

200936172A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

～発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ（PKC）の有効治療薬開発のための
分子メカニズムの解明に関する研究～

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 黒滝 直弘

平成22（2010）年4月

目 次

I. 総括研究報告

発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ (PKC) の有効治療薬開発のための 分子メカニズムの解明に関する研究.....	1
(資料) 「発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ (PKC) の疫学調査及び遺伝解析」ご協力をお願い	

II. 分担研究報告

1. 全国アンケート調査及び原因候補ゲノム変化に関する研究.....	1 1
黒滝 直弘 (資料) アンケート調査用紙	
2. PKCの候補遺伝子の領域内全塩基配列決定及び原因候補ゲノム変化に関する研究.....	1 5
吉浦 孝一郎	
3. PKCの原因候補領域の抽出と塩基配列解析、患者iPS細胞の樹立に関する研究.....	2 1
要 匡	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	2 4
--------------------------	-----

I. 総括研究報告

発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKC) の有効治療薬開発のための分子メカニズムの解明に関する研究

研究代表者 黒滝 直弘

長崎大学大学院医歯薬総合研究科

医療科学専攻展開医療科学講座・精神神経科学 講師

研究要旨

PKCは、原因不明の随意運動を主体とする神経疾患である。発作性運動異常症の一つであり、急激な随意運動直後に誘発される一過性の舞踏アテトーゼが特徴である。家族性と孤発例として見られ、広義のてんかん症候群の中に含まれる。部分発作との鑑別や時には転換ヒステリーとの鑑別も必要となる疾患で、1967年 Kertesz の報告に始まる。多くは幼少時期の発作で指摘される。臨床的には急激な運動や驚愕して立ち上がった際などに、上肢のジストニアまたは舞踏様の不随意運動であり、持続は数分程度である。一日の中で繰り返すこともある。これまで、経験的に抗てんかん薬が効くことがわかっていたが、詳細な病態や発症機序、疫学データはない。少なくとも common disease でもなく、逆にいわゆる rare disease でもない可能性がある。PKC カルマバゼピン (Tegretol) を服用し、年を重ね 30 歳を超えてくるのを待つのが、臨床的対処法なのだがそれでも、やはり患者の負担は大きい。実際に大発作が目につくのもなく、ストレスや運動開始時の一時的な発作であり、親が気付いていないこともありうる。特に小学生期に最初に発症にするために、学校での対処を間違えば一見普通であるが故にいじめの対象となりかねない。我々は、家族性 PKC から PKC の疾患本体の病態生理を解明したいと考えているが、患者は孤発性と思われる例も多い。発作が軽度であること、成人してから症状が無くなっていくことなどから、実際に孤発性なのかどうか疑問も残る。遺伝子が判明した場合には、神経伝達の異常部分が明らかとなり、現在の Tegretol 治療よりも優れた薬物の選択が可能となる可能性があり、患者自身あるいは家族の不安を適切に取り除くことが可能となる。

今回の研究は、PKC の遺伝子変異を明らかにすることによって、原因不明の小発作痙攣の鑑別診断に組み込まれ、遺伝子診断の候補となりうる。確定診断を行えることにより、臨床情報を広く一般に周知することを目指した。そこで本研究では 1) アンケートまず PKC の一般臨床医の中でどのように認知され診断されているかという疫学データを蓄積し、収集された家族例において連鎖解析で既知の遺伝子座を確認し変異解析を行った。一方、疾患の原因となりうるゲノム異常をより効率よく探索すべく、染色体ソーティングと次世代型高速シーケンサーの組み合わせによる解析方法の構築を行った。

A. 研究目的

発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKC) は運動開始時に突然起こり、アテトーゼ不随意運動症状を起こす神経系疾患です。また、実際の罹患率・有病率とも不詳である。PKC の原因遺伝子が判明し、神経伝達の異常部分を明らかにした場合には、現在の抗てんかん薬 (カルマバゼピン) 治療よりも優れた薬物の選択が可能となるだろうと思っております。本研究は、PKC の疫学や原因遺伝子解析から発症メカニズムを解明し有効な治療方法を構築することを目的とした。

B. 研究方法

黒滝 直弘は研究代表者として研究を統括するとともに、一般の臨床医においてどのくらい認知されているか、実際に診断ないしは治療を行った経験はあるかなどの基本データを得るために全国の神経内科 (4650 名) および小児神経 (1002 名) を専門とされる先生方 (計 5652 名) に記銘式アンケートを行っ

た。アンケートは平成 21 年 11 月 2 日に発送し 11 月 30 日で締切とした。その後リマインダーを送付し全データの取得は平成 22 年 1 月 15 日に終了した。アンケートで遺伝子研究に協力が可能であると返答した 540 名の臨床医にはこれまでの研究の経緯をまとめ、検体の採集をお願いすべく、リスト化を行った。本研究における検体の採集に関しては、長崎大学ヒトゲノム遺伝子解析倫理委員会の承認を得た。また吉浦 孝一郎らと共同し、原因候補ゲノム変化の確定を試みた。同領域にあるコーディング・エキソンに関しては既に変異解析が終了し、患者特異的な変異は同定出来なかった。我々は、当初報告した候補領域を 16 番染色体長腕に広げ、報告されている候補領域から最も広く候補領域と考えコーディング・エキソンの変異解析を継続した。変異解析は、PCR-直接シーケンス法によって行った。

吉浦 孝一郎は (1) その原因遺伝子の同定と病態生理の解明、(2) 病態生理に基づいた新たな治療法の探索、を行った。それらの目的で、凍結保存し

ている本症患者の不死化細胞、DNA を所有している。黒滝の方法に加えゲノム異常検出のための DNA マイクロアレイでの検索、及び技術の発掘を目的とした次世代型シーケンサーを用いた塩基配列の再解析である。

ゲノム構造異常の検出には Affymetrix 社の Genome-Wide Human SNP 6.0 array、及び Agilent 社の array CGH を使い、プロトコールに沿って実験を行った。加えて、外注にて Illumina 社の HumanExon510S-Duo BeadChip を行った。データ解析は Genotyping Console、Partek Genomics Suite、Genomic Workbench を用いる。また、得られたデータを Roche 社の LightCycler480 を用いて TaqMan 法にて定量 PCR を行い検証する。定量 PCR 時の反応液作成や分注作業は特化した分注機 (Qiagen 社の Qiagility) を使用することによって、安定したデータがえられることがわかり、Qiagility を使用した。また、今後症例をさらに集積し遺伝子解析を効率よく行うべく、次世代型シーケンサーを用いた塩基配列の再解析を試みた。

PCR-直接シーケンス法によってこれまで終了した候補領域のコーディング・エキソンの塩基配列決定を再度行うこととした。勿論、すでにキャピラリーシーケンサーにより塩基配列決定を終了した検体が対象であり、陰性データの確認となる可能性が高いが、次世代型シーケンサーの情報処理技術を習得しておく必要があり、本年度に解析をおこなった。

要 匡は家族性のPKCの原因となっている第16番染色体の候補領域を抽出し、その構造を解析すること、および、病態解析へ向け患児の細胞よりiPS細胞の樹立を試みることを目的とした。第16番染色体の候補領域抽出については、染色体ソーティングによる分離抽出、long-PCR法による増幅抽出を行った。

第16番染色体の分離については、EBV 株化細胞を用いて、一色法 (クロモマイシン A3 染色) にて分離を試みた。まず、増殖期の細胞に、コルセミド添加後、数時間培養し、分裂中期細胞を濃縮し、次に、染色体検査と同様の低張処理を行い、ポリアミン (スペルミン、スペルミジン) を含む緩衝液で置換し、さらに 0.1% ジギトニン含有ポリアミン緩衝液中でボルテックス攪拌により染色体を分離させた。その後、クロモマイシン A3 で染色し、蛍光強度を指標として高速セルソーターにて染色体ごとの分離を行い、16番染色体を単離した。

Long-PCR については、約 10~20kb ごとに増幅できるようにプライマーを設定した。プライマーは、Tm 値が 70°C~80°C になるように設定し、ヘアピン

構造などの構造をさけるように配列を決定した。Long-PCR は、KOD-FX(TOYOBO)または PrimeSTAR GXL(TAKARA)を使用し、低いバックグラウンドで効率の良い増幅が得られるよう、buffer 中の Mg⁺⁺ 濃度、アニーリング温度、プライマー濃度の設定を、各領域ごとに行った。

患者由来 EVB 不死化リンパ球より、iPS 細胞の樹立を試みた。患者細胞へ電気穿孔法 (マイクロポレーション法) にて、OCT3/4, KLF4, SOX2, c-MYC, NANOG 発現ユニットを導入し、フィーダー細胞 (マウス EF) 上で培養、胚幹細胞様未分化細胞形態を指標として iPS 細胞の有無を確認した。

PKC 患児ゲノム BAC ライブラリーの作製については PKC 患児の EBV 株化細胞を培養し、1x10⁷ 細胞/mL の密度でアガロースプラグを作製した。ドデシル硫酸リチウム処理にてそれらプラグよりゲノムを抽出し、BamHI 部分消化後、100~300kb のゲノム断片を、パルスフィールドゲル電気泳動を用いて抽出・精製した。BAC ベクター (pBACe3.6 を使用) については、BamHI 完全消化および pUC 領域の除去、アルカリフォスファターゼ処理を行い、クローニング用ベクター断片とした。これらゲノム断片とベクター断片を 1:1 の割合で ligation 反応を行い、大腸菌 (DH10B) へ電気穿孔法により導入、培養後、ライブラリー原液として、まず、作製効率の検証と品質の確認を行った。

C. 研究結果

発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKC) の疫学や原因遺伝子解析から発症メカニズムを解明し有効な治療方法を構築することを目的として全国の神経内科 (4650名) および小児神経 (1002名) を専門とされる先生方 (計5652名) に記銘式アンケートを依頼した (資料参照)。その結果、回答を得られたのは 2484名 (2484/5652) で、全体の 43.9% であった。また、この中で無記名回答者は 323名 (323/5652) で、5.7% であった。それぞれの内訳は、神経内科専門医 1655名 (1655/4650) で 35.5%、小児神経専門医 481名 (482/1002) で 48% である。また、この集計報告は初回時、リマインダーともに合わせての集計結果であり初回時 (11/2発送済、11/30締切: 神経内科専門医 3973名、小児神経専門医 1002名、11/10発送済、12/14締切: 神経内科専門 642名、計 5617名) で回答を得たのは初回時 1433名 (25.51%)、リマインダー (初回時の無記名者含む) (12/7発送済、12/21締切: 3789名、12/18発送済、1/15締切: 神経内科専門 501名、計 4290名) 1051名 (24.5%) であった。倫理面への配慮してアンケート票は厳重に管理し、統計的に管理することとした。また、今後、採血による遺伝子研究にご協力できるとご回答していただいた主

治医に対しては十分なインフォームドコンセントの前提で患者にアクセスし血液を採取しDNAを抽出することとした。また、PKCの情報を周知するためにホームページの作成を行い、長崎大学精神神経科学教室のホームページとリンクを行った。遺伝子解析に関しては以前、我々は16番染色体セントロメア近傍にPKC候補領域を同定しており(Tomita et al., 1999)、その領域内の遺伝子を直接シーケンスしたが疾患の原因となる変異は同定出来なかった(Kikuchi et al., 2007)。そこで、詳細にこれまでの報告を見直し候補領域を最大に考慮し、遺伝子のコーシングエキソンをPCR-直接シーケンス法によって変異解析した。6患者のDNAを変異解析に使用し、すべてのPKC連鎖解析の報告を包括した候補領域内の未検査である遺伝子、72遺伝子について変異解析を行った結果、複数家系に重複したアミノ酸変化を伴う塩基置換はみられなかった。一患者に変異が認められかつ対照者272名には認められないPKC原因変異の可能性のある塩基置換が2個同定している。

エキソンキャプチャー - 次世代型シーケンサーの解析は、現在情報処理が進行中であるが、新たな患者特異的変異は同定されていない。

ゲノム異常に関しては既に長崎大学で保存してある患者DNAから6家系を選び、それぞれ1名計6名と孤発例2名を合わせた計8名について、Illumina社のHumanExon510S-Duo BeadChipを外注にて行い、Partek Genomics Suiteでコピー数解析を行ったが、コピー数多型登録のない欠失・重複は検出出来なかった。Human Exon510S-Duo BeadChipの結果からは候補領域である16番染色体セントロメア近傍に関しては、すべての患者検体で欠失と思われる領域が認められた。しかしながら、この領域はDatabase of Genomic Variantsに多型の登録がなされている領域であり、また、その領域内のプローブを用いたTaqMan法による定量PCRをRoche社LightCycler480で行ったところ、患者間、健常者間で大きなばらつきがみられ、患者のみならず健常者でもコピー数が一定でない領域であることが分かり、この領域のコピー数の増減がPKCを発症させる可能性は低いと考えられた。

また、以前我々は2007年の報告で、SCNN1GとITGAL遺伝子で一家系のみみられるアミノ酸変化を伴う塩基置換を同定したが、今年度はその2遺伝子の上下流2kbを含んだ領域について大きな欠失、重複がないかAgilent社のカスタムアレイを注文しarray CGHを行い、Genomic Workbenchで解析した。両遺伝子とも疾患特異的な欠失、重複領域は認められなかった。

染色体ソーティングによる第16番染色体の分離について、EBV株化細胞を用いて、一色法(クロモイシン A3 染色)にて分離を試みたところ、

一色法のため、第17番染色体などの混入は認められるものの、全染色体からの16番染色体の濃縮ができた。しかしながら、次世代シーケンスへの解析に十分な染色体数の収集は時間的を要し、困難であった。

染色体の分離は可能であったが、分離後の実際の解析を考慮した場合、時間または純度と回収効率の向上が必要であり、それによって解決できると考えられた。よって、染色体標本準備条件、分離時の条件を検討により、課題は解決できると思われる。

広範囲ゲノム領域の全塩基配列決定については、16番染色体全体の塩基配列解析は行っていないものの、第16番染色体の一領域についてlong-PCR法により1Mb-2Mbを効率よく増幅・抽出できたため、そのゲノム領域について次世代シーケンサ(SOLiD3)を用いて、全塩基配列解読を行った。結果、その後のSNP検出等、十分なデータ解析が行えた。具体的には、SOLiD3を用いたフラグメント解析によるデータの標的領域の冗長度はx2000以上であり、信頼性の高いデータが得られ、またSOLiD内pipelineソフトウェアによるSNPコールにて、400-500のSNPが検出できた。この検出されたSNPのうち、20種類のhomoSNPについて検証したところ、すべて確認され、信頼度は100%近いと考えられた。

iPS細胞について、EBV株化細胞からOCT3/4等の遺伝子導入による樹立を試みた。電気穿孔法の導入効率の問題などにより樹立できなかった。電気穿孔法による、EBV株化細胞へのプラスミドの導入効率は、最高約10%であったため、この効率を改善させる条件や機器の変更、または導入法の変更が必要と考えられた。

BACライブラリーの作製について、患児ゲノムBACライブラリーは、インサート陽性クローンの比率は約70%、インサートの平均長は、150kbであった。しかしながら、タイターがライブラリーとしては低く(約 4×10^4 cfu/mL)、ライブラリー作製の追加(ライゲーション比率と導入の条件の再検討も含む)を行う必要がある。よって、追加でライブラリーを作製している。十分なタイターまたはクローン数が得られた後、BACクローンスクリーニングを予定している。

D. 考察

PKCとは運動開始時に突然起こり、意識障害を伴わないまま四肢のアテトーゼ様の不随意運動症状を起す稀な神経系疾患である。そして、30歳を超えてくると自然治癒されるという本体不明の疾患です。

そのことから、小児神経専門医のアンケートの返信率が神経内科専門よりもわずかに高かったのではないかと考える。また、集計結果をみて、予想以上に反響が大きく、PKCの有効治療薬開発のための分子メカニズムの解明についての関心が大いのではないかと考えられる。

遺伝子解析に関しては、最大限の PKC 候補領域に存在する遺伝子の変異解析を完全に終了した。PKCの原因の可能性のある塩基置換が2個同定されている。その2個の変異は、まったく別の遺伝子に存在しており、複数の患者に共通する変異遺伝子は存在しない。その2個の変異遺伝子が原因であるとは考えづらいが、現在これらの遺伝子について微細な欠出がないかを、他の患者で確認中である。これまで、これほど候補領域のすべての遺伝子について変異解析を行っても原因遺伝子が見つけれないとすれば、PCR-直接シーケンス法では変異が同定できないような DNA の変化であろう。考えられる可能性として、1) 重複の領域にある遺伝子（偽遺伝子も含め）があり、通常 PCR-直接シーケンス法では変異が描出できない 2) 重複等の領域にあって正常対照者内でコピー数多型が存在するが、患者では機能遺伝子が増えている 3) 遺伝子変換により機能遺伝子が機能不全となるが、偽遺伝子の存在によってそれが同定できない等の状況が考えられる。

平成 21 年度には、できる限りの PCR-直接シーケンス法による塩基配列解析を終了し、可能な手技でのコピー数解析を終了したが、PKC の原因遺伝子が同定できていない。この現実を考慮し、患者特異的構造異常検出のための BAC library 作成や染色体ソーティングによる第 16 番染色体分離・全塩基配列決定を計画した。しかし、BAC library 作成や染色体ソーティングによる第 16 番染色体分離が首尾よく進行しておらず、今後の課題である。

E. 結論

PKCとは運動開始時に突然起こり、意識障害を伴わないまま四肢のアテトーゼ様の不随意運動症状を起こす稀な神経系疾患である。そして、30歳を超えてくると自然治癒されるという本体不明の疾患である。そのことから、恐らくは神経疾患でありながら初診は、小児神経専門医ないしは一般小児科を受診するのではないかと予想される。また、過去の報告にあったように、ヒステリーのような精神疾患と診断され現時点での的確な対応が行われていない患者もいる。診断がつけば、病態がわからずとも対処療法的に薬物療法は可能である現実を考慮すると確実に

に診断し、治療を開始することが重要である。またアンケートの集計結果は回収率は約50%であるが、コメント等から、予想以上に反響が大きく、PKCの有効治療薬開発のための分子メカニズムの解明についての関心が、一般臨床に中で大いのではないかと考えられる。

PKCの原因となるゲノムの変異は、通常の PCR-直接シーケンス法による変異解析では同定できない機序の変異である可能性が高い。エキソンキャプチャー - 次世代型シーケンサーによる解析も、原因同定の可能性は低い。考えられる可能性はコピー数多型部位の複雑な変化（遺伝子変換や機能遺伝子の欠失・重複）である可能性がますます高く、来年度以降の患者から得られた染色体 16 番セントロメア領域の BAC シーケンス解析、あるいは染色体 16 番ソーティング後の次世代型シーケンス解析に期待する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishihara K, Kinoshita H, Kurotaki N, Ozawa H, Imamura A.: Could subclinical hypothyroidism cause periodic catatonia with delusional misidentification syndrome? *Psychiatry Clin. Neurosci.*, In Press, 2010
2. Wu L, Liang D, Niikawa N, Ma F, Sun M, Pan Q, Long Z, Zhou Z, Yoshiura K, Wang H, Sato D, Nishimura G, Dai H, Zhang X, Xia J. A ZRS duplication causes syndactyly type IV with tibial hypoplasia. *Am J Med Genet A.* 2009 Feb 15;149A(4): 816-818.
3. Kuniba H, Pooh RK, Sasaki K, Shimokawa O, Harada N, Kondoh T, Egashira M, Moriuchi H, Yoshiura KI, Niikawa N. Prenatal diagnosis of Costello syndrome using 3D ultrasonography amniocentesis confirmation of the rare HRAS mutation G12D. *Am J Med Genet A.* 149A(4): 785-7. 2009. Feb 15.
4. Miyazaki K, Mapendano CK, Fuchigami T, Kondo S, Ohta T, Kinoshita A, Tsukamoto K, Yoshiura KI, Niikawa N, Kishino T. Developmentally dynamic changes of DNA methylation in the mouse *Snurf/Snrpn* gene. *Gene* 432(1-2): 97-101. 2009. Mar 1.
5. K Hamanoue H, Megarbane A, Tohma T, Nishimura A, Mizuguchi T, Saitsu H, Sakai H, Miura S, Toda T,

Miyake N, Niikawa N, Yoshiura K, Hirahara F, Matsumoto N. A locus for ophthalmo-acromelic syndrome mapped to 10p11.23. *Am J Med Genet A*. 2009 Mar;149A(3): 336-342.

6. Kuniba H, Yoshiura K, Kondoh T, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Kaname T, Naritomi K, Matsumoto T, Moriuchi H, Kishino T, Kinoshita A, Miyake N, Matsumoto N, Niikawa N. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J Hum Genet*. 2009 May; 54(5): 304-309.

7. Toyoda Y, Sakurai A, Mitani Y, Nakashima M, Yoshiura KI, Nakagawa H, Sakai Y, Ota I, Lezhava A, Hayashizaki Y, Niikawa N, Ishikawa T. Earwax, osmidrosis, and breast cancer: why does one SNP (538G>A) in the human ABC transporter ABCC11 gene determine earwax type? *FASEB J*. 2009. Jun; 23(6): 2001-2013.

8. Nakano M, Miwa N, Hirano A, Yoshiura K, Niikawa N. A strong association of axillary osmidrosis with the wet earwax type determined by genotyping of the ABCC11 gene. *BMC Genet*. 2009 Aug 4; 10: 42.

9. Machida J, Félix TM, Murray JC, Yoshiura K, Tanemura M, Kamamoto M, Shimozato K, Sonta S, Ono T. Searching for genes for cleft lip and/or palate based on breakpoint analysis of a balanced translocation t(9;17)(q32;q12). *Cleft Palate Craniofac J*. 2009 Sep; 46(5): 532-540.

10. The Super Science High School Consortium. Japanese map of the earwax gene frequency: a nationwide collaborative study by Super Science High School Consortium. *J Hum Genet*. 2009 Sep; 54(9): 499-503.

11. Kimani JW, Yoshiura K, Shi M, Jugessur A, Moretti-Ferreira D, Christensen K, Murray JC. Search for Genomic Alterations in Monozygotic Twins Discordant for Cleft Lip and/or Palate. *Twin Res Hum Genet*. 2009 Oct; 12(5): 462-468.

12. Saitsu H, Kurosawa K, Kawara H, Eguchi M, Mizuguchi T, Harada N, Kaname T, Kano H, Miyake N, Toda T, Matsumoto N. (2009). Characterization of the complex 7q21.3 rearrangement in a patient with bilateral split foot malformation and hearing loss. *Am J Med*

Genet., 149A:1224-1230.

Pierron S, Richelme C, Triolo V, Mas JC, Griffet J, Karmous-Benailly H, Quere M, Kaname T, Lambert J-C, Giuliano F. (2009). Evolution of a Patient with Bohring-Opitz Syndrome. *Am J Med Genet.*, 149A:1754-1757.

13. 要匡：ゆるやかなゲノムのはなし 「知の津梁—やわらかい南の学と思想—」 第3巻 pp340-351 沖縄タイムス出版 2010年3月。

2. 学会発表

国内学会

第28回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会 2009年7月10日、丸駒温泉ホテル、札幌
発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKC) の有効治療薬開発のための分子メカニズムの解明
黒滝直弘、小野慎治、菊池妙子、吉浦孝一郎、小澤寛樹

第31回長崎てんかん研究会 2009年10月30日(土)、ニュー長崎ホテル、長崎
発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKC) の遺伝解析、その歴史から学ぶ
黒滝直弘、小野慎治、菊池妙子、中根 允文、吉浦孝一郎、小澤寛樹

第16回日本遺伝子診療学会 2009年7月30日(水)~8月1日(土)、ホテル札幌ガーデンパレス、札幌
W-14: 日本における HPV 感染の特徴と HPV 持続感染に関わる SNP 検索. 吉浦孝一郎, 三浦清徳, 中山大介, 増崎英明

O-03: ヒト疾患モデルとしての interferon regulatory factor 6 遺伝子改変マウスの表現型解析

O-06: アレイ染色体検査のための健常人 CNV データベース構築の試み. 松井 健, 霜川 修, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 松本直通, 原田直樹

O-08: Brain AVM maps to 5p13-q14, 15q11-q13 or 18p11: Linkage analysis with clipped fingernail DNA using high-density SNP array. 及川将弘, 国場英雄, 近藤達郎, 永安 武, 新川詔夫, 吉浦孝一郎

O-11: PCR-高解像度融解曲線分析法による遺伝子スキャンニングシステムの構築. 要 匡, 柳 久美子, 福嶋義光, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二

O-12: 次世代型シーケンサを用いた原因候補全領域リシーケンス解析へのアプローチ: 日本人ゲノム16q122領域の構造解析. 要 匡, 塚原正俊, 柳 久美子, 藤森一浩, 喜久里育也, 照屋盛実, 今田有美, 鼠尾まい子, 矢野修一, 佐藤友紀, 三輪有希乃, 平野 隆, 平野隆城, 高嶋 博, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二

O-23: 母体血中への胎盤特異的 miRNA の流入量に関する検討. 三浦清徳, 三浦生子, 東嶋 愛, 阿部修平, 山崎健太郎, 嶋田貴子, 吉浦孝一郎, 増崎英明

O-25: 自己免疫疾患におけるマイクロキメリズムノ関与に関する検討. 東嶋 愛, 三浦清徳, 山崎健太郎, 小川文秀, 川上 純, 吉浦孝一郎, 増崎英明

O-26: 長崎県における HPV-DNA 型の分布と DNA 型による癌化への影響に関する検討. 阿部修平, 山崎健太郎, 三浦清徳, 中山大介, 嶋田貴子, 三浦生子, 藤下 晃, 鮫島哲郎, 村上 誠, 吉浦孝一郎, 増崎英明

O-33: 軟口蓋裂および粘膜下口蓋裂のゲノムワイド連鎖解析. 津田雅由, 中島光子, 平野明喜, 三古谷忠, 山田崇弘, 吉浦孝一郎

第 54 回日本人類遺伝学会 2009 年 9 月 23 日 (水) - 26 日 (土), グランドプリンスホテル高輪, 東京

OA 016: 6 番染色体部分片親性ダイソミーを認めた 3M 症候群の 1 例. 佐々木健作, 岡本伸彦, 小崎健次郎, 川良洋城, 吉浦孝一郎, 松本直通, 原田直樹

OA 019: アレイ染色体検査のための健常人 CNV データベース構築の試み. 松井健, 霜川修, 齋藤和正, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 松本直通, 原田直樹

OA 056: 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKC) の変異解析. 小野慎治, 菊池妙子, 木下晃, 小澤寛樹, 新川詔夫, 吉浦孝一郎

PA 031: 網羅的解析による母胎血中胎盤特異的 microRNA の同定とその局在に関する検討. 三浦清徳, 三浦生子, 東嶋愛, 阿部修平, 山崎健太郎, 嶋田貴子, 吉田敦, 中山大介, 吉浦孝一郎, 増崎英明

PB 100: 羊水検査で検出した 2 番染色体長腕逆位重複の 1 例. 松井健, 堀越嗣博, 川目裕, 霜川修, 佐々木由喜, 松本直通, 吉浦孝一郎, 原田直樹

PB 133: 日本人口唇裂患者における 8q24 の検証. 津田雅由, 引田正宣, 秋田定伯, 平野明喜, 内山健, 吉浦孝一郎

PB 147: 次世代シーケンサによる日本人ゲノム 16q-ADCA 原因候補領域の構造解析. 要匡, 塚原正俊, 柳久美子, 藤森一浩, 喜久里育也, 照屋盛実, 今田有美, 鼠尾まい子, 矢野修一, 佐藤友紀, 三輪友希乃, 平野隆, 平野隆城, 高嶋博, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二

PB 148: 嚢胞内乳ガンは嚢胞内乳頭腫に比べ顕著なゲノム変化を有する: 高密度 SNP マイクロアレイによるゲノムワイド copy number/LOH 解析. 及川将弘, 永安武, 矢野洋, 安倍邦子, 林徳真吉, 新川詔夫, 吉浦孝一郎

PB 150: 長崎県における HPV-DNA 型の分布と子宮頸癌との関連に関する検討. 阿部修平, 山崎健太郎, 三浦清徳, 三浦生子, 嶋田貴子, 中山大介, 吉浦孝

一郎, 増崎英明

PB 151: 長崎における HPV-DNA 型の頻度と持続感染に関する研究. 山崎健太郎, 三浦清徳, 三浦生子, 嶋田貴子, 藤下晃, 鮫島哲郎, 村上誠, 吉浦孝一郎, 増崎英明

要匡, 塚原正俊, 柳久美子 他 14 名: 次世代シーケンサを用いた染色体 16q22 領域の日本人ゲノム構造解析 第 49 回 日本先天異常学会学術集会 鹿児島 2009 年 6 月

要匡, 塚原正俊, 柳久美子 他 14 名: 次世代シーケンサを用いた原因候補全領域リシーケンス解析へのアプローチ; 日本人ゲノム 16q22 領域の構造解析 第 16 回 日本遺伝子診療学会 札幌 2009 年 7 月

要匡, 塚原正俊, 柳久美子 他 14 名: 次世代シーケンサによる日本人ゲノム 16q-ADCA 原因候補領域の構造解析 日本人類遺伝学会第 54 回大会 東京 2009 年 9 月

要匡: ヒト遺伝性疾患の原因同定へ向けた全候補領域リシーケンス解析 第 4 回 バイオインフォマティクス研究者と医学研究者の交流会 柏 (千葉) 2009 年 11 月

要匡: これから目線でゲノムを見に行こう 一次世代シーケンサーが我々にもたらしたもの- 市民講座「ゲノム情報がもたらす医療の革新」東京 2010 年 2 月

国際学会

The American Society of Human Genetics, 59th Annual Meeting

Honolulu, Hawaii, October 20-27, 2009

1106/W: The difference of HPV (human papillomavirus) DNA genotypes may influence the speed of carcinogenesis in cervical squamous intraepithelial lesions among Japanese patients. Yakamaski K, Miura K, Miura S, Shimada T, Fujishita A, Samashima T, Murakami M, Yoshiura K, Masuzaki H.

1292/W: Intracystic papillary carcinoma of breast harbors significant genomic alteration compared with intracystic papilloma: Genome-wide copy number and LOH analysis using high-density single-nucleotide polymorphism arrays. Oikawa M, Nagayasu T, Yano H, Hayashi T, Abe N, Yoshiura K, Niikawa N.

1377/W: DNA array-based copy number analysis in chorionic villus samples (CVS) of spontaneous abortions with normal karyotypes. Yamada T, Ohra T, Hosoki K, Shimada S, Morikawa M, Yamada T, Yoshiura K, Minakami H, Niikawa N.

1619/T: Microarray-based analysis using cell-free mRNA in pregnant women has a potential to estimate a placental status. Miura K, Miura S, Yamasaki K, Shimada T, Higashijima A, Abe S, Yoshiura K, Niikawa N, Masuzaki H.

1985/T: Brain arteriovenous malformation maps to 5p13-q14, 15q11-q13 and 18p11: Linkage analysis with clipped fingernail DNA on SNP array. Kuniba H, Oikawa M, Kondoh T, Kinoshita A, Moriuchi H, Nagayasu T, Niikawa N, Yoshiura K.

2892/F: Resequencing of the whole candidate region for 16q22-linked spinocerebellar ataxia in Japanese individuals using next-generation sequencing. Kaname T, Tsukahara M, Yanagi K, Fujimori K, Kikuzato I, Teruya M, Imada Y, Nezu M, Yabo S, Sato Y, Miwa Y, Hirano T, Hirano R, Takashima H, Yoshiura K, Niikawa N, Naritomi K.

Kanmae T, Tsukahara M, Yanagi K, *et al.* (14 others), Resequencing of the whole candidate region for 16q22-linked spinocerebellar ataxia in Japanese individuals using next-generation sequencing. *59th the American Society of Human Genetics Annual meeting* Hawaii, USA, 2009.October.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許得取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(資料)

関係各位殿

平成 21 年 11 月

「発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ (PKC) の疫学調査及び遺伝解析」ご協力をお願い

謹啓 時下ますますご健勝のこととお慶び申し上げます。

私どもは平成21年度厚生労働科学研究(難治性疾患克服研究事業)「発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ(PKC)の有効治療薬開発のための分子メカニズムの解明」を担当させていただいております。

PKCは古くは運動誘発性発作と称され、何か突然運動を開始した直後に意識障害を伴わないまま、四肢のアテトーゼ様の不随意運動を示す疾患です。

本研究は、PKC の疫学や原因遺伝子解析から発症メカニズムを解明し有効な治療方法を構築することを目的としてここに神経内科および小児神経を専門とされる先生方にアンケートをご依頼する次第です。本調査は別紙にございます。

ご回答いただきましたアンケート票は厳重に管理し、統計的に処理いたします。結果につきましては、研究班の報告会および報告書で公表いたしますが、個人情報厳重に管理します。日々の臨床、研究、教育に大変にご多忙な中を誠に恐縮ですが、本研究の趣旨にご理解とご賛同を賜り、アンケート調査にご協力賜わりたく、お願い申し上げます。また、重ね重ね誠に恐縮に存じますが、アンケートにご回答を頂き、12月14日(月)までに同封の封筒にてご返信いただきますと幸甚に存じます。

ご不明の点などございましたら、下記までご連絡賜りますようお願い申し上げます。

謹白

平成 21 年度厚生労働研究(難治性疾患克服研究事業)
「発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ(PKC)の有効治療薬開発のための分子メカニズムの解明」

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻展開医療科学講座・精神神経科学
黒滝 直弘(研究代表)
小澤 寛樹
同大学院・医療科学専攻社会医療科学講座・公衆衛生学 本田 純久
同大学院・原爆後障害医療研究施設分子医療部門・変異遺伝子解析分野 吉浦 孝一郎
琉球大学医学部医科遺伝学 要 匡

連絡先

〒852-8501 長崎市坂本1-7-1

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

医療科学専攻展開医療科学講座・精神神経科学

TEL:095-819-7293 FAX:095-819-7296

E-mail:naokuro@nagasaki-u.ac.jp(黒滝直弘)

調査票

はじめに先生の年齢、性別、ご専門をお聞かせください。

また、もしよろしければ、御名前と施設の御連絡先を教えてください。

年齢 _____ 歳

性別 男・女

御専門 _____

御名前 _____

御施設名 _____

施設住所 _____

施設の電話番号、または先生の e-mail アドレス _____

問1 先生は発作性運動誘発性舞蹈アテトーゼ(PKC)という疾患をご存知ですか。

A 聞いたことはない

B 聞いたことはあるが、症状など詳しい病態については知らない。

C 詳しい病態についても知っている。

問2 これまでに本疾患を診断なさったことはありますか。

A ある

→何年間でいくつの症例を診断されましたか。

_____年間で_____例

B ない

問3 本疾患の治療を現在されていますか。

A 現在治療している

もしされているならば、何人ですか。 _____人

それぞれの患者さんの性別、現在の年齢、PKC の発症年齢、薬物治療での主剤について裏面にご記入ください。

B 治療していない

問4 問2、問3のいずれかで A と答えられた先生にお聞きします。

PKC はかつて解離性障害と診断されたことがありますか、先生の患者さんではそのようなことはありますか。

A ある

B ない

問5 問2、問3のいずれかで A と答えられた先生にお聞きします。

原因遺伝子解明のための遺伝子解析を今後計画しています。採血による遺伝子研究にご協力いただけますか。

A 協力できる

→ご協力いただける先生は、研究ご依頼に関する連絡は電話と e-mail のどちらがよろしいですか

1 電話

2 e-mail

B 協力できない

現在治療されている患者さんに関する情報をご記入ください

性別	現在の年齢	PKCの発症年齢	薬物治療での主剤
男・女	歳	歳	

PKCの全国アンケート調査及び原因候補ゲノム変化に関する研究

研究代表者 黒滝 直弘

研究要旨

発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ（PKC）とは運動開始時に突然起こり、アテトーゼ不随意運動症状を起こす稀な神経系疾患である。また、正確な診断がつかずとも"てんかん"の診断で抗てんかん薬（カルマバゼピン）による薬物療法で症状が抑えられる。そして、30歳を超えてくると自然治癒されるという本体不明の疾患である。発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ（PKC）の原因となっている遺伝子を候補領域（16p11.2-q12.2）から特定し、ストレス負荷や運動開始時の一時的な小発作のメカニズムを探ることによって、神経伝達の異常部分が明らかとなり現在の抗てんかん薬（カルマバゼピン）治療よりも。その遺伝子情報に基づき、より効果的な薬物の選択治療が可能となる。それが可能となったならば、患者自身あるいは家族の発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ（PKC）という本疾患の不安を適切に取り除いていく。また実際にどの位の患者数を臨床医が診断しているかといった医療行政の面に関する基礎データを取得し、今後の医療に生かしていく。

A. 研究目的

発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ（PKC）は運動開始時に突然起こり、アテトーゼ不随意運動症状を起こす神経系疾患です。また、実際の罹患率・有病率とも不詳である。PKCの原因遺伝子が判明し、神経伝達の異常部分を明らかにした場合には、現在の抗てんかん薬（カルマバゼピン）治療よりも優れた薬物の選択が可能となるだろうと思っております。本研究は、PKCの疫学や原因遺伝子解析から発症メカニズムを解明し有効な治療方法を構築することを目的とする。

B. 研究方法

発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ（PKC）の疫学や原因遺伝子解析から発症メカニズムを解明し有効な治療方法を構築することを目的として全国の神経内科（4650名）および小児神経（1002名）を専門とされる先生方（計5652名）に記銘式アンケートをご依頼した。その結果、回答を得られたのは2484名（2484/5652）で、全体の43.9%であった。また、この中で無記名回答者は323名（323/5652）で、5.7%であった。それぞれの内訳は、神経内科専門医1655名（1655/4650）で35.5%、小児神経専門医481名（482/1002）で48%である。また、この集計報告は初回時、リマインダーともに合わせての集計結果であり初回時（11/2発送済、11/30締切：神経内科専門医3973名、小児神経専門医1002名、11/10発送済、12/14

締切：神経内科専門642名、計5617名）で回答は初回時1433名（25.51%）、リマインダー（初回時の無記名者含む）（12/7発送済、12/21締切：3789名、12/18発送済、1/15締切：神経内科専門501名、計4290名）1051名（24.5%）であった。

（倫理面への配慮）

アンケート票は厳重に管理し、統計的に処理を行う。また、今後、採血による遺伝子研究に協力できると回答した主治医に対しては十分なインフォームドコンセントの前提で患者にアクセスし血液を採取しDNAを抽出する予定である。

C. 研究結果

全国の神経内科（4650名）および小児神経（1002名）を専門とされる医師（計5652名）に依頼した記銘式アンケートには計5つの質問（問1～問5）がありそれぞれの回答結果については次の通りである。まず、問1発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ（PKC）の認知度についてである。聞いたことはないと回答した人が全体では232名（232/5652）、4.1%であり、そのうち神経内科専門医は156名（156/4650）、3.35%、小児神経専門医は37名（37/1002）、3.69%、無記名者は39名（39/5652）、0.69%であった。聞いたことはあるが症状など詳しい病態については知らないと回答した人が全体では1161名（1161/5652）、20.5%であり、そのうち神経内科専門医は802名（802/4650）、17.2%、小児神経専門医は200名（200/1002）、19.9%、無記名者は159名（159/5652）、

2.81%であった。詳しい病態についても知っている
と回答した人が全体では 1011 名 (1011/5652)、17.8%
であり、神経内科専門医は 660 名 (660/4650)、14.1%、
小児神経専門医は 231 名 (231/1002)、23.0%、無記
名者は 120 名 (120/5652)、2.12%であった。

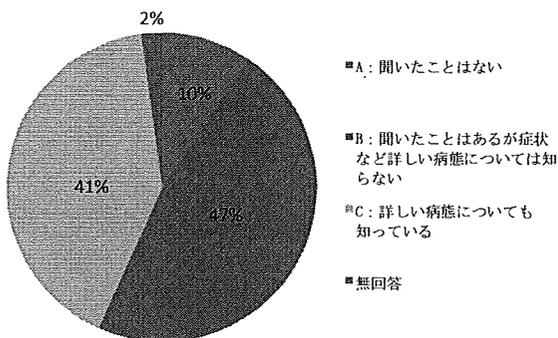
また、無回答は全体で 55 名 (55/5652)、0.97%であ
り、神経内科専門医は 37 名 (37/4650)、0.79%、小
児神経専門医は 13 名 (13/1002)、1.29%、無記名者
は 5 名 (5/5652)、0.08%であった。

(表 1、図 1)

表 1 問 1 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKC)
の認知度

	全体 (5652名)	神経内科専門医 (4650名)	小児神経専門医 (1002名)	無記名者 (5652名)
A: 聞いたことはない	232名 : 4.1%	156名 : 3.35%	37名 : 3.69%	39名 : 0.69%
B: 聞いたことはあるが症状など詳しい病態については知らない	1161名 : 20.5%	802名 : 17.2%	200名 : 19.9%	159名 : 2.81%
C: 詳しい病態についても知っている	1011名 : 17.8%	660名 : 14.1%	231名 : 23.0%	120名 : 2.12%
無回答	55名 : 0.97%	37名 : .79%	13名 : 1.29%	5名 : 0.08%

図 1 問 1 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKC)
の認知度 (全体 : 5652名中のみ結果を100%として換算)



問 2 これまでに本疾患の診断有無については、あ
ると回答した人が全体では 893 名 (893/5652)、15.7%
であり、そのうち神経内科専門医は 584 名
(584/4650)、12.5%、小児神経専門医は 211 名
(211/1002)、21.0%、無記名者は 98 名 (98/5652)、
1.73%であった。

ないと回答した人が全体では 1540 名 (1540/5652)、
27.2%でありそのうち神経内科専門医は 1053 名
(1053/4650)、22.6%、小児神経専門医は 264 名
(264/1002)、26.3%、無記名者は 223 名 (223/5652)、

3.94%であった。

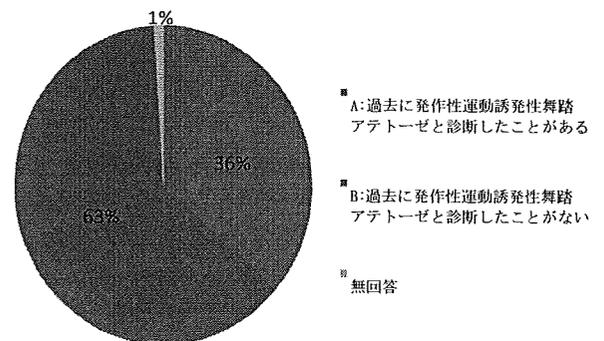
また、無回答は全体で 26 名 (26/5652)、0.46%であ
り、そのうち神経内科専門医は 18 名 (18/4650)、
0.38%、小児神経専門医は 6 名 (6/1002)、0.59%、
無記名者は 2 名 (2/5652)、0.035%であった。

(表 2、図 2)

表 2 これまでに本疾患の診断有無

過去に PKC と診断したこ との有無	全体 (5652 名)	神経内科専門 医(4650 名)	小児神経専門 医(1002 名)	無記名者 (5652 名)
A:ある	893 名: 15.7%	584 名:12.5%	211 名:21.0%	98 名: 1.73%
B:ない	1540 名: 27.2%	1053 名:22.6%	264 名:26.3%	223 名: 3.94%
無回答	26 名:0.46%	18 名:0.38%	6 名:0.59%	2 名: 0.035%

図 2 これまでに本疾患の診断有無 (全体 : 5652 名
中のみ結果を 100%として換算)



問 3 本疾患の治療を現在されているかについては、
現在していると回答した人が全体では 273 名
(273/5652)、4.83%であり、そのうち神経内科専門
医は 159 名 (159/4650)、3.41%、小児神経専門医は
95 名 (95/1002)、9.48%、無記名者は 19 名 (19/5652)、
0.33%であった。

治療していないと回答した人が全体では 2065 名
(2065/5652)、36.5%であり、そのうち神経内科專
門医は 1409 名 (1409/4650)、30.3%、小児神経専門
医は 363 名 (363/1002)、36.2%、無記名者は 293 名
(293/5652)、5.18%であった。

また、無回答は全体で 121 名 (121/5652)、2.14%
であり、そのうち神経内科専門医は 87 名 (87/4650)、
1.87%、小児神経専門医は 23 名 (23/1002)、2.22%、
無記名者は 11 名 (11/5652)、0.19%であった。

(表 3、図 3)

表3 本疾患の治療を現在されているか

本疾患の治療の有無	全体 (5652名)	神経内科専門医 (4650名)	小児神経専門医 (1002名)	無記名者 (5652名)
A: 現在治療している	273名 : 4.83%	159名 : 3.41%	95名 : 9.48%	19名 : 0.33%
B: 治療していない	2065名 : 36.5%	1409名 : 30.3%	363名 : 36.2%	293名 : 5.18%
無回答	121名 : 2.14%	87名 : 1.87%	23名 : 2.22%	11名 : 0.19%

図3 本疾患の治療を現在されているか(全体:5652名中のみの結果を100%として換算)

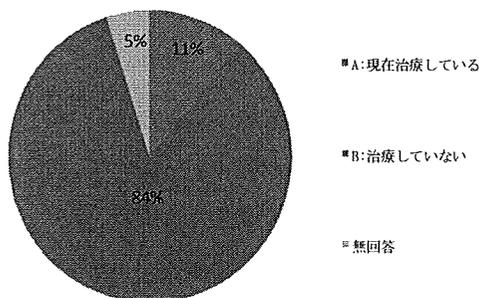
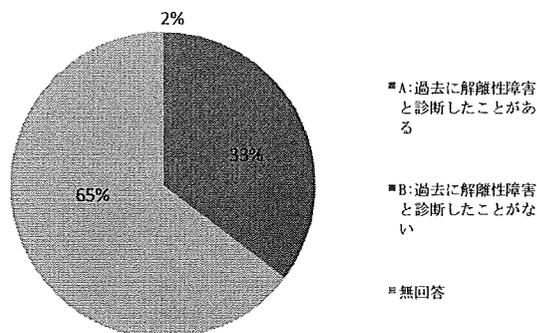


表4 過去に解離性障害と診断したことの有無

過去に解離性障害と診断したことの有無	全体 (5652名)	神経内科専門医 (4650名)	小児神経専門医 (1002名)	無記名者 (5652名)
A: ある	43名 : 0.76%	32名 : 0.68%	7名 : 0.69%	4名 : 0.07%
B: ない	826名 : 14.6%	547名 : 11.7%	189名 : 18.8%	90名 : 1.59%
無回答	1590名 : 28.1%	1076名 : 23.1%	285名 : 28.4%	229名 : 4.05%

図4 過去に解離性障害と診断したことの有無 (全体:5652名中のみの結果を100%として換算)



問4 過去に解離性障害と診断したことの有無についてでは、あると回答した人が全体では43名(43/5652)、0.76%であり、そのうち神経内科専門医は32名(32/4650)、0.68%、小児神経専門医は7名(7/1002)、0.69%、無記名者は4名(4/5652)、0.07%であった。

ないと回答した人が全体では826名(826/5652)、14.6%であり、そのうち神経内科専門医は547名(547/4650)、11.7%、小児神経専門医は189名(189/1002)、18.8%、無記名者は90名(90/5652)、1.59%であった。

また、無回答は全体で1590名(1590/5652)、28.1%であり、そのうち神経内科専門医は1076名(1076/4650)、23.1%、小児神経専門医は285名(285/1002)、28.4%、無記名者は229名(229/5652)、4.05%であった。(表4、図4)

問5 採血による遺伝子研究にご協力できるかの有無についてでは、協力できると回答した人が全体では236名(236/5652)、4.17%でありそのうち神経内科専門医は149名(149/4650)、3.20%、小児神経専門医は84名(84/1002)、8.38%、無記名者は3名(3/5652)、0.053%であった。

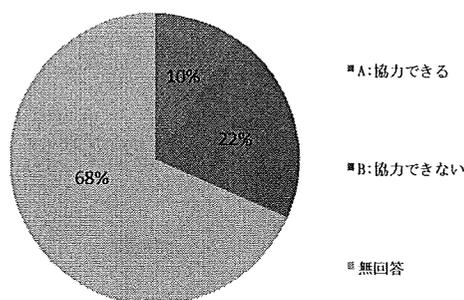
協力できないと回答した人が全体では540名(540/5652)、9.55%であり、そのうち神経内科専門医は369名(369/4650)、7.93%、小児神経専門医は93名(93/1002)、9.28%、無記名者は78名(78/5652)、1.38%であった。

また、無回答は全体で1683名(1683/5652)、29.7%であり、そのうち神経内科専門医は1137名(1137/4650)、24.4%、小児科医は304名(304/1002)、30.3%、無記名者は242名(242/5652)、4.28%であった。(表5、図5)

表5 採血による遺伝子研究にご協力できるかの有無

	全体 (5652名)	神経内科専門医 (4650名)	小児神経専門医 (1002名)	無記名者 (5652名)
A: 協力できる	236名 : 4.17%	149名 : 3.20%	84名 : 8.38%	3名 : 0.053%
B: 協力できない	540名 : 9.55%	369名 : 7.93%	93名 : 9.28%	78名 : 1.38%
無回答	1683名 : 29.7%	1137名 : 24.4%	304名 : 30.3%	242名 : 4.28%

図5 採血による遺伝子研究にご協力できるかの有無 (全体: 5652名中のみの結果を100%として換算)



D. 考察

PKCとは運動開始時に突然起こり、意識障害を伴わないまま四肢のアテトーゼ様の不随意運動症状を起こす稀な神経系疾患である。そして、30歳を超えてくると自然治癒されるという本体不明の疾患です。そのことから、小児神経専門医のアンケートの返信率が神経内科専門医よりもわずかに高かったのではないかと考える。また、集計結果をみて、予想以上に反響が大きく、PKCの有効治療薬開発のための分子メカニズムの解明についての関心が高いのではないかと考えられる。

E. 結論

PKCは神経内科専門医、小児神経科医両者で診断されていた。各々の臨床医が診察する患者数が異なるのは当然であって単純な比較はできないが、対象

とした5652人の臨床医において2484人から回答を得た。これは全体の43.9%に相当する。その中で2172人(87.4%)がPKCについて認知していた。うち、実際に診断の経験は893人であった。解離性障害と一旦は診断されたものの、後にPKCと確定された経験を43名の臨床医が有していた。今後は各々の症例の詳細を把握し、転帰を含めた治療予後を詳しく追跡することが必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishihara K, Kinoshita H, Kurotaki N, Ozawa H, Imamura A.: Could subclinical hypothyroidism cause periodic catatonia with delusional misidentification syndrome? *Psychiatry Clin. Neurosci.*, In Press, 2010

2. 学会発表

第28回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会 2009年7月10日、丸駒温泉ホテル、札幌
 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ(PKC)の有効治療薬開発のための分子メカニズムの解明
 黒滝直弘、小野慎治、菊池妙子、吉浦孝一郎、小澤寛樹

第31回長崎てんかん研究会 2009年10月30日(土)、ニュー長崎ホテル、長崎
 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ(PKC)の遺伝解析、その歴史から学ぶ
 黒滝直弘、小野慎治、菊池妙子、中根 允文、吉浦孝一郎、小澤寛樹

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

PKCの候補遺伝子の領域内全塩基配列決定及び原因候補ゲノム変化に関する研究

吉浦 孝一郎

研究要旨

発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (PKC [Paroxysmal Kinesigenic Choreoathetosis]) は稀な疾患と考えられるが、実際の罹患率・有病率ともに不明である。正確な診断がつかずとも“てんかん”の診断でカルマバゼピンを服用すれば症状は抑えられ、30歳を超えてくると自然治癒とされる本体不明の疾患である。本申請による目的は、PKCの原因となっている遺伝子を候補領域から特定し、ストレス負荷や運動開始時の一時的な小発作のメカニズムを探ることである。我々は、これまでに家族性PKCの連鎖解析を行い、候補領域を16p11.2-q12.2に特定し、その領域内のほとんど全ての“いわゆる遺伝子”部分を塩基配列決定したが、原因の特定までに至っていない。本疾患に注目して解析している他のグループも遺伝子の報告は行っておらず、これまでの古典的なエクソンに注目したPCR-塩基配列決定では、原因ゲノム変化が特定できない可能性がある。家系解析を行った全てのグループから16p11.2-q12.2が候補領域として報告されており、この領域に遺伝性の要因があることは間違いない。既にコーディングエクソンに関しては、全ての塩基配列解析を行っており、単純な塩基配列置換によるアミノ酸変異または、蛋白質として発現されないなどの単純な変化ではないと予想され、イントロン部位あるいはスペーサー部位に存在するmiRNAの変化や、限られた範囲の欠失・重複、あるいは遺伝子変換などの特殊変異と考えられる。すなわち、これまで知られている機序とは異なった新しい疾患発症機序の発見につながる可能性がある。現在、全ゲノムシーケンスが行える状況となっており、16番染色体の塩基配列決定を行い微細なゲノム構造異常も含めて解析して、遺伝要因を明らかにする。遺伝子が判明した場合には、初代培養神経細胞を使ったシナプスのはたらき、患者由来iPS細胞から誘導した神経細胞を使った神経ネットワークの解析を行う。神経伝達の異常部分が明らかとなり、現在のTegretol治療よりも優れた薬物の選択が可能となる可能性があり、患者自身あるいは家族の不安を適切に取り除くことが可能となる。

A. 研究目的

発作性運動誘発性舞踏アテトーゼ (paroxysmal kinesigenic choreoathetosis: PKC) は思春期早期に好発する神経疾患で、家族性発症 PKC と散發性 PKC が知られている。家族性の場合には、主に常染色体優性遺伝の形式をとることが知られている。当教室は 1999 年にその候補領域を 16p11.2-q12.2 に同定したが、いまだ候補遺伝子は不明である。本研究の目的は (1) その原因遺伝子の同定と病態生理の解明、(2) 病態生理に基づいた新たな治療法の探索をおこなうことである。

B. 研究対象・研究方法

(1) 研究対象

当教室では、すでに凍結保存している本症患者の不死化細胞、DNA を所有している。17 家系 78

名の試料はすぐに研究試料として利用できる。研究期間中に、全国の神経内科および精神科へのアンケートを行い PKC の全国的な患者把握、有病率算出を行いながら、典型例の収集に着手する。家族例 PKC と散發例 PKC ともに解析対象とする。調査によって明らかになった患者のなかから研究の協力が得られた場合には、血液試料から DNA を抽出するとともに不死化細胞 (lymphoblastoid cell line: LCL) を樹立する。これらの新規収集試料も研究対象とする。

(2) 候補領域内のゲノム変化の確認

当疾患の候補領域である 16p11.2-q12.2 を富田らが報告して以来、同領域にあるコーディング・エクソンに関しては既に変異解析が終了し、患者特異的な変異は同定出来なかった。われわれは、当初報告した候補領域を 16 番染色体長腕に広げ、

報告されている候補領域から最も広く候補領域と
考えコーディング・エキソンの変異解析を継続し
た。変異解析は、PCR-直接シーケンス法によっ
て行った。

単純な塩基変化に伴うアミノ酸変異が原因で
ない可能性も考えられ、コピー数変化に重点を
置いたゲノム構造異常を検出する。検出には
Affymetrix 社の Genome-Wide Human SNP 6.0 array、
及び Agilent 社の array CGH を用い、プロトコ
ルに沿って実験を行う。加えて、外注にて Illu
mina 社の HumanExon510S-Duo BeadChip を行
う。データ解析は Genotyping Console、Partek
Genomics Suite、Genomic Workbench を用い
る。また、得られたデータを Roche 社の Light
Cycler480 を用いて TaqMan 法にて定量 PCR
を行い検証する。定量 PCR 時の反応液作成
や分注作業は特化した分注機 (Qiagen 社の
QiaGility) を使用することによって、安定し
たデータがえられることがわかり、QiaGility
を使用する。

(3) 患者特異的構造異常検出のための BAC library 作成

染色体 16 番セントロメア周辺は、コピー数多
型が存在しており塩基配列決定とコピー数変
化の検出だけでは患者特異的な変化を検出
することが不可能な可能性がある。そこで、患
者の LCL から患者特異的 BAC (Bacterial
Artificial Chromosome) library を作成して
塩基配列決定することにより、欠出や重複
領域から患者特異的な塩基変化を検出する
ことを試みた。

(4) 次世代型シーケンサーを用いた塩基配 列の再解析

PCR-直接シーケンス法によってこれまで終
了した候補領域のコーディング・エキソンの
塩基配列決定を再度行うこととした。染色
体ソーティングや BAC library 作成による患
者特異的染色体 16 番の解析前に、エキソ
ンキャプチャーによるエキソン領域の DNA
を濃縮し、次世代型シーケンサーによる塩
基決定 (外部委託研究による) を行った。勿
論、すでにキャピラリーシーケンサーによ
り塩基配列決定を終了しており、陰性デー
タの確認となる可能性が高いが、次世代型
シーケンサーの情報処理技術を習得してお
く必要があり、本年度に解析をおこなった。

染色体ソーティングによる第 16 番染色体
分離・全塩基配列決定次世代型高速セルソ
ーターにて染色体ごとの分離を行い、16 番
染色体を単離する。ソーターは精度の高い
染色体分離を目指し、ジェットインエアー
方式の高速ソーターを使用する。超高分
子 DNA 抽出後、次世代シーケンサー

による 16 番染色体リシーケンス解析を行
う。次世代シーケンサー解析はメイトペ
ア解析を行い、1 塩基置換の他、欠失/挿
入の検出精度も高めて行う。患者の他、
コントロール (非罹患者) 検体について
も同様に行い、互いにシーケンスを比較
することで、有意な変異の検出を行う。こ
れまでの全ての PKC 連鎖解析の報告から、
候補領域は 16 番染色体セントロメア近
傍に位置することは一致しているが、そ
れぞれがオーバーラップしているものの、
その範囲に差がみられる。それら全ての
候補領域を包括した領域内で、かつ未検
査である遺伝子の変異解析を行う。

(5) 患者細胞からの iPS 細胞樹立および 神経細胞誘導による遺伝子解析

患者細胞へ電気穿孔法 (マイクロポレー
ション法) またはウイルスベクター法を用
い、OCT3/4、KLF4、SOX2、c-MYC、
NANOG 発現ユニットを導入し、フィー
ダー細胞 (マウス EF) 上で培養、胚幹
細胞様未分化細胞形態を指標として iPS
細胞単離を行う。それらは、同時にアル
カリフォスファターゼ活性など未分化マ
ーカーの発現を確認し、iPS 細胞と同定
する。樹立した iPS 細胞をレチノイン酸
により神経細胞へ分化させ、患者で同定
された変異遺伝子の神経細胞での影響を
解析する。

C. 研究結果

(1) 拡大した候補領域の変異解析

以前、我々は 16 番染色体セントロメア
近傍に PKC 候補領域を同定しており (Tomita
et al., 1999)、その領域内の遺伝子を直
接シーケンスしたが疾患の原因となる変
異は同定出来なかった (Kikuchi et al.,
2007)。そこで、詳細にこれまでの報
告を見直し候補領域を最大に考慮し、
遺伝子のコーディングエキソンを PCR-
直接シーケンス法によって変異解析し
た。6 患者の DNA を変異解析に使用し、
すべての PKC 連鎖解析の報告を包括
した候補領域内の未検査である遺伝子、
72 遺伝子について変異解析を行った結
果、複数家系に重複したアミノ酸変化
を伴う塩基置換はみられなかった。一患
者に変異が認められかつ対照者 272 名
には認められない PKC 原因変異の可
能性がある塩基置換が 2 個同定している。

エキソンキャプチャー - 次世代型シー
ケンサーの解析は、現在情報処理が進
行中であるが、新たな患者特異的変異
は同定されていない。

(2) 例試料収集 - DNA チップ解析 について

その結果からコピー数異常が疾患の
原因となる可能性があるという仮説を
立て、患者検体でのコ

ピー数解析を行った。全国の神経内科および精神科宛てに通知したPKC患者検体の募集により、新規に1家系2名と家系内健常者2名を収集した。それら4名について、Affymetrix社のGenome-Wide Human SNP 6.0 arrayを用い、Partek Genomics Suiteでコピー数の解析を行った。また、既に長崎大学で保存してある患者DNAから6家系を選び、それぞれ1名計6名と孤発例2名を合わせた計8名について、Illumina社のHumanExon510S-Duo Bead Chipを外注にて行い、Partek Genomics Suiteでコピー数解析を行った。その結果、コピー数多型登録のない欠失・重複は検出出来なかった。Human Exon510S-Duo BeadChipの結果からは候補領域である16番染色体セントロメア近傍に関しては、すべての患者検体で欠失と思われる領域が認められた(図1)。しかしながら、この領域はDatabase of Genomic Variantsに多型の登録がなされている領域であり、また、その領域内のプローブを用いたTaqMan法による定量PCRをRoche社LightCycler 480で行ったところ、患者間、健常者間で大きなばらつきがみられ、患者のみならず健常者でもコピー数が一定でない領域であることが分かり、この領域のコピー数の増減がPKCを発症させる可能性は低いと考えられた。

また、以前我々は2007年の報告で、SCNN1GとITGAL遺伝子で一家系のみにもみられるアミノ酸変化を伴う塩基置換を同定したが、今年度はその2遺伝子の上下流2kbを含んだ領域について大きな欠失、重複がないかAgilent社のカスタムアレイを注文しarray CGHを行い、Genomic Workbenchで解析した(図2)。両遺伝子とも疾患特異的な欠失、重複領域は認められなかった。

D. 考察

最大限のPKC候補領域に存在する遺伝子の変異解析を完全に終了した。PKCの原因の可能性のある塩基置換が2個同定されている。その2個の変異は、まったく別の遺伝子に存在しており、複数の患者に共通する変異遺伝子は存在しない。その2個の変異遺伝子が原因であるとは考えづらいが、現在これらの遺伝子について微細な欠出がないかを、他の患者で確認中である。候補領域に存在するコーディング・エキソンすべての解析を終了しており、単純な塩基置換による変異が原因であればすでに原因遺伝子が見つかっていると考えられる。これほど候補領域のすべての遺伝子について変異解析を行っても原因遺伝子が見つけれないとするれば、PCR-直接シーケンス法では変異が同定できないようなDNAの変化であろう。考えられる可能性として、1)重複の領域にある遺伝子(偽

遺伝子も含め)があり、通常PCR-直接シーケンス法では変異が描出できない2)重複等の領域にあって正常対照者内でコピー数多型が存在するが、患者では機能遺伝子に変化している3)遺伝子変換により機能遺伝子が機能不全となるが、偽遺伝子の存在によってそれが同定できない等の状況が考えられる。

平成21年度には、できる限りのPCR-直接シーケンス法による塩基配列解析を終了し、可能な手技でのコピー数解析を終了した。これらの既存の方法では、PKCの原因遺伝子が同定できないことは明らかである。それらのことを考慮し、患者特異的構造異常検出のためのBAC library作成や染色体ソーティングによる第16番染色体分離・全塩基配列決定を計画した。しかし、BAC library作成や染色体ソーティングによる第16番染色体分離が首尾よく進行しておらず、平成22年度の課題である。

E. 結論

PKCの原因となるゲノムの変異は、通常のPCR-直接シーケンス法による変異解析では同定できない機序の変異である可能性が高い。エキソンキャプチャー - 次世代型シーケンサーによる解析も、原因同定の可能性は低い。考えられる可能性はコピー数多型部位の複雑な変化(遺伝子変換や機能遺伝子の欠失・重複)である可能性がますます高く、来年度以降の患者から得られた染色体16番セントロメア領域のBACシーケンス解析、あるいは染色体16番ソーティング後の次世代型シーケンス解析に期待する。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Wu L, Liang D, Niikawa N, Ma F, Sun M, Pan Q, Long Z, Zhou Z, Yoshiura K, Wang H, Sato D, Nishimura G, Dai H, Zhang X, Xia J. A ZRS duplication causes syndactyly type IV with tibial hypoplasia. *Am J Med Genet A*. 2009 Feb 15;149A(4): 816-818.

2. Kuniba H, Pooh RK, Sasaki K, Shimokawa O, Harada N, Kondoh T, Egashira M, Moriuchi H, Yoshiura KI, Niikawa N. Prenatal diagnosis of Costello syndrome using 3D ultrasonography amniocentesis confirmation of the rare HRAS mutation G12D. *Am J Med Genet A*. 149A(4): 785-7. 2009. Feb 15.

3. Miyazaki K, Mapendano CK, Fuchigami T, Kondo S, Ohta T, Kinoshita A, Tsukamoto K, Yoshiura KI, Niikawa N, Kishino T. Developmentally dynamic changes of DNA methylation in the mouse Snurf/Snrpn gene. *Gene* 432(1-2): 97-101. 2009. Mar 1.
4. K Hamanoue H, Megarbane A, Tohma T, Nishimura A, Mizuguchi T, Saito H, Sakai H, Miura S, Toda T, Miyake N, Niikawa N, Yoshiura K, Hirahara F, Matsumoto N. A locus for ophthalmo-acromelic syndrome mapped to 10p11.23. *Am J Med Genet A*. 2009 Mar;149A(3): 336-342.
5. Kuniba H, Yoshiura K, Kondoh T, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Kaname T, Naritomi K, Matsumoto T, Moriuchi H, Kishino T, Kinoshita A, Miyake N, Matsumoto N, Niikawa N. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J Hum Genet*. 2009 May; 54(5): 304-309.
6. Toyoda Y, Sakurai A, Mitani Y, Nakashima M, Yoshiura KI, Nakagawa H, Sakai Y, Ota I, Lezhava A, Hayashizaki Y, Niikawa N, Ishikawa T. Earwax, osmidrosis, and breast cancer: why does one SNP (538G>A) in the human ABC transporter ABCC11 gene determine earwax type? *FASEB J*. 2009. Jun; 23(6): 2001-2013.
7. Nakano M, Miwa N, Hirano A, Yoshiura K, Niikawa N. A strong association of axillary osmidrosis with the wet earwax type determined by genotyping of the ABCC11 gene. *BMC Genet*. 2009 Aug 4; 10: 42.
8. Machida J, Félix TM, Murray JC, Yoshiura K, Tanemura M, Kamamoto M, Shimosato K, Sonta S, Ono T. Searching for genes for cleft lip and/or palate based on breakpoint analysis of a balanced translocation t(9;17)(q32;q12). *Cleft Palate Craniofac J*. 2009 Sep; 46(5): 532-540.
9. The Super Science High School Consortium. Japanese map of the earwax gene frequency: a nationwide collaborative study by Super Science High School Consortium. *J Hum Genet*. 2009 Sep; 54(9): 499-503.
10. Kimani JW, Yoshiura K, Shi M, Jugessur A, Moretti-Ferreira D, Christensen K, Murray JC. Search for Genomic Alterations in Monozygotic Twins Discordant for Cleft Lip and/or Palate. *Twin Res Hum Genet*. 2009 Oct; 12(5): 462-468.
2. 学会発表
国内学会
第16回日本遺伝子診療学会 2009年7月30日(水)～8月1日(土), ホテル札幌ガーデンパレス, 札幌
W-14: 日本におけるHPV感染の特徴とHPV持続感染に関わるSNP検索. 吉浦孝一郎, 三浦清徳, 中山大介, 増崎英明
O-03: ヒト疾患モデルとしての interferon regulatory factor 6 遺伝子改変マウスの表現型解析
O-06: アレイ染色体検査のための健常人 CNV データベース構築の試み. 松井 健, 霜川 修, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 松本直通, 原田直樹
O-08: Brain AVM maps to 5p13-q14, 15q11-q13 or 18p11: Linkage analysis with clipped fingernail DNA using high-density SNP array. 及川将弘, 国場英雄, 近藤達郎, 永安 武, 新川詔夫, 吉浦孝一郎
O-11: PCR-高解像度融解曲線分析法による遺伝子スキャンニングシステムの構築. 要 匡, 柳 久美子, 福嶋義光, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二
O-12: 次世代型シーケンサを用いた原因候補全領域リシーケンス解析へのアプローチ: 日本人ゲノム16q122領域の構造解析. 要 匡, 塚原正俊, 柳久美子, 藤森一浩, 喜久里育也, 照屋盛実, 今田有美, 鼠尾まい子, 矢野修一, 佐藤友紀, 三輪有希乃, 平野 隆, 平野隆城, 高嶋 博, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二
O-23: 母体血中への胎盤特異的 miRNA の流入量に関する検討. 三浦清徳, 三浦生子, 東嶋 愛, 阿部修平, 山崎健太郎, 嶋田貴子, 吉浦孝一郎, 増崎英明
O-25: 自己免疫疾患におけるマイクロキメリズムノ関与に関する検討. 東嶋 愛, 三浦清徳, 山崎健太郎, 小川文秀, 川上 純, 吉浦孝一郎, 増崎英明
O-26: 長崎県におけるHPV-DNA型の分布とDNA型による癌化への影響に関する検討. 阿部修平, 山崎健太郎, 三浦清徳, 中山大介, 嶋田貴子, 三浦生子, 藤下 晃, 鮫島哲郎, 村上 誠, 吉浦孝一郎, 増崎英明
O-33: 軟口蓋裂および粘膜下口蓋裂のゲノムワイド連鎖解析. 津田雅由, 中島光子, 平野明喜, 三古谷 忠, 山田崇弘, 吉浦孝一郎
第54回日本人類遺伝学会 2009年9月23日(水)～26日(土), グランドプリンスホテル高輪, 東京