

遺伝子の解明が望まれる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kaseda Y, Kawakami H, Matsuyama Z, Kumagai R, Toji M, Komure O, Nishimura M, Izumi Y, Udaka F, Kameyama M, Nishio T, Sunohara N, Kuroda Y, Nakamura S. Spinocerebellar ataxia type 6 in relation to CAG repeat length. *Acta Neurol Scand.* 99(4):209-12,1999

Kitamura T, Miyachi T, Nakamura S, Kawakami H. Identification and analysis of the promoter region of the human neuroD-related factor (NDRF). *Biochim Biophys Acta* 1999 Apr 14;1445(1):142-147

Miyachi T, Kitamura T, Maruyama H, Nakamura S, Kawakami H. Structure and regulation of the human NeuroD (BETA2/BHF1) gene. *Molecular Brain Research* 1999 Jun 8;69(2):223-231

Matsuyama Z, Wakamori M, Mori Y, Kawakami H, Nakamura S, Imoto K. Direct Alteration of the P/Q-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Property by Polyglutamine Expansion in Spinocerebellar Ataxia 6. *J. Neurosci.* 1999 19: RC14

Matsuyama Z, Kawakami H, Maruyama H, Harada H, Nakata K, Yamaguchi Y, Nakamura S. Variation in the number of CAG repeats in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in the Japanese population. *J Neurol Sci* 1999 Jun 15;166(1):71-3

Kawakami H, Takai S, Maruyama H, Torii T, Kitamura T, Miyachi T, Nakamura S. Assignment of Neurod1 to rat chromosome 3 band 3q24-q32 and mouse chromosome 2 band 2E2-E3 by in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics* 1999, 86:3-4:325-326.

### 2. 学会発表

[第96回日本内科学会総会、東京、1999.3.30-4.1]

村田芳夫、渡辺千種、川上秀史、井門ゆかり、丸山博文、松山善次郎、三森康世、中村重信、山口慎也。 Machado-Joseph 病、脊髄小脳失調症 6 型、孤発性オリープ橋小脳萎縮症の頭部 MRI 画像の特徴

[第17回日本神経治療学会総会、横浜、1999.6.10-11]

川上秀史、井門ゆかり、今川潤、木下彩栄、重本隆一、中村重信。免疫療法で改善した神経細胞抗体陽性の若年発症小脳失調症の一例

[第66回日本神経学会中国・四国地方会、岡山、1999.6.26]

尾木浩、末成和義、宮地隆史、池田順子、井上健、川上秀史、原田俊英、三森康世、中村重信。シェーグレン症候群に脊髄小脳変性症を合併した2例

[第29回日本脳波・筋電図学会学術大会、東京、1999.11.10-12]

満岡恭子、加世田ゆみ子、中野葉子、熊谷留美、江春輝、川上秀史、中村重信。脊髄小脳変性症の聴覚性事象関連電位

熊谷留美、加世田ゆみ子、川上秀史、中村重信。脊髄小脳失調症6型(SCA6)の電気生理学的検討～統計学的アプローチ

## G. 知的所有権の取得状況

なし。

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)  
分担研究報告書

南九州・沖縄地方における脊髄小脳失調症 (SCA) の分子疫学と  
その自然経過についての検討

分担研究者 中川 正法 鹿児島大学医学部第三内科

研究要旨

目的：南九州・沖縄地方における SCA の分子疫学とその自然経過を解明する。方法：1992年以降に SCA を疑われ当科にて遺伝子診断を行った169家系186例について、SCA1, 2, 3, 6, 7, 8, DRPLA, Freidreich 失調症の遺伝子検査を行った。また、SCA 6の臨床経過を検討した。結果：MJD 5家系5例、SCA6 13家系15例、DRPLA 4家系4例をみとめ、既知の異常を示さない例は147家系であった。SCA 615例(男:女=9:6)の平均発症年齢51歳、平均罹病期間 11.5 年であった。CAG リピート21回例と25回例では、発症年齢に有意差を認めた。初発症状は、歩行障害、構音障害以外に「めまい」「めまい感」の訴えが多くみられた。1例のみが70歳前後より寝たきりとなっていた。結論：南九州・沖縄地方における SCA 分子疫学と SCA 6の自然経過の一面を明らかにした。

研究協力者

鹿児島大学医学部第三内科

池田賢一 大窪隆一 高嶋 博

有村公良 納 光弘

国立療養所沖縄病院神経内科

末原雅人 平田圭子

鹿児島市医師会病院神経内科

園田 健

SCA6 の臨床経過・症状については、調査票を作成し初診時の調査を行った。更に、可能な例については継続的にその臨床症状を評価検討した。

遺伝子検査のために採血を行う際には、“診断に関すること”と“DNA の保存に関すること”について患者または家族に説明した。具体的には、検査の意義、方法、その限界、検査をする場所と責任者の明示、プライバシーは最大限守られること、再検査の可能性を考慮し、少なくとも一年間は遺伝子を保存することを説明した。1年以上の保存に関しては、保存はいつでも拒否できること、病気の原因を調べたり、治療法の開発のために用いる可能性のあることを説明した。以上の点についてインフォームドコンセントを得た場合に、検査同意文書に署名捺印を頂いた。以上より、本研究は倫理面で問題はないと判断した。

A. 研究目的

南九州・沖縄地方では、北海道・東北地方と異なり、SCA1, 2などは現在までのところ非常にまれである。一方、同地方では、既知の遺伝子異常を認めない脊髄小脳失調症 (SCA) 家系が多く認められる。本研究では、南九州・沖縄地方における SCA の分子疫学を明らかにし、既知の遺伝子異常を示す例についてその自然経過を解明することである。今回は、SCA 6の臨床経過の中心に検討したので報告する。

B. 研究方法

対象は、1992年以降に SCA を疑われ当科にて遺伝子診断を行った169家系186例である。末梢血より DNA を抽出し、PCR 法にて SCA1, 2, 3, 6, 7, 8, DRPLA, Freidreich 失調症の遺伝子診断を行

C. 研究結果

遺伝子検索の結果、169家系中に SCA3/MJD 5家系5例、SCA6 13家系15例、DRPLA 4家系4例をみとめ、既知の異常を示さない例は147家系であった(表1)。既知の遺伝子異常を示さなかった147家系中には、常染色体優性遺伝と考えられる10家系、常染色体劣性遺伝1家系を認めた。

SCA6 の 13 家系 15 例の CAG リピート数は、21 回から 25 回であった。SCA6 の母息子例 1 家系で明らかな表現促進現象を認めた。

表 1. SCA169 家系の遺伝子検索の結果

SCA3/MJD	5 家系	5 例
SCA6	13 家系	15 例
DRPLA	4 家系	4 例
既知の異常を示さない例	147 家系中	
常染色体優性遺伝	10 家系	
常染色体劣性遺伝	1 家系	

SCA6 15 例（男性 9 例，女性 6 例）中，家族例が明らかな例 9 例，平均発症年齢 51 歳，罹病期間 4 - 46 年（平均 11.5 年）であった（表 2）。

表 2. SCA6 13 家系 15 例のプロフィール

男女比	9 : 6
家族歴	あり 9 家系 11 例（73%） なし 4 家系 4 例（27%）
検査時年齢	62.1 歳
発症年齢	15 例 50.5 歳
	CAG21 61.3 歳 } CAG25 36.0 歳 } p=0.024
罹病期間	11.5 年（4 - 46 年）

初発症状は，歩行障害・構音障害以外に「めまい」「浮遊感」の訴えが多くみられた（表 3）。15 例中 1 例のみが 70 歳前後より寝たきりとなっていた。各症状の推定発現年齢または診察上はじめて症状が確認された時点の平均年齢を表に示す（表 4）。

#### D. 考察

SCA6 は，発症年齢も高く，進行も緩徐であるためにその自然経過を明らかにする上で困難な点もあるが，今後，長期の追跡調査および家系調査を継続的に行い，SCA6 をはじめ他の遺伝性脊髄小脳変性症の南九州・沖縄地方における分子疫学とその自然経過を明らかにして行く必要がある。

表 3. 検討した SCA6 15 例の初発症状

歩行障害	6 例
構音障害	4 例
めまい	3 例
浮動感	2 例
書字困難	1 例

（重複あり）

#### E. 結論

南九州・沖縄地方における SCA の分子疫学と SCA6 の自然経過について検討した。疫学調査を継続し，同地方における SCA の分子疫学とその自然経過を明らかにして行きたい。

#### F. 研究発表

該当なし

#### G. 知的所有権の取得状況

該当なし

表 4. SCA6 の臨床経過（SCA15 例）

症状・所見	出現年齢	例数	%
めまい	45.8 歳	6	40
片足立ち不可	51.5 歳	8	53
つぎ足歩行不安定	53.3 歳	7	47
体幹失調	54.8 歳	10	67
複視	55.5 歳	2	13
歩行障害	56.6 歳	13	87
四肢運動失調	57.2 歳	12	80
眼振	57.3 歳	12	80
構音障害	57.6 歳	11	73
衝動性眼球運動	59.3 歳	9	60
杖歩行	59.8 歳	5	33
つぎ足歩行不能	62.1 歳	9	60
車椅子使用	65.5 歳	2	13
眼球運動制限	66.0 歳	3	20
嚥下障害	70.0 歳	3	20
寝たきり	77.0 歳	1	7

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)  
分担研究報告書

SCA6染色体の連鎖不平衡解析

分担研究者 佐々木秀直 北海道大学神経病態学講座神経内科

共同研究者 矢部一郎<sup>1)</sup>、山下 功<sup>1)</sup>、田代邦雄<sup>1)</sup>、滝山嘉久<sup>2)</sup>、西澤正豊<sup>3)</sup>、羽田 明<sup>4)</sup>、井ノ上逸朗<sup>5)</sup>、  
大西晃生<sup>6)</sup>、法化図陽一<sup>7)</sup>、永松啓爾<sup>7)</sup>、織田辰郎<sup>8)</sup>、貴田秀樹<sup>9)</sup>、鈴木義広<sup>10)</sup>

所属：1)北海道大学神経病態学講座神経内科、2)自治医科大学神経内科、3)国際医療福祉大学臨床医学研究センター、4)旭川医科大学公衆衛生、5)群馬大学生体調節研究所遺伝情報分野、6)産業医科大学神経内科、7)大分県立病院、8)国立下総療養所、9)貴田神経内科病院、10)山形県立日本海病院

研究要旨:SCA6変異の由来を検討する目的で、21 家族と非血縁患者 25 人について、CACNA1A を含む 4cM の範囲に在る D19S840、D19S226、D19S885、CACNA1A 第7イントロン内の D19S1150、第8エクソン nt1457G→A(C/D)、第16エクソン nt2369G→A(A/B)の1塩基置換多型(SNPs)を解析し、各アリル頻度を対照(健常者172人)と比較した。その結果、遺伝子内多型のハプロタイプは17家系が“5-C-B”、4家系が“1-C-B”であった。5-C-Bは患者群の49%、対照群の11%であった(p<0.001)。同じく1-C-Bは患者群で5%、対照群では0%であった。SNPsハプロタイプは、患者群の70%と対照群の45%が“C-B”であった(p<0.001)。以上より、SCA6変異は母集団において頻度の高い特定の染色体に由来し、その染色体上にCAGリピート伸長を助長する因子が在るものと推定された。

A. 研究目的

SCA6 は P/Q タイプ Ca チャンネル  $\alpha_{1A}$  サブユニット遺伝子 (CACNA1A) エクソン 47 内の CAG リピートが軽度伸長して発症する遺伝性小脳皮質萎縮症である。SCA6 は本邦に多いと推定されるが、その背景にある理由については良くわかっていない。そこで、リピート伸長の分子機構に拘わる手がかりを得ることを目的に、SCA6 変異の由来を検討した。

B. 研究方法

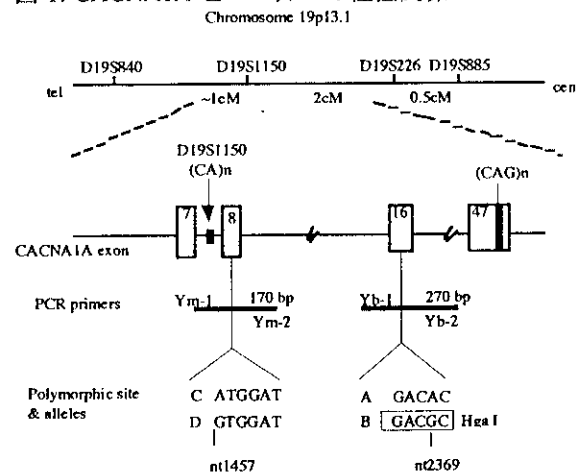
対象は SCA6 と確定診断された非血縁の患者 25 人、ならびに同胞発症によりハプロタイプ解析が可能な 21 家系である。対照は健常者 172 名である。CACNA1A を含む 4 cM 内に位置しているマイクロサテライトの中から、D19S840、D19S1150、D19S226、D19S885 について多型解析した。特に D19S1150 は CACNA1A イントロン 7 に位置している。同時に CACNA1A 内のエクソン 8 内 nt1457 G→A (C/D) 及びエクソン 16 内 nt2369 G→A (A/B) の 1 塩基置換多型 (SNPs) についても解析した (図 1)。マイクロサテライトについては、PCR 法により増幅した後、蛍光ジーンシーケンサーにより多型解析を行った。エクソン 8 の SNP {nt1457 G→A (C/D)} については Ym-1 (5'-ATACTCTGGCT TTTCTATGC-3') と mismatch プライマー Ym-2 (5'-TTTCATCCTCGG CGAGGATCACCTCTTCTGCTTTTGTAGATCGA-3') により増幅した制限酵素 Cla-I にて消化し、2%アガロース電気泳動を行って検出した。同じく、エクソン 16 の SNP

{nt2369G→A(A/B)}については、プライマー Yb-1 (5'-TCCACAGCTG-CATCTCCAAG-3') と Yab-2 (5'-ACCCCTCCCTTGAGCCCCCT-3') により制限酵素 Hga-I 認識部位を導入して、多型を検出した。発症者及び対照群のハプロタイプについてはコンピュータソフト GENEF (Jeunemaitre et al, Am J Hum Genet 1997;60:1448-60) により統計学的に推定した。2 群間の比較はカイ二乗検定によった。

(倫理面での配慮)

遺伝子分析については、口頭で説明し、あらかじめ了解を得た上で行った。

図 1. CACNA1A とマーカーの位置関係。



### C. 研究結果

ハプロタイプ解析により決定された 21 個の SCA6 染色体と対照群の間では、CACNA1A 遺伝子より末端側の D19S840 に関しては有意差を認めなかった(表 1)。一方、第 7 イントロンに位置する D19S1150 の allele “5”(p<0.0001) と “1”(p<0.005) は SCA6 に有意に頻度が高かった。SCA6 染色体においてエクソン 8 内 nt1457 の SNP は全て “C” であり、同じく第 16 エクソン内 nt2369 の SNP においても全て “B” であり、共にその頻度は対照に比して有意に高かった。CACNA1A より動原体側の D19S226 と D19S885 についても SCA6 染色体と連鎖している allele 頻度に有意な偏りが認められた。

表 1. SCA6 染色体と対照でのアリル頻度の比較

多型部位	SCA6 (n=21)		対照群		有意差
	allele No	頻度	頻度	$\chi^2$	
D19S840	2	55%*	45% <sup>a</sup>	0.47	n.s.
	7	40%	30% <sup>a</sup>	0.63	n.s.
D19S1150 (intron 7)	5	81%	17% <sup>b</sup>	51.23	p<0.0001
	1	19%	2% <sup>b</sup>	22.63	p<0.005 <sup>§</sup>
nt1457 (exon 8)	C	100%	65% <sup>c</sup>	11.33	P<0.001
	B	100%	72% <sup>c</sup>	8.18	P<0.005
D19S226 (exon16)	10	57%	14% <sup>a</sup>	22.79	p<0.0001 <sup>§</sup>
D19S885	2	70%*	32% <sup>a</sup>	10.47	p<0.005

\*n=20, n. s.: not significant. <sup>§</sup>Fisher's exact probability test.. n =318<sup>a</sup>, 388<sup>b</sup>, 344<sup>c</sup>.

D19S1150-エクソン 8/16 SNPs-ハプロタイプ解析では 21 家系中 17 家系が “5-C-B”、他の 4 家系は “1-C-B” であった。発端者 25 名 (=50 alleles) のハプロタイプを GENEF により推定すると 5-C-B は患者群で 49% であり対照群の 11% に比較して有意に高頻度であった (p<0.001)。同じく 1-C-B は患者群では 5% で、対照群では 0% であった(表 2)。さらに SNP ハプロタイプに限って比較してみると、患者群の 70% 及び対照群の 45% が “C-B” であり、患者群に有意に高頻度であった (p<0.001)。“D-B” ハプロタイプは対照群では 27% であるが、SCA6 群には認められなかった(表 3)。

表 2. C/D-A/B ハプロタイプ頻度の推定値.

	SCA6 患者 (allele = 50)	対照 (allele = 344)
C-B	0.70	0.4470*
D-B	0	0.2710
C-A	0.12	0.1984
D-A	0.18	0.0836

\*  $\chi^2 = 11.14$  (df=1), p<0.001

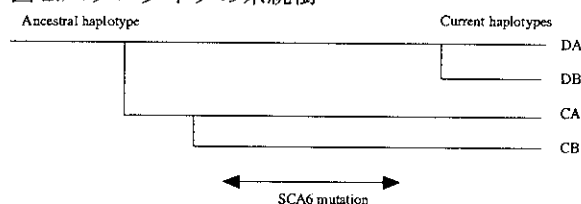
表 2. D19A1150-C/D-A/B ハプロタイプ頻度

D19A1150- C/D-A/B ハプロタイプ	SCA6 患者 (allele =50)	対照 (allele =332)
1-C-B	0.0515	0
3-C-B	0.0225	0.0687
5-C-B	0.4858	0.1068*
6-C-B	0.0957	0.1282
9-C-B	0.0245	0.0968
10-C-B	0.0200	0.0435
3-D-B	0	0.0223
5-D-B	0	0.0205
6-D-B	0	0.0727
8-D-B	0	0.0281
9-D-B	0	0.1233
1-C-A	0.0285	0
5-C-A	0	0.0304
6-C-A	0.0715	0.0505
8-C-A	0	0.0198
9-C-A	0.020	0.0721
10-C-A	0	0.0248
3-D-A	0.0375	0.0144
5-D-A	0.0542	0.020
6-D-A	0.0328	0.0407
8-D-A	0	0.0123
9-D-A	0.0555	0
10-D-A	0	0.004

$\chi^2 = 46.69$  (df=1), p<<0.001

ヒト CACNA1A とのホモロジーを検討した結果、ラット及びラビットでは第 8 エクソンの SNPs は “D”、ラットにおけるエクソン 16 の SNPs は “A” であった。以上の結果から、“D-A” ハプロタイプが発生的に最も古いこと、SCA6 の変異は、D-A ハプロタイプから D-B が分離する以前に生じたと推定される(図 2)。

図 2. ハプロタイプの系統樹



### D. 考察

血縁関係から決定された 21 個の SCA6 染色体のハプロタイプを見てみると 19% が “1-C-B” であったが、残りは全て “5-C-B” であった (81%)。CACNA1A 遺伝子内多型にもとづいたハプロタイプ解析からは、この 2 つのハプロタイプのみが認められ、しかも SNPs からみると全てが “C-B” ハプロタイプであった。これらの結果は、家系解析のみならず他の非血縁の患者 25 人のハプロタイプを統計学的に推定した結果とも一致して

いる。対象とした患者家族は北海道在住の者が多いが、本州、九州の家系も含まれている。しかも、道内の患者の祖先が広く日本国内各地よりの移住者の子孫であることを考えると、今回の結果は日本人の SCA6 ハプロタイプの概略を反映していると考えられる。コントロールの結果を考慮すると“C-B”ハプロタイプは母集団アレルの70%を占め、最も頻度が高いと推定される。以上の結果は、SCA6 変異が C-B ハプロタイプを有する染色体に由来する可能性の高いことを示唆している。

CACNA1A の CAG リピート数は正常では7及び11-13 リピートのものが最も頻度が高く、20リピート以上に伸長する SCA6 としての症状を呈し得る。15-19 リピート数の境界領域のアレルは欧米では稀であるが、我が国では数%を占めることから、SCA6 の罹患率との関連で注目されてきた。これら中間サイズのアレルが全て“C-B”ハプロタイプか否かを検討する必要がある。SCA6 アレルが全て単一の“C-B”ハプロタイプを有していたことは、CACNA1A 遺伝子の CAG リピート伸長を助長する何らかの因子が存在していることを示している。同様のことは、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症においても知られている。SCA6 染色体で D19S1150 の allele が2つ認められていることから、C-B ハプロタイプを有する複数の染色体より SCA6 変異が生じたものと推定される。

## E. 結論

SCA6 変異は母集団において頻度の高い特定の染色体に由来し、その染色体上に CAG リピート伸長を助長する cis-acting factor が存るものと推定される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 矢部一郎、佐々木秀直、山下 功、柳原哲郎、田代邦雄. 繰り返す“めまい”で発症し、15年経過してなお、“めまい”が主症状の spinocerebellar ataxia type 6 の1例. 神経内科 51:75-78, 1999.
- 2) Matsuura T, Sasaki H, Yabe I, Hamada K, Hamada T, Shitara S, Tashiro K. Mosaicism of unstable CAG repeats in the brain of spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2). J Neurol 246: 835-839, 1999.
- 3) Shiojiri T, Tsunemi T, Matsunaga T, Sasaki H, Yabe I, Tashiro K, Nishizawa N, Takamoto K, Yokota T, Mizusawa H. Vocal cord abductor paralysis in spinocerebellar ataxia type 1. J Neurol Neurosurg Psychiatry 67: 695, 1999.
- 4) 矢部一郎、佐々木秀直、山下 功、武井麻子、深澤俊行、濱田 毅、田代邦雄. Spinocerebellar

ataxia type 6 (SCA6)におけるアセタゾラミドの治療効果. 臨床神経 39: 793-799, 1999.

- 5) Pang J, Allotey R, Wadia N, Sasaki H, Bindoff L, Chamberlain S. A common disease haplotype in spinocerebellar ataxia 2 (SCA2) pedigrees of diverse ethnic origin. Eur J Hum Genet: 841-845, 1999.
- 6) 佐々木秀直. SCA1 の遺伝子変異と異常遺伝子産物 ataxin-1 の生物学的活性と神経変性機序. 日本臨床 57:801-804, 1999.
- 7) 佐々木秀直、三瓶 一弘. CAG リピートの異常伸長に伴う脊髄小脳変性症2型(SCA2)の臨床的多様性. 日本臨床 57:818-821, 1999.
- 8) 佐々木秀直、田代邦雄. 日本におけるトリプレットリピート病の疫学調査と頻度統計 -脊髄小脳変性症を中心に-日本臨床 57:787-791, 1999.
- 9) 佐々木秀直. SCA1 Clinical Neuroscience 17: 390-391, 1999.
- 10) 佐々木秀直. SCA2 Clinical Neuroscience 17: 392-393, 1999.
- 11) 佐々木秀直、菊地誠志. SCA4. Clinical Neuroscience 17: 394, 1999.
- 12) 佐々木秀直、田代邦雄. Spinocerebellar ataxia type 4 (SCA4). 日本臨床 1999年別冊「神経症候群 II」, 280-282, 1999.
- 13) 佐々木秀直、田代邦雄. Spinocerebellar ataxia type 5 (SCA5). 日本臨床 1999年別冊「神経症候群 II」, 283-284, 1999.
- 14) 佐々木秀直、田代邦雄. Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7). 日本臨床: 1999年別冊「神経症候群 II」, 285-287, 1999.
- 15) 佐々木秀直、田代邦雄. 脊髄小脳変性症. 別冊・医学のあゆみ「神経疾患 state of arts」ver.1, 534-537, 1999.

### 2. 学会発表

- 1) Yamashita I, Sasaki H, Yabe I, Takada A, Tashiro K, Shiraishi K, and Hata A. A distinct form of dominantly inherited late-onset pure cerebellar ataxia associated with maternal anticipation and intermittent axial tremor. 124th Annual Meeting of the American Neurological Association. Ann Neurol 46: 480, 1999 (abstract 134).
- 2) Yabe I, Sasaki H, Yamashita I, Takada A, Hamada T, Tashiro K, Suzuki Y, Kida H, Takiyama Y, Nishizawa M., Hokezu Y, Nagamatsu K, Oda T, Ohnishi A, Inoue I, Hata A. Founder effect, ancestral haplotype, and predisposing chromosome of SCA6 in the Japanese. 124th Annual Meeting of the American Neurological Association. Ann Neurol 46:480, 1999 (abstract 133).

G. 知的所有権の取得状況  
該当なし。

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)  
分担研究報告書

本邦の優性遺伝型Holmes型失調症(AD-CCA)原因遺伝子は、SCA4遺伝子座に存在する

分担研究者 水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学

共同研究者 高島 実、長岡詩子、石川欽也  
東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学

#### 研究要旨

本研究では、本邦に多くかつ原因遺伝子が判明していない常染色体優性遺伝型 Holmes型失調症の6家系を集積し連鎖解析を行った。臨床的に本家系は発症年齢が平均 55.9歳と比較的高齢で、軽度の世代間促進現象が見られる純粋小脳失調症を示すことを特徴とした。連鎖解析の結果、本6家系は第16番染色体長腕上のマーカーD16S3050やD16S3107と強く連鎖することを見出した。さらに、ハプロタイプや多点連鎖解析から本家系の原因遺伝子はD16S3089 と D16S515の間の約 10.9 cM領域に存在する可能性が高いと考えられた。本家系の遺伝子座は、既に米国から1家系報告されている脊髄小脳失調症4型(SCA4)の遺伝子座と同一であったが、SCA4で見られる末梢神経障害や錐体路徴候は本家系患者には見られず、臨床的にはかなり異なる病型が同一遺伝子座に連鎖することが判明した。

#### A. 研究目的

常染色体優性遺伝型小脳失調症 (autosomal dominant cerebellar ataxia: ADCA) は、臨床的にも遺伝子レベルでも様々な疾患の集まった疾患概念といえる。もっとも広く用いられている Harding の分類によると、ADCA は 3 病型に分類することが可能で、ADCA type I は進行性の小脳症状に加えて小脳性以外の神経障害、すなわち錐体路徴候や錐体外路徴候、末梢神経障害などを有する病型で、分子レベルでの原因解明が進んでいる今日では、脊髄小脳失調症 1 型(SCA1)、SCA2、Machado-Joseph 病(MJD)、SCA4 などがこれに分類されるのが妥当と考えられている。また ADCA type II は視神経変性 (macular degeneration) を伴うことが古くから特徴とされており、SCA7 が相当する。一方、ADCA type III は、小脳失調失調症状のみに終始することが特徴とされ、本邦の分類ではいわゆる Holmes 型失調症に相当すると思われる。遺伝子レベルでは SCA5、SCA6、SCA10、SCA11 がこの範疇に含

まれる。このように、ADCA の病型が遺伝子レベルで再分類され、その原因解明とともに本邦における各病型の頻度が明らかになってきているが、一方ではどの脊髄小脳失調症 (SCA) にも該当しない病型があることも判明してきた。

我々は、臨床的に ADCA type III に相当する家系で、SCA6 など既知の遺伝子変異を認めない家系を集積してきた。本研究ではその原因遺伝子を解明するための first step として、連鎖解析を行い、その遺伝子座を明らかにした。

#### B. 研究方法

対象は 6 家系、発症者 28 名を含む合計 56 名である。6 家系中 1 家系は大分県出身の家系であるが、残る 5 家系は茨城県出身の家系である。いずれの家系でも、本研究の内容と意義を説明するだけでなく、対象者に及ぼす不利益がないこと、研究を通して得られた種々の情報に関してプライバシーを保護することなどについて詳しく説明をし、同意を得た上で家系調査を行った。

方法は、臨床的検索としては診察により詳細な神経学的所見を集積した。通院中の患者のみならず、通院が困難な患者の場合、検者が訪ねる形で複数回診察するように努めた。発症年齢は、本人のみならず家族が発症に気付いた時期の年齢を参考にし、十分信頼できる場合以外は不明とした。世代を経る毎に発症年齢が早くなる、いわゆる表現促進化現象(anticipation)については、親子間の発症年齢の差を算出し、有意差を Mann-Whitney U 検定にて解析した。

臨床検査では、可能な限り頭部 MRI による画像検査を行い、小脳を中心とした脳病変の有無を検索した。電気生理学的には末梢神経伝導速度検査と脳波検査を最低各家系の発端者については行った。

分子遺伝学的検索では、まず同意を得た上で末梢静脈血液を採取し各人から DNA を抽出した。次に、ヒト常染色体を広く検索するため、Cooperative Human Linkage Center (CHLC)、あるいは Genethon から多型性 DNA マーカーを約 10 から 20 cM 程度の距離で約 250 個選択した。各マーカーについて各人の遺伝子型(genotype)を PCR 法を用いて全自動 DNA シークエンサー上で決定し、連鎖の有無を検討した。連鎖解析にはコンピューターソフトウェア LINKAGE (ver 5.1) を用いた。さらに連鎖の可能性を否定できない場合には、近傍のマーカーを選定し、詳細に連鎖解析を行った。なお浸透率は、発症年齢の分布から 5 段階に区分し、遺伝子頻度は有病率から 10 万分の 1、男女間での組み換え率の差はないものとして解析を行った。

## C. 研究結果

### 臨床所見

集積した 6 家系の発症年齢は、45~72 歳で、平均は 55.9 歳であった。親子間での発症年齢の差は平均で 4.9 歳、子が親より若く発症しており、軽度ながら有意な差が見られた( $p=0.046$ )。

臨床症状では、全例で歩行運動失調(gait ataxia)が見られ、かつ経過中最も程度の強い症状であった。また四肢筋トーンスの低下や小脳性

構音障害(いずれも 92.6%)が高率に見られ、側方注視時の水平性眼振(63.0%)を伴う例が多かった。一方、感覚障害はほとんどの例で明らかなものではなく、発症後 25 年を経過した 85 歳男性例に軽度の振動覚低下を認めた程度であった。腱反射は、多くの例で正常で、反射の異常な亢進や消失、Babinski 徴候は見られなかった。

頭部 MRI では、小脳虫部に最も萎縮が明らかで、虫部、半球部ともに上面優位の萎縮が見られた。一方、脳幹の萎縮は明らかではなかった。神経伝導速度や脳波は検索した範囲では全て正常であった。

### 連鎖解析

6 家系との連鎖の有無をすべての常染色体について広く検索した。その結果第 16 番染色体上のマーカー D16S752 との間に組み換えを認めず、2 点連鎖解析では合計ロッド値が最大 1.52 ( $\theta=0.10$ ) を示し、連鎖の可能性が認められた。このため、同マーカーの近傍のマーカーを用いてさらに詳細に検索した。Genethon によると、各マーカー間の距離は centromere 側から順に D16S3089-5.0 cM- D16S3050- 0.2 cM- D16S3043- 1.3 cM- D16S3107- 5.8 cM- D16S515- 0.5 cM- D16S3051- 6.7 cM- D16S516- 4.8 cM- D16S507 であった。その結果、D16S3050、D16S3043、D16S3107 では組み換えが認められず、D16S3089、D16S515 でも少数の組み換えを認めるに留まった。2 点連鎖解析を行うと、いずれの家系でも有意な連鎖を証明するには至らなかった。しかし、遺伝的異質性を検討する HOMOG の結果では、6 家系での遺伝的異質性は棄却する結果であった。ロッド値を合計した場合、最大ロッド値は 3 を大きく越え、強く連鎖を支持する結果を得た。

ハプロタイプを解析すると、centromere 側では D16S3089 と D16S3050 の間で組み換えを認め、telomere 側では D16S3107 と D16S515 との間で組み換えを認めた。しかし D16S3050、D16S3043、D16S3107 の 3 つのマーカーに関しては組み換えを認めず、遺伝子座は



D16S3089 と D16S515 の間に存在すると考えられた。

また多点連鎖解析では、D16S3107 付近で最大ロッド値が 9.25 に達し、Zmax-1 による support interval はやはり D16S3089 と D16S3050 の間の約 10.9 cM 領域であると考えられた。この領域は SCA4 遺伝子座にほぼ一致していた。

#### D. 考察

今回我々は本邦に存在する ADCA type III, あるいは常染色体優性遺伝型 Holmes 型失調症 (ADCCA) の範疇に属する家系群が、第 16 番染色体長腕の約 10.9 cM 領域に連鎖することを報告した。この領域は結果的に別の ADCA である、SCA4 の遺伝子座であった。したがって、SCA4 遺伝子座のある遺伝子変異により常染色体優性遺伝型の純粋な小脳失調症が起きるといえる。

SCA4 は、米国から 1 家系のみ報告されている稀な病型であり、臨床的には平均 45 歳程度で発症し、緩徐進行性の小脳失調症状を示す以外に、末梢神経障害が全例で認められることが特徴である。また、Babinski 徴候が 20% 程度に見られる。したがって、SCA4 は先の Harding の分類では ADCA type I に分類される病型であり、小脳失調症上以外には臨床的な附随症状があまりない本家系の臨床像とは大きく異なるものである。本家系の原因遺伝子が SCA4 原因遺伝子と同一なものかあるいは同一遺伝子内の異なる変異なのか (allelic disease), 同一遺伝子座内ではあるが全く異なる遺伝子の変異なのか、今後の研究により解明してゆく必要がある。

#### E. 結論

本邦に存在する常染色体優性遺伝型の Holmes 型失調症の、少なくとも一部の家系の原因遺伝子は SCA4 遺伝子座と同じ 16 番染色体長腕領域に存在することが判明した。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

A gene in the SCA4 locus causes autosomal dominant pure cerebellar ataxia (ADCA III). H. Mizusawa et al. The Inherited Ataxias, National Ataxia Foundation, 1999 年 10 月 13 日, シアトル, アメリカ合衆国.

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)  
分担研究報告書

Spinocerebellar ataxia type7 遺伝子異常と脳機能解析

分担研究者 津田 丈秀 東北大学医学部神経内科  
共同研究者 丹治宏明、小野寺好明、糸山泰人 東北大学医学部神経内科

研究要旨：日本人 Spinocerebellar ataxia (SCA) type7 の脳糖代謝を含めた臨床像と遺伝子異常を検討した。48/10 CAG repeats の例では眼症状を初発とし、後に小脳症状が加わった。一方、47/10 repeats の例では小脳症状の後に眼症状が加わり初発症状の違いを認めた。脳糖代謝をみると 48/10 repeats の例では両側前頭葉から頭頂 - 側頭葉、脳幹及び小脳の広範な領域において  $^{18}\text{F}$ -FDG の取り込み低下を認めた。47/10 repeats の例では両側側頭葉下部、脳幹及び小脳において  $^{18}\text{F}$ -FDG の取り込み低下を認め脳機能障害の違いを認めた。この結果は異常遺伝子の病態発現に与える影響を考慮する上で注目に値する。

A. 研究目的

SCA7 は黄斑・網膜変性を特徴とし、CAG repeat の異常伸長を原因とする常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症である。これまで、臨床及び遺伝子学的特徴は日本人を除く幾つかの人種で報告されている。欧米の報告によると、CAG 49 repeat 以上の例では眼症状を初発とし、その後小脳症状を含む多彩な神経症状が加わる傾向があるとされる。一方、それ以下の repeat 数の例では小脳症状初発後に眼症状が加わり臨床所見もさほど多岐には及ばないとの報告である。しかし、日本人 SCA7 発症は稀なため脳機能を含めた臨床像と病的遺伝子の病態発現に及ぼす影響を検討した報告はない。そこで、我々は、脳糖代謝をはじめとする臨床像と遺伝子異常を日本人 SCA7 において検討し遺伝性脊髄小脳変性症病態究明の試みをおこなった。

B. 研究方法

東北地方における日本人常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症発端者 177 例を本人同意のうえ遺伝子検索を施行した。同検索例のうち 2 家系の発端者の chr.3p12-13 に CAG 異常伸長を認め SCA type7 と同定した。各発端者は 27 歳男性(症例 1)及び 46 歳女性(症例 2)であり CAG repeat 数と臨床像比較のため、これらの症例において  $^{18}\text{F}$ -FDG PET study (model SET-2400W scanner)を施行した。

C. 研究結果

症例 1 の CAG repeat は 47/10 で heterozygous type であった。20 歳時小脳症状・歩行時のふらつきを初発とし 4 年後視力障害が加わった。症例 2 の CAG repeat は 48/10 で同様に heterozygous type であった。28 歳時の視力障害から始まり 10 年後小脳症状・歩行時のふらつきが加わった。症例 1 の PET study では、両側側頭葉下部、脳幹及び小脳において  $^{18}\text{F}$ -FDG 取り込み低下を認めた。症例 2 では両側前頭葉から頭頂 - 側頭葉、脳幹及び小脳にかけ広範な  $^{18}\text{F}$ -FDG 取り込み低下を認めた。

D, E. 考察・結論

今回の結果は、CAG repeat 数が大きい例程脳障害は多岐に及び症状も複雑化する可能性のあること、また、repeat 数の違いにより初発症状は日本人でも異なる可能性のあることを示唆する。この結果は異常遺伝子が病態発現に与える影響を考慮する上で注目に値する。今後は、異常遺伝子のおよぼす病的作用メカニズムの詳細を究明する目的で両発端者の cDNA を COS-cell 及び retinoblastoma Y-79 等にトランスフェクトし、病的 ataxin7 の毒性の解析が求められる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) H. Shimizu, T. Tsuda, Y. Shiga, K. Miyazawa,  
Y. Onodera, M. Matsuzaki, I. Nakashima,  
K. Furukawa, M. Aoki, H. Kato, T. Yamazaki and  
Y. Itoyama: Therapeutic efficacy of transcranial  
magnetic stimulation for hereditary spinocerebellar  
degeneration . Tohoku J. Exp. Med. 1999  
189: 203-211

2) T. Katayama, K. Imaizumi, N. Sato, K. Miyoshi,  
T. Kudo, J. Hitomi, T. Morihara, T. Yoneda,  
F. Gomi, Y. Mori, Y. Nakano, J. Takeda, T. Tsuda,  
Y. Itoyama, O. Murayama, A. Takashima  
P.St George-Hyslop, M. Takeda and  
M .Tohyama: Presenilin-1 mutations downregulate  
the signalling pathway of the unfolded-protein  
response. Nature Cell Biology 1999 1: 479-485

# 厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業) 分担研究報告書

## 遺伝性脊髄小脳変性症の新しいポリグルタミン病遺伝子に関する研究

分担研究者 金澤一郎 東京大学医学部 神経内科教授  
共同研究者 中村 浩一郎<sup>1</sup>、市川 弥生子<sup>1</sup>、後藤 順<sup>1</sup>  
池田 修一<sup>2</sup>  
所属：<sup>1</sup>東京大学医学部 神経内科  
<sup>2</sup>信州大学医学部 第三内科

研究要旨: 伸長したポリグルタミン鎖を認識する抗体を用いて、本邦に於ける遺伝子未同定の遺伝性脊髄小脳変性症などのスクリーニングから新規の常染色体優性遺伝する変性疾患を見いだした。この疾患は TATA binding Protein 遺伝子中の CAG リピートの伸長によって引き起こされ、ハンチントン病をはじめとするポリグルタミン病と同様の疾患と考えられる。

### A. 研究目的

Trottier ら(1995)が報告した伸長したポリグルタミン鎖を強く認識するモノクローナル抗体は、伸長ポリグルタミン鎖の構造変化を鋭く捉えることが可能であり、この抗体を用いてフランスの Mandel ら(Nature 378: 403-406, 1996)が脊髄小脳失調症 2 型 (SCA2) の遺伝子のクローニングに成功したのは記憶に新しい。本邦においても、そして当教室の検討でも遺伝性脊髄小脳変性症の表現型を取りながら既知の遺伝子異常の見出せない症例が 1 / 3 近く存在する。本研究は、東大病院神経内科に蓄積された遺伝子未同定の脊髄

小脳変性症患者由来のリンパ芽球株とこの抗体(1C2 Ab)を用いて、新規のポリグルタミン病遺伝子を同定する事を目的とした。

### B. 研究方法

当教室における遺伝子未同定の遺伝性脊髄小脳変性症 24 例のリンパ芽球を出発材料として 1C2 Ab を用いて Western blot を行い、新規ポリグルタミン蛋白の有無をスクリーニングした。具体的には、患者リンパ芽球  $5 \times 10^7$  細胞を 2 ml TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7.5, 0.01% Tween 20) に懸濁し、超音波破碎後、15k rpm、30 分遠心した可溶性分画を用いた。蛋白定

量後、各 50 $\mu$ g を電気泳動し、PDVF 膜に転写し、一次抗体として 1C2 (1:2000)、二次抗体として抗マウス IgG-peroxydase 抗体 (1:5000) を用いて ECL 発色を行った。一部の PDVF 膜に関しては、stripping 後、抗 TATA binding protein (TBP) 抗体を用いて reprobing を行った。また患者リンパ芽球より抽出した genomic DNA を用いて、TBP に対する PCR と direct sequence を行い、TBP 遺伝子中の CAG リピート数を検討した。

(倫理面での配慮)

当教室では Cell line Bank および DNA の保存において患者及びその家族に口頭と文書による説明を行いインフォームドコンセントを得た上で登録するようにしている。

### C. 研究結果

24 家系中 1 例のリンパ球から分子量約 47 kDa のポリグルタミン蛋白を見出した。この 47 kDa の蛋白は TATA binding protein (TBP) に対する抗体 (Santa Cruz) とは反応しなかったが、Koide ら (*Hum Mol Genet*, 8; p2047-2053, 1999) の報告した TBP 遺伝子中の伸長ポリグルタミンによる脊髄小脳変性症の可能性を検討するため、PCR によりこの患者および同胞の TBP 遺伝子を検討

したところ、ともに正常アリルよりも約 60 bp 長い異常アリルを確認した。TBP 遺伝子中の正常 CAG リピート数が 31~42 であることより、この患者および同胞の TBP 遺伝子中の CAG リピート数 (約 55) は病的範囲と考えられた。この家系では phenotype は若年発症の常染色体優性遺伝の形式を取っていた。神経症状は①痴呆、②小脳症状、③錐体外路症状 (パーキンソニズム、ジストニア)、④腱反射亢進であり、Koide らの報告した孤発例 (低身長、知能低下、小脳症状、錐体路症状、非定型意識消失発作) とは異なる臨床像を示した。

### D. 考察

ポリグルタミン病と呼ばれる一群の神経疾患が現在まで 9 つ報告されており、これらは責任遺伝産物中の伸長したポリグルタミン鎖が何らかの機序により神経細胞死を来すものと考えられている。TATA binding protein は転写遺伝子であるが、正常でも 31~42 個のグルタミンをその蛋白翻訳領域に持つとされている。過去のポリグルタミン病の報告ではポリグルタミン鎖が約 40 リピート以上に伸長すると病的範囲であることがほとんどであり、この家系で認めた 55 リピートは病的伸長で

ある可能性が高い。今後多数正常者例における TBP 蛋白のポリグルタミンリピートの検討が必要である。Koide らが報告した孤発例と本症例との臨床症状の違いは、リピート数の違いによる phenotype の variation である可能性がまず考えられるが、発症年齢、経過年数、その他の遺伝的負因等の複数の因子が関与している可能性も考えられ、今後この疾患の多数例における検討が重要である。

#### E. 結論

当教室の遺伝性小脳変性症等の 1C2 抗体によるスクリーニングから、常染色体優性遺伝する TBP 遺伝子の

伸長ポリグルタミンによる脊髄小脳変性症の一家系を見出した。この家系の臨床像は Koide らの報告した孤発例と異なっており、これを TBP 遺伝子によるポリグルタミン病の phenotype の多様性と考えた。ただし今後の症例の集積が重要である。

#### F. 研究発表

1. 論文発表 未
2. 学会発表 未

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 未
2. 実用新案登録 未
3. その他

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

ポリグルタミン鎖の凝集体形成における周辺アミノ酸配列の影響に関する検討

分担研究者 小野寺理 新潟大学脳研究所神経内科

共同研究者 野崎兼吉、高野弘基、辻省次 新潟大学脳研究所神経内科

研究要旨

ポリグルタミン鎖周辺のアミノ酸配列が凝集体形成能に影響を与える可能性を考え SCA2, HD, DRPLA, MJD で凝集体形成能の違いと個々の疾患との関連を検討した. SCA2, DRPLA で増大したポリグルタミン鎖を含む部分蛋白の発現が長さ依存性に閾値を持って細胞内凝集を引き起こすことが明らかとした. CAG 繰り返し配列周囲のアミノ酸配列が凝集体形成能に影響を及ぼすことを明らかとした.

A. 研究目的

遺伝性脊髄小脳変性症の内、現在 8 疾患が CAG 繰り返し配列によりコードされる増大したポリグルタミン鎖により引き起こされることが明らかとなっている。増大したポリグルタミン鎖は神経細胞毒性を示し、長さ依存性に閾値をもって神経細胞内に凝集体を形成することが近年明らかにされている。これらの疾患では CAG リピート数の増加に伴い発症年齢が若年化する傾向が知られている。しかし同じ CAG リピート数でも疾患間で発症年齢が異なる。この理由については明らかにされていない。我々はポリグルタミン鎖周辺のアミノ酸配列が凝集体形成能に影響を与える可能性を考え、truncated ataxin2, huntingtin, DRPLA protein(DRPLAP), MJD protein(ataxin3)においてその凝集体形成能の違いと、凝集体形成能に及ぼす周辺アミノ酸配列の影響、及び個々のポリグルタミン病との関連を検討することを目的とした。

B. 研究方法

PCR 法を用いて SCA2, HD, DRPLA, MJD 遺伝子の種々の長さの CAG リピートとその 5' 側の 24 塩基, 3' 側の 27 塩基を含む DNA 断片

を作成し pEGFPN1 に組み入れた。このベクターを COS7 細胞にトランスフェクションし、ポリグルタミン鎖と周辺アミノ酸及び GFP の融合蛋白を発現させた。72 時間後に GFP 発現 500 個細胞中の凝集体形成細胞の割合を算出し 3 回の実験の平均を求めた。また蛋白分析の為にトランスフェクション 48 時間後細胞を回収し 1%NP-40 を含む buffer を用いて溶解し遠心後可溶、不溶分画に分離し、それぞれを 10%SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後抗 GFP 抗体を用いてウエスタンブロットした。

C. 研究結果

truncated ataxin2, DRPLAP の発現ではともに CAG リピートの長さ依存性に 34 から 36 リピート間に閾値を持って凝集体形成能の増加を認めた (図 1)。

ウエスタンブロット法でも truncated ataxin2, DRPLAP でともに 34 から 40 repeat 間で不溶分画のバンドの増強を認めた。56 CAG リピートを共通に含む truncated ataxin2, huntingtin, DRPLAP, ataxin3 の発現では truncated ataxin2 及び huntingtin が truncated DRPLAP 及び

ataxin3 に比べ高率な凝集体形成能を示した (図 2). ウェスタンブロット法でも truncated ataxin2 及び huntingtin が truncated DRPLAP 及び ataxin3 に比べ不溶分画で強いバンドの出現を認めた。

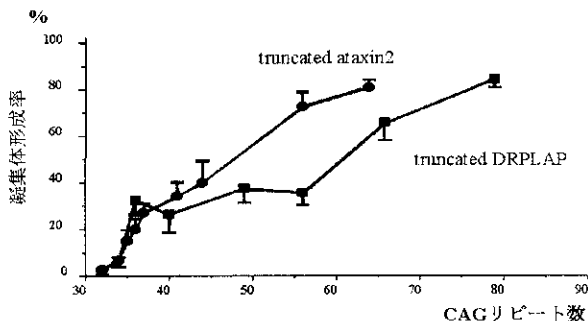


図 1

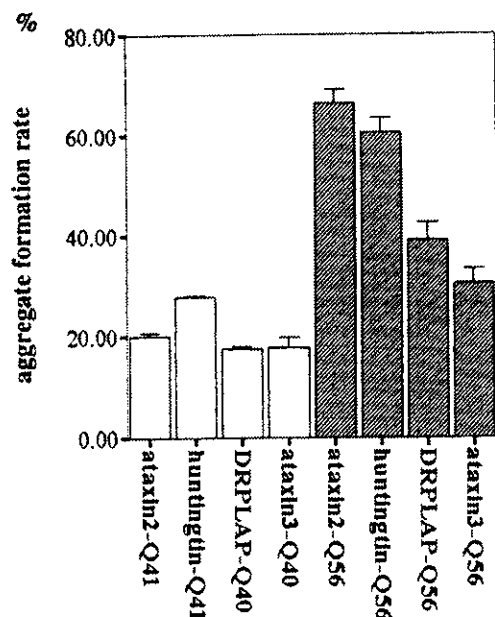


図 2

#### D. 考察

Truncated ataxin2 および DRPLAP の細胞内発現においてともに凝集体形成能が 34 から 40 repeat 間で閾値を認めたがこれは SCA2 および DRPLA での正常リピート数の上限 (SCA2; 32 リピート, DRPLA; 39 リピート) と近く臨

床像との関連が示唆される。また 56 CAG リピートを共通に含む truncated ataxin2, huntingtin, DRPLAP, ataxin3 の発現における凝集体形成能の結果は、ヒトで認められる同一 CAG リピート数での発症年齢の傾向 (SCA2, HD, DRPLA, MJD の順に高齢化すること) と一致しており、疾患による CAG 繰返し配列の影響の相違が凝集体形成能の違いにより説明される可能性を示唆しており興味深い。

#### E. 結論

SCA2, DRPLA で増大したポリグルタミン鎖を含む部分蛋白の発現が長さ依存性に閾値を持って細胞内凝集を引き起こすことが明らかになった。また同じ CAG repeat 数を有する SCA2, HD, DRPLA, MJD 部分蛋白の発現で凝集体形成能に差が見られ CAG 繰返し配列周囲のアミノ酸配列が凝集体形成能に影響を及ぼすことが示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nagai, Y., Onodera, O., Chun, J., Strittmatter, W. J. & Burke, J. R. (1999) Expanded polyglutamine domain proteins bind neurofilament and alter the neurofilament network, *Exp Neurol*, 155, 195-203.

Ozawa, T., Takano, H., Onodera, O. et al. (1999) No mutation in the entire coding region of the alpha-synuclein gene in pathologically confirmed cases of multiple system atrophy, *Neurosci Lett*, 270, 110-2.

Moulder, K. L., Onodera, O., Burke, J. R., Strittmatter, W. J. & Johnson, E. M., Jr. (1999) Generation of neuronal intranuclear inclusions by polyglutamine-GFP: analysis of inclusion clearance and toxicity as a function of polyglutamine length, *J Neurosci*, 19, 705-15.

Sato, T., Oyake, M., Nakamura, K., Nakao, K., Fukusima, Y., Onodera, O., Igarashi, S., Takano,



H., Kikugawa, K., Ishida, Y., Shimohata, T., Koide, R., Ikeuchi, T., Tanaka, H., Futamura, N., Matsumura, R., Takayanagi, T., Tanaka, F., Sobue, G., Komure, O., Takahashi, M., Sano, A., Ichikawa, Y., Goto, J., Kanazawa, I., Katsuki, M. and Tsuji, S.: Transgenic mice harboring a full-length human mutant DRPLA gene exhibit age-dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable to those in DRPLA patients. *Hum. Mol. Genet.* 8(1): 99-106, 1999

## 2. 学会発表

野崎兼吉, 小野寺理, 辻省次. 増大したポリグルタミン鎖の凝集体形成能は周辺アミノ酸配列によって影響を受ける. 第40回日本神経学会総会 (1999, 東京)

小野寺理, 野崎兼吉, 辻省次, 永井義隆, Burke, J.R., Strittmatter, W.J., 増大したポリグルタミン鎖と中関係フィラメント (IF) との関係. 第72回日本生化学会大会 (1999, 横浜)

小野寺理. 蛋白構造異常と病態機序. 第29回新潟神経学夏期セミナー (1999, 新潟)

K. Nozaki, O. Onodera, S. Tsuji. Amino acids flanking polyglutamine stretches influence the competence of aggregate formation. ASHG Annual Meeting (1999, San Francisco)

O. Onodera, K. Nozaki, T. Shimohata, A. Sato, S. Tsuji, Y. Nagai. Aggregation of expanded polyglutamine stretches and their intracellular regulation pathway. International Symposium Elucidation of Molecular Mechanisms of Human Brain Disease Based on Genome Analysis. (1999, Niigata)

G. 知的所有権の所得状況  
特になし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

Machado-Joseph 病における凝集体形成の分子機構

分担研究者 西澤 正豊 国際医療福祉大学臨床医学研究センター教授

研究要旨：Machado-Joseph 病（MJD）におけるポリグルタミン（ポリ Q）による凝集体形成と神経細胞変性の分子機構を解明するために、種々の修飾を加えた MJD1 遺伝子を COS 細胞に導入し、GFP との融合蛋白として発現させて、凝集体の形成過程を経時的に観察した。

その結果、MJD1 蛋白のポリ Q の N 末領域（282-5 残基）は核への移行シグナル（NLS）として、また C 末端（351-9 残基）は核からの排出シグナル（NES）として機能していることを確認した。ポリ Q が 20 個の場合には、NLS、NES が存在すれば凝集体は主に核の周囲に形成され、NES を削ると凝集体は形成されなくなった。C 末領域のみでも凝集体が核周囲に形成され、これらは  $\gamma$ -tubulin と共存することから、C 末領域は NES として機能するだけでなく、tubulin 系と相互作用して microtubulus organizing center（MTOC）に凝集体を形成させると考えられた。ポリ Q が 72 個の場合には、NES が存在しても一部の凝集体は核内に形成され、これらは経時的に増加した。

これらの結果は凝集体の形成過程における核内外でのポリ Q を含む蛋白の traffic とこれに関与する因子の重要性を示している。

A. 研究目的

Huntingtin の exon 1 を導入したトランスジェニックマウスの神経細胞核内に封入体が認められて以来、伸長したポリグルタミン鎖（ポリ Q）が神経細胞の核内に凝集体を形成し、細胞死を誘導することが CAG トリプレットリピート病に共通する病態である可能性が想定されている。

Machado-Joseph 病（MJD）は本邦に存在する CAG リピートの異常伸長に伴う優性遺伝性小脳変性症としては最も頻度が高い重要な疾患である。我々は MJD において伸長したポリ Q を含む異常蛋白が凝集体を形成する分子機構を解明し、現在有効な治療法が知られていない遺伝性小脳変性症において新たな治療法を開発することを本研究の目的としている。

B. 研究方法

正常の長さのリピート（Q 20）と伸長したリピート（Q 72）をもつ MJD1 cDNA から 5' 側、3' 側を様々な長さに切断した constructs を作成し、これらを GFP との fusion protein として COS 細胞に発現させ、経時的に凝集体の形成過程を観察した。

（倫理面での配慮）

本研究は培養細胞に遺伝子断片を導入してその発現様式を解析するものであるため、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除、インフォームドコンセントに関わる状況、実験動物に対する動物愛護上の配慮などに関する倫理的な問題は発生しないと判断している。

### C. 研究成果

MJD1 蛋白のポリ Q の N 末領域 (282-5 残基) には核への移行シグナル (NLS) と想定される配列があるが、N 末領域を徐々に削り NLS まで除いた construct では、Q 20 の場合には凝集体は核周囲にのみ認められるようになった。Q 72 の場合には核内にも大きな凝集体が形成される点で Q 20 の場合と異なるが、NLS 配列を除くと、核内の凝集体は減少し、核周囲の凝集体が増加した。

一方、MJD1 蛋白の C 末端 (351-9 残基) には核からの排出シグナル (NES) と想定される配列がある。Q 20 の場合には NES を除去すると凝集体は形成されなくなり、Q 72 の場合にも NES を除去すると凝集体は核内のみ認められ、核周囲には形成されなくなった。

以上の結果から、MJD1 蛋白にはポリ Q に隣接して NLS と NES が存在し、それぞれ機能していることが確認された。

さらに C 末領域のみを発現させた場合にも Q 20 の場合と同様に凝集体が核周囲に形成されることが判明した。抗 tubulin 抗体による免疫染色を行い、GFP で示される凝集体の局在との関連を検討すると、これらの凝集体は  $\gamma$ -tubulin と共存していることが明らかになった。 $\gamma$ -tubulin は microtubulus organizing center (MTOC) のマーカーとされているので、C 末領域は NES として機能するだけでなく、tubulin 系との相互作用を介して MTOC に凝集体を形成させると考えられた。

### D. 考察

今回の結果はポリ Q による凝集体の形成にはポリ Q を含む蛋白の核内外への移行に関与する因子が重要な役割を果たしていることを証明している。MJD1 では Q 20 の場合でもポリ Q の N 末領域の一部が存在すれ

ば凝集体が形成されるが、NLS と NES がともに存在すれば、凝集体は主に核周囲に形成され、さらに核内に点状の小さな凝集体も形成された。NLS がないと凝集体は核周囲にのみ形成されて核内には認められなくなり、NES がないと凝集体そのものが認められなくなった。MJD1 蛋白の C 末端部は核からの排出シグナルとしての機能だけでなく、tubulin 系との相互作用にも関与し、細胞質で凝集体を核周囲の MTOC に蓄積させる働きをも担っていると思われる。

これに対して伸長した Q 72 の場合には NLS と NES がともに存在する場合には主に核周囲に、一部は核内に凝集体が形成されたが、この核内凝集体は Q 20 の場合よりも大きく、しかも時間とともに増大した。NLS を除いても、NES の有無に関わらず核内には凝集体が形成された。伸長したポリ Q は NLS を介する経路とは異なる経路で核内に移行し、核内に凝集体を形成するものと考えられる。

以上の結果から今後、MJD 以外のポリグルタミン病においても MJD1 蛋白の場合と同様に核内外への移行シグナルの機能について検討する必要がある。また実際の疾患の病態では MJD1 蛋白がどのような processing を受けているのかを明らかにする必要がある。

凝集体の形成と細胞死との関連についても蛋白の細胞内移行を考慮に入れて今後さらに検討しなければならない。

### E. 結論

ポリグルタミン病における凝集体の形成過程には、蛋白の核内外への移行を制御するシグナルが重要な役割を果たしている。

核周囲への凝集体の蓄積は tubulin 系との相互作用の結果であり、蓄積部位は MTOC である。

### F. 研究発表

#### 2. 学会発表

Machado-Joseph 病における凝集体の形成機構。  
文部省重点領域研究「神経細胞死とその防  
御の分子制御」平成 11 年度研究班会議、  
東京、H11.12.13

Machado-Joseph 病における凝集体形成の分  
子機構。運動失調に関する調査及び病態機  
序に関する研究班平成 11 年度研究班会議、  
東京、H12.1.21

G. 知的所有権の取得状況

なし

共同研究者

自治医科大学神経内科 迫江公巳、天池美  
帆、滝山嘉久、嶋崎晴雄、井波尚子