

200906022A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

運動失調症の病態解明と
治療法開発に関する研究班

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

Annual Report of the Research Committee on Ataxic Diseases
Research on Measures for Intractable Diseases

Health and Labour Sciences Research Grants
The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan

主任研究者 西澤正豊

平成22(2010)年3月

目次

I. 総括研究報告書

運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究 主任研究者 西澤正豊 …… 1

II. 分担研究報告

1. Machado-Joseph 病ではオヌフ核が障害される …… 7
分担研究者 山田 光則 (国立病院機構さいがた病院臨床研究部)
研究協力者 清水 宏・豊島 靖子・高橋 均 (新潟大学脳研究所病理学分野)
2. 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)
(新規病型名 : SCA31) の原因遺伝子同定 …… 10
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 石川欽也・網野猛志・佐藤 望・石黒太郎・新美祐介・高橋 真
(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・戸田達史
(神戸大学大学院医学系研究科神経内科) 浅川修一 (慶応義塾大学医学部
部分子生物学(現 東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物工学])
3. 16 番染色体長腕に連鎖する常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症 (SCA31) の
挿入変異の解析 …… 15
分担研究者 吉田邦広 (信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科)
研究協力者 池田修一、堺 温哉、松本直通 (横浜市立大学大学院環境分子医科学)
4. 南九州地域の常染色体優性脊髄小脳変性症の分子疫学とその病態 …… 18
分担研究者 高嶋 博 (鹿児島大学医歯学総合研究科 神経内科・老年病学)
研究協力者 岡本裕嗣¹, 平野隆城¹, 崎山佑介¹, 大窪隆一¹, 有村公良¹, 要 匡²
(¹ 鹿児島大学医歯学総合研究科 神経内科・老年病学、² 琉球大学医学部
医科遺伝学)
5. SCA12 遺伝子座に連鎖しているが *PPP2R2B* 遺伝子変異を認めない優性遺伝性脊髄小脳変性症
の 1 家系 …… 21
分担研究者 佐々木 秀直 北海道大学医学研究科神経内科学分野
研究協力者 佐藤 和則・相馬 広幸・矢部 一郎 (北海道大学医学研究科神経内科
学分野) 福田 陽子・三井 純・中原 康雄・辻 省次 (東京大学医学部
附属病院神経内科)

6. 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…………… 23
- 分担研究者 辻 省次 東京大学神経内科
- 研究協力者 石浦 浩之・高橋祐二・後藤 順（東京大学神経内科）
JASPAC Japan Spastic Paraplegia Research Consortium
7. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) の頭部 MRI 所見
…………… 26
- 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, 本多純子, 太田京子, 滑川道人, 中野今治(自治医大神経内科)
津川潤, 坪井義夫(福岡大学神経内科) 迫江公己(山梨大学血液内科)
8. 多系統萎縮症の全ゲノム関連解析…………… 29
- 分担研究者 辻 省次(東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科)
- 研究協力者 中原 康雄・市川 弥生子・福田 陽子・高橋 祐二・後藤 順
(東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科)
百瀬 義雄(北原脳神経外科病院神経内科)
西田 奈央・徳永 勝士(東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学)
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)
9. 神経変性関連蛋白質 UCH-L1 の新たな分子機能の解明に関する研究…………… 31
- 分担研究者 和田圭司 (国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部)
- 研究協力者 株田智弘 (国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部)
10. 遺伝性脊髄小脳変性症の遺伝子治療法開発…………… 34
- 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 飯塚 朗・高山 清彦(群馬大学大学院医学系研究科)
11. ポリグルタミン病の核機能病態に基づく治療開発に関する研究…………… 37
- 分担研究者 岡澤 均(東京医科歯科大学難治疾患研究所神経病理学分野)
- 研究協力者 田村拓也・榎戸 靖・伊藤日加瑠(東京医科歯科大学難治疾患研究所
神経病理学分野)

12. 運動失調症の病態機序における細胞内輸送機能の検討 40
- 分担研究者 吉良潤一（九州大学大学院医学研究院神経内科学）
- 研究協力者 大八木保政・栄信孝・本村今日子（九州大学大学院医学研究院神経内科学）洲崎悦男・中山敬一（九州大学生体防御医学研究所 分子発現制御学分野）近藤久雄（九州大学大学院 分子生命科学系部門 細胞工学）
13. SCA10 AUUCU RNA foci の解析 43
- 分担研究者 池田佳生（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学）
- 研究協力者 松浦 徹（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学）
黒崎辰昭（名古屋大学神経遺伝情報学、University of Rochester）
大野欽司（名古屋大学神経遺伝情報学）
阿部康二（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学）
14. DRPLA 治療薬探索を目指した FDA 承認化合物を使った Cell-based high throughputscreening 46
- 分担研究者 辻 省次（東京大学附属病院神経内科）
- 研究協力者 伊達 英俊・後藤 順（東京大学附属病院神経内科）
15. 細胞膜透過性 PTD-QBP1 ペプチドを用いたポリグルタミン病に対する分子治療法の開発 48
- 分担研究者 永井 義隆（国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部）
- 研究協力者 ポピエル 明子・藤掛 伸宏（国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部）戸田 達史（大阪大学 大学院医学系研究科 臨床遺伝学）
和田 圭司（国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第四部）
16. 「ポリグルタミン病の治療ターゲット探索研究」
- シャペロン介在オートファジーを用いた新規ポリグルタミン病治療戦略 51
- 分担研究者 貫名 信行（独）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 BAUER, Peter・GOSWAMI, Anand・WONG, Hon Kit・奥野 弥佐子・黒沢 大・山田 みず樹・宮崎 晴子・松本 弦・紀嘉浩（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）
永井 義隆（国立精神・神経センター）

17. ポリグルタミン病における筋エネルギー代謝測定の試み…………… 54
 分担研究者 佐々木秀直（北海道大医学研究科神経内科学分野）
 共同研究者 矢部 一郎・佐藤 和則・相馬 広幸（北海道大学医学研究科神経内科学
 分野）寺江 聡（北海道大学附属病院放射線科） 沖田 孝一（北翔大学
 健康プランニング学科）
18. 多系統萎縮症における脳内 α -シヌクレイン蛋白凝集体のPETによる画像化…………… 57
 分担研究者 糸山泰人（東北大学大学院医学系研究科神経感覚器病態学講座
 神経内科学分野）
 研究協力者 武田 篤・菊池昭夫（東北大学大学院医学系研究科神経感覚器病態学
 講座神経内科学分野）岡村信行・谷内一彦（東北大学大学院医学系研究
 科生体機能学講座機能薬理学分野）工藤幸司（東北大学未来医工学治療
 開発センター）古本祥三・田代 学（東北大学サイクロトロン核医学研
 究部）三木康生・森 文秋・若林孝一（弘前大学大学院医学研究科脳神
 経病理学講座）
19. MSA-Cにおける3 T磁気共鳴スペクトロスコピーを用いた脳幹代謝物評価…………… 60
 分担研究者 中田 力（新潟大学脳研究所 統合脳機能研究センター）
 研究協力者 鈴木 雄治・山田 謙一（新潟大学脳研究所 統合脳機能研究センター）
 高堂 裕平（新潟大学脳研究所 神経内科）大久保真樹（新潟大学医学
 部 保健学科）五十嵐 博中（新潟大学脳研究所 統合脳機能研究セン
 ター）
20. パソコンソフトを用いた小脳性運動失調の評価（第5報）…………… 63
 分担研究者 黒岩 義之（横浜市立大学大学院医学研究科・医学部神経内科学講座主
 任教授）
 研究協力者 上田 直久（同医学部神経内科），波木井 靖人（済生会横浜南部病院神
 経内科）
21. 多系統萎縮症とパーキンソン病に共通して見られる腸音発生頻度の低下に関する研究
 ……………… 66
 分担研究者 小澤鉄太郎（新潟大学脳研究所神経内科）
 研究協力者 佐治越爾・矢島隆二（新潟大学脳研究所神経内科）
 小野寺 理（新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター）
 西澤正豊（新潟大学脳研究所神経内科）

22. 多系統萎縮症における経時的な volumetry・拡散テンソル像の検討（第2報）…………… 69
 分担研究者 祖父江元（名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科 教授）
 研究協力者 伊藤瑞規、渡辺宏久、熱田直樹、千田 譲、加賀友継、加藤重典
 （名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科）
 長縄慎二（名古屋大学大学院医学系研究科 放射線科）
23. 運動失調症（脊髄小脳変性症・多系統萎縮症）患者の実態調査（第2報）
 ～近畿SCD友の会会員へのアンケートを通じて～…………… 72
 分担研究者 二村直伸（国立病院機構 兵庫中央病院 神経内科）
 研究協力者 松村隆介（国立病院機構 奈良医療センター 神経内科）
 中馬孝容（滋賀県立成人病センターリハビリテーション科）
 高柳哲也（奈良県立医科大学 名誉教授）
24. 小脳失調症に対する短期集中リハビリテーションの効果に関する無作為比較研究
 Trial for Cerebellar Ataxia Rehabilitation (GAR trial) 試験ID/公開日
 UMIN000000824 2007/09/12…………… 75
 分担研究者 宮井一郎（社会医療法人大道会森之宮病院院長代理）
 祖父江元（名古屋大学神経内科教授）
 研究協力者 服部憲明、三原雅史、畠中めぐみ、矢倉一（森之宮病院神経リハ研）
 伊藤瑞規（名古屋大学神経内科）
25. ABCD1欠損マウスにおける極長鎖脂肪酸代謝：脳における極長鎖脂肪酸延長反応と
 フラボノイド genistein 投与の効果…………… 78
 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）
26. 副腎白質ジストロフィーの生体試料収集及び臨床病型修飾因子についての研究…………… 81
 分担研究者 辻 省次（東京大学医学部附属病院神経内科）
 研究協力者 後藤 順・高橋 祐二・市川弥生子・松川 敬志（東京大学医学部附
 属病院神経内科）下澤 伸行（岐阜大学生命総合研究支援センター）
 鈴木 康之（岐阜大学医学教育開発研究センター）

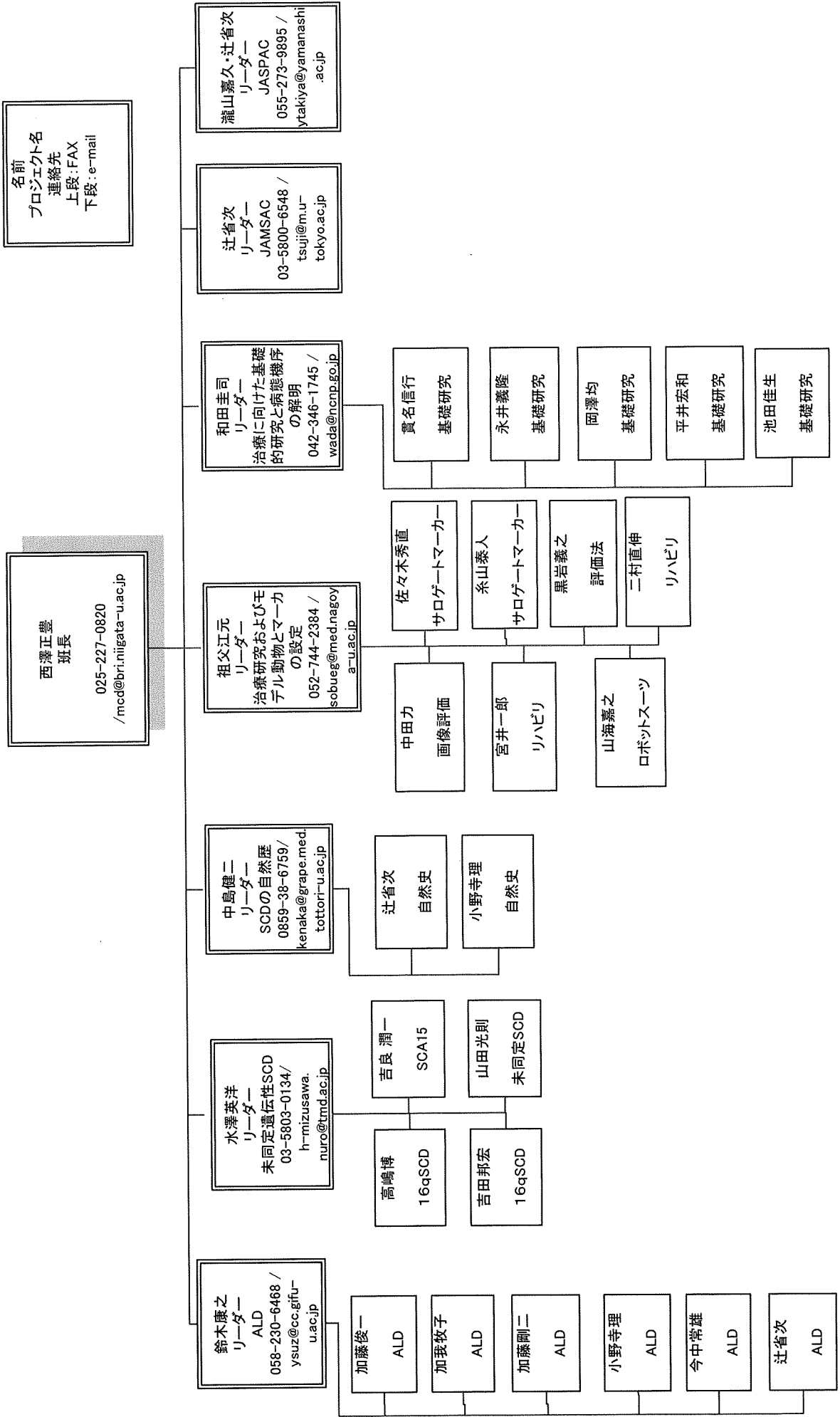
27. 副腎白質ジストロフィー日本人家系解析と発症前診断と取組み 83
- 分担研究者 鈴木康之(岐阜大学医学部医学教育開発研究センター)
- 研究協力者 下澤伸行(岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野)
28. 副腎白質ジストロフィー症に対する造血細胞移植 86
- 分担研究者 加藤剛二 (名古屋第一赤十字病院 小児血液腫瘍科)
- 分担研究者 加藤俊一 (東海大学医学部 基盤診療学系 再生医療科学)
29. 副腎白質ジストロフィー 造血細胞移植後のキメラリズムの推移に関する研究 89
- 分担研究者 加藤 俊一 (東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学)
- 研究協力者 矢部 普正 (東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学)
- 矢部 みはる (東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学)
- 森本 克・清水 崇史・高倉 広充(東海大学医学部専門診療学系小児学)
30. 小児大脳型 ALD 児の高次脳機能評価による診断ならびに治療効果判定に関する研究
- 聴覚失認を呈した小児・思春期大脳型副腎白質ジストロフィー(ALD)の事象関連電位に関する研究 93
- 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)
- 研究協力者 稲垣真澄・古島わかな・軍司敦子・井上祐紀・後藤隆章・崎原ことえ・
- 佐久間隆(国立精神・神経センター精神保健研究所知的障害部)
- 中村雅子(国立精神・神経センター精神保健研究所知的障害部・
- 東京大学医学部耳鼻咽喉科)
31. early onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia (EAOH)/
ataxia-oculomotor apraxia type 1 (AOA1)の genotype-phenotype correlation の解明
..... 96
- 分担研究者 小野寺 理 新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター
- 研究協力者 横関 明男・石原 智彦・西澤 正豊(新潟大学脳研究所神経内科)
- 辻 省次・伊達 英俊(東京大学医学部神経内科)
- 山田 光則 (国立病院機構さいがた病院臨床研究部)

32. 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 2009 年度報告
..... 99

分担研究者 中島健二 (鳥取大学脳神経内科)
研究協力者 安井建一 (鳥取大学脳神経内科) 矢部一郎、佐々木秀直(北海道大学神
経内科)新井公人、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) 伊藤瑞規、祖父江元(名古屋大学神経内科) 磯崎
英治(都立神経病院神経内科) 児矢野繁、黒岩義之(横浜市立大学神経
内科) 足立芳樹(NHO 松江病院神経内科) 小野寺理、西澤正豊(新潟大
学神経内科)

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成21年度 運動失調班 組織図



I 総括研究報告

1. 本研究班の目的

本研究班は、臨床的に運動失調症を共通の主症状とする脊髄小脳変性症、多系統萎縮症および副腎白質ジストロフィーを対象として、その病態を解明し、病態の進行を阻止できる治療法を確立することにより、これらの神経難病を克服することを目的とする。

運動失調症の研究分野においても、神経系における異常蛋白質の蓄積機序など、分子病態に関する基礎的研究が著しく進歩したことに伴い、運動失調症の進行阻止を目的とする治療法の有効性が、培養細胞系や動物モデルで検証出来るようになってきている。こうした現状で、残された最大の課題はこれらの治療法を臨床に応用することにある。

本研究班はこれまでの4年間に、最新の基礎的研究の成果を臨床に還元することを目的として、全国レベルで臨床治療研究を行うことが出来る体制を構築してきた。しかし、運動失調症のような神経変性疾患の進行抑制を目的とした治療薬の臨床効果を検証する方法論は、未だ確立されていない。さらに運動失調症の分野で臨床治験を実施するためには、臨床経過を先取りし、小脳の機能障害を的確に反映することができる代理バイオマーカーを開発することが不可欠である。

このような病態に即した根治的な進行抑制治療法の開発を進める一方で、小脳性運動失調により損なわれた機能を代償する方法を確立することも、運動失調症の患者さんには極めて重要な取り組みである。小脳性運動失調に対してリハビリテーションは実際に広く行われているが、果たしてリハビリテーションは小脳性運動失調に有効か、有効とすれば、どのようなリハビリテーションプログラムが小脳機能を賦活するために最も有効か、さらには、小脳機能を代償するロボットを開発することは可能かなどの課題にも、本研究班は全力を挙げて取り組む。

2. 研究の方法

本研究班は、運動失調症の臨床・治療法開発に関する研究、病態の進行を的確に反映する代理バイオマーカーの確立、分子病態に関する基礎的研究、マシャド・ジョセフ病・脊髄小脳萎縮症6型・多系統萎縮症・家族性痙性対麻痺に関する包括的調査研究、運動失調症に対するリハビリテーションの有効性に関する研究、遺伝子未同定の疾患群の分子病態研究、副腎白質ジストロフィーの治療研究の7プロジェクトについて、それぞれプロジェクトチームを編成し、各プロジェクトリーダーの下に班員、班友が有機的に連携した共同研究を推進している。

臨床治療研究、基礎研究、自然歴研究、リハビリテーション研究、多系統萎縮症研究、家族性痙性対麻痺研究、遺伝子同定研究、副腎白質ジストロフィー治療研究のプロジェクトリーダーは、祖父江元教授、和田圭司部長、中島健二教授、祖父江元教授（宮井一

郎院長代理)、辻省次教授、滝山嘉久講師、水澤英洋教授、鈴木康一教授がそれぞれ務め、5名前後の研究分担者による研究チームを組織して研究を推進し、主任研究者の西澤は研究全体を統括している。各プロジェクトの概要は以下の通りである。

- 1) 運動失調症に関する病態の理解に基づいた進行阻止治療の臨床応用を、多施設共同研究として推進するために、治験の実施に不可欠な、臨床経過を適切に反映する代理バイオマーカーの開発に取り組む。特に、神経細胞に蓄積する異常蛋白質を標的としたイメージング技術の開発を目指す。
- 2) 蛋白質合成の品質管理機構の研究から、異常蛋白質の蓄積を阻止するための熱ショック蛋白質の発現誘導、トレハロースのような蛋白質凝集抑制活性を有する物質の系統的な探索、RNA 干渉やオートファジー機構の誘導などによるさまざまな治療法に関する基礎的検討を行う。小脳に特異的に遺伝子導入を行うことができる方法論を確立し、治療候補物質の効果を検証する。この動物モデル系での治療実験により効果が確認されたものについては、順次臨床応用を目指す。
- 3) 臨床調査個人票に基づく脊髄小脳変性症の自然歴に関する前向き研究を継続し、このデータベースを臨床治療研究の基盤として利用できるようにする。より詳細な調査を必要とする Machado-Joseph 病と脊髄小脳失調症 6 型については、新たな調査票に基づく症例登録を継続する。
- 4) 本研究班を母体として組織されている全国共同研究組織である多系統萎縮症を対象とした JAMSAC、および家族性痙性対麻痺を対象とした JASPAC を引き続き班研究としてサポートし、症例登録と追跡調査を継続する。第一次全国アンケート調査を実施した家族性痙性対麻痺については、引き続き臨床像の把握と原因遺伝子解析を行い、病態に基づいた治療法の開発を目指す。
- 5) 運動失調症に対して最も有効なリハビリテーションの手法を確立する。まず、運動学習の主座である小脳が変性しても、繰り返し練習による短期集中リハビリテーションが有効であるか否か、その効果はどの程度持続するか、また、どのような訓練プログラムが小脳の機能維持に有効であるかを検証する臨床研究を実施する。さらに、筑波大学の山海教授により開発されているロボットスーツ HAL の、運動失調症に対する臨床応用を試みる。
- 6) 原因遺伝子が未同定である優性および劣性遺伝性の脊髄小脳変性症に関しては、家系を有する多施設共同のプロジェクトチームにより、大規模ゲノム解析の手法により

原因遺伝子の同定を目指す。16 染色体長腕に連鎖する優性遺伝性小脳失調症 (SCA31) については、今回同定された原因遺伝子変異が小脳変性を来す分子病態の解明を目指す。

7) 副腎白質ジストロフィーを早期診断し、骨髄移植を速やかに実施できる診療体制を確立するとともに、骨髄移植治療の効果に関する前向き研究を継続する。

3. 本研究の特色と期待される成果

本研究班は3年間で各プロジェクトの成果をまとめ、運動失調症の病態解明と治療法の開発に向けて具体的な提言を行うことを目標としているが、中でも蛋白質の凝集抑制作用を持つ物質による運動失調症の臨床治療研究は本研究班の独創であり、病態の進行抑制に基づく治験の方法論を開発しつつ、早急に取り組むべき課題である。特に、最も重要な課題と位置付けられる代理バイオマーカーの確立に関して、蓄積蛋白質を標的とした画像診断法の確立を目指すプロジェクトも、本研究班の独創的な取り組みである。候補物質遺伝子を小脳に導入して個体レベルで効果を検証できるマウスのシステムは既に確立されている。また、運動学習の主座である小脳の変性に対するリハビリテーションの効果に関しては、世界的にエビデンスが得られておらず、本研究班の取り組みが初めてのものである。短期集中リハビリテーションが運動失調症の進行抑制に有効であるかを検証する臨床研究では、中間解析で非常に有望な結果が得られている。小脳性運動失調に対するロボットスーツの応用に関する研究も本研究班による独創である。

脊髄小脳変性症、多系統萎縮症、副腎白質ジストロフィーなどの運動失調症を呈し、患者数が2万人を上回る難治性神経疾患を克服することは、厚生行政上の重要課題と位置付けられる。当研究の長期的な成果として、これら神経難病の分子病態が解明され、病態の進行阻止に基づく新たな治療法が開発されて、未だ有効な治療法がないこれら疾患に苦しむ患者さんに大きな福音となるばかりでなく、身体介護の負担を軽減することなどを通じて、広く国民の保健医療福祉の向上に繋がり、社会に対して貢献することが期待される。また、研究終了時に期待される目標としては、分子病態の理解が進むことにより、適切な代理バイオマーカーが設定でき、病態の進行阻止を目指した新たな治療法の開発と臨床治験に繋がり、運動失調症に対する有効なリハビリテーションの方法論が確立できて、根治的な治療法が仮に未確立であったとしても、小脳の変性に対抗して運動機能を長く維持することが可能となること、などが挙げられる。

4. 研究の進捗状況

各プロジェクトの進捗状況については、分担研究報告書に詳述されているが、以下に2年目の進捗状況を要約する。

臨床治療研究チームは、臨床経過を先取りできる代理バイオマーカーの探索と継続的なデータ収集を続けており、中でも小脳の変性を直接画像化する方法論の確立に取り組んでいる。

基礎研究チームは、細胞内での蛋白質凝集を阻止するために、ユビキチン・プロテアソーム系、およびオートファジー系の制御によるポリグルタミン病の治療法開発に向けて研究を継続している。基礎研究で得られた成果を直ちに動物個体レベルで検証すべく、小脳プルキニエ細胞特異的に遺伝子導入が可能なシステムがマウスで構築され、進行抑制作用を有する候補物質の効果を *in vivo* でも検証できる体制が整った。

自然歴研究、および多系統萎縮症と家族性痙性対麻痺の研究チームは、それぞれ症例の登録と解析を順調に継続している。遺伝子変異をハイスループットで解析できるシステムも構築され、家族性痙性対麻痺や副腎白質ジストロフィーなどでは新たな遺伝子変異が相次いで見出されている。

リハビリテーション研究チームは、短期集中リハの有効性を確立するための世界初の介入研究をほぼ終了し、最終結果の取りまとめに入っている。中間解析では、運動学習の首座である小脳の変性疾患においても、*use-dependent plasticity* が成立し、短期集中リハの効果が確認されている。今後の臨床への応用が大いに期待される成果である。

遺伝子未同定の遺伝性脊髄小脳変性症研究チームは、わが国に多発することが判明した第16染色体長腕に連鎖する優性遺伝性純粋小脳萎縮症 (SCA31) の原因遺伝子について同定し、新たな遺伝子変異機序を明らかにするという成果を挙げた。また平成21年夏には、原因遺伝子未同定の遺伝性小脳変性症をテーマとしてワークショップを開催し、症例の集積方法と遺伝子解析の体制について協議した。

副腎白質ジストロフィーALD治療研究チームは、小児大脳型ALDに対する骨髄移植療法の改良と、その普及に向けた啓発活動に取り組んでいる。

さらに、平成21年度の研究班会議においては、小脳の生理機能に関する最新の進歩を理解し、これを踏まえて、小脳の機能障害を的確に捉えることができる手法を確立すること、およびこうした手法を臨床の現場に応用することを目的として、小脳の神経生理学に関する基礎、臨床の研究者によるミニシンポジウムを開催した。

臨床症状に代わるバイオマーカーの確立と候補薬の臨床治験は、予想された通り、極めて困難な課題であり、計画通りには進捗していないが、これ以外の研究プロジェクトは予定通り順調に進行していると判断している。3年目のまとめに向けて、鋭意研究を進めたい。

Ⅱ 分担研究報告

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

運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究

Machado-Joseph 病ではオヌフ核が障害される

分担研究者	山田 光則	国立病院機構さいがた病院臨床研究部
研究協力者	清水 宏	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
	高橋 均	新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

Machado-Joseph 病(MJD)の7剖検例においてオヌフ核を定量的に検討し、その下位運動神経細胞数がCAGリピート数依存性に脱落することが明らかにされた。今後、MJDにおけるオヌフ核変性の臨床的意義を解明することが望まれる。

A. 研究目的

オヌフ核は仙髄前角にあり、外尿道・肛門括約筋を支配する下位運動神経細胞を内在し、排尿反射や随意的な蓄尿に関わる。Machado-Joseph 病(MJD)患者はしばしば下部尿路障害や括約筋電図異常を呈し、オヌフ核が変性している可能性がある。我々はMJD患者のオヌフ核を定量的に評価し、CAGリピート数などの臨床データとの関連を調べた。また四肢筋支配の下位運動神経細胞を内在する仙髄外側核群も同様に検討した。

B. 研究方法

MJD患者7名(男性4名、女性3名、年齢34-71歳、平均52歳、CAGリピート数72-80)と、年齢の一致した正常対照5名を検索した。MJD患者6名は多彩な下部尿路障害を呈し、尿失禁・便失禁は各々3名で認められた。S2吻側を含む10 μ m厚パラフィン包埋連続切片を作成し、S2上端から100 μ mおきに15切片をKB染色し、左右15対、計30個のオヌフ核及び外側核群に含まれる核小体が明瞭な神経細胞を数えた。両核の変性程度を年齢で調節し、 R_{ON} 、 R_{LNG} とした。 R_{ON} =(正常対照オヌフ核細胞数の平均 - 患者オヌフ核細胞数) / 正常対照オヌフ核細胞数の平均 / 年齢 \times 100%。 R_{LNG} も同様に算出した。さらにMJD患者3名では、S2上端から200 μ m

おきに8切片をataxin-3抗体で、100 μ mおきに15切片をpTDP-43抗体で免疫染色し、オヌフ核・外側核群での、ataxin-3陽性神経細胞核内封入体(NIIs)の出現率及びpTDP-43陽性神経細胞胞体内封入体(NCIs)の出現個数を調べた。

C. 研究結果

正常対照(図1a, b)と比較し、MJD患者全例で、オヌフ核・外側核群の中等度から高度の神経細胞脱落を認めた(図1c-f)。両核の変性程度は必ずしも同等ではなく、CAGリピート数が大きい患者ではオヌフ核優位の変性が認められた(図1c, d)。他方、リピート数が中等度から小さい患者では、両核の障害程度は同等、あるいは外側核群に変性が強調されていた(図1e, f)。

オヌフ核の細胞数はMJD患者で4-37個(平均17個)であり、正常対照(87-101個(平均93個))に比し有意に少なく($P<0.001$)、またCAGリピート数と有意な逆相関を認めた($r=-0.800$, $P=0.03$)。MJD群で、尿・便失禁の有無でオヌフ核の細胞数に差はなかった。外側核群の細胞数はMJD患者で18-104個(平均58個)であり、正常対照(175-244個(平均211個))に比し有意に少なかったが($P<0.001$)、CAGリピート数、年齢、罹病期間のいずれとも相関しなかった。

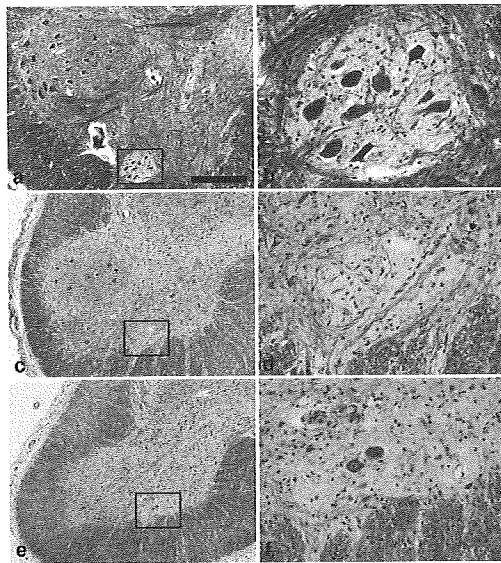


図 1 S2 前角 (a, c, e) とオヌフ核の拡大 (b, d, f). a, b 正常対照; c, d MJD (45 歳男性, CAGn 77); e, f MJD (65 歳男性, CAGn 75). KB. Bar 500 μ m (a, c, e), 100 μ m (b, d, f)

R_{ON} は $1.6 \pm 0.6\%$, R_{LNG} は $1.5 \pm 0.5\%$ であり, CAG リピート数が大きい患者では, R_{ON} は R_{LNG} より大きく, リピート数が中等度から小さい患者では R_{ON} は R_{LNG} が同等もしくは, 後者が大きい症例もあった. また R_{ON} および R_{LNG} はリピート数と優位に相関していた (R_{ON} , $r=0.943$, $P=0.001$; R_{LNG} , $r=0.907$, $P=0.005$).

Ataxin-3 陽性 NIs 出現率は, オヌフ核で 17-25%, 外側核群で 6-15%であった(図 2a). 他方, pTDP-43 NCI は, オヌフ核では認められず, 外側核群では 2-3 個認められた(図 2b).

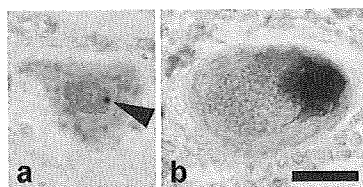


図 2 (a) ataxin-3 陽性 NI (オヌフ核). (b) pTDP-43 陽性 NCI (外側核群) Bar 20 μ m

以上の如く, オヌフ核は MJD の疾患過程で障害される. オヌフ核の病理と, 尿・便秘の有無との間に, 直接的な関連は認めなかった. この背景には, 臨床情報が十分ではない可能性, また MJD では基底核の変性 (Sakakibara R, 2004) などが複合的に蓄尿障害を惹起している可能性などがあると考

えられた.

MJD 患者の年齢が様々でありながら, オヌフ核の細胞数が CAG リピート数と相関したことは, その病理像が強くリピート数に依存していることを示唆している. 一方, 外側核群では, 変性程度を年齢で調節した値がリピート数と相関し, 年齢もその病理像に強く影響すると考えられた.

MR_{ON} , R_{LNG} は, 変性が生後から一定速度で進むと仮定した場合の 1 年間に消失する細胞割合を示す. 本研究では, R_{ON} , R_{LNG} がリピート数と相関する可能性が示された. またリピート数が大きい患者では $R_{ON} > R_{LNG}$ であり, オヌフ核優位に変性し, 中等度から小さい患者では, $R_{ON} = R_{LNG}$ か, $R_{ON} < R_{LNG}$ であり, 両核が同等か, 外側核群優位に変性する可能性が考えられた. これは, 臨床病型の 3 型に分類され, リピート数が小さい MJD 患者で四肢筋萎縮が目立つ事実とも矛盾がない.

我々は既に MJD の脳幹や脊髄前角の下位運動神経細胞に pTDP-43 陽性 NCIs が出現することを示し, この病理所見が, 細胞が大型で, 長く長い軸索を持つなどの細胞形態の反映ではないかと考察した (Tan CF, 2009). より小型で, 細く短い軸索をもつオヌフ核の下位運動神経細胞に pTDP-43 陽性 NCIs が出現しないことは, この考察に矛盾しないものと考えられた.

D. 研究発表

1. 論文発表

Tan CF, Yamada M, Toyoshima Y, Yokoseki A, Miki Y, Hoshi Y, Kaneko H, Ikeuchi T, Onodera O, Kakita A, Takahashi H. Selective occurrence of TDP-43-immunoreactive inclusions in the lower motor neurons in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathol* 118:553-560, 2009

2. 学会発表

清水宏, 山田光則, 高橋均. マチャド・ジョセフ病ではオヌフ核が障害される. 第 50 回神経病理学会総会, 2009 年 6 月, 高松

E. 知的財産権の出願・登録状況 なし

F. 健康危険情報 なし

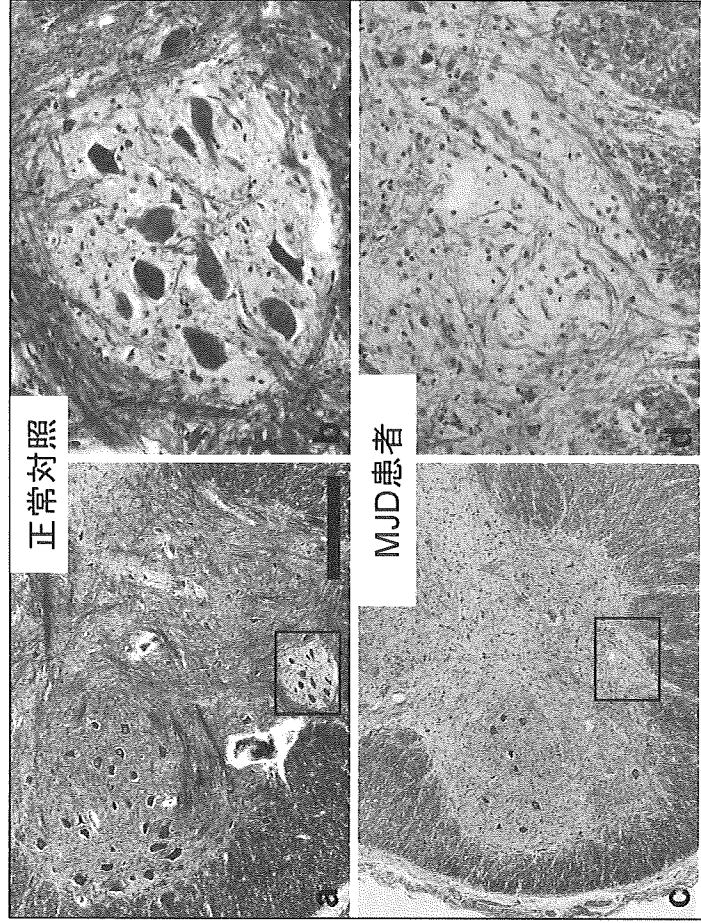


図1 仙髄前角(a, c)とオヌフ核の拡大像(b, d).
MJD患者ではオヌフ核の下位運動神経細胞
が明らかに脱落していた。

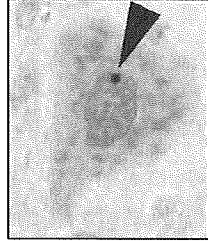


図2 MJD患者オヌフ核
には、病的蛋白質による
核内封入体が出現。

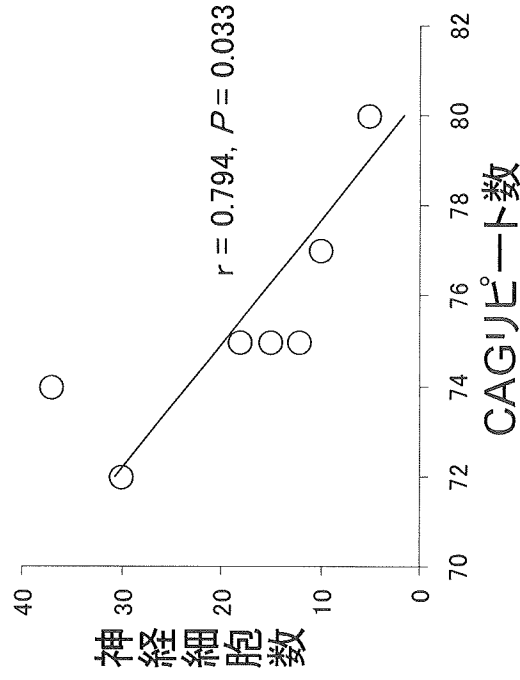


図3 MJD患者のオヌフ核細胞数は、
CAGリピート数と相関した。

**マチャド・ジヨセフ病ではオヌフ核が障害される。
排尿障害との関連を明らかにする必要がある。**

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脊髄小脳変性症(16q22.1-linked ADCA)
(新規病型名:SCA31)の原因遺伝子同定

<p>分担研究者</p> <p>研究協力者</p>	<p>水澤英洋</p> <p>石川欽也</p> <p>網野猛志</p> <p>佐藤 望</p> <p>石黒太郎</p> <p>新美祐介</p> <p>高橋 真</p> <p>小林千浩</p> <p>戸田達史</p> <p>浅川修一</p>	<p>東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)</p> <p>東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)</p> <p>東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)</p> <p>東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)</p> <p>東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)</p> <p>東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)</p> <p>東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)</p> <p>東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)</p> <p>神戸大学大学院医学系研究科神経内科</p> <p>神戸大学大学院医学系研究科神経内科</p> <p>慶応義塾大学医学部分子生物学(現 東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物工学)</p>
---	---	---

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。我々は約 900(kb: キロベース)の候補ゲノム領域について、1)患者ゲノム由来の候補領域につき、サザンブロット解析を行うとともに、2)患者ゲノム由来に BAC clone contig を構築し、そのショットガンシーケンスを完了し、網羅的に遺伝子変化を同定した。その結果、サザンブロットングにて、患者ゲノムに特異的な 2.5~3.8kb の挿入配列を見出した。この挿入配列は長さが長いほど発症年齢が若くなる傾向を見出し、統計的に有為であった。挿入配列は(TGGAA)_n を中心とする 5 塩基配列で構成され、何らかの動原体からの挿入が示唆された。また、患者脳 Purkinje 細胞の核内に転写産物が凝集する所見を認めた。長らく原因が不明であった、第 16 番染色体長腕連鎖型優性遺伝性脊髄小脳変性症は、(TGGAA)_n を中心とする 5 塩基配列の挿入変異で起きると考えられ、新しく脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)と命名し、誌上報告した(Sato N. & Amino T. et al. *Am J Hum Genet* 85 (5): 544-557, 2009)。今後はこの疾患の病態解明と治療法開発に向かって研究を進めたい。

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。本疾患患者では健常者にはない特異的なハプロタイプを持つことから、16q-ADCA と診断されている患者のハプロタイプ(または特異的アレル)の有無をショットガンシーケンスおよびサザンブロット法で検索したところ、昨年度患者に特有な遺伝子変化を3つに絞り込んだ。

本年度は、疾患の原因となる遺伝子変異を決定する最終段階を行った。

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。

患者ゲノムからすでに報告した方法 (Ishikawa K. & Toru S. et al. Am J Hum Genet 77 (2): 280-296, 2005) に従って、候補領域をカバーするように cosmid contig を作製してプローブを用意しサザンブロット法を行い、数百 bp 以上の大きなゲノムの挿入や欠失の検索をサザンブロット法で行った。

また、ホモ接合体患者 DNA から BAC/fosmid ライブラリーを作製しショットガンシーケンスを行うことで、患者の候補領域のゲノム塩基配列の完全解読を行った。これらの結果をデータベース (NCBI build 36.2) や日本人の正常対象例と比較を行い、疾患特異的な配列変化を検出した。

さらに、明らかとなった配列の変化について、多数の失調症家系での検討を行った。

(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)に則って行った。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。

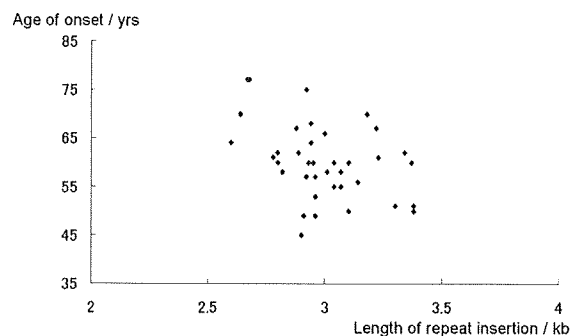
C. 研究結果

候補領域について、完全にサザンブロット法で解析したところ、1 か所のみ患者と対

照者間で矛盾なく segregate する遺伝子変化を見出した。これは、患者ゲノムに認められる 2.5 ~ 3.8kb 程度の長さのある「挿入」であった。この他の残る 2 か所のうち、1 か所は患者と対照者では segregate しないことが判明して棄却、残る 1 か所は遺伝子 *TK2* (thymidine kinase 2) のイントロンにある 1 塩基置換であり、病態への寄与は否定的であった。このため、挿入配列に焦点を絞った。

患者に見られた挿入の長さは、同一家系内ではほぼ同じであったが、家系間では長さが異なっていた。詳細に検索すると、発症年齢が若い患者では、同じ家系内の他の患者よりも挿入長が長いという所見を稀ながら見出した。

一方、発症年齢が確かであった 39 症例について解析したところ、下図のように挿入の長さが長いほど発症年齢が若くなる傾向を見出した。この傾向を Pearson の方法で統計的解析すると、その有為性が証明された ($r = -0.41$, $p = 0.01$)。



挿入箇所の内部配列を確認したところ、通常のシーケンスでは読み切れない 5 塩基繰り返しの複雑な複合体であることが判明した。

一方、健常者集団では 630 人のゲノムを解析したところ、わずか 3 染色体で同じ箇所に患者より小さい挿入を見出したのみであった。さらにこの挿入配列には (TAGAA) $_n$ と (TAAAA) $_n$ は見出したものの、(TGGAA) $_n$ は一切見出されず、患者では (TGGAA) $_n$ が特異的配列であると考えられた。

挿入箇所は、ゲノムデータベースでは何らの遺伝子とも関わりがない領域であることが示された。しかし、隣接する遺伝子 *BEAN* (brain expressed, associated with Nedd4) と *TK2* の下流にそれぞれ複数のエクソンがあり、挿入箇所はこれら 2 つの遺伝子が共有するイントロンに存在することが示唆された。*BEAN* と *TK2* は