

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

本邦の優性遺伝性痙性対麻痺における large deletion による SPG4 の発症頻度

分担研究者 佐々木秀直 北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野

研究協力者 相馬広幸、佐藤和則、矢部一郎（北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野）

松浦 徹（名古屋大学医学系研究科神経遺伝情報学）

### 研究要旨

SPG4 は本邦において優性遺伝性痙性対麻痺（AD-HSP）の約 40%を占めると報告され、欧米においてもほぼ同様に報告されてきた。しかし、通常の遺伝子解析に用いる direct sequencing 法は exon や intron を広範囲に含む欠失（large deletion）の検出が不可能であったため、large deletion により発症した SPG4 の報告はごく少数であった。しかし近年、西欧において、large deletion の検出が可能である multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法を用いた遺伝子解析の結果から、large deletion による SPG4 が AD-HSP の約 11~16%を占めることが報告された。従って AD-HSP における SPG4 の比率はこれまでの報告と大きく異なる可能性がある。そこで、本邦の AD-HSP の疾患構成を正しく把握するため、AD-HSP 23 家系において MLPA 法を用いた SPG4 遺伝子解析を行った。また、SPG4 には孤発例も散見されるため原因不明の孤発性痙性対麻痺患者 15 名も対象に含めた。その結果、SPG4 遺伝子の large deletion は AD-HSP では 1 家系にのみ認められ、孤発例では認めなかった。我々が過去に報告した孤発例を除く SPG4 の 8 家系を含めると、large deletion により発症した SPG4 は AD-HSP31 家系中に 1 家系のみであり、その割合は 5%未満であった。今回の解析症例数は少なく、AD-HSP の疾患構成を確定するには解析症例の蓄積が必要ではあるが、本邦では large deletion による SPG4 は少ないと推定された。

### A. 研究目的と背景

**背景** SPG4 は本邦において優性遺伝性痙性対麻痺（AD-HSP）の約 40%を占めると報告され、欧米においてもほぼ同様に報告されてきた。しかし、通常の遺伝子解析は direct sequencing 法を用いるため、exon や intron を広範囲に含む欠失（large deletion）の検出が不可能であった。そのため large deletion により発症した SPG4 の報告はごく少数であったが、近年、西欧において large deletion の検出が可能である multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法を用いた遺伝子解析により、large deletion による SPG4 が AD-HSP の約 11~16%を占めることが報告された。従っ

て本邦においても、AD-HSP における SPG4 の比率はこれまでの報告よりも大きい可能性がある。そこで、AD-HSP の疾患構成を正しく把握するため、AD-HSP 症例において MLPA 法を用いた SPG4 遺伝子解析を行った。また、SPG4 には孤発例も散見されるため、原因不明の孤発性痙性対麻痺患者も解析の対象とした。

**目的** 本邦の AD-HSP の疾患構成を正しく把握するために、AD-HSP における large deletion による SPG4 の比率を算出すること。

### B. 研究方法および対象

対象は AD-HSP 23 家系及び原因不明の孤発性痙性対麻痺患者 15 名。そのうち AD-HSP13 家系及び孤発例 4 名は direct sequencing 法による

SPG4 遺伝子の解析では変異を認めなかった。その他の症例はdirect sequencing法による解析が未完了である。MLPAにはSalsa MLPA Kit p165 (MRC-Holland)を用い、その産物は蛍光シークエンサー ABI PRISM 377で解析した。

#### (倫理面での配慮)

本研究の遺伝子解析については、北海道大学医学研究科医の倫理委員会の承認を得た。対象者には遺伝子解析について文書で説明し、文書にて同意を得た。

### C. 研究結果及び考察

AD-HSP では1家系にSPG4 遺伝子にlarge deletion (exon10-16)を認めた。孤発例ではlarge deletionは検出されなかった。我々が過去に報告した孤発例を除くSPG4の8家系を含めると、large deletionによるSPG4はAD-HSP31家系中に1家系のみである。その割合は5%未満であり、約11~16%とする西欧の既報とは大きな開きを示した。今回の検討により、本邦ではlarge deletionにより発症するSPG4が少数である可能性が示されたが、解析家系数は充分ではなく、解析症例の蓄積が必要である。

### D. 結論

本邦ではlarge deletionにより発症するSPG4は少ないと推定される。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Soma, H., Yabe, I., Takei, A., Fujiki, N., Yanagihara, T., Sasaki, H.: Associations between Multiple System Atrophy and Polymorphisms of SLC1A4, SQSTM1, and EIF4EBP1 Genes. *Mov Disord* 23, 1161-1167, 2008
- 2) Yabe, I., Kitagawa, M., Suzuki, Y., Fujiwara, K., Wada, T., Tsubuku, T., Takeichi, N., Sakushima, K., Soma, H., Tsuji, S., Niino, M., Saitoh, S., Sasaki, H.: Downbeat positioning nystagmus is a common clinical feature despite variable phenotypes in an FHM1 family. *J Neurol* 255, 1541-1544, 2008

#### 2. 学会発表

- 1) Yabe, I., Tha, K. K., Terae, S., Okita, K., Sasaki, H.: Skeletal muscle energy

- metabolism in Machado-Joseph disease, 12<sup>th</sup> International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Hilton Chicago, Chicago, IL, USA, 6/22-6/26 2008
- 2) 佐藤和則、矢部一郎、相馬広幸、安井建一、中島健二、伊藤瑞規、祖父江元、下畑享良、小野寺理、西澤正豊、佐々木秀直：日本語版 Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA)の信頼性、第49回日本神経学会総会、横浜、2008
  - 3) 相馬広幸、矢部一郎、バスリレハナ、武井麻子、藤木直人、柳原哲郎、佐々木秀直：多系統萎縮症疾患感受性候補遺伝子の関連解析、第49回日本神経学会総会、横浜、2008
- ### F. 知的財産権の出願・登録状況
- 該当なし

## 本邦の優性遺伝性痙性対麻痺における large deletionによるSPG4の発症頻度

分担研究者: 佐々木秀直 北海道大学大学院医学研究院神経内科学分野  
研究協力者: 相馬広幸, 佐藤和則, 矢部一郎 北海道大学大学院医学研究院神経内科学分野  
松浦 徹 名古屋大学医学系研究科神経遺伝情報学

SPG4は優性遺伝性痙性対麻痺(AD-HSP)の約40%を占めると報告されてきた

検出が困難であったlarge deletionがMLPA法により容易に検出可能となった

西欧において large deletionによるSPG4がAD-HSPの約11~16%を占めることが報告された

本邦においても, AD-HSPにおけるSPG4の比率は既報と大きく異なる可能性がある

MLPA法を用いたSPG4遺伝子解析により検討

large deletionによるSPG4はAD-HSP31家系中に1家系のみ(5%未満)

本邦ではlarge deletionによるSPG4は少ないと推定

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究平成 20 年度終了報告書

運動失調症に関する調査研究

*Seipin* 遺伝子のナンセンス変異をホモ接合で認めた痲性対麻痺の 1 家系

分担研究者	瀧山嘉久	山梨大学神経内科
研究協力者	嶋崎晴雄, 太田京子, 本多純子, 滑川道人, 中野今治	自治医科大学神経内科
	石浦浩之, 高橋祐二, 後藤順, 辻省次	東京大学神経内科
	矢崎正英, 池田修一	信州大学第三内科学

## 研究要旨

現在, JASPAC として遺伝性痲性対麻痺家系を集積して, 遺伝子解析を行っている。今回, 本邦ではじめて *seipin* 遺伝子のナンセンス変異 (R275X) をホモ接合で認めた痲性対麻痺の 1 家系 (SPG17) を見い出した。本家系の患者は, 欧米 SPG17 症例とは異なり, 明らかな手内筋萎縮は認めなかった。さらに, 既報告の R275X ホモ接合例でみられる脂肪萎縮や糖尿病なども認めず, その臨床像は異なっていた。本変異の病態機序や臨床像の多様性についての意義は, 今後の同胞例の臨床・分子遺伝学的解析を含めてさらに検討する必要がある。

## A. 研究目的

遺伝性痲性対麻痺は, 現在, 50 に近い遺伝子座が決定され, 少なくとも 22 の原因遺伝子が同定されている。我々は, JASPAC として遺伝性痲性対麻痺家系を集積し, 遺伝子解析を行っている。今回, 本邦ではじめて, 優性遺伝性 HSP である SPG17 の原因遺伝子 *seipin* のホモ接合変異を持つ HSP の 1 家系を見い出した。そこで, 本家系の遺伝子変異と臨床像を既報告例と比較検討し, SPG17 の遺伝的・臨床的多様性の有無を明らかにする。

## B. 研究方法

JASPAC に集積された HSP 患者の 37 検体について, *seipin* を含む HSP の原因遺伝

子解析を網羅的に行った。*Seipin* 遺伝子の変異が同定された本邦家系について, 欧米の SPG17 症例 (ミスセンス変異のヘテロ接合) や, *seipin* のホモ接合体変異を持つ常染色体劣性全身性脂肪萎縮症 (Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy type 2: BSCL2) の若年症例とで, 遺伝子変異や臨床像についての比較検討を行った。

尚, この研究は自治医科大学遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

発端者に *seipin* 遺伝子のナンセンス変異 (R275X) をホモ接合で認めた。発端者の両親は血族婚であった。発端者と同様な臨床像を呈している同胞について, 今

後の seipin 遺伝子解析を予定している。

発端者の臨床像は、ほぼ純粋な痙性対麻痺であり、欧米の SPG17 症例とは異なり、明らかな上肢遠位筋や手内筋の萎縮は認めなかったが、軽度両側大腿萎縮と両側アキレス腱反射消失を伴っている点が特徴的であった。興味深いことに、同じ R275X ホモ接合変異が、これまで本邦の BSCL2 家系において同定されていた。しかし、発端者には BSCL2 に認められるような明らかな脂肪萎縮はなく、糖尿病や中性脂肪高値などの代謝異常も認めなかった。

既報告の R275X ホモ接合例と比較して、本家系の発端者の臨床像は異なっており、本変異の病態機序や臨床像の多様性についての意義は、今後の同胞例の臨床・分子遺伝学的解析を含めてさらに検討する必要がある。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ouyang Y, Segers K, Bouquiaux O, Wang FC, Janin N, Andris C, Shimazaki H, Sakoe K, Nakano I, Takiyama Y. Novel SACS mutation in a Belgian family with sacs-in-related ataxia. *J Neurol Sci* 264: 73-76, 2008.

2) Shimazaki H, Vazifehmand R, Heidari MH, Khorram-Khorshid HR, Saber S, Hejazi S, Aghakhani-Moghadam F, Ouyang Y, Honda J, Nakano I, Takiyama Y. A large family with spinocerebellar ataxia type 6 in Iran: a clinical and genetic study. *Arch Iran Med* 11: 459-62, 2008.

3) Craig K, Takiyama Y, Soong BW, Jardim

LB, Saraiva-Pereira ML, Lythgow K, Morino H, Maruyama H, Kawakami H, Chinnery PF. Pathogenic expansions of the SCA6 locus are associated with a common CACNA1A haplotype across the globe: founder effect or predisposing chromosome? *Eur J Hum Genet* 16: 841-847, 2008.

4) Breckpot J, Takiyama Y, Thienpont B, Ortibus E, Devriendt K. A novel genomic disorder: a deletion of the SACS gene leading to spastic ataxia of Chairlevoix-Saguenay. *Eur J Hum Genet* 16: 1050-1054, 2008.

##### 2. 学会発表

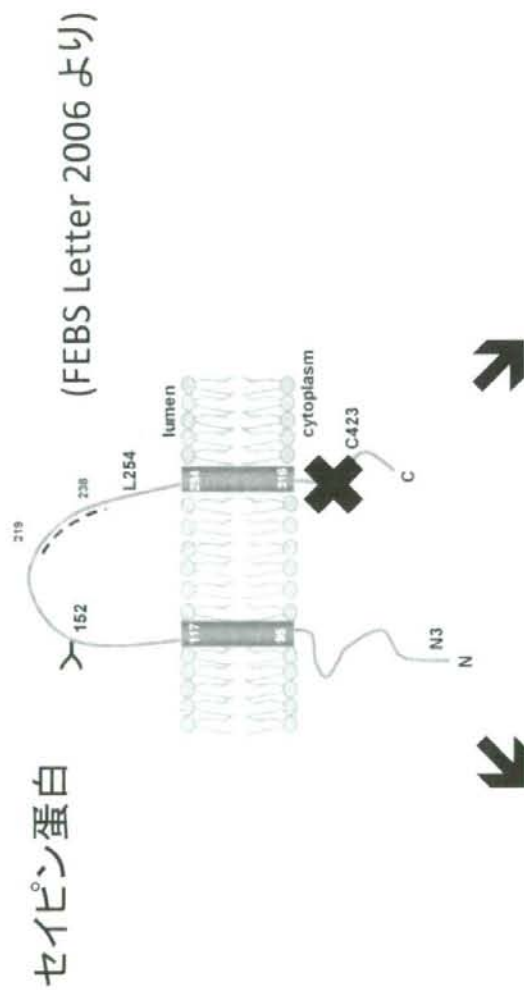
1) 嶋崎晴雄, 中野今治, 瀧山嘉久. ARSACS の MRI, SPECT 所見. 第 49 回日本神経学会総会. 2008 年 5 月 16 日. 横浜.

2) 滑川道人, 嶋崎晴雄, 瀧山嘉久, 中野今治, 田中 亨. 常染色体優性遺伝形式を取る痴呆・難聴・糖尿病をともなった脊髄小脳変性症 (AD-SCD with 3D) の 2 家系. 第 49 回日本神経学会総会. 2008 年 5 月 15 日. 横浜.

E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)  
なし

F. 健康危険情報  
特になし

セイピン蛋白が短くなる遺伝子異常により，先天性脂肪萎縮症のみでなく，遺伝性痙性対麻痺も発症しうることがわかった。



脂肪細胞の萎縮 → 先天性脂肪萎縮症



運動神経細胞の変性 → 遺伝性痙性対麻痺

## 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

## 多系統萎縮症の全ゲノム関連解析

<b>分担研究者 研究協力者</b>	中原 康雄	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科
	百瀬 義雄	北原脳神経外科病院神経内科
	市川 弥生子	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科
	福田 陽子	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
	西田 奈央	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学
	徳永 勝士	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学
	山本 健	九州大学生体防御医学研究所ゲノム機能制御学部門
	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
	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

**研究要旨**

多系統萎縮症において関連遺伝子の同定を目標に、ゲノム解析を基盤とした全ゲノム関連解析によるアプローチを行ない、locus ごとの  $\chi^2$  検定をすべての locus において施行し p 値を算出した。有意差の得られた SNP に関して、家族性 MSA における連鎖解析の結果なども併せ、引き続き解析を行なっていく。

**A. 研究目的**

多系統萎縮症は成人発症の自律神経症状、パーキンソニズム、小脳症状、錐体路症状を呈する進行性神経変性疾患である。本疾患は従来、孤発性疾患と考えられてきており、家族発症例の検索は充分にはなされてこなかった。しかし、近年病理学的に診断された家族発症例が複数確認され、その発症における遺伝因子が注目されるに至っている。多系統萎縮症の病因解明へのアプローチとしては、1. まれに見られる家族性多系統萎縮症に焦点を絞った連鎖解析に基づくアプローチ、2. 孤発性多系統萎縮症および健常対照者の大規模ゲノム解析 (association study) という2つのアプローチを統合して進めており、本報告では孤発性多系統萎縮症における関連遺伝子の同定を目標に、ゲノム解析を基盤とした全ゲノム関連解析によるアプローチについて述べる。

**B. 研究方法**

国内18施設とともに多系統萎縮症における多施設共同研究体制 (Japan MSA research Consortium; 通称 JAMSAC) を構築し、臨床情報およびゲノムリソースを収集。Illumina HumanHap 550K Genotyping BeadChip<sup>®</sup> を利用し、ゲノム解析を施行。MSA 検体 209 例、正常対照者検体 220 例について解析を行なった。

**C. 研究結果および考察**

タイピングの行なわれた検体について、検体ごとの Call rate ( $\geq 99\%$ )、近親者や同一検体のチェック (IBD)、染色体異常の有無について調べ、その結果最終解析検体として MSA: 209 検体、正常対照者: 220 検体について解析を行なった。タイピングされた約 56 万個の SNP にて Locus ごとの call rate が MSA 群、正常対照者群共に 98% 以上得られ、正常対照者群にて Hardy-Weinberg 平衡を満たす SNP ( $p > 1E-6$ ) に基づいて選別された 544,148 個の SNP のうち、 $\chi^2$  検定 (Allelic test) の p 値における有意差の認められる SNP 数

は  $p < 0.05$ : 24,024,  $p < 0.01$ : 4,748,  $p < 0.001$ : 482,  $p < 0.0001$ : 47 であった。併せて層別解析を行い、その結果、MSA-C では  $\chi^2$  検定の  $p$  値における有意差の認められる SNP 数は  $p < 0.05$ : 19,258,  $p < 0.01$ : 4,280,  $p < 0.001$ : 454,  $p < 0.0001$ : 37, MSA-P では  $p < 0.05$ : 18,585,  $p < 0.01$ : 4,384,  $p < 0.001$ : 555,  $p < 0.0001$ : 68,  $p < 1E-5$ : 10,  $p < 1E-6$ : 6 であった。

#### D. 結論

有意差の得られた SNP に関しては、家族性 MSA における連鎖解析の結果などとも併せ、MSA の原因遺伝子、疾患関連遺伝子の同定を目指すと共に、日本人症例の replication study に向けて検体の収集、海外の Consortium との協力の検討なども併せて行なっており、引き続き情報を蓄積することにより、MSA における病因解明へのアプローチに応用が可能であると思われる。

#### E. 研究発表

##### 1. 学会発表

中原康雄, 百瀬義雄, 高橋祐二, 西田奈央, 徳永勝士, 後藤順, 辻省次, 演題タイトル: 多系統萎縮症(MSA)における Genome-wide association study, 第49回神経学会総会 5月 2008 横浜

中原康雄, 百瀬義雄, 市川弥生子, 三井純, 高橋祐二, 後藤順, 辻省次, 演題タイトル: 多系統萎縮症(MSA)の家族発症例における候補遺伝子解析, 第53回日本人類遺伝学会 9月 2008 横浜

中原康雄, 百瀬義雄, 市川弥生子, 高橋祐二, 山本健, 後藤順, 辻省次, 演題タイトル: Genome-wide association studies on Multiple system atrophy (MSA), The American Society of Human Genetics 58<sup>th</sup> Annual Meeting 11月 2008 Philadelphia

#### 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

多系統萎縮症の臨床的特徴に関する多施設共同研究

分担研究者	辻 省次	東京大学神経内科
研究協力者	JAMSAC	Japan MSA research consortium
	市川弥生子	東京大学神経内科
	中原康雄	東京大学神経内科
	後藤 順	東京大学神経内科

研究要旨

多系統萎縮症(Multiple system atrophy: MSA)は自律神経症状、小脳性運動失調、パーキンソンズム、錐体路症状を呈する進行性神経変性疾患である。MSAは成人発症の孤発性疾患として知られているが病因については明らかにされていない。MSAの臨床的特徴、自然史を明らかにし、大規模ゲノム解析によるMSAの病因解明を目的としてJAMSAC(Japan MSA research Consortium)が構築された。多施設共同体制にてMSAの臨床情報およびゲノムリソースの収集が行われている。

A. 研究目的

本邦におけるMSAの臨床的特徴、自然史を明らかにする。

B. 研究方法

国内21施設とともに共同研究体制を構築し、情報およびゲノムリソースの収集を行っている。臨床情報調査用紙およびweb入力システムを構築し、各施設から臨床情報の収集・登録を行った。

患者エントリーに関してはGilmanらのConsensus statementでpossible以上を基本としたが、自律神経症状、パーキンソン症状、小脳症状でcriterionを満たす場合は、頭部MRI画像で橋のいわゆる十字サインか、被殻外側異常信号を呈する症例は登録することとした(MRI登録)。登録された患者について性別・発症年齢・サブタイプ(MSA-C/MSA-P)について明らかにした。

登録時点の機能評価をUMSARS, Barthel index, 臨床調査個人票に基づく神経症状、ICARS部分点、UPDRS部分点を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究については「多系統萎縮症(MSA)についての多施設共同大規模遺伝子解析研究」として東京大学医学系研究科・医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会から承認されている。各共同研究施設においてもそれぞれ倫理委員会に提出し承認をいただいた上で、臨床情報・検体の収集を行っている。

C. 研究結果

登録された181名(男性101名、女性80名)のMSA患者において、平均発症年齢 $58.4 \pm 9.2$ 歳(40-79歳)であった。サブタイプではMSA-Cが69%を占め、MSA-Pが29%、分類不能が2%であった。Probable MSA症例が66%、Possible MSAが24%、MRI登録症例が10%であった。登録された症例のうち、上記の評価スケールにて臨床評価をされている症例は160(MSA-C:109, MSA-P:51名)であり、各スケールの点数において臨床経過年数ごとに有意差( $P < 0.0001$ )が見られ

Rating Scale(UMSARS, Barthel index, 臨床調査個人票に基づく神経症状、ICARS部分点、UPDRS部分点)は機能の評価する上で有用であり、経過年数とともに機能が低下していくことが示された。

発症 7 年以降は MSA-P と MSA-C の機能レベルは同程度になる傾向がみられた。

Rating scale は約 2 年間の間隔でも機能変化をとらえられる可能性があり、今後、より適切な縦断的解析方法をデザインした上で、縦断的解析症例を増やしていく

**D. 研究発表**

1. 論文発表

準備中

2. 学会発表

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)

現時点で予定なし。

**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。)

特になし。

## 責任遺伝子同定研究グループ総括報告

プロジェクトリーダー 水澤英洋（東京医科歯科大学大学院脳神経病理学）

第16番染色体長腕連鎖型優性遺伝性脊髄小脳変性症(16q22.1-linked ADCA)の原因遺伝子探索が本グループの中心課題の一つであるが、水澤班員からは約900kbの原因遺伝子候補領域の全ゲノム配列を明らかにし、新たな家系を解析することで3つの候補遺伝子を同定し解析中であることが報告され、高嶋班員からは候補領域の再検討と次世代シーケンサーを用いたアプローチが紹介された。山田班員からは、Machado-Joseph病におけるTDP-43の異常発現が報告され、TDP-43 proteinopathy のスペクトラムに新しい疾患が加わった。吉田班員は長野県における遺伝性脊髄小脳変性症の疫学研究から、常染色体劣性遺伝性の9家系10例の臨床的・分子遺伝学的検討を行った。発表会の後のグループ内検討会議では、現在残っているまれな病型や小さな家系に対するアプローチを決めるために、研究班として全国に呼びかけて症例や家系の発表会を行う方針が確認された。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究年度終了報告書  
運動失調症に関する調査研究

Machado-Joseph 病における TDP-43 の異常発現

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	譚 春鳳	新潟大学脳研究所病理学分野
	豊島 靖子	新潟大学脳研究所病理学分野
	横関 明男	新潟大学脳研究所 神経内科
	三木 ゆかり	新潟大学脳研究所病理学分野
	星 康浩	新潟大学脳研究所病理学分野
	金子 博之	新潟大学脳研究所神経内科
	池内 健	新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野
	小野寺 理	新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野
	柿田 明美	新潟大学脳研究所脳疾患標本解析学分野
	高橋 均	新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

Machado-Joseph 病 (MJD) と球脊髄性筋萎縮症 (BSMA) に関して TDP-43 の異常発現の有無を検討した。MJD では下位運動神経核、とくに脊髄前角運動神経細胞に比較的限局して、ごく少数ながら TDP-43 陽性神経細胞内封入体 (TDP-43-ir NCI) が認められた。形態学的及び免疫組織学的に、それらは孤発性筋萎縮性側索硬化症 (sALS) に出現する TDP-43-ir NCI によく類似していた。BSMA では、異常発現を認めなかった。MJD における TDP-43 の異常蓄積は、伸長ポリグルタミン鎖蓄積による核の機能異常、下位運動神経という部位特異性などが密接に関連していることが示唆された。

A. はじめに

TDP-43 は転写に関わる核内蛋白の 1 種であり、前頭側頭葉変性 (FTLD) と孤発性筋萎縮性側索硬化症 (sALS) に出現するユビキチン陽性封入体の構成蛋白でもある。最近、アルツハイマー病やピック病など痴呆疾患において TDP-43 の異常発現が多く報告されているが、運動神経細胞変性を伴う疾患においては未解明な点が多い。Machado-Joseph 病 (MJD) ならびに球脊髄性筋萎縮症 (BSMA) では下位運動神経系が変性することから、我々は両疾患の神経系における TDP-43 の異常発現の有無について免疫組織化学的および生化学的に検討した。

B. 材料と方法

新潟大学脳研究所に保管されている MJD10 例と BSMA3 例を検討した。ホルマリン固定パラフィン包埋した脊髄、延髄、橋および中脳の各部位から連続切片を作製、9 枚置き計 4 枚について TDP-43 免疫染色 (Polyclonal, Protein Tech Group, Inc., Chicago, IL) を施行し、脊髄前角と脳幹運動神経核 (XII, VII, VI, V, III) を観察した。神経細胞胞体内の TDP-43 陽性封入体 (TDP-43-ir NCI) の形態、分布および出現

数を評価し、神経細胞脱落との関連性を検討した。残りの未染切片を用いて、抗リン酸化 TDP-43 抗体 (pS409-410, monoclonal) と抗 ubiquitin 抗体による検討も行った。TDP-43-ir NCI の出現部位の特異性を検討するため、TDP-43 抗体を用い MJD の 2 症例において中枢神経系全体を調べた。また、TDP-43 と ubiquitin, polyQ 鎖 (1C2) および ataxin-3 との関連性を二重免疫蛍光染色で検討した。封入体の超微構造は免疫電顕により観察した。さらに対照 1 例、sALS2 例、MJD2 例の前頭葉及び脊髄凍結組織について、TDP-43 のウエスタンブロット解析を行った。

C. 結果

MJD 全例の下位運動神経核において TDP-43-ir NCI が出現し、大多数は脊髄前角の大型神経細胞に認められた。脊髄前角の TDP-43-ir NCI は 1 例につき 1~4 個と少数であり、出現数と脊髄前角細胞の脱落程度との間に明らかな相関は認められなかった。脳幹運動神経核 (XII, V, III) に関しては、3 例に TDP-43-ir NCI が認められたが、その数は各部位 0~1 個であった。一方、中枢神経系全体を検査した MJD の 2 症例においては、下位運動神経系以外に TDP-43-ir

NCI は認められなかった。形態学的に TDP-43-ir NCI は linear wisp, skein-like あるいは ragged 状を呈し、sALS の下位運動神経細胞に認められるものに類似していた (図 1)。TDP-43-ir NCI はリン酸化 TDP-43 抗体と ubiquitin 抗体にも認識された。二重免疫蛍光染色では、TDP-43-ir NCI は ubiquitin と共存して認められたが、1C2 や ataxin-3 抗体では陰性であった。超微形態学的に封入体は、random あるいは放射状に配列する線維束 (線維の直径は 19-24 nm) から構成されていた (図 2)。ウエスタンブロット解析 (Sarkosyl 不溶性 TDP-43) では、sALS 症例に認められる断片型異常 TDP-43 (~23kDa) が MJD 症例では検出されなかった。BSMA 症例では TDP-43 の異常構造物は認められなかった。

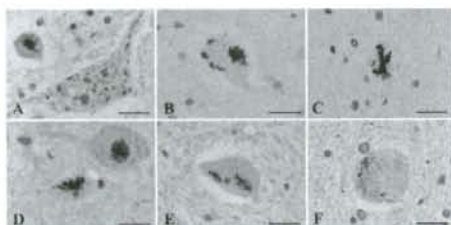


図 1. MJD 症例の下位運動神経細胞内に認められた TDP-43、pS409/410 と ubiquitin 陽性の神経細胞胞体内封入体。A, B, C, E, F 脊髄前角、D 三叉神経核運動核。A, B, C, D TDP-43 染色、E pS409/410 染色、F ubiquitin 染色。Bar 20  $\mu$ m



図 2. MJD 症例に認められた TDP-43-ir NCI の免疫電顕像。線維束の辺縁部は密に、中心部は疎になっている。構成線維の直径は 19~24 nm。

#### D. 考察

TDP-43-ir NCI は FTLD や sALS に加え、アルツハイマー病、レビー小体病、ピック病、大脳皮質基底核変性症などにも出現す

ることが報告されている。今回、下位運動神経系の変性を伴ったポリグルタミン病の代表疾患である MJD でも TDP-43-ir NCI が出現することが明らかとなった。その特徴としては、1) 下位運動神経核、とくに脊髄前角に出現すること、2) 形態学および免疫組織化学的に、sALS の下位運動神経核に出現する TDP-43-ir NCI によく類似すること、3) その出現率が非常に小さいことである。

MJD2 症例の中中枢神経系を広範に調べたが、脊髄前角・脳幹運動神経核以外に TDP-43 の異常蓄積は認められなかった。こうした結果を総合すると、MJD では下位運動神経系、特に脊髄前角運動神経細胞に TDP-43 が蓄積しやすい状態にあると考えられる。TDP-43-ir NCI が 1C2 や ataxin-3 抗体で認識されないことから、protein-protein interaction により polyQ 鎖や ataxin-3 と直接結合している可能性は低い。異常ポリグルタミン鎖の蓄積による核の機能異常と、下位運動神経という部位特異性などが、この病態に密接に関連している可能性が示唆される。

BSMA には TDP-43 の異常蓄積が観察されなかった。ポリグルタミン病でも TDP-43 の蓄積に関して疾患特異性があるのか、症例数を増やしてさらに検索する必要がある。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nishihira Y, Tan CF, Onodera O, et al. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. *Acta Neuropathol* 116: 169-182, 2008

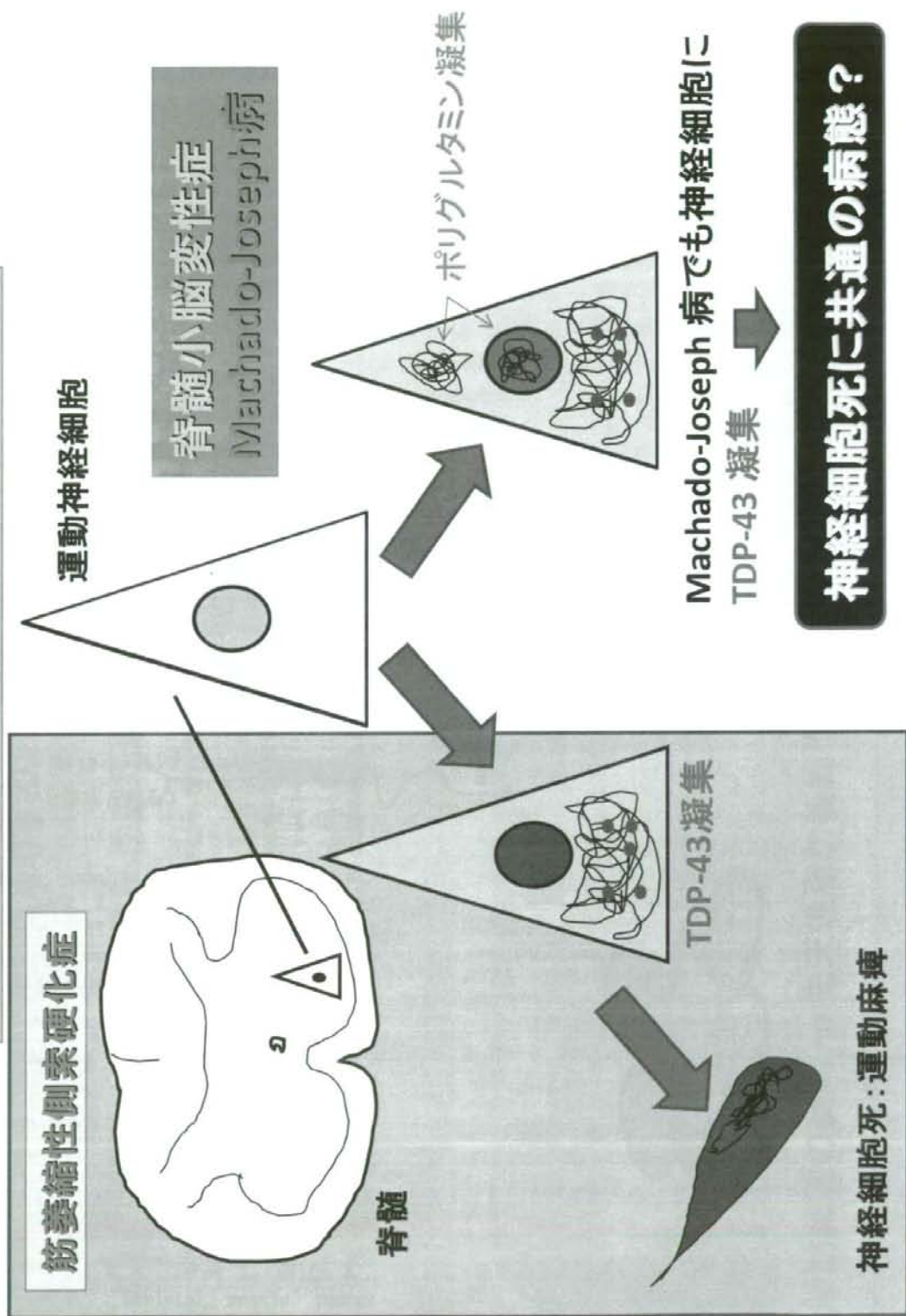
Sato T, Miura M, Yamada M, et al. Severe neurological phenotypes of Q129 DRPLA transgenic mice serendipitously created by *en masse* expansion of CAG repeats in Q76 DRPLA mice. *Hum Mol Genet* 18: 723-736, 2009

##### 2. 学会発表

山田光則, 佐藤俊哉, 辻省次, 高橋均, 齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) モデルマウスにおけるポリグルタミン鎖長依存性の病理組織変化. 神経病理学会総会 5月 2008 東京

F. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

# 神経細胞死の原因を探る



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

常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症 9 家系 10 例の臨床的・分子遺伝学的検討

分担研究者 吉田邦広<sup>1</sup> 信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

研究協力者 中村勝哉<sup>1</sup>、森田 洋<sup>1</sup>、池田修一<sup>1</sup> 牧下英夫<sup>2</sup>、大原慎司<sup>3</sup>、牛山雅夫<sup>4</sup>、露崎淳<sup>5</sup>、清水雄策<sup>6</sup>、堺 温哉<sup>7</sup>、松本直通<sup>7</sup> (<sup>2</sup>北信総合病院神経内科、<sup>3</sup>NHO まつもと医療センター-中信松本病院神経内科、<sup>4</sup>健和会病院神経内科、<sup>5</sup>小諸厚生総合病院神経内科、<sup>6</sup>伊那中央病院神経内科、<sup>7</sup>横浜市立大学大学院環境分子医科学)

#### 研究要旨

常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症 9 家系 10 例につき、その臨床像、および分子遺伝学的な検討を行い、新たに ataxia with oculomotor apraxia type 2 (AOA2)患者を見出した。この患者は臨床的には若年発症で、緩徐に進行する小脳失調症、脊髄前角細胞障害・末梢神経障害を呈した。

#### A. 研究目的

常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症 (AR-SCD)は頻度的に稀であり、かつ常染色体優性遺伝性 SCD に比べて遺伝学的検査が容易ではないため確定的な病型診断には至らない症例が多い。今回は当科で集積した AR-SCD とと思われる 9 家系 10 例につき、その臨床像を検討し、分子遺伝学的な病因解明を進めることを目的とした。

#### B. 研究方法

臨床的に SCD、ないしは多系統萎縮症 (MSA)が疑われ、当科に遺伝学的検査を含めて精査を依頼された 9 家系 10 例につき、その臨床像を検討した。また臨床像から原因遺伝子を推定し、症例を選択して APTX、SETX、TDP1 遺伝子などの解析を行った。

#### C. 研究結果と考察

9 家系のうち、6 家系では血族婚 (両親がいとこ婚)、あるいは同胞罹患のいずれか、ないしは両方が見られ、常染色体劣性遺伝が強く疑われた。発症年齢から見ると、幼少時期～若年期発症 (若年期発症)の 5 家系 5 例と中年期以降発症 (成人期発症)の 4 家系 5 例とに大別された。初発症状は 8 例が歩行障害、他の 2 例は精神発達遅滞、手指振戦であった。成人期発症の 5 例はすべて歩行障害が初発症状であった。8 例で小脳失調、および頭部画像上の小脳萎縮が見られたが、成人期発症 2 例では小脳失調が明らかではなく、主訴である歩行障害は下肢痠性が主因と考えられた。深部腱反射は 8 例で消失、ないしは低下、2 例で亢進していた。3 例では病的反射が陽性であった。眼球運動失

行は若年期発症の4例に見られた。また知能・精神障害も6例で見られたが、このうち3例では眼球運動失行と知能・精神障害が併存していた。末梢神経伝導速度は検索した8例中、5例で明らかな低下が見られた。

臨床像を要約すると、AR-SCDでは発症時期にかかわらず、臨床的・神経生理学的に末梢神経障害の併発が高頻度に見られた。さらに、若年期発症例では眼球運動失行や知能障害、精神発達遅滞の併発が高率に見られた。一方、成人期発症例では末梢神経障害以外には随伴症候が目立たなかった。このうち小脳失調や小脳萎縮が明らかではなかった2例のうち1例は罹患同胞が後にSPG17 (seipin異常症)であることが確認された。

分子遺伝学的な検討では、眼球運動失行が見られた4例のうち1例でAPT<sub>X</sub>遺伝子の689insT (ホモ接合体)が確認された (Sekijima Y, et al. *Mov Disord* 18: 1198-1200, 2003)が、他の3例に関しては現時点ではAPT<sub>X</sub>遺伝子に明らかな変異が同定できていない。また、このうち血清 $\alpha$ -fetoproteinが高値であった1例に関しては、SET<sub>X</sub>遺伝子に新規のナンセンス変異 (385Glu→Ter)を認め、AOA2であることが確定された。

この患者は17歳頃に歩行障害で発症、臨床的には眼球運動失行、小脳失調に加えて、四肢のびまん性の筋萎縮、筋力低下、四肢末梢の感覚障害を認めた。22歳頃には自力での起立・歩行不能となったが、70歳になる現在でも認知機能や嚥下機能は保たれている。針筋電図や筋

生検では慢性の脱神経所見が顕著であった。

SET<sub>X</sub>遺伝子は常染色体劣性遺伝性のAOA2および常染色体優性遺伝性の若年型筋萎縮性側索硬化症 (ALS4)の原因遺伝子とされる。既報のAOA2とALS4の遺伝子変異は異なっているが、今回同定したAOA2患者の臨床像は一部、ALS4と重複するところがあると考えられた。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yoshida K, Shimizu Y, Morita H, et al. Severity and progression rate of cerebellar ataxia in 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (16q-ADCA) in the endemic Nagano area of Japan. *Cerebellum* (in press).

##### 2. 学会発表

1) 吉田邦広, 清水雄策, 森田洋ら. 16番染色体長腕に連鎖する優性遺伝性脊髄小脳変性症 (16q-ADCA)の自然史. 第49回日本神経学会総会. 2008. 5.15-17. 横浜.

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



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

16 番染色体に連鎖する常染色体優性脊髄小脳変性症の原因同定の試み

分担研究者	高嶋 博	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経病学、神経内科・老年病学
研究協力者	平野隆城、岡本裕嗣	鹿児島大学神経内科
	大窪隆一、有村公良	鹿児島大学神経内科
	要 匡	琉球大学医科遺伝学
	吉田邦広	信州大学神経内科

研究要旨

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を行うため、マイクロアレイおよび SNPs を用いた遺伝子マッピング、全ゲノムとくに候補領域の染色体コピー数解析を行った。遺伝子候補領域は、Amino らの報告した 900kb と一致した。染色体コピー数については患者に共通する異常は認めなかった。現在、900kb の候補領域について患者リンパ球から作製した BAC クローン・LA-PCR 産物の次世代ゲノムシーケンサーによる解読・データ解析を行っている。

A. 研究目的

**研究背景** 16 番染色体に連鎖する 16q-ADCA type III の原因遺伝子は、GGAA05 から-16C>T puratrophin-1 遺伝子変異までの約 900kb であると推定されている。当該領域の疾患特異的 SNP ハプロタイプが示され、16q-ADCA type III のマッピングに有効であると考えられている。一方で南九州地方の 16q-ADCA type III の患者家系間では puratrophin-1 変異に近接しセントロメア側に位置する GATA01 とテロメア側に位置する 17msm のアリルが異なっておりマッピングを複雑なものにしている。

**目的** 16q-ADCA type III の候補領域を再検討し、疾患原因遺伝子を特定する。

南九州地域の 16q-ADCA 患者家系と Puratrophin-1 変異を持たない例外症例について SNP ハプロタイプを明らかにし、原因遺伝子の候補領域について再検討する。候補領域のコピー数について疾患との関連を検討

する。疾患候補領域のゲノムシーケンスを行い、得られた変異について疾患との関連を検討する。

**B. 研究方法** Puratrophin-1 変異を持つ 16q-ADCA 患者家系のシーケンスを行い、疾患特異的とされる一連の SNP の有無を調べ、マイクロサテライトマーカーによる結果との比較を行った。家系内で Puratrophin-1 変異を持たない長野家系についても、研究協力を得て、多型マーカー関連解析を行った。また PCR-RFLP 法により原因遺伝子が特定されていない遺伝性脊髄小脳変性症患者のスクリーニングを行ったところ SNP05 を持つ 3 家系が見つかった。その一家系について segregate study を行った。ハプロタイプをホモ接合体に持つ患者を含め、一部の患者 DNA 検体について Affymetrics 社の SNP6.0 DNA chip を用いて候補領域のコピー数の検討を行った。疾患ハプロタイプをホモ接合体に持つ患者リンパ球から BAC ライブラリを作製し、候補領域を十分にカバーする BAC クローンを選択し、次世代ゲノムシーケンサーABI SOLiD システムによるゲノムシーケンスを行い、配列を決定した。(進行中)

(倫理面への配慮)本研究は、鹿児島大学および琉球大学の倫理審査を受け許可を得ている。また、解析した患者全員から文書で同意を得ている。

### C. 研究結果

南九州の 16q-ADCA 患者は疾患特異的な SNP ハプロタイプを持っていたが、GATA01 と 17msm は家系間で異なっていた。長野家系の解析で Puratrophin-1 の下流は完全に候補領域から外すことができた。Puratrophin-1 を持たない例外症例はテロメア側のマイクロサテライトマーカーのアリルが南九州の患者と一致しなかった。スクリーニングにより発見した SNP05 を持つ一家系の患者は SNP02 から SNP05 の疾患に関連した一連の変異がみられたが、家系内で segregate しなかった。

候補領域内でゲノムのコピー数の変化は認められなかった。

候補領域を含めたゲノムシーケンスを行っている。

**考察** 以上の結果より、候補領域としては Amino らが報告している GGAA05 から -16C>T puratrophin-1 遺伝子変異までの約 900kb であると考えられた。検討する領域をできるだけ絞り込むために、疾患特異的な変異とされている SNP05 を持つ家系については検体を集め、さらに検討する必要がある。今回、候補領域のコピー数の検討を行ったがコピー数変異は認められなかった。SNP アレイを用いた場合、短い領域のコピー数変異や逆位、挿入は検出されないことから、ゲノムの構造的な変異は、今後も検討していく。同時にゲノムシーケンスの解析により、患者特異的な変異を検出し、疾患との関連を慎重に調べる

### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

投稿中

#### 2. 学会発表

高嶋 博ら 鹿児島県における遺伝性失調症の疫学 第 49 回日本神経学会総会 2008 年 横浜

### 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)

特になし

### F. 健康危険情報

特になし

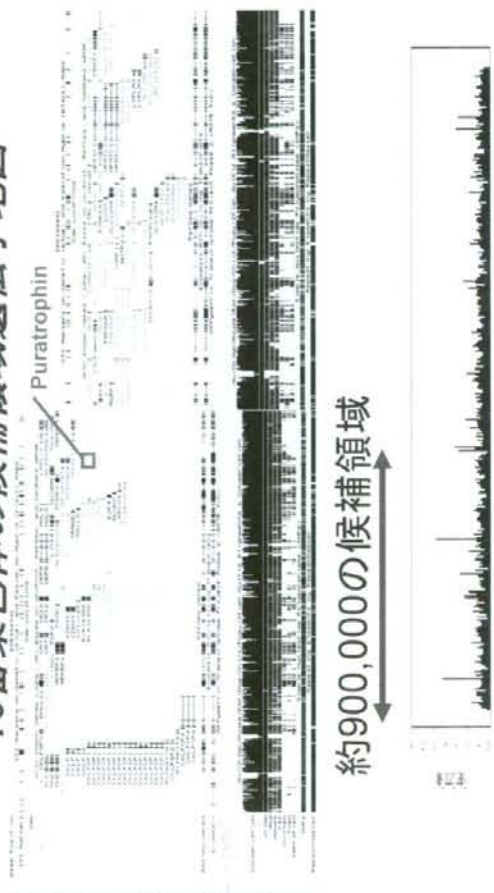
## 16番染色体に連鎖する常染色体優性脊髄小脳変性症の原因同定の試み

班員 高嶋 博 鹿児島大学 神経内科、老年病学

【目的】 全国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】 マイクロアレイ法や次世代ゲノムシーケンサーを駆使して、患者さんの遺伝子を解読し、原因遺伝子を追求しています。

### 16番染色体の候補領域遺伝子地図



エクソンアレイ発現量の比較—変化の大きい遺伝子を検出

### 【今後の方針】

次世代ゲノムシーケンサーは、強力な機械で、数人の患者さんの候補領域の配列を完全に決定し、原因を探しています。マイクロアレイでマッピング、発現、ゲノムの重複などさらべています。理屈的には、遠くない時期に、原因が必ず見つかると思います。

## 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

## 分担研究年度終了報告書

## 運動失調症に関する調査研究

## 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)
研究協力者	網野猛志	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)
	石黒太郎	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)
	佐藤望	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)
	小林千浩	大阪大学大学院臨床遺伝
	戸田達史	大阪大学大学院臨床遺伝
	石川欽也	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。我々はこれまでに、本病型患者は日本中で単一ハプロタイプを示すほど強い創始者効果を示し、約 900kb のゲノム領域が原因遺伝子変異の存在する候補領域であることを明らかにした。本研究では、ゲノムの定量的 PCR, array CGH, サザンブロッティング, BAC/fosmid ライブラリー作製とショットガンシークエンスの結果、約 900kb のゲノム上の候補領域について患者の塩基配列を完全に解読した。その結果、本疾患に特異的な変化が 5 つ明らかとなり、さらに多数の失調症家系での検討から 3 つの塩基配列変化が原因遺伝子変異の候補として絞り込まれた。それぞれの変化について疾患発症との関連について検討を行っている。

## A. 研究目的

第 16 番染色体長腕に連鎖する脊髄小脳変性症(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)、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である。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。

我々はこれまで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た。また、多数の家系で共通するハプロタイプの領域を解析し、原因遺伝子変異の存在する候補領域として、ゲノム上の約 900kb の範囲を同定した。この候補

領域内に登録されている全ての遺伝子のゲノム領域について解析をおこなったが、本疾患の原因変異は明らかとならなかった。

本研究では、疾患の原因となる遺伝子変異を明らかにするために、このゲノム上の候補領域について網羅的に完全な解析を行った。

## B. 研究方法

ゲノム上の候補領域をホモ接合体で本疾患のハプロタイプをもつ患者の末梢血液からリンパ芽球を作製し、そのゲノム DNA を解析した。

候補領域の中に登録されている遺伝子の配列に対して定量的 PCR を行い、また同時に、候補領域内のゲノムの配列に対して約 100bp 毎にプローブを設計したマイクロアレイを用いて oligo array CGH を行い、ゲノムのコピー数の変化を検討した。候補領域をカバーするよう