

の同定についても試みた。

### C. 研究結果

MJD 155polyQ Tg マウスは約6ヶ月齢ころから進行性の運動障害を呈し、約10ヶ月齢頃には死亡する。少なくとも約7ヶ月齢には軽度ではあるが、明らかな運動障害を認めたため、この時期を発症早期とした。ゴルジ体の形態変化の経時的検討では、ゴルジ体のマーカーである抗 GM130 抗体による蛍光免疫染色で、10ヶ月齢だけでなく、6-7ヶ月齢の発症早期 Tg マウスの脊髄前角細胞においても、ゴルジ体の断片化を認めた。また、ゴルジ体の構造維持に関与する VCIP135 について、蛍光免疫染色により NTg マウスと比較して Tg マウス脊髄前角細胞で局在変化を認めた。さらにゴルジ体関連分子である p97/VCP, GS15, p115, p37 に関しても蛍光免疫染色およびウェスタンブロット解析により比較検討したが、これらの分子に関しては明らかな発現量の違いや局在変化は認めなかった。一方、ゴルジ関連タンパクである Grasp65 に関しては 10ヶ月齢脊髄前角細胞における局在が変化していることが示唆された。

### D. 研究発表

1. 論文発表なし

2. 学会発表

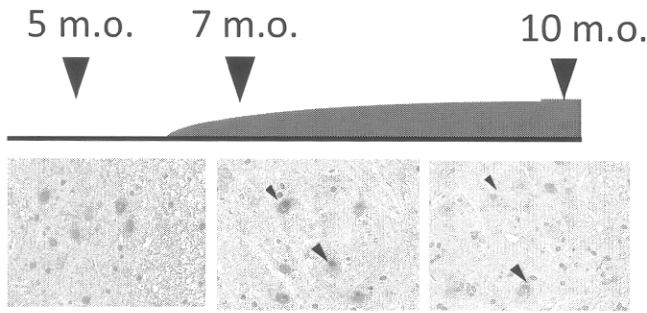
第 51 回日本神経学会総会

2010 Neuroscience meeting

E. 知的財産権の出願・登録状況           なし

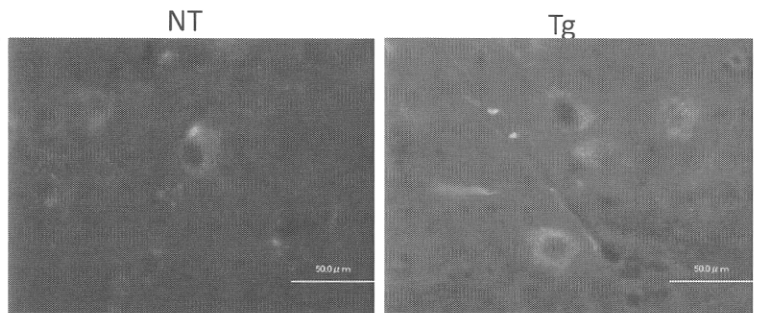
F. 健康危険状況           なし

MJD 155polyQ Tgマウスの臨床経過



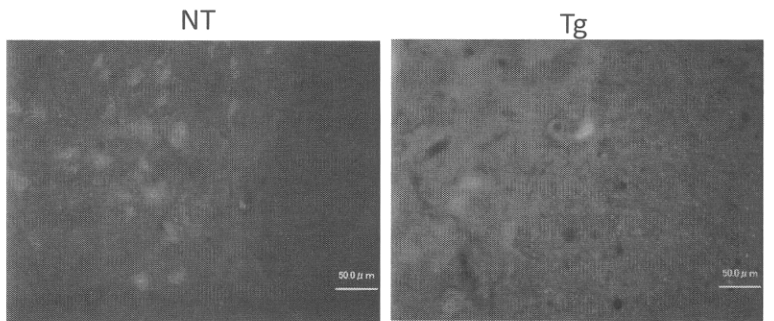
核内封入体は7ヶ月頃から認められる

蛍光免疫染色(脊髄、6-7ヶ月齢、抗GM130抗体)

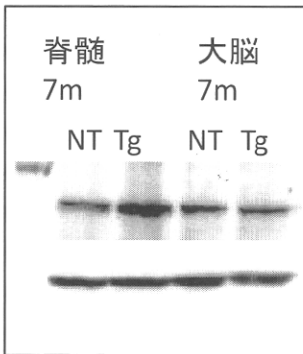


発症早期脊髄前角細胞に認められたゴルジ体の断片化

蛍光免疫染色(脊髄、7ヶ月齢、抗VCIP135抗体)

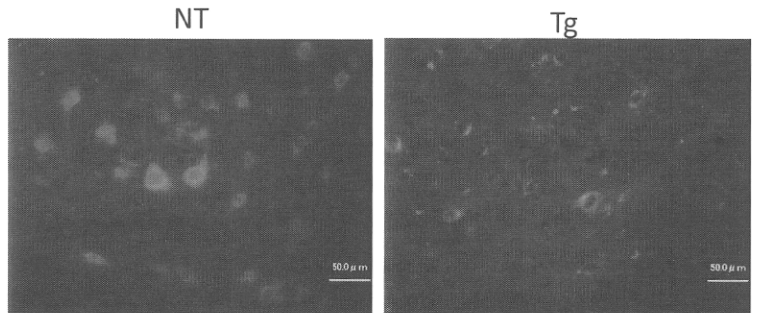


VCIP135は局在が変化

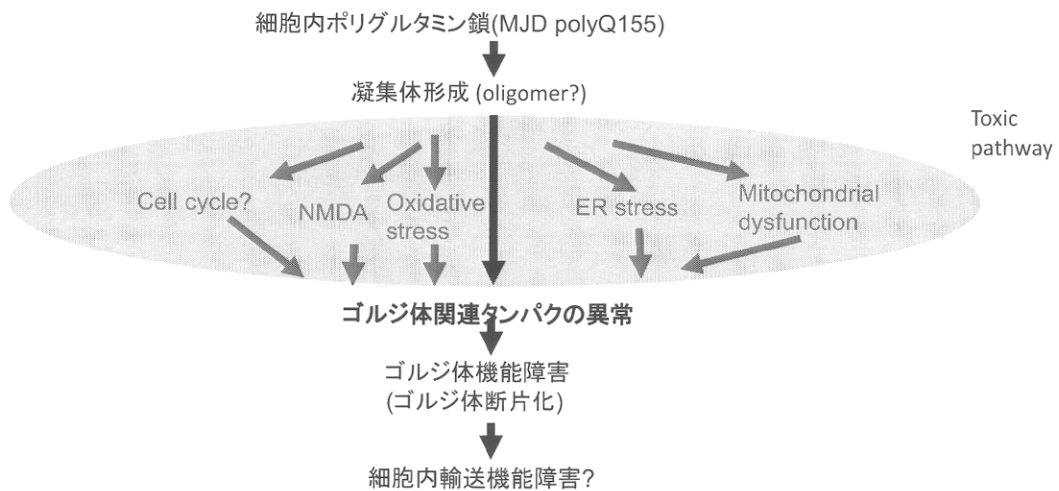


VCIP135は6-7ヶ月齢の脊髄で増加

蛍光免疫染色(脊髄、10ヶ月齢、抗Grasp65抗体)



Grasp65は局在が変化



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

SCA8 症例の臨床病理学的検討

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	横山照夫	国立病院機構相模原病院
	長谷川一子	国立病院機構相模原病院
	内原俊記	東京都神経科学総合研究所
	柳下三郎	神奈川リハビリテーションセンター

研究要旨

若年発症の spinocerebellar ataxia type 8 (SCA8) 剖検例について、臨床病理学的検討を行った。脳は高度の萎縮を呈し(脳重 400 g)、広範囲に高度の神経細胞脱落が認められた。特徴的な所見として、残存する神経細胞の胞体内に好塩基性の封入体が高頻度に認められた。この封入体は、免疫組織化学的に伸長ポリグルタミン、ユビキチン、TDP43 に陽性であり、超微形態学的には多量のリボソームから形成されていた。本症例の所見は、既報の SCA8 症例所見とは異なっており、SCA8 の病理学的多様性が示唆された。

A. 研究目的

ポリグルタミン病の中には non-coding region の expansions が RNA のスプライシングを阻害することにより細胞障害を惹起するものが認められている。SCA8 は non-coding region の CTA/CTG リピートの延長に伴い ataxin 8 のスプライシングが障害されることが報告されている。臨床的には成人発症の緩徐進行性の小脳失調が多く症例で報告されているが、錐体路徴候、錐体外路徴候、認知機能障害などの多彩な症状が報告され、その臨床像は一定ではない。また精神疾患患者の一部でも SCA8 遺伝子異常が報告されている。今回我々は SCA8 遺伝子異常を伴う若年発症例の臨床・病理学的検討をした。

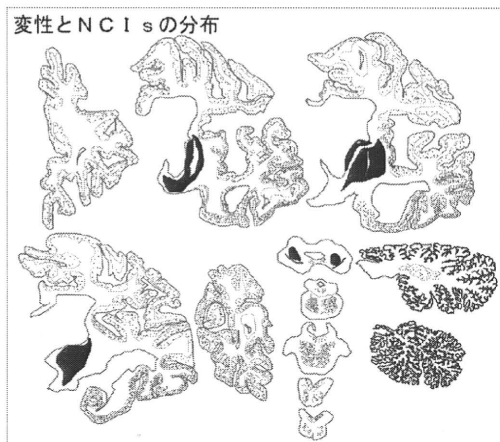
B. 臨床所見

32 歳男性。周産期・出生時に問題なし。乳幼児期に運動機能・知的発達障害にて発症。学童期に出現した小脳失調とてんかん発作が加わった。筋萎縮は進行し 15 歳時に呼吸筋障害にて人工呼吸器装着。その後、知的機能障害進行し 23 歳時に廃疾状態になった。32 歳時に胆嚢炎の合併にて死亡。神

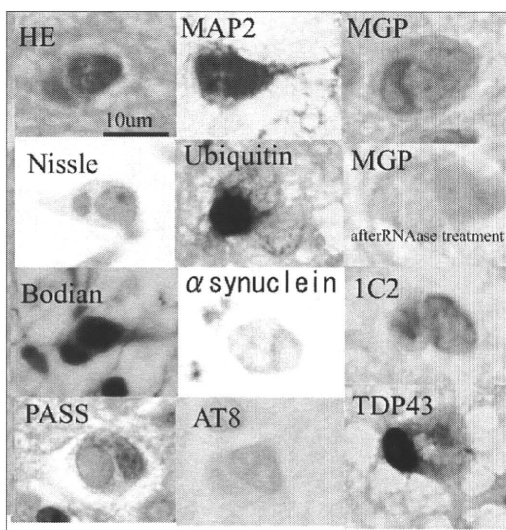
経学的には 11 歳時 IQ (田中・ビネー) 57、四肢筋萎縮、深部腱反射消失、体幹失調と構音障害を認めた。31 歳時には刺激に対して無反応、自発運動なし、脳幹反射消失、四肢・体幹の筋萎縮を認めた。電気生理学的検索で四肢の末梢神経伝導速度低下と全身の神経原性変化を認めた。経時的(19、23、32 歳時)に観察しえた頭部画像検査で小脳を含む全脳の進行性の萎縮が確認された。SCA8 遺伝子解析にて CTG リピート 127 への延長を認めた。

C. 病理所見

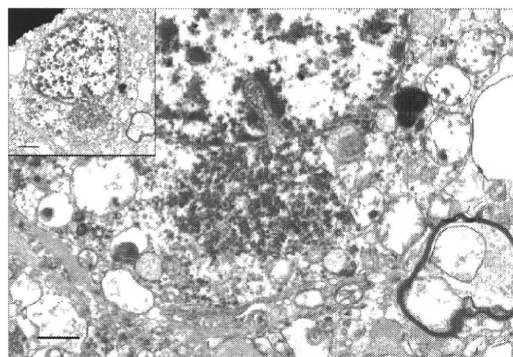
脳重 400 g。脳は高度に萎縮し、組織学的に全脳で著しい神経細胞の萎縮・消失を認め、高度のグリオシスを認めた。脳血流障害や無酸素脳症による変化は否定的であった。全脳で神経細胞質内封入体(NCIs)を認めた。NCIs は全脳に広く分布し、その頻度は残存神経細胞の 10%以上に認められた。但し視床・小脳・赤核・黒質は変性・萎縮が著しく、神経細胞がほとんど確認できなかった(図 1)。



NCI s は、HE、Nissl 染色では好塩基性に濃染していた。Methylgreen Pyronin 染色陽性とその RNAase 処理後の陰性所見より、封入体内の RNA の存在が確認された。ほとんどの封入体はユビキチンに陽性で、多くの封入体で TDP43 に陽性であった。また一部の封入体では伸長ポリグルタミンが陽性であった。αシヌクレイン・タウは陰性であった。核に隣接してユビキチン陽性 NCI s が存在している像が確認された。封入体を形成していない神経細胞でも核の周囲にもユビキチン陽性構造物が認められた。多くの封入体ではユビキチン・TDP43 が共存していた。一部の NCI s ではユビキチン・伸長ポリグルタミン双方に陽性像が認められた(図 2)。



電顕による検索では封入体は多量のリボソームにより形成されていることが確認された。神経細胞核から封入体にリボソームが直接に流入している像も確認されている(図 3)。



免疫電顕では、封入体を構成するリボソームはユビキチンに陽性であることが確認された。

rRNA の蓄積が本症と関連しているように観察され、異常な rRNA であるか否かの検討が今後必要と思われる。PolyQ と本症例の NCI との関連については今後の検討が待たれる。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ishiguro T, Ishikawa K, Takahashi M, et al. The carboxy-terminal fragment of alpha(1A) calcium channel preferentially aggregates in the cytoplasm of human spinocerebellar ataxia type 6 Purkinje cells. *Acta Neuropathol*, 119: 447-464, 2010

Shimizu H, Yamada M, Toyoshima Y, et al. Involvement of Onuf's nucleus in Machado-Joseph disease: a morphometric and immunohistochemical study. *Acta Neuropathol*, 120: 439-448, 2010

山田光則, 豊島靖子, 高橋 均. 家族性多系統萎縮症の神経病理. *神経内科*, 73: 356-362, 2010

##### 2. 学会発表

石山宮子, 柳下三郎, 横山照夫, 他. SCA8 と MSA の神経細胞質封入体の比較検討～免疫染色, 免疫電顕を含む透過型電顕像, 走査型電顕像について～. 第 51 回神経病理学会総会, 2010 年 4 月, 東京

#### E. 知的財産権の出願・登録状況 なし

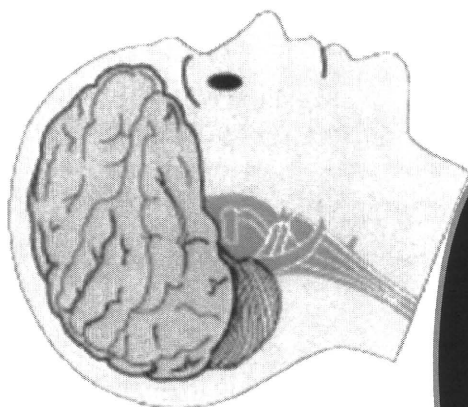
#### F. 健康危険情報 なし



# 脊髄小脳失調症 8 型

病気のしくみを明らかにする

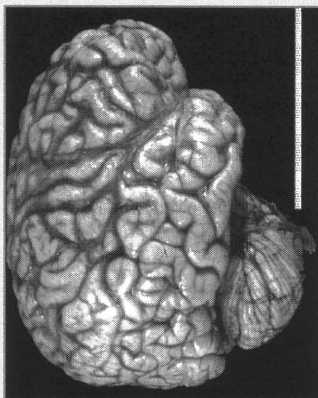
症例



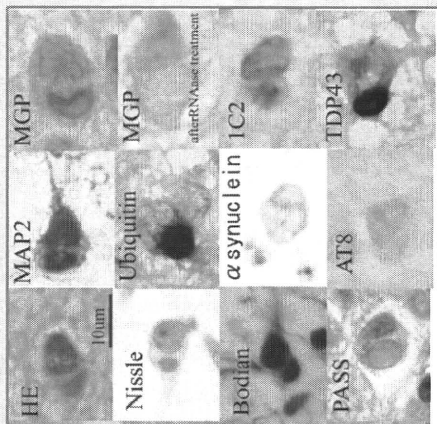
遺伝子診断

臨床症状の特徴

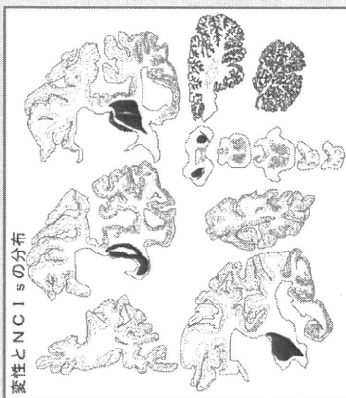
脳の変化を調べる



病理検査



病変の分布



異常構造の形成

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

脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)の頻度と残る「原因未同定」SCD の臨床像

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	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)
	佐藤 望	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)
	新美祐介	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)
	大林正人	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)
	高橋 真	東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)

研究要旨

昨年度我々は本研究班のご支援などを得て、第16番染色体長腕に連鎖する脊髄小脳変性症(SCD), すなわち「脊髄小脳失調症 31 型」(SCA31; OMIM # 117210)の原因として、連鎖ゲノム領域内に存在する挿入変異を見出すことが出来た(Sato N. & Amino T. et al. *Am J Hum Genet* 85 (5): 544-557, 2009). SCA31 は我が国に存在する「原因未同定遺伝性 SCD」の中では最も頻度が高い病型であると言われていたため、SCA31 の原因を同定した今日、残る「未同定 SCD」にどのような疾患が存在するかを明らかにすることは、重要である。本研究の目的は、当施設で集積した優性遺伝型 SCD の 100 家系について病型別疾患頻度を明らかにし、未同定 SCD の臨床像を明らかにすることである。今回の研究では、未同定型を暫定的に SCA1,2,MJD, SCA6, SCA31, DRPLA 以外の優性遺伝型病型と定義した。その結果、この暫定的未同定 SCD は全体の 14% を占めた。臨床的には「小脳症状」あるいは「小脳症状と錐体路徴候」にまとめられる家系が 75% と多かったが、多系統変性型と呼ぶべき家系も少数存在することが分かり、発症年齢も 30 代～70 歳代と幅が見られた。すなわち、「未同定 SCD」は優性遺伝型の家系に限っても多様であり、今後の集積が重要であると考えられた。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症(SCD)は、多数の疾患の総称であり、原因が同定された遺伝性疾患だけでなく、未だ原因不明なものも多数存在する。

脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)は、連鎖不平衡にある *puratrophin-1* 遺伝子変化の結果から、我が国に存在する「原因未同定遺伝性 SCD」の中では最も頻度の高い病型と言われていた。昨年度我々は SCA31 の原因が、互いに逆方向に転写される 2 つの遺伝子 BEAN と TK2

が共有するイントロンに、(TGGA)n などの 5 塩基繰り返し配列からなる挿入変異であることを発見した(*Am J Hum Genet* 85: 544-557, 2009)。したがって、「未同定遺伝性 SCD」の中から SCA31 を除くとどのような病型が存在するのかを明らかにすることが出来る。

本研究の目的は、SCA31 の頻度と臨床像、および現時点で当施設が有する「原因未同定 SCD」の臨床像を明らかにすることである。

## B. 研究方法

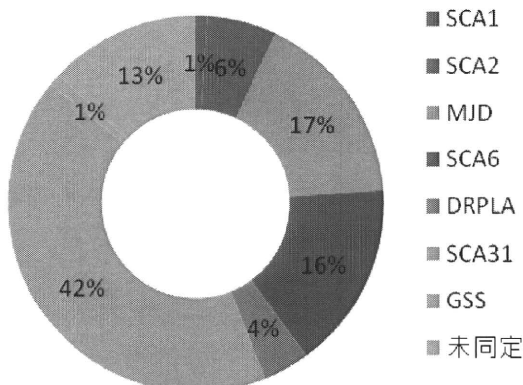
2008年1月～2010年6月までに集積した優性遺伝型脊髄小脳変性症(SCA)患者の100家系。明らかな家族歴がない患者や、同胞間発症のみの患者は除いた。分子遺伝学的にはSCA1, SCA2, Machado-Joseph病, SCA6, SCA31, DRPLAについて、それぞれのリピート伸長変異をPCR法で検索し、SCA31についてはGGAA05, puratrophin-1遺伝子C/T置換も併せて解析した。また、同意を得られた方にはプリオン遺伝子も検索した。何れにも該当しないものを本研究では暫定的に「未同定型」とし、別途臨床像に見合った疾患の変異を検索する方針とした。

### (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

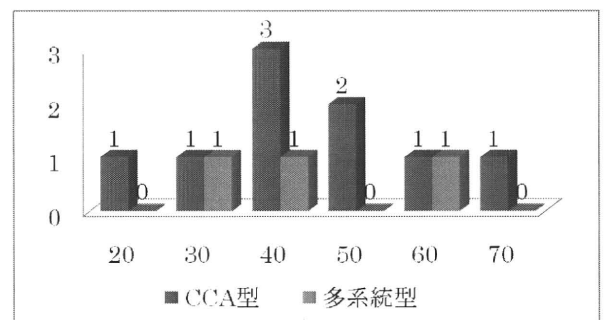
100家系の内、42家系がSCA31(42%)で、17%がMachado-Joseph病, 16%がSCA6であった。その他は、SCA1が1%, SCA2が6%, DRPLA4%, GSSが1%であった。これらのいずれでもない「暫定的未同定型」は13%であった(下図)。



SCA31について挿入長と発症年齢を検討した結果、既報と同様に両者間に負の相関関

係( $r = -0.38, p = 0.0044 (n = 56)$ )が示された。

次に、暫定的未同定家系の臨床的解析では、「小脳症状のみ」または「小脳症状+錐体路徴候型」が75%を占めた。残る25%の家系は、脳幹部の萎縮を認める等の「多系統変性型」であった。発症年齢でこの2群が区別できるかを検討したが、次図の様に発症年齢は34歳から76歳とばらつき、群間でもさまざまであったため区別できないことが判明した。



以上のことから、暫定的ではあるものの、「遺伝子未同定」は、臨床的に不均一であることが判明した。だった。

今回の研究で、まず我々はSCA31では、挿入変異の病的意義を追認した。すでに我々の報告以降、国内でもSCA31の挿入変異とその意義を追認した誌上報告がなされたことも併せて、SCA31の挿入変異が病的意義を持つことがほぼ間違いないと考えられる。

SCA31の同定後残った「未同定遺伝性SCD」については、今回の研究で明らかになった様に、SCA全体での頻度は15%程度であろうと結論できる。しかし、臨床的には不均一であり、ここの病型ごとでは、頻度はさらに低下する。今後、「小脳型」はSCA15などの解析を、「多系統変性型」はさらに集積をしてゆく。中規模の家系も少数存在し、遺伝子探索が可能かを検討する必要がある。

一方、近年の遺伝子探索技術はさらに発展しており、従来に比べてより少数の家系の規模でも原因の同定が容易になりつつある。このことから、臨床的解析と家系の集積を充分に行い、将来の原因探索に備える必要があると改

めて感じられた。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ishikawa K, Mizusawa H. The chromosome 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (16q-ADCA\*): A newly identified degenerative ataxia in Japan showing peculiar morphological changes of the Purkinje cell. *Neuropathology* Jul 27. Epub, 2010.
2. Tsunemi T, Ishikawa K, Tsukui T, Sumi T, Kitamura K, Mizusawa H. The effect of 3, 4-diaminopyridine on the patients with hereditary pure cerebellar ataxia. *J Neurol Sci* 2010; 292(1-2): 81-4.
3. Ishiguro T, Ishikawa K (Corresponding Author), 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 alpha1A calcium channel preferentially aggregates in the cytoplasm of human spinocerebellar ataxia type 6 Purkinje cells. *Acta Neuropathol* 2010;119(4):447-64. 10.1007/s00401-009-0630-0

##### 2. 学会発表

Ishikawa K, Sato N, Amino T, Kobayashi K,

Asakawa S, Ishiguro T, Takahashi M, Matsuura T, Tsunemi T, Flanigan KM, Iwasaki S, Ishino F, Saito Y, Murayama S, Yoshida M, Hashizume Y, Takahashi Y, Tsuji S, Shimizu N, Toda T, Mizusawa H. Spinocerebellar ataxia type 31 common in Japan is caused by a founder insertion consists of penta-nucleotide repeats containing (TGGAA)<sub>n</sub>. The American Society of Human Genetics, 60<sup>th</sup> Annual Meeting. 米国, ワシントンDC, 2010年11月3日

Niimi Y, Ishikawa K, Sato N, Mizusawa H. Modeling SCA31 non-coding pentanucleotide expression in cultured cells. The American Society of Human Genetics, 60<sup>th</sup> Annual Meeting. 米国, ワシントンDC, 2010年11月5日

Sato N, Niimi Y, Amino T, Ishiguro T, Takahashi M, Ishikawa K, Mizusawa H. Pathogenic significance of the complex penta-nucleotide repeat insertion containing (TGGAA)<sub>n</sub> in spinocerebellar ataxia type 31. The American Society of Human Genetics, 60<sup>th</sup> Annual Meeting. 米国, ワシントンDC, 2010年11月5日

Ishikawa K, Sato N, Niimi Y, Amino T, Yoshida M, Hashizume Y, Saito Y, Murayama S, Mizusawa H. SCA31: A new SCA identified in Japan showing peculiar pathology of Purkinje cells. The 17<sup>th</sup> International Congress of Neuropathology (ICN2010). Salzburg, Austria, Sept. 13, 2010.

Ishiguro T, Ishikawa K, Takahashi M, Obayashi M, Brookes R, Sakamoto M, Fujigasaki H, Arai T, Sasaki H, Nagashima K, Kato T, Yamada M, Takahashi H, Hashizume Y, Mizusawa H. The carboxy-terminal fragment of alpha1A-calcium channel behavior underlies SCA6 neurodegeneration. The 17<sup>th</sup> International Congress of Neuropathology (ICN2010). Salzburg, Austria, Sept. 11-15, 2010.

Sato N, Amino T, Ishikawa K, Asakawa S, Ishiguro T, Takahashi M, Shimizu N, Tsuji S, Kobayashi K, Toda T, Mizusawa H. A non-coding penta-nucleotide repeat insertion containing (TGGAA)<sub>n</sub> is associated with spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31). The

62<sup>nd</sup> American Academy of Neurology Annual Meeting. カナダ, トロント, 2010 年 4 月 13 日

Ishikawa K, Niimi Y, Sato N, Amino T, Matsuo H, Ishiguro T, Takahashi M, Obayashi M, Mizusawa H. Spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) is a common late-onset purely cerebellar ataxia. The 62<sup>nd</sup> American Academy of Neurology Annual Meeting. カナダ, トロント, 2010 年 4 月 14 日

佐藤望, 石川欽也, 網野猛志, 新美祐介, 石黒太郎, 高橋真, 水澤英洋. 脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)の発症機序についての検討～RNA 機能獲得の立場から. 第 51 回日本神経学会総会. 東京. 2010 年 5 月 20 日

大林正人, Rachel Brookes, 高橋真, 石黒太郎, 新美祐介, 石川欽也, 水澤英洋. 脊髄小脳変性症 6 型におけるプルキンエ細胞内凝集体に非筋細胞ミオシン II B が含まれる. 第 51 回日本神経学会総会. 東京. 2010 年 5 月 22 日

新美祐介, 高橋真, 大林正人, 佐藤望, 網野猛志, 石黒太郎, 石川欽也, 水澤英洋. SCA31 の細胞モデルの確立. 第 51 回日本神経学会総会. 東京. 2010 年 5 月 22 日

**E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)**

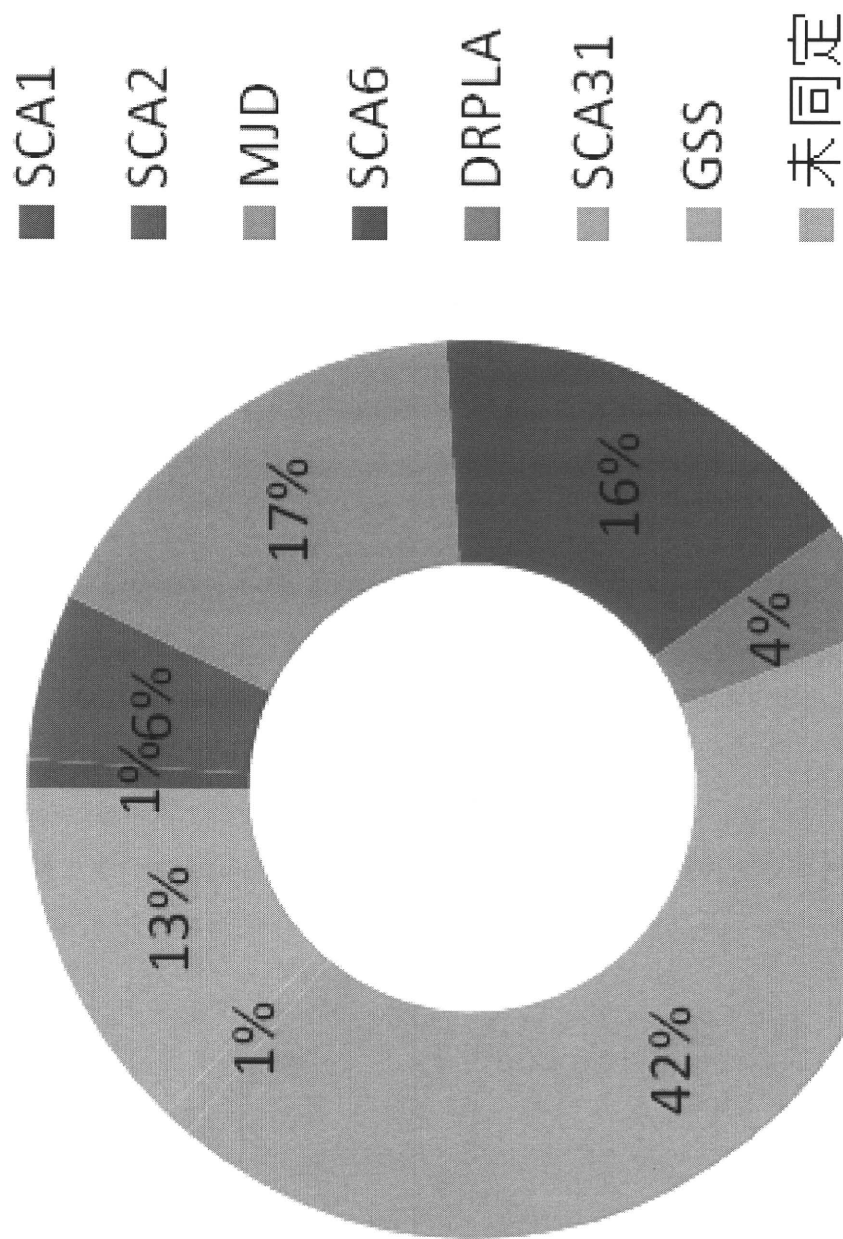
なし

**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、  
残る「未同定」SCDの臨床像を明らかにした。



東京医科歯科大学での優性遺伝型脊髄小脳変性症100家系での頻度



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

南九州地域の常染色体優性脊髄小脳変性症の分子疫学、病態および新規疾患の確立に関する研究

分担研究者	高嶋 博	鹿児島大学大学院 神経病学講座
研究協力者	岡本裕嗣	鹿児島大学大学院 神経病学講座
	西郷隆二	鹿児島大学大学院 神経病学講座
	崎山祐介	鹿児島大学大学院 神経病学講座
	平野隆城	藤元早鈴病院 神経内科
	大窪隆一	鹿児島大学大学院 神経病学講座
	要 匡	琉球大学医学部 医科遺伝学分野

研究要旨

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 167 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た。特に鹿児島においては Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS) が 18%と高率で小脳失調症の鑑別として重要である。GSS は通常下肢の運動失調、下肢反射低下、下肢のしびれで発症するが、痙性対麻痺型や認知症で発症する型も存在する。SCA31 の (TGGA)<sub>n</sub> を含む penta-nucleotide repeats 挿入は、南九州症例についても約 2.5-3.1kbp の挿入を認めた。宮崎県の南部地域に小脳失調、パーキンソンズム、自律神経障害、軽度の認知障害を伴う優性遺伝性の MSA 様の変性疾患の家系を認めた。

A. 研究目的

南九州地域(鹿児島、宮崎、大分、沖縄)における遺伝性の小脳失調を呈する症例において、トリプレットリピート病に加え、GSS や SCA31(16q-ADCA type III)を含めた、詳細な遺伝子診断を行い、その結果に基づいた疫学調査をおこなう。また、それぞれの南九州地域の様々な優性遺伝性の小脳失調症について、臨床的遺伝学的に解析を行い、地域の未同定および疾患概念さえ確立されていない新しい疾患について検討を進める。

B. 研究方法

優性遺伝性小脳失調症 167 家系について、SCA1,

SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA8, SCA12, DRPLA, SCA31 遺伝子のリピートの延長を PCR 法で調べた。また、GSS (P102L) はシーケンス解析をおこなった。また、遺伝子異常が見つけれない優性遺伝性の新しい小脳失調症について、臨床的に検討し、疾患概念を確立する。

(倫理面への配慮)

これらの実験に使用する DNA 検体の使用については、鹿児島大学のヒトゲノム使用に関する倫理委員会で承認され、患者または家族全員から文書で遺伝子検査に関する同意書を得ている。



### C. 研究結果

地域別にみると、鹿児島県においては SCA31 が最も多く、次いで GSS, SCA6, SCA3 (MJD) がほぼ同率であった。その他 DRPLA や SCA8 の症例を認めた。GSS の多さは、他地域において類をみないほどである。GSS にも失調でなく、認知症で始まる例、痙性対麻痺を示す例を認め、大きなバリエーションがみられた。沖縄県では、DRPLA と SCA2 の重症型の小脳失調症が多い。宮崎県では SCA31, SCA6, SCA3 が多く、大分県では SCA6, SCA3, SCA31 の順で、軽症の小脳失調症の頻度が高い。

Purtrophin 変異 陽性の 16q-ADCA type III 症例について、南九州地域においても、2.5-3.1K のリピートの挿入変異を確認した。リピートの長さや発症年齢や病状には相関はなかった。優性遺伝性小脳失調症の 1 家系で 16q-ADCA に多くみられる SNPs を持つものの 2.5-3K のリピートの挿入変異を持たない家系を認めた。本家系が SCA31 かどうかは不明である。宮崎県の南部地域に小脳失調、パーキンソニズム、軽度の認知障害を伴う優性遺伝性の変性疾患の家系を認めた。臨床的に MSA にやや近い臨床像であった。

南九州地域の優性遺伝性小脳失調症は、病型に地域によって明らかな差が存在する。特に沖縄地域には、本邦に多い SCA31 を全く認めないこと、逆に沖縄県に多い SCA2 が九州本島にみられないことが興味深い。GSS については、鹿児島県に本邦報告例の半数以上が集積しており、その特徴をこれまでに明らかにしてきた。

宮崎県南部の新しい小脳失調症については、これまでの疾患と合致せず、新しい疾患である可能性がある。今後さらなる調査を行う予定である。

### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

- Walton C, Interthal H, Hirano R, Salih MA, Takashima H, Boerkoel CF. Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. Adv Exp Med Biol. 2010;685:75-83. Review.

- 高嶋 博、荒田 仁、納 光弘、有村公良 Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群の臨床像と早期診断 老年期認知症研究会誌 16:2010 年 11 月

- 高嶋 博 地域の脊髄小脳変性症への取り組み-ローカルな問題を解明し、世界へ向けて発信- 全国脊髄小脳変性症・多系統委縮症 友の会ニュース 185: 2010 年 10 月

#### 2. 学会発表

- 吉村 道由, 中村 友紀, 高嶋 博, 有村 由美子, 有村 公良 Gerstman-Sträussler-Scheinker 病における電気生理学的所見の検討; 第 39 回日本臨床神経生理学学会学術大会 2009. 11. 北九州

- 吉村道由、荒田 仁、大窪隆一、有村公良、高嶋 博 Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群における臨床像と画像所見 (SPECT, PET) の検討; 第 51 回日本神経学会総会 2010. 5. 東京

- 高口 剛、樋口雄二郎、渡邊 修、高嶋 博 痙性対麻痺が先行し急速進行性の経過を辿った P102L 型 Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群 (GSS) の一例; 第 191 回日本神経学会九州地方会 2010. 9. 佐賀

### E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

特になし

### F. 健康危険情報

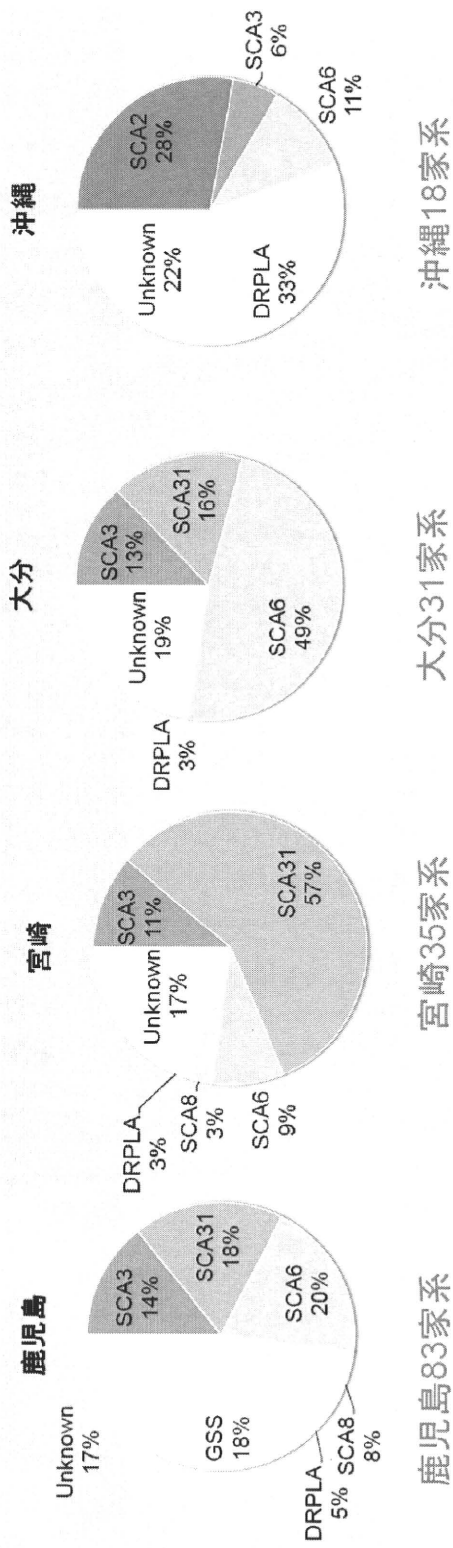
特になし

## 南九州地域の常染色体優性脊髄小脳変性症の分子疫学、病態および新規疾患の確立に関する研究

班員 高嶋 博 鹿児島大学大学院神経病学講座

【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167家系について、病態および疫学的検討をおこなう。特に全国に多発する脊髄小脳変性症SCA31，小脳失調を呈するプリオン病であるGSS、地域の新しい小脳失調症などに注目した。

【結果】南九州地域ではSCA31が最も多い病型で、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。



地域別にみると、鹿児島県においてはSCA31が最も多い。GSSは、他地域において類をみないほどである。GSSは失調だけでなく、認知症で始まる例、痙性対麻痺を示す場合がある。

小脳失調、パーキンソンズム、自律神経障害を伴う優性遺伝性を示すMSA様の家系があり、その研究は今後の小脳失調症の発展につながるであろう。

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

脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) 患者の末梢血白血球を用いた網羅的遺伝子発現解析

分担研究者	吉田邦広	信州大学神経難病学講座分子遺伝学部門
研究協力者	宮崎大吾	信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科
	日根野晃代	信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科
	涌井敬子	信州大学遺伝学・予防医学
	小柳清光	信州大学神経難病学講座分子病理学部門
	堺 温哉	横浜市立大学環境分子医科学 (遺伝学)
	松本直通	横浜市立大学環境分子医科学 (遺伝学)
	池田修一	信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科

研究要旨

新たに見出された脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) の挿入変異が遺伝子発現に及ぼす効果を見るため末梢血白血球を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。

A. 研究目的

2009 年に Sato らにより、SCA31 の遺伝子変異が両方向性に転写される *BEAN*、*TK2* のイントロン内の挿入変異であること、挿入配列内に含まれる(TGGAA)<sub>n</sub> が疾患特異的であることが報告された (Sato N, et al. *Am J Hum Genet* 85: 1-14, 2009)。我々も 71 家系 94 名の SCA31 患者で追試したが、*puratrophin-1* 遺伝子の C/T 置換を有さない 2 名を含めて、例外なく当該挿入変異が見られた (Sakai H, et al. *Neurogenetics* 11: 409-415, 2010)。

一方、SCA31 の発症機序に関しては、依然として不明な点が多い。SCA31 の遺伝子変異は非コード領域であるイントロン内の挿入変異であるため、特定の蛋白の構造異常をきたすものではないと考えられる。その発症機序として、異常な挿入配列を含む前駆体 mRNA によ

る RNA 結合蛋白の捕捉、あるいは異常な挿入配列による染色体の構造変化を介して、他の遺伝子の発現変化 (発現抑制、スプライシング異常など) をきたす可能性が考えられる。そこで SCA31 の病態に関与する介在分子を探索することを目的に SCA31 患者における遺伝子発現の変化を網羅的に検討した。

B. 研究方法

SCA31 患者 3 名、および健常対照者 3 名 (いずれも男性、年齢は 65-73 歳) の末梢血白血球から全 RNA を抽出し、Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent 社) を用いて遺伝子発現を比較検討した。有意な差異がありそうな候補遺伝子については、対象者を増やして (SCA31 患者、健常対照者それぞれ 10 名、11 名)、SYBR®Green Reagents を用いた real-time

PCR 法により個別に発現解析を行った。さらに末梢血白血球から抽出した蛋白を用いて、western blot 法により蛋白の半定量的検討を行った。また SCA31 患者、および健常対照者それぞれ 5 名の培養リンパ球からヒストン蛋白を抽出し、EpiQuik™ Global Acetyl Histone H3-K9 Quantification Kit を用いてヒストン H3-K9 のアセチル化を検討した。

### C. 研究結果と考察

Microarray による解析対象 probe 数は 41,078、このうち健常対照群に比べて患者群で 2 倍以上、あるいは 1/2 以下の発現を示した probe 数はそれぞれ 439、884 であった。Microarray では挿入変異が存在する 16q22.1 にマップされる probe 数は GeneBank Accession 番号のあるものだけで puratrophin-1 遺伝子を含めて 136 あったが この中で対照群に比較して、患者群で 2 倍以上、あるいは 1/2 以下の遺伝子は見られなかった。挿入変異が存在する *BEAN*、*TK2* についても両群間で発現に有意差はなかった。これまでに患者群で発現が 2 倍以上、あるいは 1/2 以下に変化している候補遺伝子の中から、脳での発現が確認され、かつ機能的に RNA 結合、転写、スプライシングに関連する約 25 の遺伝子を抽出し個別に解析したが、両群間で発現に有意差を示すものはなかった。挿入配列の (TGGAA)<sub>n</sub> と結合するとされる serine/arginine-rich splicing factor 1 (SFRS1)、および SFRS9 遺伝子にも患者群で明らかな発現の増減はなかった。

上記の結果は、SCA31 の病態機序に関しては、Friedreich 失調症に見られるような gene silencing 機序は否定的であることを示唆する。

Sato らは異常な前駆体 mRNA がプルキンエ細胞の核内で RNA foci を形成することを報告しており、RNA toxic gain-of-function 機序を支持する有力な根拠となっている。これは筋強直性ジストロフィー (DM1) と同様の機序であるが、DM1 が多臓器障害をきたすのに対して、SCA31 の細胞傷害はほぼ小脳に局限している点が大きく異なる。今後、SCA31 の病態理解を進めるには特異な挿入変異と小脳変性をつなぐ介在分子の探索・解明が不可欠ではないかと考える。

### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Sakai H, Yoshida K, Shimizu Y, et al. Analysis of an insertion mutation in a cohort of 94 patients with spinocerebellar ataxia type 31 from Nagano, Japan. *Neurogenetics* 11: 409-415. 2010.

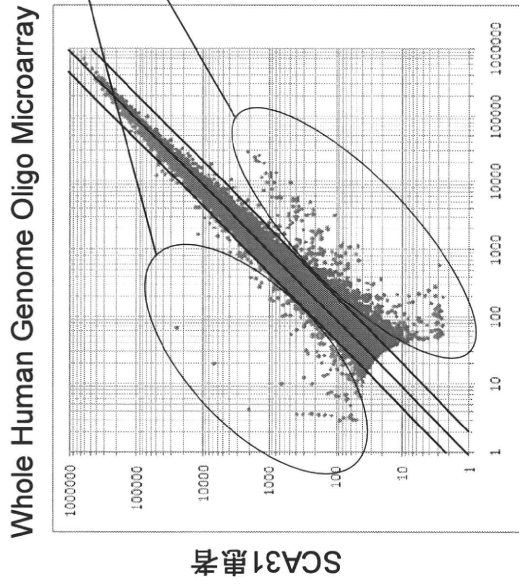
#### 2. 学会発表

- 1) 吉田邦広, 池田修一, 堺温哉, ら. 脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) の挿入変異の解析. 第 51 回日本神経学会総会. 2010.5.21. 東京.
- 2) 堺温哉, 吉田邦広, 池田修一, ら. 長野県における優性遺伝性脊髄小脳失調症 31 型患者における (TGGAA)<sub>n</sub> リピート挿入解析. 日本人類遺伝学会第 55 回大会. 2010. 10. 28. 大宮.

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

# SCA31患者末梢白血球を用いた遺伝子発現解析



患者群で2倍以上、あるいは1/2以下の遺伝子を抽出



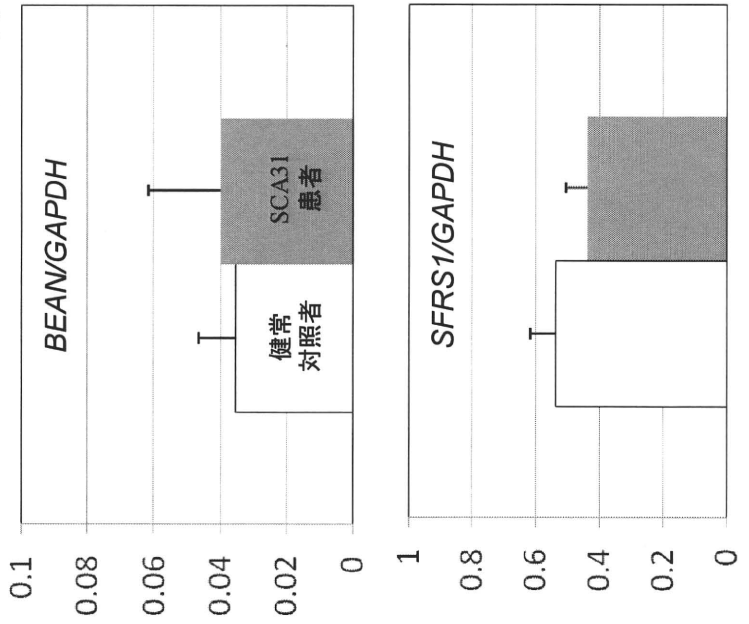
- 脳での発現が見られる
- 機能的にRNA結合、転写、スプライシングなどに関する
- SYBR®Green reagentsを用いたreal-time PCR法にて検出できる程度の発現がある



SYBR®Green reagentsを用いたreal-time PCR法

健常対照者

Real-time PCR法による個別の遺伝子発現解析(下図、mean + SEを表示した)



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

Target capture と大規模塩基配列解析による  
posterior column ataxia with retinitis pigmentosa の原因遺伝子探索

<b>分担研究者 研究協力者</b>	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
	石浦 浩之	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科
	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
	三井 純	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科
	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
	Budrul Ahsan	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
	市川 弥生子	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科
	伊達 英俊	東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科
	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
	酒井 徹雄	姫野病院神経内科

**研究要旨**

Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa (PCARP)は稀な変性疾患で、若年発症の網膜色素変性症と後索失調症を主症状とする。現在まで2家系の報告がなされ、常染色体劣性遺伝を呈し、原因遺伝子座が1q32に同定されているが、原因遺伝子は不明であった。今回、本邦からPCARP症例を見出し、連鎖解析を行ったところ、既知のPCARP遺伝子座への連鎖が示された。本領域について、target capture技術と、次世代シーケンサーによる大規模塩基配列解析を行うことでFLVCR1遺伝子に新規アミノ酸置換p.G493Rを認めた。最近になり、オリジナルのPCARP家系でもFLVCR1遺伝子変異が存在することが示され、FLVCR1がPCARPの原因遺伝子であることを示すことができた。

**A. 研究目的**

Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa (PCARP)は稀な変性疾患で、若年発症の網膜色素変性症と後索失調症を主症状とする。現在まで2家系の報告がなされ、常染色体劣性遺伝を呈し、原因遺伝子座が1q32に同定されているが、原因遺伝子は不明であった(Higgins et al., 1999, Higgins et al., 2000)。

今回、本邦から新規PCARP家系を見出したため、原因遺伝子を同定するための研究を行った。

対象は、若年発症の網膜色素変性症と後索失調症を呈し、臨床的にPCARPと診断された兄妹例。両親はいとこ婚であった。両親、発症者の兄妹、また非発症者の同胞1名の計5名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。

**B. 研究方法**

**C. 研究結果および考察**

連鎖解析を行うために、Affymetrix 社の GeneChip 100K set で genotyping を行った。その後、SNP-HiTLink (Fukuda et al., 2009) と Allegro version 2 (Gudbjartsson et al., 2005) を用いて常染色体劣性遺伝モデルでパラメトリック多点連鎖解析を施行したところ、第 1 染色体と第 20 染色体に最大 LOD スコア 1.93 となる領域を認めた。第 1 染色体の領域については、既知の PCARP 遺伝子座とのオーバーラップが認められた。

しかしながら、候補領域については合計 30Mb に達し、領域内の全ての遺伝子を従来の方法で塩基配列解析することは困難と考えられた。そのため、NimbleGen 2.1M capture array を用いて LOD スコアの高い領域について target capture を行い、Illumina GAIIX 2 レーンを用いて大規模塩基配列解析を行った。結果、3.4Gb のマップ可能なリードを得ることができた。短鎖長リードについては BWA (Li et al., 2009) を用いて参照配列 hg18 にアラインメントを行い、SAMtools (Li et al., 2009) で basecall を行った。Variant についてはアノテーションを行ったところ、新規非同義置換として合計 3 つ認めた。3 つのうち、既知の PCARP 領域内にも存在するものは一つのみで、FLVCR1 c.1477G>C (p.G493R) であった。これは家系内で共分離を認めた。G493 は膜貫通部位内の保存されたアミノ酸であり、コントロール 192 染色体には同塩基置換は認めなかった。以上より、同塩基置換は PCARP の原因であると考えられた。

## D. 結論

本研究と独立に、オリジナルの PCARP 2 家系と、新規 1 家系において *FLVCR1* 遺伝子変異を認めたとの報告がなされ (Rajadhyaksha et al., 2010)、本研究とともに、*FLVCR1* 変異が PCARP を引き起こすことが確認された。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Ishiura H, Fukuda Y, Mitsui J, Nakahara Y, Ahsan B, Takahashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Sakai T, Tsuji S. Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in FLVCR1. *Neurogenetics*, in press.

### 2. 学会発表

なし

### 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

多系統萎縮症における分子バイオマーカーの検討

分担研究者	佐々木 秀直	北海道大学大学院医学研究科神経内科分野
研究協力者	浜 結香、佐藤和則、矢部一郎	北海道大学大学院医学研究科神経内科分野
	那波 宏之	新潟大学脳研究所 分子神経生物学分野
	林 克之	DNA チップ研究所
	内海 潤	京都大学大学院薬学研究科最先端創薬研究センター

研究要旨

多系統萎縮症(MSA)の分子バイオマーカーを探索する目的で、患者と健常者の白血球をもとにマイクロアレイによる mRNA の網羅的発現解析を行った。患者群で有意に発現亢進していた mRNA に Neuregulin-1 (NRG1)があり、今回、その血中濃度をサンドイッチ ELISA により、MSA、健常対照者、パーキンソン病患者の三群間で比較検討したが、有意差を示さなかった。

A. 研究目的

MSA の分子バイオマーカーは現時点では知られていない。新規候補を探索するために、末梢白血球を用いて、マイクロアレイにより mRNA の網羅的発現解析を行った。

B. 研究方法

発現解析の対象は MSA 患者 3 名、健常者 3 名、片方のみ罹患している“discordant”一卵性双生児 1 組、計患者 4 名と健常者 4 名である。全員、成人男性とした。末梢血より leukoLock®(Ambion)を用いて白血球を分離し、発現解析用マイクロアレイ Whole Human Genome 4x44K (Agilent)を用いて、mRNA の網羅的発現解析を行った。発現統計解析には GeneSpring GX、Network 解析には GeneGo 社 MetaCore (ver. 6.5) を用いた。血清中の NRG1 は、サンドイッチ ELISA 法にて測定した。NRG1 血中濃度には性差があるので、今回の対象は成人男性のみとし、コントロール 14 名、MSA 患者 15 名、パーキンソン病患者 21 名である。

(倫理面への配慮)

研究は医の倫理委員会承認を得て行った。血液提供者には、事前に研究の主旨を説明して文

書で同意を得て採血した。

C. 研究結果

マイクロアレイ mRNA 発現測定において、健常者に比べて 1.5 倍の変動している Up Gene は非血縁群 49、双子間 1277、Down Gene は非血縁群 46、双子間 1340 であった。また、双子と非血縁者間で同じ動態をとるものは 5 であった。双子と非血縁者間で共通した動態をとるものに NRG1 があり、患者 vs 健常者で  $p < 0.05$  (t-test)、発現量では 1.5 以上と、NRG1 mRNA の明らかな発現亢進が検出された。しかし、NRG1 血中濃度では、control vs. MSA で  $p = 0.38$ , control vs. PD で  $p = 0.19$  (t-test)に留まり、共に有意差は認められなかった。Network 解析では、非血縁群(患者と健常者)では 34 Up Gene と 32 Down Gene、双子間(患者と非患者)では対数比の差が 1.5 以上である遺伝子の 28 Up Gene と 35 Down Gene で調べた。その結果から Up Gene は細胞増殖と細胞接着に関与すること、Down Gene はサイトカイン/ケモカインに関与することが推察された。

中枢神経系に発現している NRG1 は、N 末端構造により Type I-III の variant があり、可溶性シグナル蛋白が Type I と II、細胞膜表面発現シグナル蛋白は Type III とされている。今回の研究において、マイクロ

アレイのプローブが NRG1 のコアドメインである EGF-like ドメインを認識しているため、Type I, II, III の全てを認識していると考えられる。一方、NRG1 定量に使用した ELISA キットの抗体は、IgG ドメインを認識するので Type I, II の測定となっている。今回の ELISA 測定系では、Type III を測定できなかった。この Type III NRG1 は、ミエリン形成細胞の分化を促進するとされている。MSA が oligopathy であること考慮すると、Type III が産生亢進している可能性が残る。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Tha KK, Terae S, Yabe I, Miyamoto T, Soma H, Zaito Y, Fujima N, Kudo K, Sasaki H, Shirato H: Microstructural white matter abnormalities of multiple system atrophy: in vivo topographic illustration by using diffusion-tensor MR imaging. *Radiology* 2010;255:563-569

2) Sato K, Yabe I, Fukuda Y, Soma H, Nakahara Y, Tsuji S, Sasaki H: Mapping of autosomal dominant cerebellar ataxia without the pathogenic *PPP2R2B* mutation to the locus for spinocerebellar ataxia 12. *Arch Neurol* 2010;67: 1257-1262

3) Yabe I, Tha KK, Yokota T, Sato K, Soma H, Takei A, Terae S, Okita K, Sasaki H: Estimation of skeletal muscle energy metabolism in Machado-Joseph disease using <sup>31</sup>P-MR spectroscopy. *Mov Disord* 2010 (in press)

4) 佐々木秀直: I 症候編 5. 四肢・関節系の症候-運動失調、In: 今日の診断指針第 6 版, 総編集: 金澤一郎, 永井良三, 医学書院, p244-246, 2010

5) 佐々木秀直: 多系統萎縮症(MSA)の対処療法 - 診断・治療・療養の現状及び原因解明への取り組み. *難病と在宅ケア* 2010; 16:7-10

##### 2. 学会発表

1) 矢部一郎, 佐藤和則, 相馬広幸, Tha Khin Khin, 寺江 聡, 沖田孝一, 佐々木秀直: ポリグルタミン病の筋エネルギー代謝. 第 51 回日本神経学会総会, 2010 年 5 月 20 日~22 日, 東京国際フォーラム.

2) 相馬広幸, 佐藤和則, 矢部一郎, 佐々木秀直: MSA 疾患感受性候補遺伝子の関連解析. 第 51 回日本神経学会総会, 2010 年 5 月 20 日~22 日, 東京国際フォーラム.

3) 佐藤和則, 矢部一郎, 相馬広幸, 佐々木秀直, 福

田陽子, 三井 純, 中原康雄, 辻 省次: SCA12 遺伝子座に連鎖しているが PPP2R2B の変異を認めない ADCA の 1 家系. 第 51 回日本神経学会総会, 2010 年 5 月 20 日~22 日, 東京国際フォーラム.

#### E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

該当無し

#### F. 健康危険情報

該当無し