

福原 忍、水江伸夫、坂井拓郎、稲澤奈津子、池本 亘、足立憲昭、下澤伸行：同一遺伝子異常を持ちながら臨床型が異なるALD兄弟例. 小児科臨床62: 457-461、2009.

下澤伸行：日本人が発見に関わった疾患遺伝子 ペルオキシソーム病. 小児科 50 増刊号. 特集「小児疾患における臨床遺伝学の進歩」907-913、2009.

下澤伸行：ペルオキシソーム病. 小児内科 41 増刊号、小児疾患診療のための病態生理 2 479-486、2009.

Morita M, Shimozawa N, Kashiwayama Y, Suzuki Y, and Imanaka T: ABC subfamily D proteins and very long chain fatty acid metabolism as novel targets in adrenoleukodystrophy. Current Drug Targets 2010 Epub

Shimozawa N, Honda A, Kajiwara N, Kozawa S, Nagase T, Takemoto Y, Suzuki Y. Diagnostic and follow-up system of patients with X-linked adrenoleukodystrophy in Japan. J Hum Genet 2010 Epub

2. 学会発表

Nobuyuki Shimozawa, Ayako Arai, Naomi Kajiwara, Sachi Kozawa, Tomoko Nagase, Yasuhiko Takemoto, Yasuyuki Suzuki. Genotype and phenotype of Japanese patients with X-linked adrenoleukodystrophy. 59th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Honolulu, Oct, 2009.

下澤伸行、荒井綾子、梶原尚美、小澤 祥、長瀬朋子、竹本靖彦、鈴木康之. 副腎白質ジストロフィー早期診断・早期治療へ向けての取組み—発症前診断に関するガイドライン作成に向けて—第 54 回日本人類遺伝学会、東京、2009.9.

鈴木康之、下澤伸行：ペルオキシソーム病との30年：二人三脚の旅 学会賞受賞講演. 第 51 回日本先天代謝異常学会、第 8 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、東京、2009.11.

長瀬朋子、玉置也剛、梶原尚美、本田綾子、小澤 祥、柴田敏之、國貞隆弘、下澤伸行.

ES 細胞からの分化系を用いたペルオキシソーム病解析の試み. 第 51 回日本先天代謝異常学会、第 8 回アジア先天代謝異常症シンポジウム、東京、2009.11.

長瀬朋子、鈴木康之、下澤伸行. ES 細胞からの分化系を用いたペルオキシソーム病の病態解明の試み. 第 113 回日本小児科学会学術集会. 2010.4.23-25、盛岡

下澤伸行、本田綾子、梶原尚美、小澤 祥、長瀬朋子、竹本靖彦、杉尾陽子、鈴木康之、Wanders RJA. 岐阜大学ペルオキシソーム病診断システムの展開—プラスマローゲンによる近位肢型点状軟骨異形成症の診断. 第 52 回日本先天代謝異常学会、2010.10.21-23、大阪

下澤伸行、本田綾子、梶原尚美、桐山寛子、小澤 祥、長瀬朋子、竹本靖彦、鈴木康之. 副腎白質ジストロフィー発症前患者に対する早期介入の取組み. 第 52 回日本先天代謝異常学会、2010.10.21-23、大阪

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）

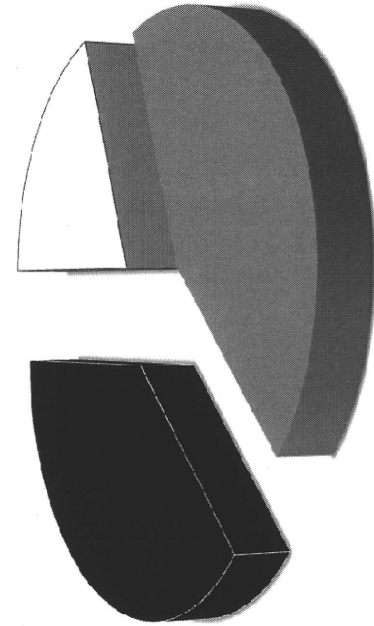
なし

F. 健康危険情報

なし

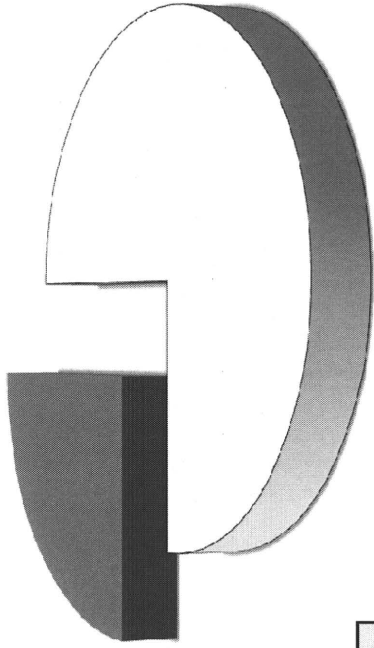
2005年以降、造血幹細胞移植の成績は めざましい改善を示している

岐阜大学医学部 鈴木康之・下澤伸行



- 進行停止
- 進行
- 死亡

~2004 (n=21)
西澤班以前



- 進行停止
- 進行
- 死亡

2005~ (n=4)
西澤班以降

ALD研究グループ
啓発活動
早期診断
遺伝カウンセリング
移植法の改善
的確な移植適応

観察期間の短い5例も経過良好

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 造血細胞移植による治療方法の確立

分担研究者 研究協力者	矢部 普正	東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学
	加藤 俊一	東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学
	矢部 みはる	東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学
	森本 克	東海大学医学部専門診療学系小児科学
	清水 崇史	東海大学医学部専門診療学系小児科学
	高倉 広充	東海大学医学部専門診療学系小児科学

研究要旨

副腎白質ジストロフィー(ALD)は同種造血細胞移植(SCT)が根治を望める唯一の治療法とされ、移植時期の選択や移植方法の確立が求められている。移植時期については臨床的に未発症期、病初期、進行期に分けて移植成績を検討し、家族歴のある非発端者が未発症あるいは病初期に移植を受け、順調な経過であることが明らかとなった。移植方法としては、中枢神経障害を起こさない造血細胞移植を可能にするため、放射線胸腹部照射(TAI)、メルファラン(L-PAM)および抗胸腺細胞グロブリン(ATG)を用いた前処置を開発し、HLA 一致同胞以外のドナーからの移植も高率に成功した。移植後の生着の動態を short-tandem repeat 法 (STR 法)を用いて評価することにより、混合キメラの改善などにつなげることができた。

A. 研究目的

副腎白質ジストロフィー(ALD)に対する同種造血細胞移植(SCT)では、移植後の生着不全や晩期拒絶が多いことや、前処置の中枢神経系毒性が問題になりやすい。移植後の生活の質(QOL)を維持するために、適切な移植時期の選択と前処置を含む移植方法を開発する。さらに、安定した生着状態をモニターする方法を確立し、混合キメラに対する治療も検討する。

B. 研究方法

1. 移植時期の検討対象

移植時期の検討対象は 1996 年～2007 年に造血幹細胞移植を希望して東海大学を受診した 25 例の ALD 患者または 7 例の ALD 変異陽性未発症者、合計 32 例であった。32 例の診療録により家系内に ALD の患者が存在するかどうかを調査した。また、移植例においては、病気別の成績と移植後

の QOL について比較検討した。

2. 移植前処置の検討対象

新たに開発した前処置の対象は 2002 年より 2010 年までに SCT を施行した 13 例で、年齢の中央値(範囲)は 10 歳(5～15 歳)であった。移植細胞ソースは HLA 一致同胞骨髄が 3 例、HLA 不一致を含む代替ドナーが 10 例であった。移植前処置の詳細は TAI 12 Gy(6 分割;3 日間)+メルファラン(L-PAM) 70 mg/m²/日、3 日間 + ATG 1.25 mg/kg/日 4 日間であった。移植片対宿主病(GVHD)予防は HLA 一致同胞間移植ではシクロスポリン(CyA)単独あるいはメソトレキセート(MTX)との併用、HLA 不一致血縁者間移植および HLA 一致非血縁骨髄移植では MTX とタクロリムス(Tac)の併用とし、HLA-DR1 抗原不一致移植ではさらにミコフェノール酸モフェチル(MMF)を投

与した。

3. STR 法による生着確認

移植後 2, 4, 8 週の骨髓と、移植後 4 週以降の末梢血サブセットの short-tandem repeat 法 (STR 法) によるキメラ解析を行った。

(倫理面への配慮)

移植の説明および生着確認および STR 法の説明は患者両親へ文書を用いて行い、文書による同意を得た。

C. 研究結果

1. 移植時期の検討

19 例においては家族歴がなく、13 例において家族歴が確認された。家族歴のない 19 例のうち 9 例が 6 歳 3 カ月～12 歳 (中央値 9 歳 0 カ月) で移植を受けた。移植時の重症度は 7 例が重症、2 例が中等症であった。2 例が生着し臨床効果を認めて生存中であるが、5 例では病状が進行し、内 2 例は生存中であるが、3 例は死亡した。

家族歴を有する 13 例のうち 7 例が 4 歳 7 カ月～10 歳 10 カ月 (中央値 7 歳 8 カ月) で移植を受けた。移植時の重症度は中等症が 2 例、軽症が 1 例、無症状が 4 例であった。移植後は、全例において病状の進行が停止しているか無症状のままの状態が維持されている。

2. 移植前処置の検討

13 例中 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 $500/\mu\text{L}$ 、血小板が $2\text{万}/\mu\text{L}$ 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。

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。

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 カ月で死亡した。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。

3. STR 法による生着確認

骨髓で STR を検査し得たのは入院中のみであり、9 例において移植後 2 週、4 週、8 週間後を目安に骨髓穿刺を行い、骨髓全血で STR 検査を行った。移植後 2 週でドナータイプが 100% になったのは 3 例、4 週で 100% になったのがさらに 1 例、8 週で 100% に至ったのがさらに 3 例であった。移植後早期から末梢血検体を経時的に検査した 9 例のうち、3 例は持続して 100% ドナータイプであったが、6 例で混合キメラを認めた。骨髓検体で 100% ドナータイプでありながら、末梢血検体で混合キメラを認めたのが 5 例あった。混合キメラに対しては、早期の免疫抑制剤の減量・中止を行うことで、ほとんどの例が末梢血でも 100% ドナータイプに転換した。

4. 結論

家族歴のある非発端者例では移植を受けた病期も早く、移植後の成績、効果も良好であった。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。ALD に対する造血細胞移植においては、骨髓に加えて末梢血の STR 検査を定期的に行い、混合キメラの出現を早期に把握して、GVHD 予防の早期減量や中止を検討する必要がある。今後は進行例での成績向上が急務であり、強度を減弱した前処置 (TAB/TAI+フルダラビン+L-PAM) による緊急臍帯血移植の確立が必要である。

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. 22nd 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. 22nd 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. 36th 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)

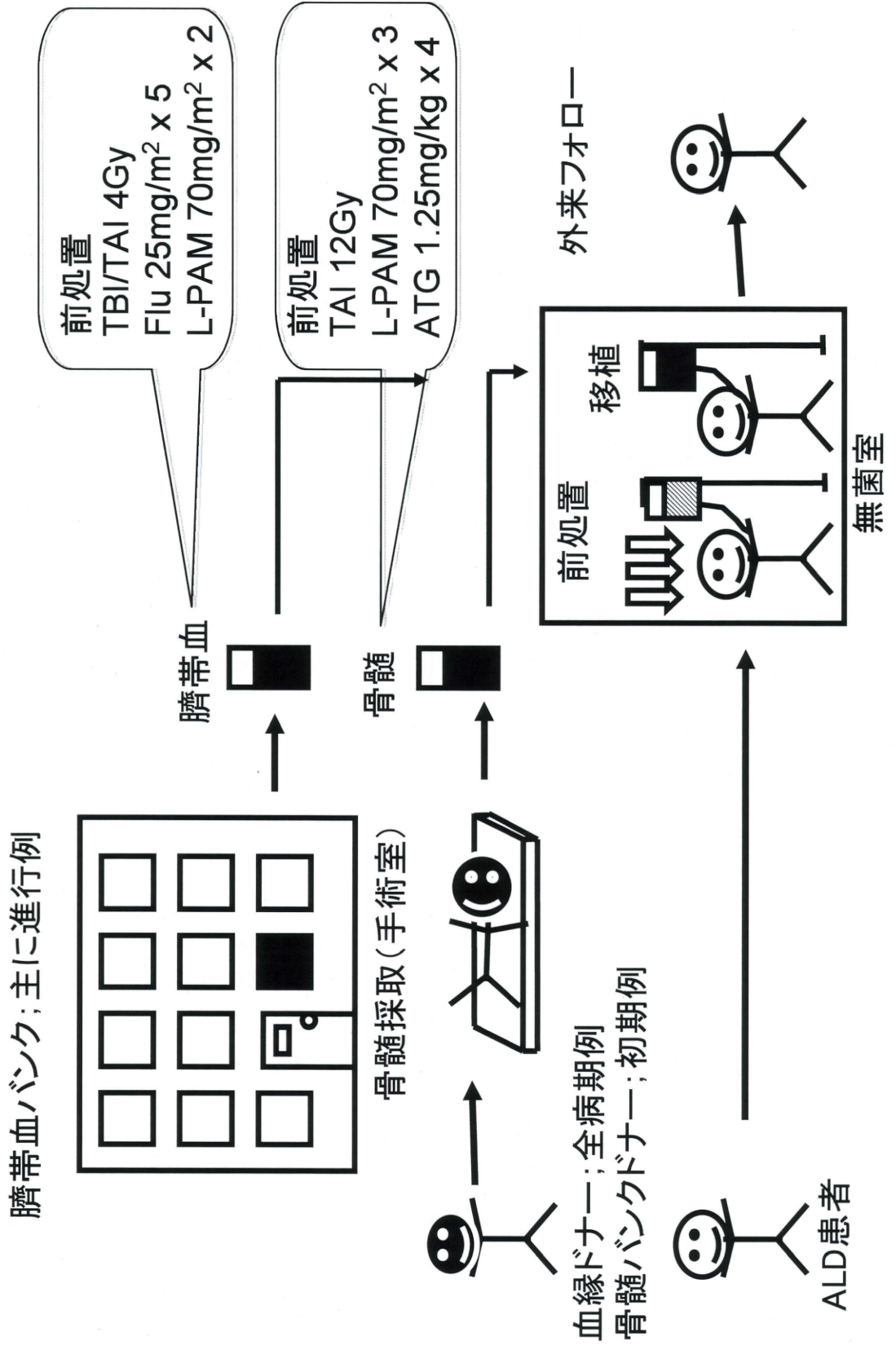
(特許取得・実用新案登録・その他)

なし

F. 健康危険情報

なし

ALDに対する同種造血細胞移植



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

小児大脳型 ALD 児の高次脳機能評価による診断ならびに治療効果判定に関する研究

分担研究者	加我 牧子	国立精神・神経センター精神保健研究所
研究協力者	稲垣真澄、 古島わかな 軍司敦子 後藤隆章 崎原ことえ 佐久間隆介 中村雅子	国立精神・神経センター精神保健研究所知的障害部 同上 同上 同上 同上 同上 同上、東京大学医学部耳鼻咽喉科

研究要旨

小児大脳型 ALD の早期診断に関わる臨床的課題について検討した。ALD は視覚症状や行動異常などで発症することが多いが、中枢性聴覚障害での発症例も知られている。このタイプは診断がより難しく、効果的な治療を行うための診断が遅れがちとなる。そこで聴覚性高次機能障害、特に聴覚失認を呈した ALD 児に対して神経心理学的検査に加えて神経生理学的検査を行い、その臨床特徴と特に有用な検査を明らかにした。聴覚失認を呈した ALD の評価に生理学的客観的指標は有効であり。治療後、臨床所見や MRI 所見が悪化していた症例で改善例がみられた。また家系内に ALD や AMN 症例があるにもかかわらず、近親者の発症リスクについて伝えられてない症例があり、早期診断・治療のチャンスを逃している症例もみられたことから未発症近親者にいつどのようにリスクを伝えるかについての見解を検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

ALD への造血幹細胞移植・遺伝子治療など治療法が確立しつつある現在、小児大脳型 ALD の早期診断による早期治療は重大な課題である。従って気づかれにくい状況を明らかにし、対応を考えることは臨床的に重要な課題である。

ALD では聴覚障害で病変が初発する場合は診断が難しく、診断が遅れがちで、学校生活やリハビリテーションに際し困難が倍加すると予想される。そこで聴覚性高次機能障害の早期診断と的確な治療効果判定、生活支援のため、聴覚失認を呈した ALD 児の臨床特徴と特に有用な検査方法を明らかにすることにした。また家系内に ALD や AMN 症例があっても近親者の発症リスクについて十分

伝えられていない症例があり、対策が必要と考えられたため、家族発症例の診断までの期間や兄弟例の特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

経過中に聴覚失認を呈した小児・思春期大脳型 ALD3 症例に対してすでに報告している心理学的・神経心理学的検査に加え、神経生理学的評価を行った。すなわち、耳音響放射(OAE)、聴性脳幹反応(ABR)、非言語音ならびに言語音による頭頂部緩反応 SVR、mismatch negativity(MMN)、P300 を測定した。このうち1例は治療前後の比較を行った。又この研究プロジェクトにより当センター病院を受診した 36 症例について家系内に発症者のある症例と発端者の診断までの時や臨床特徴につ

いて調査した。

(倫理面への配慮)

紹介もと病院での主治医の説明に加えて、当院来院時に患児および保護者に、上記検査について説明し、同意を得て検査を実施した。

C. 研究結果

初発症状に聴覚障害を呈した 3 症例の評価時年齢は 13 歳(術後は 14 歳)、11 歳、10 歳であった。いずれも純音聴力は正常で、語音聴力検査、環境音検査の成績が悪く、視覚的補助があると改善した。また OAE と ABR の V 波閾値は正常で、3 例中 2 例に脳幹伝導障害が認められた。SVR, MMN, P300 とも言語音への反応より、非言語音への反応の方がより不良であった。治療後 1 年を経た症例では MRI 所見は術前より脳が萎縮しており、臨床的聴覚障害も悪化していたが、MMN は言語音から出現し、明らかな改善所見と考えられた。聴覚失認を呈した ALD の評価に生理学的客観的指標は有効であり、特に治療後、臨床所見や MRI が悪化していた症例では神経生理学的検査に改善していた項目があった。これは治療の有効性や今後の改善を期待できるものとして意味があると考えられた。今後、治療前後の経過を追えた症例の蓄積と縦断的な検討が必要であり、より詳細な病態の推移を検証できるものと期待できる。ALD の家系発症 21 例と発端者 15 例の診断までの平均は 13.7 か月と 8.3 か月と差があった。前者の中に、近親者の発症リスクについて十分説明されていない症例があった。このような情報を何時どのような形で伝えるべきか研究班の中でも検討する必要があるとおもわれた。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Kaga M et al.: Early neuropsychological signs of childhood adrenoleukodystrophy (ALD). Brain Dev. 31: 558-561, 2009.

2. Furushima W et al.: Early Signs of Visual Perception and Evoked Potentials in Radiologically Asymptomatic Boys With X-linked Adrenoleukodystrophy. J Child Neurol 24: 927-935, 2009..

3. Kaga M, et al. Diagnosis of Auditory Neuropathy (AN) in Child Neurology. Kaga K, Starr A (ed.): Neuropathies of Auditory and Vestibular Eighth Cranial Nerves. Springer, pp123-133, 2009..

2. 学会発表

1. Kaga M: Auditory perception in patients with childhood adrenoleukodystrophy, Joint Symposium of Child neurology Germany-Japan 2008, Munich, September 9, 2008..
2. 古島わかな他: 小児大脳型 ALD の視覚性事象関連電位 P1 成分の検討 - 発症極早期診断における有用性 - . 第 50 回日本小児神経学会総会, 東京, 2008.5.29.
3. 古島わかな他. 聴覚失認で発症した小児・思春期大脳型副腎白質ジストロフィー 3 例の検討. 第 50 回日本小児神経学会, 米子, 2009 年 5 月
4. Kaga M et al. Auditory perception in Landau-Kleffner syndrome. 29th International Congress of Clinical Neurophysiology, Kobe, Japan. October 28-November 1, 2010.
5. 加我 牧子: 小児聴覚失認の治療 - Landau-Kleffner 症候群を中心に - . 第 55 回音声言語医学会総会・学術講演会, 東京, 2010.10.14.

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

該当なし

F. 健康危険情報 なし

小児大脳型ALDの早期治療のため の早期診断に関わる課題

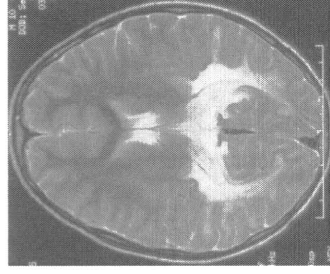
国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所
加我牧子、古島わかかな、稲垣真澄、軍司敦子、中村雅子

1. 聴覚失認での発症

- ★ 呼びかけへの反応性低下などで気づかれる
- ★ 耳鼻科を受診しても純音聴力検査・ABR正常のため、異常なしと判断されがちである
- ★ しかし純音聴力検査、ABRの結果の割には語音聴力、環境音認知は著しく低下する(聴覚失認)

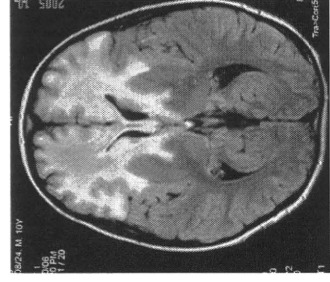
★ 年長児で、知能も保たれているため
疑えば検査ができ、診断できる

後頭型



視覚障害
運動機能障害
成績低下等 で発症

前頭型



落ち着きがなくなる
多動・注意力欠如
異常行動等で発症

聴覚障害に注目されず診断が遅れがち

2. 家族発症例の遺伝カウンセリングと臨床経過観察

発端者周囲の男児の発症リスクについて全く

知られてないか、またはは不十分な知識しかなく診断が遅れる場合がある

診断の遅れ→治療の遅れに直結
寝たきり・重症化・死へ

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造血細胞移植

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）の治療法としては造血細胞移植が唯一有効な治療とされており、発症例および未発症例に対して種々の移植細胞および前処置にて施行されている。これまで国内で実施された骨髄破壊的および骨髄非破壊的前処置による造血細胞移植を比較検討した結果、骨髄非破壊的前処置にて安全に施行でき、また臍帯血を用いた場合には緊急的移植に対応できるため今後の目指すべき方向性として妥当性が示唆された。

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くの症例に対して実施されてきた。しかし最近では骨髄非破壊的移植が骨髄のみならず臍帯血を用いて実施されている。この両者を比較し、至適前処置および移植細胞の選択につき検討する。

B. 研究方法

1. 症例：対象はこれまで骨髄破壊的移植が実施された 47 例と骨髄非破壊的移植がなされた 7 例である。

C. 研究結果

1) 骨髄破壊的移植症例：日本小児血液学会造血細胞移植委員会のデータを基に初回移植症例につき解析した。1988 年から 2005 年までに 47 例に対して造血幹細胞移植が施行され、ドナー及び移植細胞の種別は血縁者間 24 例（同胞間骨髄移植 20 例、母子間または父子間骨髄移植 3 例、同胞間

臍帯血移植 1 例）、および非血縁者間 23 例（骨髄移植 12 例、臍帯血移植 11 例）であった。前処置別移植結果は HLA 一致血同胞間骨髄移植では BU + CY ± ATG/TEPA (12 例)、L-PAM+TAI+ATG (4 例)、その他 1 例で、17 例中 12 例で生着生存中。HLA 一致同胞以外の血縁者間骨髄移植では L-PAM+TAI+ATG (4 例)、その他 2 例で、6 例中 4 例で生着生存中。非血縁者間骨髄移植では BU+CY+ATG ± TLI (6 例)、CY + TBI/TLI ± ATG (2 例)、L-PAM+TAI/TBI+ATG ± FL (3 例)、その他 1 例で、12 例中 8 例で生着生存中。非血縁者間臍帯血移植では BU + CY + ATG ± TEPA (3 例)、BU + CY + FL (2 例)、その他 6 例で、11 例中 3 例で生着生存中。以上のように血縁者間および非血縁者間の骨髄移植では比較的良好な結果が得られたが臍帯血移植においては不良であった。

2) 骨髄非破壊的移植

症例 1. (徳島大学小児科) 発症時および移植時年齢は 1 歳、移植前の神経症状は左

下肢の痙性。頭部 MRI score は 2.5。前処置は Flu, Mel, TBI (2Gy) で血清学的 6/6HLA 一致ドナーから非血縁者間骨髄移植を施行し、1年後のキメリズムはドナー100%であり、神経学的にも安定している。

症例 2 (岐阜大学小児科) 移植時 13 歳。移植前の神経症状は両側同名半盲と軽度の感音性難聴。MRI score は 4。移植前処置は Flu1, Mel, TBI (4Gy) で HLA 一致同胞より骨髄移植を施行した。移植後 14 ヶ月の時点では神経症状なし。

症例 3. (京都大学小児科) 発症時年齢は 7 歳、移植時年齢は 8 歳。移植時の頭部 MRI score は 11。前処置は Flu, Mel, TBI (4Gy)

(症例 4 も同様) で血清学的 6/6HLA 一致ドナーから非血縁者間臍帯血移植を施行した。移植後生着し、52 ヶ月を経て神経症状の進行はない。

症例 4. (京都大学小児科) 発症時年齢は 8 歳、移植時年齢は 9 歳。移植前の神経症状は歩行障害、発語及び嚥下困難で頭部 MRI score は 4。血清学的 6/6HLA 一致ドナーからの非血縁者間臍帯血移植を施行。生着が得られたが移植後 1 ヶ月で神経症状は進行。

症例 5 (当科) 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 score は 9。前処置は Fludarabine 25 mg/m²/d x 5days, Melphalan 70mg/m²/d x 2days, TBI 4Gy (症例 6, 7 も同様), GVHD 予防は MTX+prograf。ドナーは HLA8/8 一致非血縁者臍帯血。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 6 (当科) 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 score 11.5。GVHD 予防は MTX+ prograf、ドナーは HLA 5 /6 一致非血縁者臍帯血。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 7 (当科) 移植時 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 score は 9, GVHD 予防は MTX+ CsA、ドナーは HLA6/6 一致同胞から骨髄移植。移植後 day15 で生着し、急性 GVHD を認めず、移植後 3 ヶ月で視力低下、歩行可。

D. 考察

副腎白質ジストロフィーに対する造血細胞移植施行時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関連合併症および Busulfan 使用時の神経症状の進行が問題であった。しかしながら近年骨髄非破壊的移植が施行され、その臨床経過は、骨髄破壊的移植と同等、もしくは移植後の経過はむしろ良好との結果が得られたと考えられる。

E. 結論

ALD に対する造血細胞移植は Busulfan を投与せず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は多数症例における前向きな検討が必要と考えられる。

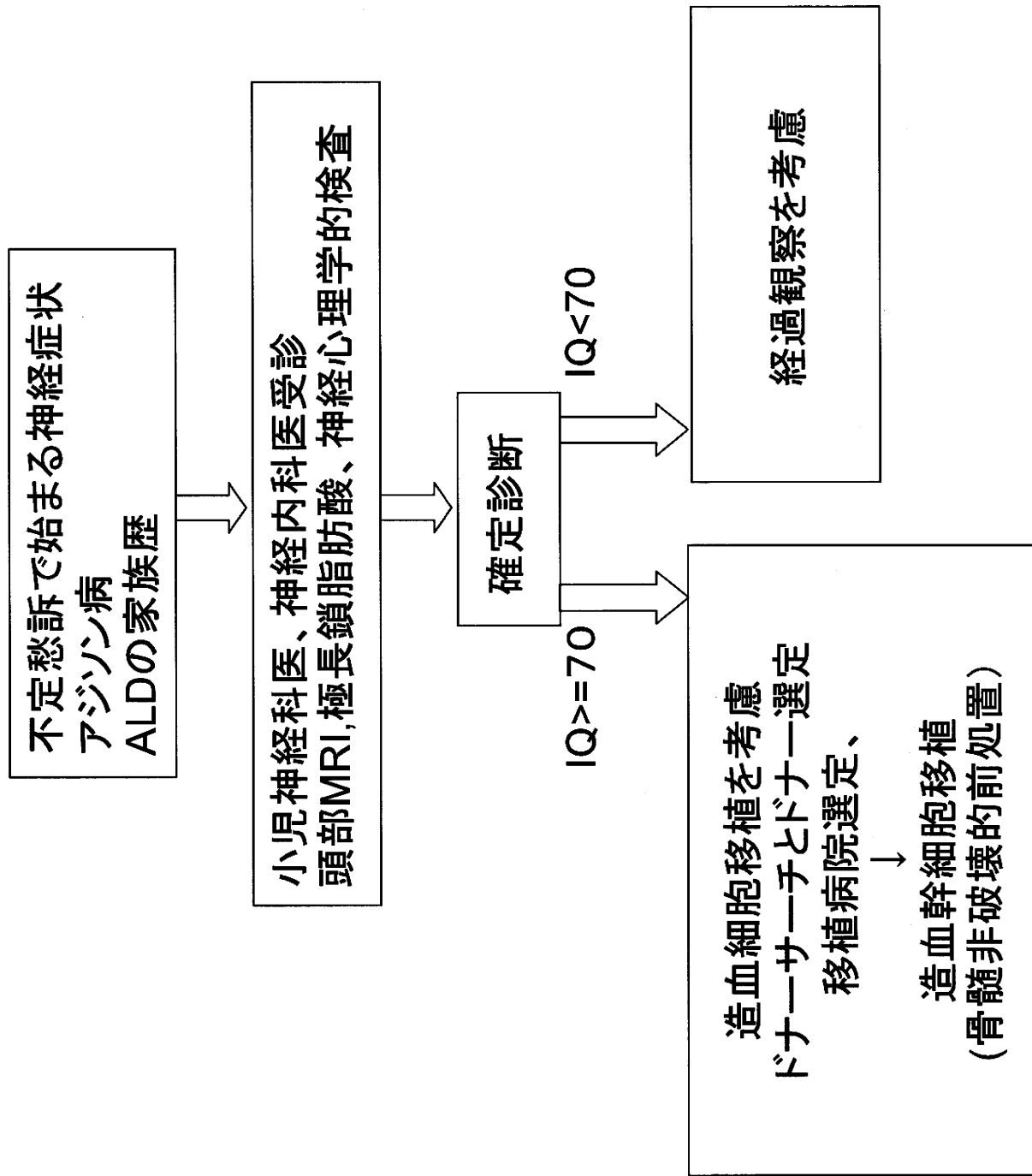
F. 研究発表

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、

G. 健康危険情報：なし。

H. 謝辞：本報告に際し、徳島大学小児科 渡辺力氏、岐阜大学小児科 小関道夫氏、京都大学小児科足立壮一氏に深謝いたします。

副腎白質ジストロフィーの診断と治療



運動失調症に関する調査研究

ALD 分子病態の解析

分担研究者 今中 常雄 富山大学大学院医学薬学研究部
研究協力者 守田 雅志 富山大学大学院医学薬学研究部

研究要旨

本研究計画では、副腎白質ジストロフィーの中樞神経系における極長鎖脂肪酸の蓄積と発病との関連性を解明するため、1) ABCD1 欠損マウス脳における脂肪酸延長反応の測定、2) 病態モデルマウスの作製と植物フラボノイド genistein の効果、3) 初代培養アストロサイトの極長鎖脂肪酸代謝と発病と関連する遺伝子発現について検討した。その結果、3 週齢のマウス脳ミクロソーム画分で極長鎖脂肪酸延長反応の増加傾向が認められた。一方、ゲニステイン投与による ABCD1 欠損マウス脳の極長鎖脂肪酸含量の低下は認められなかった。ABCD1 欠損マウス由来アストロサイトでは極長鎖脂肪酸代謝異常は認められたが、酸化ストレスや炎症反応に関わる遺伝子に有意な差は認められなかった。しかし、あるケモカインレセプターや細胞接着分子で有意な遺伝子発現の増加が確認された。これらの結果は、ALD の分子病態の解明に新たな手がかりになると期待される。

A. 研究目的

副腎白質ジストロフィー (ALD) に認められる極長鎖脂肪酸の異常蓄積は、中樞神経系における脱ミエリン化など神経変性の原因の一つと考えられる。しかし、その詳しい発病メカニズムは解明されていない。本研究では、ABCD1 欠損マウス脳における脂肪酸延長反応のアッセイ条件の確立、及び極長鎖脂肪酸蓄積に対する植物フラボノイド genistein の効果について検討した。また、ABCD1 欠損マウス由来アストロサイトの遺伝子発現解析を行い、中樞神経系における ABCD1 の役割について検討することを目的とした。

B. 研究方法

マウス脳の脂肪酸延長反応は、脳ミクロソーム画分を調製し、NADPH 存在下で放射性マロニル CoA から基質 (C16:0-CoA, C20:0-CoA) への放射活性の取り込みを測定することにより行った。ABCD1 欠損マウスへの genistein 投与実験は、3 週齢のマウス (体重約 20g) に、0%, 0.01%, 0.1% (w/w) の genistein (岐阜大学鈴木先生より供与) を含む粉餌 (AIN-93G 標準飼料) を 8 週間与えた。投与後、各組織 (血液、脳) の極長鎖脂肪酸含量を、ガスクロマトグラフィーにより定量した。

一方、マウス脳により調製した混合グリア細胞から、プラスチックシャーレへの吸着性の違いを利用

してミクログリアを除去し、初代培養アストロサイトの分離培養を行った。極長鎖脂肪酸の β 酸化活性は、 $[1-^{14}\text{C}]$ C24:0 を基質として細胞とインキュベートし、酸可溶性画分への放射活性の取り込みを測定することにより行った。遺伝子発現解析は DNA チップおよびリアルタイム PCR により行った。

C. 研究結果と考察

1) マウス脳における極長鎖脂肪酸含量と延長反応
生後 3 週令の ABCD1 欠損マウス脳では、極長鎖脂肪酸蓄積の指標である C26:0/C22:0 値が野生型に比べ約 3 倍増加していた。マウス脳から調製したミクロソーム画分について、脂肪酸延長反応のアッセイ条件を確立した。このアッセイ条件では活性は 3 週令で最も高く、それ以降は急激に減少した。生後 3 週令の ABCD1 欠損マウス脳では野生型に比べ脂肪酸延長反応の増加傾向が認められた。

2) Genistein 投与による極長鎖脂肪酸蓄積に対する効果

生後 3 週令のマウスに genistein を 8 週間投与した。血清ならびに脳における極長鎖脂肪酸含量 (C26:0/C22:0) を測定した結果、投与群において有意な低下は認められなかった。今後、投与量ならびに投与期間等の検討が必要である。

3) ABCD1 欠損マウス由来初代培養アストロサイト

における脂質代謝異常

ABCD1 欠損マウス脳から分離培養したアストロサイトでは、野生型に比してリグノセリン酸の β 酸化活性は40%程度減少していた。また極長鎖脂肪酸含量(C26:0/C22:0)は野生型に比して約2倍程度増加していた。一方、放射性リグノセリン酸のコレステロールエステルやトリアシルグリセロールへの取り込み増加が認められた。以上のことから、初代培養アストロサイトにおいてもALD患者脳で認められる極長鎖脂肪酸 β 酸化活性の減少と含量の増加が認められ、また中性脂質への極長鎖脂肪酸の取り込みの増加が起こっていると推察された。

4) ABCD1 欠損マウス由来初代培養アストロサイトの遺伝子発現解析

DNAチップによる網羅的な遺伝子解析を行い、その結果をもとにいくつかの遺伝子についてリアルタイムPCRによる解析を行った結果、酸化ストレス関連遺伝子、炎症反応関連遺伝子、小胞体ストレス関連遺伝子に発現の増加は認められなかった。一方、ケモカインレセプターの一つであるDarc遺伝子やCadm3遺伝子の特徴的な発現増加が確認された。

5) 考察

脳における極長鎖脂肪酸含量の低下は、発病を抑える化合物を探索する上でひとつの指標となる。極長鎖脂肪酸の分解系を増加、もしくは合成系を抑制する化合物が有効と考えられ、植物フラボノイドの中には、このような活性をもつ化合物が存在する可能性がある。今回genistein投与では効果が認められなかったが、今後、マウス脳ミクロソーム画分の脂肪酸延長反応活性を指標にして、この活性を阻害する植物フラボノイドを探索することが可能と考えられる。

ABCD1 欠損マウス由来アストロサイトにおいては炎症性サイトカインや酸化ストレス遺伝子の増加は認められなかった。アストロサイトではABCD1機能欠損が直接発病とは関係していないが、ケモカインや様々な刺激に対する反応性に違いがある可能性が推察された。

D. 結論

ABCD1 欠損マウスの極長鎖脂肪酸蓄積に対するgenistein投与による効果は認められなかったが、極長鎖脂肪酸延長反応のアッセイ系を利用して、極

長鎖脂肪酸合成系を抑制する化合物の検討も可能となった。一方、ABCD1 欠損マウスから調製した初代培養アストロサイトでは炎症性サイトカインや酸化ストレスに関わる遺伝子の発現増加は認められなかった。しかし、発現増加が認められたDarc遺伝子やCadm3遺伝子については、遺伝子発現増加の機構やアストロサイトにおける役割について検討することにより、発病の手がかりになることが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morita M., Kanai M., Mizuno S., Iwashima M., Hayashi T., Shimozawa N., Suzuki Y., and Imanaka T.: Baicalein 5, 6, 7-trimethyl ether activates peroxisomal but not mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J. Inherit. Metab. Dis.* 31, 442-449, 2008.
- 2) 守田雅志, 今中常雄: 極長鎖脂肪酸代謝と疾患. *生化学*, 80, 434-439, 2008.
- 3) Kashiwayama Y., Seki M., Yasui A., Murasaki Y., Morita M., Yamashita Y., Sakaguchi M., Tanaka Y. 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH_2 -terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins. *Exp. Cell Res.* 315, 190-205, 2008.
- 4) Sato Y., Shibata H., Nakatsu T., Nakano H., Kashiwayama Y., Imanaka T., and Kato H.: Structural basis for docking of peroxisomal membrane protein carrier Pex19p onto its receptor Pex3p. *EMBO J.* 29, 4083-4093, 2010.
- 5) Kashiwayama Y., Tomohiro T., Narita K., Suzumura M., Glumoff T., Hiltunen J. K., Van Veldhoven P. P., Hatanaka Y., and Imanaka T.: Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal β -oxidation enzyme by photoaffinity labeling with a novel palmitoyl derivative. *J. Biol. Chem.* 285, 26315-26325, 2010.
- 6) Woudenberg J., Rembacz P. K., Hoekstra M., Pellicoro A., van den Heuvel F. A. J., Heegsma J., van IJzendoorn S. C. D., Holzinger A., Imanaka T., Moshage H., and Faber K. N.: Lipid rafts are essential for peroxisome biogenesis

in HepG2 cells. *Hepatology* 52, 623–633, 2010.

- 7) Morita M, Shimozawa N, Kashiwayama Y, Suzuki Y, and Imanaka T.: ABC Subfamily D proteins and very long chain fatty acid metabolism as novel targets in adrenoleukodystrophy. *Curr. Drug Targets. (in press)*

2. 学会発表

- 1) 守田雅志, 岩島誠, 林利光, 下澤伸行, 鈴木康之, 今中常雄: 植物フラボノイド Baicalein 5, 6, 7-trimethyl ether はペルオキシソームの脂肪酸 β 酸化を活性化する. 日本薬学会第128年会, 2008, 3, 27, 横浜.
- 2) 小松史明, 守田雅志, 田村文, 渡辺志朗, 下澤伸行, 今中常雄: ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 機能欠損における極長鎖脂肪酸蓄積の分子機構. 第31回日本分子生物学会、第81回日本生化学会合同大会. 2008, 12, 9, 神戸.
- 3) 守田雅志, 今中常雄: U87 グリオブラストーマ細胞におけるペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 機能欠損によるコレステロール代謝異常. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会. 2008, 12, 12, 神戸.
- 4) Morita M., and Imanaka T.: Stable knock-down of ABCD1 up-regulate cholesterol synthesis in human glioblastoma U87 cells. The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences: Bioactive Lipid Molecules and Transporters, 2009, 5, 25, Tokyo.
- 5) 川道美里, 小松史明, 守田雅志, 渡辺志朗, 今中常雄: ペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 ABCD1 欠損マウス脳の脂肪酸伸長反応. 第82回日本生化学会大会, 2009, 10, 22, 神戸.
- 6) 守田雅志, 今中常雄: Silencing of ABCD1, a peroxisomal ABC protein, led to a perturbation of cholesterol metabolisms in human glioblastoma cells. 第82回日本生化学会大会, 2009, 10, 22, 神戸.
- 7) Morita M., Kawamichi M., Shimura Y., Taniguchi N., and Imanaka T.: Impact of ABCD1, a peroxisomal ABC protein, on very long chain fatty acid and cholesterol metabolisms in astrocytes. 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2009, 12, 1, 大阪.
- 8) Imanaka T.: Organelle selective targeting of ABC subfamily D proteins: Importance of NH₂-terminal hydrophobic motifs. 3th FEBS Special Meeting: ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases (invited lecture). 2010, 2, 27–3, 5, Innsbruck, Austria.
- 9) 西澤千穂, 永井徹, 池田和貴, 守田雅志, 唐沢健, 原田史子, 佐藤典子, 中西広樹, 田口良, 下澤伸行, 今中常雄, 井上圭三, 横山和明: ペルオキシソーム病の繊維芽細胞に存在する極長鎖脂肪酸含有脂質の分子構造解析. 日本薬学会第130年会, 2010, 3, 28–30, 岡山.
- 10) 横山和明, 西澤千穂, 池田和貴, 永井徹, 守田雅志, 原田史子, 佐藤典子, 唐沢健, 今中常雄, 下澤伸行, 田口良: ペルオキシソーム病の繊維芽細胞に蓄積する極長鎖脂肪酸含有脂質. 第52回日本脂質生化学会, 2010, 6, 14–15, 渋川.
- 11) 志村裕介, 川道美里, 谷口範壮, 新保沙織, 渡辺志朗, 守田雅志, 今中常雄: 野生型および ABCD1 欠損マウス脳における極長鎖脂肪酸延長反応と関連タンパク質 ELOVL1 の発現. 日本薬学会北陸支部第122回例会, 2010, 11, 21, 金沢.
- 12) 新保沙織, 志村裕介, 守田雅志, 今中常雄: マウス脳由来初代培養アストロサイトのペルオキシソーム膜タンパク質 ABCD1 欠損による代謝変動の解析. 日本薬学会北陸支部第122回例会, 2010, 11, 21, 金沢.
- 13) 新保沙織, 志村祐介, 守田雅志, 渡辺志朗, 今中常雄: ABCD1 欠損マウス由来アストロサイトを用いた ALD 分子病態の検討. 第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会合同大会, 2010, 12, 7–10, 神戸.
- 14) 西澤千穂, 永井徹, 池田和貴, 守田雅志, 唐沢健, 原田史子, 佐藤典子, 中西広樹, 田口良, 下澤伸行, 今中常雄, 井上圭三, 横山和明: ペルオキシソーム病の繊維芽細胞にみられる極長鎖脂肪酸含有脂質の分子構造決定. 第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会年会合同大会, 2010, 12, 7–10, 神戸.

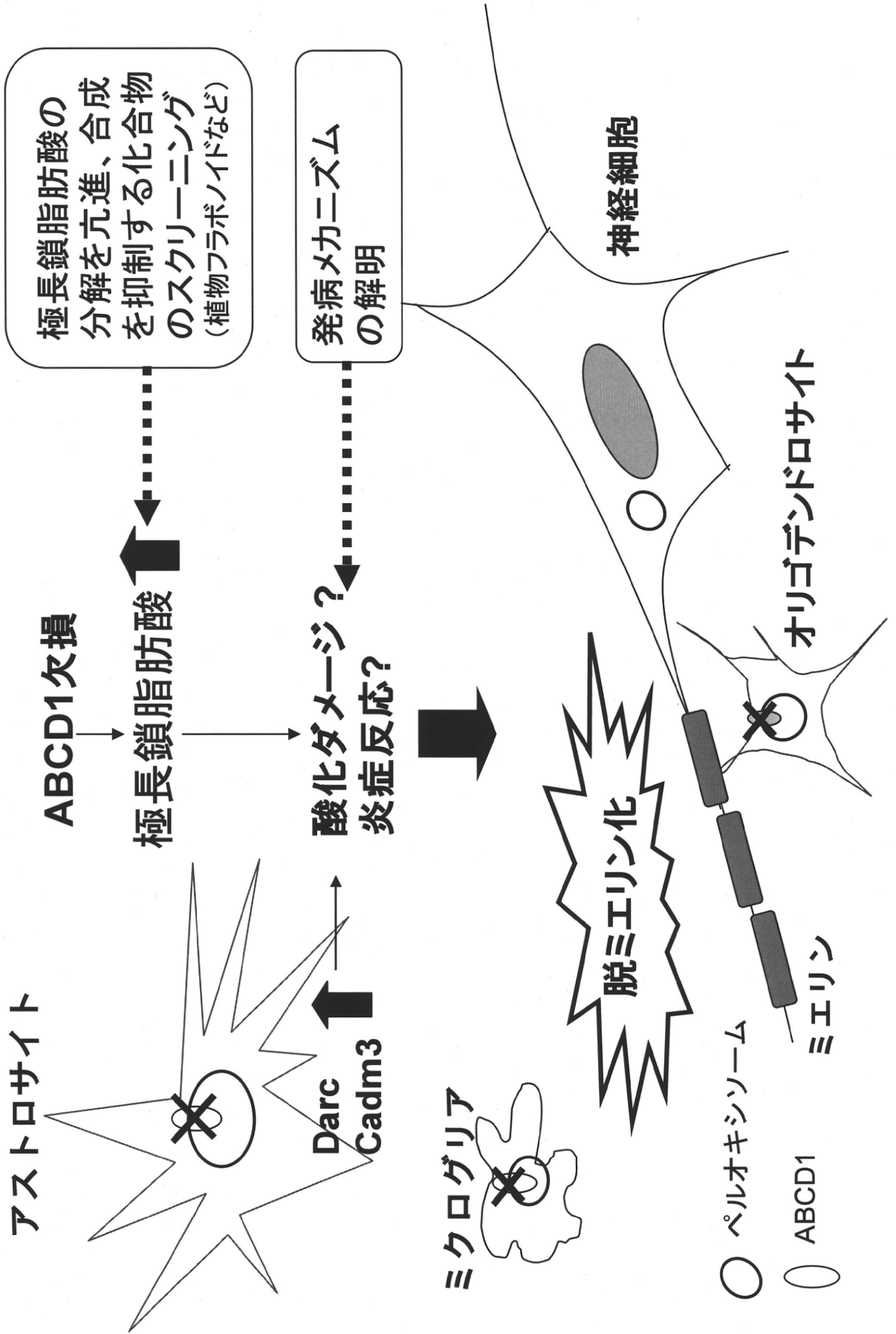
F. 知的所有権の出願・登録状況

なし

G. 健康危険情報

なし

ALD分子病態の解明と極長鎖脂肪酸代謝を指標とした治療薬開発



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)の原因同定と残る「原因未同定」SCD の臨床像

<p>分担研究者 研究協力者</p>	<p>水澤英洋 石川欽也 網野猛志 佐藤 望 石黒太郎 新美祐介 高橋 真 大林正人 小林千浩 戸田達史 浅川修一</p>	<p>東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科) 神戸大学大学院医学系研究科神経内科 神戸大学大学院医学系研究科神経内科 慶応義塾大学医学部分子生物学(現 東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物工学)</p>
--------------------------------------	---	---

研究要旨

第 16 番染色体長腕に連鎖する脊髄小脳変性症(16q-ADCA; OMIM # 117210)は、我国の優性遺伝性脊髄小脳変性症では Machado-Joseph 病, SCA6, DRPLA 等と並んで頻度が高い疾患と考えられる。我々は約 900(kb: キロベース)の候補ゲノム領域について、1)患者ゲノム由来の候補領域につき、サザンブロット解析を行うとともに、2)患者ゲノム由来に BAC clone contig を構築し、そのショットガンシーケンスを完了し、網羅的に遺伝子変化を同定した。その結果、サザンブロットングにて、患者ゲノムに特異的な 2.5~3.8kb の挿入配列を見出した。この挿入配列は長さが長いほど発症年齢が若くなる傾向を見出し、統計的に有為であった。挿入配列は(TGGAA)_n を中心とする 5 塩基配列で構成され、何らかの動原体からの挿入が示唆された。また、患者脳 Purkinje 細胞の核内に転写産物が凝集する所見を認めた。長らく原因が不明であった、第 16 番染色体長腕連鎖型優性遺伝性脊髄小脳変性症は、(TGGAA)_n を中心とする 5 塩基配列の挿入変異で起きると考えられ、新しく脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)と命名し、誌上報告した(Sato N. & Amino T. et al. *Am J Hum Genet* 85 (5): 544-557, 2009)。平成 22 年度我々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、今なお原因が未同定である優性遺伝型 SCD の臨床像を明らかにした。その結果、未同定 SCD は全体の 14% を占め、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。第 16 番

染色体長腕に連鎖する脊髄小脳変性症(chromosome 16q22.1-linked ADCA; OMIM # 117210)は、我国の優性遺伝性脊髄小脳変性症で、Machado-Joseph 病、脊髄小脳失調症 6

型(SCA6), 齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)等と並んで頻度が高い疾患である。臨床的には平均 56 歳程度で体幹失調による歩行障害で発症し, 長期に経過しても純粋小脳失調症の範疇に留まる神経障害を呈することが多い。

我々は平成 19 年度までに本病型には強い創始者効果があり, 日本中の患者が単一ハプロタイプを示していることを見出した。また, 多数の家系で共通するハプロタイプの領域を解析し, 原因遺伝子変異の存在する候補領域として, ゲノム上の約 900kb の範囲を同定した。この候補領域内に登録されている全ての遺伝子のゲノム領域について解析をおこなったが, 本疾患の原因変異は明らかとならなかった。本疾患患者では健常者にはない特異的なハプロタイプを持つことから, 16q-ADCA と診断されている患者のハプロタイプ(または特異的アレル)の有無をショットガンシーケンスおよびサザンブロッティングで検索したところ, 昨年度患者に特有な遺伝子変化を3つに絞り込んだ。平成 20 年度から 21 年度は, 疾患の原因となる遺伝子変異を決定する最終段階を行った。

平成 22 年度は, 16q-ADCA(新規病名: 脊髄小脳失調症 31 型(SCA31))の原因同定から先に研究を進め, SCA31 を除くと残る「原因未同定の優性遺伝性 SCD」はどのような臨床像を呈し, かつその頻度がどの程度であるかを明らかにし, 今後の我が国の SCD に関する研究に資することを目標とした。

B. 研究方法

SCA31 遺伝子探索研究: ゲノム上の候補領域をホモ接合体で本疾患のハプロタイプをもつ患者の末梢血液からリンパ芽球を作製し, そのゲノム DNA を解析した。

患者ゲノムからすでに報告した方法(Ishikawa K. & Toru S. et al. Am J Hum Genet 77 (2): 280-296, 2005) に従って, 候補領域をカバーするように cosmid contig を作製してプローブを用意しサザンブロッティングを行い, 数百 bp 以上の大きなゲノムの挿入や欠失の

検索をサザンブロット法で行った。

また, ホモ接合体患者 DNA から BAC/fosmid ライブラリーを作製しショットガンシーケンスを行うことで, 患者の候補領域のゲノム塩基配列の完全解読を行った。これらの結果をデータベース(NCBI build 36.2)や日本人の正常対象例と比較を行い, 疾患特異的な配列変化を検出した。

さらに, 明らかとなった配列の変化について, 多数の失調症家系での検討を行った。

未同定遺伝性 SCD の疾患頻度と臨床像の

解析: 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。

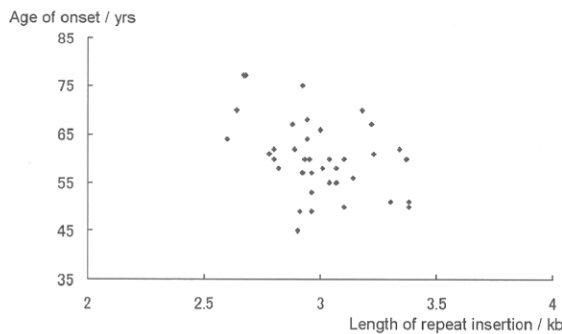
C. 研究結果

SCA31 遺伝子探索研究: 候補領域について, 完全にサザンブロッティング法で解析したところ, 1 か所のみ患者と対照者間で矛盾なく segregate する遺伝子変化を見出した。これは, 患者ゲノムに認められる 2.5～3.8kb 程度の長さのある「挿入」であった。この他の残る 2 か所のうち, 1 か所は患者と対照者では segregate しないことが判明して棄却, 残る 1 か所は遺伝子 *TK2* (thymidine kinase 2) のイントロンにある 1 塩基置換であり, 病態への寄与は否定的で

あった。このため、挿入配列に焦点を絞った。

患者に見られた挿入の長さは、同一家系内ではほぼ同じであったが、家系間では長さが異なっていた。詳細に検索すると、発症年齢が若い患者では、同じ家系内の他の患者よりも挿入長が長いという所見を稀ながら見出した。

一方、発症年齢が確かであった 39 症例について解析したところ、下図の様に挿入の長さが長いほど発症年齢が若くなる傾向を見出した。この傾向を Pearson の方法で統計的解析すると、その有為性が証明された($r=-0.41$, $p=0.01$)。



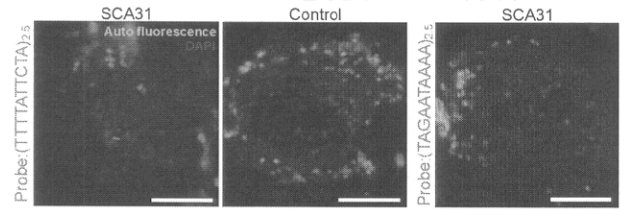
挿入箇所内の内部配列を確認したところ、通常のシーケンスでは読み切れない 5 塩基繰り返し反復の複雑な複合体であることが判明した。

一方、健常者集団では 630 人のゲノムを解析したところ、わずか 3 染色体で同じ個所に患者より小さい挿入を見出したのみであった。さらにこの挿入配列には (TAGAA) n と (TAAAA) n は見出したものの、(TGGAA) n は一切見出されず、患者では (TGGAA) n が特異的配列であると考えられた。

挿入箇所は、ゲノムデータベースでは何らの遺伝子とも関わりがない領域であることが示された。しかし、隣接する遺伝子 *BEAN* (brain expressed, associated with Nedd4) と *TK2* の下流にそれぞれ複数のエクソンがあり、挿入箇所はこれら 2 つの遺伝子が共有するイントロンに存在することが示唆された。*BEAN* と *TK2* は逆方向に転写され、前者は脳特異的に、後者は多くの組織で発現するものの、脳では手低い量しか発現していないことが判明した。

さらに患者でこの挿入配列が転写されているかどうかをオリゴプローブを用いて検索した。その結果、患者の Purkinje 細胞の核には *BEAN* 方向に転写された挿入配列が、特異的

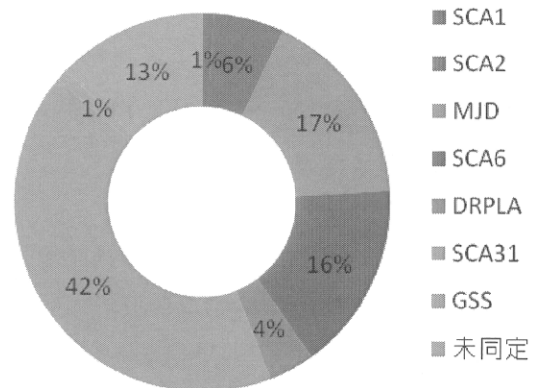
に凝集していることを見出した(図)。



以上のことから、16q-ADCA(新規病名: SCA31)は、患者に特有の挿入配列が、脳で発現し、転写の後に核内で凝集している所見を見出した。ゲルシフトアッセイでは、この配列には細胞の機能に必須のスプライス因子 SFRS (splicing factor, arginine/serine-rich) 1 や SFRS9 が吸着する可能性を我々は見出している。したがって、患者の Purkinje 細胞などでは SFRS1 や SFRS9 が挿入配列の転写産物で形成される凝集体に没収 (sequester) され、量が減少することでスプライス機構に影響を与え、神経細胞の機能障害がおこる可能性を推察している。しかし、正確な病態は不明であり今後は適切なモデル細胞・モデル動物を作製し、その病態の全容を究明してゆきたいと考えている。

未同定遺伝性 SCD の疾患頻度と臨床像の解析:

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