

Genetic Studies

DNA was extracted from blood. Genes implicated in neurodegeneration were interrogated by sequencing and dosage assays in the affected proband (172 genes; details available on request). *DCTN1* Sanger sequencing validated results in the family and additional Japanese subjects (200 probands with familial parkinsonism and 468 healthy individuals). *DCTN1* has also been sequenced in an ethnically diverse set of 1,100 patients with age-associated neurodegeneration. Public genetic databases, including 1000 Genomes Project and NHLBI Exome Sequencing Project, were examined.

Microtubule Binding and Cellular Distribution of Wild-Type and Mutant p150^{Glued}

HEK293T cells transfected with complementary DNA (cDNA) encoding wild-type (WT) or mutant (p.Phe52Leu, p.Gly59Ser, or p.Gly71Arg) p150^{Glued} were assessed by immunocytochemistry² (see legend to Fig. 1). Equal amounts of cell lysate were incubated in the presence or absence of previously assembled microtubules and binding was quantified, as previously described.²

Results

Clinical and Genealogical Studies

The OMT-1 kindred originated in Western Japan and includes 23 family members spanning three generations (Fig. 1A). Among them, 3 subjects met criteria for PD by exam; another 8 individuals had symptoms of parkinsonism according to their medical history (Table 1).

III-11

The proband (arrowed) was a 67-year-old right-handed woman who was in good health until age 48. She developed slowness of movement with stooped posture. After a diagnosis of PD, treatment with levodopa/carbidopa was initiated with marked improvement. At age 52, despite dopaminergic medication, her parkinsonian features became more pronounced and her gait slowed with bilaterally reduced arm swing. At age 58, parkinsonian features included a mask-like face, hypophonic voice, rigidity and bradykinesia. Her gait was unstable with postural instability consistent with H & Y stage IV. Her cognition was normal, but mood changes, such as irritability and disinhibition, were noted. At age 59 she developed respiratory failure and required breathing assistance. Chest radiography, chest computed tomography (CT) findings and pulmonary function were normal, suggestive of central hypoventilation. Her spontaneous speech and movements gradually decreased, and she mostly closed her eyes from apraxia. At age 68, brain MRI revealed

marked frontotemporal atrophy (Fig. 1B). At this stage, MIBG cardiac scintigraphy showed decreased uptake (heart/mediastinum [H/M] ratio: 1.34 early phase and 1.08 late phase [normal, >1.9]), and the patient was akinetic-mute and respirator bound.

III-10

The proband's elder sister developed unsteady gait at age 70, stooped posture and slow movements. She was diagnosed with PD and initially responded to L-dopa/carbidopa treatment. Only physiologic tremor (senile-type) was noted but she lost 10 kg of weight per year. At age 72, neurological exams revealed symmetrical parkinsonism, including bradykinesia, rigidity with a mildly stooped posture, and reduced arm swing. Not depressed, her cognition was normal and her Mini-Mental State Examination scored 30. At 73 years she suddenly developed episodes of tachypnea. Her arterial blood showed hypercapnia with hypoxia and she required temporary ventilator assistance. However, chest radiography, CT findings, and pulmonary function were normal. Brain MRI showed mild frontotemporal atrophy. MIBG cardiac scintigraphy revealed a low uptake (H/M ratio: 2.20 early phase and 2.20 late phase) but within the normal limits.

IV-2

The nephew of the proband developed depression at age 53. On neurological examination, he had bradykinesia and mildly stooped posture. With L-dopa, his parkinsonism and depression improved and he continues the same treatment.

II-4

The proband's mother developed apathy and bradykinesia at age 60. She had difficulty with walking and, by age 62, was bedridden. She died of an infectious disease.

III-8

The proband's elder sister developed parkinsonism, including tremor, bradykinesia, and a short step gait, at age 58. She lost weight and suffered apathy and depression. She died of respiratory failure at age 68.

Genetic Analysis

Patients (III-10, III-11, and IV-2) harbor an exon 2 *dynactin* (*DCTN1*) c.156T>G mutation resulting in a conserved amino acid substitution, p. Phe52Leu (Fig. 1C). Unaffected family members had no mutation nor was it identified in Japanese or more ethnically diverse individuals, with or without neurodegeneration. Nor was it identified within public databases.

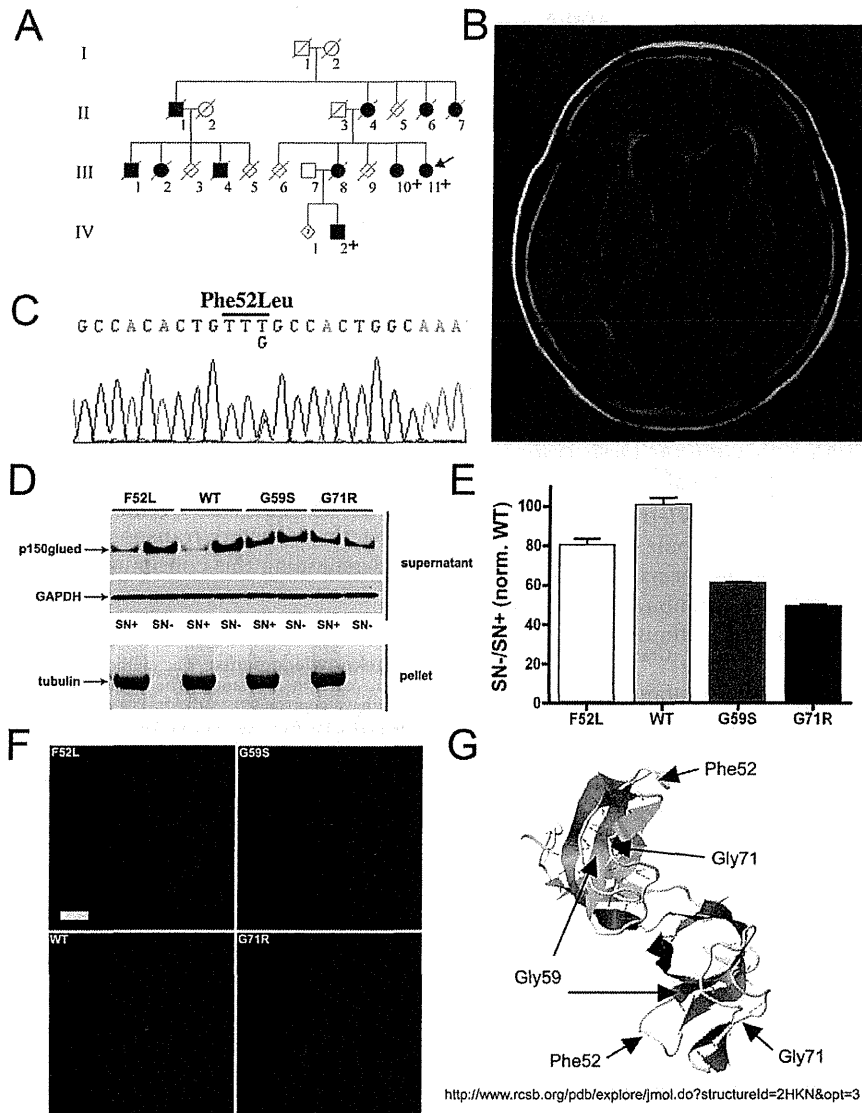


FIG. 1. (A) Pedigree with p.Phe52Leu mutation. Squares indicate male, and circles indicate female. Solid symbols indicate affected members, + illustrates available DNA, and the arrow indicates the proband. A slash indicates deceased family members. (B) T1-weighted MRI of the proband revealed frontotemporal atrophy with dilated lateral ventricle and sylvian fissure. (C) Heterozygous c.156T>G point mutation in exon 2 of the *dynactin* gene (*DCTN1*) that results in a p.Phe52Leu amino acid substitution. (D) Microtubule binding properties of WT and mutant p150^{Glued}. Equal amounts of lysates from HEK293T cells transfected with cDNA encoding either WT or mutant (p.Phe52Leu, p.Gly59Ser, or p.Gly71Arg) p150^{Glued} were incubated in the presence or absence of previously assembled microtubules at room temperature. To separate microtubule-bound and unbound p150^{Glued}, the suspension was placed on a glycerol cushion and centrifuged at 100,000×g at room temperature for 40 minutes. The resulting supernatants and pellets were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and subsequently analyzed using Coomassie staining (pellets ± microtubule) and western blotting (supernatants) probed with p150^{Glued} or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibodies (goat anti-p150^{Glued} 1:1,000; Abcam, Cambridge, MA; mouse anti-GAPDH 1:50,000; Biodesign International, Saco, ME). (E) The ratio of p150^{Glued} in the supernatant of the sample incubated with microtubules (SN⁺), compared with the supernatant incubated without microtubules (SN⁻), was arbitrarily set as 100 for WT p150^{Glued} protein. An average and standard deviation is given for each respective mutant. The blots shown from one experiment are representative of three replicates. Whereas the supernatant incubated with microtubules (SN⁺) is almost depleted for p150^{Glued} WT protein, considerable amounts, indicative of reduced microtubule binding, are found for p.Gly59Ser and the p.Gly71Arg Perry mutations. Compared to the other variants, the novel p.Phe52Leu change causes a moderate decrease in microtubule-binding affinity. (F) Cellular distribution of WT and mutant p150^{Glued}. HEK293T cells were transiently transfected with plasmids encoding WT or mutant (p.Phe52Leu, p.Gly59Ser, and p.Gly71Arg) p150^{Glued} protein. One day after transfection, cells were fixed in 4% formaldehyde, blocked in 3% bovine serum albumin (BSA), and subsequently stained for p150^{Glued} (red). A polyclonal goat antibody directed against C' terminal p150^{Glued} was used (1266-1278 amino acids [aa]; Abcam, 1:200 in 1% BSA in phosphate-buffered saline) because p150^{Glued} mutations may affect N' terminal epitopes and antibody affinity. Confocal pictures were taken using the 63× oil immersion objective of a Zeiss Axiovert 200M microscope equipped with LSM510META technology (Carl Zeiss AG, Jena, Germany). Scale bar indicates 10 μm. (G) Three-dimensional structure of the dimer of p150^{Glued} protein (Protein Data Bank accession: 2hkn¹⁶) highlighting the centrally located p.Gly59 mutated in familial motor neuron disease. In contrast, the p150^{Glued} p.Gly71 and p.74 residues mutated in Perry syndrome were found on the surface and disrupt the CAP-Gly motif. The p150^{Glued} p.Phe52 residue was predicted on the surface.

TABLE 1. Clinical characteristics

| No. | Sex | Age at Onset | Disease Duration (Years) | Age at Death | Initial Symptom | Clinical Features | | | | | |
|---------------------|-----|--------------|--------------------------|--------------|-----------------|-------------------|------------|----|-----------------|----|--------------------|
| | | | | | | P | Apathy/Dep | WL | Resp. to L-dopa | HV | Others |
| II-1 | M | NA | NA | 70 | NA | + | NA | NA | NA | NA | Dementia |
| II-4 | F | 60 | 2 | 62 | Apathy | + | + | NA | NA | + | |
| III-2 | F | 50 | 10 | 60 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | |
| III-8 | F | 58 | 10 | 68 | P | + | + | + | NA | + | |
| III-10 ^a | F | 70 | 4 | Alive | P | + | — | + | + | + | Ventilator bounded |
| III-11 ^a | F | 48 | 21 | Alive | P | + | — | ? | + | + | Ventilator bounded |
| IV-2 ^a | M | 53 | 6 | Alive | Dep | + | + | + | + | — | |

^aPatients examined by neurologist.

P, parkinsonism; Dep, depression; WL, weight loss; Resp, response; HV, hypoventilation; M, male; F, female; NA, not available.

Microtubule Binding and Cellular Distribution of WT and Mutant p150^{Glued}

Supernatant from WT *DCTN1*-transfected cells incubated with assembled microtubule are depleted of p150^{Glued} protein, indicative of normal binding affinity. p150^{Glued} p.Phe52Leu exhibited moderately decreased microtubule binding affinity (Fig. 1D,E). Compared to transfected WT p150^{Glued}, which decorates filamentous microtubules, mutant *DCTN1* protein has a more diffuse cytoplasmic distribution (Fig. 1F). In *DCTN1* p.Gly59Ser-transfected cells, intracytoplasmic inclusions are more evident than with other mutations (p.Phe52Leu and p.Gly71Arg).

Discussion

We report a novel missense mutation, *DCTN1* c.156T>G, encoding a p.Phe52Leu substitution in dynactin p150^{Glued} in autosomal dominantly inherited parkinsonism (mean onset: 58 years; range, 48–70). Early clinical symptoms are consistent with a diagnosis of PD, with a good response to L-dopa treatment, but atypical features develop including weight loss and central hypoventilation. Though these features are observed in Perry syndrome, affected individuals with p150^{Glued} p.Phe52Leu show marked variability of disease onset with far longer disease duration. Apathy and /depression are not obvious until late in the course and only in some patients. In contrast to Perry syndrome, where the cortex is spared,⁵ and hereditary motor neuronopathy, where the phenotype is largely restricted to motor neurons,⁸ frontotemporal atrophy was also apparent on MRI in patients with *DCTN1* p.Phe52Leu. Remarkably, these rather distinct neurodegenerative diagnoses, typically associated with TDP-

43 proteinopathy and disrupted RNA metabolism,⁹ result from *DCTN1* mutations within a 22-amino-acid stretch of p150^{Glued} (Fig. 1G).¹⁰ Hence, studies of dynactin-mediated transport may prove insightful in understanding this continuum. ■

Acknowledgments: The authors thank subjects who generously participated in this study. The authors also thank the many clinicians who have contributed to the follow-up of family. The authors acknowledge past laboratory support by Jennifer Kachergus and Sarah Lincoln.

References

1. Wider C, Wszolek ZK. Rapidly progressive familial parkinsonism with central hypoventilation, depression and weight loss (Perry syndrome)—a literature review. *Parkinsonism Relat Disord* 2008; 14:1–7.
2. Farrer MJ, Hulihan MM, Kachergus JM, et al. *DCTN1* mutations in Perry syndrome. *Nat Genet* 2009;41:163–165.
3. Wider C, Dachsel JC, Farrer MJ, Dickson DW, Tsuboi Y, Wszolek ZK. Elucidating the genetics and pathology of Perry syndrome. *J Neurol Sci* 2010;289:149–154.
4. Tsuboi Y, Dickson DW, Nabeshima K, et al. Neurodegeneration involving putative respiratory neurons in Perry syndrome. *Acta Neuropathol* 2008;115:263–268.
5. Wider C, Dickson DW, Stoessl AJ, et al. Pallidonigral TDP-43 pathology in Perry syndrome. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15: 281–286.
6. Ohshima S, Tsuboi Y, Yamamoto A, et al. Autonomic failures in Perry syndrome with *DCTN1* mutation. *Parkinsonism Relat Disord* 2010;16:612–614.
7. Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, et al. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 2003;33:455–456.
8. Puls I, Oh SJ, Sumner CJ, et al. Distal spinal and bulbar muscular atrophy caused by dynactin mutation. *Ann Neurol* 2005;57:687–694.
9. Honnappa S, Okhrimenko O, Jaussi R, et al. Key interaction modes of dynamic +TIP networks. *Mol Cell* 2006;23:663–671.
10. Geser F, Martinez-Lage M, Robinson J, et al. Clinical and pathological continuum of multisystem TDP-43 proteinopathies. *Arch Neurol* 2009;66:180–189.

モデルショウジョウバエを用いた遺伝性若年性パーキンソン病の研究

今居 讓

キーワード：パーキン, PINK1, ピージーエム5, マイトファジー, ミトコンドリア

Parkin, PINK1, PGAM5, mitophagy, mitochondria

はじめに

遺伝性パーキンソン病原因遺伝子の同定は、本疾患の分子生物学、分子遺伝学的な研究の機会を与えてくれた。ショウジョウバエは分子遺伝学的研究に適し、パーキンソン病を含めたヒト疾患モデルの作製が現在精力的に行われている。ショウジョウバエモデルが遺伝性パーキンソン病研究の突破口を開いた例として、若年性劣性遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子 *PINK1* と *Parkin* の間の遺伝的相互作用の発見が挙げられる。本稿では、その遺伝子産物である *Parkin* と *PINK1* がミトコンドリアの機能を維持するメカニズムに関して、我々の最新の知見を概説する。

パーキンソン病原因遺伝子 *parkin* と *PINK1*

PARK2 にリンクするパーキンソン病は、若年性パーキンソン病の主要な原因となっている。L-ドーパに対する反応性はよく睡眠効果も見られるが、早期にジスキネジアや wearing-off を起こしやすい。また、進行は遅く痴呆は伴わない。神経病理学的特徴としてレビー小体の形成はほとんど認められない。1998年に *PARK2* の責任遺伝子として *parkin* がクローニングされ⁵⁾、遺伝子産物 *Parkin* がユビキチンリガーゼ活性を持つことが明らかとなった⁴⁾⁷⁾¹¹⁾。その後、*parkin* ノックアウトマウスの作製が多くの研究室で試みられたが、ドーパミン神経変性が再現できないことから *PARK2* 発症機序の解析は遅れていた。

一方、臨床症状が *PARK2* と酷似している *PARK6* の原因遺伝子として *PINK1* が2004年に同定された⁸⁾。遺伝子産物 *PINK1* はミトコンドリア局在シグナルをもつキナーゼであると予想された。しかし、transcript の発現は確認できるにもかかわらず、タンパク質の発現が確認できないため、その機能は不明であった。

キイロショウジョウバエは、*parkin*, *PINK1* 遺伝子のオルソログをもつ。これらの遺伝子をノックアウトすると、筋肉や精子などエネルギー要求性の高い組織においてミトコンドリアの変性が起こる(図1)。2006年に我々を含む3グループが、ショウジョウバエにおいて *PINK1* と *parkin* との間に遺伝的相互作用があることを見出した¹⁾⁶⁾¹⁰⁾。すなわち、*PINK1* と *Parkin* は協調してミトコンドリアの機能維持に関与していることが示唆された。

PINK1 結合分子 *PGAM5* の同定

ミトコンドリアの機能維持をする *PINK1-Parkin* シグナルを理解するために、ヒト培養細胞から *PINK1* 結合分子を精製し、質量分析解析により同定した。次に、結合分子が *PINK1* シグナルに機能的に関与するかどうかを、モデルショウジョウバエを用いてスクリーニングした。*PINK1* ノックアウトショウジョウバエの羽の表現型(図1)は目視下で容易に観察出来ることから、大規模な遺伝学的スクリーニングが可能となる。同定した *PINK1* 結合分子のショウジョウバエオルソログに変異をもつショウジョウバエを収集し、*PINK1* ノックアウトショウジョウバエとかけ合わせることにより、ショウジョウバエの羽の表現型を修飾する分子をスクリーニングした。その結果、*PGAM5* という遺伝子を同定することに成功した²⁾。*PGAM5* は、解糖系の酵素 phosphoglycerol mutase ファミリーに属するが、酵素活性中心の保存されたアミノ酸残基が保存されていないため、phosphoglycerol mutase 活性を持たない機能未知の分子である。*PGAM5* 遺伝子を不活性化すると、*PINK1* 変異によるミトコンドリアの変性が部分的に抑制された。さらに、*PINK1* ノックアウトショウジョウバエで見られる生存性の低下、ドーパミン神経の変性も改善された。すなわち、*PGAM5* は *PINK1* シグナルの負の制御分子であると考えられた。

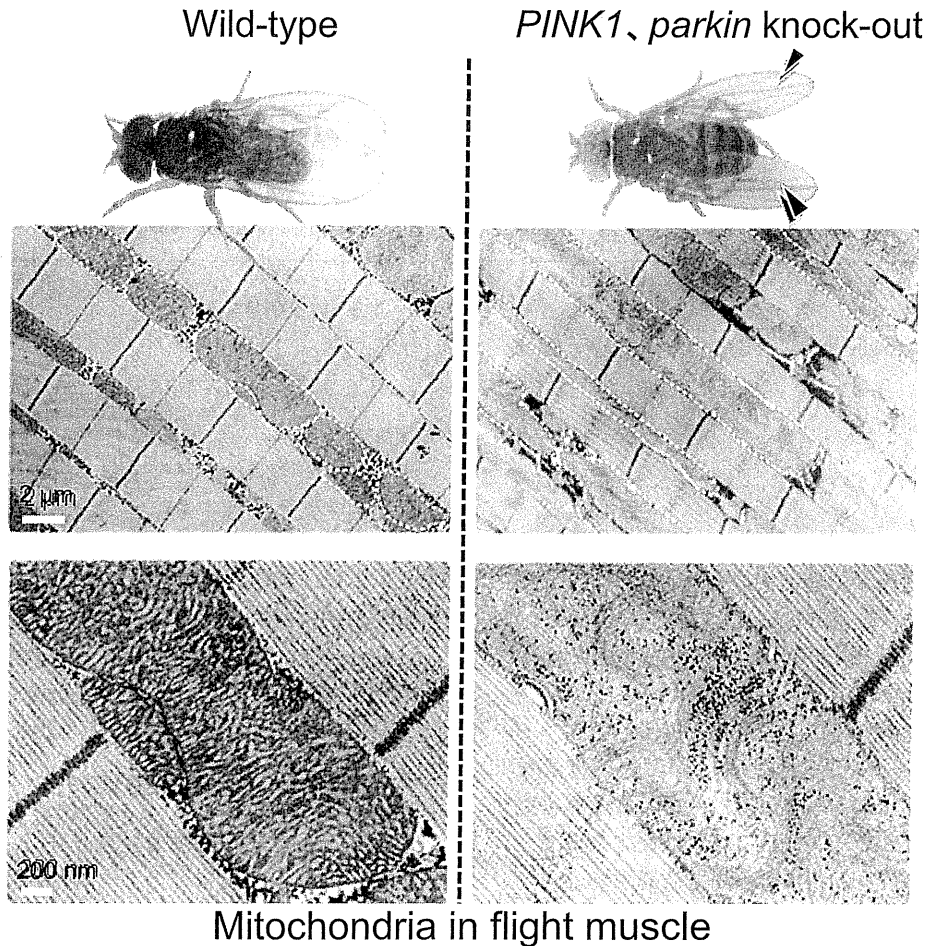


図1 PINK1 および Parkin ノックアウトショウジョウバエの表現型

飛翔筋や精子のミトコンドリアが変性し、クリステ構造が不明瞭になる（電子顕微鏡写真，右下）。同時にミトコンドリアの異常融合が起こることが特徴的である。飛翔筋のミトコンドリアが変性することにより、羽の姿勢を適切に制御できなくなり、羽の下垂が可視化表現型として現れる（矢頭）。

Parkin と PGAM5 の関係

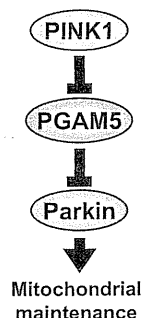
PINK1 ノックアウトショウジョウバエのミトコンドリアの変性は、Parkin の過剰発現により抑制される。すなわち、遺伝学的に PINK1 は parkin の上位遺伝子であることが示唆されている。PINK1 ノックアウトショウジョウバエから PGAM5 遺伝子を除去することにより、PINK1 ノックアウトの表現型が改善されることから、PGAM5 は PINK1 の下位遺伝子であると考えられた。そこで、PINK1 の下流で働くと考えられる PGAM5 と parkin の遺伝学的な位置関係を解析した。具体的には、parkin ノックアウトショウジョウバエが示すミトコンドリア変性の表現型が PGAM5 遺伝子の不活性化で抑制できるかどうかを調べた。その結果、PGAM5 の不活性化は parkin ノックアウトショウジョウバエが示す表現型を

抑制しないことが明らかになった。すなわち、PGAM5 は Parkin の上流因子かあるいは並列の関係であることが考えられた（図2）。

おわりに

細胞生物学的な解析から、PINK1 と Parkin は損傷を受けた（膜電位の低下した）ミトコンドリアのオートファジーによる選択的な除去（マイトファジー）に関与することが明らかになった³⁾。さらに、我々および他研究グループは PINK1-Parkin シグナルがミトコンドリアの神経軸索輸送にも関与していることを見出している⁹⁾。ミトコンドリアに局在する PGAM5 の生理的機能は未解明であるが、今後、マイトファジーやミトコンドリア輸送に関与しているかどうかを明らかにしていきたい。

PGAM5 acts between PINK1 and Parkin



PGAM5 acts downstream of PINK1 and independently of Parkin

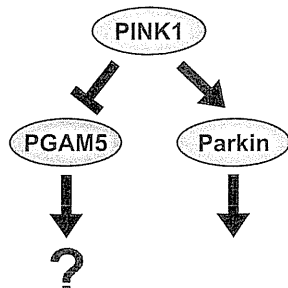


図2 PINK1, Parkin と PGAM5 の分子関係の仮説
PINK1-Parkin シグナルの制御分子である可能性 (左) と、
PINK1 の下流で Parkin とは独立にミトコンドリア機能制御を
する可能性 (右) が考えられる。

文 献

- 1) Clark IE, Dodson MW, Jiang C, et al. *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 2006; 441: 1162—1166.
- 2) Imai Y, Kanao T, Sawada T, et al. The loss of PGAM5 suppresses the mitochondrial degeneration caused by inactivation of PINK1 in *Drosophila*. *PLoS Genet* 2010; 6: e1001229.
- 3) Imai Y, Lu B. Mitochondrial dynamics and mitophagy

in Parkinson's disease: disordered cellular power plant becomes a big deal in a major movement disorder. *Curr Opin Neurobiol* 2011; 21: 935—941.

- 4) Imai Y, Soda M, Takahashi R. Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem* 2000; 275: 35661—35664.
- 5) Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 605—608.
- 6) Park J, Lee SB, Lee S, et al. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 2006; 441: 1157—1161.
- 7) Shimura H, Hattori N, Kubo S, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; 25: 302—305.
- 8) Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004; 304: 1158—1160.
- 9) Wang X, Winter D, Ashrafi G, et al. PINK1 and Parkin target miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* 2011; 147: 893—906.
- 10) Yang Y, Gehrke S, Imai Y, et al. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 10793—10798.
- 11) Zhang Y, Gao J, Chung KK, et al. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13354—13359.

特集2

細胞内小器官と神経難病

ミトコンドリア病としての パーキンソン病

さわだともよ¹⁾、いまい^かか^ず今居^り讓^る、たかはしりょうすけ¹⁾高橋良輔

1)京都市立大学大学院医学研究科臨床神経学（〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54）
2)順天堂大学大学院医学研究科神経変性疾患病態治療探索講座
E-mail: tsawada@kuhp.kyoto-u.ac.jp

SUMMARY

パーキンソン病は超高齢社会を迎えたわが国において、病態の解明と根本的な治療法の確立が最も求められる難病のひとつである。その発症機序にはいまだ多くの謎が残されているが、古くからミトコンドリア機能障害の関連が示唆されてきた。その中で近年、ミトコンドリア品質管理機構における家族性パーキンソン病原因遺伝子産物 PINK1, Parkin の重要性が明らかにされ、ミトコンドリア品質管理機構の破綻とパーキンソン病の関連が注目を浴びている。本稿では、これに加え、著者らの見出した PINK1, Parkin によるミトコンドリア輸送制御機構を中心に、ミトコンドリア機能障害によって発症する広義のミトコンドリア病としてのパーキンソン病について概説する。

KEY WORDS

パーキンソン病
ミトコンドリア
PINK1
Parkin
マイトファジー

▶ はじめに

ほとんどすべての真核細胞に存在するミトコンドリアは、細胞内エネルギー産生の中核をなす二重膜構造のオルガネラであり、核ゲノムとは独立した固有のゲノム (mtDNA) を有している。進行性の神経変性疾患であるパーキンソン病は、ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群 (MELAS) や赤色ぼろ線維・ミオクロームスτέんかん症候群 (MERRF)、慢性進行性外眼筋麻痺症候群 (CPEO) のような、ミトコンドリア呼吸鎖複合体や酵素などの遺伝子変異によって発症し、全身のミトコンドリア機能異常を伴うミトコンドリア病ではないものの、その発症機序のひとつとしてミトコンドリア機能障害を示唆する論文が数多く発表されている。そこで本稿では、ここ数年のホットトピックである若年性家族性パーキンソン病原因遺伝子とミトコンドリア品質管理機構との関連を中心に、広義のミトコンドリア病としてのパーキンソン病について述べていきたい。

▶ I. パーキンソン病

パーキンソン病は中脳黒質ドーパミン神経細胞の変性・脱落による運動症状を主徴とする中枢神経変性疾

患である。65歳以上の高齢者における本疾患の有病率は、人口10万人あたり1,000とアルツハイマー病に次いで高く、超高齢社会を迎えたわが国においては今後も患者数の大幅な増加が見込まれている。

パーキンソン病の90%以上は孤発性（非遺伝性）であるが、残りの5～10%は家族性（遺伝性）に発症することが知られている。家族性パーキンソン病の原因遺伝子としてこれまでに10以上の候補遺伝子が同定されており、これら原因遺伝子の生理機能解明を切り口として孤発例の発症機序解明に向け解析が進められている。

II. パーキンソン病とミトコンドリア機能障害

孤発例のパーキンソン病は多因子疾患（環境因子と遺伝因子の両方が重なることで発症する）であるが、これまでに得られた多くの実験結果が、その発症機序として「ミトコンドリア機能障害仮説」を支持している。

パーキンソン病とミトコンドリアの関連が注目されるようになったきっかけは、1980年代はじめの1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) という神経毒の発見である。MPTPはグリア細胞内でMPP⁺に変換されたのち、ドーパミントランスポーターを介してドーパミン神経に取り込まれ、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体Iを阻害する。自然毒のロテノンもMPTP同様にミトコンドリア複合体Iに対する選択的な阻害作用を示すことが知られており、MPTPやロテノンを投与した動物では、ヒトのパーキンソン病に類似した症状が観察されている¹⁾。さらに、パーキンソン病患者の死後脳におけるミトコンドリア複合体Iの活性低下²⁾や量的低下³⁾も報告されており、これらの結果はミトコンドリア機能障害がパーキンソン病の原因となる可能性を強く示唆している。

また、稀な例ではあるものの、ミトコンドリア病とパーキンソン症候群（パーキンソン病およびパーキンソン病症状を呈する疾患の総称）との強い関連を示唆する報告もなされている。mtDNAそのものやmtDNAの合成・修復を担うmitochondrial DNA polymerase gamma (POLG) 遺伝子の変異がパーキンソン症候群の患者で認められており、これらの臨床

的知見からもパーキンソン病発症とミトコンドリア機能障害の関連が強く示唆される⁴⁾。

1. PINK1, Parkin とミトコンドリア

さらにここ数年、ミトコンドリア機能障害仮説をさらに強く支持する数多くの結果が、家族性パーキンソン病原因遺伝子の研究から得られている。

PINK1 と Parkin は協働してミトコンドリアの機能・形態維持を担う

PINK1, *parkin* はともに常染色体劣性遺伝形式（遺伝子産物の機能喪失によって発症する）をとる若年性パーキンソン病の原因遺伝子である。その遺伝子産物PINK1, Parkinはそれぞれ、ミトコンドリア局在型Ser/Thrキナーゼ、ユビキチンリガーゼとしての機能を有する。PINK1, Parkinの生理機能には不明な点が多く残されていたが、2006年、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析から、この*PINK1*と*parkin*の間に強い遺伝的相互作用があり、ともに共通の経路を介してミトコンドリアの機能および形態を制御することが示された⁵⁻⁷⁾（図1）。この結果から、PINK1, Parkinの遺伝子変異によって発症するパーキンソン病にも、ミトコンドリアの機能障害が深く関わっていることが示唆された。

III. ミトコンドリア品質管理とパーキンソン病

ミトコンドリアがATPを産生する際には、電子伝達系から漏れ出た電子が酸素分子などと反応して活性酸素種（ROS）が放出されるため、ミトコンドリアは常にROSによるストレスに曝されている。このため、ミトコンドリアにはROSを消去する抗酸化機能に代わって、ROSによって傷付いた不良蛋白質を分解する機能が備わっていると考えられている。さらに、これら蛋白質レベルでの品質管理機構では対応できないほどにダメージが蓄積した場合には、オートファジー（自食作用）によってミトコンドリアが丸ごと除去される。この過程がマイトファジーであり、酵母からヒトまで保存されている。近年、このマイトファジーとパーキンソン病の関連を強く示唆する報告が相次ぎ、注目を浴びている。

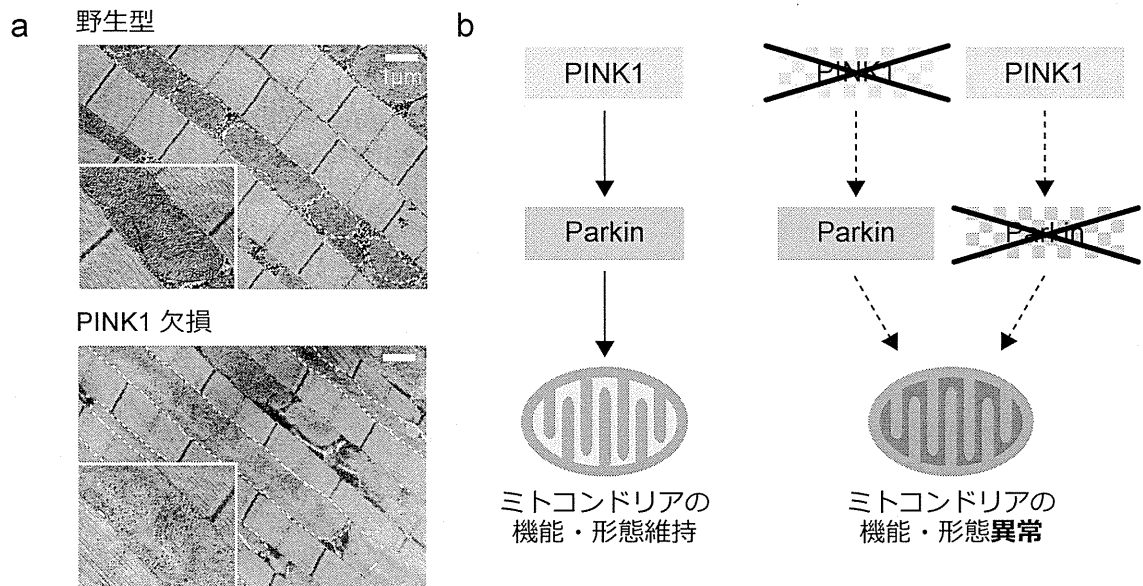


図1 PINK1とParkinはミトコンドリアの機能・形態維持を担う

a: ショウジョウバエ飛翔筋の電子顕微鏡像

PINK1の欠損変異体では、ミトコンドリアの形態異常が観察される。破線で囲ったひとつひとつのミトコンドリアが野生型にくらべ顕著に長く、クリステ構造にも異常が認められる。

b: ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析により示されたPINK1とParkinの機能

PINK1はParkinの上流で機能し、ミトコンドリアの機能・形態維持を担っている。両者は共通の経路で機能しており、PINK1, parkinのどちらかが機能しなくなってもミトコンドリアが変性する。

1. PINK1, Parkinとマイトファジー

2008年、マイトファジーにおけるParkinの重要性を示す論文⁸⁾がNIHのグループから発表された。強力な脱共役剤であるCarbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP)を用いて、ヒト培養細胞のミトコンドリア膜電位を消失させると、Parkinが損傷ミトコンドリアへ選択的に移行し、そのオートファジーによる除去を促すというものである。その後、Parkin同様にPINK1もマイトファジーに必須であることが明らかとなり^{9,11)}(詳細は図2および今泉の項を参照)、パーキンソン病発症におけるミトコンドリア品質管理機構の破綻の関与が強く示唆された。つまり、遺伝子変異によってこれらの分子が機能しなくなると、損傷ミトコンドリアの蓄積が起これ細胞死に至ると考えられている。

2. PINK1, Parkinはミトコンドリア軸索輸送を制御する しかしながら、マイトファジーは神経細胞特異的な

現象ではなく、これだけでPINK1, Parkinの機能不全による神経細胞の選択的な変性を説明するには不十分であった。この神経選択性の謎を明らかにすべく行った解析の結果、著者らとWangらは、損傷ミトコンドリアの神経終末への輸送をPINK1とParkinが抑制し、マイトファジーによる除去を促進することを明らかにした^{12,13)}。

PINK1はミトコンドリア輸送関連分子Miroを介して、ミトコンドリアの輸送を制御する

われわれはまず、ショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングにより、微小管に沿ったミトコンドリアの輸送を担う分子MiroとPINK1が強い相互作用を示すことを見出した。Miroはミトコンドリア外膜に局在するRho GTPaseである¹⁴⁾。PINK1欠損ショウジョウバエで認められるミトコンドリア異常などの表現型が、Miroをノックダウンすることにより顕著に改善されたことから、PINK1がMiroの機能を制御

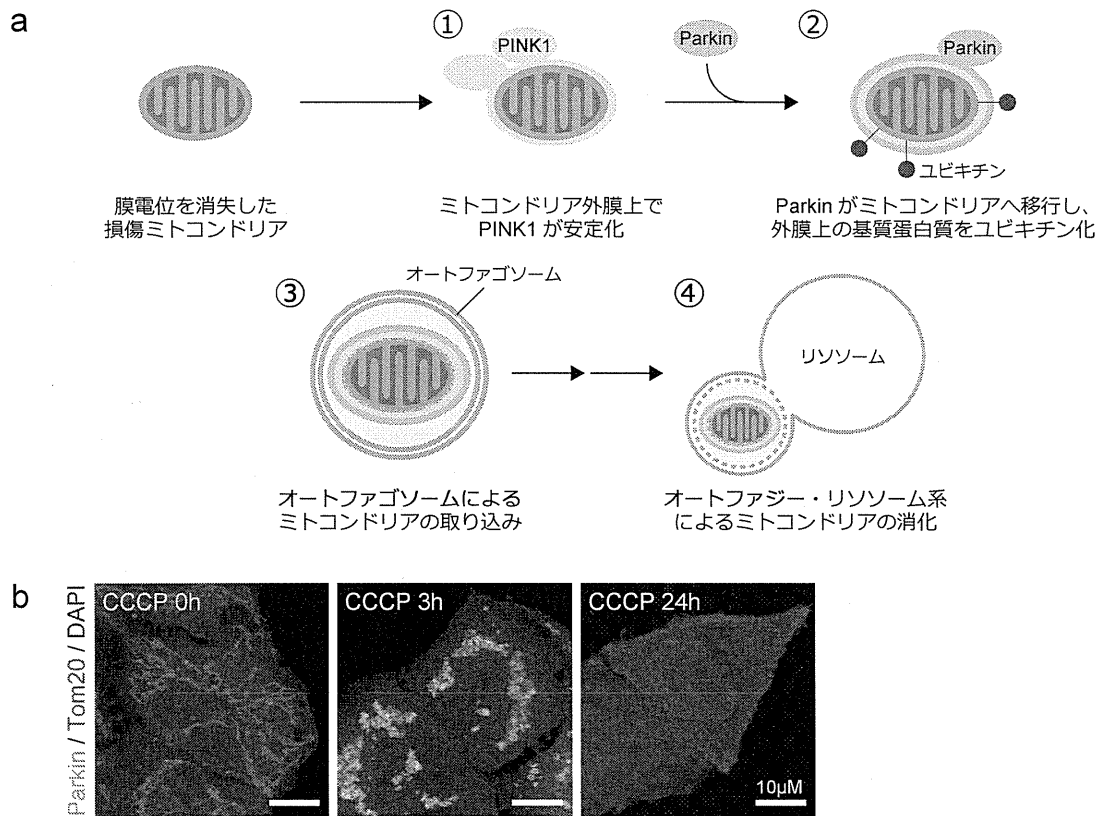


図2 PINK1, Parkin によるマイトファジー制御

a: PINK1, Parkin が誘導する損傷ミトコンドリアの選択的除去 (マイトファジー)

膜電位を消失したミトコンドリアの外膜上ではまず PINK1 が安定化し (①), これが引き金となって細胞質に局在している Parkin がミトコンドリアへと移行する (②). ミトコンドリアに移行した Parkin はユビキチンリガーゼ活性を發揮し, 外膜上の基質蛋白質をユビキチン化する. ユビキチン化された基質蛋白質はプロテアソームによってすばやく分解される. 外膜蛋白質が分解されたミトコンドリアは, オートファゴソームによって隔離され (③: 図では別々に示しているが, 外膜蛋白質のユビキチン化と③はほぼ同時に起こることが分かっている), その後オートファジー・リソソーム系によって除去される (④).

b: HeLa 細胞におけるマイトファジー

Parkin を安定的に発現させた HeLa 細胞を CCCP で処理し, 免疫染色によりマイトファジーの時間経過を観察した (カラー写真および詳細は今泉の項 (p.15) を参照いただきたい).

している可能性が考えられた.

PINK1 とミトコンドリア輸送の関連性を明らかにするため, ショウジョウバエ幼虫の運動神経を用いたライブイメージングによりミトコンドリアの動きを調べたところ, PINK1 ノックダウンによりミトコンドリアの順行性輸送に亢進が認められた. これに対し PINK1 の過剰発現は, Miro ノックダウンと同様にミトコンドリア輸送を抑制した. この結果は, PINK1 がミトコンドリアの軸索輸送を調節することを示している.

PINK1 は Parkin と協働して Miro の安定性を調節し, マイトファジーによる損傷ミトコンドリアの除去を促進する

次に著者らは, PINK1 によるミトコンドリア輸送制御の分子メカニズムを明らかにするため HeLa 細胞を用いた解析を行った. 哺乳類には二つの Miro 遺伝子 *Miro1*, *Miro2* が存在する. HeLa 細胞を CCCP で処理しミトコンドリア膜電位を消失させると, *Miro1*, *Miro2* ともにユビキチン-プロテアソーム経路により PINK1/Parkin 依存的に分解されることが明らかと

なった。くわえて、この Miro の分解がマイトファジーの進行を早めることも見出している。

ショウジョウバエと哺乳類細胞を用いた以上の結果から、PINK1 と Parkin は膜電位の低下した損傷ミトコンドリアが神経終末へと輸送される前に、損傷ミトコンドリア上の Miro を分解することでその輸送を阻止し、それと同時にマイトファジーによる除去を促すことが示唆された (図 3)。

局所的なエネルギー需要に応じたミトコンドリアの輸送は、極性を有する神経細胞にとって特に重要である。著者らの見出した PINK1, Parkin によるミトコンドリア輸送制御機構は、PINK1, Parkin の機能不全による神経細胞の選択的な変性のメカニズムの一端を担うものと考えられる。

おわりに

パーキンソン病のミトコンドリア機能障害説は本稿

で紹介した以外にも、数多くの知見から支持されている。本稿で取り上げた“PINK1, Parkin の生理機能はミトコンドリアの品質管理である”という発見は、パーキンソン病の基礎研究に大きな影響を与えたものの、これだけでパーキンソン病の発症機序が完全に解明されたわけではない。世界中で詳細に研究が進められてきたパーキンソン病原因遺伝子には *PINK1*, *parkin* のほかに、*a-synuclein*, *LRRK2*, *DJ-1* があげられる。特に DJ-1 は抗酸化作用を有することが知られており、ミトコンドリアから生じる酸化ストレスを抑制する可能性が示唆されている^{15,16}。*a-synuclein* と *LRRK2* に関しては、それぞれにミトコンドリアとの関連を示唆する研究結果も報告されているが、その生理的意義についてはさらなる検討が必要である。

一方、孤発性パーキンソン病に関しては、近年、SNP (一塩基置換) 解析や GWAS (全ゲノム関連解析) によるリスク遺伝子の解析が進められており、*a-synuclein* や *LRRK2*¹⁷、ゴーシェ病の原因遺伝子 *Glucosylceramidase*

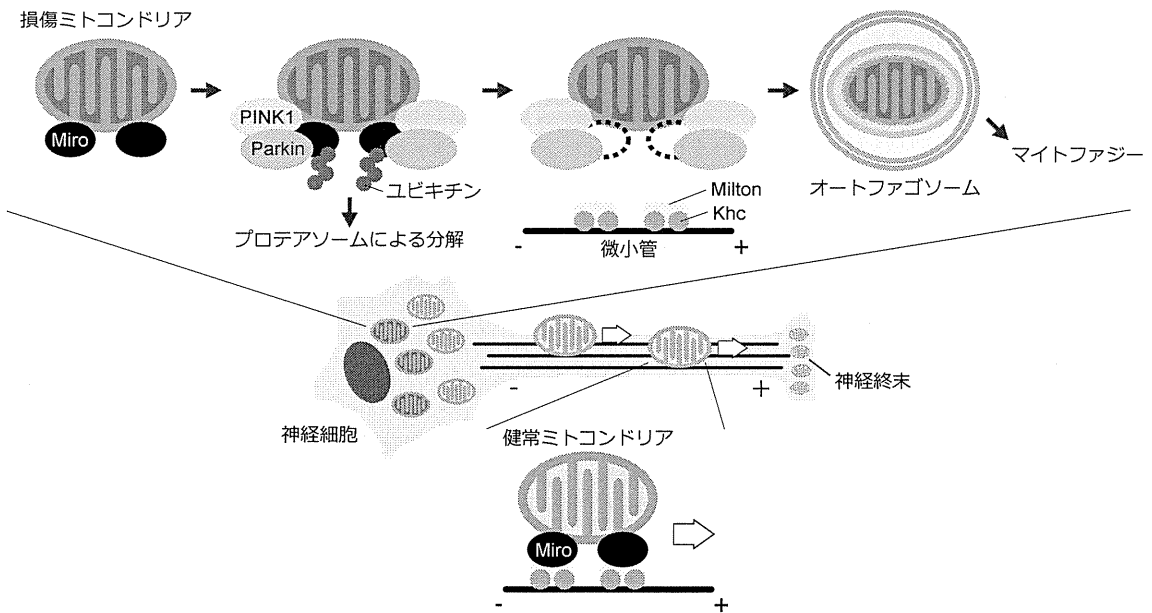


図 3 PINK1 と Parkin は Miro を分解することでマイトファジーを促進する

正常ミトコンドリアは Miro, Milton, Kinesin heavy chain (Khc) の複合体によって軸索の微小管上を神経終末へと順行性に輸送される。これに対し、膜電位を消失した損傷ミトコンドリアには、まず PINK1 と Parkin が選択的に集合し、外膜上の Miro をユビキチン化する。ユビキチン化された Miro はプロテアソームによってすばやく分解される。その結果、Miro を失った損傷ミトコンドリアは Milton, Khc と複合体を形成することができないために輸送系に乗らず、最終的に細胞体でマイトファジーによって除去される。

cerebrosidase (GBA) などが同定されている¹⁸⁾。前述の通り、パーキンソン病の90%以上は孤発例であり、稀な家族性疾患の研究から得られた知見を踏まえつつ、その病態解明に向けより多角的な視点に立った研究が期待されている。

参考文献

- 1) Greenamyre JT, et al : Complex I and Parkinson's Disease. *IUBMB Life* **52** : 135-141, 2001.
- 2) Schapira AH, et al : Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* **1** : 1296, 1989.
- 3) Hattori N, et al : Immunohistochemical studies on complex I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **30** : 563-571, 1991.
- 4) Finsterer K : Parkinson's Syndrome and Parkinson's Disease in Mitochondrial Disorders. *Mov Disord* **26** : 784-791, 2011.
- 5) Park J, et al : Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* **441** : 1157-1161 2006.
- 6) Clark IE, et al : *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* **441** : 1162-1166 2006.
- 7) Yang Y, et al : Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila Pink1* is rescued by Parkin. *Proc Natl Acad Sci USA* **103** : 10793-10798 2006.
- 8) Narendra D, et al : Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* **183** : 795-803 2008.
- 9) Narendra D, et al : PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* **26** : e1000298 2010.
- 10) Matsuda N, 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.
- 11) Shiba-Fukushima K, et al : PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci Rep* **2** : DOI : 10.1038/srep01002.
- 12) Liu S, et al : Parkinson's disease-associated kinase PINK1 regulates Miro protein level and axonal transport of mitochondria. *PLoS Genet* **8** : e1002537 2012.
- 13) Wang X, et al : PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* **147** : 893-906 2011.
- 14) Reis, K. et al : The Miro GTPases : at the heart of the mitochondrial transport machinery. *FEBS Lett* **583** : 1391-1398 2009.
- 15) Taira T. et al : DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* **5** : 123-128 2004.
- 16) Hao LY, et al : DJ-1 is critical for mitochondrial function and rescues PINK1 loss of function. *Proc Natl Acad Sci USA* **107** : 9747-9752, 2010.
- 17) 戸田達史, 佐竹 渉 : 孤発性パーキンソン病の遺伝子 : common disease-common variants. *臨床神経学* **50** : 864, 日本神経学会, 2010.
- 18) Mitsui J, et al : Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson's disease. *Arch Neurol* **66** : 571-576 2009.

Editorial

Intronic *C9orf72* Mutation Expanding on Neurodegenerative Disorders and Other Diseases

Hiroyuki Tomiyama*

Department of Neurology, Department of Neuroscience for Neurodegenerative Disorders, Juntendo University School of Medicine, Japan

EDITORIAL

In 2011, *C9orf72* GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in intron 1 was reported to be the most common cause of Caucasian sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) / frontotemporal dementia (FTD). Indeed, the frequency of the repeat expansion was up to 3%–21% in sporadic ALS and 21%–57% in familial ALS drawing our interest [1-3]. All patients with the repeat expansion had (partly or fully) a founder haplotype, suggesting a one-off expansion occurring about 1500 years ago [3].

The Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS) analyzed 563 (552 sporadic, 11 familial) Japanese patients with ALS and found the repeat expansion in 2/552 = 0.4% of sporadic ALS patients and 0/11 = 0% of familial ALS patients [4]. The sibling of one of the two Japanese probands was found to have primary progressive aphasia (PPA) after detection of the repeat expansion. In this family, the proband with ALS had no dementia or psychosis and the sibling had no motor neuron signs, no positive clinical and laboratory findings including needle electromyogram. Notably, after the detection of the proband with “sporadic” ALS, the existence of quite different (not overlapped) clinical phenotypes of ALS and PPA caused by the same *C9orf72* mutation in the same family were found subsequently.

The combination of other publications reveals that *C9orf72* repeat expansion accounts for 0.4% (4/891) of sporadic ALS, 2.8% (3/109) of familial ALS, and 0% (0/377) of normal healthy controls in Japanese [4-6]. Of note, the Kii peninsula, which has recorded a high incidence of ALS or ALS/PDC (parkinsonism-dementia complex), frequency of the *C9orf72* repeat expansion was 20% (3/15), indicating high prevalence [6]. However, the results from the Kii peninsula revealed that whereas clinical symptoms of patients with the *C9orf72* repeat expansion overlap those of ALS/PDC, ALS patients with the *C9orf72* repeat expansion around Kozagawa area seemed to be different from ALS/PDC patients around Hohara area based on the reported clinical and pathological features. In addition, the *C9orf72* repeat

Corresponding author

Hiroyuki Tomiyama, Department of Neurology, Department of Neuroscience for Neurodegenerative Disorders, Juntendo University School of Medicine, Japan, E-mail: tomiyama@juntendo.ac.jp

Submitted: 24 July 2013

Accepted: 24 July 2013

Published: 25 July 2013

Copyright

© 2013 Tomiyama

OPEN ACCESS

expansion was not detected in ALS/PDC of Guam [7]. All the Japanese patients with the repeat expansion had a common risk haplotype within narrower region than Finnish one, suggesting a common founder effect which spread from Europe to East Asia genetically [3-6].

In Japanese patients with FTD, although only a small number of patients have been screened, of the our 75 (48 familial, 27 sporadic) patients with frontotemporal lobar degeneration (FTLD), progressive supranuclear palsy (PSP), or corticobasal syndrome (CBS) none had *C9orf72* repeat expansion (0/75 = 0%) [8]. Whereas, a very recent paper reported that the *C9orf72* repeat expansion was also observed in parkinsonism, Parkinson's disease, and PSP [9]. Moreover, relations between the *C9orf72* repeat expansion and Alzheimer's disease have been discussed, suggesting genetic heterogeneity of *C9orf72* mutation.

Based on the Caucasian data, no pathogenic mutations in coding exons of *C9orf72* have been detected. Anticipation and severer phenotype depending on the repeat length, which are often observed in polyglutamine diseases caused by triplet repeats (CAG), have not been observed so far. Intronic repeat expansion and heterogeneity in each somatic cell and tissue have been pointed out as the reasons, however, the precise reasons are not well known. “What is an exact cause that determines or separates clinical phenotype of ALS, FTD, and parkinsonism?” are very interesting questions that need to be solved.

Pathologically, ALS patients with the *C9orf72* repeat expansion have TDP-43 positive inclusion in the spinal cord as well as classical ALS. Moreover, p62-positive (in excess of TDP-43) neuronal cytoplasmic inclusions (NCIs) in frontal cortex, hippocampus (CA4), and cerebellum were characteristic features of the ALS patients with the *C9orf72* repeat expansion [10].

Concerning pathogenesis, “how does intronic GGGGCC expansion cause neurodegeneration?” is a very interesting question because this answer would lead to the universal pathogenesis of neurodegeneration by elucidating molecular genetic mechanisms. One potential mechanism was a loss of function based on decreased mRNA levels [1,2,11] and the other

potential mechanism was a toxic RNA gain of function based on the accumulation of RNA transcripts containing the GGGGCC repeat [2]. The latter mechanism suggests the RNA structure of GGGGCC repeats renders these transcripts susceptible to an unconventional mechanism of translation—repeat associated non-ATG (RAN) translation [12]. Antibodies generated against putative GGGGCC repeat RAN translated peptides (anti-C9RANT) detected high molecular weight, insoluble material in brain elucidating homogenates, and neuronal inclusions throughout the central nervous system of ALS/FTD patients with the *C9orf72* repeat expansion specifically [12]. Most of these pathologically characteristic inclusions contain poly- (Gly-Ala) and to a lesser extent poly- (Gly-Pro) and poly- (Gly-Arg) dipeptide-repeat proteins presumably generated by non-ATG-initiated translation from the expanded GGGGCC repeat in three reading frames (GGG-GCC, GGG-CCG, and GGC-CGG) [12,13]. These molecular mechanisms and abnormal accumulations which may cause ALS/FTD are good targets for essential therapies of ALS and FTD.

Thus, studies for *C9orf72* have provided important clues in the search to find the real molecular mechanisms and the essential therapeutic strategies of ALS and FTD. According to the findings of *C9orf72*, ALS and FTD were thought to have common molecular mechanisms and spread on the same disease spectrum. Furthermore, parkinsonism might also be in the same situation. These recent progresses make us rethink the importance of considering genetic testing after checking a detailed family history in neurodegenerative disorders. Based on the Caucasian and Asian data, the *C9orf72* repeat expansion spread while having the common founder effect in sporadic and familial ALS/FTD [4]. Consequently, the family histories of patients with ALS, even sporadic ALS, and other complicated neurological disorders such as dementia and parkinsonism should be examined and genetically tested more actively.

Diagnosis, management, and genetic counseling by longitudinal follow up and penetrance detection of patients with the *C9orf72* repeat expansion is evidence of the progress being made. Further studies about *C9orf72* will clarify the pathogenesis and help reveal the treatment of familial and sporadic neurodegenerative disorders such as ALS, FTD, and parkinsonism.

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to thank Dr. Nobutaka Hattori (Juntendo University) and Dr. Gen Sobue (Nagoya University) for their supervision, doctors of JaCALS, doctors of the Research Committee of CNS Degenerative Diseases, Dr. Kotaro Ogaki (Juntendo University), Dr. Seiji Yato (Sayama Neurological Hospital), Dr. Mitsunori Saito (Sayama Neurological Hospital), Dr. Hideo Yoshino (Setagaya Neurological Hospital), and all the participants for their cooperation.

This work was supported by Grants-in-Aid from the Research Committee of CNS Degenerative Diseases and Muro Disease (Kii

ALS/PDC), Grants-in-Aid from the Research Committee on CNS Degenerative Diseases and Perry Syndrome from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and a grant from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

REFERENCES

1. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72* is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72: 257-268.
2. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of *C9ORF72* causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72: 245-256.
3. Majounie E, Renton AE, Mok K, Doppler EG, Waite A, Rollinson S, et al. Frequency of the *C9orf72* hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012; 11: 323-330.
4. Ogaki K, Li Y, Atsuta N, Tomiyama H, Funayama M, Watanabe H, et al. Analysis of *C9orf72* repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 2527. e11-16.
5. Konno T, Shiga A, Tsujino A, Sugai A, Kato T, Kanai K, et al. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013; 84: 398-401.
6. Ishiura H, Takahashi Y, Mitsui J, Yoshida S, Kihira T, Kokubo Y, et al. *C9ORF72* repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii peninsula of Japan. *Arch Neurol* 2012; 69: 1154-1158.
7. Dombroski BA, Galasko DR, Mata IF, Zabetian CP, Craig UK, Garruto RM, et al. *C9orf72* hexanucleotide repeat expansion and guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia complex. *JAMA Neurol* 2013; 70: 742-745.
8. Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa K, Kobayashi T, Nonaka T, et al. Analyses of the *MAPT*, *PGRN*, and *C9orf72* mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord* 2013; 19: 15-20.
9. Lesage S, Le Ber I, Condroyer C, Broussolle E, Gabelle A, Thobois S, et al. *C9orf72* repeat expansions are a rare genetic cause of parkinsonism. *Brain* 2013; 136: 385-391.
10. Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, Lashley T, Mok K, Shakespeare T, et al. Frontotemporal dementia with the *C9ORF72* hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain* 2012; 135: 736-750.
11. Gijssels I, Van Langenhove T, van der Zee J, Sleegers K, Philtjens S, Kleinberger G, et al. A *C9orf72* promoter repeat expansion in a Flanders-Belgian cohort with disorders of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum: a gene identification study. *Lancet Neurol* 2012; 11: 54-65.
12. Ash PE, Bieniek KF, Gendron TF, Caulfield T, Lin WL, DeJesus-Hernandez M, et al. Unconventional translation of *C9ORF72* GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 2013; 77: 639-646.
13. Mori K, Weng SM, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, et al. The *C9orf72* GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science* 2013; 339: 1335-1338.

Cite this article

Tomiyama H (2013) Intronic *C9orf72* Mutation Expanding on Neurodegenerative Disorders and Other Diseases. *J Neurol Disord Stroke* 1: 1009.

わが国の ALS における C9ORF72

富山 弘幸¹⁾

要旨：最近，*C9orf72* のイントロン 1 内の 6 塩基くりかえし配列の異常伸長が，白人の孤発性および家族性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) そして前頭側頭型認知症 (FTD) のもっとも頻度の高い原因であると報告された。本邦では，*C9orf72* 変異患者は家族性 ALS の 2.8% (3/109)，孤発性 ALS の 0.4% (4/891) を占め，紀伊半島南部の ALS 多発地域では 20% (3/15) で高率であり，すべて共通リスクハプロタイプをもっていた。日本人における *C9orf72* 変異の頻度は白人よりも低かったが，*C9orf72* 変異は，家族性および孤発性 ALS において，認知症とくに FTD についても家族歴を詳細に確認の上，解析されるべきと考えられた。*C9orf72* の更なる解析から症例の蓄積とともに機能解析が進み，家族性および孤発性 ALS，ALS/FTD の病態解明から治療に繋がっていくことが期待される。

(臨床神経 2013;53:1074-1076)

Key words : *C9orf72*, 筋萎縮性側索硬化症 (ALS), 前頭側頭型認知症 (FTD), 原発性進行性失語 (PPA), 遺伝学

2011 年，白人において *C9orf72* 遺伝子イントロン 1 内の 6 塩基 (GGGGCC) くりかえし配列の異常伸長が，家族性および孤発性の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) そして前頭側頭型認知症 (FTD) のもっとも頻度の高い原因であり，家族性 ALS の 21%～57%，孤発性 ALS の 3%～21% を占めると報告された^{1)~3)}。

一方，Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS) での 563 人の日本人 ALS (家族性 11，孤発性 552) の解析結果では，同伸長変異を家族性 ALS でみとめず (0/11 = 0%)，2 人の孤発性 ALS でみとめた (2/552 = 0.4%)⁴⁾。その後そのうち 1 人の発端者について，同胞に 1 人の原発性進行性失語 (PPA) 患者が存在することがわかり，遺伝子解析をおこなったところ同伸長変異をみとめた。すなわちこの家系内には ALS と PPA ということなる臨床型の患者が共に存在し，それぞれ同一の *C9orf72* 変異によると考えられることが後に判明した。また，もう 1 家系においては，76 歳の非発症キャリアをみとめた。これまで浸透率は年齢依存性ではほぼ完全であると報告される一方，76 歳の非発症キャリアの存在は不完全浸透率の可能性も示唆した。すべての変異陽性患者は，フィンランド人からの共通リスクハプロタイプをより狭い範囲でもっており，人類遺伝学的に同変異がヨーロッパからアジアへと広がった可能性が示唆された^{3)~6)}。

他の既報告を合わせると，本邦で *C9orf72* 変異は家族性 ALS の 2.8% (3/109)，孤発性 ALS の 0.4% (4/891) を占め，正常群 377 人にはみとめず，紀伊半島南部の ALS 多発地域では 20% (3/15) で高率であった^{4)~6)}。これらの患者は同様の共通リスクハプロタイプをもっていたこともわかった。

本邦の FTD においては，まだ解析症例数が少ないものの，

われわれの他の 75 (家系 48，孤発 27) 例の前頭側頭葉変性症 (FTLD)，進行性核上性麻痺 (PSP)，大脳皮質基底核症候群 (CBS) での解析データでは，同変異は 0/75 = 0% であった⁷⁾。

これまでの欧米の遺伝子解析データからは，遺伝子の exon 内には病的変異は見つかっていない。また遺伝子型と臨床像の関連について，イントロン 1 内の 6 塩基 (GGGGCC) リピート配列伸長が，3 塩基 CAG リピート配列伸長によるポリグルタミン病にみられるような表現促進現象，リピート数増大にともなう臨床表現型の重篤化をきたすことは確認できていない。その理由として，イントロン内の伸長変異であること，体細胞，組織ごとのリピート伸長の長さや発現が違ふこと，によるとも考えられているが詳細は不明であり，ALS と FTD を分ける要因は何か，ということも大変興味深い。

病理学的には，*C9orf72* 変異症例は脊髄に TDP-43 封入体をもとめ古典的 ALS の病理像を呈する一方，大脳皮質，海馬，小脳における広範な NCI (Neuronal Cytoplasmic Inclusions) および p62 陽性，TDP-43 陰性の封入体をもとめ，とくに前頭葉皮質と海馬アンモン角 CA4 に有意な変化をみとめることが *C9orf72* 変異陽性を示唆すると報告された⁸⁾。

発症機序に関して，イントロンの GGGGCC 伸長変異がどのような病態により神経変性をひきおこすのかは，普遍的な現象にも繋がりを点で分子遺伝学的にも大変興味深い点である。1 つの発症機序としては，RNA 転写レベルでの異常，RNA 毒性，遺伝子発現の抑制が想定された。また最近，上記病理学的に特徴的な封入体の大部分は，おそらく 3 つの reading frame における，伸長 GGGGCC からの non-ATG から始まる翻訳 (Repeat Associated Non-ATG Translation; RAN

¹⁾ 順天堂大学医学部脳神経内科 / 神経変性疾患病態治療探索講座 [〒 113-8421 東京都文京区本郷 2 丁目 1-1] (受付日：2013 年 5 月 30 日)

Translation) による, poly-(Gly-Ala) とそれより少ない poly-(Gly-Pro) と poly-(Gly-Arg) のジペプチドくりかえし蛋白をふくむことがわかった⁹⁾¹⁰⁾. そのため, これらが異常凝集することで ALS/FTD が発症すると考えられ, 治療のターゲットにもなりえることが示唆された.

このように, *C9orf72* 変異の同定は, ALS および FTD の分子病態の解明において大きなインパクトを与えてきている. *C9orf72* の知見から, ALS と FTD は共通の分子病態をもち, 連続したスペクトラム上にあり広がっていることも示唆され, ALS の Awaji-EI Escorial 診断基準も認知症, FTD, 遺伝子診断についてどう扱うか改訂の必要があるとも指摘されてきている. 本邦におけるこれまでの解析の結果からは, *C9orf72* 変異は, 白人ほど高頻度でないものの孤発性および家族性 ALS/FTD 患者にも創始者効果とともに広がって存在していると考えられるため, ALS 患者では合併する他の神経疾患, 認知症とくに FTD のみならず PPA についても家族歴を詳細に確認の上, 解析されるべきであると考えられた⁴⁾. 今後 *C9orf72* の更なる解析により, 症例の蓄積とともに機能解析が進むことで, 家族性および孤発性 ALS, ALS/FTD の診断, 病態解明から治療の進歩へと繋がっていくことが期待される.

謝辞: 御指導をいただきました順天堂大学脳神経内科服部信孝先生, 名古屋大学神経内科祖父江元先生はじめ JaCALS, 神経変性疾患に関する調査研究班のすべての先生方, 順天堂大学脳神経内科大垣光太郎先生, 狭山神経内科病院谷藤誠司先生・齋藤光典先生, 世田谷神経内科病院吉野英夫先生はじめ一緒に研究を進めて下さったすべての先生方, 御協力をいただきました患者および御家族の皆様にご心より感謝いたします. 本稿の内容の一部は厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患など克服事業「Perry (ペリー) 症候群の実態, 病因・病態の解明と治療法開発研究」, 「三重県南部に多発する家族性認知症 - パーキンソン症候群 発症因子の探索と治療介入研究」の助成によっておこなわれています.

※本論文に関連し, 開示すべき COI 状態にある企業, 組織, 団体はいずれもありません.

文 献

- 1) Renton AE, Majounie E, Waite A, et al. A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron* 2011;72:257-268.
- 2) DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* 2011;72:245-256.
- 3) Majounie E, Renton AE, Mok K, et al. Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: a cross-sectional study. *Lancet Neurol* 2012;11:323-330.
- 4) Ogaki K, Li Y, Atsuta N, et al. Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2012;33:2527.e11-6.
- 5) Konno T, Shiga A, Tsujino A, et al. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:398-401.
- 6) Ishiura H, Takahashi Y, Mitsui J, et al. C9ORF72 repeat expansion in amyotrophic lateral sclerosis in the Kii peninsula of Japan. *Arch Neurol* 2012;69:1154-1158.
- 7) Ogaki K, Li Y, Takahashi M, et al. Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19:15-20.
- 8) Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, et al. Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain* 2012; 135:736-750.
- 9) Ash PE, Bieniek, KF, Gendron TF, et al. Unconventional translation of C9ORF72 GGGGCC expansion generates insoluble polypeptides specific to c9FTD/ALS. *Neuron* 2012; 77:639-646.
- 10) Mori K, Weng SM, Arzberger T, et al. The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science* 2013;339:1335-1338.

Abstract

C9ORF72 in Japanese amyotrophic lateral sclerosis (ALS)Hiroyuki Tomiyama, M.D., Ph.D.¹⁾¹⁾Department of Neurology, Department of Neuroscience for Neurodegenerative Disorders, Juntendo University School of Medicine

Recently, *C9orf72* hexanucleotide (GGGGCC) repeat expansion in intron 1 was reported to be the most common cause of sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/frontotemporal dementia (FTD) in the Caucasian population. The frequency of the intronic repeat expansion is up to 21%–57% in familial ALS and 3%–21% in sporadic ALS.

In the Japanese population, the *C9orf72* repeat expansion was found to account for 2.8% (3/109) of familial ALS, 0.4% (4/891) of sporadic ALS, and 0% (0/377) of normal healthy controls. Notably, among the Kii peninsula which has recorded a high incidence of ALS or ALS/PDC (parkinsonism-dementia complex), the frequency of the *C9orf72* repeat expansion was 20% (3/15) indicating a high prevalence. All patients with the repeat expansion had a common risk haplotype within a narrower region than the Finnish one, suggesting a common founder effect which spread from Europe to East Asia in human migration history.

Although Japanese ALS patients with the *C9orf72* repeat expansion were rarer than Caucasian patients, we should check family histories of other neurological disorders such as dementia and FTD and should do genetic testing more actively even in sporadic ALS patients. Further studies of *C9orf72* will clarify the pathogenesis and find the treatments for familial and sporadic ALS (or ALS/FTD).

(Clin Neurol 2013;53:1074-1076)

Key words: C9orf72, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), frontotemporal dementia (FTD), primary progressive aphasia (PPA), genetics

An exploratory study of the efficacy and safety of yokukansan for neuropsychiatric symptoms in patients with Parkinson's disease

Taku Hatano · Nobutaka Hattori · Tadaaki Kawanabe ·
Yasuo Terayama · Norihiro Suzuki · Yasuo Iwasaki ·
Toshiki Fujioka · On behalf of the Yokukansan Parkinson's Disease Study Group

Received: 25 May 2013 / Accepted: 15 October 2013
© Springer-Verlag Wien 2013

Abstract The present study examined the efficacy and safety of yokukansan (YKS) in neuropsychiatric symptoms in patients with Parkinson's disease (PD) using the neuropsychiatric inventory (NPI). Twenty-five patients with PD (M:F 14:11; age 72 years) were enrolled and treated with YKS (7.5 g/day) for 12 weeks. The NPI was assessed at 0, 4, 8, 12 and 16 weeks. The patient's motor function and progression were evaluated using the Unified PD Rating Scale part III (UPDRS-III) and Hoehn and Yahr scale, respectively. The serum potassium concentration (sK) and all adverse events were recorded. The median NPI

total score significantly decreased from 12 points at baseline to 4.0 points at 12 weeks ($p = 0.00003$). Within each NPI subscale, significant improvements were observed in hallucinations, anxiety and apathy. These symptoms tended to worsen after the completion of YKS treatment. Delusions, agitation, depression, euphoria, disinhibition, aberrant motor activity tended to improve but irritability showed no change. The median NPI subtotal scores, positive symptoms (delusions–hallucinations–irritability) significantly decreased ($p = 0.01660$) and negative symptoms (anxiety–apathy) significantly decreased ($p = 0.00391$). Both UPDRS-III and the Hoehn and Yahr scale showed no significant change. sK decreased mildly from 4.26 ± 0.30 to 4.08 ± 0.33 mEq/L. Two patients showed hypokalemia lower than 3.5 mEq/L without any corresponding symptoms; two patients showed listlessness and one patient showed drug eruption. Each recovered after discontinuation of YKS. YKS improved neuropsychiatric symptoms associated with PD, including hallucinations, anxiety and apathy without severe adverse events and worsening of Parkinsonism.

Members of Yokukansan Parkinson's Disease Study Group are listed in Acknowledgments.

T. Hatano · N. Hattori (✉)
Department of Neurology, Juntendo University School of
Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo, Tokyo 113-8421, Japan
e-mail: nhattori@juntendo.ac.jp

T. Kawanabe
Department of Neurology, Juntendo University Urayasu
Hospital, Chiba 279-0021, Japan

Y. Terayama
Department of Neurology and Gerontology, Iwate Medical
University School of Medicine, Iwate 020-8505, Japan

N. Suzuki
Department of Neurology, Keio University School of Medicine,
Tokyo 160-8582, Japan

Y. Iwasaki
Department of Neurology, Toho University Omori Medical
Center, Tokyo 143-8541, Japan

T. Fujioka
Department of Neurology, Toho University Ohashi Medical
Center, Tokyo 153-8515, Japan

Keywords Parkinson's disease · Neuropsychiatric
symptoms · Yokukansan (YKS) · Neuropsychiatric
inventory (NPI)

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by motor dysfunctions such as, resting tremor, rigidity, akinesia and postural instability. PD patients usually experience distress related to not only motor dysfunction but also non-motor symptoms, such as hallucination, depression, anxiety, apathy, fatigue and autonomic dysfunctions, which

might seriously affect their activities of daily living and quality of life (QOL) (Chaudhuri et al. 2006).

The management of motor dysfunctions in PD is centered on replacement therapy using L-Dopa and dopamine agonists, with the aim of supplementing the reduced levels of dopamine in the substantia nigra and striate body. However, long-term L-Dopa therapy leads to disablement such as L-Dopa-related motor complications and psychiatric problems. Dopamine agonists may also induce or exacerbate psychiatric problems and sleep disturbance. It has been reported that 10–40 % of patients administered antiparkinsonian agents suffer from hallucinations (Weintraub and Stern 2005). Once patients have developed psychiatric symptoms, these show a tendency to recur and may continue for an extended period. Psychiatric symptoms including depression, anxiety, apathy, hallucinations and sleep disorders frequently occur and may become troublesome problems (Aarsland et al. 1999). Therefore, from the point of view of improving the patient's QOL, it is essential to give careful attention to the treatment of psychiatric symptoms as well as the motor symptoms. Psychiatric problems particularly tend to occur when PD is progressing, so that patients have no hope or expectation of reducing the doses of antiparkinsonian agents and instead expect the doses of dopamine agonists to be increased to improve mobility.

In Japan, yokukansan (YKS), the traditional Japanese medicine (Kampo medicine), is approved by the Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) with an official drug price listing, and it is in wide use for treatment of insomnia, pediatric irritability and behavioral and psychological symptoms associated with dementia (Iwasaki et al. 2005a, b, 2011, 2012). YKS has also been reported to be effective in reducing hallucinations in PD patients (Fujioka et al. 2009) and for treating psychiatric symptoms in patients with PD or PD with dementia (PDD) (Kawanabe et al. 2010).

With respect to the efficacy of YKS in the psychological and neurological fields, numerous reports of clinical studies have been published in recent years, and there have been no reports of extrapyramidal side-effects or other serious adverse reactions. Therefore, YKS is considered to make a significant contribution to the alleviation of neuropsychiatric symptoms of which PD patients complain. The present study was an exploratory investigation of the efficacy and safety of YKS for treating neuropsychiatric symptoms in PD patients without any cognitive decline.

Materials and methods

Subjects

The target population was PD patients with neuropsychiatric symptoms, except for those with dementia with Lewy

bodies and/or PDD. All subjects were enrolled while being treated as out-patients at the six clinical institutions that form the Yokukansan Parkinson's Disease Study Group. Data were collected from July 2008 to March 2010.

Intervention

After an explanation, details about the study were given, written informed consent was obtained from the subject and/or his/her care giver.

Each participant received 2.5 g of YKS extract granules (Tsumura & Co., Tokyo, Japan) three times a day for 12 weeks before or after meals. YKS contain a water extract from the following mixture of seven crude drugs included in the Japanese Pharmacopoeia: 4 g of *Atractylodis Lanceae Rhizoma*, 4 g of *Poria*, 3 g of *Cnidii Rhizoma*, 3 g of *Uncariae Uncis Cum Ramulus*, 3 g of *Angelicae Radix*, 2 g of *Bupleuri Radix* and 1.5 g of *Glycyrrhizae Radix*. YKS is approved by the MHLW as a therapeutic agent for cover by the National Health Insurance Plan.

Outcome measurements

As primary endpoints, neuropsychiatric symptoms of PD were measured in accordance with the neuropsychiatric inventory (NPI) (Cummings et al. 1994) at initiation of administration, weeks 4, 8 and 12, and 4 weeks after completion of administration (week 16). In principle, each subject had the same caregiver throughout the study and evaluation was carried out by the same evaluation personnel (physicians, clinical psychologists and supporting staffs).

Based on the factorial analysis of psychiatric symptoms of PD patients, there are close correlations between delusion, hallucinations and irritability, and between anxiety and apathy (Aarsland et al. 1999). An evaluation was, therefore, carried out on the basis of the sum of scores for the three items of NPI (delusion, hallucinations and irritability), and the sum of scores for the two items of NPI (anxiety and apathy).

As secondary endpoints, mobility in PD was determined on the basis of UPDRS part III (UPDRS-III) (Fahn et al. 1987), and PD severity was evaluated on the basis of the Hoehn–Yahr classification (Hoehn and Yahr 1967) at weeks 0, 4, 8 and 12.

Glycyrrhizae Radix, which is one of the crude drugs from which YKS is composed, has been reported to induce hypokalemia (Conn et al. 1968). Therefore, the serum potassium concentration and edema were evaluated at weeks 0, 4, 8 and 12, and 16 (4 weeks after completion of administration). The judgment as to whether the potassium

level was normal or abnormal was made on the basis of the relevant clinical institution's specified criteria.

Adverse reactions were evaluated during the administration period, and were clinically undesirable and/or unexpected signs or symptoms, and abnormal changes in clinical laboratory test results.

Statistical analysis

The data are expressed as mean \pm standard deviation (SD), and significance in the results of analysis using the Wilcoxon signed rank-sum test is taken to be at $p < 0.05$. The statistics software used was SAS, Version 9.2 (SAS Institute Inc., Japan).

Ethics

This study was carried out in compliance with the spirit of the Helsinki Declaration. On entry to this study, written informed consent was obtained from each subject and/or his/her representative. The study protocol was approved by the Ethics Committee at each relevant clinical institution and entered in the Japan Pharmaceutical Information Center Clinical Trials Information (JapicCTI-080620).

Results

In accordance with the study inclusion and exclusion criteria (Table 1), 25 PD patients (four patients: Juntendo University School of Medicine, 12 patients: Juntendo University Urayasu Hospital, four patients: Iwate Medical University, two patients: Toho University Omori Medical Center, two patients: Toho University Ohashi Medical Center, one patient: Keio University) were enrolled, and were 14 males and 11 females, aged 71.7 ± 4.49 years [mean \pm standard deviation (SD)]. The background factors determined at the time of enrollment were age, sex, duration of PD morbidity, complications, findings on the basis of NPI, MMSE, UPDRS-III and the Hoehn–Yahr classification (Table 2).

None of the 25 enrolled subjects infringed the exclusion criteria or failed to meet the inclusion criteria. Five subjects were withdrawn due to adverse events, and one dropped out as a result of non-compliance with the study protocol that involved refusal to take the study drug. In this study, five subjects dropped out due to trivial side effects. One event was a drug rash and two were listlessness but recovery from these occurred as a result of a discontinuing administration of YKS. The two events were cases of hypokalemia. Recovery was achieved by a discontinuing of the YKS administration or treatment with a potassium preparation. No serious adverse reactions occurred during

Table 1 Entry criteria for the patients to the study

| Inclusion criteria | |
|--|--|
| Age from 20 to 79 years, and of either sex | |
| A score of at least 4 was found for at least one NPI subscale item | |
| The MMSE score was at least 24 | |
| The serum potassium concentrations were within the relevant clinical institution's specified range | |
| Exclusion criteria | |
| Patients diagnosed as having dementia on the basis of DSM-IV | |
| Patients with severe complications, including cardiac, hepatic, renal or hematopoietic disorders or malignancies, or with other complications judged to be life threatening | |
| Patients allergic to the study drug | |
| Patients who cannot be administered drugs orally | |
| Patients who are not competent to give informed consent | |
| Patients with whom the dose and/or regimen of antiparkinsonian agents has been changed within 4 weeks before the initiation of administration | |
| Patients administered one or more of the following agents within 4 weeks before the initiation of administration: antipsychotic agents, tiapride hydrochloride, anxiolytic agents, antidepressant agents and Kampo medicines other than the study drug | |
| Patients whose care giver is unable to visit the hospital during the scheduled study period | |
| Patients administered other study drugs within 3 months before the scheduled administration initiation date | |
| Patients whose participation is judged by the investigator or sub-investigator to be inappropriate for any other reason | |

Patients were included in the study if found to meet the inclusion criteria after an assessment on the basis of the neuropsychiatric inventory (NPI) (Cummings et al. 1994), the Mini-Mental State Examination (MMSE) (Folstein et al. 1975), and serum potassium concentration measurement, 4 weeks before, and at the initiation of administration. YKS includes Glycyrrhizae Radix, and sufficient care is, therefore, needed with respect to the possibility of hypokalemia with measurement of serum potassium concentration (Conn et al. 1968). In addition, patients to whom one or more of the criteria applied were excluded from the study

Table 2 Baseline characteristics of 25 patients with Parkinson's disease

| Characteristic | YKS group |
|--|-----------------|
| Sex, males:females | 14:11 |
| Age, mean \pm SD (years) | 71.7 \pm 4.49 |
| Duration of illness, mean \pm SD (years) | 8.07 \pm 6.35 |
| Complications, presence:absence | 23:2 |
| Test scores, mean \pm SD | |
| NPI | 14.6 \pm 8.14 |
| MMSE | 27.4 \pm 2.06 |
| UPDRS | 28.7 \pm 9.89 |
| Hoehn–Yahr | 2.76 \pm 0.78 |

MMSE Mini-Mental State Examination, NPI neuropsychiatric inventory, UPDRS Unified Parkinson's Disease Rating Scale, YKS yokukansan