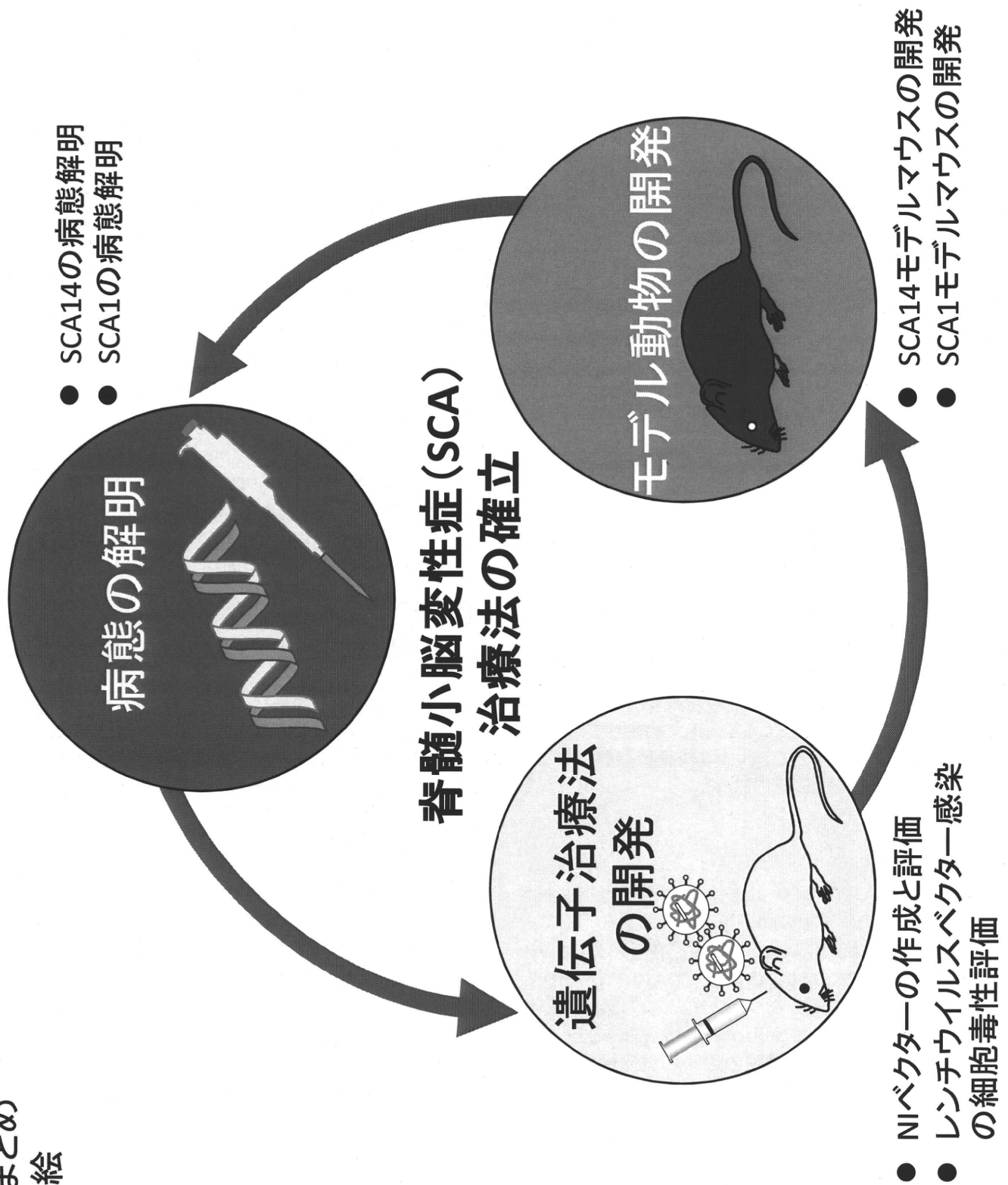


3年分まとめ
ポンチ絵



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

- I. SCA8 リピートの生物学的特性と病原性に関する研究
- II. SCA10 AUUCU RNA foci の解析
- III. 多系統萎縮症の診断におけるアルギニン負荷試験の有用性について

分担研究者	池田佳生	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学
研究協力者	出口健太郎	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学
	黒崎辰昭	名古屋大学神経遺伝情報学、University of Rochester
	大野欽司	名古屋大学神経遺伝情報学
	松浦 徹	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学
	阿部康二	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学

研究要旨

基礎研究として、原因遺伝子変異が同定されながらも未だ分子病態が明らかにされていない SCA8 および SCA10 を対象として研究を行った。伸長 SCA8 リピートの病態への関与を明らかにするため、複数の SCA8 家系におけるリピート領域の DNA 構造を比較・検討した結果、SCA8 家系の浸透率および病原性に関係する可能性のある遺伝的因子として、伸長 SCA8-CTG・CAG リピート内の CCG・CGG 挿入を見出した。

また、SCA10 における RNA レベルの分子病態については、SCA10 患者由来リンパ芽球に伸長 AUUCU リピートの核内凝集体 (AUUCU foci) を確認した。さらに伸長 AUUCU リピートに結合し、AUUCU foci と共局在する 4 種の核タンパクを同定した。

臨床研究として、多系統萎縮症 (MSA) と他の神経変性疾患との鑑別診断における、アルギニン負荷試験の surrogate marker としての臨床的有用性について検討を行った。結果的に、パーキンソン病に比べて MSA においてアルギニン負荷試験での GH 分泌低反応を認めたが、海外での報告ほど顕著ではなく、MSA の鑑別診断におけるアルギニン負荷試験の有用性については疑問があると思われた。

A. 研究目的

- I. SCA8 CTG・CAG リピートの生物学的特性および、その病態との関連を明らかにする。
- II. SCA10 AUUCU foci の核内局在と AUUCU リピート結合タンパクを検討し、SCA10 RNA 病態を明らかにする。
- III. MSA 診断における surrogate marker としてのアルギニン負荷試験の臨床的有用性を検討する。

B. 研究方法

- I. 伸長 SCA8 リピート陽性の 37 家系を対象として、SCA8 リピート周辺の DNA 構造を比較・検討し、小脳失調症の浸透率と関連する遺伝的因子を解析した。また、家系内発症者数の

多い SCA8 家系に共通して認めた遺伝的因子を培養細胞に導入し、形態学的・生化学的に解析した。

II. SCA10 リンパ芽球を用いて RNA-FISH で核内 AUUCU foci を検出後、その核内局在を明らかにするために免疫蛍光法を組み合わせることで各種タンパクとの共局在を検討した。また、核タンパクを抽出し、AUUCU-pull down 法と質量分析法を応用して AUUCU リピート結合タンパクを検索した。

III. 2007 年から 2010 年に岡山大学病院神経内科に入院した MSA-C 28 例、MSA-P 15 例、パーキンソン病 (PD) 18 例、進行性核上性麻痺 (PSP) 19 例の計 80 例を対象とした。アルギニン負荷試験は、負荷前の採血後、10% L-アル

ギニン HCL 溶液 5ml/kg 体重(最大 300ml)を 30 分間かけて経静脈投与後 30 分、60 分、90 分で採血を施行し、血清 GH 濃度を測定した。経時的な GH 分泌反応を疾患群ごとに比較し、罹病期間、臨床症候、臨床的重症度との関連についても検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は 3 省指針を遵守し、同意を得て行われている。

C. 研究結果

I. 家系内発症者数の多い SCA8 家系においては、伸長 SCA8-CTG・CAG リピート内に複数の CCG・CGG の三塩基挿入を共通して認めた。また、この伸長 SCA8 リピートを強制発現させた培養細胞においてはポリグルタミンの細胞内分布が変化し、核内に集積する像を認めた。

II. AUUCU foci は傍核小体/エクソソームに局在し、AUUCU リピート結合タンパクとして MATRN3、PSF、p54nrb、PTBP1 の 4 つを同定し、これらと AUUCU foci との共局在を確認した。

III. PD 患者に比べ、MSA 患者においてアルギニン負荷後 30 分で有意な GH 分泌低反応を認めたが、海外からの報告にあったほどの低反応ではなかった。しかしながら、MSA の罹病期間や重症度と GH 刺激反応との間に相関を認めない点は海外での報告と一致していた。また、MSA 群よりも PSP 群においてより高度の低反応を認めた。

D. 結論

I. 伸長した SCA8-CTG・CAG リピート内の CCG・CGG 挿入は SCA8 の浸透率と関係し、より強い病原性に関与している可能性がある。

II. SCA10 AUUCU foci と結合する 4 つの核タンパクを同定した。これらのタンパクの SCA10 分子病態への関与が想定された。

III. MSA においてアルギニン負荷試験における GH 分泌低反応を認めたが、海外からの報告ほど顕著ではなく、本研究の結果からは MSA の鑑別診断における surrogate marker としてのアルギニン負荷試験の有用性については疑問があると思われた。

E. 研究発表

1. 論文発表

Bidirectional expression of the SCA8 expansion mutation: one mutation, two genes. Ikeda Y, Daughters RS, and Ranum LP. *Cerebellum* 7 (2008) 150-158.

A small trinucleotide expansion in the TBP gene gives rise to a sporadic case of SCA17 with abnormal putaminal findings on MRI. Watanabe M, Monai N, Jackson M, Yamamoto-Watanabe Y, Ikeda Y, Suzuki C, Tomiyama M, Kawarabayashi T, Kimura T, Seino Y, Wakasaya Y, Miki Y, Matsubara E, and Shoji M. *Intern. Med.* 47 (2008) 2179-2182.

RNA gain-of-function in spinocerebellar ataxia type 8. Daughters RS, Tuttle DL, Gao W, Ikeda Y, Moseley ML, Ebner TJ, Swanson MS, Ranum LP. *PLoS Genet.* 5(8): e1000600 (2009).

Prevalence of autosomal dominant cerebellar ataxia in Aomori, the northernmost prefecture of Honshu, Japan. Yamamoto-Watanabe Y, Watanabe M, Hikichi M, Ikeda Y, Jackson M, Wakasaya Y, Matsubara E, Kawarabayashi T, Kannari K, Shoji M. *Intern Med.* 2010; 49: 2409-2414.

2. 学会発表

池田佳生ら. SCA8 の浸透率と関連する遺伝的因子の解析. 第 49 回日本神経学会総会, 2008 年 5 月 16 日, 横浜.

池田佳生ら. SCD における上肢協調運動障害の数量化測定装置の開発. 第 50 回日本神経学会総会, 2009 年 5 月 20 日~22 日, 仙台.

池田佳生ら. 運動失調症の治療開発研究への応用をめざした上肢協調運動障害の数量化測定装置の開発. 第 28 回日本神経治療学会総会, 2010 年 7 月 16 日, 横浜.

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

なし

G. 健康危険情報

なし

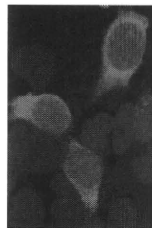
・平成20年度・平成21年度： SCA8およびSCA10の分子病態研究

* SCA8の浸透率および病態への関与を修飾する遺伝的因子

伸長SCA8リピートの病原性に関係する遺伝的因子として、伸長SCA8-CTG・CAGリピート内のCCG・CGG挿入を見出した。

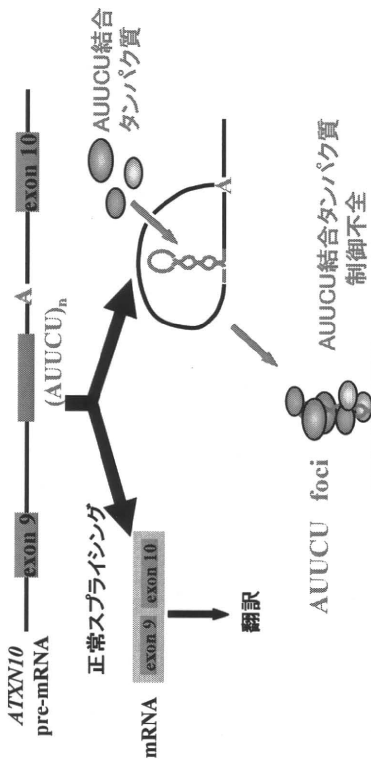


CCG・CGG挿入あり

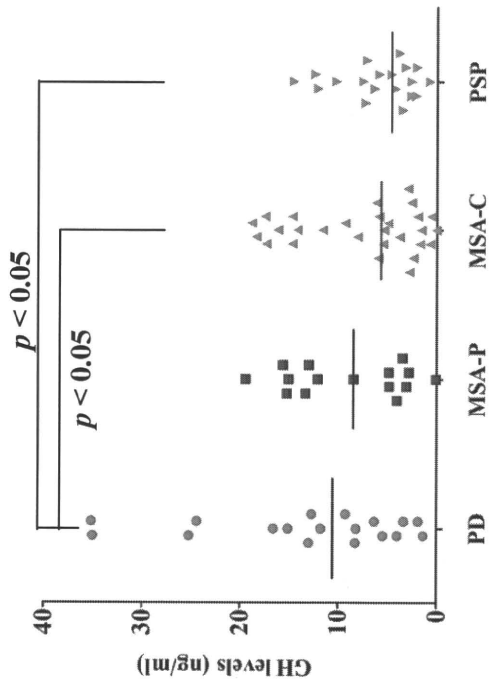


CCG・CGG挿入なし

* 想定されるSCA10の分子病態



・平成22年度： MSA診断におけるアルギニン負荷試験の有用性について



多系統萎縮症(MSA)ではアルギニン負荷試験における成長ホルモン(GH)分泌低反応を認めたと、海外での報告ほど顕著ではなく、MSAの鑑別診断におけるアルギニン負荷試験の surrogate markerとしての有用性については疑問があると思われる。

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

運動失調症の病態機序における細胞内輸送機能の検討

分担研究者	吉良潤一	九州大学大学院医学研究院神経内科学
研究協力者	栄 信孝	同上
	大八木保政	同上

研究の要旨

我々はMJD/SCA3の病態における神経機能障害に着目し、神経機能障害の基盤として細胞内輸送機能障害が存在すると仮説し、MJD 155polyQを過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスを用いた解析を行っている。ハエの系ではユビキチン伸長因子でE4Bがポリグルタミン毒性を抑制することが知られるため、マウス個体でも病態に関与するか、E4B欠損ヘテロマウスおよびE4B過剰発現マウスとの交配による病態解析も継続している。E4BはMJD 155QTgマウス脳において発現が上昇していた。一方、病態の分子機序について細胞内輸送障害による神経機能障害を仮説し、検討した。細胞内輸送に重要とされるRab familyについて、少なくとも検討したRab1, 4, 5, 6, 8に関しては蛍光免疫染色、ウェスタンブロット解析により明らかな違いは認めなかった。細胞内輸送に中心的な役割をもつゴルジ体について主に検討したところ、ゴルジ体の断片化は6-7ヶ月の発症早期から10ヶ月齢Tgマウス脊髄前角細胞において認められた。その分子機序について検討し、6-7ヶ月齢の発症早期において、ゴルジ体構造に重要と考えられるVCI135分子はTgマウス脊髄のウェスタンブロット解析で増加を認め、また蛍光免疫染色により脊髄前角細胞における局在変化もみとめた。さらに、ゴルジ体関連分子であるGrasp65に関しても10ヶ月齢脊髄前角細胞において局在変化が示唆された。現在、ゴルジ体構造異常およびゴルジ体を構成する因子についてさらに検討し、それらの病態における意義と細胞内輸送機能障害との相関について解析をすすめている。発症早期の変化を免疫学的、生化学的解析などにより明らかにすることで神経機能異常の分子基盤を明らかにしていく必要がある。

A. 研究目的

MJD/SCA3における神経機能異常と細胞内輸送機能異常との関連を検討する。

B. 研究方法

MJD 155polyQ 遺伝子を mPrP promotor 下で過剰発現するオスのトランスジェニックマウスを作製した。(Tg)および、その同胞である非トランスジェニックマウス(NTg)において、行動学的検討を行った。また、経時的な組織学的および生化学的解析を5ヶ月、7ヶ月、10ヶ月齢NTgおよびTgマウス脳および脊髄において比較検討を行った。マウス個体におけるE4Bとポリグルタミン鎖毒性との関与について交配による検討も行う一方、ウェスタンブロット解析によりE4Bの発現量変化をMJD Tgマウス脳において検討した。特に細胞内輸送機能において重要とされるRab familyについては、抗Rab1, 4, 5, 6, 8抗体を用いて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。また、細胞内輸送に中心的な役割をもつゴルジ体に着目し、その関連タンパクについて免疫染色およびタンパク発現解析も試みた。

C. 研究結果

今回作製した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ことを確認した。少なくとも約7ヶ月齢には明らかな運動障害を認めるにもかかわらず、組織学的検討では7ヶ月齢のTgマウス脳においてはNTgマウスと比較して明らかな神経細胞形態変化、アストロサイトの集簇、ミクログリアの活性化、アポトーシスなどは認めなかった。Tgマウス脳および脊髄ともに、ユビキチン陽性核内封入体については少なくとも5ヶ月齢では認めず、約7ヶ月齢から確認できた。E4BはTgマウス脳において発現増加が示唆された。Rabタンパクについては、免疫組織学的検討およびウェスタンブロット解析では明らかな違いは認めなかった。一方、ゴルジ体の検討では、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、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。

研究発表

1. 論文発表なし

2. 学会発表

第50回日本神経学会総会

第51回日本神経学会総会

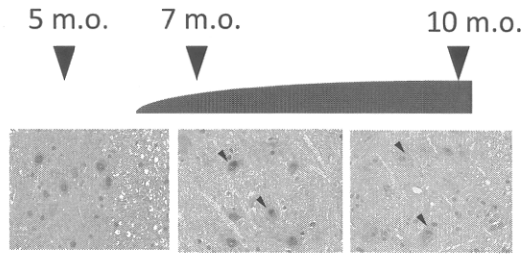
2009 Neuroscience meeting

2010 Neuroscience meeting

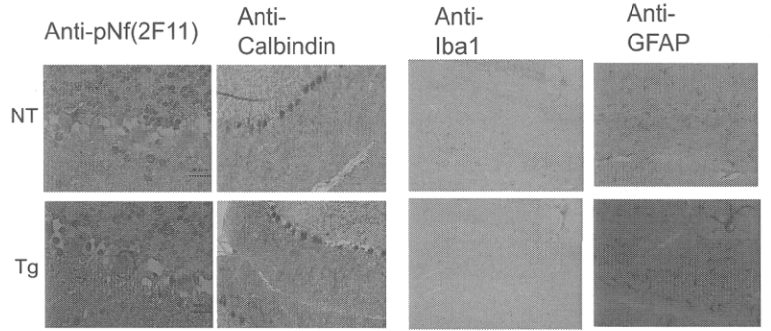
D. 知的財産権の出願・登録状況 なし

E. 健康危険状況 なし

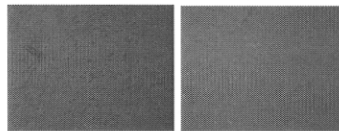
MJD 155polyQ Tgマウスの臨床経過



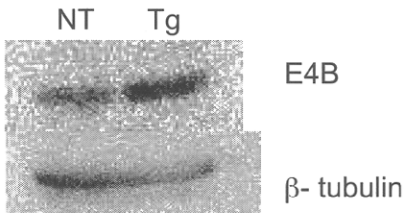
核内封入体は7ヶ月頃から認められる



TUNEL染色
NT Tg

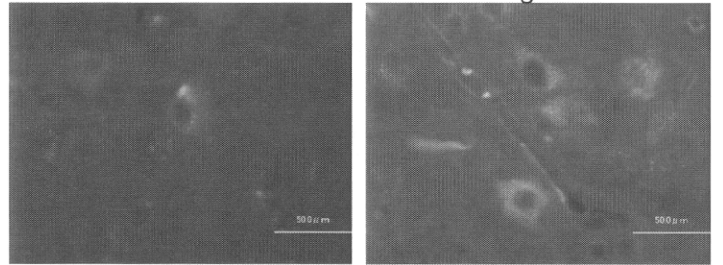


神経形態異常や炎症細胞活性化、apoptosisなどは認めない

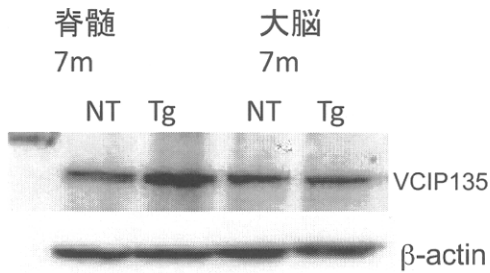


E4BはTgマウス脳で発現が増加

蛍光免疫染色(脊髄、6-7ヶ月齢、抗GM130抗体)
NT Tg

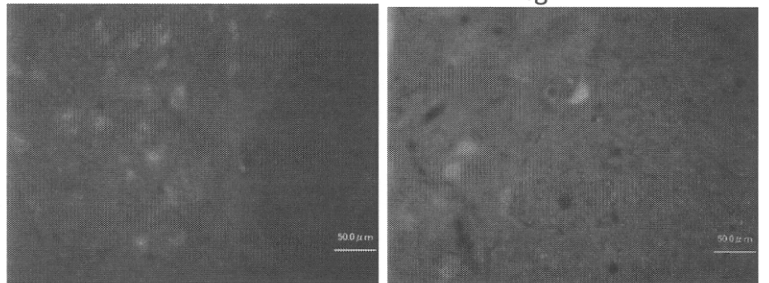


発症早期脊髄前角細胞に認められるゴルジ体の断片化

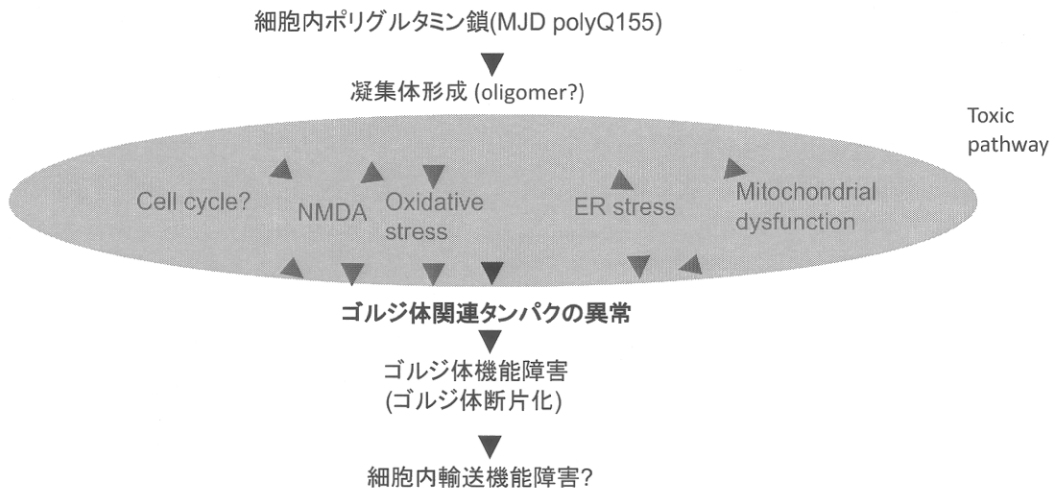


VCIP135は6-7ヶ月齢の脊髄で増加

蛍光免疫染色(脊髄、7ヶ月齢、抗VCIP135抗体)
NT Tg



VCIP135の局在が変化していることが示唆された



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究

ポリグルタミン病の新規治療法の開発

分担研究者	小野寺 理	新潟大学脳研究所生命科学リソースセンター
研究協力者	他田 正義	新潟大学脳研究所神経内科
	高橋 俊昭	新潟大学医学部保健学科
	堅田 慎一	新潟大学脳研究所神経内科
	西澤正豊	新潟大学脳研究所神経内科
	Henry L. Paulson	ミシガン大学神経内科

研究要旨

ポリグルタミン病において、細胞毒性を持つ蛋白構造を明かとし、それを標的とした治療戦略が重要である。我々は、ポリグルタミン病にて変異蛋白の二量体形成が中核的な病態イベントであることを明らかにした。さらに、本症の新規治療薬の開発を目的として、変異蛋白の二量体形成を阻害する化合物のスクリーニングを可能とする新たな細胞系を確立した。本法を用いて、FDA 承認済み化合物ライブラリーの大規模スクリーニングから複数の化合物を選定した。今後、動物モデルを用いてその有効性を検証する。二量体形成阻害を標的とした治療はポリグルタミン病全般に応用できる優れた治療戦略である。

A. 研究目的

ポリグルタミン (polyQ) 病では、伸長 polyQ 鎖を持つ変異蛋白が構造変化 (conformational change) を生じて自己重合し、その結果、難容性のアミロイド様凝集体を形成し、神経細胞内に封入体として認められる。この封入体形成は細胞の防御的反応の結果であり、初期に生じる可溶性の重合体(二量体や多量体)に強い細胞障害性があると考えられ、我々もそれを明らかにしてきた (Takahashi T, *et al. Human Mol Genet* 17:345-356, 2008)。本研究期間では、単量体の状態を保ち重合形成へ進展しないコンストラクトを作製し、単量体と重合体との細胞障害性の違いを検討することで毒性の獲得が二量体形成以降であるかどうかを検証すること。さらに、この polyQ 鎖の重合特性と細胞障害性の関係から、本症において重合体形成(とくに二量体形成)を阻害するような分子標的治療の開発が期待できる。本研究では、変異蛋白の重合体形成阻害を標的とした polyQ 病の新規治療薬開発の基盤研究を確立することを目的とした。

B. 研究方法

単量体でとどまるポリグルタミン蛋白は N 末および C 末に蛍光蛋白を融合し作製した。このコンストラクトについて蛍光顕微鏡観察 (TE-2000U; Nikon)での封入体形成率の評価、二分子 FRET 解析(AQUACOSMOS 画像解析システム; 浜松ホトニクス)による蛋白-蛋白相互作用がないことの確認を行った。一方、ポリグルタミン蛋白の C 末のみに蛍光蛋白を融合したコンストラクトは重合状態へ進展するため、各々のコンストラクトを安定発現する SH-SY5Y 細胞株を確立し、レチノイン酸と脳由来神経栄養因子(BDNF)処理にて神経細胞へ分化誘導し、それぞれの細胞が細胞死に至る過程を直視下に観察し、生存時間解析を行った。

Protein-fragment complementation assay (PCA) 法を応用し、本邦で最も多い polyQ 病である脊髄小脳変性症 3 型 (SCA3) の原因蛋白 ataxin-3 (AT3) の二量体形成のモニタリングを可能とする新たな細胞系を確立した。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験、動物実験は、新潟大学当該委員会に研究計画を提出の上、実験の

承認を得た上で、法令を遵守して実施した。

C. 研究結果

蛍光顕微鏡観察では、単量体コンストラクト (Q56) は封入体形成を認めなかった。二分子 FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 解析で、単量体コントロール (monomeric CFP & monomeric YFP) と同様の FRET 値を呈し、二量体形成をきたさないことを確認した。加えて native PAGE 解析においても重合形成するコンストラクトでは二量体に相応する高分子量バンドを確認したが、単量体コンストラクトでは確認されなかった。これらの結果より作製した単量体コンストラクトが重合形成しないことを実証した。

神経分化誘導したポリグルタミン蛋白の安定発現 SH-SY5Y 細胞の生存時間解析では、重合形成コンストラクト群、単量体コンストラクト群、non-transfected SH-SY5Y 細胞群 (control) の生存時間解析を行い、それぞれの群で平均生存日数は 3.0 日、5.0 日、6.0 日であり、logrank 検定で重合形成コンストラクト群は単量体コンストラクト群に比して有為な生存時間の延長を認めた ($p < 0.005$)。一方、単量体コンストラクトと control の SH-SY5Y 細胞群間では有為差はなかった。以上の結果から、ポリグルタミン蛋白の重合が細胞障害性の獲得に重要な要因であると考察した。

次に、YFP 断片をリポーターとして用いた PCA 法 (YFP-PCA 法) において、(1) 異常伸長したポリグルタミン鎖を有する変異 AT3 蛋白は野生型 AT3 に比べ二量体を形成しやすいこと、(2) ポリグルタミン鎖を含むドメインが二量体形成に重要であることを確認した。さらに、(3) ポリグルタミン病の動物モデルで神経変性を抑制することが報告されている既知化合物が、AT3 の総蛋白量に影響することなく、分子シャペロンの発現誘導を介して二量体形成を阻害した (図 3)。 (4) ルシフェラーゼ断片をリポーターとして用いた第二の PCA 法 (ルシフェラーゼ-PCA 法) においても同様の結果が確認された。

以上の結果から、PCA 法は、生細胞内での AT3 の二量体形成のモニタリングと二量体形成を阻害する薬剤のスクリーニングに有用な方法であると考えられた。本法を用いて、FDA 承認済み化合物ライブラリーの大規模スクリー

ニングを行い、二量体形成阻害効果を示す複数の候補化合物を選定した。今後、培養神経細胞や動物モデルを用いて候補化合物の有効性を検証する。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Yokoseki A, Ishihara T, Koyama A, Shiga A, Yamada Mi, Suzuki C, Sekijima Y, Maruta K, Tsuchiya M, Date H, Sato T, Tada M, Ikeuchi T, Tsuji S, Nishizawa M, Onodera O. Genotype-phenotype correlations in early onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminaemia. *Brain*. 2011 In press.

2. Ozawa T, Saji E, Yajima R, Onodera O, Nishizawa M. Reduced bowel sounds in Parkinson's disease and multiple system atrophy patients. *Clin Auton Res*. 2010 Dec 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21181426.

3. Tada M, Yokoseki A, Sato T, Makifuchi T, Onodera O. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia/ataxia with oculomotor apraxia 1. *Adv Exp Med Biol*. 2010;685:21-33. Review. PubMed PMID: 20687492.

4. Matsukawa T, Asheuer M, Takahashi Y, Goto J, Suzuki Y, Shimosawa N, Takano H, Onodera O, Nishizawa M, Aubourg P, Tsuji S. Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics*. 2011 Feb;12(1):41-50. Epub 2010 Jul 27. PubMed PMID: 20661612.

5. Hasegawa A, Ikeuchi T, Koike R, Matsubara N, Tsuchiya M, Nozaki H, Homma A, Idezuka J, Nishizawa M, Onodera O. Long-term disability and prognosis in dentatorubral-pallidoluysian atrophy: a correlation with CAG repeat length. *Mov Disord*. 2010 Aug 15;25(11):1694-700. PubMed PMID: 20589872.

6. Ozawa T, Tada M, Kakita A, Onodera

O, Tada M, Ishihara T, Morita T, Shimohata T, Wakabayashi K, Takahashi H, Nishizawa M. The phenotype spectrum of Japanese multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010 Nov;81(11):1253-5. Epub 2010 Jun 22. PubMed PMID: 20571046.

なし

7. Shimizu H, Yamada M, Toyoshima Y, Ikeuchi T, Onodera O, Takahashi H. Involvement of Onuf's nucleus in Machado-Joseph disease: a morphometric and immunohistochemical study. *Acta Neuropathol*. 2010 Oct;120(4):439-48. Epub 2010 May 26. PubMed PMID: 20503052.

8. Takahashi T, Katada S, Onodera O. Polyglutamine diseases: where does toxicity come from? what is toxicity? where are we going? *J Mol Cell Biol*. 2010 Aug;2(4):180-91. Epub 2010 Apr 21. Review. PubMed PMID: 20410236.

9. Toyoshima Y, Onodera O, Yamada M, Tsuji S, Takahashi H. Spinocerebellar Ataxia Type 17. 2005 Mar 29 [updated 2007 Aug 1]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=sca17> PubMed PMID: 20301611.

2. 学会発表

Tada M, McQuade T, Decker SJ, Kerppola TK, Paulson HL. A screen with protein-fragment complementation assays for drugs that reduce polyglutamine protein dimmers. AAN meeting 2010, in Toronto

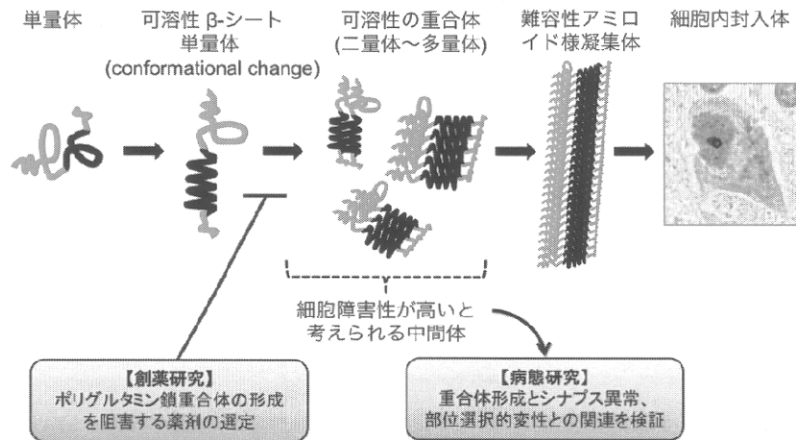
Tada M, Kerppola TK, Decker SJ, Costa MC, Todi SV, Paulson HL. Detection of polyglutamine protein oligomers in living cells using protein-fragment complementation assays. Ataxia Investigator Meeting 2010, in Chicago

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

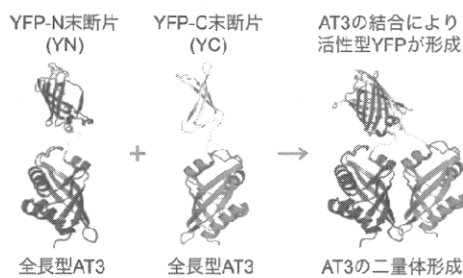
(特許取得・実用新案登録・その他)

とくになし

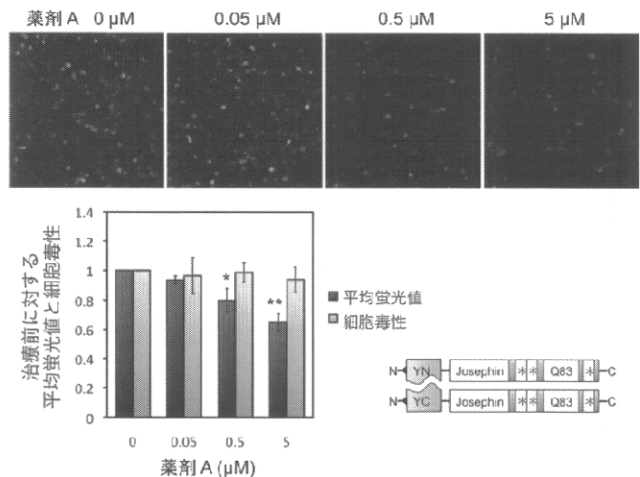
F. 健康危険情報



【図1】変異ポリグルタミン蛋白の凝集体形成カスケード
変異蛋白の conformational change により、凝集性が高まり、可溶性の重合体、難溶性のアミロイド様凝集体が蓄積し、最終的に細胞内封入体が形成される。



【図2】PCA法の原理。図は YFP-PCA法を示す。AT3の二量体形成により YFPの N末および C末断片が会合して活性型 YFPとなり、蛍光を発する



【図3】 YFP-PCA法を用いた二量体形成阻害効果の検討。
YN-AT3(Q83) および YC-AT3(Q83) を発現した細胞は二量体形成により蛍光を発する。薬剤Aによる二量体形成阻害効果を示す。

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

3年間の研究のまとめ

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, 迫江公己, 滑川道人, 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, 後藤 順, 辻 省次(東京大学医学部神経内科学講座), JASPAC

研究要旨 本邦 ARSACS 症例の頭部 MRI 所見の検討により, T2 強調/FLAIR 画像における橋の線状低信号・中小脳脚の低信号は ARSACS 診断のメルクマールに成りうることを示した. 視神経萎縮と末梢神経障害を呈する ARHSP 家系において, 第12番染色体に新規原因遺伝子となる候補遺伝子変異を見いだした. SPG4 の原因蛋白である spastin の機能解析では, spastin 遺伝子の knock-down により, エンドソーム遺伝子群, モーター蛋白遺伝子, 他の HSP 遺伝子の発現が減少することを示し, SPG4 では RTN4 が key molecule となる可能性を示した. JASPAC では 2010 年 12 月 22 日現在, 全国から HSP 339 家系が登録されている. これまでの JASPAC の網羅的遺伝子解析により, 本邦 HSP の分子疫学の outline が明らかにされた. 今後, 遺伝子型-臨床型の検討や新規原因遺伝子の同定を行う予定である.

A. 研究目的

- (1) HSP 家系の臨床・分子遺伝学的検討: ARSACS の頭部 MRI 所見の特徴を明らかにする. 別に, 複合型 ARHSP 家系の臨床像の検討・新規原因遺伝子の解明をする.
- (2) Spastin: 最も頻度の高い SPG4 の原因蛋白の機能を解析することにより, HSP の病態機序を解明し, 治療に向けての方向性を確立する.
- (3) JASPAC: 本邦 HSP の多施設共同研究体制により, 臨床・研究のリソース基盤を構築し, その自然史やゲノム解析研究を行い, HSP の原因究明と治療法の開発を目指す.

B. 研究対象と方法

- (1) HSP 家系の臨床・分子遺伝学的検討: SACS 変異が同定された本邦 5 家系 7 症例について, 頭部 MRI 所見を詳細に検討した. 別に, 複合型 ARHSP 1 家系の臨床像を詳細に検討し, 連鎖解析, exome 解析を行った.
- (2) Spastin: spastin 遺伝子の knock-down による spastin とその下流の遺伝子発現量の変化を検討した. 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 を導入した 2 日後の RNA により, CodeLink マイクロアレイを用いて解析した.
- (3) JASPAC: 2006 年から引き続いて JASPAC 事務局を担当した. 遺伝子解析については自治医大で直接塩基配列決定法により ARSACS を, 東大で直接塩基配列決定法 (SPG4/31), DNA マイクロアレイ (TKYHSP01: SPG1/2/3A/4/5/6/7/8/10/11/13/17/20/21/31/33/ABCD1), CGH アレイ (Ver. 2: SPG1/2/3A/4/5/6/7/8/10/11/13/15/17/20/21/31/33/3

9/42/ABCD1/alsin/SACS) を組み合わせた網羅的な遺伝子解析を行った.

C. 研究結果

- (1) HSP 家系の臨床・分子遺伝学的検討: ARSACS の頭部 MRI では小脳虫部上葉の萎縮, T2 強調/FLAIR 画像における橋の線状低信号・中小脳脚の低信号を全例に認めた. 複合型 ARHSP 1 家系では, 痙性対麻痺に加えて, 視神経萎縮と末梢神経障害を呈していた. この家系の連鎖解析では, 第 2, 6, 12, 13 番染色体上に lod 値の高い部分があり, 候補領域であると考えられた. この領域には既報の HSP 遺伝子座は含まれておらず, 明らかな病的遺伝子コピー異常はなかった. そこで, 次世代シーケンサーを用いた exome 解析を行ったところ, 第 12 番染色体の候補領域内に 3 個の候補遺伝子変異を同定した.
- (2) Spastin: spastin 遺伝子の knock-down により, まず, 物質輸送に関連するエンドソーム遺伝子群 (Rab5, Rab11 など多くの Rab ファミリー遺伝子) の発現量が減少していた. また, モーター蛋白の一つである KIF20B 遺伝子が減少し, その関連蛋白もほとんどが減少していた. 他の SPG 原因遺伝子である SPG3A, SPG21, SPG26 遺伝子の発現も減少していた. さらに, これらと相互作用する RTN4 遺伝子において特定の isoform の減少が認められた.
- (3) JASPAC: 2010 年 12 月 22 日現在, 全国 40 都道府県 124 施設から遺伝性痙性対麻痺 339 家系の登録があり, index patient 243 検体について網羅的遺伝子診断を行っている. これまでのところ, ADHSP (148 家系) では, SPG4 が 47% と最も多く, 次いで SPG31 (4%), SPG3A (3%), SPG8 (1%), SPG10

(1%), 不明 (44%) であった。ARHSP (20 家系) では, SPG11 (10%), ARSACS (5%), 不明 (85%) であった。両親に血族婚がある孤発例 (22 例) では, SPG11 (14%), SPG4 (4%), 不明 (82%) であった。遺伝形式不明 (37 家系) では, SPG11 (8%), SPG4 (5%), SPG3A (3%), ALD/AMN (3%), 不明 (81%) であった。孤発例 (75 例) では, SPG4 (5%), SPG3A (1%), ARSACS (1%), 不明 (93%) であった (以上の解析データは JASPAC に加えて東京大学神経内科が独自に集めた検体による)。

D. 考察と結論

(1) HSP 家系の臨床・分子遺伝学的検討: 頭部 MRI 上, 小脳虫部上葉の萎縮は, ARSACS に特異的ではなかったが, T2強調/FLAIR画像での橋の線状低信号は ARSACS に特異的であった。また, 中小脳脚の T2/FLAIR 画像における低信号はこれまで ARSACS で報告されていない所見であった。非ケベック例では, ケベック例で ARSACS に特異的とされる網膜有髄線維の増生は必ずしも認められないので, 非ケベック例での診断のメルクマールにはなりにくい。しかし, 今回得られた MRI 所見は ARSACS 診断のメルクマールに成りうると考えられた。

複合型 ARHSP の 1 家系では, 原因となる候補遺伝子が絞られた。今後, 直接塩基配列決定法での遺伝子変異の確認, 家系内での cosegregation の有無, 正常コントロールとの対比, 別家系での変異確認など, 真の原因遺伝子であるかどうかを詳細に検討する必要がある。

(2) Spastin: spastin 遺伝子の knock-down により, 成長円錐の形成異常や分岐部位の突起の過形成が生じるが, その原因の一つとして, 小胞輸送に関与するエンドソーム遺伝子群の減少が関係していると考えられた。また, モーター蛋白の減少は軸索内の物質輸送能が低下して, 神経細胞および軸索の伸長に影響を及ぼすと考えられた。spastin の減少により, 他の HSP 遺伝子が減少することから, HSP の疾患間に関連し合う蛋白群が存在することと, 蛋白間のパスウェイ解析から, SPG4 では RTN4 が key molecule となる可能性が示唆された。

(3) JASPAC: JASPAC での網羅的遺伝子解析により, 本邦 HSP の分子疫学の outline が判明した。HSP では ADHSP が大部分を占め, そのうち, 本邦でも欧米と同様に SPG4 が半数近くを占めることが判明した。ADHSP では 6 割に遺伝子変異が同定されたが, ARHSP では 2 割にしか遺伝子変異は同定できなかった。今後, 病型が確定できた症例について, 遺伝子型と臨床型の関連を明らかにしたい。病型が確定できなかった症例については, 新規原因遺

伝子の同定が必要であると思われる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takiyama Y: Sacsinopathies. Advances in spinocerebellar degeneration and spastic paraplegia 2008, eds by Takiyama Y and Nishizawa M, Research Signpost, Kerala, India: 7-30, 2008.
- 2) Sakoe K and Takiyama Y: Heat shock proteins and neurodegenerative diseases. Heat-shock proteins: International Research, eds by Morel E and Vincent C, Nova Science Publishers, Inc, NY, USA: 265-273, 2008.
- 3) Breckpot J, Takiyama Y, et al: A novel genomic disorder: a deletion of the SACS gene leading to spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. Eur J Hum Genet 16: 1050-1054, 2008.
- 4) 瀧山嘉久: 遺伝性痙性対麻痺. Annual review 神経 2008, 柳澤信夫ら編, 中外医学社, 東京: 198-211, 2008.
- 5) 瀧山嘉久: 遺伝性痙性対麻痺. 山梨医科学誌 24: 1-12, 2009.
- 6) 瀧山嘉久ら: Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC). 臨床神経学 (印刷中)
- 7) 瀧山嘉久ら: 遺伝性痙性対麻痺の疫学 -JASPAC- 神経内科 (印刷中)

2. 学会発表

- 1) 瀧山嘉久: 脊髄小脳変性症の臨床・分子遺伝学. 第 49 回日本神経学会総会, 2008 年 5 月 17 日, 横浜.
- 2) 嶋崎晴雄, 本多純子, 中野今治, 瀧山嘉久: 非ケベック ARSACS 症例の臨床・分子遺伝学的検討. 第 54 回日本人類遺伝学会, 2009 年 9 月 24 日, 東京.
- 3) Takiyama Y: Japan Spastic Paraplegia Research Consortium. 第 51 回日本神経学会総会 企画シンポジウム, 2010 年 5 月 22 日, 東京.
- 4) 瀧山嘉久: 脊髄小脳変性症の臨床・分子遺伝学 ~最近の話題. 第 27 回日本リハビリテーション医学会中部・東海地方会 専門医・認定臨床医生涯教育研修会, 2010 年 8 月 28 日, 名古屋.
- 5) 嶋崎晴雄ら: 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その候補遺伝子解析. 日本人類遺伝学会第 55 回大会, 2010 年 10 月 28 日, 大宮.
- 6) 瀧山嘉久: 遺伝性痙性対麻痺の臨床・分子遺伝学. 日本人類遺伝学会第 55 回大会 Educational Program, 2010 年 10 月 28 日, 大宮.

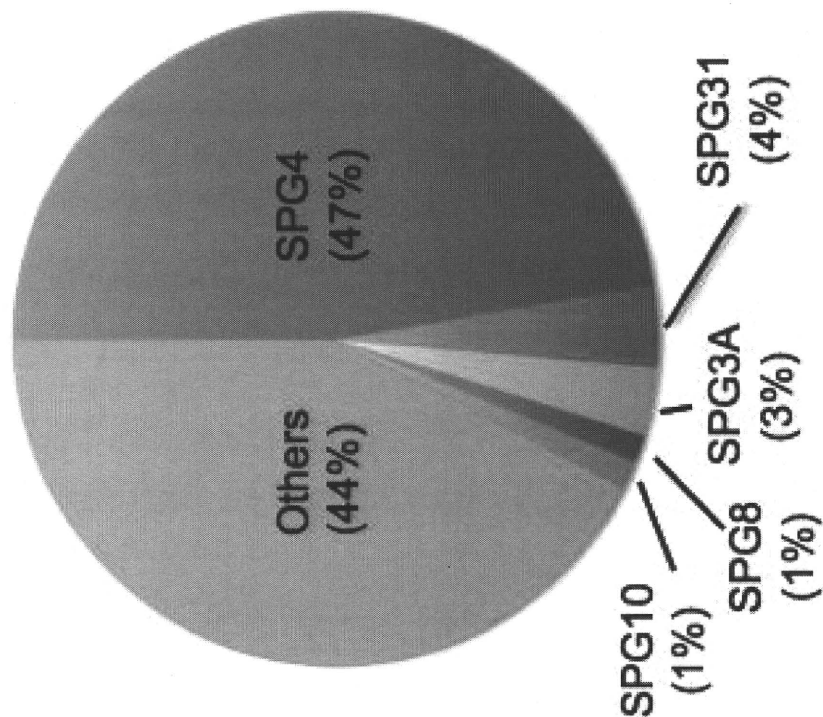
F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC)

登録 (2010年12月22日現在)

全国40都道府県, 124施設
遺伝性痙性対麻痺 339家系
index patient 243検体

ADHSP (148家系) の病型別頻度



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

運動失調症に関する調査研究班

脊髄小脳変性症の分子遺伝学的研究

分担研究者 研究協力者	辻 省次	東京大学医学部附属病院神経内科
	石浦 浩之	東京大学医学部附属病院神経内科
	市川 弥生子	東京大学医学部附属病院神経内科
	後藤 順	東京大学医学部附属病院神経内科
	高橋 祐二	東京大学医学部附属病院神経内科
	伊達 英俊	東京大学医学部附属病院神経内科
	福田 陽子	東京大学医学部附属病院神経内科
	中原 康雄	東京大学医学部附属病院神経内科 (現、リハビリテーション部)
	松川 敬志	東京大学医学部附属病院神経内科
	三井 純	東京大学医学部附属病院神経内科
	Budrul Ahsan	東京大学医学部附属病院神経内科
	下澤 伸行	岐阜大学生命総合研究支援センター
	徳永 勝士	東京大学医学系研究科人類遺伝学
	山本 健	九州大学生態防御医学研究所ゲノム機能制御学部門
	酒井 徹雄	姫野病院神経内科

Japan Multiple System Atrophy research Consortium (JAMSAC)
Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC)

研究要旨

1. 副腎白質ジストロフィー (ALD) 表現型に関して、*PEX5* 遺伝子との関連を検討した。2. 国内共同研究体制 JAMSAC による多系統萎縮症 (MSA) の臨床情報及びゲノムリソースの収集を進めた。216 名の MSA 患者が登録されている。MRI 補助基準が早期症例の登録に有用である。3. ゲノムリソースを用いて全ゲノム関連解析を行い、疾患感受性遺伝子の探索を進めた。4. 遺伝性痙性対麻痺 (HSP) の網羅的遺伝子診断アルゴリズムの構築及び国内共同研究体制 JASPAC を中心に収集された遺伝性痙性対麻痺の解析を行った。5. 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) 治療薬探索を目指した Cell-based high throughput screening 行った。6. 稀な変性疾患である Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa (PCARP) の日本人家系について、連鎖解析、候補領域の target capture、次世代シーケンサーによる大規模塩基配列解析によって、*FLVCR1* 遺伝子に新規アミノ酸置換 p.G493R を同定し、原因遺伝子であることを認めた。

A. 研究目的

1. 副腎白質ジストロフィー (ALD) は様々な表現型を呈するが、その関連因子は不明であり、その解明を目的とする。
2. JAMSAC により収集した多系統萎縮症 (MSA) の臨床情報を基に、日本における MSA の臨床的特長、自然史を明らかにする。
3. JAMSAC にて収集したゲノムリソースを用いて、全ゲノム関連解析 (GWAS) により MSA の遺伝要因を同定する。
4. 遺伝性痙性対麻痺 (HSP) の網羅的遺伝子診断アルゴリズムの構築し、JASPAC を中心に収集した国内症例を網羅的に解析し、疫学的様相

を明らかにする。

5. 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) の治療薬を探索する。
6. 新規に見出された Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa (PCARP) 日本人家系の原因遺伝子を同定する。

B. 研究方法

1. ALD 51 例の *PEX5* 遺伝子全エクソンの塩基配列を決定し表現型との関連を検討した。
2. JAMSAC 参加 22 機関より登録された MSA 216 例についての臨床情報を解析した。
3. JAMSAC にて収集したゲノムリソース、MSA 383 例、対照 391 例について、Illumina Human

660K BeadChip[®]にて全ゲノム SNP タイピングを行い、関連解析を行った。

4. DNA microarray を基盤とする HSP の網羅的遺伝子診断アルゴリズムを構築する。JASPAC を中心に収集した HSP 症例を解析する。
5. GFP-DRPLA 定常発現細胞株を用いて、核移行を指標として、FDA 承認化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行い、核移行阻害する化合物をみつけ、DRPLA トランスジェニックマウスによる治療研究を実施した。
6. 臨床的に PCARP と診断された兄妹例。両親はいとこ婚。SNP タイピングによる連鎖解析後、target capture を行い、Illumina GAIIX を用いて塩基配列解析した。

(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果および考察

1. *PEX5* 遺伝子において、新規 5 箇所、既知 2 箇所の SNP を同定したが、これらと ALD 表現型との有意な関連は認めなかった。さらなる症例の蓄積、解析が必要である。
2. MSA の平均発症年齢は、58.0±8.2 歳、サブタイプでは、MSA-C が 69%、MSA-P が 29% であった。MRI 補助基準で登録した症例のうち、罹病期間が 2 年を超えたものは possible 以上に移行した。経時的追跡を行えた 19 例の UMSARS-ME スコアの年平均変化は 5.7±3.2 であった。
3. MSA の関連解析の結果、 χ^2 検定 (Allelic Test) で、 $p < 10^{-6}$ の SNPs を見出したが、replication study による再現性の確認が必要である。
4. JASPAC と分担者所属機関収集例合わせ、315 例となり、うち 225 例の解析を終了した。常染色体性優性遺伝が 144 例で、68 例が SPG4、SPG3A と SPG31 が各 5 例、SPG8 と SPG10 が各 2 例で、約 60% の確定診断を得た。
5. DRPLA タンパク質の核移行の影響について、1040 種の薬剤をスクリーニングし、細胞外に局在させる化合物 22 種を見出し、うち中枢神経系に到達可能な化合物を用いて DRPLA トランスジェニックマウスによる治療研究を実施し、延命が期待できる化合物を見出した。今後より詳細な実験を行い検討する。
6. PCARP 家系についてパラメトリック多点連鎖解析を施行し、既知の PCARP 遺伝子座とのオーバーラップを認めた。大規模塩基配列解析を行い、原因遺伝子として *FLVCR1* c.1477G>C (p.G493R) を認めた。

D. 結論

1. 多施設共同研究体制 (JAMSAC、JASPAC) による臨床情報の収集、ゲノムリソースの収集が、疾患の自然史等の臨床研究、GWAS などのゲノム解析研究等に必須であるが、実際有用で

あることを示した。

2. DNA resequencing microarray を基盤とする HSP の網羅的遺伝子診断システムを構築した。
3. 核移行を指標とした、DRPLA 治療薬剤スクリーニングシステムを確立し、治療薬候補のスクリーニングを行い、トランスジェニックマウスを用いた治療研究を実施し、延命が期待できる化合物を見出した。
4. 連鎖解析システム及び次世代シーケンサーの応用にて、原因遺伝子未同定遺伝性家系の原因遺伝子同定を実現した。

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, Tsuji S. Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in *FLVCR1*. *Neurogenetics*. 2011.

Matsukawa T, Asheuer M, Takahashi Y, Goto J, Suzuki Y, Shimozawa N, Takano H, Onodera O, Nishizawa M, Aubourg P, Tsuji S. Identification of novel SNPs of *ABCD1*, *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) Based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics*, 2011 12:41-50.

2. 学会発表

Ishiura H, et al. A comprehensive diagnostic system for hereditary spastic paraplegia employing resequencing microarray, Sanger sequencing, and comparative genomic hybridization array allows efficient identification of various types of mutations in the causative genes. Annual Meeting of American Society of Human Genetics, 2009.

Date H, Tsuji S. A cell-based high throughput-screen for DRPLA. Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2010.

中原康雄ら. 多系統萎縮症 (MSA) における Genome-wide association study, 第 51 回日本神経学会総会 5 月 2010 東京.

JAMSAC, Yaeko Ichikawa, et al. Nationwide cross-sectional study of multiple system atrophy (MSA) in Japan. American academy of neurology 61st annual meeting 2009, Seattle. *Neurology*. 2009 March 72:17 (Suppl 3) A268

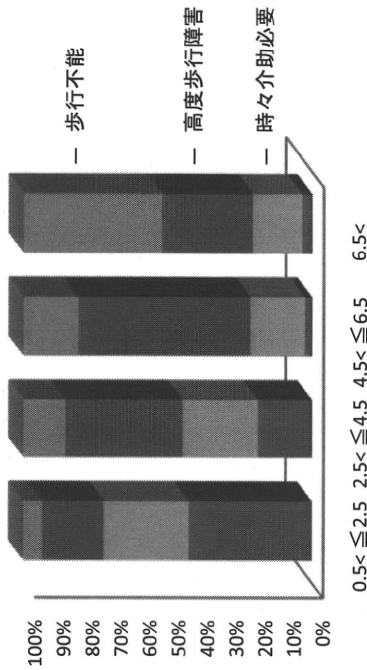
Matsukawa et al. Comprehensive resequencing of *PEX5* gene in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) and association studies with the phenotypes of ALD. American Society of Human Genetics 2010.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

脊髄小脳変性症の分子遺伝学的研究

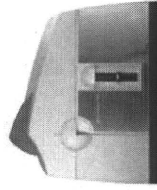
MSAの自然歴に関する研究
MSAの歩行機能 (n=201)



MSAの疾患感受性遺伝子の探索
(Genome-wide association study)

ゲノムワイド関連解析を実施し
疾患感受性遺伝子の探索を進
めている。

DRPLA治療探索を目指したFDA承認化合物を用いた
Cell-based screening



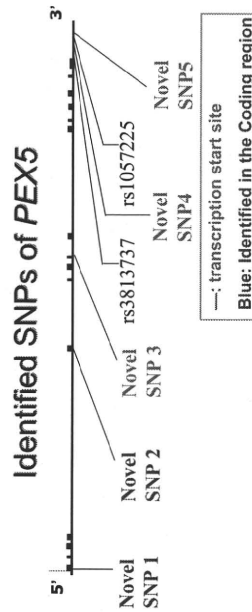
IN Cell analyzerを用いた
FDA1040種化合物について
High throughput screening

核移行阻害を示す化合物
を22種を見出した。



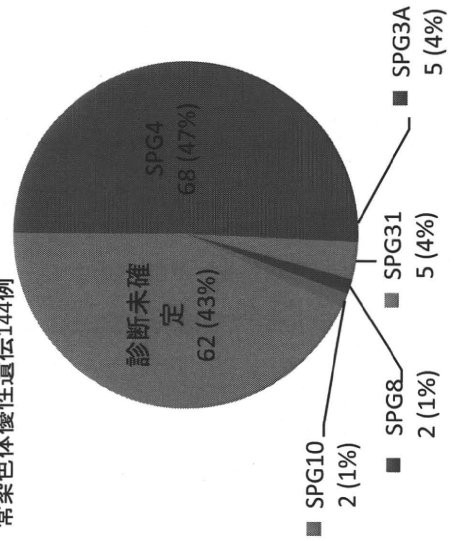
DRPLAトランスジェニックマウスへの投与実験へ

ALD51症例における表現型と
PEX5遺伝子との関連の検討



ハイスループット遺伝子解析システム
を用いた遺伝性痙性対麻痺の遺伝子解析

常染色体優性遺伝144例



次世代シーケンサーを用いた
Posterior coloumn ataxia with
retinitis pigmentosa遺伝子の同定

