

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3力年終了報告書  
運動失調症に関する調査研究

原因遺伝子未同定の脊髄小脳変性症に関する臨床病理学的研究

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  
西澤 正豊 新潟大学脳研究所神経内科学分野  
高橋 均 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

1) 同一のポリグルタミン病に属すると推測される2家系2症例を剖検脳の検索から発見し、その臨床病理学的特徴を報告した。これらの家系の疾患は遺伝子が同定された既知の疾患に属さず、新規のポリグルタミン病である可能性が高いと考えられた。2) 常染色体劣性遺伝が示唆される家族性多系統萎縮症の姉弟例を報告した。病変分布は弧発例に類似していたが、黒質の変性が被殻より強い傾向がみられた。両者とも網膜色素変性症を合併していた。3) CAGリピート伸長の短い(Q56) Machado-Joseph病と臨床診断された症例の剖検脳を病理解析した。同病と病理診断し得る神経細胞変性は生じていなかったが、橋核を含む複数の領域の神経細胞に微細な核内封入体の形成を確認した。この結果は症状の発現が神経細胞の機能異常に基づくことを示唆しており、神経細胞死の前段階における治療開始の必要性・重要性を示している。

A. 研究目的

難治性神経変性疾患の克服・治療には、原因遺伝子の同定と分子病態の解明が重要である。遺伝子同定には遺伝性疾患の解析が重要であり、近年こうしたアプローチから種々の神経変性疾患の原因遺伝子が発見され、神経細胞の機能異常・細胞死の分子機構が次第に解明されてきている。しかしながら、本邦における優性遺伝性脊髄小脳変性症の約2割が遺伝子未同定であり、劣性遺伝性の神経疾患を加えると、原因未解明な疾患が未だに多く残されている。こうした疾患を解析するため、類似症例を発見・蓄積し、その臨床病理学的所見を明らかにすることを研究目的とした。

また、神経変性疾患の克服には、早期診断・早期治療が重要であり、その判定・評価の基盤を確立するためには、疾患病初期の臨床型と病理の把握が必要である。このため、遺伝子変異の軽度な脊髄小脳変性症例の臨床・病理学的所見を明らかにすることも研究目的とした。

B. 症例、研究結果および考察

1. 新規ポリグルタミン病が示唆される遺伝性脊髄小脳変性症の2家系2症例

臨床：症例1. 13年経過の不随意運動（顔、舌、四肢）と認知症を呈した死亡時66歳の男性。両親がいとこ婚。同胞に類症あり。症例2. 失調性歩行障害、不随意運動、認知症を呈した全経過15年の75歳、女性。一卵性双生児の姉に同様の症状あり。

病理：脳重は症例1が1110g、症例2が890g。2症例とも類似の病理変化を呈した。小脳が萎縮し、プルキンエ細胞の高度脱落が認めら

れた。さらに下オリブ核の変性、線条体の小型神経細胞脱落、大脳皮質第2、4層の神経細胞脱落がみられた。白質には髄鞘の変性が広範に生じていた。異常伸長したポリグルタミン鎖の細胞核内蓄積が、変性部位の神経細胞、白質の乏突起膠細胞に認められ、一部で核内封入体形成も伴っていた。遺伝子検索で既知のポリグルタミン病は全て否定された。

考察：提示した2症例は類似の臨床病理学的所見を呈し、同一疾患である可能性が高い。その変性基盤にはポリグルタミン病と同質の分子病態が存在していることが示唆され、新規のポリグルタミン病としての原因遺伝子同定を進めている。

2. 常染色体劣性遺伝が示唆される家族性多系統萎縮症 (multiple system atrophy, MSA) の姉弟例

臨床：症例1(姉). 30歳台に網膜色素変性症を指摘された。パーキンソニズムと小脳症状を呈し、73歳で死亡。全経過5年。症例2(弟). 50歳時網膜色素変性症を指摘される。12年経過のパーキンソニズムを呈し、74歳で死亡。

病理：症例1は脳重1030g。黒質が中等度に変性。線条体に変性なし。小脳プルキンエ細胞、下オリブ核神経細胞の軽度脱落。橋核神経細胞脱落が中等度に脱落し、橋横走線維が変性。症例2の脳重は1100g。中脳黒質、被殻、橋核に高度の神経細胞脱落。小脳皮質、下オリブ核は中等度の変性。2症例とも、障害部位には $\alpha$ シヌクレイン陽性のオリゴデンドロサイト胞体内封入体が多数認められた。黒質、橋核等の神経細胞胞体内に $\alpha$ シヌクレイン陽性

の封入体が目立つ。

考察：2症例とも網膜色素変性を伴うMSAであり、MSA病変は孤発例と大差はないと考えられた。黒質優位の変性が早期から進行している点、神経細胞への $\alpha$ シヌクレイン蓄積が目立つ点が特徴と思われた。家族性が疑われるMSAの1家系から複数例が剖検された報告はなく、臨床病理学的に孤発性MSAとの異同を論じる上で貴重な2症例である。

### 3. CAGリピート短伸長のMachado-Joseph病(MJD)剖検例：臨床病理学的研究

臨床：16年経過のパーキンソニズムと8年経過の筋力低下を呈した死亡時75歳の女性。経過中、びっくりまなこ、眼球運動制限、物忘れ、幻覚、嚥下障害などが認められた。遺伝子検索で、*MJD1*遺伝子のCAGリピート数が56/22と判明。家族内に同病の発症者は認められていないが、子供に同遺伝子異常が確認されている。病理：脳重1,140g。黒質、青斑核、迷走神経背側核に高度の神経細胞脱落がみられた。同部位に加え、大脳皮質にレビー小体が多発し、びまん性Lewy小体病と病理診断された。黒質を除きMJDで通常冒される領域に神経細胞脱落は認められなかったが、視床下核、橋核、脳幹網様体等の神経細胞に核内封入体の形成が認められ、MJDの病態が進行していることが確認された。

考察：本例はびまん性Lewy小体病とMJDの両者に罹患し、パーキンソニズムの主体は前者に起因したものと推測された。他方、MJDも発症していたが、病理結果から、その病態は神経細胞死によるものではなく、細胞の機能異常に基づくものと考えられた。ヒト脳においてこうした病態が明確に把握される機会は少なく、早期治療の必要性を示す貴重な症例報告である。

### C. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kaneko-Oshikawa C, Nakagawa T, Yamada M, Yoshikawa H, Matsumoto M, Yada M, Hatakeyama S, Nakayama K, Nakayama KI. Mammalian E4 is required for cardiac development and maintenance of the nervous system. *Mol Cell Biol.* 2005, 25:10953-10964

山田光則, 下畑光輝, 佐藤俊哉, ほか. ポリグルタミン病における神経細胞変性機構. *実験医学*, 2005, 15: 198-205

山田光則, 高橋 均. ポリグルタミン病の分子病態機序. *神経進歩* 50: 439-448, 2006

Yamada M, Shimohata M, Sato T, Tsuji S, Takahashi H. Polyglutamine disease: Recent advances in the neuropathology of dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Neuropathology* 26: 346-351, 2006

Sakai K, Yamada M, Sato T, Yamada M, Tsuji S, Takahashi H. Neuronal atrophy and synaptic alteration in a mouse model of dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Brain* 129: 2353-2362, 2006

Hara K, Momose Y, Tokiguchi S, Shimohata M, Terajima K, Onodera O, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Hirasawa M, Mizuno Y, Ogata K, Goto J, Kanazawa I, Nishizawa M, Tsuji S. Multiplex families with multiple system atrophy. *Arch Neurol* 64:545-551, 2007

山田光則. DRPLA. *Clinical Neuroscience*, 25: 850-851, 2007

Yamada M, Sato T, Tsuji S, Takahashi H. CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115: 71-86, 2008

#### 2. 学会発表

山田光則. ポリグルタミン病：DRPLAを中心として. シンポジウムII. 神経病理学会総会 5月 2005 宇都宮

坂井健二, 山田光則, 佐藤俊哉, ほか. 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症モデルマウスにおける脳萎縮の病態解析. 神経病理学会総会 5月 2006 岡山

山田光則, 佐藤俊哉, 辻 省次, ほか. ポリグルタミン病における選択的細胞死：歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)モデルマウスの解析. 神経病理学会総会 5月 2006 岡山

山田光則, 柿田明美, 江口郁代, ほか. Machado-Joseph病：CAGリピート短伸例の脳病変. 神経病理学会総会 5月 2007 東京

#### D. 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)

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<sup>1)</sup>, 岩城明子<sup>2)</sup>, 松瀬大<sup>1)</sup>, 李魏<sup>1)</sup>, 三浦史郎<sup>1)2)</sup>, 柴田弘紀<sup>2)</sup>,  
古谷博和<sup>1)</sup>, 三好安<sup>1)</sup>, 小副川学<sup>1)</sup>, 松永宏美<sup>2)</sup>, 大八木保政<sup>1)</sup>, 柴田篤志<sup>2)</sup>,  
松本直樹<sup>2)</sup>, 谷脇考恭<sup>1)</sup>, 山田猛<sup>1)</sup>, 服巻保幸<sup>2)</sup>  
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

常染色体優性遺伝で緩徐進行性の純粋小脳失調症である脊髄小脳失調症 16 型(SCA16)の病因遺伝子を同定するための遺伝解析を行なった。従来 8q22.1-24.1 に連鎖するとされていたが、再解析の結果 3p26.2-pter に locus が推測され、その locus 内の CNTN4 遺伝子の 3'非翻訳領域に家系内罹患者がもつ特異な一塩基置換(4,256C>T)を発見した。しかし、臨床的に区別できない SCA15 におい報告された遺伝子欠失について本家系においても検討したところ、ITPR1 遺伝子の開始コドンを含んだ 313,318 bp の欠失が発症者のみで確認された。したがって SCA16 は SCA15 と同一疾患であった。また上記の CNTN4 遺伝子の 3'非翻訳領域の一塩基置換は、この家系に特有の稀な SNP と結論された。

### A. 研究目的

脊髄小脳失調症 16 型 (SCA16) とは、8q22.1-24.1 (LOD=3.06) に病因遺伝子があると報告された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。本家系において新たに見出された SCA16 患者 2 を解析したところ、新症例のうち 1 例において、先に SCA16 と連鎖すると報告されたハプロタイプを有さず、8q22.1-24.1 には連鎖していなかった。そこで、SCA16 の連鎖領域を改めて決定し、病因遺伝子の同定を目的とした。また、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 において 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。そこで本家系においても同部位の欠失を検討した。

### B. 研究方法

#### B-1. 連鎖領域の探索

本家系において今回新たに見出された SCA16 患者 2 名を加えた SCA16 患者 13 名とその家族 11 名について、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。常染色体

上の 776 個のマイクロサテライトマーカーを使用して genotype 解析を行い、連鎖解析については 2 点 LOD 値を MLINK program にて算出した。有意に高い LOD 値が得られた場合は、更に詳細にマイクロサテライトマーカーを設定し、連鎖領域を決定した。さらに、決定された SCA16 連鎖領域内の全遺伝子のエクソンおよびエクソン・イントロン境界領域についてダイレクトシーケンシング法にて変異の検索を行った。

#### B-2. ITPR1 遺伝子欠失の検討

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

連鎖解析では病因遺伝子は 3p26.2-pter の 3.3 Mb の領域に連鎖することが判明した. また, 当該連鎖領域内には 7 遺伝子が存在し, それらの遺伝子コピー数には異常がなかった. その領域内の CNTN4 遺伝子の 3'非翻訳領域に一塩基置換(4,256C>T)が家系内の罹患者全員および, 当初は発症者とされた IV-6 にみられた. この変異は健常対照群 520 人には認められなかった.

しかし, IV-6 を詳しく診察したところ正常であり, さらに臨床的に区別できない SCA15 において, IV-6 が正常である場合の連鎖領域内に存在する ITPR1 遺伝子から SUMF1 遺伝子にかけての欠失が報告された. そこで本家系においても検討した. 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ところ, 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 遺伝子側は 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. multiplex PCR では, 臨床的発症者では, 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, IV-4 は非罹患者であることが確認された. 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行き, 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.

D. 考察

3 年間の検討において, 以前報告された連鎖領域が訂正され, 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 の連鎖領域は最終的に 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. CNTN4 遺伝子の 3'非翻訳領域の一塩基置換(4,256C>T)は, この家系での稀な 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 rotarod 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) CNTN4 遺伝子の変異はこの家系での稀な SNP である.

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

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. 2007 2008 Jan;45(1):32-5.

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

松瀬大ら, SCA16 の病院遺伝子同定. 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

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, 太窪隆一, 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と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と比較し 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

Hirano R, Takashima H, Osame M, et al. Fine mapping of 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia type III in Japanese families. *Neurogenetics*. 2004, 5:215-221

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

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

\* 平成 17～19 年度のまとめ

分担研究者： 吉田邦広 (信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科)

研究要旨 長野県では従来から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)家系が 60%以上を占めていたが、このうち約 2/3 が *puratrophin-1* 遺伝子 (*puratrophin-1*)5'非翻訳領域内の C/T 塩基置換を有する 16q-ADCA 家系であることが判明した。この頻度 (ADCA 全体の約 44%)は国内他地域の頻度 (8-17%)に比べてきわだって高く、長野県は 16q-ADCA の集積地であると考えられる。現時点で 16q-ADCA は県内に少なくとも 59 家系確認されている。16q-ADCA は症候的には SCA6 と鑑別困難な純粋小脳型であり、罹病期間と小脳失調の進行度に関しても SCA6 と有意な差異はなかった。ただし 16q-ADCA は SCA6 に比べて有意に高齢発症であった。自験 3 家系の解析からは *puratrophin-1* よりセントロメア側が依然として有力な原因遺伝子候補領域であるが、原因遺伝子の同定には至っていない。

A. 研究目的

長野県に多数集積する 16q-ADCA の臨床的特徴を明らかにするとともに、原因遺伝子を同定することを目的とした。

B. 研究方法

我々は現在までに長野県の ADCA136 家系を集計し、病型頻度を解析した。その結果、*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%) と最頻であることが判明した。遺伝学的に確定診断された 16q-ADCA 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 SCA6 患者と対比検討した。

一方、我々は長野県南部出身の 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*) が候補領域と推察された。

この候補領域に焦点を当てて、FISH 解析によるゲノム構造変化の解析、定量的 PCR 法による遺伝子コピー数の解析、直接シーケンス法による変異解析、などを行い、新規候補遺伝子を探索した。

C. 研究結果と考察

16q-ADCA、SCA6 患者の発症年齢はそれぞれ  $59.5 \pm 9.7$  歳 ( $n = 80$ )、 $42.0 \pm 8.8$  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  $73.4 \pm 8.7$  歳、 $15.1 \pm 9.4$  年 ( $n = 39$ )であったのに対し

て、SCA6 患者では  $58.1 \pm 10.8$  歳、 $15.5 \pm 10.1$  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 塩基置換を有する罹患者全員が最近、Amino et al.により報告された *puratrophin-1* のセントロメア側の疾患特異的な SNPs (SNP05、SNP13) の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。これまでに上記 3 家系のうち 1 家系において *puratrophin-1* の C/T 塩基置換を有さない罹患者 1 名を報告してきたが、この患者においても SNP05、SNP13 の疾患特異的な塩基置換が確認された。本患者においては、家系内のハプロタイプ解析から *puratrophin-1* よりセントロメア側での組換えを想定してきたが、新規 SNPs の解析結果は従来の想定と矛盾するものではなかった。これらの結果は *puratrophin-1* のセントロメア側に新規の原因候補遺伝子が存在することを強く示唆するものと考えた。

本候補領域のゲノム構造変化を見るために計 16 の BAC クローンを用いて FISH 解析を行ったが、明らかな異常は見られなかった。また本候補領域にマップされる約 20 の遺伝子 (*PDP2*、*CDH16*、*RRAD*、*E2F4*、*SLC9A5* など) について遺伝子コピー数を検討したが、明らか

なコピー数の変化は見られなかった。さらに *TAGA02* から *GATA01* の間にマップされる 12 (*CDH5*、*TK2*、*DYNCILI2*、*APPBP1*、*CDH16*、*CBFB*、など)の遺伝子に関して直接シーケンス解析を行ったが、明らかな変異候補は見出せなかった。

#### D. 結論

長野県では従来から原因遺伝子未同定の ADCA 家系が 60%以上と過半数を占めていたが、このうち約 2/3 が 16q-ADCA であることが判明した。この頻度 (ADCA 全体の約 44%)は国内他地域の頻度 (8-17%)に比べてきわだつて高く、長野県は 16q-ADCA の集積地であると考えられる。

16q-ADCA は症候的には SCA6 と鑑別困難な純粋小脳型であるが、発症年齢は SCA6 に比べて 15-20 歳程度高齢発症であった。自験 3 家系の解析からは *puratrophin-1* よりセントロメア側が依然として有力な原因遺伝子候補領域であるが、原因遺伝子の同定には至っていない。

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



平成 17～19 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）  
分担研究総合報告書

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

我々は本邦に存在する原因未同定の優性遺伝型脊髄小脳変性症のうち、第 16 番染色体長腕に連鎖する病型(16q22.1-linked ADCA)の原因探索を行ってきた。平成 17 年度には、それまでに集積した本邦の 52 家系について候補領域の限定化を行い、その領域内の候補遺伝子をすべて直接シーケンス法などによって解析し、DKFZP434I216 としてデータベース Ensembl に登録されていた新しい遺伝子(*puratrophin-1* と命名)に関して全遺伝子構造を決定した。そして、その翻訳開始点の 16 塩基上流地点に患者に特異的な 1 塩基置換(シトシンからチミンに変換(-16C>T))を見出した。この 1 塩基置換以外には候補領域の他の全ての遺伝子に翻訳領域および近傍イントロンには変化が見られず、またこの変化自体、健常者 500 名には見られなかった(Ishikawa et al. *Am J Hum Genet* 77:380-396, 2005)。この発見を受けて、本邦の多施設で 16q22.1-linked ADCA の疾患頻度が検討され、Machado-Joseph 病、SCA6、DRPLA 等と並んで頻度が高い疾患であることが明らかになった。しかし、その後 2006 年にこの-16C>T を持たない非常に稀な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。平成 18、19 年の 2 年間でこの例外症例が確かに発症していることを確認し、そのハプロタイプを検索したところ、他の患者と *puratrophin-1* 遺伝子での 1 塩基置換(-16C>T)から centromere 側が一致していることを確認した。一方、別の家系での解析から centromere 側のマーカー GGAA05 や新たに同定した 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の家系と不一致であることを見出し、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）を示すことを確認した。これまで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で、PCR 後に直接塩基配列を解読した。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ている。この変化の中に疾患の原因となる変化があると想定し、鋭意検討を急いでいる。

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. 研究の背景と目的

本邦の脊髄小脳変性症の約 30%程度は遺伝性であると言われ、その大部分が常染色体優性遺伝型であると言われている。優性遺伝型脊髄小脳変性症には、近年原因遺伝子がつぎつぎに解明されており、その 20～30%が Machado-Joseph 病で、ほぼ同数が脊髄小脳失調症 6 型(SCA6)と考えられている。この他、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)などが続くが、依然として原因不明の病型が全優性遺伝型脊髄小脳変性症の 20～40%存在すると言われている。我々は平成 12 年に本邦の原因不明の優性遺伝型脊髄小脳変性症が第 16 番染色体長腕の脊髄小脳失調症 4 型(SCA4)遺伝子座に連鎖することを証明した。これが本研究の対象疾

患である第 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)である。

後に結果の項でも触れるが、本疾患の遺伝子診断はまだ完全ではないが、*puratrophin-1* 遺伝子の 1 塩基置換を検索することで、99%以上の正確さで診断できると考えられ、そのマーカーで検索した場合我国の優性遺伝性脊髄小脳変性症の中で、Machado-Joseph 病、脊髄小脳失調症 6 型(SCA6)、歯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 59 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粋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。

我々はこの疾患の原因を同定する目的で、ポジショナルクローニングを行った。

## B. 研究方法

### 平成 17 年度

本邦の広い範囲に分布する多数の神経内科専門施設における専門医およびそこに通院する患者家系のご協力を得て、合計 52 家系を集積した。最初の 8 家系によって第 16 番染色体長腕 16q22.1 の約 1 メガベース領域について詳細な遺伝子型(genotype)の解析を行い、全てで共通するハプロタイプがあることが判明していたため、その領域を重点的に他の家系でも解析を行った。

候補領域に存在する遺伝子について、Ensembl などの公開データベースを用いて登録された遺伝子をもれなく検索し、逐次エクソンとその両端のイントロン接合部分を含むように、プライマーを設計し患者での塩基配列を PCR によって増幅後直接塩基配列を解読し、データベースと比較した。

また、登録された遺伝子については脳での遺伝子発現状況を RT-PCR 法を用いて患者脳でも検証した。

さらに候補領域について、BAC(Bacterial artificial chromosome)クローンから染色体領域を含む cosmid clone を単離し、これをプローブに患者および健常者 DNA をサザンハイブリダイゼーション法によって解析し、挿入や欠失などの変異がないかを検索した。

### 平成 18 年度

我々が同定した *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)は、日本の広い範囲の多くの家系で見出された。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、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。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、*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。

### 平成 19 年度

[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。

### C. 研究結果

#### 平成17年度

- 1) 家系のハプロタイプ解析から, 全ての家系で一致したハプロタイプを認める領域は, マーカーGATA01から17msmまでの600キロベース(kb)領域と考えられた。この領域について, データベースに存在する全ての遺伝子とESTを解析したところ, *Puratrophin-1* 遺伝子の5'UTRのC→Tの遺伝子異常が見られた。この他には患者集団に特有の変化はなかった。
- 2) *Puratrophin-1* 遺伝子は, ヒト脳内で確かにmRNAとして発現しており, 遺伝子変化を有するmRNAも単離された。このC→Tの変化は5'UTRに存在し, アミノ酸置換には至らないと想定された。実際にこの遺伝子産物に対して作製したポリクローナル抗体で解析したところ, この遺伝子産物は蛋白として存在していることが裏付けられた。この蛋白はspectrin repeatとRho GEFドメインを有し, ゴルジ装置とアクチンとの結合に関与する細胞内骨格蛋白であると考えられた。
- 3) このC→Tの遺伝子異常は, RT-PCRで解析した限り alternative transcription に影響する可能性は否定的であった。一方, luciferase レポーターシステムを用いて解析したところ, この遺伝子異常が同蛋白の発現の低下をもたらしている可能性が示唆された。患者脳内でのTaqMan法での解析でも, 患者脳内での*puratrophin-1* mRNA量が低下している傾向が見られた。
- 4) *Puratrophin-1* 蛋白は, 小脳Purkinje細胞で発現しており, その他の神経細胞でも発現を認めた。中枢神経以外では脾臓や精巣など多数の組織で発現していた。興味深いことに,  $\beta$ アクチンなど多数の難聴原因分子が発現する内耳有毛細胞にも*puratrophin-1* 蛋白が発現していた。  
一方, 患者小脳Purkinje細胞ではこの蛋白が細胞質内で凝集している像が見られた。  
我々の誌上報告(Am J Hum Genet 77: 280-296, 2005)の後, 本邦の多数の施設でも独自に本遺伝子異常の検索がなされ, 原因未同定の優性遺伝性SCD患者の中で高率にこの異常を認めたと報告を受け, その後誌上公表となっ

た(Onodera et al. Neurology 67: 1300-1302, 2006, Ouyang et al. J Neurol Sci 247: 180-186, 2006 など計8論文)。

#### 平成18年度

*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。

#### 平成19年度

[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)筋トーンス低下, 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* 遺伝子変化が認められない症例の中から、-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。今までに幾つかの患者特異的变化が認められている。変異として説明できる可能性のあるものについて、検討を行っている。

#### D. 考察

平成 17 年度に我々は遂に 16q-ADCA 家系 52 家系の解析から、本疾患患者にのみ認める遺伝子変化を *puratrophin-1* 遺伝子に同定した。この遺伝子変化は非常にまれに 2 家系内の 2 名の発症者に認められないことを除いて、非常によく発症者と segregate している。このことから *puratrophin-1* 遺伝子変化は極めてよいマーカーであることには変わりはない。この遺伝子変化を目安に本邦の多数の施設で検討がなされ、地域差はあるものの本疾患が Machado-Joseph 病、SCA6 に次ぐ頻度の高い疾患であることが判明した。

一方、Ohata らの例外症例の報告により、俄かに *puratrophin-1* 遺伝子以外に真の原因遺伝子

がある可能性が示唆された。このため平成 18 年度には最初の家系数よりさらに多数の 62 家系に上る 16q22.1-linked ADCA 家系のハプロタイプを解析した。その結果、我々の症例の中に、*puratrophin-1* 遺伝子変化を持たない 16q22.1-linked 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。すなわち Ohata らの例外症例を含めて全ての患者で 16 番染色体ゲノム上のマーカー 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を新たに見出した。逆に *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。

平成 18 年度に報告したとおり、平成 19 年度の検討では 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、現在検討を行っている。

#### E. 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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ishikawa K., Toru S., Tsunemi T., et al. An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a

- single-nucleotide substitution in the 5'untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domains. *Am J Hum Genet* 77: 280-296, 2005.
- 2) Owada K., Ishikawa K., Toru S., et al. A clinical, genetic, and neuropathological study in a family with 16q-linked ADCA type III. *Neurology* 65: 629-632, 2005.
  - 3) 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.
  - 4) 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
  - 5) 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 非ポリグルタミン型優性遺伝性脊髄小脳変性症 第46回日本神経病理学会学術研究会 宇都宮、2005年5月12日から14日
  - 2) 石川 欽也ら 16番染色体長腕連鎖型優性遺伝性小脳皮質萎縮症(16q-ADCCA)の臨床・病理・遺伝的特徴 第46回日本神経学会総会、鹿児島、2005年5月25日から27日
  - 3) 石川 欽也ら 本邦に高頻度に存在し、創始者効果を認める第16番染色体長腕連鎖型常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症(16q-ADCA)の原因遺伝子探索 日本人類遺伝学会第50回大会、倉敷、2005年9月19日から22日
  - 4) Ishikawa K., et al. A single nucleotide substitution in the 5'-UTR in the gene encoding spectrin repeat and Rho guanine nucleotide exchange factor domains is strongly associated with autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1. *American Society of Human Genetics, 55<sup>th</sup> Annual Meeting, Salt Lake 市、2005年10月25日から29日*
  - 5) Ishikawa K. Clinical and molecular genetics of autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1. *Ataxia 2005, Gold Coast, Australia, 2005年11月3日から5日.*
  - 6) 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
  - 7) 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
  - 8) 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
  - 9) 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
  - 10) 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
  - 11) 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*
  - 12) 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*
  - 13) 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*
  - 14) 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

- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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  $\alpha 1A$  カルシウムチャン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
- 22) 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
- 23) 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

## 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** 本研究では、副腎白質ジストロフィーに対する治療薬開発のための基礎研究として、1) 植物フラボノイド (Baicalein 4, 5, 6-trimethyl ether; BTM) の ALD 治療薬としての可能性とその作用機序の解析、2) 変異 ALDP の細胞内動態と機能不全、3) ヒト中枢神経系グリア細胞株を用いた ALD モデル細胞の作製とその生化学的解析についてそれぞれ検討を行った。その結果、BTM はペルオキシソーム脂肪酸β酸化系を活性化することにより、極長鎖脂肪酸代謝改善作用をもつことが明らかとなった。一方、ミスセンス変異 ALDP の中にはミスターゲットやプロテアソームでの分解によりその機能を発現しない変異が存在していた。また ALDP をノックダウンしたグリア細胞株を用いた実験では、極長鎖脂肪酸β酸化活性の減少以外に、脂肪酸延長反応の亢進やコレステロール代謝異常が認められ、ペルオキシソーム以外のオルガネラの代謝にも影響していることが推察された。中枢神経系細胞における ALD モデル細胞を用いた生化学的解析により、発病メカニズムに基づいた治療薬開発が期待される。

### A. 研究目的

現在、副腎白質ジストロフィーALD に対する有効な治療薬はなく、リスクを伴う骨髄移植に頼らなければならないのが現状である。これまで我々は植物フラボノイドのバカレイン誘導体 (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をもつことを報告した。さらに有効な化合物を見出すため、BTM の構造活性相関やその作用機序を解析した。さらに、ミスセンス変異 ALDP の機能欠損の仕組みについて検討した。一方、中枢神経系細胞における ALDP 機能欠損による代謝異常について検討し、有用な ALD 病態モデル細胞の取得とアッセイ系の確立を目的とした。

### B. 研究方法

ALD 遺伝子に特異的な shRNA を作製し、ヒトグリア細胞株にトランスフェクションして ALDP を特異的にノックダウンした。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。脂肪酸β酸化活性は、[1-<sup>14</sup>C]リグノセリン酸 (C24:0) を基質として使用し、酸可溶性画分の放射活性を測定することにより行った。一方、C24:0 からのヘキサコサン酸 (C26:0) の合成は、[1-<sup>14</sup>C]C24:0 を基質として使用して細胞を代謝ラベルし、細胞の脂質抽出画分を TLC

により分離した後、BAS5000 で放射活性を定量することにより行った。またコレステロールの合成は [2-<sup>14</sup>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。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、各タンパク質の mRNA の発現はリアルタイム PCR により定量化した。

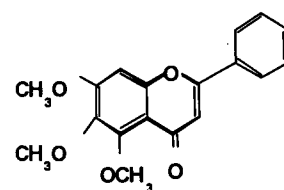
(倫理面での配慮)

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

#### 1) BTM の脂肪酸β酸化に対する作用機構の解析

BTM をリード化合物として合成した様々な構造類似体について極長鎖脂肪酸β酸化活性を測定した結果、5, 6, 7 位のメトキシ基が活性発現に必須であることが示された。



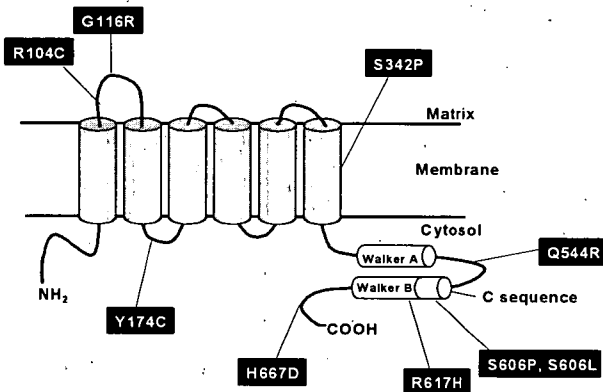
**BTM**

この BTM を健常者、ALD 患者、Zellweger 患者および carnitine acylcarnitine translocase (CACT) 欠損の線維芽細胞に処理し、それぞれ脂肪酸β酸化への影響を解析した。その結果、BTM は炭素鎖の長さに関わらず

ルオキシソームでの脂肪酸 $\beta$ 酸化活性を促進する効果があることが認められた。一方、ミトコンドリアの脂肪酸 $\beta$ 酸化系に対しては抑制的に働いた。またBTMの効果は、ペルオキシソームに局在する極長鎖脂肪酸CoA化酵素ACSVL1の発現増加を介して起こっている可能性が考えられた。

### 2) 変異ALDPの細胞内動態と機能不全

ALD患者で報告されているミスセンス変異ALDP(下図)を患者由来線維芽細胞及びCHO細胞に発現し、その細胞内動態を調べた。その結果、ペルオキシソームに正常に局在化する変異(R104C, G116R, S342P, Q554R, S606P)、ミスターゲットを起こす変異(Y174C)、細胞内で分解される変異(R617H, H667D)が認められた。分解される変異ALDPはプロテアソーム阻害剤存在下で回復することから、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。



### 3) ALDモデル細胞の作製と脂質代謝異常

ALDPの発現量を20%まで減少させたALDPノックダウングリア細胞ではC26:0含量の増加とともに、C24:0の $\beta$ 酸化活性も30%程度まで減少した。さらに $[1-^{14}C]$ C24:0で細胞を代謝ラベルした結果、炭素鎖の短い脂肪酸への放射活性の取り込みの減少とともに、ヘキサコサン酸(C26:0)への取り込みの増加が認められた。また脂肪酸延長反応の律速酵素であるelongase 1, 4, 5, 6のmRNAの発現の増加が認められた。

一方、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こっている可能性が考えられた。

### D. 考察

BTMはACSVL1の発現などを介してペルオキシソームの脂肪酸 $\beta$ 酸化系を活性化していることが推察された。今後、ミトコンドリアの脂肪酸 $\beta$ 酸化の阻害活性が低い構造類似体の合成が必要である。また、ミスセンス変異ALDPの局在化や安定性を正常化させる化合物が、ALDP分子としての機能を回復させる可能性が推察された。一方、グリア細胞における極長鎖脂肪酸の蓄積には、ペルオキシソームにおける極長鎖脂肪酸の減少とともに、脂肪酸延長反応の亢進も関与している可能性が示唆された。またコレステロール代謝にも異常が起こっていることが示唆されたことから、ALDPの機能欠損はペルオキシソームだけでなく、他のオルガネラの代謝にも異常を引き起こしていると推察された。

### E. 結論

BTMをリード化合物としてさらに極長鎖脂肪酸代謝に対して効果の高い化合物の探索が期待される。さらに、極長鎖脂肪酸の蓄積には $\beta$ 酸化以外に脂肪酸延長反応が関与している可能性が考えられた。また、変異ALDPの機能欠損の一部は安定性の低下が原因と考えられた。これらのことから、脂肪酸延長反応の亢進や変異ALDPの安定性を指標にした治療薬開発も有効かもしれない。一方、ALDP機能欠損はコレステロール代謝にも異常を引き起こしていることが示唆され、このような代謝異常が神経変性と関連している可能性が考えられた。今後は、中枢神経系でのモデル細胞を用いてALDP機能欠損と神経変性との関連性を解析し、発病メカニズムに基づいたALD治療薬のアッセイ系の確立が必要である。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kashiwayama, Y., Asahina, K., Shibata, H., Morita, M., Murtau, A. C., Roscher, A. A., Wanders, R. J. A., Shimozawa, N., Sakaguchi, M., Kato, H., and Imanaka, T.: Role of Pex19p in the targeting of PMP70 to peroxisome. *Biochim. Biophys. Acta* 1746: 116-128, 2005.
- 2) Suzuki, Y., Takemoto, Y., Shimozawa, N., Imanaka, T.,



- Kato, S., Furuya, H., Koga, M., Kato, K., Hashimoto, N., Onodera, O., and Tsuji, S.: Natural history of X-linked adrenoleukodystrophy in Japan. *Brain Dev.* 27: 353-357, 2005.
- 3) 守田雅志, 今中常雄: 脂質代謝異常と神経変性疾患. *実験医学(増刊): ダイナミックに新展開する脂質研究*. 23: 1020-1026, 2005.
  - 4) 柏山恭範, 今中常雄: ペルオキシソーム ABC 蛋白質と脂肪酸代謝. 「ABC 蛋白質」植田和光編著, 学会出版センター, 東京, 159-187, 2005.
  - 5) 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.
  - 6) 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: 163201643, 2007.
  - 7) 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.
  - 8) 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.
  - 9) 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.
  - 10) Morita M.: Adrenoleukodystrophy: Molecular pathogenesis and development of therapeutic agents. *Yakugaku Zasshi* 127: 1059-1064, 2007.
  - 11) 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) 高橋則正, 原山雄太, 前田尚啓, 守田雅志, 今中常雄: 副腎白質ジストロフィー: 変異型ペルオキシソーム ABC タンパク質 ALDP の細胞内動態. 第 27 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2005, 11, 京都.
  - 2) 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.
  - 3) 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.
  - 4) 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.
  - 5) 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.
  - 6) 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.
  - 7) 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. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許出願
  2. 実用新案登録
  3. その他  
なし
- F. 健康危険情報  
該当なし

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

小児大脳型副腎白質ジストロフィーの初発部位による神経心理・生理学的検査の特徴：

極早期発症診断への応用と造血幹細胞移植後の長期経過

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

中村雅子 東京大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科

研究要旨：骨髄移植治療前の小児大脳型 ALD 児と臨床的無症状の発症前 ALD 男児において、視覚系神経心理検査、視覚誘発電位 (VEP) と視覚性事象関連電位 (ERP) P1 成分を検討した。発症前男児の一部では、PIQ が VIQ より有意に低値という後頭部優位型と同様のパターンを示し、特に乖離の大きい例で VEP と ERP P1 成分の高振幅の程度が高いことより後頭葉の機能異常が疑われ、潜在的発症を捉えている可能性が示唆された。発症前男児において、視覚系心理検査と VEP の経過を追うことが極早期発症診断に有用である可能性がある。

A. 研究目的

小児大脳型副腎白質ジストロフィーの 85%は後頭葉白質に病変が初発し、視覚障害や知的退行、行動変化で発症することが多い。発症後は急速に神経症状が進行するが、発症早期の造血幹細胞移植により進行の停止が得られるとされている。遺伝子型から臨床病型や経過を予測することができないため、移植療法の有効性を高めるためには、発症の有無を早期に見極める必要がある。

幹細胞移植治療前の神経心理学的検査と視覚誘発電位検査 (VEP) につき小児大脳型 ALD の初発部位毎の特徴を見出すこと、また臨床的および画像上無徴候と考えられた発症前男児では、覚醒・注意レベルの関与を考慮した事象関連電位 (ERP) の P1 成分の

解析も行い、既発症例の特徴と比較することが小児大脳型 ALD の極早期発症診断に有用であるか否か検討することを目的とした。

B. 研究方法

本研究班のプロジェクトを通じて 2001 年 1 月から 2007 年 12 月に国立精神・神経センター武蔵病院小児神経科を受診した男児 28 名のうち、幹細胞移植療法前の 22 名（後頭部優位型（以下 O 型）11 例、前頭部優位型（以下 F 型）3 例、無症状（以下 A 型）8 例）を対象とした。神経心理検査は、主に Wechsler 系知能検査を行い、一部には K-ABC や Frostig 視知覚発達障害検査等も行った。視覚系神経生理学的検査は閃光刺激による視覚誘発電位 (F-VEP) と、一部には図形反転刺激による視覚誘発電位 (PR-VEP)

を施行し、P100 成分の潜時と振幅を計測した。ERP は既知漢字・未知漢字を弁別させる oddball 課題を施行し、非標的刺激に対する P1 潜時と振幅を計測した。

(倫理面への配慮) 被検者本人と保護者にあらかじめ研究の意義と方法について十分に説明をおこない、同意を得た。

### C. 結果

1. 神経心理学的検査：O 型では、VIQ は 9 例中 6 例正常、3 例低値であり、いずれも PIQ が VIQ より有意に低く乖離していた。F 型は、VIQ、PIQ とともに低値であった。A 型は、全例 VIQ は正常であったが、3 例で PIQ が有意に低く、O 型同様のパターンを呈した。A 型で PIQ の低値例は、絵画完成、積み木模様課題と Frostig 視知覚検査の形の恒常性課題が低成績で、K-ABC の同時処理尺度が継次処理尺度より低得点であった。

2. 神経生理学的検査：F-VEP では、O 型の 11 例中 6 例で潜時延長、1 例で振幅増大を認めた。F 型では、潜時、振幅ともにほぼ正常範囲内であった。A 型のうち 4 例は、潜時正常かつ高振幅であり、心理検査上 VIQ と PIQ の乖離の大きい例では特に著明な高振幅であった。PR-VEP は A 型の 3 例に施行し、F-VEP と同様に高振幅であった。ERP P1 成分の潜時は、A 型と健常児とに差がなかった。健常者では年齢とともに P1 低振幅化の傾向を示したが、A 型の一部では高振幅のままで、VEP 高振幅例と一致していた。

発症前男児における PIQ と VIQ の乖離、VEP P100 と ERP P1 成分の高振幅は後頭葉から初発する小児大脳型 ALD の潜在的発症を示唆する機能障害の可能性がある。

#### D：研究発表

##### 1. 論文発表

1) Inagaki M, Kaga Y, Kaga M, Nihei K: Multimodal evoked potentials in patients with pediatric leucodystrophy. Clin Neurophysiol. 2006;59 Suppl: 251-63

2) 古島わかな、稲垣真澄、軍司敦子、加我牧子、山崎広子、堀口寿広：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誘発電位の有用性。脳と発達 (in press)

#### 2. 学会発表

1) Kaga M, Inagaki M, Suzuki D, Gunji A, Inoue Y, Ishiguro A: Evoked potentials in patients with frontal and occipital type of childhood adrenoleucodystrophy. The 18th International Congress of Clinical Neurophysiology. Edinburgh, UK Sep, 2006

2) 古島わかな、稲垣真澄、加我牧子、鈴木康之：副腎機能不全が先行した副腎白質ジストロフィーの 4 小児例。第 110 回日本小児科学会。平成 19 年 4 月 (京都)

3) 古島わかな、稲垣真澄、軍司敦子、中村雅子、井上祐紀、加我牧子、鈴木康之：臨床的視覚症状を認めない ALD 男児における視覚認知機能検査の有用性。第 49 回日本小児神経学会。平成 19 年 7 月 (大阪)

4) Kaga M, Inagaki M, Furushima W, et al.: Visual cognitive functions in patients with childhood ALD without visual symptoms: efficacy of visual evoked potential. 48<sup>th</sup> Ann meeting of the European Society for Paediatric Research, Prague, Czech Republic. Oct, 2007

E：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

F：健康危険情報 なし

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

東海大学における副腎白質ジストロフィー（ALD）に対する造血幹細胞移植

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・教授）

研究協力者 矢部普正、矢部みはる（東海大学医学部基盤診療学系）、高倉広充、森本 克、清水崇史、小池隆志（同小児科）、柳町徳春（同放射線科）、松本正栄、井上裕靖、浜之上聡（現神奈川県立こども医療センター）、加我牧子（国立精神神経センター）

**研究要旨**

東海大学において 1996 年～2007 年に造血幹細胞移植を施行した副腎白質ジストロフィーの患者 17 例について、その臨床的特徴、移植方法、移植結果、治療効果を検討した。

前処置に用いられる薬剤のうちブスルファンは、免疫抑制という観点では優れているものの、中枢神経毒性がある点が問題である。そこで、TAI 12 Gy（6 分割、睾丸シールド）、L-PAM 70 mg/m<sup>2</sup> x 3 日、抗胸腺細胞グロブリン（ATG）1.25 mg/kg x 4 日による前処置を検討したところ、中枢神経毒性がなく、今後の移植前処置として使用できる可能性が示唆された。

移植による効果は、これまで指摘されているように、移植直前の進行度によるところが大きく、早期あるいは中期に移植を実施できた症例ほど臨床的な効果が大きいことが確認された。

**A. 研究目的**

東海大学においては当研究班が発足する前から副腎白質ジストロフィー（以下 ALD）症例に対する造血幹細胞移植を積極的に行ってきたが、研究班発足後にも症例が蓄積され、症例数の増加とともに経過観察期間が延びたことから、あらためてこれまでの移植例について詳細な検討を行った。

**B. 研究方法（移植症例）**

1) 移植時期；1996 年 2 月から 2007 年 10 月までに東海大学において造血幹細胞移植が実施された 17 例の男児を対象とした。

2) 年齢；移植時の年齢は 4～13 歳で、中央値は 10 歳であった。発症時の年齢は 3～11 歳で、診断時年齢は 1～12 歳であった。

3) 病期；移植時の症状の進行度は、臨床症状発症前 2 例、初期 2 例、中期 3 例、進行期 4 例であり、移植直前の MRI スコア（Loes 法）は 0～21.5 点（中央値 7.5 点）に分布していた。

4) ドナーと移植細胞源；HLA 一致血縁者が 6 例（骨髄 5 例、臍帯血 1 例）、HLA 不一致血縁者が 4 例（骨髄）、HLA 一致非血縁者が 2 例（骨髄）、HLA 不一致非血縁者が 5 例（骨髄 1 例、臍帯血 4 例）であった。

**C. 研究結果（移植結果）**

1) 移植前処置；BU+CY+ATG±TAI が 7 例、

CY+ATG+TAI が 1 例、LPAM+ATG+TAI が 8 例、LPAM+Flu+ATG±TAI が 2 例であった。

\*BU（ブスルファン）、CY（エンドキサン）、ATG（抗胸腺グロブリン）、TAI（橋腹部照射）、LPAM（メルファラン）

2) GVHD 予防；CYA±MTX±PSL が 8 例、FK+MTX/PSL が 9 例で、T 細胞除去+CYA が 1 例であった。

\*CYA（サイクロスポリン）、MTX（メソトレキセート）、PSL（プレドニン）、FK（タクロリムス）

3) 移植細胞数；骨髄移植においては 3.34x10<sup>8</sup>/kg（0.81～5.26）、臍帯血移植においては 2.88x10<sup>7</sup>/kg（2.76～2.94）の有核細胞が移植された。

4) 生着；13 例において移植細胞の生着が得られたが、4 例で拒絶され、2 例において再移植により生着が得られた。13 例においてはドナー完全キメラ、1 例で混合キメラであった。

拒絶された 4 例の移植内容は、2 例が HLA 不一致の血縁者からの T 細胞除去骨髄移植、2 例が HLA 不一致の非血縁者間臍帯血移植であった。

5) GVHD；急性 GVHD は 0～I 度で、予防法による差はなかった。慢性 GVHD は 1 例にも認めなかった。

6) 前処置による急性毒性；前処置中の意識状態をブスルファン使用 7 例中 4 例に認め、