

## パーキンソン病の遺伝学と遺伝子診断の手順

順天堂大学医学部脳神経内科  
服部 信孝

### はじめに

遺伝子は1つの蛋白質を作るための遺伝情報の最小単位で、遺伝情報はDNAという物質で保存されています。ただし、遺伝子という用語には、その産物である蛋白質の機能までを広く含める場合が多いのが一般的です。一方、ゲノムという概念は、ある生物種の個体全体を完全な状態に保つために必要な遺伝的情報を1セットとして考えられたものです。したがって、ヒトならヒト、ネコならネコといったように、生物種ごとに固有のゲノムが存在します。細胞小器官（オルガネラ）でも自分自身のDNAをもつミトコンドリア<sup>※1</sup>や葉緑体<sup>※2</sup>については、ミトコンドリアゲノム、葉緑体ゲノムという呼び方をすることがあります。遺伝情報そのものはDNAの塩基配列として保存されています。ゲノムの実体は細胞核のDNAであるといってもいいでしょう。

ここでは、遺伝子情報およびゲノムに関して概説するとともに、パーキンソン病（PD）における遺伝子研究の成果および遺伝子診断の手順について解説します。

#### ※1 ミトコンドリア

ほとんどすべての真核生物の細胞に含まれる細胞小器官で、エネルギー保有物質であるATP（アデノシン三リン酸）の産生が主たる機能。細胞のさまざまな活動に必要なエネルギーのほとんどは、直接、あるいは間接的にミトコンドリアからのATPの形で供給される。

#### ※2 葉緑体

光合成生物における、光合成を行う半自律性の細胞小器官のこと。

#### ※3 ヌクレオチド

核酸（DNAやRNA）の構成単位で、核酸はヌクレオチドが長く連結した鎖状の高分子化合物である。

### ゲノムの構造と疾患遺伝子

ヒトの細胞核には、24種類の直鎖DNA（染色体）が含まれており、この中にあるDNA全体をまとめて核ゲノムといいます。また、細胞小器官のミトコンドリアには環状のDNAがあり、ミトコンドリアゲノムと呼ばれます。ミトコンドリアDNAは1種類ですが、この中にはDNAを構成する単位であるヌクレオチド<sup>※3</sup>が1万6,569個も存在し、一方の核ゲノムには32億個もの膨大なヌクレオチドが存在しています。核ゲノムとミトコンドリアゲノムに含まれるDNAの配列情報は、生物としてのヒトを構成し維持するのに必要な生物学的情報がつまっています。

#### 1. ヒトゲノムの構造

DNAから蛋白質が合成されるには次のようなプロセスを辿ります。まず、細胞核にあるDNAは二重らせん構造の内側に遺伝情報を蓄積・保存していますが、

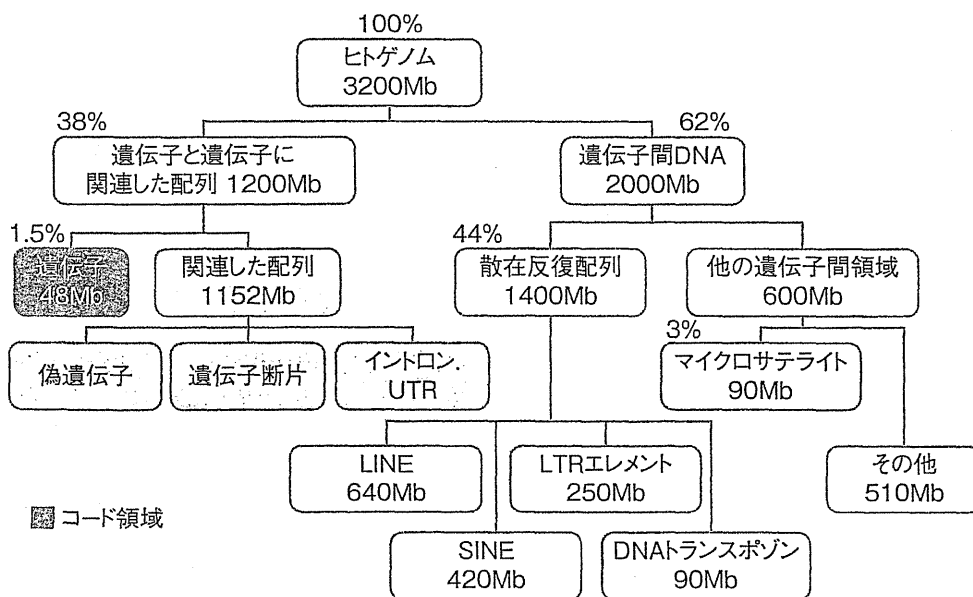
そこにRNA合成酵素（RNAポリメラーゼ）が結合するとDNAの一本鎖の塩基配列を読み取ってRNAを合成する転写（transcription）が開始されます。転写されたRNAはメッセンジャーRNA（mRNA）と呼ばれ、細胞核の外側にあり蛋白質を合成する細胞小器官のリボソーム<sup>※4</sup>に転写したDNAの遺伝情報を伝える役割を果たしています。次に、リボソームではmRNAの塩基配列に基づいて蛋白質の合成を行う翻訳（translation）が行われますが、その際にトランスファーRNA（tRNA）が蛋白質の合成に必要なアミノ酸をリボソーム内に運搬し、リボソームを構成するリボソームRNA（rRNA）がmRNAがもつ遺伝情報とtRNAが運搬したアミノ酸を使って蛋白質を合成していきます。DNAの遺伝情報がmRNAに転写される際に、転写されるDNAの塩基配列をエクソンといい、転写されずに除去（スプライシング）される塩基配列をイントロンといいます。

ヒトゲノムの構造を機能面からみると、遺伝子領域と非遺伝子領域の2つに大別されます。遺伝子領域は、さらに構造遺伝子領域と非コード領域に分けられ、構造遺伝子領域はmRNAに転写され蛋白質をコードするDNAの塩基配列部分を指し、非コード領域はRNAポリメラーゼが結合するプロモーター領域やmRNAの転写発現を調節する調節領域、転写の際にスプライシングされるイントロンなどを指します。一方、非遺伝子領域には塩基配列をもちながらその機能を失い「ジャンク遺伝子」とも呼ばれる偽遺伝子（pseudogene）と、同じ配列が繰り返しみられる反復配列などがあります。ヒトゲノムの構成比率をみると、遺伝子と遺伝子に関連した配列は全体の38%、遺伝子間DNAは全体の62%となっており、蛋白質をコードする構造遺伝子領域はわずか1.5%にしかすぎません（図1）。

※4 リボソーム

mRNAからのDNA転写遺伝情報に基づいて蛋白質を合成する翻訳反応を行う細胞内小器官。多数の蛋白質と複数のrRNAから構成される。

図1 ヒトゲノムの構成



IHGSC, 2001 および Venter, et al. 2001 より作成

## 2. マイクロサテライトと疾患感受性遺伝子

ゲノム構造にある反復配列は、散在反復配列と縦列反復配列の2つに分類されます。

散在反復配列は反復配列単位がゲノム上にランダムに散らばっているものを指し、ヒトゲノムの44%は散在反復配列といわれています。一方の縦列反復配列は、反復単位が隣り合って並んでいるものを指し、数百kb (1kb = 1,000bp)に及ぶ縦列反復配列からなるサテライトDNA、25bpまでの反復単位がクラスターを形成しているミニサテライトDNA (約20kb)、4bpまたはそれ以下の反復単位がクラスターを形成した短いマイクロサテライトDNA (< 150bp)の3つのタイプに分けられます。

このうち、マイクロサテライトは反復回数が人によって異なり、高い遺伝子多型<sup>\*5</sup>を示すこと、またその検出や型判別も容易であることなどから、ゲノムの全領域にわたって疾患に関連する遺伝子(疾患感受性遺伝子)の存在位置を正確に絞り込む、いわゆる遺伝子マーカー(DNAマーカー)として優れています。近年、遺伝性疾患の原因が解明されてきた背景には、このマイクロサテライトを対象とした研究が大きく貢献しています。

### ※5 遺伝子多型

個々のDNA配列は多種多様であり、一般に1%以上の頻度で異なるDNA配列を遺伝子多型といい、疾患に罹りやすいといった遺伝的素因を形作っていると考えられている。

### ※6 ハンチントン病

線条体・尾状核における神経細胞の変性・脱落により引き起こされる常染色体優性遺伝の神経変性疾患で、慢性進行性の舞踏病様不随意運動と認知機能障害を特徴とする。

### ※7 進行性筋ジストロフィー

筋線維の破壊・変性(筋壊死)と再生を繰り返しながら、次第に筋萎縮と筋力低下が進行していく遺伝性筋疾患の総称。

## 遺伝形式からみた単因子遺伝病の種類と特徴

遺伝病と呼ばれる疾患には、いくつかの種類があります。1つは染色体異常によるもので、ダウン症などがこれにあたります。また、1つの遺伝子が突然変異して発症するものを単因子遺伝病といい、ハンチントン病<sup>\*6</sup>や進行性筋ジストロフィー<sup>\*7</sup>などがこれに該当します。ある遺伝子変異に環境要因等の外因が組み合わさって発症に至る種類のものもあり、悪性高熱症などはこれに分類されます。一方、数種類の異常遺伝子を背景に、環境的な要因が加わって発症するものは多因子遺伝病と呼ばれ、高血圧や動脈硬化、がんなどはこの分類に含まれます。

現在のところほとんどのPDは多因子遺伝病と捉えられており、これまで遺伝性PDの比率は数パーセント程度と考えられてきましたが、近年の研究からは20%程度が遺伝性PDに属するのではないかとされています。

単因子遺伝病は遺伝形式から、単一遺伝子病(メンデル遺伝)、母系遺伝(非メンデル遺伝)、トリプレットリピート病(一部は非メンデル遺伝)、ゲノム刷り込み(非メンデル遺伝)に分類されます。

### ① 単一遺伝子病

単一遺伝子病は1種類の遺伝子異常がメンデル遺伝の法則に従って遺伝して発症する疾患で、常染色体優性遺伝、常染色体劣性遺伝、伴性劣性遺伝の遺伝形式があります。両親からそれぞれ1セットのゲノムを受け継いだ計2セットのゲノムにおいて、父母のそれぞれのゲノムに由来した2つの対立遺伝子(アレル)が存在し、同じ種類の対立遺伝子をもつものをホモ接合体といい、異なる種類の対立遺伝子をもつものをヘテロ接合体といいます。ヘテロ接合体において、一方の対立遺伝子が他方の対立遺伝子の発現を抑えてその遺伝子変異が現れて発症するものを常染色体優性遺伝と呼びます。逆に、対立遺伝子の一方の変異のみでは発

症せず、両方の対立遺伝子に変異がある場合にのみ発症するものを常染色体劣性遺伝と呼びます。

また、性染色体上に存在する遺伝子が親から子に伝わることを伴性遺伝と呼び、女性にはX染色体が2本あり、男性には1本しかありませんので、X染色体の1本に遺伝子変異がある場合には男性は必ず発病し、女性は保因者となります。

## ② 母系遺伝

ミトコンドリアは細胞の活動に必要なエネルギーを産生する細胞小器官で、核内のDNAとは別個のDNAをもっています。ミトコンドリアの変異による疾患をミトコンドリア遺伝病といますが、このDNAは核内のDNAとはまったく別の遺伝形式をとります。ヒトのミトコンドリアはすべて卵子由来で精子由来のミトコンドリアは存在しないため、ミトコンドリアDNAはすべて母親由来となり、母系遺伝と呼ばれます。ミトコンドリア脳筋症<sup>※8</sup>はその1つですが、この疾患は母親を経由して遺伝します。

## ③ トリプレットリピート病

ヒトの遺伝子の中には特定の3塩基配列(トリプレット)が繰り返して存在していますが、この繰り返し(リピート)が異常に伸長・増大してしまうことで遺伝子が正常に機能しなくなり、発症に至る疾患がトリプレットリピート病です。現在知られているトリプレットリピート病には、ハンチントン病や遺伝性脊髄小脳失調症<sup>※9</sup>、球脊髄性筋萎縮症<sup>※10</sup>などがあり、球脊髄性筋萎縮症は伴性劣性遺伝ですが、ほかはすべて常染色体優性遺伝です。

## ④ ゲノム刷り込み(インプリンティング)

メンデル遺伝は、異常を起こす遺伝子の由来が父親、母親であるかはまったく関係がなく、片方の対立遺伝子の異常で発症するのが優性遺伝、両方の対立遺伝子の異常で発症するのが劣性遺伝とするものですが、近年の研究からこのメンデル遺伝とは別に、父親、母親のいずれに由来するかによって発現があらかじめ刷り込まれた遺伝子が存在することが明らかとなっています。父親から受け継いだ染色体でしか発現しない遺伝子をPEG (paternally expressed genes)、母親からの染色体でしか発現しない遺伝子をMEG (maternally expressed genes)といい、これらの遺伝子の働きによって起きるさまざまな現象をゲノム刷り込み(インプリンティング)と呼びます。メンデル遺伝には従わずに、父親由来の染色体の遺伝子が欠失することで発症するプラダー・ウィリー症候群<sup>※11</sup>はその1つです。

## パーキンソン病の原因遺伝子の同定

### 1. 逆行性遺伝子解析のアプローチ

疾患の原因遺伝子を見つけ出す方法には、順行性遺伝子解析と逆行性遺伝子解析の2つがあります。順行性遺伝子解析は、まず疾患に関連した蛋白質について、mRNAを解析してそれを鋳型に逆転写酵素によって相補的な塩基配列をもつ一本鎖のcDNA (complementary DNA) を作製(クローン)し、そのcDNAを

### ※8 ミトコンドリア脳筋症

ミトコンドリアDNAの異常により脳と筋肉におけるミトコンドリア機能が障害され引き起こされる疾患。筋力低下や筋萎縮などの骨格筋の症状、知能低下、けいれん、ミオクロームス、小脳失調、難聴、外眼筋麻痺などの多彩な神経症状を呈する。

### ※9 遺伝性脊髄小脳失調症

小脳および脳幹から脊髄にかけての神経細胞が徐々に破壊・消失してさまざまな運動失調症状を呈する脊髄小脳変性症のうち、遺伝性により発症するもの。

### ※10 球脊髄性筋萎縮症

下位運動ニューロン変性による四肢の筋力低下および筋萎縮、線維束れん縮を主症状とする緩徐進行性の神経筋疾患。男性にのみ発症し、女性化乳房、睾丸萎縮、生殖能力の減弱などを合併する。

### ※11 プラダー・ウィリー症候群

先天性の奇形症候群で、内分泌学的異常としては肥満、糖尿病、低身長、性腺機能不全など、神経学的異常としては発達遅滞、筋緊張低下、特異な性格障害・行動異常などを特徴とする。

※12 遺伝子座

染色体やゲノムにおける遺伝子の位置のこと。なお、遺伝子に該当しないような塩基配列・遺伝マーカーの位置は座位という。

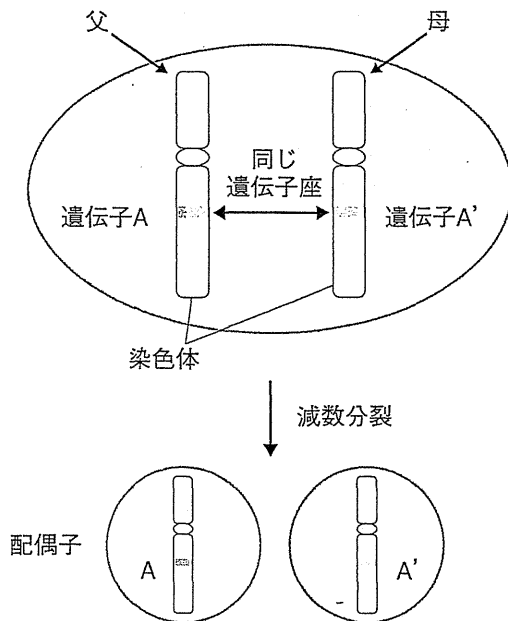
※13 レビー小体

主に  $\alpha$ -synuclein と呼ばれる蛋白質が神経細胞の内部に線維化・凝集して形成される異常な封入体で、パーキンソン病では黒質に、レビー小体型認知症では大脳皮質の神経細胞に認められ、それぞれの病態形成に関連していると考えられている。

シーケンスすることで遺伝子変異を同定するアプローチです。しかし、疾患のなかには遺伝要因があることがわかっていても関連する蛋白質が明らかでないことの方がほとんどです。

これに対し、未知の疾患遺伝子とどの遺伝マーカーである対立遺伝子が同時に子孫に伝達（連鎖）されていくかを調べ、疾患遺伝子の位置を探っていくアプローチが逆行性遺伝子解析です。逆行性遺伝子解析では、まず同一の疾患が多発している家系において連鎖解析を行って疾患の発現と強い連鎖をもつ候補遺伝子を探し出しますが、この連鎖解析は、同じ染色体上にのった遺伝子同士は、その遺伝子間の物理的距離が短いほど連鎖しやすいのに対し、距離が離れるほど連鎖しにくくなるという原理を応用しています。たとえば、図2の染色体上にある a, b, c の遺伝子を例にとると、距離の離れた a と c が連鎖する割合よりも、距離

図2 対立遺伝子および遺伝子マーカーと連鎖解析



相同染色体上の同一の遺伝子座に乗っている遺伝子 A と遺伝子 A' を対立遺伝子（アレル）と呼ぶ。

遺伝子 A, A' は、本来同一遺伝子であるが、DNA 配列の変化によって遺伝子の働きに違いが生じ、表に現れる形質（表現型）が A と A' の間で異なってくる場合がある。このとき、この対立遺伝子を遺伝子マーカーとして利用することができる。

3つ以上の異なる型の対立遺伝子が存在する場合、それらを多重対立遺伝子と呼ぶ（ABO 式血液型等）。

対立遺伝子が減数分裂によって分離し、異なる配偶子に分配されることを分離の法則と呼ぶ。

連鎖解析

同じ染色体上に乗った遺伝子同士は、その遺伝子間の物理的距離が短いほど連鎖し（行動を共にして子孫に伝わり）、距離が長いほど染色体間の組み換え（交差）によって連鎖しづらくなる原理に基づいている。その組み換え頻度から、遺伝子（DNA マーカー）間の相対距離を統計的に算出する。



遺伝子（または DNA マーカー）の a, b, c が子孫に伝わる連鎖の関係において、a と c が連鎖する割合が一番低く、b と c が連鎖する割合が一番高くなる。

の近い b と c が連鎖する割合の方が高くなり、仮に b を疾患遺伝子とすればその近傍にある遺伝マーカーの c との相対距離を統計的に解析することで染色体上の遺伝子の位置（遺伝子座）を推定することができます。そして、その領域の DNA をクローニングして候補遺伝子を見つけ出し、それらをシーケンスすることで遺伝子変異を同定します。

## 2. 家族性パーキンソン病の原因遺伝子

近年、家族性 PD の原因遺伝子に関する研究が精力的に進められ、現在のところ表 1 に示す多くの原因遺伝子が同定されています。家族性 PD の遺伝子座<sup>※12</sup>のシンボルとして PARK が使われていますが、PARK のうちいくつかの原因遺伝子

※14 SNP（一塩基多型）、ゲノム塩基配列では一塩基が変異した多様性がみられるが、その変異が集団内で 1% 以上の頻度で見られるものをいう。塩基配列のわずかな違いにより、遺伝子を元に体内で作られる酵素などの蛋白質の働きが微妙に変わることから、疾患への罹りやすさや薬剤への反応性の違いといった多様性につながっている。

表 1 家族性パーキンソン病の原因遺伝子

遺伝子シンボル	遺伝子座	遺伝形式	原因遺伝子	レビー小体形成有無	発症年齢
PARK1	4q21-22	AD	SNCA	+	46 ± 13
PARK2	6q25.2-27	AR	Parkin	- / +	40 <
PARK3	2p13	AD	Unknown	+	35 - 89
PARK4	4q21-23	AD	SNCA	+	24 - 48
PARK5?	4p14	AD	UCH-L1	?	Around 50
PARK6	1p35-36	AR	PINK1	-	32 ± 7
PARK7	1p36	AR	DJ-1	?	27 - 40
PARK8	12p11.2-q13.1	AD	LRRK2	+ / -	Around 65
PARK9	1p36	AR	ATP13A2	?	11-16
PARK10	1p32	SP	Unknown	?	65.8
PARK11	2q36-37	AD	GIGYF2 (Grb10-Interacting GYF2)	?	58
PARK12	Xq21-25	XR	Unknown	?	Around 60
PARK13	2p13	AD	Omi/HtrA2	?	
PARK14	22q13.1	AR	PLA2G6	?	20-25
PARK15	22q12-q13	AR	FBX07	-	10-19
PARK16	1q32	SP	Unknown	?	58.8 (22-88)
GBA	1q21	SP	glucocerebrosidase	+	Sporadic PD
SCA2	12q24	AD	Ataxin-2	+	19-61
NR4A2?	2q22-23	AD	Nurr1	?	?

AD：常染色体優性遺伝，AR：常染色体劣性遺伝，XR：X染色体劣性遺伝，SP：孤発性

#### ※ 15 ユビキチン—プロテアソーム系

細胞内の蛋白質分解機構の1つ。不要になった蛋白質にユビキチンと呼ばれる蛋白質が結合し、これを分解シグナルと認識したプロテアソームという巨大な蛋白質分解酵素複合体が分解・除去する。

#### ※ 16 オートファジー—リソソーム系

細胞内の蛋白質分解機構の1つ。不要になった蛋白質などをオートファゴソームと呼ばれる膜が包み込み、これに消化酵素をもつリソソームとよばれる小胞が融合することで、包み込んだ内容物を分解・除去する。

#### ※ 17 分子シャペロン

蛋白質分子がひも状の状態から折りたたみ（フォールディング）によって特定の構造をとることで蛋白質としての機能を発揮するが、分子シャペロンは蛋白質分子が正しく折りたたまれるのを助ける蛋白質を指す。

#### ※ 18 スカベンジャー

体内で余分に発生した活性酸素による酸化ストレスから細胞を守る働きをする物質の総称。

#### ※ 19 リン酸化

蛋白質の翻訳後修飾における反応で、細胞の分裂の調整やシグナル伝達、酵素の活性などさまざまな生体反応上の重要な機能は蛋白質のリン酸化と脱リン酸化によって行われている。蛋白質をリン酸化する酵素をプロテインキナーゼという。

#### ※ 20 セルロプラスミン

血液中で銅と結合して運搬する輸送蛋白質。血液中の銅の90~95%はこの蛋白の中に含まれている。

#### ※ 21 ウィルソン病

体内に銅が蓄積することにより脳、肝臓、腎臓、眼などが障害される遺伝性代謝疾患。

#### ※ 22 無セルロプラスミン血症

セルロプラスミンが合成されないため脳、肝臓、脾臓など全身性に鉄の過剰沈着をきたし、糖尿病、神経症状、網膜変性を引き起こす遺伝性疾患。

は孤発性PDの病態形成においても関連していることが明らかになりつつあります。

以下、家族性PDで同定された主な原因遺伝子について簡単に解説します。

#### ① $\alpha$ -synuclein (PARK1/PARK4)

$\alpha$ -Synucleinは、遺伝子座のPARK1およびPARK4に関連した家族性PDの原因遺伝子として初めて同定されたものです<sup>2)</sup>。

$\alpha$ -Synucleinの遺伝子変異が家族性PDに占める割合は非常にまれですが、遺伝子産物としての $\alpha$ -synucleinは凝集性が高く、その凝集によって形成される蛋白質封入体のレビー小体<sup>※13</sup>が非遺伝性の孤発性PDで観察されることから、 $\alpha$ -synucleinがPDの病態の本質になっている可能性が示唆されています。実際、孤発性PD患者の中脳黒質において $\alpha$ -synucleinのmRNAの発現が健常者の約4倍も高いという報告は、孤発性PDにおいても遺伝的因子が深く関与していることを示唆しているといえます。 $\alpha$ -Synucleinのエクソン内にはSNP（一塩基多型）<sup>※14</sup>は存在せず、プロモーター領域とイントロン4にきわめて強い関連を示すSNPが見出されており、これらのSNPがPDの疾患感受性遺伝子として働いている可能性があります<sup>3, 4)</sup>。

また、 $\alpha$ -synucleinには点変異だけでなく、遺伝子コピー数の異常（CNV：copy number variation）もあり、遺伝子の二重重複（duplication）や三重重複（triplication）が報告されています<sup>5)</sup>。 $\alpha$ -Synucleinの遺伝子重複では、コピー数に比例してPDを重症化させたり、若年発症の傾向をもたらしなどの可能性が示唆されています。

#### ② parkin (PARK2)

Parkin (PARK2)は、常染色体劣性若年性パーキンソンニズム（AR-JP）の原因遺伝子として同定されたもので、parkinが原因のAR-JPは若年性PDのおよそ50%を占め、また45歳以下の早発性の孤発性PD患者の約20%がparkinの遺伝子変異を有していると報告されるなど、若年発症のPDにおける頻度がきわめて高いことが知られています<sup>7)</sup>。

Parkinには、細胞内の重要な蛋白質分解機構の1つであるユビキチン—プロテアソーム系<sup>※15</sup>において蛋白質を分解するための酵素としての働きがあり<sup>8)</sup>、遺伝子変異によりparkinの活性が欠損すると蛋白質が正常に分解されずに細胞内に蓄積し、これにより細胞のアポトーシスが引き起こされて、PDの病態に関与していると考えられています。また、最近ではもう1つの蛋白質分解機構であるオートファジー—リソソーム系<sup>※16</sup>において、ミトコンドリアのオートファジーであるマイトファジーの選択的蛋白質の分解にparkinが関与していることが明らかとなっており、parkinの遺伝子変異によるマイトファジーの機能不全が病態に影響している可能性が考えられています<sup>9, 10)</sup>。

#### ③ PINK1 (PARK6)

PARK6に相関する常染色体劣性遺伝性PD（ARPD）の原因遺伝子としてPINK1（PTEN-induced putative kinase 1）が同定されています<sup>11)</sup>。ただし、PINK1の遺伝子変異はparkinの遺伝子変異に比べると頻度はまれであり、ARPDの2%、孤発性PDの1%程度にしかすぎません。

PINK1 の遺伝子産物はミトコンドリアに局在し、PINK1 の遺伝子変異は主にミトコンドリア機能障害に関わっていると考えられています。PINK1 によりリン酸化された蛋白質は分子シャペロン<sup>\*17</sup>として異常な蛋白質の分解処理に働いていると同時に、ミトコンドリア内における活性酸素種 (ROS) の発生を抑制して酸化ストレスに対し保護的に働いていますが、PINK1 の遺伝子変異はこれらの働きを抑制してPDの発症に関与していると推察されます<sup>10</sup>。また、最近の研究からPINK1はparkinと協働してマイトファジーに関与することが示されており、オートファジー系から病態に影響を及ぼしている可能性があります。

#### ④ DJ-1 (PARK7)

DJ-1 (PARK7) は、parkin に続いて、AR-JP の2つめの原因遺伝子として同定されたものですが<sup>13</sup>、parkin 遺伝子の変異がAR-JP の約半数に認められるのに対して、DJ-1 の遺伝子変異はAR-JP の1%以下とはるかにまれです。

しかし、DJ-1 は強力な抗酸化作用を有しており、酸化ストレスに密接に関与していることから、孤発性PDにおける病態生理としても注目されています。具体的には、遺伝子産物のDJ-1は活性酸素種の除去に働く活性酸素スカベンジャー<sup>\*18</sup>として機能することが知られ、酸化ストレスを受けるとDJ-1はミトコンドリアに誘導されて、ミトコンドリアを酸化ストレスから保護するよう働きます。DJ-1の遺伝子変異はミトコンドリアに影響する酸化ストレスに対する保護作用が失われることでPDの発症に関与していると考えられます<sup>13</sup>。

#### ⑤ LRRK2 (PARK8)

PARK8のLRRK2 (leucine rich repeat kinase 2) は、わが国の相模原地方で多発する遺伝性PDとして連鎖解析が行われ、遺伝子座が決定され<sup>14</sup>、その後、常染色体優性遺伝性PDの原因遺伝子として同定されたもので、PDのなかで最も頻度の高い変異として知られています<sup>15, 16</sup>。ただし、人種間において著しい頻度の差があり、北アフリカのアラブ人やユダヤ人ではPDの30~40%と多くを占め、次いで白人が5%と続きますが、アジア人ではわずか0.1%にすぎません。

LRRK2がどのような機序でPDを発症させているかはよくわかっていませんが、蛋白質をリン酸化<sup>\*19</sup>する酵素であるキナーゼ活性を異常亢進させることで細胞毒性が生じ、これがPDの発症に関与するという機序が推察されています<sup>17</sup>。孤発性PD患者を対象とした全ゲノム関連解析により、 $\alpha$ -synuclein、LRRK2をコードするSNPがPD発症のリスク因子となることが報告されており、 $\alpha$ -synuclein と並び、LRRK2の遺伝子変異が孤発性を含めたPD全体の病態に深く関わっている可能性が示唆されています。LRRK2の遺伝子変異は孤発性PDの病態に最も近いとされており、現在、LRRK2に対する研究が精力的に進められています。

### 3. 家族性パーキンソン病に対する遺伝子診断の手順

図3に若年発症のジストニア・パーキンソニズムにおけるPARK遺伝子診断手順のアルゴリズムを示します。まず、銅/セルロプラスミン<sup>\*20</sup>濃度を測定し、異常があればウィルソン病<sup>\*21</sup>、無セルロプラスミン血症<sup>\*22</sup>を疑い、また有棘赤血球<sup>\*23</sup>の有無を調べて陽性であれば、McLeod症候群<sup>\*24</sup>やハンチントン病

#### ※23 有棘赤血球

棘のないいくつもの突起をもつ形態異常をきたした赤血球のこと。

#### ※24 McLeod症候群

有棘赤血球を伴う舞蹈病の1つで、まれな伴性劣性遺伝性神経筋疾患。

#### ※25 ハンチントン病類縁疾患2型

有棘赤血球を伴う舞蹈病の1つで、ジャンクトフィリン-3遺伝子におけるCTG/CAG反復伸長により引き起こされる。臨床的にハンチントン病と区別することはできない。

#### ※26 ニューロアカントサイトーシス

有棘赤血球症と神経症候を併せもった疾患の総称。

#### ※27 NBIA症候群

脳の過剰鉄沈着と神経症状を呈する疾患の総称。15歳までに進行性ジストニアをきたし、構音障害、筋強剛、網膜色素変性症を呈する常染色体劣性遺伝性疾患。

#### ※28 ニューロフェリチノパチー

脳全体の広範な鉄、フェリチン沈着を特徴とし、ジストニアと舞蹈運動を主症状とする常染色体優性遺伝の神経疾患。

#### ※29 Kufor - Rakeb症候群

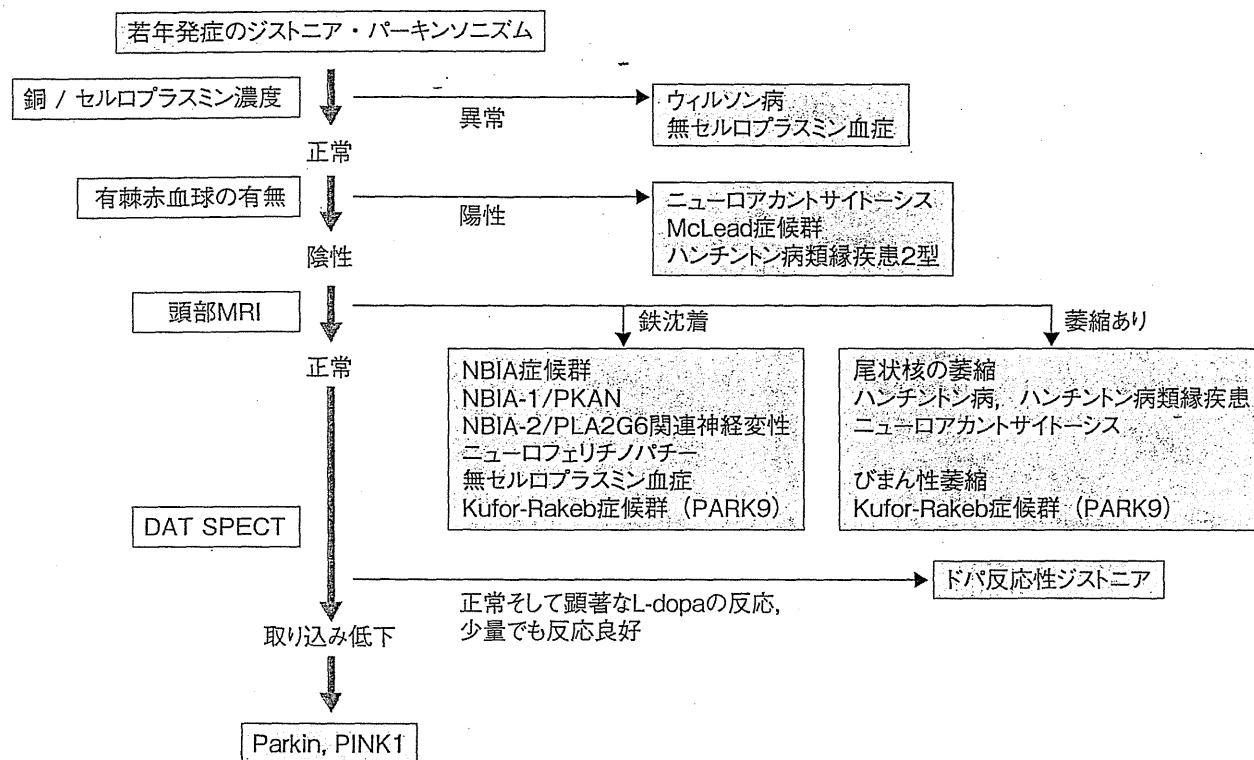
PARK9のATP13A2変異による常染色体劣性遺伝若年性パーキンソニズムで、パーキンソニズムに加えて、眼球運動の異常、認知障害、不随意運動など呈する。

#### ※30 尾状核

視床の両側に位置し、被殻とともに線条体を形成している。ドパミンニューロンの神経支配を受けて高次運動の調節に関与するほか、学習と記憶にも関与している。



図3 若年発症のジストニア・パーキンソニズムにおける PARK 遺伝子診断手順のアルゴリズム



Klein C, et al. Mov Disord 24 : 2042-2058, 2009.

類縁疾患2型<sup>25</sup>などのニューロアカントサイトーシス<sup>26</sup>を疑って除外します。次に頭部MRIを撮影し、鉄の沈着がみられればNBIA症候群<sup>19, 20</sup><sup>27</sup>、ニューロフェリチノパチー<sup>28</sup>、あるいはKufor-Rakeb症候群<sup>29</sup>(PARK9)などを疑い<sup>21</sup>、尾状核<sup>30</sup>の萎縮が認められればハンチントン病やハンチントン病類縁疾患などを、びまん性の萎縮の場合にはKufor-Rakeb症候群を疑い、これらを除外します。さらに、DAT SPECTを施行して、ドーパミンの取り込み能が正常かつ顕著なL-dopaへの反応(少量でも反応良好)がみられればドーパ反応性ジストニアの瀨川病<sup>31</sup>を疑い、ドーパミンの取り込み能が低下している場合にはparkin, PINK1の遺伝子変異による疾患を疑います。また、低換気、体重減少、うつを合併していればペリー症候群<sup>32</sup>を鑑別にあげる必要があります<sup>23</sup>。

一方、上記の遺伝子診断アルゴリズムとは別に人種による遺伝子変異の頻度を参考にして検討するアプローチもあります。たとえば、アジア人であれば脊髄小脳失調症2型、黒人であればハンチントン病類縁疾患2型を、アシケナージ系ユダヤ人であればLRRK2遺伝子変異疾患やゴーシェ病<sup>33</sup>を疑うといった具合です。

さらに、臨床型および遺伝的多様性から検討するアプローチを示したものが表2です。PARK遺伝子による若年発症のパーキンソニズムがみられる場合には、まずparkin遺伝子変異を考え、症状の早い経過と認知症が認められる場合には

※31 瀨川病

常染色体優性遺伝性の神経疾患で、黒質線条体ドーパミン神経のドーパミン欠乏により引き起こされる固縮型筋緊張異常によるジストニア姿勢およびジストニア運動を主症状とする。

※32 ペリー症候群

パーキンソニズム、うつ、体重減少、低換気をきたし、予後不良のまれな遺伝性疾患。遺伝形式としては、常染色体優性遺伝形式が考えられている。

※33 ゴーシェ病

グルコセラブロシダーゼ遺伝子(GBA)変異による酵素機能低下から引き起こされる糖脂質代謝異常症で、肝脾腫大症や血小板減少に伴う貧血症、病的な骨折などの症状を呈する。

表2 若年発症のジストニア・パーキンソニズムに対する臨床型および遺伝的多様性からの診断アプローチ

PARK 遺伝子による非定型的症状	PARK 遺伝子以外の変異による典型的パーキンソン病	PARK 遺伝子以外による変異に伴うパーキンソニズム関連疾患
<p>① Parkin/PARK2, PINK1/PARK6, DJ-1/PARK7 (Early-onset parkinsonism) 緩徐な経過。Parkin 遺伝子変異ケースが若年性の約半分を占める。DJ-1 は1例も存在しない。</p> <p>② SNCA/PARK1/4 (Early-onset parkinsonism) 早い経過と認知症。わが国でも優性遺伝性パーキンソン病としては頻度が高い。</p> <p>③ ATP13a2/PARK9 (Juvenile parkinsonism) 経過は早い。錐体路 / 錐体外路障害, 核上性眼球運動障害, 認知症。</p> <p>④ PLA2G6/PARK14 (Early-onset pyramidal extrapyramidal syndrome; Early onset form; infantile neuroaxonal dystrophy; MRI with or without iron deposition) わが国も存在が確認されている。認知症を伴い頭部 MRI で萎縮が認められるケースは検討すべき。</p>	<p>① TAF1/DYT3 (X-linked dystonia-parkinsonism; Lubag)</p> <p>② GTP cyclohydrolase I and tyrosine-hydorolase/DYT5</p> <p>③ ATP1A3/DYT12 (Rapid-onset dystonia-parkinsonism)</p> <p>④ PRKRA/DYT16</p> <p>⑤ SCA2</p> <p>⑥ SCA3</p> <p>⑦ SCA6</p> <p>⑧ SCA8</p> <p>⑨ SCA17</p> <p>⑩ Glucocerebrosidase (Gaucher disease)</p> <p>⑪ Mitochondrial gene mutations</p> <p>⑫ Nurr1?</p> <p>⑬ Synphilin-1?</p>	<p>① FMR1 (Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome)</p> <p>② MAPT (Frontotemporal dementia-parkinsonism linked to Chromosome17)</p> <p>③ Progranulin (Frontotemporal dementia-parkinsonism linked to Chromosome17)</p> <p>④ Prion protein (Creutzfeldt Jacob disease)</p> <p>⑤ ATP7B (Wilson disease)</p> <p>⑥ PANK2 (Panthothenate-kinase 2-associated neurodegeneration)</p> <p>⑦ FBXO7 (Extrapyramidal pyramidal syndrome)</p> <p>⑧ CHAC (Chorea-acanthocytosis)</p> <p>⑨ FTL1 (Neuroferritinopathy)</p> <p>⑩ Huntingtin (Huntington disease)</p> <p>⑪ JPH3 (Huntington disease-like)</p>

Klein C, et al. Mov Disord 24 : 2042-2058, 2009 より一部改変

$\alpha$ -synuclein 遺伝子変異, あるいは PARK9 の遺伝子変異を疑います<sup>18)</sup>。認知症を伴って頭部 MRI で萎縮が認められるケースには PARK14 の遺伝子変異を検討します<sup>19, 20)</sup>。また, PARK 遺伝子以外の変異による典型的な PD / パーキンソニズム関連疾患の場合には, それぞれ表 2 に示す遺伝子変異を検討します。

以上, 家族性 PD の遺伝子解析について簡単な目安を示すと, 若年発症 (20 歳代あるいはそれ以下での発症) で MIBG 心筋シンチグラフィ<sup>※34</sup> が正常であれば, まず parkin 遺伝子変異である可能性が高く, parkin 変異陰性でジストニア<sup>※35</sup> が目立たなければ, PINK1 遺伝子変異である可能性が高いといえます。一方, 優性遺伝性 PD では LRRK2 と  $\alpha$ -synuclein の二重重複の可能性が高いといえます。また, 最近の研究から 2 種類の遺伝子変異が融合したタイプも少なくないことが明らかになっていますので, その可能性も考慮する必要があります。

※34 MIBG 心筋シンチグラフィ  
心筋内のノルエピネフリン神経の密度を調べる検査。近年の研究から心臓のノルエピネフリン神経がパーキンソン病やレビー小体病の患者の大部分で減少することが明らかにされ, これら疾患の診断・評価のために施行される。

※35 ジストニア  
中枢神経系の障害によって引き起こされる不随意で持続的な筋収縮にかかわる運動障害を指し, 姿勢異常, 身体の捻れや硬直, けいれんといった症状を呈する。

## 文献

- 1) Hatano T, Kubo S, Sato S, et al. Pathogenesis of familial Parkinson's disease : new insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J Neurochem* 111 : 1075-1093, 2009.  
遺伝性パーキンソン病の総説。遺伝子の単離・同定の解説から機能の解説も述べられている。
- 2) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276 : 2045-2047, 1997.  
遺伝性パーキンソン病の論文。α-synuclein がレビー小体の構成蛋白であることがわかり、パーキンソン病の研究に大きく貢献している。
- 3) Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, 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.  
α-Synuclein が孤発性パーキンソン病の感受性遺伝子であることを報告した論文。
- 4) Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* 41 : 1308-1312, 2009.  
同じく α-synuclein が孤発性パーキンソン病の感受性遺伝子であることを報告した海外グループからの論文。
- 5) Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, et al. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 59 : 298-309, 2006.  
わが国から最初に報告された α-synuclein の duplication の論文。
- 6) Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392 : 605-608, 1998.  
わが国から最初に報告された劣性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子 parkin の同定・単離の論文。α-synuclein の duplication の論文。
- 7) Shimura H, Hattori N, Kubo S, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25 : 302-305, 2000.  
Parkin がユビキチンリガーゼであることを証明した論文。
- 8) Kawajiri S, Saiki S, Sato S, et al. PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS Lett* 584 : 1073-1079, 2010.  
Parkin が PINK1 と協働して、たとえば膜電位低下がなくとも mitophagy を誘導することを示した論文。
- 9) Matsuda N, Sato S, Shiba K, et al. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 189 : 211-221, 2010.  
ミトコンドリアの膜電位低下が PINK1 と parkin が協働して異常ミトコンドリアを消去することを示した論文。言い換えると parkin がミトコンドリアの品質管理を行っていることを示した。
- 10) Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*. 304 : 1158-1160, 2004.  
PARK6 に連鎖する劣性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子 PINK1 の同定・単離を示した論文。
- 11) Samaranch L, Lorenzo-Betancor O, Arbelo JM, et al. PINK1-linked parkinsonism is associated with Lewy body pathology. *Brain* 133 : 1128-1142, 2010.  
PINK1 変異患者にレビー小体が観察されたことを示した論文。
- 12) Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299 : 256-259, 2003.  
PARK7 に連鎖する若年性パーキンソン病の原因遺伝子 DJ-1 の同定・単離を示した論文。
- 13) Irrcher I, Aleyasin H, Seifert EL, et al. Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics. *Hum Mol Genet* 19 : 3734-3746, 2010.  
DJ-1 はミトコンドリアに関与し、酸化ストレスから防衛的に作用する。DJ-1 がいないと異常なミトコンドリア形態を示すが、この状態に parkin と PINK1 を補充すると異常形態が是正されることを示している。劣性遺伝性パーキンソン病の遺伝子産物はミトコンドリアの機能維持に関わっていることが予想される。
- 14) Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, et al. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* 51 : 296-301, 2002.  
わが国で見出された PARK8 連鎖の相模原家系の遺伝子座が 12 番染色体に連鎖することを示した論文。
- 15) Funayama M, Hasegawa K, Ohta E, et al. An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Ann Neurol* 57 : 918-921, 2005.  
オリジナルの家系の LRRK2 変異が T2020I であることを示した論文。
- 16) Zimprich A, Biskup S, Leitner P, et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44 : 601-607, 2004.  
PARK8 の原因遺伝子が LRRK2 であることを示した論文。
- 17) Moore DJ. The biology and pathobiology of LRRK2 : implications for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 14 (Suppl2) : S92-98, 2008.
- 18) Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 38 : 1184-1191, 2006.  
PARK9 の原因遺伝子が ATP13A2 であることを示した論文。
- 19) Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, et al. Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 65 : 19-23, 2009.  
ジストニアパーキンソニズムの原因遺伝子が PLA2G6 であることを示した論文。基底核に鉄の沈着がなくてもパーキンソニズムを呈することから、若年発症のジストニアパーキンソニズムと認知症を合併する症例に関しては鑑別の必要がある。
- 20) Yoshino H, Tomiyama H, Tachibana N, et al. Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism. *Neurology* 75 : 1356-1361, 2010.  
わが国も PLA2G6 遺伝子変異を伴う症例が存在している。よって上記に示したように鉄の沈着がなくても遺伝子スクリーニングをする必要がある。

## 4. 神経変性疾患に関与する miRNA と その臨床応用への可能性

今居 讓・服部信孝

miRNA 合成酵素 Dicer のノックアウトマウスの解析から、miRNA が予想以上に哺乳類の神経細胞・グリア細胞の発生・分化・機能維持に関与していることが示唆されている。さらに個々の遺伝性神経変性疾患の研究から、これら疾患に関与する miRNA とその標的遺伝子が明らかとなってきた。今後は、これらの発見の臨床での検証・応用へ向けての技術開発が課題となる。一方、血液・脳脊髄液から検出される miRNA を利用した孤発性神経変性疾患バイオマーカー開発の試みは、疾患の早期診断につながると期待される。

### はじめに

近年、タンパク質をコードしない RNA 群が様々な生物種から同定された。これらの RNA は多様な方法で遺伝子の発現を制御することが明らかにされつつあるが、このうち microRNA (miRNA) と呼ばれる 20 塩基あまりの RNA 断片が細胞内で合成され、mRNA の発現を制御していることが理解されるようになった。脳神経系での miRNA の役割もここ数年で急速に解明が進んでおり、神経組織の発生から疾患・再生まで、様々な過程において関与している事例が報告されている。本稿では、神経組織の維持や神経変性に関与する可能性を示唆した miRNA 研究を紹介し、その臨床応用への可能性を概説する。

### I. 神経細胞やグリア細胞の生存性と機能を支える miRNA

多くの miRNA は RNA ポリメラーゼ II により 1000 塩基以上の pri-miRNA として転写された後、Drosha と呼ばれる RNase により、ヘアピンステムル

ープ構造をもった 70 塩基程度の RNA (pre-miRNA) として切断される。pre-miRNA はさらに Dicer と呼ばれる RNase によって 20~25 塩基の二本鎖 (miRNA : miRNA\*) にプロセスされる。その後、RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれ一本鎖にされた miRNA は、その配列特異性に依存して mRNA のサイレンシング (翻訳の阻害) を行う。

miRNA の役割を解析するために、その合成に必須の酵素 Dicer のノックアウトマウスが作製されたが、胚性致死となることから成熟した神経系での miRNA の役割は不明であった<sup>1)</sup>。そこで、Cuellar らはドーパミン受容性神経細胞特異的に Dicer 遺伝子をノックアウトしたマウスを作製した<sup>2)</sup>。このマウスは運動失調を示し、解剖学的には脳サイズおよび神経細胞のサイズの減少を示したが、神経細胞死は認められなかった。一方、プルキンエ細胞特異的な Dicer の不活性化は、加齢依存的な運動失調とそれに伴ったプルキンエ細胞の変性が報告されている<sup>3)</sup>。オリゴデンドロサイトおよびシエワン細胞特異的な Dicer の不活性化はミエリン化

#### key words

アルツハイマー病, パーキンソン病, エクソソーム, 血液・脳脊髄液, バイオマーカー

の阻害や脱ミエリン化を引き起こし、ミエリン構造により維持される神経軸索の変性が認められている<sup>9,10)</sup>。さらに、アストロサイトにおける *Dicer* 遺伝子の出生後の除去においても、小脳顆粒細胞やプルキンエ細胞の変性、加齢依存的な運動失調と寿命の短縮が報告されている<sup>8)</sup>。

## II. 神経変性疾患に関する miRNA

### 1. アルツハイマー病

マウス前脳特異的に *Dicer* を不活性化すると、進行性の運動失調、神経変性、寿命の短縮がみられる。病変部位ではグリア細胞の活性化や高度にリン酸化された Tau の蓄積が認められた。その病理メカニズムとして、miR-15 の発現低下が ERK1<sup>阻害</sup> の発現亢進の原因となり、Tau のリン酸化と神経変性を導くことが示されている<sup>9)</sup>。老人斑の構成成分でありアルツハイマー病の病因であることが疑われている A ベータの前駆タンパク質である APP やその産生酵素 BACE1 の発現上昇は、アルツハイマー病発症のリスクを高めると考えられる。これに関連して miR-29a/b-1 が BACE1 の翻訳を抑制すること、孤発性アルツハイマー病において miR-29a/b-1 の発現低下が報告されている<sup>10)</sup>。一方、miR-106a と miR-520c が APP の発現を抑制することが *in vitro* で示されている<sup>11)</sup>。しかし現在まで、アルツハイマー病とリンクした miRNA 遺伝子の変異や、APP や BACE1 の miRNA 結合部位の変異は分離されていない<sup>12)</sup>。

### 2. パーキンソン病

中枢ドーパミン神経の発生および維持に必須の

転写因子 Pitx3 が miR-133b によって負に制御されることが報告されている<sup>13)</sup>。Pitx3 自身は miR-133b の発現を正に制御することから、Pitx3 と miR-133b の間にはネガティブフィードバックループが存在することが提案されている (図 1)。miR-133b の発現低下がドーパミン神経の変性をもたらすことが示唆されているが、Pitx3、miR-133b 遺伝子多型がパーキンソン病における危険因子となる事例は今のところ見つかっていない<sup>14)</sup>。

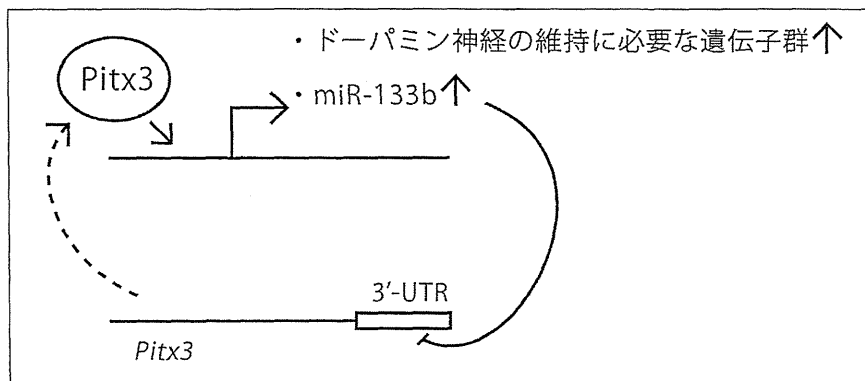
多方面の研究結果より  $\alpha$ -Synuclein の発現亢進が孤発性パーキンソン病の危険因子となることが明らかとなっているが、miRNA が *a-synuclein* 遺伝子の発現制御をする可能性も検討されている<sup>15)16)</sup>。さらに、 $\alpha$ -Synuclein の発現亢進との相関が指摘されている *Fgf20* 遺伝子のパーキンソン病リスク多型として miR-433 結合部位が同定されている<sup>17)</sup> (図 2)。一方、パーキンソン病リスク多型とはならないという報告もある<sup>18)</sup>。

孤発性および遺伝性パーキンソン病にリンクするキナーゼ LRRK2 は、キナーゼ活性に依存して let-7 および miR-184\* を負に制御する<sup>19)</sup>。その結果、転写因子複合体を形成する DP と E2F1 の神経細胞における発現上昇と細胞死をもたらすことが示唆されている。

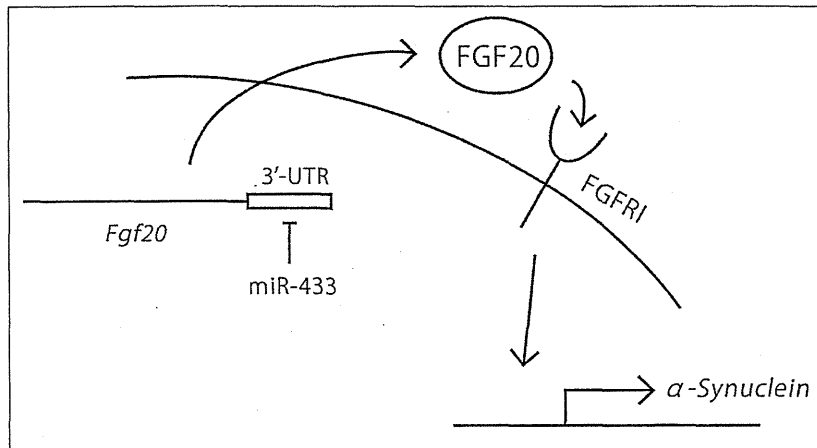
### 3. ハンチントン病

転写抑制因子 REST は huntingtin (Htt) と結合することによって細胞質に隔離されている。しかし、ポリグルタミンが伸長した疾患型 Htt は REST との結合が減弱しており、核への移行が誘導されるということが報告された<sup>20)21)</sup>。REST はゲノム上の

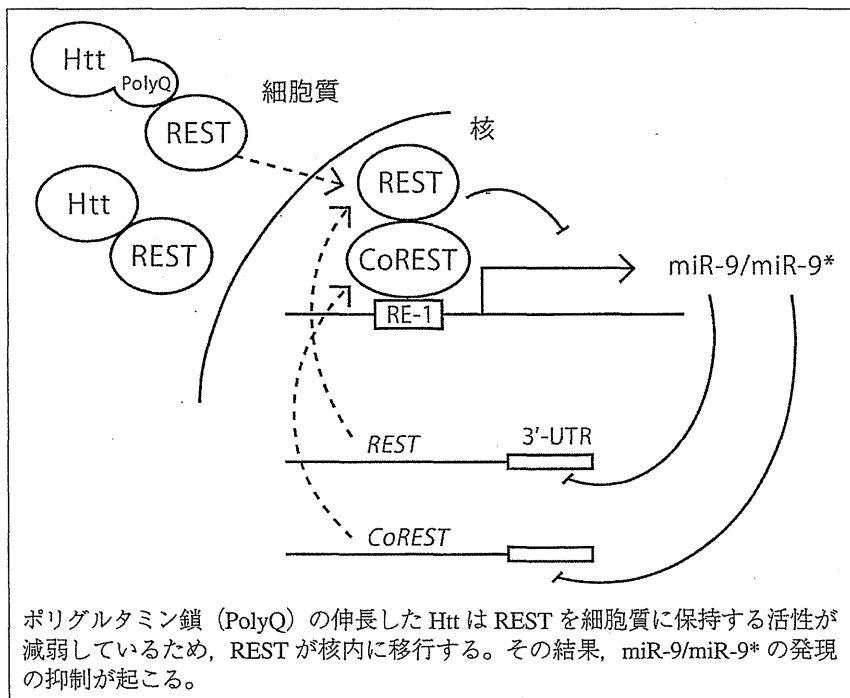
図 1 Pitx3 と miR-133b の間のネガティブフィードバックループ



図② miR-433, FGF20 と  $\alpha$ -Synuclein の関係



図③ Htt が機能を制御する REST/CoREST と miR-9/miR-9\* の関係



ポリグルタミン鎖 (PolyQ) の伸長した Htt は REST を細胞質に保持する活性が減弱しているため、REST が核内に移行する。その結果、miR-9/miR-9\* の発現の抑制が起こる。

RE-1 コンセンサス配列に結合し、REST corepressor 1 (CoREST) などとともに、神経特異的な遺伝子群の発現を抑制する。さらに、REST/CoREST 複合体は脳に豊富に発現する miR-9/miR-9\* の発現も負に制御する。一方で、miR-9/miR-9\* が REST/CoREST の発現を負に制御するというネガティブフィードバックループが存在することが示されている<sup>20)21)</sup> (図③)。

miRNA を疾患のバイオマーカーとして検討する研究も進められている。血漿中の miRNA は比

較的安定に存在し、試料の凍結融解にも耐性である。疾患型 Htt 遺伝子キャリアにおいて発症前から miR-34b の存在量が増加していることが観察されており、ハンチントン病のバイオマーカーとなる可能性が考えられている<sup>22)</sup>。

#### 4. 脊髄小脳失調

脊髄小脳性運動失調症 1 型 (spinocerebellar ataxia type 1: SCA1) の原因遺伝子 *ataxin-1* 内の CAG リピートの異常伸長は、小脳プルキンエ細胞の変性をもたらす。伸長した CAG リピートか

4. 神経変性疾患に関与する miRNA とその臨床応用への可能性

ら翻訳されたポリグルタミン鎖をもつ Ataxin-1 の神経細胞内における蓄積が変性をもたらすと考えられている。ataxin-1 は約 7 kb と比較的長い 3'UTR をもち、この領域に miR-19, miR-101 および miR-130 が結合すること、これらの miRNA の機能を阻害すると疾患型 Ataxin-1 による細胞死が増強することが示されている<sup>23)</sup>。

おわりに

神経変性に関与する miRNA とその分子標的が明らかになってきた。しかし、これらの研究はまだ端緒についたばかりであり、臨床においてこれ

ら miRNA の制御の有用性を検証していかなければならない。また個々の発見に基づき、特定の miRNA や遺伝子発現を阻害する試薬や、脳神経系に対する効果的なドラッグデリバリーシステムの開発も今後の課題である。一方これらのアプローチとは別に、孤発性アルツハイマー病、パーキンソン病のような罹患率が高く社会的な影響の大きい神経変性疾患に関しては、血液・脳脊髄液のエクソソーム内外に存在する疾患特異的な miRNA を同定し、疾患バイオマーカーとしての有用性を検討していく必要があると考えられる。

用語解説

1. miRNA\*: 長い一本鎖 RNA として転写された pri-miRNA は、ヘアピン型の構造をもつ miRNA 前駆体として切り出され、細胞質に輸送された後、Dicer により成熟型の短い二本鎖 RNA (miRNA: miRNA\*) へとプロセスされる。通常、一方の鎖が

miRNA として RISC に取り込まれ機能すると考えられるが、miRNA\* が機能的な miRNA として機能する例も報告されている。

2. ERK1: MAP キナーゼの一種。

参考文献

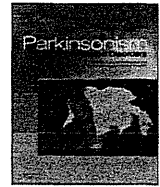
- 1) Bernstein E, Kim SY, et al : Nat Genet 35, 215-217, 2003.
- 2) Harfe BD, McManus MT, et al : Proc Natl Acad Sci USA 102, 10898-10903, 2005.
- 3) Cuellar TL, Davis TH, et al : Proc Natl Acad Sci USA 105, 5614-5619, 2008.
- 4) Schaefer A, O'Carroll D, et al : J Exp Med 204, 1553-1558, 2007.
- 5) Shin D, Shin JY, et al : Ann Neurol 66, 843-857, 2009.
- 6) Bremer J, O'Connor T, et al : PLoS One 5, e12450, 2010.
- 7) Pereira JA, Baumann R, et al : J Neurosci 30, 6763-6775, 2010.
- 8) Tao J, Wu H, et al : J Neurosci 31, 8306-8319, 2011.
- 9) Hebert SS, Papadopoulou AS, et al : Hum Mol Genet 19, 3959-3969, 2010.
- 10) Hebert SS, Horre K, et al : Proc Natl Acad Sci USA 105, 6415-6420, 2008.
- 11) Patel N, Hoang D, et al : Mol Neurodegener 3, 10, 2008.
- 12) Bettens K, Brouwers N, et al : Hum Mutat 30, 1207-1213, 2009.
- 13) Kim J, Inoue K, et al : Science 317, 1220-1224, 2007.
- 14) de Mena L, Coto E, et al : Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 153B, 1234-1239, 2010.
- 15) Junn E, Lee KW, et al : Proc Natl Acad Sci USA 106, 13052-13057, 2009.
- 16) Doxakis E : J Biol Chem 285, 12726-12734, 2010.
- 17) Wang G, van der Walt JM, et al : Am J Hum Genet 82, 283-289, 2008.
- 18) Wider C, Dachsel JC, et al : Mov Disord 24, 455-459, 2009.
- 19) Gehrke S, Imai Y, et al : Nature 466, 637-641, 2010.
- 20) Johnson R, Zuccato C, et al : Neurobiol Dis 29, 438-445, 2008.
- 21) Packer AN, Xing Y, et al : J Neurosci 28, 14341-14346, 2008.
- 22) Gaughwin PM, Ciesla M, et al : Hum Mol Genet 20, 2225-2237, 2011.
- 23) Lee Y, Samaco RC, et al : Nat Neurosci 11, 1137-1139, 2008.

今居 謙

1994年 京都大学農学部卒業  
 1999年 京都大学大学院理学研究科博士後期課程修了(理博)  
 理化学研究所脳科学総合研究センター研究員  
 2004年 スタンフォード大学医学部病理学部門博士研究員

2007年 東北大学加齢医学研究所准教授  
 2011年 順天堂大学医学研究科神経変性疾患病態治療探索講座先任准教授

専門：分子遺伝学、分子生物学。パーキンソン病モデルショウジョウバエ、マウスを用いて、パーキンソン病の発症メカニズムに関する研究を行っている。



## Short communication

## Long-term effect of repeated lidocaine injections into the external oblique for upper camptocormia in Parkinson's disease

Yoshihiko Furusawa<sup>a,d,\*</sup>, Yohei Mukai<sup>a</sup>, Tomoya Kawazoe<sup>a</sup>, Terunori Sano<sup>a</sup>, Harumasa Nakamura<sup>a</sup>, Chikako Sakamoto<sup>b</sup>, Yasuyuki Iwata<sup>b</sup>, Mizuki Wakita<sup>b</sup>, Yasuhiro Nakata<sup>c</sup>, Kohei Kamiya<sup>c</sup>, Yoko Kobayashi<sup>b</sup>, Takashi Sakamoto<sup>a</sup>, Yoshihisa Takiyama<sup>d</sup>, Miho Murata<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Neurology, National Center Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-higashi-cho, Kodaira, Tokyo 187-8551, Japan

<sup>b</sup>Department of Rehabilitation, National Center Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-higashi-cho, Kodaira, Tokyo 187-8551, Japan

<sup>c</sup>Department of Radiology, National Center Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-higashi-cho, Kodaira, Tokyo 187-8551, Japan

<sup>d</sup>Department of Neurology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, Kofu, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 12 May 2012

Received in revised form

11 August 2012

Accepted 18 September 2012

## Keywords:

Parkinson's disease

Camptocormia

Dystonia

External oblique muscle

Lidocaine

## ABSTRACT

**Background:** Parkinson's disease (PD) is occasionally complicated by camptocormia. In a previous study, we classified camptocormia into upper and lower types based on the inflection point, and reported that lidocaine injection into the external oblique muscle, but not into the internal oblique or rectus abdomen, improved upper camptocormia in PD. The effect of a single lidocaine injection disappeared over a period of few days. In this study, we used repeated lidocaine injections into the external oblique for 4–5 days and evaluated the effects of such treatment for up to 90 days.

**Methods:** The study subjects were 12 patients with PD and upper camptocormia who were treated with repeated lidocaine injections into the bilateral external oblique followed by rehabilitation. The effect of treatment was evaluated by measuring the angle of truncal flexion before and after the injection. Patients who showed improvement with repeated injections were evaluated during a 90-day period.

**Results:** Eight out of 12 patients showed significant improvement in posture after a single lidocaine injection. However, the effect subsided several days after treatment. Repeated injections produced long-term improvement in 9 out of 12 patients, which was maintained during the 90-day observation period in eight of these patients.

**Conclusions:** Our results showed that repeated lidocaine injections into the external oblique improved upper camptocormia, and that the effect was maintained in the majority of patients during the 90-day observation period, indicating that repeated lidocaine injections into the external oblique have therapeutic effect on upper camptocormia in patients with Parkinson's disease.

Crown Copyright © 2012 Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Camptocormia (from the Greek *kamptos* or to bend, and *kormos* or trunk) is defined as an abnormal thoracolumbar flexion that appears on standing or walking but disappears in the supine position. There is a strong relationship between camptocormia and Parkinson's disease (PD) [1]. The possible causes of camptocormia include myopathy, myositis [2], and truncal dystonia [1]; however, the exact etiology of camptocormia in PD has not been determined.

In camptocormia, several flexion patterns exist, which include bending at an upper position or hip joint and scoliosis or rotation of the trunk. However, there is little information on these classification patterns of camptocormia. In a previous study, we categorized camptocormia into upper and lower types and showed that lidocaine injection into the external oblique (EO) muscle, but not into the internal oblique or rectus abdomen, improved posture in PD patients with upper camptocormia [3]. We also reported that the effect of single lidocaine injection disappears over several days [3]. Our results support the notion that dystonia in the EO is involved in the pathogenesis of upper camptocormia [3]. In this study, we confirmed the effects of a single lidocaine injection and evaluated the effect of repeated lidocaine injections into the EO in upper camptocormia for patients with PD.

\* Corresponding author. Department of Neurology, National Center Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-higashi-cho, Kodaira, Tokyo 187-8551, Japan. Tel.: +81 423412711; fax: +81 423446745.

E-mail address: [yfuru@ncnp.go.jp](mailto:yfuru@ncnp.go.jp) (Y. Furusawa).



## 2. Methods

### 2.1. Classification of camptocormia

Camptocormia was clinically categorized by our group into upper and lower types based on spinal inflection points [3]. Based on X-ray images of the spine, upper camptocormia was defined as abnormal truncal flexion at a point between the lower thoracic and upper lumbar vertebrae, while lower camptocormia represented truncal flexion at the hip joint.

### 2.2. Patients

PD patients with upper camptocormia (flexion angle  $>40^\circ$ ) received single and repeated lidocaine injections into the EO between December 2010 and July 2011, and followed for a 90-day period. Patients were diagnosed with PD according to the United Kingdom Parkinson Disease Society Brain Bank criteria. Patients with severe spondylosis associated with kyphosis or other similar conditions arising from truncal muscle weakness were excluded in this study.

Twelve patients (8 women and 4 men, age:  $72.8 \pm 6.0$ , mean  $\pm$  SD, PD duration:  $10.0 \pm 7.7$  years, Hoehn & Yahr stage:  $3.6 \pm 0.7$ ) were included in this study. All patients showed some resistance to passive truncal extension and complained of stiffness and pain in the upper abdomen. The wearing-off phenomenon was noted in 4 patients, and treatment with anti-Parkinson medications in these patients partially corrected upper camptocormia in two patients. The inflection points were located between Th10 and L2 on the spinal X-ray images. Primary pathologies that could affect the paraspinal muscles and potentially explain upper camptocormia (e.g., myopathy or myositis) were evaluated by neurological examination, needle electromyography (EMG), muscle computed tomography (CT), and magnetic resonance imaging (MRI). Although muscle CT showed moderate paraspinal atrophy in 3 patients, and MRI T2-weighted images showed hyperintensity of the paraspinal muscles in one patient, none of the patients showed truncal extension weakness or myogenic response on needle EMG.

The study was approved by the ethics committee of the National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP), and informed consent was obtained from all participants.

### 2.3. Measurement of upper camptocormia flexion angle

The angle of the upper camptocormia was defined as the angle formed between a line perpendicular to the ground and a line linking the C7 vertebra with the inflection point of the trunk (Fig. 1) [3]. The inflection point was defined as the point

most distant from another line between C7 and L5. Truncal flexion angle was also measured in 7 age-matched PD patients free of camptocormia (flexion angle:  $29.4 \pm 3.7^\circ$ ).

### 2.4. Lidocaine injection and rehabilitation

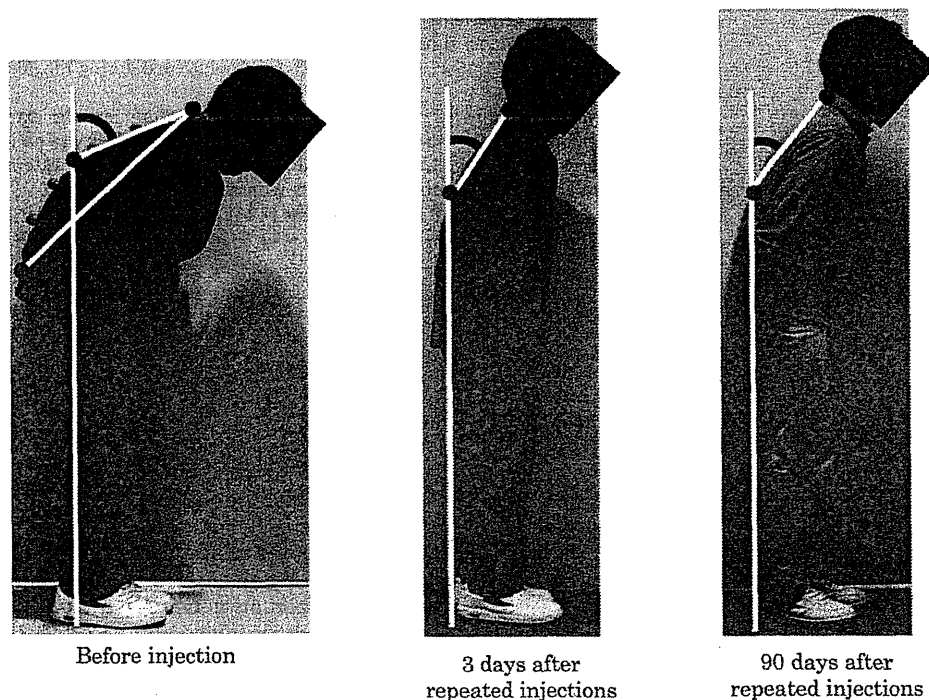
Lidocaine (50 mg of 1% xylocaine<sup>®</sup>, Astrazeneca, Japan) was injected in the bilateral EO muscles under ultrasound guidance. A single injection was used first and then repeated lidocaine injections (once a day for 4–5 days) in all patients. Repeated injections were commenced after diminishment of improvement following a single injection or at 2 weeks when improvement following a single injection was maintained or after few days when a single injection failed to induce improvement. The upper camptocormia flexion angle was measured prior to injection, one day after single injection, and three days after repeated injections. Flexion angles were measured during the on-state in four patients who had the wearing-off phenomenon. Patients showing improvement with repeated injections were followed-up for 90 days. In addition, all patients were trained to perform regular daily rehabilitation program that emphasized on truncal extension, during and after repeated injections. Anti-Parkinson drug use was not changed prior to or after the injections.

### 2.5. Statistical analysis

Values were reported as mean  $\pm$  standard deviation. Differences in flexion angles prior to and after a single or repeated injections were analyzed using the Wilcoxon signed rank test. A  $p$  value  $< 0.05$  was considered statistically significant. To analyze the effect of repeated injections of lidocaine during the 90-day observation period, we calculated the rate of improvement in the flexion angle. For this purpose, the rate measured at 3 days after repeated injections relative to the baseline was considered 100%. Thus, the following equation was used to calculate the improvement rate: Improvement rate (%) = [(flexion angle at baseline – flexion angle at time  $x$ )/(flexion angle at baseline – flexion angle at 3 days after repeated injections)  $\times$  100].

## 3. Results

Upper camptocormia improved in 8 out of 12 patients (66.7%) after single injection with lidocaine. The mean camptocormia flexion angle decreased from  $62.1 \pm 13.4^\circ$  to  $54.0 \pm 16.8^\circ$  ( $p = 0.018$ ;



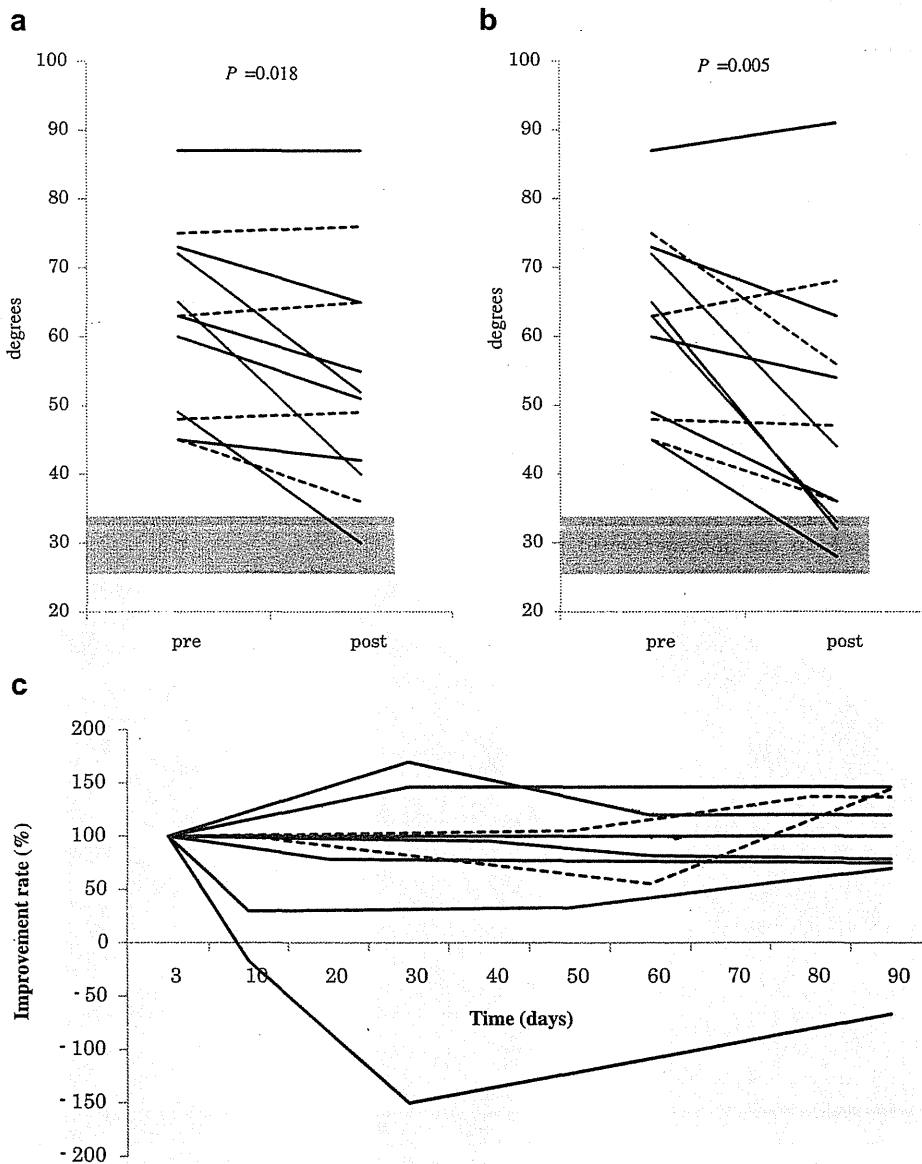
**Fig. 1.** Measurement of upper camptocormia flexion angle and time course of camptocormia in a representative patient. Patients were instructed to stand during evaluation without exerting any effort. In this patient, the camptocormia flexion angle decreased from  $65$  to  $32^\circ$  after repeated injections of lidocaine and the improvement was maintained over the 90-day observation period.

Fig. 2a). The observed improvement diminished between 3 and 8 days after the single injection in all but two patients, in whom improvement was maintained for more than 12 days. Repeated injections were performed for 5 days (4 patients) or 4 days (8 patients). Upper camptocormia improved in 9 out of 12 patients (75%) after repeated lidocaine injections, including one patient who had not previously shown improvement with the single injection. The mean camptocormia flexion angle decreased with repeated injections from  $62.1 \pm 13.4^\circ$  to  $49.0 \pm 18.5^\circ$  ( $p = 0.005$ ; Fig. 2b). In addition, the improvement was maintained for 90 days in 8 of 9 patients who responded to the repeated injection course (Figs. 1 and 2c). Six of these patients maintained over 75% improvement rate during the 90-day observation period.

One patient developed acute lumbago 7 days after receiving the repeated injection course, with subsequent deterioration in posture. No other side effects, such as truncal weakness, were observed after a single injection or repeated injections.

**4. Discussion**

In our previous study [3], camptocormia in PD patients was classified into upper and lower types based on the inflexion point of the spinal flexion. The results of that study showed improvement of upper camptocormia after a single ultrasound-guided lidocaine injection into the EO muscle, but not into the internal oblique or rectus abdomen, suggesting that the EO muscle is the primary



**Fig. 2.** Changes in upper camptocormia flexion angle after (a) single and (b) repeated injections of lidocaine, and (c) Changes in flexion angle improvement rate following repeated injections of lidocaine. Post: one day after a single injection in (a), and 3 days after repeated injections in (b). (c) To analyze the effect of repeated injections of lidocaine during the 90-day observation period, we calculated the rate of improvement in the flexion angle. For this purpose, the rate measured at 3 days after repeated injections relative to the baseline was considered 100%. Thus, the following equation was used to calculate the improvement rate: Improvement rate (%) = [(flexion angle at baseline – flexion angle at time x)/(flexion angle at baseline – flexion angle at 3 days after repeated injections) × 100]. Solid lines: patients treated with repeated injections for 4 days. Dotted lines: patients treated with repeated injections for 5 days. Gray box: range of truncal angle of age-matched PD patients free of camptocormia.

culprit in upper camptocormia [3]. In this study, posture improved in 8 out of 12 patients with camptocormia after a single lidocaine injection, which was consistent with the previous study [3]. Because our previous study showed that the effect of a single lidocaine injection diminished after several days, a repeat lidocaine injection course was applied in this study. Our findings clearly showed a long-term effect lasting over several months in patients who received repeated injections.

Lidocaine is a class 1B anti-arrhythmic drug that suppresses nerve conduction reversibly by blocking Na<sup>+</sup> channels, thereby inhibiting sensory and motor nerves. Neural excitation arising from dystonia involves the afferent nerves which originate from the muscle spindle and efferent fibers, which include the  $\gamma$  fibers and  $\alpha$  motor nerves [4]. Previous studies have suggested that lidocaine suppresses dystonic excitation by blocking type Ia or the  $\gamma$  fiber but not the  $\alpha$  motor nerve, thus alleviating dystonia without weakening the targeted muscle [4]. Here we showed that upper camptocormia improved after lidocaine injection without causing truncal weakness. We suspect that EO dystonia was suppressed by lidocaine, leading to improvement of upper camptocormia.

Upper camptocormia in patients treated with a single lidocaine injection improved over a period of 3 to more than 12 days, which is longer than the drug's half-life. The observed duration of improvement cannot be attributed solely to the effect of lidocaine on the target nerve since the half-life of this drug is only 102 min with a 200 mg intramuscular injection [5]. We speculate that it takes several days to reconstruct the neuronal circuit responsible for upper camptocormia once dystonic excitation is blocked by lidocaine. In contrast, improvement by repeated lidocaine injections was maintained over several months in most patients. Irwin et al. [6] reported a patient with corticobasal degeneration whose dystonia was improved by a 5-day intravenous lidocaine infusion. The effect in their patient lasted three months; however, the mechanism of the prolonged action of lidocaine was not discussed. Though the route of lidocaine administration in the present study was different from the aforementioned report, a similar improvement in upper camptocormia was observed. Rehabilitation, which is considered to be partially effective in camptocormia [7], may help prolong the effect of lidocaine. In this regard, Ohara et al. [8] showed that intravenous lidocaine injection prolonged P300 latency. Mexiletine, a derivative oral form of lidocaine is also considered to affect the central process of dystonia [9]. Our results showed that the prolonged improvement observed in four patients was similar to the improvement assessed 3 days after repeated injections. These results suggest that lidocaine acts both peripherally and centrally, thereby modifying the central processes of dystonia and producing long-term effects.

Although camptocormia is defined as abnormal thoracolumbar flexion of at least 45° when standing or walking [10], there is no standard method for the measurement of the angle of camptocormia. Seki et al. [11] assessed camptocormia by measuring the angle between the vertical plane and a line connecting the trochanter and the acromion, but did not take into consideration the flexion point. For this reason, we developed a new method to measure the angle of upper camptocormia (Fig. 1). Compared to the method described by Seki et al. [11], the new method is more sensitive to upper camptocormia, with the inflection point located between the lower thoracic and upper lumbar vertebrae.

Acute lumbago seven days after repeated injections was observed in one patient. This adverse effect may be explained by postural changes occurring after the injection. However, no other side effects were seen during the observation period. Rankin et al. [12] reported that the mean thickness of the EO muscle was 0.67 cm

(0.33–1.01) in males, 0.59 cm (0.23–0.95) in females in the supine position. We used ultrasound guide during the injection of lidocaine into the EO muscle for safe and precise injection. Muscle morphological changes (e.g., fibrosis) arising from lidocaine injection were not evaluated in this study. Therefore, the effect of lidocaine injection on muscle morphology needs to be investigated and evaluated in a future study.

The present study has some limitations. Repeated lidocaine injections were performed during a 5-day (4 patients) or 4-day (8 patients) period. The optimal number of days required for repeated lidocaine injections was not analyzed given the small sample size. In addition, the optimal lidocaine dose was not evaluated. The effect of rehabilitation on upper camptocormia was not formally evaluated and thus cannot be ruled out. The study also did not evaluate changes in the quality of life following improvement of camptocormia. Finally, the study is non-blinded, non-control trial and conducted in a small sample size. Though we cannot rule out placebo effect; the improvement was noted only by injection into the EO muscle, but not into the internal oblique or rectus abdomen [3]. Furthermore, the improvement by repeated lidocaine injections was maintained for several months in many patients, suggesting the improvement is not a placebo effect but the true effect on upper camptocormia. Further research, including proper randomized clinical trials in larger number of patients, is required to confirm the effect of lidocaine in camptocormia and develop the best protocol for repeated lidocaine injections for the treatment of upper camptocormia in patients with PD.

#### Funding source

This work was supported in part by Grants-in-Aid from the Research Committee of CNS Degenerative Disease, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, and Intramural Research Grant (21B-4) for Neurological and Psychiatric Disorders of NCNP.

#### Financial disclosures

None of the authors has any financial disclosure to report, with the exception of Miho Murata, who has received honoraria for consultations and/or lectures from GlaxoSmithKline, Boehringer Ingelheim, Daiinippon Sumitomo Pharma, and Novartis Pharma.

#### Acknowledgments

The authors extend their gratitude to Dr. Atsuo Nakagawa, whose extensive support and insightful comments were invaluable to our study.

#### References

- [1] Djaldetti R, Mosberg-Galili R, Sroka H, Merims D, Melamed E. Camptocormia (bent supine) in patients with Parkinson's disease—characterization and possible pathogenesis of an unusual phenomenon. *Mov Disord* 1999; 14:443–7.
- [2] Margraf NG, Wrede A, Rohr A, Schulz-Schaeffer WJ, Raethjen J, Eymess A, et al. Camptocormia in idiopathic Parkinson's disease: a focal myopathy of the paravertebral muscles. *Mov Disord* 2010;25:542–51.
- [3] Furusawa Y, Mukai Y, Kobayashi Y, Sakamoto T, Murata M. Role of the external oblique muscle in upper camptocormia for patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012;27:802–3.
- [4] Kaji R, Rothwell JC, Katayama M, Ikeda T, Kubori T, Kohara N, et al. Tonic vibration reflex and muscle afferent block in writer's cramp. *Ann Neurol* 1995; 38:155–62.
- [5] Adjepon-Yamoah KK, Prescott LF. Lidocaine metabolism in man. *Br J Pharmacol* 1973;47:672–3.
- [6] Irwin D, Revuelta G, Lippa CF. Clinical improvement of secondary focal limb dystonia in neurodegenerative disease following a five-day lidocaine infusion: a case report. *J Neurol Sci* 2009;277:164–6.

- [7] Seze MP, Creuze A, Seze M, Mazaux JM. An orthosis and physiotherapy programme for camptocormia: a prospective case study. *J Rehabil Med* 2008;40:761–5.
- [8] Ohara S, Hayashi R, Momoi H, Miki J, Yanagisawa N. Mexiletine in the treatment of spasmodic torticollis. *Mov Disord* 1998;13:934–40.
- [9] Lucetti C, Nuti A, Gambaccini G, Bernardini S, Brotini S, Manca ML, et al. Mexiletine in the treatment of torticollis and generalized dystonia. *Clin Neuropharmacol* 2000;23:186–9.
- [10] Tiple D, Fabbrini G, Colosimo C, Ottaviani D, Camerota F, Defazio G, et al. Camptocormia in Parkinson disease: an epidemiological and clinical study. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2009;80:145–8.
- [11] Seki M, Takahashi K, Koto A, Mihara B, Morita Y, Isozumi K, et al. Camptocormia in Japanese patients with Parkinson's disease: a multicenter study. *Mov Disord* 2011;26:2567–71.
- [12] Rankin G, Stokes M, Newham DJ. Abdominal muscle size and symmetry in normal subjects. *Muscle Nerve* 2006;34:320–6.