

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

脊髄小脳失調症 16 型の病因遺伝子同定に関する研究

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

研究要旨

脊髄小脳失調症 16 型 (SCA16) は常染色体優性の純粋小脳失調症である。臨床的に区別できない SCA15 で ITPR1 遺伝子から SUMF1 遺伝子にかけての欠失が報告されたため、SCA16 家系においても同部位の欠失を検討した。【方法】ITPR1 遺伝子から SUMF1 遺伝子にかけての領域について、定量的 PCR 法にてそれぞれの領域の DNA コピー数を決定した。また欠失特異的 PCR 法を用いて家系内の欠失の有無を判定した。【結果】発症者においてのみ ITPR1 遺伝子の開始コドンを含む領域が 1 コピー、SUMF1 遺伝子は 2 コピーであった。欠失部位は ITPR1 遺伝子の開始コドンを含む 313,318 bp であった。PCR 法では、発症者では正常と欠失 allele の両方が、非発症者では正常 allele のみが増幅された。【考察、結論】発症者特異的に ITPR1 遺伝子のみ欠失が確認され、SCA16 と SCA15 は同一疾患であった。また昨年報告した CNTN4 遺伝子の 3'非翻訳領域の一塩基置換は、この家系特有の稀な SNP であった。

A. 研究目的

脊髄小脳失調症 16 型 (SCA16) とは九州地区に認められる常染色体優性遺伝形式をとる緩徐進行性の経過を示す純粋小脳失調症である。昨年までに SCA16 の連鎖領域が 3p26.2-pter であり、その領域に存在する CNTN4 遺伝子の 3'非翻訳領域での一塩基置換(4,256C→T)を報告した。しかしその変異が"真の"SCA16 の原因となっているアリルと強く連鎖しているだけという可能性は依然として残っている。

一方、緩徐進行性の純粋小脳失調症であり、SCA16 とは臨床的に区別できない SCA15 が 3p24.2-pter に連鎖すると報告され、SCA16 の連鎖領域は完全に SCA15 の連鎖領域内に存在する。そして van de Leemput らは、inositol 1,4,5-triphosphate receptor (ITPR1) 遺伝子から sulfatase-modifying factor 1 (SUMF1) 遺伝子にかけての、それぞれの開始コドンを含んだ約 200kb の heterozygous な欠失が SCA15 家系内の発症者でのみ見られたことを報告した。そこで SCA16 家系においても同部位の欠失を検討した。

B. 研究方法

SCA16 の家系において、インフォームド・コンセントを得た後、末梢血リンパ球よりゲノム DNA を抽出した。ITPR1 遺伝子においては exon 1, 7, 20, 42, 48, 49, 52 の領域を、SUMF1 遺伝子においては exon 2, 5 の領域を、そして ITPR1 遺伝子-SUMF1 遺伝子間の DNA 領域 6 箇所について、それぞれ PCR プライマーを設計した。それぞれの領域の DNA コピー数は SYBR Green を用いた real-time 定量 PCR 法にて決定した。その遺伝子コピー数解析の結果予測された遺伝子欠失部位を挿んだ外側の部分に PCR プライマーを設計し、遺伝子欠失のある allele のみを増幅できるように PCR プライマーペアを設定した。それを用いて遺伝子欠失部位の配列を決定した。さらに欠失部位の内部と外部にそれぞれ PCR プライマーを設計し、遺伝子欠失のない allele のみを増幅できる PCR プライマーペアを設定した。遺伝子欠失特異的 PCR プライマーペアと遺伝子非欠失特異的 PCR プライマーペアを混合し、multiplex PCR を行うことにより、遺伝子欠失の有無を判定した。

(倫理面への配慮)

九州大学の倫理委員会の承認を得ている。また、遺伝子解析に対する同意を書面により得ている。サンプルは匿名化され厳重に保管され、データも厳重に管理している。

C. 研究結果

発症者(IV-2)と非発症者(IV-1)のサンプルを用いて遺伝子コピー数の解析を行った。その結果、発症者ではITPR1 遺伝子 exon 1, 7, 20, 42, 48, それにITPR1 遺伝子-SUMF1 遺伝子間のITPR側は1コピー、ITPR1 遺伝子 exon 49, 52, SUMF1 遺伝子, ITPR1 遺伝子-SUMF1 遺伝子間のSUMF側は2コピーであった。非発症者では全ての領域で2コピーであった。遺伝子欠失部位は、ITPR1 遺伝子の開始コドンを含む313,318 bpであった。SUMF1 遺伝子とその上流13 kbまでは欠失は見られなかった。

遺伝子欠失特異的 PCR プライマペアと遺伝子非欠失特異的 PCR プライマペアを混合して行う multiplex PCR では、臨床的に発症者であるとされたものにおいては、366bpの正常 allele と547bpの欠失 allele の両方が増幅された。一方、非発症者では366bpの正常 allele のみが増幅された。発症者であるIII-13, IV-2, IV-9においては上記のコピー数の検討もを行い、欠失があることが確認された。さらにその後、HumanCNV370-Duo を用いたコピー数解析も行い、上記領域が発症者では1コピーであることを再度確認した。

昨年までの検討において発症者とされ、SCA16の連鎖領域を3p26.2-pterとした決め手となった遺伝子組み換えをもったIV-6は、再度の神経学的検討と、ビデオ眼振計により非発症者であることが判明し、PCRを用いた検討でも欠失はみられず、非罹患者と結論された。

D. 考察

今回行われた検討では、発症者特異的にITPR1 遺伝子のみのheterozygousな欠失が確認された。van de LeemputらはITPR1 遺伝子からSUMF1 遺伝子にかけての欠失をSCA15患者で発見したが、マウスでITPR1 遺伝子を欠失させると失調をきたすこと、ヒトにおいてはSUMF1 homozygous 変異が multiple sulfate deficiency (MIM: 272200) を来すが heterozygous carrier では何も失調がないこと、SCA15患者のリンパ球でのITPR1 蛋白の発現が大きく低下していることより、ITPR1 が責任遺伝子であるとしている。今回のわれわれの結果は、ITPR1 遺伝子の heterozygous な欠失が遺伝性小脳性失調症の責任変異であることを確認できたものであり、SCA16はSCA15と同一疾患であること

を示した。またIV-6が非罹患者であったため、SCA16の連鎖領域は3p26.1-26.3の3.7-Mbと訂正された。ITPR1は確かにその領域に存在し、連鎖解析と遺伝子欠失の結果が一致した。昨年報告したCNTN4 遺伝子の3'非翻訳領域の一塩基置換(4,256C→T)は、この家系に特異的に見られる稀なSNPと結論された。

ITPR1 蛋白は小脳 Purkinje 細胞において強く発現し、マウスのHomozygousな欠損では強い失調を来して早期に死亡する。またheterozygousな欠損では正常に成長するが、生後2カ月の時点でのrotating rodテストにより協調運動が障害されたと報告され、小脳障害に関連すると考えられ、その小脳障害の機序説明が求められる。

E. 結論

- 1) SCA16とSCA15は遺伝学的に同一疾患である。
- 2) SCA15(16)はITPR1 遺伝子の heterozygous な欠失が責任変異である。
- 3) 以前に発症者であると判定されていたIV-6は、臨床所見およびITPR1 遺伝子欠失の解析により、非罹患者であることが確認された。

F. 研究発表

特になし

1. 論文発表

Heterozygous deletion of ITPR1, but not SUMF1 in spinocerebellar ataxia type 16
Iwaki A, Kawano Y, Miura S, Shibata H, Matsuse D, Li W, Furuya H, Ohyagi Y, Taniwaki T, Kira J, Fukumaki Y
J Med Genet. 2008 Jan;45(1):32-5.

2. 学会発表

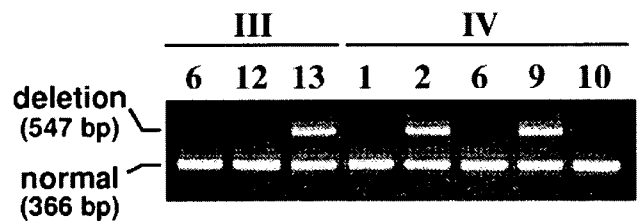
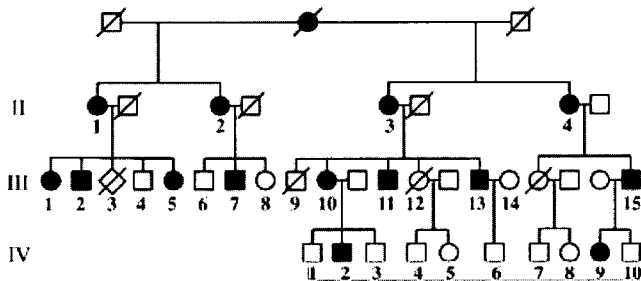
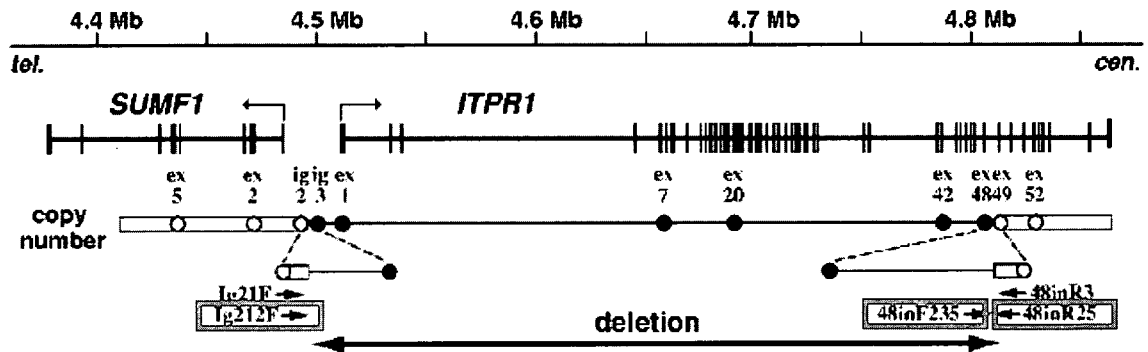
SCA16の病院遺伝子同定
松瀬大, 河野祐治, 李魏, 三浦史郎, 小副川学, 大八木保政, 服巻保幸, 吉良潤一
第48回日本神経学会総会 2007/5/16-18, 名古屋

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. SCA16はSCA15と同一疾患である
2. inositol 1,4,5-triphosphate receptor gene (*ITPR1*) heterozygous deletion が SCA 15 (SCA16) の病因となる遺伝子異常である
3. *CNTN4* 4256C>T はこの家系特有の稀なSNPである (病因とは無関係)

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
南九州地方の脊髄小脳変性症の臨床的遺伝学的研究

-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

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)

研究趣旨

2005 年 Ishikawa らにより、16 番染色体に連鎖する 16qADCA type III の原因として Puratrophin の疾患との強い関連性が報告された。我々の報告してきた南九州の常染色体優性脊髄小脳変性症においても Puratrophin の異常が、全例に確認され、疾患の同一性が確認された。しかしながら、同一家系内でも Puratrophin の異常をもつ例と持たない例が混在する家系が長野から報告され、Puratrophin の異常以外の新しい原因の存在の可能性が高まってきている。それゆえ我々は、さらなる点連鎖解析や家系間のハプロタイプ解析により、候補領域をしぼり込み、また、マイクロアレイによる発現解析により候補遺伝子を絞ってきた。また、候補領域に特化したタイリングアレイ(CGH)による解析もおこなった。我々は、今までの検討で家系間での連鎖解析の結果に矛盾があることから、症例を重ねると同時に、新たな SNPs を用いた多型解析を行い、候補領域を再検討した。その結果、候補領域のゲノム配列の矛盾の存在を確認し、2MB の範囲に候補領域の再設定をおこなった。またエクソンアレイを導入し、新しい原因の候補遺伝子をエクソン断片のレベルでの検出を試みるなど、原因同定への様々なアプローチを実施し、原因に近づきつつある。

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/16qADCA type III の遺伝的原因を明らかにする。

B. 研究方法

南九州地域に多発する常染色体優性遺伝性の小脳失調症 (=16qADCA type III) 家系について Puratrophin 遺伝子の 5'UTR の C→T の mutation の有無を調べた。また一方、16 番染色体に連鎖する家系については、連鎖マーカー、SNPs を用いた詳細な遺伝子ハプロタイプ解析

を行った。Puratrophin 遺伝子の mutation を homozygous に有す症例において、その mRNA の発現量を解析する目的で、末梢血リンパ球より抽出した RNA 検体を用い、疾病連鎖候補領域の各遺伝子およびエクソンごとの遺伝子発現量を GeneChip® (Affymetrix Human Genome U133 2.0, Human Exon 1.0 ST Array,)を用いて解析した。一方で、homozygous を有す症例についてタイリングアレイ (CGH(Comparative Genomic Hybridization)アレイ)を用いてゲノム DNA の micro deletion/ duplication の有無を検討した。

(倫理面への配慮) 本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、文書による同意の下行われている。

C. 研究結果

Puratrophin 遺伝子異常は、南九州の 16 番染色体に連鎖する家系の全例で認められた。また、連鎖マーカーおよび SNPs を用いた詳細な連鎖解析結果からは、Puratrophin 遺伝子周囲の強い連鎖を認める領域に、通常ではみられない短い距離で頻繁なゲノムの組み替えが起こらなければつじつまの合わない部分があり、ヒトゲノム配列の誤りかまたは、患者ゲノムに異常な組み替えが起こっている可能性が示唆された。

GeneChip®アレイ解析においては、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遺伝子がみられた。また、Exon アレイにおいては、13 のエクソンにおいてコントロールに比較し 2 倍以上の発現の増加を認めた。同じ遺伝子内においても各エクソンの発現量には差異が認められ、遺伝子の部分的な発現の増加が確認された。CGH アレイにおいてはこれまでに規定された領域には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。

D. 考察

連鎖解析の結果からは、ヒトゲノム (Human Genome ; 物理地図) が間違っているか、疾患関連領域のゲノムの組み替えがある可能性が高く、詳細な連鎖解析データに基づいた FISH 法などによる確認が重要と考えられた。また、他染色体からの insertion や大きな範囲での転座などについての可能性も否定できず、その解析には、全ゲノム領域の CGH アレイ解析が必要であり、検討している。

E. 結論

候補領域のゲノム配列の矛盾の存在を確認し、候補領域を 2MB の領域に再設定した。エクソンアレイにより新しい候補遺伝子を検出した。

F. 研究発表

学会発表

第 48 回日本神経学会総会 2007 年 5 月
高嶋 博, 岡本裕嗣, 平野隆城, 大窪隆一, 有里敬代, 納 光弘, 有村公良
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

論文発表

Arata H, Takashima H, , Arimura K et al.
Early clinical signs and imaging findings in Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome (Pro102Leu). Neurology. 2006 Jun 13;66(11):1672-8.

Hirano R, Arimura K, Takashima H et al.
Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy: consequence of a Tdp1 recessive neomorphic mutation? EMBO J. 2007; 26(22):4732-43

G. 知的所有権の出願・取得状況 なし

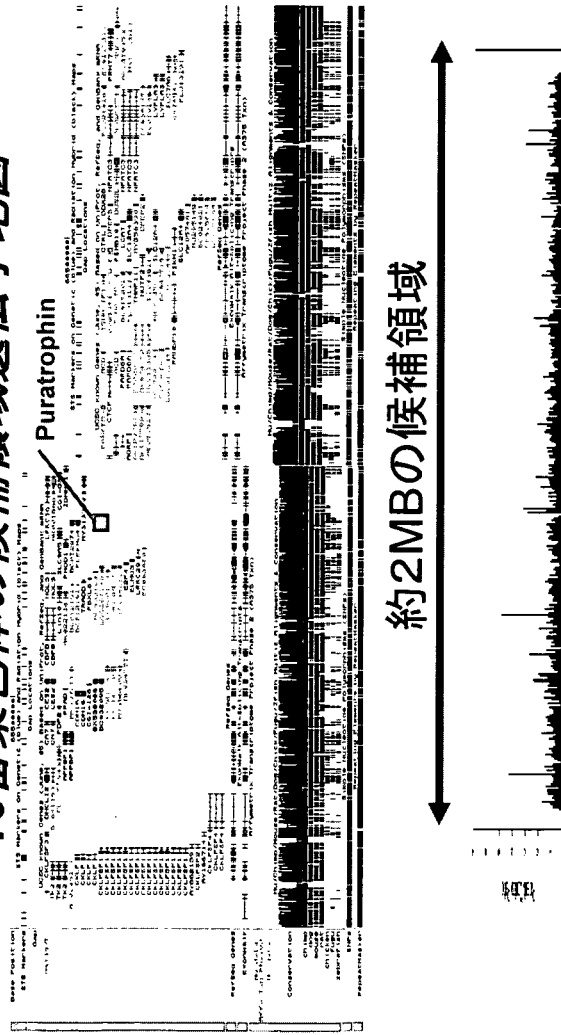
16番染色体に連鎖する常染色体優性脊髄小脳変性症の原因同定の試み

班員 高嶋 博 鹿児島大学 神経内科、老年病学

【目的】 南九州地域に多発する脊髄小脳変性症(16qADCA type III)の遺伝学的原因を明らかにすること。

【結果】 一時病気の原因候補として報告されたPuratrophin遺伝子の異常は、診断には有用であるが、おそらく真の原因で無いことが明らかとなりました。新しい候補遺伝子の検出のため、マイクロアレイ法を用いたアプローチを行っており、候補遺伝子を見つけています。

16番染色体の候補領域遺伝子地図



【今後の方針】

本症の原因は、他の病気によく見られるような単純な遺伝子異常ではないようであり、ます。現在、いろんな可能性を考え、研究をつづけております。

遺伝子の配列の異常だけでなく、もっと大きな範囲での異常が病気を起こしうることもあるため、それらについても研究をすすめています。

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(16q-ADCA)の
臨床的・分子遺伝学的検討

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)

研究要旨

長野県内の 16q-ADCA の臨床像を SCA6 と対比検討した。16q-ADCA は SCA6 に比べて有意に高齢発症であったが、神経症候に関しては両者に明らかな差異は見られなかった。また ICARS、SARA をもとに評価した罹病期間と小脳症状の進行度に関しても両者には有意な差異が見出せなかった。候補遺伝子解析については *puratrophin-1* 遺伝子(*puratrophin-1*)のセントロメア側に焦点を当て直接シーケンス解析を行ったが、現在までに検索した限りでは新たな原因遺伝子候補は同定されていない。

A. 研究目的

長野県の常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症 (ADCA)136 家系を解析した結果、*puratrophin-1* の 5' 非翻訳領域内の C/T 塩基置換を有する 16q-ADCA が 59 家系(約 44%)と最頻であり、次いで SCA6 が 26 家系(約 19%)であった。すなわち長野県ではこの両者で ADCA 全体の約 60%を占めていることが判明した。

一方、我々はこれまでに行った長野県南部出身の 16q-ADCA 3 家系のハプロタイプ解析から *puratrophin-1* の C/T 塩基置換がきわめて有力な疾患特異的マーカーではあるものの真の病因ではない可能性を提起してきた。当該 3 家系の解析では *puratrophin-1* のセントロメア側(*TTCC01*~*puratrophin-1*)が候補領域と想定された。

今回は罹病期間と小脳失調症状の重症度に焦点を当て、16q-ADCA と SCA6 の臨床像を対比検討した。また上記の可能性を検証するために *puratrophin-1* よりセントロメア側の新規候補遺伝子について解析した。

B. 研究方法

遺伝学的に確定診断された16q-ADCAおよびSCA6患者について発症年齢、罹病期間と ICARS、SARAの評価点、小脳症状以外の神経症候を対比検討した。

分子遺伝学的検討は上記の 3 家系において *puratrophin-1* のセントロメア側に焦点を絞って解析した。この領域にマップされ、かつこれまでに 16q-ADCA 患者で解析されていない、よりセントロメア側の候補遺伝子をピックアップ

アップし、直接シーケンス法により変異解析を行った。また上記家系から抽出した複数名につき、Amino et al.により報告された新たな SNPs (SNP05、SNP13)についても確認した。

C. 研究結果と考察

16q-ADCA、SCA6 患者の発症年齢はそれぞれ 59.5 ± 9.7 歳 ($n = 80$)、 42.0 ± 8.8 歳 ($n = 29$) と 16q-ADCA 患者で明らかに高齢発症であった。ICARS、SARA の評価時年齢および評価時点までの罹病期間は 16q-ADCA 患者で 73.4 ± 8.7 歳、 15.1 ± 9.4 年 ($n = 39$) であったのに対して、SCA6 患者では 58.1 ± 10.8 歳、 15.5 ± 10.1 年 ($n = 23$) であった。罹病期間と ICARS および SARA の評価点の相関に関しては、16q-ADCA と SCA6 患者で有意な差異は見出せなかった。小脳症状以外の神経症候に関しては、両者とも目立った特性を見出すことはできなかった。

上記の 3 家系において *puratrophin-1* の C/T 塩基置換を有さない 1 名を含めて、罹患者全員が SNP05、SNP13 に関して、疾患特異的な塩基置換を有していた。家系内の非罹患者では SNP05、SNP13 の塩基置換は見られなかった。新規 SNPs の解析結果は従来のハプロタイプ解析結果から想定された候補領域と矛盾するものではなかった。

また現在までに *TAGA02* から *GATA01* の間にマップされる 12 (*CDH5*、*TK2*、*DYNC1L12*、*APPBP1*、*CDH16*、*CBFB*、など) の遺伝子に関して検索したが、変異候補は見出せなかった。

D. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshida K, Okano T, Hoshi K, et al. Congenital fibrosis of the extraocular muscles (CFEOM) syndrome associated with progressive cerebellar

ataxia. *Am J Med Genet* 143A: 1494-1501, 2007.

2) Yoshida K, Wada T, Sakurai A, et al.

Nationwide survey on predictive genetic testing for late-onset, incurable neurological diseases in Japan. *J Hum Genet* 52: 675-679, 2007.

2. 学会発表

1) 吉田邦広, 堺温哉, 大畑尚子, ら. 16 番染色体長腕に連鎖する優性遺伝性脊髄小脳変性症の病因解析. 第 48 回日本神経学会総会.

2007.5.16-18, 名古屋.

2) 岡野友美, 吉田邦広, 清水雄策, ら. 長野県の原因遺伝子未同定 SCA 患者における SCA14 遺伝子異常の検討. 第 48 回日本神経学会総会.

2007.5.16-18, 名古屋.

3) 清水雄策, 吉田邦広, 岡野友美, ら.

puratrophin-1 遺伝子-16C>T 置換陽性患者の臨床像に関する検討. 第 48 回日本神経学会総会. 2007.5.16-18, 名古屋.

4) 吉田邦広, 和田敬仁, 涌井敬子, ら. 成人発症の遺伝性神経難病に対する発症前遺伝子診断. 日本人類遺伝学会第 52 回大会.

2007.9.12-15, 東京.

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

F. 健康危険情報

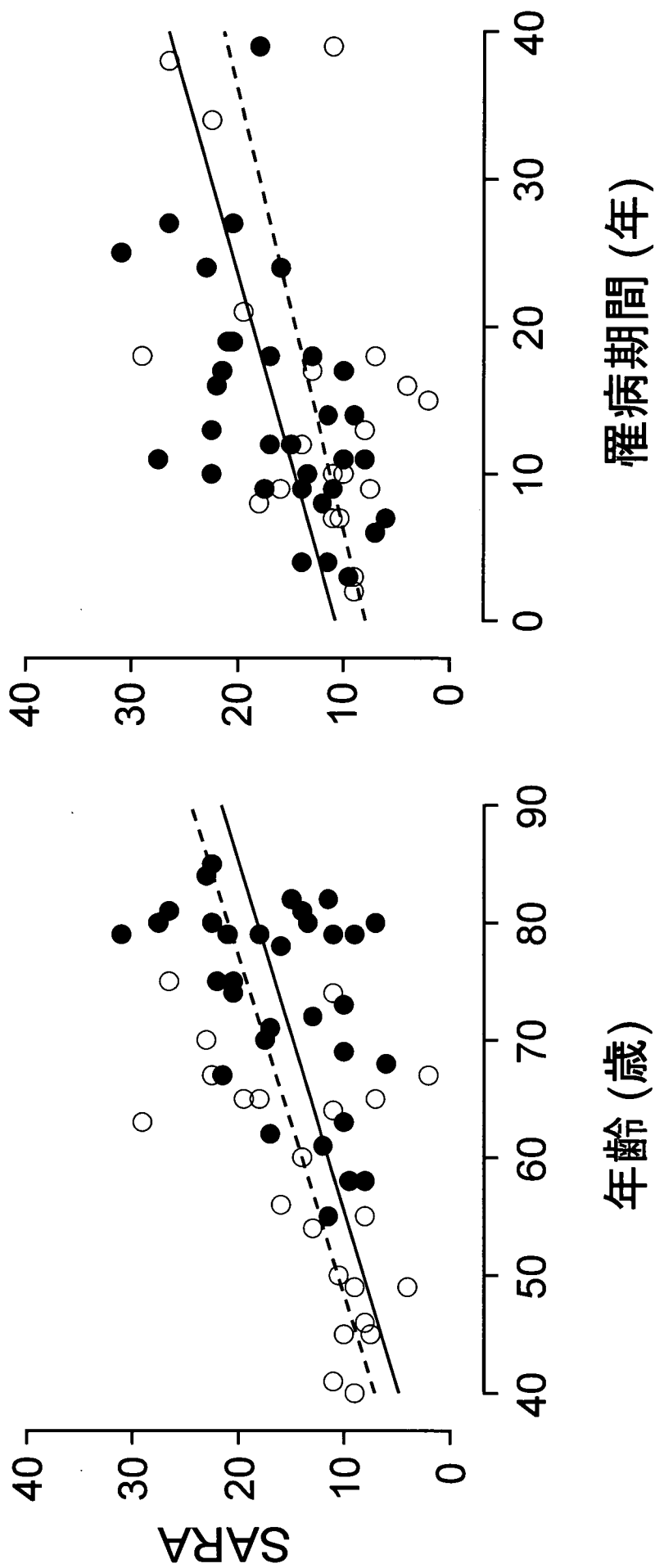
なし

16q-ADCAとSCA6の小脳失調の重症度

—SARAと年齢および罹病期間—

● 16q-ADCA (n = 38)

○ SCA6 (n = 23)



平成 19 年度 厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究総括報告書

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

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(-16C>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 2006 年にこの 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、この例外症例の臨床所見の解析を行った。その結果、明らかな構音障害と軽度の体幹失調など本疾患に矛盾しない症候を認め、確かに発症していることを確認した。この患者のハプロタイプ解析は、他の患者 *puratrophin-1* 遺伝子での 1 塩基置換(-16C>T)から centromere 側が一致していたことから、同遺伝子変化より centromere 側に遺伝子変異が存在するものと想定した。一方、別の家系での解析から centromere 側のマーカー GGAA05 や新たに解析した 1 塩基置換多型(SNP)など複数の centromere 側マーカーで、その患者での遺伝子型が他家系と不一致であった。逆にこの SNP04 から *puratrophin-1* 遺伝子-16C>T までの 900kb 区間ではすべての家系で一致したハプロタイプ（または遺伝子型）をした。次に、この区間を含む領域をホモ接合体としてもつ患者ゲノムについて、PCR 後に直接塩基配列を解読した。その結果全領域の 97%の範囲を解読し、約 200 個の遺伝子変化を認め、患者で特異的な変化を幾つか見出した。この変化の中に疾患の原因となる変異があると想定される。

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)教授
研究協力者 網野猛志 1), 石黒太郎 1), 佐藤 望 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

A. 研究の背景

第 16 番染色体長腕に連鎖する脊髄小脳変性症(chromosome 16q22.1-linked ADCA; OMIM # 117210)は、我国の優性遺伝性脊髄小脳変性症で、Machado-Joseph 病, 脊髄小脳失調症 6 型(SCA6), 齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(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 56 歳程度で体幹失調による歩行障害で発症し、長期に経過しても純粹小脳失調症の範疇に留まる神経障害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-16C>T *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、この-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化を持たない発症例を報告した。この家系でのハプロタイプ解析では、この「例外」症例を含めて発症者は全員、-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化より centromere 側のハプロタイプが共通していた。これは、真の原因遺伝子変異が-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化より centromere 側にある可能性を示していた。

このため、平成 18 年度に本研究事業で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。これまでのマイクロサテライト型 DNA マーカーだけでなく、1塩基多型(SNP)も検索した。その結果、centromere 側境界を GGAA05、telomere 側境界を 17msm とする領域では、基本的にハプロタイプは全家系で共通し、この区間のマーカーGGAA10 や GATA01、TA001 においてアレルが患者間で1リピート異なることは、マイクロサテライト配列の不安定性による可能性が考えやすいと判断した。

以上の結果から、GGAA05 から -16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化までの約 900kb のゲノム領域が正しい候補領域であると推定した (Amino et al. *J Hum Genet* 52:643-649, 2007)。この領域に疾患原因遺伝子変異が存在すると考えられた。

B. 目的

以上の背景から、16q22.1-linked ADCA の原因を同定する目的で、以下のことを行った。

1) 症例の検討と遺伝子座解析：-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化を持たない症例について、多型性マーカーでの遺伝子型の確認を行い、原因遺伝子変異の存在する可能性のある候補領域について確認する。特に、Ohata らの例外症例の臨床的解析を行うこととした。

2) 候補領域のゲノムシーケンス：候補ゲノム領域における遺伝子変異の検索を行う。すなわち原因遺伝子単離のために、GGAA05 から -16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化までの約 900 キロベース(kb)のゲノム領域をホモ接合性に有する発症者について、候補領域のゲノムシーケンス解析を行うこととした。

C. 研究方法

[1] 症例の検討と遺伝子座解析：*puratrophin-1* の 1 塩基置換を持たない例外症例 (Ohata et al. *J Hum Genet* 51:461-466, 2006) について、臨床的な評価を行い、マイクロサテライトマーカーにおける遺伝子型の解析とともに、先に我々の報告した疾患アレルに関連する SNP の解析を行い、患者に共通するゲノム領域について検討を行った。まず、共通するハプロタイプの再解析のために、-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化があった家系 64 家系を再検討した。

次に、これまで -16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変

化が認められず 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、-16C>T *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。

[2] 候補領域のゲノムシーケンス：先に我々が候補領域として同定した SNP04 から -16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化までの約 900kb のゲノム領域について、可能な範囲で塩基配列を確認した。この領域をホモ接合体で疾患アレルを持つ患者の末梢血液からリンパ芽球細胞株を作製し、ゲノム DNA を抽出した。PCR にて約 800bp の断片が増幅されるように、約 900kb のゲノム上にプライマーを連続して設定し、DNA を PCR で増幅した後、直接シーケンスを行い ABI3100 で塩基配列を解析した。NCBI のヒトゲノムデータベースと比較し、塩基配列の変化を検出した。

(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。

D. 研究結果

[1] 症例の検討と遺伝子座解析：信州大学吉田邦広先生のご厚意により、Ohata らの報告した -16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化を持たない例外症例を診察する機会を得た。症例は現在 62 歳で、55 歳時にろれつが廻らないことで発症し、60 歳頃から歩行時にふらつきを自覚するようになった。診察上、1)歩行は wide base で方向転換時などに少し動揺するが、片足立ちが 20 秒でも可能な程度にまだ体幹失調は軽度、2)明瞭な小脳性構音障害、3)筋トーン低下、4)振戦：コップを持つ、字を書くなどで強くなる手の動作時振戦と首の回旋性振戦(本態性振戦に

合致)を認めた。以上より程度は軽度ではあるが失調症状は存在し、16q22.1-linked ADCA を発症していると判断した。この症例のハプロタイプ解析を現在詳細に検討しているが、-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化よりセントロメア側で疾患患者に共通する染色体領域が見られた。

この症例の他に、別の家系からも小脳失調があり、-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化より centromere 側が通常の 16q22.1-linked ADCA 家系と同じアレルを有している症例が 1 例同定できた。

逆に、-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化を有し GGAA05 とそれより centromere 側マーカーの複数が他の家系と異なっている症例を見出した。この症例では SNP04 も GGAA05 と同様に他の家系と異なっていた。一方 SNP05 とそれより telomere 側でアレルが他のすべての家系と一致していた。

以上の解析結果から候補領域として SNP04 から-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化までの区間ではすべての発症者で矛盾がないことを再度確認した。

[2] 候補領域のゲノムシーケンス : SNP04 から-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化までの約 900kb のゲノム領域のうち、97%以上の領域が PCR にて増幅され、直接シーケンスにて塩基配列を決定することができた。その結果、データベースとの比較にて約 200 カ所の相違が見つかった。現在、逐次正常対照ゲノムと比較検討し、疾患との特異性の高いものについて絞り込んでいるが、大部分は対照者ゲノムでも認められる変化であった。しかし幾つかは患者特異的であり、変異として説明できる可能性があるかを検討している。

E. 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 centromere 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 centromere 側に真の変異が存在する可能性が考えられた。今回の我々独自の検討でも、-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化を持たない例外症例は、Ohata らの報告通り、*puratrophin-1* の -16C>T 変化より centromere 側で疾患患者に共通する染色体が存在し、発症していると考えられた。すなわち *puratrophin-1* の -16C>T 変化より telomere 側は非共通のゲノム領域であり、原因遺伝子変異は-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化より centromere 側にあることを確認した。また、同様に-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化より centromere 側の遺伝子型が一致した発症者を別の家系でも発見し、その意義を確認した。

昨年度報告したとおり、今回の検討では SNP04 から-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化までの区間にて全ての患者でのハプロタイプ(または遺伝子型の組み合わせ)の一致があり、健常者集団ではこの組み合わせは見られていない。したがって、この区間内に遺伝子変異が存在すると考えられる。

この区間の塩基配列検索を今年度行った結果、その 97%に当たる領域を解読し、データベースと異なる遺伝子変化を約 200 個認めた。逐次、健常日本人での変化と比較し、患者特有の変化を絞り込んでいる。この中のどれが真の遺伝子変異か、現在検討を加えている。

F. 結論

16q22.1-linked ADCA の原因遺伝子変異は、-16C>T *puratrophin-1* 遺伝子変化より centromere 側の約 900kb の範囲にある可能性が非常に高い。その中で、遺伝子変異の候補がいくつか明らかになっており、検討を行っている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Amino T, Ishikawa K, Toru S, Ishiguro T, Sato N, Tsunemi T, Murata M, Kobayashi K, Inazawa J, Toda T, Mizusawa H. Redefining the disease locus of 16q22.1-linked autosomal dominant cerebellar ataxia. *J Hum Genet.* 2007; 52(8):643-9. Epub 2007 Jul 5.

2. 学会発表

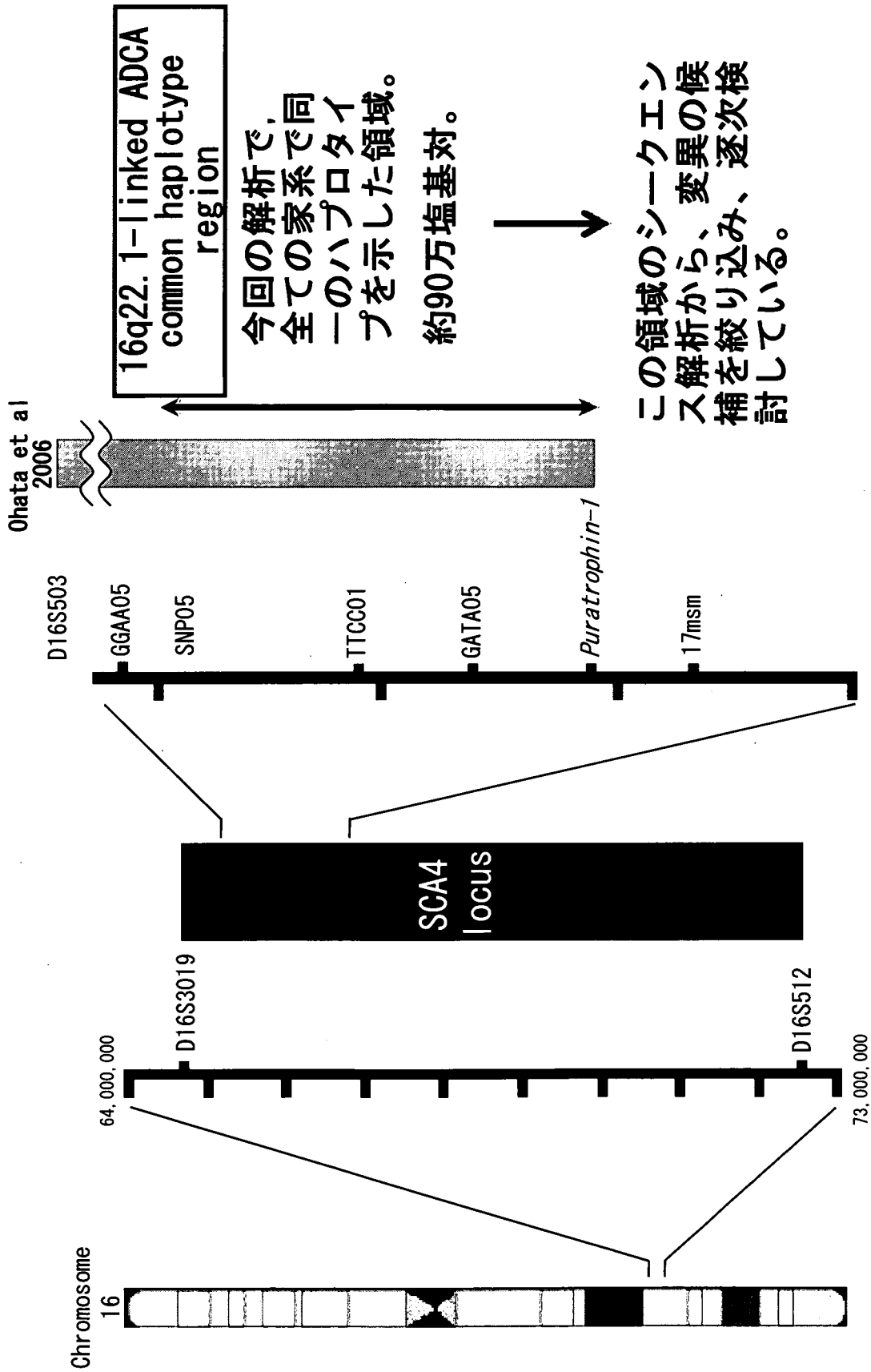
- 1) 石川 欽也, 網野 猛志, 佐藤 望, 石黒 太郎,

- 常深泰司, 瀧山嘉久, 水澤英洋 16 番染色体連鎖型脊髄小脳変性症ホモ接合体家系の臨床および分子遺伝学的研究. 第 48 回日本神経学会総会 名古屋, 2007 年 5 月 18 日
- 2) 網野猛志, 佐藤 望, 石黒太郎, 常深泰司, 融 衆太, 戸田達史, 水澤英洋, 石川欽也. 16 番染色体長腕連鎖型優性遺伝性脊髄小脳変性症の原因遺伝子座の解析. 第 48 回日本神経学会総会 名古屋, 2007 年 5 月 17 日
- 3) 常深泰司, 石川欽也, 水澤英洋, 角 卓郎, 津久井 慶. 脊髄小脳変性症に対する 3, 4-diaminopyridine の効果. 第 48 回日本神経学会総会 名古屋, 2007 年 5 月 18 日
- 4) 佐藤 望, 石川欽也, 網野猛志, 石黒太郎, 常深泰司, 水澤英洋. 非典型的例を含む 16 番染色体連鎖型脊髄小脳変性症 1 家系の臨床および分子遺伝学的研究. 第 48 回日本神経学会総会 名古屋, 2007 年 5 月 18 日
- 5) 石黒太郎, 石川欽也, 網野猛志, 常深泰司, 水澤英洋 SCA6 における伸長ポリグルタミン鎖を含む変異 $\alpha 1A$ カルシウムチャネル蛋白の細胞内分布について. 第 48 回日本神経学会総会 名古屋, 2007 年 5 月 17 日
- 6) 石川欽也, 村山繁雄, 吉田眞理, 橋詰良夫, 水澤英洋 第 16 番染色体長腕連鎖型優性遺伝性脊髄小脳変性症での Purkinje 細胞の形態的变化. 第 48 回日本神経病理学会総会学術研究会 東京, 2007 年 5 月 30 日
- 7) Ishikawa K, Amino T, Sato N, Kobayashi K, Asakawa S, Toda T, Mizusawa H. Redefining candidate region of, and identification of specific genetic changes for the chromosome 16q22.1-linked autosomal dominant cerebellar ataxia. The American Society of Human Genetics, 57th Annual Meeting, New Orleans, 2007.10.23~27.

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失調症 (16q22.1-linked ADCA) の原因遺伝子の探索

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



今回の解析で、
全ての家系で同
一のハプロタイ
プを示した領域。
約90万塩基対。

この領域のシーケン
ス解析から、変異の候
補を絞り込み、逐次検
討している。

16q22.1-linked 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、その範囲を約90万塩基対の区間に狭めた。さらに変異の候補を絞り込んだ。

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

ベルギーARSACS2家系における新規遺伝子変異の同定

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 巖，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 Hospital Leuven)

研究要旨 これまで我々は本邦のARSACS7家系10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、早発型失調症を呈するベルギー人2家系について、臨床症状の検討とSACS遺伝子解析を行った。第1家系では発症年齢が遅く、両家系で網膜有髄線維の増生は認められず、第2家系では知能低下を認め、臨床症状の多様性を示していた。また、2種類の新規のミスセンス変異と、約1.42Mb以上の欠失変異を同定した。ベルギー人にもARSACSが存在することが明らかとなり、今後も他の国から報告される可能性がある。

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遺伝子変異が原因である。その特徴的な臨床像は、早発性小脳失調、下肢痙縮、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、これまでに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、下肢痙縮を認めない例など非典型例も知られてきている。

我々はこれまでの本学会議で、本邦ARSACS 7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。今回、我々は、早発型失調症を呈するベルギー人2家系について、臨床症状の検討とSACS

遺伝子解析を行い、ベルギー人においても本疾患が存在するかどうかを検討した。

B. 研究方法

第1家系は、遺伝子診断にてFreidreich失調症が否定された患者4名、健常者8名であり、血族結婚を認めた。第2家系は、患者1名、健常者2名であり、血族結婚は認めなかった。両家系とも神経学的所見を評価し、協力が得られた症例には、頭部MRI、末梢神経伝導速度、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産物の直接シークエンスにより遺伝子変異を解析した。また、第2家系については、FISH, array CGH, real-time PCRにて第13番染色体の欠失を検索した。

C. 研究結果

第1家系の発症年齢は12-13歳であり、神経学的に小脳失調、錐体路徴候、末梢神経障害の組み合わせを認めた。網膜有髄線維の増生は見られず、頭部MRIでは、小脳萎縮を認めた。SACS遺伝子解析では患者にはミスセンス変異 (c.3419T>A, p.M1164K) がホモで、また両親にはヘテロで存在した。第2家系の患者は、2歳頃の発症であり、神経学的に小脳失調、錐体路徴候、両側聴力低下、末梢神経障害を認め、網膜有髄線維の増生は見られず、MRIで小脳萎縮を認めた。遺伝子解析では、患者には、13番染色体長腕に1.42-1.49Mbの欠失とミスセンス変異 (c.10517T>C, p.F3506S) の複合ヘテロ変異を認めた。前者は、母親由来のアリルに *de novo* で生じたと考えられ、後者は父親にヘテロで認められた。2種類のミスセンス変異については正常ベルギー人コントロールには認められず、いずれも新規の変異であった。

D. 結論と考察

1. ベルギー人にもARSACSが存在することが明らかとなり、SACS遺伝子の新規ミスセンス変異と比較的大きな欠失変異を同定した。
2. ベルギーのARSACSはケベック州の症例に比し第1家系では発症年齢が遅く、両家系で網膜有髄線維の増生は認められず、第2家系では知能低下が認められ、臨床症状の多様性を示していた。
3. 今後、他の国からも報告される可能性がある。

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) Takiyama Y: Sacsinopathies: saccin-related ataxia. *Cerebellum* 6: 353-9, 2007.
- 2) Shimazaki H, Sakoe K, Nijima K, Nakano I, and Takiyama Y: An unusual case of spasticity-lacking phenotype with a novel SACS mutation. *J Neurol Sci* 255: 87-9, 2007.
- 3) Ouyang Y, Segers K, Bouquiaux O, Wang FC, Janin N, Andris C, Shimazaki H, Sakoe K, Nakano I, and Takiyama Y: Novel SACS mutation in a Belgian family with saccin-related ataxia. *J Neurol Sci* 264: 73-6, 2008.

2. 学会発表

- 1) 嶋崎晴雄, 欧陽崑, 迫江公己, 中野今治, 瀧山嘉久, Karin Segers, Vincent Bours. 新規遺伝子変異を認めたベルギーのARSACS家系. 第48回日本神経学会総会, 2007年5月16日, 名古屋.

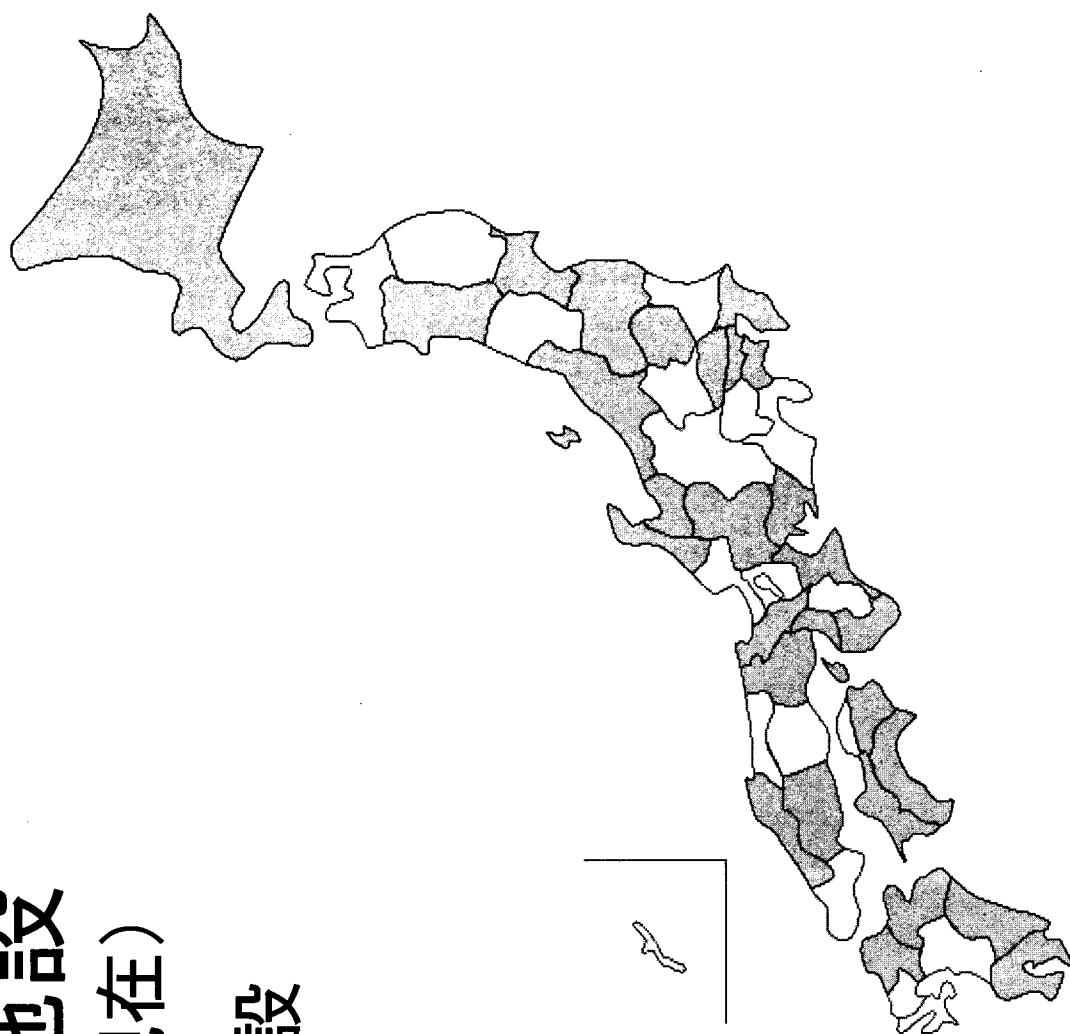
G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

JASPAC登録施設

(平成20年1月25日現在)

28都道府県 65施設



HSP家系

登録済み

148

採血済み

74

解析中

65

SPG4

7

SPG3A

4

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

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

分担研究者 研究協力者	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
	石浦 浩之	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科
	高橋 祐二	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科
	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	

研究要旨

遺伝性痙性対麻痺の DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析システムを構築し、遺伝性痙性対麻痺症例についての解析を行った。現在までに同定されている 15 原因遺伝子のうち 13 遺伝子を搭載した DNA マイクロアレイを作成し、ジデオキシ直接塩基決定法と併用して網羅的解析を 93 症例について行った。常染色体性優性遺伝症例のうち 47%は *spastin* (SPG4) 変異が原因であった。その他、*atlastin* (SPG3A), *REEP1* (SPG31), *sapatacsin* (SPG11) の変異が同定された。

A. 研究目的

遺伝性痙性対麻痺 (hereditary spastic paraplegia, HSP) は進行性の下肢痙性を主徴とする疾患群である。臨床像は多岐にわたり、原因遺伝子も多数存在する。現在まで SPG1-37 の遺伝子座が知られ、うち 15 個の原因遺伝子が同定されている。遺伝カウンセリング、分子疫学、自然史解明、治療法の開発のためには確定診断が重要である。しかし、HSP は症状のみでは確定診断は困難で、網羅的遺伝子診断が必須である。従来の直接塩基決定法で網羅的遺伝子解析を行うことは通常の研究室規模では困難であるが、DNA マイクロアレイを用いることにより網羅的解析が可能である。遺伝性痙性対麻痺についての DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析システムを構築し、多数例についての網羅的解析を行い、遺伝性痙性対麻痺の分子疫学を明らかにする。

うち純粋型 57 名、複合型 36 名で、常染色体性優性遺伝と考えられたのが 38 名、血族婚があり常染色体劣性遺伝が疑われるものが 12 名、遺伝形式不明ながら家族に類症が疑われるのが 6 名、孤発例が 38 名であった。

LICAM (SPG1), *PLP1* (SPG2), *atlastin* (SPG3A), *spastin* (SPG4), *NIPA1* (SPG6), *paraplegin* (SPG7), *strumpellin* (SPG8), *KIF5A* (SPG10), *HSP60* (SPG13), *BSCL2* (SPG17), *spartin* (SPG20), *maspardin* (SPG21), *REEP1* (SPG31) の 13 遺伝子を搭載する DNA マイクロアレイ開発し、ジデオキシ直接塩基決定法を併用し網羅的解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は 3 省指針を遵守し、東京大学医学部研究倫理委員会の承認のもと遂行した。

B. 研究方法

対象は、当科解析依頼の 93 例と JASPAC 31 例である。前者については、男女比~1.5、

C. 研究結果および考察

当科 93 例のうち、優性遺伝が疑われる 38 名のうち 18 名で *spastin* (SPG4) の変異

が認められた (47%)。また 1 名で *atlastin* (SPG3A) 変異を認め (2.6%)、もう 1 名で *REEP1*(SPG31) 変異を認めた (2.6%)。血族婚のある症例で、2 名の *spatacsin* (SPG11) 変異を認めた。また 1 名の *spastin* のアミノ酸置換を認めた。正常対照には存在せず、変異であることが疑われた。孤発例で、1 名の *spastin* 既知変異、1 名の *atlastin* の既知変異が認められた。

JASPAC (Japan Spastic Paraplegia Research Consortium) 症例では、31 症例について *spastin*, *atlastin*, *REEP1* から解析を行い、11 例で *spastin* のアミノ酸置換もしくは一塩基の欠失、4 例で *atlastin* アミノ酸置換を認めた。内 6 例については、正常対照集団での有無を検討する必要であるが、新規であった。

D. 結論

常染色体優性遺伝を呈する症例では *spastin* 変異が最も多く、従来の報告 (30-40%) よりもやや高頻度である可能性が示唆された。SPG3A は本邦にも存在し、若年発症の傾向があった。*REEP1* は最近発見された遺伝子であるが、本邦でも稀ながら存在する可能性がある。SPG11 は脳梁菲薄化を伴う常染色体劣性痙性対麻痺 (ARHSP-TCC) として本邦を中心として疾患概念が確立され、昨年 *spatacsin* が原因遺伝子として報告されたが、本邦例でも *spatacsin* の変異が確認された。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 石浦浩之, 高橋祐二, 後藤順, 辻省次: DNA マイクロアレイを用いた遺伝性痙性対麻痺遺伝子の網羅的解析システム. 第 52 回日本人類遺伝学会, 2007 年 9 月, 東京.
2. Ishiura H, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S: A comprehensive mutational analysis system using resequencing microarray delineates molecular epidemiology of hereditary spastic paraplegias in the Japanese population. The American

Society of Human Genetics 57th Annual Meeting, 2007.10, San Diego, California

F. 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)

分担研究年度終了報告書

運動失調症に関する調査研究班

多系統萎縮症の病態解明と治療に向けた基礎的研究

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

研究要旨

多系統萎縮症(MSA)は非遺伝性の脊髄小脳変性症で原因は解明されていない難治性疾患である。神経変性に対する根本的な治療法は確立していない。中枢神経病理学的な特徴は α -synuclein (Syn)の蓄積である。本研究では MSA の発病機序を解明するために、MSA の病態を備えたモデルマウスを使って神経細胞の変性機序を検討した。その結果、MSAモデルマウスの神経細胞の変性にはSynの蓄積が関与することを示した。神経細胞に起こるSynの蓄積は、Synが不溶化することが重要であることも解った。以上より、MSA の発病機序の解明のために有用なモデル動物が得られ、マウス脳から初代培養系を確立し MSA の治療を目的とした研究の準備が整った。今後、細胞レベルの治療、モデル動物の治療、さらにヒトへの応用と治療に関する研究を段階的に進め、MSA の治療法の開発をめざす。

A. 研究目的

多系統萎縮症(MSA)は非遺伝性の脊髄小脳変性症の1つで、発病の原因やメカニズムは解明されていない難治性疾患である。今日、MSA では症状を緩和する治療法はあっても、神経変性に対する根本的な治療法は確立していない。したがって、発病機序の解明と治療法の開発は重要な研究課題である。

MSA の臨床症状は、運動失調症、パーキンソン症候群及び自律神経障害で、病気が進行すると長期臥床状態に至る。MSA の中枢神経系に起こる病理学的特徴は、GCI (glial cytoplasmic inclusion)や神経細胞内封入体などに認める α -synuclein (Syn)の蓄積である。本研究では MSA の発病機序を解明するために、MSA の病態を備えたモデルマウスを使って神経細胞に起こる Syn 蓄積の機序を明らかにする。さらに、MSA に起こる Syn 蓄積の予防方法により、MSA の治療法を開発することをめざす。難治性疾患に起こる長期臥床状態を予防し発病を遅らせるための方法を開発することにより、医療費を削減し安全な医療を国民へ届けることが本研究の目的である。

B. 研究方法

矢澤らは、特異的にマウス脳のオリゴデンドロサイトにヒト野生型 Syn を強制発現するトランスジェニック(TG)マウスを作製し、このマウスが MSA の神経病理に類似することから MSA の疾患モデルマウスとして報告した(Yazawa et al, *Neuron*, 2005)。TG マウスでは、加齢ともに明らかな脳萎縮、運動機能の低下、さらに MSA の神経病理の分布や病理所見に類似する病理を有し著明な神経細胞の脱落を認めた。以上の所見は、マウスの中枢神経系に進行性の神経細胞の変性が起こったことを示した。TG マウスの神経細胞の変性には、神経細胞の軸索や神経終末にマウス内因性 Syn の蓄積が関与した。そこで、本研究では確立した TG マウス由来の初代培養系を用いて、TG マウスに起こる Syn 蓄積の機序を検討した。初代培養はマウス脳のグリア細胞単独の培養系と神経細胞-グリア細胞の混合培養系の2つの初代培養を用いて検討した。初代培養細胞は約40日間培養し、生存率、Syn 蓄積や局在について、免疫組織化学染色法や界面活性剤などによる蛋白溶解性試験により検討した。