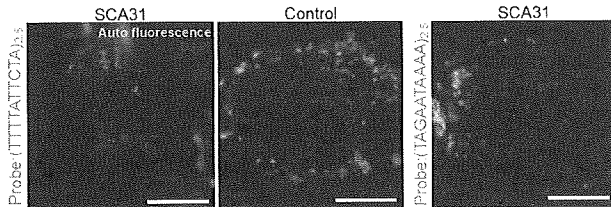


逆方向に転写され、前者は脳特異的に、後者は多くの組織で発現するものの、脳では手低い量しか発現していないことが判明した。

さらに患者でこの挿入配列が転写されているかどうかをオリゴプローブを用いて検索した。その結果、患者の Purkinje 細胞の核には BEAN 方向に転写された挿入配列が、特異的に凝集していることを見出した(図)。



以上のことから、16q-ADCA は、患者に特有の挿入配列が、脳で発現し、転写の後に核内で凝集している所見を見出した。ゲルシフトアッセイでは、この配列には細胞の機能に必須のスプライス因子 SFRS (splicing factor, arginine/serine-rich) 1 や SFRS9 が吸着する可能性を我々は見出している。したがって、患者の Purkinje 細胞などでは SFRS1 や SFRS9 が挿入配列の転写産物で形成される凝集体に没収(sequester)され、量が減少することでスプライス機構に影響を与え、神経細胞の機能障害がおこる可能性を推察している。しかし、正確な病態は不明であり今後は適切なモデル細胞・モデル動物を作製し、その病態の全容を究明してゆきたいと考えている。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Sato N, Amino T, Kobayashi K, Asakawa S, Ishiguro T, Tsunemi T, Takahashi M, Matsuura T, Flanigan KM, Iwasaki S, Ishino F, Saito Y, Murayama S, Yoshida M, Hashizume Y, Takahashi Y, Tsuji S, Shimizu N, Toda T, Ishikawa K, Mizusawa H. Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with “inserted”

penta-nucleotide repeats containing (TGGAA)<sub>n</sub>. *Am J Hum Genet* 2009; 85 (5): 544-557.

2. Ishiguro T, Ishikawa K, Takahashi M, Obayashi M, Amino T, Sato N, Sakamoto M, Fujigasaki H, Tsuruta F, Dolmetsch R, Arai T, Sasaki H, Nagashima K, Kato T, Yamada M, Takahashi H, Hashizume Y, Mizusawa H. The carboxy-terminal fragment of  $\alpha 1A$  calcium channel preferentially aggregates in the cytoplasm of human spinocerebellar ataxia type 6 Purkinje cells. *Acta Neuropathologica* 2009 Dec 31. [Epub ahead of print].

### 2. 学会発表

Ishiguro T., Ishikawa K., Mizusawa H. The carboxy-terminal fragment of  $\alpha 1A$ -calcium channel preferentially aggregates in human spinocerebellar ataxia type 6 cerebella. The American Society of Human Genetics, 59<sup>th</sup> Annual Meeting. ハワイ, ホノルル, 2009 年 10 月 22 日

Ishikawa K., Amino T., Sato N., Ishiguro T., Takahashi M., Ohbayashi M., Mizusawa H. Clinical heterogeneity and gene mutation frequencies in spinocerebellar ataxias with only predominant cerebellar features. The American Society of Human Genetics, 59<sup>th</sup> Annual Meeting. ハワイ, ホノルル, 2009 年 10 月 22 日

石川 欽也, 網野 猛志, 佐藤 望, 水澤 英洋. 新たに同定された遺伝性小脳失調症 16q-ADCA の分子メカニズム 第 32 回日本神経科学大会 シンポジウム SY3 小脳神経回路の発達, 障害その治療戦略 名古屋, 2009 年 9 月 18 日

佐藤 望, 石川 欽也, 網野 猛志, 浅川 修一, 新美 祐介, 石黒 太郎, 高橋 真, 水澤 英洋. 分子遺伝学的解析による 16 番染色体連鎖型脊髄小脳変性症(16q-ADCA)の原因変異の探索.

第 50 回日本神経学会総会 仙台, 2009 年 5 月 20 日

新美祐介, 網野猛志, 佐藤 望, 高橋 真, 石黒太郎, 石川欽也, 水澤英洋. 第 16 番染色体連鎖型脊髄小脳変性症の遺伝子候補領域における SNP 解析. 第 50 回日本神経学会総会 仙台, 2009 年 5 月 20 日

石川欽也, 網野猛志, 佐藤 望, 石黒太郎, 高橋 真, 新美祐介, 大林正人, 水澤英洋. 第 16 番染色体型脊髄小脳変性症の臨床像と分子遺伝学. 第 50 回日本神経学会総会 仙台, 2009 年 5 月 20 日

渡瀬 啓, Curtis Barret, 宮崎大輔, 海野敏紀, 石川欽也, 笠井沙由美, 渡辺雅彦, 水澤英洋, Richard Tsien, Huda Zoghbi. SCA6 ノックインマウス表現型の経時的検討. 第 50 回日本神経学会総会 仙台, 2009 年 5 月 20 日

高橋 真, 石川欽也, 石黒太郎, 水澤英洋.  $\alpha 1A$  カルシウムチャネル C 末端断片の核内での機能について. 第 50 回日本神経学会総会 仙台, 2009 年 5 月 21 日

網野猛志, 佐藤 望, 新美祐介, 石川欽也, 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における遺伝子発現の解析. 第 50 回日本神経学会総会 仙台, 2009 年 5 月 21 日

石黒太郎, 石川欽也, 高橋 真, 網野猛志, 佐藤 望, 水澤英洋. SCA6 における C 末側  $\alpha 1A$  Ca チャネル蛋白の細胞毒性, 細胞内分布の検討. 第 50 回日本神経学会総会 仙台, 2009 年 5 月 21 日

石川欽也, 網野猛志, 佐藤 望, 石黒太郎, 水澤英洋. 脊髄小脳変性症への分子遺伝学的アプローチ. 第 50 回日本神経学会総会 シンポジウム 9 「ポリグルタミン病への分子生物学的アプローチ」 仙台, 2009 年 5 月 21 日

**E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)**

なし

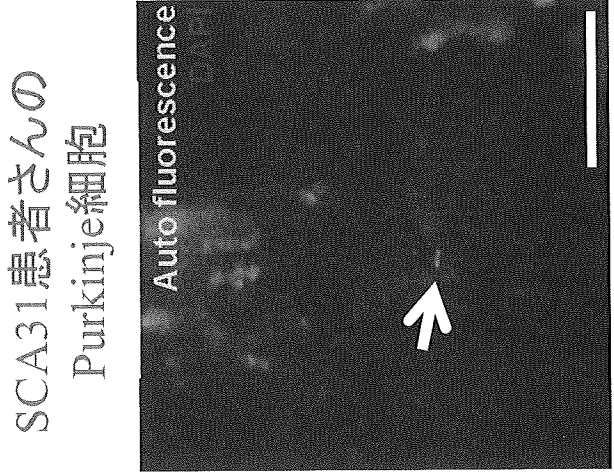
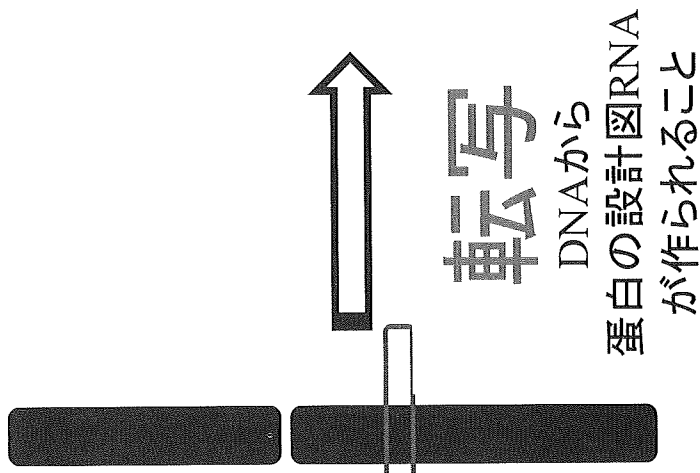
**F. 健康危険情報**

なし

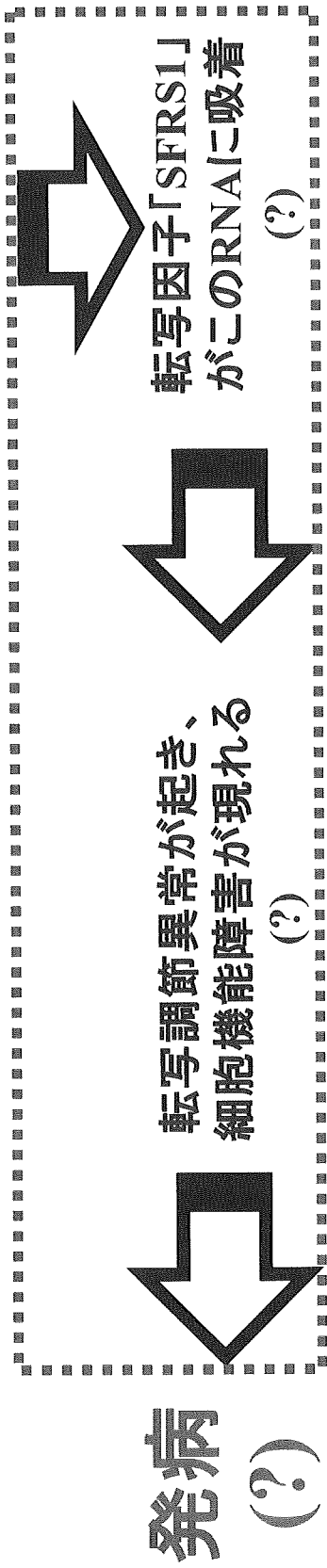
研究成果  
第16番染色体長腕連鎖型優性遺伝性  
脊髄小脳変性症(新規病型名:SCA31)の  
原因遺伝子を同定した。

SCA31の病態  
(点線内は仮説)

(TGGAA)<sub>n</sub>  
正常では存在しない配列  
が患者さんでは挿入され  
てういた。



神経細胞の核内に  
RNAが沈着



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（分担）研究報告書

運動失調症に関する調査研究班

16 番染色体長腕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

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 池田修一<sup>1</sup>、堺 温哉<sup>2</sup>、松本直通<sup>2</sup>（<sup>2</sup>横浜市立大学大学院環境分子医科学）

研究要旨

新たに見出された脊髄小脳失調症 31 型（SCA31）の挿入配列を 71 家系 93 名の患者において検証した。患者全員に(TGGAA)*n* リピートを含む挿入配列が確認された。挿入配列長は発症年齢と有意な逆相関が見られた。長野県内の SCA31 の高集積地では、同一地域内の患者の挿入配列長は比較的均一であり、他地域とは有意な差異が見られた。また(TGGAA)*n* リピートの上流に位置する(TAGAA)*n* リピートにも 0-4 回の variation が見られ、(TAGAA)*n* リピートが存在する場合、その数が多いほど挿入配列長は短い傾向が見られた。

A. 研究目的

16 番染色体長腕に連鎖する常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症は従来 16q22.1-linked ADCA と称されていたが、ごく最近、Sato により本症の疾患特異的な変異として、当該領域に(TGGAA)*n* リピートを含む挿入配列が見出された（Sato N, et al. *Am J Hum Genet* 85: 1-14, 2009）。これまでに puratrophin-1 遺伝子の翻訳開始部位から-16 位の C/T 塩基置換を有する患者、および puratrophin-1 遺伝子の当該 C/T 塩基置換を有さなくても、puratrophin-1 遺伝子よりセントロメア側 900 kb に疾患特異的なハプロタイプを有する患者では、例外なく上記の挿入配列が確認された。これに伴い、本症は新たに SCA31 と呼称されるに至った。

今回、新規変異の同定を受けて、当科で集積した SCA31 患者において当該挿入配列の有無、

挿入配列長と発症年齢や地域分布との関連を検討した。

B. 研究方法

当科で集積した 71 家系 93 名の SCA31 患者を対象とした。このうち 70 家系 91 名には puratrophin-1 遺伝子の当該 C/T 塩基置換が確認されたが、残りの 2 家系 2 名（1 家系は C/T 塩基置換陽性者と陰性者が混在）は puratrophin-1 遺伝子のセントロメア側の疾患特異的なハプロタイプの存在から SCA31 と診断された。挿入配列の確認は Sato らの方法に準じて、PCR 法により行った。挿入配列長は、PCR 産物を *Hae* III で消化した後、ゲル電気泳動を行い、泳動距離を基に Alpha Ease FC Software を用いて算出した。また挿入配列を含む PCR 産物をゲルから切り出し、直接塩基

配列の解析を行った。

### C. 研究結果と考察

71 家系 93 名全員で挿入配列が確認された。挿入配列長はおよそ 2.6~3.7 kb と算定された。また全員が挿入配列内の(TGGAA)<sub>n</sub> リピートを有していた。挿入配列長と発症年齢の間には緩やかな負の相関が見られた。同一家系内で上下世代の検体が入手できた 5 家系における挿入配列長の検討では、必ずしも下の世代において挿入配列がより長いとは言えなかった。また高集積地である木曾、伊那、佐久地域では、同一地域内の患者の挿入配列長は比較的均一であり、他地域とは有意な差異が見られた。

また挿入配列 5'端に存在する(TAGAA)<sub>n</sub> リピート数にも 0~4 回の variation が見られた。興味深いことに(TAGAA)<sub>n</sub> リピート数と挿入配列長には逆相関が見られた。

さらに puratrophin-1 遺伝子の C/T 塩基置換のヘテロ接合体である 1 名の患者において、約 3.0 kb と 4.0 kb 強の PCR 産物が見られ、両方のアレルに挿入配列があるものと考えられた。4.0 kb 強の PCR 産物には 5'端の(TGGAA)<sub>n</sub> リピートはなく、約 3.0 kb の産物には(TGGAA)<sub>n</sub> リピートが見られた。Sato らは稀に 1.5-2.0 kb の挿入配列が健常者にも見られることを示しているが、挿入配列の存在、あるいは挿入配列長のみでは病的意義づけが困難であることが示唆された。

### 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* 8: 46-51, 2009.

- 2) Nakamura K, Yoshida K, Miyazaki D, Morita H, Ikeda S. Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6): Clinical pilot trial with gabapentin. *J Neurol Sci* 278: 107-111, 2009.

- 3) Nakamura K, Yoshida K, Makishita H, Kitamura E, Hashimoto S, Ikeda S. A novel nonsense mutation in a Japanese family with ataxia with oculomotor apraxia type 2 (AOA2). *J Hum Genet* 54: 746-748, 2009.

#### 2. 学会発表

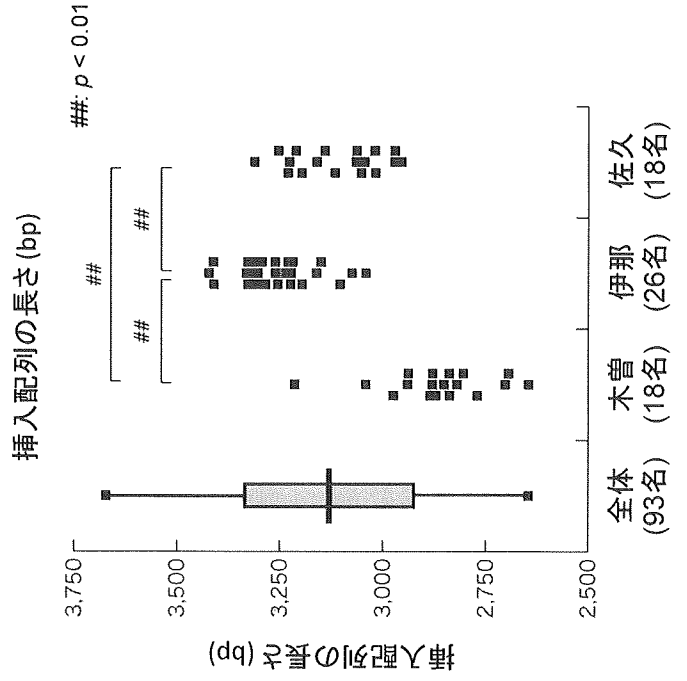
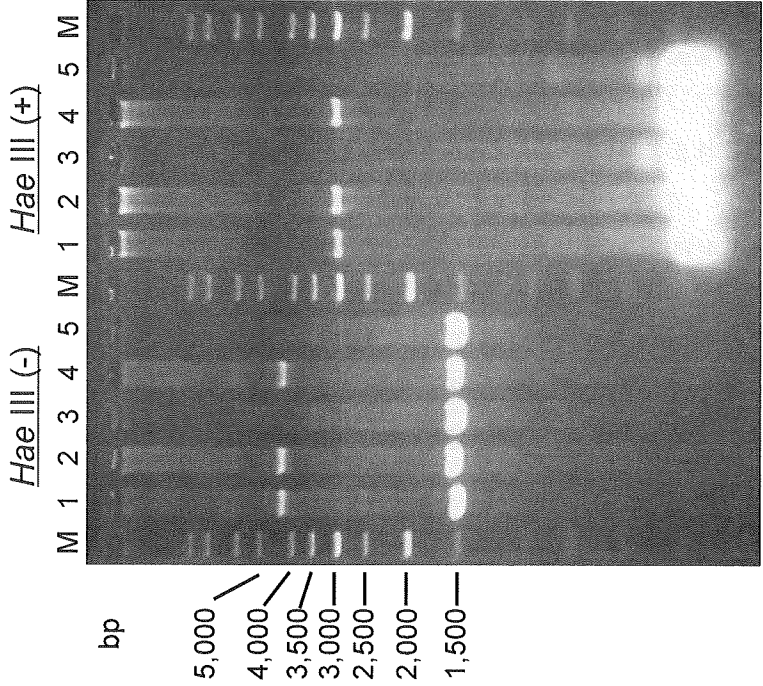
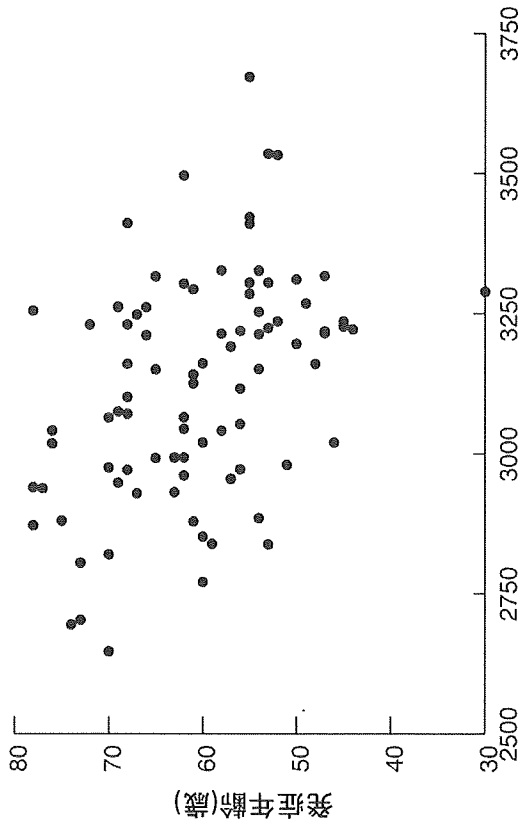
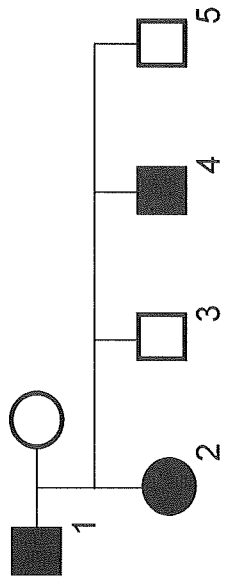
- 1) 中村勝哉, 吉田邦広, 関島良樹, 森田洋, 露崎淳, 大原慎司, 牧下英夫, 池田修一. 末梢神経障害を伴った脊髄小脳変性症 (SCD) 患者の臨床像. 第 50 回日本神経学会総会. 2009.5.21. 仙台.

- 2) 清水雄策, 吉田邦広, 安出卓司, 栢沼勝彦, 池田修一. 純粋小脳型脊髄小脳変性症における臨床像と脳血流シンチグラフィの検討. 第 50 回日本神経学会総会. 2009.5.22. 仙台.

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

長野県における脊髄小脳失調症31型の挿入変異解析 (71家系93名)



## 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

分担研究者 高嶋 博<sup>1</sup>

岡本裕嗣<sup>1</sup>, 平野隆城<sup>1</sup>, 崎山佑介<sup>1</sup>, 大窪隆一<sup>1</sup>, 有村公良<sup>1</sup>, 要 匡<sup>2</sup>

(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)

### 研究趣旨

南九州地域における常染色体優性遺伝性の小脳失調を呈した 116 家系について、疫学的検討を行ったところ南九州地域では SCA31 が 27.5%と最も多い病型で、以下 SCA6、SCA3 の順であった。各地域で疾患集積性に違いを認めしたが、特に鹿児島においては Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS) が 17.5%と高率に認めた。SCA31 の原因として (TGGA)n を含む penta-nucleotide repeats 挿入の存在が明らかにされたのを受け、南九州症例についても発症年齢、杖歩行、車椅子開始年齢について検討したところ疾患共通のハプロタイプを有する症例は約 2.5-3.1 kbp の挿入を認め、疾患との強い連鎖が確認された。repeat 数と発症年齢、杖歩行、車椅子開始年齢に相関は認めなかった。次世代シーケンサーを用いた検討では insertion 部位はギャップを認め、冗長度の低下として捉えられた。

### A. 研究目的

南九州地域(鹿児島、宮崎、大分、沖縄)における常染色体優性遺伝性症例において分子生物学的アプローチを行い、疫学的検討を行う。またこれまで 16q-ADCA type III として原因を調べてきた SCA31 と (TGGA)n を含む penta-nucleotide Repeats 挿入の関連が報告されたのを受け(Sato et al. Am J Hum Genet. 2009 Nov;85:544-57) 南九州症例についても挿入が存在し、疾患との連鎖が認められるか、発症年齢、杖歩行、車椅子開始年齢との間に相関があるかについて検討した。

### B. 研究方法

遺伝子検査に同意した優性遺伝性小脳失調症 116 家系(鹿児島、大分、宮崎、沖縄)について、SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA8, SCA12, DRPLA 遺伝子のリピートの延長を PCR 法で調べ。また、鹿児島に集積地域のある GSS については

制限酵素とシーケンス解析を用いて調べた。南九州地域において *puratrophin-1* 遺伝子変異 (-16C>T)、疾患特異的なハプロタイプブロックを有し、SCA31 と診断した症例をもつ家系例 68 例(発症者 51 例)において既報告のある penta-nucleotide repeats insertion の部位を中心に long PCR, シーケンス法を用い、疾病との連鎖について確認する。またこの insertion が病気の進行に及ぼす影響を見るため、発症年齢、杖歩行年齢、車椅子年齢との関連も検討した。また前年度から取り組んできた次世代シーケンサー SOLiD™3 システムフラグメント解析後において repeats insertion がどのように捉えられたかも確認した。

### C. 研究結果

南九州における常染色体優性の脊髄小脳変性症は SCA31 が 27.5%と最も多く、SCA6 21.5%、SCA3 14.6%の順に存在した。各地域において疾患の集

積性は異なり、沖縄県において、SCA31 は存在せず DRPLA 40%, SCA2 33%と他の地域と異なる分布を認めた。また鹿児島県においては GSS 症例が 17.5%と数多く含まれることが特徴的であった。

南九州の症例における SCA31 の Penta-Nucleotide repeats insertion は疾患特異的なハプロタイプを有する症例全て約 2.5k-3.1kbp の insertion 認め、疾患との強い連鎖が考えられた。既報告では repeat 数と発症年齢に相関があるとされていたが、発症年齢だけでなく、杖歩行、車椅子開始年齢共に repeat 数と相関は認められなかった。次世代シーケンサーを用いた検討では insertion 部位はギャップを認め冗長度の低下として捉えられた。

#### D. 考察

SCA31 における penta-nucleotide insertion は疾患を引き起こす可能性の高い原因である。しかし現時点ではどのような遺伝子への影響を与えているかも明らかではない。我々は昨年度までの報告で今回の検討課題となった penta-nucleotide insertion を含む約 900Kb に原因領域があるとしてきた。また我々が示してきた疾患特異的なハプロタイプをホモ接合体で有する家系は、ヘテロ接合体を呈する症例に比較して、発症年齢や疾病進行に差がないことを示したことは、少数例での検討であるもホモ接合体で存在しているにもかかわらず、発症年齢や重症度への影響は認めないか、軽微であった。本症は gain-of-function の機序により起こっている可能性が高い。

またこの penta-nucleotide insertion は、次世代シーケンサーのフラグメント解析においてはギャップとして検出され、その領域の冗長度の低下が示された。この事実は、今後このような挿入変異を原因とする疾患の原因を探索するのに有用な情報である。

#### F. 研究発表

Hirano R, Takashima H, Okubo R et al. "Clinical and genetic characterization of 16q-linked autosomal dominant spinocerebellar ataxia in South Kyusyu," Japan. J Hum Genet (2009) 54:377-381

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



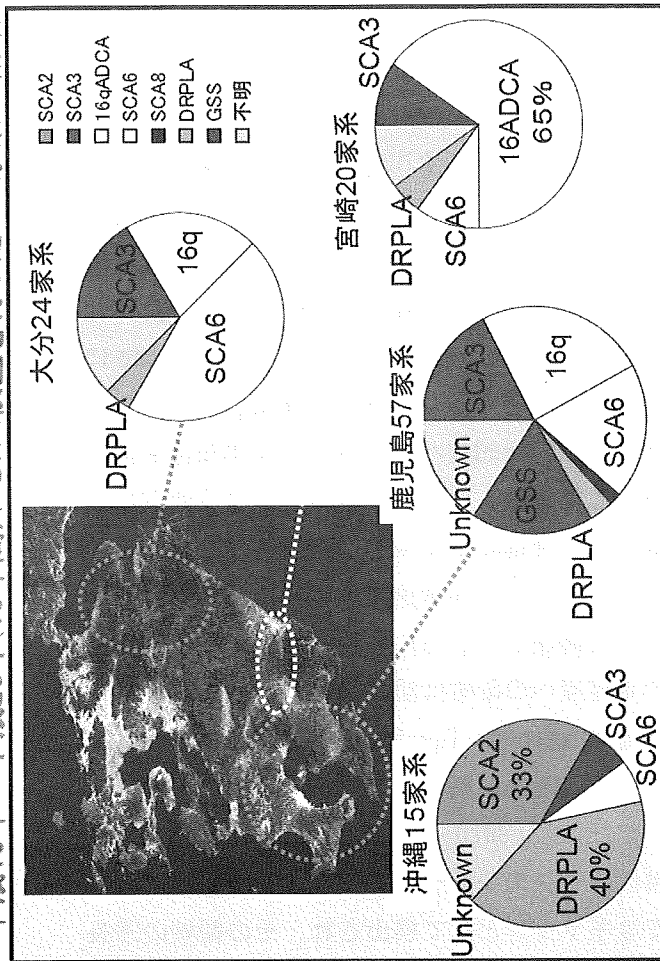
## 南九州地域の常染色体優性脊髄小脳変性症の分子疫学とその病態

班員 高嶋 博 鹿児島大学 神経内科、老年病学

【目的】南九州地域における常染色体優性遺伝性の小脳失調を呈した116家系について、疫学的検討を行う。特に全国に多発する脊髄小脳変性症SCA31 (16qADCA type III)の頻度と遺伝学的原因を明らかにすること。

【結果】南九州地域ではSCA31が27.5%と最も多い病型で、疾患集積性に違いを認めた。特に鹿児島においてはGerstmann-Sträussler-Scheinker 病 (GSS) を高率に認めた。

平成10年～平成20年(10年間)にDNA検査を行った116家系の結果



### SCA31 (16qADCA type III)

#### の原因検索

#### SCA31の原因として

(TGGAA) $n$ を含むpenta-nucleotide repeats 挿入の存在が明らかになされたのを受け、南九州症例についても検討したところ、疾患共通のハプロタイプを有する症例は全例に約2.5-3.1kbpの挿入を認め、この異常は南九州の症例についても認められた。今後発症機序の解明が重要となる。

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

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

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	北海道大学医学研究科神経内科学分野
	相馬 広幸	北海道大学医学研究科神経内科学分野
	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	東京大学医学部附属病院神経内科
	三井 純	東京大学医学部附属病院神経内科
	中原 康雄	東京大学医学部附属病院神経内科
	辻 省次	東京大学医学部附属病院神経内科

研究要旨：原因遺伝子が未定の優性遺伝性脊髄小脳変性症 1 家系において、連鎖解析を行った。対象は発症者 4 名を含む 10 名からなる 1 家系である。起因変異が既知の SCA を除外した後、マイクロアレイによる SNP タイピングを行い、連鎖解析を行った。連鎖解析により、5q31-q33.1 上、4.0Mb 領域に連鎖を認め、本家系で理論的に得られる最大の LOD 値 2.408 が得られた。この候補領域には、SCA12 の原因遺伝子である *PPP2R2B* 遺伝子が含まれているが、SCA12 の原因変異とされるプロモーター領域の CAG リピート異常伸長は認められず、また同遺伝子各エクソンにも変異を認めなかった。ゲノム候補領域について array CGH 解析によ構造多型を検討したが、発症者群に共通する欠失/重複は認められなかった。今後、*PPP2R2B* 遺伝子のイントロンを含む非翻訳領域の解析や、候補領域内の他の候補遺伝子の解析が必要である。

#### A. 研究目的と背景

我々は優性遺伝性 spinocerebellar ataxia (SCA) の 1 家系について、約 400 のマイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析を行い、第 5 染色体上、D5S436 - D5S2014 の区間に最大 LOD スコア 2.39 を得たが、マーカー密度が十分ではなく、他領域の可能性を除外することは困難であった。今回、対象家系の疾患遺伝子のマッピングと当該遺伝子の同定を目的に、SNP アレイを用いて連鎖解析を行い、さらに候補遺伝子について変異の有無を検討した。

#### B. 研究方法および対象

発症者 4 名を含む本家系 10 名を対象とした。インフォームドコンセントを得た後に末梢血白血球から抽出し解析した。SCA1、SCA2、MJD/SCA3、SCA5、SCA6、SCA7、SCA8、SCA10、SCA12、SCA13、SCA14、SCA17、SCA27 および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) については、当該遺伝子の変異を既報に従い検討して除外した。SCA31 にお

ける *puratrophin-1* 遺伝子多型 (-16C>T) については TRPLP 法により検討し除外した。

15 の既知の SCA を除外診断後、約 90 万 SNP を含む the Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix) を用いて SNP のタイピングを行った。パラメトリック連鎖解析は、解析ソフト Allegro を用い、LOD は優性遺伝形式、浸透率 100%、性別間での同等の組み換え率、遺伝子頻度 0.001 を仮定して計算された。また、以下の条件を満たす SNP を選択した：Hardy-Weinberg 平衡  $> 0.05$ 、call rate = 1、confidence score  $< 0.02$ 。さらに、80~120kb の間で最もマイナーアレル頻度が高い SNP を選択し解析に用いた (Min-Max 法)。遺伝子座の存在が疑われた染色体では、全 SNP マーカーにより MLINK を用いて解析をおこなった。

連鎖解析の結果より、候補遺伝子である *PPP2R2B* (protein phosphatase 2, regulatory subunit B, b isoform) のエクソン 1 の 2 つのプライス変異を含む 9 エクソンおよびプロモーター領域の DNA 塩基配

列の検討を行った。

さらに、the custom high-definition CGH microarrays 2x105kフォーマット (Agilent Technologies Inc) を用いて array CGH 解析を行いコピー数多型を検討した。候補領域を関心領域として平均プローブ間隔を70bpに設定した。

(倫理面への配慮)

本研究は医の倫理委員会の審査・承認を得て行った。説明は口頭に加えて文書で行い、文書で同意を得た。

#### C. 研究結果および考察

5q31-q33.1に存在する4.28Mb領域に、本家系における理論的的最大値であるLOD2.408が得られた。候補領域の境界はセントロメア側境界がrs681591とrs10477291との間、テロメア側境界がrs741580とrs32582との間と考えられた。この領域はD5S436とD5S2014間に存在し、さらにSCA12の原因遺伝子である*PPP2R2B*遺伝子を含んでいる。

本家系では、SCA12の起因変異とされる*PPP2R2B*プロモーター領域におけるCAGリピートの異常伸張は認められなかった(発症者全員が16/17リピートのヘテロ)。また、同遺伝子の各エクソン・イントロン境界領域およびプロモーター領域における点変異、欠失、挿入も認められなかった。array CGH解析では、発症者群に共通する欠失や重複は認められなかった。

本家系は緩徐進行性の純粋小脳性運動失調を特徴とする。一部の若年発症者には頭部振戦が認められた。脳MRIでは、患者全員に小脳に限局した萎縮を認めた。

SCA12は*PPP2R2B*プロモーター領域のCAGリピート異常伸張に起因する(変異アレル55~78リピート、正常7~32)が、本邦には公式には今まで報告されていない。SCA12は上肢および頭部の振戦で初発し、パーキンソニズム、認知症など多彩な症状を呈する。本家系は純粋小脳型であり、従来のSCA12とは異なった臨床像を呈している、*PPP2R2B*のCAGリピートの異常伸張が認められないことから、本家系は従来のSCA12

とは異なる疾患と考えられる。本家系の当該遺伝子の候補領域は4.0Mbであり、その中には44の遺伝子が含まれる。今後、*PPP2R2B*のイントロンを含めてより広範な検索し、候補領域における他の遺伝子の変異の有無についても検討が必要である。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sato K, Yabe I, Fukuda Y, Soma H, Nakahara Y, Tsuji S, Sasaki H: Autosomal dominant cerebellar ataxia without pathogenic *PPP2R2B* mutation maps to SCA12 locus. Arch Neurol (in press)

##### 2. 学会発表

佐藤和則、矢部一郎、福田陽子、相馬広幸、中原康雄、辻省次、佐々木秀直: 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。9/26/2009 日本人類遺伝学会第54回大会(東京)

#### E. 知的所有権の取得状況

該当なし。

#### 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

運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究

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

**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 東京大学神経内科  
高橋祐二 東京大学神経内科  
後藤 順 東京大学神経内科  
JASPAC Japan Spastic Paraplegia Research Consortium

**研究要旨**

遺伝性痙性対麻痺について 315 例のリソースを収集し、マイクロアレイを用いた網羅的解析システムで原因遺伝子解析を行った。遺伝性痙性対麻痺原因遺伝子と関連する遺伝子 17 個を解析可能な resequencing microarray を導入し、また 22 遺伝子を解析可能な comparative genomic hybridization array を導入してさらに解析可能な遺伝子を増やした。常染色体優性遺伝例では約 60% で診断が可能になった。遺伝子未同定例については高密度一塩基多型 (SNP) チップを用いた高速連鎖解析システムを用いて解析を進めた。結果、既知の遺伝子座に連鎖しない家系を見出し、今後さらなる家系収集とともに新規遺伝子同定を目指す。

**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 SPG1-45 の遺伝子座が知られ、うち 21 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っている。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は CGH アレイを作成して検討を行っている。本年は新規マイクロアレイでの解析を軌道に乗せ、本研究班を基盤として設立された JASPAC (Japan Spastic Paraplegia Research

Consortium) を中心に収集された検体の解析を進めるとともに、遺伝子未同定例の解析、収集を行った。

**B. 研究方法**

遺伝性痙性対麻痺については、計 17 遺伝子を解析可能な TKYHSP01 アレイを導入し、SPG5、SPG11、SPG33、ABCD1 を追加で解析可能にした。また、計 22 遺伝子を解析可能な新規 CGH アレイを設計し、解析を開始した。症例は JASPAC からの 165 例を合わせ、315 例となり、そのうち 225 例について解析を終了した。

また、遺伝子未同定例に関しては家系調査を行い、高密度 SNP アレイ (Affymetrix SNP6) とパイプラインソフトウェア SNP-HiTLink を用いた高速連鎖解析システムを用いて解析を行った。現在まで 8 家系について解析を行った。

(倫理面への配慮)

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

**C. 研究結果**

常染色体優性遺伝性脊髄性対麻痺 144 例中、SPG4 を 68 例、SPG3A を 5 例、SPG31 を 5 例、SPG8 を 2 例、SPG10 を 2 例認め、約 60%で診断可能だった。10 代以下発症と 40 代発症群において診断率が悪く (40%程度)、新規病型、新規遺伝子の関与が疑われた。

連鎖解析では、7 家系において既知の遺伝子座への連鎖を認めなかった。ただいずれも小家系であり、今後家系収集を続けることで新規遺伝子同定を目指している。

#### D. 研究発表

Ishiura H, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S. A comprehensive mutational analysis system revealed mutational spectrum of hereditary spastic paraplegia. The 22<sup>nd</sup> Biennial Meeting of International Society for Neurochemistry. 2009 Aug, Busan, Korea.

Ishiura H, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S. A comprehensive diagnostic system for hereditary spastic paraplegia employing resequencing microarray, Sanger sequencing, and comparative genomic hybridization array allows efficient identification of various types of mutations in the causative genes. The 59<sup>th</sup> annual meeting of American Society of Human Genetics. 2009 Oct, Hawaii, USA.

石浦浩之、高橋祐二、嶋崎晴雄、滑川道人、瀧山嘉久、後藤順、辻省次、JASPAC. 遺伝性脊髄性対麻痺(HSP)の大規模な分子疫学の解明. 第 50 回日本神経学会総会、2009 年 5 月、仙台.

石浦浩之、高橋祐二、後藤順、辻省次. 遺伝性脊髄性対麻痺の原因遺伝子の網羅的解析による分子疫学の解明. 第 54 回人類遺伝学会総会. 2009 年 9 月、東京.

石浦浩之. 神経疾患における診断アルゴリズム. 第 54 回人類遺伝学会総会. 教育講演. 2009 年 9 月、東京.

#### E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

#### F. 健康危険情報

遺伝性痙性対麻痺遺伝子の網羅的遺伝子解析

変異

小さな重複・欠失  
(数塩基~数十塩基)

大きな重複・欠失  
(数百塩基~数千塩基)

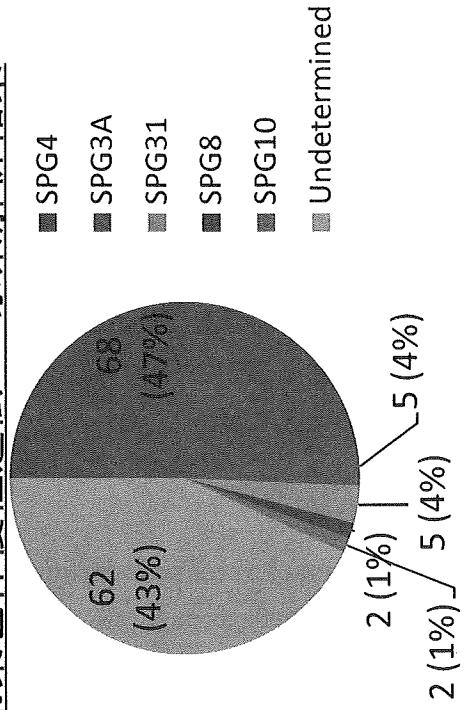
サンガー法

一塩基置換  
Missense  
Nonsense  
Splice site

Resequencing microarray  
<13⇒17遺伝子>

カスタムCGHアレイ  
<16⇒22遺伝子>  
(Comparative Genomic Hybridization)

常染色体優性遺伝144家系解析結果



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

Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) の頭部 MRI 所見

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

研究要旨

今回、臨床的、遺伝学的多様性を示す自験 ARSACS 5 家系 7 症例について、頭部 MRI 所見を詳細に検討した。最近海外の ARSACS 症例で報告のある T2 強調/FLAIR における橋の線状の低信号は、全例に存在していた。また、自験例では、全例に T2 強調/FLAIR 画像で中小脳脚が低信号を呈することを新たに見いだした。同様の所見は、検索し得た範囲では、他の脊髄小脳変性症病型の MRI では認められなかった。以上より、少数例の検討ではあるが、これらの T2 強調/FLAIR 画像における所見は、臨床的多様性を呈する ARSACS の特異的な所見と考えられ、小脳失調や下肢痙性を呈する疾患の鑑別診断に役立つものと考えられた。

A. 研究目的

Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) は、カナダのケベック州より初めて報告され、小脳失調、下肢痙性、末梢神経障害、網膜の有髄線維増生などを特徴とし、知能は正常で、頭部 MRI で小脳虫部上葉の萎縮を呈する。しかし、非ケベック例ではその臨床像は多様であり、下肢痙性を認めない例や、網膜の変化を来さない例、知能低下を示す例などが報告されている。現在のところ、genotype-phenotype correlation は明らかでない。

最近、外国 ARSACS 症例の頭部 MRI T2 強調/FLAIR 画像で、橋に線状の低信号を呈することが報告された (Am J Neuroradiol 2007,

Neurology 2009)。ARSACS は、日本にも 10 数家系の報告があるが、頭部 MRI 所見を詳細に検討した報告は少ない。今回、我々は、遺伝子変異の確認された日本人 ARSACS 患者の頭部 MRI 所見を検討し、その特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

SACS 遺伝子変異を持つ 5 家系 7 症例について、頭部 MRI を施行し、その所見を他の脊髄小脳変性症症例 (MJD/SCA3, LCCA など) の頭部 MRI 所見と比較、検討した。

(倫理面への配慮) 患者に対しインフォームドコンセントを行った上で採血を行い、遺伝子解析を行った。なお、当研究は自治医科大学倫理委員会の承認を得ている。

## C. 研究結果

頭部 MRI の T1 強調画像矢状断で全例に小脳虫部上葉の萎縮を認めた。また、T2 強調画像及び FLAIR 画像水平断で橋腹側と中小脳脚の低信号域を全例に認めた。

MRI での小脳虫部萎縮は、LCCA などでも観察され、ARSACS に特異的ではなかった。

一方、MRI T2 強調画像及び FLAIR 画像における橋腹側の低信号域は、カナダのケベック州の ARSACS 5 症例 (Am J Neuroradiol 2007) や ベルギーの ARSACS 1 症例 (Neurology 2009) でも報告されているが、調べ得た範囲では他の脊髄小脳変性症や遺伝性痙性対麻痺症例ではみられなかった。

さらに、両側中小脳脚の T2 強調画像及び FLAIR 画像での低信号域は、これまで ARSACS や他の脊髄小脳変性症病型では報告のない所見であった。

今後さらに症例を蓄積してから判断する必要があるが、T2 強調画像及び FLAIR 画像における橋腹側と中小脳脚の低信号域という MRI 所見は、痙性失調症を呈する症例の鑑別診断に役立つと考えられた。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 瀧山嘉久. 遺伝性痙性対麻痺. 山梨医科学誌 24: 1-12, 2009.
- 2) 瀧山嘉久. マチャド・ジョセフ病の臨床・分子遺伝学. 山梨医科学誌 24: 13-24, 2009.
- 3) 瀧山嘉久. MJD/SCA3. Clinical Neuroscience 27: 52-54, 2009.
- 4) 太田恵美子, 長坂高村, 新藤和雅, 当間忍, 長坂加織, 三輪道然, 瀧山嘉久, 塩澤全司. ニューロフェリチノパチーの臨床. 臨床神経 49: 254-261, 2009.

5) 末田芳雄, 高橋哲也, 越智一秀, 大槻俊輔, 滑川道人, 郡山達男, 瀧山嘉久, 松本昌泰. 新規 GFAP 遺伝子変異 (S398F) を認めた成人型 Alexander 病の 1 例. 臨床神経 49: 358-363, 2009.

### 2. 学会発表

1) 嶋崎晴雄, 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, 中村勝哉, 吉田邦広, 池田修一, 瀧山嘉久. SPG17 の原因遺伝子 seipin のナンセンス変異をヘテロ接合で認めた痙性対麻痺の 1 家系. 第 50 回日本神経学会総会. 2009 年 5 月 21 日. 仙台.

2) 嶋崎晴雄, 本多純子, 滑川道人, 中野今治, 迫江公己, 瀧山嘉久. 非ケベック ARSACS 症例の臨床・分子遺伝学的検討. 第 54 回日本人類遺伝学会大会, 2009 年 9 月 24 日, 東京.

3) 太田恵美子, 長坂高村, 新藤和雄, 長坂加織, 三輪道然, 瀧山嘉久, 当間忍, 塩澤全司. ニューロフェリチノパチーの画像所見. 第 50 回 日本神経学会総会. 2009 年 5 月 21 日. 仙台.

4) 滑川道人, 嶋崎晴雄, 小川朋子, 本多純子, 迫江公己, 中野今治, 瀧山嘉久. 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) の臨床的検討. 第 50 回 日本神経学会総会. 2009 年 5 月 21 日. 仙台.

## E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

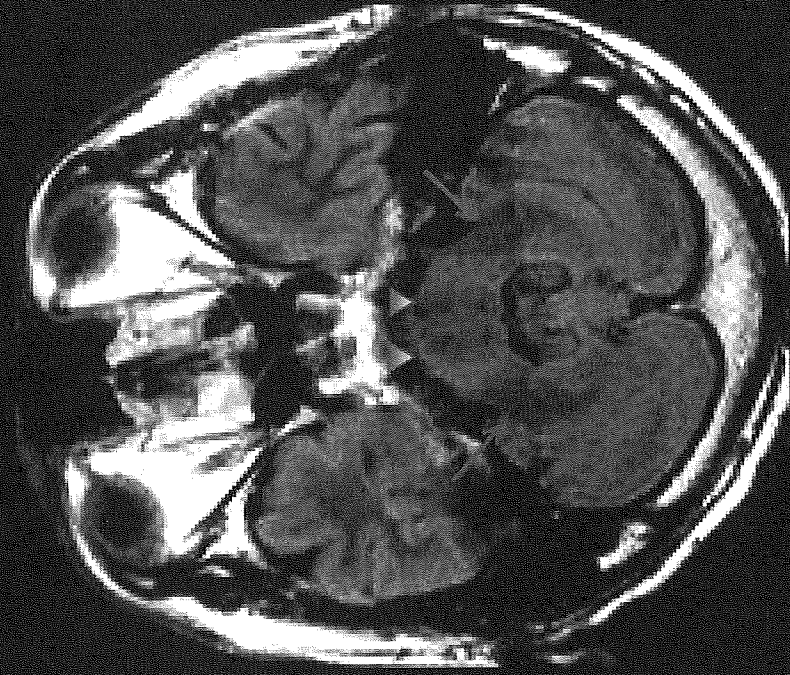
なし.

## F. 健康危険情報

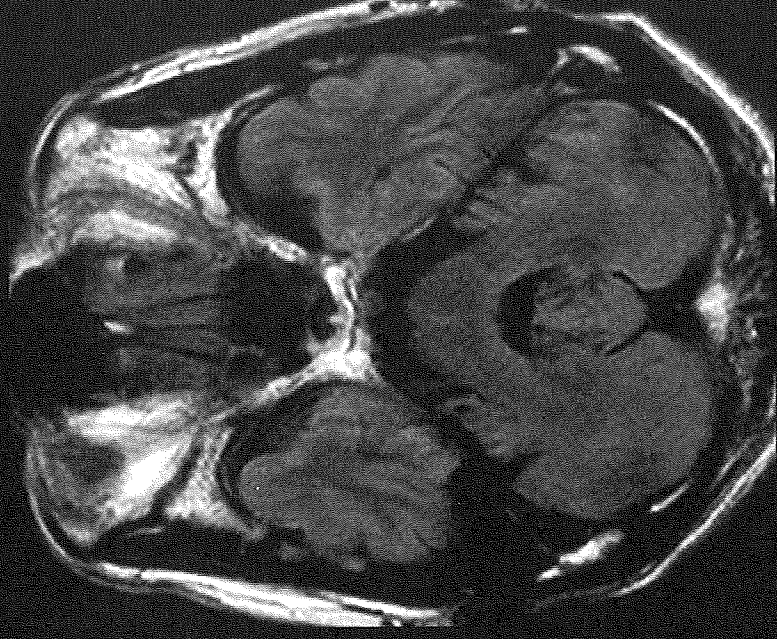
なし.



## ARSACSの頭部MRI所見 (FLAIR画像)



ARSACS



MJD

ARSACS症例では、MRIのT2強調/FLAIR画像で、橋(△)と中脳脚(↓)に低信号域がみられた。この所見はMJDなど他の脊髄小脳変性症には認められず、ARSACSに特異的である。

## 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

## 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</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
	<b>研究協力者</b>	市川 弥生子
	百瀬 義雄	北原脳神経外科病院神経内科
	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。2008 年度にタイピングを行なった 1<sup>st</sup> set (MSA 検体 209 例, 正常対照者検体 220 例) に加え、追加解析検体として 2<sup>nd</sup> set (MSA 検体 174 例, 正常対照者検体 171 例) について、Illumina Human660K BeadChip<sup>R</sup> にてタイピングを行ない、解析を施行した。

**C. 研究結果および考察**

タイピングの行なわれた 2<sup>nd</sup> set の検体について、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チェック後、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 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  $p < 0.05$ : 24,516 個,  $p < 0.01$ : 4,945 個,  $p < 0.001$ : 478 個,  $p < 0.0001$ : 44 個,  $p < 0.00001$ : 4 個であった。1<sup>st</sup> set と 2<sup>nd</sup> set を combine しての解析も併せて行ない、 $\chi^2$  検定(Allelic test)の  $p$  値における有意差の認められる SNP 数は  $p < 0.05$ : 23,803 個,  $p < 0.01$ : 4,790 個,  $p < 0.001$ : 462 個,  $p < 0.0001$ : 32 個,  $p < 0.00001$ : 2,  $p < 0.000001$ : 1 個であった。

#### D. 結論

日本人の MSA の 2set による GWAS が終了し、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、更なる replication に向けて、同規模の MSA 症例の収集、replication study を進めることが必要である。また、海外の MSA 症例を用いた replication study も並行して進めていく必要がある。

#### E. 研究発表

##### 1. 学会発表

中原康雄, 百瀬義雄, 市川弥生子, 福田陽子, 高橋祐二, 西田奈央, 徳永勝士, 山本健, 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 50 回日本神経学会総会 5 月 2009 仙台

中原康雄, 百瀬義雄, 市川弥生子, 福田陽子, 高橋祐二, 西田奈央, 徳永勝士, 山本健, 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 54 回日本人類遺伝学会 9 月 2009 東京

#### 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

運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究

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

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

研究要旨

UCH-L1 の欠損マウスである gad マウスは主に延髄薄束における逆行性軸索変性を呈し、進行性感覚失調を示すことから、UCH-L1 研究は感覚性運動失調の病態機序を解明する上で有用であると考えられる。今回我々は UCH-L1 の新たな機能として、UCH-L1 がその hydrolase 活性非依存的に CDK の kinase 活性を調節することを明らかにした。さらにショウジョウバエ UCH のノックダウンにより MJD モデルの複眼変性が悪化することを見出した。CDK の機能異常は神経変性に関わるという報告が多数あることから、今回見出された UCH-L1 の新規機能は UCH-L1 の神経保護作用に関与する可能性がある。さらに、UCH-L1 は MJD の病態に関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

脱ユビキチン化酵素の一つ ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1)は神経細胞において高い発現を示す蛋白質である(脳可溶性蛋白質の 1-5%)。UCH-L1 の欠損マウスである gad マウスは主に延髄薄束における逆行性軸索変性を呈し、進行性感覚失調を示すことから、UCH-L1 研究は感覚性運動失調の病態機序を解明する上で有用であると考えられる。また UCH-L1 はパーキンソン病やハンチントン病など様々な神経変性疾患への関与も報告されている。UCH-L1 はその酵素活性非依存的にモノユビキチンを安定化するが、UCH-L1 の hydrolase 活性は非常に弱いことがわかっており、現在のところ UCH-L1 の分子機能に関しては不明な点が多く残されている。そこで本研究では UCH-L1 の新たな分子機能を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

抗体アレイを用い、UCH-L1 の新たな結合蛋白質を探索した。結合候補蛋白質について、免疫沈降法により細胞内における結合を検討

した。また精製蛋白質のみを用いた cell-free kinase assay や培養細胞を用いた kinase assay を行うことにより cyclin-dependent kinase (CDK)による基質のリン酸化に UCH-L1 が与える影響を解析した。UCH-L1 の hydrolase 活性を欠失させた C90S UCH-L1 を用いて UCH-L1 の新規機能に hydrolase 活性が必要であるかを解析した。さらにショウジョウバエの MJD 複眼変性モデルを用いて UCH の生理機能の解析を行った。

C. 研究結果

今回我々は UCH-L1 の新たな結合蛋白質として Cdk1, Cdk2, Cdk4, Cdk5 を見出した。精製蛋白質のみを用いた cell-free kinase assay を行った結果、UCH-L1 は CDK による基質のリン酸化を増強した。培養細胞を用いた kinase assay においても UCH-L1 は CDK による基質のリン酸化を増強した。UCH-L1 の hydrolase 活性を欠失させた C90S UCH-L1 も野生型 UCH-L1 と同様に CDK と結合し、CDK の kinase 活性を増強した。以上の結果から、UCH-L1 はその hydrolase 活性非依存的に