

19990563

神経変性疾患に関する研究

(課題番号 H11-特疾-15)

厚生科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
平成11年度研究報告書

平成12年3月

主任研究者 田代邦雄

(北海道大学大学院医学研究科脳科学専攻神経病態学講座神経内科学教授)

目 次

研究組織	-----	1
研究成果の概要	-----	2
総括研究報告書	-----	5
分担研究報告書		
1. パーキンソン病の発症機序に関する分子生物学的研究	-----	8
順天堂大学医学部脳神経科	水野 美邦	
2. 神経変性疾患における自律神経障害や		
痴呆の予防・治療に関する研究	-----	13
広島大学医学部第三内科	中村 重信	
3. 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン痴呆複合		
(ALS/PDC) の臨床病理学的検討とタウ蛋白解析	-----	15
三重大学医学部神経内科	葛原 茂樹	
4. 紀伊半島多発地域の筋萎縮性側索硬化症と		
パーキンソン痴呆複合の臨床像に関する研究	-----	18
三重大学医学部神経内科	葛原 茂樹	
5. アデノ随伴ウイルスベクターを用いた		
パーキンソン病の遺伝子治療の研究	-----	21
自治医科大学医学部神経内科	中野 今治	
6. 筋萎縮性側索硬化症の運動ニューロンの遺伝子発現		
プロファイリング - レーザーマイクロダイセクションと		
cDNA マイクロアレイによる検索	-----	24
名古屋大学大学院医学研究科神経内科	祖父江 元	

7. 筋萎縮性側索硬化症の遺伝子発現プロファイリングに よる病態関連分子の探索 -----	26
名古屋大学大学院医学研究科神経内科 祖父江 元	
8. 球脊髄性筋萎縮症の transgenic mouse model の 作成と臨床病理学的検索 -----	28
名古屋大学大学院医学研究科神経内科 祖父江 元	
9. パーキンソン病の高次神経機能に関する研究 -----	30
国立精神・神経センター武蔵病院 川井 充	
10. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	34

研究組織

主任研究者 田代 邦雄（北海道大学大学院医学研究科神経内科学教授）

分担研究者 水野 美邦（順天堂大学医学部脳神経科教授）
中村 重信（広島大学医学部第三内科教授）
葛原 茂樹（三重大学医学部神経内科教授）
中野 今治（自治医科大学医学部神経内科教授）
祖父江 元（名古屋大学大学院医学研究科神経内科教授）
川井 充（国立精神・神経センター武蔵病院第2病棟部部長）

研究補助金 47,000 千円

研究結果の概要

本研究班は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄性進行性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症（Kennedy-Alter-Sung 病）、脊髄空洞症、パーキンソン病（PD）、ハンチントン病、進行性核上性麻痺、線条体黒質変性症、ペルオキシソーム病、ライソゾーム病の 10 疾患を対象疾患とし、それらの基礎的ならびに臨床的研究を進展させ、これら難病の治療法の開発も視野に入れた調査研究を行うことを目的としている。

主任研究者（田代邦雄）1 名、分担研究者（水野美邦、中村重信、葛原茂樹、中野今治、祖父江 元、川井 充）6 名に研究協力者（青木正志、阿部康二、荒崎圭介、岩崎泰雄、岡本幸市、小川紀雄、郭 伸、梶 龍兒、加知輝彦、久野貞子、長谷川一子、高橋 均、田中順一、中島健二、中田 力、中野亮一、中川正法、水澤英洋、森松光紀、森若文雄、山田 猛、渡部和彦）22 名、計 29 名の研究体制で、ALS、PD およびそれらの関連疾患に重点をおき、分子遺伝学、神経病理、神経薬理、神経化学、神経生理、神経疫学、神経治療などの多方面から各個研究を展開し、今後のプロジェクト研究を計画した。

平成 11 年度研究班の班会議・研究報告会は平成 12 年 2 月 4 日～5 日に全共連ビルで開催した。その研究報告会では 54 題の各個研究が発表された。

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の基礎的研究として、ALS における受容体型チロシンキナーゼ EphA4 の発現、ヒト脳脊髄単一ニューロンにおけるグルタミン酸受容体 mRNA 発現量、ALS の遺伝子発現プロファイリングによる病態関連分子の検索と ALS の運動ニューロンの遺伝子発現プロファイリング、遺伝子関連では、日本人家族性 ALS にみられた Cu/Zn SOD 遺伝子変異とそれらを導入したトランスジェニックマウスの作製、変異 Cu/Zn SOD トランスジェニックマウスにおける生存シグナル関連蛋白の変化、家族性 ALS 関連変異 Cu/Zn SOD のアデノウイルスベクターを用いた発現による神経細胞障害機構の解析を行なった。神経病理の面からは、ALS 脊髄の前側索の錐体路以外にびまん性にみられる macrophage の出現、多数の Basophilic inclusion を有する ALS 脊髄前角細胞の免疫組織学的検討、孤発性筋萎縮性側索硬化症の線条体におけるユビキチン陽性神経細胞内封入体の出現を検討した。

ALS に対する治療に関しては、成体ラット顔面神経核運動ニューロン損傷に対する GDNF 組換えアデノウイルス・ベクターの治療効果、大量メチルコバラミンが実験的アクリルアミドニューロパチーにおける DNA フラグメンテーションを阻害すること、大量メチルコバラミンの ALS 患者における筋力におよぼす影響（二重盲検クロスオーバー法による検討）、FGF-9 の培養ラット脊髄前角細胞に対する効果、Wobbler mouse motor neuron disease に対する creatine monohydrate 療法の効果と ALS 患者に対する Creatine monohydrate の投与成績と安全性を研究した。

臨床・生理の面からは、神経変性疾患の心理的検討、microstimulation による運動単位推定数（MUNE）を算出するためのコンピュータープログラムの開発とその臨床応用と ALS の運動単位発火様式を検討した。

球脊髄性筋萎縮症の臨床・病理では、四肢遠位の筋力低下、痴呆を主徴とする家族

性運動ニューロン病、球脊髄性筋萎縮症の transgenic mouse model の作成と臨床病理学的検索、女性化乳房を伴った常染色体優性遺伝型球脊髄性筋萎縮症の一家系と近位筋優位の筋萎縮を示す遺伝性運動感覚ニューロパチーの臨床的、病理学的、遺伝学的検討を行なった。

パーキンソン病 (PD) の基礎・病因に関しては、MPTP マウスパーキンソニズムにおける nucleosomal DNA fragmentation、MPTP マウスパーキンソニズムにおける L-DOPA の急性毒性、ARJP における酸化ストレスを検討した。遺伝子関連では、パーキンソン遺伝子の変異解析、偽優性遺伝性を呈した若年性パーキンソニズム家系における parkin 遺伝子変異解析、パーキンソン病とドーパミントランスポーター遺伝子多型および相模原パーキンソニズムの遺伝子を研究した。

臨床・薬理では、L-DOPA/DCI コンビネーションと投与量の違いによる脳内生化学的变化、ドーパミンアゴニスト apomorphine の培養グリア細胞における神経栄養因子産生作用に関する研究、パーキンソン病の診断におけるアポモルフィンテストの有用性に関する検討、悪性症候群と MAO-B 遺伝子 GT リピート多型との関連を研究した。また、パーキンソン病患者の ¹²³I-MIBG 心筋シンチグラフィーの検討、パーキンソン病と高次神経機能（算数問題と脳血流 SPECT 所見）、パーキンソン病の脳血流変化に関する検討（運動機能障害、認知機能障害との関連）とパーキンソン病の疫学調査を行なった。

パーキンソン病に対する治療では、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いたパーキンソン病の遺伝子治療の研究、LacZ 遺伝子組み込みアデノウイルス脳内注入時の遺伝子発現の経時変化、および内因性 MAO 活性阻害物質イサチンの実験的パーキンソン病モデルラットに及ぼす影響を調べた。

臨床面では、多系統萎縮症初期例の PET 所見、大脳皮質基底核変性症の MRI、SPECT、磁気共鳴画像による拡散テンソル解析を用いた神経変性疾患における非侵襲的軸索機能解析（定量解析）、多系統萎縮症における左右差、多系統萎縮症における自律神経機構を解析し、臨床病理からは全経過 19 年の多系統萎縮症の 1 剖検例、レビー小体病と多系統萎縮症脳における α -synuclein associated protein (Synphilin-1) の局在を研究した。

関連疾患では、Niemann-Pick 病 C 型モデルマウス (spm) 由来培養シュワン細胞株の樹立、進行性核上性麻痺と皮質基底核変性症における髄液中総タウ蛋白およびリン酸化タウ蛋白の検討と P301L 変異を認めた FTDP-17 の 2 症例における臨床像およびタウ遺伝子型を解析した。

紀伊半島の ALS/PDC では、紀伊半島多発地域の ALS とパーキンソン痴呆複合の臨床像、紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン痴呆複合 (ALS/PDC) の臨床病理学的検討とタウ蛋白解析と Argrophilic grain dementia と amyotrophic lateral sclerosis with dementia との関連性に関する臨床病理学的検討を行なった。

研究により得られた成果の今後の活用・提供

家族性 ALS や球脊髄性筋萎縮症のモデル動物の開発により、病態の解明、治療法の開発への貢献が期待され、ALS の多発地域である三重県南部の集積地 A 地区の ALS/PDC の臨床像や病理所見が明らかにされ、今後の研究の方向性が明示された。

パーキンソン病関連では、遺伝子変異を Taq Man probe を用いた定量的 PCR 解析法を応用すると、通常の PCR 解析で変異の見られなかった家系でも compound heterozygote の存在を確認できるので、ARJP の早期診断、疫学調査、保因者の発見に有用な方法であり、今後、活用が期待される。

対象 10 疾患に対する臨床研究のみならず、社会的ニードへ対応できるような体制を目指し、今後はプロジェクトリーダーを中心に、研究を継続、充実を図り、最終年度までの 3 年間に研究の進展と研究成果の普及に努める。

總 括 研 究 報 告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

神経変性疾患に関する研究

主任研究者 田代邦雄 北海道大学大学院医学研究科教授

研究要旨

本研究班は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄性進行性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症（Kennedy-Alter-Sung 病）、脊髄空洞症、パーキンソン病（PD）、ハンチントン病、進行性核上性麻痺、線条体黒質変性症、ペルオキシソーム病、ライソゾーム病の 10 疾患を対象疾患とし、それらの基礎的ならびに臨床的研究を進展させ、これら難病の治療法の開発も視野に入れた調査研究を行うことを目的としている。主任研究者 1 名、分担研究者 6 名に研究協力者 22 名、計 29 名の研究体制で、ALS、PD およびそれらの関連疾患に重点をおき、分子遺伝学、神経病理、神経薬理、神経化学、神経生理、神経疫学、神経治療などの多方面から各個研究を展開し、今後のプロジェクト研究を計画した。

A. 研究目的

本研究の目的は、本研究班の筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脊髄性進行性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症（Kennedy-Alter-Sung 病）、脊髄空洞症、パーキンソン病（PD）、ハンチントン病、進行性核上性麻痺、線条体黒質変性症、ペルオキシソーム病、ライソゾーム病の 10 対象疾患の基礎的ならびに臨床的研究を進展させ、これら難病の治療法の開発も視野に入れた調査研究を行うことを目的としている。

B. 研究方法

厚生省特定疾患神経変性疾患調査研究班の研究体制は、班長 1 名、班員 6 名、研究協力者 18 名、特別研究員 1 名の 25 名の研究体制であったが、今回の厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業では主任研究者 1 名、分担研究者 6 名に研究協力者 22 名、計 29 名の体制を構築した。

主任研究者、分担研究者は筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、およびそれらの関連

疾患に重点をおき、これらについて各個研究及びプロジェクト研究を分子遺伝学、神経病理、神経薬理、神経化学、神経生理、神経疫学、神経治療などの多方面から展開した。また、今回の目的達成のため主任研究者は研究協力者を指名し、全国レベルでのデータの集積と研究協力のもとにこれらの神経変性疾患の研究、治療法、予防法の開発も目指し研究総括を行った。対象 10 疾患に対しては研究のみならず、社会的ニードへの対応も可能な体制を目指した。平成 11 年度はプロジェクトリーダーを決定し、研究体制の構築と研究に着手に重点をおき、平成 12 年度、13 年度は研究を継続、充実をはかり、平成 13 年度に研究の総括と研究成果の普及に努める。

C. 研究結果

平成 12 年 2 月 4 日～5 日に平成 11 年度研究班の班会議・研究報告会を開催した。研究報告会では 54 題の各個研究が発表された。

筋萎縮性側索硬化症（ALS）に関しては、その基礎的研究として、ALS における受容体

型チロシンキナーゼ EphA4 の発現に関する研究、ヒト脳脊髄単一ニューロンにおけるグルタミン酸受容体 mRNA 発現量の検討、ALS の遺伝子発現プロファイリングによる病態関連分子の検索と ALS の運動ニューロンの遺伝子発現プロファイリング：レーザーマイクロダイセクションと cDNA マイクロアレイによる研究を行なった。遺伝子関連では、日本人家族性 ALS にみられた Cu/Zn SOD 遺伝子変異とそれらを導入したトランスジェニックマウスの作製、変異 Cu/Zn SOD トランスジェニックマウスにおける生存シグナル関連蛋白の変化および家族性 ALS 関連変異 Cu/Zn SOD のアデノウイルスベクターを用いた発現による神経細胞障害機構の解析を行なった。神経病理の面からは、ALS 脊髄の前側索の錐体路以外にびまん性にみられる macrophage の出現、多数の Basophilic inclusion を有する ALS 脊髄前角細胞の免疫組織学的検討、孤発性筋萎縮性側索硬化症の線条体におけるユビキチン陽性神経細胞内封入体の出現を検討した。

ALS に対する治療に関しては、成体ラット顔面神経核運動ニューロン損傷に対する GDNF 組換えアデノウイルス・ベクターの治療効果、大量メチルコバラミンが実験的アクリルアミドニューロパチーにおける DNA フラグメンテーションを阻害すること、大量メチルコバラミンの ALS 患者における筋力におよぼす影響（二重盲検クロスオーバー法による検討）、FGF-9 の培養ラット脊髄前角細胞に対する効果、Wobbler mouse motor neuron disease に対する creatine monohydrate 療法の効果と ALS 患者に対する Creatine monohydrate の投与成績と安全性を研究した。

臨床・生理の面からは、神経変性疾患の心

理的検討、microstimulation による運動単位推定数 (MUNE) を算出するためのコンピュータープログラムの開発とその臨床応用と ALS の運動単位発火様式を検討した。

球脊髄性筋萎縮症の臨床・病理では、四肢遠位の筋力低下、痴呆を主徴とする家族性運動ニューロン病、球脊髄性筋萎縮症の transgenic mouse model の作成と臨床病理学的検索、女性化乳房を伴った常染色体優性遺伝型球脊髄性筋萎縮症の一家系と近位筋優位の筋萎縮を示す遺伝性運動感覚ニューロパチーの臨床的、病理学的、遺伝学的検討を行なった。

パーキンソン病 (PD) の基礎・病因に関しては、MPTP マウスパーキンソニズムにおける nucleosomal DNA fragmentation、MPTP マウスパーキンソニズムにおける L-DOPA の急性毒性、ARJP における酸化的ストレスを検討した。遺伝子関連では、パーキンソン遺伝子の変異解析、偽優性遺伝性を呈した若年性パーキンソニズム家系における parkin 遺伝子変異解析、パーキンソン病とドーパミントランスporter 遺伝子多型および相模原パーキンソニズムの遺伝子を研究した。

臨床・薬理では、L-DOPA/DCI コンビネーションと投与量の違いによる脳内生化学的变化、ドーパミンアゴニスト apomorphine の培養グリア細胞における神経栄養因子産生作用に関する研究、パーキンソン病の診断におけるアポモルフィンテストの有用性に関する検討、悪性症候群と MAO-B 遺伝子 GT リピート多型との関連を研究した。また、パーキンソン病患者の ¹²³I-MIBG 心筋シンチグラフィの検討、パーキンソン病と高次神経機能(算数問題と脳血流 SPECT 所見)、パーキンソン病の脳血流変化に関する検討(運動機能障

害、認知機能障害との関連)とパーキンソン病の疫学調査を行なった。

パーキンソン病に対する治療では、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いたパーキンソン病の遺伝子治療の研究、LacZ 遺伝子組み込みアデノウイルス脳内注入時の遺伝子発現の経時変化、および内因性 MAO 活性阻害物質イサチンの実験的パーキンソン病モデルラットに及ぼす影響を調べた。

臨床面では、多系統萎縮症初期例の PET 所見、大脳皮質基底核変性症の MRI、SPECT、磁気共鳴画像による拡散テンソル解析を用いた神経変性疾患における非侵襲的軸索機能解析 (定量解析)、多系統萎縮症における左右差、多系統萎縮症における自律神経機構を解析し、臨床病理からは全経過 19 年の多系統萎縮症の 1 剖検例、レビー小体病と多系統萎縮症脳における α -synuclein associated protein (Synphilin-1) の局在を研究した。

関連疾患では、Niemann-Pick 病 C 型モデルマウス (spm) 由来培養シュワン細胞株の樹立、進行性核上性麻痺と皮質基底核変性症における髄液中総タウ蛋白およびリン酸化タウ蛋白の検討と P301L 変異を認めた FTDP-17 の 2 症例における臨床像およびタウ遺伝子型を解析した。

紀伊半島の ALS/PDC では、紀伊半島多発地域の ALS とパーキンソン痴呆複合の臨床像、紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン痴呆複合 (ALS/PDC) の臨床病理学的検討とタウ蛋白解析と Argrophilic grain dementia と amyotrophic lateral sclerosis with dementia との関連性に関する臨床病理学的検討を行なった。

D. 考察

本研究班の研究対象疾患は、筋萎縮性側索

硬化症、パーキンソン病などの 10 疾患であり、これらおよびその関連疾患に重点を置いて、各個研究及びプロジェクト研究で分子遺伝学、神経病理、神経薬理、神経化学、神経生理、神経疫学、神経治療などの多方面から研究を推進することが必要である。また、今回の目的達成のため多数の研究協力者を指名し、全国レベルでのデータの集積と研究協力のもとに、これらの神経変性疾患の研究、治療法、予防法の開発も目指していく臨床研究を基盤にした研究を開始している。また、対象 10 疾患に対する臨床研究のみならず、社会的ニードへ対応できるような体制を目指した。今後は、プロジェクトリーダーを中心に、研究を継続、充実を図っていき最終年度の平成 13 年度に研究の総括と研究成果の普及に努める。

E. 結論

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、脊髄性進行性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症 (Kennedy-Alter-Sung 病)、脊髄空洞症、パーキンソン病 (PD)、ハンチントン病、進行性核上性麻痺、線条体黒質変性症、ペルオキシソーム病、ライソゾーム病の 10 疾患を対象疾患とした本研究班は、これらの疾患の基礎的ならびに臨床的研究を推進させ、治療法の開発も視野に入れた調査研究を行うことを目的としている。主任研究者 1 名、分担研究者 6 名に研究協力者 22 名、計 29 名の研究体制で、分子遺伝学、神経病理、神経薬理、神経化学、神経生理、神経疫学、神経治療などの多方面から各個研究を展開し、今後のプロジェクト研究を計画した。

F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記載

分 担 研 究 報 告

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

パーキンソン病の発症機序に関する分子生物学的研究

分担研究者 水野 美邦 順天堂大学医学部教授

研究要旨

パーキンソン病の発症機序に関し、本邦で発見され、遺伝子クローニングが行われた常染色体性劣性遺伝の若年性パーキンソン病（ARJP）の遺伝子診断に関する研究を行った。即ち臨床症候がARJPに合致していてもPCR解析にてparkin遺伝子に変異を発見できない家系がかなり存在することが判明しており、これら家系の大部分はcompound heterozygoteであろうとの予測をたて、Taq Man probeを用いた定量的PCR解析により、parkin遺伝子の各エクソンを定量化する、compound heterozygoteの解析法を確立した。本法を通常のPCR解析で変異の見られなかった家系に応用して、compound heterozygoteの存在を確認した。本法は、ARJPの早期診断、疫学調査、保因者の発見に有用な方法である。

次にARJP剖検例3例について、酸化障害の有無を解析する目的で黒質切片について3価鉄を組織化学的に染色した。その結果、孤発型パーキンソン病以上に強い鉄の沈着を認め、酸化ストレスがARJPにおいても重要であることが推定された。最後に家族性前頭側頭型痴呆パーキンソンニズムの症状の多様性を解析する目的で、タウ遺伝子の遺伝子多型の分析を行い、同じ病的変異を持ちながら遺伝子多型の組み合わせの異なる症例の存在を確認した。

A. 研究目的

近年家族性パーキンソン病が注目されており、原因遺伝子が複数あること、臨床症候の多様性が指摘されている。家族性パーキンソン病の原因遺伝子並びに転写産物の同定は、黒質神経細胞の選択的細胞死の機序解明のみならず、孤発型パーキンソン病における根本的治療法開発のためにも重要な研究テーマである。我々は、最近本邦に多いとされてきた常染色体性劣性遺伝の若年性家族性パーキンソン病（ARJP）の原因遺伝子を同定し、parkinと命名した。parkin遺伝子の変異解析により、本症患者には様々な変異が見られることを報

告してきたが（Ann Neurol 44:935-941）、遺伝子解析を進める内に臨床症候がARJPに一致するにも拘わらず、parkin遺伝子に変異を発見できない症例がすくなく存在することが判明した。これらの症例に関しては、compound heterozygotesである可能性が高いとの推測とたて、これを解析する方法を開発した。

次に、孤発型パーキンソン病においては、酸化ストレスが、神経細胞死に重要な役割を演じることが推定されるが、ARJPにおいてもその可能性があるかどうかを検討した。

最後に最近関心の高い家族性前頭側頭型痴

呆パーキンソニズム (FTDP-17) について臨床症候の多様性と遺伝子変異の関連を分析した。

B. 研究方法

compound heterozygotes の解析には、定量的に PCR を行う必要がある。そのため PCR に使用するプローブに、蛍光標識をした Tac Man probe を使用した。これは PCR が 1 回行われる毎に、蛍光標識したプローブがメディアム中に放出され、その蛍光強度を定量して、PCR プロダクトを定量的に解析する方法である。

parkin 遺伝子は、12 のエクソンを有するので、各エクソン単位に PCR を行い、エクソンの量を定量した。正常エクソンが 2 つあれば、定量値は 1 前後の値をとり、正常エクソンが 1 個しかなければ 0.5 前後の値をとる。正常エクソンが 1 個であることは、本症の保因者か compound heterozygotes であることを意味する。更に異なるエクソンの定量値が 2 つ以上 0.5 前後であれば、compound heterozygotes を意味する。

次に、3 例の parkin 遺伝子変異の証明された ARJP 剖検例 3 例の黒質線条体系につき、酸化ストレスの関与について検討するため、Perl-DAB 染色にて鉄沈着の有無を検索した。

FTDP-17 については、FTD が疑われる患者末梢血白血球より DNA 抽出。Tau 遺伝子のすべてのコーディングエクソンとその近傍イントロン領域についてそれぞれ PCR 増幅産物をテンプレートとしシーケンスをおこなった。このうち P301L の変異をもつ 2 症例につき、家族歴、現病歴、現症およびタウ遺伝子の多型による遺伝子型について解析した。

C. 研究結果

ARJP の compound heterozygote の解析に関しては、臨床症候は全く ARJP に一致していながら、通常の PCR 解析にて parkin 遺伝子の変異を見いだしえなかった家系について分析を行った。本家系は、両親は一見正常、6 名の同胞のうち、4 名に発症を見、2 例は正常であった。これらの構成員のうち、母親、4 例の発症者、1 名の健常者について解析を行うことができた。

エクソン毎の定量的 PCR の結果では、4 名の発症者は、エクソン 2、3、4 の定量値が 0.5 前後を示し、1 名の健常者は全て 1.0 前後の値、母親は、エクソン 2 の定量値が 0.5 前後、エクソン 3、4 は 1.0 前後を示した。このことから、母親は、正常エクソン 2 は 1 個で、エクソン 2 の欠失した保因者であると推定された。一方発症者は、全てエクソン 2~4 の値が 0.5 前後であるので、一方の染色体はエクソン 2 を欠失し、他方の染色体ではエクソン 3 と 4 を欠失していると判定した。またこの結果から父親はエクソン 2 と 3 の欠失した保因者であると推定された。

次に ARJP 剖検脳についての酸化ストレスの検索では、正常対照に比較し、孤発型パーキンソン病例では中等度に、ARJP 例では高度に鉄沈着を認めた。ARJP では、paranigralis の一部で neurite が濃染された。黒質細胞の神経脱落と gliosis は、パーキンソン病では黒質腹外側部のみであるが、ARJP では、黒質腹外側部に加え内側部にも認められた。

最後に FTDP-17 に関する検索では、2 症例の臨床症候を詳細に分析できた。症例 1 は、脱抑制的性格変化および痴呆。家族歴で母、およびその第二子に同一症状あり。46 歳時に怒りっぽく傲慢な態度をとるようになり、計

算が苦手、地名が理解できなくなる。48歳時、物を投げつけ大声を張り上げる。Pick病と診断。51歳時、病棟内で食物を盗む。長谷川式的機能検査3/30。錐体路徴候、パーキンソン徴候はいずれも認めなかった。症例2は、主訴右半身の動作緩慢。家族歴で姉が52歳よりPick病と診断。50歳頃ジョギング中右足のつま先が引っかかる。10か月後右手の書字が下手になり歩行がしづらくなる。右片側パーキンソニズムと診断。L-DOPAは多少効果あり。52歳時記憶力はほぼ正常であるが保続傾向あり。感情失禁あり。質問をオウム返しに反復する。軽度仮面様顔貌。右半身動作緩慢で固縮あり、歩行は小歩かつ痙性。右で臆反射亢進。

2症例ともタウ遺伝子にP301Lの病的変異を有していたが、臨床症候の相違を検索する一環としてタウ遺伝子の多型解析を行った結果、エクソン4Aとエクソン6、エクソン10の5'上流のイントロン領域のそれぞれに多型が認められた。症例1は(AB, AA, AA)、症例2(AA, BB, BB)であり、症例1と症例2の遺伝子型は異なっていた。

D. 考察

ARJPは、parkin遺伝子の変異による常染色体性劣性遺伝の若年性家族性パーキンソン病である。遺伝子の判明している家族性パーキンソン病の中では最も頻度が高い。本症は、本邦に限られると考えられていたが、parkin遺伝子の変異解析が行われるようになってから世界に広く分布することがわかり、また一見孤発型に見える症例の中にも、稀に遺伝子変異を有する症例があり、保因者の頻度がかなり高いと推測される。発症者でもparkin遺伝子周辺の遺伝子マーカーのハプロタイプが

異なることがあり、血族結婚でなくても発症の危険があることが指摘されるようになった。

このような研究の進展に伴い、臨床的にARJPに合致していても、通常のPCR解析でparkin遺伝子に変異の認められない家系にしばしば遭遇するようになった。このような症例は、血族結婚のない家系にも時々本症が見られる所見と合わせると、compound heterozygoteである可能性が示唆される。compound heterozygoteとは、2つの相同染色体の同じ遺伝子にそれぞれ異なる変異をもつ個体をいう。通常のPCRでは、PCRプロダクトの定量が困難であるため、正常エクソンが増幅され、結果は正常との区別が不可能である。そこでPCRがまだダイナミックに進行している間に反応を停止させ、PCR産物を定量化することにより、正常エクソンが2個あるか、1個しかないかを判定する方法の1つがTaq Mann probeを用いた定量的PCRである。本邦を1家系に応用することにより、compound heterozygoteを証明できた。更に本法を補強するため、未発表ではあるが、fluorescent in situ hybridization(Fish)により、parkin遺伝子のエクソンが1個あるか2個あるかの組織化学的方法を開発しており、上記の家系では、Fishによってもcompound heterozygoteであることを証明できた。更に、シーケンスを加えることにより、現在別の家系で1塩基欠失と1塩基置換によるcompound heterozygoteの家系を証明できている。これらの解析方法を加えることにより、ARJPの遺伝子診断の精度は倍増し、保因者の頻度算定にも威力を発すると期待できる。

次に、ARJPにおいて酸化的ストレスが存在するかどうかを解析するため、parkin遺伝子に変異の判明している3剖検例について、3

銻鉄を染める組織化学を行った。孤発型パーキンソン病において、黒質に鉄が沈着していることを既に多くの研究で証明され、酸化ストレス存在の傍証とされているが、ARJPにおいては孤発型パーキンソン病を上回る高度の鉄の沈着が証明できた。これが発症機序に直接関与する病態か、罹病期間の長さを反映して結果であるかは、今後更に検討を加えないといけないが、Lewy 小体の出現しないARJPにおいても孤発型パーキンソン病と同様の鉄沈着が認められたことは興味深い。これはParkin 蛋白の機能を考える上でも示唆にとむ所見である。即ち、Parkin 蛋白にはC末付近に2つのRING-finger like motif を持ち、亜鉛のような2価金属を保持できる構造を持つが、鉄を結合できる蛋白であるかどうか、次のテーマとして重要であろう。Parkin 蛋白がもし鉄結合蛋白であれば、その欠失により、組織に鉄が過剰に沈着するのは、変性の結果というよりは、発症機序に関連している可能性がある。Parkin 蛋白の機能に関しては、未発表であるが、研究を推進しており、細胞質とGolgi 装置に多く発現している蛋白で、軸索輸送を受ける蛋白であることを明らかにしている。更にParkin 蛋白のN末にはユビキチンとの部分的相同性があるため、ユビキチン代謝への関与を解析し、これも未発表ではあるが、ubiquitin ligase の一種であるらしい知見を得ている。

家族性パーキンソン病は、全パーキンソン病の5~10%をしめるに過ぎないが、多くの臨床病型が報告され、原因遺伝子は相当数に上ることが推定されている。いずれも黒質のほぼ選択的神経細胞死に結びついており、これら家族性パーキンソン病の原因遺伝子を同定し、その転写産物の機能を解析することは、

パーキンソン病の原因解明のみならず、神経細胞保護をめざした、パーキンソン病の根本的治療法開発のためにも、重要な研究テーマであると考えられる。

最後に FTDP-17 は、最近注目され始めた痴呆とパーキンソニズムを示す優性遺伝の家族性疾患である。タウ遺伝子の変異によることが明らかになっており、パーキンソニズムを起こす遺伝子としては、3番目に発見されたものである。同じ変異を持ちながら、臨床症候の多様性に富むことでも有名で、原因遺伝子の同定が行われるまでは、5つ以上の色々な名前と呼ばれたが、変異解析の結果同じタウ遺伝子の異常でおきるようになってきている。臨床症候の多様性は、ある程度神経変性疾患に共通する現象で、それが何によるかは、症状の発症機序の解析のみならず、神経細胞保護をめざす治療法の研究にとっても重要である。それは、軽症例においては、なんらかの神経細胞保護を促進する遺伝子多型が存在している可能性を検索する価値があるからである。今回タウ遺伝子に同じP301L変異を持ちながら臨床症候の大きく異なる2症例のタウ遺伝子の多型を調べたところ、それらの遺伝子型の組み合わせが2症例で異なっていた。これがすぐ臨床症候の違いを説明するものではないが、このような遺伝的背景の違いを分子レベル更に解析することにより、症状多様性の機序をいずれは解明できるのではないかと考えられる。

E. 結論

以上、ARJP について、compound heterozygote の解析方法を確立し、更にARJPにおいても酸化ストレスが著明であることを示した。更に、FTDP-17につき、臨床症候の

多様性を解析する一歩として、タウ遺伝子多型の解析を同じ遺伝子変異を持ちながら臨床症状の異なる2症例について施行した。

F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記載

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

神経変性疾患における自律神経障害や痴呆の予防・治療に関する研究

分担研究者 中村 重信 広島大学医学部教授

研究要旨

神経変性疾患における自律神経障害や痴呆を予防・治療するため、次の3点について検討した。
1) ドーパミントランスポーターの遺伝子多型とパーキンソン病 (PD) 発症の関連性を検討し、エクソン9の1215A/GはPD群と正常対照群で分布が異なり、PD発症に関与することが示唆された。2) 痴呆を伴うALS 脳における Gallyas-Braak 銀染色陽性の封入体の意義を検討し、argyrophilic grain が海馬 CA1 海馬支脚、迂回回、扁桃体に多数認められることが痴呆発症と関係することを明らかにした。3) 多系統萎縮症では精神性発汗反応、交感神経性皮膚血流反応ともに低下しており、サーモグラフィー上、体幹の皮膚温上昇と上下肢末梢での皮膚温の著明な低下を認めた。神経変性疾患の遺伝子多型などの検討により、疾患を早期に発見し、予防や治療によって、進行を防ぎ、痴呆や自律神経障害を来さないような方策を見つけることが重要である。

A. 研究目的

神経変性疾患の発症には遺伝的因子と環境因子が関与し、自律神経障害や痴呆がみられるが、その詳細は不明である。今回、神経変性疾患における自律神経障害や痴呆を予防・治療するために次の3点について検討した。

1) ドーパミントランスポーター (DAT) の遺伝子多型とパーキンソン病 (PD) の発症の関連性、2) 痴呆を伴うALS (ALSD) 脳における Gallyas-Braak 銀(GB)染色陽性の封入体の意義、3) 多系統萎縮症 (MSA) 患者の皮膚自律神経障害

B. 研究方法

1) DAT 遺伝子多型の研究では PD 患者 172 名 (平均 62.7 歳)、正常対照群 132 名 (63.7

歳) の白血球を用いた。DAT 遺伝子多型の同定のため直接塩基配列決定法と一本鎖 DNA 高次構造多型により、非翻訳領域であるエクソン1を除く14エクソンをスクリーニングした。同定した多型の頻度を dot blot hybridization で両群間の比較をした。

2) 臨床病理学的に ALSD と診断した4症例のパラフィン包埋切片を用いて、ルーチンの染色、GB 染色、抗 ubiquitin(Ub)抗体、抗リン酸化 tau 抗体(AT8)、抗 α B-crystallin 抗体を用いた免疫組織化学法および、GB 染色と他の抗体による二重染色を行った。

3) PD、若年発症パーキンソニズム (EOP)、MSA 各5例を対象として、四肢・体幹のサーモグラフィー、左右母指での精神性発汗と交感神経性皮膚血流反応 (SFR) を解析し、各群で比較した。サーモグラフィーはサーモトレー

サ(NEC 三栄 TH3107ME)を、精神性発汗測定は局所発汗量連続記録装置(Kenz Perspiro OSS100)を、SFR測定はレーザードプラー血流測定装置(Advance ALF 21R)を用い、精神性発汗とSFRは母指にて同一プローベで同時に測定した。被検者には各検査の主旨を十分に説明し、同意を得た。

C. 研究結果

1) 2つの方法により、2個ずつの多型を同定したが、それらはともに同じ一塩基多型であった。同定した多型はエクソン 9 (1215A/G) およびエクソン 15 (1898T/C) に存在し、両者ともアミノ酸の置換を伴わなかった。1215GはPD患者群で有意に低率であった[遺伝型: $p=0.012$, 対立遺伝子: $p=0.042$, オッズ比=2.07(95%信頼区間: 1.15-3.78)]。

2) ALSDは4例全体にrod状のargyrophilic grain (AGs)を海馬CA1海馬支脚、迂回回、扁桃体に多数、眼窩回、中隔野、分界条に少数、中脳黒質、中心灰白質、迷走神経背側核に極少数認めた。海綿状変化、gliosisの部位に一致して長いAGsを認めた。AT8陽性神経突起の中にAGsを認めた。扁桃体、側頭葉深部皮質に α B-cystallin陽性神経細胞を認めた。

3) PDでは比較的早期から精神性発汗反応の低下を認め、SFRは比較的保たれていた。EOPでは精神性発汗反応はむしろ亢進傾向で、SFRは保たれていた。サーモグラフィーでは、PD、EOPともに四肢末梢、特に下肢末梢で皮膚温の低下を認めた。MSAでは精神性

発汗反応、SFRともに低下しており、サーモグラフィー上、体幹の皮膚温上昇と上下末梢での皮膚温の著明な低下を認めた。

D. 考察

1) DAT遺伝子多型の検索により2つの一塩基多型を同定した。そのうち1215A/GはPD群と正常対照群で分布が有意に異なり、PD発症に関与することが示唆された。

2) 神経変性疾患患者では、病期の進行とともに自律神経障害による皮膚の異常が出現する。皮膚の栄養障害、皮膚循環障害、発汗異常、皮膚温の異常などが見られ、末期には褥瘡を呈し、患者のquality of life (QOL)を損なう原因になると考えられた。

E. 結論

神経変性疾患の遺伝子多型などの検討により、疾患を早期に発見し、予防や治療によって、進行を防ぎ、痴呆や自律神経障害を来さないような方策を見つけることが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表：別紙記載
2. 学会発表：別紙記載

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

紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン痴呆複合 (ALS/PDC) の
臨床病理学的検討とタウ蛋白解析

分担研究者 葛原茂樹 三重大学医学部教授

研究要旨

紀伊半島多発地区のALS/PDCの同胞剖検例を報告した。姉は62歳でパーキンソニズムと痴呆で発症し、無動無言状態になり70歳で死亡した。弟例は45歳に球麻痺で発症し、レスピレーター管理下で49歳に死亡した。姉はPDC、弟はALSと臨床診断されたが、神経病理学的所見は両例ともよく似ており、大脳と脳幹では神経細胞脱落と神経原線維変化塊が多発するPDCの所見が、脊髄ではALS病変が認められた。この所見は、紀伊半島多発地区のALSとPDCが単一疾患の異なった臨床型である可能性を示唆する。姉例で実施した異常タウ蛋白解析では、3 repeat と4 repeat のアイソフォーム比はほぼ等しく、タウ遺伝子には変異は認められなかった。

A. 研究目的

紀伊半島南部地域には、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の高頻度発生地区があり、これと重なってパーキンソン痴呆複合 (parkinsonism-dementia complex: PDC) も集積している。ALSとPDCの関連について、グアムにおいては集積地の重なり合い、同一家系内での両疾患の発生、両疾患の合併例・中間型の存在、病理学的所見の共通性から、集積地のALSとPDCは疾病学的には単一の疾患の表現型の相違とする学説が提唱され、ALS/PDCと呼ばれている。我々は、紀伊半島の多発H地区で、1980年以降もALSとPDCの高頻度発生が持続していることを疫学的調査により確認し、家族性発症例が多いこと、ALS/PDCが同一家系・同一患者に発生していることを報告した。

最近、われわれは、臨床的に弟はALS、姉はPDCと診断された多発地区同胞発症例に

おいて、神経病理学的には共通のALS病変と多数のアルツハイマー神経原線維変化塊 (NFT) を認めたので、剖検脳の異常タウのアイソフォーム解析、DNAからのタウ遺伝子解析所見と併せて報告する。なお、本家系は1995年度の本研究班で、姉をPDCの臨床例、弟のALS剖検例として報告した症例である。研究対象者からのDNA採血にあたっては、文章によってインフォームドコンセントを得た。また、研究対象者に対して不利益とならないようプライバシーに十分配慮した。

B. 研究方法

両親ともに多発H地区の出身であったがALS/PDC罹患は確認されていない。母方祖父はALSで死亡したといわれている。同胞6名のうち2名は幼少時に死亡した。

[姉例]62歳時(1992年)に動作緩慢、小刻み歩行というパーキンソニズムで発症し、間もなく痴呆が加わり、徐々に自発語と自発運