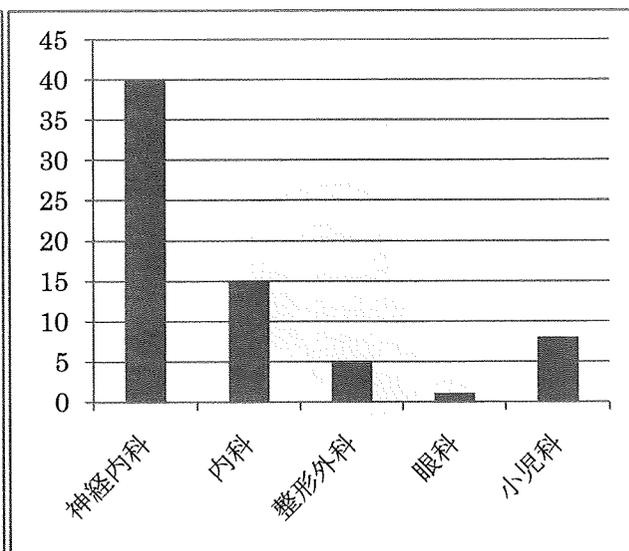
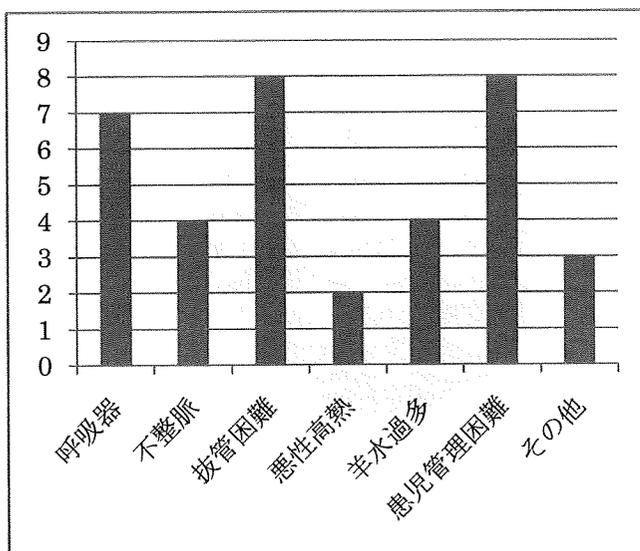


< 周産期合併症 >

< 産婦人科以外の受診科 >



< 参考 > 以前お願いいたしましたアンケートの内容は以下の通りです。

1. 御診療の施設は？

A. 病院(神経内科有り) B. その他の病院 C. 診療所

2. 卒後年数は？ A. ～10年目 B. ～20年目 C. 21年以上

3. 過去に本疾患患者を診ておられますか

A. 経験あり ( 名)、B. 経験無し

4. 貴科で本症の患者が受療された疾患は何ですか

A. 不妊症 B. 妊娠異常 C. 子宮筋腫 D. 内膜症 E. 良性腫瘍

F. 悪性腫瘍 G. その他( )

5. 貴科への受診が契機になり本疾患と診断された症例はありますか。 A. あり (過去に 名)、B. なし

6. 受診中の患者様で本症を疑うのはどの様な時ですか

A. 筋力低下 B. 握った手が開きにくい C. 顔貌 D. CK 高値

E. 家族歴 G. 先天性筋強直性ジストロフィー患児の出産

7. 本疾患患者でどのような周術期合併症を経験されましたか。

A. 呼吸器合併症 B. 不整脈 C. 抜管困難 D. 悪性高熱症

E. その他 ( )

8. 貴科以外の受診科をご存じでしたらお教えてください

A. 神経内科 B. 内科 C. 整外 D. 眼科 E. 小児科

F. その他( )

9. 本疾患の診療において困ったご経験があればお教え下さい

## 筋強直性ジストロフィーの臨床データベース構築の試み

分担研究者： 松村 剛 独立行政法人国立病院機構刀根山病院神経内科 医長

**研究要旨：** 多彩な合併症を有する筋強直性ジストロフィーは、専門医でも総合的管理が容易では無い。また、分子病態機構解明の進歩により、将来の分子治療の可能性も期待される。合併症を含む総合的管理の補助として、疫学的・臨床研究のためのデータ集積のため、将来の臨床治験への準備などを目的に、臨床データベースの構築を試みた。現在入力作業を行っており、より臨床現場における実用性を目指した改善を図り、多施設での利用が可能となるシステムに発展させたい。

### A. 研究目的

筋強直性ジストロフィーは DMPK の非翻訳領域に存在する CTG 繰返し配列の伸長により生じることが明らかとなり、各種の遺伝子の mRNA splicing 異常により多臓器障害を来す RNA 病であることが示されている。分子病態機構の解明と共に、分子治療の可能性も期待され、既に欧米では複数の国で登録システムが稼働している。希少疾患である筋ジストロフィーの臨床治験では、対象患者の recruit が治験成功の大きな課題となる。Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)では各国が治験に必要な共通した項目を持つ登録システムを構築し、国際共同治験が円滑に進むような体制作りが進行しており、本邦でも筋ジストロフィー臨床研究班で登録システム (Remudy) が稼働し始めている。

本症は、CTG 繰返し配列延長によって生じるため、DMD に比べると遺伝子治療の対象者選別の問題は低いと思われるが、多彩な合併症が影響を及ぼすことが懸念される。また、呼吸管理や感染治療の進歩により生命予後が大きく改善した DMD と異なり、本症の生命予後や死因の実態は大きな変化を認めておらず、複雑な合併症

対策の改善が重要である。本症に対する遺伝子治療はもう少し先と思われるが、合併症の疫学的解析・介入試験などに必要なデータの集積は本症の生命予後・QOL 改善の上で重要と思われる。臨床データベースの構築は、本症の臨床管理の補助として、疫学的研究の手段として、将来の国際的データベースへの準備として重要と考える。

### B. 研究方法

入力項目を検討し、基礎情報として患者情報 (性別、生年月日)、初発症状・発症時期、家族歴、診断根拠、生殖能力、学歴・就業 etc、臨床症状・機能障害として、主要症状 (筋強直現象、筋力低下部位、運動機能障害、禿頭 etc)、装具使用状況、嚥下機能障害・栄養管理、呼吸機能障害・呼吸管理、心機能・伝導障害・治療内容、脂質・糖代謝・内分泌異常・治療内容 etc、合併症として白内障、脂質糖代謝・内分泌異常、消化管・肝・胆道系障害、腎機能障害、頸椎症 etc、検査データとして体格測定、呼吸機能、sleep study、血液ガス、心電図、Holter 心電図、心エコー、ABI、75gOGTT、臍囲 CT、Brain MRI etc を記録項目とした。

データベースは Microsoft Access 2007 を用いて作成し、入力フォームの工夫により省力化と入力内容の統一化を図った。

### C. 研究結果

現時点までに、データベースと入力フォーム案を作成した。現在、当院受診中の患者の入力を行っており、150 名余りが入力された。入力を実施する中で、臨床の立場から入力項目内容やフォームの再検討を行っているところである。

### D. 考察

本症の合併症は多岐にわたっており、神経内科医・小児神経科医でも本症の患者が抱える医療的問題を総合的に管理することは困難である。適切なデータベース(入力フォーム)の存在は、本症の総合的管理の補助としても有効なことが期待される他、個人情報を除いたデータ集積により疫学的研究・臨床研究の促進にも友好と思われる。データの蓄積により、将来の臨床治験へ遅滞なく参加できると drug lag の解消にも有効と期待される。

臨床現場でより使いやすい入力項目やフォームの検討、個人情報を除いた出力方法の検討などが課題である。

### E. 結論

筋強直性ジストロフィー臨床データベースを作成した。

### G. 研究発表

1. 論文発表：無し
2. 学会発表：無し

### 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

## イオンチャンネルと神経細胞のオートファジー制御機構

分担研究者： 荒木 敏之 国立精神神経センター 神経研究所 部長

**研究要旨：**イオンチャンネルの点変異などの遺伝変異に基づく機能異常が神経・筋細胞の機能不全や細胞死をきたすメカニズムは未だ十分に解明されていない。我々は、細胞膜・細胞内膜系に存在する Na/H 交換機構に着目し、このメカニズムが細胞のオートファジー活性化に関与する可能性を示した。神経系においてはオートファジー不全マウスが神経変性様症状を示すことがわかっており、このようなイオンチャンネルの機能変化と細胞機能とをつなぐメカニズムとして注目される。

### A. 研究目的

オートファジーとはユビキチン-プロテアソーム系と並ぶ細胞内大規模分解系であり、酵母から哺乳類まで広く保存された機構である。近年、分子生物学的手法により、多くの関連遺伝子群(Atg 遺伝子群)が明らかにされている(Ohsumi, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2001; Xie and Klionsky, *Nat Cell Biol.*, 2007)。これらの遺伝子改変動物を用いた解析から Atg5, Atg7 はオートファジーの誘導過程に必須の遺伝子であることが報告されている(Kuma *et al.*, *Nature*, 2004; Komatsu *et al.*, *J Cell Biol.*, 2005)。特に、神経特異的なオートファジーの不全は神経変性疾患様の徴候を示すことから神経変性疾患治療の標的として注目を集めている(Hara *et al.*, *Nature*, 2006; Komatsu *et al.*, *Nature*, 2006; Rubinsztein *et al.*, *Nat Rev Drug Discov.*, 2007)。更に、オートファジー不全により起こるユビキチン陽性封入体形成に関与する p62/SQSTM1 との関連も徐々に明らかにされている(Bjørkøy *et al.*, *J Cell Biol.*, 2005; Komatsu *et al.*, *Cell*, 2007)。多くの神経変性疾患では神経細胞内に異常蛋白の凝集体が起こることが知られているが、神経毒性はこれらの凝集体ではなく、凝集する前段階のオリゴマーが毒性を発揮すると考えられている(Taylor *et al.*, *Hum Mol Genet.*, 2003; Sánchez *et al.*, *Nature*, 2003)。細胞内凝集体の一種で

あるアグリソームの形成にはヒストン脱アセチル化酵素 HDAC6 が重要な役割を果たすことが報告されている(Kawaguchi *et al.*, *Cell*, 2003)。HDAC6 は酵素活性領域のほかにユビキチンおよび微小管のそれぞれと結合する領域を持ち、ユビキチン化蛋白を微小管形成中心に集める機能を有することから、こうして凝集した異常蛋白はオートファジーによって分解されることが示唆されていた。実際、ハンチントン舞踏病や脊髄球筋萎縮症といったポリグルタミン病モデルにおいて HDAC6 はオートファジーを増強して症状を改善しうることを示された (Iwata *et al.*, *J Biol Chem*, 2005; Pandey *et al.*, *Nature*, 2007)。また、オートファジーの調節因子の一つとして知られる mTOR を抑制することで誘導されるオートファジーがハンチントン舞踏病モデルにおいて凝集体の形成と細胞毒性を有意に低減することも報告されている(Ravikumar *et al.*, *Nat Genet.*, 2004)。しかし、神経系では飢餓状態においてもオートファゴソーム形成の指標である GFP-LC3 のドットは光学顕微鏡ではほとんど観察することができない(Mizushima *et al.*, *Mol Cell Biol.*, 2004)。これらのことから絶食などの飢餓状態によらないオートファジーの誘導機構を見出すことはこれらの細胞内異常蛋白凝集を特徴とする難治性の神経変性疾患に新たな治療法を開発の道を拓く可能性がある。

本研究では、まず、神経細胞様に形態分化する培養細胞を用い、培養環境の変化によるオートファジー誘導を網羅的に検討し、次に、オートファジー誘導にいたる分子基盤を検討した。

## B. 研究方法

神経系でのオートファジーの誘導機構を解析するため、マウス神経芽細胞腫由来 Neuro-2a 細胞を用いて EGFP-LC3 を安定に発現する細胞株 (EGFP-LC3/N2a) を作製し、様々な細胞外環境 (表1) におけるオートファジーの誘導の有無を形態的・生化学的に検討した。

さらに、ここで得られたオートファジー誘導機序の分子レベルでの解析のため、NHE 欠損細胞株 (PS120 細胞、Pouysségur より供与を受けた) における細胞外環境変化の影響の評価、PS120 細胞に過剰発現させた外来遺伝子のオートファジー誘導に対する影響、を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験および遺伝子組み換え実

験は関係法令および指針に基づき、実施場所である国立精神・神経センター神経研究所の定める「小型実験動物倫理指針」、「小型実験動物研究施設の運営に関する規則」および「組み換え DNA 実験安全規則」、「組み換え DNA 実験内部規則」に従って行った。

## C. 研究結果

まず、EGFP-LC3 を安定に発現する Neuro2a 細胞株 (EGFP-LC3/N2a) では、単純な血清・アミノ酸除去ではオートファジーが誘導されなかった。

そこで様々な細胞外液 (Krebs-Ringer 液、Hanks 液、Earl 液、PBS、電気生理学用細胞外液ほか) を比較したところ、Krebs-Ringer 液で最も強くオートファジーが誘導されることを見出した。また、電気生理学等で用いられるイオン置換法を用いて検討したところ、この細胞ではオートファジーの誘導に細胞外  $\text{Na}^+$  と  $\text{HCO}_3^-$  および  $\text{Ca}^{2+}$  が存在することが非常に重要であること、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度がオートファジーの度合いを調節していることを発見した。更に、細胞外 pH の低下すなわち酸性化がオートファジーを抑制することを見出した

	Earle's		Hanks'		Krebs-Ringer bicarbonate		Bath Solution (Glucose 10mM)		PBS	
	mM	mOsm	mM	mOsm	mM	mOsm	mM	mOsm	mM	mOsm
NaCl	116.40	232.80	136.90	273.78	129.40	258.80	140.00	280.00	137.00	274.00
KCl	5.40	10.80	5.37	10.74	5.20	10.40	5.00	10.00	2.68	5.36
CaCl <sub>2</sub>	1.80	5.40	1.26	3.78	2.70	8.10	2.00	6.00	-	-
MgCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	2.00	6.00	-	-
MgSO <sub>4</sub>	0.80	1.60	0.81	1.62	1.30	2.60	-	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.02	2.04	-	-	-	-	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	0.34	1.02	-	-	-	-	10.00	30.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	0.44	0.88	1.30	2.60	-	-	2.00	4.00
NaHCO <sub>3</sub>	26.20	52.38	4.17	8.34	24.80	49.60	-	-	-	-
Glucose	5.56	5.56	5.56	5.56	3.33	3.33	10.00	10.00	-	-
HEPES (pH 7.4)	-	-	-	-	-	-	10.00	10.00	-	-
Total osmolarity		310.6		305.7		335.4		322.0		313.4
Mannitol	24.9	24.9	29.7	29.7	0	0	13.4	13.4	22.1	22.1

表1 スクリーニングに使用した EGFP-LC3/N2a に対する培養条件

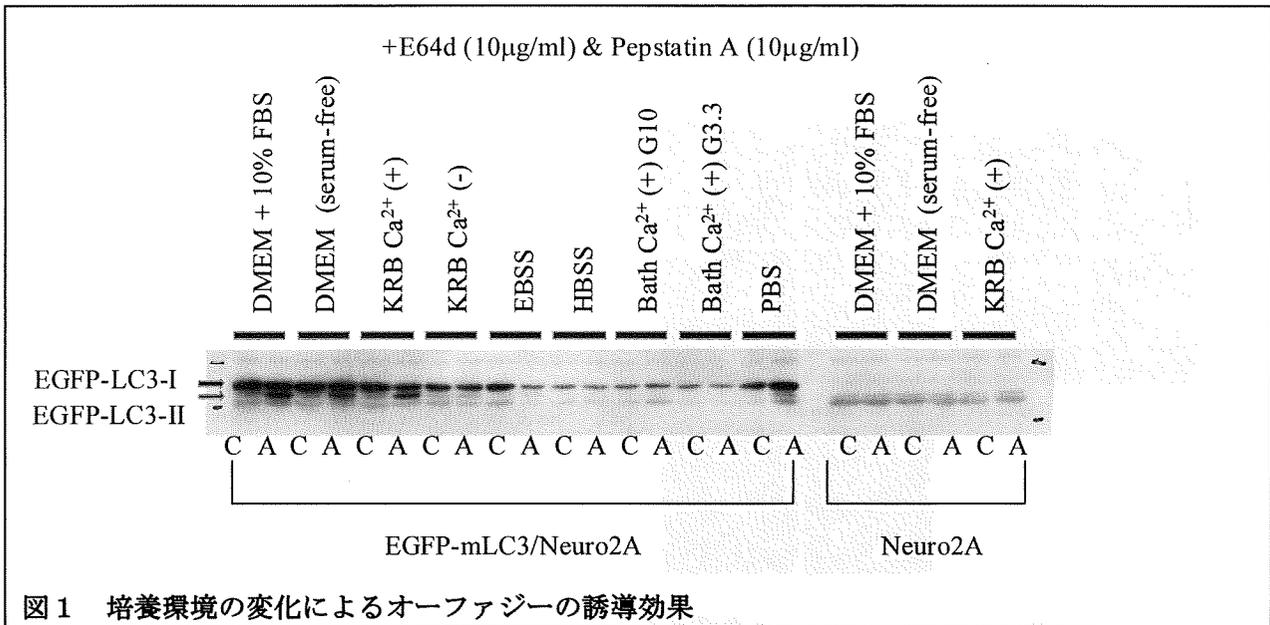


図1 培養環境の変化によるオートファジーの誘導効果

(図1)。対照的に細胞外 pH の上昇は血清を含有する培地中でもオートファゴソーム形成を誘導することが確認された。

哺乳動物において細胞内外の pH を調節する分子機構には大きく分けて  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交換担体(NHE)と、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  共輸送担体(NBC)が挙げられる(一部プロトンチャネルやプロトンポンプも関与(図2)); (Chesler, *Physiol Rev*, 2003; Taylor *et al.*, *J Physiol*, 2006)。

EGFP-LC3 を安定発現する PS120 細胞(NHE 欠損細胞株)を用い、血清・アミノ酸除去及び細胞外 pH 依存的なオートファジー誘導条件で培養したところ、Neuro2A 細胞で観察されたオートファジー誘導は認められなかった。さらに、この細胞に NHE1 または NHE5 をそれぞれ強制発現させると細胞外環境による刺激なしにオートファゴソームが形成されることが確認された。このことは、細胞外 pH 変化に伴うオートファジーの制御に NHE1 または NHE5 あるいはその両方が関与していることを示唆しているものと考えられた(図3)。

実際、NHE1 は全身ほぼすべての細胞に発現し、主要な細胞内 pH の制御に関わると考えられているが、組織特異的に発現する他の NHE 分子と共存することも知られている(Masereel *et al.*, *Eur J Med Chem.*, 2003)。そこで、NHE の属する SLC9A ファミリーの遺伝子発現を RT-PCR 法により検証したところ、

EGFP-LC3/N2a 細胞には細胞膜に存在する分子としては NHE1 と NHE5 が発現することが確認された。

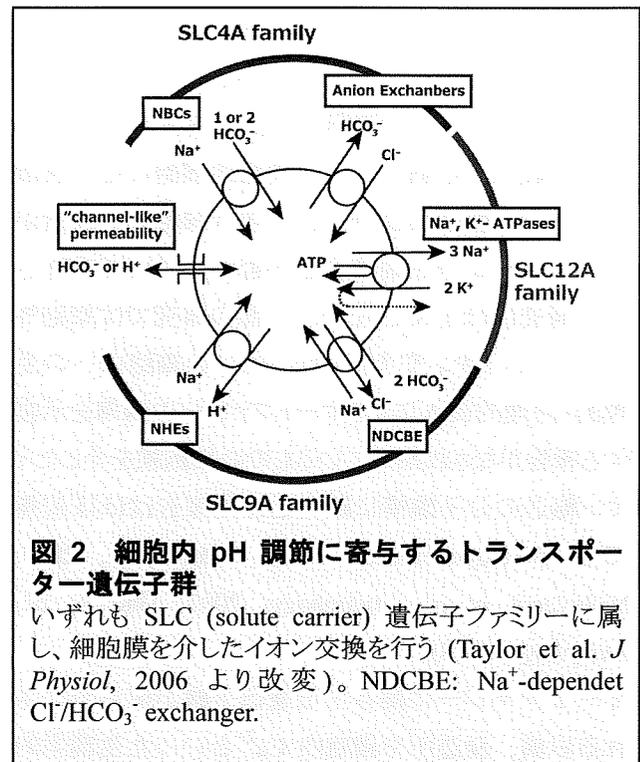


図2 細胞内 pH 調節に寄与するトランスポーター遺伝子群

いずれも SLC (solute carrier) 遺伝子ファミリーに属し、細胞膜を介したイオン交換を行う (Taylor *et al.* *J Physiol*, 2006 より改変)。NDCBE:  $\text{Na}^+$ -dependent  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger.

#### D. 考察

これまでオートファジー研究の発展は電子顕微鏡を用いた形態学に始まり、分子生物学・生化学的手法を用いてその遺伝子群の同定及び機能の解明がなされてきた。また、オートファジーは飢餓状態で

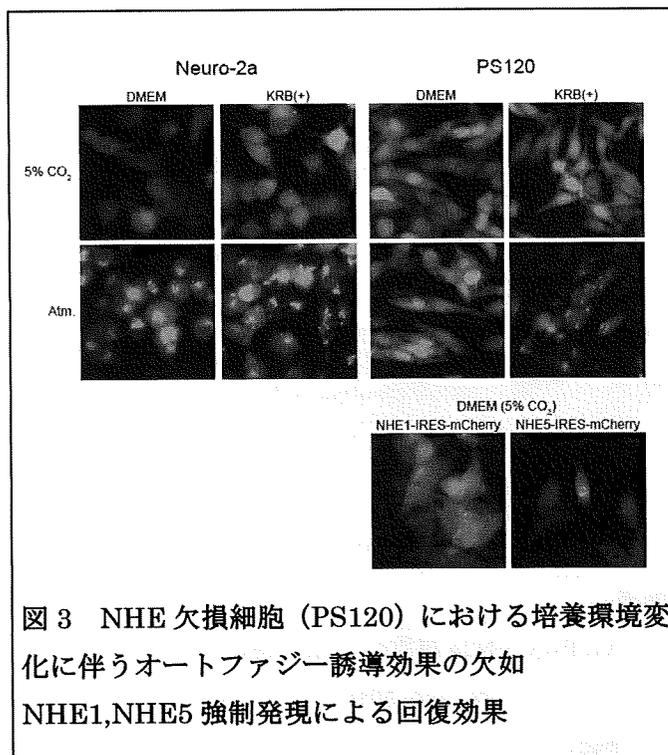


図3 NHE欠損細胞(PS120)における培養環境変化に伴うオートファジー誘導効果の欠如 NHE1, NHE5 強制発現による回復効果

誘導されることから代謝・内分泌学的な見地からの考察が先行している。しかし、オートファジーに関与する多くの遺伝子群が明らかにされる中で、神経系や心筋といった興奮性細胞のその特徴たるイオン輸送およびこれに伴う細胞膜の興奮がオートファジーと関連するか否かについて吟味された研究はほとんどない。一部の研究では細胞外カルシウムイオンやナトリウムイオンの細胞内への生理的・病的流入によるオートファジーの誘導を示唆する報告がなされ始めているものの細胞膜を介したイオン輸送の分子機構に踏み込んだ報告はほぼ皆無である(Høyer-Hansen *et al.*, *Mol Cell.*, 2007; Nishiyama *et al.*, *Autophagy*, 2007; Gao *et al.*, *Autophagy*, 2008)。

オートファジーに関与する遺伝子群が明らかにされる以前、浸透圧や細胞内  $Ca^{2+}$  といった生理学的な研究も一部行われたが(Margrete *et al.*, *Eur J Biochem.*, 1995)、それらが単離されたオートファジー関連分子とどのように関係するかは不明なままである。このような背景にあって、 $Ca^{2+}$  を含む他のイオン輸送機構とオートファジーの関連は現在のところ明らかにされていない。深閨細胞と非神

経細胞におけるオートファジーの分子機構の違いを明らかにすることは、その生理的役割と多くの神経変性疾患に対する治療法開発の基盤の礎を構築するうえで非常に重要であると考えている。

$Na^+/H^+$  交換機構の分子メカニズムは強制発現系を用いた解析から個々のトランスポーターとしての機能は解析されているものの、個体レベルにおける役割は不明な点が多い。特に、膵外分泌細胞や腸管などの消化器系や腎臓に優位に発現するNHEでは各種欠損動物が作成されその機能の解明が進んでいるものの、全身に分布するNHE1や中枢神経系に発現が制限されているNHE5に関してはほとんど明らかにされていない。今後、このような点に関し、遺伝子変異・欠損によるモデルマウスを用いて個体レベルでの解析を含め、NHEの機能に関する検討を行っていく予定である。

## E. 結論

細胞膜・細胞内膜系に存在する  $Na/H$  交換機構のなかで、特にNHE1、NHE5のいずれかもしくは両方が、細胞の栄養飢餓状態とは異なる新規のオートファジー活性化メカニズムに関与する可能性を示した

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(投稿準備中)

### 2. 学会発表

国内学会

シンポジウム講演

荒木敏之 神経系に対するレスベラトロールの作用とSirtuin活性 第82回日本生化学会大会 平成21年9月 神戸

一般演題

若月 修二、齋藤 文典、荒木 敏之 ユビキチンリガーゼ ZNRF1 はプロテアソームによる Akt の選

沢的分解を介して神経軸索変性の進行を制御する  
第 32 回日本分子生物学会年会 平成 21 年 12 月  
横浜

館野美成子、高橋良輔、荒木敏之 変異 SOD1 は  
KAP3 の機能阻害により choline acetyltransfer-  
ase の軸索輸送阻害とアセチルコリン分泌低下を  
引き起こす 第 32 回日本分子生物学会年会 平  
成 21 年 12 月 横浜

齋藤文典、荒木敏之 ユビキチンリガーゼ ZNRF1  
によるシュワン細胞の分化制御機構 第 32 回日  
本分子生物学会年会 平成 21 年 12 月 横浜

富樫 和也、荒木 敏之  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交換輸送体による  
オートファジーの調節 第 32 回日本分子生物学  
学会年会 平成 21 年 12 月 横浜

## 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

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

本邦における筋チャンネル病の実態に関する研究班

平成21年度班会議

プログラム

日時 平成22年2月11日（木・祝） 13:30-17:00

会場 千里ライフサイエンスセンター 6階 602号室  
大阪府豊中市新千里東町1-4-2  
電話 06-6873-2010

事務局

大阪大学大学院医学系研究科 神経内科学教室内  
厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業  
「本邦における筋チャンネル病の実態に関する研究班」事務局  
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2 D-4  
TEL 06-6879-3571  
FAX 06-6879-3579

## プログラム

### 第一部 筋強直性ジストロフィー (座長 木村 卓)

筋強直性ジストロフィーの大阪府下受療動向調査—循環器・糖尿病専門医に対するアンケートから  
兵庫医科大学内科 (神経・脳卒中科) 木村 卓

筋強直性ジストロフィーの大阪府下受療動向調査—眼科・産婦人科専門医に対するアンケートから  
大阪大学医学系研究科神経内科学 穀内 洋介

筋強直性ジストロフィーの臨床データベース構築  
国立病院機構刀根山病院 松村 剛

(指定発言)

国立病院機構東埼玉病院 川井 充

<休憩>

### 第二部 骨格筋チャネル病 (座長 高橋 正紀)

イオンチャンネルと神経細胞のオートファジー制御機構  
国立精神神経センター神経研究所 荒木 敏之

本邦における骨格筋チャネル病についての実態調査—神経内科・小児神経科専門医に対するアンケートから  
大阪大学医学系研究科神経内科学 高橋 正紀

骨格筋型電位依存性 Na チャネルのスプライシング異常によるミオトニーの一例  
大阪大学医学系研究科神経内科学 久保田 智哉

寒冷誘発性低 K<sup>+</sup>性周期性四肢麻痺の一家系  
福島県立医科大学医学部神経内科学講座 杉浦 嘉泰

T1313M の PMC 及び Q1633E の PAM の臨床像と診断に有用な EMG 所見  
首都大学東京 健康福祉学部 木下 正信

本邦における骨格筋チャネル病の遺伝子解析  
三重大学 神経内科 佐々木 良元

甲状腺中毒性周期性四肢麻痺の原因遺伝子同定の試み  
鹿児島大学 有村 公良

## IV 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
	なし				

## V 研究成果の刊行物・別刷

なし

