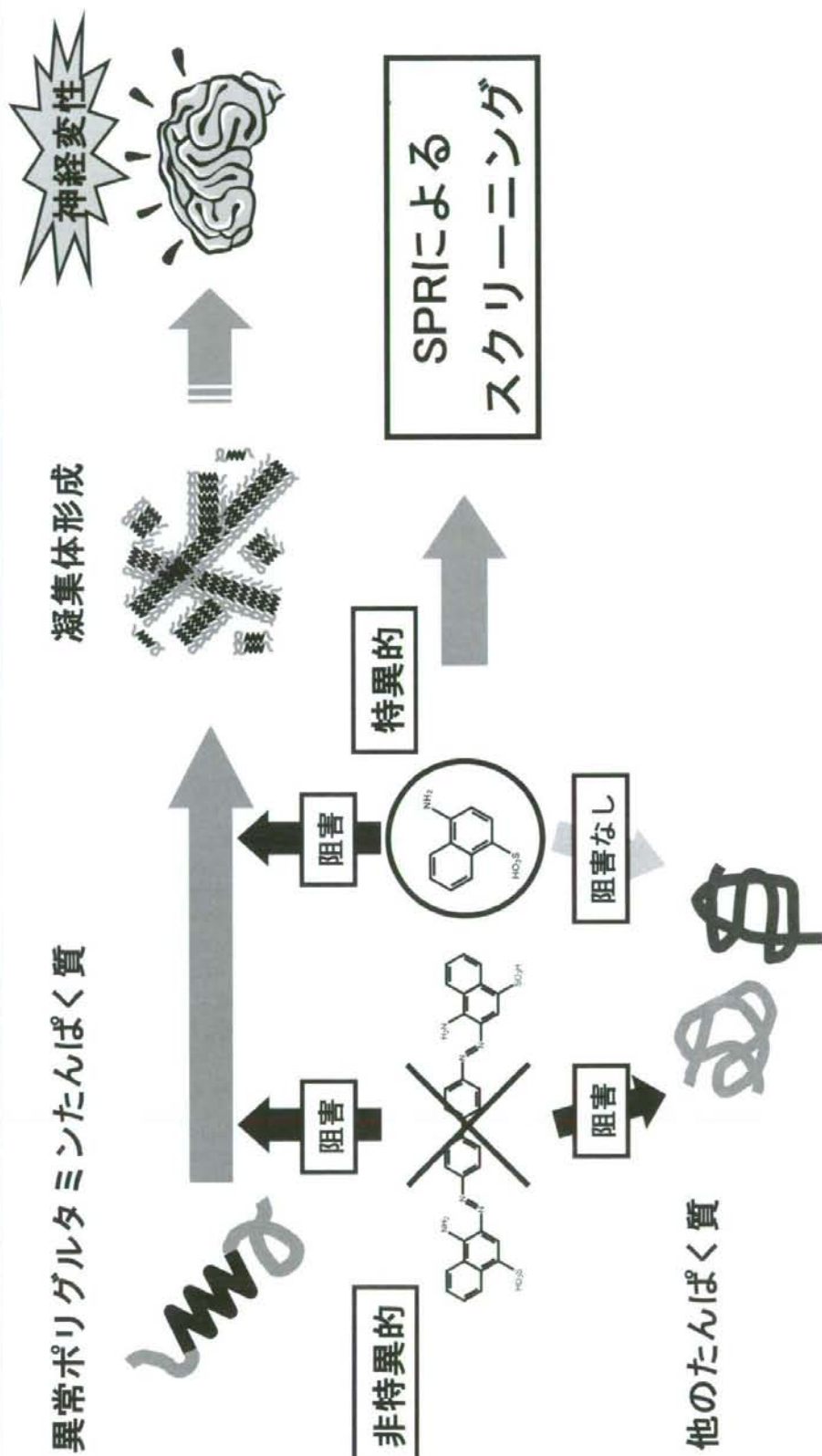


表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いた 特異的ポリグルタミン凝集阻害化合物のスクリーニング



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

脊髄小脳変性症遺伝子治療用ウイルスベクターの開発

分担研究者	平井 宏和	群馬大学大学院医学系研究科
研究協力者	寅嶋 崇	群馬大学大学院医学系研究科
	大上 美穂	群馬大学大学院医学系研究科
	飯塚 朗	群馬大学大学院医学系研究科
	山口 晴保	群馬大学大学院医学系研究科

研究要旨

遺伝性脊髄小脳変性症は根本的な治療法が確立していない。しかし、近年の研究により分子レベルから病態解明が急速に進み、それに基づく治療への道筋も明らかになりつつある。とくに、培養細胞に原因遺伝子を発現させた実験系により、分子シャペロンやユビキチンプロテアソーム系を促進する遺伝子を発現させることで、原因遺伝子産物の毒性及び細胞死を抑制できることが報告され、治療への応用が期待されている。レンチウイルスベクターは遺伝子導入効率が高く、遺伝子発現も長期にわたるため、遺伝子治療ベクターとしての臨床応用が期待されている。本研究ではレンチウイルスベクターの臨床応用に向けて、プルキンエ細胞選択的遺伝子発現ベクターの開発を試みるとともに、その副作用について検討した。

A. 研究目的

(1)プルキンエ細胞に優先的に遺伝子発現するプロモーターを、レンチウイルスベクターを用いて検討する。

(2)レンチウイルスベクターの臨床応用を考えた場合、感染による細胞障害が大きな問題となる。たとえば、アデノウイルスベクターを幼弱マウスの小脳皮質に接種するとかなりの細胞障害が観察される。そこで、高力価のレンチウイルスベクターを生後 0 日のラットの小脳皮質に接種し、プルキンエ細胞の発達を観察することでレンチウイルスベクターの細胞障害性を評価する。

(3)レンチウイルスベクターはレトロウイルスよりはるかに可能性は少ないものの挿入変異によるガン化誘導など、致命的な障害を惹起する可能性が否定できない。そこで、プロウイルスを染色体に組み込む役割をもつインテグレースに変異を導入することで挿入変異の確立を大幅に軽減するベクターを作製する(Nonintegrating vector, NI ベクター)。このウイ

ルスベクターの宿主染色体へのプロウイルス組み込み能力、遺伝子発現能力及び持続性について検討する。

B. 研究方法

(1)MSCV, CMV, CAGあるいはRSVプロモーターのいずれかを GFP 発現レンチウイルスベクターに組み込み、各ウイルス粒子を得てマウス小脳皮質に接種した。10日後に小脳皮質を観察し、プルキンエ細胞への遺伝子発現の選択性を検討した。

(2) 1×10^{10} TU(Transduction unit)/ml の GFP 発現レンチウイルスベクター $5 \mu\text{l}$ を、生後 0 日のラットの小脳皮質に接種した。生後 21 日の時点で、小脳スライスを作製し、ホールセルパッチクランプ法にてウイルス感染プルキンエ細胞を解析した。このときにLucifer yellowを加えた記録電極を用いることで、プルキンエ細胞を蛍光標識し、電気生理解析後に固定した。次に、GFP 発現プルキンエ細胞の形態を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、プルキンエ細胞の

発達に変化がないかを検討した。

(3) レンチウイルスのインテグレースに D64V の変異をもつ GFP 発現 NI ベクターコンストラクトを作製した。これを用いてウイルス粒子を産生し、HeLa 細胞に感染させ、HeLa 細胞染色体へのプロウイルス組み込みの程度を、野生型インテグレースをもつレンチウイルスベクターと比較した。さらに GFP 発現 NI ベクターをマウス小脳皮質に接種し、2 ヶ月後に小脳皮質における GFP 発現の程度を検討した。

C. 研究結果

(1) MSCV プロモーターを用いるとプルキンエ細胞に優先的に遺伝子発現することが明らかとなった。一方、RSV プロモーターを用いると、ほぼ選択的なバークマングリアへの遺伝子発現が観察された。

(2) 生後 0 日でレンチウイルスベクターの接種を受けたラットのプルキンエ細胞は、生後 21 の時点では未感染プルキンエ細胞とほとんど見分けがつかないほどよく発達していた。しかし、樹状突起の長さをコンピューターソフトで解析したところ、ウイルス感染したプルキンエ細胞の樹状突起の長さは約 10% 短かった。これは、ウイルス感染の直接的影響も完全に否定できないが、プルキンエ細胞の発達期に GFP を過剰発現させたためと推測される。パッチクランプ解析では、シナプス機能、シナプス成熟、膜抵抗、膜容量に有意な変化は見られなかった。以上より、レンチウイルスベクター感染による神経障害は、たとえあるとしてもかなり軽微であることが明らかとなった。

(3) GFP 発現 NI ベクターあるいは、GFP 発現野生型ベクターを HeLa 細胞に感染させ、Alu-LTR real-time nested PCR assay によりプロウイルスの組み込みの程度を検討したところ、NI ベクターの組み込み能力は野生型の 1000 分の 1 であった。この NI ベクターをマウス小脳皮質に接種し、2 ヶ月後に小脳皮質における GFP 発現の程度を検討したところ、野生型ベクターによる GFP 発現とほとんど差が見られなかった(図参照)。

D. 研究発表

1. 論文発表

Takayama K, Torashima T, Horiuchi H, Hirai H: Purkinje-cell-preferential transduction by lentiviral vectors with the murine stem cell virus promoter. *Neurosci Lett*, 443(1): 7-11, 2008.

Shiba K, Torashima T, Hirai H, Ogawa K, Akhter N, Nakajima K, Kinuya S, Mori H: Potential usefulness of D2R reporter gene imaging by IBF as gene therapy monitoring for cerebellar neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008 in press.

2. 学会発表

堀内始、寅嶋崇、高山清彦、飯塚朗、三ツ村一浩、飯野昌枝、小山知穂、平井宏和。レンチウイルスベクターを用いたマウス小脳核神経細胞への遺伝子導入。第 31 回日本神経科学大会、東京、2008 年 7 月 9 日

大上美穂、寅嶋崇、山口晴保、平井宏和。SCA3 モデルマウス小脳におけるポリグルタミン封入体の免疫電顕解析。第 31 回日本神経科学大会、東京、2008 年 7 月 10 日

高山清彦、寅嶋崇、堀内始、平井宏和。レンチウイルスベクターを用いたプルキンエ細胞選択的な GFP 発現。第 31 回日本神経科学大会、東京、2008 年 7 月 11 日

Takayama K, Torashima T, Horiuchi H, Hirai H. Purkinje-cell-selective transduction by the MSCV promoter incorporated in lentiviral vectors. *Neuroscience* 2008, Washington DC, Nov. 19, 2008.

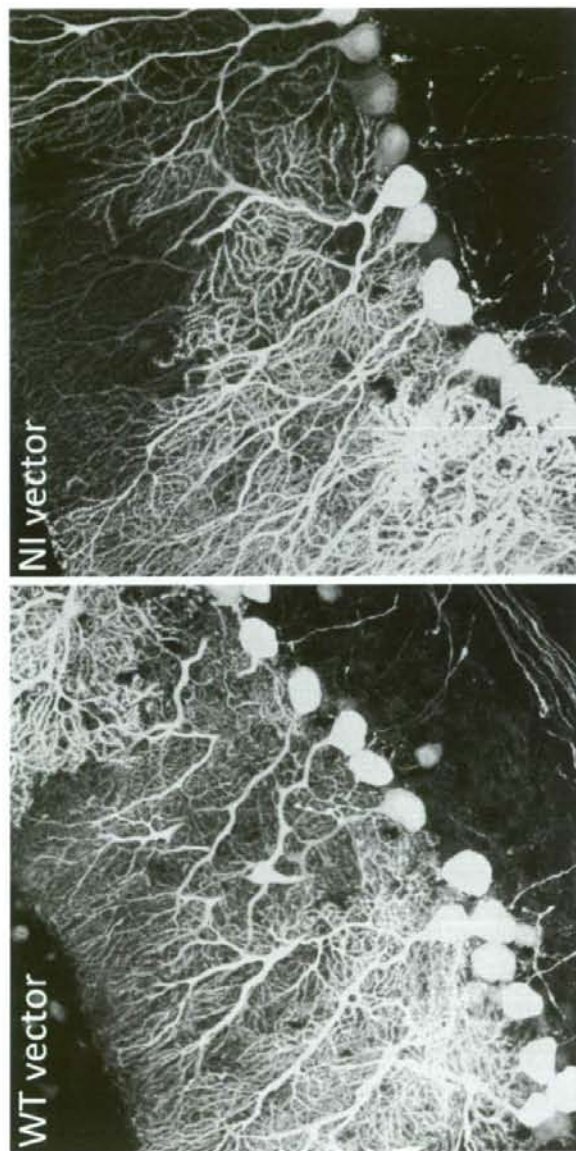
E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

該当なし

F. 健康危険情報

該当なし

■ GFP発現レンチウイルスベクター接種2カ月後のマウス小脳



野生型インテグラーゼまたは変異インテグラーゼをもつGFP発現レンチウイルスベクターを、マウスの小脳皮質に接種し2ヶ月後に小脳を観察した。インテグラーゼに変異をもち、プロウイルスの組み込み能力が1000分の1のベクター(右; NI vector)であってもGFP発現の程度は野生型インテグラーゼをもつベクター(左; WT vector)とほとんど変わりがなかった。すなわちNI vectorは挿入変異の割合が野生型の1000分の1と安全であり、かつ少なくとも2か月の時点までは遺伝子発現能力も野生型と同等であることが明らかとなった。

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

ポリグルタミン病の治療ターゲット探索のためのトランスジェニックマウスの開発・解析に関する研究

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	小山文隆	同上
	宮崎晴子	同上
	山田みず樹	同上
	黒沢大	同上

研究要旨

ポリグルタミン病の発症のごく初期に障害を受ける細胞を *in vivo* で標識し、FACS で精製する方法の開発を試みた。マウス $\beta 4$ プロモーター制御下で Venus を脳で発現するトランスジェニックマウス(TG)を確立した。線条体で強い発現を示す TG では $\beta 4$ を発現する線条体投射神経細胞で蛍光タンパク質が発現された。このマウスをハンチントン病モデルマウスと交配したところ、線条体では内在性の $\beta 4$ と同様に Venus の発現が強く抑制された。さらにこの TG の線条体から FACS で Venus 発現神経細胞を精製することができた。この方法によりポリグルタミン病発症のごく初期に障害を受ける神経細胞の単離が可能になり、*in vivo* の初期病変の同定にいたる可能性がある。

A. 研究目的

ポリグルタミン病の治療原理の開発には細胞レベルでの早期病変の理解が重要である。我々はハンチントン病(HD)モデルマウスの発症に先立ち顕著に発現が抑制される分子としてナトリウムチャンネル $\beta 4$ サブユニット($\beta 4$)を同定した。この分子は伸長 polyQ により発現抑制を直接受けるので、その発現細胞は最も早く障害されることができると考えられる。その神経細胞を単離し解析すれば、新たな治療ターゲットの同定につながると思われる。

本研究では、 $\beta 4$ プロモーター制御下で蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウス(TG)を作製し、目的の神経細胞が単離できるかどうかの検討を加えた。

B. 研究方法

マウス $\beta 4$ プロモーターの下流に Venus cDNA、イントロンおよびポリ A 付加シグナルを挿入したトランスジーンを構築した。約 400

個のマウス受精卵にトランスジーンを注入し TG を作製した。尻尾からゲノム DNA を調製し、PCR でファウンダーマウスを同定した。得られたファウンダーマウスから F1 マウスを作製した。各ラインから凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡と Western blot で Venus を発現するラインを選別した。トランスジーン発現は定量 RT-PCR および *in situ* ハイブリダイゼーションで解析した。蛍光標識された神経細胞の単離は線条体をパピイン処理し、fluorescence-activated cell sorter (FACS) で行った。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子組み換え、実験動物を用いる実験に該当する。独立行政法人理化学研究所の遺伝子組み換えおよび動物実験計画の承認を受け、研究所の実験動物指針に基づいてきてできる限り実験動物に苦痛を与えないように配慮した。

C. 研究結果

約 20 匹のファウンダーマウスから脳で Venus を発現する 6 ラインを同定した。それらは Venus を線条体で強く発現する、皮質で強く発現する、および線条体および皮質で強い発現を示すラインに大別できた。このことから、脳で $\beta 4$ プロモーター制御下で Venus を発現する TG を確立できたと考えた。線条体で強い発現を示す TG では $\beta 4$ を発現する線条体投射神経細胞で蛍光タンパク質が発現された。この TG を HD マウスと交配し double TG を作製した。Single TG、double TG の線条体より RNA を調製し、定量 PCR および *in situ* ハイブリダイゼーションで解析した。このマウスの線条体では内在性の $\beta 4$ と同様に Venus の発現が強く抑制された。さらに TG の線条体から FACS で Venus 発現神経細胞を精製することができた。以上の結果から、HD の発症のごく初期に障害を受ける細胞を *in vivo* で標識し、FACS で精製する方法を確立した。

D. 研究発表

1. 論文発表

Kaminosono, S., Saito, T., Oyama, F., Ohshima, T., Asada, A., Nagai, Y., Nukina, N. & Hisanaga, S. Suppression of mutant Huntingtin aggregate formation by Cdk5/p35 through the effect on microtubule stability. *J Neurosci* **28**, 8747-55 (2008).

Wong, H.K., Bauer, P.O., Kurosawa, M., Goswami, A., Washizu, C., Machida, Y., Tosaki, A., Yamada, M., Knopfel, T., Nakamura, T. & Nukina, N. Blocking acid-sensing ion channel 1 alleviates Huntington's disease pathology via an ubiquitin-proteasome system-dependent mechanism. *Hum Mol Genet* **17**, 3223-35 (2008).

Yamanaka, T., Miyazaki, H., Oyama, F., Kurosawa, M., Washizu, C., Doi, H. & Nukina, N. Mutant Huntingtin reduces HSP70 expression through the sequestration of NF- κ B transcription factor. *EMBO J* **27**, 827-39 (2008).

Khan, L.A., Yamanaka, T. & Nukina, N. Genetic impairment of autophagy intensifies expanded polyglutamine toxicity in *Caenorhabditis*

elegans. *Biochem Biophys Res Commun* **368**, 729-35 (2008).

Doi, H., Okamura, K., Bauer, P.O., Furukawa, Y., Shimizu, H., Kurosawa, M., Machida, Y., Miyazaki, H., Mitsui, K., Kuroiwa, Y. & Nukina, N. RNA-binding protein TLS is a major nuclear aggregate-interacting protein in huntingtin exon 1 with expanded polyglutamine-expressing cells. *J Biol Chem* **283**, 6489-500 (2008).

2. 学会発表

F. Oyama, H. Miyazaki, M. Kurosawa, M. Yamada and N. Nukina: Downregulation of sodium channel $\beta 4$ subunit in Huntington Disease transgenic mice. The 58th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Philadelphia, Pennsylvania, November 2008

小山文隆、宮崎晴子、黒沢大、山田みず樹、貫名信行: Downregulation of sodium channel $\beta 4$ in Huntington Disease transgenic mice. 第 31 回日本神経科学大会、第 31 回大会、東京、2008 年 7 月

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

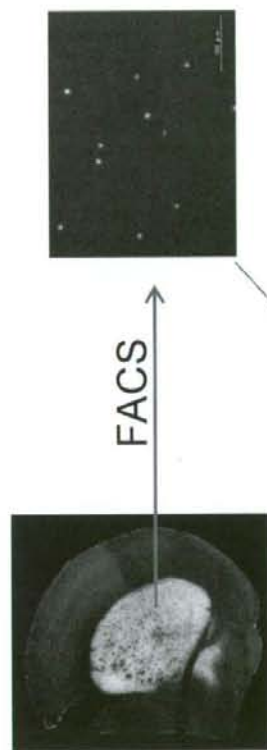
該当なし

F. 健康危険情報

該当なし

FACS-Based Neuropathology:β4 発現細胞の単離

Venus (β4)を発現する細胞がハンチントン病では発症初期に障害を受ける



DNA マイクロアレイ解析を行う
遺伝子発現の初期変化を同定する

伸長ポリグルタミンで障害を受ける神経細胞の特性を調べる

自然史研究グループ総括報告

プロジェクトリーダー 中島 健二（鳥取大学医学部脳神経内科）

自然史グループでは、MJD・SCA6の自然史に関する多施設共同研究をプロジェクト研究として行っている。これまでMJD36例、SCA6型49例が登録された。登録時の運動失調スコアとADLスコアは良い相関が見られ、臨床調査個人票の有用性/意義が確認できた。過去5年分の個票から抽出する後ろ向き研究では、集団としての年次変化を把握でき、経過予測に有用な自然史情報と考えられた。前向き研究では1年目ながら有意な変化が観察され、特にSARAの鋭敏性、有用性が確認できた。今後、継続調査/症例追加により、進行速度を規定する要因/病期などの詳細な解析が期待される。個別研究としては、鳥取大学からMSAにおける認知症についての研究、新潟大学からDRPLA150例の臨床経過に及ぼす要因についての後方視的研究が報告された。自然史把握のために更に精力的な研究が望まれる。

認知症を合併した多系統萎縮症の検討

分担研究者 中島健二（鳥取大学医学部脳神経内科）
共同研究者 北山通朗、和田健二、安井建一（同上）

研究要旨

多系統萎縮症 (MSA) は、MSA における認知機能障害については、その経過中主に前頭葉機能障害を示唆する報告は認められるものの、その臨床的特徴についての詳細な検討は少ない。本研究では、認知症を合併した MSA について、その臨床的特徴および ^{123}I -MIBG 心筋シンチグラフィについて検討した。対象は 1996 年から 2008 年までに鳥取大学医学部附属病院脳神経内科に入院し、MSA と診断された 69 症例とした。臨床分類は、MSA-C 54 例 (78%)、MSA-P 15 例 (22%) であり、11 例 (15%) に認知症の合併を認めた。そのうち小脳性運動失調、錐体外路徴候、自律神経障害などの MSA の症候に先行して認知症を認めた症例が 3 例 (4%) 存在した。認知症を合併した MSA 群 (MSA (D+)) と認知症を合併していない MSA 群 (MSA (D-)) を比較すると、検索時年齢、性別、発症年齢、罹病期間、ICARS には有意な差が認められなかった。 ^{123}I -MIBG 心筋シンチグラフィでは、心縦隔比において MSA (D-) 群に比べ MSA (D+) 群において有意に低下していた。MSA (D+) 群の認知症の特徴としては、計算力、語想起、理解、数唱の低下が中心であったが、MSA の発症に先行して認知症を認めた 3 例では、他の 7 例に比べ見当識障害、記憶力障害、構成失行が著明であり、画像所見上でも脳萎縮、大脳深部白質の変化が強い傾向が認められた。MSA における認知機能障害の原因は、他の認知症の合併の可能性も考えられた。

A. 研究目的

多系統萎縮症 (MSA) は、小脳性運動失調、錐体外路徴候、錐体路障害、自律神経障害を中核症状とする神経変性疾患である。近年、病理学的特徴であるグリア細胞質内封入体が α -synuclein を構成成分とすることが明らかとなり、Lewy 小体病とともに α -シヌクレイノパチーとしても分類されるようになった。

MSA における認知機能障害については、主に前頭葉機能障害を示唆する報告は散見されるものの、その臨床的特徴についての詳細な検討は少ない。

今回、認知症を合併した MSA について、臨床的特徴および ^{123}I -MIBG 心筋シンチグラフィについて検討した。

B. 研究方法

対象は 1996 年から 2008 年までに鳥取大学医学部附属病院脳神経内科に入院し、MSA と診断された 69 症例とした。

MSA の診断基準は、Gilman ら (1999) による診断基準を用い、probable MSA を対象とした。認知症の診断は DSM-IV および Clinical Dementia Rating 1.0 以上とした。

^{123}I -MIBG 心筋シンチグラフィは、心縦隔比 (H/M)、Washout rate (WR) を測定した。

認知症の有無により、認知症を合併した MSA 群 (MSA (D+)) と認知症を合併していない MSA 群 (MSA (D-)) に分類し、臨床分類、性別、発症年齢、罹病期間、ICARS、MMSE、HDS-R、 ^{123}I -MIBG 心筋シンチグラフィ等について比較検討した。

C. 研究結果

MSA 69 症例のまとめを表 1 に示す。

表 1 MSA 69 症例のまとめ

検索時年齢 (y)	63.1 ± 8.4 (mean ± SD)
発症年齢 (y)	59.5 ± 8.8
性別 (男:女)	34:35
罹病期間 (y)	3.6 ± 2.4
ICARS (n=44)	47.4 ± 21.5
HDS-R (n=55)	25.4 ± 5.4
MMSE (n=43)	26.0 ± 4.6
^{123}I -MIBG 心筋シンチ (n=40)	
H/M 早期像	2.15 ± 0.40
後期像	2.10 ± 0.52
Washout rate	30.5 ± 7.6

臨床分類は、MSA-C 54 例 (78%)、MSA-P 15 例 (22%) であった。11 例 (15%) に認知症の合併を認め、そのうち小脳性運動失調、錐体外路徴候、自律神経障害などの MSA の症候に先行して認知症を認めた症例が 3 例 (4.5%) 存在した。

MSA (D+) 群と MSA (D-) 群を比較すると、検索時年齢、性別、発症年齢、罹病期間、ICARS には統計学的に有意な差は認められなかった (表 2)。

表 2 認知症の有無による比較

	MSA (D-)	MSA (D+)	p value
検索時年齢 (歳)	63.8 ± 8.7	64.2 ± 6.7	0.145
発症年齢 (歳)	59.6 ± 9.1	60.0 ± 6.2	0.258
性別 (男/女)	29 / 29	5/6	0.178*
罹病期間 (年)	3.4 ± 2.2	4.2 ± 2.6	0.523
ICARS	46.3 ± 19.8	51.1 ± 24.9	0.419
HDS-R	27.0 ± 2.4	21.0 ± 5.3	< 0.001
MMSE	27.8 ± 2.4	20.3 ± 4.8	< 0.001

p-value: Mann-Whitney U test * chi square test

¹²³I-MIBG 心筋シンチグラフィ（早期像 H/M, 後期像 H/M, WR）は, MSA (D+) 群では 1.81 ± 0.3 , 1.68 ± 0.5 , $34.7 \pm 8.8\%$ であったのに対し, MSA (D-) 群では 2.27 ± 0.4 , 2.23 ± 0.5 , $28.9 \pm 6.7\%$ と MSA (D+) 群において有意に低下していた。

MSA (D+) 群 11 症例のまとめを表 3 に示す。認知症の特徴としては, 計算力, 語想起, 理解, 数唱の低下が中心であった。また, MSA の発症に先行して認知症を認めた 3 例では, 他の 7 例に比べさらに見当識障害, 記憶力障害, 構成失行が著明であり, 画像所見上でも脳萎縮, 大脳深部白質の変化が強い傾向が認められた。

表 3 認知症を伴う MSA 11 例のまとめ

性 別	発症 年齢 (年)	罹病 期間 (年)	ICARS	MMSE	前頭葉 萎縮	白質 変化	H/M (早期/後期)	
1	F	71	2	32	23	+	-	1.88/1.72
2	F	52	2	45	24	+	-	1.73/1.43
3	F	54	3	33	22	+	-	2.04/2.29
4	M	53	3	49	21	++	-	1.61/1.38
5	M	62	5	53	20	+	-	1.82/2.09
6	F	58	6	90	23	+++	-	1.34/1.04
7	M	59	7	71	21	++	-	1.43/1.13
8	M	45	10	96	6	+++	++	2.49/2.54
9	F	58	3	23	18	+++	+	2.06/1.58
10	M	64	4	94	9	++	++	1.47/1.21
11	F	69	6	34	18	+++	+++	2.38/2.37

Case 9 - 11: 認知症が先行発症

合併の可能性も考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

European Journal of Neurology に掲載予定

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

D. 考察

当院入院患者における MSA 患者のうち, 認知症を合併している MSA は 15% に認められた。認知症を合併している MSA の中には認知症が先行する症例も認められ, 経過とともに認知症が発症した群に比べ, 認知症の特徴や, 画像所見に差が認められた。このことは MSA における認知機能障害の原因は, 他の認知症の合併の可能性も考えられた。

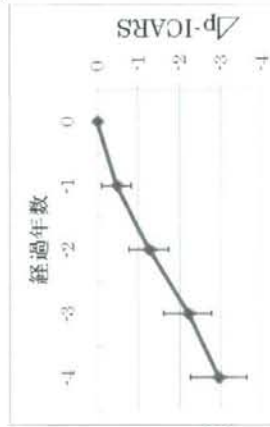
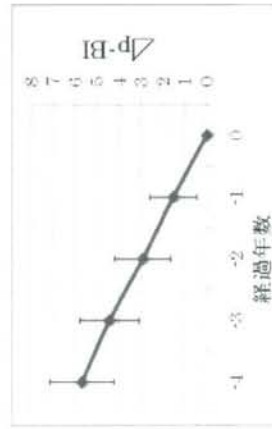
また, 認知症を合併している MSA では ¹²³I-MIBG 心筋シンチグラフィに差が認められた。このことは, 認知症を合併している MSA はより強い心臓交感神経障害を有している可能性があると考えられた。

E. 結論

- (1) 認知症を伴う MSA について検討した。
- (2) 認知症を伴う MSA は MSA 全体の約 15% であり, 臨床病型はすべて MSA-C であった。
- (3) 認知症を伴う MSA の中には, 初発症状として認知機能障害から発症する症例が存在する。
- (4) 認知症を伴う MSA の認知機能障害の特徴は, 計算力, 語想起, 理解, 数唱の低下が中心であった。認知機能障害から発症する症例では, 加えて見当識障害, 記憶力障害, 構成失行が著明であった。
- (5) MSA における認知機能障害の原因は, 他の認知症の

【多施設共同MJD・SCA6 自然史研究】

小脳変性症の自然経過を前向き縦断的に調査しています。



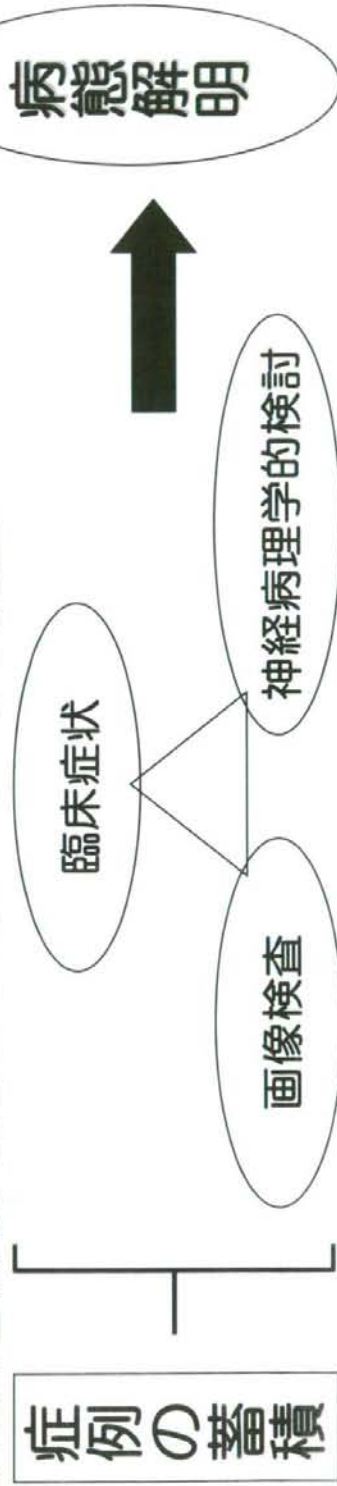
臨床情報データベース

登録～
一年毎の調査

患者臨床情報

【認知症を合併したMSAの検討】

認知症を合併したMSAについての調査



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

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)の臨床経過に及ぼす要因についての検討

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	長谷川 有香	西新潟中央病院神経内科
	池内 健	新潟大学医学部生命科学リソース研究センター
	小池 亮子	西新潟中央病院神経内科
	小野寺 理	新潟大学医学部生命科学リソース研究センター

研究要旨

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症(dentatorubral-pallidoluysian atrophy, DRPLA)の自然史を明らかにする目的で、遺伝子診断にて確定された150例について臨床徴候および長期経過について検討した。DRPLA遺伝子の増大CAGリピート数は、発症年齢および各臨床徴候の出現年齢と強く相関していた。増大CAGリピート数は、車いすが必要となった年齢、死亡時年齢、および発症から車椅子になるまでに期間との間にも相関を示した。増大CAGリピート数は発症年齢のみならず、発症後の病気の進行にも影響を与えていると考えられたが、その相対的な寄与は比較的軽度であり、増大CAGリピート数以外の要因も関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症(dentatorubral-pallidoluysian atrophy: DRPLA)の自然史を明らかにする目的で、遺伝子診断されたDRPLA症例の臨床徴候および長期経過について検討した。

小脳失調、精神症状、および認知機能障害について検討した。

統計学的手法としては、Pearson係数を用いた相関解析およびKaplan-Meier曲線とログランク検定を用いた。

B. 研究方法

新潟大学脳研究所で遺伝子診断されたDRPLA 150例について後方視的に解析した。DRPLA遺伝子内の増大CAGリピート数と、発症年齢、臨床徴候の出現年齢、また発症年齢から車椅子が必要となる期間および死亡時までの期間を病気の進行の指標として検討した。臨床徴候としては、ミオクローヌス、てんかん、舞踏アテトーシス、

C. 研究結果

1) 解析したDRPLA症例のサマリー

DRPLA症例150例の発症年齢は 30.4 ± 20.1 歳(平均 \pm SD)であった。調査時点までの平均罹患期間は 9.1 ± 6.5 歳であった。発症から車椅子が必要になる時点までの期間は 10.3 ± 4.5 年であった。死亡時年齢は 46.4 ± 6.5 歳であり、発症から死亡までの期間は 14.2 ± 3.9 年であった。DRPLA遺伝子内の増大CAGリピート

ト数は、 64.9 ± 4.4 リピートであった。

2) 増大 CAG リピートと発症年齢および各臨床徴候の相関

増大 CAG リピートと発症年齢の間には、既報の通り有意な負の相関を認めた ($p < 0.01$, $r = -0.791$)。また、増大 CAG リピート数はミオクローヌス、てんかん、舞踏アテトーシス、小脳失調、精神症状、認知機能障害のいずれの臨床徴候の出現年齢とも有意な負の相関を認めた。増大 CAG リピートの中間値である CAG 65 リピートを境に二群 (CAG < 65 群と CAG \geq 65 群) に分別化を行い、各群において Kaplan-Meier 曲線を作成したところ、CAG \geq 65 群の症例の各臨床徴候の出現年齢は有意に早発化していた。

3) 病気の進行度に及ぼす要因の検討：増大 CAG リピート、発症年齢

増大 CAG リピート数と車椅子が必要になった年齢との間には有意な負の相関を認めた ($p < 0.01$, $r = -0.848$)。また、増大 CAG リピート数は、発症から車椅子が必要となるまでの期間との間にも緩い相関を認めた ($p < 0.01$, $r = -0.308$)。一方で、発症年齢と車椅子が必要になるまでの期間の間には相関を認めなかった。

死亡時年齢と増大 CAG リピート数との関連を検討したところ、有意な負の相関を認めた ($p < 0.01$, $r = -0.904$)。しかしながら、発症年齢から死亡までの期間と増大 CAG リピート数、および発症年齢との間には有意な相関は認めなかった。

D. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

(特許取得・実用新案登録・その他)

該当なし

F. 健康危険情報

(国民の生命・健康に重大な影響を及ぼす情報として厚生労働省に報告すべきものについて把握した過程、内容、理由を記載する。またその情報源の詳細。)

該当なし

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA) の自然史について

DRPLA: 常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症

発症年齢, 臨床病型が多彩

CAGリピートの異常伸長を原因とするポリグルタミン病

増大CAGリピート数と発症年齢, 臨床病系とには強い相関

検討事項

DRPLAの長期予後, 病期の進展に影響する因子は何か?

相関する因子

増大CAGリピート数と車椅子が必要となった年齢

増大CAGリピート数と発症から車椅子が必要となるまでの期間

増大CAGリピート数と死亡時年齢

相関しない因子

発症年齢と車椅子が必要となる年齢

増大CAGリピート数と発症から死亡時までの期間

発症年齢と発症から死亡時までの期間

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

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

分担研究者 研究協力者	中島健二	鳥取大学脳神経内科
	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
	矢部一郎、佐々木秀直	北海道大学神経内科
	新井公人	千葉東病院神経内科
	金井数明、服部孝道	千葉大学神経内科
	吉田邦広	信州大学第三内科
	磯崎英治	都立神経病院神経内科
	伊藤瑞規、祖父江元	名古屋大学神経内科
	小野寺理、西澤正豊	新潟大学神経内科

研究要旨

遺伝性脊髄小脳失調症の代表的疾患である Machado-Joseph 病、脊髄小脳失調症 6 型の自然史を把握することを目的に特定疾患調査個人票を有効利用し、多施設共同で自然史調査研究を開始している。H17 年度に調査法の検討、H18 年度に予備調査、H19 年度特定疾患申請にあわせて調査を開始し、H20 年度は 1 年目の前向き調査結果を得、調査結果を報告した。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症 (SCD) の新規治療、新薬開発を見据えて、SCD の現状と運動失調症状、日常生活動作を中心とした自然経過 (自然史) を把握する。本邦で頻度が高い Machado-Joseph 病 (MJD) と純粋小脳型である脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) を対象に多施設共同で MJD、SCA6 の自然史を調査する。

B. 研究方法

調査デザインは、厚生労働省特定疾患研究事業の特定疾患調査個人票 (個票) を最大限利用する形をとり、個票に症状調査票を加えた調査とした。H17 年度に調査方法を決定、H18 年度に予備調査、H19 年度の特定疾患申請にあわせて調査を開始している。

調査は、過去 5 年の個票集計解析 (後ろ向き調査) と個票に加え、Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA)、International cooperative ataxia rating scale (ICARS) などを含む症状調査票を用い年一回の前向きに継続する調査 (前向き調査) である。

主な抽出データは、前向き調査として、ICARS

(SCA6 では SARA)、バーテルスコア (BI)、後ろ向き調査では個票内の部分 ICARS (p-ICARS)、部分バーテルスコア (p-BI) とした。

(倫理面への配慮)

調査は匿名符号化を用いて個人情報进行削除したデータを管理する。事務局である鳥取大学医学部の倫理委員会の承認を得たのち、各共同研究施設での倫理委員会承認を経て研究を実施している。

C. 研究結果

解析が可能な症例数は SCA6 で 49 例 (登録 51 例)、MJD で 36 例 (登録 44 例) であった。

[SCA6]

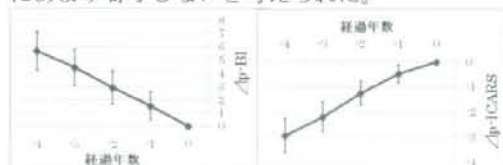
(1) 後ろ向き調査

登録 49 例中、過去 5 年の追跡が出来た 36 例 (登録時年齢 64.8 ± 8.4 、罹病期間 17.1 ± 7.8 年) を対象とした。

p-ICARS は登録時 21.0 ± 5.4 に対して、4 年前には 18.1 ± 6.1 であり、4 年間で 2.9 ± 4.1 の変化が認められた。この変化は、一年ごとに有意な変化として観察され、緩徐進行性とされる SCA6 も失調症状は年単位で悪化することが明らかに出来た。同様に p-BI も経年的変化

が観察されたが、1年単位での有意な変化ではなかった。(図1)

リピート数が既知の症例をリピート数23以下、24以上の2群に分けてp-ICARSと調査時年齢の相関を検討した。リピート数24以上群のp-ICARSはリピート数23以下群に比して高値であったが、延べ調査における経年変化の傾きはほぼ同様であり、リピート数は進行速度にあまり寄与しないと考えられた。



(図1) SCA6 後ろ向き調査

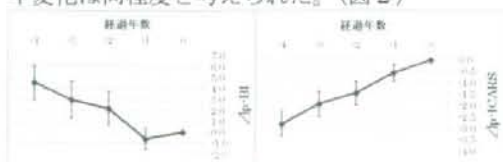
(2) 前向き調査

H19年に登録し、H20年再調査が可能であった症例数は40例で肺炎による死亡例を1例認めた。H19年度に 15.8 ± 6.8 であったSARAの平均値は 17.2 ± 6.7 に悪化していた。SARAでは不変/改善の5例を除き、35例が点数の悪化を認め、他のスコアに比して、変化が最も鋭敏であった。各SARA項目では歩行/立位/言語での変化が目立った。

[MJD]

(1) 後ろ向き調査

登録36例中、過去5年の追跡ができた25例(登録時年齢 55.1 ± 13.4 、罹病期間 14.4 ± 5.6 年)を対象とした。p-ICARSは登録時 21.2 ± 6.1 に対して、4年前 18.4 ± 6.0 であり、4年間で 2.8 ± 2.8 の変化が認められた。年度によるばらつきがあり、一年もしくは二年で有意な変化を認めた。p-ICARSの変化幅はSCA6のそれとほぼ同等であり、運動失調症状の経年変化は同程度と考えられた。(図2)



(図2) MJD 後ろ向き調査

(2) 前向き調査

H19年に登録し、H20年再調査が可能であった症例数は28例で、肺炎、誤嚥による2例の死亡例を認めた。H19年度に 49.3 ± 16.8 であったICARSの平均値は 53.7 ± 15.0 に悪化して

いた。1年間の変化は-2~13の幅でばらつきがあり、ひろく分布していた。変化幅は経過年数、年齢、リピート数などの臨床マーカーとの相関は現時点でははっきりしなかった。

【まとめ】

SCA6/MJDの2008年度自然史調査結果をまとめた。登録時の運動失調とADLスコアは良い相関が見られ、個票調査項目の有用性/意義が確認できた。後ろ向き調査により、集団としての年次変化をある程度把握でき、経過予測に有用なデータと考えられる。前向き調査では1年でも有意な変化が観察され、特にSARAの鋭敏性、有用性も確認できた。

継続調査/症例増加による進行速度を規定する要素/病期などの詳細データの解析が必要である。また、集団としての年次変化は把握できているが、治験に活用できるような短期/少数例に対応した症状把握調査という観点では課題が残る。

D. 研究発表

1. 論文発表

和田健二ほか、【神経内科疾患と高次脳機能の障害】多系統萎縮症。老年精神医学雑誌(0915-6305)19巻8号 Page848-855(2008.08)
北山通朗ほか、神経疾患における123I-MIBG心筋シンチグラフィの臨床的意義について。分子精神医学(1345-9082)8巻2号 Page157-159(2008.04)

福田弘毅ほか、脊髄小脳変性症に対するマシントレーニングを用いたリハビリテーション。神経治療学(0916-8443)25巻2号 Page163-167(2008.03)

2. 学会発表

安井建一ほか、脊髄小脳失調症6型の自然史。第49回日本神経学会総会(2008.5)
野村哲志ほか、パーキンソン病と多系統萎縮症におけるレム睡眠行動異常症の性状と経過。日本自律神経学会総会(2008.11)

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

JAMSAC・JASPAC グループ総括報告

プロジェクトリーダー 瀧山嘉久（山梨大学医学部神経内科学講座）

辻 省次（東京大学医学部附属病院神経内科）

JASPACには平成21年1月9日現在、全国32都道府県、89施設から遺伝性痙性対麻痺 (HSP) 204家系が登録されており、検体収集は順調に進んでいる。現時点でHSPは50近い病型が分子遺伝学的に分類されており、臨床症状から遺伝子型を推定することは極めて困難である。そこで、東大神経内科では、DNAマイクロアレイを用いた網羅的解析システムとCGHアレイを用いた *genomic rearrangement* の解析システムを組み合わせ、常染色体優性遺伝が疑われるHSP96例を解析した。その結果、SPG4 (53%)、SPG3A (5%)、SPG31 (3%)、SPG10 (2%)、SPG8 (1%) であることが判明し、高率 (63.5%) に遺伝子型を決定することができた。今後、常染色体劣性遺伝性HSPを含めた本邦HSPの分子疫学が明らかにされることと思われる。HSPの各論では、北大神経内科から本邦の *large deletion* によるSPG4の発症頻度が報告された。また、自治医大神経内科からは、JASPAC症例のうち、*seipinopathy* の概念を広げる可能性があるホモ接合変異のSPG17症例について、臨床・分子遺伝学的解析が行われた。

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

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	Japan Spastic Paraplegia Research Consortium

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の構築を進め、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 19 原因遺伝子のうち 13 遺伝子を搭載した resequencing microarray を作成し、サンガー法と併用して網羅的解析を行った。また、resequencing microarray やサンガー法では検出不可能な大きな欠失・挿入に関しては CGH アレイを作成し検出を試みた。常染色体性優性遺伝症例のうち 53% は *spastin* (SPG4) 変異が原因であった。その他、*atlastin* (SPG3A)、*REEPI* (SPG31) に加えて *KIAA0196* (SPG8)、*KIF5A* (SPG10) 変異を確認した。また、脳梁菲薄化と高次機能障害を呈する劣性遺伝症例からは *sapatacsin* (SPG11) の変異の頻度が高いことが判明した。

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 SPG1-42 の遺伝子座が知られ、うち 19 個の原因遺伝子が同定されている。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 は症候のみでは確定診断は困難で、網羅的遺伝子解析が必須である。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膨大な労力を要するが、resequencing microarray を用いることにより網羅的解析が可能となった。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ことを目的とした。本年は特に症例数を増やして解析するとともに、resequencing microarray、サンガー法で検出不可能だった大きな欠失・

重複の検出のために CGH アレイを作成して検討を行った。

B. 研究方法

痙性対麻痺症例 226 例 (JASPAC からの 86 例を含む) について解析を開始している。

LICAM (SPG1)、*PLP1* (SPG2)、*atlastin* (SPG3A)、*spastin* (SPG4)、*NIPA1* (SPG6)、*paraplegin* (SPG7)、*KIAA0196* (SPG8)、*KIF5A* (SPG10)、*HSP60* (SPG13)、*BSCL2* (SPG17)、*spartin* (SPG20)、*maspardin* (SPG21)、*REEPI* (SPG31) の 13 遺伝子を搭載する DNA マイクロアレイ開発し、サンガー法と併用し網羅的解析を行った。

また、上記 13 遺伝子に加えて *SPG11* (SPG11)、*CYP7B1* (SPG5)、*ZFYVE27* (SPG33) を含む 16 遺伝子について CGH アレイを作成し、大きな欠失・重複の検出を試みた。

(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。

C. 研究結果および考察

常染色体優性遺伝を呈する96症例中SPG4が53%、SPG3Aが5%、SPG31が3%、SPG10が2%、SPG8が1%と合計63.5%で診断可能となった。

孤発例も含めて57家系のSPG4のうち12%でCGHアレイでのみ検出可能だった大きな欠失・重複であり、その割合は欧米とほぼ同数と考えられた。

脳梁菲薄化と高次機能障害を呈する劣性遺伝症例では、9例でSPG11を解析し、4例で確定診断が得られた。脳梁菲薄化と高次機能障害を呈する症例ではSPG11の頻度は高いものと考えられた。

D. 結論

SPG4には大きな欠失・重複が多く、CGHアレイでの解析は必須と考えられた。

その他、SPG10、SPG8などの稀な優性遺伝形式の痙性対麻痺症例が本邦にも存在することが確認された。

脳梁菲薄化と高次機能障害を呈する症例ではまずSPG11の解析を行うべきである。

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、古谷博和、瀧山嘉久、JASPAC、DNA microarrayを用いた遺伝性痙性対麻痺遺伝子の網羅的解析、第59回日本神経学会総会、横浜、2008年5月17日

2, 石浦浩之、高橋祐二、後藤順、辻省次、JASPAC、遺伝性痙性対麻痺遺伝子の網羅的解析システムの確立とその応用、平成20年度運動失調に関する調査研究班班会議、東京、都市センターホテル、2009年

1月16日

3, 嶋崎晴雄、太田京子、滑川道人、中野今治、石浦浩之、高橋祐二、後藤順、辻省次、矢崎正英、池田修一、瀧山嘉久、JASPAC、Seipin 遺伝子のナンセンス変異をホモ接合で認めた痙性対麻痺の1家系、平成20年度運動失調に関する調査研究班班会議、東京、都市センターホテル、2009年1月16日

4, H. Ishiura, Y. Takahashi, J. Goto, S. Tsuji, Identification of rearrangements in causative genes of hereditary spastic paraplegia based on a high-resolution array comparative genomic hybridization method. The 58th annual meeting of American Society of Human Genetics, 2008.11, Philadelphia, USA.

5, 荒畑創、上田麻紀、荒木栄一、古谷博和、藤井直樹、石浦浩之、辻省次、MIBG心筋シンチグラフィ異常を認めたSPG11の3症例、2008年3月日本神経学会九州地方会

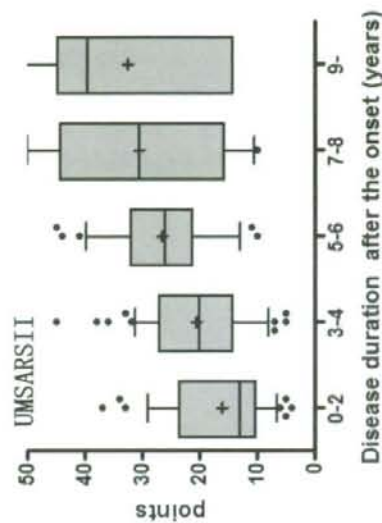
F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

運動失調症に関する調査研究班

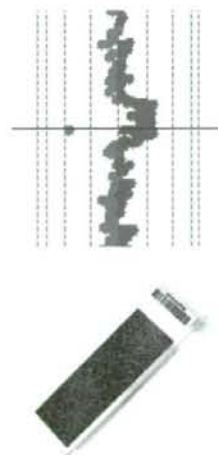
東京大学医学部附属病院
神経内科
辻 省次

自然歴



遺伝性痙性対麻痺 (SPG) 多施設協同研究体制 JASPAC

網羅的SPG原因遺伝子
解析システムの構築



アレイCGH

