

201024079A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

Perry(ペリー)症候群の診断基準等の
作成のための奨励研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 服部 信孝

分担研究者 佐藤 栄人
富山 弘幸
斉木 臣二
坪井 義夫

平成23(2011)年 5月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

Perry (ペリー) 症候群の診断基準等の
作成のための奨励研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 服部 信孝

分担研究者 佐藤 栄人
富山 弘幸
斉木 臣二
坪井 義夫

平成 23 (2011) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
Perry(ペリー)症候群の診断基準等の作成のための奨励研究	1
服部 信孝	
II. 分担研究報告	
1. Perry(ペリー)症候群の診断基準等の作成のための奨励研究	5
佐藤 栄人	
2. Perry(ペリー)症候群の診断基準等の作成のための研究	7
富山 弘幸	
3. Perry(ペリー)症候群に関する研究	13
斉木 臣二	
4. Perry(ペリー)症候群の診断基準等の作成のための奨励研究	15
坪井 義夫	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

Perry (ペリー) 症候群の診断基準等の作成のための奨励研究

研究代表者：服部信孝（順天堂大学脳神経内科教授）

分担研究者：坪井義夫（福岡大学神経内科）

佐藤栄人（順天堂大学脳神経内科）

富山弘幸（順天堂大学脳神経内科）

斉木臣二（順天堂大学脳神経内科）

研究要旨

Perry 症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたす予後不良の遺伝性疾患であり，2009年に *DCTN1* が原因遺伝子として報告されたが，世界で9家系のみでの報告と極めて稀な疾患である。本疾患の分布や頻度，臨床像は明らかにされておらず，L-Dopa 反応性の症例もあり，パーキンソン病との異同が問題となる。そこで本研究は，本症候群を臨床疫学的，分子遺伝学的に明らかにし，臨床診断基準を作成することを目的とする。研究代表者の施設にはパーキンソニズムを中心とした国内外からの約2200例のDNAバンクが確立出来ており，大規模解析により変異頻度を明らかにし，早晚疫学調査に繋げ得る点で意義がある。

1年目に，日本人パーキンソニズム973例中5家系24人と，日本にも少なからず症例が存在することが判明した。家系は九州に集中しており，地域性，創始者効果が存在することが確認できた。患者群の検査所見，臨床像の評価から成果を得て，近々 *Neurology* 誌に論文投稿予定である。世界の研究者と共に国際会議を開催，本邦のみならず国際的な臨床診断基準を作成した。神経学会年次大会で発表したが，今後も講演，学会誌上，インターネットなどを通じ広く公表していく予定である。さらに，今回新規変異も2つ同定した。Perry 症候群は低換気を呈するとともにTDP-43の蓄積を示し，*DCTN1* 変異はTDP-43プロテインパチーとしての筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こすことも知られ，その機能解析は封入体形成機構を明らかに出来る可能性を秘めており，本研究は，特殊と考えられている疾患の研究から広く主要な神経変性疾患の根本的病態解明に繋げることを究極の目標とする極めて独創的で意義深いものとなってきている。また医療費，制度等に関し，厚生労働行政の課題の解決の一助になる可能性を広げてきている。

尚，本解析は順天堂大学倫理委員会の承認に基づき行った。

A. 研究目的

Perry 症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたす予後不良の稀な遺伝性疾患とされる。2009年坪井らのグループにより *DCTN1* が原因遺伝子として報告された(Farrer et al. *Nat Genet*)が，本邦2家系を含む世界で9家系のみでの報告で，分布や頻度，臨床像は明らか

でない。L-Dopa 反応性の症例もあり，パーキンソン病との異同が問題である。

このような背景の中，その診断基準を作成し，世界及び本邦での疾患の分布，頻度およびその実態を明らかにすることを本研究の主目的とした。

最長寿命国である日本においては，高齢化社会

のなか医療費公費負担も年々増加していくものと予想される。また介護保険制度改革の中、介護の人材不足とともに介護保険もますます負担が増えるものと予想され、さらに ALS においては医療費公費負担とともに、24 時間体制で介護が必要なことも多く、人工呼吸器管理患者の療養先、高額医療がますます問題となると予想される。

そのため本研究は難病の医療費公費負担、介護保険制度、療養型病床の利用など医療と介護の制度につき、より広く発展した形で社会的成果をもたらす、厚生労働行政の課題の解決の一助になる可能性を十分に秘めている。このように本研究は、医学の向上から、間接的には行政及び国民の保健・医療・福祉の向上等社会へ貢献することを究極の目的とした。

B. 研究方法

研究目的の達成のため、約 2200 例の DNA バンク症例中、日本の 973 例に対し、*DCTN1* の変異解析を行った。 正常対照の解析も行い、解析可能な家系では家系内での変異の共分離も確認し、病的変異としての意義を確認した。変異陽性家系については同意を得た上で実地診療に赴き、変異陽性患者を実際に診察の上、検査所見を検討、解析した。

その情報に基づき、臨床診断基準(案)を世界の Perry 症候群患者の担当医、世界の Perry 症候群患者の研究者とともに作成した。

また、機能解析は細胞をもちいた実験で *dynactin* の凝集の確認、*dynactin* 凝集体の局在の確認、免疫組織化学・生化学的検討を行った。野生型・変異型 *dynactin* を *Drosophila* に打ち込み、各 line の樹立を行った。

業務は研究分担者が分担し遂行した。

(倫理面への配慮)

本研究では個人の遺伝情報を取り扱うので、DNA, RNA 検体採取にあたっては研究対象者、研究協力者の不利益・危険性が排除されるよう

十分な説明と同意を得た。 各試料はランダムイズし、研究者は個人々人の特定ができないように配慮するとともに、得られた個人情報については人権擁護のため法令等を遵守のうえ厳重に管理し、漏洩等のないように十分注意して研究を遂行した。遺伝子解析については順天堂大学倫理委員会の承認に基づいた。

本研究ではモデル動物として、ハエの作製を行ったが、動物実験計画をとともに動物愛護上の配慮に基づき研究を進めた。動物の取り扱いについては学内倫理委員会の承認を得て、SPF 内で P2 レベルの安全管理のもとに実験を行い、実験が終了した動物は速やかに焼却処分し拡散の防止に努めた。

C. 研究結果

日本に少なくとも 5 家系 24 人の患者が存在することが明らかとなり、地域特異性、創始者効果の有無、有病率、分布など疫学調査を進めることができている。新規変異も 2 家系で同定できた。 実地診療に基づく臨床 data の蓄積もできてきた。

この結果が得られたことにより、臨床像の評価に基づき、臨床診断基準を作成を行った。 今後は、日本人のみならず人種を超えた多数例での臨床症状、MRI、SPECT、MIBG 心筋シンチ、電気生理学的所見、認知機能やうつ病スケールなどの検査所見、経過などに基づき、診断基準の改定を繰り返し、よりよいものに update していく必要がある。

細胞レベルにおける変異型 *dynactin* の機能解析も順調に進んでおり、Wszolek らの報告(Nat Genet 2009;41:163)のように Perry 症候群の病因変異を持つ *dynactin* の強制発現により、核周囲に 2-5 μ m 程度の均一な *dynactin* 凝集物を形成することを確認した。さらに 6 病因変異全てに同様の評価を行い、変異毎に凝集物形成比率・細胞死誘導比率が大きく異なることを新たに確認しており、論文発表を準備中である。

トランスジェニック (Tg) ドロゾフィラの検討については、野生型・変異型 dynactin を *Drosophila* に打ち込み、各 line の樹立、モデルの作成を完了した。同モデルの行動学的解析(主に climbing test などの運動機能)および形態的異常・病理学的異常の詳細な検討は残念ながら 1 年の研究期間内には完結不能であった。

D. 考察

1 年目の日本人 973 例の解析で、本邦に少なくとも 5 家系 24 人の患者の存在が確認され、地域特異性、創始者効果の有無、有病率、分布など疫学調査を進めることができていることは、これまで世界で他に 7 家系だったことを考えると大きな進歩である。新規変異も 2 家系で同定できていることは、変異例ごとの臨床像の違いを検討しつつ、機能解析へ応用することにおいても重要な意義をもたらしている。得られた data をもとに日本人での臨床症状、MRI、SPECT、MIBG 心筋シンチ、電気生理学的所見、認知機能やうつ病スケールなどの検査所見、経過など臨床像の評価も進んできており、その知見に基づき、臨床診断基準を作成することができてきている。2010 年、坪井らは起立性低血圧、自律神経機能異常を呈し、MIBG 心筋シンチの取り込み低下をきたす症例が存在したことを *Parkinsonism Relat Disord* 誌に初めて報告したが、この知見により Perry 症候群と PD との類似点がさらに示された。このように当初の計画通りに順調に研究は進み、実績が残せてきている一方、PD との異同、鑑別がますます重要になり、今後の研究の重要性が増してきている。これまで MIBG 心筋シンチでの心筋への取り込み低下の結果は、synucleinopathy のスペクトラムとして Lewy 小体、 α -synuclein の蓄積の広がりやを反映しているとも考えられてきたため、本年度以降、病理像も得られるようであれば、臨床病理学的診断基準も付帯することも重要事項と考えられる。研究代表者のグループの施設で

は海外からの症例も豊富であるため、日本人以外の症例の解析を進め、全世界的規模で Perry 症候群の実態を明らかにしていく予定である。

同時に、その臨床的特徴や診断基準に沿って全国の医療機関にどれだけ患者が存在しているのか約 9000 人の日本神経学会会員を対象として アンケート調査もしくは関連施設の実地調査が可能になることが望ましい。

当初の研究計画にはなかったことだが、平成 23 年度 2 月 22-23 日東京において開催された国際シンポジウム *International Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome in Tokyo* での診断基準作成のための国際会議を通じて、本邦を含めた国際的な診断基準を作成し、論文、日本神経学会、ホームページなどを通じて広く発表していく計画を組むことができてきた。この国際会議では、一緒に *Nature Genet* 誌に Perry 症候群の最初の変異家系群を発表した Mayo Clinic のグループをはじめとした世界の最先端の研究者や臨床家が来日し、ALS/Motor Neuron Disease と Perry 症候群に共通な分子メカニズムである TDP-43 プロテノパチーの最先端の研究者とともに、遺伝子、分子レベルの発症機序の解明から、本邦発の iPS を用いた治療の開発戦略にまで焦点をあてて議論し、本研究の成果を確認するとともに、今後の方向性を協議することができた。このことは研究計画以上に本研究が進んでいることを示している。今後も世界最先端の連携体制の中で情報交換を続けながら、Perry 症候群、ALS/Motor Neuron Disease そして PD、パーキンソン症候群といった神経変性疾患に対しての広い視点で、研究を進めていく体制をさらに確立していくことは大変重要なことと考えられた。

機能解析において、これまでの培養細胞の実験では、Perry 症候群の変異をもつ p150 蛋白は tubulin との親和性がより低下することが判明しており、これら変異をもつ動物モデルの作製は病態の解明に必須である。これらの作製は容易であり、また中枢神経に病変を持つモデル動物

が生まれる可能性も高いと思われ、今後の研究の成果が期待される。野生型・変異型 dynactin を *Drosophila* に打ち込み、すでに各 line の樹立を完了したことは、本研究において同モデルの行動学的解析(主に climbing test などの運動機能)および形態的異常・病理学的異常の詳細な検討を早晩可能にできてきている。 このことは、モデル動物を用いた dynactin の機能解析として極めて重要な結果をもたらすものと考えられ、各種運動機能評価や免疫組織化学による凝集体の形成やドパミン細胞死の有無の検討、さらには p150 と相互作用する蛋白質の網羅的な解析等を行うこととしている。 PD にしてもよいモデルマウスが存在しない現在、Perry 症候群の変異を持つ Tg マウス・ドロゾフィラは本疾患に限らず広く神経変性疾患の凝集体形成やドパミン神経細胞死の病態解析に有益となると予測される。同モデルの行動学的解析(主に climbing test などの運動機能)および形態的異常・病理学的異常の詳細な検討を継続していくことが必要であり、その結果が期待される。

E. 結論

以上のように *DCTN1* 変異はパーキンソン病との異同が問題になる臨床症候を呈するとともに、TDP-43 プロテインパチーとしての筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こすことも知られ、その機能解析は封入体形成機構を明らかに出来る可能性を秘めており、本研究は、特殊と考えられている疾患の研究から広く主要な神経変性疾患の根本的病態解明に繋げることを究極の目標

とする極めて独創的で意義深いものである。今年度の本研究から得られた多くの data に基づき、本年度以降も、遺伝子解析による診断のみならず蛋白機能解析、免疫組織学的解析も並行し、分子遺伝学の知見、病理学的知見も反映したより集学的に完成された形での診断基準作成を目指すとともに、難治性疾患、神経変性疾患の病態解明、克服にむけて研究をさらに進めていきたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

研究代表者 服部信孝

1. Tomiyama H, Yoshino H, Hattori N. Analysis of *PLA2G6* in patients with frontotemporal type of dementia. *Parkinsonism Relat Disord* 2011 (in press).

2. 学会発表

1. 富山弘幸, 李林, 中尾絃一, 京楽格, 栗崎玲一, 李元哲, 舩山学, 吉野浩代, 音成龍司, 坪井義夫, 服部信孝. 日本人パーキンソニズムにおける *DCTN1* 変異解析—Perry 症候群について 2011 年 第 53 回日本神経学会学術大会.

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：特になし

Perry（ペリー）症候群の診断基準等の作成のための奨励研究

分担研究者：佐藤栄人（順天堂大学医学部脳神経内科学・准教授）

研究要旨

2003年にALSの原因遺伝子としてDynactin遺伝子(DCTN1)が報告された。一方、Perry症候群はパーキンソニズム、うつ、体重減少、低換気をきたす予後不良の稀な遺伝性疾患であり、2009年にDCTN1が原因遺伝子として同定された。両者の変異は異なるものでありDCTN1の変異によって異なる病態を示す可能性がある。Dynactinは軸索輸送に関わる重要なタンパク質であるがその機能はいまだ不明な点が多い。そこで本研究は、DCTN1のin vivoでの機能を明らかにするために各変異体を過剰発現するショウジョウバエモデルを作製し、DCTN1が関与する病態機序を明らかにする。現在作製過程の途上にあるが、新たな知見が得られるものと期待される。

A. 研究目的

Perry症候群はパーキンソニズム、うつ、体重減少、低換気をきたし、DCTN1が原因遺伝子として報告された。これまでにDCTN1の変異についてはALS患者から報告されたG59S変異が知られていた。NIHのFischbeckらはdynactin(p150 glued)にG59S mutationを持つALSモデルマウスの表現型・病理を検討しており、G59S変異のmotor neuron(脳幹・脊髄)は細胞体の膨化・核融解・核の偏在化を呈し、ubiquitin陽性顆粒を細胞質内に認める。さらにaxonは膨化し、リン酸化されていないneurofilamentが多数認められる。G59S変異のcytoplasmic inclusionを持つneuronを電顕で観察すると、autophagosomeらしい2重膜構造が多数認められ、同時期に神経細胞の減少が認められる。今回G59S変異ならびにPerry症候群で指摘されているDCTN1の変異体を過剰に発現するショウジョウバエモデルを作製ならびに解析を行うことにより、ALSとPerry症候群の病態の違いを明らかにする。

B. 研究方法

Gal4-UASシステムによるPerry症候群ショウジョウバエモデルを作製する。Perry症候群患者は神経変性疾患を呈することから、Gal4の発現を調整するエンハンサーとして、末梢および中枢神経系の神経細胞特異的な発現を促すelav、複眼特異的な発現を促すGMR、およびドーパミン作動性ニューロン特異的な発現を促すTHをドライバー系統として用意する。エフェクター系統としてUAS-DCTN1系統を作製する。まず、Gal4ターゲット配列となるUAS配列下流にヒトDCTN1遺伝子を組み込んだプラスミドを作製し、これを産卵30分以内の卵の極細胞に注入する。その後羽化した成虫からオスを選抜しバランス系統のメスと交配し、F1から赤眼のオスを選抜し再度バランス系統のメスと交配し系統化させる。本研究ではDCTN1 WT, G59S, G71A, G71E, G71R, T72P, Q74PcDNAを導入した7種類のUAS-DCTN1系統を作製し、組織特異的にDCTN1を過剰発現させてその表現型を免疫組織科学的手法により観察する。

C. 研究結果

現在、インジェクションした卵から羽化した成虫からオスを選抜し、バランサー系統のメスと交配している。系統の樹立後 DCTN1 の野生型、各変異体の発現量を免疫染色とウエスタンによって確認する。その後、神経変性の有無や凝集体形成の有無を観察する。

E. 結論

現在研究途中であるが、有用なモデル動物になることが期待される。今後の解析により Perry 症候群の病態が明らかになるとと思われる。

Perry（ペリー）症候群の診断基準等の作成のための研究

研究分担者：富山弘幸（順天堂大学脳神経内科/神経変性疾患病態治療探索講座 准教授）

研究要旨

Perry 症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたす予後不良の遺伝性疾患であり，2009年に *DCTN1* が原因遺伝子として報告されたが，世界で9家系のみの報告と極めて稀な疾患である。本疾患の分布や頻度，臨床像は明らかにされておらず，L-Dopa 反応性の症例もあり，パーキンソン病との異同が問題となる。そこで本研究は，本症候群を臨床疫学的，分子遺伝学的に明らかにし，臨床診断基準を作成することを目的とした。研究代表者の施設にはパーキンソニズムを中心とした国内外からの約2400例のDNAバンクが確立出来ており，大規模解析により変異頻度を明らかにし，早晚疫学調査に繋げ得る点で意義があると考えられた。

1年間の研究で，日本人パーキンソニズム 973 例中 5 家系 24 人と，日本にも少なからず症例が存在することが判明した。家系は九州に集中しており，地域性，創始者効果が存在することが確認できた。患者群の検査所見，臨床像の評価から成果を得て，近々 *Neurology* 誌に論文投稿予定である。世界の研究者と共に国際会議を開催，本邦のみならず国際的な臨床診断基準を作成した。平成 23 年度日本神経学会学術大会で発表したが，今後も講演，学会誌上，インターネットなどを通じ広く公表していく予定である。さらに，今回新規変異も 2 つ同定した。

Perry 症候群は，うつや L-dopa の反応性のパーキンソニズムで発症し，数年から 5 年前後のうちにも急激に低換気となり突然死に至る臨床経過から，その診断，治療法の確立のための研究の意義は極めて高い。これまで同定された Perry 症候群の数十症例の検討から，30-50 歳くらいの比較的若年発症で，パーキンソン病と同様の症状を呈しながら，短い経過の中で認知症も合併しにくい中，突然呼吸障害から突然死に至ることがわかったので，臨床診断基準に基づき早期診断をし，ALS と同様，病名告知をして人工呼吸管理をするか否か選択していく必要性も考慮されるべきであると考えられた。

Perry 症候群は低換気を呈するとともに TDP-43 の蓄積を示し，その凝集蓄積機構からも新しい TDP-43 プロテノパチーであるという概念が示唆されてきている。*DCTN1* 変異はパーキンソン病と似た Perry 症候群とともに，TDP-43 プロテノパチーとしての筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を引き起こすことも報告されている。従ってその機能解析は封入体形成機構，神経変性機序を明らかに出来る可能性を秘めており，本研究は，特殊と考えられている疾患の研究から広く主要な神経変性疾患の根本的病態解明に繋げることを究極の目標とする極めて独創的で意義深いものとなってきた。また医療費，制度等に関し，厚生労働行政の課題の解決の一助になる可能性を広げてきている。

尚，本解析は順天堂大学倫理委員会の承認に基づき行った。

A. 研究目的

Perry 症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたす予後不良の稀な遺伝性疾患とされる。2009 年坪井らのグループにより *DCTN1* が原因遺伝子として報告された (Farrer et al. Nat Genet) が，本邦 2 家系を含む世界で 9 家系のみで報告され，分布や頻度，臨床像は明らかでない。L-Dopa 反応性の症例もあり，パーキンソン病との異同が問題である。*DCTN1* は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因遺伝子であることも報告されていた。

このような背景の中，その診断基準を作成し，世界及び本邦での疾患の分布，頻度およびその実態を明らかにすることを本研究の主目的とした。

最長寿命国である日本においては，高齢化社会のなか医療費公費負担も年々増加していくものと予想される。また介護保険制度改革の中，介護の人材不足とともに介護保険もますます負担が増えるものと予想され，さらに ALS においては医療費公費負担とともに，24 時間体制で介護が必要なことも多く，人工呼吸器管理患者の療養先，高額医療がますます問題となると予想される。

そのため本研究は難病の医療費公費負担，介護保険制度，療養型病床の利用など医療と介護の制度につき，より広く発展した形で社会的成果をもたらし，厚生労働行政の課題の解決の一助になる可能性を十分に秘めている。このように本研究は，医学の向上から，間接的には行政及び国民の保健・医療・福祉の向上等社会へ貢献することを究極の目的とした。

B. 研究方法

研究目的の達成のため，昨年度までの約 2200 例の DNA バンク症例中，日本の 973 例に対し，*DCTN1* の変異解析を行った。 正常対照の解析も行い，解析可能な家系では家系内での変異の共分離も確認し，病的変異としての意義を確認した。変異陽性家系については同意を得

た上で実地診療に赴き，変異陽性患者を実際に診察の上，検査所見を検討，解析した。G71A 変異についてはジェノタイプングを行い創始者効果の有無を検証した。

その情報に基づき，国際臨床診断基準 (案) を世界の Perry 症候群患者の担当医，世界の Perry 症候群患者の研究者とともに作成した。

また，機能解析は細胞をもちいた実験で *dynactin* の凝集の確認，*dynactin* 凝集体の局在の確認，免疫組織化学・生化学的検討を行った。野生型・変異型 *dynactin* を *Drosophila* に打ち込み，各 line の樹立を行った。

業務は研究分担者が分担し遂行した。

(倫理面への配慮)

本研究では個人の遺伝情報を取り扱うので，DNA, RNA 検体採取にあたっては研究対象者，研究協力者の不利益・危険性が排除されるよう十分な説明と同意を得た。 各試料はランダムイズし，研究者は個人の人特定ができないように配慮するとともに，得られた個人情報については人権擁護のため法令等を遵守のうえ厳重に管理し，漏洩等のないように十分注意して研究を遂行した。遺伝子解析については順天堂大学倫理委員会の承認に基づいた。

本研究ではモデル動物として，ハエの作製を行ったが，動物実験計画をとともに動物愛護上の配慮に基づき研究を進めた。動物の取り扱いについては学内倫理委員会の承認を得て，SPF 内で P2 レベルの安全管理のもとに実験を行い，実験が終了した動物は速やかに焼却処分し拡散の防止に努めた。

C. 研究結果

DCTN1 の直接シーケンス解析結果により日本に少なくとも 5 家系 24 人の患者が存在することが明らかとなり，地域特異性，創始者効果の有無，有病率，分布など疫学調査を進めることができている。 新規変異も 2 家系で同定でき

た。5家系とも九州に存在したが、G71A 変異についてはジェノタイプングにより共通祖先からの創始者効果であることが推定された。実地診療に基づく臨床 data の蓄積もできてきた。

この結果が得られたことにより、臨床像の評価に基づき、臨床診断基準の作成を行った。

国際臨床診断基準としては、

4 主要徴候：

- A) L-dopa 反応性の parkinsonism (対称性の固縮，無動など)
 - B) うつ，Apathy
 - C) 中枢性低換気
 - D) 体重減少
- に加え、

支持項目：

- a) 家族歴(パーキンソニズム，うつ，突然死)
 - b) 急激な進行
 - c) 50 歳以前の若年発症
 - d) 夜間呼吸困難/無呼吸
 - e) 日中の過度な眠気
 - f) 自殺年慮，企図
 - g) 自律神経障害
 - h) ポリソムノグラフィ：中枢性無呼吸/低換気，stage 3/4 と REM 睡眠の減少
- を加え、

確実：A) の他に 2 つの主要症状，および 2 つ以上の支持項目に加え，遺伝子診断もしくは病理診断がされていること

疑い：A) の他に 2 つの主要症状，および 2 つ以上の支持項目

可能性あり：A) の他に 1 つの主要症状，および 3 つ以上の支持項目を満たすこととしている。

ただし，Perry 症候群の症例数はまだまだ少ないと言え、今後は、日本人のみならず人種を超えた多数例での臨床症状，MRI，SPECT，MIBG 心筋シンチ，電気生理学的所見，認知機能やうつ病スケールなどの検査所見，経過などに基づ

き、診断基準の改定を繰り返し、よりよいものに update していく必要がある。

細胞レベルにおける変異型 dynactin の機能解析も順調に進んでおり，Wszolek らの報告 (Nat Genet 2009;41:163) のように Perry 症候群の病因変異を持つ dynactin の強制発現により，核周囲に 2-5 μ m 程度の均一な dynactin 凝集物を形成することを確認した。さらに 6 病因変異全てに同様の評価を行い，変異毎に凝集物形成比率・細胞死誘導比率が大きく異なることを新たに確認しており，論文発表を準備中である。

トランスジェニック (Tg) ドロソフィラの検討については，野生型・変異型 dynactin を *Drosophila* に打ち込み，各 line の樹立，モデルの作成を完了した。同モデルの行動学的解析 (主に climbing test などの運動機能) および形態的異常・病理学的異常の詳細な検討は残念ながら 1 年の研究期間内には完結不能であった。

D. 考察

1 年目の日本人 973 例の解析で，本邦に少なくとも 5 家系 24 人の患者の存在が確認され，地域特異性，創始者効果の存在，有病率，分布など疫学調査を進めることができていることは，これまで世界で他に 7 家系だったことを考えると大きな進歩である。G71A 変異については，これまでハワイの日系人からも同定されているが，おそらく同じ創始者効果である可能性が考えられる。新規変異も 2 家系で同定できていることは，変異例ごとの臨床像の違いを検討しつつ，機能解析へ応用することにおいても重要な意義をもたらしている。得られた data をもとに日本人での臨床症状，MRI，SPECT，MIBG 心筋シンチ，電気生理学的所見，認知機能やうつ病スケールなどの検査所見，経過など臨床像の評価も進んできており，その知見に基づき，臨床診断基準を作成することができている。2010 年，坪井らは起立性低血圧，自律神経機能異常を呈し，MIBG 心筋シンチの

取り込み低下をきたす症例が存在したことを Parkinsonism Relat Disord 誌に初めて報告したが、この知見により Perry 症候群と PD との類似点がさらに示された。このように当初の計画通りに順調に研究は進み、実績が残せてきている一方、PD との異同、鑑別がますます重要になり、今後の研究の重要性が増してきている。これまで MIBG 心筋シンチでの心筋への取り込み低下の結果は、synucleinopathy のスペクトラムとして Lewy 小体、 α -synuclein の蓄積の広がりやを反映しているとも考えられてきていたため、本年度以降、病理像も得られるようであれば、臨床病理学的診断基準も付帯することも重要事項と考えられる。研究代表者のグループの施設では海外からの症例も豊富であるため、日本人以外の症例の解析を進め、全世界的規模で Perry 症候群の実態を明らかにしていく予定である。同時に、その臨床的特徴や診断基準に沿って全国の医療機関にどれだけ患者が存在しているのか約 9000 人の日本神経学会会員を対象としてアンケート調査もしくは関連施設の実地調査が可能になることが望ましい。

当初の研究計画にはなかったことだが、平成 23 年度 2 月 22-23 日東京において開催された国際シンポジウム International Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome in Tokyo での診断基準作成のための国際会議を通じて、本邦を含めた国際的な診断基準を作成し、論文、日本神経学会、ホームページなどを通じて広く発表していく計画を組むことができてきた。この国際会議では、一緒に Nature Genet 誌に Perry 症候群の最初の変異家系群を発表した Mayo Clinic のグループをはじめとした世界の最先端の研究者や臨床家が来日し、ALS/Motor Neuron Disease と Perry 症候群に共通な分子メカニズムである TDP-43 プロテノパチーの最先端の研究者とともに、遺伝子、分子レベルの発症機序の解明から、本邦発の iPS を用いた治療の開発戦略にまで焦点をあ

てて議論し、本研究の成果を確認するとともに、今後の方向性を協議することができた。このことは研究計画以上に本研究が進んでいることを示している。今後も世界最先端の連携体制の中で情報交換を続けながら、Perry 症候群、ALS/Motor Neuron Disease そして PD、パーキンソン症候群といった神経変性疾患に対しての広い視点で、研究を進めていく体制をさらに確立していくことは大変重要なことと考えられた。

Perry 症候群は、うつや L-dopa の反応性のパーキンソニズムで発症し、数年から 5 年前後のうちにも急激に低換気となり突然死に至る臨床経過から、その診断、治療法の確立のための研究の意義は極めて高い。これまで同定された Perry 症候群の数十症例の検討から、30-50 歳くらいの比較的若年発症で、PD と同様の症状を呈しながら、短い経過の中で認知症も合併していく中、突然呼吸障害から突然死に至ることがわかったので、早期診断し、ALS と同様、病名告知をして人工呼吸管理をするか否か選択していく必要性も考慮されるべきであると考えられた。

Perry 症候群は低換気を呈するとともに TDP-43 の蓄積を示し、その凝集蓄積機構からも新しい TDP-43 プロテノパチーであるという概念が示唆されてきている。DCTN1 変異はパーキンソン病と似た Perry 症候群とともに、TDP-43 プロテノパチーとしての筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を引き起こすことも報告されている。従ってその機能解析は封入体形成機構、神経変性機序を明らかに出来る可能性を秘めている。

機能解析において、これまでの培養細胞の実験では、Perry 症候群の変異をもつ p150 蛋白は tubulin との親和性がより低下することが判明しており、これら変異をもつ動物モデルの作製は病態の解明に必須である。これらの作製は容易であり、また中枢神経に病変を持つモデル動物が生まれる可能性も高いと思われ、今後の研

究の成果が期待される。野生型・変異型 dynactin を *Drosophila* に打ち込み、すでに各 line の樹立を完了したことは、本研究において同モデルの行動学的解析(主に climbing test などの運動機能)および形態的異常・病理学的異常の詳細な検討を早晩可能にできてきている。 このことは、モデル動物を用いた dynactin の機能解析として極めて重要な結果をもたらすものと考えられ、各種運動機能評価や免疫組織化学による凝集体の形成やドパミン細胞死の有無の検討、さらには p150 と相互作用する蛋白質の網羅的な解析等を行うこととしている。 PD にしてもよいモデルマウスが存在しない現在、Perry 症候群の変異を持つ Tg マウス・ドロゾフィラは本疾患に限らず広く神経変性疾患の凝集体形成やドパミン神経細胞死の病態解析に有益となると予測される。同モデルの行動学的解析(主に climbing test などの運動機能)および形態的異常・病理学的異常の詳細な検討を継続していくことが必要であり、その結果が期待される。

E. 結論

以上のように *DCTN1* 変異はパーキンソン病との異同が問題になる臨床症候を呈するとともに、TDP-43 プロテインオパチーとしての筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こすことも知られ、その機能解析は封入体形成機構を明らかに出来る可能性を秘めており、本研究は、特殊と考えられている疾患の研究から広く主要な神経変性疾患の根本的病態解明に繋げることを究極の目標とする極めて独創的で意義深いものである。今年度に本研究から得られた多くの data に基づき、今年度以降も、遺伝子解析による診断のみならず蛋白機能解析、免疫組織学的解析も並行し、分子遺伝学の知見、病理学的知見も反映したより集学的に完成された形での診断基準作成を目指すとともに、難治性疾患、神経変性疾患の病態解明、克服にむけて研究をさらに進めていきたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

研究分担者 富山弘幸

1. Tomiyama H, Yoshino H, Hattori N. Analysis of *PLA2G6* in patients with frontotemporal type of dementia. *Parkinsonism Relat Disord* 2011 (in press).
2. Tomiyama H. Axon guidance pathway genes and Parkinson's disease (Commentary). *J Hum Genet* 56:102-3.
3. 富山弘幸. 遺伝的因子, 遺伝学的見地からのパーキンソン病 update -パーキンソン病にどこまで遺伝的要因が関与しているか?-。パーキンソン病. 中外医学社 2010;37-65.
4. Ogaki K, Motoi Y, Li Y, Tomiyama H, Shimizu N, Takanashi M, Nakanishi A, Yokoyama K, Hattori N. Visual grasping in FTDP-17 (MAPT) - A comparison of ¹²³I-IMP brain perfusion SPECT analysis with PSP -. *Mov Disord* (in press).
5. Funayama M, Tomiyama H, Wu RM, Ogaki K, Yoshino H, Mizuno Y, Hattori N. Rapid screening of ATP13A2 variant with high-resolution melting analysis. *Mov Disord* 2010;25:2434-7.
6. Yoshino H, Tomiyama H, Tachibana N, Ogaki K, Li Y, Funayama M, Hashimoto T, Takashima S, Hattori N. Phenotypic spectrum of patients with *PLA2G6* mutation and *PARK14*-linked parkinsonism. *Neurology* 2010;75:1356-1361.
7. Mitsui J, Takahashi Y, Goto J, Tomiyama H, Ishikawa S, Yoshino H, Minami N, Smith DI, Lesage S, Aburatani H, Nishino I, Brice A, Hattori N, Tsuji S. Mechanisms of

- genomic instabilities underlying two common fragile-site-associated loci, PARK2 and DMD, in germ cell and cancer cell lines. *Am J Hum Genet* 2010;87:75-89.
8. Lesage S, Patin E, Condroyer C, Leutenegger AL, Lohmann E, Giladi N, Bar-Shira A, Belarbi S, Hecham N, Pollak P, Ouvrard-Hernandez AM, Bardien S, Carr J, Benhassine T, Tomiyama H, Pirkevi C, Hamadouche T, Cazeneuve C, Basak AN, Hattori N, Dürr A, Tazir M, Orr-Urtreger A, Quintana-Murci L, Brice A. Parkinson's disease-related LRRK2 G2019S mutation results from independent mutational events in humans. *Hum Mol Genet* 2010;19:1998-2004.
9. Li L, Funayama M, Tomiyama H, Li Y, Yoshino H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Mizuno Y, Hattori N. No evidence for pathogenic role of GIGYF2 mutation in Parkinson disease in Japanese patients. *Neurosci Lett* 2010;479:245-248.
2. 学会発表
研究分担者 富山弘幸
1. 富山弘幸, 李林, 中尾紘一, 京楽格, 栗崎玲一, 李元哲, 船山学, 吉野浩代, 音成龍司, 坪井義夫, 服部信孝. 日本人パーキンソニズムにおける *DCTN1* 変異解析—Perry 症候群について 2011年 第53回日本神経学会学術大会.
2. Tomiyama H, Funayama M. Genetic Epidemiology Of Parkinson's Disease Consortium 5th annual meeting data blitz from Juntendo University, Japan (17 April, 2010. 5th GEO-PD meeting. Toronto, Canada).
- 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 : 特になし

Perry（ペリー）症候群に関する研究

研究分担者：齊木臣二（順天堂大学医学部神経学 助手(現准教授)）

研究要旨

Perry 症候群は常染色体優性遺伝を呈する神経変性疾患で、原因遺伝子は dynactin であり、運動ニューロン障害・パーキンソニズムなどを呈する複合システムの障害を呈するが、希少疾患であり病態解明・治療法開発に繋がり得る知見は殆どないのが現状であった。

本分担研究では運動神経細胞死・黒質神経細胞死の共通メカニズムを解明すべく、病因変異を持った dynactin の機能変化・細胞内小器官との関連及び細胞死への影響を検討し、病因変異 dynactin の過剰発現により dynactin の細胞質内凝集物が形成され、形成率は各病因変異によって異なっていた。さらに dynactin 細胞質内凝集物を形成した細胞では細胞死が有意に高頻度で惹起されていた。以上の結果より細胞質内凝集物が、細胞死に対して重要な役割を果たすことが示唆され、種々の蛋白分解系を調節することにより治療的介入の可能性が期待される。

A. 研究目的

神経難病である Perry 症候群における原因遺伝子 dynactin の機能・遺伝子変異による影響を培養細胞にて検討し、病態を解明することにより、新規治療法に繋がる知見を得ること。

B. 研究方法

本研究では主に培養細胞(HeLa 細胞)を用いた。以下にそれぞれの実験の詳細を述べる。

1. プラスミド DNA

Dynactin 野生型に FLAG および EGFP をタグしたプラスミド DNA を作製し、Mutagenesis®(Stratagene 社製)を用いて、病因変異を挿入した変異型 dynactin (G59S, G71A, G71E, G71V, T72P, Q74P) を作製した。

2. 免疫細胞染色

HeLa 細胞に、Lipofectamine 2000®(Invitrogen 社製)を用いて、dynactin 野生型・変異型を夫々強制発現し、24 時間後、48 時間

後、72 時間後に各種抗体を用いて免疫細胞染色を行い、24 時間後に最も dynactin の発現が高いことを確認し、同条件下による検討を中心に行った。用いた 1 次抗体は、p62, ubiquitin, alpha-tubulin, LC3, LAMP2, TDP-43 などであった。

3. 細胞死検討

Trypan blue exclusion test, Nuclear morphological change による細胞死評価を、夫々 Saiki ら (Saiki et al.), Webb ら (Webb et al., 2003) と同様な手法により評価した。

Saiki, S. et al. Autophagy 7, 176-187. Webb, J.L. et al. J Biol Chem 278, 25009-25013.

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

結果 1: 野生型 dynactin は HeLa 細胞に置いて、alpha-tubulin と共局在しており、過去の

報告とも一致した。また変異型 dynactin では、FLAG または GFP にタグされたいずれの場合でも、細胞質内凝集体を形成し、その割合は G59S 変異で最も高かった(最大で 15% 程度の細胞に細胞内凝集体の形成を認めた)。しかし同 dynactin 凝集体は、p62, LC3, actin, LAMP2, TDP-43 のいずれとも有意な共局在はしなかった。

結果 2 : Trypan blue exclusion test では、十分な過剰発現が得られていない細胞の細胞数も含まれており、野生型・全ての変異型 dynactin 過剰発現において、有意な細胞死の変化を認めなかった。よって、十分な dynactin 発現量を持つ細胞数と核断片化・核凝縮を伴う細胞の両者を評価し、細胞死率を評価したところ、変異型細胞過剰発現では、細胞死の有意な増加を認めた。現在、細胞死の原因を検討すべく、更なる検討を進めている。

D. 考察

変異型 dynactin の過剰発現は細胞質内凝集体を形成し、さらに細胞死を誘導した。細胞内蛋白の分解経路としてはユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・ライソゾーム系の 2 系統が重要とされる。過去の報告ではオートファゴゾームの細胞内での増加が認められており、細胞死との関連が考えられた。その機序については、アポトーシスの誘導・autophagic cell death などが考えられるため、現在フローサイトメーター等を用いてさらなる検討を重ねている。細胞死のタイプを解明することにより、治療的介入の糸口が発見されると期待される。

E. 結論

野生型 dynactin は alpha-tubulin と共局在し、微小管輸送に関与するが、変異型 dynactin の

強制発現は dynactin 凝集体を細胞質内に形成させ、細胞死を誘導する。

F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Saiki S, Sasazawa Y, Imamichi Y, Kawajiri S, Fujimaki T, Tanida I, Kobayashi H, Sato F, Kei-Ichi Ishikawa, Sato S, Imoto M, Hattori N. Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy* 7:176-87 (2011)
2. Kawajiri S, Machida Y, Saiki S, Sato S, Hattori N. Zonisamide reduces cell death in SH-SY5Y cells via an anti-apoptotic effect and by upregulating MnSOD. *Neurosci Lett* 481:88-91 (2010)

2. 学会発表

1. 石川景一, 河尻澄宏, 齊木臣二, 佐藤栄人, 李元哲, 今道洋子, Matthew J. Farrer, 服部信孝. Perry 症候群の原因遺伝子産物ダイナクチンの機能解析. 第 52 回日本神経学会(名古屋) 平成 23 年 5 月 18-20 日

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

Perry（ペリー）症候群の診断基準等の作成のための奨励研究

分担研究者：坪井義夫（福岡大学医学部神経内科学・准教授）

研究要旨

Perry 症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたす予後不良の稀な遺伝性疾患であり，2009 年に DCTN1 が原因遺伝子として報告されたが，まだ世界で 9 家系のみでの報告で，本疾患の分布や頻度，臨床像は明らかでない．L-Dopa 治療反応性の症例もあり，パーキンソン病との異同が問題となる．そこで本研究は，本症候群を臨床疫学的，分子遺伝学的に明らかにし，その臨床診断基準，指針を作成し確立することを目的とする．約 2200 例のパーキンソニズム患者を中心とした DNA 解析から，本邦における同症候群の頻度も 4 家系と増加し，その臨床症候の分析および診断基準案を作成した．

A. 研究目的

Perry 症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたし，生命予後 10 年以内の予後不良の稀な遺伝性疾患で，我々のグループにより DCTN1 が原因遺伝子として報告された (Farrer et al. Nat Genet 2009)．しかし本疾患は本邦の 2 家系を含む世界で 9 家系のみでの報告であり，本疾患の分布や頻度，臨床像は明らかでない．L-Dopa 治療反応性の症例もあり，臨床的にパーキンソン病との異同が問題となる．

そのため，その診断基準を作成し，世界及び本邦での疾患の分布，頻度を明らかにすることが急務で，本研究の目的となる．

B. 研究方法

研究の目標の達成のため，即解析開始可能な約 2200 例の DNA バンク症例に対し，DCTN1 の変異解析を行う．更なる DNA バンクの構築とともに，パーキンソニズム患者に加え，TDP-43 プロテインパチー，ALS の患者についても直接シーケンス法で解析を行う．既に報告されている家系の臨床症状，経過を詳細に検討し，臨床表現型の特徴を集約し，

感度，特異度の高い診断基準の作成することを目的とする．

（倫理面の配慮）

本研究の対象患者および患者家族に対して十分に説明を行い，理解を得た上で同意された患者にのみ本治療研究は実施された．本治療研究に対して同意を得る場合は人権保護の立場から慎重に検討し，安全の確保に充分配慮し，対象患者のプライバシー保護には十全の配慮を行われた．同意が得られない場合でも何ら差別なく疾患に対して必要な治療を行うことを原則とし，患者の個人情報については慎重に対応した．

C. 研究結果

1 年目の日本の 973 例の解析で，日本に少なくとも 5 家系 24 人の患者が存在することが明らかとなり，地域特異性，創始者効果の有無，有病率，分布など疫学調査，臨床像の評価を行った．

その中で本邦家系症例の特徴は，平均発症年齢が 48 歳（範囲：35-70 歳），平均罹病期間が 5 年（範囲 2-12 年）で孤発性パーキンソン病

より若年発症で経過が速い。L-DOPA 治療効果はほぼ全例でみられ、早期の運動合併症が見られる症例が散見された。体重は半年単位で10kg以上の減少がみられる例が多く、左右対称性の筋固縮、動作緩慢、姿勢反射障害がみられた。検査所見では増部MRIは正常で、脳血流SPECT検査では前頭葉における血流低下が特徴と考えられた。肺活量、胸部CTなどの異常は見られないにもかかわらず、夜間に呼吸不全に陥る症例が多く、夜間睡眠ポリグラフで中枢性低換気が認められた。死亡原因は突然死が最も多く、その他では呼吸不全、肺炎、自殺の順に多かった。診断基準の草案として主要徴候 a. 左右対称性のL-DOPA反応性パーキンソン症候群, b. 無気力あるいはうつ病の合併, c. 睡眠障害, d. 体重減少の4項目で、支持症候として, a. 家族歴, b. 進行の早いパーキンソン症候 c. 50歳未満の発症, d. 夜間の呼吸困難あるいは無呼吸の存在, e. 日中の過眠, f. 自殺企図, g. 自律神経障害 h. 睡眠ポリグラフにおける中枢性低換気及び睡眠ステージ3, 4, REM睡眠潜時の著しい低下, とした。

D. 考察

Perry症候群はまれな疾患であるが、DCTN1遺伝子変異の発見は、パーキンソン病における神経変性の選択性、特に黒質に強い障害をもたらす機序を解明するための新たな材料を与えた。またこの疾患の脳病理においてTDP-43病理を認める点は他のTDP-43プロテインパチーであるFTLD-UやALSなどの変

性疾患と病態を共有する可能性を示唆しており、さらにDCTN1変異でみられる家族性球脊髄萎縮症との比較検討を行うことで、神経細胞障害の選択性に新たな知見が得られると思われる今回の新たな家系の発掘と診断基準の作成は、今後さらにPerry症候群の認知を高め、新たな患者の発掘に寄与すると共に今後の病態解明につながるものと考えられる。

E. 結論

Perry症候群の新たな家系の発見と、基準草案の作成を行った。

G. 研究発表

1. 坪井義夫, 山田達夫. Perry症候群. MDSJ Letters 2010; 3: 2-6
2. 坪井義夫. 臨床医のための神経病理 Perry症候群. Clinical Neuroscience 2010 ; 28: 366-367
3. 坪井義夫. 脳神経系の情報伝達と疾患 さまざまなシグナル伝達因子の異常が引き起こす精神疾患・発達障害・神経変性疾患のメカニズム】神経情報伝達と疾患 Dynactin変異とPerry症候群 モータータンパクと神経変性. 実験医学 2010; 28: 764-768
4. Ohshima S, Tsuboi Y, Yamamoto A, Kawakami M, Farrer MJ, Kira J, Shii H. Autonomic failures in Perry syndrome with DCTN1 mutation. Parkinsonism and Related Disorders 2010;16:612-4.

研究成果の刊行に関する一覧表