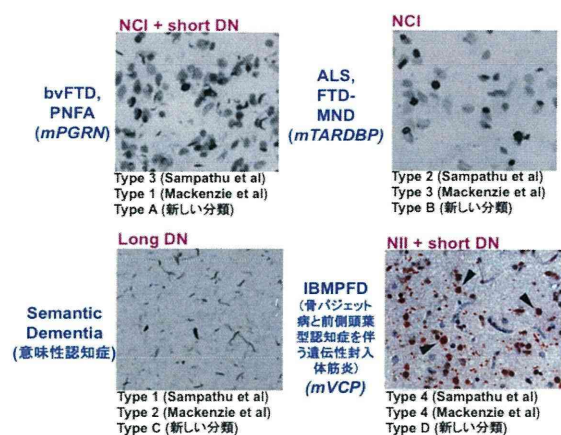
TDP-43 蓄積症の臨床病理型の違いは、生化学的にも分類が可能であり、それは TDP-43 の C 末端バンドパターンの違いとして検出される<sup>6)</sup>。

本研究は、TDP-43 の病理、生化学の違いがどのように生じるのか、患者脳に蓄積する TDP-43 の生化学解析をもとに明らかにすることを目的とする。また TDP-43 の蓄積を引き起こす遺伝子変異とそれぞれの病理型の対応づけを行い、これまでの論文報告、および実験結果をもとにして、TDP-43 蓄積の分子メカニズムについて考察する。

#### B. 研究方法

Type A, B, C それぞれの病理を示す患者剖検脳からサルコシル不溶性画分を調製し、それをトリプシン、あるいはキモトリプシン処理した後、プロテアーゼ抵抗性を示す TDP-43 バンドをリン酸化特異抗体 pS409/410 で検出した。

PGRN, TARDBP, VCP 遺伝子変異と TDP-43 の蓄



積に関しては、変異効果を細胞、あるいは動物モデルを用いて検討した。具体的には *PGRN* 変異については *PGRN* 欠損マウス(12 ヶ月, 24 ヶ月齢)の脳組織を TDP-43 抗体を用いて組織染色し病変の有無を観察した。 *TARDBP*, *VCP* 変異については、それぞれの変異体を SH-SY5Y 細胞に発現し、TDP-43 の凝集、蓄積に影響を及ぼすかどうかを中心に検討した。

(倫理面への配慮)

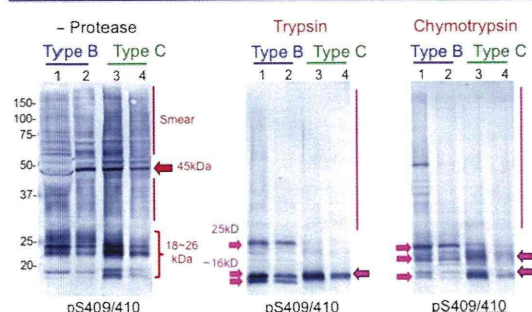
剖検脳の生化学解析は、当研究所の倫理委員会に研究の申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

### C. 研究結果

#### 1. TDP-43 のプロテアーゼ耐性バンドの解析

TDP-43 の C 末端バンドパターンが臨床病理型の違う疾患で異なるのは、異常 TDP-43 の構造(線維構造)を反映している可能性が考えられる。そこで、トリプシン、キモトリプシンを用いてプロテアーゼ処理を行い、その耐性バンドを C 末端抗体で検出した。その結果、トリプシン処理により、45kD の全長分子、スミアの反応は消失し、新たに 25kD, 16kDa のバンドが出現した。そしてそのバンドは、ALS(Type B)と意味性認知症(Type C)で異なっていた<sup>7)</sup>。キモトリプシンの場合も、同様に病理型によるバンドの違いが検出された。

患者脳に蓄積するTDP-43のプロテアーゼ耐性バンドの解析



プロテアーゼ耐性TDP-43のバンドパターンの違いは異常分子の重合状態の構造の違いを反映する。

Hasegawa M, et al. J Mol Neurosci 2011

Type A, B, C それぞれの病理を示す患者脳の多数例から不溶性画分を調製し、同様の検討を行った結果、病理型の違いによって、プロテアーゼ耐

性バンドのパターンが明確に区別できることが示された(Tsuji et al, manuscript under review)。このプロテアーゼ耐性 TDP-43 バンドパターンの違いは線維構造をとって蓄積した TDP-43 の最も固い線維の中心構造の違いを反映すると思われる。すなわち TDP-43 の C 末断片のバンドパターンの違いは TDP-43 の重合状態、立体構造の違いを反映すると考えられた。

重要なことに、一人の患者脳の様々な脳の部位に蓄積する TDP-43 の C 末断片バンドのパターンを調べた結果、蓄積量の違いはあれ、どの部位をとっても基本的に同じバンドパターンを示した。細胞内の異常蛋白質が外から導入されたシードをもとに細胞内で重合することが実験的に示されている<sup>8)</sup>ことなどと考え合わせ、この結果は、ある一カ所で生じた異常蛋白質が細胞間を伝って広がった可能性を強く示唆する<sup>9)</sup>。

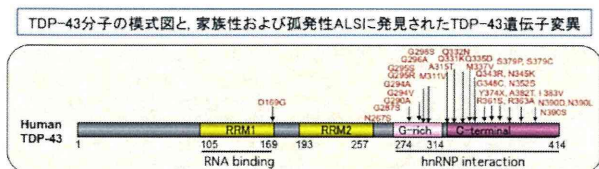
#### 2. *PGRN* 欠損マウスの免疫組織学的解析

12 ヶ月齢, 24 ヶ月齢の *PGRN* 欠損マウスの脳切片を作製し、各種抗体を用いて免疫組織染色を行った。ヘテロ、ホモ欠損マウスにおいて、*PGRN* の発現低下は観察されたものの、いずれのマウスにおいても、残念ながら、TDP-43 の異常蓄積は検出されなかった(Arai et al, manuscript in preparation)。*PGRN* の機能喪失があってもマウスの寿命である 2 年間では異常 TDP-43 のシードが形成されない可能性が示唆された。

最近 *PGRN* に関して、興味深い論文がサイエンス誌に発表された。*PGRN* は TNFRs(腫瘍壊死因子レセプター)に結合し、TNF $\alpha$  と TNFR の相互作用を妨害するという<sup>10)</sup>。*PGRN* と TNFR の結合を免疫沈降で確認すると共に、*PGRN* 欠損マウスでは、コラーゲン誘導間接炎に感受性が高いこと、またその炎症は、*PGRN* 投与により回復することを示している<sup>10)</sup>。*PGRN* は TNFR のリガンドであり、TNF $\alpha$  のアンタゴニストであるというこの報告は TDP-43 の蓄積に炎症が関わっている可能性を示唆する。

### 3. TARDBP 変異と TDP-43 の蓄積

TARDBP 遺伝子には ALS の発症に関わる変異が多数(30 種類以上)報告されているが、D169G 以外はすべて 250 番以降の C 末端側に位置している。



変異例の生化学を含めた病理報告は少ないが、愛知医大の G298S 変異例剖検脳の生化学解析では、ALS と区別できない TDP-43 の C 末バンドのパターンが検出された。

TDP-43 の変異効果については、様々な報告があるが、我々が検出できた効果は、C 末断片の凝集促進のみであった<sup>11)</sup>。ほとんどの変異が凝集を強める効果が観察され、一部の変異は有為差をもってそれが検出された。最近、我々の結果を支持する論文も発表されており、TARDBP 変異が TDP-43 の凝集、線維形成を促進し、毒性を強めるという<sup>11)</sup>。この報告で最も興味深いのは、TDP-43 の C 末の配列がプリオンと非常によく似た配列の特徴を有しているという点である<sup>12)</sup>。一部変異導入による構造のシミュレーションも行っているが、配列上からも、変異は蛋白質の構造異常を引き起こしてアミロイド線維形成を促進する可能性を示唆する。

### VCP 変異と TDP-43 蓄積

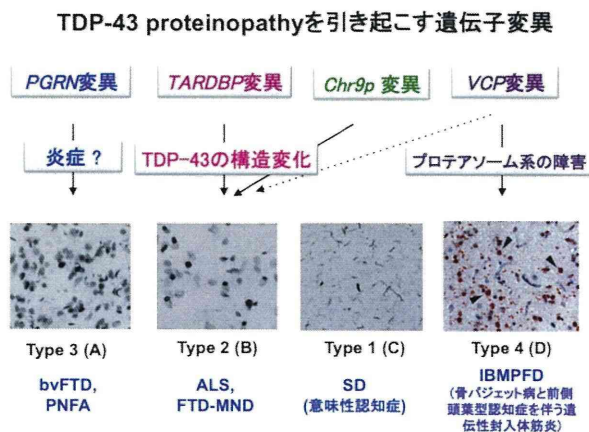
VCP(valosin-containing protein)/p97 は、AAA ATPase スーパーファミリーの一種であり、6 量体を形成し、エネルギー依存的タンパク質分解に関与する分子である。二つの ATPase ドメインをもち、N 末端側半分がポリユビキチン及びコファクターの結合ドメインとされている。機能としては、ユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームへ運ぶことや、細胞周期に付随した小胞体やゴルジ器官の再構築への関与など、多様な機能が報告されている。2004 年に IBMPFD (骨パジェット病と前側頭葉型認知症を伴う遺伝性封入体筋炎)

の原因遺伝子として同定された<sup>13)</sup>。昨年 12 月、ALS 患者にも VCP 変異が多数同定され、再び注目を集めることとなった<sup>14)</sup>。変異例の多くは IBMPFD を発症しているが、ALS やパーキンソン病を発症する場合もある。

変異はポリユビキチンとの結合ドメインや、ATPase ドメインに集中していることから、プロテアソーム系に障害を与えて TDP-43 の蓄積を増加させる可能性が考えられた。そこで SY5Y 細胞に野生型あるいは変異 VCP を安定的に発現させ、そこに TDP-43 の全長あるいは C 末断片を発現して、その凝集に変化があるか、蛍光顕微鏡、およびウエスタンブロットで観察した。その結果、野生型 VCP を発現したものに比べ、変異 VCP を導入した細胞において、より多くの TDP-43 凝集体が観察された。またその結果はウエスタンブロットでも確認された(Yamashita et al, manuscript in preparation)。

### D. 考察

まだ不明の点も多いが、以上の結果から、遺伝子変異と TDP-43 の蓄積の間をつなぐものとして以下のようなことが示唆される。



PGRN 変異は発現量の減少による機能喪失が TDP-43 蓄積(Type A)を引き起こすが、もしかすると炎症がそこに関わっている可能性が示唆される。AD や DLB などでも Type A の TDP-43 蓄積が認められることがあるが、その関係も興味深い。炎症が直接的に TDP-43 の凝集促進に働くのか、

異常分子が広がりに関わるのか、今後の検討が必要である。

*TARDBP* 変異はタウや  $\alpha$  シヌクレインの変異と同様、TDP-43 蛋白自体の構造変化に関わり、アミロイド様の構造変化を起こすスピードを速めたり、広がりやすい構造に変化させる効果があると考えられる。

Chr 9p の遺伝子変異も ALS を引き起こすことが報告されているが、この原因遺伝子についてはまだ明らかにされていない。また Type C の病理を引き起こすような遺伝子の異常もいまのところ報告はない。

一方、*VCP* 変異は部分的に機能喪失を起こした変異体がドミナントネガティブ効果によって、プロテアソーム系の異常を引き起こすと考えられる。様々な蛋白質の処理にそれが影響することで、細胞に障害を与えて複数の phenotype が出るのかもしれない。TDP-43 に対しても構造変化した分子の処理機能が不十分となって、凝集を増加させる方向に働く可能性が考えられる。

## E. 結論

TDP-43 の発見から 5 年を経て、TDP-43 の異常蓄積病態が整理されてきた。疾患の臨床病理型と TDP-43 の封入体の形態や生化学が強く相関する。プロテアーゼ耐性バンドの解析から、この病理、生化学の違いは TDP-43 の重合構造の違いを反映すると考えられる。一方で、一人の患者の脳に蓄積する TDP-43 は脳のどの部位をとっても生化学的に区別することはできない。この結果は、一カ所で生じた異常 TDP-43 が細胞間を伝わって広がったことを示唆する。*PGRN*, *TARDBP*, *VCP* のそれぞれの遺伝子変異によって TDP-43 の病変を伴う変性疾患を発症するが、*PGRN* 変異では Type C 病理、*TARDBP* 変異では Type B, *VCP* 変異は Type D あるいは Type B の病態を形成する。その機序はまだまだ不明の点が多いが、それぞれの変異が、炎症、TDP-43 蛋白自体の構造異常、プロテアソーム系の障害に関係する可能性が示唆される。

## F. 文献

- 1) Arai T, et al: *Biochem Biophys Res Commun.* 602-611, 2006.
- 2) Neumann M, et al: *Science*, 130-133, 2006.
- 3) Sampathu DM, et al: *Am J Pathol*, 1343-1352, 2006.
- 4) Mackenzie IRA, et al: *Acta Neuropathol*, 539-549, 2006.
- 5) Mackenzie IRA, et al: *Acta Neuropathol*, 111-113, 2011.
- 6) Hasegawa M, et al: *Ann Neurol*, 60-70, 2008.
- 7) Hasegawa M, et al: *J Mol Neurosci*, 2011.
- 8) Nonaka T et al: *J Biol Chem*, 34885-34898, 2010.
- 9) 長谷川成人: *実験医学*, 1318-1323, 2009.
- 10) Tang W, et al: *Science*, 478-484, 2011.
- 11) Nonaka T, et al: *Hum Mol Genet*, 3353-3364, 2009.
- 12) Guo W, et al: *Nat Struct Mol Biol*, 822-830, 2011.
- 13) Watts GD, et al: *Nat Genet.* 377-381, 2004.
- 14) Johnson JO, et al: *Neuron*, 857-864, 2010.