

た遺伝子は登録を抹消され、新たに LOC642891 (内容が変更されている), LOC728133 (294 アミノ酸), LOC728221 (343 アミノ酸)の3 遺伝子が予測され、登録された。そこで、各遺伝子についてその配列の決定を進めている段階である。

D. 考察

CNTN4 遺伝子の3'非翻訳領域に同定された一塩基置換(4,256C→T)は、霊長類ではCでよく保存されていた。したがって、本家系の罹患者に見られた変異は、きわめて特徴的と考えられる。一方ラット、マウスでは同アリルはTであり、罹患者に見られたものと同じであった。しかし動物種によって遺伝子発現調節機構の細かい差もあるため、今回の結果を持ってTアリルが単なる“真の”SCA16の原因となっているアリルと強く連鎖しているにすぎないと結論するまでには至らず、今後の検討が必要である。

今回検討した5つの遺伝子内には罹患者特異的変異は確認できなかった。しかしデータベースは定期的に更新されており、今回検討した5つの遺伝子も新しいデータベースでは登録を抹消され、代わりに3つの新しい遺伝子が登録され、地道に罹患者特異的変異を検討する必要があると考えられる。

今後は CNTN4 4256C→T について 1) SCA16 の原因変異である可能性の検討として、1.1) ヒト型 CNTN4 遺伝子に置換したマウスでの検討、1.2) CNTN4 4256C→T 変異による mRNA 安定性、翻訳効率などの検討、2) 別の原因遺伝子が存在する可能性の検討として、2.1) 新たに予測された3個の遺伝子の解析、2.2) 今後のデータベース改訂後に新たに予測される遺伝子の解析を予定している。

E. 結論

1) CNTN4 遺伝子 3' 非翻訳領域の一塩基置換 (4,256C→T) のアリルは、霊長類では C アリルで保存されていたが、ラット、マウスでは罹患者と同じ T アリルであった。

2) 検討しえた限りでは新たに予測された5 遺伝子に罹患者特異的変異は同定できなかった。また、さらに新たな3 個の遺伝子が連鎖領域に予測された。

F. 研究発表

特になし

1. 論文発表

The contactin 4 gene locus at 3p26 is candidate gene of SCA16. S. Miura, H. Shibata, H. Furuya, Y. Ohyagi, M. Osoegawa, Y. Miyoshi, H. Matsunaga, A. Shibata, N. Matsumoto, A. Iwaki, T. Taniwaki, H. Kikuchi, J. Kira, and Y. Fukumaki, NEUROLOGY 267:1236-1241, 2006

2. 学会発表

三浦史郎ら、脊髄小脳失調症 16 型(SCA16)の責任遺伝子は 3p26.2-pter に連鎖する。神経学会総会 5 月 2006 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況: なし

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: なし

脊髄小脳失調症16型の病因遺伝子同定

(1) *CNTN4* 遺伝子3' 非翻訳領域の一塩基置換 (C>T) allele --->SCA16の原因変異である可能性の検討

Human wild type	(254)	TCTATTTTGAATGAAATTTAAAAAAG--TAATTCCTGTCGAATGCATTCTTAATTCCTTTA
Human mutant typ.	(954)	TCTATTTTGAATGAAAATTAAAAAAG--TAACTCTGTCGAATGCATTCTTAATTCCTTTA
Chimpanzee	(254)	TCTATTTTGAATGAAACTTTAAAAAAG--TAATTCCTGTCGAATGCATTCTTAATTCCTTTA
Bonobo	(NA)	TCTATTTTGAATGAAATTTAAAAAAG--TAATTCCTGTCGAATGCATTCTRAATTCCTTTA
Gorilla	(NA)	TCTATTTTGAATGAAATTTAAAAAAG--TAATTCCTGTCGAATGCATTCTRAATTCCTTTA
Orang-utan	(NA)	TCTATTTTGAATGAAAATTAAAAAAG--TAACTCTGTCGAATGCATTCTRAATTCCTTTA
Hoolock gibbon	(NA)	TCTATTTTGAATGAAAATTAAAAAAG--TAACTCTGTCGAATGCATTCTRAATTCCTTTA
Green monkey	(NA)	TCTATTTTGAATGAAAATTAAAAAAG--TAACTCTGTCGAATGCATTCTRAATTCCTTTA
Hamadryas baboon	(NA)	TCTATTTTGAATGAAAATTAAAAAAG--TAACTCTGTCGAATGCATTCTRAATTCCTTTA
Common squirrel monkey	(NA)	TCTATTTTGAATGAAAATTAAAAAAG--TAACTCTGTCGAATGCATTCTRAATTCCTTTA
Sing-tailed Lemur	(NA)	TCTATTTTGAATGAAAATTAAAAAAG--TAACTCTGTCGAATGCATTCTRAATTCCTTTA
Rat	(922)	TCTGTTTTCGAATGAAAATTAAAAAAG-----TCTGTCGAATGCATTCTRAATTCCTTTA
Mouse	(924)	TCTGTTTTCGAATGAAAATTAAAAAAG-----TCTGTCGAATGCATTCTRAATTCCTTTA

CNTN4 遺伝子の一塩基置換 (4,256C>T) について
--->霊長類: “C”, げっ歯類: “T”

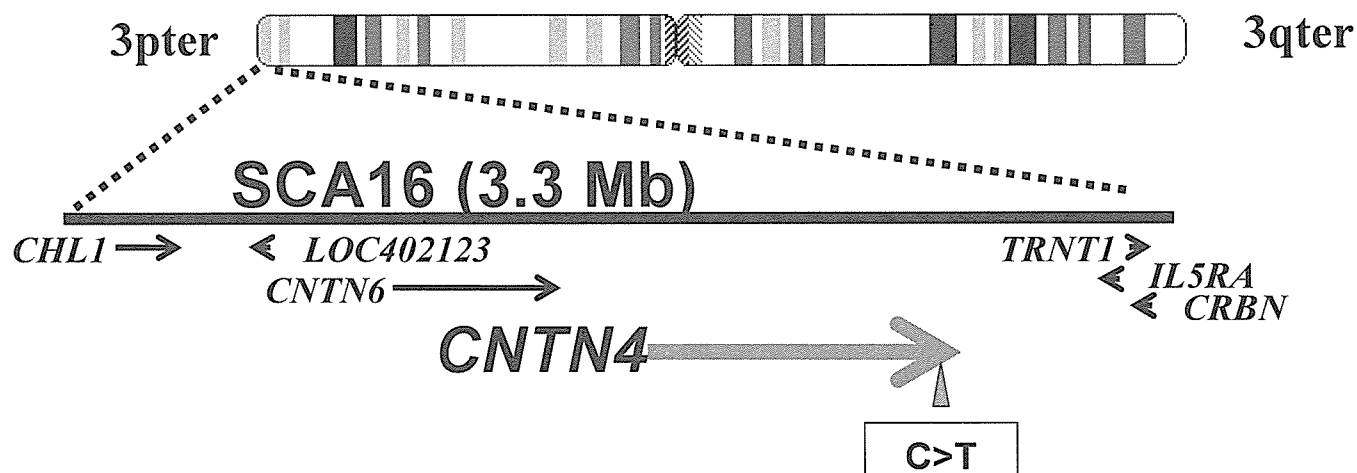
--->罹患者のT alleleは, なにか病的意味を有する?

今後の予定:

ヒト型CNTN4 遺伝子に置換したマウスでの検討

CNTN4 4256C>T変異によるmRNA安定性, 翻訳効率などの検討

2) 別の原因遺伝子が存在する可能性の検討



新たに予測された5個の遺伝子のうち, 3個については罹患者特異的変異は見出せなかった. またデータベースの改訂の際に削除された

← LOC642930 → ← LOC643039 → LOC643120 →
← LOC642891 → LOC643060 →

解析途中, さらに新たな3個の遺伝子が予測され, それらの配列を解析中

← LOC728133 → LOC728221 →
← LOC642891 →

今後の予定

新たに予測された3個の遺伝子の解析

今後のデータベース改訂後に新たに予測される遺伝子の解析

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

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

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

研究要旨

Puratrophin-1 遺伝子 5'非翻訳領域の C→T 置換を伴う脊髄小脳変性症 を 59 家系 65 例に見出し、臨床遺伝学的検討を行った。発症年齢は平均 59.1 歳と、既知の常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症 (AD-SCA)のなかでは最も高齢であり、緩徐進行性の小脳失調を中核症状としていた。AD-SCA の 8.9%を占め、SCA6, Machado-Joseph 病 (MJD), 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)に次ぐ頻度であり、特に 60 歳以上の発症では、SCA6 に次ぐ頻度であった。

A. 研究目的

Puratrophin-1 遺伝子 5'非翻訳領域の C→T 塩基置換を伴う 16q-SCA の臨床遺伝学的特徴および AD-SCA における頻度を明らかにする。

B. 研究方法

当科に遺伝子診断を依頼された 690 家系 721 例の AD-SCA と小脳皮質萎縮症につき、既知の CAG リピート増大の有無および Puratrophin-1 遺伝子 C→T 置換の有無を解析した。

Puratrophin-1 遺伝子の解析として、5'非翻訳領域の C→T 塩基置換について、EcoNI を用いた PCR-RFLP を行い、PCR 産物を direct sequence で解析した。

次に、家系内で複数者の遺伝子解析が可能なサンプルに対して、Puratrophin-1 近傍のマイクロサテライト多型解析を行った。

さらに、AD-SCA に占める 16q-SCA の頻度と発症年齢、神経症候についての検討を行った。

(倫理面への配慮)

患者 DNA は、同意を得て、末梢血リンパ球から抽出した検体を使用しており、倫理面の問題はない。

C. 研究結果

58 家系 64 名に puratrophin-1 遺伝子 C→T 塩基置換を見いだした。Puratrophin-1 近傍のマイクロサテライト多型解析では、発症者に共通の genotype を認めた。

発症年齢は平均 59.1 歳(46~77 歳)で、緩徐進行性の純粋小脳失調が大部分を占めていた。小脳失調以外の神経症候として、43.6%に深部腱反射異常を認め、9.8%に振動覚低下、3.3%に舞踏運動の合併を認めた。AD-SCA に占める頻度は 8.9%

で、MJD(28.3%), SCA6(27.6%), DRPLA(21.0%)に次ぐ頻度であった。また、発症年齢が 60 歳以上の AD-SCD に占める頻度は、SCA6(46.0%)について第 2 番目(24.2%)であった。

D. 考察

Puratrophin-1 遺伝子 C→T 置換は 16q-SCA の有用な診断マーカーである。16q-SCA の平均発症年齢は既知の AD-SCA のなかでは最も高齢であり、緩徐進行性の小脳失調を呈する。また、AD-SCA 中、第 4 番目の頻度である。

E. 結論

この塩基置換を伴う AD-SCD は高齢発症で緩徐進行性の小脳失調を中核病型とする。本邦における頻度は稀ではない。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nozaki H, Ikeuchi T, Kawakami A, Kimura A, Koide R, Tsuchiya M, Nakamura Y, Mutoh T, Yamamoto H, Nakao N, Sahashi K, Nishizawa M, Onodera O. Clinical and Genetic Characterizations of 16q-Linked Autosomal Dominant Spinocerebellar Ataxia (AD-SCA) and Frequency Analysis of AD-SCA in the Japanese Population Movement disorder 2007, in press

2. 学会発表

野崎洋明、新保淳輔、原賢寿、池内健、小野寺理、西澤正豊 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 神経学会総会 5月 2006 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

第16番染色体に連鎖する脊髄小脳変性症 (16q-SCA) の臨床遺伝学的検討

野崎 洋明^{1,2}

池内 健²

小野寺 理²

新保 淳輔¹

原 賢寿¹

西澤 正豊¹

¹新潟大学脳研究所神経内科

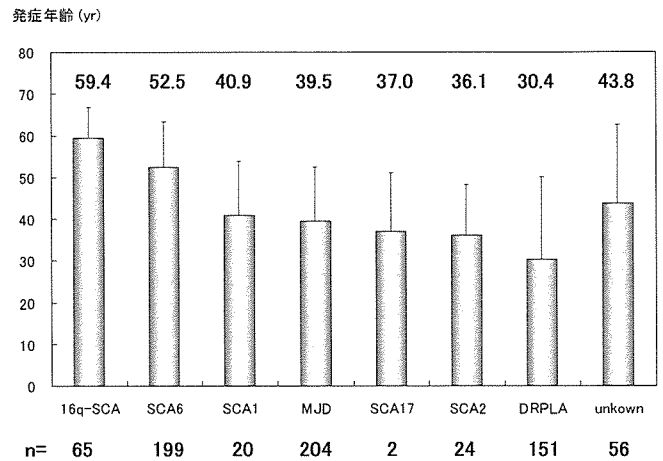
²新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター

【16q-SCAの臨床的特徴】

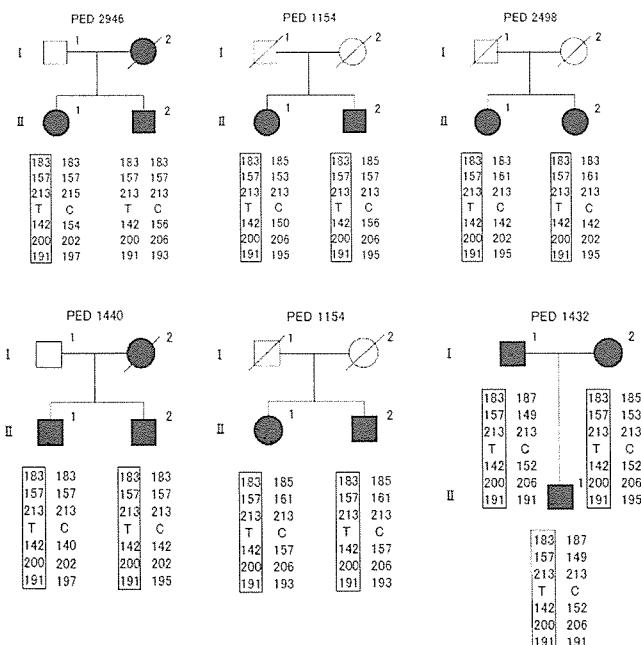
患者数 (n)	65	(男/女 33/32)
発症年齢 (yr)	59.4	(46 - 80)
診察時年齢 (yr)	67.5	(47 - 94)
罹病期間 (yr)	8.1	(1 - 23)

神経症候 (%)	罹病期間 (yr)		総計 (n=61)
	0-9 (n=41)	>10 (n=20)	
眼振	26	71	45
構音障害	88	100	92
四肢失調	81	100	89
体幹失調	100	100	100
認知機能障害	2	15	7
不随意運動	7	10	8

【SCAの疾患別発症年齢】

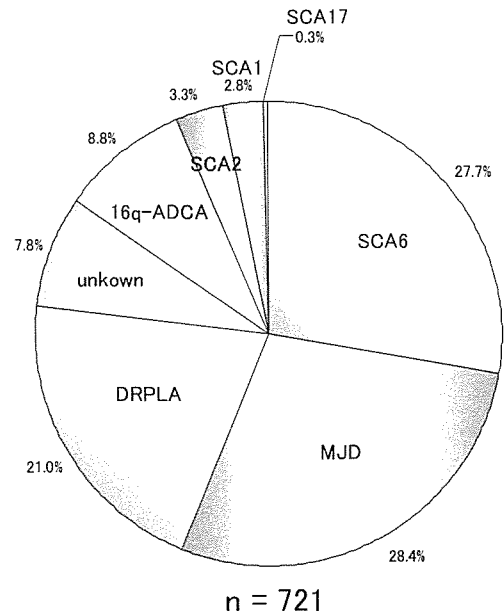


【マイクロサテライト多型解析】



* □内は発症者に共通のgenotype

【SCAの疾患別頻度】



* MJD: マシヤド・ジョセフ病

* DRPLA: 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症

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

運動失調症に関する調査研究班

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

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²⁾、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

研究要旨

長野県内の原因遺伝子未同定の常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症(ADCA)のうち過半数の52家系(ADCA全体の43%)が最近、同定された puratrophin-1 遺伝子の5'非翻訳領域の-16C>T塩基置換を有する家系であった。ただそのうち1家系において当該塩基置換陽性および陰性の罹患者が混在する家系が見られたことから当該塩基置換が真の病因ではない可能性を考えた。本症の真の病因を見出すためにこの家系を用いて16q22.1領域のさらなる解析を行った。しかしながら現時点までに新たな変異候補は同定されていない。今後は本領域におけるより詳細なハプロタイプ解析により連鎖領域を絞込む必要がある。

A. 研究目的

これまでに長野県の常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症(ADCA)の120家系を解析したところ80家系(67%)がSCA1、SCA2、SCA3/MJD、SCA6、SCA7、SCA12、SCA17、DRPLAのいずれでもない原因遺伝子未同定家系であることが判明した。このうち52家系(全体の43%)が最近同定された puratrophin-1 遺伝子の5'非翻訳領域内のC/T塩基置換を有しており、長野県では puratrophin-1 異常症が最頻のADCA病型であることが判明した。

ただ上記52家系の中で1家系において puratrophin-1 遺伝子のC/T塩基置換陽性と陰性の罹患者が確認された。本家系のハプロタイプ解析より当該塩基置換陰性の罹患者では

puratrophin-1 遺伝子のセントロメア側で組換えが起こっていることが示唆された。この患者が puratrophin-1 遺伝子以外の原因による phenocopy である可能性は否定できないが、当該塩基置換が真の病因ではない可能性も考慮される。そこで本研究では puratrophin-1 遺伝子のC/T塩基置換に関連したADCAの真の病因を見出すことを目的として16q22.1領域に関して、さらなる変異解析を行った。

B. 研究方法

今回は上記の1家系について以下の3つの解析を行った。

(1) puratrophin-1 遺伝子のセントロメア側で、ハプロタイプ共通領域に存在する遺伝子(*FBXL8*、

HSF4, *NOL3*, *E2F4*, *HSPC171*)について直接シーケンス解析を行った。*E2F4*はエクソンに3塩基リピート(CAG)を有するため、ポリアクリルアミド電気泳動にてバンドパターンの確認も行った。

2) 16q22.1領域について、ゲノム構造変化を同定するため、FISH解析を施行した。この領域をカバーする計16のBACクローンを選定し、Nick translation法にてspectrum orangeもしくはspectrum greenで標識し、FISHを行った。

(3) 定量的real-time PCR法を用いて、候補領域にマップされる遺伝子のコピー数を検討した。健常対照者1名のゲノムDNAを標準試料として検量線を作成した。遺伝子コピー数の計測は、1候補遺伝子につき最低1ヶ所を関心領域として設定し、コントロール領域は*FBN1*遺伝子の中に1ヶ所設定した。2領域で定量したコピー数について、その比(候補遺伝子のコピー数/*FBN1*遺伝子のコピー数)を求めた。候補遺伝子として*PDP2*, *CDH16*, *RRAD*, *E2F4*, *SLC9A5*など約20の遺伝子を探索した。

上記の(2)、(3)の検討はいずれも当該家系のpuratrophin-1遺伝子のC/T塩基置換陽性者1-2名のゲノムDNAに対して行った。

C. 研究結果と考察

前記5つの遺伝子に関しては、全エクソンおよびエクソン-イントロン境界部を解析したが、現在までのところ明らかな変異候補は見出せていない。またFISH解析ではこの領域に関して、ゲノム上の構造変化は見出せなかった。本候補領域についてはすでに繰り返し配列の過剰伸長の有無、候補遺伝子の直接的な塩基配列解析が行われてきたが、puratrophin-1遺伝子のC/T塩基置換以外に有意な病因は報告されていない。今回の結果もこのことを追認するものである。最近、常染色体優性遺伝性のParkinson病の1型であ

るPARK4では野生型の α -synuclein遺伝子の3重複が原因であることが示されている。我々も同様の変異機序の可能性も考えて、当該領域にて候補遺伝子のコピー数の解析を行ったが、現在までには明らかな遺伝子コピー数の変化は同定できていない。

D. 結論

現時点ではpuratrophin-1遺伝子のC/T塩基置換の陽性および陰性の罹患者が混在する家系の分子異常・病態は解明できていない。引き続き本家系の臨床的な経過観察および16q22.1領域の解析を継続する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohata T, Yoshida K, Sakai H, Hamanoue H, Mizuguchi T, Shimizu Y, Okano T, Takada F, Ishikawa K, Mizusawa H, Yoshiura K, Fukushima Y, Ikeda S, Matsumoto N. A -16C>T substitution in the 5' UTR of the puratrophin-1 gene is prevalent in autosomal dominant cerebellar ataxia in Nagano. J Hum Genet 51: 461-466, 2006.

2) Morita H, Yoshida K, Suzuki K, Ikeda S. A Japanese case of SCA14 with the Gly128Asp mutation. J Hum Genet 51: 1118-1121, 2006.

2. 学会発表

1) 岡野友美, 吉田邦広, 清水雄策, 大畑尚子, 松本直通, 福嶋義光, 池田修一. 長野県のADCA家系におけるpuratrophin-1遺伝子C→T置換の解析. 第47回日本神経学会総会 2006.5.11-5.13. 東京.

2) 清水雄策, 吉田邦広, 岡野友美, 大畑尚子,

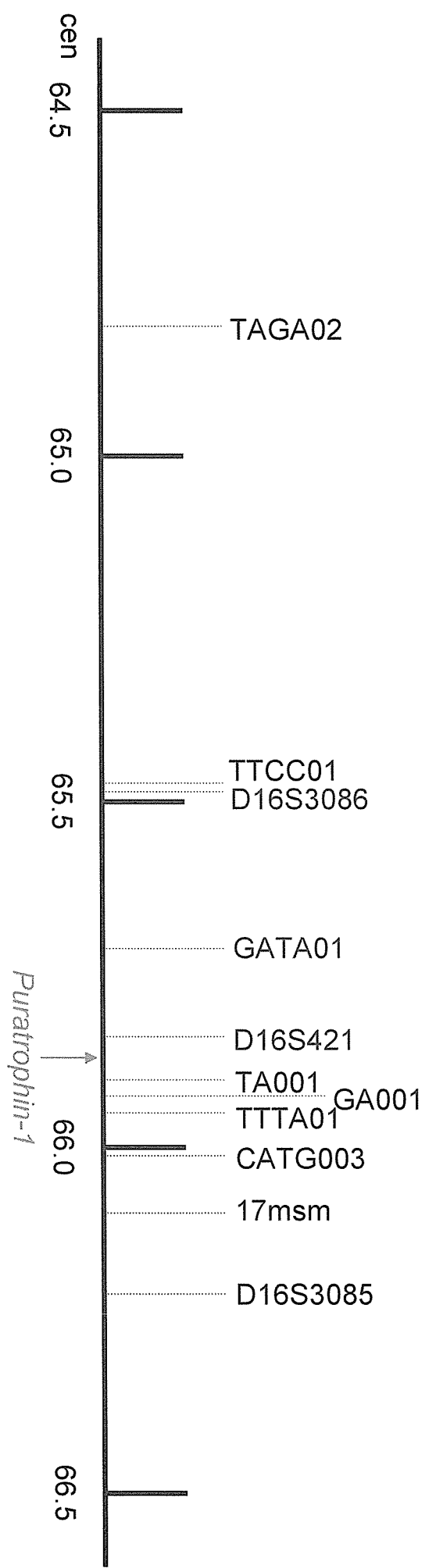
松本直通, 池田修一. Puratrophin-1 遺伝子
-16C>T 置換陽性, 陰性の患者が混在する
ADCA 家系の検討. 第 47 回日本神経学会総会
2006.5.11-5.13. 東京.

3) 大畑尚子, 高田史男, 吉田邦広, 松本直通.

長野県における常染色体優性遺伝性脊髄小脳
変性症家系の解析. 日本人類遺伝学会第 51 回
大会. 2006.10.17-20. 米子.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

長野県内のPuratrophin-1遺伝子C>T置換陽性52家系のハプロタイプ解析 (16q22.1領域)



TAGA02	3	3	3	1
TTCC01	4	4	3	2/3
D16S3086	1	1	1	1
GATA01	3	3	3	2/3
D16S421	2	2	2	2
Puratrophin-1	C	T	T	T
TA001	5	1	1	1/6
GA001	5	2	2	2
TTTA001	5	5	5	5
CATG003	1	1	1	1
17msm	4	2	2	2
D16S3085	1	2	2	2

家系41
(患者21)

家系41
(患者21以外)
家系25

家系9

長野県内の
他の49家系

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

分担研究者 高嶋 博

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

(鹿児島大学医歯学総合研究科 神経内科・老年病学)

研究趣旨

南九州地域の 16qADCA type III 家系において、疾病連鎖候補領域の遺伝子の mRNA 発現量の評価を行った。また micro deletion/duplication の同定や、genome の組み換え異常などについても検討した。GeneChip®アレイにおいては、少数であるがいくつかの遺伝子において mRNA の発現が変化しているのがみられた。しかし原因遺伝子候補である Puratrophin mRNA の発現は、末梢血リンパ球において 5' UTR の C→T の mutation を heterozygous に有する症例においても、homozygous に有する症例においても有意な変化は認めなかった。CGH アレイにおいてはこれまでに規定された領域には Puratrophin も含めて発現の上昇や低下は認めず、micro deletion/duplication の存在は否定的であった。同疾患の原因遺伝子については尚も検討が必要であり、今後連鎖解析の再検討および mRNA に変化を認めた遺伝子の発現量の評価が必要である。

A. 研究目的

南九州地域に多発する高齢発症の常染色体優性脊髄小脳変性症の遺伝的原因を明らかにする。疾病連鎖候補領域の遺伝子の mRNA 発現量の評価を行った。また micro deletion/duplication の同定や、genome の組み換え異常などについても検討した。さらに Puratrophin 遺伝子の 5' UTR の異常が、南九州地域の 16qADCA type III においてどのような影響を示しているかについても検討した。

B. 研究方法

16qADCA type III 家系のうち、Puratrophin 遺伝子の 5' UTR の C→T の mutation を heterozygous に有す症例と homozygous に有す症例を抽出し、その末梢血リンパ球より抽出した検体を用いて、コントロールリンパ球を対照とし、疾病連鎖候補領域の各遺伝子の mRNA 発現量について GeneChip®アレイを用いて検討した。

一方で、homozygous を有す症例とコントロールのリンパ球から DNA を抽出し、タイリングアレイで

ある CGH(Comparative Genomic Hybridization)アレイを用いて micro deletion/ duplication の有無や、genome の組み換え異常などについて検討した。

C. 研究結果

GeneChip®アレイにおいては、少数であるがいくつかの遺伝子においてコントロールに比較し検討したいずれの症例においても mRNA の発現が変化しているのがみられた。しかし Puratrophin は 5' UTR の C→T の mutation を heterozygous に有する症例においても、homozygous に有する症例においても有意な変化は認めなかった。CGH アレイにおいてはこれまでに規定された領域には Puratrophin も含めて発現の上昇や低下は認めず、micro deletion/duplication は否定的であった。

D. 考察

リンパ球レベルであるが、Puratrophin の 5' UTR の C→T の mutation が heterozygous であること、homozygous であることは mRNA レベルにおいて発現に差がないことが示された。昨年報告したように

我々の検討した家系においては homozygous であっても必ずしも重症であったり、発症が早まるわけではなかった。今回の結果は、臨床型とも合致する結果である。Puratrophin の 5' UTR の異常が本症を引き起こしているというには、分子生物学的メカニズムも含めて今後検討の余地があると考えられた。また微少な変化も含めると複数の症例で同時に mRNA が動いている遺伝子があることが判明した。Real-time PCR などを用いて発現について確認予定である。

また、Ishikawa らの報告した連鎖領域と我々の同定した、1.25Mb の領域はオーバーラップしておらず、我々の同定した領域に疾病に強く co-segregate した領域もある。他施設の連鎖解析データと比較すると非常に短い領域で組みかえが起こっていることに理論上なるが、今後マッピングアレイなども用いた連鎖領域の再解析も検討している。またエクソンアレイなどを用いた解析により本症の原因についての検討を深めたい。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

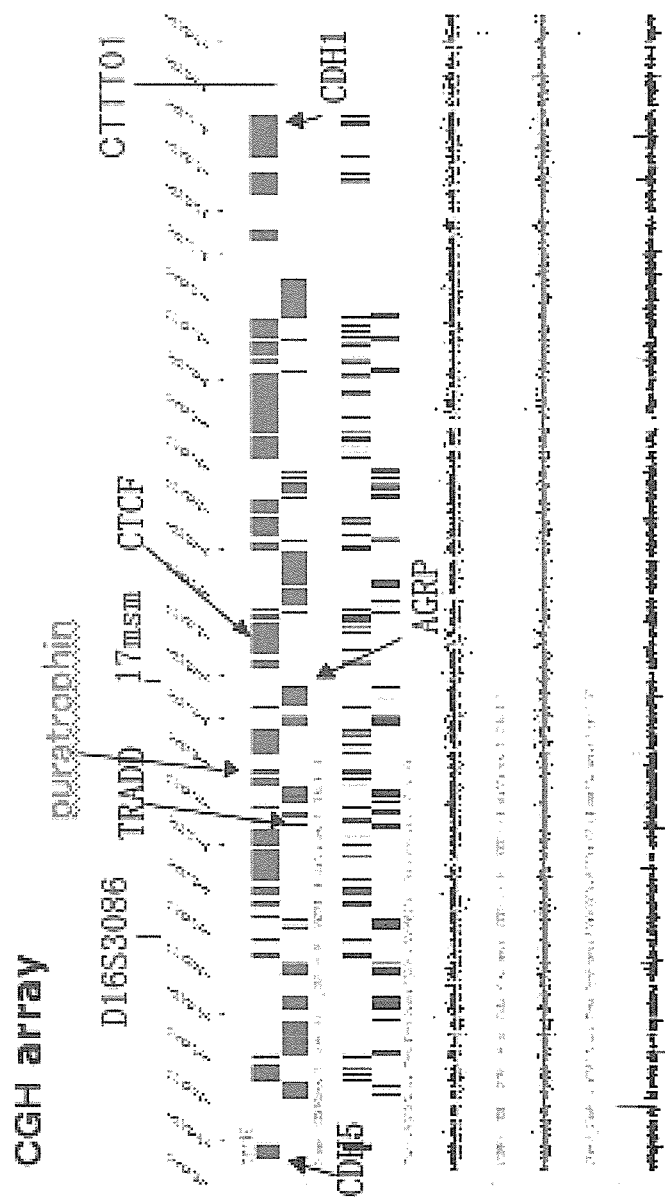
なし

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

分担研究者 高嶋 博 (鹿児島大学医学総合研究科 神経内科・老年病学)
共同研究者 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

南九州地域に多発する脊髄小脳変性症の遺伝的原因を明らかにすること。Puratrophin遺伝子を含め、開心領域に遺伝子コピー数の変化があるか？

Puratrophin遺伝子だけでなく、本疾患の原因領域の広い範囲でCGHアレイという新しい方法で検討しましたが、明らかな異常は認めませんでした。少なくとも遺伝子の欠失や重複は本疾患の原因として考えにくいという結果でした。



【今後の方針】
今回これまでにない方法で本疾患の原因について検討しました。CGHアレイだけでなく、発現アレイという方法で幾つかの遺伝子に変化を認めました。現在real-timePCR法という方法で詳細を検討中です。原因遺伝子については様々な可能性考え同定を進めていく予定です。

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

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)

所属 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

研究要旨

第16番染色体長腕に連鎖する脊髄小脳変性症(16q-ADCA; OMIM # 117210)は、我国の優性遺伝性脊髄小脳変性症ではMachado-Joseph病, SCA6, DRPLA等と並んで頻度が高い疾患と考えられる。我々は2005年に本病型には強い創始者効果があり、日本中の患者が単一ハプロタイプを示していることを見出し、そのゲノム領域内にある *puratrophin-1* 遺伝子での5'非翻訳領域内の1塩基置換(C→T)が、疾患発症と強く関連することを見出した。しかし、その後この1塩基置換を持たない例外症例の報告があり、真の原因遺伝子変異が他にある可能性が示された。今回、多数の患者間で確実に連鎖している領域を確定するため、より多くの家系でハプロタイプの解析を行った。我々の解析の結果からは、16番染色体上の約120万塩基対の範囲が確実に連鎖している範囲であること、また *puratrophin-1* 遺伝子の1塩基置換は我々が検索を行った64家系の全ての患者が持っており、極めて有効なマーカーであることが示された。他の施設からの報告と合わせて考えると、DNAマーカーのGGAA05と *puratrophin-1* 遺伝子変化の間の約90万塩基対の範囲が全ての16q-ADCAの患者で共通する領域であり、この中に原因遺伝子変異が存在する可能性がある。

A. 研究目的

第16番染色体長腕に連鎖する脊髄小脳変性症(16q-ADCA; OMIM # 117210)は、我国の優性遺伝性脊髄小脳変性症で、Machado-Joseph病, SCA6, DRPLA等と並んで頻度が高い疾患と考えられる。臨床的には平均50歳代発症の、純粋小脳失調症を呈することが多い。我々は2005年に本病型には強い創始者効果があり、日本中の患者が単一ハプロタイプを示していることを見出し、そのゲノム領域内にある *puratrophin-1* 遺伝子での5'非翻訳領域内の1塩基置換(C→T)(以下 *puratrophin-1* 遺伝子変化とする)が、疾患発症と強く関連することを見出した(Ishikawa & Toru et al. Am J Hum Genet 77: 280-296, 2005)。その後の検索にてこの遺伝子変化は、日本の広い範囲の多くの家系で見出された(Onodera et al. Neurology 67: 1300-1302, 2006, Ouyang et al. J Neurol Sci 247: 180-186, 2006)。

しかし、Ohataら(Ohata et al. J Hum Genet 51: 461-466, 2006)は、単一の共通ハプロタイプをもつ家系の中で、1塩基置換を持たない発症例を報告した。これは、真の原因遺伝子変異が他の領域にある可能性を示しており、改めて多くの家系のハプロタイプを詳細に調べ、発症者に共通しているゲノム領域の決定を行った。

B. 研究方法

まず、共通するハプロタイプの再解析のために、*puratrophin-1* 遺伝子のC→T置換があった家系64家系を再検討した。

次に、これまで *puratrophin-1* 遺伝子のC→T置換が認められず16q-ADCAと診断できず、また既知の遺伝子変異も認められなかった遺伝子変異未同定の13家系について、*puratrophin-1* 遺伝子変化を有する16q-ADCAでの創始者ハプロタイプが、どの程度存在するかを検索した。

方法は、これまでに連鎖するとしていた領域を広げてD16S3043からD16S512までの22個のDNAマーカーで、遺伝子型はABI3100で電気泳動後フラグメント解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、文部科学省・厚生労働省・経済産業省より平成13年3月に告示されたヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年12月28日全部改訂、平成17年6月29日一部改訂)に則って行っている。また本学の倫理審査委員会の承認を得て行っており、倫理面にも充分配慮している。

C. 研究結果

puratrophin-1 遺伝子変化を有する16q-ADCA家系についてハプロタイプを解析したところ、*puratrophin-1* 遺伝子よりセ

ントロメア側では GATA01, GGAA10 において、共通するハプロタイプとリピート数が1つ異なる家系が複数あり、さらに GGAA05 ではリピート数が大きく異なる家系が複数認められた。またテロメア側では TA001 でリピート数が1つ分異なる1家系があり、17msm においてリピート数が2つ以上大きく異なる家系が複数認められた。これらの家系において認められた、GGAA10 や GATA01, TA001 における1リピートの違いは、染色体組み替えによるものではなく、マイクロサテライト配列の不安定性による可能性も考えられ、大きく遺伝子型が異なっている GGAA05 から 17msm が共通している染色体の領域とするのが妥当と考えられた。

遺伝子変異未同定の 13 家系では、全家系が GGAA05 と GA001 の DNA マーカーにおいて *puratrophin-1* 遺伝子変化を有する 16q-ADCA での遺伝子型と異なっており、創始者ハプロタイプと共通した領域をもつものはなかった。これらの家系の中で、単一家系で 16 番染色体に連鎖することが証明できる家系はなかったため、少なくとも現段階では他のハプロタイプの存在は確認できなかった。

D. 考察

多数の 16q-ADCA の家系のハプロタイプの解析から、全ての患者で 16 番染色体ゲノム上の GGAA05 から 17msm までの約 120 万塩基対が、共通した領域と考えられ、この中に疾患発症の原因となる遺伝子変異が存在することが示唆された。

我々の症例の中に、*puratrophin-1* 遺伝子変化を持たない 16q-ADCA の家系は見つけられなかったが、Ohata らにより報告された *puratrophin-1* 遺伝子変化を有さない患者のハプロタイプは、*puratrophin-1* 遺伝子変化より D16S503 までのセントロメア側で、他の患者と同一であった。このため、*puratrophin-1* 遺伝子変化よりセントロメア側に真の変異が存在する可能性が考えられる。これらの結果を合わせて考えると、*puratrophin-1* 遺伝子からセントロメア側で、かつ GGAA05 よりテロメア側の約 90 万塩基対の染色体領域の中に、疾患発症の原因となる遺伝子変異が存在することになる。

E. 結論

今回の結果で、まず *puratrophin-1* 遺伝子変化は 16q-ADCA の患者のほとんどが有しているものであり、極めて有効なマーカーであることは変わらないことが判明した。しかし、真の変異が他にある可能性が

あり、候補領域の遺伝子変異探索をくまなく行う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohata T, Yoshida K, Sakai H, Hamanoue H, Mizuguchi T, Shimizu Y, Okano T, Takada F, Ishikawa K, Mizusawa H, Yoshiura K, Fukushima Y, Ikeda S, Matsumoto N. A 16C>T substitution in the 5'UTR of the *puratrophin-1* gene is prevalent in autosomal dominant cerebellar ataxia in Nagano. *J Hum Genet* 51:461-466, 2006

2) Ouyang Y, Sakoe K, Shimazaki H, Namekawa M, Ogawa T, Ando Y, Kawakami T, Kaneko J, Hasegawa Y, Yoshizawa K, Amino T, Ishikawa K, Mizusawa H, Nakano I, Takiyama Y. 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia: a clinical and genetic study. *J Neurol Sci* 247:180-186, 2006

2. 学会発表

1) 石川欽也, 融衆太, 網野猛志, 常深泰司, 水澤英洋 第 16 番染色体連鎖型優性遺伝性失調症の臨床病理像と関連遺伝子同定 第 47 回日本神経学会総会 東京, 2006 年 5 月 11 日から 13 日

2) 網野猛志, 常深泰司, 融衆太, 石川欽也, 戸田達史, 水澤英洋 16 番染色体長腕連鎖型優性遺伝性脊髄小脳変性症ハプロタイプの検討 第 47 回日本神経学会総会 東京, 2006 年 5 月 11 日~13 日

3) 常深泰司, 石川欽也, 水澤英洋 脊髄小脳失調症 6 型におけるプルキンエ細胞特異的スプライス異常の検索 第 47 回日本神経学会総会 東京, 2006 年 5 月 11 日~13 日

4) 姜喜玲, 石川欽也, 水澤英洋 SCA1 の新しい遺伝子診断法の開発 第 47 回日本神経学会総会 東京, 2006 年 5 月 11 日~13 日

5) 石黒太郎, 石川欽也, 網野猛志, 坂本昌己, 藤ヶ崎浩人, 水澤英洋 SCA6 における細胞質内凝集体形成について 第 47 回日本神経学会総会 東京, 2006 年 5 月 11 日~13 日

6) Ishikawa K, Amino T, Toru S, Tsunemi T, Ishiguro T, Mizusawa H. Autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is a common subtype among spinocerebellar ataxias in Japan. The 58th Annual Meeting, the American Academy of Neurology, San Diego, 2006.4.1~8

7) Tsunemi T, Ishikawa K, Mizusawa H. Cell-specific alternative splicing in spinocerebellar ataxia type 6. The 58th Annual Meeting, the American Academy of

Neurology, San Diego, 2006.4.1~8

8) Ishikawa K, Amino T, Sato N, Ishiguro T, Tsunemi T, Toru S, Mizusawa H. Clinical and genetic correlations in subjects with puratrophin-1 (-16C>T) genetic change. The American Society of Human Genetics, 56th Annual Meeting, New Orleans, 2006.10.9~13

9) Tsunemi T, Ishikawa K, Jun H, Mizusawa H. Analysis of gene dosage of alpha-synuclein gene in multisystem atrophy. The American Society of Human Genetics, 56th Annual Meeting, New Orleans, 2006.10.9~13

10) Ishiguro T, Ishikawa K, Amino T, Tsunemi T, Mizusawa H. Cytoplasmic aggregates and proteolytic cleavage of the alpha1A calcium channel in Spinocerebellar

ataxia type 6. The American Society of Human Genetics, 56th Annual Meeting, New Orleans, 2006.10.9~13

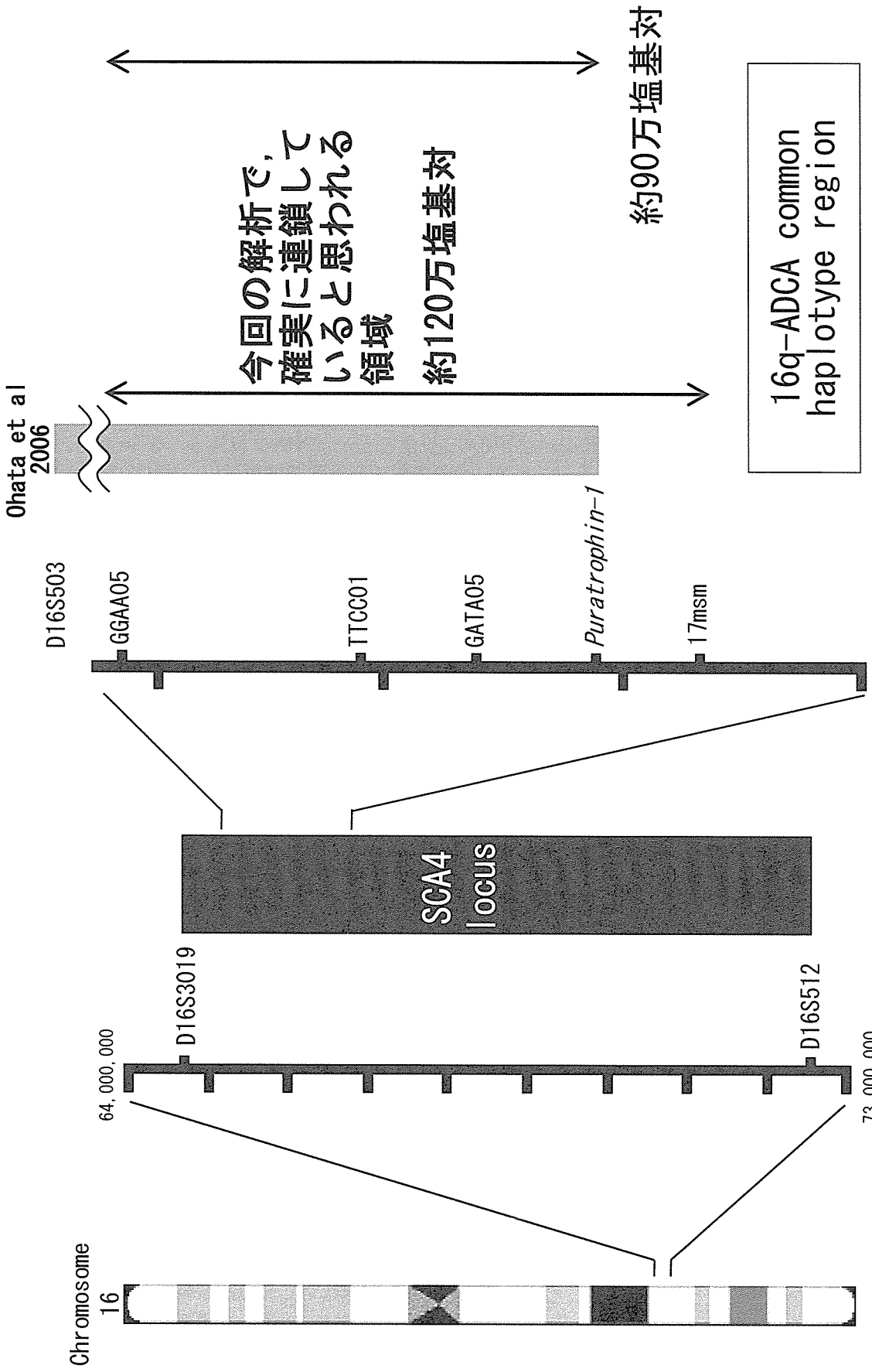
11) Amino T, Sato N, Ishiguro T, Tsunemi T, Toru S, Toda T, Mizusawa H, Ishikawa K. Haplotype analysis in patients with chromosome 16q22.1-linked autosomal dominant cerebellar ataxia. The American Society of Human Genetics, 56th Annual Meeting, New Orleans, 2006.10.9~13

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

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

分担研究者 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 水澤 英洋



16q-ADCAはSCA4と同じ領域に原因遺伝子変異の存在が示唆されており、その範囲は約90〜120万塩基対の区間に狭められた。

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

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

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

研究要旨

優性遺伝性非翻訳領域リピート病である脊髄小脳変性症 10 型 (SCA10)の病態メカニズムを検証した。その遺伝子変異である ATTCT expansion は AUUCU を含む pre-mRNA に転写されることから、筋強直性ジストロフィー類似の AUUCU gain-of-function が、その本態である可能性が高い。さらに、SCA10 expansion 全長を増幅できる long PCR 法の開発は、遺伝子診断においてサザン法にとって替わり得るだけでなく、そのインスタビリティーやリピート内構造の解析に威力を発揮すると思われる。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症 10 型 (SCA10) の原因遺伝子変異は *ATXN10* 遺伝子イントロン 9 の ATTCT 5 塩基リピートの不安定異常伸長である。優性遺伝性非翻訳リピート病は SCA10 を含め、幾つかあるが、研究の進展が著しいポリグルタミン病と異なり、その病態は良く分かっていない。本研究では、ATTCT expansion が、どのような機序で SCA10 を発症させるのか、更にその不安定性メカニズムについて解析する。

B. 研究方法

- ① SCA10 と *ATXN10* との関係調べるために、*Sca10* ノックアウトマウスを作製した。8 か月齢のマウスを用いて、RotaRod テスト・神経組織学的解析を施行した。
- ② ATTCT expansion の周辺遺伝子発現への影響を、複数の SCA10 細胞を用いて real-time RT-PCR で調べた。
- ③ 複数の SCA10 細胞を用いて、*ATXN10* 転写産物を定量し(ノーザンブロット法)、更に異常スプライシングを検討した(RT-PCR)。
- ④ AUUCU 核内凝集物の有無を検討するため、SCA10 リンパ芽用いて用いた FISH を施行した。
- ⑤ 不安定性メカニズム解明のため SCA10 expansion 全長を増幅できる long-PCR 法開発

を試みた。

(倫理面への配慮) 本研究はヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守し、文書による同意が行なわれている。動物実験は米国で施行され、米国 NIH の基準を守り動物が受ける苦痛を最小限に止めた。

C. 研究結果

- ① *Sca10*-null mice は胎生致死であった。*Sca10*-null heterozygous は viable であり、SCA10 の病態を考える上で、*ATXN10* のハプロ不全の関与を検証する良いモデルと考えられた。生後 18 か月まで観察したが、WT と比べ肉眼所見のみならず、異常行動などを認めなかった。8 か月齢での RotaRod テスト、神経組織所見は WT と比べて差がなかった。つまり、SCA10 の病態を考える上で、*ATXN10* 遺伝子ハプロ不全を支持する結果を得なかった。
- ② ATTCT repeat の 200kb centromeric に *fibulin1*(*FBLN1*) が、286kb telomeric に peroxisome proliferative activated receptor α (*PPARA*) が存在する。SCA10 リンパ芽球、fibroblast、myoblast、somatic cell hybrid lines を用いて、対照コントロールと比較したが、両者共に、一貫した増減を認めなかった。
- ③ ATTCT expansion 下流域に intronic SNP (C/G 66bp upstream of exon 11)を heterozygous に

持つ SCA10 患者由来のリンパ芽球を用いて、RT-PCR を施行したが、この SNP は保たれていた。さらに、SCA10 リンパ芽球 fibroblast、myoblast、somatic cell hybrid lines を用いて、*ATXN10* 転写産物を定量したが、対照と比べ差はなかった。*ATXN10* の異常スプライシング転写産物も認められなかった。これらの事実から、SCA10-disease allele では、転写が ATTCT expansion を超えて進行している事、ATTCT expansion が *ATXN10* の RNA プロセシングに影響を与えていないことが明らかになった。

- ④ (AGAAT)₁₀ プローブを用いて、AUUCU 核内凝集物を認めた。
- ⑤ リピート数が~4500 に及ぶ SCA10 expansion 全長を増幅できる long PCR 法を開発した。

D. 考察

SCA10 の病態において、*ATXN10* や周辺遺伝子の loss-of-function mechanism の寄与は否定的と思われた。ATTCT expansion は AUUCU を含む pre-mRNA に転写されることから、筋強直性ジストロフィー類似の AUUCU gain-of-function 説を考えるのが、妥当のように思われる。SCA10 expansion 全長を増幅できる long PCR 法の開発は、遺伝子診断においてサザン法にとって替わり得るだけでなく、そのインスタビリティーやリピート内構造の解析に威力を発揮すると思われる。

E. 結論

1. SCA10 の病態メカニズムは RNA gain-of-function であろう。
2. SCA10 expansion 全長を増幅できる long PCR 法を開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsuura T, Fang P, Pearson CE, Jayakar P, Ashizawa T, Roa BB, Nelson DL. Interruptions in the expanded ATTCT repeat of spinocerebellar ataxia type 10. Repeat purity as a disease modifier? Am J Hum Genet 2006; 78:125-129.

2) Wakamiya M, Matsuura T, Liu Y, Shuster GC, Gao R, Xu W, Sarkar P, Lin X, Ashizawa T. The role

of ataxin 10 in spinocerebellar ataxia type 10 pathogenesis. Neurology 2006; 67: 607-613.

3) Alonso I, Jardim LB, Artigalas O, Saraiva-Pereira ML, Matsuura T, Ashizawa T, Sequeiros J, Silveira I. Reduced penetrance of intermediate size alleles in spinocerebellar ataxia type 10. Neurology 2006; 66: 1602-1604.

2. 学会発表

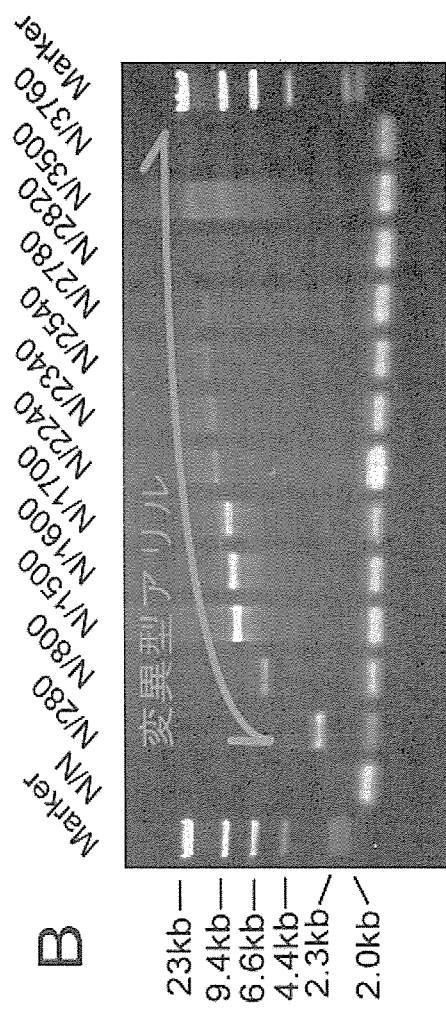
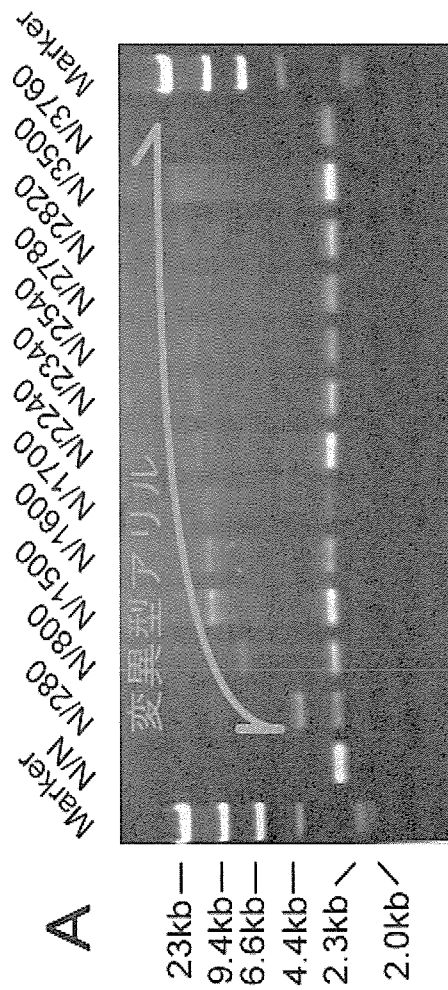
松浦 徹、大野 欽司、David L.Nelson. SCA10 ATTCT 異常伸長の interruption は disease-modifier か? 第 47 回日本神経学会総会 5 月 2006 東京

Kurosaki T, Matsuura T, Ohno K, Ueda S. Comparative analysis of the SCA10 ATTCT pentanucleotide repeat indicates the repeat sequence originates from retrotransposons. American Society of Human Genetics, 56th Annual Meeting, 10 月 2006 New Orleans, USA

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Long-range PCR法によるSCA10遺伝子診断



SCA10変異をサザン法に替わりPCRで検出することが可能になった

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)蛋白の生化学的解析

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

研究要旨

ポリグルタミン病では RNA 干渉による治療法が検討され、ポリグルタミン病の原因遺伝子産物である蛋白の構造や機能の解析は重要である。ポリグルタミン病である歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)は遺伝性の脊髄小脳変性症で、原因遺伝子産物である DRPLA 蛋白(atrophin-1)の存在は明らかになったが蛋白に関する詳細は解析されていない。本研究では、ヒト cDNA ライブラリーから DRPLA 遺伝子をクローニングし、*E. coli*で発現させたリコンビナント DRPLA 蛋白の解析を行った。リコンビナント DRPLA 蛋白は一定の切断を受け、電気泳動パターンはヒト脳に存在する DRPLA 蛋白に類似した。今後、蛋白切断の詳細な機序を検討し、伸長ポリグルタミンの影響を検討する。

A. 研究目的

ポリグルタミン病では、神経細胞に起こる核内封入体の発見と、伸長ポリグルタミンと核内転写因子の結合による転写障害の解明により、現在 RNA 干渉法による原因遺伝子の発現調節による治療法が検討されている。ポリグルタミン病の1つで、遺伝性脊髄小脳変性症である歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)においても同様の治療アプローチが考えられるが、DRPLA 遺伝子産物である DRPLA 蛋白(atrophin-1)の性質と機能については解っていない。RNA 干渉による治療法を確立する上でも、発現調節を受ける蛋白の解析は欠かせない。

DRPLA 蛋白は1995年、矢澤らにより同定された蛋白で DRPLA 遺伝子が翻訳され、ヒト中枢神経等に広く分布する蛋白である。DRPLA 蛋白は伸長するポリグルタミンを有するが、特異な電気泳動移動度を示すことや神経細胞内の分布に関して不明な点が多い。さらに、DRPLA 蛋白の構造や生理機能は解明されていない。本研究では、DRPLA 蛋白の構造を明らかにするために、*E. coli*で発現したリコンビナント DRPLA 蛋白に関するプロセッシングを検討した。

B. 研究方法

ヒト cDNA ライブラリーから DRPLA (atrophin-1)遺伝子のクローニングを行い、CAG リピート数 15 の正常 DRPLA 遺伝子を得た。得られた DRPLA 遺伝子を利用して、*E. coli*を用いた発現系の構築を行った。DRPLA 遺伝子には 5' 側に His-tag と T7-tag, 3' 側に Strep-tagII の 3 種のタグ配列を接続させ、リコンビナント DRPLA 蛋白はタグ融合蛋白として産出される。さらに、ポリグルタミンおよび CAG リピートの影響を検討するため、それぞれを欠失させた変異体(DR-Q0, DR-Q4)と、CAG リピートを伸長させた変異体(DR-Q54)の作出を行った。

C. 研究結果

ベクターと宿主菌を検討した結果、DRPLA 遺伝子を発現する最適な組み合わせが明らかになり、DRPLA 遺伝子の発現系を構築した。ポリグルタミン鎖および CAG リピートの影響を検討するため、それぞれを欠失させた変異体と CAG リピートを伸長させた変異体の作出を行った。本研究で構築した *E. coli*での発現系で産出された DRPLA 蛋白は、イムノブロット解析により正常体のパターンと正常体と変異体との関係が、ヒト脳組織における DRPLA 蛋白のパターンと類似していた。さらに、DRPLA の