

200936069A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業
疾病・障害対策分野

有棘赤血球舞踏病の疫学調査と診断法の確立
および分子病態の解明

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 佐野 輝

平成 22 (2010) 年 5 月

目次

I. 平成 21 年度厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服事業） 有棘赤血球舞踏病の疫学調査と診断法の確立および分子病態解明班名簿	1
II. 総括研究報告書 有棘赤血球舞踏病の疫学調査と診断法の確立および分子病態解明	3
III. 班会議資料等	
班合同班会議プログラム	17
班会議抄録	19
IV. 「有棘赤血球舞踏病」有病者数全国一次調査 関連資料	21
V. 研究成果の刊行物	
Chorea-acanthocytosis with upper motor neuron degeneration and 3419_3420 delCA and 3970_3973 delAGTC VPS13A mutations	25
モデル動物を用いた精神神経疾患の病態解析	29

- I. 平成 21 年度厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）
有棘赤血球舞踏病の疫学調査と診断法の確立および分子病態解明班名簿

平成 21 年度 厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）
有棘赤血球舞踏病の疫学調査と診断法の確立および分子病態解明班

	氏名	所属	職名
研究代表者	佐野 輝	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 精神機能病学分野	教授
研究分担者	上野 修一	愛媛大学大学院医学系研究科 脳とこころの医学	教授
	中村 雅之	鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 メンタルケアセンター神経科精神科	講師

II. 総括研究報告書

有棘赤血球舞蹈病の疫学調査と診断法の確立および分子病態解明

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服事業）
総括研究報告書

有棘赤血球舞踏病の疫学調査と診断法の確立および分子病態解明班

研究代表者 佐野 輝 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨：有棘赤血球舞踏病（chorea-acanthocytosis; ChAc）は主に常染色体劣性の遺伝型式をとる稀な遺伝性神経変性疾患である。その臨床表現型は Huntington 病類似の不随意運動と末梢血の有棘赤血球症を呈し、病理学的には脳の線条体の神経変性を特徴とする。疾患遺伝子(*VPS13A*)変異は遺伝子全体に分布しており、ヘテロ接合性にしか変異が見つからない ChAc 症例も存在する。

ChAc は国際的に本邦からの症例報告が多く日本人に多いと言われているがその頻度は明らかでなく、遺伝子診断のついた症例の病理の報告は殆どない。本研究によって、ChAc の *VPS13A* 遺伝子変異には一般的なシーケンシングでは同定できない欠失や挿入変異が含まれており、ChAc の分子診断にはコピー数バリエーション解析やウエスタンブロット解析も併用する必要があることが明らかとなった。また、ChAc の遺伝子診断のついた上位運動ニューロン障害を伴う症例の神経病理学的解析では ALS や FTLD-ALS でみられる封入体はなく、これら運動ニューロン疾患とは異なる変性機構の存在が示唆された。また ChAc の疫学調査では有棘赤血球を伴う舞踏病の診断基準を満たす症例の頻度は非常に少なく、その中では ChAc が最も多いことが示唆された。

A. 研究目的

有棘赤血球舞蹈病 (Chorea-acantocytosis; ChAc) は Huntington 病類似の神経精神症状と有棘赤血球症を呈する稀な遺伝性神経変性疾患である。ChAc は国際的に日本からの報告が半数以上を占め、比較的日本人に多い疾患と考えられている。ところが、*VPS13A* (Vacuolar protein sorting 13 homolog A) 遺伝子変異の種類や分布、*VPS13A* 遺伝子産物 chorein の発現との関連、日本人 ChAc の頻度などの詳細は明らかでなく、遺伝子診断のついた症例の神経病理の報告は殆どない。ChAc は平成 20 年度に特定疾患に認定され、その実態の把握について研究調査が求められている。そこで、多施設における有棘赤血球舞蹈病疑い症例についてコピー数バリエーション (Copy Number Variant; CNV) 解析を含めた遺伝子解析および赤血球膜を用いた chorein 検出解析などを行い ChAc の分子的診断法を確立し、遺伝子変異の実態を明らかにする。また、ChAc の臨床症状に加え上位運動ニューロン障害を呈した症例について遺伝子解析を行い、その剖検脳について神経病理学的解析を行う。さらに、ChAc の疫学調査を行い、分子的診断を行うことにより疾患頻度や分布を明らかにし、臨床症状との相関について検討を行う。将来的にはこれらの研究から得られたサンプルやモデルマウスを用いて生化学

的、組織学的手法によって関連タンパク質発現や相互作用する分子の同定など ChAc の分子病態の解明に結びつく研究に繋げていきたい。

B. 研究方法

ChAc の臨床診断がつき、遺伝子検査および chorein の検出解析について同意が得られた 34 名に対して、血液サンプルの採取を行い、mRNA および gDNA 抽出や cDNA 合成および赤血球膜を分離した。それらを用いて直接シーケンシング法による遺伝子変異解析、Taqman probe を用いた定量的 Polymerase chain reaction (PCR)法による CNV 解析、ウエスタンブロット法による chorein 検出解析を行い、結果を総合して分子的診断法を確立し、同定した遺伝子変異について変異の種類や遺伝子上の分布を解析する。ChAc 臨床症状に加え上位運動ニューロン障害を伴う症例について、遺伝子診断を行い、死後脳に対しヘマトキシリン・エオジン染色もしくは Klüver-Barrera 染色、glial fibrillary acidic protein (GFAP)、TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43)、リン酸化および非リン酸化ニューロフィラメント、ミクログリア、ユビキチンの免疫染色を行った。また、ChAc 頻度などを把握するために全国の精神科および神経内科にアンケート調査を行った。アンケート調査として、全国の大学病院精神科(80 施設)、精神科病院協会

に所属する日本精神神経学会研修指定病院(525 施設)、自治体立精神科病院(113 施設)、日本神経学会専門医認定施設(657 施設)、計 1375 施設に対して有棘赤血球を伴う舞蹈病の診断基準ならびに一次アンケート調査用紙を配布した。

本研究における疫学調査については「疫学研究に関する倫理指針」に基づき、鹿児島大学の倫理委員会の承認を得、説明と同意を得た上で行った。また、本研究課題はヒトゲノム・遺伝子解析研究を含むため、人間の尊厳及び人権を第一とし、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針の施行等について」(平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省研究振興局長・厚生労働省大臣官房厚生科学課長・経済産業省製造産業局長 4 連名通知) に基づき鹿児島大学医学部遺伝子研究倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果および考察

1. *VPS13A* 遺伝子変異解析

34 名に対して行った直接シーケンシングによる遺伝子変異解析では、ホモ接合性に変異を認めたものが 19 名(55.9%),複合ヘテロ接合性に変異を有したもの

が11名であった。直接シーケンシング法では変異をヘテロ接合性に一つしか有さないものが4名存在した。CNV解析の結果、その4名中1名が exon24 から45までの duplication を有していた。また4名中1名は exon24 から26までの欠失を有していた。シーケンシングとCNV解析を総合すると、ホモ接合性に変異を有したものが19名(55.9%)、複合ヘテロ接合性に変異を有したものが13名(38.2%)、ヘテロ接合性に一つしか変異が見出せなかったものが2名(5.9%)であった。遺伝子解析の結果2種類のCNVを含めた23種類の新規疾患変異を見出した。その種類はスプライスサイト、ナンセンス変異、欠失/挿入変異であり exon24 から45までの duplication 変異を除くと変異下流に premature stop codon を生じ、truncated protein を産するタイプの変異であった。タンパク質抽出が可能であった15名に対してウエスタンブロット解析を行った結果、全例について chorein のバンドは認めなかった(図1)。遺伝子解析でヘテロ接合性にひとつしか変異がみいだせなかった2名についてもウエスタンブロット解析では chorein のバンドは認めなかった(図1)。従ってヘテロ接合性に変異を一つしか認めなかったものも、今回の解析では見つからない種類の遺伝子変異を有している可能性が強く示唆され、本研究の対象症例は全例について劣性遺伝形式である可能

性が高い。CNV 解析やウエスタンブロットによる chorein 検出解析は ChAc の分子診断の補助として有用であり、これまでのシーケンシングによる遺伝子変異解析だけでは変異を見逃してしまう例についても、CNV 解析を含めた遺伝子解析とウエスタンブロットによる chorein の検出解析を併用することによって分子診断が下せる症例が存在することが明らかとなった。これらの解析で得られた結果から表 1 に日本人で見られた *VPS13A* 遺伝子変異アレル頻度を示した。日本人の *VPS13A* 変異は Exon37 4411C>T (R1471X) と Exon60_61 欠失変異が比較的多く半数以上を占めたが、その他の変異については部位分布ともに多様であった。

2. ChAc の臨床症状に加え上位運動ニューロン障害を伴った症例の *VPS13A*

遺伝子解析と死後脳解析

VPS13A 遺伝子解析の結果、この症例は 3419_3420delCA 変異および 3970_3973delATGC 変異を複合ヘテロ接合性に有していた。これらの変異はそれらの下流に premature stop codon を生じ、その結果 truncated protein を産することから疾患変異であると考えられた。脳病理ではグリオシスを伴う神経脱落変

性を尾状核、被殻や黒質などに強く認め、運動皮質や錐体路にも変性を来していた。この症例の上位運動ニューロンの変性には ALS や FTL D-ALS などの運動ニューロン疾患で見られる Bunina 小体や TDP-43 やユビキチン陽性封入体は認めず、これらの疾患とは異なる運動ニューロンの変性機構の存在が示唆された。

3. 神経有棘赤血球症の疫学調査（表 2）

全国の精神科一次調査を行ったところ、平成 21 年 12 月 18 日現在、14 通が不通のため返却され、609 施設からの回答を回収した（回収率 47.7%）。その中で、平成 20 年 11 月 1 日から平成 21 年 10 月 31 日までの一年間に「有棘赤血球を伴う舞踏病の診断基準」の臨床所見を有するが確定診断には至っていないものが 13 症例、遺伝子診断により有棘赤血球舞踏病の確定診断を受けたものが 9 症例であり、合計すると 22 症例であった。McLeod 症候群やその他の有棘赤血球を伴う舞踏病で分子的に確定診断された症例は認めなかった。以上より、「有棘赤血球を伴う舞踏病」については臨床的に把握されている数は非常に少なく、そのうちのほとんどが有棘赤血球舞踏病であることが示唆された。Tani らの報告¹⁾でも 16,160,714 もの献血血液の解析で最終的に McLeod phenotype として同定で

きたのは3例にすぎなかった。全日本で McLeod phenotype として登録されているのもわずか9例であり、McLeod 症候群は ChAc よりも稀な疾患であると考えられる。今後は、「有棘赤血球を伴う舞踏病の診断基準」の臨床所見を有する症例をもつ施設に対し二次調査を行いうとともに確定診断に至っていない症例については分子的診断を進めていく予定である。

D. まとめ

ChAc の臨床表現型を呈する 34 名について CNV 解析を含めた *VPS13A* 遺伝子解析と chorein 検出解析を行い、全例について ChAc の分子的診断を確定し、2 つの CNV を含んだ 23 種類の新規疾患変異を見出した。遺伝子変異は *VPS13A* の 5'側から 3'側まで広く分布していた。それらはナンセンス変異やスプライスサイト変異、欠失挿入変異など多種に渡り、そのほとんどが premature stop codon を生ずる変異であり、chorein 検出解析の結果と総合すると全例が劣性遺伝であることが示唆された。また上位運動ニューロン変性をともなう ChAc 症例では Bunina 小体や TDP-43 およびユビキチン陽性封体は認めなかったことから、ALS や FTLD-ALS などの運動ニューロン疾患とは異なる変性機構の存在が示唆された。有棘赤血球を伴う舞踏病の疫学調査から、臨床的に把握されている「有棘

赤血球を伴う舞蹈病」は非常に稀であり、分子的に確定診断されたものは ChAc のみであったことから、そのほとんどが ChAc であることが示唆された。

参考文献

- 1) Y. Tani *et al.* *Neuroacanthocytosis Syndromes II* (R. Walker *et al.* eds.) McLeod Syndrome: A Perspective from Japanese Blood Centers. p143-150, Springer, 2007

表 1 日本人の VPS13A 変異アレル頻度

Exon 37 4411C>T R1471X	13 (31.0%)
Exon 60_61 EX60_EX61del	11 (26.2%)
Exon 34 3889C>T R1297X	2 (4.8%)
Exon 9 622C>T R208X	2 (4.8%)
Exon 53 7411C>T Q2471X	2 (4.8%)
Exon 65 8848_8860del 2950NfsX13	1 (2.4%)
Exon 12_928C>T Q310X *	1 (2.4%)
Exon 24_45 EX24_EX45dup	1 (2.4%)
Exon 72 9403C>T R3134X	1 (2.4%)
Exon 15 1287del 429GfsX29	1 (2.4%)
Exon 72 9403C>T R3134X	1 (2.4%)
Exon 15 1305G>A W435X	1 (2.4%)
Exon 57 8035G>A	1 (2.4%)
Exon 32 3418_3419del 1140TfsX5	1 (2.4%)
Exon 35 3970_3973del 1324SfsX3	1 (2.4%)
Intron20 2037+2T>G	1 (2.4%)

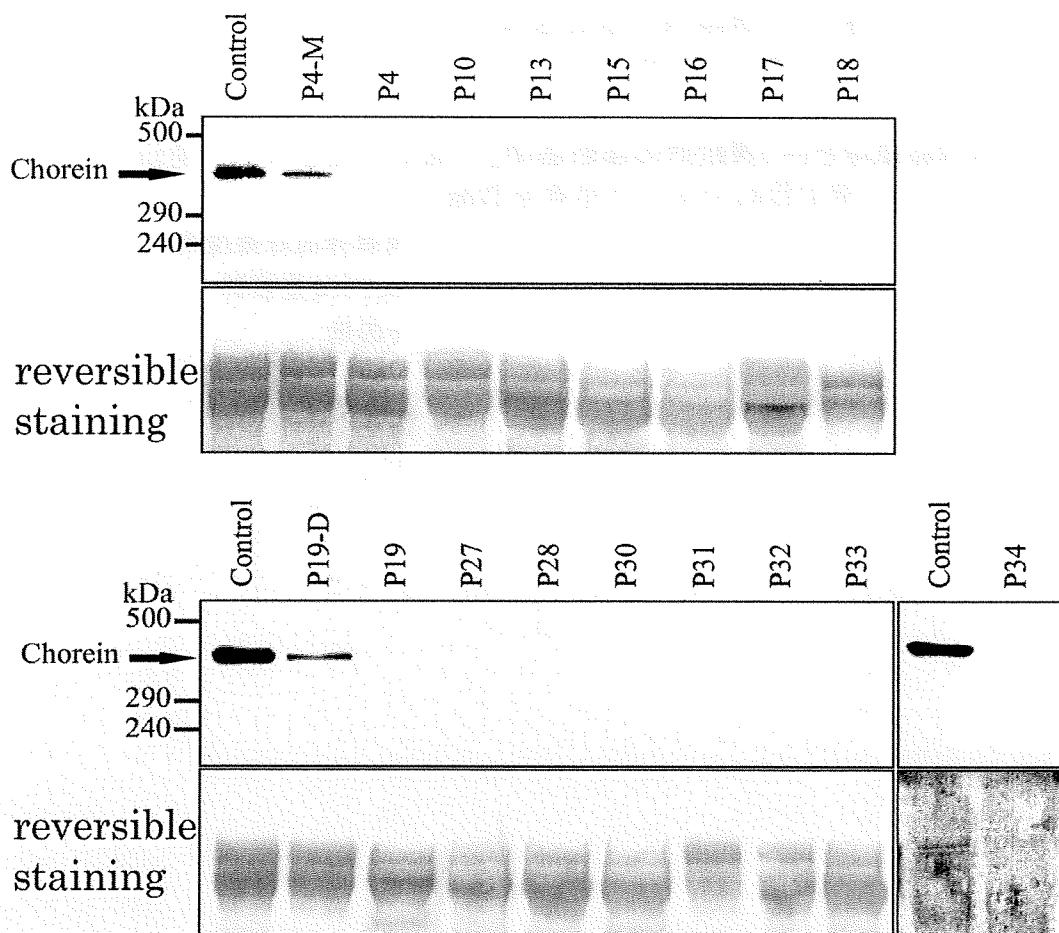
計 42

表2

アンケート集計結果 (1375 施設中の回答施設数 609 施設)

	施設数	症例数
1. 「有棘赤血球を伴う舞踏病の診断基準」の臨床所見を有すが確定診断には至っていない患者を診療した	12	13
2. 「有棘赤血球を伴う舞踏病の診断基準」の臨床所見を有し、遺伝子診断などにより確定診断を受けた患者を診療した		
有棘赤血球舞踏病	7	9
McLeod 症候群		0
その他		0
計	19	22

図1 赤血球膜分画のウェスタンプロットによるchorein検出



矢印はchoreinのバンドを示す。Controlは健常者で、P4-M, P19-Dはヘテロ接合性変異保因者である。その他は今回対象とした臨床的にChAc疑いの患者由来の赤血球膜分画でありchoreinのバンドは認めなかった。P31とP34はシークエンシング法やCNV解析ではヘテロ接合性にしか変異を認めていないがchoreinは検出されなかった。尚それぞれのウェスタンプロットの下図は転写膜の可逆性タンパク染色を示したものでサンプルローディングの指標とした。

E. 研究発表

1) 国内

論文発表

中村雅之、佐野 輝：モデル動物を用いた精神神経疾患の病態解析 脳と精神
の医学 20, 243-248, 2009

学会発表

富安昭之, 中村雅之, 松永溪, 瀬戸下玄郎, 出口晃子, 三月田葉子, 林岳宏,
石塚貴周, 森さつき, 下 洋央, 塩川奈理, 上野修一, 佐野 輝

有棘赤血球舞踏病病因遺伝子 *VPS13A* の疾患変異解析

第 17 回日本精神・行動遺伝医学会 2010 年 2 月 11 日大阪

2) 海外

論文発表

Miki Y, Nishie M, Ichiba M, Nakamura M, Mori F, Ogawa M, Kaimori M, Sano
A, Wakabayashi K. Chorea-acanthocytosis with upper motor neuron
degeneration and 3419_3420delCA and 3970_3973delAGTC *VPS13A* mutations.
Acta Neuropathol. 119, 271-3, 2010

学会発表

Tomiyasu A, Nakamura M, Shiokawa N, Shimo H, Ichiba M, Ueno SI, Sano A.

Novel pathogenic mutations and copy number variations of *VPS13A* gene in patients with chorea-acanthocytosis. XII World Congress PSYCHIATRIC GENETICS San Diego CA, USA 2009

F. 知的所有権の出願・取得状況

1) 特許取得

該当なし

2) 実用新案登録

該当なし

3) その他

該当なし

III. 班會議資料等