

症例2.

20歳頃失調性歩行で発症。30歳頃歩行障害が増悪し、受診した。受診時、眼球運動障害、bulding eyes, 小脳性言語、失調性歩行、深部反射亢進、四肢筋萎縮なし。ジストニア運動およびジストニア姿位を認め、四肢の筋トーンは固縮。40歳頃から車椅子生活。四肢筋萎縮も認めるようになり、また、膀胱直腸障害も見られるようになりバルーン留置となり、時に末梢循環不全様状態となることもあった。58歳、肺炎で死亡。

症例3.

8歳頃、歩行障害で発症。12歳時、四肢失調が増悪し、普通学級通学困難となり初診。知能は正常。著明な眼球運動障害と小脳性言語、小脳性歩行を認め、深部反射は亢進を示した。13歳頃から四肢のジストニア姿位やジストニア運動を認めるようになったが、四肢筋の明らかな萎縮なし。Fasciculation なし。18歳頃より、寒冷時に四肢末梢や耳介にサイアノーシスを認めることが目立つようになった。特に肺泡低換気は認めない。この頃より、時に尿閉となりカテーテルを使用することが見られるようになった。20歳死亡しているところを発見され、担送された。

症例2～3のCAGリピート数は症例1は不明。症例2は56、症例3は80であった。

C. 剖検結果:

一般病理所見では症例1～3共に肺炎像を認めた。一般臓器では心重量が症例1:240g、症例2:240g、症例3:130gであった。症例1～3共に身長170cm前後、症例1, 2は体重50～60kg、症例3は体重45kgであるため、身体の大きさに比較して、3症例共に心重量の低下がみられ、世代を経る毎に顕著化した。病理所見では光顕レベルでは明らかな変性像はなかった。

神経病理学的には脳重量は症例1:1120g、症例2:1340g、症例3:13000gであった。肉眼的には若干の小脳の萎縮傾向を認める以外、著変なし。組織学的には

通常のMJD同様、脳幹被蓋を中心とした神経細胞の変性萎縮とグリオシス、小脳歯状核神経細胞のグルモース変性像、黒質神経細胞、淡蒼球、レイ体の神経細胞の変性脱落、グリオシスを認めた。

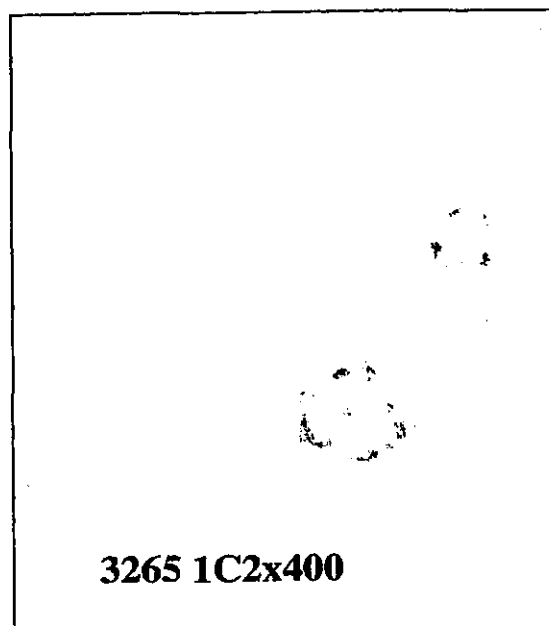


図2. 症例2 橋神経細胞体、および核内にポリグルタミン抗体陽性の封入体を認める。

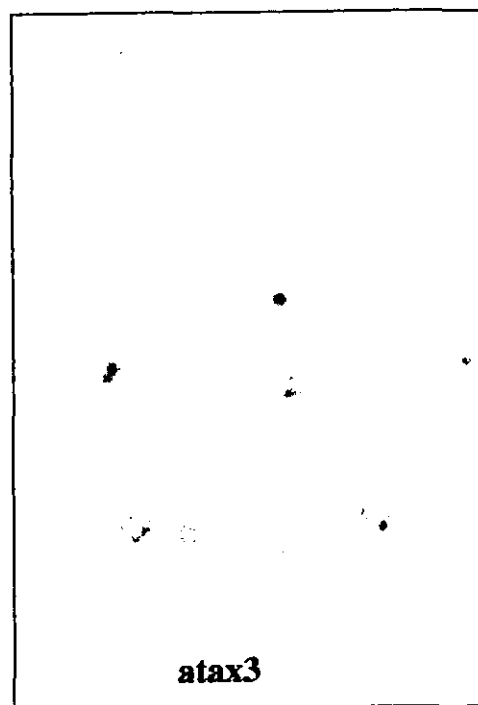


図3. 症例3. 橋神経細胞. 抗 ataxin3 抗体で陽性の核内封入体を認める。

組織化学的には図2に示すように橋、および淡蒼球の神経細胞質、核内にポリグルタミン封入体を認めた。また、図3に示すように ataxin3 抗体陽性の核内封入体も認めた。

さらに我々の方法では図4に示すように、小脳プルキンエ細胞内にも細胞内ポリグルタミン封入体を認め、封入体はほぼ Nissle 顆粒に相当するかのよう染色された。なお、抗ユビキチン抗体染色ではポリグルタミン陽性顆粒を含む細胞の細胞体、核小体、核内封入体が染色されたが、これらがポリグルタミン封入体や ataxin3 と colocalize するかについては検討していない。

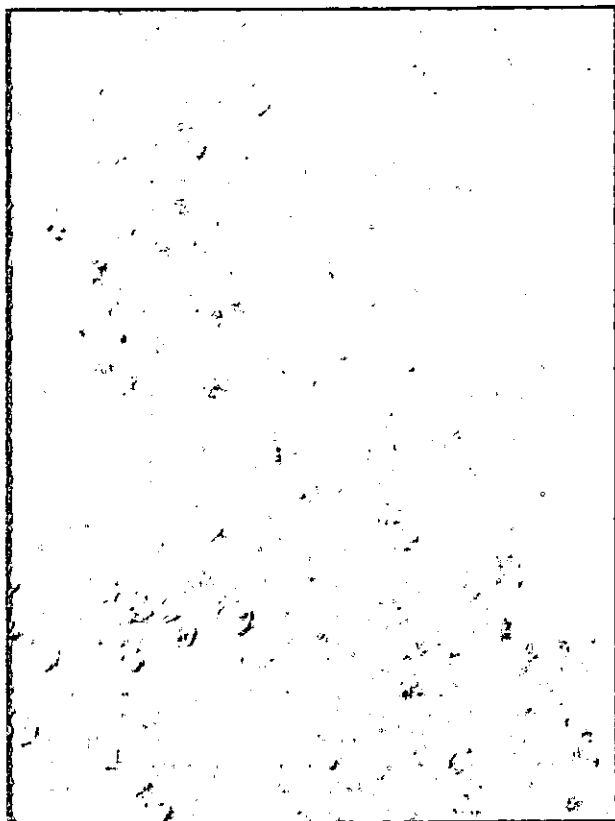


図4. 症例3. 小脳プルキンエ細胞抗ポリグルタミン抗体染色(400倍)

D. 考案

3世代の臨床像は、第一世代が錐体外路症状が不明確であったとされるが、第2, 3世代は典型的な MJD の臨床像を示した。神経病理学的には、基本的には3世代ともに MJD の典型的な病理所見の分布を示したが、

第3世代が最も脳萎縮の程度が軽度であった。本家系の臨床像の特徴は第2世代および第3世代でみられた末梢循環不全状態で、剖検時に心重量の低下として、心拍出量低下が推定された。心病変については心筋繊維の細さとして病理学的には表現されたが、明らかな変性像は認めず、MJD 症例の心所見に関する蓄積が必要であると思われる。

小脳プルキンエ細胞の抗ポリグルタミン抗体陽性封入体については、厳しい染色条件では染色されないが、我々の方法では染色できた。本法では、多系統萎縮症などの対照疾患では染色されず、他のポリグルタミン病である脊髄小脳変性症の他型についての検討、他の MJD 脳に対する染色を現在検討中である。

E. 結論:

MJD では剖検を得る機会が比較的高いが、同一家系での他世代に亘る剖検報告は少なく貴重な家系と考えた。本家系の MJD 基本病変分布はほぼ同一であるが、若年死亡例では第1, 2世代に比較して脳萎縮の程度が軽度であった。また、本家系に見られた心重量の低下が MJD によるものか、本家系に特徴的なものかについては症例の蓄積が必要である。

参考文献

1. K Iwabuchi et al: Autosomal dominant spinocerebellar degenerations. Clinical, pathological, and genetic correlations. Rev Neurol 155:255-270.1999.

F. 研究発表:

1. 第45回神経病理学会発表予定

G. 知的所有権の獲得状況:

1. 特許取得;なし。
2. 実用新案登録;なし。
3. その他;なし。

都城地域に多発する常染色体優性脊髄小脳変性症の臨床的、遺伝学的研究

研究者 納 光弘

（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科、老年病学）

【共同研究者】氏名：○高嶋 博、平野隆城、大窪隆一、荒田 仁、
有里敬代、田島圭子、有村公良

研究要旨

都城に多発する高齢発症の常染色体優性脊髄小脳変性症の患者 8 家系 15 例について、臨床的に解析し、発症や臨床経過、症状、神経所見、MRI などについて疾患の特徴をまとめた。

遺伝子学的にも検討し、2 点連鎖解析では遺伝子マーカー D16S3107 で Lod score 4.82 優位な値を示し、16 番染色体に連鎖が確認された。本家系は、常染色体の 16 番染色体に連鎖する、高齢発症の pure な小脳失調症と特徴づけられ、疾患遺伝子の同定を行っている。

分担研究者： 納 光弘
鹿児島大学医歯学総合研究科
神経病学講座 神経内科・老年病学・教授

A. 研究目的

都城に多発する高齢発症の常染色体優性脊髄小脳変性症の臨床的特徴、および遺伝的原因を明らかにする。

B. 研究方法

患者 8 家系 15 例について、臨床的に解析し、発症や臨床経過、症状、神経所見、MRI などについて疾患の特徴をまとめた。

ヒトゲノム・遺伝子解析に伴う倫理指針に準拠した研究概要について詳細に説明したのち、文書にて同意を得た 7 家族 28 名（うち患者 19 名）において遺伝子学的検討を行った。

はじめに、既知の遺伝子異常の有無を調べるため、SCA 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12, 17, DRPLA について、トリプレットリピートの異常を調べた。次に多型 DNA マーカーを用いて遺伝子連鎖解析を行い、疾患遺伝子存在部位を決定した。

C. 研究結果

1. 臨床的特徴

1) 40～65 歳で発症し、常染色体優性遺伝の形式を示す。

2) 小脳症状（歩行障害または構音障害）で発症し、緩徐進行性。

3) 全家系が都城盆地の狭い地域を出生地とする。

4) 小脳症状以外に、軽度の腱反射亢進、軽度の下肢筋力低下、感覚障害（主に深部感覚障害）が多く見られる。進行例に、膀胱直腸障害、振戦あり。

5) 画像上は、小脳および橋被蓋部の萎縮を認めた。

6) 痴呆などの精神症状なし。

7) 全体的に生命予後は良好。

8) タルチレリン水和物に効果を示す例有り。

9) 既知の SCA 遺伝子異常なし。

2. 遺伝子学的検討

SCA 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12, 17, DRPLA について、トリプレットリピートの異常を調べたが異常は認めなかった。

次に、他の SCA との異同を調べるため、連鎖解析法にて現在報告されている既知の遺伝子座について調べたところ、唯一、16q22 に位置するマーカーに連鎖を認めた。2 点連鎖解析では、遺伝子マーカー D16S3107 で Lod score 4.82 と最も高い値を示し、優位な連鎖を認めた。

また、遺伝子ハプロタイプおよび連鎖不平衡解析で遺伝子マーカー D16S3086 と D16S3067 の間（遺伝子距離は 2.1MB）に連鎖を認めた。

D. 考察

本家系は、常染色体の 16 番染色体に連鎖する、高齢発症の pure な小脳失調症と特徴づけられる。

この疾患の連鎖領域は、SCA4 または、16q-ADCCA と全く重なる領域であり、特に 16q-ADCCA とは、臨床的に表現型が類似しており、同一の遺伝子異常を示す疾患である可能性が高いと考えられた。現在さらなる家系の収集を行ない、疾患遺伝子の同定を試みている。

E. 結論

1. 都城に多発する脊髄小脳変性症の臨床型を明らかにした。

2. 遺伝子解析の結果から本疾患は 16q22 にマップされ、SCA4 または、16q-ADCCA と同一の原因（遺伝子異常）で起こる可能性が高いと考えられた。

厚生科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

運動失調に関する調査及び病態機序に関する研究 (第 16 染色体連鎖に連鎖する常染色体優性遺伝性皮質性小脳萎縮症の原因遺伝子の同定)

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分野 教授

共同研究者 融 衆太、李 明順、石川欽也 東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学分野

今回我々は、第 16 染色体連鎖に連鎖する常染色体優性遺伝性皮質性小脳萎縮症の原因遺伝子の同定を行うために、ハプロタイプ解析・遺伝子解析を行った。その結果、候補領域の絞り込みに成功し、患者に特有な塩基置換を見出した。また、病理学的検索で本病型に特徴的な変化を見出した。

A. 研究目的

我々は本邦の常染色体優性遺伝性皮質性小脳萎縮症(ADCCA)の家系を多数集積し、その半数が SCA6 であり、残る家系は第 16 番染色体長腕 (16q13-q22) の約 10cM の領域に連鎖することを見出した(Nagaoka et al. Neurology, 2000)。本症の遺伝子座は、既に報告されていた SCA4 遺伝子座にほぼ一致していた (Flanigan et al. Am J Hum Genet, 1996)。しかし、SCA4 と本症では臨床的にはかなり異なっており、SCA4 は、米国から一家系のみ報告されている稀な家系で小脳失調を認めるほか、感覚障害や腱反射減弱といった末梢神経障害が 100%にみられ、また錐体路徴候がみられる例もある。一方、本症は本邦の ADCCA のなかで比較的多いものと思われ、高齢発症 (平均 55.9 歳) の純粋な小脳失調で、表現促進現象に関しては、本症ではより軽度である (平均 4.9 歳)。したがって、SCA4 と本症とが allelic disease であ

るかどうか今後の研究により解明していく必要がある。本症について、さらにこの領域の多数の DNA マーカーを検索した結果、この部分では、全家系に共通する創始者ハプロタイプを認め、候補領域を約 3cM に狭めた (Takashima et al. J Hum Genet, 2001)。本研究の目的は、この第 16 染色体連鎖 ADCCA の原因遺伝子を同定し、その発症機序の解明と治療法の開発を行うことである。

B. 研究方法

既に報告したとおり、我々が連鎖を見出した第 16 番染色体に連鎖する優性遺伝性皮質性小脳萎縮症に関して、これまでのポジショナルクローニングの結果、候補領域は約 3cM と考えられていたが、この領域内のマイクロサテライト DNA マーカーと sequence tagged site (STS) マーカーを用いて、bacterial artificial chromosome (BAC) クローンを選定し、BAC クローンの連続化

(contig) の構築を行い、また、公表されたデータベースの解析を行った結果、この BAC contig は最大で約 5.8Mb の領域を有することが分かった。

本疾患が、優性遺伝性で緩徐進行性の経過をとる神経変性疾患であり、軽度ながら表現促進現象を認めるなど、CAG リピートを含めたいわゆるリピート病に合致しており、その範疇に入る可能性が十分考えられたので、リピート伸長の有無を検索した。この領域内に認められる tandem repeat を、リピート伸長の有無について解析した。現在までのところ、CAG リピートを含めて明らかなりピートの異常伸長は見つかっていない。

一方で、この領域をさらに狭めるために、他施設の協力を得て、連鎖が示唆され出身地の異なる新たな家系を追加し、既知のマイクロサテライト DNA マーカー10 個、および我々が独自に見出した 15 個のマーカーについて、患者および正常対照者のゲノム DNA を用いて PCR を行い、蛍光オートシーケンサーを用いて解析を行い、元の 6 家系との共通したハプロタイプを示す領域を検索した。

また、候補領域の中に含まれる遺伝子をデータベースの中から検索し、それぞれにつきエクソンを含む領域を増幅するようなプライマーを設定し、患者および正常対照者のゲノム DNA を用いて PCR を行い、DNA 蛍光オートシーケンサーを用いて直接シーケンシングを行い、変異の有無について検索した。また、ゲノム情報から 5' 端の遺伝子情報が得られないものについては 5' RACE 法を用いて上流の塩基配列を決定し、同様に

患者での変異の有無を解析した。これまでに解析した遺伝子の総数は 50 近くに上った。

さらに、我々の集積した家系で剖検例が得られたので、病理学的検索を行った。

(倫理面での配慮)

遺伝子解析を協力していただいた被検者には、該当施設の倫理規定に則った方法でインフォームドコンセントを得て、文書にて承諾を取り、実験を行った。

C. 研究結果

1. ハプロタイプ解析

既知のマイクロサテライト DNA マーカー 10 個および我々が独自に見出したマーカー 15 個、計 25 個につき、ハプロタイプを解析を行った結果、複数のマーカーについて全家系の発症者が共通したアレルを有しており、創始者効果を認めた。この結果、約 4.8Mb あった候補領域は約 600Kb に狭めることができた。さらに、この中に、健常者 40 人には認められないアレルを発症者に共通して認め、このマーカーで最も高い連鎖不平衡が示された。

2. 遺伝子解析

この領域は、遺伝子が大変豊富に存在しており、既に登録されているもので 30 以上ある。これらの遺伝子のほぼすべて解析をおこなった結果、患者に特有な塩基置換を見出した。同塩基置換は健常者にはこれまでのところ見られていない。

3. 病理学的検索

剖検例は死亡時95歳の女性で、小脳性失調症が70歳頃より出現し、末期は難聴と老年性痴呆を伴っていた。

マクロ所見では小脳虫部上面に軽度の萎縮を認めた。

組織学的には小脳皮質の変性がみられ、特にプルキンエ細胞の萎縮・神経細胞脱落を認めるが、顆粒細胞の脱落は軽度であった。この変化は小脳虫部に最も強く認められた。強拡大でみると、萎縮したプルキンエ細胞の周囲にはアモルファスな構造を認めました。これを、シナプス前神経終末に特異的なシナプトフィジンで染色すると、このアモルファスな構造の少なくとも一部はシナプトフィジン陽性であった。

次に、プルキンエ細胞のマーカーであるカルビンディンに対する免疫染色を行うと、形態の異常な樹状突起を多数胞体から出している異常なプルキンエ細胞が認められ、また、胞体での免疫反応性が減少し、わずかにその周囲に顆粒状の反応物を認めるプルキンエ細胞がしばしば認められた。

D, E. 考察および結論

今回、多数例の家系を追加して、ハプロタイプ解析を行った結果、本症の遺伝子の候補領域を 600Kb に狭めることができた。この領域に存在する遺伝子を解析した結果、患者に特有な塩基置換をある遺伝子の exon 内に見出した。同塩基置換は健常者にはこれまでのところ見られていない。現在、この塩基置換が真の遺伝子変異であるかどうかについて、剖検脳を用いた遺伝子の転写産物の解析を含めて、詳細に検討している。

また、病理学的検索を行った結果、萎縮したプルキンエ細胞の周囲には少なくとも一部

はシナプトフィジン陽性であるアモルファスな構造を認め、したがってプルキンエ細胞が変性・萎縮する過程で、これに inputs するシナプス前終末が増生しているという可能性が考えられる。このような変化は同じADCCAであるSCA6では認められないことなどから、本病型に特徴的な変化であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Li M. Ishikawa K. Toru S. Tomimitu H. Takashima M. Goto J. Takiyama Y. Sasaki H. Imoto I. Inazawa J. Toda T. Kanazawa I. Mizusawa H. Physical map and haplotype analysis of 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (ADCA) type III in Japan. J Hum Genet. 2003; 48: 111-118.

2. 学会発表

融 衆太, 李 明順, 石川 欽也, 高橋 博樹, 大和田 潔, 水澤 英洋.

第16番染色体に連鎖する優性遺伝性小脳失調症の頻度と臨床的特徴. 第44回日本神経学会総会. (2003.5.15-7, 横浜)

H. 知的所有権の獲得

なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

長野県における常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症の疾患頻度
—16q-ADCCA のハプロタイプ解析を含めて—

吉田邦広 信州大学医学部附属病院遺伝子診療部副部長

共同研究者 岡野友美¹⁾、清水雄策²⁾、大原慎司³⁾、福嶋義光⁴⁾、池田修一¹⁾

¹⁾信州大学医学部第三内科、²⁾伊那中央病院神経内科、

³⁾国立療養所中信松本病院神経内科、⁴⁾信州大学医学部附属病院遺伝子診療部

研究要旨:長野県の常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症(AD-SCD)の疾患頻度を検討した。長野県内の63家系の検討ではSCA6(15家系、24%)が最も多く、次いでDRPLA(9家系、14%)であったが、全国的に頻度が高いとされるSCA3/MJDは少なかった(2家系、3%)。またSCA1、SCA2、SCA3/MJD、SCA6、SCA7、SCA12、SCA17、DRPLAのいずれにも該当しない原因遺伝子未同定のAD-SCDが35家系(56%)を占め、全国的な平均に比べはるかに高頻度であった。これらの未同定家系の大半(30家系)は比較的高齢発症の純粋小脳型と考えられた。この30家系を用いて、第16番染色体長腕に連鎖する優性遺伝性皮質性萎縮症(16q-ADCCA)のハプロタイプ解析を行ったところ、検索した8つのマイクロサテライトマーカーにおいて、既報の創始者ハプロタイプに矛盾しない家系は見いだせなかった。長野県には原因遺伝子未同定のAD-SCD家系が多数集積する可能性が示唆された。

A. 研究目的

常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症(AD-SCD)は分子遺伝学的には異質性の高い疾患群であり、その疾患頻度には地域差があることが知られている。長野県は急峻な山岳・高原により県内各地域が隔てられ、それぞれに独自の文化、生活を育んできたことから特定の遺伝性疾患が集積しやすい条件を有すると思われる。本研究では長野県におけるAD-SCDの疾患頻度を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

対象は長野県出身でかつ2世代以上にわたって複数の家系内罹患者が確認できたAD-SCDの63家系82名である。末梢白血球からゲノムDNAを抽出し、既報に従ってSCA1、SCA2、SCA3/MJD、SCA6、SCA7、SCA12、SCA17、DRPLAに対する遺伝子解析を行い、当該原因遺伝子のCAG repeat数を算出した。

これら既知のSCDが否定された35家系のうち臨床的に緩徐進行性の純粋小脳型と考えられる30家系につき、各家系から1

名ずつ抽出してLiら¹⁾、Takashimaら²⁾の報告に従って16q-ADCCA患者に共通する創始者ハプロタイプを検討した。現時点までに有意な連鎖不平衡の見られたマイクロサテライトマーカーを中心に8種類のマーカー(TTCC01、GATA01、TTTA001、CTTT01、D16S496、D16S3067、D16S3141、GT01)を用いて当該アレルのサイズを解析した。

(倫理面での配慮)

遺伝子検査にあたっては、被験者に対して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。また検体、遺伝子解析結果は当院遺伝子診療部において一括管理し、個人情報の保護には十分に配慮した。

C. 研究結果

2003年10月の時点で長野県内の10ヶ所の保健所で集計されたSCDの臨床調査個人表は491人分であった。長野県の人口を約220万人とすると県内のSCDの罹患率は10万人あたり約22人となり、これは全国的な平均(10万人あたり7-10人)の2倍程度と推定された。地域別に見ると背景人口の割に北信地域で罹患頻度が少ない傾向が見られた。

AD-SCD63家系のうち遺伝子検査により診断が確定したのは28家系(44%)であった。その内訳はSCA6が15家系(24%)と最も多く、次いでDRPLAが9家系(14%)、SCA3/MJDとSCA1がそれぞれ2家系(3%)であった。今回の検索ではSCA2、SCA7、SCA12、SCA17家系は確認できなかった。また残りの35家系(56%)については上記のいずれもが否定された。未同定家系の割合は佐久地方を中心とする東信地域(19家系中15家系、79%)および伊那地方を中心と

する南信地域(15家系中9家系、60%)で高い傾向が見られた。なお家族歴が明らかでない孤発の18人について検索したところ2人がSCA6、1人がSCA3であることが確認されたが、他の15人については上記のいずれもが否定された。

16q-ADCCAのハプロタイプ解析に関しては、検索した30家系のうち16q-ADCCA家系に共通して見られる創始者ハプロタイプに完全に一致する家系は見いだせなかった。

D. 考察

国内の他地域と比較して、長野県のAD-SCDの特徴としては、1)SCA3/MJDの頻度が相対的に低いこと、2)原因遺伝子が未同定のAD-SCDの頻度が高いこと、が上げられる。SCDのうち約40%が遺伝性で、その大半が常染色体優性遺伝性とする、長野県にはおよそ100-150家系のAD-SCD家系が存在する。したがって今回検討した63家系は全体の半数近くを占めるものと推察され、およその疾患傾向は反映していると考えられる。ただ地域的には木曾地方や長野市以北、駒ヶ根市以南の患者の集積が不十分であり、全県的傾向とするにはやや難がある。

原因遺伝子未同定家系は全国的には10-30%台とされるが、今回の検討では56%に及んでおり、このことは長野県のきわだった特徴と考える。これらの家系の大半は比較的高齢発症の純粋小脳型であり、臨床的にSCA6が疑われた家系が多かった。この点は最近提唱されている16q-ADCCAに合致する特徴である。さらに16q-ADCCAは全国的に分布し、SCA6やSCA3/MJDに次いで高頻度であることが指摘されている

ことから、これらの原因遺伝子未同定家系に対して、16q-ADCCA のハプロタイプ解析を行った。その結果、これらの家系の中で今回検索した 8 つのマイクロサテライトマーカーに関して 16q-ADCCA の創始者ハプロタイプに矛盾せず、16q-ADCCA が強く示唆される家系は見られなかった。ただ 16q-ADCCA の診断は現時点では 3 cM に分布するマイクロサテライトマーカーを用いた間接的な遺伝子診断であるため、上記の未同定家系の中に 16q-ADCCA が含まれる可能性は完全には否定できない。

長野県の未同定家系の特徴として、佐久地方や伊那地方など比較的限局した地域に集積する傾向が見られることは注目すべき点と思われる。このことは 16q-ADCCA を含めた新たな AD-SCD 病型が長野県内の特定の地域に集積している可能性を示唆するものである。このような地域では特有の連鎖不平衡が存在する可能性もあり、今回の結果は、今後のゲノムワイドな解析の足がかりになると考えられる。

E. 結論

長野県の AD-SCD の疾患頻度として、SCA6 と DRPLA が多い一方、他地域と比較して SCA3/MJD の相対頻度が低い傾向が見られる。さらに長野県には現時点で原因遺伝子が未同定の AD-SCD 家系が高頻度に存在し、かつ比較的限局した特定の地域に集積する傾向が示唆される。今後、これらの原因遺伝子未同定の家系に対して、16q-ADCCA を含めた新たな AD-SCD 病型の探索を行う予定である。

(引用文献)

1) Li M, Ishikawa K, Toru S, et al. *J Hum*

Genet 48: 111-118, 2003.

2) Takashima M, Ishikawa K, Nagaoka U, et al. *J Hum Genet* 46: 167-171, 2001.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Hashimoto T, Sasaki O, Yoshida K, Takei Y, Ikeda S. Periodic alternating nystagmus and rebound nystagmus in spinocerebellar ataxia 6. *Mov Disord* 18: 1201-1204, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし

分担研究報告書

皮質性小脳萎縮症における Protein kinase C gamma (PRKCG) 遺伝子変異の検討

分担研究者: 佐々木秀直 北海道大学医学研究科 神経病態学講座神経内科学分野

共同研究者: 矢部一郎¹, 山下 功², 辻 省次³

1) 北海道大学医学研究科 神経病態学講座神経内科学分野

2) カリフォルニア大学神経内科

3) 東京大学大学院医学系研究科 神経内科

研究要旨

常染色体 19q13.4-qter に遺伝子座を有する脊髄小脳変性症 14 型(SCA14)は Proteinkinase C gamma (PRKCG) 遺伝子の第 4 エキソンにおける点変異に起因する疾患である。臨床的には小脳性運動失調が主な症候であって、生命予後は良好である。既知の起因遺伝子が特定されていない自験例においても同一の変異を示す例が認められた。皮質性小脳萎縮症の病像を示す一群に SCA14 が含まれている可能性がある。

A. 研究目的

成年期に発病する脊髄小脳変性症(以下 spinocerebellar ataxia: SCA)は原因の異なる様々な疾患を含んでいる。我が国の SCA の 60~70%は非遺伝性疾患からなり、その中で最も頻度の高い疾患は多系統萎縮症(MSA)である。残りの 30~40%は、地域により異なるが、遺伝性疾患と推定されている。遺伝性 SCA においても原因の異なる多様な疾患を含んでいる。現在までに、遺伝子座もしくは原因遺伝子の起因変異が同定された疾患は 20 余にのぼり、その多くはトリプレットリピート病である。

SCA14 遺伝子座は第 19 染色体 19q13.4-qter に決定されたが、起因遺伝子と変異については長らく不明であった。SCA14 の症状は緩慢進行性の小脳性運動失調である。家系によっては若年発症

例において軀幹の不規則な震えを間欠的に伴うことがある。しかし、大部分は緩慢進行性の運動失調が唯一の症候であり、生命予後も良好である。本邦の SCA14 家系においては間欠的症候の発現や発病年齢に促進現象を示すことから、我々は候補領域内に位置する繰り返し配列や、チャンネル遺伝子について解析を試みたが、原因遺伝子を見出すには至らなかった。2003 年にアメリカの家系において、その原因遺伝子がセリン・スレオニンキナーゼファミリーに属する protein kinase C γ (PRKCG)であることが明らかにされた。報告された起因変異は全て 1 塩基置換によるミスセンス変異であり、いずれも変異部位は第 4 エクソンに位置していた。そこで、原因が特定されていない運動失調症において、この遺伝子変異を検討した。

B. 研究方法

対象は連鎖解析により SCA14 と推定された家系である。対照として既知の SCA 遺伝子変異が否定された原因不明の SCA 家系の発端者 24 名、健康者 50 名である。いずれも口頭に加えて文書で研究趣旨を説明し、文書で同意を得た。また、研究は倫理委員会の承認を得て行った。

PRKCG 遺伝子全 18 エクソンを PCR 法にて増幅し、蛍光 DNA シークエンサー (ABI PRISM377) を用い direct sequence 法にて解析した。

C. 研究成果

SCA14 と考えられる家系において PRKCG 遺伝子 380 番目のアデニンがグアニンに置換する一塩基置換を認めた。これは 127 番目のアミノ酸をグルタミンからアルギニンに置換するミスセンス変異であった。この変異は、対照群には認められなかった。原因遺伝子が未知の遺伝性 SCA 家系の発端者 24 名にも、同様の変異は認められなかった。

D. 考察

解析結果に示すように、本邦にも PRKCG 遺伝子変異に起因する疾患の存在が確認された。本邦例で認められた変異はアメリカの家系で報告された変異とは異なっていたが、第 4 エクソンに位置することは共通していた。PRKCG は catalytic domain と regulatory domain の二つの domain を持つ。第 4 エクソンは、そのうち regulatory domain の cystein rich な領域である Cys2 領域を翻訳している。この部位は Zn や diacylglycerol が結合する部位であり、これらとの結合により酵素活性が高まり、細胞内情報伝達が機能することが知られている。現在のところ SCA14 に関連する

変異は全て第 4 エクソンに集積しており、このことはこの領域のミスセンス変異により Zn や diacylglycerol と PRKCG の結合能が低下し酵素活性が低下することによって、未知の機序により小脳機能に影響を与え、疾患発症に導く可能性があることを示唆している。

E. 結論

SCA14 は PRKCG 遺伝子第 4 エクソンにおける点変異に起因する。本疾患は皮質性小脳変性症とされてきた疾患群に含まれていた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yabe I, Sasaki H, Chen H-H, Raskind WH, Bird TD, Yamashita I, Tsuji S, Tashiro K: Spinocerebellar ataxia type 14 caused by a mutation in protein kinase C gamma. Arch Neurol 60:1749-1751, 2003

2. 学会発表

Yabe I, Sasaki H, Chen D-H, Raskind W, Bird TD, Yamashita I, Tsuji S, Tashiro K: Spinocerebellar ataxia type 14 is caused by a mutation in protein kinase C gamma. American Neurological Association 128th annual meeting and the 6th annual neurology outcomes symposium, San Francisco, Oct 19-22, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

脊髄小脳変性症 6 型（SCA6）の創始者効果の検討

分担研究者 川上秀史 広島大学大学院脳神経内科

共同研究者：寺澤英夫，織田雅也，森野豊之，宮地隆文，和泉唯信，丸山博文，松本昌泰
広島大学大学院脳神経内科

研究要旨

中国・関西地方に高い発症分布を示す脊髄小脳変性症 6 型（Spinocerebellar ataxia type 6, SCA6）の遺伝的背景を明らかにするため，創始者効果について検討した。SCA6 の原因遺伝子 CACNA1A 近傍に存在する DNA 多型マーカーを用いてアレル頻度の解析を行い，さらに SCA6 家系におけるハプロタイプの同定と出身地分布との関連性について検討した。日本人 SCA6 家系の大半に共通するハプロタイプ・コアを有し，3 種類の主要ハプロタイプが同定された。このうち 2 種類は全国的な広い分布を示し，他方 1 種類は，中国・関西地方に特異的な分布が示唆された。主要ハプロタイプの頻度と分布が，SCA6 の発症頻度の地域的分布差に影響することが示唆された。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症 6 型（Spinocerebellar ataxia type 6, SCA6）は，発症頻度に地域的分布差が存在する。本邦，とくに中国・関西地方では，世界的にみても最も発症頻度が高いことが明らかにされており，その遺伝的背景を明らかにするためハプロタイプの解析を行い，創始者効果について検討した。

B. 研究方法

書面によって同意の得られている SCA6 患者群 150 名（発症年齢は 24-79 歳，平均 49.7±12.0 歳）と同様の年齢や出身地背景をもつ健常群 100 名を対象とし，SCA6 の原因遺伝子 CACNA1A の CAG 繰り返し配列近傍に存在する 5 種類のマイクロサテライトマーカー（D19S221，

D19S840，D19S1150，D19S226，D19S885）と 3 種類の単塩基多型（nt1457，nt2369，rs16031）について，アレルの解析を行い，SCA6 群と健常群との間でアレル頻度について統計学的検定を行った。また，SCA6 家系においては，ハプロタイプの同定と出身地分布との関連性についても検討した。

なお，本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日文科省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）に基づき，広島大学医学部倫理委員会の承認を得て実施された。

C. 研究結果

マイクロサテライトマーカーの多型について，D19S221 は 18 種類，D19S840 は 9 種類，

D19S1150 は 10 種類, D19S226 は 14 種類, D19S885 は 11 種類のアレル多型の存在を認めた. CACNA1A 近傍の DNA 多型マーカーのうち, D19S840, D19S1150, nt2369, rs16031 において, SCA6 群と健常群の両群間のアレル頻度に統計学的有意差を認めた [p<0.0001 (D19S840, nt2369, rs16031), p=0.0006 (D19S1150)]. SCA6 家系を対象に “D19S1150-nt1457-nt2369-rs16031” の CACNA1A 遺伝子内マーカーを用いてハプロタイプの同定を行った結果, “1-A-G-C”, “5-A-G-C”, “9-A-G-C” の 3 種類の主要ハプロタイプが同定され, “A-G-C” という共通のハプロタイプ・コアを全体の 81%に認めた. SCA6 家系における主要ハプロタイプと出身地分布との関連性では, “1-A-G-C”, “5-A-G-C” は全国的に広い分布が示唆されたが, “9-A-G-C” は中国・関西地方, 特に瀬戸内沿岸部に特異的に高い集積が認められ, 同地域における SCA6 家系の半数を占めた.

D. 考察

3 種類の主要ハプロタイプのうち, “1-A-G-C”, “5-A-G-C” は既知の報告と一致し, 全国的に広い分布が示唆された. 本研究にて新規に同定された “9-A-G-C” は, その分布に地域特異性が高く, 特に, 中国・関西地方に特異的な集積が認められた. 中国・関西地方における SCA6 の発症頻度は, 東日本や欧米諸国に比べて高く, 全国的に分布するハプロタイプ以外にも, 同地域に特異的な集積を示す新規ハプロタイプの存在が, 同地域の SCA6 の浸透率や発症頻度の高さに大きく影響している可能性が示唆された. SCA6 家系の大半は, “A-G-C” とい

うハプロタイプ・コアを有する共通の発端者から, それぞれの主要ハプロタイプに相当する 3 種類に分岐したと考えられ, それぞれのハプロタイプの頻度と分布が, SCA6 の発症頻度の地域的分布差に影響することが示唆された.

E. 結論

日本人 SCA6 家系には 3 種類の主要ハプロタイプが存在し, このうち 1 種類は中国・関西地方の特異的な分布を示し, SCA6 の発症頻度の地域的分布差に影響する.

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

- 1.Oda M, Maruyama H, Komure O, Morino H, Terasawa H, Izumi Y, Imamura T, Yasuda M, Ichikawa K, Ogawa M, Matsumoto M, Kawakami H. Expansion of 44–47 CAG/CAA Repeats in the TATA-Binding Protein Gene May Not be Fully Penetrat in Spinocerebellar Atxia 17. *Archives of Neurology* (in press)
- 2.Terasawa H, Oda M, Morino H, Miyachi T, Izumi Y, Maruyama H, Matsumoto M, Kawakami H. Molecular basis of prevalence and founder effect for Japanese SCA6 population. *Neuroscience Lett* (in press)
3. Honjo K, Ohshita T, Kawakami H, Naka H, Imon Y, Maruyama H, Mimori Y, Matsumoto M. Quantitative assessment of cerebral blood flow in genetically confirmed spinocerebellar ataxia type 6 *Archives of Neurology* (in press)

H.知的財産権の出願・登録状況 なし

家族性多系統萎縮症の連鎖解析

～Multiplex family を基盤とした多系統萎縮症の疾患感受性遺伝子同定へ

向けてのアプローチ～

分担研究者 小野寺理 新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター

共同研究者 原 賢寿¹⁾, 西澤正豊²⁾, 宮下哲典³⁾, 桑野良三³⁾, 柿田明美⁴⁾, 山田光則⁴⁾,
高橋 均⁴⁾, 若林孝一⁵⁾, 登木口 進⁶⁾, 平澤基之⁷⁾, 水野美邦⁷⁾,
尾方克久⁸⁾, 後藤 順⁹⁾, 辻 省次⁹⁾

所属：1) 国立療養所新潟病院 2) 新潟大学脳研究所神経内科 3) 新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター 4) 新潟大学脳研究所神経病理 5) 弘前大学脳神経疾患研究施設神経病理 6) 小千谷総合病院神経内科 7) 順天堂大学脳神経内科 8) 国立精神神経センター武蔵病院神経内科 9) 東京大学大学院医学系研究科神経内科

研究要旨：多系統萎縮症(MSA)はこれまで遺伝性が認められない疾患とされてきたが、最近になり MSA の家族内発症例の報告が相次いでいる。そこで、MSA の病因遺伝子ないし疾患感受性遺伝子の同定を目的に、ハイスループットな連鎖解析のシステムを構築し、3家系を対象に全ゲノム領域の連鎖解析を行った。Parametric 解析では有意な連鎖部位を同定できなかったが、遺伝モデルを必要としない non parametric 解析では 1, 2, 4, 5, 7, 11, 13, 16 番染色体上にそれぞれ NPL score >1.0 の領域を認めた。今後、候補領域を絞り込むには更なる家系の集積が必要である。

A. 研究目的

これまで多系統萎縮症(以下 MSA)は弧発性の脊髄小脳変性症の代表とされ、遺伝性が認められない疾患であるとされていた。しかし、我々は3家系の MSA の同胞発症例を経験した。(最新の全国調査では、11家系の MSA 家族例が報告されている。)この事実から、MSA の発症に遺伝因子が関与するという仮説を立て、MSA の病因遺伝子あるいは疾患感受性遺伝子の同定を目的に、全ゲノム領域の parametric および non parametric 連鎖解析を行った。

B. 研究方法

Gilman の consensus criteria に合致し、遺伝子解析にて SCA1, 2, 3, 6, DRPLA が否定され、かつ MRI 上 MSA を支持する所

見(小脳+橋萎縮、橋の十字サイン、被殻後外側の異常信号)を有し、同胞発症者を有する3家系(A, B, C, definite 1名, probable 3名, possible 2名)を対象に、全ゲノム領域の parametric および non-parametric 連鎖解析を行った。Genotyping には全ゲノムを平均 4.6cM 間隔で分布する 811 の microsatellite marker を用いた。Parametric 解析のモデルとしては、両親の血族婚を1家系(A家系)に認めること、累代発症を認めないことから常染色体劣性遺伝のモデルを想定したが、B, C家系では両親の血族婚を認めない点から遺伝子頻度の高い劣性モデルを想定した。2点解析の計算には LINKAGE program (ver 5.1)の MLINK を、多点解析には Allegro (ver 1.1)を使用した。また今回、

Allegro による計算に要するファイルを、Excel の typing data から自動的に生成する program “ MakeLink (ver 1.2)” を作成し、計算の効率化、加速化をはかった。

(倫理面での配慮)

協力していただいた被験者には、DNA の保存と同疾患研究を行うことについて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。また、プライバシーを守るため十分な情報保全を行った。

C. 研究結果

2 点連鎖解析では 5 番染色体に 2 箇所 (D5S422, D5S2050)、11 番染色体に 1 箇所 (D11S4174) にそれぞれ LOD>2.0 の locus を認めたが、各 locus の周辺をさらに詳細に解析した結果、多点解析では LOD<1.0 と低下し連鎖の可能性は低いと考えられた。一方、Non-parametric 連鎖解析の結果では、1, 2, 4, 5, 7, 11, 13, 16 番染色体上にそれぞれ NPL score >1.0 の領域を認めた。

また、今回構築したハイスループットな解析システムにより、全ゲノム領域の genotyping は約 2 ヶ月、1 家系に要する全ゲノムの LOD 計算は約 1 日の短時間で可能となった。

D. 考察

Non-parametric 連鎖解析は parametric 連鎖解析と比べ、解析のアルゴリズムの違いから、浸透率や遺伝形式などが不明の疾患や多遺伝子疾患の解析が可能であるという大きな利点があるが、一方有意な LOD score を得るには多数の家系を必要とするため、今後この手法により候補領域を絞りこむには類似家系の集積が必須条件である。また、今回多点解析用の program として従来の GENEHUNTER の機能を拡張した Allegro を導入した。多点解析は一般に 2 点解析に比

べ、haplotype を組みながら計算を行うため false positive が少ない利点もあるが、膨大な計算を行うため、計算に時間を要し、かつ解析する遺伝子座の数も制限されていた。しかし、この Allegro の導入により従来の GENEHUNTER の 30 倍の速さで計算が行え、かつ対象とする遺伝子座も無制限に行えるようになったため、連鎖解析を大幅にハイスループット化することができた。今後の課題としては、臨床的にできるだけ均一な類似家系を集積し、解析を進めていくことが挙げられる。また、本研究は今後、孤発性の MSA を対象とした大規模な association study を効率よく進めるための重要なステップと考えられる。

E. 結論

- 1) Parametric および non-parametric 多点解析のハイスループットなシステムを構築した。
- 2) MSA の同胞発症を有する 3 家系を対象とした全ゲノム領域の連鎖解析を行い、遺伝子頻度の高い劣性モデルによる parametric 連鎖解析では有意な連鎖領域は同定できなかったが、Non-parametric 連鎖解析では 1, 2, 4, 5, 7, 11, 13, 16 番染色体上にそれぞれ NPL score >1.0 の領域を認めた。
- 3) 今後、候補領域を絞るためには類似家系の集積を要する。

F. 研究発表

(学会発表)

原 賢寿, 宮下哲典, 桑野良三, 柿田明美, 山田光則, 高橋 均, 若林孝一, 登木口 進, 平澤基之, 水野美邦, 西澤正豊, 後藤 順, 辻省次 : 第 44 回日本神経学会総会 2003.5.15 横浜

Kenju H, Takao H, Mitsuteru S, Kenshi T, Akinori

M, Ryozo K, Akemi K, Hitoshi T, Susumu T,
Motoyuki H, Yoshikuni M, Jun G, and Shoji T:
Clinical and Genetic Analysis of Familial Multiple
System Atrophy. 55th Annual Meeting of the
American Academy of Neurology 2003.3.29-4.5,
Honolulu, Hawaii

G 知的所有権の取得状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）

（総括・分担）研究報告

MSA 家族例についてのアンケート調査結果

分担研究者 辻 省次 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科教授

共同研究者 百瀬 義雄¹ 後藤 順²

東京大学大学院医学系研究科

1. クリニカルバイオインフォマティクス研究ユニット科学技術振興特任教員

2. 脳神経医学専攻神経内科講師

研究要旨 多系統萎縮症（multiple system atrophy; MSA）の遺伝因子を明らかにすべく、日本神経学会専門医 3695 名を対象に MSA 家系例の経験有無について全国規模のアンケート調査を行った。結果、MSA 家系例を 11 家系確認した。うち同胞発症例は 10 家系、近親婚は 2 家系、表現型（MSA-P、あるいは MSA-C）が一致した家系は 6 家系であった。また、家系内に PD が存在する MSA 患者の家系を 8 家系（うち近親婚 1 家系）把握した。さらに分離比の計算結果から、もし MSA に遺伝因子が存在するのであれば、稀な常染色体劣性遺伝形式が推測された。今回の調査結果は MSA 発症における遺伝因子存在の可能性を示唆するものと思われる。さらに家系発症例を収集することが発症機序解明の重要な糸口になると考えられる。

A. 研究目的

MSA は成人発症の自律神経症状、パーキンソニズム、小脳症状、錐体路症状を呈する進行性神経変性疾患である。本疾患は従来、孤発性疾患と考えられてきており、家族発症例の検索はなされてこなかった。しかし、近年病理学的に診断された家族発症例が複数確認され、その発症における遺伝因子が注目されるに至っている。今回我々は全国規模の調査を行い、本邦の家系内発症 MSA 症例と家系内にパーキンソン病（Parkinson disease; PD）を発症した MSA 症例の調査を行った。

B. 研究方法

日本神経学会専門医 3695 名に郵送アンケートによる一次調査を行い、（1）同一家系内で、複数の MSA 発症例の経験有無、（2）MSA 症例の家系内に PD が存在したケースの経験有無の二点を質問した。「経験がある」との返答が得られた場合、電話により二次アンケート送付の許可を得ると共に、臨床情報などについて簡単な聴取を行った。

C. 研究結果

2004 年 1 月 5 日の時点で、2088 名（56.5%）より一次調査の返答が得られた。（1）同一家系内で、複数の MSA 発症例の経験がある、との返答を 121 名（5.8%）、（2）MSA 症例の家系内に PD が存在し

たケースの経験がある、との返答を 88 名 (4.2%) から得た。

さらに二次調査を進めることにより、現在までに MSA 家系例を 11 家系確認した。うち同胞発症例は 10 家系、近親婚は 2 家系、表現型 (MSA-P、あるいは MSA-C) が一致した家系は 6 家系であった。

また、家系内に PD が存在する MSA 患者の家系を 8 家系 (うち近親婚 1 家系) 把握した。

D. 考察

PD は臨床病理学的研究により、生前診断 PD である患者の 5~6%が MSA であることが報告されている。単なる偶然の可能性を完全には否定できないが、MSA 家系内の「PD 患者」が実は MSA である可能性、あるいは PD と MSA の発症に α -シヌクレイノパチーとして共通の発症機序が働いている可能性などを考えた。

また、現時点で見つかっている家系から分離比の推定を行ったところ、同胞法 (Fisher, 1934) では $p=0.072\sim 0.262$ 、最尤法 (Haldane, 1938) では $p=0.142\sim 0.264$ であった。もし MSA に遺伝因子が存在するのであれば、稀な常染色体劣性遺伝形式である可能性が推測された。

E. 結論

MSA には遺伝因子は存在しないと考えられてきたが、今回の調査結果はその存在の可能性を示唆するものと思われる。さらに家系発症例を収集することが発症機序解明の重要な糸口になると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Y. Momose, J. Goto, M. Murata, T. Tsuji. Hospital-based survey for family history in multiple system atrophy. The American Society of Human Genetics 53rd Annual Meeting (2003, Los Angels).

2) 百瀬義雄、後藤順、村田美穂、辻省次. 多系統萎縮症における家族歴調査. 日本人類遺伝学会第 48 回大会 (2003 年長崎).

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

多系統萎縮症に関する多施設共同研究について

「運動失調に関する調査及び病態機序に関する研究班」事務局

要 旨 多系統萎縮症についての臨床データベースの構築及び原因ないし疾患感受性遺伝子の探索を目的とした全国規模の多施設共同研究を実施するため、幹事班員を中心として共同研究グループを組織し、JAMSAC(Japan Multiple System Atrophy Consortium)と名づけ、共同研究を開始した。

A. 緒 言

「運動失調に関する調査及び病態機序に関する研究班」として、多系統萎縮症についての全国規模の多施設共同研究を実施するため、幹事班員を中心としたワーキンググループによる準備を進め、JAMSAC(Japan Multiple System Atrophy Consortium)と名づけ、以下の概要の共同研究を開始した。

B. 研究概要

図に示すように、研究は、全国規模の臨床データベースの構築と遺伝子解析研究の2本柱から構成される。それぞれの概要は以下の通りである。

1. 臨床データベース

全国規模のMSAについての臨床データベースの構築を目標とし、個人調査票の全国集計では、明らかにすることができない以下の点を考慮し、データ

ベースを構築する。

- ① 経時的なデータベースとする。
- ② 遺伝子解析研究との連携が可能であるように構築する。
- ③ 画像など、調査票集計では実施できない解析も行えるようにする。
- ④ 個人調査票との重複など、臨床現場での負担の増加を十分考慮した上で、実行可能な質の高いデータ収集を行う。

2. 遺伝子解析研究

MSAの病因または疾患感受性遺伝子の同定を目標としている。ケースコントロール研究と家族例(複数患者発症家系)研究の2本立てで行う。

- ① ケースコントロール研究:患者1000例規模の検体収集を目標として、関連解析研究を行う。
- ② 家族例(複数患者発症家系)研究:連鎖解析による研究を行う。