

200731014A

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 19 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20(2008)年3月

目次

I. 総括研究報告書

運動失調症に関する調査研究	主任研究者 西澤正豊	1
---------------	------------	---

II. 分担研究報告

1. ALD の分子病態解析		11
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)	
2. DNA マイクロアレイを用いた副腎白質ジストロフィーの原因及び関連遺伝子解析		14
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)	
研究協力者	松川 敬志(東京大学医学部附属病院), 高橋 祐二・後藤 順(東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科)、鈴木 康之(岐阜大学医学部医学教育研究センター)、下澤 伸行(岐阜大学生命科学総合実験センターゲノム研究分野)、高野 弘基・西澤 正豊(新潟大学脳研究所神経内科分野)、小野寺 理(新潟大学脳研究所脳疾患リソース解析分野)	
3. 小児大脳型副腎白質ジストロフィーの視覚性事象関連電位 P1 成分の検討 : 極早期発症診断における有用性		16
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)	
研究協力者	稲垣真澄、古島わかな、軍司敦子、井上祐紀(国立精神・神経センター 精神保健研究所 知的障害部)、山崎広子(国立精神・神経センター 国府台病院眼科)	
4. 副腎白質ジストロフィー (ALD) における造血幹細胞移植に関する研究		19
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)	
5. 国内の副腎白質ジストロフィー症に対する造血細胞移植成績		24
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 (東海大学医学部 基盤診療学系 再生医療科学)	
6. 小児大脳型副腎白質ジストロフィーの両親のメンタルヘルス		27
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) 倉坪和泉 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)	
7. 人工声帯を用いた上気道モデルの作製 —実験的声帯外転麻痺に対する NPPV の効果—		30
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、神田武政、林 秀明(東京都立神経病院 脳神経内科) 高西淳夫、福井孝太郎(早稲田大学理工学術院)	

8.	多系統萎縮症における尿路感染症発症の自然史と導尿を伴う治療介入の効果	33
	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、内山 智之、山本 達也、榊原 隆次、桑原 聡	
9.	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	36
	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 (鳥取大学脳神経内科)、足立 芳樹 (国立病院機構松江病院神経内科)	
10.	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 3 報~	39
	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) 北翔大学健康プランニング学科	
11.	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	42
	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)	
12.	パソコンソフトを用いた運動失調症状の定量的評価	45
	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、鈴木ゆめ、児矢野 繁、西山毅彦、馬場泰尚、釘本千春、岸田日帯、木村活生、黒川隆史、岩橋幸子、関口健志、東山雄一、山本良央 (同医学部神経内科)	
13.	ガバペンチンが運動失調に有効であったと思われる、てんかんを合併する脊髄小脳変性症の 1 例: 臨床試験へ向けての戦略	48
	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)	
14.	多系統萎縮症の認知機能障害と脳機能画像	53
	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 川合圭成、末永正機、伊藤瑞規、千田譲、加賀友継、熱田直樹、渡邊宏久、祖父江元 (名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科)	
	加藤克彦、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)	
15.	日本語版 Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) の信頼性に関する検討	56
	分担研究者 佐々木秀直 (北海道大学医学研究科神経内科学分野)	
	共同研究者 佐藤和則 1)、相馬広幸 1)、矢部一郎 1)、安井建一 2)、中島健二 2)、伊藤瑞規 3)、祖父江 元 3)、下畑享良 4)、小野寺 理 4)、西澤正豊 4)	
	所 属 1) 北海道大学医学研究科神経内科学分野 2) 鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設脳神経内科部門 3) 名古屋大学医学研究科神経内科学分野 4) 新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野	

16. 小脳失調症に対する短期集中リハビリテーションの効果に関する無作為比較研究…………… 59
- 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)
- 祖父江元 (名古屋大学神経内科)
- 研究協力者 服部憲明、矢倉一、畠中めぐみ、田中尚 (森之宮病院神経リハ研)
- 伊藤瑞規 (名古屋大学神経内科)
17. MSA 疾患感受性候補遺伝子の関連解析…………… 62
- 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 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)
18. 多系統萎縮症の全ゲノム関連解析…………… 65
- 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
- 研究協力者 中原 康雄、百瀬 義雄、福田 陽子、高橋 祐二、後藤 順 (東京大学大学院医
学系研究科脳神経医学専攻神経内科) 西田 奈央、徳永 勝士 (東京大学大学院
医学系研究科人類遺伝学)
19. 多系統萎縮症の姉弟例：臨床病理学的検討…………… 68
- 分担研究者 山田 光則 (新潟大学脳研究所病理学分野)
- 研究協力者 豊島 靖子 (新潟大学脳研究所病理学分野) 成瀬 聡、藤田 信也 (長岡赤十字病
院 神経内科) 江村 巖 (長岡赤十字病院 病理部) 高橋 均 (新潟大学脳研究所
病理学分野)
20. 脊髄小脳失調症 15 型 Spinocerebellar Ataxia Type 15 (SCA15) の原因遺伝子の同定…………… 71
- 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 志賀篤, 原賢寿, 野崎洋明 (新潟大学大学院医歯学総合研究科 神経内科学分野)
- 石黒英明 (秋田赤十字病院神経内科), 栗崎博司, 四茂野はるみ (東京病院神経内
科) 高橋祐二, 三井純, 後藤順, 辻省次 (東京大学大学院医学系研究科 神経内
科学分野), 池内健, 小野寺理 (新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター)
21. 脊髄小脳失調症 16 型の病因遺伝子同定に関する研究…………… 74
- 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学
- 研究協力者 河野祐治¹⁾, 岩城明子²⁾, 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⁾, 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学
- 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

22. 南九州地方の脊髄小脳変性症の臨床的遺伝学的研究	77
-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
研究協力者	平野隆城, 大窪隆一, 岡本裕嗣, 荒田 仁, 有里敬代, 池田賢一, 東 桂子, 中村友紀, 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)
23. 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(16q-ADCA)の臨床的/分子遺伝学検討	80
分担研究者	吉田邦広 ¹ 信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科 准教授
研究協力者	堺 温哉 ² 、大畑尚子 ² 、松本直通 ² 、清水雄策 ³ 、中村勝哉 ¹ 、森田 洋 ¹ 、池田修一 ¹ (² 横浜市立大学大学院環境分子医科学、 ³ 伊那中央病院神経内科)
24. 第16番染色体長腕連鎖型優性遺伝性小脳失調症(16q22.1-linked ADCA)の原因遺伝子の探索	83
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)
25. ベルギーARSACS2家系における新規遺伝子変異の同定	88
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, 本多純子, 欧陽 疑, 中野今治 (自治医科大学内科学講座神経内科学部門) K. Segers, N. Janin (Department of Human Genetics, Hôpital du Sart Tilman, Liege) J. Breckpot, K. Devriendt (Centre of Human Genetics, University Hospita
26. DNA マイクロアレイを用いた遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子の網羅的解析システムの構築	91
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)
研究協力者	石浦 浩之、高橋 祐二、後藤 順 (東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科) JASPAC
27. 多系統萎縮症の病態解明と治療に向けた基礎的研究	93
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	中山 貴美子 国立長寿医療センター 研究資源有効利用室
28. ATXN1 遺伝子におけるCAGリピートの分子進化	96
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講座)
研究協力者	黒崎 辰昭, 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講座) 植田 信太郎(東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)
29. DRPLA タンパク移行経路解析	99
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
研究協力者	出岡 顕、伊達 英俊、後藤 順 (東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科)

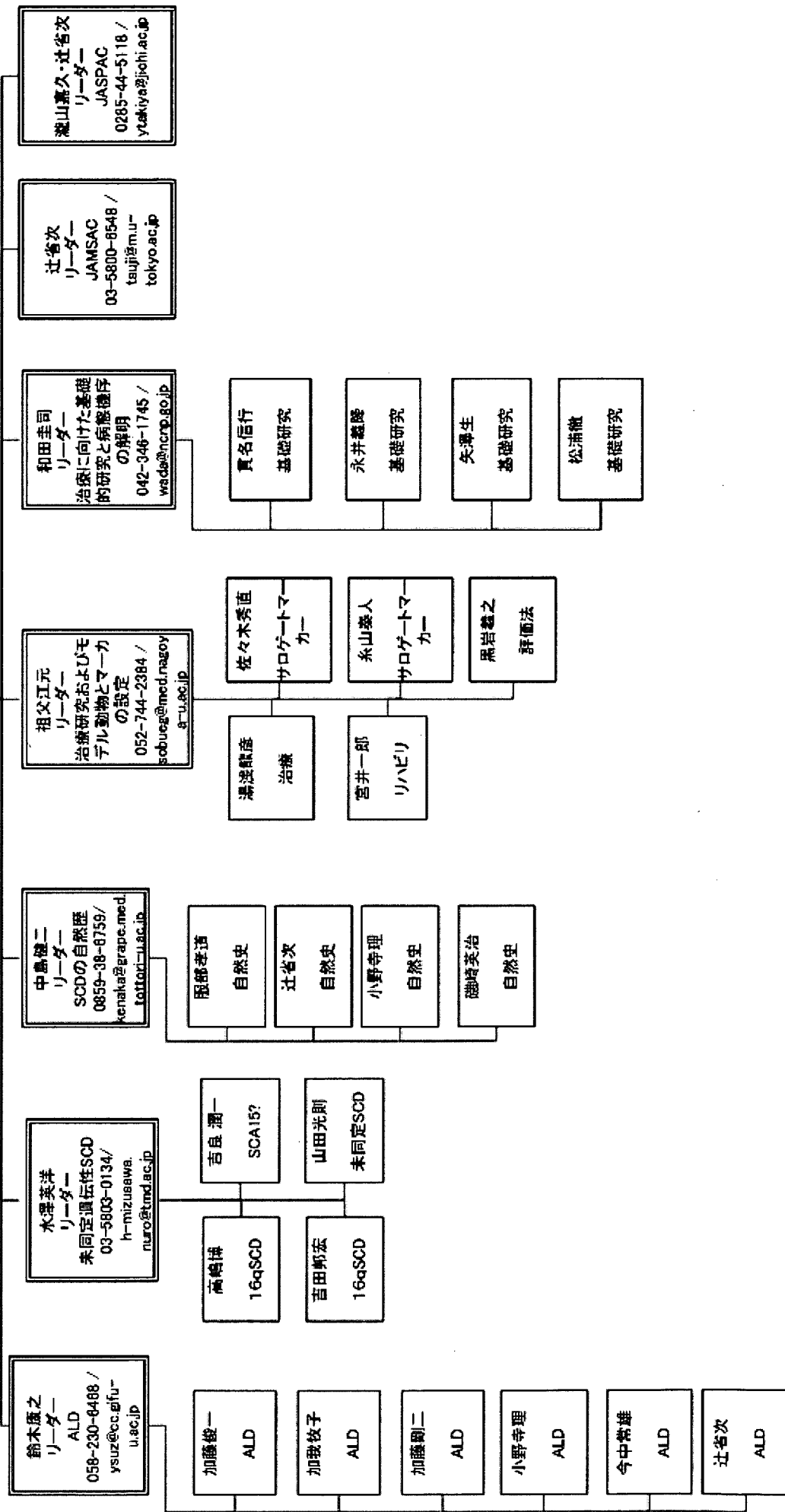
30. 増大ポリグルタミン鎖によるオリゴマーの細胞障害性の解析…………… 101
- 分担研究者 小野寺理（新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター）
- 研究協力者 菊地信矢、堅田慎一（新潟大学脳研究所神経内科学分野）、高橋俊昭（新潟大学医学部生体情報学講座）西澤正豊（新潟大学脳研究所神経内科学分野）
31. ポリグルタミン蛋白質の毒性構造体の捕捉－露出 β シート仮説の提唱－…………… 104
- 分担研究者 永井 義隆（大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学）
- 研究協力者 乾 隆（大阪府立大学大学院環境生命科学研究科蛋白質科学）
- ポピエル 明子、藤掛 伸宏（大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学）
- 後藤 祐児（大阪大学蛋白質研究所蛋白質構造形成）、内木 宏延（福井大学医学部分子病理学）、戸田 達史（大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝学）
32. 分子シャペロン誘導薬の細胞保護作用に関する検討…………… 107
- 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、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）
33. Amiloride derivative によるポリグルタミン病モデルマウスの治療とその作用機序…………… 110
- 分担研究者 貫名 信行
 （独立行政法人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 Hon-kit Wong, 黒沢大, Peter O. Bauer, 鷲頭知花, 町田陽子, 戸崎麻子
 （独立行政法人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）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成19年度 運動失調班 組織図

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

名前
プロジェクト名
連絡先
上段: FAX
下段: e-mail



I 総括研究報告

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)

【研究目的】

本研究班は、臨床的に運動失調症を共通の主症状とする脊髄小脳変性症 SCD、多系統萎縮症 MSA、家族性痙性対麻痺 FSP、副腎白質ジストロフィーALD、およびペルオキシソーム病を対象として、これらの病態を解明し、解明された病態に基づいてその進行を阻止することによる治療法を確立し、これらの神経難病を克服することを目的としている。

運動失調症の分野でも、神経細胞内における異常蛋白質の蓄積機序など、分子病態に関する基礎的研究が著しく進歩し、運動失調症の病態の進行阻止を目的とする治療法の有効性を培養細胞系や動物モデルで検証出来るようになってきている。このため、この分野で残された最大の課題はこれらの治療法の臨床への応用である。本研究班は、全国レベルで運動失調症を対象とした臨床治療研究を行うことが出来る体制を構築するとともに、十年を超える臨床経過の変化を先取りできる有効な代理バイオマーカーを選定し、適切なエンドポイントを設定することにより、SCDのような難治性神経変性疾患の進行抑制を目的とする治験の方法論を確立することも併せて目標とした。新たな方法論が確立できれば、その応用範囲は広く、極めて有意義であると考えられる。

患者数が全国で併せて2万人を超える難治性、進行性の運動失調症を克服することは、厚生行政上の重要課題と位置付けられる。これら神経難病の分子病態が解明され、病態の進行阻止に基づく新たな治療法が開発できれば、未だ有効な治療法がない患者にとって大きな福音となるばかりでなく、介護負担の軽減などを通じて、広く国民の保健医療福祉の向上に貢献することが期待されるからである。

【研究方法】

本研究班は、全ての班員が有機的に連携して共同研究を行うことにより、運動失調症を克服するという目標を達成するために、各リーダーの下に以下の研究プロジェクトチームを構築し、班員はいずれかのプロジェクトに所属して研究を推進する体制を採用した。

1) 臨床調査個人票等に基づく SCD、MSA の自然歴研究

現行の臨床調査個人票は、SCD の自然歴を前向きに研究するためのデータベースとして設計されており、世界的にも貴重なリソースとなり得る。SCD の臨床治験に際して、個人票を用いて臨床経過を的確に把握できるか否か、その問題点を検証するとともに、次の機会に必要な改訂点を検討する。

一方、わが国における遺伝性 SCD では最も頻度が高い Machado-Joseph 病 MJD と脊髄小脳失調症 6 型 SCA6 については、臨床治験の実施に向けた高精度の臨床情報データベースを構築するため、新たに調査票を作成し、症例登録を開始する。

2) 病態の進行抑制治療に関する臨床研究および基礎研究

SCD の分子病態に関する基礎研究として、ポリグルタミン蛋白モノマーが重合して生じる蛋白オリゴマーの細胞障害性について詳細な検討を行う。また熱ショック蛋白の発現誘導やオートファジー系の制御により、細胞変性の抑制が可能か否かについて、モデル細胞系を用いて基礎的検討を行う。

臨床試験の実施に向けて、全国レベルで多施設共同研究チームを組織し、SCD、MSA を対象とした治験に適したプロトコルのデザイン、エンドポイントの設定、適切な代理バイオマーカーの設定等について検討する。特に、進行度の指標となり得る新たなバイオマーカーの開発に重点を置き、MRI による拡散テンソル解析、筋の MR スペクトロスコピー、指鼻試験軌跡のコンピューター解析などの評価指標の有用性について検討する。

さらに平成 18 年度からは運動失調症の新たな評価スケールとして提唱された Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) について、ICARS に替わる臨床指標として利用するために、本研究班として和訳を統一し、validation を行う。

運動失調症に対するリハビリテーションの有効性について、運動機能の回復に寄与する課題指向型練習の繰り返しが、運動学習の中核である小脳が変性する SCD においても use-dependent plasticity を促進するかを検証することを目的に、平成 18 年度から世界で初めての無作為臨床研究を計画し、平成 19 年度から短期介入試験を実施する。

3) 大規模ゲノム解析による遺伝子未同定 SCD の病態解明

(1) MSA 研究

Japan MSA Research Consortium (JAMSAC) は、大規模ゲノム関連解析による MSA の疾患感受性遺伝子同定と、家族性 MSA の連鎖解析による MSA の原因遺伝子同定を目標として平成 16 年度に構築された全国共同研究組織であり、平成 17 年度から症例登録を開始し、ゲノム情報の収集と解析を行ってきた。本研究班も引き続き JAMSAC をサポートし、症例登録を推進する。

(2) FSP 研究

FSP に関しては、わが国で初めての全国実態調査とゲノム解析をリンクさせたプロジェクト研究を行うことを目的として、Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC) を JAMSAC に習って本研究班内に組織し、自治医科大学倫理委員会の承認を得て、平成 18 年度にはわが国初の全国的なアンケート調査を実施し、症例の登録とゲノム情報の収集を開始した。平成 19 年度も症例登録を継続するとともに、ゲノム情報の収集と解析を続ける。

(3) 遺伝子未同定 SCD の原因遺伝子同定

puratrophin 遺伝子の 5' 非翻訳領域に 1 塩基変異が同定された第 16 染色体に連鎖する優性遺伝性純粋小脳型失調症 (16q-ADCA) については、わが国の優性遺伝性 SCD では 4 番目の頻度であり、特に長野県に多発することが明らかになった。さらに、同一家系内にこの変異を持たない発症者が複数同定されたことから、真の責任変異を同定して、分子病態の解明を目指す。

同じく優性遺伝性で純粋小脳型を示す SCA15、および九州で報告された SCA16 につい

て、原因遺伝子の同定を目指す。

4) ALD の臨床研究とペルオキシソーム病の病態解明

小児大脳型 ALD における造血幹細胞移植治療 HSCT の有効性が明らかになっているので、引き続き ALD の早期治療に向けて、早期診断と HSCT が速やかに施行できる診療体制の整備、およびより生着率の高い HSCT の方法論について検討する。

他のペルオキシソーム病についても、診断・予後追跡システムの構築を計画する。

(倫理面への配慮)

臨床調査個人票を用いた解析、およびゲノム解析は、本人の同意を得た場合に限り、情報を匿名化して行う。臨床研究は十分なインフォームド・コンセントに基づき、倫理面には常に最大限配慮しつつ、3省合同の倫理指針に従い、各施設の倫理委員会の許可の下に遂行する。

【研究結果及び考察】

1) 臨床調査個人票等に基づく SCD の自然歴研究

現行の臨床調査個人票は、小脳性運動失調症状の評価スケールとして国際的に広く用いられてきた ICARS を基に、わが国で実施される臨床治験においても評価スケールとして用いることを前提として、年度を超えた連結調査にも対応できるように設計されたものである。しかしながら、実際の運用面では入力率が非常に低い自治体があり、また評価者によるばらつきが非常に大きいことが判明したため、現行の個人票をそのまま治験において運動失調症の評価スケールとして用いるのは困難と結論した。現行の個人票は、そのまま治験の基礎データとすることは難しいものの、日常生活動作の経時的な変化を総合的に捉えるためには、十分に利用可能と判断された。また次の機会に向けて、こうした点を考慮した個人票の改訂を計画した。

わが国で最も頻度が高い遺伝性 SCD である MJD と SCA6 については、臨床治験の実施に向けた高精度の臨床情報データベースを構築する必要があると判断し、新たに調査票を作成した。鳥取大学倫理委員会の承認を得て平成 19 年度より班員の所属施設を対象として症例の登録を開始した。その結果、現在までに MJD が 22 例、SCA6 が 37 例登録された。今後はより多数例の登録と解析を予定している。

本プロジェクトの今後の課題としては、次項の臨床プロジェクトと合同で、臨床治験を目的とする多施設共同研究体制を構築すること、臨床サブグループの各疾患における症候について比較検討を行うこと、および運動失調症以外の諸症状について評価することが挙げられる。

2) 病態の進行抑制治療に関する臨床研究および基礎研究

(1) 基礎研究

SCD の分子病態に関する基礎研究としては、ポリグルタミン病の病態に関して、ポリグルタミン蛋白モノマーや細胞内凝集体よりも、ポリグルタミン蛋白オリゴマーが細胞にと

ってより有害であることが証明できた。また、RNA 干渉を応用した Huntington 病の治療法を開発し、注目された。さらに、熱ショック蛋白の発現誘導やオートファジー系の制御により、細胞変性の進行を抑制できることも示された。

基礎研究プロジェクトとしては、このような研究に高い評価を受けたが、臨床治験の実施に向けて具体的な治療手段として提案するまでには至らなかった。今後も分子病態を解明し、その進行を阻止することによる進行抑制療法の実現に向けて、研究を継続する必要がある。

(2) 臨床研究

臨床試験の実施に向けて全国レベルで多施設共同研究チームを組織した。SCD、MSA の新たなバイオマーカーとして、MRI 拡散テンソル解析による神経変性の定量的評価、筋肉組織の MR スペクトロスコピー、指鼻試験軌跡のコンピューター解析、血中核酸代謝物などの評価指標の有用性について、経時的な観察を開始した。

バイオマーカーとしては、経過と共に変化し、病態と重症度を反映し、なんらかの治療的介入により値が改善するものが必要である。今後はポリグルタミン病、MSA など、細胞内に凝集体が形成される疾患では、超高磁場 MRI や PET を用いて、細胞内に蓄積する凝集体を直接画像化する方法の実現を目指す必要がある。

運動失調症の新たな評価スケールとして臨床に導入された SARA については、本研究班として和訳と実施方法を統一し、開発者の同意を得てわが国における validation も終了した。その結果、ICARS では平均 13 分を要する評価が SARA では 4 分で簡便に終了できた。今後は初心者と熟練者などの評価者間のばらつき、および施設間のばらつきを評価し、調整を図る必要があるが、今後の臨床研究において、小脳性運動失調の評価スケールとして用いることとした。

運動失調症に対するリハビリテーションの効果に関しては、課題指向型練習の繰り返しだが、運動学習の中核である小脳が変性する SCD においても 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か否かを検証し、運動失調症に対するリハビリテーション効果のエビデンスを得ることを目的として、「短期集中リハビリテーションの効果に関する無作為比較研究」を世界で初めて計画した。近畿地区の 16 施設と近畿 SCD 友の会の協力を得て、小脳性運動失調を主徴候とする SCA6、16q-ADCA、CCA の 3 疾患を対象とし、一般的な基本動作、日常生活動作訓練を 1 日 PT 1 時間、OT 1 時間で 4 週間行い、初めの 4 週間のみを RCT として、長期経過を 3 ヶ月観察するというプロトコールを作成した。主要評価項目は SARA、FIM、10m 歩行速度、ケーダンス、転倒回数などとした。名古屋大学倫理委員会より本プロトコールの承認を得、平成 19 年 10 月にキックオフミーティングを行い、同年 12 月 23 日に第 1 例が登録された。最終観察は 2010 年 2 月までを予定しているが、運動失調症に対するリハビリテーション療法の効果に関しては、世界的にエビデンスがないため、結果が大いに注目される場所である。

SCD の治療戦略として、適応外使用に関する通達に基づいて、少数例における効果判定を行うことは現在でも可能であるので、ギャバペンチンの SCA6 に対する効果の検証などを今後予定する。そのためにも、前期第二相としての proof of concept を確立する必要がある。

3) 大規模ゲノム解析による遺伝子未同定 SCD の病態解明

(1) MSA 研究

JAMSAC は、孤発性 MSA の大規模分子遺伝学的研究では国内 15 施設の協力を得て、MSA230 例、対照 294 例について解析を終了した。その結果、疾患感受性遺伝子の候補として、両群間で有意差が認められる塩基置換 SNP を多数同定した。現在これらの SNP に関して関連解析を進めている。またわが国の MSA では MSA-C と MSA-P の比率が 2 対 1 であることが確かめられた。

また multiplex family を基盤とした家族性 MSA の連鎖解析も、ハイスループットな連鎖解析システムを構築しながら進行した。その結果、わが国の MSA では家系内にパーキンソン病が多い傾向が明らかになってきた。しかし、候補遺伝子座を特定するには至らず、解析精度を高めるために、今後更なる症例の蓄積が必要と結論された。

(2) FSP 研究

平成 18 年度に構築された JASPAC は、自治医大倫理委員会の承認を得て平成 18 年度にゲノム情報の収集ともリンクさせた、わが国初となる全国実態調査を実施した。その結果、全国の 204 施設から回答があり、209 家系 321 例の家族例と 370 例の孤発例が確認され、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。遺伝性 FSP に関しては、68% が優性遺伝性であることが判明した。

FSP は現在 34 の遺伝子座が知られ、15 の原因遺伝子が同定されている。そこで東京大学神経内科で、既知の遺伝子における変異を同定できるジーンチップが作成され、稼働を開始した。その結果、優性遺伝性が 25 家系、劣性遺伝性が 2 家系登録され、SPG 4 が 10 例、SPG3A が 4 例同定された。優性遺伝性 SPG の中では、SPG4 が 45% を占めた。孤発性 SPG とされた群においても、その 10% は SPG4 であることが判明した。

今後は、変異を同定してから、その病的意義をどのようにして確かめるかが課題であり、既知の変異でない新たな変異が見出された場合の対応を検討しておく必要がある。また治療法の開発に向けた病態研究も継続する必要がある。

またわが国でも家系が見出されている ARSACS について、表現型と遺伝子変異について解析が進められた。

(3) 遺伝子未同定 SCD の原因遺伝子同定

16q-ADCA の puratrophin 遺伝子変異については、この変異の陽性者と陰性者の混在する家系がさらに見出されたため、真の責任変異が探索された。新たに同定された SNP を利用して、多数例についてのハプロタイプ解析から候補領域を約 900 キロベースの領域に絞り込むとともに、この変異を持たない発症者からリンパ芽球を樹立し、候補領域の塩基配列を直接シーケンスした。しかし、責任変異は未だ同定されていない。班研究としてマーカーの位置決定、ハプロタイプの組み上げ、ゲノム領域のシーケンスなどを共同して行うには至らず、班としての共同研究の限界を感じさせた。

オーストラリアから家系が報告され、優性遺伝性純粋小脳型を示す SCA15 については、inositol triphosphate receptor (ITPR) type 1 遺伝子の欠失変異であることが平成 19 年に初めて

報告され、わが国の1家系でも確認された。オーストラリアの1家系とイギリスの2家系はいずれもITPR1の部分欠失であったが、わが国の1家系は完全欠失であった。さらに、新潟大学ではわが国のもう1家系において、世界で初めてITPR1に点変異を同定した。以上の結果から、SCA15はITPR1の遺伝子変異により生ずる病型であることを明らかにできたと考える。

九州大学から報告されたSCA16も、その後の検索の結果、ITPR1遺伝子の部分欠失が確認され、SCA15と同一疾患であることが判明した。

4) ALDの臨床研究とペルオキシソーム病の病態解明

小児大脳型ALDに対する早期診断を目的とする遺伝子診断システムを構築し、東京大学では病型解析のためのDNAマクロアレイを開発した。

HSCTが速やかに施行できる診療体制を整備し、同時により生着率の高いHSCTの方法論を検討するとともに、HSCTのretrospective studyを継続し、HSCTのprospective studyのためのプロトコルを検討した。

患者家族のQOLと心理について検討し、ハンドブックやパンフレットを作成する啓発活動、親の会と連携した社会活動を行った。

他の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学で構築され、倫理委員会の承認を得て運用を開始した。

【評価：達成度について】

(1) 臨床調査個人票等に基づくSCDの自然歴研究

臨床調査個人票を臨床治療研究における運動失調症の評価スケールとして用いるための課題の検証は終了したので、今後の改訂の際に有効に活用される。またMJDとSCA6については、今後数年間にわたり症例登録と臨床自然歴を把握する研究を継続する体制を整えることができ、目標はほぼ達成されたと考える。

(2) 病態の進行抑制治療に関する臨床研究および基礎研究

SCDの分子病態に関する基礎研究としては、ポリグルタミン蛋白オリゴマーの細胞障害性について国際的に高く評価される新知見を得ることができた。熱ショック蛋白の発現誘導、オートファジー系の制御、RNA干渉等によるSCDの進行抑制治療に関する基礎的検討もほぼ予定通り進行したが、基礎研究の成果を臨床応用するには至らなかった。

臨床試験の実施に向けては、新たな代理バイオマーカーの確立が急務であり、MRIによる拡散テンソル解析などの評価指標の有用性について、経時的な検討を開始した。しかし、これらが真に有効な指標となり得るかは今後の検討課題であり、代理マーカーの設定と神経変性疾患に対する治験の方法論の確立に対する達成度は道半ばである。

運動失調症に対するリハビリテーションの効果に関しては、これまで全くエビデンスがなく、本研究班が開始した短期集中型介入試験によるリハビリテーション効果の検証は、世界的にも初めての試みであり、その結果が大いに注目される。症例登録の開始までは計画通り進行している。

(3) 大規模ゲノム解析による遺伝子未同定 SCD の病態解明

JAMSAC も JASPAC もいずれも全国レベルで症例登録を継続しており、わが国における実態が初めて明らかになりつつある。実態調査とゲノム解析をリンクさせて、数年後には班研究として大きな成果が上がると考えている。これらのプロジェクトは計画通りに進行している。

遺伝子未同定の SCD について、SCA15 の責任変異を同定できたのは大きな成果である。16q-ADCA の原因遺伝子同定も着実に進捗しており、達成度はほぼ予定通りと考えられる。

(4) ALD の臨床研究とペルオキシソーム病の病態解明

ALD の早期診断と HSCT を速やかに施行できる診療体制の整備を進めるとともに、啓蒙普及のためのパンフレットを作成した。患者家族の心理に対するアプローチも開始した。他のペルオキシソーム病を対象とした診断・予後追跡システムも計画通り運用を開始し、全体としてはほぼ予定通りの達成度と考えられる。

(5) 班研究全体としての達成度

本研究班はプロジェクトチーム制を採用したことにより、MJD、SCA6、MSA、FSP などの全国疫学調査や ALD の治療研究が班員相互の緊密な連携により、極めて効率よく実施できたと考える。一方、基礎研究に関しては、班員相互の共同研究に発展するまでには至らなかった。

最終的な目標である運動失調症の進行抑制治療法の開発に向けて、有効な代理バイオマーカーを確定し、慢性に進行する神経変性疾患に対する臨床治験の方法論を確立することは、残念ながらこの3年間では達成できず、今後の課題として残された。しかし、運動失調症に対するリハビリテーションの効果を検証する世界初の臨床研究を開始することができたので、エビデンスを得ることができれば、分子病態に基づく治療法に加えて、運動失調症の進行抑制に有効な方法を確立できると考える。

【研究成果の学術的・国際的・社会的意義について】

本班の研究成果は英文の原著論文として発表し、特にポリグルタミン蛋白オリゴマーの細胞障害性に関する研究は国際的に高い評価を受けた。

SCD や MSA のような慢性進行性神経変性疾患に対する進行抑制治療を確立するには、急性疾患を対象とする治験とは異なるパラダイムを作り上げた上で、治験基準をクリアする必要がある、国際的な検討課題となっている。十年以上に及ぶ臨床経過を先取りする代理バイオマーカーを見出し、治験の方法論を確立しなければ、この課題は解決できない。難治性疾患克服研究事業の対象となる神経変性疾患は依然数多く残されており、この課題が解決できた場合の社会的意義は極めて大きい。

【今後の展望について】

最も重要な課題は、上記の通り SCD、MSA の進行を反映する代理バイオマーカーを確

定し、慢性進行性の神経変性疾患に対する臨床治験の方法論を確立して、最終的な目標である運動失調症の進行抑制治療法を開発することである。この目標に向けて最大限努力することが難治性疾患克服研究事業の目標であり、その成果は社会のニーズに応えることに直結している。困難な研究課題ではあるが、神経変性疾患の中でも球脊髄性筋萎縮症のような成功例も現れてきており、運動失調症に対しても同様の成果を期待できる環境は整ってきている。有用なバイオマーカーの候補としては、今後、伸長ポリグルタミン鎖やリン酸化 α -シヌクレインなどにより細胞内に形成される凝集体を、超高磁場 MRI を用いて直接画像化する研究に取り組む。

一方、進行抑制療法の開発と同時に、運動失調症の進行を抑制するためにリハビリテーションが有効か否かを検証し、有効である場合にはどのような方法論が最も効果的であるかを明らかにすることは、患者さんの期待も大きく、実地臨床でも極めて大きな意義がある。今後もリハビリテーションの有効性に関する検証を続けるとともに、小脳機能を維持する上で最も効果的な方法を確定することを目標に、研究を継続する。次の研究班では、運動失調症に対して、筑波大学の山海教授が開発した装着型ロボットであるロボットスーツ HAL の臨床応用にも取り組む。

【研究内容の効率性について】

班員が各自関連する研究テーマを自由に選ぶ班研究に比べ、プロジェクト研究方式は班員が研究班を組織し、共同して共通する研究課題に取り組むことに対する目的意識を明確にする効果があり、その結果として全国実態調査や共同研究組織への症例の登録を極めて効率よく実施することができたと考える。

【結論】

運動失調症の克服を目的とした研究班を組織し、SCD の臨床調査個人票を用いた自然歴把握、病態進行抑制治療のための基礎研究・代理バイオマーカーの探索・臨床治療研究のための体制構築、大規模遺伝子解析による遺伝子未同定 SCD の責任遺伝子同定、ALD の治療・ペルオキシソーム病の診断体制の確立に関するプロジェクト研究を班員が協力して推進した。

MSA、FSP、MJD、SCA6 に関する全国的な実態調査と遺伝子解析を行う共同研究組織を構築するとともに、ポリグルタミン病の発症におけるオリゴマーの細胞障害性を解明するという成果を挙げた。

適切な代理マーカーを選定して、運動失調症の進行抑制治療を現実のものとするのが残された課題である。

Ⅱ 分担研究報告

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の原因タンパク質 ALDP の生化学的解析はこれまで主に ALD 患者由来皮膚線維芽細胞で行われており、中枢神経系細胞での報告はない。本研究では、ヒトグリア細胞株について siRNA 法を用いて ALDP を特異的にノックダウンしたモデル細胞を作製し、ALDP 機能欠損による代謝異常について検討した。その結果、極長鎖脂肪酸代謝異常とともに、コレステロール代謝にも異常が認められた。一方、植物フラボノイドであるバイカレイン誘導體 (Baicalein 4,5,6-trimethyl ether; BTM) が ALD 患者由来線維芽細胞の極長鎖脂肪酸 β 酸化活性を亢進し、含量を低下させる作用について、その作用機構を検討した。その結果、アシル CoA 合成酵素 (ACSVL1) の発現などを介してペルオキシソームの脂肪酸 β 酸化系を活性化していることが認められた。

A. 研究目的

ALD 患者由来線維芽細胞では、ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ALDP の機能欠損により、ペルオキシソームでの極長鎖脂肪酸の β 酸化活性が減少し、炭素数 26 などの極長鎖脂肪酸の蓄積が認められる。しかしながら、中枢神経系細胞での ALDP 機能欠損による代謝異常の詳細は不明である。本研究では、ヒトグリア細胞株について siRNA 法を用いて ALDP を特異的にノックダウンすることによりモデル細胞を作製し、ALDP 機能欠損による代謝異常を明らかにすることを目的とした。一方、バイカレイン誘導體 (Baicalein 4,5,6-trimethyl ether; BTM) が ALD 患者由来の線維芽細胞の極長鎖脂肪酸 β 酸化活性を亢進し、含量を低下させる作用をもつことをこれまで報告しているが、今回、BTM の作用機構の解析を目的とした。

B. 研究方法

in vitro transcription system で作製した ALD 遺伝子に特異的な shRNA、及び発現ベクター (pSilencer) に組み込んだ shRNA を、ヒトグリア細胞株 U87 に発現させた。極長鎖脂肪酸含量の測定はガスクロマトグラフィーにより行った。リグノセリン酸 (C24:0) の β 酸化活性、及び C24:0 からのヘキサコサン酸 (C26:0) の合成は、 $[1-^{14}\text{C}]$ C24:0 を基質として使用し、その代謝産物の放射活性を測定することにより行った。コレステロールの合成は $[2-^{14}\text{C}]$ 酢酸からのコレステロール画分への取り込みを測定した。U87 のコレステロール含量はコレステロールオキシダーゼを用いた比色定量により測定した。各

elongase mRNA の発現はリアルタイム PCR により定量化した。

(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

ALDP ノックダウン U87 細胞における脂質代謝異常

1) 極長鎖脂肪酸代謝異常

ALDP ノックダウン細胞では、C26:0 含量の増加が認められた。 $[1-^{14}\text{C}]$ C24:0 で細胞を代謝ラベルした結果、C26:0 への放射活性の取り込みの増加が認められた。また極長鎖脂肪酸 β 酸化活性の減少 (30%) と共に極長鎖脂肪酸延長酵素である elongase 1, 4, 5, 6 の mRNA の発現の増加が認められた。

2) コレステロール代謝異常

ALDP ノックダウン細胞では、通常の 10%血清添加条件下、コレステロール合成が 40%程度まで減少していた。一方、LPDS 培地で培養するとコレステロール合成は誘導されるが、ALDP ノックダウン細胞の誘導率は、対照細胞に比べ抑制されていた。興味深いことに、ALDP ノックダウン細胞のコレステロール含量は対照細胞より低く、コレステロール合成の低下は、コレステロール量の増加による抑制ではなく、コレステロール合成系に異常が起きている可能性が考えられた。

BTM の脂肪酸 β 酸化に対する作用機構の解析

健常者、ALD 患者、Zellweger 患者および carnitine acylcarnitine translocase (CACT) 欠損の線維芽細

胞を BTM 処理し、それぞれ脂肪酸 β 酸化への影響を解析した。その結果、BTM は Zellweger 以外の細胞で極長鎖脂肪酸 β 酸化活性の増加を示した。一方、健常者、ALD、Zellweger 細胞では、長鎖脂肪酸の β 酸化活性は有意に低下した。特に、Zellweger 細胞での減少の割合が高かった。一方、CACT 欠損細胞では、逆に長鎖脂肪酸の β 酸化活性は増加した。この結果により、BTM は炭素鎖の長さに関わらずペルオキシソームでの脂肪酸 β 酸化活性を促進することが認められた。一方、ミトコンドリアの β 酸化活性にはむしろ抑制的に働くことが示された。BTM を処理した細胞の、各種脂質代謝関連酵素の発現を検討した結果、ペルオキシソームに局在する極長鎖脂肪酸 CoA 化酵素 ACSVL1 の発現増加が認められた。

D. 考察

ALDP 機能欠損グリア細胞では、極長鎖脂肪酸の β 酸化活性の減少とともに、脂肪酸延長反応の亢進も蓄積の原因になっている可能性が示唆された。さらに極長鎖脂肪酸代謝の他にコレステロール代謝にも異常が認められ、この代謝異常も発病と関連しているかもしれない。一方、BTM による極長鎖脂肪酸 β 酸化活性亢進には、ペルオキシソームでの ACSVL1 の発現増加が一部関与していることが推察された。

E. 結論

グリア細胞では ALDP 機能欠損が極長鎖脂肪酸延長反応の亢進やコレステロール代謝異常を引き起こしていることが示唆された。また、BTM はペルオキシソームの脂肪酸 β 酸化を活性化し、ミトコンドリアの β 酸化活性には抑制的に作用していることが明らかとなった。今後、ミトコンドリア β 酸化への影響が低い構造類似体の合成など、ALD 代謝異常の改善に有効な化合物の探索を行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 101, 1632-1643, 2007.
- 2) Kashiwayama Y., Asahina K., Morita M., and Imanaka T.: Hydrophobic regions adjacent to

transmembrane domain 1 and 5 are important for the targeting of the 70-kDa peroxisomal membrane protein. *J. Biol. Chem.* 282, 33831-33844, 2007.

- 3) Takahashi N., 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.
- 4) Morita M.: Adrenoleukodystrophy: Molecular pathogenesis and development of therapeutic agents. *Yakugaku Zasshi* 127, 1059-1064, 2007.
- 5) 今中常雄, 柏山恭範, 守田雅志: ペルオキシソーム ABC タンパク質と副腎白質ジストロフィー. *最新医学*, 62, 68-75, 2007.
- 6) Toro A., Arredondo C., Cordova G., Araya C., Palacios J. L., Venegas A., Morita, M., Imanaka T., and Santos M. J.: Evaluation of the role of the endoplasmic reticulum-Golgi transit in the biogenesis of peroxisomal membrane proteins in wild type and peroxisomal biogenesis mutant CHO cells. *Biol. Res.* 40, 231-249, 2007.

2. 学会発表

- 1) 今中常雄, 柏山恭範, 守田雅志: ペルオキシソーム ABC タンパク質の機能と副腎白質ジストロフィー. (シンポジウム) 日本薬学会第 127 年会, 2007, 3, 富山.
- 2) 守田雅志, 田村文, 今井美帆, 小松史明, 朝日彰子, 水野聖子, 今中常雄: グリア細胞におけるペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 の機能 - 脂肪酸及びコレステロール代謝との関連性 -. 第 29 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2007, 11, 仙台.

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

H. 健康危険情報

該当なし

ALD治療薬開発の基礎研究

