

る同意を得た。

### C. 研究結果

#### 1. 生着

12 例で生着が得られたが、拒絶方向が 3 抗原不一致の父親からの移植例で拒絶された。生着例における造血能の回復では、好中球が 500/ $\mu$ L、血小板が 2 万/ $\mu$ L を超えたのはそれぞれ中央値で 17 日(範囲 11~34 日)、22 日(14~53 日)であった。生着の確認は骨髓あるいは末梢血の short-tandem repeat (STR) 法で行い、早期死亡の 1 例は+60 日の骨髓で 96.2%ドナータイプ、他の 11 例は少なくとも一度は 100%ドナータイプとなった。

#### 2. 移植後合併症

急性 GVHD は評価可能な 12 例中 5 例に認め、grade I が 4 例、grade II が 1 例であった。慢性 GVHD は評価可能な 2 例に認め、限局型が 1 例、広汎型が 1 例であった。grade II の急性 GVHD を発症した例と広汎型慢性 GVHD を発症した例は同一症例で、HLA 一致同胞間移植であったにもかかわらず、GVHD が重症化した。

起炎菌が同定された敗血症は 6 例に認め、いずれも抗生剤の投与で軽快した。重症ウイルス感染は 2 例に認め、1 例は EB ウイルスによる移植後リンパ増殖症(EBV-LPD)であったが、リツキシマブの投与で軽快した。他の 1 例はアデノウイルスによる出血性腎炎を合併、片腎症例であったために急速に腎不全に至って死亡した。

#### 3. 転帰

進行期移植の 6 例中 3 例が移植後それぞれ 54 日、359 日、5 年 8 ヶ月で死亡した。進行期の生存例の 3 例中 2 例は臥床生活であるが、1 例は車イスで養護学校へも通学し、意思の疎通も図れる状態を維持している。極早期あるいは病初期に移植した 6 例は、学習やスポーツも通常の活動を行っており、その他の日常生活にはなんら支障はない。

#### 4. 結論

本前処置は中枢神経障害を認めずに、HLA 不一致非血縁ドナーからの移植も成立しており、有用と考えられた。しかし、小児型 ALD の

発症年齢の中央値が 7 歳であることから、12Gy の TAI は長管骨への照射を外しているとは言え、より低年齢の症例においては成長への影響が懸念される。今後は特に低年齢の症例における QOL の維持を考慮して、低線量の放射線照射で生着を可能とする前処置の開発が期待される。

### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

##### 原著論文

1. Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Sukanuma E, Sugiyama N, Kato S and Yabe H. Alternative donor marrow transplantation in children with aplastic anemia using low-dose irradiation and fludarabine-based conditioning. Bone Marrow Transplant 18 October 2010 doi:10.1038/bmt.2010.241 [Epub ahead of print]
2. Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Arakawa S, Kato S and Yabe H. Therapy-related myelodysplastic syndrome of recipient origin in a juvenile myelomonocytic leukemia patient 17 years after allogeneic BMT. Bone Marrow Transplant 27 September 2010; doi:10.1038/bmt.2010.224
3. Tomita Y, Ishiguro H, Yasuda Y, Hyodo H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Hattori K, Matsumoto M, Inoue H, Yabe H, Yabe M, Shinohara O, Kojima S, Minemura T, Kato S. High incidence of fatty liver and insulin resistance in long-term adult survivors of childhood SCT. Bone Marrow Transplant. 2010 Jun 21. [Epub ahead of print]
4. Imaizumi M, Tawa A, Hanada R, Tsuchida M, Tabuchi K, Kigasawa H, Kobayashi R, Morimoto A, Nakayama H, Hamamoto K, Kudo K, Yabe H, Horibe K, Tsuchiya S, Tsukimoto I. Prospective study of a therapeutic regimen with all-trans retinoic acid and anthracyclines in

combination of cytarabine in children with acute promyelocytic leukaemia: the Japanese childhood acute myeloid leukaemia cooperative study. *Br J Haematol* 2010 Aug 5 [Epub ahead of print]

5. Nabhan SK, Bitencourt M, Duval M, Abecasis M, Dufour C, Boudjedir K, Rocha V, Socie' G, Passweg J, Goi K, Sanders J, Snowden J, Yabe H, Pasquini R, Gluckman E. Fertility recovery and pregnancy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in Fanconi anemia patients. *Haematologica* 2010 95(10): 1783-1787.
6. Yabe H, Yabe M, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Kato S. Rapid improvement of life-threatening capillary leak syndrome after stem cell transplantation by bevacizumab. *Blood* 2010; 115(13): 2723-2724.
7. Yabe H, Koike T, Shimizu T, Ishiguro H, Morimoto T, Hyodo H, Akiba T, Kato S and Yabe M. Natural pregnancy and delivery after unrelated bone marrow transplantation using fludarabine-based regimen in a Fanconi anemia patient. *Int J Hematol* 2010; 91(2): 350-351.
8. 渡辺修大、足立壮一、堀部敬三、永利義久、加藤剛二、田淵 健、吉見礼美、加藤俊一、矢部普正、日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)SCT 委員会小児急性骨髄性白血病第一寛解期でのHLA 一致同胞間骨髄移植におけるGVHD 予防(MTX 単独 vs. CyA 群)の比較 *日本小児血液学会雑誌* 2010;24(53): 32-36.
9. 加藤陽子、羽田紘子、龍 彩香、田嶋朝子、矢野一郎、玉置尚司、伊藤文之、秋山政晴、星 順隆、金子隆、清水崇史、矢部みはる、矢部普正 軽症で7年間経過観察後最重症に進行し HLA1 座不一致血縁ドナーより骨髄移植を施行した後天性特発性再生不良性貧血の1例 *日本小児血液学会雑誌* 2010;24(53): 53-58.

## 著書

1. 血液診療エキスパート;貧血 難治性貧血に対する fludarabine を前処置に用いた造血幹細胞移植 中外医学社 2010 231-234(共著)

## 2. 学会発表

### 国外

1. Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Kato S and Yabe M. Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for Fanconi anemia. 22<sup>nd</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. October, 2010, Minneapolis, USA
2. Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Kato S and Yabe M. Long-term follow-up after unrelated bone marrow transplantation in a patient with dyskeratosis congenita. 22<sup>nd</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. October, 2010, Minneapolis, USA
3. Yabe H, Ohara A, Bessyo F, Nakahata T, Kobayashi R, Tsuchida M, Ohga S, Kosaka Y, Mugishima H, Ito E, Morimoto A, Kojima S, on behalf of the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Comparison of three preparative regimens in alternative donor transplant for aplastic anemia in Japan. 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation 2010, Vienna, Austria.

### 国内

1. Yabe H, Yabe M, Kato S, Koike T, Takakura H, Hyodo H, Tomita Y, Ishiguro H, Shimizu T, Morimoto T and Akiba T. Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for aplastic anemia. 第72回日本血液学会総

会 2010 年

**E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)**

(特許取得・実用新案登録・その他)

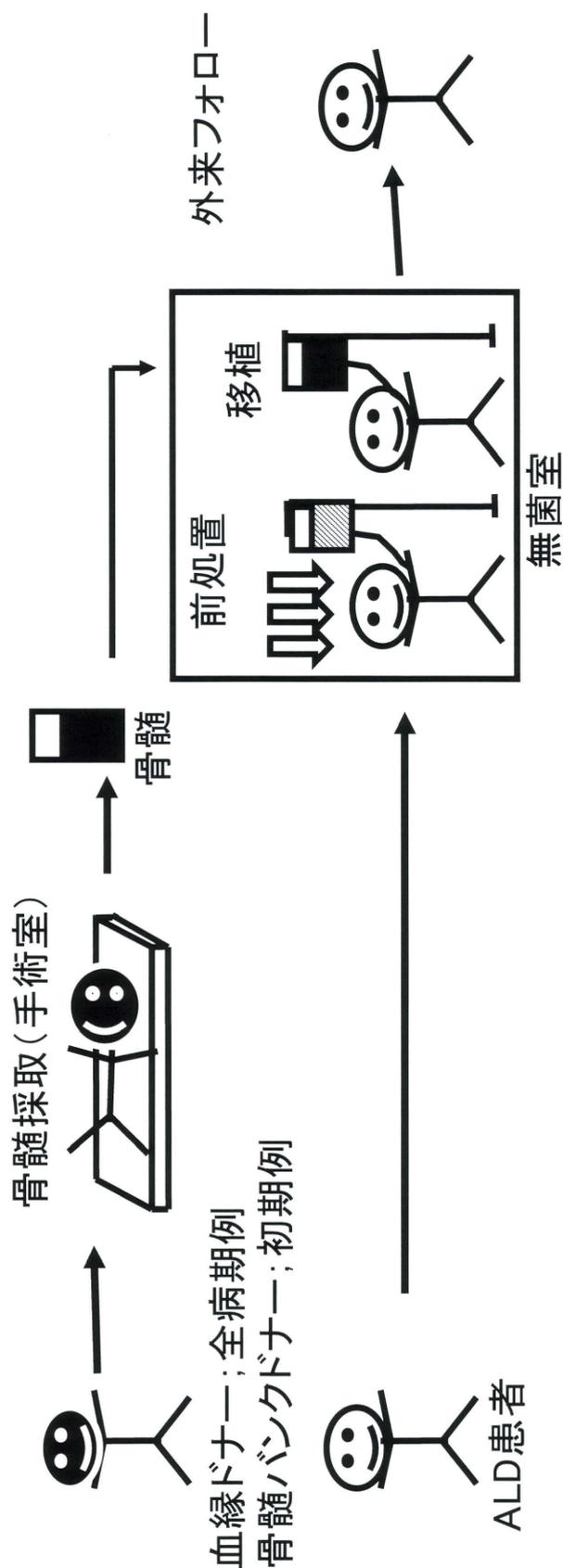
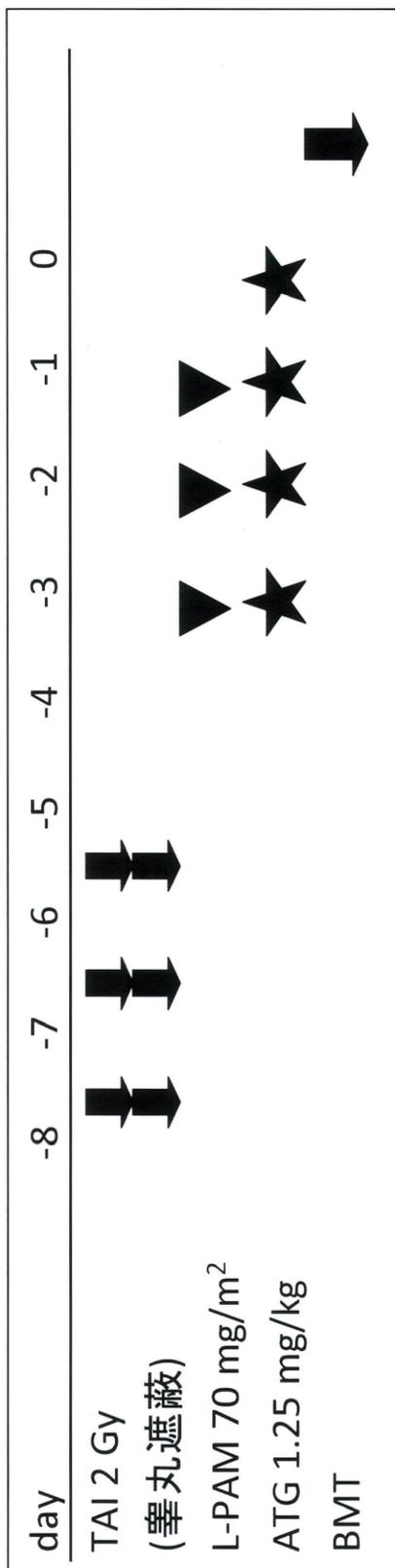
なし

**F. 健康危険情報**

なし

# TAI+L-PAM+ATGによる同種骨髓移植

前処置のスケジュール



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

副腎白質ジストロフィー症に対する骨髄非破壊的移植

分担研究者 加藤剛二 名古屋第一赤十字病院 小児血液腫瘍科

研究要旨：副腎白質ジストロフィー（以下 ALD）の治療法としてはこれまで造血細胞移植が唯一有効な治療とされており、その移植前処置としては骨髄破壊的前処置が多く施行されているが移植後の治療関連合併症および神経症状の進行が問題になっている。これに対して骨髄非破壊的前処置では移植後の合併症の低減が期待でき、かつ臍帯血を用いることで緊急的な移植に対応が可能になる。当科では非血縁者臍帯血および HLA 一致同胞の骨髄を用いて ALD に対して骨髄非破壊的造血細胞移植を施行したので報告する。

#### A. 研究目的

副腎白質ジストロフィー症（以下 ALD）に対する造血細胞移植はこれまで骨髄移植を主体とした骨髄破壊的前処置が多量の症例に対して実施されてきたが骨髄非破壊的移植の報告も散見される。当科では Fludarabine (Flu), Melphalan (Mel), 低線量 TBI（全身放射線照射）等の前処置による骨髄非破壊的移植 (RIST) を臍帯血及び骨髄を用いて実施し、その安全性と有効性につき検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. 症例

対象は当科で 2010 年に施行した 3 例の ALD 症例。

症例 1 は移植時年齢 11 歳、発症後 4 ヶ月で移植、移植時の神経症状は視力低下および視野狭窄、頭部 MRI の Loes score は 9。前処置は Fludarabine 25 mg/m<sup>2</sup>/d x 5days, Melphalan 70mg/m<sup>2</sup>/d x 2days, TBI 4Gy,

GVHD 予防は MTX+prograf。ドナーは HLA8/8 一致非血縁者臍帯血。

症例 2 は移植時年齢 9 歳、移植時の神経症状は軽度の視力低下、言語性 IQ104、動作性 IQ<40、頭部 MRI の Loes score 11.5。前処置は Fludarabine 25 mg/m<sup>2</sup>/d x 5days, Melphalan 70mg/m<sup>2</sup>/d x 2days, TBI 4Gy, GVHD 予防は MTX+ prograf、ドナーは HLA 5/6 一致非血縁者臍帯血。

症例 3 は移植時年齢 8 歳、移植時の神経症状は視力低下および視野狭窄、頭部 MRI の Loes score は 9。前処置は Fludarabine 25 mg/m<sup>2</sup>/d x 4days, Melphalan 70mg/m<sup>2</sup>/d x 2days, TBI 4Gy, GVHD 予防は MTX+ CsA、ドナーは HLA6/6 一致同胞で移植細胞は骨髄。

#### C. 研究結果

症例 1 では移植後 day19 で生着が得られ、急性 GVHD を認めず、移植後 6 ヶ月で視力は光覚弁、聴力良好、介助歩行可。

症例 2 では移植後 day24 で生着が得られ、急性 GVHD を認めず、移植後 3 ヶ月で視力は明暗のみ、歩行可。

症例 3 では移植後 day15 で生着が得られ、急性 GVHD を認めず、移植後 3 ヶ月の時点で視力低下、歩行可。

#### D. 考察

副腎白質ジストロフィー症に対して造血細胞移植による臨床的効果が得られるためには 1) 発症後早期に実施する事、2) 生着を得る事、及び 3) 中枢神経系に対する副作用を少なくする事が重要である。とりわけ生着を確実にするためにこれまで骨髄破壊的前処置が施行されてきたが移植後の移植関連合併症の発症が常に問題であった。しかしながら近年血液悪性腫瘍領域において骨髄非破壊的前処置による造血細胞移植が多数施行され、移植後の合併症軽減に効果が認められてきた。近年国内において ALD 症例に対して骨髄非破壊的移植が少数ながら実施され、移植細胞が臍帯血であっても良好な生着が得られ、移植後の経過も比較的良好である。当科において施行された Fludarabine + Melphalan + low dose TBI を前処置とした骨髄非破壊的移植による 3

症例の臨床経過は生着が得られ、移植関連合併症は軽度であり、移植後に神経症状は進行しているものの従来の骨髄破壊的移植よりも軽度と考えられる。そのため今後は ALD に対して本前処置を用いた造血細胞移植を多数の症例に施行し、その安全性と有効性とをさらに確認することが望ましいと考えられる。

#### E. 結論

ALD に対する造血細胞移植としては骨髄非破壊的前処置を用いることが望ましいと考えられ今後の前向きな検討が必要と考えられる。

#### F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 加藤剛二他、先天性代謝異常症に対する RIST による同種造血細胞移植、第 33 回日本造血細胞移植学会総会、平成 23 年 3 月 9 日 松山

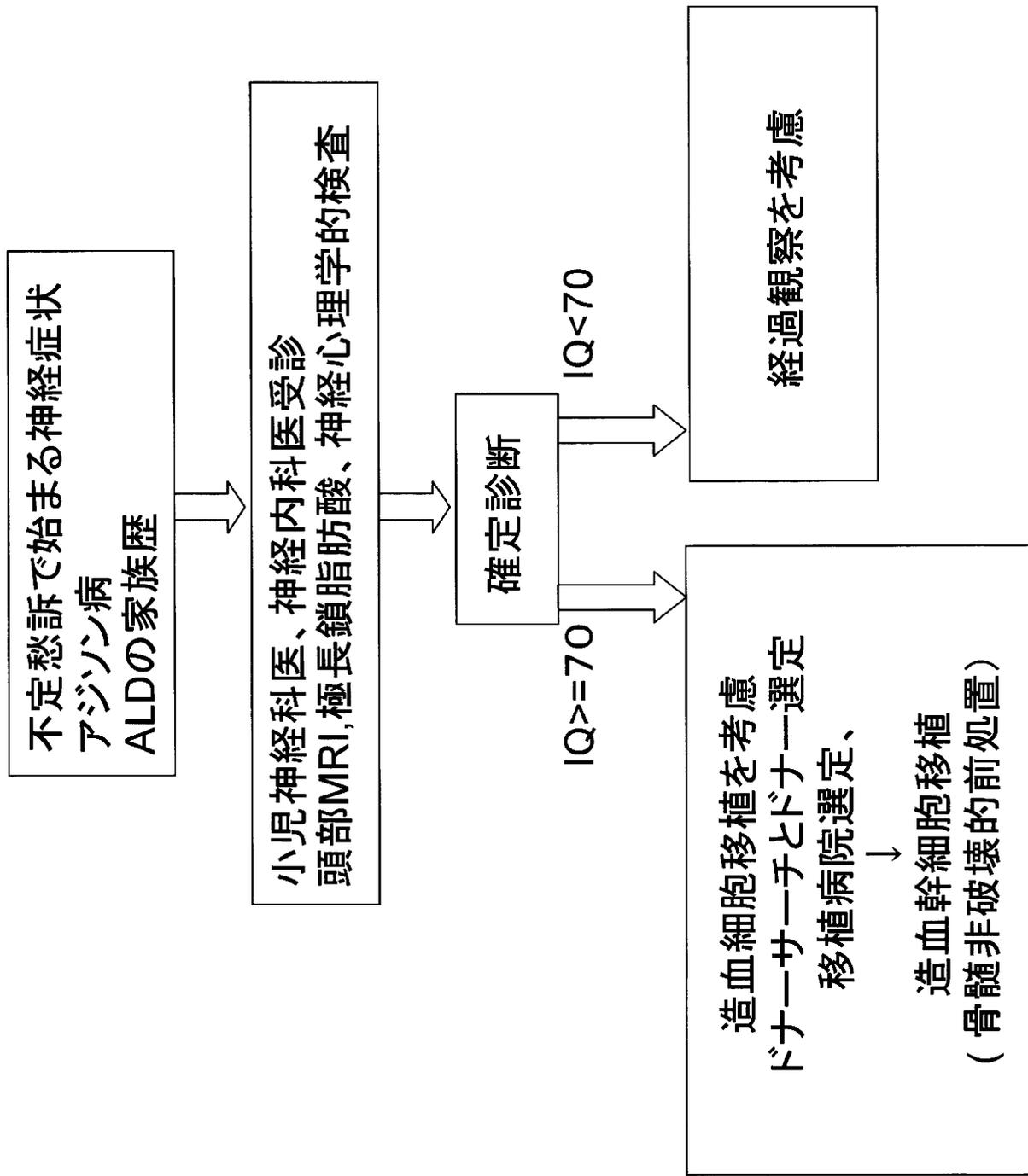
#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### H. 健康危険情報

なし。

# 副腎白質ジストロフィーの診断と治療



## Spastin 蛋白の機能解析

分担研究者：瀧山嘉久（山梨大学医学部神経内科学講座）

共同研究者：迫江公己、嶋崎晴雄、滑川道人、本多純子、中野今治（自治医科大学内科学講座神経内科学部門）

### 研究要旨

本研究は、SPG4の原因蛋白であるspastinのタンパク機能と下流タンパクを同定し、解析することにより、遺伝性痙性対麻痺の病態機序を解明し、治療に向けての手がかりを得ることを目的とした。spastin遺伝子のknock-downによりspastinとその下流の遺伝子の変化を分子レベルで解析した結果、spastin遺伝子およびタンパクの減少により、物質輸送に関与するエンドソーム遺伝子群、KIF遺伝子の低下が認められた。さらに、SPG3A、SPG21、SPG26遺伝子が減少すること、これらの遺伝子産物と相互作用を示し、軸索の再生に関与するRTN4タンパクの減少が認められた。これらのことから、SPG遺伝子産物は関連し合うこと、共通の下流タンパクパスウェイが存在することが示唆された。今後、これらのタンパクパスウェイと、spastin関連遺伝子として同定された遺伝子を解析することによりSPG4だけではなく、他の神経疾患および軸索再生と治療への手がかりが得られるものと思われる。

### A. 研究目的

本研究は、SPG4の原因蛋白であるspastinの機能不全により影響を受けるspastinの下流タンパク群とそれらのパスウェイを同定することにより、遺伝性痙性対麻痺の治療および軸索再生の機序を解明することを目的とした。

### B. 研究方法

Spastin発現量の解析には、ヒト肝臓、腎臓、心臓、脾臓、脳、筋肉由来のタンパクおよびこれら組織由来のcDNAを用いた。遺伝子およびタンパク発現量はreal-time PCRとisoform 特異的な抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。Spastinの機能不全により影響を受ける下流遺伝子群を同定するために、4種類のsiRNAを合成し、spastin遺伝子およびタンパクのknock-down率を確認後、knock-down率の異なる2つのsiRNAを選択した。遺伝子発現量の増減は、ヒト神経前駆細胞hNTにcontrol siRNAと2種類のsiRNAを導入し、2日後のRNAを持ってCodeLink マイクロアレイにより

解析した。得られた遺伝子の増減はcontrol siRNAおよびspastin siRNA間で比較し、さらに、Injenuity社のIPAソフトによりタンパク間のパスウェイを解析した。マイクロアレイにより同定された遺伝子は、抗体または、cDNAの作製によりspastin との関連を確認した。

なお、試料に関してはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成14年文部科学省・厚生労働省告示第1号）および自治医大遺伝子解析倫理規定を遵守した。

### C. 研究結果

Spastin遺伝子のknock-downによりcontrol siRNAとの比較およびsiRNA間で増減に同様の変化が認められた遺伝子群は以下の通りである。

1. エンドソーム関連タンパクであり、エンドサイトーシスの制御に関与するRab5、およびSPG33の原因タンパクとされるProtrudin/ZFVE27と相互作用するRab11を始め多数のRab ファミリー遺伝子が減少を示した。

2. モータータンパクの一つであり、細胞分裂時にmid bodyに局在するKIF20Bの遺伝子が減少し、その関連タンパクもほとんどが減少を示した。KIF20Bの抗体を用いた解析により、spastinタンパクの減少はKIF20Bタンパクを微小管上に蓄積させることが示された。

3. 他のSPG原因遺伝子である、SPG3A, SPG21, SPG26遺伝子にも発現の減少が認められた。さらに、これらタンパクと相互作用するRTN4遺伝子において特定のisoformの減少が認められた。RTN4は、spastin遺伝子の減少により、タンパク量も減少し、神経突起先端部位におけるspastinとの共局在が阻害されることが示された。

4. Spastin遺伝子のknock-downによりSPG関連遺伝子だけではなく、ALS, muscular dystrophy, schizophreniaに關与する遺伝子群が減少していることが示された。

#### D. 考察

Spastin遺伝子のknock-downによる成長円錐の形成異常および分岐部位における突起の過形成の原因の一つとしてエンドソーム遺伝子群の減少が關与していると考えられた。軸索の伸長には小胞輸送による膜輸送が必要であり、小胞輸送に關与する遺伝子群の減少は神経突起の伸長に影響を及ぼすと考えられた。また、モータータンパクの減少は軸索内の物質輸送能が低下し、神経細胞および軸索の伸長にマイナスの影響を与えると考えられた。さらに、spastinの減少によりSPG3A, SPG21, SPG26遺伝子等のSPG原因遺伝子が減少していることから、遺伝性痙性対麻痺の疾患間において、関連し合うタンパク群が存在すること、SPG4においてはRTN4がkey moleculeとなる可能性が示唆された。

#### E. 結論

我々のこれまでの研究から、spastinの機能は主として微小管の切断であると考えられ、特に神経系の細胞

では、spastinの機能異常および機能不全により、小胞輸送、モータータンパクの減少による神経突起先端への膜成分等の材料輸送の減少が起こり、軸索の伸長に影響する可能性があることが示唆された。また、spastinは突起の先端や分岐部分に集積して切断と伸長のバランスをとっているものと考えられた。

遺伝性痙性対麻痺の病態を解明する上で、spastinの微小管切断と安定化の機能解析は治療にむけて有効な手段となり得ること、さらに、SPG4関連タンパクの同定と解析は、SPG4の治療だけではなく他の遺伝性痙性対麻痺の病態解明や軸索再生機構の解明につながると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 迫江公己、瀧山嘉久、嶋崎晴雄、中野今治：spastinの機能解析. 第48回日本神経学会総会、東京、2007年5月16日.

#### G. 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

視神経萎縮, 末梢神経障害を伴う遺伝性痙性対麻痺症例の臨床像と, 原因遺伝子検索

分担研究者 瀧山嘉久 (山梨大学医学部神経内科学講座)

研究協力者 嶋崎晴雄, 本多純子, 太田京子, 直井為任, 滑川道人, 迫江公己, 中野今治  
(自治医科大学内科学講座神経内科学部門)

石浦浩之, 福田陽子, 高橋祐二, 後藤順, 辻省次 (東京大学医学部神経内科学講座)

研究要旨

常染色体劣性遺伝と考えられる, 視神経萎縮, 末梢神経障害を伴う遺伝性痙性対麻痺の 1 家系 2 症例について, その臨床像を検討し, 原因遺伝子検索を試みた. 2 症例の臨床像はほぼ均一で, 幼少期発症で, 上下肢遠位筋萎縮と両下肢遠位に表在覚の低下を認めた. 連鎖解析では 4 つの染色体に弱い連鎖を認めたが, 既報の遺伝性痙性対麻痺の遺伝子座は含まれず, 新しい病型と考えられた. エクソーム解析により, 連鎖部位内の 3 つの候補遺伝子変異を同定した.

A. 研究目的

遺伝性痙性対麻痺(HSP)は, 両下肢の痙性対麻痺を中核症状とし, その他様々な症状を合併する症候群である. その遺伝子座は SPG1 ~48 まで 40 以上同定されており, 20 余りの原因遺伝子が単離されている. 今回我々は, 遺伝性痙性対麻痺の同胞例を経験したので, その臨床像を検討し, 原因遺伝子を検索した.

B. 研究方法

対象は両親が従兄弟婚で, 幼少期発症の痙性対麻痺, 視神経萎縮, 末梢神経障害を呈した同胞 2 例である. 神経学的診察を行い, 同意が得られた発症者 2 名より末梢血を採血し, DNA を抽出し, SNP を用いて連鎖解析を行った. さらに患者 1 名の DNA を用いて, 連鎖部位の array CGH を施行し遺伝子コピー数の異常を検索した. 次に, 患者 1 名の DNA のエクソン部分のみを濃縮し, 次世代シーク

エンサーによりシークエンスを行った(エクソーム解析).

(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

神経学的診察では, 高次脳機能は正常で, 脳神経系では視力低下, 眼底は蒼白乳頭で, 視野検査で中心暗点の拡大を認めた. 運動系では下肢筋緊張が亢進し, 上下肢遠位筋に筋力低下と筋萎縮を認めた. また, 下肢の腱反射は, アキレス腱反射以外は亢進していた. 感覚系では両下肢遠位優位の表在覚低下を認めた.

連鎖解析では, 第 2, 6, 12, 13 の 4 つの染色体上に lod 値の高い部分があり, 候補領域と考えられた. 尚, この領域には既報の

HSP の遺伝子座は含まれておらず、候補領域に明らかな病的遺伝子コピー数異常はなかった。次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析の解析を行ったところ、第 12 番染色体の候補領域内に、3 つの候補遺伝子変異を同定した。今後 Sanger 法での遺伝子変異の確認や、別の患者で変異が見られるかなど検討する。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

Namekawa M, Takiyama Y, Honda J, Shimazaki H, Sakoe K, Nakano I. Adult-onset Alexander disease with typical “tadpole” appearance of the brainstem and unusual involvement of bilateral basal ganglia: a case report and review of the literature. BMC Neurology 10(1): 21, 2010.

##### 2. 学会発表

嶋崎晴雄, 本多純子, 滑川道人, 迫江公己, 瀧山嘉久, 中野今治. 当科における常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症 (ARSCD) の遺伝子解析. 第 51 回日本神経学会総会. 2010 年 5 月 22 日, 東京.

嶋崎晴雄, 石浦浩之, 福田陽子, 本多純子, 太田京子, 滑川道人, 迫江公己, 高橋祐二, 後藤順, 辻省次, 中野今治, 瀧山嘉久. 視神経萎縮, 末梢神経障害を伴う遺伝性痙攣性対麻痺症例の臨床像と, その候補遺伝子解析. 第 55 回日本人類遺伝学会. 2010 年 10 月 28 日, 大宮.

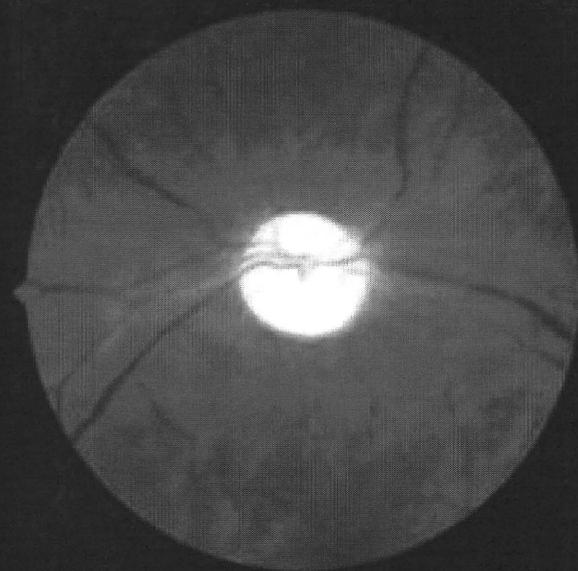
#### E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

なし.

#### F. 健康危険情報

なし.

視神経萎縮，末梢神経障害を伴う遺伝性痙性対麻痺



視神経萎縮



末梢神経障害による下腿萎縮

遺伝子解析により，4つの候補遺伝子座と，3つの候補遺伝子変異を同定した

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

## 多系統萎縮症の自然歴に関する多施設共同研究

分担研究者	辻 省次	東京大学神経内科
研究協力者	JAMSAC	Japan MSA research consortium
	市川弥生子	東京大学神経内科
	中原康雄	東京大学リハビリ科
	三井 純	東京大学神経内科
	後藤 順	東京大学神経内科

### 研究要旨

多系統萎縮症(multiple system atrophy: MSA)は自律神経症状、小脳性運動失調、パーキンソニズム、錐体路症状を呈する進行性神経変性疾患である。MSA は成人発症の弧発性疾患として知られているが病因については明らかにされていない。MSA の臨床的特徴、自然歴を明らかにし、大規模ゲノム解析による MSA の病因解明を目的として 2003 年 JAMSAC (Japan MSA research consortium) が設立された。多施設共同体制にて MSA の臨床情報およびゲノムリソースの収集が行っている。MSA の自然史について横断的・縦断的解析を行い、治験の基盤となる自然史を明らかにしていく。

### A. 研究目的

治験の基盤となる本邦における MSA の臨床的特徴、自然史を明らかにする。

登録された患者について性別・発症年齢・サブタイプ(MSA-C/MSA-P)について明らかにした。

### B. 研究方法

国内 22 施設とともに共同研究体制を構築し、情報およびゲノムリソースの収集を行っている。臨床情報調査用紙および web 入力システムを構築し、各施設から臨床情報の収集・登録を行った。

登録時点の機能評価を UMSARS, Barthel index, 臨床調査個人票に基づく神経症状、ICARS 部分点、UPDRS 部分点を用いて行った。

患者エントリーに関しては Gilman らの Consensus statement で possible 以上を基本としたが、自律神経症状、パーキンソン症状、小脳症状で criterion を満たす場合は、頭部 MRI 画像で橋のいわゆる十字サインか、被殻外側異常信号を呈する症例は MRI 補助基準により登録可能とした (MRI 登録)。MRI 登録症例については、登録後の疾患カテゴリーの推移について検討した。

2 時点以上で UMSARS にて運動機能を縦断的に評価しえた症例は 19 症例であった。これらの症例における UMSARS part2(運動機能:UMSARS-ME)におけるスコアの推移から、治験必要症例数について、共分散分析を用いて推定した。1年後のスコア値(換算値)は線形近似を用いて内挿にて求めた(4 症例は評価間隔が 1 年未満のため外挿値)。

### (倫理面への配慮)

本研究については「多系統萎縮症 (MSA) についての多施設共同大規模遺伝子解析研究」として東京大学医学系研究科・医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員

会から承認されている。各共同研究施設においてもそれぞれ倫理委員会に提出し承認をいただいた上で、臨床情報・検体の収集を行っている。

### C. 研究結果および考察

登録された 216 名の MSA 患者において、平均発症年齢  $58.0 \pm 8.2$  歳 (35-79 歳) であった。サブタイプでは MSA-C が 69% を占め、MSA-P が 29%、分類不能が 2% であった。

疾患カテゴリー別では、Probable MSA 症例が 141 (63%)、possible MSA が 66 (29%)、MRI 登録症例が 18 (8%) であった。MRI 登録された症例のうち転医を除いた 16 例においては 2010 年末の時点で、15 例が疾患カテゴリーの possible 以上に移行していた (definite MSA:1, probable MSA:10, possible MSA:4)。MRI 登録のままであった 1 例は罹病期間 2 年以内の症例であった。

評価スケールにて臨床評価をされている症例は 190 (MSA-C:109, MSA-P:51 名) であり、各スケールの点数において臨床経過年数ごとに有意差 ( $P < 0.0001$ ) が見られた。Rating Scale は機能を評価する上で有用であり、経過年数とともに機能が低下していくことが示された。

JAMSAC において経時的フォローを行えた 19 例における UMSARS-ME スコアの初期値は  $18.6 \pm 10.1$ 、1 年後のスコア換算値は  $24.5 \pm 10.4$  であった。初期値と 1 年後換算値における変化は  $5.7 \pm 3.2$  で、両者の相関係数は 0.956 であった。共分散分析を用いて解析した結果、90%power で 10% の変化を検出するのに必要とされる症例数は 602 例と推定された。

### D. 結論

MRI 補助基準で登録した症例のうち罹病期間が 2 年を超えた症例では、possible/probable MSA に移行していた。MRI 補助基準は早期 MSA 症例の登録に有用と考えられた。

治験デザインを考える上で、縦断的解析

に基づく評価スケールの検討、必要症例数の検討が必要である。

患者間の変動を含めた共分散分析に基づく統計学的解析では、2つの時点での評価のばらつき (進行度の患者間の違いや評価そのもののばらつきなど) が、必要なサンプルサイズを決める上での重要な要因となる。

早期患者を的確に診断できる登録基準、評価項目を整えた上で、縦断的研究を行い、臨床治験デザインの基盤となるデータを構築していく。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

準備中

#### 2. 学会発表

1. JAMSAC, 市川弥生子, 百瀬義雄, 中原康雄, 後藤 順, 辻 省次. 多系統萎縮症の自然史についての横断的解析. 第 51 回日本神経学会総会. 東京
2. 市川弥生子. シンポジウム: 神経疾患の臨床研究を目指したコンソーシアム. Japan multiple system atrophy research consortium (JAMSAC). 第 51 回日本神経学会総会. 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

一卵性双生児 CNV 解析による多系統萎縮症のゲノムコピー数異常の同定

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学分野

研究協力者 矢部 一郎

北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野

加藤丈夫

山形大学大学院医学系研究科内科学第三

江見充、飯島寛、伊東紀子、佐藤秀則

DNA チップ研究所 CNV ラボラトリー

## 研究要旨

片方のみ MSA に罹患している一卵性双生児間で、発症者に限定したゲノムコピー数の欠失領域を同定した。同領域の欠失は、今回解析できた範囲では、MSA 群 33 例中 15 例にヘテロ性の欠失を認めたが、対照群では欠失例を認めなかった。このゲノム領域において神経系に発現している遺伝子の CNV が MSA の発病素因の1つである可能性が示唆された。

### A. 研究目的

同一の受精卵からなる一卵性双生児のゲノムは同一と考えられているが、一卵性双生児の片方が病気を発症し他方は発症しないという例があり、discordant twin として知られている。本件研究では多系統萎縮症(MSA)の discordant twin 1 組、及び非血縁の MSA 患者集団を対象にゲノムコピー数の差異(CNV)をゲノムワイドに解析し、MSA におけるゲノムコピー数(CNV)異常を探索した。

### B. 研究方法

対象は片方のみ MSA を発病した一卵性双生児 1 組を含めて、非血縁の孤発性 MSA 患者 33 人(男 18 例、女 15 例; 病型:MSA-P11 例、MSA-C 22 例、平均発病年齢 58.1±8.2 歳)、健常対照群 100 人である。末梢血より DNA を抽出し、全ゲノム網羅的 CNV 解析は Agilent CNV 400K array と deCODE/Illumina CNV57K chip で行い、候補領域は region-targeted high-density oligonucleotide tiling microarray (Agilent カスタムアレイ)を作成して詳細な CNV 解析を行なった。臨床診断は Consensus Criteria に準じ、画像所見も考慮した。双生児の一卵性の遺伝学的検証は Illumina 300K SNP アレイで行ない、SNP 多型の一致率から一卵性であることを確認した。

### (倫理面への配慮)

本研究は医の倫理委員会の承認を得て行った。対象者には予め研究の主旨を説明し、文書で同意を得た。

### C. 研究結果

一卵性双生児の片方の DNA を Cy3 でラベルし、他方の DNA を Cy5 でラベルし、両者の DNA を混合して競合的 Hybridization を行うことにより、両者間でゲノム構造の異なる部位をゲノムワイドに探索したところ、染色体サブテロメア上の反復配列に富んだ領域に MSA 発症者の側のみでゲノムコピー数(CNV)の欠失を呈する領域を同定した。孤発性 MSA 患者 33 名を CNV57K チップおよびカスタムアレイにて解析したところ、やはり同じ領域にて、MSA 患者の約半数(33名中15名)にてヘテロ性のゲノム欠失を認めた。同部分の欠失は対照群には認められなかった。同一の受精卵に由来する一卵性双生児間のゲノム Hybridization は、実質的には self hybridization を行っていることになり、ゲノム構造が同一であれば差異は認められないはずである。今回の解析では、MSA 一卵性双生児の片方にゲノム構造の欠失を認めた。この結果は、受精卵の形成後にゲノムが動的に変化していることを示唆している。同じ部位には、MSA 患者群でも欠失を認めたが、対照群には欠失を認めな

かった。現在、双生児対およびMSA患者群について詳細な欠失構造の解析を進めている。今後、より多数例で解析することにより、MSA素因遺伝子の同定と疾患特異的な分子マーカーの開発に関して手掛かりが得られるものと期待される。

#### 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. *MovDisord* 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, ThaKhinKhin, 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)

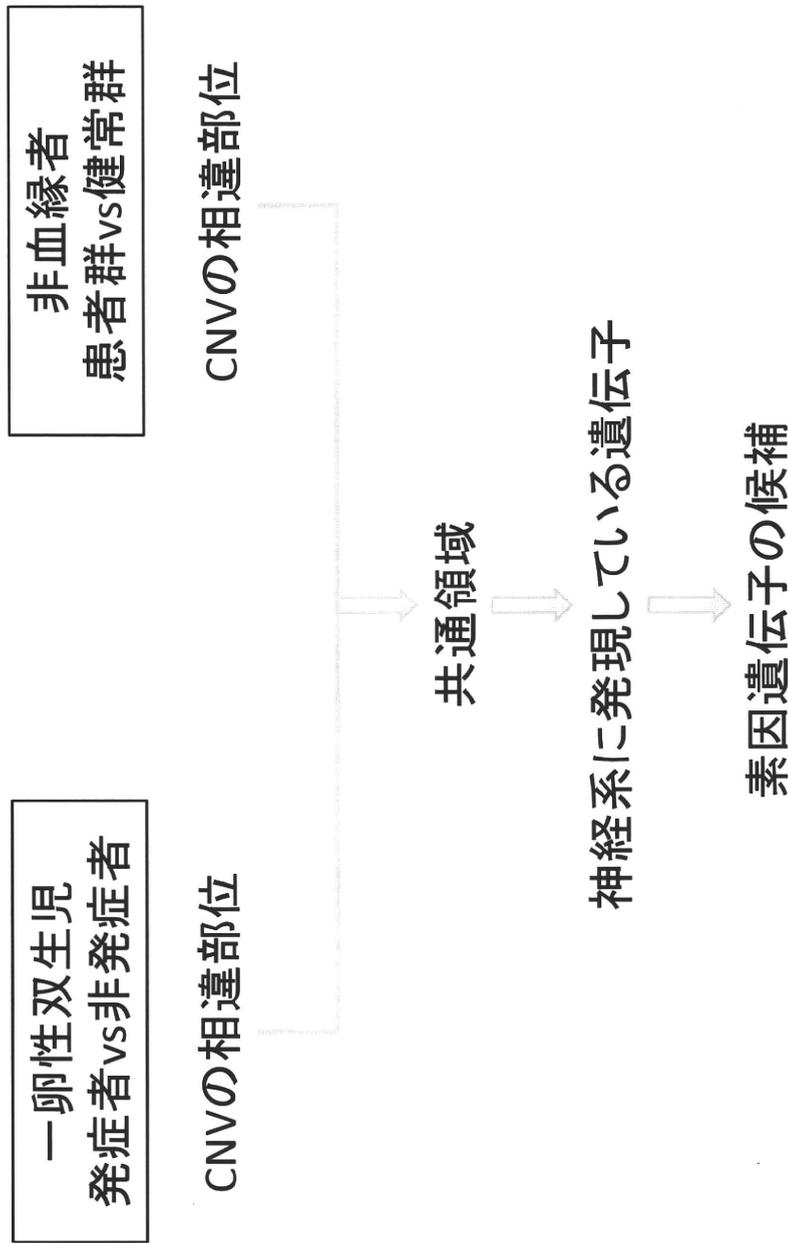
該当無し

#### F. 健康危険情報

該当無し

## MSA素因遺伝子の探索計画

背景と仮説：一卵性双生児間のCNVはde novo変異に由来する。一般に変異率はSNPよりCNVの方が高い。片方のみMSAを発病している一卵性双生児例では、このCNVの相違が発病機序に関与している可能性が姉。



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

多系統萎縮症における自然歴評価とリファンピシン内服臨床試験

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)
	太田浄文	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)
	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)
	石橋 哲	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

多系統萎縮症(MSA)は我が国の脊髄小脳変性症で最も多い疾患であり、パーキンソン症候群の中ではパーキンソン病に次いで多い。現在 MSA の根本的治療法は皆無と言っても過言ではなく、その開発が急務である。本研究の目的は、MSA マウスモデルで有効性が示唆された抗結核薬 rifampicin(RFP)の有効性を明らかにし、また MSA の自然歴評価を行うことである。今回 17 名の MSA 患者が研究に参加し、6 カ月間の内服臨床試験を行った。その結果、各種評価項目のうち ICARS(International Cooperative Ataxia Rating Scale)と 6 分間歩行距離測定が有用な指標であることが明らかになり、特に後者は客観的な指標として非常に有用であることが新しく判明した。RFP の効果は患者によって様々で統計的な有意差は証明できなかった。今後より多数における長期間の臨床試験を通して、その有効性を検証する必要があると考えられた。

### A. 研究の背景と目的

多系統萎縮症(MSA) の病態には、グリア細胞質内封入体(GCI)が重要と考えられており、その主要構成成分に  $\alpha$ -synuclein 蛋白が重要であると考えられている。また、 $\alpha$ -synuclein 遺伝子を乏突起神経膠細胞に過剰発現させたトランスジェニックマウスでは GCI が観察され、MSA の病態をある程度反映するモデルであると考えられている(J Neurosci 2005; 25: 10689-99 など)。

このマウスに  $\alpha$ -synuclein 抗凝集作用がある抗結核薬リファンピシン(RFP)を投与すると、GCI 形成が阻止されたことが報告された

(NeuroReport 2008; 19: 1271-6)。この知見は、MSA モデルマウスにおいて特定の薬剤が効果を示した最初の研究と言え、RFP が MSA 患者の根本的治療法の一つになる可能性を示唆している。

本研究では、MSA 患者に RFP が有効であるかを明らかにする。加えて、RFP の安全性検証はもちろん、MSA の進行度(自然歴)を評価する有効な手段を得ることも目的とする。

### B. 研究方法

対象は、MSA 患者 17 名(MSA-c 13 名、MSA-p 4 名)。性別では男性 10 名、女性 7 名。

MSA の診断は Gilman の診断基準(改訂版)に従った。何れの患者も本剤の有効性などは不確かであることを含め臨床試験の意義を理解し、積極的に参加した患者である。

評価方法は以下の 5 項目に大別して行った。

- ①安全性: 血算, 血液生化学, 凝固系検査
- ②運動失調評価: ICARS
- ③パーキンソニズム: UPDRS
- ④自律神経機能: Schellong 試験
- ⑤全般的 ADL 評価: 6 分間歩行距離測定, Barthel Index

このうち、「6 分間歩行距離測定」は、平坦な廊下での 30m の 区間を往復でき、妨害が起きない環境として、静かな病院内の廊下を選んだ。症状が進行しており、廊下を歩けない場合は平行棒を用いて、その間を歩くことにした。

服薬は、RFP (薬剤名リファジン<sup>®</sup>) 450mg を 毎朝、朝食前に内服し、6 カ月間服薬後、再度上記 5 項目を評価した。

自然歴評価としては、初回入院時点での罹病期間(X 軸)に対する各評価項目の値(Y 軸)の「回帰」を検討した。

RFP 有効性検証については、自然歴評価で信頼度の高い項目について、6 か月内服後で回帰の差を検証した。

#### (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

自然歴について: 投与前臨床データを集積すると、経過年数と相関したのは ICARS と 6 分間歩行距離で、ICARS 平均 5.63 点/年の悪化、6 分間歩行距離は 61.25m/年の短縮であり、いずれも

統計的に有意な回帰係数であった。特に 6 分間歩行は簡便であるうえ、客観的で再現性も高く、有用な指標であると考えた。

RFP の効果について: 自覚症状は少数例で改善したが、多くは 6 ヶ月後不変または多少の悪化を自覚した。6 分間歩行と ICARS は症例によっては悪化の傾向を認めないものもある一方、進行を示唆する症例もあり、統計的に有意な効果は見いださなかった。

#### 考察

今回の研究で、RFP は MSA 患者が長期間服用できる安全な薬剤であることが確認できた。本薬剤の効果を判定するためには、MSA の自然歴が確立していることが前提条件であるが、患者の経過は一樣ではなく、薬剤の効果判定をするにはより細かく正確に病状を反映できるバイオマーカーが重要であることが改めて感じられた。本研究では新しく「6 分間歩行距離測定」検査を導入した。この指標は、大まかにではあるが患者の ADL を反映する指標として活用されているが(Eur Respir J 1999; 14: 270-4), MSA 患者でも客観的で有用な指標であることを初めて明らかにできた。

今後 RFP の有効性を明らかにするためには、症例数のさらなる蓄積することと、6 か月ではなく 1 年程度とより長期間の観察が必要と思われる。また、今後、髄液中  $\alpha$ -synuclein 濃度測定などの生化学的検索でも評価する予定である。

#### 結論

- ① MSA の自然歴が不明確であるため、薬物効果の判定には多数の症例における、詳細かつ長期間の検証が必要であることを、改めて認識した。
- ② 自然歴評価には、ICARS 以外に客観的数値で表される 6 分間歩行距離測定が有用である可能性がある。
- ③ RFP が有効であることを明らかにするには、多数の症例の解析と鋭敏な臨床指標・バイオマーカーの確立が必要である。
- ④ 動物実験で、経口投与にした場合の有効性の確認と、その分子基盤を解明する必要がある。

## 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