

## マウス 26S プロテアソーム欠損を用いた神経変性疾患モデルの検討

研究分担者 高橋良輔<sup>1),2)</sup>

研究協力者 田代善崇<sup>1),2)</sup>、伊東秀文<sup>1)</sup>、井上治久<sup>2),3)</sup>、山崎真弥<sup>4)</sup>、阿部学<sup>4)</sup>、  
阿部学<sup>4)</sup>、三澤日出巳<sup>5)</sup>、崎村建司<sup>4)</sup>

- 1) 京都大学医学研究科臨床神経学、2) JST-CREST、  
3) 京都大学物質・細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター、  
4) 新潟大学脳研究所基礎神経科学部門、5) 慶応大学薬学部薬理学講座

### 研究要旨

神経変性疾患は異常タンパク質の蓄積に起因するコンフォメーション病と考えられており、これらの原因として、タンパク質分解障害が示唆されている。今回、我々はユビキチンプロテアソームタンパク質分解系（UPS）に必須のタンパク質を部位特異的に欠損させる遺伝子改変マウスシステムを樹立した。この系を用いて運動ニューロン特異的 UPS 機能障害マウスを作製し解析を行ったところ、8 週齢以降に振戦様の症状を認め、行動解析では、ロタロッドで運動機能及び握力の低下が認められた。また、神経病理学所見では、運動ニューロンに ALS 関連分子の蓄積等の異常が認められた。以上より、運動ニューロン特異的 UPS 機能障害は、運動ニューロン変性を伴う運動機能障害を引き起こすことが判明した。運動ニューロン特異的 26S プロテアソーム欠損マウスは ALS マウスモデルとしての病態解明への応用が期待できる。

### A. 研究目的

多くの神経変性疾患の神経病理学的所見では異常タンパク質の蓄積が観察され、病因にタンパク質分解系の障害の関与が示唆されている。今回の研究で、我々は運動ニューロン特異的にユビキチンプロテアソームタンパク質分解系（UPS）の機能障害マウスを作製し、ALS モデルの検討を行うこととした。

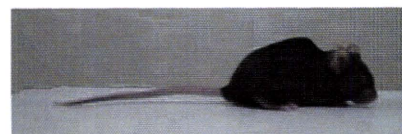
### B. 研究方法

部位特異的欠損作製システムを用い、運動ニューロン特異的 UPS 機能障害マウスの作製を行った。得られたマウスに対して運動機能及び神経病理学的所見を中心に表現型の解析を行った。動物の取り扱いについては、京都大学医学部動物実験ガイドラインに準じ、動物委員会の承認を得て行った。

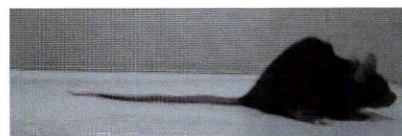
### C. 研究結果

Cre-loxP システムを用いて、26S プロテアソーム構成ユニットの一つである Rpt3 にソーム構成ユニットの一つである Rpt3 に loxP 配列を導入したマウス（floxed Rpt3

マウス）の系を確立した。運動ニューロン特異的に Cre を発現する VAcH-T-Cre マウスとの交配を行い、産仔が正常に出生することを確認した。この運動ニューロン特異的 UPS 機能障害マウスは、8 週齢において振戦様の症状を認めた。

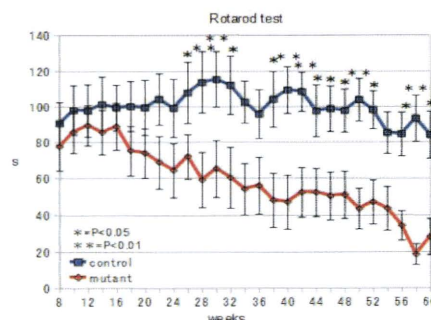


Control (Rpt3<sup>Δ/+</sup>;Cre<sup>+</sup>)



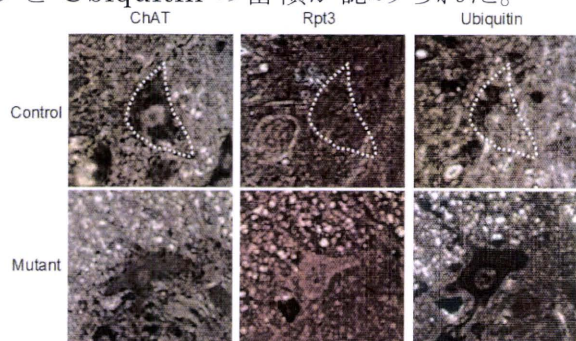
Mutant (Rpt3<sup>Δ/flox</sup>;Cre<sup>+</sup>)

体重比較を行ったところ、40 週以降に減少傾向を認めた。ロタロッド測定を行った

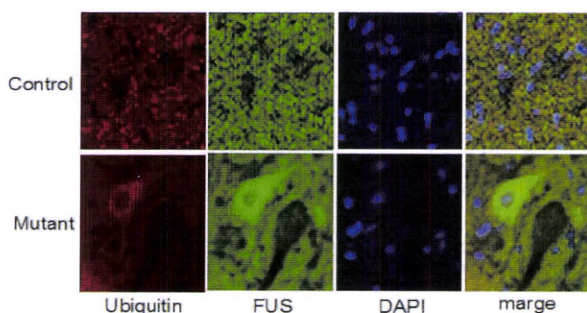
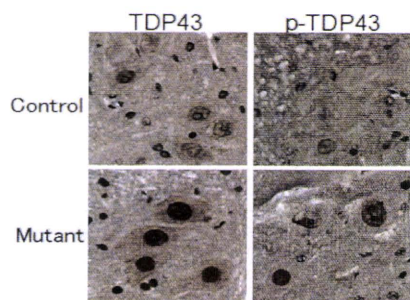


ところ 25 週齢以降に運動機能の低下が生じ、握力測定でも、20 週齢以降から前肢・後肢ともに握力低下が認められ 80%程度に低下していた。

病理学的解析では、6 週齢のマウス脊髄にて、運動ニューロンに相当する ChAT 陽性細胞において、同じ細胞で Rpt3 の発現減少と Ubiquitin の蓄積が認められた。



また孤発性・遺伝性 ALS との類似性を検討するため、近年遺伝性 ALS 患者より同定され、孤発性 ALS との関連が示唆されている因子である、TDP43 ならびに FUS を調べたところ、TDP43 の発現上昇、リン酸化された TDP43 の発現が確認され、FUS も同様に発現上昇していることが確認された。



また、振戦様症状を呈している段階である 12 週齢のマウス脊髄を調べたところ、運動ニューロンに相当する ChAT 陽性細胞数の低下を認めた。

#### D. 考察

運動ニューロン特異的に Cre を発現する

VACht-Cre と floxed Rpt3 マウスの交配によって運動ニューロン特異的 Rpt3 欠損マウスを作製した。このマウスは振戦様症状を呈し、運動機能低下ならびに体重低下を確認した。病理学的所見においても、ALS 病因関連因子として同定された TDP43 や FUS の発現が孤発性 ALS や遺伝性 ALS と類似の変化を示した。これらの現象は、UPS 機能障害が孤発性・遺伝性 ALS においても病態に関与していることを示唆している。以上より、運動ニューロン特異的 UPS 機能障害マウスは ALS の病態解明および治療法開発のため新たなツールとなる期待が持たれる。

#### E. 結論

1. 運動ニューロン特異的 UPS 機能障害マウスを確立した。
2. このマウスは振戦様症状及び運動機能障害を呈し、神経病理学的にもヒト ALS との類似性が認められた。
3. 運動ニューロン特異的 UPS 機能障害マウスは ALS の病態解明および治療法開発のため新たなツールとなる。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Washida K, Ihara M, Nishio K, Fujita Y, Maki T, Yamada M, Takahashi J, Wu X, Kihara T, Ito H, Tomimoto H, Takahashi R. (2010) Nonhypotensive Dose of Telmisartan Attenuates Cognitive Impairment Partially due to Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Activation in Mice with Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Stroke* 41:1798-806.

Matsui H, Ito H, Inoue H, Taniguchi Y, Takeda S, Takahashi R. (2010) Proteasome inhibition in medaka brain induces the features of Parkinson disease. *J Neurochem*, 115:178-87.

Hideyama T, Yamashita T, Suzuki T, Tsuji S, Higuchi M, Seeburg PH, Takahashi R, Misawa H, Kwak S. (2010) Induced loss of ADAR2 engenders slow death of motor neurons from Q/R site-unedited GluR2. *J Neurosci*,

30:11917-25.

Matsui H, Ito H, Taniguchi Y, Takeda S, Takahashi R. (2010) Ammonium chloride and tunicamycin are novel toxins for dopaminergic neurons and induced Parkinson's disease-like phenotypes in medaka fish. *J Neurochem*, in press.

Imai Y, Kanao T, Sawada T, Kobayashi Y, Moriwaki Y, Ishida Y, Takeda K, Ichijo H, Lu B, Takahashi R. The loss of PGAM5 suppresses the mitochondrial degeneration caused by inactivation of PINK1 in *Drosophila*. *Plos Genetics*, [Epub Dec 2 ;6(12)] in press.

Murakami G, Inoue H, Tsukita K, Asai Y, Amagai Y, Aiba K, Uesugi M, Nakatsuji N, Takahashi R. (2010) Transcription-targeted screening assay for drugs to treat ALS. *J Biomol Screen*, in press

Egawa N, Yamamoto K, Inoue H, Hikawa R, Nishi K, Mori K, Takahashi R. (2010)The

endoplasmic reticulum stress sensor, ATF6{alpha}, protects against neurotoxin-induced dopaminergic neuronal death. *J Biol Chem*, in press

## 2.学会発表

田代善崇、井上治久、山崎真弥、阿部学、伊東秀文、三澤日出巳、崎村建司、高橋良輔、神経変性疾患モデル作製のための 26S プロテアソームコンディショナルノックアウトマウスの確立と解析、第 33 回日本神経科学大会、神戸 (2010.9.3)

Tashiro Y, Inoue H, Yamazaki M, Abe M, Ito H, Misawa H, Sakimura K, Takahashi R, The establishment and analysis of 26S proteasome conditional knockout mice for the mechanisms of neurodegenerative diseases. *BMB2010*、神戸 (2010.12.8)

## H.知的所有権の取得状況

- 1.特許取得
- 2.実用新案登録
- 3.その他

## ALS モデルマウス脊髄血管における neurovascular unit の異常

研究分担者 阿部康二

研究協力者 宮崎一徳，太田康之，森本展年，倉田智子，池田佳生，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

### 研究要旨

近年、脊髄血管の機能的、構造的異常が ALS 病態に関与することが示唆されている。そこで、ALS モデルマウスを用いて脊髄血管の neurovascular unit 構成成分である endothelium, tight junction, basement membrane の主要タンパクの運動機能障害の進行に伴う変化を調べ、脊髄血管の異常と ALS 病態との関連について検討した。ALS モデルマウスの脊髄では運動障害が見られる前から endothelium タンパクである PCAM-1 陽性の微小血管の径、密度は減少しており、進行性に減少した。また、tight junction タンパクである occludin, basement membrane タンパクである collagen IV 陽性の血管構造も減少していった。これらの異常は運動障害を発症する前から見られ、特に脊髄前角で顕著であった。さらに neurovascular unit の外側に位置する構成成分ほど損傷が激しかった。これらのことから neurovascular unit 構成成分の異常と ALS 病態との強い関連が示唆され、今後重要な治療ターゲットとなり得ると考えている。

### A.研究目的

Neurovascular unit とはニューロンの機能と循環の密接な連関を1つのユニットとして統合的に理解するための機能構造体である。Neurovascular unit は血管内腔側から外側に向かって endothelium, tight junction, basal lamina, pericyte, astrocyte の endfeet という多層構造になっている。これらの構造物により脳では blood brain barrier、脊髄では blood spinal cord barrier が形成され、選択的な物質移送の制御が行われている。近年、脳梗塞やアルツハイマー病、他の神経変性疾患においてこの neurovascular unit の障害が注目を浴びており、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) においても脊髄血管の機能的、構造的異常が ALS 病態に関与することが示唆されている。そこで、本研究では ALS モデルマウスを用いて脊髄血管の neurovascular unit 構成成分である endothelium, tight junction, basement

membrane の主要タンパクの運動機能障害の進行に伴う変化を調べ、脊髄血管の異常と ALS 病態との関連について検討した。

### B.研究方法

実験には ALS のモデル動物である G93A トランスジェニック (Tg) マウスおよびコントロールとして同週同腹子の野生型 (WT) を用いた。Tg マウスは 14 週齢頃から運動機能の低下が見られ、19 週齢頃に死亡する。そのため、10 週を ALS 発症前モデル、15 週を発症初期モデル、18 週を ALS 末期モデルとした。各個体から採取した腰髄の切片を作製し、免疫染色を行い、endothelium タンパクである PCAM-1、tight junction タンパクである occludin、basement membrane タンパクである collagen IV の発現量と詳細な分布を調べた。また、腰髄を中心管に沿って腹側部と背側部に切り分け、ウェスタンブロット解析を行い発現量の変

化を調べた。

(倫理面への配慮)

岡山大学動物実験規則に準拠して、動物の使用数および苦痛の低減に最大限に配慮した。

### C. 研究結果

免疫染色を行い endothelium の構成タンパクである PCAM-1 の空間的分布を調べたところ、WT マウスでは週齢による変化は認められなかったが、Tg マウスでは発症前の 10 週からすでに血管密度および血管径が減少し始め、その後進行性に減少し、白質と灰白質の違いが分かりづらくなっていった (図 1)。また、血管径を定量したところ運動障害の進行とともに有意に血管が小さくなっていった。

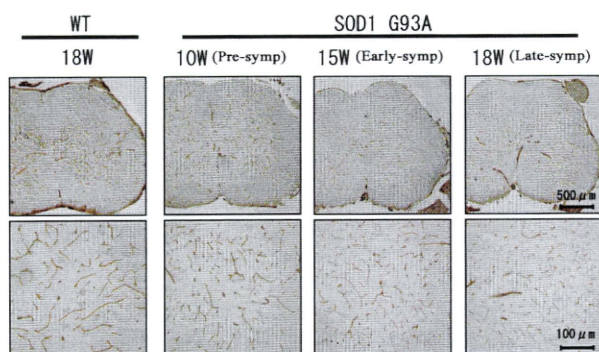


図 1 PCAM-1 陽性の血管構造の密度、径は減少する

次に蛍光二重染色を行い、tight junction の構成タンパクである occludin の空間的分布を調べたところ、WT マウスでは週齢による変化は見られなかったが、Tg マウスでは 10 週から occludin の PCAM-1 陽性の血管上での発現が部分的に失われ始め、15 週ではさらに減少し、18 週では PCAM-1 の血管構造は残っているのに対して occludin の発現はほとんど見られなくなった (図 2)。また、Tg マウスでは進行性に occludin 陽性の大型運動ニューロンの減少がみられたが、グリア細胞と思われる細胞では occludin の発現が亢進していった。ウェスタンブロット解析を行い occludin のタンパク量の変化を調べたところ、Tg マウスの腹

側部では進行性に減少していき、18 週で有意な減少が認められた。一方背側部では有意な変化はみられなかった。

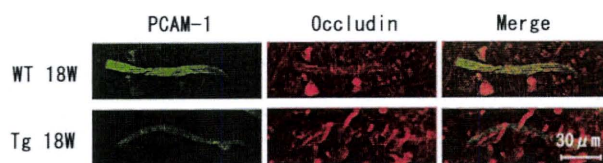


図 2 Occludin の血管上での発現は減少する

Neurovascular unit の中でより外側の構造物である collagen IV を免疫組織化学的に検討したところ、WT マウスでは 18 週まで何の変化も認められなかったが、Tg マウスでは発症前の 10 週からすでに collagen IV 陽性の血管構造が著しく減少しており、それは 15 週、18 週とさらに増悪していった (図 3)。それに対して neuropil では 15 週、18 週と逆に染色性が著しく増加した。これらの傾向はウェスタンブロット解析でも確認された。neuropil では collagen IV の発現が亢進していたので、collagen IV を発現している細胞種を特定するために二重染色を行ったところ、Tg マウスでは Iba-1 抗体を用いた場合に強く merge するものが多数認められ、主にミクログリアが collagen IV を産生していることが確認できた。

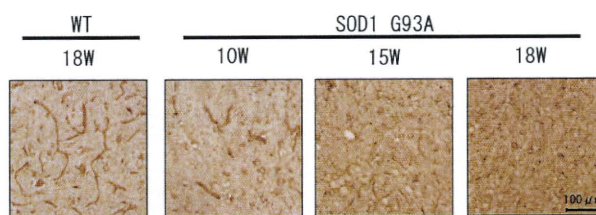


図 3 Collagen IV は血管構造上での発現は減少するが、neuropil での染色性は強くなる

### D. 考察

WT マウスでは neurovascular unit を構成する 3 つの成分は 18 週までしっかり保たれていたが、Tg マウスでは発症前の 10 週ですでに PCAM-1 の染色性は落ち始めており、occludin, collagen IV と外側に向かうほど障害はより強く認められた。この傾向は 15 週、18 週と運動障害の進行に伴い

さらに顕著になっていった(図4)。Neurovascular unit 構成成分の異常は運動障害が現れる前から見られ、運動障害と共に進行的に悪化していくため、ALS 病態との強い関連が示唆され、今後重要な治療ターゲットとなり得ると考えられる。

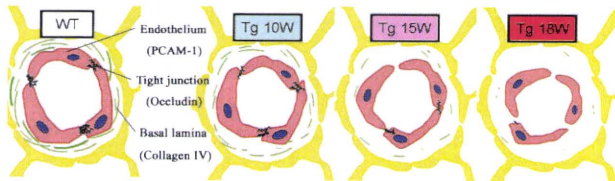


図4 結果のまとめ

## E.結論

ALS モデルマウスでは neurovascular unit の異常が発症前からすでに起こっており、特に脊髓前角で顕著であった。Neurovascular unit の外側の成分ほど早期から著しく障害されていた。ALS 病態における neurovascular unit の重要性が示唆された。

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

Miyazaki K., Ohta Y., Nagai M., Morimoto N., Kurata T., Takehisa Y., Ikeda Y., Matsuura T., and Abe, K. Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in ALS. J Neurosci Res, (in press)

### 2. 学会発表

宮崎一徳、太田康之、森本展年、倉田智子、池田佳生、松浦徹、阿部康二: ALS モデルマウス脊髓血管における neurovascular unit の異常, 第18回血管生物医学会, 大阪, 2010年12月1-3日.

## H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

### 1.特許取得

なし

### 2.実用新案登録

なし

### 3.その他

なし

## ALS-FUS モデルショウジョウバエの作成

研究分担者 中川正法<sup>1)</sup>

徳田隆彦<sup>1)</sup>， 笹山博司<sup>1)</sup>， 水野敏樹<sup>1)</sup>， 島村真依<sup>2)</sup>， 山口政光<sup>2)</sup>

1)京都府立医科大学大学院医学研究科神経内科学， 2)京都工芸繊維大学応用生物学

### 研究趣旨

*TDP43* および *FUS* が筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子として報告され、これらは転写制御因子であるとされているが、その生体内の役割および ALS の病態発現機序は未だ明らかにされていない。我々は、ALS-FUS の病態発現機序を検討する目的で、そのショウジョウバエホモログである *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエ系統を樹立した。神経特異的に *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエでは、3 齢幼虫の中樞神経系で *Caz* の発現が減少していた。また、複眼特異的な *Caz* のノックダウンでは、成虫において個眼の融合や剛毛の欠失などの異常が見られた。今後、運動神経特異的なノックダウンにより運動機能への影響を検討する。また、*Caz* ノックダウンによる複眼異常の表現型を *rescue* する分子を、特異的な変異ショウジョウバエ系統との交配することにより、網羅的にスクリーニングする。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は *SOD 1* に加えて 2006 年に *TDP43*、2009 年に *FUS* がその原因遺伝子として報告され(1-3)、*TDP43* は ALS の細胞内封入体の主成分であることが明らかにされた。研究協力者の徳田は ALS 患者の髄液中 *TDP-43* を定量し、ALS 患者群では髄液中 *TDP-43* 濃度が有意に増加し、特に発症後 10 ヶ月以内の患者で増加していることを報告した(4)。*TDP43* や *FUS* は転写制御因子の一つとされるが、その生体内の役割はまだ十分明らかにされていない。そこで我々は、*TDP43*、*FUS* のショウジョウバエホモログである *TBPH*、*Caz* をノックダウンしたショウジョウバエ系統を樹立し、その病態解析を行うことを計画した。

ショウジョウバエはヒト神経系を構成する遺伝

子の約 70% のホモログを有し、*C. Elegans* と比較してヒト遺伝子との相同性も高く、多くの遺伝子解析が可能である。また疾患モデルとして頻用されるマウスと比較するとライフサイクルが 10 日間と短く、*GAL4/UAS* 標的発現システムを用いることにより組織特異的に標的遺伝子を過剰発現またはノックダウンさせることが可能である。従って目的とする神経系標的遺伝子の機能解析や、変異を有する疾患発症原因遺伝子による神経系への影響を短期間で解析できる利点を有している。京都工芸繊維大学山口らは神経変性疾患の病態解析モデルとして有用であることを示してきた(5)。ショウジョウバエには、*FUS* のホモログである *Cabeza* (以下 *Caz*) が存在し、*Caz* は *FUS* と同様に核に存在していて、RNA の代謝制御に重要な役割をしている

と考えられている。FUS と同様に RNA の代謝制御に関係する TDP-43 では、そのホモログである TBPH をノックダウンしたショウジョウバエで運動障害を生じることが報告されており(6)、我々も Caz をノックダウンさせるショウジョウバエを作製した。

## B.研究方法

### 1) ショウジョウバエに dsRNA を発現させる pRISE ベクターの作成

ヒト *FUS* に相同なショウジョウバエの *Caz* を RNAi によりノックダウンするため、*Caz* cDNA 断片を head to head で pRISE ベクター(自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター発生遺伝学 研究部門、影山裕二先生より御供与)へクローニングした。Off-target 効果でないことを担保するために、2つの標的領域を target とする dsRNA を発現する transgene を作成した。すなわち、*Caz* の N 末端から RNA binding motif (RRM) の途中までの領域に相当する 500bp の cDNA 断片とその C 末端側で RRM の一部から Zn finger motif を含む領域に相当する 500bp の cDNA 断片を head to head で pRISE ベクターへクローニングした(図 1)。また、この pRISE ベクターには、目的遺伝子導入部位の上流に、GAL4/UAS システムにより組織特異的に遺伝子発現を制御できる UAS 配列が含まれている。

### 2) Caz ノックダウンショウジョウバエの作成

1) で作成したベクターを用いて *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエシステムを作製した。dsRNA および GFP を発現する pRISE ベクターを受精卵へ微量注入し、P 因子法とバランス染色体を応用した交配を繰り返して、*Caz* をノックダウンする遺伝子導入ショウジョウバエを作成した。さ

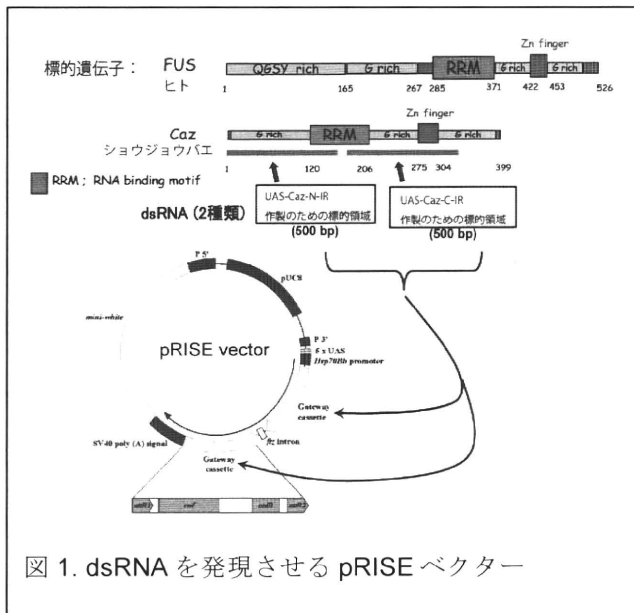


図 1. dsRNA を発現させる pRISE ベクター

らに、この *Caz* ノックダウンシステムと各組織特異的に発現を制御できる GAL4 ドライバーシステムとを交配させることにより、目的とする組織特異的に *Caz* のノックダウンを行い複眼形態などの表現型に異常を生じるかを解析した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト及びヒト由来の試料を対象としない。

## C.研究結果

### 1) 神経系特異的な Caz ノックダウンショウジョウバエの作成

Line 化した *Caz* をノックダウンする遺伝子導入ショウジョウバエ(ホモ接合体の)と神経系特異的な GAL4 ドライバーである *elav3A-GAL4* を有するショウジョウバエシステムとを交配させて、神経特異的に *Caz* をノックダウンした。その 3 齢幼虫(2 回脱皮後の蛹期前の幼虫、ふ化後 3,4 日目)では、中枢神経系特異的に *Caz* の発現量の低下が見られた。

### 2) 複眼特異的な Caz ノックダウンショウジョウバエの作成

*Caz* をノックダウンする遺伝子導入ショウジョウバエと複眼特異的な GAL4 ドライバーである GMR-GAL4 を有するショウジョウバエ系統とを交配させて、複眼特異的に *Caz* をノックダウンした。成虫の複眼では、コントロールと比較すると、ノックダウン・ショウジョウバエでは個眼の融合や剛毛の欠失などの異常な表現型が見られた (図 2)。

#### D. 考察

今回、我々は家族性 ALS の原因遺伝子である *FUS* の病態発現メカニズムを検討する目的で、*FUS* のショウジョウバエホモログである *Caz* をノックダウンさせるショウジョウバエ系統を樹立した。*FUS* の遺伝子異常による ALS 病態発現機序が、変異によって異常凝集蛋白が細胞質への沈着することなどの gain-of-function 機序であるのか、あるいは正常な *FUS* 蛋白が細胞質にトラップされることなどによって核内で機能すべき正常な *FUS* が失われるなどの loss-of-function 機序であるのかは未だ明らかではない。しかし、先行研究で、*FUS* と同様に RNA の代謝制御に関係する TDP-43 では、そのホモログである *TBPH* をノックダウンしたショウジョウバエで運動障害を生じることが報告されており(6)、今回の研究では我々も *Caz* をノックダウンさせるショウジョウバエを作製した。

抗ショウジョウバエ・*Caz* 抗体を用いた免疫染色による中枢神経系における *Caz* の局在の検討では、*Caz* 蛋白は 3 齢幼虫及び成虫では中枢神経系に全体的に広がって分布していた。この *Caz* 蛋白の発現を、*elav3A-GAL4* 系統との交配によって神経特異的にノックダウンすると、3 齢幼虫では中枢神経系において *Caz* の発現が減少しており、我々の RNAi 発現 transgene はショウジョウバエの中枢神

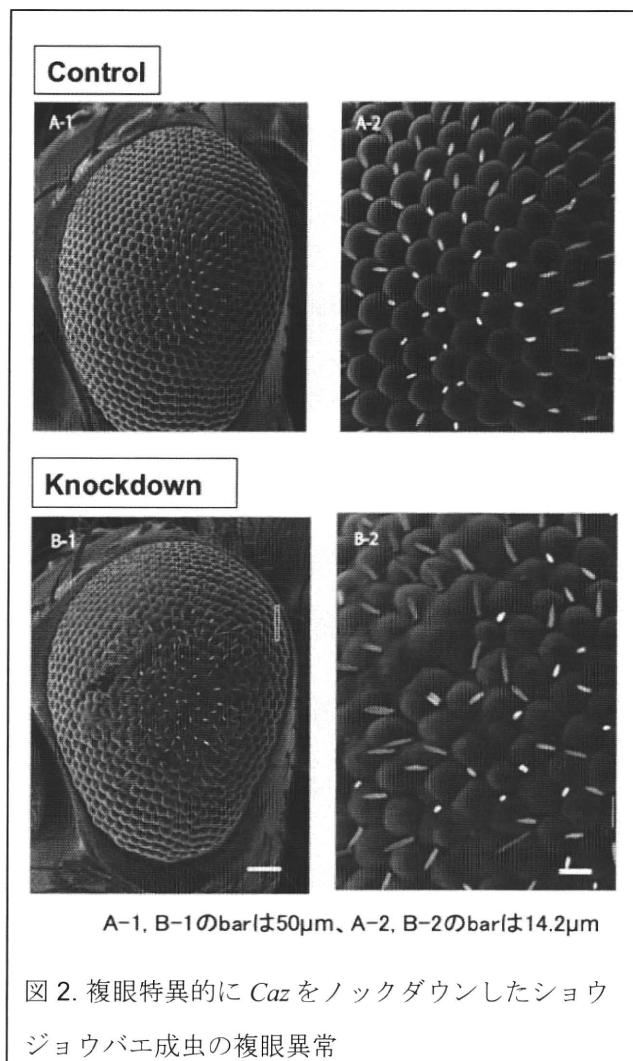


図 2. 複眼特異的に *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエ成虫の複眼異常

経で予定通りに発現していることが確認された。今後、Western blotting などによって発現レベルを検討する必要があるが、免疫染色による検討では *Caz* 発現の抑制は 100%ではなく、運動機能の解析などにはより強く *Caz* 発現レベルを抑制する必要がある可能性がある。

さらに、GMR-GAL4 ドライバー系統を用いて複眼特異的に *Caz* をノックダウンすると、個眼の融合(mild rough eye) と剛毛の欠失などの異常が認められた。複眼異常の表現型が得られたことで、*Caz* ノックダウンの表現型の確認が容易になり、その表現型の発現に影響を与える因子の解析の効率が

増大する。とくに、ショウジョウバエを用いた分子遺伝学研究の最大の利点であるすでに確立された突然変異系ショウジョウバエとの交配による病態修飾分子の大規模なスクリーニングが可能になると考えられる。共同研究者である島村、山口が所属する京都工芸繊維大学ショウジョウバエ遺伝資源センターには 20,000 系統の突然変異体が保存維持されている。今後の研究では、これらの突然変異系統と、今回我々が作成した *Caz* をノックダウンした Tg-D との交配により、*Caz* のノックダウンにより生じた機能異常を回復させられる突然変異体をスクリーニングし、改善または悪化に関わる分子を同定することを予定している。このようにして同定した分子のヒトホモログは疾患の新規診断マーカーや治療薬の新規分子標的となる可能性がある。

#### E. 結論

- 1) *Caz* をノックダウンさせるショウジョウバエを作製した。
- 2) 神経特異的にノックダウンすると、3 齢幼虫の中枢神経系で *Caz* の発現が減少していた。
- 3) 複眼特異的にノックダウンすると、成虫において個眼の融合や剛毛の欠失などの異常が見られた。
- 4) 今後、運動神経特異的なノックダウンにより運動機能への影響を検討する。また、*Caz* ノックダウンによる複眼形成異常を *rescue* する分子を、特異的な変異ショウジョウバエ系統との交配によりスクリーニングすることにより、*Caz* 機能異常の表現型に影響を与える分子を網羅的にスクリーニングする。

#### 文献

1. M. Neumann, et al. Science, 314: 130-133, 2006.
2. T.J. Kwiatkowski, et al. Science, 323: 1205-1208, 2009.
3. C. Vance, et al. Science, 323: 1208-1211, 2009.
4. T. Kasai, et al. Acta Neuropathol 117: 55-62, 2009.
5. N. Fujikake et al. J. Biol. Chem. 283: 26188-26197, 2008
6. F. Feiguin, et al. FEBS Letters, 583: 1586-1592, 2009.

F. 健康危惧情報：なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tatebe H, Nakagawa M, Tokuda T. et al. Extracellular neurosin degrades  $\alpha$ -synuclein in cultured cells. Neurosci Res. 67: 341-6, 2010.
- 2) Tokuda T, Qureshi MM, Nakagawa M, et al. Detection of Elevated Levels of  $\alpha$ -Synuclein Oligomers in CSF from Parkinson's Disease Patients. Neurology 75: 1766-70, 2010.

##### 2. 学会発表

- 1) 徳田隆彦, 笠井高士, 石神紀子, 中川正法, 玉岡晃: ヒト髄液中の  $\alpha$ -synuclein oligomer の検討. 日本神経学会総会(第 51 回), 東京, 2010. 5. 22.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## SOD1 変異 ALS マウス脊髄不溶性分画における 2次元電気泳動プロテオミクス解析

研究分担者 中島健二

研究協力者 渡辺保裕, 河瀬真也, 安井建一, 北山通朗, 中野俊也

鳥取大学医学部医学科脳神経医科学講座 脳神経内科学分野

### 研究要旨

変異 SOD1 の関連する家族性 ALS において、脊髄の不溶性分画で増加もしくは低下する蛋白の同定を試みた。ALS モデルマウスと対照マウスから採取した脊髄の不溶性分画を 2 次元電気泳動し、変化の見られた蛋白スポットを液体クロマトグラフ/タンデム質量(LC-MS/MS)解析で同定した。発症後の ALS マウスで増加を示したスポットとして glial fibrillary acidic protein (GFAP), keratin, vimentin, heat shock protein 27 と  $\alpha$ B-crystallin を同定した。免疫組織科学的検討で、いずれの蛋白も非神経細胞（アストロサイトとミクログリア）での発現が確認された。

### A. 研究目的

Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) の変異による家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の発症仮説として、“凝集毒性”は一つの有力な候補とされる。しかし、凝集した SOD1 自体が神経毒性を示すのか、SOD1 の凝集にともなう神経細胞に必須の因子の量的・質的な異常が神経細胞死を惹起するののかに関しては未だ明確ではない。FALS の病態に関連して脊髄の不溶性分画で増加する蛋白成分を、2次元電気泳動プロテオミクス解析で検討した。

### B. 研究方法

150 日齢のトランスジェニック SOD1<sup>L126de1TT</sup> マウス (D) と SOD1<sup>L126de1TT-FLAG</sup> マウス (DF), および対照として FLAG 付加野性型ヒト SOD1 を導入した SOD1<sup>WT-FLAG</sup> マウス (WF) と野性型 C57BL/6 マウス (NTG) の全脊髄 (それぞれ n=4) を採取した (図 1)。D マウスは 250 日齢で発症、DF マウスは 140 日齢で発症するため、D マウスは発症前、DF マウスは発症後の解析といえた。1% triton X-100 不溶性 (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% triton X-100, および protease inhibitor cocktail), 8 M Urea 可溶性 (8 M Urea, 4% CHAPS, 60 mM DTT, 10 mM Tris-HCl pH 7.4) の分画を対象とした。2次元電気泳動後に疾患群と対照群で 2 倍以上

の増減のあるスポットを液体クロマトグラフ/タンデム質量(LC-MS/MS)解析で同定した。DF マウスと SOD1<sup>G93A</sup> マウスの脊髄の免疫組織化学で、増減の認められたスポットに関して組織学的に検討した。

組換え DNA 実験、動物実験および動物の取り扱いに関しては、鳥取大学の当該委員会での承認を得てこれを遵守して行った。

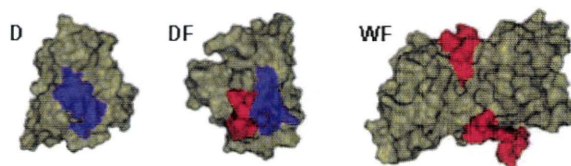


図 1. D, DF および WF 型 SOD1 の構造シミュレーション  
ヒト野生型 SOD1 に FLAG 配列 (赤) を付加した WF が 2 量体を形成するのに対し、D と DF は単量体で存在すると考えられる。青い部分は欠失によってアミノ酸配列が異なる部分を示す。D, DF, WF マウスはこれらの SOD1 蛋白を強制発現するトランスジェニックマウスを示す。

### C. 研究結果

D, DF, WF, NTG マウスを対象に 2次元電気泳動を施行した。図 2 に DF と WF の比較解析の結果を示した。2次元電気泳動の比較にて、症状を有する DF マウスでのみ増加する 5 つの蛋白スポットと、発症後の DF と発症前の D でともに増加する 1 つのスポットを同定した (Table 1)。

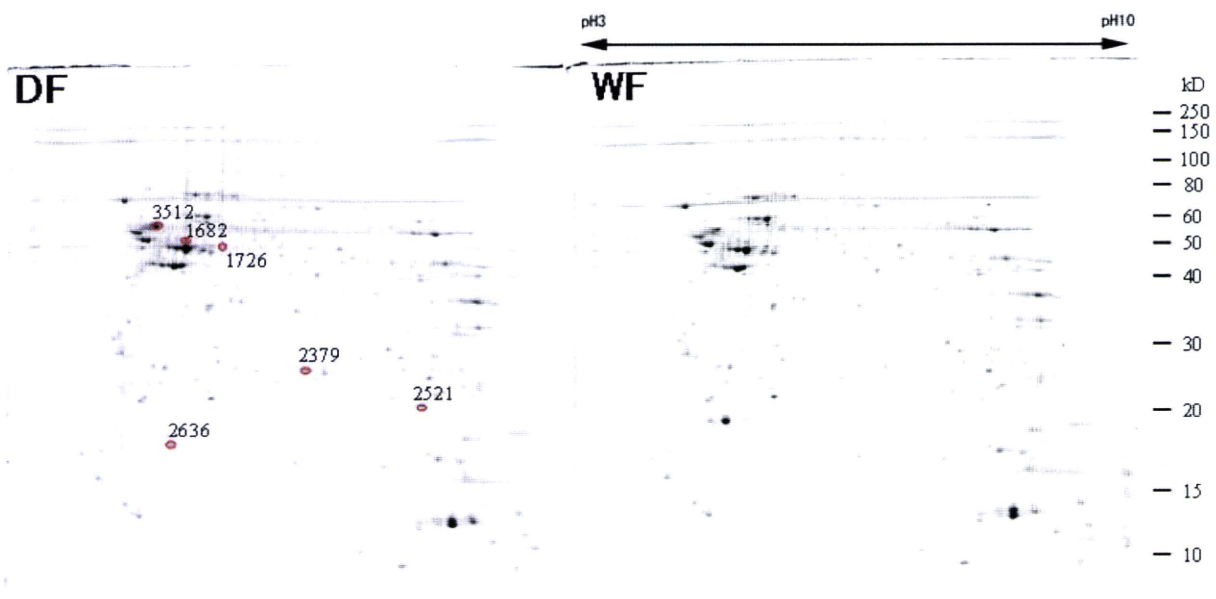


図2. DFとWFの二次元電気泳動の比較

赤で囲ったスポットがWFと比較してDFで増加したスポットを示す。WFと比較してDFで減少を認めたスポットは認めなかった。

LC-MS/MS解析にて、DFのみで増加していた5スポットはkeratin, vimentin, heat shock protein 27 (Hsp27)と $\alpha$ B-crystallin(ABC)であった(Table 2)。またDとDFでともに増加していたスポットもGFAPであった(Table 2)。

これらの結果を免疫組織化学的に検討した。アストロサイトとミクログリアのマーカーとしてそれぞれ抗GFAP抗体と抗Iba1抗体を使用した。GFAP, vimentinおよびHsp27はDFマウスおよび高発現のSOD1<sup>G93A</sup>トランスジェニックマウスにおいてアストロサイトで著明に増加しており、ABCはアストロサイトとミクログリアでの増加が認められた(図3)。

Table1

Spot	DF	D	WF	NTG	DF/WF ratio	DF/NTG ratio	D/WF ratio	D/NTG ratio
1682	0.539	0.192	0.212	0.142	2.54	3.80	0.91	1.35
1726	0.175	0.036	0.015	0.016	11.73	11.00	2.25	2.25
2379	0.240	0.069	0.067	0.054	4.21	4.44	1.28	1.28
2521	0.191	0.079	0.079	0.052	2.29	2.92	1.27	1.27
2636	0.257	0.003	0.002	0.003	129.50	85.67	1.00	1.00
3512	1.300	0.794	0.510	0.567	2.55	2.29	1.40	1.40

Table2

Spot	Reference	Abbreviation	Accession	P (pre)	Coverage	MW	Peptide Hits
1682	Glial fibrillary acidic protein	GFAP	P03995	2.80E-10	55.80	49899.7	58
1726	Glial fibrillary acidic protein	GFAP	P03995	5.23E-09	38.37	49899.7	19
2379	Heat shock protein 27	Hsp27, HspB1	P14602	9.33E-14	65.55	23013.7	16
2521	$\alpha$ B-crystallin	HspB5	P23927	2.06E-08	44.57	20068.7	11
2636	Keratin		Q61781	1.88E-11	19.63	52866.7	6
3512	Vimentin		P20152	2.22E-15	62.45	53687.3	62

#### D. 考察

GFAP, keratinおよびvimentinは中間径線維蛋白であり非神経細胞、特にアストロサイトで発現する。Hsp27とABCは低分子熱ショック蛋白群に属し神経保護作用を有するとされる。本検討で同定された蛋白は、過去にLewy body-like hyaline inclusion (LBHI)との共局在、SOD1との直接の結合、脊髄不溶性分画での増加などが示されていた。

GFAP遺伝子異常により生じるAlexander病の病理組織像で認められるRosenthal fiberでは、GFAPに加えvimentin, Hsp27, ABCが不溶性分画に共局在することが知られており、構成蛋白上の本検討との類似性は興味ある知見と考えられた。さらにRosenthal fiberはAlexander病のみならず神経変性疾患における慢性神経炎でも出現されるとされ、GFAPを中心として、vimentin, Hsp27, ABCが共局在する可能性を示唆すると考えられた。Alexander病では、神経保護的なHsp27, ABCが、GFAPと共に不溶性分画へ移行することが発症に関与するとの仮説があり、ALSにおいても同様な機序が背景にある可能性はあると考えられた。

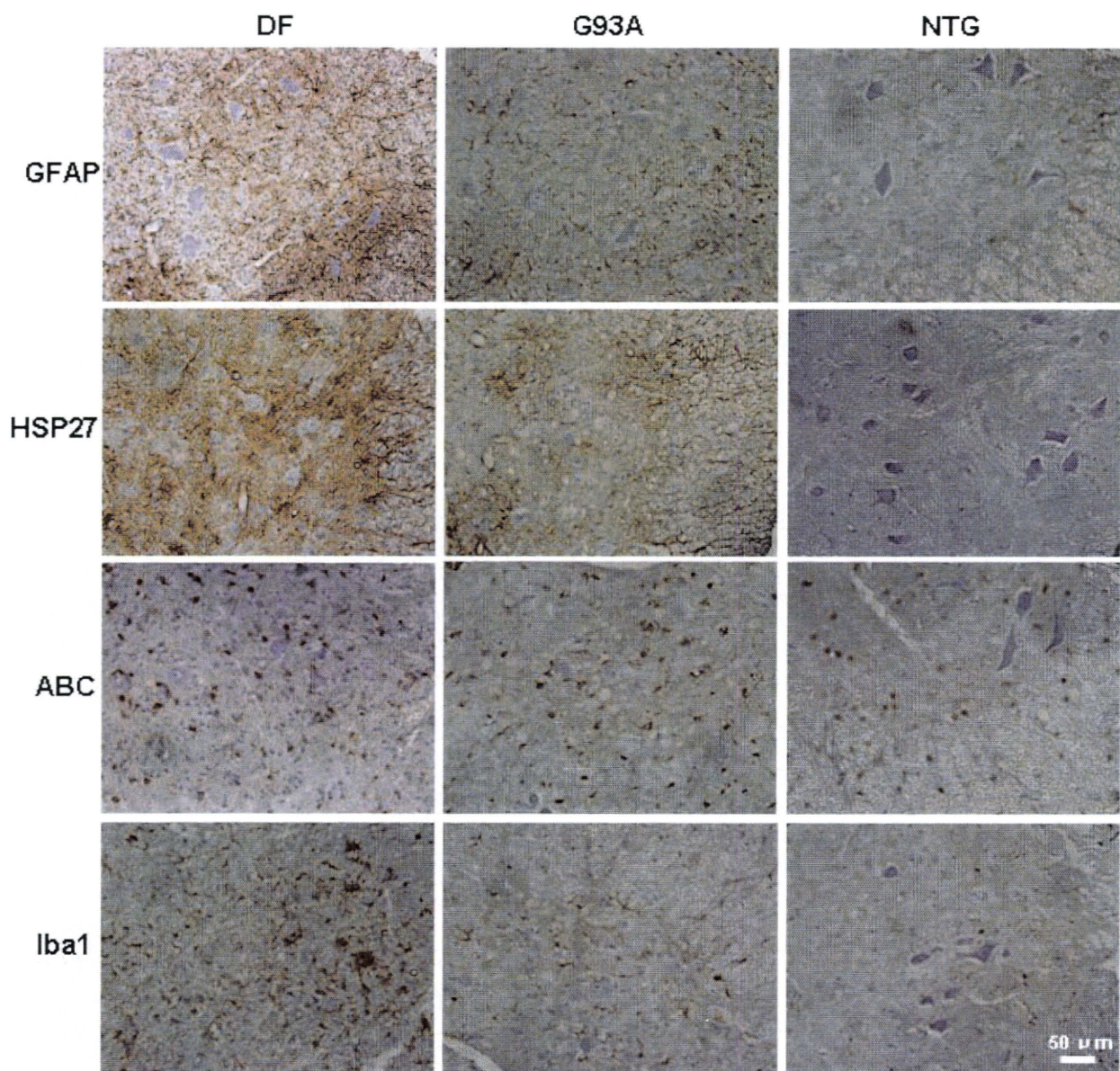


図3. 免疫組織染色

DF, G93A マウスにおいて NTG と比較して GFAP, Hsp27, ABC, Iba1 の発現増強が認められた。

## E. 結論

中間径線維蛋白と低分子熱ショック蛋白の変化が、非運動神経細胞における強い神経保護活動を反映するものであるのか、Hsp27 や ABC の不溶性分画への移行による神経変性の一因子であるのかは今後の検討が必要と考えられた。

## G. 研究発表

21<sup>ST</sup> International Symposium on ALS/MND, Orlando

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

「家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) 発症するトランスジェニックマウス」中島健二ら (特許第 4590638号) .

## 日本語版 UHDRS の信頼性検討

研究分担者 長谷川一子<sup>1)</sup>

研究協力者 公文彩<sup>1)</sup>，中野今治<sup>2)</sup>，Japan UHDRS study group

- 1) 独立行政法人国立病院機構相模原病院
- 2) 自治医科大学神経内科

### 研究要旨

ハンチントン病の臨床症状の推移や薬物の効果をみる上で、統一した尺度が必要である。ハンチントン病については海外では UHDRS: unified Huntington's disease rating scales が使用されているが、我が国では UHDRS は翻訳されているものの、信頼性検定は未実施であった。本研究では、日本語版 UHDRS の信頼性検定を Japan UHDRS study group により行った。得られた結果について統計解析をおこなったところ、すべてのパートにおいて高い信頼性を得ることができた。この結果、我が国でも日本語版 UHDRS を用いた臨床試験、臨床研究が可能となった。

### A. 研究目的

ハンチントン病(以下 HD)の臨床経過の判定や臨床試験での薬物の効果判定には統一した評価基準が必要である。この目的のために海外で使用されている臨床評価尺度として unified Huntington' disease rating scale: UHDRS がある。我が国では武藤らにより日本語訳がなされているが、信頼性検定が未着手であった。このため、日本語版 UHDRS の信頼性検定を行った。信頼性が確認されることにより、研究の評価が可能となり、研究、および薬物の開発が進展することが期待される。

### B. 研究方法

日本語版 UHDRS の検定を行うに当たり、HD の臨床経験が数例以上ある神経変性疾患調査研究班班員ならびにその関連病院の神経専門医と精神機能評価に堪能な精神科医師、臨床心理士、統計の専門家により HD study group を結成した。同時に、患者会にも本研究の趣旨を説明し、本研究に対する協力を要請した。実際の患者の診察は原則として HD study group の関連施設で行った。

日本語版 UHDRS は UHDRS 原版の翻訳の許可を武藤が得、すでに翻訳が行われていたため、武藤版（金澤一郎監修）を使用した。

運動パートについては評価の手引きをもとに評価し、ビデオ撮影により記録した。眼球運動については十分な評価ができない場合にそなえて、眼球運動速度、および潜時の測定についてビデオ眼振計を用いて検査した。

運動機能評価パート以外のパートについては精神科医師と臨床心理士が中心となって、評価方法や課題について検討した。その結果、前頭葉機能については海外版が他言語であるという問題があり、海外版をそのまま流用することができないため、慶応大学医学部精神神経科で臨床に使用し、かつ、年齢別標準値の見出されている語彙流暢性テストとストループテストを使用することとした。ストループテストの得点化については、評価後に蓋然性を求め、得点を階層化した。

行動評価については、テスト・リテストはテストの内容にそぐわないため、構造化面接により UHDRS の行動評価パートと能力評価パート、GHQ28, NPI を臨床心理士 2 者で同一患者につ

いて行い、2者間の一致性を検定した。行動評価についてはそれぞれの評価の頻度や重症度などについては、あらかじめ具体化して評価を行った。

### (倫理面への配慮)

研究内容について相模原病院の倫理審査会を受審し、研究の承認を得た。対象となった症例はUHDRS study groupの構成員の施設の症例、もしくはHD患者会の有志であるが、公平性を保つため直接の担当医でない臨床心理士が本研究について説明を行い、同意が得られた症例についてのみ日本語版UHDRSで評価を行った。研究に当たっては個人情報保護法、臨床研究に関する指針を遵守した。

### C.研究結果

特に問題なく、UHDRS日本語版の信頼性検定は終了した。

運動パートについては当初細則を定めなかったところ、大きなばらつきがあった。このため、改めて評価の細則を定め、筋トーン以外の項目について、3人の神経専門医によるビデオ判定を行った。評価後、スピアマンの相関係数を求めた。

その結果、級内相関係数は0.974、各項目の $\kappa$ 係数は評価法が明確なもの（決められた時間内の動作可能な回数など）では高く、評価法が曖昧なもの（ジストニアや舞踏運動の程度など）では低かった。しかし、すべての $\kappa$ 係数の値はすべてfair to goodの結果が得られ、運動機能パートについて、十分な信頼性が得られた。（表1、2）

表1. 運動評価 3名の評価者の総合得点平均値

	平均値	標準偏差	n
評価者 A	57.32	27.435	31
評価者 B	59.58	26.264	31
評価者 C	61.45	26.697	31

表1. 運動機能評価の総合得点に関する評価者間信頼係数.

	級内相関	95%信頼区間		有意確率
		下限	上限	
単一測定値	.979	.962	.989	.000
平均測定値	.993	.987	.996	.000

運動パート以外の部分についてはそれぞれの評価点について、ノンパラメトリック検定を採用し、UHDRS(頻度/程度)とGHQ, NPIの得点を算出した上で、スピアマンの相関係数(両側)を用いて解析した。この結果、それぞれの $\kappa$ 係数は0.70以上となり、評価者の一致率は十分に高いと検定でき、日本語版UHDRSの運動パート以外にも、信頼性が検定できた。（表3、4、5）

表3. 行動評価の各項目の評価者間の信頼性

項目	$\kappa$ 係数（1・2群を統合して算出）
憂鬱な気分 程度/頻度	.836/.836
自己軽視・罪悪感 程度/頻度	.789/.946
不安 程度/頻度	.755/.828
自殺企図 程度/頻度	---/.927
破壊的または攻撃的行動 程度/頻度	---/1.00
いらいらした行動 程度/頻度	---/---
固執・強迫観念 程度/頻度	.729/.788
強迫行動 程度/頻度	---/---
妄想 程度/頻度	1.00/1.00
幻覚 程度/頻度	---/1.00
無気力 程度/頻度	.832/.781

表 4. 行動評価；評価者群毎の信頼性（ $\alpha$ 係数）

1群 (評価者 A × B)	程度の合計得点：.9881 頻度の合計得点：.9873	2群 (評価者 C × D)	程度の合計得点：.9915 頻度の合計得点：.9704

表 5. 行動評価に関する妥当性

群	評価者	程度・頻度	GHQとの相関	NPIとの相関
1	評価者A	程度	.785**	.645**
	評価者B	程度	.766**	.716**
	評価者A	頻度	.734**	.678**
	評価者B	頻度	.691**	.683**
2	評価者C	程度	.512*	.555*
	評価者D	程度	.488*	.628**
	評価者C	頻度	.653**	.606**
	評価者D	頻度	.646**	.605**

\*\*：1%水準で有意      \*：5%水準で有意

#### D. 考察

UHDRS は HD 症例の病状を精神面，社会面についても把握し，研究や臨床試験でも評価基準として利用できるように 1996 年にロチェスター大学で開発された。その後 1999 年に改定され，武藤らにより米国 Huntington Study group に翻訳の許可を得，翻訳および back translation がなされた。今回は武藤訳日本語版 UHDRS について UHDRS study group が信頼性を検定した。武藤訳日本語版 UHDRS では認知機能パートに関する不備があったため，慶応大学精神医学教室の援助を得て，ストループテスト，語彙流暢性テストは慶応版をそのまま UHDRS で使用することにするなど，準備に時間がかかった。また，行動パート，能力パートについても同時に指導を受け，信頼性検定を行うことが出来た。

その結果すべてのパートで高い信頼性を確認することができた。運動パートでは定性的な症状

についての評価では低い  $\kappa$  係数にとどまったがいずれも fair to good 以上であり，級内相関では高い一致性が得られた。

今後，UHDRS 日本語版を評価の実施の手引きに加えて我々の作成した細則に従って利用し，臨床試験や研究に応用していくことが望まれる。現時点でもすでに，予定されている HD に対する臨床試験で日本語版 UHDRS が使用される予定である。わが国では欧米人に比較して HD の有病率が低く，単独では臨床試験が実施されない可能性もある。このため，海外とのグローバルな臨床試験を視野に入れていくことも肝要といえる。

#### E. 結論

UHDRS 日本語版の検定が終了した。細則利用により，すべてのパートで高い信頼性を得ることができた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

長谷川一子：ハンチントン病 pp302-316 各疾患領域の治療の現状とメディカルニーズ DATA BOOK 技術情報協会 2010

##### 2. 学会発表

長谷川一子ら：UHDRS の信頼性検定の進捗状況。第 51 回日本神経学会総会

#### H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

## 有棘赤血球舞踏病の総合的分子診断

研究協力者 佐野 輝<sup>1)</sup>  
中村雅之<sup>2)</sup>，富安昭之<sup>1)</sup>

1) 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科精神機能病学分野

2) 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院メンタルケアセンター神経科精神科

有棘赤血球舞踏病（ChAc）は、常染色体劣性遺伝型式の稀な遺伝性神経変性疾患である。臨床表現型は Huntington 病類似の不随意運動と末梢血有棘赤血球症を呈し、神経病理学的には脳の線条体の神経変性を特徴とする。また、ChAc には気分障害や強迫症状などの多彩な精神症状を高率に伴うことが報告されている。前回までに我々は、直接塩基配列決定法とコピー数バリエーション(CNV)解析による *VPS13A* 遺伝子変異解析に加え、ウエスタンブロット法による遺伝子産物 chorein の検出解析を行うことによって、従来までの方法では見逃されていた可能性がある病的変異を検出できるようになった。今回、同様に解析を行った日本人 ChAc 疑い患者に対して変異の分布を解析したところ、exon60\_61 欠失変異(31.8%)や R1471X 変異(27.3%)は頻度高く分布していたが他の変異は多岐に渡っていたことから、日本人 ChAc の変異は多様であり、単一創始者由来ではないことが明らかとなった。さらに、ChAc 患者や変異保因者には気分障害などの精神疾患を伴うことが多いことから、common disease-rare variants 仮説に基づき、気分障害患者 85 名を対象として ChAc の病因遺伝子 *VPS13A* について resequencing および CNV 解析をふくめた変異解析を行い健常者と比較した。その結果、気分障害者において健常者には認められなかったミスセンス変異や疾患変異をヘテロ接合性に有すものが存在しており、有棘赤血球舞踏病病因遺伝子である *VPS13A* の変異をヘテロ接合性に有す場合、気分障害の発症に関与する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

有棘赤血球舞踏病(chorea-acanthocytosis; ChAc) は、主に常染色体劣性の遺伝型式をとる稀な遺伝性神経変性疾患である。その臨床表現型は Huntington 病類似の不随意運動と末梢血の有棘赤血球症を呈し、病理学的には脳の線条体の神経変性を特徴とする。最近、我々は ChAc の病因遺伝子(Vacuolar protein, sorting 13A; *VPS13A*)の発見に成功し、遺伝子産物を chorein と命名した。*VPS13A* 遺伝子は、全長 244kb、cDNA でも 10kb を超える巨大な遺伝子である。先行報告では、ChAc の遺伝子変異は *VPS13A* 上に広く分布していたが、ヘテロ接合性に一つしか遺伝子変異が見つからない症例が 16%あり、一部は常染色体優性の遺伝形式をとる可能性が想

定されていた。前回までに我々は、直接塩基配列決定法と CNV 解析による *VPS13A* 遺伝子変異解析に加え、ウエスタンブロット法による chorein 検出解析を行うことによって、従来までの方法では見逃されていた可能性がある病的変異を検出できるようになった。今回、同様に解析を行った日本人 ChAc 疑い患者に対して変異の分布を調べた。

最近、Parkinson 病や Lewy 小体型認知症において Gaucher 病の疾患原因遺伝子である glucosylceramide  $\beta$ -glucosidase の稀な疾患変異が高率にヘテロ接合性に認められることが明らかにされ、“multiple rare variants-common disease”仮説が実証され、注目されている。ChAc は気分障害や強迫症状などの精神症状を高率に伴うことが知られており、

我々は VPS13A 変異をヘテロ接合性に持つ保因者に高率に気分障害を呈する ChAc 家系例に遭遇した。このような背景から、VPS13A 遺伝子が気分障害者の病因に関与している可能性を考え、気分障害患者を対象として変異解析を行った。

## B. 研究方法

20 名の日本人 ChAc 疑い症例の白血球から RNA 抽出/cDNA 合成あるいは gDNA を抽出し、それぞれ VPS13A の翻訳領域あるいは VPS13A 上の 73 個の Exon 及びそれらに隣接する領域に対して直接シーケンシング法によって遺伝子変異を検索した。ヘテロ接合性に一つしか遺伝子変異がないものについては Taqman probe を用いた定量的 PCR 法とロングレンジ PCR 法によって CNV 解析を行った。また、タンパク質抽出用の検体が入手できたものに対してはウェスタンブロット法による chorein 検出を合わせて行った。気分障害患者 85 名の白血球から抽出した gDNA を用いて同様に VPS13A 遺伝子の変異解析を行った。同定された変異について健常対象者から抽出した gDNA を用いて頻度を求めた。また得られた変異についてはオンラインの疾患変異予測プログラム polyphenII を用いて疾患変異の予測を行った。(倫理面への配慮)

本研究課題はヒトゲノム・遺伝子解析研究を含むため、人間の尊厳及び人権を第一とし、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 16 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針の施行等について」(平成 13 年 3 月 29 日 付 文部科学省研究振興局長・厚生労働省大臣官房厚生科学課長・経済産業省製造産業局長 4 連名通知) に基づいて研究を実施した。また、この研究については鹿児島大学大学院医歯学総合研究科遺伝子研究倫理委員会での審査を経て研究を行う承認を得た上で行った。

## C. 研究結果

日本人 ChAc 疑い症例について VPS13A 変異解析を行った結果、変異をホモ接合性にもつものが 13

例、複合ヘテロ接合性に持つものが 7 例であった。Exon60, 61 欠失変異および EXON37 上の 4411C>T (R1471X) が全変異アレル中それぞれ 31.8% および 27.3% と頻度高く存在した。その他の変異アレルは 4.5~2.3% の頻度で VPS13A 上の exon9 から exon72 まで多岐に分布していた。また、CNV 解析で exon24 から 45 までの duplication を同定したが、これはシーケンシング法のみでは検出できない変異であった。赤血球膜分画のタンパク質抽出が可能であった検体についてウェスタンブロットを行った結果、全例全長 chorein は検出されなかった。

気分障害患者の VPS13A のリークエンシングの結果、10 種類の新規のミスセンス変異と 17 種類の新規のサイレント変異を同定した。その中で PolyphenII による解析の結果、疾患変異の可能性を有するものは H196R, R208Q 変異であり、気分障害患者にそれぞれ 170 対立遺伝子中 2 対立遺伝子(1.2%)、170 対立遺伝子中 1 対立遺伝子(0.6%) 存在したが健常対象者にはこれらの変異は存在しなかった。また、CNV 解析の結果、気分障害患者に ChAc 疾患変異である exon60\_61 欠失変異が 170 対立遺伝子中 1 対立遺伝子(0.6%) 存在したが、健常対象者には存在しなかった。

## D. 考察

20 名の日本人 ChAc 疑い患者について総合的分子診断を行った。全例ホモ接合性もしくは複合ヘテロ接合性に変異を有していたが、中には CNV 解析や chorein 検出解析を加えないと変異を確定できないものもあり、ChAc の分子診断にはシーケンシング法に CNV 解析や chorein 検出解析を加えた総合的な解析が必要であると考えられた。

ChAc は全世界で 300 例ほどしか報告がなく、そのうちおよそ半数は日本の症例が占めている。今回の研究で、日本における変異は多岐にわたっており、日本人 ChAc は単一の創始者由来では説明がつくものではないことが明らかとなった。

気分障害患者において VPS13A 遺伝子上に健常者には認めなかった疾患変異や遺伝子産物の機

能と関係する可能性がある変異をヘテロ接合性  
に持つ者を認めたことから、VPS13A 遺伝子異常  
が気分障害の病因に関与している可能性が示唆  
された。しかし、検体数が少ないため、今後は検  
体数を増やす必要がある。さらに今回同定したミ  
スセンス変異がタンパク質機能に与える影響に  
ついてはさらなる解析が必要であると考えられ  
た。

## E. 結論

20 名の日本人 ChAc 疑い患者について総合的分子  
診断を行った結果、全例ホモ接合性もしくは複合  
ヘテロ接合性に変異を有していた。exon60\_61 欠  
失変異や R1471X 変異は比較的頻度高く存在した  
が他の変異は多岐にわたっており、日本人 ChAc は  
単一の創始者由来ではないことが明らかとなっ  
た。また気分障害患者において、VPS13A 上に  
ChAc 疾患変異や健常者には認めないミスセンス  
変異をヘテロ接合性に有すものが存在しており、  
VPS13A 遺伝子が気分障害に関与する可能性が  
示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

### 1. 論文発表

Shimo H, Nakamura M, Tomiyasu A, Ichiba M,  
Ueno S, Sano A. Comprehensive analysis of the  
genes responsible for neuroacanthocytosis in mood  
disorder and schizophrenia. *Neurosci Res.* in press

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 脊髄空洞症の第二次全国調査

研究分担者 佐々木秀直<sup>1)</sup>

研究協力者 佐久嶋研<sup>1)</sup>、矢部一郎<sup>1)</sup>、坪井 聡<sup>2)</sup>、上原里程<sup>2)</sup>、中野今治<sup>3)</sup>

1) 北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野

2) 自治医科大学公衆衛生学部門

3) 自治医科大学内科学講座神経内科部門

### 研究要旨

脊髄空洞症の第二次全国調査を行い、第一次全国調査で脊髄空洞症通院患者ありと報告された 427 診療科に対して、二次調査票を郵送し調査を行った。返送された症例は 720 症例で、重複症例と考えられた 12 例を統合した 708 例で解析を行った。調査時平均年齢(±SD)は 38.0±23.5 歳であった。無症候性空洞症は 160 例(22.7%)であった。空洞成因はキアリ I 型奇形が 340 症例(48.3%)と最も多く、次いで特発性が 111 例(15.8%)であった。本邦における脊髄空洞症の実態が明らかとなった。

### A. 研究目的と背景

脊髄空洞症は脊髄内部に脳脊髄液が貯留した空洞により感覚障害、疼痛、筋萎縮呈する疾患で、Chiari 奇形、脊髄損傷、脊髄感染症、腫瘍などと関連して生じることが多い。MRIにより診断は容易となった。本邦における全国疫学調査では、脊髄空洞症とその関連疾患の病態と治療に関する研究班の報告（平成3-4年度）があり、1982年から1991年の10年間の経験症例として、一次調査で2191例、二次調査で1243例が報告されている。また、外国からの報告では、8.2人/10万人の推定有病率が報告されている。2009年度に第一次全国調査を行い、2937診療科（神経内科、脳神経外科、整形外科、小児科）から1215症例が報告された。今回、第一次全国調査で報告された症例に対して、症例の詳細を調査するため、第二次全国調査を行った。

### B. 研究方法および対象

2009年に実施された脊髄空洞症の第一次全国調

査において脊髄空洞症通院患者ありと報告された 427 診療科 1215 症例（神経内科、脳神経外科、整形外科、小児科）に対して、二次調査票による郵送調査を 2009 年 11 月から 2010 年 4 月にかけて行った。調査項目は全症例に対して、性別、生年月日、診断年月、空洞左右差、空洞分布、成因、合併奇形、症候の有無とした。更に症候性空洞症症例に対しては、神経症候・徴候、経過、外科治療の有無、家族歴を調査した。

（倫理面での配慮）

本研究は、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

1215 症例への調査に対して、720 症例(回収率:59.3%)の返送が得られた。性別、生年月日、空洞分布などの情報から重複報告と考えられた 12 例を統合した 708 症例（男性:298 症例、女性:400 症例：図 1）で解析を行った。症候性脊髄空洞症:544