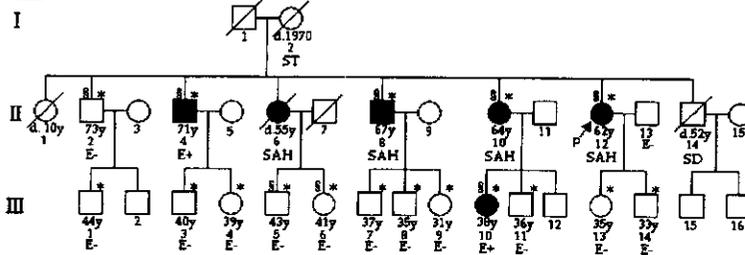
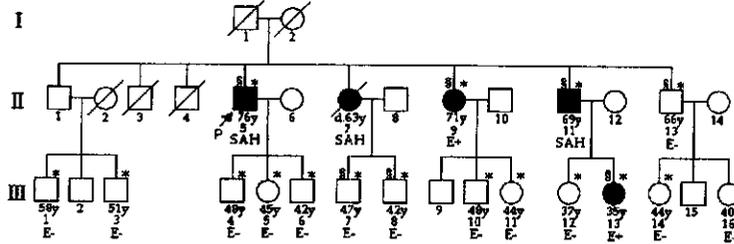


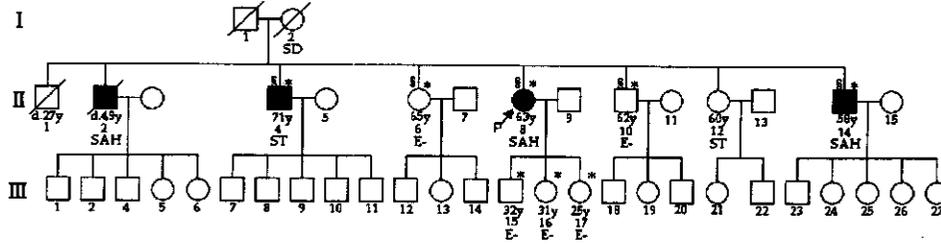
HI



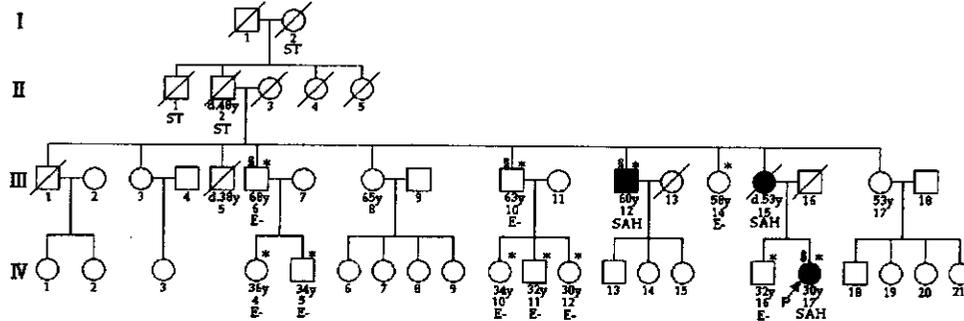
GR



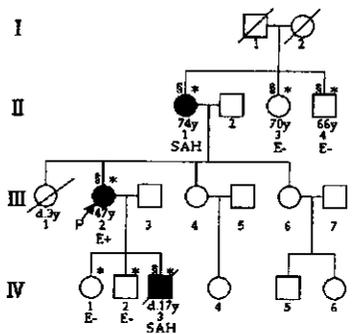
KYA



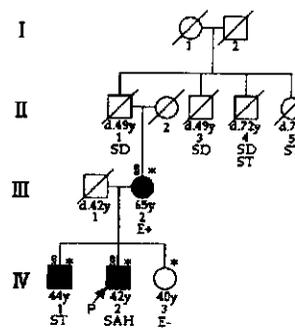
KYB



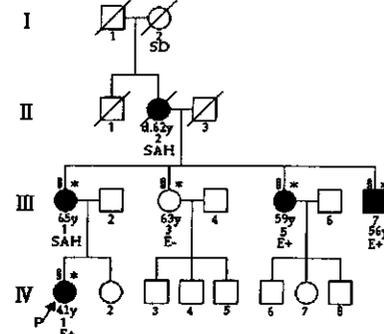
GS



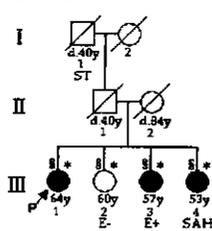
KYD



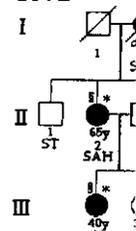
SSB



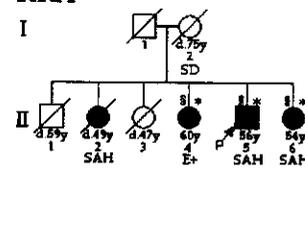
FNA



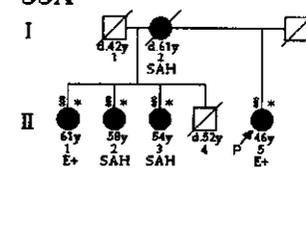
FNC



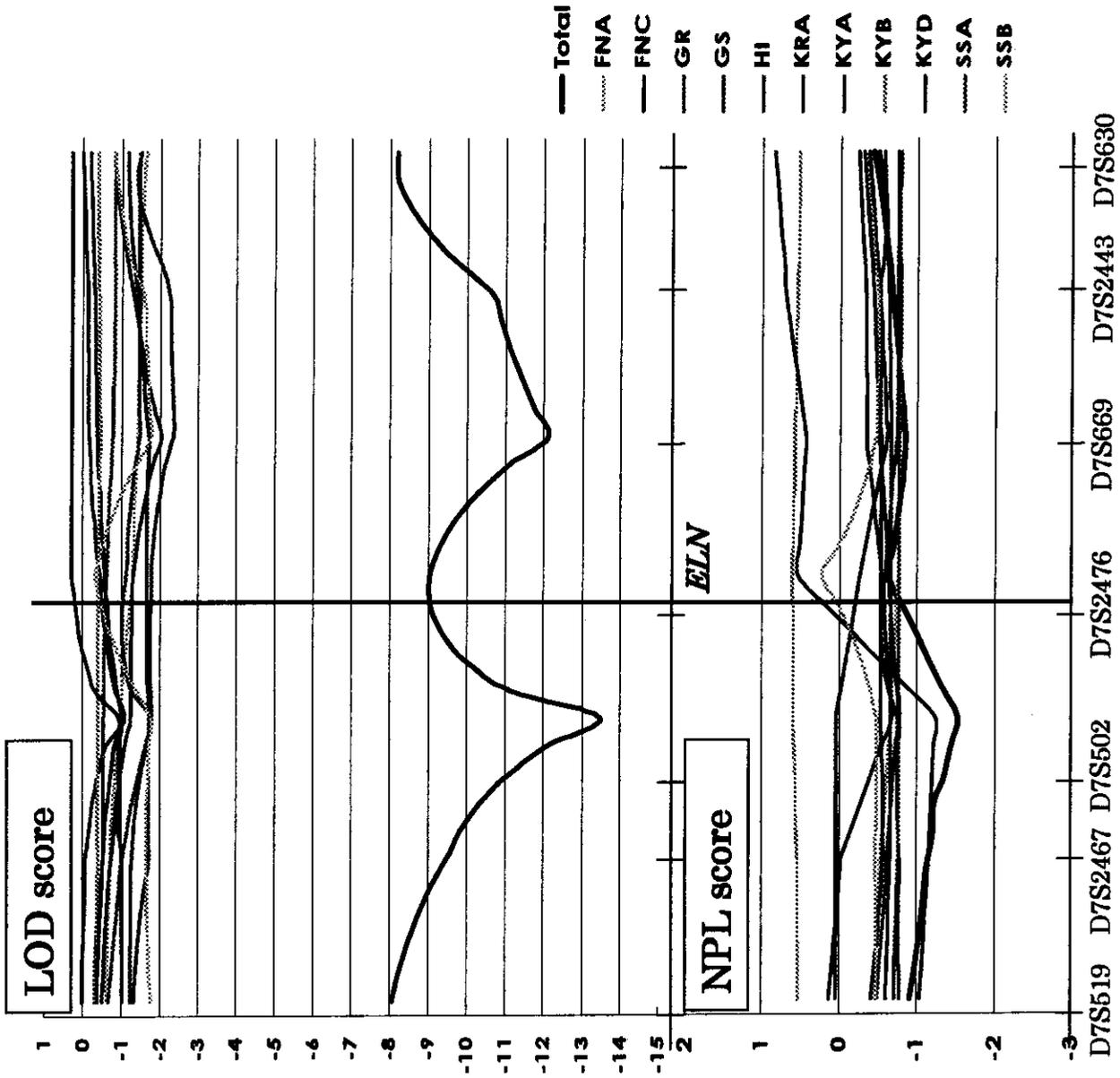
KRA



SSA



Chromosome 7



厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

分担研究報告書

本邦における脊髄小脳変性症の分布に関する研究

分担研究者 阿部康二 岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学 教授

研究協力者 永野 功、村上哲郎、真邊泰宏

研究要旨 日本各地における遺伝性脊髄小脳変性症の分布を調査した結果、仙台や新潟など東日本では SCA3/MJD がもっとも高頻度に認められ、SCA6 は比較的にまれな疾患であったが、岡山や鳥取など西日本では SCA6 が約 50% と半数を占め、SCA3/MJD は約 20% 程度にとどまっていた。本研究を通じ、脊髄小脳変性症には日本の地域ごとに特徴的な分布があり、各地域間でその頻度の大きな差があることが明らかとなった。また今回の研究を通じて、岡山県を含む中国地方の山陽地域には、SCA6 とは異なる Holmes 型の遺伝性脊髄小脳変性症が複数家系存在していることが新たに判明し、脊髄小脳変性症の新しい遺伝子異常の可能性も示唆された。

A. 研究目的

近年の分子生物学の発達により、従来臨床的観点から分類のなされていた遺伝性脊髄小脳変性症が CAG などの遺伝子上の 3 塩基の繰返し配列の増多によることが明らかとなり、分子遺伝学に立脚して遺伝性脊髄小脳変性症を改めて分類する試みがなされている。その結果、世界および日本各地方で遺伝性脊髄小脳変性症のタイプや頻度に違いがあることが明らかとなってきている。厚生労働省指定の特定疾患であり、いわゆる神経難病である脊髄小脳変性症の有病率の地域差を明らかにし、行政側からの難病対策を円滑ならしめるために、地域の実情を明らかにすることは重要である。そこで我々は、日本の一地域としての中国地方における遺伝性脊髄小脳変性症の特徴を調査することにより、この地域における遺伝性脊髄小脳変性症の頻度や分布を明らかにし、また遺伝子診断にていずれの分類にも該当しない家族性の脊髄小脳変性症の家系を通して新しい遺伝性脊髄小脳変性症の発見をめざして調査を行った。

B. 研究方法

岡山県・広島県出身の家族性脊髄小脳変性症の家系のうち、SCA6 に類似した phenotype を持つものについて調査した。informed consent を得て末梢血から分離した DNA を使用して PCR 法にて遺伝子検査を行い、SCA6 と判明したものは除き、さらに他の triplet repeat を伴う既知の脊髄小脳変性症を除外した。

(倫理面への配慮)

十分な説明と同意のもとでインフォームドコンセントを得た上で遺伝子診断を行った。

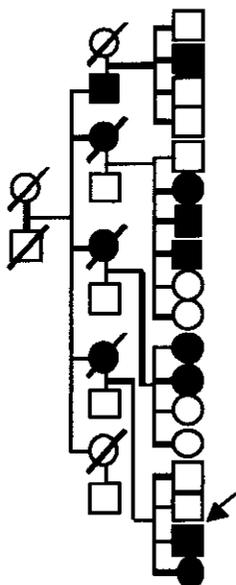
C. 研究結果

Figure 1 に示す 3 家系が見いだされた。Family A は広島県福山市、Family B は兵庫県姫路市、Family C は岡山県倉敷市出身の家系である。近親婚はなくまた男女とも冒されていることなどから、遺伝型式は常染色体優性遺伝と推定された。世代に従って発症が早まる anticipation が不完全ながら認められ、triplet-repeat disease の可能性が推測された。臨床的には、発症者にはほぼ小脳失調症状のみがみられ、錐体路徴候・錐体外路徴候・自律神経症状は著明ではなかった。PCR

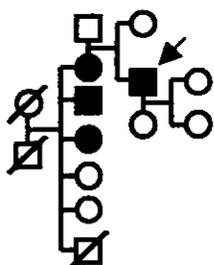
法による遺伝子検索では、検索を行った発症者においては発端者を含めて SCA6 は全て陰性であった。Family A には死去している発症者が3名いるが病理学的検索は行われていない。

Figure 1. Pedigree charts of three families with autosomal-dominant spinocerebellar ataxia.

Family A



Family B



Family C



D. 考察

中国地方の家族性脊髄小脳変性症で、遺伝子診断可能なものとしては SCA6 が多いが、全体では原因遺伝子不明の症例が最も多い。今回我々が検索した3家系も、SCA6 と類似した表現型を示しており、Holmes 型 SCA に分類される。ただし長期罹患者はびっくり眼、下肢中心の痙直がみられたのが特徴である。また Family A の発端者には顔面にミオキミアが観察された。今後は、採取した DNA の解析とトリプレットリピートの検出を行う予定である。

E. 結論

中国地方出身で常染色体優性遺伝をし、Holmes 型に分類される SCA 家系のうち、SCA6 など既知の遺伝子異常が認められなかった3家系を報告した。今後は、遺伝子の解析を通して新患の解明に迫る予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ①. Y. Manabe, Y. Shiro, K. Takahashi, K. Kashihara, and K. Abe. A case of spinocerebellar ataxia accompanied by severe involvement of the motor neuron system. *Neurol. Res.*22 (2000) 567-570
- ②. K. Abe. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells *J. Cereb. Blood against ischemic brain injury. Flow Metabol.* 20 (2000)1393-1408
- ③. Y. Onodera, M. Aoki, T. Tsuda, H. Kato, T. Nagata, T.Kameya, K. Abe, and Y. Itoyama. High prevalence of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) in an isolated region of Japan. *J. Neurol. Sci.*178 (2000) 153-158.

- ④. Y. Manabe, J.M. Wang, T. Murakami, H. Warita, T. Hayashi, M. Shoji, and K. Abe. *Journal of Neuroscience Research* 65: 371-377: Expressions of nitrotyrosine and TUNEL immunoreactivities in cultured rat spinal cord neurons after exposure to glutamate, nitric oxide, or peroxynitrite, 2001
- ⑤. Warita, Y. Manabe, T. Murakami, Y. Shiro, I. Nagano, and K. Abe. *Apoptosis* 6:345-352: Early decrease of survival signal-related proteins in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene, 2001
- ⑥. Y. Manabe, H. Warita, T. Murakami, M. Shiote, T. Hayashi, I. Nagano, M. Shoji, and K. Abe. *Brain Research* 915:104-107: Early decrease of redox factor-1 in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene, 2001
- ⑦. Warita, T. Murakami, Y. Manabe, K. Sato, T. Hayashi, T. Seki, and K. Abe. *Neuroscience Letters* 300: 75-78: Induction of polysialic acid-neural cell adhesion molecule in surviving motoneurons of transgenic amyotrophic lateral sclerosis, 2001
- ⑧. T. Murakami, I. Nagano, T. Hayashi, Y. Manabe, M. Shoji, Y. Setogushi, and K. Abe. *Neuroscience Letters* 308: 149-152: Impaired retrograde axonal transport of adenovirus-mediated E. Coli LacZ gene in the mice carrying mutant SOD1 gene, 2001
- ⑨. T. Murakami, H. Warita, T. Hayashi, K. Sato, Y. Manabe, S. Mizuno, K. Yamane, and K. Abe. *Journal of the Neurological Science* 189: 45-47: A novel SOD1 gene mutation in familial ALS with low penetrance in females, 2001
- ⑩. 阿部康二、村上哲郎:筋萎縮性側索硬化症 (ALS). 遺伝子検査早わかり事典. 中外医学社, 2001, 75.
- ⑪. 阿部康二、永野功:筋萎縮性側索硬化症 (ALS). 神経・筋疾患の最新医療, 先端医療シリーズ 14 神経・筋疾患. 先端医療技術研究所, 2001, 175-179.
2. 学会発表
- ①. 小野寺好明、青木正志、津田丈秀、加藤宏之、糸山泰人、阿部康二:東北地方の SCA1 患者出身地の集積. 第 41 回日本神経学会総会、松本市、2000. 5.24
- ②. 村上哲郎 松原悦朗 永野功 真邊泰宏 東海林幹夫 阿部康二:日本人家系における Notch3 遺伝子の解析. 第42回日本神経学会総会、東京、2001.5.11
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし.

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

日本人 Barth 症候群患者における TAZ (G4.5) 遺伝子の解析に関する研究

分担研究者 大浦敏博

(東北大学大学院医学系研究科小児医学講座小児病態学分野 助教授)

研究要旨

日本人 Barth 症候群2症例において責任遺伝子である TAZ (G4.5) の解析を行なった。症例1ではイントロン3の+110の GがAに変化しており(IVS3+110G>A)、その結果スプライス異常が生じエクソン3が 106 塩基伸長するものと考えられた。早期に停止コドンが出現するためこの遺伝子産物は活性を持たないことが予想され、表現型が重症であることと一致する。症例2はエクソン3に R94S を検出した。本例は軽症型であり残存機能が残っていると考えられた。Barth 症候群の一部には成人例も存在しており、原因不明の X 染色体連鎖性心筋症に遭遇した場合は本症も念頭に置くべきと考えられる。

A. 研究目的

Barth 症候群は 1983 年 Barth により報告された拡張型心筋症、低身長、好中球減少、3-メチルグルタコン酸尿を主徴とする伴性劣性遺伝疾患である。1996 年 Bione らにより Xq28 に局在する責任遺伝子 TAZ (G4.5) がクローニングされた。その遺伝子産物は taffazzins と名付けられたが、その機能は不明である。既に欧米では 20 異常の変異が報告されているが日本人症例での報告はまだない。多くは小児期に心筋症の進行により死亡するが、非典型例では成人例も報告されており、原因不明の拡張型心筋症として診断されないでいる症例も存在するものと考えられている。原因不明の心筋症患者を対象に TAZ (G4.5) の遺伝子解析をすすめることにより今まで見逃されていた Barth 症候群が発見される可能性がある。今回我々は日本人 Barth 症候群患者の2例(典型例と軽症例)の解析を初めて行ない遺伝子型

と表現型の相関に関して若干の知見を得たので報告する。

B. 研究方法

患者及び家族より遺伝子検査をするにあたり書面で同意書を得た。症例1では EB ウイルスにより株化したリンパ芽球を用いて total RNA を抽出し、cDNA を合成後 RT-PCR を行ない、その産物の塩基配列をダイレクトシーケンシング法にて決定した。さらに、症例1、2及びその母親ではゲノム DNA を用いてそのエクソン部分を増幅し塩基配列を決定した。

C. 研究結果

【症例 1】

生後まもなくより哺乳障害、筋緊張低下を呈した。その後も頸定 6ヶ月、座位 10ヶ月、独歩 2歳と運動系の発達の遅れを認めた。ECG で ST-T の変化がみられ心筋症が疑われた。9歳時低身長(-3SD)の精査のため入院となった。

心筋症、好中球減少、3-メチルグルタコン酸尿を認め、Barth 症候群と診断した。カルニチン、ジコキシンなどにて経過観察を行ったが 10 歳時突然死した。患者ゲノムにおいて全 11 エクソンの翻訳領域および近傍のイントロンには塩基置換は見られなかった。培養リンパ芽球より total RNA を抽出し RT-PCR を行ったところ、エクソン 1 からエクソン 6 の領域の増幅において正常より長いバンドが得られた。サブクローニングしてシーケンスを行ったところ、エクソン 3 とエクソン 4 の間に挿入配列が認められた。この配列はイントロン 3 の +1 から +106 の領域に相当した。イントロン 3 が authentic 5' GT donor site で離断されず、donor site より 106 塩基下流でスプライシングを受け、エクソン 4 に接続したものと考えられた。あらためて患者ゲノムよりイントロン 3 のシーケンスを行ったところ、新しい cleavage site の 4 塩基下流に 1 塩基置換が見いだされた (IVS3+110G>A)。この変異により variant GC consensus が形成され、新たな donor site として認識されたものと考えられた。イントロン 2 からイントロン 4 にかけてエクソントラッピングプラスミドにサブクローニングし、COS7 を用いて発現実験を行った。この変異を導入したプラスミドからエクソン 3 とエクソン 4 の間にリンパ芽球の RT-PCR で得られたものと同様のイントロン 3 の +1 から +106 の領域の挿入が認められた。

【症例 2】

生後 2 ヶ月時心雑音を指摘され、心エコーにて左心室、心室中隔の肥厚を認めた。周期性好中球減少のため、しばしば熱発・下痢を呈した。1 歳時心カテーテル検査の際に心筋生検が施行され、電顕にてミトコンドリア異常を認めた。尿中有機酸分析にて 3-メチルグルタコン酸尿を認めたため、Barth 症候群と診断し

た。遺伝子解析にてエクソン 3 に 1 塩基置換が見いだされた (R94S)。患児は現在 17 歳であるが身長は 165.7cm、心エコー検査でも心筋の拡張、肥厚は認めず、Ejection fraction は正常範囲内である。

D. 考察

症例 1 ではイントロン 3 の +110 の G が A に変化しており、そのためその上流に新たなスプライス部位が形成され、エクソン 3 に 106bp の挿入がもたらされるものと考えられた。この新たに作られた 5' ドナー部位の配列は (1) CAG/GCAAGG であり、通常の GT 配列でないこと、(2) 下流に新たに出来たドナー部位が上流の正しいドナー部位より優先的にスプライシングを受けたことより、今までに報告のない新しいスプライシング変異である。その結果、機能を持たない tafazzins 蛋白が合成され、重症型の表現型をとるものと考えられた。

症例 2 は 94 番目のアルギニンがセリンに代わる変異をもっていた。対照 DNA を用いて 65 アリルを調べたが、この変異はなく、また他種属においてもこの 94 番目のアルギニンは保存されていることよりこの変異は本症の原因となる変異であると考えられた。患児は既に 17 歳であるが心拡大、心筋肥厚はみられず、Ejection fraction も正常範囲であり表現型としては軽症である。おそらくこのミスセンス変異は残存機能が残されているのであろう。

心筋症は肥大型と拡張型に大別され、前者では β ミオシン重鎖、 α トロポミオシン、トロポニン T 等に変異を持つ家系が報告されている。しかし、拡張型での遺伝子異常の報告は少ない。Barth 症候群の典型例では症例 1 の如く小児期に死亡することが多い。しかし、症例 2 の如く軽症例では成人例も存在し、原因不明の

拡張型心筋症としてフォローされている例も少なからず存在すると考えられる。また軽症例では加齢とともに心肥大が増強することも予想され、原因不明の拡張型心筋症の男子例に遭遇した場合は本症も疑い、尿中有機酸分析、好中球減少の有無、さらにはG4.5遺伝子の解析も行なうべきと考えられる。

E. 結論

日本人 Barth 症候群の遺伝子解析を初めて行なった。非典型例も存在しており、原因不明の拡張型心筋症患者に遭遇した場合は本症も念頭に入れて鑑別すべきと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sakamoto O, Kitoh T, Ohura T, Ohya N, Iinuma K.

Novel missense mutation (R94S) in the TAZ (G4.5) gene in a Japanese patient with Barth syndrome.

J Hum Genet (2002) in press

Yuriko Katsushima, Ikuma Fujiwara, Osamu Sakamoto, Toshihiro Ohura, Shigeaki Miyabayashi, Akira Ohnuma, Seiji

Yamaguchi, Kazuie Iinuma.

Normal pituitary function in a Japanese patient with Barth syndrome.

Eur J Pediatr (2002) 161: 67-68

Osamu Sakamoto, Toshihiro Ohura, Yuriko Katsushima, Ikuma Fujiwara, Eishin Ogawa, Shigeaki Miyabayashi and Kazuie Iinuma.

A novel intronic mutation of the TAZ (G4.5) gene in a patient with Barth syndrome: creation of a 5' splice donor site with variant GC consensus and elongation of the upstream exon. Human Genetics 2001;109,559-563

2. 学会発表

第44回日本先天代謝異常学会.

平成13年11月8-10日、久留米市

Barth症候群における特異なイントロン変異: 5'GC consensusの形成とエクソン伸長.

坂本修、大浦敏博、勝島由利子、藤原幾磨、小川英伸、宮林重明、飯沼一字

第46回日本人類遺伝学会

平成13年10月3-5日、さいたま市

Barth症候群の遺伝子解析: 5' GC consensusの形成と上流のエクソン伸長の原因となったイントロン内1塩基置換.

坂本修、大浦敏博、勝島由利子、藤原幾磨、小川英伸、宮林重明、飯沼一字

厚生科学科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

糖尿病遺伝素因に関する研究

分担研究者 山田 祐一郎 京都大学医学研究科病態代謝栄養学・助教授

研究要旨 膵β細胞に発現するイオンチャネル遺伝子と糖尿病遺伝素因との関連を検索した。

A. 研究目的

わが国において糖尿病患者は激増している。糖尿病は、大血管や細小血管の動脈硬化を惹起し、脳梗塞や心筋梗塞、腎不全などの危険因子となる。これらを未然に防ぐためには、糖尿病を発症させる遺伝素因を明らかにすることが必要である。わが国の糖尿病患者では、膵β細胞の分泌能が低いことが特徴である。したがって、膵β細胞に発現する因子が遺伝素因として重要と考えられる。膵β細胞に発現する代表的なイオンチャネルで、インスリン分泌に密接に関連することが報告されている ATP 感受性カリウムチャネルの Kir6.2 サブユニットおよび電位依存性カルシウムチャネルの α 1D サブユニットにおける遺伝子変異の有無を検索した。

B. 研究方法

① Kir6.2 遺伝子および α 1D 遺伝子における遺伝子変異

日本人 2 型糖尿病患者および正常耐糖能者から抽出したゲノム DNA をもとに蛋白翻訳領域において遺伝子変異の有無を PCR-SSCP 法で検索した。蛍光色素で標識した 1 対のオリゴプライマーを用いて、

PCR を施行し、得られた PCR 産物を変性後、ALF シークエンサーにて電気泳動に供した。ゲルは、6% LongRanger ゲルを用い、5% グリセロール存在、非存在の 2 つの条件で電気泳動した。

（倫理面への配慮）

遺伝子変異の検索に関して、各患者および対照者に、検索の目的等を記載したインフォームドコンセントを用いて説明し、納得いただけた方には署名をいただいた。

C. 研究結果

① Kir6.2 遺伝子の解析

ヒト Kir6.2 遺伝子の蛋白翻訳領域を PCR-SSCP 法で検索し、direct sequence 法で塩基配列を決定したところ、23 番目のアミノ酸がグルタミン酸(GAG)からリジン(AAG)へ置換、および 337 番目のアミノ酸がイソロイシン(ATC)からバリン(GTC)に置換が検出できた。ハプロタイプ解析より、23 番目のアミノ酸がグルタミン酸で、337 番目のアミノ酸がイソロイシンである allele(EI)と、23 番目のアミノ酸がリジンで、337 番目のアミノ酸がバリンである allele(KV)の 2 種類であることが明らかとなった。allele 頻度は、EI が 2 型糖尿病患者

者 103 名中 61.2%、正常耐糖能者 73 名中 65.8%、KV が 2 型糖尿病患者で 38.8%、正常耐糖能者で 34.2%と有意差を認めなかった。

② $\alpha 1D$ 遺伝子の解析

$\alpha 1D$ 遺伝子の蛋白翻訳領域を PCR-SSCP 法で検索し、direct sequence 法で塩基配列を決定したところ、いくつかのサイレント変異以外に、trinucleotide repeat 数の異なる変異を認めた。

第 1 エクソンでは、通常 7 回の ATG の反復により、7 個のメチオニン残基が連続するが、反復数が 8 回の症例を認めた。

また、第 42 エクソンでは、通常 3 回の GAA の反復により、3 個のグルタミン酸残基が連続するが、反復数が 2 回の症例を認めた。

第 1 エクソンの変異は、918 名の糖尿病患者のうち 2 名、336 名の正常耐糖能者には認めなかった。また、第 42 エクソンの変異は、918 名の糖尿病患者のうち 3 名、336 名の正常耐糖能者に 1 名認めた。

D. 考察

イオンチャネルは、種々の疾患で原因遺伝子となっている。たとえば、骨格筋のナトリウムチャネル (SCN4A) の遺伝子変異は hyperkalemic periodic paralysis、電位依存性カリウムチャネル (Kv1.1) の遺伝子変異は episodic ataxia/myokymia syndrome を惹起する。インスリン分泌には、細胞内 ATP 濃度を関知して細胞膜の電位を変化させる ATP 感受性カリウムチャネルや、細胞膜の電位を関知して細胞内のカルシウム濃度を変化させる電位依存性カルシウムチャネルが重要な役割を有してい

ることが知られている。そこで、今回、分担研究者は糖尿病とそれらの遺伝子変異の有無を検索した。

その結果、Kir6.2 遺伝子には、2 つの allele を同定した。これらの allele 頻度について、2 型糖尿病患者と正常耐糖能者で比較したが、有意な差を認めなかった。今後症例を増やすことが重要であると考えられた。また、 $\alpha 1D$ 遺伝子には、trinucleotide repeat 数の異なる症例を同定した。trinucleotide repeat は、種々の神経変性疾患などで repeat 数の増大が疾患発症に関連することが報告されているが、糖尿病との関連は否定的であった。

E. 結論

糖尿病遺伝素因の解析の一環として、Kir6.2 遺伝子と $\alpha 1D$ 遺伝子を解析したが、糖尿病との有意な相関は見出せなかった。Kir6.2 遺伝子については、今後症例を増やして解析する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

$\alpha 1D$ 遺伝子は、糖尿病発症に寄与する割合はきわめて低いと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada Y, Kuroe A, Li Q, Someya Y, Kubota A, Ihara Y, Tsuura Y, Seino Y Genomic variation in pancreatic ion channel genes in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev* 17(3):213-216, 2001
- 2) Sugawara F, Yamada Y, Kuroe A,

Someya Y, Kubota A, Ihara Y, Takahashi K, Seino Y. Human TSC-22 gene: no association with type 2 diabetes. Intern Med 40(10): 993-997, 2001

- 3) Shihara N, Yasuda K, Moritani T, Ue H, Uno M, Adachi T, Nunoi K, Seino Y, Yamada Y, Tsuda K Synergistic effect of polymorphisms of uncoupling protein 1 and beta3-adrenergic receptor genes on autonomic nervous system activity. Int J Obes 25(6):761-766, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

脳動脈瘤の感受性要因に関する研究

研究者 野崎 和彦 京都大学大学院医学研究科 脳統御医科学系 脳神経外科学 講師

研究要旨 脳動脈瘤が形成されるメカニズムは、未だ解明されていない。我々は、ヒト脳動脈瘤に性状、形成過程が非常に近いとすでに認められている実験的脳動脈瘤のモデルを用いて、脳血管分岐部に強いずり応力が長期間は発生した場合に iNOS が誘導され、NO の多量生産により、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞が障害され、その結果、血管拡張（脳動脈瘤形成初期段階）が起こるというメカニズムを示した。また、iNOS 阻害薬やずり応力を低下させる目的で使用した抗凝固薬によって、脳動脈瘤の形成が抑制されることも実験的に示した。これまで脳動脈瘤の形成を抑制する根本的な治療法はなかったが、今回の実験結果が新たな予防法の発展に貢献できると考えられた。

A. 研究目的

脳動脈瘤の破裂はクモ膜下出血の主な原因であり、一旦破裂すると死亡率が非常に高い疾患である。しかし、未だ脳動脈瘤の成因がよく分かっていないため、その予防法が全く確立していない疾患である。

我々は、ヒト脳動脈瘤の成因を解明するために有用であると認められている実験的に作製した脳動脈瘤モデルを用いて、脳動脈瘤の成因とその予防法を解明したいと考えた。

B. 研究方法

これまで、我々のラットやサルの実験的脳動脈瘤を用いて、Willis 動脈輪の血管分岐部に形成される動脈壁の変性と拡張が動脈瘤の形成初期段階として観察された

こと、同部位と脳動脈瘤の（特に末端側の）開口部において血行力学的に壁のずり応力が最も高かったことが認められた。この結果によって、ずり応力が脳動脈瘤の形成に関与しているであろうことと、それによって NO を含む様々な伝達物質が生産されることが実験的に示されていることから、我々はずり応力の増加によって iNOS が誘導され、それが脳動脈瘤の形成に関与しているのではないかと考え、実験を開始した。

6~8 週令の雄の Sprague-Dawley rat を用いて、従来の方法で実験的に脳動脈瘤を作製した。手術は pentobarbital 50mg/kg 腹腔内投与による全身麻酔下に右頸動脈と両側腎動脈後枝を結紮した。術後 1 週間後から 0.5% 食塩水を与えた。

NO 阻害物質である aminoguanidine (AG) を 100mg / kg / day 投与群 (n=6)、

AG 200mg / kg / day 投与群 (n=6)、AG 100mg / kg / day に NO 拮抗薬である L-arginine 300mg / kg / day 投与群(n=10) と線維素除去薬である batroxobin (BX) を 60 U / kg / day 投与群 (n=16)、コントロールの生理食塩水投与群 (n=27)に分けて、それぞれを 14 日間連続投与した後に麻酔下にラットを sacrifice した。その後、電顕、光顕用に脳血管標本を切り出し、免疫染色を行った。

さらに、手術で摘出されたヒト脳動脈瘤検体も免疫染色し、我々の作製した実験的脳動脈瘤と比較した。

(倫理面への配慮)

京都大学大学院医学研究科・医学部動物実験委員会の承認を得て、実験を行った。この実験は実験動物倫理的基準 C に基づいて行われた。

C. 研究結果

まず、ラットの実験的脳動脈瘤の開口部末端側とヒト脳動脈瘤開口部の血管平滑筋細胞で、iNOS 免疫反応がそれぞれに類似して認められ、この反応が実験的脳動脈瘤にのみ特異的ではないことを確認した。

続いて、外科的処置を加えた後にそれぞれの薬剤を投与したラットの脳血管分岐部の内皮細胞と平滑筋細胞を変性の程度に応じて 5 段階に分類して比較した。生理食塩水投与のコントロール群では Grade 3~5 と強く障害されていたのに対し、BX 投与群、AG 100mg、AG 200mg 投与群では Grade 1~3 と内皮細胞、平滑筋細胞の障害が明確に減少していた。しかし、AG 100mg に L-arginine を加えて投与した群では Grade 3~5 と強い障害を認めた。CBF はコントロール群と比較してどれも変わらなかったが、AG 100mg に L-arginine を加えて投与した群のみ平均動脈血圧がかなり低下していた。

eNOS、iNOS 免疫染色を行ったところ、eNOS は動脈内皮細胞の特に分岐部周辺で広く認められたが、分岐部周囲の動脈壁の障害程度が強くなるにつれて eNOS 免疫反応が減少するのが認められた。これに対し、iNOS では障害の認められない部分ではほとんど免疫反応を認められなかったが、障害の強い血管分岐部で強く反応が認められた。

次に、ずり応力を減じるために抗凝固薬である BX を用いた。ラットで BX 60 U / kg / day 投与が 24 時間 fibrinogen の集塊が抑制し、抗凝固作用を有することを確認し、CBF や平均動脈圧が変化しないことも確認した。よって、BX 投与は脳循環や脳の自動能には影響なく血液の粘調度を低下させる作用によってずり応力を低下させたと考えられた。BX 60U / kg / day 投与群では、いずれにおいても iNOS 免疫反応は確認されなかった。

この結果から、BX 投与によるずり応力の低下が血管分岐部の障害を減少させ、このため iNOS の誘導が妨げられたと考えられた。

さらに、AG 投与によって脳動脈瘤の形成が抑制されるかを確認したところ、コントロール群(n=8)では脳動脈瘤が 9 つ形成されていたのに対し、AG 100mg 投与群(n=13)では脳動脈瘤が 2 つしか形成されず、統計学的に有意に抑制された。

D. 考察

我々の実験的脳動脈瘤では通常術後 3 ヶ月で脳動脈瘤が形成されるが、術後 2 週間で脳動脈瘤の形成される血管分岐部にまず血管内皮細胞の障害が、続いて血管平滑筋細胞の障害が確認された。これは脳動脈瘤形成の初期段階を観察したものと考えられた。さらに、脳動脈瘤の開口部で観察された iNOS 免疫反応は、血管分岐部の内

皮細胞や平滑筋細胞の障害が強い部分で特に強く観察された。この結果から、血管分岐部に加わる様々な刺激によって、NOSが誘導され、NOが大量に産出されて血管壁に障害をもたらし、これが原因となって脳動脈瘤が形成されると考えた。このことは、NOS阻害薬であるAGを投与することによって脳動脈瘤の形成が抑制された結果にも一致した。AGはiNOSを比較的選択的に抑制するが、eNOSも抑制しているので、iNOSとeNOSの両者を免疫染色で比較したところ、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の障害程度に応じてeNOSは反比例していたのに対し、iNOSは比例して免疫反応が増加していた。よって、AG投与によって、障害程度が減少していたのはiNOSの作用によると考えられた。

また、抗凝固薬を用いたずり応力を低下も、血管分岐部の障害とiNOSの誘導を抑制したと考えられた。

まとめると、強いずり応力に長期間さらされ続けると、血管分岐部の内皮細胞と平滑筋細胞が障害され、これに平行してiNOS誘導が促され、障害程度を加速させる。この障害程度が強くなると、血管分岐部の拡張（脳動脈瘤の形成初期段階）が起こる。この結果は、脳動脈瘤の成因の解明に重要であると思われる。

さらに、これらの作用はNOS阻害薬や抗凝固薬を用いて抑制することが可能であった。我々は脳動脈瘤の成因を解明する目的から、家族性脳動脈瘤の連鎖解析を行い、脳動脈瘤感受性遺伝子を探索する研究を別に現在進行中である。将来、脳動脈瘤感受性遺伝子が発見され、脳動脈瘤の遺伝素因が診断に取り入れられた場合や、脳動脈瘤のスクリーニング検査によって脳動脈瘤の前病変が認められた場合などに、今回の実験結果から、iNOS阻害薬や抗凝固薬などが、脳動脈瘤形成を根本的に抑制す

る予防的治療薬となりえる可能性を導いた。

E. 結論

脳動脈瘤の形成に、ずり応力とiNOSが強く関与していることを示した。

また、ずり応力の低減やiNOSの誘導を阻害することによって、脳動脈瘤の形成が抑制されることを実験的に示し、全く新しい脳動脈瘤の予防的治療法の発展の可能性を示唆した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukuda S, Hashimoto N, Naritomi H, Nagata I, Nozaki K, Kondo S, Kurino M, Kikuchi H. Prevention of rat cerebral aneurysm formation by inhibition of nitric oxide synthase. *Circulation* 101: 2532 - 2538, 2000

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）分担研究報告書
家族性脳動脈瘤、家族性脳動静脈奇形の遺伝疫学に関する研究
分担研究者 竹中 勝信 高山赤十字病院 脳神経外科

研究趣旨： 無症候性の脳血管障害患者の発見を行う1つの手法として遺伝子解析と画像診断を組み合わせて地域保健診療の構築を行うため、疾患ターゲットとして脳動脈瘤と脳動静脈奇形に焦点をあて、発症者からの家系調査を中心に、その感受性遺伝子の解明に取り組むこととした。3家系の多発脳動脈瘤家系（一家系内に3名以上）（5名、3名、3名（3世代にわたる）の家系内脳動脈瘤発症者の存在）、4家系の家族性脳動静脈奇形家系（おのおの一家系内2名の発症）、3家系のもやもや病家系（一家系内6名（3世代にわたる）、3名、2名の発症）が検索された。岐阜県飛騨地域という比較的せまい地域（半径50km）の中に家系内多発脳血管障害患者が比較的多く発見されたことは、創始者効果の存在が推察される。発病予防のためには、疾患感受性遺伝子の同定とそれを用いた遺伝子診断が期待される。

A. 研究目的

脳卒中は、いったん発症すれば致死的な状態に陥ったり（死因の第2位）、治療が適切に施されても後遺障害が残存し、その後の生活に支障をきたし介護者の負担も大きな疾患である（医療費、介護費用は患者の高齢化に伴い益々増大している）。そこで我々は、その予防、予知こそきわめて重要と考え、無症候性の脳血管障害患者の発見を行う1つの手法として遺伝子解析と画像診断を組み合わせて地域保健診療の構築を行うため、疾患ターゲットとして脳動脈瘤と脳動静脈奇形に焦点をあて、発症者からの家系調査を中心に、その感受性遺伝子の解明に取り組むこととした。

B. 研究方法

平成8年度より我々は岐阜県飛騨地区を対象地域と設定してフィールドワークを行ってきた。40歳以上の住民検診受診者のうち脳血管障害の危険因子をもつ（収縮期血圧180mmHg以上もしくは拡張期血圧105mmHg以上の高血圧を有し、かつ総コレステロール値300mg/dl以上、LDLC値200mg/dl以上）対象者を、さらに喫煙歴、一過性脳虚血発作等

の既往、生活習慣のアンケートを加味して、最重要危険因子保有群54人を選出した。これらの方々に十分な説明のもと脳磁気共鳴検査（MRI,MRA）を行った。その結果、脳動脈瘤疑い（7名、14.9%）、頸部内頸動脈狭窄症（7.9%）等を見とめ、これは従来の脳ドックを中心とした予防外来の結果よりはるかに高率であった。そこで同地区に脳血管障害の潜在性予備軍が効率的に存在している可能性が考えられたため飛騨地域での中核病院である高山赤十字病院および県立下呂温泉病院にて、今回研究分担を受け無症候性患者および発症者の調査を計画した。高山赤十字病院および県立下呂温泉病院のある岐阜県飛騨地方は、岐阜県の北部、海拔300-573m、東に乗鞍・穂高の北アルプス連峰を、西に加賀の白山を眺めた、昔は閉鎖的な地域であった。安房トンネルが開通し関東方面から、東海北陸自動車道が延び中京関西方面から、交通の便の改善とともに年々飛躍的に観光客の訪問が増えているが、比較的人口の移動の少ない地域であることは変わらない。高山赤十字病院と県立下呂温泉病院の医療圏は、高山市および周囲三郡、対象人口17万人で、一次から三次医療までの救急症例を扱い、脳神経外

科手術総数(200/年間、高山赤十字病院および県立下呂温泉病院)、脳動脈瘤および脳動脈奇形の入院数(40名/年間、高山赤十字病および県立下呂温泉病院)である。これらの患者およびその家系を最近10年間にさかのぼり診療録を中心に家族歴調査を行った。家系の詳細な調査および遺伝子解析にあつたては、京都大学倫理委員会、高山赤十字病院倫理委員会、岐阜県立下呂温泉病院倫理委員会、岐阜市民病院倫理委員会の承認をえた。家計調査にて一家系に2名以上の発病者の存在が示唆された家系に対して、家系内家族全員に電話および面接をおこない、今回の研究の趣旨を理解していただいた上で脳磁気共鳴検査(MRIとMRA)と末梢血採血(ゲノムDNAの採取)を行った。MRIとMRAにて潜在性の無症候性疾患保因者が発見された場合にそなえ、これら疾患に対する治療方針をもうけた(治療マニュアルの作成)。末梢血採血より得られたゲノムDNAは、疾患多発家系の疾患感受性遺伝子同定のため、家系内連鎖解析を行う目的で主任研究者へ搬送し研究を依頼した。

遺伝子カウンセリングの希望者に対してカウンセリングを行うため、日本人類遺伝学会にて行われているセミナーへ参加して(3年間)カウンセリングの準備を行った。すべての対象者に対し採血およびMRI検査後、MRIの結果とその所見を印刷し、対象者の現在の健康状態(血圧、高脂血漿、糖尿病)や喫煙歴、飲酒歴、血族結婚有無などを調査するアンケート用紙として同封し、返送してもらうこととした。

C. 研究結果

3家系の多発脳動脈瘤家系(一家系内に3名以上)(5名、3名、3名(3世代にわたる)の家系内脳動脈瘤発症者の存在)、4家系の家族性脳動脈奇形家系(おのおの一家系内2名の発症)、3家系のもやもや病家系(一家系内6名(3世代にわたる)、3名、2名の発症)

が検索された。遺伝子カウンセリングの希望者は、存在しなかった。アンケートの回収率は98%で、そのうちで喫煙歴が多数存在した。血族結婚者は存在しなかった。遺伝子解析は、現在進行中である。今回発見された家系の構成員は、以前より同疾患に対し心配をされていた。また今後定期的な検査を希望するものが多く引き続きフォローを行うこととした。

D. 考察

家系内に2名以上存在する脳動脈瘤、もやもや病の患者の頻度としておのおの数%、10%といわれているが、今回の一家系内に脳動脈瘤が多世代に渡り5名、3名、3名と存在することは、比較的めずらしいと考えられた。もやもや病の3家系は、従来の発生頻度と同様であったが、一家系で6名3世代にわたる家系は、非常にまれな家系と考えている。脳動脈奇形の家族発症は、世界的にも17家系ほどが報告されているにすぎないが、今回、この比較的せまい地域内で4家系が発見されたことは、同地区に創始者の存在を示唆した。今回の研究の問題点として、発見された家系のその後の長期的な調査および支援体制をいかにしていくのかということが浮かび上がった。具体的には、対象者は子孫への心配、今回の検査では正常であっても今後の発症リスクは、他の者に対してより高いのではないかとする心配を訴える意見が多かった。

E. 結論

岐阜県飛騨地域という比較的せまい地域(半径50km)の中に家系内多発脳血管障害患者が比較的多く発見されたことは、同地区の特殊性が存在するものと考えられた。このことは創始者の存在が推察されるが、発病予防のためには、さらに家系を幾世代にもわたり詳細に調査する必要と、その疾患感受性遺伝子の同定を早期におこない、これを住民検診スクリーニング

に応用することができれば発病率の低下に結びつくのではないかと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

脳卒中患者のゲノム解析の現状 竹中勝信、加藤貴之、村川孝次 高山赤十字病院紀要 第24号：p3-7 (2000)

G. 研究協力者

岩田辰夫；

岐阜県立下呂温泉病院 脳神経外科

山川弘保、岩井知彦；

岐阜市民病院 脳神経外科

小谷嘉則、村川孝次；

高山赤十字病院 脳神経外科

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
阿部康二、村上哲郎	筋萎縮性側索硬化症 (ALS)		遺伝子検査早わかり事典	中外医学社		2001	75
阿部康二、永野功	筋萎縮性側索硬化症 (ALS)		先端医療シリーズ 14 神経・筋疾患	先端医療技術研究所		2001	175-179

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
T.Kubota, M.Dakeishi, J.Nozaki, M.Manabe, A.Koizumi	Probable involvement of a germ-line mutation of an unknown mismatch repair gene in a Japanese Muir-Torre syndrome phenotype	J dermatological Science	23	117-125	2000
T.Kayo, H.Fujita, J.Nozaki, Xiaofei E, and A.Koizumi	Indentification of Two Chromosomal Loci Determining Glucose Intolerance in a C57BL/6Mouse Strain	Comparative Medicine	50	296-302	2000
Takahashi T, Nozaki J, Komatsu M, Wada Y, Utsunomiya M, Inoue K, Takada G, Koizumi A	A new locus for a dominant form of multinodular goiter on 3q26.1-q26.3	Biochem Biophys Res Commun	284	650-654	2001

Nozaki J, Dakeishi M, Ohura T, Inoue K, Manabe M, Wada Y, Koizumi A	Homozygosity mapping to chromosome 5p15 of a gene responsible for Hartnup disorder	Biochem Biophys Res Commun	284	255-60	2001
Fujita H, Haseyama T, Kayo T, Nozaki J, Wada Y, Ito S, Koizumi A	An Increased Expression of Glutathione S-Transferases in the Renal Proximal Tubuli in the Early Stage of Diabetes: a Study in a Mouse Model of Type 2 Diabetes, Akita Mouse	Exp Nephrol	9	380-386	2001
Dakeishi M, Shioya T, Wada Y, Shindo T, Otaka K, Manabe M, Nozaki J, Inoue S, Koizumi A	Genetic epidemiology of hereditary hemorrhagic telangiectasia in a local community in the northern part of Japan	Human Mutation	19	140-148	2001
Seiichi Oyadomari, Akio Koizumi, Kiyoshi Takeda, Tomomi Gotoh, Shizuo Akira, Eiichi Araki, Masataka Mori	A targeted disruption of The CHOP gene protects mice against ER stress-induced diabetes	J Clin Invest	109	525-532	2002
Sumiko Inoue, Kayoko Inoue, Maki Utsunomiya, Jun-ichi Nozaki, Yuichiro Yamada, Toshio	Mutation Analysis of <i>PKD1</i> in Japanese Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease	Human Mutation	In press		

Iwasa, Eitaro Mori, Takeo Yoshinaga, Akio Koizumi	(ADPKD)Patients				
Y. Manabe, Y. Shiro, K. Takahashi, K. Kashihara, and K. Abe	A case of spinocerebellar ataxia accompanied by severe involvement of the motor neuron system	Neurol. Res	22	567-570	2001
K. Abe	Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells	J. Cereb. Blood against ischemic brain injury. Flow Metabol	20	1393-1408	2000
Y. Onodera, M. Aoki, T. Tsuda, H. Kato, T. Nagata, T.Kameya, K. Abe, and Y. Itoyama	High prevalence of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) in an isolated region of Japan	J. Neurol. Sci	178	153-158	2000
Y. Manabe, J.M. Wang, T. Murakami, H. Warita, T. Hayashi, M. Shoji, and K. Abe	Expressions of nitrotyrosine and TUNEL immunoreactivities in cultured rat spinal cord neurons after exposure to glutamate, nitric oxide, or peroxynitrite	J Neuro Res	65	371-377	2001
Warita, Y. Manabe, T. Murakami, Y. Shiro, I. Nagano, and K. Abe	Early decrease of survival signal-related proteins in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice	Apoptosis	6	345-352	2001