

B. 研究方法

MJD のリピート数と ADL や症状を指標とする前向き多施設共同研究である。事務局への登録時の患者データは、病歴や神経学的所見の他、あらかじめリピート数が判っているそれぞれのコントロール・プラスミドで施設間誤差を補正したリピート数も含まれる。年に1回、症状および所見を事務局に送って頂き、経年変化について解析を行う。調査項目は、Barthel index および ICARS の評価項目などを使用する。特に、発症から独歩不能までの時間、発症から経口摂取が不十分になるまでの経過年数などを主眼に検討を行う予定である。

(倫理面への配慮)

方法について多施設でさらに検討を行ってプロトコルを作成した後に、まず事務局が所属する施設倫理委員会に提出。その後、各施設の倫理委員会に提出後、調査を開始する予定である。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

全国集計研究について

分担研究者 辻 省次 東京大学医学部附属病院 神経内科

共同研究者 大津洋¹，百瀬 義雄¹，後藤 順²

東京大学医学部附属病院 クリニカルバイオインフォマティクスユニット¹，神経内科²

研究要旨 平成 11 年度～16 年度の運動失調班で行われた，臨床調査個人票に基づく調査研究についての分析結果を示し，今後の課題を検討した．ICARS の項目と罹病期間の間には強い相関が見出された．平成 15 年度から多系統萎縮症が加えられ，MSA-C, MSA-P の比で見ると，MSA-C が 82.5%と多数を占めた．ただし，MSA-P の一部がパーキンソン病関連疾患で登録されている可能性があり，今後の検討課題である．都道府県レベルでの入力率に大きなばらつきがある点は，地域別の疫学調査の上では支障となり，今後改善すべき検討課題である．

A. 研究目的

平成 11 年度～16 年度の運動失調班で行われた，臨床調査個人票に基づく調査研究の概要と，その成果を示し，今後の課題を検討する．

B. 研究方法および結果

平成 11 年度～16 年度の運動失調班では，平成 12 年度に，臨床調査個人票が改訂された機会に，わが国の脊髄小脳変性症の自然歴について，前向きの研究として，臨床調査個人票を全面的に改定し，電算処理を効率よく取り入れる形で，臨床調査個人票を改訂した．この際に，自然歴を明らかにすることを目的として，運動失調の評価基準である ICARS (International cooperative ataxia rating scale) を導入した．この臨床調査個人票については，膨大な記入項目があ

り，現場の負担は大きかったが，罹病期間と ICARS 各項目についての詳細な相関解析を行うことができ，歩行，四肢の失調に関する評価項目が強い相関を示すのに対して，眼球運動などについての項目は相関が弱いことが示された．この結果を，平成 15 年度からの改訂にあわせて活用し，簡略化した臨床調査個人票をデザインした．

多系統萎縮症については，これまでの特定疾患の分類では，オリブ橋小脳萎縮症，シャイ・ドレーガー症候群が別の分類で取り入れられており，線条体黒質変性症は含まれていなかった．このことから，多系統萎縮症全体についての疫学，自然歴の把握ができないという課題があった．多系統萎縮症の自然歴の把握を行うために，平成 15 年度より，シャイ・ドレーガー症候群の分類を多系統萎縮症として改め，ここに，オ

リープ橋小脳萎縮症，線条体黒質変性症を含め，多系統萎縮症の疫学調査，自然歴の把握を目的とした臨床調査個人票を定めた。

平成 15-16 年度の解析では，多系統萎縮症の中で，オリーブ橋小脳萎縮症が 82.5%，線条体黒質変性症が 10.6%，シャイ・ドレーガー症候群が 1.8%，残りは分類が困難な例であった。この結果からは，オリーブ橋小脳萎縮症が多いと考えられるが，線条体黒質変性症の一部はパーキンソン病関連疾患で登録されている可能性があり，今後の検討課題である。

平成 15 年からは，連結して縦断的な追跡が可能となったが，1 例 1 例の ICARS などの評価項目を解析すると，変動幅が大きく，記載者が変わったりすると，その評価項目がかなり変動することが示唆され，縦断的な自然歴の把握には検討課題が多いことが示された。

もう 1 つの検討課題としては，一部の都道府県において，データの入力が十分に行われておらず，全体としては 50%程度の入力であり，地域別に詳細な解析を行うことができないという状況がある。この点については，背景を良く分析して，データの入力率の改善を目指すべきである。

C. 今後の展望

臨床調査個人票に基づく疫学調査のように，全国規模で詳細な調査を実施できるシステムを有しているのはわが国だけである。この調査基盤を活用して，population-based の自然歴の把握は，さまざまな臨床研究をより積極的に追求していく必要がある。

そのためには，このような全国規模の調査において有効に把握できる調査項目など

についてはより吟味を重ねて，より簡潔な調査項目で，より信頼度の高い調査を目指す必要がある。また，縦断的な調査については，記入者による変動が無視できない要素となり，一定の限界があることを認識した上で調査研究を進めていく必要がある。

最後に，都道府県レベルでの入力率に大きなばらつきがある点は検討課題である。各都道府県の段階での入力作業が膨大となっており，特定疾患治療研究事業全体のシステムとしても，より実現性の高いものとしての検討を進めていく必要がある。

臨床調査個人票の修正案ならびに SCA6 自然歴多施設共同研究

分担研究者 中島健二¹⁾
研究協力者 安井建一¹⁾、足立芳樹¹⁾

1) 鳥取大学医学部脳神経内科

研究趣旨

多系統萎縮症および脊髄小脳変性症の臨床調査個人票の有効活用を目的に、改訂・修正案を提示した。個人票の電子化に伴い、全国の個人票を集計して疾患を把握することが可能となってきた。しかしながら、患者一般データの解析に留まっており、より詳細な病状、特に病状進行の把握が困難であるのが現在の問題点である。疾患の自然歴を把握、確認することは、臨床の現場だけでなく、今後の新規治療を開発する上でも不可欠であるが、海外を含めデータがほとんどない。そこで、おおまかな自然歴研究に利用すべく、生活状況項目を強化する修正案を提示した。また、詳細な神経症候の解析を全国集計で行うことは困難であるため、同調査票を用いて脊髄小脳失調症 6 型の自然歴調査を多施設共同で長期に行うことを提案した。

A.研究目的

疾患の自然史を把握、確認することは臨床の現場だけでなく、今後の新規治療を開発する上でも不可欠なものであるが海外を含めデータがないのが現状である。臨床個人調査票が疾患の把握を目的とした研究に有効利用されるよう改訂修正案を作成することを目的とした。

B.研究方法

全国で入力される多数の個人票から詳細な神経症候を解析するのはデータの信頼性などの問題がある。シンプルで複数年データの連結に耐えうる項目として生活状況項目がもっとも適していると考えられた。疾患による ADL の低下を指標とした調査項目として Barthel index を調査票に追加することを提案した。その他、非侵襲的人工呼吸など近年使用頻度が増加している治療項目の追加を提案した。また、詳細な自然史が明らかとなっていない脊髄小脳失調症 6 型(SCA6)の自然史調査案を提案した。

C.研究結果

提示した調査票修正案に対して、いくつかの指摘を受け修正を追加した。

また、SCA6 自然史調査に関しては、本臨床調査個人票を用いて長期に経過をフォローする多施設共同研究を開始する方向で計画を進めることとした。

劣性遺伝性痙性対麻痺にみられるニューロパチー

分担研究者：小牟禮修 国立病院機構宇多野病院神経内科・診療部長

共同研究者：村瀬永子，村田佳子，齊田孝彦
国立病院機構宇多野病院神経内科

研究要旨：遺伝性痙性対麻痺（HSP）は緩徐進行性の両下肢の痙性と筋力低下を主徴とし，家族歴を有する疾患の総称であり，上位運動ニューロンの障害が一義と考えられるが，劣性遺伝性 HSP を中心に末梢神経障害の報告も散見される。今回我々は，家系の異なる劣性遺伝性と考えられる 4 例の HSP について，詳細な臨床・電気生理学的検討を行った。その結果，2 例で下肢優位・感覚神経優位・軸索障害優位の明らかな末梢神経障害を認めた。足の変形（凹足）を伴い，膝蓋腱反射に比べアキレス腱反射が低下している HSP 症例では，末梢神経障害の合併を考慮する必要がある。HSP の末梢神経障害は，distal axonopathy が主たる病態と考えられるが，中枢と末梢では神経線維の再生能力に差があり，central dominant axonopathy の臨床像が前面にでる可能性が高い。このため注意深い電気生理学的検討が必要である。

心に末梢神経障害の報告も散見される。

A. 研究目的

遺伝性痙性対麻痺（HSP）は緩徐進行性の両下肢の痙性と筋力低下を主徴とし，家族歴を有する疾患の総称であり，その表現型から純粋型と複合型の二群に大別される。分子遺伝学の進歩により，HSP では現在 31 の遺伝子座（SPG1-29 + α ）が明らかになっており，このうち 11 個の原因遺伝子が同定されている。しかし，SPG2, 7 に代表されるように，同一遺伝子の異常にもかかわらず，純粋型と複合型を呈する家系が報告されるなど，遺伝子型と表現型の相関については未だ不明な部分が多い。

一方，HSP は上位運動ニューロンの障害が一義と考えられるが，劣性遺伝性 SPG を中

今回我々は，原因遺伝子が判明した際に，遺伝子型と表現型の相関を明らかにすることを目的として，家系の異なる劣性遺伝性と考えられる 4 例の HSP について，詳細な臨床・電気生理学的検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

表 1 に示すような臨床症状，画像所見を有する 4 症例の HSP に対して，末梢神経伝導検査，針筋電図，体性感覚誘発電位：SEP，経頭蓋磁気刺激（TMS）による運動誘発電位：MEP の検査を施行した。

表 1 劣性遺伝性痙性対麻痺 4 症例の臨床像

| | 症例 1 | 症例 2 | 症例 3 | 症例 4 |
|-----------|---------|------------------|--------------|---------|
| 年齢・性別 | 43 歳・男性 | 32 歳・女性 | 50 歳・男性 | 19 歳・男性 |
| 発症年齢 | 30 歳 | 12 歳 | 9 歳 | 乳児期 |
| 発症時の症状 | 下肢のつっぱり | 歩行障害 | 下肢のふるえ | 歩行のおくれ |
| 随伴症状 | 下肢の強い痛み | 知的機能低下 筋萎縮 | ジストニア 性振戦 | 精神発達遅滞 |
| 家族歴 | 兄に同症状 | - | 兄に同症状 | 弟に同症状 |
| 血族結婚 | - | - | 両親がいとこ婚 | 両親がいとこ婚 |
| 凹足 | + | + | ± | ± |
| 排尿障害 | + | + | - | - |
| 振動覚 | 低下 | 消失 | 低下 | 軽度低下 |
| PTR / ATR | 4+ / 2+ | 2+ / - | 2+ / + | 3+ / 2+ |
| 下肢遠位筋力 | 4+ | 1 | 5 | 5 |
| MR I | 脊髓の萎縮 | 脳梁の菲薄化 大脳白質病変 | 脳幹の萎縮 | 脳幹の萎縮 |

C. 研究結果

表 2 に示すように劣性遺伝性と考えられる HSP 4 例のうち 2 例で、下肢優位・感覚神経優位・軸索障害優位の明らかな末梢神経障害を認めた。

表 2 劣性遺伝性痙性対麻痺 4 症例の電気生理検査の結果

| | 症例 1 | 症例 2 | 症例 3 | 症例 4 |
|----------|--------------|------------------------|--------------|----------|
| 腓腹神経：感覚 | 誘発不能 | 誘発不能 | WNL | 低電位 |
| 正中神経 | WNL | 低電位 | WNL | WNL |
| 尺骨神経 | WNL | 低電位 | WNL | WNL |
| 脛骨神経：運動 | F 波分散波形 | 誘発不能 | WNL | WNL |
| 腓骨神経 | WNL | 誘発不能 | WNL | WNL |
| 正中神経 | A 波 | Repeater F | WNL | WNL |
| 尺骨神経 | WNL | Repeater F | WNL | WNL |
| 針筋電図 | WNL | Late rec., reinner. | WNL | WNL |
| SEP：正中神経 | N20 潜時延長 | 誘発不能 | 誘発不能 | WNL |
| TMS：上肢 | 閾値上昇 分散波形 | 閾値 100%以上 | 閾値 100%以上 | 閾値 上昇 |

WNL：正常, Late rec.：late recruitment, reinner.：reinnervation unit

D. 考察

足の変形（凹足）を伴い、膝蓋腱反射に比べアキレス腱反射が低下している HSP 症例では、末梢神経障害の合併を考慮する必要がある。HSP における末梢神経障害は、central-peripheral distal axonopathy が主たる病態と考えられるが、中枢と末梢では神経線維の再生能力に差があり、central dominant axonopathy の臨床像が前面にでる可能性が高い。このため注意深い電気生理学的検討が必要である。

E. 結論

足の変形（凹足）を伴い、膝蓋腱反射に比べアキレス腱反射の低下傾向にある HSP 症例においては、末梢神経障害を合併する可能性があり、注意深い電気生理学的検討が必要である。HSP の各病型における遺伝子型と表現型の相関を明らかにする上で、詳細な臨床・電気生理学的検討は必須である。

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

村田佳子，村瀬永子，小牟禮修，他：脳梁の菲薄化を伴う痙性対麻痺の 1 例。第 83 回日本神経学会近畿地方会，大阪市，2005 年 12 月 17 日。

H. 知的所有権の取得状況

特になし。

本邦の Charlevoix-Saguenay 型痙性失調症 6 家系 9 名における臨床・分子遺伝学的検討

分担研究者：瀧山嘉久 自治医科大学内科学講座神経内科学部門

共同研究者：嶋崎晴雄¹、迫江公己¹、欧陽 嶷¹、小川朋子¹、中野今治¹、平岡宏太良²、
長野清一²、山本洋一²

¹自治医科大学内科学講座神経内科学部門

²大阪大学神経内科・脳卒中科

研究要旨

本邦のARSACS6家系9症例について、新規変異を含むSACS遺伝子変異を同定し、本邦にもARSACS家系が存在することを示した。その臨床像をカナダの例と比較検討したところ、本邦例では発症年齢が遅く、網膜有髄線維の増生は軽度であった。下肢痙性のみられない家系や、中等度の知能低下を伴う症例も存在し、臨床像の多様性が観察された。今回の検討では、遺伝子型と表現型の明らかな関連は認められず、今後の症例の蓄積が必要と考えられた。ARSACSに特徴的とされる網膜所見あるいは下肢痙性を欠くような劣性遺伝性早発性小脳失調の症例においても、ARSACSを疑って遺伝子診断を行うべきであると思われた。SACS遺伝子には、従来報告されていた単一巨大エクソンよりも上流に8エクソンが存在するため、ARSACSが疑われるが、巨大exon9に変異が認められない場合、上流のエクソンも解析する必要があると考えられた。

A. 研究目的

Charlevoix-Saguenay型痙性失調症 (Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay : ARSACS) は、カナダのケベック州で最初に報告された遺伝性神経変性疾患で、SACS遺伝子変異を認める。その特徴的な臨床像は早発性小脳失調、下肢痙性、末梢神経障害、足変形、網膜有髄線維の増生であり、知能はほぼ正常であるとされている。しかし、近年、本邦や地中海沿岸地方からも遺伝子変異が同定されたARSACSの報告がなされ、我々も報告したように、網膜有髄

線維の増生を欠く例や知能低下を認める例、下肢痙性を認めない例など非典型例も知られてきている。

SACS遺伝子は、当初一万塩基あまりの単一巨大エクソンを持つ遺伝子とされていたが、現在ではその上流に8つのエクソンの存在が知られている。cDNAのコード領域は13737塩基で、遺伝子産物のsacsin蛋白質は4579アミノ酸と推定されている。

我々は昨年のも会議で、本邦のARSACS4家系について、臨床像を明らかにし、SACS遺伝

子変異を報告したが、その後、臨床的にARSACSが疑われる2家系を経験した。そこでこの2家系について臨床所見の検討とSACS遺伝子解析を行い、先の4家系と合わせて本邦におけるARSACSの臨床および分子遺伝学的特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

対象はARSACS6家系9症例であり、うち3家系は血族結婚が確認された。神経学的所見を評価し、協力の得られた症例には、頭部MRI、末梢神経伝導速度、神経生検、知能テストを試行した。また、インフォームドコンセントを得て、末梢血白血球よりゲノムDNAを抽出し、SACS遺伝子のPCR産物の直接シーケンシングおよびTAクローニングにより遺伝子変異を解析した。

なお、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)、遺伝子治療臨床研究に関する指針(平成14年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、疫学研究に関する倫理指針(平成14年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成15年厚生労働省告示第255号)、および自治医大遺伝子解析倫理規定を遵守した。

C. 研究結果、考察

本邦ARSACSの発症年齢は、早発性ではあるものの、ケベック州の症例に比し遅かった。基本

的な臨床像はケベック州の症例と類似しており、歩行障害、構音障害などの小脳症状、Babinski徴候は全例で見られたが、腱反射亢進、下肢痙性は1家系で認めなかった。なお、3家系で手指の変形、網膜の有髄線維増生を認めず、また、注視方向性眼振、遠位筋萎縮、凹足を欠く例を各1例ずつ認めた。末梢神経生検は2例で試行し、軸索変性が認められた。WAIS-Rを行った4例では軽度から中等度の知能低下がみられたが、MMSEを行った1家系では低下を認めなかった。頭部MRIでは全例で小脳の萎縮が認められた。神経伝導検査を施行した5家系中4家系では、感覚神経活動電位は誘発不能であり、1家系で低下していた。全症例でSACS遺伝子変異が認められ、4家系でミスセンス変異をホモ接合体で認め、2家系で欠失変異を複合ヘテロ接合体で認めた。

今回の新たな2家系では、1家系で巨大エクソン9上に新規のナンセンス変異(c.12973C>T, p.R4325X)を同定した。もう1家系はエクソン9に変異はなかったが、臨床的にARSACSが強く疑われた。丁度この頃、巨大エクソンの上流に8つのエクソンの存在が明らかとなったため、エクソン1から8までの解析を行ったところ、エクソン7に欠失変異(c.1184-93delGTAACAGTGT/c.2060delA, p.D687V-fsX713/p.C395W-fsX407)が見い出された。巨大エクソン9以外の変異の同定は、本家系が初めてである。

今回の検討では、遺伝子型と表現型の明らかな関連は認められず、今後の症例の蓄積が必要であると考えられた。

D. 結論

- 1) ARSACS 4家系での巨大 exon 9 の 4種類の遺伝子変異に加え、今回、新たに 2家系で exon9 と exon7 に新規遺伝子変異を同定した。
- 2) SACS 遺伝子には、従来報告されていた単一巨大エクソンよりも上流に 8 エクソンが存在するため、ARSACS が疑われるが、巨大 exon9 に変異が認められない場合、上流のエクソンも解析する必要があると考えられた。
- 3) 本邦の ARSACS はケベック州の症例に比し、網膜有髄線維の増生、下肢痙性、四肢腱反射の亢進を欠く症例が存在したり、知能低下を認める症例もあり、臨床像の多様性が示された。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimazaki H, Takiyama Y, Sakoe K, Ando Y and Nakano I: A phenotype without spasticity in saccin-related ataxia. *Neurology* 64: 2129-2131, 2005.
- 2) Yamamoto Y, Hiraoka K, Araki M, Nagano S, Shimazaki H, Takiyama Y and Sakoda S: Novel compound heterozygous mutations in saccin-

related ataxia. *J Neurol Sci* 239: 101-104, 2005.

3) 瀧山嘉久：脊髄小脳変性症の最近の進歩. 難病と在宅ケア 11: 7-10, 2005.

4) 瀧山嘉久：最近の進歩. 脊髄小脳変性症のすべて. 千葉, 日本プランニングセンター, 2006, pp23-26.

5) Ouyang Y, Takiyama Y, Sakoe K, Shimazaki H, Ogawa T, Nagano S, Yamamoto Y, Nakano I: Saccin-related ataxia (ARSACS): Expanding the genotype upstream from the gigantic exon. *Neurology (in press)*

6) Takiyama Y.: Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Neuropathology (in press)*

7) Takiyama Y.: Saccin-related ataxia: the SACS gene mutations. In: R.M. Mohan, ed. *Research Advances in Neurology*. Kerala: Global Research Network, 2006 (*in press*)

2. 学会発表

1) 瀧山嘉久：Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). 第 46 回日本神経病理学会総会学術研究会シンポジウム「脊髄小脳変性症の最前線」、栃木、2005 年 5 月 12 日.

2) 嶋崎晴雄、瀧山嘉久、迫江公己、安藤喜仁、中野今治：下肢痙性を認めなかった ARSACS の 1 家系. 第 46 回日本神経学会総会、鹿児島、2005 年 5 月 27 日.

3) 山本洋一、平岡宏太良、荒木睦子、長野清一、佐古田三郎、嶋崎晴雄、瀧山嘉久：Charlevoix-Saguenay 型痙性失調症の双子例.

第 82 回日本神経学会近畿地方会、大阪、2005
年 6 月 25 日.

4) 嶋崎晴雄、瀧山嘉久、迫江公己、小川朋子、
中野今治、平岡宏太良、長野清一、佐古田三
郎：本邦 ARSACS 症例の臨床・遺伝学的検討.
日本人類遺伝学会第 50 回大会、倉敷、2005
年 9 月 20 日.

G. 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

Spastin 蛋白の機能解析

分担研究者：瀧山嘉久 自治医科大学内科学講座神経内科学部門

共同研究者：迫江公己、嶋崎晴雄、本多純子、中野今治

自治医科大学内科学講座神経内科学部門

研究要旨

本研究は、優性遺伝形式をとる遺伝性痙性対麻痺の中で、最も頻度の高いSPG4の原因蛋白であるspastinの蛋白機能を解析することにより、遺伝性痙性対麻痺の病態機序を解明することを目的とした。我々は、spastinに特異的な抗体や培養細胞を用いた過剰発現およびknock-downの系を作成して解析を行い、spastinは分裂細胞では核の分配と細胞分裂後期の微小管切断に関与し、神経系の細胞では突起の伸長に関与することを見出した。また、spastinの減少によって微小管が不安定となり、核分配の異常やミトコンドリアをはじめとする細胞内物質輸送に異常が生じていることが示唆された。さらに、spastinのknock-down系は、微小管の安定や神経突起の形成を正常化する物質のスクリーニング系として、SPG4の治療に向けての方向性を確立する手段として有用であると考えられた。Spastin蛋白機能解析から、未知の遺伝性痙性対麻痺の候補遺伝子として、微小管切断機能を持つ蛋白やモーター蛋白等が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は継続して遺伝性痙性対麻痺の臨床・分子遺伝学的研究を行っており、中でも優性遺伝性痙性対麻痺（ADHSP）のうち、欧米で最も頻度が高いSPG4については、本邦で初めて新規spastin遺伝子変異を持つ一大家系を報告している。その後も他の国内施設からの遺伝子解析依頼を受けており、SPG4は本邦でも最も頻度が高く、40%を占めることを確認している。

SPG4の原因蛋白であるspastinは多彩な機能を持つAAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ファミリー蛋白に属しており、微小管関連の機能を持つことが報告されているが、SPG4の病態機序は未だ不明の点が多い。

本研究は、spastinの蛋白機能を解析することにより、遺伝性痙性対麻痺の病態機序を解明し、治療に向けての方向性を確立することを目的とした。

B. 研究方法

Spastin特異的なポリクロナール抗体は、spastinのN末領域の合成ペプチドおよびAAAを含むC末領域のリコンビナント蛋白を用いて作成した。Spastinの過剰発現系は、野生型及び病的変異cDNAをPCR法にて合成し、myc等の融合蛋白として解析した。Spastinのknock-downは4カ所の異なるspastin遺伝子部位を認識する合成siRNAを作成し、HeLa、NT2およびIMR32細胞に導入して解析した。Spastinの遺伝子量と蛋白発現量の減少は、それぞれ、real-time PCR法およびウエスタンブロット法により確認した。siRNAの特異性はsiRNAによって誘導された現象の遺伝子レスキューが可能かどうかにより検討した。遺伝子レスキューには、野生型と同じアミノ酸配列を持ち、siRNA認識配列に変異を導入したconstructと、病的変異に加えてsiRNA認識配列に変異を導入したconstructを作成して用いた。微小管とモーター蛋白の解析は、それぞれ α -tubulin、抗MKLP1抗体による免疫染色を用いて行い、F-actinとミトコンドリアの局在は、PhalloidinおよびMitoTracker染色により行った。核形成の異常はヘキスト33324染色により行い、分裂細胞の細胞周期同調はヒドロキシウレア、ノコダゾールを用いて行った。

なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、遺伝子治療臨床

研究に関する指針（平成14年文部科学省・厚生労働省告示第1号）、疫学研究に関する倫理指針（平成14年文部科学省・厚生労働省告示第2号）、臨床研究に関する倫理指針（平成15年厚生労働省告示第255号）、および自治医大遺伝子解析倫理規定を遵守した。

C. 研究結果

Spastinは最近になり、異なった開始コドンから読まれるlong formとshort formの2つの蛋白が存在することが報告された。我々の作成した抗体は、ウエスタンブロットの結果、それぞれlong formのみ、short formのみ、および全てのformを認識する抗体の3種類が揃っていることが確認された。

Spastinの過剰発現系における微小管の動態およびミトコンドリアの局在については、既報告と同様に、野生型蛋白では微小管の切断が認められ、変異型蛋白では、一部微小管と共局在する線維状の局在を示し、ミトコンドリアの局在変化を認めた。

抗spastin抗体を用いた内在性spastinの局在解析から、short formは中心体に存在すること、long formは一部微小管と一致した局在を認めることを確認した。

さらに、分裂系の細胞（HeLa）では細胞周期によってその局在が変化し、全ての抗体において間期には主として核に存在しているが、分裂期には核には存在せず、中心体と紡錘糸と一致した局在を示した。Spastin蛋白の細胞

分裂への関与を検討するために、HeLa細胞に siRNAを導入したところ、核分配の異常が起り、分裂後期には細胞間橋の微小管切断が不十分となり、細胞分裂が阻害されて、多核細胞を生じることを見いだした。siRNA導入によって生じた核分配の異常や多核化は、野生型 spastinの導入によってレスキューされるが、病的変異蛋白ではレスキューされないことを確認した。

siRNA導入後の多核化細胞では、ノコダゾール処理を行うと、微小管は脱重合されずに線維状を保つ細胞がみられ、異常に細い微小管や部分的に寸断された微小管が観察された。これらの異常が観察された多核細胞では、ミトコンドリアの局在が変化し、正常細胞で見られる微小管に沿った均一な分配とは異なり、細胞縁へのミトコンドリアの密度が低下している細胞やミトコンドリアの凝集が観察された。

神経系の細胞 (NT2、IMR32) における spastin蛋白の局在は、これまでに他の細胞で報告されているように、神経突起の遠位と分岐部位にspastinが集積することを確認した。siRNA導入細胞では神経突起の長さが異常に細く長い細胞や、突起先端の成長円錐の形成が不十分な細胞が多く観察された。

D. 考察

Spastin蛋白は、過剰発現系およびsiRNAによるknock-down系の解析により、分裂細胞

(HeLa細胞) では、微小管の切断および安定化に関与し、主として細胞分裂期の染色体の分配、および細胞質分裂時の細胞間橋における微小管の切断時に機能することが考えられた。

HeLa細胞において、siRNA導入後に野生型蛋白をtransfectionした遺伝子レスキュー実験により、野生型の蛋白は多核化や核の形態を軽減したが、病的変異蛋白は軽減しなかったことから、spastinは微小管の切断機能を持ち、微小管の安定にも関与しているが、病的蛋白ではこれらの機能が低下していることが考えられた。

以上のことから、spastinは微小管の切断機能を持つが、微小管の正常な分布と安定化にも必要な蛋白であり、SPG4ではspastin蛋白の減少 (loss of function) により、微小管の安定性が低下して細胞内輸送が正常に行われなくなり、軸索遠位の変性が引き起こされる可能性が考えられた。

E. 結論

Spastin 蛋白は、微小管の切断機能の他に、微小管を安定させ正常な伸長および分布に関与していると思われた。また、siRNAを用いた神経突起形成の異常や分裂細胞における形態変化は、spastin 蛋白の knock-down に特徴的な現象であり、これらを指標にしたスクリーニング系の作成が可能であると考えられる。

Spastin と同様に微小管切断機能を持つ他

の蛋白(katanin p60 等) は、遺伝子未同定の HSP の原因蛋白となりうる可能性がある。今後は、神経突起形成を指標にして微小管関連物質をスクリーニングする系の検討に加えて、spastin 関連遺伝子を解析することにより、治療に向けての方向性を検討したいと考えている。

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

なし。

2. 学会発表

- 1) 迫江公己、瀧山嘉久、嶋崎晴雄、
中野今治：spastin の機能解析。
第 46 回日本神経学会総会、
鹿児島、2005年5月26日。

G. 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

DNA マイクロアレイを用いた痙性対麻痺遺伝子の網羅的解析

分担研究者 辻 省次 東京大学医学部附属病院 神経内科

共同研究者 石浦浩之, 高橋祐二, 後藤 順

東京大学医学部附属病院 神経内科

研究要旨 痙性対麻痺は下肢痙性を主体とする症候群で、責任遺伝子座が多数存在し、診断には多くの遺伝子解析が必要で従来の技術では容易ではなかった。痙性対麻痺の網羅的遺伝子解析を実現するために、DNA マイクロアレイを用いた効率良いシステムを構築した。41名の痙性対麻痺症例について、5つの遺伝子 (*L1CAM*、*PLP1*、*atlastin*、*spastin*、*paraplegin*) の変異解析を施行した。優性遺伝の2例と一見孤発性の3例で *spastin* の変異を認めた。一方、純粋型の1例で *L1CAM* の変異を認めた。同遺伝子変異では重篤な症状を呈するとされてきたが本研究により新しい臨床病型が示唆された。*Perizaeus-Merzbacher* 病の一例では *PLP1* の変異を確認した。

A. 研究目的

痙性対麻痺とは、臨床的にも遺伝学的にも非常に多彩な症候群である。現在まで28の遺伝子座が明らかとなり、そのうち11の原因遺伝子が同定されている。このように、遺伝学的に多様な一方、臨床症状も多彩であり臨床症状のみから変異遺伝子を推定することはできないとされる。そのため正確な遺伝子学的診断のためには非常に多くの遺伝子の解析が必要となり、従来の技術では多くの困難を伴った。またそのために研究がなかなか進まないという側面があった。本研究では DNA マイクロアレイを用いた high-throughput な遺伝子診断システムを確立し、日本における痙性対麻痺の分子疫学について考察することを目的とした。また

将来的には、遺伝子診断にとどまらず、病態機序の解明や治療法の開発のための基盤研究として必要であると考えた。

B. 研究方法

Affymetrix 社の CostumSeq resequencing system を用いて家族性痙性対麻痺遺伝子を網羅的に解析可能な4枚のDNA マイクロアレイ (TKYPD01、TKYALS01、TKYAD01、TKYPD02) を作成。対象とした遺伝子は9つ (*L1CAM* [SPG1]、*PLP1* [SPG2]、*atlastin* [SPG3A]、*spastin* [SPG4]、*NIPA1* [SPG6]、*paraplegin* [SPG7]、*KIF5A* [SPG10]、*spartin* [SPG20]、*alsin* [ALS2]) で、TKYPD01に *spastin* と *atlastin*、TKYALS01に *paraplegin* と *alsin*、TKYAD01に *L1CAM* と *PLP1*、

TKYPD02 に NIPA1、KIF5A、spartin と配置した。各遺伝子について適切なプライマーを設計し、PCR 法によりエクソンとスプライス部位を含むように増幅。各々の PCR 産物を定量し、等モルになるようにプーリングを行う。その後制限酵素を用いて適切な長さに分断した後、標識化する。それをマイクロアレイ上でハイブリダイズさせ染色、スキャンすることでシグナルを得る。解析ソフトウェアでシグナル解析を行った後、実際にシグナルを目で確認することで塩基配列の解析を行った。

今回、解析可能な 9 つの遺伝子のうち *LICAM*、*PLP1*、*atlastin*、*spastin*、*paraplegin* の 5 つの遺伝子について解析を行った。

対象は痙性対麻痺と診断された 41 名（男性 27 名、女性 14 名）。HTLV-1 陽性やビタミン B12 欠乏例などその他痙性対麻痺を来たしうる疾患は除外している。

全例について書面でインフォームドコンセントを取得。研究にあたり、本学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

常染色体優性遺伝が疑われた 10 例のうち、2 例で *spastin* の nonsense 変異を認めた。また、一見孤発例と考えられた 26 例のうち 3 例（12%）でも *spastin* の変異（1 例は nonsense 変異、2 例は missense 変異）を認めた。うち 2 例はさらなる詳細なる問診と両親の診察により常染色体優性遺伝を呈していた可能性が示唆された。また、X 連鎖が疑われていた 1 例で *LICAM* の missense 変異を認めた。Perizaeus-Merzbacher 病と診断されていた 1 例では *PLP1* の変異を確認でき

た。*Atlastin*、*paraplegin* については、病因となる遺伝子変異は認めなかった。

これらの変異は従来の直接塩基配列決定法によって確認された。

D. 考察

結果的に、常染色体優性遺伝と結論付けられた 12 例のうち 4 例（36%）で *spastin* の変異を認めたことになる。これは従来の、常染色体優性遺伝を呈する痙性対麻痺患者のうち 30-40%は *spastin* 変異を持つという欧米や韓国・中国からの報告と一致する結論であった。また、孤発例においても遺伝子変異が存在することが明らかとなり、浸透率が低い変異の存在もしくは *de novo* 変異が孤発例の一部を説明しうると考えられた。

一方で、ヨーロッパでは 10 歳以下の若年発症の常染色体優性遺伝症例では *atlastin* 変異が多いとされているが、今回 *atlastin* の変異は認めなかった。韓国からの報告でも *atlastin* は認めておらず、アジアでは非常に稀であることが推測された。

常染色体劣性遺伝が強く疑われた 4 例について、*paraplegin* 変異は認めなかった。現在まで痙性対麻痺の臨床像を呈した *paraplegin* 変異症例は数例のみに過ぎず、*paraplegin* は比較的稀な病型であると考えられるとともに更なる常染色体劣性遺伝性の病因遺伝子が存在するものと考えられた。

X 連鎖が疑われた純粋型の 1 症例においては *LICAM* の missense 変異を認めた。コントロール集団における本変異の頻度については今後検討する予定であるが、*LICAM* 変異では通常複合型の痙性対麻痺やさらに重篤な CRASH 症候群、MASA 症候群、X

連鎖性水頭症などの表現型を呈するが、今回純粋型という表現型を呈するという可能性が呈されたと言える。

PLP1 変異においては純粋型の痙性対麻痺から Perizaeus-Merzbacher 病まで様々な表現型を呈していることが知られている。今回 Perizaeus-Merzbacher 病の 1 症例において *PLP1* の nonsense 変異を確認した。しかしながら、痙性対麻痺と診断された症例の中からは *PLP1* 変異を認めなかった。

また、5 つのすべての遺伝子について多くの SNP を発見し、その多くが新規であることが明らかとなった。詳細な SNP データの蓄積は今後これらの遺伝子領域の相関解析などにも有用と考えられる。症例の蓄積により、今後 SNP 解析も有効となるであろう。

以上のように、本システムを用いることで効率的かつ迅速に遺伝子解析を行うことが明らかとなった。痙性対麻痺患者を全国的に集計し解析するプロジェクトが開始されようとしているが、正確な診断に基づいた調査が重要であると考えられる。そのような点で本システムはそのプロジェクトの基盤的な役割を担うと考えられる。今後、すべての病因遺伝子をカバーする網羅的診断システムとして整備して行く予定である。

E. 結論

- ・家族性痙性対麻痺遺伝子を網羅的に解析するための DNA マイクロアレイを作成した。
- ・本システムを多数の痙性対麻痺症例の解析に応用し、効率的に遺伝子解析が可能であることが示され、かつ臨床的にも疫学的にも有益な情報を得ることができた。今後

症例が蓄積することでさらなる結果が得られると考えられる。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

H. Ishiura, Y. Takahashi, J. Goto and S. Tsuji, Development of a high-throughput DNA microarray based resequencing system for comprehensive mutational analyses for hereditary and sporadic spastic paraplegias, American Society of Human Genetics 2005 annual meeting, Oct 2005, Salt Lake City, Utah, USA.

H. 知的財産権の出願登録状況

特になし。

痙性対麻痺全国共同研究の提案 – JASPAC (Japan Spastic Paraplegia Research Consortium) –

分担研究者：瀧山嘉久 自治医科大学内科学講座神経内科学部門

共同研究者：JASPAC発足委員会

(辻 省次¹、佐々木秀直²、服部孝道³、湯浅龍彦⁴、小野寺 理⁵、西澤正豊⁶)

¹東京大学医学部神経内科、²北海道大学医学部神経内科、³千葉大学医学部神経内科、⁴国立精神・神経センター国府台病院神経内科、⁵新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター、⁶新潟大学脳研究所神経内科)

研究要旨

本邦のHSPについて多施設共同研究体制により、臨床および研究のリソース基盤を構築して、HSPの自然史やゲノム解析研究を行い、かつ将来的に多くの研究者に幅広く活用されるシステムとすること、HSPの原因の究明と治療法の開発を目指し、将来的に本邦から世界にむけて情報を発信できることを目的として、JASPAC (Japan Spastic Paraplegia Research Consortium) を立ち上げることとした。JASPACは本研究班の活動として運営し、ゲノム研究、臨床研究、治療研究をその研究の柱とする。

A. 研究目的

遺伝性痙性対麻痺 (HSP) は、常染色体優性遺伝性、常染色体劣性遺伝性、伴性劣性遺伝性に分けられ、現時点で SPG1～30 の原因遺伝子座が同定されており、このうち 10 種類を越える原因遺伝子が同定されている。本邦では HSP は脊髄小脳変性症の中にも含まれているが、各病型の頻度や自然史など、全国レベルでの HSP の実態は不明である。

そこで、本邦の HSP について多施設共同研究体制により、臨床および研究のリソース基

盤を構築して、HSP の自然史やゲノム解析研究を行い、かつ将来的に多くの研究者に幅広く活用されるシステムとすること、HSP の原因の究明と治療法の開発を目指し、将来的に本邦から世界にむけて情報を発信できることを目的として JASPAC (Japan Spastic Paraplegia Research Consortium) を立ち上げることとした。

B. 研究方法

本研究班には、多系統萎縮症に関する全国多施設共同研究体制である JAMSAC というよ

いお手本があるので、そのシステムを参考に
して、JASPAC発足委員会のメンバーで会議
を行い、JASPACをどのように構築、運営す
るかを話し合った。

なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関す
る倫理指針(平成13年文部科学省・厚生労働
省・経済産業省告示第1号)、遺伝子治療臨床
研究に関する指針(平成14年文部科学省・厚
生労働省告示第1号)、疫学研究に関する倫理
指針(平成14年文部科学省・厚生労働省告示
第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成15年
厚生労働省告示第255号)、および当該研究機
関で定めた倫理規定等を遵守する。

C. 研究結果、考察

会議の結果、1) 上述したJASPACの目的、2)
JASPACを本研究班の活動として運営し、広報活
動を研究班のホームページを通して行うこと、3)
事務局およびコア研究施設を自治医大神経内科
に置くこと、4) ゲノム、臨床情報、画像、神経
生理、血清、髄液などを含めたバイオバンク化
を目指すこと、5) ゲノム研究(遺伝子診断・
candidate gene approachなどの個別研究など)、臨
床研究(臨床像と自然史の解明、画像・神経生理
研究など)、治療研究を研究の柱とすること、6)
遺伝子診断に関しては、既知遺伝子変異につい
ての診断チップがすでに稼働している東京大学
神経内科の協力を仰ぎ、自治医大神経内科も一
部の遺伝子診断を行うこと、7) JASPAC発足委員
がJASPACの研究推進委員会のメンバー、西澤班

長がその委員長となり、共同研究施設からの研
究計画案を審査して、将来の治療法の開発へむ
けて透明性の高いシステムとすること、など
JASPAC大枠が決定した。

今後は、JASPACの規約、外部委託を考慮
に入れた検体・臨床情報の収集方法、自治医
大および当該研究機関の倫理委員会の承認、
運営費やマンパワーの問題など、JASPACの
細部を詰めていくことが必要であるが、可能
な限り早い時期に稼働にこぎ着けたいと考え
ている。

D. 結論

将来的に本邦から世界へむけて、HSPの情
報が発信できることを目指してJASPACを立
ち上げることとした。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし。
2. 学会発表
なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。