
厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

運動失調症に関する調査研究班

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

Annual Report of the Research Committee on Ataxic Diseases
Research on Measures for Intractable Diseases

Health and Labour Sciences Research Grants
The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan

主任研究者 西 澤 正 豊

平成19 (2007) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

運動失調症に関する調査研究

主任研究者 西澤正豊

II. 分担研究報告

1. ALD・ペルオキシソーム病の診断・治療開発システムの構築とその展開……………9
分担研究者 鈴木康之(岐阜大学医学部医学教育開発研究センター)
研究協力者 下澤伸行(岐阜大学生命科学総合研究支援センター)
2. ALD の分子病態解析……………12
分担研究者 今中 常雄 富山大学大学院医学薬学研究部
研究協力者 守田 雅志 富山大学大学院医学薬学研究部
3. ハイスループット ALD 遺伝子診断システムの稼働状況……………15
分担研究者 辻 省次 東京大学医学部神経内科
研究協力者 後藤順、高橋祐二、松川敬志 東京大学医学部神経内科
4. 小児大脳型副腎白質ジストロフィーの超早期発症診断に関する研究: 視覚系心理検査および視覚系誘発電位の有用性……………17
分担研究者 加我牧子 国立精神・神経センター精神保健研究所 知的障害部 部長
5. 国内の副腎白質ジストロフィー症に対する造血幹細胞移植成績……………31
分担研究者 加藤剛二 名古屋第一赤十字病院 小児血液腫瘍科
分担研究者 加藤俊一 東海大学医学部 基盤診療学系 再生医療科学
研究協力者 矢部普正 東海大学 小児科
6. 副腎白質ジストロフィー(ALD)における至適造血幹細胞移植の開発に関する研究……………34
分担研究者 加藤 俊一 東海大学医学部基盤診療学系・教授
研究協力者 矢部 普正 東海大学医学部基盤診療学系・講師
7. 多系統萎縮症における頸動脈小体……………39
分担研究者 磯崎英治 東京都立神経病院 脳神経内科
研究協力者 飛澤晋介、川田明広、神田武政、林 秀明
8. 多系統萎縮症の REM sleep behavior disorders 症状の検討……………42
分担研究者 中島 健二 鳥取大学脳神経内科
研究協力者 野村 哲志、安井 建一 鳥取大学脳神経内科
笹井 妙子、難波 一義、井上 雄一 神経研究所附属睡眠学センター
9. 多系統萎縮症の睡眠呼吸障害と突然死に関する検討……………44
分担研究者 西澤正豊 新潟大学脳研究所神経内科
研究協力者 下畑享良、小澤鉄太郎 新潟大学脳研究所神経内科
中山秀章 新潟大学第2内科 富田雅彦 新潟大学耳鼻咽喉科
小野寺理 新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター
10. 気管切開及び胃瘻造設が多系統萎縮症の自然経過に与える影響……………47
分担研究者 服部 孝道 千葉大学大学院医学研究院神経内科学 教授
共同研究者 金井 数明、新井 公人、朝比奈 正人、榎原 隆次、山口 美香
11. Machado-Joseph 病、脊髄小脳失調症 6 型の自然史に関する多施設共同研究……………54
分担研究者 中島 健二 鳥取大学脳神経内科
研究協力者 安井 建一、野村 哲志 鳥取大学脳神経内科

12. ポリグルタミン病における筋エネルギー代謝測定の試み～第2報～……………56
 分担研究者 佐々木秀直 北海道大医学研究科神経内科学分野
 共同研究者 矢部一郎 1)、寺江 聡 2)、沖田孝一 3)
 所属 1) 北海道大学医学研究科神経内科学分野
 2) 北海道大学医学研究科放射線医学分野
 3) 浅井学園大学健康プランニング学科
13. 神経変性疾患に於ける血中核酸・及び核酸修飾物量の変化: LC/ESI-MS/MS を用いた検討……………59
 分担研究者 糸山泰人 東北大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態学講座神経内科学分野
 研究協力者 武田 篤、志賀裕正 東北大学病院神経内科
 齋藤昌良、菱沼隆則、後藤順一 東北大学病院薬剤部
14. パソコンソフトを用いた運動失調症状の定量的評価(第三報)……………62
 分担研究者 黒岩義之(横浜市立大学大学院医学研究科・医学部神経内科学講座主任教授)
 研究協力者 波木井靖人(同医学部神経内科), 鈴木ゆめ(同医学部神経内科) 児矢野 繁(同医学部
 神経内科), 西山毅彦(同医学部神経内科), 馬場泰尚(同医学部神経内科), 岸田日帯
 (同医学部神経内科), 木村活生(同医学部神経内科), 釘本千春(同医学部神経内科),
 岩橋幸子(同医学部神経内科), 清野うらら(同医学部神経内科)
15. 拡散テンソル画像を用いた多系統萎縮症の錐体路病変の検討……………64
 分担研究者 祖父江元 名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科教授
 研究協力者 伊藤瑞規、渡邊宏久、熱田直樹、千田 譲、川合圭成
 名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科
 長縄慎二、深津 博 名古屋大学大学院医学系研究科 放射線科
16. Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) の有用性の検討……………67
 分担研究者 佐々木秀直 北海道大医学研究科神経内科学分野
 共同研究者 松島理明、相馬広幸、矢部一郎 北海道大学医学研究科神経内科学分野
17. 脊髄小脳変性症の TRH 治療脊髄小脳変性症に関する研究……………70
 分担研究者 湯浅龍彦 国立精神・神経センター国府台病院神経内科 部長
 研究協力者 坂本 崇 国立精神・神経センター国府台病院神経内科医長
 研究協力者 岩村晃秀 国立精神・神経センター国府台病院神経内科
18. 厚労省研究班における脊髄小脳変性症の薬剤治療の歴史と今後の展望……………73
 分担研究者 湯浅 龍彦 国立精神・神経センター国府台病院神経内科 部長
19. 運動失調症に対するリハの方法論の確立にむけて - 失調性歩行時の脳活動について……………77
 分担研究者 宮井一郎 特定医療法人大道会森之宮病院院長代理神経リハビリテーション研究部長
 研究協力者 三原雅史、畠中めぐみ、矢倉一
 特定医療法人大道会森之宮病院神経リハビリテーション研究部
20. ハイスループット連鎖解析システムの構築と家族性 MSA の連鎖解析……………88
 分担研究者 辻 省次 東京大学・神経内科
 研究協力者 福田 陽子、中原 康雄、百瀬 義雄、伊達 英俊、高橋 祐二、後藤 順
 東京大学・神経内科
 原 賢寿、西澤 正豊 新潟大学脳研究所神経内科
 中村 英二、安達 宏紀 ダイナコム

29. 脊髄小脳失調症 16 型の病因遺伝子同定に関する研究 113
 分担研究者 吉良潤一 九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科
 研究協力者 河野祐治¹⁾, 松瀬大¹⁾, 李魏¹⁾, 三浦史郎¹⁾²⁾, 柴田弘紀²⁾, 古谷博和¹⁾,
 三好安¹⁾, 小副川学¹⁾, 松永宏美²⁾, 大八木保政¹⁾, 柴田篤志²⁾, 松本直樹²⁾,
 岩城明子²⁾, 谷脇考恭¹⁾, 山田猛¹⁾, 服巻保幸²⁾
 1) 九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科
 2) 九州大学生体防御医学研究所遺伝実験情報センターゲノム機能学分野
30. Puratrophin-1 遺伝子 5'UTR の C→T 置換を伴う脊髄小脳変性症の臨床遺伝学的検討 116
 分担研究者 小野寺 理 新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター
 研究協力者 野崎洋明 新潟大学脳研究所神経内科
 池内健 新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター
 西澤正豊 新潟大学脳研究所神経内科
 山本 紘子 藤田保健衛生大学神経内科
 中村 雄作 近畿大学堺病院
 佐藤 功 愛知医科大学神経内科
 増田 眞之 東京医科大学神経内科
31. 16 番染色体長腕(16q22.1)に連鎖する優性遺伝性脊髄小脳変性症(ADCA)の変異解析 119
 分担研究者 吉田邦広 信州大学医学部附属病院脳神経内科、リウマチ・膠原病内科 助教授
 研究協力者 堺 温哉¹⁾、大畑尚子¹⁾、松本直通¹⁾、清水雄策¹⁾、池田修一³⁾
 1)横浜市立大学大学院環境分子医科学、2)伊那中央病院神経内科、3)信州大学医学部
 附属病院脳神経内科、リウマチ・膠原病内科
32. 16 番染色体に連鎖する常染色体優性脊髄小脳変性症の原因同定の試み 123
 分担研究者 高嶋 博
 研究協力者 岡本裕嗣, 平野隆城, 大窪隆一, 荒田 仁, 有里敬代, 田島圭子, 納 光弘, 有村公良
 (鹿児島大学歯学総合研究科 神経内科・老年病学)
33. 第16番染色体長腕連鎖型優性遺伝性脊髄小脳変性症(16q22.1-linked ADCA)の原因遺伝子同定の試み 126
 分担研究者 水澤 英洋 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)
 研究協力者 網野猛志¹⁾, 石黒太郎¹⁾, 佐藤 望¹⁾, 常深泰司¹⁾ 融 衆太¹⁾, 小林千浩²⁾,
 戸田達史²⁾, 石川欽也¹⁾
 1) 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 2) 大阪大学大学院臨床遺伝
34. 脊髄小脳変性症 10 型の神経変性とインスタビリティー機構 130
 分担研究者 松浦 徹 名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学
 研究協力者 大野欽司 名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報学
 芦澤哲夫 Department of Neurology, University of Texas Medical Branch
 黒崎辰昭 東京大学大学院理学系研究科生物科学
 植田信太郎 東京大学大学院理学系研究科生物科学
35. 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)蛋白の生化学的解析 133
 分担研究者 矢澤 生 国立長寿医療センター 研究資源有効利用室
 研究協力者 鈴木康予 国立長寿医療センター 研究資源有効利用室

36. 蛍光相関分光法による細胞内ポリグルタミン蛋白質オリゴマーの検出とその阻害	136
分担研究者	永井 義隆 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学
研究協力者	高橋 保夫 (株)オリンパス研究開発センター、北海道大学
	ポピエル 明子 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学
	藤掛 伸宏 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学
	金城 政孝 北海道大学電子科学研究所超分子分光研究分野
	戸田 達史 大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学
37. 線虫系を用いたオートファジーのポリグルタミン毒性に与える影響の検討	139
分担研究者	貫名 信行 理化学研究所脳科学総合研究センター構造神経病理研究チーム
研究協力者	KHAN, Liakot Ali 理化学研究所脳科学総合研究センター構造神経病理研究チーム
	山中 智行 理化学研究所脳科学総合研究センター構造神経病理研究チーム
38. 熱ショック転写因子 1(HSF1)活性制御因子の解析	142
分担研究者	和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部
研究協力者	鈴木 泰行 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部
	田中 修二 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	145

I 総括研究報告

平成18年度 運動失調班 組織図

名前
プロジェクト名
連絡先
上段: FAX
下段: e-mail

西澤正豊
班長
025-227-0820
/mcd@bri.niigata-u.ac.jp

鈴木康之
リーダー
ALD
069-230-6468 /
ysuz@cc.gifu-
u.ac.jp

加藤俊一
ALD

加我牧子
ALD

加藤剛二
ALD

小野寺理
ALD

今中常雄
ALD

辻省次
ALD

水澤英洋
リーダー
未同定遺伝性SCD
03-5803-0134 /
h-mizusawa.
nuro@tmd.ac.jp

高嶋博
16qSCD

吉田邦宏
16qSCD

吉良潤一
SCA15?

山田光則
未同定SCD

小牟禮修
未同定SCD

中島健二
リーダー
SCDの自然歴
0859-38-6759 /
kenaka@grape.med.
tottori-u.ac.jp

服部孝道
自然史

辻省次
自然史

小野寺理
自然史

磯崎英治
自然史

祖父江元
リーダー
治療研究およびモ
デル動物とマーカー
の設定
052-744-2384 /
sobueg@med.nagoy
a-u.ac.jp

湯浅龍彦
治療

宮井一郎
リハビリ

佐々木秀直
サロゲートマ
ーカー

糸山泰人
サロゲートマ
ーカー

黒岩義之
評価法

和田圭司
リーダー
治療に向けた基礎
的研究と病態機序
の解明
042-346-1745 /
wada@ncnp.go.jp

貫名信行
基礎研究

永井義隆
基礎研究

矢澤生
基礎研究

松浦徹
基礎研究

辻省次
リーダー
JAMSAC
03-5800-6548 /
tsuji@m.u-
tokyo.ac.jp

瀧山嘉久・辻省次
リーダー
JASPAC
0285-44-5118 /
ytakiya@ichi.ac.jp

総括研究報告書

運動失調症に関する調査研究

西澤 正豊 (新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野)

A. 研究目的

本研究班は、運動失調を主症状とする脊髄小脳変性症、多系統萎縮症、および副腎白質ジストロフィー、ペルオキシソーム病を対象として、わが国における実態を明らかにし、その病態を解明して、病態機序に基づいた新たな治療法を確立することにより、これらの難治性疾患を克服することを目的としている。平成17年4月に研究を開始し、今年度は3年計画の2年目にあたる。

脊髄小脳変性症 (spinocerebellar degeneration: SCD) は、孤発性と遺伝性の2群に大別される。臨床調査個人票の発行数から推定される患者数は約2万人であり、孤発性が3分の2、遺伝性が残り3分の1を占めている。孤発性 SCD はさらに、変性が小脳に限局する小脳皮質萎縮症 (CCA) と、変性が小脳系以外の多系統に及ぶ多系統萎縮症 (MSA) に分けられる。遺伝性 SCD は遺伝形式から優性遺伝性と劣性遺伝性に分けられるが、本研究班ではさらに家族性痙性対麻痺 (FSP) を対象として加えている。

副腎白質ジストロフィー (ALD) に関しては、小児大脳型に対する造血幹細胞移植治療 (HSCT) の有効性が確認され、早期診断と治療法の普及が急務となっている。ペルオキシソーム病に関する早期診断システムも稼働し始めている。

本研究班は1年目の当初から班研究として班員が有機的に連携し、共同して上記の目的を達成するために、研究プロジェクトを設定し、班員はいずれかのプロジェクト・チームに所属して研究を推進する体制を採用してきた。今年度の研究プロジェクトは、

1) 臨床調査個人票等に基づく SCD の自然歴

研究

2) 病態の進行抑制治療に関する臨床研究

3) 大規模ゲノム解析による遺伝子未同定 SCD の病態解明

4) ALD の臨床研究、およびペルオキシソーム病の病態解明

であり、各プロジェクトのリーダーとチーム名簿は別紙の通りであり、今年度は新たに松浦班員がプロジェクト3)、宮井班員が2)に参加している。

B. 各プロジェクトの研究方法与結果

1) SCD の自然歴研究

【方法】

前研究班から引き継いだ臨床調査個人票に基づく SCD の自然歴に関する前向き研究を継続し、将来の臨床試験に向けた基礎データとして利用できるように準備する。また、臨床調査個人票を調査研究に利用する上での問題点を検証し、必要な改訂を行う。

わが国で最も頻度が高い優性遺伝性 SCD である Machado-Joseph 病 (MJD) と脊髄小脳失調症6型 (SCA6) について、個別の自然歴調査を新たに調査票を作成して実施する。

【結果】

臨床調査個人票は前研究班において、population-based の前向き研究の基盤と位置付けられ、SCD の臨床像、疫学、自然歴を明らかにし、将来の治療研究にも役立てられるように再設計されて、電子データとして集計されることとなった。このような研究は海外では皆無であり、その意義は非常に大きい。しかし、依然として自治体による入力率は約 50% に留まり、誤入力も多く、しかも地域によって入りに偏りがみられている。昨年度の解析の

結果、(1)年度を超えた連結調査による縦断的な解析では、年度により評価者が異なる場合には評価のばらつきが大きくなり、個々の症例ではノイズが大きくなってしまふこと、(2)集計中のデータでは、MSAの中でMSA-Pが11%と少なく、劣性遺伝性群でFriedreich失調症が38%を占めるなど、実態とは乖離したデータがみられること、(3)死亡イベントが捉えられていないので、予後調査には利用できていないことが示された。

したがって、現在の臨床調査個人票は日常生活動作の障害度を評価するためには有用であるが、精度の高い解析を必要とする臨床試験には適さないので、頻度が高い臨床病型について治験を前提として臨床経過を把握するためには、それぞれの病型毎に詳細な調査票が必要であると判断した。MSAについては後述する多施設共同研究がすでに開始されているので、今年度はMJDとSCA6についてそれぞれ個別に調査票を作成し、鳥取大学医学部倫理委員会の承認を得て、本研究班のコア班員による症例登録を開始した。MJDについては、60例の登録を目標にしている。またSCA6については、経過が緩徐であることから、臨床調査個人票に必要な修正を加えたものを利用することとした。

さらにMSAの自然歴に関連して、新潟大では経過中にしばしば合併する突然死を予防することを視野に、MSAにおける睡眠呼吸障害の特徴が解析された。その結果、喉頭内視鏡により見出されるさまざまな上気道閉塞所見の重要性が指摘された。また千葉大では気管切開や胃瘻の増設がMSAの自然経過に与える影響も解析され、MSAの呼吸障害に対する治療手段として用いられている気管切開や持続陽圧換気(CPAP)の適応について、今後より詳細にプロスペクティブな検討を行うこととした。また鳥取大ではMSAに伴うREM睡眠行動異常症の実態について、アンケートとポリソムノグラフィーにより解析され、

MSAでは周期性四肢運動指数の高いことが特徴であると指摘された。

2)病態の進行抑制治療に関する臨床研究 (1)SCDの分子病態に関する基礎的研究

【方法】

SCDの分子病態に関する基礎研究と臨床試験に向けた候補物質の探索を行う。伸長ポリグルタミン鎖を含む蛋白質の凝集抑制作用を有する化合物や核内輸送を阻止する化合物を広くスクリーニングし、培養細胞系やポリグルタミン病のトランスジェニックマウスを用いてその効果を検証する。

【結果】

ポリグルタミン鎖を含む異常蛋白質の凝集抑制作用を有する物質の大規模スクリーニングは大阪大学で継続されており、有効物質は培養細胞系、ショウジョウバエ複眼形成モデル系、およびトランスジェニックマウスでその効果が検証されている。また蛍光相関分光法を利用して、細胞内で伸長ポリグルタミン鎖によりオリゴマーが形成される過程を捉えることに成功した。本システムは、より強い細胞毒性を有すると想定されるオリゴマーの形成阻害効果をもつ薬剤のスクリーニングにも、応用可能と考えられる。

異常タンパク質の蓄積に伴うHSP70などの分子シャペロンの発現誘導は、熱ショック転写因子HSF1により促進されることから、HSF1の活性制御は治療薬剤の標的となり得る。そこでHSF1の活性を制御する薬剤の探索が行われ、今回はHSF1の分解を促進する因子が見出された。

異常凝集した蛋白質は従来、ユビキチン-プロテアソーム系により分解されると考えられてきたが、最近ではオートファジー系の重要性も注目されている。線虫でオートファジーに関与する遺伝子を制御することにより、ポリグルタミンによる毒性が影響を受けることが確認され、オートファジー系もポリグルタミン病の治

療ターゲットとなり得ることが指摘された。

(2) 病態の進行抑制治療に関する臨床研究

【方法】

これまでの基礎研究からポリグルタミン病の進行を抑制する効果が確認されている候補物質について、治療前研究、臨床試験を推進し、臨床応用を目指して多施設共同研究チームを組織し、臨床試験に向けた体制を整備する。

また、SCD のような慢性進行性疾患を対象とした治験を行うのに適したプロトコルのデザイン、エンドポイントや代理マーカーの設定などについて検討を行う。

さらに今年度より、小脳性運動失調に対する有効なリハビリテーションの方法論を確立することを目的として、宮井班員を中心として検討を開始する。

【結果】

ハンチントン病モデルマウスで進行抑制効果が確認されたトレハロース、球脊髄性筋萎縮症モデルマウスで進行抑制効果が確認された HSP 誘導物質(ゲラニルゲラニルアセトン、あるいはゲルダナマイシン誘導體)などの有力な治療候補物質について、治療前研究として他のモデル系での検証を行うと同時に、臨床研究を実行することが可能であるか否かを検討した。その結果、運動失調の進行抑制を目的とした臨床研究のプロトコルをデザインすることは、本研究班の最も重要な課題ではあるが、研究班として医師主導治験を推進することは困難であると判断した。

そこで今年度は、将来の臨床治験に向けて臨床経過を評価するために最も適したバイオマーカーを開発することに重点を置くこととした。横浜市大では渦巻きをなぞる際の軌跡のずれから運動失調の程度を評価するコンピュータープログラムが開発され、北海道大学では MR スペクトロスコピーを用いて、運動負荷からの回復過程における筋エネルギー代謝

のモニタリングが試みられた。東北大学では血中グアノシンの上昇を確認して、診断マーカーとしての可能性が検討され、名古屋大学では拡散テンソル画像における FA 値を用いて、MSA における錐体路の変性を鋭敏に捉えることに成功した。これらが SCD の有用な診断マーカーになり得るかを検証するためには、今後経時的な観察を行い、臨床上的アウトカムよりも鋭敏な指標となるか否かを検証する必要がある。

運動失調症状を評価する方法として広く用いられてきた International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS) に変わり得る新たな指標として、昨年 Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) が提唱された。そこで本研究班では日本語訳を統一し、班としてこの validation を行うこととした。ICARS よりも簡便に評価できるという利点があることから、今後の臨床評価プロトコルに採用することを考慮している。

国府台病院では、小脳性運動失調に対してわが国で唯一保険適用が認められている TRH 製剤の SCD 病型による再評価が行われ、SCA6 に対する有効性が改めて示された。今後ギャバペンチンや塩酸メマンチンなど、既存の薬剤の適応拡大の可能性が検討されている。

小脳性運動失調に対するリハビリテーションの方法論は未だ確立されていないが、近年課題指向型練習の繰り返しが脳の use-dependent plasticity を促進し、運動機能の回復や運動学習の成立に寄与することが明らかになってきている。しかし、運動学習の首座である小脳が進行性に障害される変性疾患の場合に、繰り返しのより use-dependent plasticity がどの程度、どのように成立するかは不明であるので、使用量に依存した介入効果を検証する短期的な介入試験を立案し、次年度に実行に移すこととした。

3)大規模ゲノム解析による原因遺伝子未同定 SCD の病態解明

(1)MSA 研究

【方法】

大規模ゲノム解析による MSA の病因・病態解明を目的に、前研究班を母体として組織された縦断的なプロジェクト・チームである Japan MSA Research Consortium (JAMSAC) をサポートし、症例の登録を進める。

【結果】

JAMSAC は、(1)孤発性 MSA に関する大規模ゲノム関連解析 (association study) により、MSA の疾患感受性を規定する遺伝子を同定すること、および(2)家族性 MSA の連鎖解析により、単一の原因遺伝子を同定すること、を目標として大規模ゲノムリソースの収集を行うとともに、高精度の縦断的臨床情報データベースを構築しつつある。

国内15施設の協力を得てゲノムリソースを集積し、これまでに MSA166 例、正常対照 95 例について解析を行い、年度末までに MSA220 例、正常対照 294 例の解析を完了する見込みである。正常対照で Hardy-Weinberg 平衡を満たす SNP について関連解析が行われた結果、有意差の認められる SNP が多数同定されている。一方、家族性 MSA の連鎖解析は大規模 SNP タイピングを用いたハイスループット連鎖解析システムを構築しながらの作業であり、これまでに集積された家族性 MSA 家系も、遺伝学的に均一ではないために、今後さらに家系に集積が必要である。北大でも MSA の疾患感受性に関係すると想定される候補遺伝子についての関連解析が進められている。

(2)遺伝子未同定 SCD の原因遺伝子同定

【方法】

原因遺伝子が未同定である遺伝性 SCD に関して、家系を有する多施設が共同して、系統的な連鎖解析により原因遺伝子の同定を

目指す。第 16 染色体に連鎖する優性遺伝性純粋小脳型 SCD については、さらに分子病態の解明を進める。

【結果】

第 16 染色体長腕に連鎖する純粋小脳型優性遺伝性 SCD に関しては、puratophin-1 遺伝子の 5'UTR に C→T 変異がすでに同定され、患者脳における mRNA の発現低下が報告されている。しかし、南九州地域における鹿児島大による解析では、(1)この C→T 変異の homozygous mutation が 4 例見出され、その症状が重症ではないことから、蛋白質の発現低下による loss of function では説明が困難であること、(2)ゲノム上の連鎖領域についても、医科歯科大の報告とはオーバーラップしていないことが改めて報告された。さらに信州大と新潟大から、同一家系内の発症者でもこの C→T 変異の陽性者と陰性者が混在している家系例が報告されたことから、この C→T 変異が真に疾患の責任変異であるか否かは依然として確定できていない。微小な欠失や重複の可能性については否定的である。

九州大学から報告された優性遺伝性で純粋小脳型を呈する SCA16 は、その後の解析により連鎖領域が 3p26.2-pter に変更され、さらにこの領域に位置するコンタクチン CNTN4 遺伝子の 3' 非翻訳領域に、発症者に特異的な 1 塩基置換が見出された。この変異が真の責任変異であるか否かに関して、現在検証が進められている。ごく近傍には同じく純粋小脳型を呈する SCA15 もマップされており、極めて興味深い。

(3)FSP 研究

【方法】

SCD に含まれながら、従来系統的な全国調査が行われてきていない FSP に関して、全国調査とゲノム解析をリンクさせたプロジェクトチーム Japan Spastic Paraplegia Research Consortium: JASPAC を JAMSAC に習って立

ち上げ、高精度の縦断的臨床情報データベースを構築するとともに、大規模ゲノム解析に向けてゲノムリソースの収集を行う。

【結果】

本研究班を母体として、JAMSAC と同様の多施設共同研究組織 JASPAC を自治医大の滝山を中心として立ち上げ、自治医大の倫理委員会の承認を得て、全国疫学調査を実施した。その結果、全国の 204 施設より回答を得、209 家系 321 例の家族例と 370 例の孤発例を確認し、わが国における FSP の実態を初めて明らかにすることができた。家族例は優性遺伝性が 141 家系 220 例と最多であり、劣性遺伝性が 63 家系 44 例、X 連鎖が 4 家系 4 例、遺伝形式不明が 3 例であった。遺伝子変異が証明されたのは、優性遺伝性では SPG4 が 25 家系であった。SPG4 は欧米では 40% を占めているが、わが国では 16% と少なかった。劣性遺伝性では ARSACS が 5 家系、X 連鎖性では SPG1 が 1 例、SPG2 が 2 例であった。今後は未同定遺伝子変異の解析を進めるとともに、2 次調査により詳細な臨床情報を収集して、遺伝子変異型と臨床型の相関解析を予定している。

東京大では DNA マイクロアレイを用いた原因遺伝子の網羅的解析システムが構築され、SPG4 においてハプロ不全をきたし得る新たな変異が見出された。

わが国で最も頻度が高い優性遺伝性 FSP である SPG4 の責任遺伝子 spastin の機能解析が自治医大で進められ、spastin は微小管と結合し、微小管の安定性に関与する可能性が示唆された。

4) ALD とペルオキシソーム病の臨床研究

【方法】

前研究班による前向き調査研究から、小児大脳型 ALD における HSCT の有効性が明らかになってきたので、本プロジェクトでは早期治療に向けて、早期診断と HSCT が速やかに

施行できる診療体制の整備を進める。HSCT 治療効果の追跡調査を継続するとともに、ALD に関する知識の普及と啓蒙、および新規治療薬の開発を行う。他のペルオキシソーム病についても、病態の解明を目指した基礎研究と治療薬の開発スクリーニングを開始する。

【結果】

ペルオキシソーム病を対象とした診断・予後追跡システムが岐阜大で構築され、運用を開始した。ALD を除いたペルオキシソーム病の年間発症者は約 20 名と推定されるので、限られた診断施設を入り口とする患者追跡システムを整備することは有効であり、さらに温度感受性遺伝子変異を回復させる治療薬剤のスクリーニングも開始された。

東京大では、DNA マイクロアレイを応用した ALD のハイスループット遺伝子解析システムが構築され、ALD の病因遺伝子 ABCD1 に新規の変異 1 例を含めて 12 例の変異が同定された。さらに関連遺伝子 ABCD2 の変異解析も迅速に行うことが可能となった。

ALD に対する HSCT は東海大と名古屋第一赤十字病院において施行されているが、白血病と異なり正常骨髄に前処置して移植するために、臍帯血では生着率が約 50% と低いこと、および前処置に使用される busulfan の中枢神経毒性が課題となっていた。小児大脳型は 60% に家族歴があるが、この情報は有効利用されておらず、診断から移植までに平均 6 ヶ月を要していた。ALD は進行抑制のために、緊急に HSCT を要する病態であるという認識が必要であることが改めて強調された。

今後さらに、HSCT の保険適応、骨髄移植ネットワークへの周知、小児科医・神経内科医への周知などの課題を徹底する必要がある。Lorenzo オイルは MRI 上異常がない場合の発症リスクを低下させるという報告があり、前向き研究として調査すべきか、さらに検討している。

5) 倫理面への配慮

臨床調査個人票を用いた解析は同意を得た場合に限り行い、集計結果についてのみ報告する。臨床研究は十分なインフォームド・コンセントに基づき、3省合同の倫理指針に従い、各施設における倫理委員会の承認の下に遂行する。

C. まとめ

本研究班は共同研究体制の有効性を最大限発揮できるように、プロジェクト・チーム制を採用して組織されており、2年目の今年度も各プロジェクト・チームとも順調に研究を推進していると考えている。今後の有効な班研究に向けて、本研究班としては以下の共通する課題を検討している。

1) 臨床調査個人票の有効利用

臨床調査個人票は前向き研究のデータベースとして世界的にも貴重なリソースとなり得るが、実際の運用面では自治体による入力率を向上させなければ、有効活用は難しい。いかに入力率を向上させるか、行政面からもさらに検討を要する。

また、ペルオキシソーム病も特定疾患治療研究事業の対象疾患としての要件をすべて満たす難病であることから、以前に Fabry 病がライソゾーム病に拡大された前例にならない、ALD が ALD を含めたペルオキシソーム病に拡大されるよう要望する。

2) 臨床試験の実施に向けて

わが国で医師主導による臨床試験を実施することは依然として極めて困難である。加えて SCD のような慢性進行性神経変性疾患を対象とした臨床治験は、従来のパラダイムによるエンドポイント評価では、5年～10年以上の追跡調査が必要となり、一個人や製薬会社の能力を遙かに超えてしまう。本研究班としては現時点では、臨床的なエンドポイントに勝る新たなバイオマーカーの開発に重点を

置いている。しかし、短期的に結論を得にくい進行抑制治療に対して、新たな治験パラダイムを確立しなければ、近年進歩の著しい基礎研究の成果を患者さんに還元する道は開かれないままに終わる。

3) バイオバンクの構築

ゲノム解析を目的とした大規模ゲノムリソースの収集は、高精度の縦断的臨床情報データベースの構築とリンクさせ、得られたリソースを共有するバイオバンクとして利用できるように準備した。班員による共同研究が活発に進められるだけでなく、外部からの申請にも対応できるように、研究審査会も設置した。

4) 小脳性運動失調に対するリハビリテーションの方法論の確立

病態の進行抑制を目的とした分子標的治療の臨床応用が困難である現状では、小脳性運動失調に対するリハビリテーションの方法論を確立することは極めて重要な意義をもつ。しかし、脳血管障害に対する機能回復訓練と異なり、本研究班が対象とする神経変性疾患においては、運動学習の首座たる小脳そのものが障害されており、このような状況でも既存のリハビリテーション手法が有効に機能するか否か自体が未だ検証されていない。こうした基礎的研究を進めつつ、本研究班ではまず使用量に依存した介入効果を検証するための短期的・長期的な介入試験を計画する。

5) 研究情報の公開

本研究班ではホームページを立ち上げて、研究の進捗状況を公開している。本報告書もよりわかり易い報告書であることを目標として、各分担研究者による研究のまとめ図を最後に掲げるとともに、カラー版のまとめ図もホームページ上に公開する。

Ⅱ 分担研究報告

厚生科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
運動失調症に関する調査研究班

ALD・ペルオキシソーム病の診断・治療開発システムの構築とその展開

分担研究者 鈴木康之(岐阜大学医学部医学教育開発研究センター)
研究協力者 下澤伸行(岐阜大学生命科学総合研究支援センター)

研究要旨

ペルオキシソームの代謝機能に異常をきたす副腎白質ジストロフィー(ALD)やペルオキシソーム欠損症では中枢神経病変が主体であり、前者は脱髄、後者は神経細胞移動障害が特徴的である。疾患概念自体、比較的新しく国内においてその普及や診断システムが不十分であるにもかかわらず、小児大脳型 ALD では出来るだけ早期の骨髄移植が唯一有効な治療法と考えられており、早期診断・治療体制の整備とともに、新たな有効な治療法の開発が不可欠である。今年度の本研究では昨年度までの成果で確立した国内ペルオキシソーム病診断システムにより集積した患者細胞を用いた治療薬開発のための化合物スクリーニングシステムを確立したので報告する。

A. 研究目的

脂肪酸代謝など生体内で重要な役割をもつペルオキシソームの代謝機能に異常を来して発症するペルオキシソーム病には、副腎白質ジストロフィー(ALD)をはじめとした単一のタンパク異常症と、それらのタンパクのペルオキシソームへの細胞内輸送や膜の生合成に関わるペルオキシタンパクの異常によるペルオキシソーム形成異常症に大別される。前者の ALD は学童期に学習障害や知能低下、視力障害等で発症し、数年で寝たきりになる小児大脳型から成人で歩行障害などの脊髄症状で発症する AMN など様々な臨床型を有し、その治療法に関しては小児大脳型では造血幹細胞移植(HSCT)が唯一、有効とされるものの発症早期例にしか効果を認めず、移植による重篤な副作用も問題となる。

後者のペルオキシソーム形成異常症では出生直後より筋緊張低下、哺乳障害、肝腫大などを呈して乳児期早期に死亡する Zellweger 症候群から乳児期に発症し成人生存例も存在する乳児型 Refsum 病まで幅広い臨床型を有し、いずれも神経症状を主体とする難治性疾患で現在まで有効な治療法は開発されていない。

演者らはペルオキシソーム病の国内唯一の総合診断センターとして研究を続け、ペルオキシソーム形成異常症については国内の全症例に加えて海外の症例も集積し、その病因遺伝子を世界で初めて発見し、さらに軽症型の患者細胞においては培養温度の変化によりこの異常が可逆的に正常化する温度感受性現象を遺伝子レベルで明らかにしている。この温度感受性現象の機序は明らかではないものの、いずれの遺伝子変異もミスセンス変異であり、リボソームで合成された変

異タンパクが品質管理、輸送、分解を受ける過程やタンパク間の相互作用等において温度により可逆性にその機能が安定、不安定化することにより起こる可能性が考えられる。近年、フォールディング病の概念が確立し、それに対して分子シャペロンやペプチド、低分子化合物などを用いたシャペロン療法等も種々の難治性神経疾患に対して細胞レベルで検討されている。本研究では岐阜大学に集積した種々の遺伝子型を有するペルオキシソーム病患者細胞に低分子化合物を添加することにより、細胞レベルでの治療効果をスクリーニングし、治療薬の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

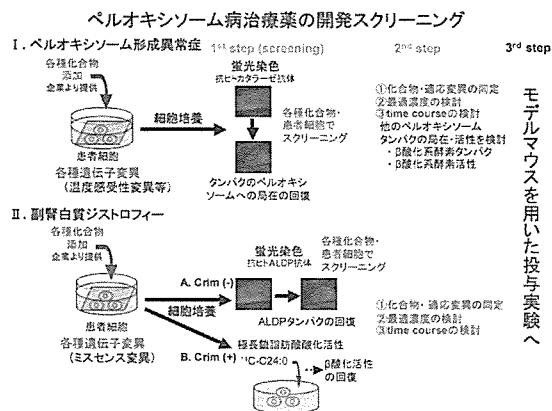
岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野に保存されているペルオキシソーム病患者細胞のうち、温度感受性を含めたミスセンス変異を有するペルオキシソーム形成異常症および ALD 患者細胞を用いて、企業より提供された化合物を複数の条件下に培養液中に添加し、以下の方法でその治療効果を検討する(図1参照)。

1.ペルオキシソーム形成異常症:ペルオキシソーム酵素の抗体を用いた蛍光免疫染色により、タンパクのペルオキシソームへの局在の正常化によりその治療効果を判定する。

2. 副腎白質ジストロフィー:RI を用いたリグノセリン酸酸化活性を指標に患者細胞でのペルオキシソーム β 酸化活性の正常化によりその治療効果を判定する

さらに治療効果が認められた化合物、遺伝子型の組合せについてはその機序を解明し、モデル

動物を用いた治療研究へと展開し、臨床応用に発展させる。



C. 研究結果

これまでの一次スクリーニングにおいて提供された 20 数種類の化合物に対して4つの異なる温度感受性遺伝子変異を有する形成異常症の患者細胞に投与した結果、複数の種類の化合物においてペルオキシソームタンパクの局在の回復を認め、現在、二次スクリーニングに進めている。また ALD に関してもスクリーニング系を確立中である。

D. 考察および結論

ペルオキシソーム病はその疾患概念自体、比較的新しく国内においても充分には周知されていない。演者らは本疾患群に対し、疾患の存在自体も含めた全国への情報提供、日本人症例の把握、国内診断システムの確立、そして治療法の開発、特にALD小児大脳型におけるHSCTに代わる、またはHSCT施行までの治療法の開発を重要課題と捉えて研究を進めている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Funato M, Shimozawa N, Nagase T, Takemoto Y, Suzuki Y, Imamura Y, Matsumoto T, Tsukamoto T, Kojidani T, Osumi T, Fukao T, Kondo N. Aberrant peroxisome morphology in peroxisomal beta-oxidation enzyme deficiencies. Brain &

Development 28 (5); 287-292, 2006

2) Takahashi N, Morita M, Maeda T, Harayama Y, Shimozawa N, Suzuki Y, Furuya H, Sato R, Kashiwayama Y, Imamura T Adrenoleukodystrophy: subcellular localization and degradation of adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ ABCD1) with naturally occurring missense mutations. J. Neurochem, in press

3) 下澤伸行、鈴木康之. ペルオキシソーム病 小児科診療 69(11) 1646-1652, 2006

2. 学会発表

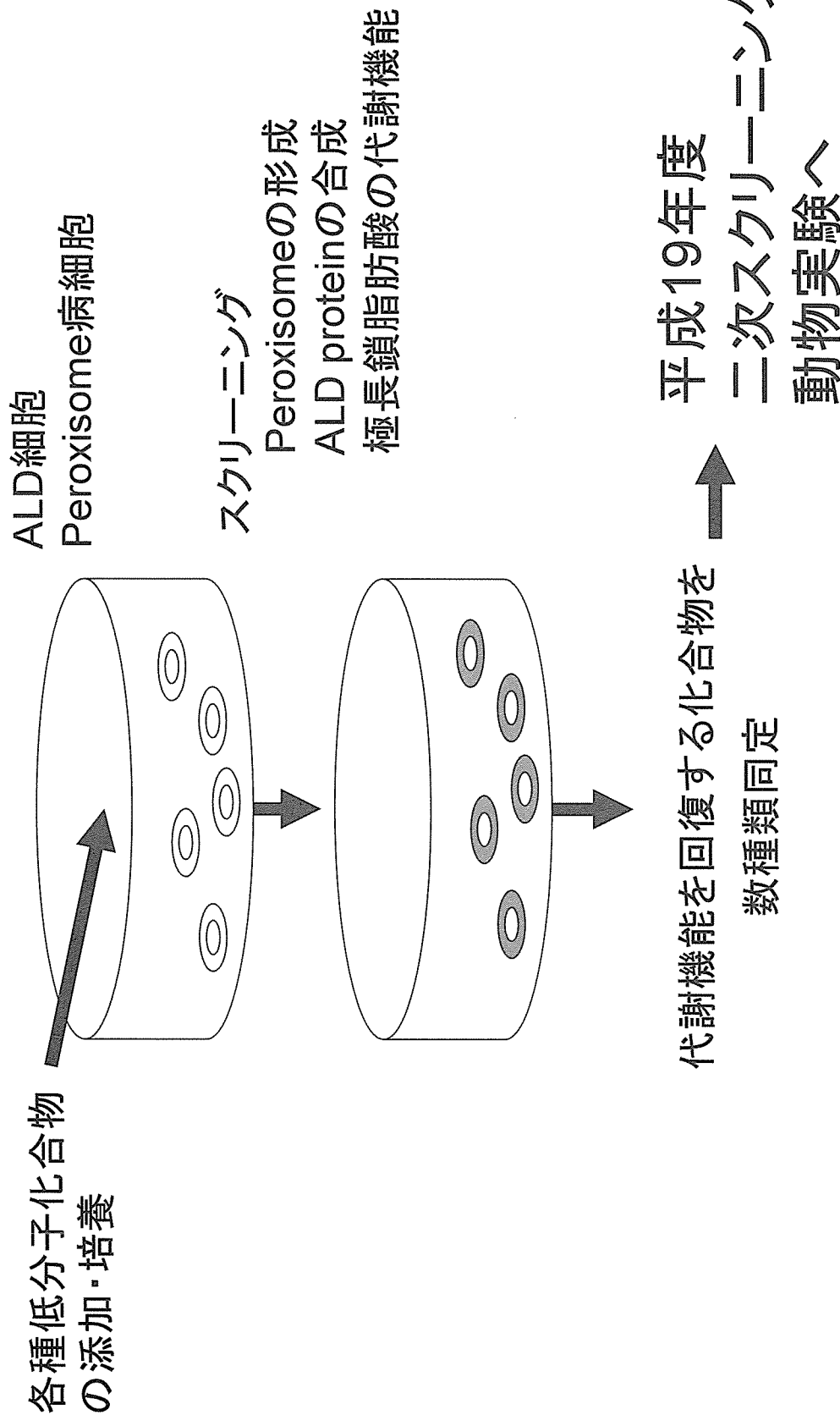
1) Suzuki Y, Shimozawa N: Early stage of childhood X-linked adrenoleukodystrophy: a questionnaire survey. 10th International Congress of Inborn Error of Metabolism. 2006.9.12-16, Makuhari

G. 知的所有権の取得状況

なし

ALD・Peroxisome病治療薬の開発スクリーニング

岐阜大学医学部 鈴木康之・下澤伸行



ALD の分子病態解析

分担研究者 今中 常雄 富山大学大学院医学薬学研究部
研究協力者 守田 雅志 富山大学大学院医学薬学研究部

研究要旨 副腎白質ジストロフィー(ALD)は ABCD1 遺伝子の変異によりペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ALDP/ABCD1 の機能欠損が原因で引き起こされる。患者で報告されている変異の約 50%はミスセンス変異であり、そのうち約 70%で ALDP が存在していない。本研究では、ミスセンス変異 ALDP の細胞内動態を解析し、その分解システムについて検討した。その結果、ペルオキシソームに正常に局在化する変異、ミスターゲットを起こす変異、さらにプロテアソームで分解される変異が認められた。また、ALDP をノックダウンした中枢神経系グリア細胞を用い、その代謝異常について検討したところ、極長鎖脂肪酸 β 酸化活性の減少以外に、コレステロール代謝に異常が認められた。

A. 研究目的

その変異が ALD の原因となる ALDP は遊離型ポリソームで生合成され、ペルオキシソームへと局在化し、ダイマーを形成して機能している。本研究では ALD 患者で見ついているミスセンス変異 ALDP の変異の位置と細胞内局在化や安定性および存在様式にどのような関連性があるかを解析し、ALDP の機能ドメインおよび変異 ALDP の処理機構について検討することを目的とした。一方、中枢神経系での ALDP の役割について検討する目的で、ALDP をノックダウンしたグリア細胞を用い、脂肪酸やコレステロール代謝について検討を行った。

B. 研究方法

ALD 患者で報告されているミスセンス変異の中から、TMD から 4 つ、NBD から 4 つ、C 末端部位から 1 つを任意に選び、変異 ALDP の細胞内運命を解析した。①野生型と変異型 His-ALDP を ALD 線維芽細胞に一過性に発現し、その局在化や発現量を蛍光抗体法やイムノブロット法により解析した。②野生型 ALDP と変異 ALDP-GFP を安定に共発現する CHO 細胞を作製し、その細胞内局在や発現量を解析した。一方、ヒトグリア細胞株 U87 を siRNA 法により ALDP の発現をノックダウンした細胞を作製して、 $[1-^{14}\text{C}]$ リグノセリン酸や $[1-^{14}\text{C}]$ 酢酸を基質として代謝ラベルし、可溶性画分や中性脂質画分への取り込みを定量化した。

(倫理面での配慮)

ALD 患者線維芽細胞は、提供者(幼児の場合は両

親)の同意を得て採取したものを、岐阜大医学部鈴木康之教授より供与を受けた。

C. 研究結果

ミスセンス変異 ALDP は以下に示すように 4 種類の細胞内動態を示した。①野生型と同様にペルオキシソームに局在するがその機能が阻害されている変異(R104C, G116R, S342P, Q544R, S606P)、②ペルオキシソームへの局在化に障害がある変異(Y174C)、③変異によりタンパク質の安定性が低下しプロテアソームでの分解を受けるが、一部ペルオキシソームに局在する変異(S606L)、④変異によりタンパク質の安定性が低下しプロテアソームで選択的に分解を受け、細胞内でほとんど確認できない変異(R617H, H667D)である。

発現量も局在化も正常な変異では、ABC タンパク質としての機能に直接関与している機能ドメインの障害が起こっていると推察される。局在化に異常が認められた Y174C は、TMD2 と 3 の間のループ 2 に位置しており、この領域が ALDP のペルオキシソームへのターゲティングに必要であることを示している。一方、R617H 及び H667D を発現した細胞では変異 ALDP の分解と同時に野生型 ALDP も分解消失した。この変異 ALDP はプロテアソーム阻害剤存在下で回復したことから、プロテアソームが分解に関与していることが示唆された。また変異 ALDP はダイマーを形成した後、分解されていること、さらに PMP70 とはダイマーを形成していないことが示唆された。

一方、U87 細胞の ALDP の発現量を 20%以下まで減少させると、 $[1-^{14}\text{C}]$ リグノセリン酸の β 酸化活性の減少とともに $[1-^{14}\text{C}]$ 酢酸の遊離コレステロール画分への取り込みが減少し、ラノステロール画分への取り込

みが増加した。また[1-¹⁴C]リグノセリン酸のコレステロールエステル画分への取り込みは有意に増加していた。ALDP ノックダウン細胞では遊離コレステロール量が増加しており、主に細胞膜画分での増加が認められた。

D. 考察

ミスセンス変異 ALDP の ABC タンパク質としての機能不全のみならず、ミスターゲッティングやプロテアソームを介した分解が ALD の疾患と関連していることが示唆された。変異の位置によってはシャペロン様の機能をもつ薬剤で、変異 ALDP の局在化や安定性を正常化させることにより、ALDP 分子としての機能を回復させる可能性が考えられる。一方、ALDP をノックダウンしたヒトグリア細胞株では、ペルオキシソームにおける極長鎖脂肪酸の β 酸化活性の減少とともにコレステロール合成や含量、および分布にも異常が認められ、ALDP はコレステロールの恒常性を維持するために必要であると推察された。

E. 結論

ALD 患者で報告されているミスセンス変異では、発現した変異 ALDP が様々な原因で機能を失うことが分かった。その多くはプロテアソーム分解系で分解されていると推察された。変異 ALDP の局在化や安定性を正常化させることにより、その機能を回復させることが可能かもしれない。また、中枢神経系グリア細胞では ALDP の機能が極長鎖脂肪酸代謝のみならずコレステロール代謝にも関連していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morita M., Kurisu M., Kashiwayama Y., Yokota S., and Imanaka T.: ATP-binding and -hydrolysis activities of ALDP (ABCD1) and ALDRP (ABCD2), human peroxisomal ABC proteins, overexpressed in Sf21 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1836-1842, 2006
- 2) Takahashi M., Morita M., and Imanaka T.: Adrenoleukodystrophy: Structure and function of ALDP, and intracellular behavior of mutant ALDP with naturally occurring missense mutations. *Yakugaku Zasshi* 127, 163-172, 2007
- 3) Takahashi N., Morita M., Maeda T., Harayama Y., Shimozawa N., Suzuki Y., Furuya H., Sato R,

Kashiwayama Y., and Imanaka T.: Adrenoleukodystrophy: subcellular localization and degradation of adrenoleukodystrophy protein (ALDP/ABCD1) with naturally occurring missense mutations. *J. Neurochem.*, 2007 (in press)

2. 学会発表

- 1) Imanaka T.: Targeting mechanisms of ABCD subfamily protein to peroxisome or endoplasmic reticulum. FEBS Special Meeting ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases. 2006, 3, Innsbruck.
- 2) 高橋則正, 原山雄太, 前田尚敬, 守田雅志, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィー: ミスセンス変異 ALDP の細胞内動態と病態解析. (シンポジウム) 日本薬学会第 126 年会, 3 月 2006 仙台.
- 3) 熊倉学, 守田雅志, 今井美帆, 今中常雄: マクロファージ系細胞での副腎白質ジストロフィータンパク質の発現とその. 日本薬学会第 126 年会, 3 月 2006 仙台.
- 4) Imanaka T., Kumakura M., Imai M., Harayama Y., and Morita M.: Expression of ALDP, a peroxisomal ABC protein, is up-regulated via PPAR δ in THP-1 monocytic cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006, 6, Kyoto.
- 5) Morita M., Mizuno S., Tamura A., and Imanaka T.: Impaired expression of ALDP, a peroxisomal ABC protein, leads to their disruption of lipid metabolisms in human glioblastoma cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006, 6, Kyoto.
- 6) 今中常雄: ABC タンパク質による脂質代謝制御と疾患. 油化学シンポジウム in 金沢, 12 月 2006 金沢

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願
2. 実用新案登録
3. その他
なし