

日本人パーキンソン病患者における *VPS35* 変異の頻度と臨床的特徴

研究分担者 服部信孝^{1,2,12)}

研究協力者 安藤真矢¹⁾, 船山学^{1,2)}, 李元 哲²⁾, 柏原健一³⁾, 村上善勇⁴⁾, 石津暢隆⁵⁾, 豊田千純子⁶⁾,
野口克彦⁷⁾, 橋本貴司⁸⁾, 中野直樹⁹⁾, 佐々木良元¹⁰⁾, 小久保康昌¹⁰⁾, 葛原茂樹¹¹⁾,
大垣光太郎¹⁾, 山下 力¹⁾, 吉野浩代²⁾, 波田野琢¹⁾, 富山弘幸^{1,12)}

- 1) 順天堂大学医学部脳神経内科, 2) 順天堂大学老人性疾患病態・治療研究センター,
3) 岡山旭東病院神経内科, 4) 済生会栗橋病院神経内科, 5) 国立病院機構埼玉病院神経内科,
6) 東京慈恵会医科大学附属第三病院神経内科, 7) 柿生記念病院神経内科,
8) 橋本クリニック, 9) 近畿大学医学部脳神経外科, 10) 三重大学大学院医学系研究科神経内科,
11) 鈴鹿医療科学大学保健衛生学部, 12) 順天堂大学神経変性疾患病態治療探索講座

研究要旨

[目的] 常染色体優性遺伝性パーキンソン病の新規原因遺伝子である *vacuolar protein sorting 35 (VPS35)* について変異解析し、日本人パーキンソン病 (PD) 患者における変異の頻度および臨床的特徴を検討した。[方法] 日本人優性遺伝性 PD 300 家系、孤発性 PD 433 名、非血縁健常者 579 名について欧米人 PD 患者から同定されたと報告のあった 7 種の非同義多型を PCR direct sequence 法で解析した。変異陽性患者については創始者効果を検討するためマイクロサテライトを用いたハプロタイプ解析を行った。また、変異陽性患者の臨床症候を比較検討した。[結果および考察] 優性遺伝性 PD 3 家系 (1.0%)、孤発性 PD 1 名 (0.23%) で D620N 変異を同定した。その他 6 種の非同義多型は全例で認めなかった。D620N 変異陽性患者のハプロタイプ解析結果から、複数の創始者が推定された。患者はいずれも典型的な振戦優位のパーキンソニズムを呈していた。[結論] *VPS35* D620N 変異は、比較的稀だが本邦では欧米よりも頻度が高く優性遺伝性 PD のみならず振戦優位の孤発性 PD でも検索すべきである。

A. 研究目的

パーキンソン病 (PD) はその多くが孤発性だが、約 10% の患者は近親者に複数の発症者を認める家族歴がある。従ってパーキンソン病の病態を理解するためには、患者の遺伝的背景を明らかにすることが非常に重要である。

メンデル遺伝性 PD は単一遺伝子の変異が原因で発症し、現在までに原因遺伝子は十数種単離されている。しかしながらこれらの遺伝子に変異が同定される家族性 PD は全体の約 20% 弱にすぎず、優性遺伝性 PD に限ればその陽性患者は 15% に満たない。つまり優性遺伝性 PD の遺伝子

解析を推進し、その全容を明らかにすることが、パーキンソン病の遺伝子解析においては重要だと言える。

vacuolar protein sorting 35 (VPS35) は欧米の高齢発症優性遺伝性パーキンソン病家系からエクソーム解析法を用いて単離された常染色体優性遺伝性パーキンソン病 (ADPD) の新規原因遺伝子である。これまで報告された変異または多型は全て欧米人 PD から同定されており、日本人を含めアジアからの報告はない。

このような背景を踏まえ、*VPS35* の既報候補病的変異を解析し日本人 PD 患者における変異の有

無、頻度を明らかにし、さらに *VPS35* 変異陽性 PD の臨床的特徴を検討することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

方法概要

・日本人優性遺伝性 PD 300 家系、孤発性 PD 433 名、非血縁健常者 579 名を対象とし、*VPS35* の 7 種の既報非同義多型の変異解析を行った。

・変異陽性者の創始者効果を検討する目的でマイクロサテライトを用いたハプロタイプ解析を行った。

・変異陽性者の臨床神経学的解析を行った。

(1) 対象

順天堂大学 PD ゲノムバンクに登録されている日本人優性遺伝性 PD 300 家系、孤発性 PD 433 名、非血縁健常者 579 名。

平均発症年齢は優性遺伝性 PD 51.2 ± 11.5 (8-83) 歳、孤発性 PD 47.2 ± 12.9 (5-88) 歳である。平均検査時年齢および男女比は優性遺伝性 PD 58.1 ± 10.8 (17-85) 歳、男女比 1.35、孤発性 PD 55.9 ± 12.5 (12-92) 歳、男女比 1.13、非血縁健常群 58.0 ± 9.34 (23-89) 歳、男女比 1.54 だった。既報の PD 原因遺伝子 (*SNCA*, *parkin*, *PINK1*, *DJ-1*, *LRKK2*, *PLA2G6*) はいずれも陰性の症例を選出した。

(2) 方法

これまでに 7 種の非同義多型が欧米人 PD 患者から同定おり、そのうち M57I、I241M、R524W、D620N は PD 患者のみで同定され、P316S、A737V、L774M は PD 患者および健常者から同定されている。これら 7 種の既報非同義多型それぞれを優性遺伝性 PD 家系、孤発性 PD 症例では PCR-direct sequencing 法で変異解析を行った。D620N 変異については健常対象群を

Hi-Resolution Melting analysis 法で解析した。

変異陽性患者についてハプロタイプ解析法を

用いて創始者効果の有無を検討した。また臨床神経学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は順天堂大学医学部倫理委員会の承認を得ており、解析対象者へは医師による十分なインフォームドコンセントを行い、書面での同意書を得ている (承認番号 順大医倫第 2012157 号)。

C. 研究結果

・**変異解析結果**；優性遺伝性 PD 3 家系 (1.0%)、孤発性 PD 1 名 (0.23%) で D620N 変異を同定した。その他の多型は全例で認めなかった。

・**ハプロタイプ解析結果**；D620N 変異陽性家系のうち A,B は共通祖先を有する可能性があったが家系 C、孤発例 D では異なるハプロタイプを有しており複数の創始者の存在が示唆された。

・**臨床神経学的解析結果**；L-dopa 反応良好な振戦優位のパーキンソニズムを呈していた。発症年齢は自検例では 30-60 代とばらつきを認めた。

(1) 変異解析

D620N (c.1858G>A) を優性遺伝性 PD 3 家系 (1.0%)、孤発性 PD 1 例 (0.23%) からヘテロ接合体で同定した (図 1)。当該アミノ酸は酵母からヒトまで種を超えて保存されていた。他の非同義置換は認めなかった。また、健常群ではいずれの変異も認めなかった。

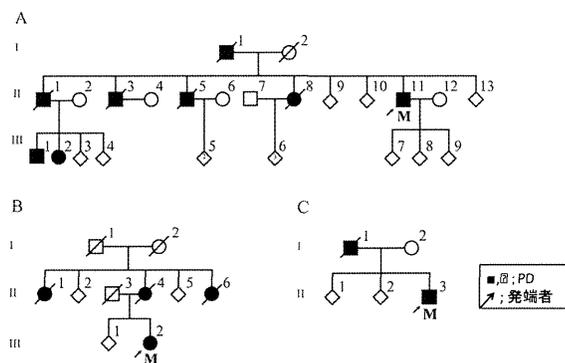


図 1. D620N 変異陽性家系の家系図

発端者は AII-11、BIII-2、および CII-3 である。

いずれの発端者も D620N 変異をヘテロ接合体で認めた。D620N 変異は図に示した以外に孤発性 PD1 例から認めた。

(2) 変異症例の家系図および臨床的特徴

変異陽性患者の発症年齢は欧米人 PD を対象とした既報では 50-60 歳で発症している症例が多く、平均年齢は 50.6±7.3 歳だが、自検例では発症年齢が 34-62 歳と幅が広がった。患者はいずれも典型的な振戦優位の L-dopa 反応性パーキンソニズムを呈しており認知機能低下は目立たなかった。またいずれの症例も精神症状、幻覚、著明な自律神経障害はなかった (表 1)。

表 1. *VPS35* D620N 変異陽性患者の臨床的特徴

	優性遺伝性PD			孤発性PD
	AII-11	BIII-2	CII-3	D
Age at disease onset (years)	62	55	34	42
Disease duration (years)	15	2	7	21
Resting tremor	+	+	+	+
Bradykinesia	+	+	+	+
Rigidity	+	+	+	+
Gait disturbance	+	-	-	+
Postural instability	+	-	-	+
Clinical response to levodopa	+	+	+	+
Orthostatic hypotension	+	-	-	-
Hallucination	-	-	-	-
Other psychosis	-	-	-	-
Dementia	+	-	-	-

(3) 創始者効果の検討

家系 A および B のハプロタイプ解析の結果から、同一の遺伝子型であるマイクロサテライト (MS) が連続して存在していることが明らかとなり (表 2、黒枠)、家系 A および B は共通祖先を有する可能性が示唆された。一方、家系 C と孤発性 PD 患者 D は家系 A および B とは異なり、それぞれ異なるハプロタイプを有していた。以上の結果から、本邦には少なくとも 3 人以上の創始者が存在していることが示唆された。これまで D620N 変異陽性の欧米人 PD から数種類の創始者が報告されており、自検例とハプロタイプを比較した結果、いずれの D620N 変異陽性欧米人 PD 患者とも一致しなかった。

表 2. D620N 変異陽性患者のハプロタイプ解析

マイクロサテライト	優性遺伝性PD				孤発性PD
	AII-11	BIII-2	CII-3	D	
D16S401	170	166/170	166/172	166/170	
D16S3068	143	141/145	145/147	145/145	
D16S753	272	272,268	268/276	264/268	
<i>VPS35</i> p.D620N (c.1858G>A)	A	A/G	A/G	A/G	
Chr16_45.333M	294	294,298	294/300	294/304	
D16S3105	191	191,189	189/193	187/187	
Chr16_45.615M	147	147,147	147/145	147/145	
Chr16_45.806M	246	246,238	246/244	246/244	
Chr16_45.835M	237	237,237	237/237	237/237	
Chr16_45.855M	212	212,210	210/210	210/216	
D16S3044	195	195,195	195/197	197/197	

VPS35 およびその近傍のマイクロサテライト遺伝子型検査により、ハプロタイプを決定した。AII-11 は近親者のハプロタイプと比較することにより、家系 A の disease haplotype を決定した。家系 B、C、および孤発性 PD 患者 D については当該患者のみ検査可能であったため、ハプロタイプの相が決定できないため、全てのマイクロサテライト遺伝子型を示す。

D. 考察

VPS35 の D620N 変異の頻度を欧米人 PD の頻度と比較すると欧米人 PD では 0.1-0.2% で D620N が陽性である。また既報のアジア人 (台湾人、中国人) は合計 1000 例以上で解析が施行されているが全例で変異陰性である。本研究では、*VPS35* D620N は PD 全体の 0.55% (4/733) であり、欧米から報告された頻度やアジアからの陽性例報告が未だないことを考慮すると頻度は高いと言える。特に優性遺伝性 PD では 1.0% (3/300) と既報の 5-10 倍の頻度となる。しかしフランスからの報告では家族性 PD の 1.22% の頻度を占める変異であり、頻度のばらつきに関しては議論の余地がある。また既報 7 種の非同義置換のみでの解析のため日本人 PD における *VPS35* 変異頻度の全容は不明であり、今後、*VPS35* 全遺伝子配列を決定することで明らかにする必要がある。*VPS35* D620N 変異には創始者効果はなく、D620N は人種を超えて変異が起こりやすい hotspot である可能性がある。

VPS35 D620N 変異陽性患者の臨床神経学的特徴に関しては、振戦優位で L-dopa 有効の典型的な PD であるが、発症年齢に関しては既報と比しばらつきがあった。発症年齢の幅が未知の環境因子や遺伝的要因によるものか否かを今後詳細な臨床遺伝学的解析を行うことで、VPS35 と相互作用する因子を同定することが可能かもしれない。

VPS35 はレトロマーという複合蛋白質の一つの構成成分で他の 2 種の VPS タンパク質 (VPS26 および VPS29) とヘテロ 3 量体を形成しエンドソーム膜上や細胞質に存在し細胞内膜輸送に関与している。レトロマーは酸性加水分解酵素など積み荷分子を捉えて、エンドソーム膜上で被覆小胞を形成し、積み荷分子を輸送しトランスゴルジ網に戻す役割を担う。このことから PD 発症に VPS35 が関わる場合、「VPS35 の変異がレトロマーの機能障害を招き、細胞内の輸送機構が障害されることで不要分子の蓄積や必要分子の枯渇の結果、神経細胞死が引き起こされる」という一連の経路が推測される。しかしその全容は未だ明らかにはなっておらず、今後の機能解析を含めた更なる検討が必要となる。

E. 結論

アジア初の VPS35 変異陽性症例を報告した。VPS35 変異は比較的稀な頻度ではあるが、本邦では欧米よりも頻度が高く、振戦優位の孤発性 PD でも検索すべきである。またこの変異による細胞内輸送機構の障害が PD の病態に関与する可能性があることから、VPS35 は PD の治療・創薬の標的として重要な遺伝子である。

F. 健康危険情報

本年度は特に健康危険情報として報告すべきものはなかった。

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) Ando M, Funayama M, Li Y, *et al.* VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson disease. *Mov Disord.* 27(11):1413-7, 2012.

2. 学会発表

- 1) Ando M, Funayama M, Li Y, *et al.* VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson's disease. (2012, 7th GEO-PD meeting. Korea, Seoul).
- 2) Ando M, Funayama M, Li Y, *et al.* The Asp620Asn mutation of VPS35 in Japanese patients with typical Parkinson disease. (2012, American Society of Human Genetics annual meeting. U.S. San Francisco).
- 3) 安藤真矢、船山学、李元哲、ら. 日本人パーキンソン病患者における VPS35 p.D620N 変異の解析 (2012, MDSJ. 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

3. その他

なし

パーキンソン病のモデルマウスに対する γ グロブリン大量腹腔内投与の効果

研究分担者 三輪英人¹⁾
研究協力者 中西一郎²⁾，厚芝友美²⁾

1) 順天堂大学医学部附属練馬病院脳神経内科，2) 和歌山県立医科大学神経内科

研究要旨

パーキンソン病の進行抑止を目的とした新規治療戦略を開発するため、パーキンソン病モデルマウスに対する大量 γ グロブリン腹腔内投与（IPIG）の神経保護効果について検討した。マウスに大量 γ グロブリンまたは対照を腹腔内投与し、神経毒 MPTP を投与しパーキンソン病モデルを作成した。IPIG 群では対照群と比較して投与後 1 週間での運動機能が保たれ、免疫組織学的検討においても線条体および黒質における MPTP 誘発ドパミン神経細胞変性が抑制されていた。IPIG 群では炎症性変化（ミクログリアの活性化）も抑制されていた。さらに、IPIG 群では MPTP による血液脳関門の障害が軽減していた。これらの所見より、IPIG が神経炎症を抑制し、かつ血液脳関門を保持することが推定された。当該研究結果は、大量 γ グロブリン療法が神経変性に好ましい影響を与え得る可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

パーキンソン病におけるドパミン神経細胞変性の病態は不明であるが、神経炎症が重要な役割を担っていると推定されている。実際、疫学的研究では抗炎症薬服用がパーキンソン病発症リスクを低減する可能性が示唆されている。実験的にも抗炎症作用を有する薬物がドパミン神経細胞死を抑制することが明らかにされている。本研究では、大量 γ グロブリン腹腔内投与（Intra-peritoneal immunoglobulin: IPIG）の MPTP 誘発ドパミン神経細胞死に対する神経保護効果の機序について、特に血液脳関門機能を中心に検討した。

B. 研究方法

対象：C57/BL マウス

方法：免疫グロブリン Venoglobulin-IH（Mitsubishi）2.0 g/kg を、対照薬として同量の human serum albumin を腹腔内投与した。MPTP 投与によるパーキンソンモデルマウスの作成は、免

疫グロブリンまたは対照薬投与 2 時間後に、急性投与（20 mg/kg 2 時間毎に 4 回）により行った。

MPTP 投与 1 週間後に行動計測（pole test）を行い、直後に灌流固定し、抗チロシン水酸化酵素（TH）抗体と、抗 Iba-1 抗体を用いて免疫組織学的検索を行った。

血液脳関門（BBB）機能の評価は、投与した FITC-albumin と、血管内皮細胞の tight junction の構成要素である ZO-1 を標識した蛍光免疫染色、さらにエバンスブルー（EB）漏出量の定量により行った。有意差の検定には one-way ANOVA と T 検定を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意差とした。

当該研究は和歌山県立医科大学における実験動物倫理委員会の審査を受けた後に行われた。

C. 研究結果

行動計測

Pole test（マウスを垂直に設置されたポール先端においた後に着地するまでの秒数 descent

latency を計測した) では、MPTP + Albumin 群と比較して MPTP + IPIG 群では着地までの要した時間は有意に低下していた (図 1)。

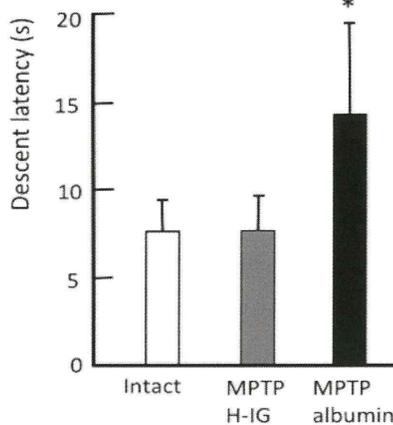


図 1 Pole test における着地時間 descent latency (秒) を示す。高用量 γ グロブリン投与群 (H-IG) では対照 (アルブミン) と比して着地時間の有意な正常化が認められた (データは平均および標準偏差)。

免疫組織学的検討

IPIG 群では、対照群と比較して、線条体における TH 陽性線維の脱落と黒質における TH 陽性細胞数の減少はともに抑制されていた。Iba-1 陽性ミクログリアの活性化も抑制されていた (図 2)。また、黒質の TH 陽性細胞を stereological に定量的に解析した結果、対照群と比較して IPIG 群では有意に MPTP による黒質 TH 陽性細胞死を抑制していることが明らかにされた。

血液脳関門機能

血液脳関門を評価するために、tight junction に対する抗体 (ZO-1 抗体) を用いて線条体の免疫組織学的検索を行った。線条体の ZO-1 は、未処理群では血管壁に均質に発現していた。一方、MPTP + albumin 群では染色性の顕著な消失が認められたが、MPTP + IPIG 群では有意に残存して

いた (DATA not shown)。

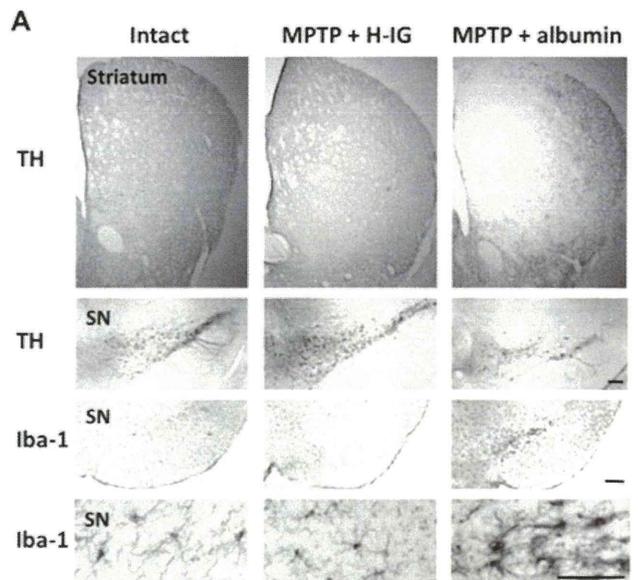


図 2 免疫組織学的検索結果を示す。上 2 段は線条体 (striatum) および黒質 (SN) のチロシン水酸化酵素免疫染色 (TH)。下 2 段は Iba-1 免疫染色 (弱拡大および強拡大)。MPTP+albumin 群では線条体における TH 陽性線維の減少、黒質における TH 陽性細胞の減少、黒質における Iba-1 陽性ミクログリアの活性化が認められる。一方、 γ グロブリン投与群 (MPTP+H-IG) では、それらの変化は軽減しているのがわかる。

FITC-albumin 投与後、蛍光顕微鏡を用いて線条体における蛍光標識の血管外漏出を観察した。MPTP + albumin では顕著な FITC-albumin の血管外漏出が認められた。一方、MPTP + IPIG 群では血管外漏出が抑制されていることが明らかにされた (図 3)。

さらに、エバンスブルーの全身投与後の線条体ホモジュネート中のエバンスブルーを測定したところ、MPTP + albumin に比して MPTP + IPIG 群ではエバンスブルー量は有意に低下していた。これは IPIG 群において血液脳関門の破綻が抑制されていることを示唆する。

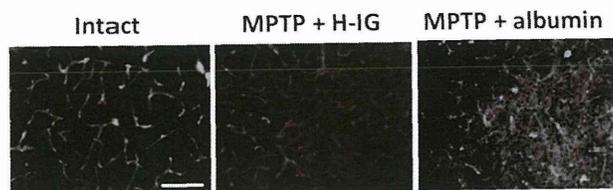


図3 FITC-albuminの血管外漏出を示す。未処置群ではFITC-albuminは血管壁にのみ認められる。MPTP + albumin群では線条体内にFITCの漏出が認められるが、高用量 γ グロブリン投与群(MPTP+H-Ig)では、血管外漏出が軽減していることがわかる。

D. 考察

本研究では、大量 γ グロブリン腹腔内投与(IPIG)が、MPTPの神経毒性に対して神経保護的に作用することを明らかにできた。その機序として、ミクログリアの活性化が抑制されていたことから、抗神経炎症作用が役割を担っていることが示唆された。パーキンソン病(PD)患者脳では、活性化ミクログリアや浸潤性T細胞などの神経炎症を示唆する所見が認められることから、神経炎症の抑制が、ドパミン神経変性に対する治療の選択肢となりうると期待されている。実際、抗炎症薬がパーキンソン病発症のリスクを低減する可能性も示されており、ミクログリア活性化を抑制するミノサイクリンが実験的ドパミン神経細胞変性に対して神経保護的に作用し得ることも報告されている。

現在、大量免疫グロブリン療法(IVIG)は、神経炎症を背景とする様々な神経疾患に対し有効な治療法として使用されている。しかし、その機序に関しては不明な点が多い。T細胞増殖抑制作用、B細胞分化抑制作用、補体系への干渉作用、サイトカイン産生抑制作用、内因性免疫グロブリン産生抑制作用、自己抗体中和作用などがある可能性が提唱されている。アルツハイマー病モデルマウスに対するIVIGの効果機序について検討した報告では、投与されたヒトIgGは海馬周囲

の脳実質に沈着していることが免疫組織学的に示されている。IVIGの沈着部位はA β 沈着やmicroglia遊走部位と一致しており、IVIGはBBBを通過して神経炎症に作用していることが示唆されている。本研究でも、投与された免疫グロブリンが脳実質内に漏出している所見が得られており(未発表データ)、MPTPにより惹起された神経炎症に対して直接抑制的に作用している可能性もある。

一方、本研究ではIPIGがMPTP投与によって引き起こされたBBBの破綻に対して抑制的に働いたことが示唆された。PD患者脳やMPTP、6-OHDAによる実験的PDモデルでの検討でも血液脳関門の障害が指摘されているが、これまでminocycline、Caffeine、Mesenchymal stem cell transplantationなどがMPTPによる血液脳関門の障害に対して抑制的に働き、ドパミン毒性を軽減し得ることが報告された。アルツハイマー病でもその病態に血液脳関門障害の関与が示唆されているがA β の血液脳関門への障害作用をIVIGが抑制することが報告されている。これらと同様にIPIGがMPTPによる血液脳関門の破綻を抑制することで、MPTPのドパミン神経毒性に対し保護的に作用した可能性も考えられる。

E. 結論

MPTPのドパミン神経毒性に対するIPIGの神経保護効果の機序として、抗神経炎症作用とともに、MPTPによる血液脳関門障害を軽減していることが考えられた

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

2.学会発表

2010年 第5回パーキンソン病・運動障害疾患
カンファレンス（東京）ポスター発表

2011年 3rd Asian and Oceania Parkinson's
Disease and Movement Disorders Congress（台
湾）ポスター発表

2011年 第52回日本神経学会総会（東京）ポ
スター発表

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

ショウジョウバエにおいて Nitric oxide シグナルは FoxO を介してドーパミン 神経細胞の生存性に影響する

研究分担者 服部 信孝^{1,2)}

研究協力者 金尾智子²⁾, 澤田知世³⁾, Shireen A Davies⁴⁾, 高橋良輔³⁾, 今居 譲⁵⁾

1) 順天堂大学 医学部 神経学, 2) 順天堂大学大学院 医学系研究科 老人性疾患病態・治療研究センター,
3) 京都大学大学院 医学研究科 臨床神経学, 4) IBL Division of Mol. Gen., Univ. of Glasgow, 5) 順天堂
大学大学院 医学系研究科 神経変性疾患病態治療探索講座

研究要旨

〔目的〕 FoxO は、代謝、分化、ストレス応答に関与する転写因子である。我々はショウジョウバエにおいて、パーキンソン病原因遺伝子産物 LRRK2 が転写因子 FoxO をリン酸化・活性化させることでドーパミン神経変性に関与することを報告した。その後、LRRK2 を介した FoxO 活性化因子の探索を目的とした遺伝学的スクリーニングを行う過程で、cGMP-dependent kinase II(cGKII)とその上流のシグナル伝達経路である Nitric oxide (NO)シグナルを同定した。本発表では新規に同定した NO-FoxO シグナル伝達経路のドーパミン神経細胞への影響を報告する。〔方法〕 cGKII が FoxO をリン酸化する部位を同定し、FoxO の非リン酸化変異体のトランスジェニックショウジョウバエを作製、ドーパミン神経への影響を解析した。さらに cGKII の上流因子を遺伝学的スクリーニングにより同定した。〔結果および考察〕 キナーゼアッセイおよび遺伝学的テストにより cGKII は LRRK2 とは独立に FoxO の同じアミノ酸残基を直接リン酸化することが明らかとなった。cGKII と FoxO の神経特異的な共発現は、ショウジョウバエ成虫において加齢に伴うドーパミン神経変性をもたらす寿命の短縮および運動機能を低下させた。この運動機能低下は L-DOPA の経口投与によって改善された。一方、FoxO の非リン酸化変異体のトランスジェニックショウジョウバエにおいては cGKII 共発現によるドーパミン神経変性はみられなかった。また、遺伝学的解析により cGKII-FoxO の上流因子として NO synthase, Guanylate cyclase の関与を明らかにした。〔結論〕 NO シグナルが cGKII を介して FoxO を活性化する新たなシグナル伝達経路の存在がショウジョウバエにおいて示され、さらに中枢ドーパミン神経の生存性や運動障害、寿命へ影響を与える可能性が示唆された。

A. 研究目的

パーキンソン病(PD)は最も発症頻度が高い老人性運動神経変性疾患である。中脳黒質ドーパミン神経を含む神経細胞が選択的細胞死を起こし脱落することで PD シンドロームを引き起こす。

PD シンドロームは炎症、ミトコンドリア機能不全、鉄の蓄積や酸化ストレスなど数々の要因により引き起こされることが報告されており、シグナル伝達物質である一酸化窒素 (NO) も PD シンドロームに関わっている。

NO は一酸化窒素合成酵素(NOS)によって合成

される。ほ乳細胞において NOS は neuronal NOS (nNOS)、endothelial NOS (eNOS)、inducible NOS (iNOS)の3種類存在している。PD患者の中脳黒質にて nNOS と iNOS の発現上昇が報告されている。また、神経細胞死が起こる際の炎症反応で活性化したグリア細胞が iNOS を過剰に発現し、NO の過剰産生が起こっていることも指摘されている。

我々は、晩発性 PD 原因遺伝子産物 LRRK2 のショウジョウバエオルソログである *Drosophila* LRRK(dLRRK)が転写因子であるショウジョウ

バエ FoxO オルソログ (dFoxO)をリン酸化・活性化し、pro-apoptotic 遺伝子である *hid* の発現を上昇させ神経変性を起こすことを報告した。dFoxO を介した神経変性は dLRRK のキナーゼ活性が亢進している PD 疾患型変異体において増悪した。一方、キナーゼ活性の無い dLRRK 変異体の発現によって神経変性を完全に抑えることができなかった。したがって dLRRK-dFoxO シグナル伝達経路の他に別の経路 (あるいは因子) の存在が考えられた。

今回ショウジョウバエの複眼を用いた遺伝学的 *in vivo* スクリーニングにより cGKII-FoxO シグナル伝達経路を見出し、cGKII が LRRK2/dLRRK と同様に FoxO をリン酸化・活性化することを報告する。また、NO シグナル伝達によるドーパミン神経細胞への影響を報告する。

B. 研究方法

①ショウジョウバエを用いた dFoxO と遺伝的相互作用のある遺伝子のスクリーニング

我々は、dFoxO による目の変性を LRRK2/dLRRK が増悪することをすでに報告した。LRRK2 シグナル伝達の上流のキナーゼを同定する目的で、dFoxO を複眼で発現させたハエに FoxO をリン酸化することが報告されているキナーゼの過剰発現系統 (あるいは変異系統) を交配させ、次世代のハエの複眼の形態観察を行った。

②*in vitro* キナーゼアッセイ

スクリーニングにより同定された候補キナーゼおよび FoxO の組み換えタンパク質を作製し ³²P で標識されたリン酸を用いた *in vitro* キナーゼアッセイを行った。

③レポーターアッセイ

FoxO のターゲット配列にルシフェラーゼを融合させたベクターと FoxO および cGKII を培養細胞に共発現させてレポーターアッセイを行い FoxO の転写活性に与える影響を解析した。

④候補キナーゼの上流因子および下流因子の探索

候補遺伝子のシグナル経路を明らかにするため、複眼に dFoxO を発現させたハエに遺伝子を共発現させて遺伝的解析を行った。

⑤ショウジョウバエドーパミン神経の計測

ショウジョウバエ成虫の神経特異的に遺伝子を発現させ、約半数のハエが死亡する 24 日目の脳を取り出し、抗チロシン水酸化酵素 (TH) 抗体陽性の細胞数の測定を行った。

C. 研究結果および考察

①ショウジョウバエを用いた dFoxO と遺伝的相互作用のある遺伝子のスクリーニング DG2 (cGKII のショウジョウバエオルソログ) が LRRK2/dLRRK と同様に dFoxO による眼の変性を増悪させた。ここで LRRK2/dLRRK を加えると複眼の変性は相加的に増強されていた (図 1)。

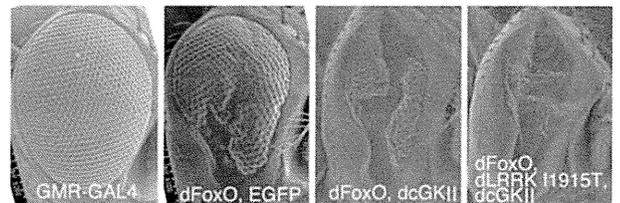


図 1 FoxO、dLRRK と DG2 の遺伝的相互作用 ショウジョウバエ複眼に表記の遺伝子を発現させたときの電子顕微鏡画像。

I1915T : PD 型変異体

②cGKII は *in vitro* で FoxO を直接リン酸化する

cGKII による cGMP 依存的な FoxO のリン酸化が観察された (図 2)。様々な部位の非リン酸化変異体を作製し分析した結果、cGKII が FoxO の 319 番目のセリンをリン酸していることを明らかになった。LRRK2/dLRRK のリン酸化部位も同じ 319 番目である。

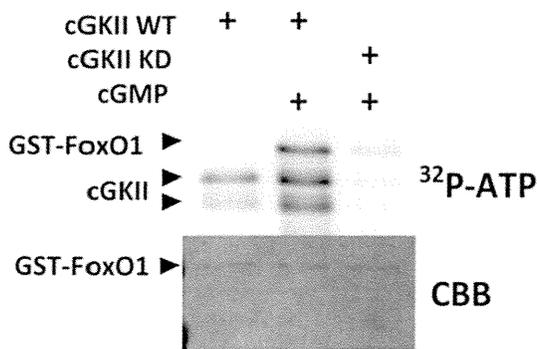


図2 cGKIIはFoxOを直接リン酸化する基質として組み換えGST-FoxO1を用いたcGKIIの*in vitro*キナーゼアッセイの結果。KD: キナーゼ不活性型

③cGKIIはLRRK2をリン酸化するがFoxOのキナーゼ活性には影響を与えない
cGKIIがFoxOの転写活性を亢進し(図3)、LRRK2を加えると転写活性はさらに亢進した。

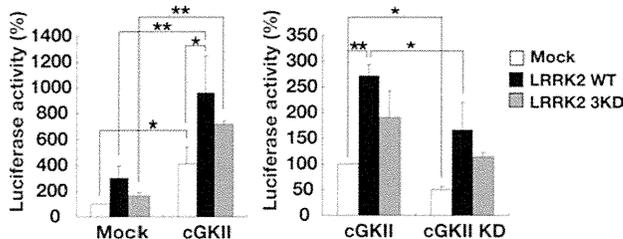


図3 cGKIIはFoxOの転写活性を亢進するレポーターアッセイの結果。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

cGKIIのキナーゼ活性がLRRK2の活性に影響を及ぼすかどうかを調べるために、LRRK2の基質である4E-BPのリン酸化レベルを目安にキナーゼアッセイを行った。その結果LRRK2にcGKIIを加えても4E-BPのリン酸化レベルに変化が無いことから(図4のlanes 5, 6)cGKIIとLRRK2は独立にFoxOを活性化していることが明らかとなった。

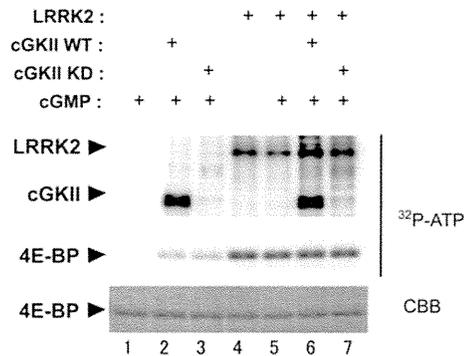


図4 cGKIIはLRRK2のキナーゼ活性に影響を与えない
*in vitro*キナーゼアッセイの結果。LRRK2の基質である4E-BPのリン酸化レベルはLRRK2存在下でcGKIIを加えても変化は無い。

④NOシグナルがDG2-FoxOを介して眼の変性に関与する
ほ乳類においてcGKIIの上流にはNOシグナル伝達経路の存在が知られている。ハエ複眼にdFoxOとNOSを過剰発現させるとGFPを発現させた対照と比較し眼の変性が増強されていた。NOSの下流であるGuanylate cyclaseをノックダウンさせるとdFoxOによる眼の変性が改善されることからNOシグナル経路がDG2-FoxOによる眼の変性に関与していることが示唆された(図5)。

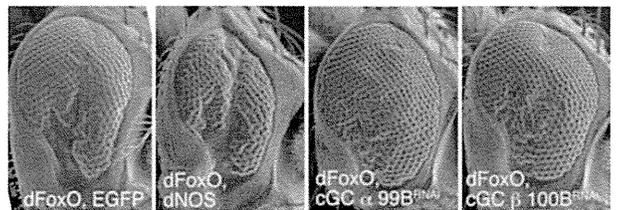


図5 NOシグナルはcGKIIによる眼の変性に関与する

ショウジョウバエ複眼に表記遺伝子を発現させたときの電子顕微鏡画像。

cGC: cytosolic guanylate cyclase

cGC α 99B^{RNAi}: cGC α サブユニットノックダウン

cGC β 100B^{RNAi}: cGC β サブユニットノックダウン

⑤DG2によるFoxOリン酸化がドーパミン神経変性を引き起こす

dFoxO と DG2 を共発現させたハエにおいて有意にドーパミン神経の減少が観察された。一方セロトニン神経数の変化は見られなかった。ドーパミン神経の減少は L-DOPA の経口投与で抑制された。dFoxO と DG2 を共発現させたハエに NOS の活性阻害剤である

N(G)-Nitro-L-Arginine-Methyl-Ester

(L-NAME)を経口投与すると無処理群と比較してドーパミン神経減少が抑制された。一方 NOS の活性阻害効果のない D-NAME 投与群ではドーパミン神経数抑制効果はみられなかった (図6)。

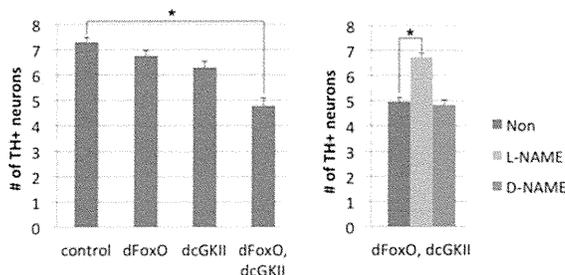


図6 NO シグナルはドーパミン神経変性に関与する

成虫ショウジョウバエ神経特異的に遺伝子を発現させたときの PPM1/2 神経核の抗 TH 抗体陽性細胞数。羽化後 24 日目に評価した。

L-NAME : NO 合成酵素阻害剤

D-NAME : NO 合成を阻害しない L-NAME の立体異性体

* $p < 0.05$

E. 結論

NO シグナルが cGKII を介して FoxO をリン酸化・活性化させドーパミン神経変性を引き起こす新たなシグナル伝達経路を見出した。一方、ショウジョウバエにおいてドーパミン神経変性を NO シグナル伝達阻害剤投与により抑制できることから、PD の新しい予防・治療法の可能性が提示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomoko Kanao; Tomoyo Sawada; Shireen-Anne Davies; Hiroshi Ichinose; Kazuko Hasegawa; Ryosuke Takahashi; Nobutaka Hattori; Yuzuru Imai. The Nitric Oxide-Cyclic GMP Pathway Regulates FoxO And Alters Dopaminergic Neuron Survival in Drosophila. *PLoS One*. 2012;7(2):e30958.

2. 学会発表

金尾智子、澤田知世、Shireen A Davies、高橋良輔、服部信孝、今居譲. ショウジョウバエにおいて NO シグナルが FoxO の転写活性を調節しドーパミン神経の生存性に影響を与える. 第 34 回日本分子生物学会年会 平成 23 年 12 月 16 日. 横浜

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

Park8 患者脳脊髄液におけるビオプテリン代謝-その 2

研究分担者 長谷川一子¹⁾

研究協力者 一瀬 宏²⁾, 横山照夫¹⁾, 堀内恵美子¹⁾, Jan O. Aasly³⁾

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

3) Department of Neurology, St. Olav's University Hospital, Trondheim, Norway

研究要旨

脳脊髄液(CSF)中に存在するビオプテリンは、黒質線条体系ドーパミンニューロンの指標として用いることができると考えられる。昨年度の研究において、相模原家系 Park8 患者 (*LRRK2* 遺伝子の I2020T 変異) では CSF 中のビオプテリン量が特発性パーキンソン病 (特発性 PD) 患者より高く、ドーパミンニューロンの変性が軽度であると考えられることを報告した。そこで、さらに他の Park8 患者や、神経変性疾患を有しない患者、PD 以外の神経変性疾患患者等において CSF 中ビオプテリン量を測定した。その結果、*LRRK2* の G2019S 変異、および、N1437H 変異を有する Park8 患者の CSF 中ビオプテリン量は正常対照者より有意に低く、sPD 患者と同程度であった。また、CSF 中テトラヒドロビオプテリン量は、加齢とともに顕著に低下していくことが明らかとなった。これらの結果は、CSF 中ビオプテリン量がドーパミンニューロン変性を示す良い生化学的マーカーとなることを示唆した。

A. 研究目的

テトラヒドロビオプテリン (BH4) は、チロシン水酸化酵素やトリプトファン水酸化酵素の補酵素としてドーパミン・ノルアドレナリン・セロトニンなどのモノアミン系神経伝達物質の生合成に必須な化合物である。脳内で必要とされるビオプテリンはグアノシン三リン酸 (GTP) から脳内で生合成されている。

我々は昨年度の報告において、遺伝性パーキンソン病 (遺伝性 PD) の一つである Park8 患者 (相模原家系) では、同程度の症状を有する特発性 PD 患者より CSF 中ビオプテリン量が有意に高いことを報告した [Koshiba et al. (2011) J Neural Transm]。CSF 中ビオプテリン量が黒質線条体系ドーパミンニューロン変性の程度を反映していると考え、我々の結果は、相模原家系の Park8 患者では同程度の症状を示す特発性 PD 患者より黒質線条体系ドー

パミンニューロンの変性がマイルドであることを示唆した。この結果は、相模原家系 Park8 患者剖検脳での病理学的所見とも一致し、CSF 中ビオプテリン測定が黒質線条体系ドーパミンニューロンの変性程度を知るための良い生化学的マーカーとなることを示唆した。

本年度の研究においては、*LRRK2* 遺伝子の I2020T 変異を有する相模原家系以外の Park8 患者における CSF 中ビオプテリン量の検討、さらに、変性疾患以外の患者でのビオプテリン量について検討したので、その結果について報告する。

B. 研究方法

患者 CSF 中の総ネオプテリン・ビオプテリン量は、CSF 溶液をヨウ素酸化したのち、高速液体クロマトグラフィ-蛍光検出法により定量した。還元型ビオプテリン (BH4, ジヒドロビオプテリン) の分別定量

には、ポストカラム酸化法を用いて還元型ビオプテリンを高速液体クロマトグラフィで分離後に亜硝酸ナトリウムで酸化して蛍光強度を測定してそれぞれのピークを定量した。

Dr. Aasly から供与された CSF 検体の内訳は、20 例の非変性疾患対照者、14 例の LRRK2 遺伝子変異を有するが未発症者、6 例の LRRK2 遺伝子変異を有する発症者、さらに、20 例の特発性 PD 患者であった。これらの Park8 患者および未発症者は LRRK2 遺伝子の N1437H 変異、あるいは、G2019S 変異を有しており、相模原家系の変異 I2020T とは異なる変異であった。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト試料を用いる研究として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。

C. 研究結果

まず、総ビオプテリン値についての測定結果を図 1 に示す。図のように対照群の総ビオプテリン量は 19.3 ± 1.1 pmol/ml (平均値 \pm S.E.M.)、変異を有する未発症者では 16.9 ± 1.3 pmol/ml、Park8 患者では 14.0 ± 0.9 pmol/ml、特発性 PD 患者で

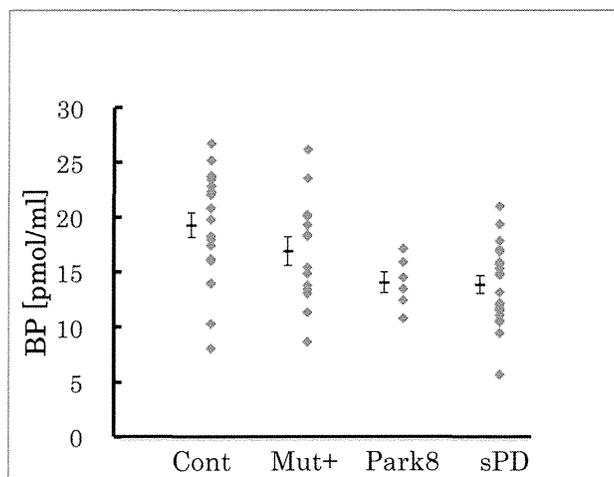


図 1. Park8 患者および特発性 PD 患者 CSF 中の総ビオプテリン量 Cont: 非変性疾患患者、Mut+: LRRK2 変異を有している未発症者、Park8: LRRK2 変異を有している PD 発症者、sPD: 特発性 PD 患者

は 13.8 ± 0.8 pmol/ml であった。対照群と Park8

患者、および、対照群と特発性 PD 患者群との間には統計的に有意な差が認められた。また、Park8 患者と特発性 PD 患者間には有意な差が認められなかった。

次に、ビオプテリンの活性型である BH4 の値について検討してみたところ、Park8 発症者や特発性 PD 患者では総ビオプテリン量と同様に対照群と比べて有意な低値を示し、Park8 群と特発性 PD 群との間に差は見られなかった。一方、変異を有する未発症者では、対照群より CSF 中 BH4 量が有意に低下しており、PD 患者群と対照群の中間の値を示した。これは、未発症者群でも症状として現れていないもののドーパミンニューロンの変性が起こり始めていることを示す結果を示していると考えられる。

また、対照群試料について CSF 中 BH4 量を年齢に対してプロットしたところ、図 2 のように BH4 量が加齢とともに低下していく明瞭な負の相関が認められた。さらに、ほとんどの PD 患者 BH4 量は、各年齢の対照群より低値を示した。

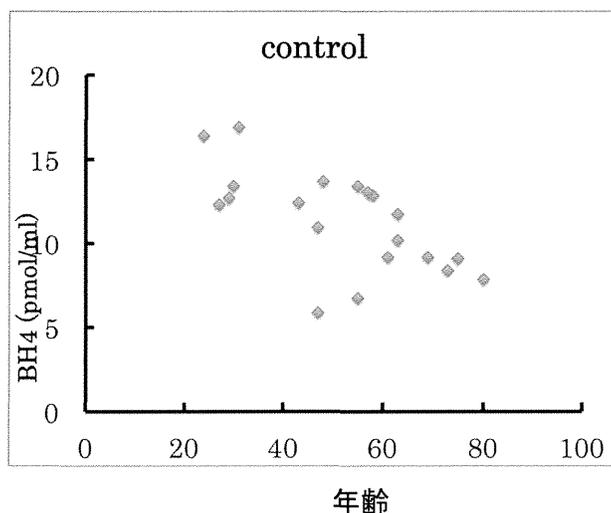


図 2. 対照群試料における年齢と CSF 中 BH4 量の相関

D. 考察

以前の我々の解析結果では、LRRK2 遺伝子の I2020T 変異を有する相模原家系患者の CSF 中ビオプテリン量は、特発性 PD 患者より有意に高い値を示した。しかし、今回測定した N1437H 変異や

G2019S 変異を有する Park8 患者においては、特発性 PD 患者と同様の低値を示した。相模原家系患者の剖検脳の病理学的所見からも、神経変性がマイルドである知見が得られており、I2020T 変異は Park8 の中でもドーパミンニューロンの変性程度はマイルドではないかと考えられた。臨床的にも

N1437H 変異の患者は比較的シビアな症状を示すことが知られており、臨床症状とドーパミンニューロンの変性の程度、および、CSF 中バイオプテリン量に相関関係があると考えられる。

また、PD は加齢により大きく発症率が増加する疾患であり、黒質線条体系ドーパミンニューロンは加齢に伴い徐々に減少していくことが知られている。非変性疾患患者の CSF について還元型バイオプテリンである BH4 量と年齢の関係を調べてみたところ、明瞭な負の相関が認められた。この結果は、CSF 中バイオプテリン (BH4) 量が加齢に伴うドーパミンニューロンの変性過程を反映している結果と考えられる。しかし加齢に伴う還元型 BH4 量の低下が、加齢に伴う脳内ドーパミンの低下、あるいは、ドーパミンニューロンの変性過程に関与している可能性もあり、今後さらに詳細に検討していきたいと考えている。

E. 結論

相模原家系以外の Park8 患者 (LRRK2 の N1437H 変異、および、G2019S 変異) では、CSF 中バイオプテリン量は特発性 PD 患者と同様の値を示した。相模原家系以外の Park8 患者では、特発性 PD 患者と同様にドーパミンニューロンの変性が進行していることが示唆された。また、CSF 中還元型バイオプテリン (BH4) 量は、加齢とともに顕著に低下していき、加齢に伴うドーパミンニューロンの変性過程を反映していると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

BH4-deficient mouse models: Implication for brain development and dystonia-parkinsonism. 7th Annual GEO-PD (Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease) Meeting, Seoul Oct 8-10, 2012

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

パーキンソン病における血中 Neuregulin-1 SMDF の検討

研究分担者 佐々木秀直¹⁾

研究協力者 浜 結香¹⁾、矢部一郎¹⁾、加納崇裕¹⁾、廣谷 真¹⁾、若林孝一²⁾、
大庭幸治³⁾、岩倉百合子⁴⁾、内海 潤⁵⁾

1) 北海道大学神経内科, 2) 弘前大学脳神経病理, 3) 北海道大学病院高度先進医療センター,
4) 新潟大学脳研究所分子神経生物学, 5) 公益財団法人がん研究会がん研究所

研究要旨

Neuregulin-1 (NRG1) は近年注目されている神経栄養因子であり、I-VIの isoform が知られている。その中でニューロンに特異的に発現している NRG1 type III SMDF の濃度について各疾患の血漿と CSF で定量し比較した。SMDF は CSF のみならず末梢血にも発現していること、血漿中の濃度については対照群 (n=30) では性別で有意差無く、年齢とも関連しなかった。対照群、筋萎縮性側索硬化症 (n=38)、多系統萎縮症 (n=51)、パーキンソン病群 (n=45) との群間比較では、パーキンソン病群のみで有意に低値 (p<0.05) を示した。しかし、血漿中 SMDF 濃度は重症度との相関を認めなかった。NRG1 SMDF はドパミン産生細胞の生存と機能維持に重要な栄養因子であり、今回の研究で CSF より末梢血に高濃度に存在していた。パーキンソン病患者の末梢血で特異的に低下しているから、病態に寄与している可能性が示唆される。

A. 研究目的

パーキンソニズムをきたす疾患の鑑別診断に役立つ、あるいは重症度と相関する分子指標を開発することである。

B. 研究方法

1) 一卵性双生児で片方のみ MSA を発病した 1 組、非血縁の MSA 患者 2 名、及び正常対照群 3 名について白血球の mRNA 発現解析を 44K マイクロアレイで行なった。
2) 正常対照群とパーキンソン病群 (各 3 例) の CSF を LC-MS/MS で分析し、検出された蛋白質をパスウェイ解析した。結果より標的となりうる因子である Neuregulin-1 (NRG1)、その中でも神経細胞にのみ発現しているアイソフォームの type III (SMDF) に着目し、血中での蛋白発現を WB 法、血中濃度を ELISA 法により測定した。WB 及び ELISA は市販抗体により行なった。SMDF の特異性は市販

抗原ヒト EGF, betacellulin, HB-EGF, TGF α 、NRG α -1/HRG1- α EGF ドメイン、NRG1- β /HRG1- β 細胞外ドメインの各ペプチドとの交差性も検討し最大<0.5%の交差率で特異性を確認した。

3) ELISA 法で末梢血 SMDF 定量を行なった対象は、正常対照群 30 例、パーキンソン病 45 例、対照疾患として ALS38 例、MSA51 例である。各疾患群及び正常対照群とパーキンソン病群との群間比較及びパーキンソン病重症度との相関解析を行った。さらに、ホルマリン固定剖検脳組織を用いて NRG1 SMDF の蛋白発現を免疫染色法で確認した。

(倫理面への配慮)

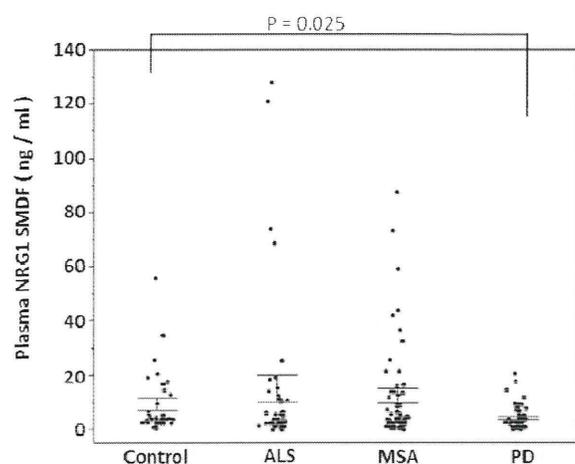
研究は医の倫理委員会で承認を得た。また試料提供者には予め口頭と文書で説明して同意を得た。

C. 研究結果

白血球のトランスクリプトーム解析では NRG1 を認識する probe のみ、MSA で発現量が亢進して

いた。この probe で認識される NRG-1 から神経系に発現しているものとして最初に type I を末梢血で定量測定し比較したが、各疾患で差を認めなかった。そこで、ニューロンに特異的に発現している NRG1SMDF を定量測定する事にした。最初に WB により、NRG1 SMDF が血中に存在することを確認した上で、対照群の血中濃度を測定した。その結果、年齢($r=0.098$, $p=0.605$)、性別($p=0.866$)には相関・有意差を認めなかった。次いで、パーキンソン病群と各疾患及び正常対照群との比較検討 (t 検定) を行なったところでは、パーキンソン病群でその他の群より有意に低い値を呈した ($p<0.05$ 、図)。MSA 群では MSA-P 群において、有意差はないものの低い値を示した。Yahr stage や UPDRS によるパーキンソン病の進行度とは相関がなかった。脳組織免疫染色では、レビー小体が陽性を示した。

図 疾患別 NRG1 type (SMDF) 測定値



PDのみ対照群、他の疾患と比較して有意に低値を示した。

D. 考察

NRG1 family は神経栄養因子の一つであり、N 末端の構造により 6 種類の isoform が知られている。全て EGF-like domain 及び膜貫通ドメインを有している。白血球による mRNA 発現解析、及び CSF のプロテオミクス解析結果を元にバイオインフォマティクス解析したところ、病態に関与する

因子として NRG1 が検出された。その中でニューロンに特異的に発現している NRG-1SMDF は血中に CSF より高濃度で存在している。SMDF は中脳黒質ドパミン産生細胞の分化と機能維持に関与しているとされることから、パーキンソン病の発現に何らかの関与が推定される。少なくともパーキンソン病患者で特異的に認められた血漿中の低値は、個々の例の前向き経過観察によりパーキンソン病の発病と関係があるのか、今後検討する価値がある。

E. 結論

NRG1 SMDF はパーキンソン病で有意差をもって低値を示すが、その濃度はパーキンソン病の進行度とは相関がなくバイオマーカーとしての有用性は低い。しかし、NRG1 SMDF は成人脳でも発現が見られ、神経細胞の保護や脳ドパミン産生神経細胞に作用してドパミンの産生を促す神経栄養因子としての作用があることから、NRG1 SMDF はパーキンソン病の発症に何らかの役割を果たしていると推定される。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿中

2. 学会発表

該当無し

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

該当無し

レビー小体型認知症の血清バイオマーカーの検討

研究分担者 中島健二¹⁾

研究協力者 中下聡子¹⁾，和田健二¹⁾

1) 鳥取大学医学部 脳神経医科学講座脳神経内科学分野

研究要旨

レビー小体型認知症 (DLB) はアルツハイマー型認知症 (AD) とは異なる臨床経過をたどり、その鑑別は重要である。我々は、より臨床応用しやすい血液を利用した DLB 診断バイオマーカーを探索し、その有用性を検討した。血中蛋白の網羅的検討から、DLB 群で有意に高値である 3 つの候補蛋白を thymosin β 4 (THB4), Retinol binding protein 4 (RBP4), Human Platelet factor4 (HPF4) を同定した。パーキンソン病 (PD) 群, AD 群, DLB 群, 対照 (CTL) 群の保存血清を用いて、同定した各蛋白の血清濃度測定し、診断の有用性を検討した。THB4, RBP4 血清濃度値より、DLB 群と非 DLB 群を判別する感度は 64%, 特異度は 87% (AUC=0.823) であった。THB4 と RBP4 の血清濃度の測定は DLB の診断のバイオマーカーとなる可能性が示された。今後複数のバイオマーカーを併用し診断精度が高めるとともに、バイオマーカーの臨床的意義の確立、病期診断や重症度診断を加味した縦断的な検討を行い臨床応用の可能性を検討していく。

A. 研究目的

レビー小体型認知症 (DLB) は神経変性性認知症の中ではアルツハイマー型認知症 (AD) に次いで頻度の高い疾患であり、認知症を伴うパーキンソン病 (PDD) とは 1 つの疾患スペクトラム上の表現型のバリエーションと理解されている。DLB は AD に比べて症状の進行が早いとされ、死亡までの期間も短い症例が存在するため、早期に両疾患を鑑別する意義は大きい。

従来の診断マーカーは AD に関するものが多く、また使用されるマーカーも頭部 MRI, 脳血流シンチグラフィ, PET などの画像検査, 脳脊髄液 (CSF) を用いたバイオマーカーが主体となっている。DLB に関しても MIBG 心筋シンチグラフィや DAT-SPECT などが診断基準に記載されているが、施設限定という問題点もある。

本研究では DLB 診断について、日常診療や疫学研究に応用しやすい血液を利用したバイオマーカーを探索し、その有用性を検討した。

B. 研究方法

1) 候補蛋白の探索

SELDI-TOF-MS 解析法で DLB 群 8 例, コントロール (CTL) 群 8 例において血中蛋白の網羅的検討を行い、マーカー候補ピークを抽出した。

2) 候補蛋白の絞り込み

DLB 群 8 例, CTL 群 8 例, AD 群 8 例においてマーカー候補ピークの中から DLB 群を特異的に分別する 4 つのピークを見出した (図 1)。

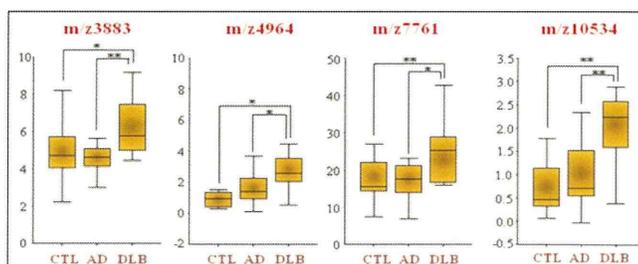


図 1. SELDI-TOF-MS 解析による DLB 候補ピーク

3) 候補ピークの同定

精製のため -80°C で冷凍保存している血清サンプルを用いて目的ピークのみを検出する最適化条件や溶出条件を決定した。候補蛋白を精製用スピカラムに結合させ、単一ピークを確認したのち、溶出条件で目的の候補蛋白溶出を行い精製した。精製蛋白はプチドマスフィンガープリンティングおよび

MS/MS 解析を行った。その結果、3つの候補蛋白として thymosin β 4 (THB4), Retinol binding protein 4 (RBP4), Human Platelet factor4(HPF4) を同定した。

4) 候補蛋白の血中濃度測定

パーキンソン病 (PD) 群 78 名, AD 群 52 名, DLB 群 22 名, CTL 群 46 名の保存血清を用いて, 汎用性に高い ELISA キットにて同定した各蛋白の血清濃度測定し, 診断の有用性を ROC 解析で検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床研究に関する倫理指針を遵守し, 研究を実施した。検体採取にあたっては, 鳥取大学医学部倫理委員会の承認を得て, 研究者に対しては研究内容や倫理的配慮を詳細に説明した後に書面による同意を得て研究を実施している。

C. 研究結果

1) ELISA 法による血中濃度の結果

THB4 血清濃度は, DLB 群において他の疾患群と比較して有意に上昇していた。RBP4 血清濃度は AD 群に比較して DLB 群で有意に上昇していた (図 2)。

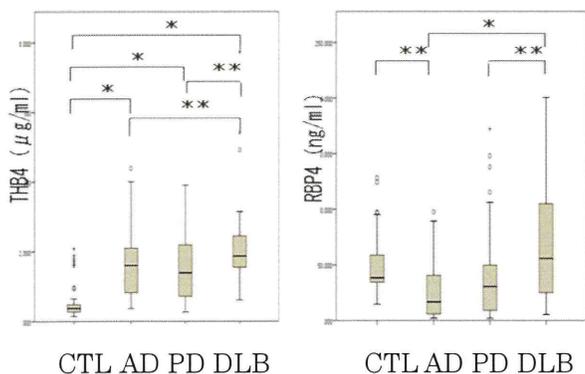


図 2. 各疾患群における血清 THB4 と RBP4 の血中濃度

2) 診断精度の検討

血清 THB4 および RBP4 測定による DLB 群, non-DLB 群の診断精度を行った。THB, RBP4 のそれぞれの血中濃度での ROC 解析ならびに THB4 と RBP4 の血中濃度を合わせた二項ロジス

ティック解析による予測値を基に ROC 解析を行い, 非 DLB 群と DLB 群を診断する精度を検討した。単一マーカーの場合, THB4 では感度 91%で, 特異度 55%で, 曲線下面積(AUC)は 0.748, であり, RBP4 では感度 50%で, 特異 86%で, AUC は 0.682 であった。両方のマーカーを組み合わせた際の感度は 64%, 特異度は 87%, AUC は 0.823 であり, 単一マーカーに比べ診断精度は高い (図 3)。

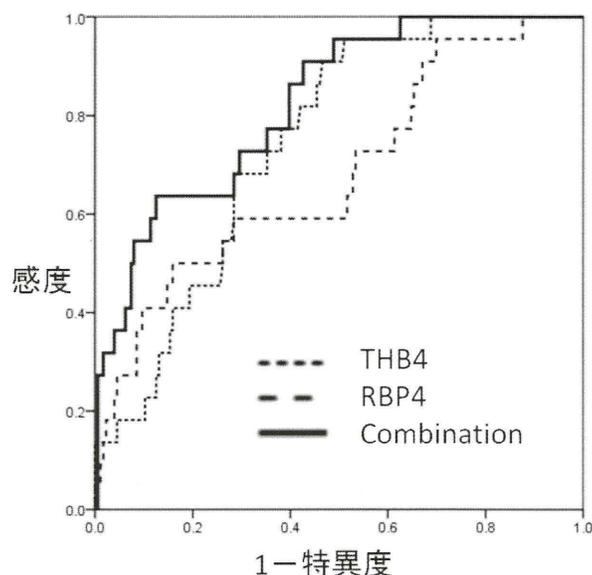


図 3. 血清 THB4, RBP4 測定による DLB 群, 非 DLB 群の診断精度

D. 考察

本研究の利点として, 神経変性疾患のバイオマーカーとして汎用されている脳脊髄液ではなく, 採取が容易である血液サンプルを使用することで, 設備を整った施設でなくても容易に測定が可能である。更に ELISA キットを使用して測定が可能であり, 臨床への汎用が可能となる。よって, 臨床応用の際には一般かかりつけ医などでスクリーニングとして行う検査としての活用が期待できる。

THB4 は神経疾患においては Creutzfeldt-Jakob disease の脳脊髄液中の上昇や, 血液中では冠動脈疾患や肝疾患での上昇の意義が報告されている。本研究では血清 THB4 は DLB 群において AD, PD, CTL 群より高値であった。一方で血中 RBP4 はメタ

ポリックのバイオマーカーとして糖尿病に関連して上昇することが知られており、他にも膠原病、悪性腫瘍、肝疾患での上昇、低下について報告されている。本研究では血清 RBP4 は DLB 群では上昇、AD 群では低下を示していた。これらのマーカーの DLB のおける臨床的な意義や病期や重症度との関連を調べることで診断マーカーとしての有用性を高めることができる。

一方で、血液バイオマーカーを使用するに当たっては、それぞれの血中濃度は急性・炎症性疾患、治療などの全身状態の影響を受けやすい欠点がある。それを補うためには、単一のバイオマーカーではなく、複数のバイオマーカーを組み合わせることで、他要因による偽陽性・偽陰性は排除することが可能となると考えられる。本研究においても、単一マーカーの検討より 2 つのマーカーの組み合わせた診断精度は高い事が示されている。

E. 結論

SELDI-TOF MAS 解析により、DLB の血清中で高値である候補蛋白を同定した。その中で、血清 THB4 と RBP4 の結果から、DLB の診断バイオマーカーとなる可能性が示された。複数のバイオマーカーの組み合わせは疑陽性・偽陰性の排除ができるため、バイオマーカーを増やし検討を進める。更にこれらのバイオマーカーの臨床的意義を確立するための縦断的な検討を加えていく。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Wada-Isoe K, Ito S, Adachi T, Yamawaki M, Nakashita S, Kusumi M, Hiroe Y, Takada T, Watanabe K, Hikasa C, Nakashima K. Epidemiological survey of frontotemporal lobar degeneration in Tottori prefecture, Japan. Dement Geriatr Cogn Disord Extra 2012;2:381-386

2) Wada-Isoe K, Uemura Y, Nakashita S, Yamawaki M, Tanaka K, Yamamoto M, Shimokata H, Nakashima K. Prevalence of dementia and mild cognitive impairment in the rural island town of Ama-cho, Japan. Dement Geriatr Cogn Dis Extra. 2012 ;2:190-9.

2. 学会発表

1) 中下聡子, 和田健二, 中島健二. レビー小体型認知症の血清バイオマーカーの検討. 第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 24 日 東京

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。