

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 中野 今治 自治医科大学内科学講座神経内科学部門

プロジェクト名：ALSおよび関連疾患分科会

プロジェクトリーダー名：祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学

研究課題：2.ALS 臨床調査個人票を用いた疫学研究

A.背景・研究目的

2003年度に特定疾患臨床調査個人票（個票）の大幅改訂があり、更新申請の頻度がそれまで3年に一回であったのが毎年に変更され、合わせて個票の研究活用体制が整備された。これまでに神経変性疾患に関する調査研究班として2006年度までの個票データからALS患者横断像の解析を行い、発症年齢がALSの病像に大きく影響を与えることなどを明らかにしてきた。

今後も我が国のALS患者横断像を経時的に把握していくことは、診療、福祉、介護提供の施策策定のために重要である。ALS 個票情報から2003年度以降の我が国のALS患者横断像の推移を検討した。

B.研究方法

2003～2009年度のALS臨床調査個人票のうち、データベースへの入力となされた各年度4071～5044人分の横断像データを解析対象とした。

(倫理面への配慮)

特定疾患治療研究事業における臨床調査個人票の研究目的利用に関する要綱を遵守した。データは連結不可能匿名化の状態を提供を受けた。

C.研究結果

我が国のALS患者横断像で見て、気管切開を行ったうえでの人工呼吸器装着（TPPV）患者の割合が2003年度31.1%、2009年度31.1%と大きな変動が無かったのに対して、非侵襲的換気補助装置（NPPV）使用者は2003年度9.8%、2009年度12.9%、経管栄養使用者は2003年度36.9%、2009年度42.7%と経年的な上昇傾向を示した。特定疾患認定患者総数から推計した実数では、

2003年度から2009年度の7年間で、TPPVが導入されたALS患者は500人程度、NPPV導入患者は400人程度、経管栄養導入患者は1100人程度増加したと推定された。TPPV患者のうち、在宅で療養している割合は2003年度48.5%、2009年度42.4%とやや低下する傾向を示した。実数推計では、在宅療養TPPV使用ALS患者数は2003年度から2009年度にかけて横ばいで、全国で1000人程度であるのに対して、入院で療養するTPPV使用ALS患者は2003年度から2009年度で400人程度増加したと推定された。

D.考察

2003年度以降、治療ガイドラインの普及などにより、ALS患者に対してNPPVや経管栄養がより積極的に導入されるようになってきたことが考えられる。

E.結論

我が国におけるALS患者の療養状況等の横断像は経時的に変化しており、実数も年度ごとに相当の変化がある。TPPV導入患者等の割合や実数を遅滞なく把握しながら、適切な支援体制整備をはかっていく必要がある。

F.研究発表

1.論文発表

Atsuta N, Watanabe H et al. Age at onset influences on wide-ranged clinical features of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci. 2009;276:163-9.

G.知的所有権の取得状況

特記なし。

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 中野 今治 自治医科大学内科学講座神経内科学部門

プロジェクト名：パーキンソン病および関連疾患分科会

プロジェクトリーダー名：戸田 達史 神戸大学大学院医学研究科神経内科学

研究課題：多因子遺伝病としてのパーキンソン病危険因子の探索

A.研究目的

パーキンソン病 (PD) の感受性遺伝子を発見するため、ここ 10 年間、多くの研究がなされてきたが、ゲノムワイド有意水準 ($P < 5 \times 10^{-7}$) を満たす確実なものは、 α -synuclein とゴーシェ病遺伝子 *GBA* の 2 つの遺伝子座のみであった。

そこで、我々は、世界最大規模の患者対照集団を用いて、56 万個の一塩基多型 (SNP) による、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) と、2 つの独立な再現研究を行い、PD の遺伝リスク因子を明示しようとした。

B.研究方法

日本人の PD 2,011 検体、対照 18,381 検体を用いて、ゲノムワイド関連解析と 2 つの再現研究を行った。

(倫理面への配慮)

検体収集に際しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、文章によるインフォームドコンセントを得た。

C.研究結果

我々は、新しい PD 感受性遺伝子座を、1q32 ($P = 1.52 \times 10^{-12}$) と 4p15 ($P = 3.94 \times 10^{-9}$) に同定した。さらに、疾患との強い関連を、*SNCA* (4q22, $P = 7.35 \times 10^{-17}$) と *LRRK2* (12q12, $P = 2.72 \times 10^{-8}$) の領域に検出した。白人集団の関連解析の結果と比較することにより、我々は、人種間で共通した PD リスク遺伝子座として、*PARK16*、*SNCA*、*LRRK2*、人種差を示す遺伝子座として、*BST1* と *MAPT* を見出した。

D.考察

PARK16 の発現量的形質座解析より、この領域の責任遺伝子として、*NUCKS1* が最も有力と考えた。また、*BST1* の発見は、細胞内のカルシウム恒常性の重要性を示唆した。

E.結論

PD 発症に関わる、2 つの新しい遺伝子座を同定した。また、常染色体優性遺伝性 PD の原因遺伝子の、典型的 PD への関与を証明した。さらに、人種差が、PD の遺伝的不均一性に、寄与していることを示唆した。

F.研究発表

1.論文発表

- Krüger R et al., *Neurobiol Aging* (in press)
Kanagawa M et al., *J Biol Chem* 85:31208-16; 2010
Tan EK et al., *Neurology* 75:508-12;2010
Satake W et al., *Nature Genetics* 41:1303-7;2009
Sidransky E et al., *N Engl J Med* 361:1651-61; 2009
Mitsui J et al., *Arch Neurol* 66:571-6;2009
Tomiyama H et al., *Neurosci Lett* 455:159-61; 2009
Tomiyama H et al., *J Hum Genet* 53:1012-5;2008.
Mizuta I et al., *Hum Genet* 124:89-94;2008.
Kumazawa R et al., *Arch Neurol* 65:802-8;2008

2.学会発表

- The American society of human genetics 60th Annual Meeting
14th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders
The American society of human genetics 59th Annual Meeting
13th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders
第 49 回日本神経学会総会
The American Society of Human Genetics 58th Annual Meeting

G.知的所有権の取得状況

1.特許取得

パーキンソン病発症リスクマーカー，2010-112507，出願日2010年5月14日

2.実用新案登録 なし

3.その他 なし

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 中野 今治 自治医科大学内科学講座神経内科学部門

プロジェクト名：ハンチントン病分科会

プロジェクトリーダー名：長谷川一子 独立行政法人国立病院機構相模原病院神経内科

研究課題：UHDRS 日本語版の検証

A.研究目的

ハンチントン病(以下 HD)を対象とした臨床試験や研究で使用可能とするべくハンチントン病状評価尺度である unified Huntington' disease rating scale: UHDRS 日本語版の信頼性を UHDRS study group により検定した。

B.研究方法

1. 運動パートについては我が国で HD 症例を多く診察している施設で、3人の医師で同一症例を診察し、3者の評価点についての一致度を検定した。
2. 精神機能、行動評価、能力評価については信頼性評価に様々な問題を先ず解決した。前頭葉機能のうち、ストループテスト及び語彙流暢性テストについては海外版を使用できないため、慶応大学版を使用した。UHDRS の行動評価については構造化面接により行動評価、能力評価、GHQ28, NPI について臨床心理士 2 者間の一致性を検定した。

(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。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

運動評価以外の部分については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 κ 係数は 0.70 以上となり、日本語版 UHDRS の信頼性は高いと検定できた。

運動パートについては当初細則を定めなかったと

ころ、得点のばらつきが大であった。このため、細則を定め、3人の神経専門医によるビデオ判定の後、スピアマンの相関係数を求め、級内相関係数は 0.974, 各項目の κ 係数は評価法が明確なものは高く、評価法が曖昧なものは低かったもののすべて fair to good 以上の結果が得られた。

D.考察

UHDRS 日本語版を UHDRS study group により検定した。その結果すべてのパートで信頼性が確認できた。運動パートでは定性的な症状についての評価で低い κ 係数であったものの、級内相関では高い一致性が得られた。今後、UHDRS 日本語版を評価の細則に従って利用し、臨床試験や研究に用いられることが可能となった。予定されている HD に対する臨床試験や、海外とのグローバルな臨床試験に日本語版 UHDRS が利用されることが期待される。

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.研究発表

1. 論文発表 長谷川一子：ハンチントン病。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

G.知的所有権の取得状況

- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他 なし

I. 3年間(2008年度～2010年度)の
研 究 総 括

3. 研究分担者・研究協力者

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 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

【目的・方法】 ① パーキンソン病（PD）の早期診断法の精度を高める目的で、日本人用に開発されたキットを用いた嗅覚検査（O）、中脳超音波検査（T）、¹²³I-MIBG 検査（M）を 59 例の発症早期・未治療 PD 患者を対象に行い、独自のカットオフ値を基準に異常頻度を調べた。② PD 患者 34 例を対象に腰 X-P 検査、腰 MRI 検査を行い側弯の頻度、MRI 上の信号異常、萎縮の頻度の検討を行った。1 例では脊柱起立筋の筋生検を行い組織学的に検討した。③ L-DOPA を含有する八升豆の PD 治療的応用をはかる目的で、健常対照 4 名と PD 患者 3 例において L-DOPA/DCI 100 mg または八升豆 11 g 摂取後の L-DOPA 血中濃度推移と PD 患者では症状推移を観察した。

【結果・結論】 ① 異常値の頻度は O: 73%、T: 64%、M: 54%であった。M は Lewy 小体病に対する特異性は高いが早期例では異常値を呈する患者の頻度は低い。発症前から異常が出現するといわれている O や T を複合的に組み合わせることで早期診断精度が向上できる可能性がある。

② PD 患者の 70%に側弯が合併し、その 75%の患者に脊柱起立筋の萎縮・脂肪変性を示唆する MRI 所見を得た。1 例の筋病理所見から廃用性を示す速筋萎縮と結合織増生を認めた。これらは早期からの理学療法的介入で側弯が防止できる可能性を示唆する。③ L-DOPA/DCI 100 mg または八升豆 11 g 摂取後の健常人 1 名における L-DOPA 血中濃度推移の検討では Cmax、Tmax はほぼ同等であった。PD 患者 3 名全員が八升豆摂取により On 時間が延長し、個々の症例が常用する L-DOPA/DCI 量服用時よりも L-DOPA 血中濃度が高いにもかかわらず、ジスキネジアは軽かった。八升豆は PD の運動合併症治療に有用である可能性がある。

研究分担者：近藤 智善

所属機関名：和歌山県立医科大学

A.研究目的

① パーキンソン病（PD）の早期診断法の開発と検証を行う。

② PD 患者の側弯の病態について傍脊柱筋の MR 画像および筋病理学的検討を行う。

③ L-DOPA を含有することが知られている八升豆の臨床応用を検討する。

B.研究方法

① 日本人用嗅覚検査キット（OSIT-J）、黒質超音波検査（T）、¹²³I-MIBG 心筋シンチグラフィ

（M）検査を発症早期（罹病期間 1.7±1.7 年）の PD 患者 59 例を対象に実施し、独自に設定したカットオフ値から異常値の頻度を算出した。

② PD 患者 34 例の腰部 X-P 像、MRI 像より側弯

の有無と傍脊柱筋の萎縮と信号異常の有無について検討した。PD 1 例では傍脊柱筋の生検を行った。

③ 健常対照 4 名と PD 患者 3 例を対象に八升豆摂取または L-DOPA/DCI 服用後の L-DOPA 血中濃度推移を検討した。PD 患者では八升豆摂取または L-DOPA/DCI 服用後の症状変化を観察した。

（倫理面への配慮）

研究①はルーチン検査ないし無侵襲の検査であり口頭による説明ののち同意を得て検査した。②③については和歌山医大倫理委員会の承認を得、患者からは文書による同意を得た。

C.研究結果（図表を 1～2 点添付）

① 各検査の異常率は O: 73%、T: 64%（中脳が描出可能であった症例のみの頻度）、M: 54%で

あった。

② PD 患者では対照と比べ最長筋の萎縮が高度で、患者の 70%に側弯を認め、側弯症例の 75%で脊柱起立筋の萎縮と脂肪混在を示唆する MRI 所見をみとめた。1 例の傍脊柱筋の生検所見では廃用性を示唆する速筋萎縮と高度な結合織増生が見られた (図 1, 2)。

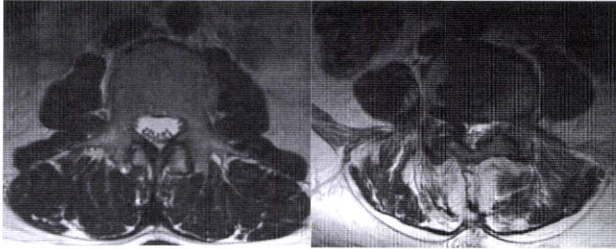


図 1. MRI T2 強調画像 (左: 対照, 右: パーキンソン病)

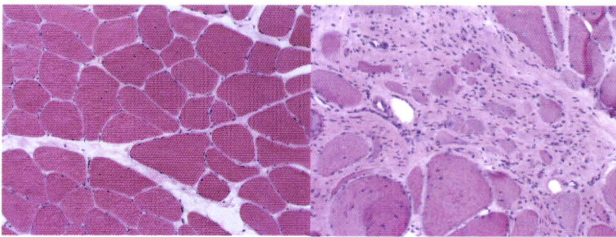


図 2. 脊柱起立筋の HE 染色 (左: 対照, 右: パーキンソン病)

③ 健常人 1 名の薬動学的検討では八升豆 11 グラム摂取で、血中 L-DOPA は L-DOPA/DCI 100/10 mg 内服と同等の Cmax、Tmax が得られた。八升豆 11 グラムを試験摂取した運動合併症のある PD 患者 3 例ではジスキネジアの増悪のない On 時間の延長が得られた。

D. 考察

① M は Lewy 小体病に特異性が高いが早期例では異常率が低く、発症前から異常があるされる O、T を加えることで、PD の早期診断精度が高められる可能性がある。

② PD 患者の腰曲り・側弯には傍脊柱筋 (最長筋または脊柱起立筋) の廃用性変化がみとめられ、その進行防止の観点からは傍脊柱筋に対する理学療法的介入が必要と考えられる。

③ 八升豆 11 グラムを試験摂取した運動合併症のある PD 患者 3 例ではジスキネジアの増悪のない On 時間の延長が得られた。八升豆の治療

的応用が期待される。

E. 結論

① 中脳超音波検査、嗅覚検査を補助検査に複合的に加えることで PD の早期診断精度を高めることができる。

② PD の腰曲り・側弯の病態の一部に廃用性の要素があることを明らかにした。理学的介入により進行が防止できる可能性がある。

③ 八升豆摂取は運動合併症の対策として有用と考えられる。薬剤としての検証が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kajimoto Y, Miwa H, Okawa-Izawa M, Hironishi M, Kondo T: Transcranial sonography of the substantia nigra and MIBG myocardial scintigraphy: Complementary role in the diagnosis of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15(4):270-272, 2009
- 2) Kajimoto Y, Miwa H and Kondo T: Transcranial sonography in relation to SPECT and MIBG. In: Daniela Berg and Uwe Walter, eds, *Transcranial sonography in Movement Disorders*, Vol 90, Academic Press, 2010, pp49-62

2. 学会発表

- 1) Sakata M, Nishimori H, Nomoto M and Kondo T: Potential therapeutic application of *Mucuna pruriens* for Parkinson's disease. The 14th Congress of EFNS, Geneva, 2010

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

パーキンソン病の脊柱起立筋

難治性疾患克服研究事業 神経変性疾患に関する調査研究班

氏名 近藤 智善

所属 和歌山県立医科大学 神経内科

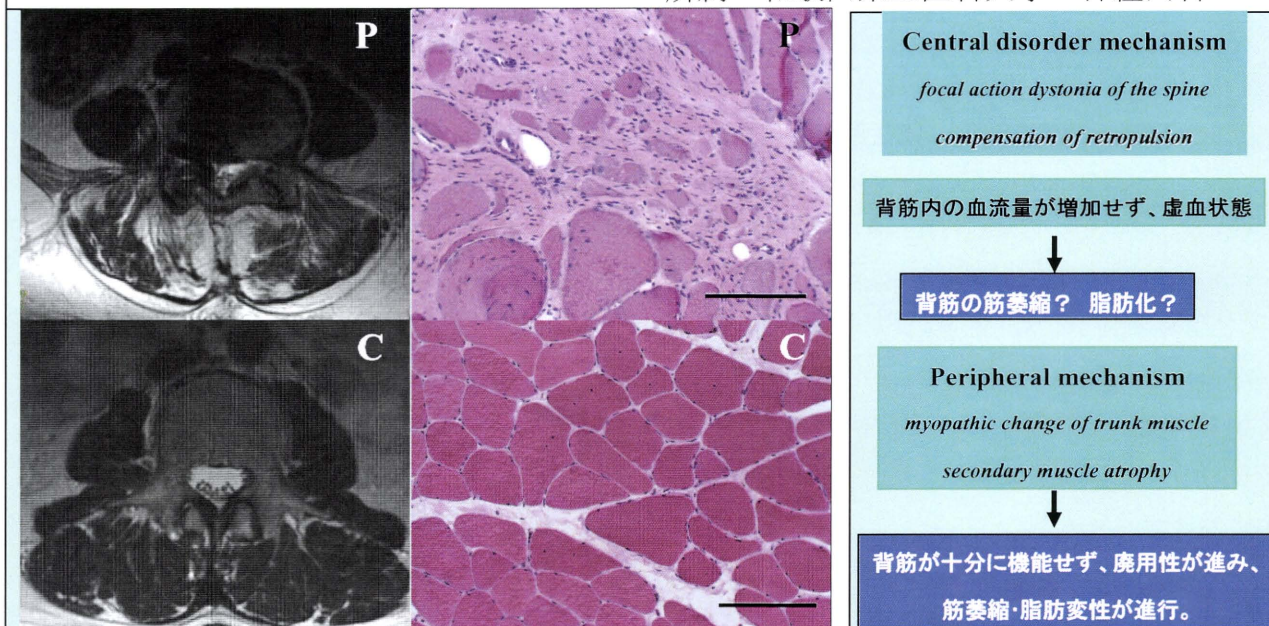


図1 脊柱起立筋の T2 強調 MRI

図2 脊柱起立筋の HE 染色

図3 筋萎縮のメカニズム

P: Parkinson's disease C: Control (Bar: 100 μ m)

パーキンソン病患者では、背筋の固縮・2次的屈曲姿勢により、脊柱起立筋（ES）が、虚血状態に陥る。MRI では、ES の筋萎縮脂肪混在が顕著で（図1）、病理学的には壊死・再生は伴わないが、廃用性を示す速筋萎縮と2次性変化である遅筋優位・高度な結合組織増生を呈する（図2）。進行予防の観点から早期よりの治療介入（薬物療法・リハビリテーション）が重要である。

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 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

球脊髄性筋萎縮症（SBMA）特定疾患認定基準および臨床調査個人票の作成を行った。筋萎縮性側索硬化症（ALS）について、上位運動ニューロン症候を臨床的に呈さない患者の特定疾患認定に問題が生じうることを示した。ALS 患者コホートの運営を推進し、474 例の患者登録・ゲノム遺伝子保存を行った。SBMA 患者 30 例の血清、尿検体保存を行った。臨床調査個人票により我が国の ALS 患者横断像の変化を示した。TDP-43 の機能喪失により Rho family の活性低下を介して神経変性を起す可能性を示した。パーキンソン病（PD）治療薬ドパミンアゴニストによる心弁膜症の把握に血清 BNP が有用であることを示した。PD 患者の日中仮眠は疾患の進行に関連することを示した。

研究分担者：祖父江 元

所属機関名：名古屋大学大学院医学系研究科
神経内科学

A.研究目的

1. 球脊髄性筋萎縮症（SBMA）特定疾患認定基準および臨床調査個人票を作成。
2. 筋萎縮性側索硬化症（ALS）診断基準の検討。
3. ALS 生体試料および臨床情報収集。
4. SBMA 生体試料収集。
5. 我が国の ALS 患者横断像の経時的変化について、ALS 臨床調査個人票を解析。
6. TDP-43 による神経変性機序の検討。
7. パーキンソン病（PD）治療薬ドパミンアゴニストに関連した心臓弁膜症への対応を検討。
8. PD 患者日中過眠について検討。

B.研究方法

1. 本研究班において実施した全国調査の情報、名古屋大学で行った 223 例の SBMA 自然歴調査結果、388 例の SBMA 遺伝子検査基礎情報を基に検討した。
2. 1998～2008 年の連続剖検例のうち ALS と病理診断された 117 例の臨床病理像を検討した。
3. 多施設共同 ALS 患者コホートである JaCALs の構築、運営を行い、縦断的臨床像のデータベース化、遺伝子検体の収集を実施した。
4. 治療介入未実施の SBMA 患者自然歴を半年ごとに評価し、血清、尿検体保存を実施した。
5. 2003～2009 年度の ALS 臨床調査個人票のう

ち、データベースへの入力済みの各年度 4071～5044 人分の横断像データを解析した。

6. Neuro-2a 細胞に対して siRNA により TDP-43 をノックダウンし、その後分化させ、細胞形態や細胞死を観察した。

7. 麦角系ドパミンアゴニストを継続内服し、治療当初からの内服歴が明らかな PD 患者 25 例と年齢と罹病期間を一致させた麦角系ドパミンアゴニストによる治療歴の無い 25 例を検討した。

心臓超音波検査とともに、血清 BNP を測定した。

8. 310 例の PD 患者について、ADL、QOL、鬱、幻覚、睡眠、嚥下、唾液、便秘、排尿障害、起立性低血圧、動悸、異常感覚、痛み、発汗に関してアンケートを用いて評価した。日中の予期せぬ睡眠の重症度評価は、PDQ39 の同項目を用いた。さらに連続 71 例の PD 中、認知症や幻覚がなく

Epworth sleepiness scale (ESS) で 10 点以上を示す PD 群の脳萎縮の有無を MRI voxel based morphometry (VBM) にて検討した。

(倫理面への配慮)

ヒトに関する研究計画については関連倫理指針を遵守し、名古屋大学倫理委員会承認を得て、参加者の文書同意を取得して実施した。

C.研究結果（図表を 1～2 点添付）

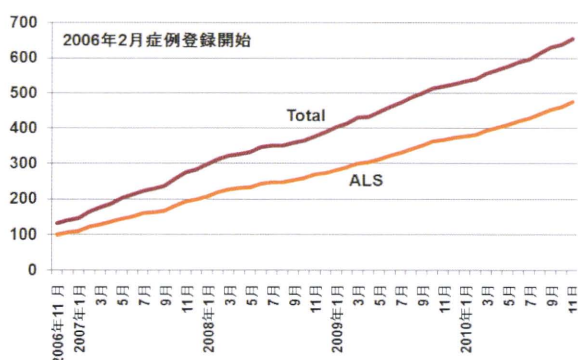
1. 臨床診断が SBMA であった 394 人中 384 人（97%）が遺伝子検査陽性であったことから、適切な診断を行えば、SBMA は高い確度で臨床診断可能な疾患であると考えられ、遺伝子診断なしで

も診断可能な形で認定基準を作成した。全国調査および自然歴調査情報を基に共通基礎情報、診断根拠、現症、経管栄養・呼吸器装着などの療養状況、ADL、フェノタイプ、進行、自然歴の把握、総括的重症度を盛り込む形で臨床調査個人票を作成した。

2. 117例の連続剖検例のうち臨床情報不十分の22例を除外し、計95例を対象とし、そのうち14例(14.7%)は上位運動ニューロン(UMN)症候を臨床的には認めない例であった。いずれも神経病理では何らかのUMN変性所見を認めた。

JaCALS登録例の検討、自験例検討を合わせて、1割程度は臨床的にUMN症候を認めないALSが存在することを示した。

3. JaCALSにおけるALS患者登録数は474例となり、縦断的臨床像収集を継続すると共に、ゲノム遺伝子検体の保存も行った。正常コントロール遺伝子検体181例の保存も行った。



縦断的臨床像の解析から、ALSの重症度スケールであるALSFRS-Rスコアの年あたり低下率と%予測肺活量の組み合わせにより、1年後の予後予測を高率に行えることを示した。

4. 治療介入を受けていないSBMA患者30例の血清、尿検体保存を実施した。

5. 我が国のALS患者横断像で、気管切開+人工呼吸器装着(TPPV)患者の割合は2003年度から2009年度で大きな変化が無かったのに対し、非侵襲的換気補助装置(NPPV)使用者は2003年度9.8%→2009年度12.9%、経管栄養使用者は同36.9%→42.7%と経年的な上昇傾向を示した。

6. TDP-43をノックダウンすることにより神経突起の伸張阻害と細胞死が誘導された。神経突起の伸張阻害と細胞死をきたす原因としてRhoA, Rac1, Cdc42に注目し検討すると、RhoA, Rac1, Cdc42の活性が一様に低下していた。

7. 心弁膜症は麦角系薬剤で非麦角系薬剤よりも出現率が高く、弁膜症の重症度の把握は心臓超音波検査に加え血清BNPも有用な指標の一つであることを示した。

8. 日中過眠は、横断的な310例の検討では幻覚と最も関連していた。またMRI voxel based morphometryの検討では、幻覚や認知症が無くとも日中過眠群PD群は、過眠の無いPD群や健常対象群に比べて有意な大脳萎縮を認めた。

D. 考察および E. 結論

1. 今後継続的な臨床調査個人票解析により我が国のSBMA患者横断像を明らかにする。

2. 臨床的にUMN症候を認めないALS患者も特定疾患認定可能にするような基準改訂が必要。

3. ALS患者縦断像情報の臨床現場、治験計画への還元を進めると共に病態解析を推進する。

4. 生体試料および縦断像のさらなる蓄積を行う。

5. 我が国のALS患者療養状況、数の変化に対応できるように、継続的な横断像把握が重要。

6. TDP-43の機能喪失により神経変性を起す可能性が示唆され、その病態機序としてRho familyの活性低下が一因と考えられた。

7. 心臓弁膜症の重症度を反映する指標としてBNPは有用である。

8. PD患者の日中過眠は薬剤よりも疾患の進行に伴う要素が強いことを見いだした。

F. 研究発表 論文発表

Katsuno M et al. Lancet Neurol. 2010;9:875-84.

Watanabe H et al. Neurology. 2009;72:621-6.

Iguchi Y et al. J Biol Chem. 2009;284:22059-66.

Banno H et al. Ann Neurol. 2009;65:140-50.

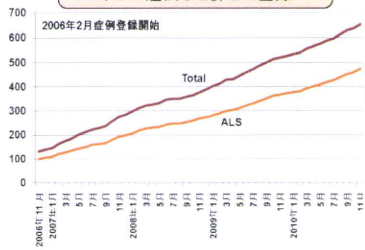
Atsuta N et al. J Neurol Sci. 2009;276:163-9.

G. 知的所有権の取得状況

特記なし

多施設共同ALS患者コホートの構築と運営

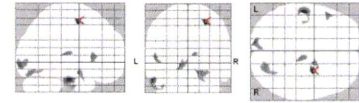
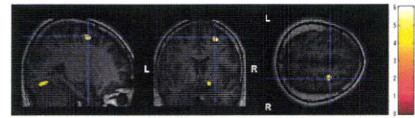
ALS 474例 コントロール181例を
ゲノム遺伝子と併せて登録



ALS
病態解明
リソース

難治性疾患克服研究事業
神経変性疾患に関する調査研究班
祖父江 元 名古屋大学 神経内科

パーキンソン病患者日中過眠責任病巣

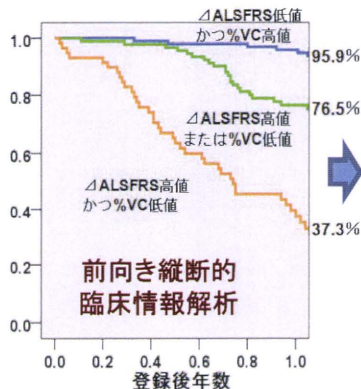


パーキンソン
病
多彩な非運動
機能異常への
対応

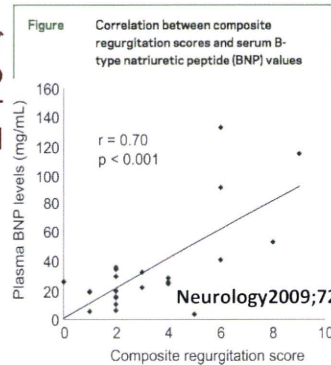
麦角系ドパミンアゴ
ニスト内服時の
心弁膜症を検出する
上でBNPは有用

診療、介護の現場
治験計画

パーキンソン治療薬副作用
への対応



前向き縦断的
臨床情報解析



・多施設共同筋萎縮性側索硬化症（ALS）コホートであるJaCALSについて、事務局として構築、運営を行った。全国21施設が参加し、平成22年12月の段階で474例のALS患者を登録、前向き縦断的臨床情報収集を行っている。同数のゲノム遺伝子も保存し、臨床情報データベースと同一の匿名符号で連結可能とした。

・JaCALSの縦断的臨床データを用いて、ALSの代表的な重症度スケールであるALSFRS-Rの年ごとの低下率を Δ ALSFRS-Rと定義したときに、登録時情報から1年後の予後予測を Δ ALSFRS-Rと%予測肺活量の組み合わせで高率に予測可能であることを示した。これらは診療、介護の現場における判断、説明、治験のデザイン策定や割付因子の選定などに重要な基礎資料を提供できる。

・パーキンソン病（PD）治療薬として、麦角系ドパミンアゴニストは広く使われてきたが、心臓弁膜症のリスクを高めることが明らかにされ、心臓弁膜症の評価をしながら使用する必要がある。麦角系ドパミンアゴニストを継続内服してきた25例のPD患者および、年齢と罹病期間を一致させた麦角系ドパミンアゴニストによる治療歴の無い25例について、循環器内科医による心臓超音波検査とともに、血清BNPを測定した。心臓弁膜症の重症度は、BNP値と良く相関し、良い指標の一つになることが示された。

・PDでは運動機能障害のみならず、多彩な非運動機能障害が問題となる。その一つである日中過眠は、横断的な310例の検討で幻覚と最も関連していた。また連続71例のPD患者中、日中過眠を示す例と示さない例のMRI voxel based morphometryを用いた検討では、日中過眠群で前頭葉、後頭葉、側頭葉の萎縮を認め、薬剤よりも疾患の進行に伴う要素が強いことを見いだした。

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 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

ゴーシェ病患者および保因者でパーキンソン病（PD）を発症する例が報告されたことから、GBA が PD の疾患感受性候補遺伝子として注目されている。我々は、患者・対照群で GBA 遺伝子の全 11 エクソンとその近傍をリシーケンスした。その結果 PD 患者 534 人中 50 人（9.4%）、対照 544 人中 2 人（0.37%）に GBA 変異ヘテロがみられ、極めて強い関連があった（ $p = 6.9 \times 10^{-14}$ 、オッズ比 28.0）。GBA 変異ヘテロは PD の確実なリスク因子であるといえる。日本人の PD 2,011 検体、対照 18,381 検体を用いて、ゲノムワイド関連解析と 2 つの再現研究を行った。我々は、1q32（ $P = 1.52 \times 10^{-12}$ 、*PARK16*）と、4p15（ $P = 3.94 \times 10^{-9}$ ）に、新しい PD 感受性遺伝子座を同定した。さらに、 α -synuclein（4q22、 $P = 7.35 \times 10^{-17}$ ）と *LRRK2*（12q12、 $P = 2.72 \times 10^{-8}$ ）の領域に疾患感受性を検出した。白人集団の関連解析の結果と比較することにより、我々は、人種間で共通した PD リスク遺伝子座として、*PARK16*、*SNCA*、*LRRK2*、人種差を示す遺伝子座として、*BST1* と *MAPT* を見出した。さらに *SNCA* 遺伝子の SNP にアレル特異的に結合する転写因子を同定した。これを介してパーキンソン病感受性に影響すると考えられる。

研究分担者：戸田 達史

所属機関名：神戸大学大学院医学研究科

A.研究目的

パーキンソン病（PD）の感受性遺伝子を発見するため、ここ 10 年間、多くの研究がなされてきたが、ゲノムワイド有意水準（ $P < 5 \times 10^{-7}$ ）を満たす確実なものは、 α -synuclein とゴーシェ病遺伝子 *GBA* の 2 つの遺伝子座のみであった。

そこで、我々は、世界最大規模の患者対照集団を用いて、56 万個の一塩基多型（SNP）による、ゲノムワイド関連解析（GWAS）と、2 つの独立な再現研究を行い、PD の遺伝リスク因子を明示しようとした。また PD の感受性遺伝子同定のため、候補遺伝子ゴーシェ病遺伝子の患者対照関連解析を行う。また *SNCA* の SNP が PD の発症に関与するメカニズムを明らかにすることである。

B.研究方法

日本人の PD 2,011 検体、対照 18,381 検体を用いて、ゲノムワイド関連解析と 2 つの再現研究を行った。GBA 変異はリシーケンスにより決定した。

アジア人とヨーロッパ人に共通な PD 関連 *SNCA* SNP を選出した。それらの SNP に対して SH-SY5Y 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイを行った。両アッセイでアレル間の違いが明らかにみられた SNP については、アレル結合蛋白を DNA アフィニティービーズで精製し、質量分析で同定した。

(倫理面への配慮)

DNA 収集のための採血の際には「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守し、文書によるインフォームドコンセントを得た。なお、本研究は各研究機関倫理委員会の承認を得ている。

C.研究結果（図表を 1～2 点添付）

GBA 変異ヘテロは PD 患者 534 人中 50 人（9.4%）、対照 544 人中 2 人（0.37%）であり、極めて強い関連がみられた（オッズ比 28.0）。変異を持つ群の発症年齢（ 52.5 ± 7.4 ）は変異を持たない群（ 58.8 ± 10.7 ）よりも有意に低かった（ $p < 0.001$ ）。

我々は、新しい PD 感受性遺伝子座を、1q32（ $P = 1.52 \times 10^{-12}$ ）と 4p15（ $P = 3.94 \times 10^{-9}$ ）に同定した。さらに、疾患との強い関連を、*SNCA*（4q22、 $P = 7.35 \times 10^{-17}$ ）

と *LRRK2*(12q12, $P=2.72 \times 10^{-8}$) の領域に検出した。白人集団の関連解析の結果と比較することにより、我々は、人種間で共通した PD リスク遺伝子座として、*PARK16*、*SNCA*、*LRRK2*、人種差を示す遺伝子座として、*BST1* と *MAPT* を見出した。

SNCA の intron 4, 3'-UTR, 3'-flanking 領域にある 4 個の SNPs が、両人種に共通して PD と極めて強く関連していた。そのうちアレル間の違いが顕著に現れたのは 3'-flanking 領域の SNP

rs356219 であった。rs356219 の protective allele におけるルシフェラーゼ活性は disease allele の約 1.6 倍に有意に増加していた。さらに、ゲルシフトアッセイでは、rs356219 の protective allele に特異的に結合する核蛋白の存在が示され、転写因子であることが同定された。

D. 考察

GBA に関しては海外からも同様の報告が多数あり、遺伝統計学的に GBA 変異は確実な PD リスク因子であると言える。GBA 変異が PD の病態にどのように関与しているのかはまだ明らかではない。

PARK16 の発現量の形質座解析より、この領域の責任遺伝子として、*NUCKS1* が最も有力と考えた。また、*BST1* の発見は、細胞内のカルシウム恒常性の重要性を示唆した。

SNCA 蛋白は、PD の病理像である Lewy body の主成分である。メンデル遺伝型 PD の *SNCA* 遺伝子重複家系では、重複回数が増えると *SNCA* の発現が上昇し臨床症状も重篤になることが報告されている。従って、孤発性 PD においても *SNCA* の高発現が疾患感受性をもたらすと考えられている。以上のことから、rs356219 がアレル特異的に結合する転写因子を介して *SNCA* の転写レベルを調節している可能性が示唆される。

E. 結論

PD 発症に関わる、2 つの新しい遺伝子座を同定した。また、常染色体優性遺伝性 PD の原因遺伝子の、典型的 PD への関与を証明した。さらに、人種差が、PD の遺伝的不均一性に、寄与していることを示唆した。GBA 変異は確実な PD リスク因子である。病態メカ

ニズムを明らかにすることが今後の課題である。

SNCA 遺伝子の SNP はアレル特異的な転写因子の結合を介してパーキンソン病感受性に影響すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Krüger R et al., *Neurobiol Aging* (in press)
Kanagawa M et al., *J Biol Chem* 85:31208-16; 2010
Tan EK et al., *Neurology* 75:508-12;2010
Satake W et al., *Nature Genetics* 41:1303-7;2009
Sidransky E et al., *N Engl J Med* 361:1651-61; 2009
Mitsui J et al., *Arch Neurol* 66:571-6;2009
Tomiyama H et al., *Neurosci Lett* 455:159-61; 2009
Tomiyama H et al., *J Hum Genet* 53:1012-5;2008.
Mizuta I et al., *Hum Genet* 124:89-94;2008.
Kumazawa R et al., *Arch Neurol* 65:802-8;2008

2. 学会発表

- The American society of human genetics 60th Annual Meeting
14th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders
The American society of human genetics 59th Annual Meeting
13th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders
第 49 回日本神経学会総会
The American Society of Human Genetics 58th Annual Meeting

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

パーキンソン病発症リスクマーカー, 2010-112507, 出願日 2010 年 5 月 14 日

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

<パーキンソン病の多因子遺伝解析>

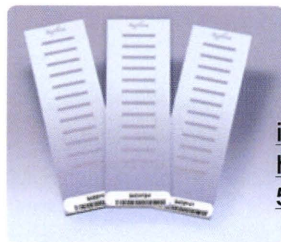
難治性疾患克服研究事業
 神経変性疾患に関する調査研究班
 戸田 達史
 神戸大学大学院医学研究科

	GBA変異		計
	+	-	
PD	50 (9.4%)	484	534
対照	2 (0.37%)	542	544

Rare variant
 パーキンソン病の10%弱はゴー
 シェ変異を持つ→確実な危険因
 子である

OR = **28.0** (7.3 - 238.3)

Arch Neurol (2009), New Engl J Med (2009)



55万SNP

illumina
 humanhap
 550

患者2011人, 対照18435人のゲノムワイド関
 連解析(GWAS)にてパーキンソン病4つの感
 受性遺伝子を同定
 (Nature Genet, 2009 Dec.)

患者2011人, 対照18435人のゲノムワイド関連解析にて孤発性パーキンソン病の4つ
 の
 感受性遺伝子を同定した。
 またrare variantとしてゴーシェ遺伝子変異が確実なPDリスクであることを明らかに
 した。

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 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

ハンチントン病の臨床評価尺度である日本語版 UHDRS の信頼性検定を行った。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 UHDRS 日本語案を用いた臨床試験、臨床研究の端緒が開かれた。

ハンチントン病の臨床評価尺度である日本語版 UHDRS の検定

研究分担者：長谷川一子

所属機関名：独立行政法人国立病院機構

相模原病院

A.研究目的

HD の臨床試験や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を目的として、ハンチントン病(以下 HD)の臨床評価尺度である unified Huntington' disease rating scale: UHDRS (日本語版) の信頼性検定を行った。

B.研究方法

UHDRS の検定を行うに当たり、まず、HD の臨床経験が数例以上ある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、統計の専門家による HD study group を結成し、患者の診察は当グループの施設で行った。

運動パートについては評価の手引きをもとに評価し、ビデオ撮影によりリテストに備えた。また、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であるが、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 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 (図表を 1~2 点添付)

特に大きな問題なく、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、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 κ 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 κ 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。

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 κ 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ついても、信頼性が検定できた。

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 κ 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. 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

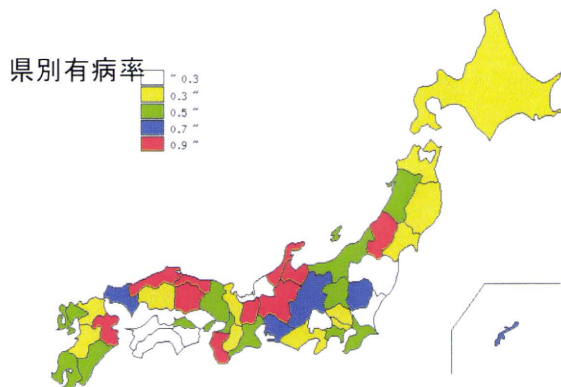
G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

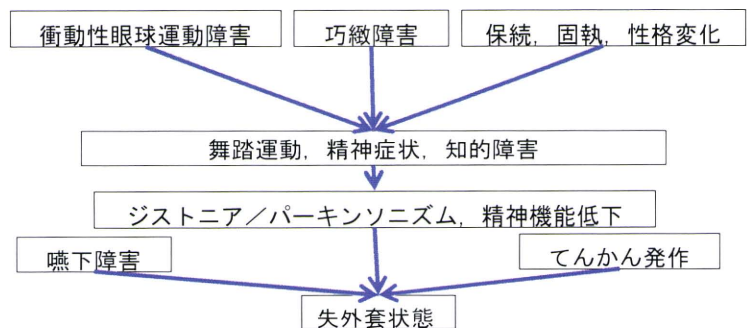
ハンチントン病の現状とUHDRS信頼性検定

難治性疾患克服研究事業
神経変性疾患に関する調査研究班
所属 NHO相模原病院神経内科
氏名 長谷川一子

ハンチントン病の有病率：0.57/10万人



ハンチントン病の臨床経過



- ハンチントン病の有病率は人口10万人当たり0.57人で、H16年の調査より微増している。
- 前回の調査にから、機能障害が高度で、自立している症例が少ないことが明らかとなった。
- ハンチントン病の臨床症状を軽快するための治療薬の開発が望まれ、評価方法としてのUHDR日本語版の検定を行った。
- 日本語版UHDRSは十分臨床応用が可能であることが明らかとなった。

解説

- ハンチントン病の有病率を前回に引き続いて特定疾患受給者証の発行件数を元に調査した。H20年とH16年との比較では、有病率は微増している。有病率の地域差については図示したとおりである。
- 臨床上の進展は図右に示したとおりであるが、前回の調査により自立した社会生活を営んでいる症例は少数であった。このため、治療介入および治療薬の開発のためにハンチントン病の評価法であるUHDRSの日本語版の信頼性を検定する必要がある。
- UHDDR日本語版の信頼性検定を行ったところ、高い信頼性が得られ、治療薬の開発や世界同時の臨床試験も可能となった。
- 懸案であった「ハンチントン病療養の手引き」にも着手したところであり、ハンチントン病を病んでいる患者および介護者を支援していく予定である。

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 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

遺伝性パーキンソン病のうち、PARK3, PARK8 について研究を行った。PARK3 の原因遺伝子は未だ不明であるが、セピアプテリン還元酵素（SPR）遺伝子は原因遺伝子領域の中心に位置している。Spr 遺伝子とパーキンソン病発症との関連を調べるために、Spr ノックアウトマウスにおける生化学的変化、組織化学的変化、行動学的変化を解析した。Spr ノックアウトマウスはパーキンソン病と同様に脳内ドーパミンおよび TH タンパク質量の顕著な低下、無動・振戦などの行動異常を示し、SPR 遺伝子が PARK3 の原因遺伝子である可能性を示唆できた。PARK8 パーキンソニズムについては髄液バイオプテリン値を測定し、パーキンソン病との差異を見出した。これからは PARK 8 の原因遺伝子 LRRK2 がドーパミンの放出機構に関与している可能性が示唆された。

研究分担者氏名：長谷川一子

所属機関名：独立行政法人 国立病院機構
相模原病院

A.研究目的

1. 遺伝性パーキンソン病（以下 PD）の一つである PARK3 の原因遺伝子は未だに同定されていない。セピアプテリン還元酵素（SPR）は、PARK3 の候補遺伝子のひとつである。このため、SprKO マウスを作成し、生化学的、組織化学的、行動学的に解析することにより、Spr 遺伝子欠損により引き起こされるマウスフェノタイプを検討した。Spr 変異による PD 症状の発現を明らかにし、PD モデル動物としての SprKO マウスの有用性について検討した。
2. 相模原家系は PARK8 パーキンソニズムの一家系であるが、比較的経過が良いことが明らかとされている。この要因として、バイオプテリン代謝が他の PD と異なるかを検討した。

B.研究方法

1. SPR ノックアウトマウスは、前明海大学歯学部生化学教室教授加藤節子博士から供与していただいた。脳内モノアミン含量は、高速液体クロマトグラフィ・電気化学検出法により定量した。バイオプテリン量は

高速液体クロマトグラフィ・蛍光検出法により定量した。免疫組織化学は 4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定後に、マウス脳凍結切片を用いて発色法により観察した。Self-clasping test はマウスの尻尾を持って 30 秒間吊り下げてビデオ撮影し、両方の前肢、後肢をあわせる姿勢をとる時間を測定した。

2. PARK8 患者および対照である特発性 PD の髄液バイオプテリン値の測定は、定法のように髄液を採取し、凍結後 1. と同様の方法で髄液バイオプテリン量を測定した。

(倫理面への配慮)

1. マウスの解析は東京工業大学動物実験倫理指針に則って行った。
2. 研究を開始する前に研究計画書を相模原病院倫理委員会に提出し、審査を受け、研究の承認を得た。患者については説明を行い、同意が得られた患者の髄液のみを研究に使用した。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（図表を 1～2 点添付）

1. SPR ホモ欠損マウス 17 日齢(P17)のマウスで、脳内バイオプテリン量は SprKO マウスにおいて野生型の約 30%に低下した。他の脳内全てのモノアミン含量も SprKO マウスでは著明に減少した(図 1)。

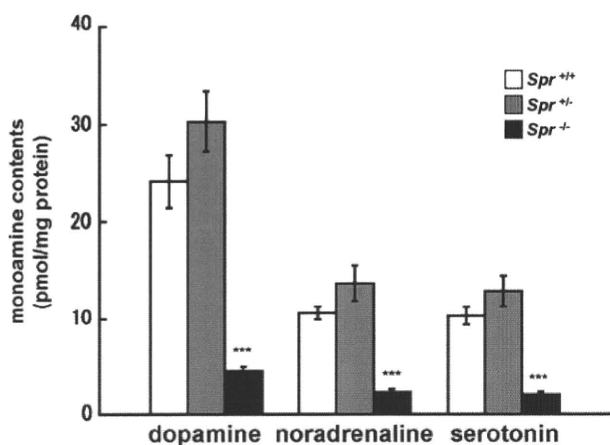
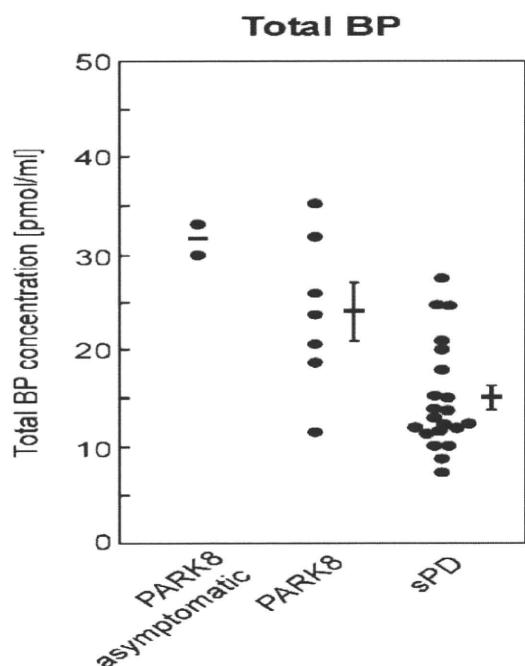


図1 野生型, SprKO マウス脳内モノアミン含量

次いで, モノアミン量の発達に伴う変化を免疫組織学的に調べたところ, SprKO マウスでは発達に伴ってモノアミンの欠乏が顕著になった。

行動学的にも self-clasping test では, SprKO マウスの多くは Self-clasping 肢位を取った。また, SprKO マウスの運動量は野生型と比較して無動であった。さらに, 6 週齢以上生存した SPR ホモ欠損マウスでは高率で前肢の震えを観察した。

2.PARK8 患者および無症候性キャリア, 孤発性 PD の髄液ビオプテリン量の検討では, PARK8 患者およびキャリアは髄液ビオプテリン量の減少が少なく, 孤発性 PD と異なっていた。(図2)



D.考察

1.マウス SprKO マウスの生化学的変化と行動学的変化を解析した. ヒトにおいては SPR 欠損症の存在が 2001 年に報告され, ジストニアと発達障害と認知機能障害が認め, ドーパの投与が運動障害に著効する. 今回, SprKO マウスが PD も出る動物として使用できる可能性を示すことが出来た. PARK 3 パーキンソニズムの原因遺伝子が解明された場合, セピアプテリンとの関連でさらに検討が進められることが期待できる。

2.PARK8 のビオプテリン代謝の障害は孤発性 PD と異なっており, PARK8 の病因遺伝子である LRRK2 の機能の一つとされるドーパミンの放出障害との関連が示唆された. 今後, 他の変異でのビオプテリン代謝に関する検討を進めていく予定である。

E.結論

1.SPRKO マウスは脳内モノアミンの低下を基盤に無動・前肢の振戦など PD 類似の行動変化を示した. この KO マウスは PARK3PD のモデル動物となり得ることが示唆された。

2.PARK8 のビオプテリン代謝は孤発性 PD と異なることが示唆され, 今後の蓄積が待たれる。

F.研究発表

1.論文発表

Ichiro Kawahata, Saburo Yagishita, Kazuko Hasegawa, Ikuko Nagatsu, Toshiharu Nagatsu, Hiroshi Ichinose: Immunohistochemical analyses of the postmortem human brains from patients with Parkinson's disease with anti-tyrosine hydroxylase antibodies. Biogenic Amins 23:1-7, 2009.

2.学会発表 2010 ADPD で発表予定

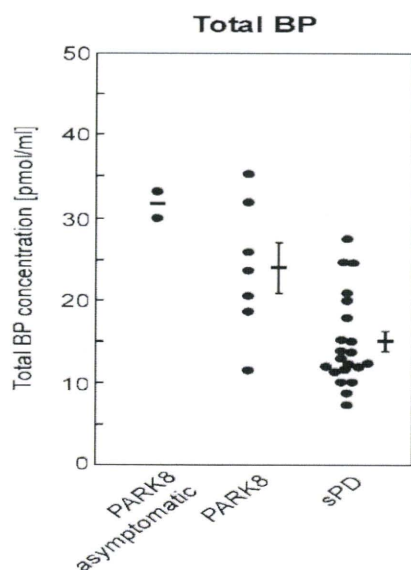
G.知的所有権の取得状況

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

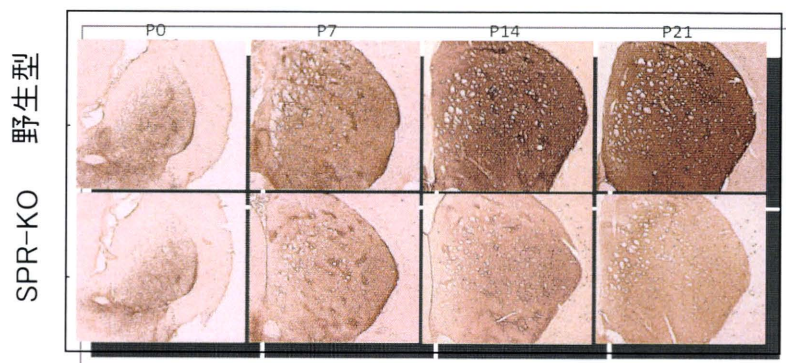
家族性パーキンソン病の病態に関する研究

I. PARK8患者髄液の生化学的解析

- 難治性疾患克服研究事業
- 神経変性疾患に関する調査研究班
- 所属 NHO相模原病院神経内科
- 氏名 長谷川一子



II. SPR-KOマウス線条体におけるTHタンパク質の減少



- sPD患者に比較してPARK8患者では髄液バイオプテリンの低下が軽度である。
- キャリアではさらに低下が軽度である。
- SPRはPARK3の原因遺伝子候補である。
- 生後発達に伴いKOマウスでは線条体TH活性低下がP14頃から顕在化する。
- SPR遺伝子変異によりSPR活性が低下し、THタンパク質が減少する

I. PARK8, PARK8無症候キャリア, 孤発性PD症例: sPDに対する髄液バイオプテリン:BPの検討

- sPD髄液バイオプテリンは低値であった。
- PARK8患者の髄液バイオプテリン量はsPD患者より有意に高かった。
- 2人の無症候性キャリアではPARK8発症者と比べて高いバイオプテリン値を示した。
- PARK8ではsPDよりドパミンニューロンの変性の程度が低くても症状が現れる
- PARK8の原因遺伝子であるLRRK2の変異が、神経変性よりドパミンの放出障害などのドパミンニューロンの機能障害を引き起こすことと関連するといえる。

II. セピアプテリンノックアウト: SPM-NOマウス線条体のチロシン水酸化酵素:THタンパク質の減少

- SPRは、PARK3遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子の候補である。
- SPR-KOマウスを作製し、脳内におけるTHタンパク質の変化を解析した。
- SPR-KOマウスでは、生後14日ごろから線条体でTH免疫反応性の低下が顕著になった。
- SPR活性が低下することにより、THタンパク質の減少からドパミンニューロンの機能低下が起ることが示唆された。

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 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

RNA 干渉（RNA interference、RNAi）は配列特異的な遺伝子発現抑制法として強力なツールであり、将来の臨床応用が期待されている。しかし、生体内での効果的な short interfering RNA（siRNA）のデリバリー法は確立されていない。神経変性疾患の遺伝子治療を目的に内因性のリポタンパク質 HDL をベクターとして用いて、トコフェロールまたはコレステロール結合 short interfering RNA（siRNA）を脳室内投与で脳神経細胞へ、静脈内に投与にて脳血管内皮細胞へ導入することに成功した。その結果、脳神経細胞の内因性 BACE1 や脳血管内皮細胞の内因性 OAT3 の mRNA の発現を約 50-60%抑制することができ、中枢神経系への siRNA の新規デリバリー方法を開発に成功した。

研究分担者：水澤 英洋

所属機関名：東京医科歯科大学脳神経病態学分野

A. 研究目的

神経変性疾患の遺伝子治療を目的に内因性のリポタンパク質をベクターとして用いて、1) 脳神経細胞や 2) 脳血管内皮細胞への short interfering RNA（siRNA）の新規 in vivo デリバリー方法を開発する。

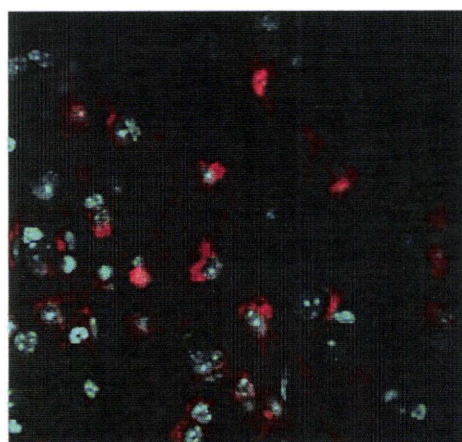
B. 研究方法

アンチセンス鎖 5' 端にトコフェロールを結合したマウス BACE1 に対する siRNA (Toc-siBACE)、およびセンス鎖 3' 端にコレステロールを結合した脳血管内皮細胞に特異的に発現するマウス Organic anion transporter に対する siRNA (chol-siOAT3) を、血清から超遠心法で分離精製した HDL に導入して、Toc-siBACE/HDL をマウス第 3 脳室内に 1 週間持続投与、chol-siOAT3/HDL を静脈内に投与した。その取り込みの範囲と程度を蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡で観察し、有効性を標的遺伝子 mRNA の qRT-PCR および Western Blot にて評価した。さらに HDL のリガンドである ApoE に対する中枢側レセプターの LDL 受容体をノックアウトしたマウスを用いて HDL ベクターを介した取り込みの影響を検討した。

（倫理面への配慮） siRNA の核酸医薬は本学の組換え DNA 実験安全管理規則（承認番号：2008-27）に従って化学合成により作製し、倫理的な問題はない。マウス動物実験は本学の動物実験施設の規定に従って動物実験委員会の承認（承認番号：100101）を得て行っている。

C. 研究結果（図表を 1～2 点添付）

1) Toc-siBACE/HDL の脳室内投与により蛍光観察にて頭頂側頭葉および海馬に広範な siRNA の取り込みが認められた。取り込みはより投与部位に近い場所、脳室系に接している場所で強い傾向があった。共焦点顕微鏡による免疫蛍光観察では、海馬で MAP2 陽性の錐体細胞層などの神経細胞層に強く取り込まれた（次頁上図）。siRNA 取り込み陽性部位の qRT-PCR による評価では、コントロールに対して頭頂葉において 64%の BACE1 mRNA の遺伝子抑制が得られた。BACE1 タンパクは Toc-siBACE/HDL を投与したマウスの頭頂葉皮質において 52%の発現抑制が得られた。免疫組織染色では蛍光観察で見られた Toc-siRNA 取り込み陽性部位である頭頂側頭葉皮質および海馬において BACE1 タンパク発現減少による染色性の低下が認められた。



VE-siRNA/HDL の脳室投与 3 日後、ほとんどの神経細胞に siRNA (Cy3; 赤) が導入された。

NA/HDL を脳室内投与すると野生型マウスに投与した場合と比べて Toc-siRNA/HDL の取り込みは減少した。

2) chol-siOAT3/HDL を静脈内投与後、蛍光観察に