

201024183A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と、
病態評価に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 水谷 修紀

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）

毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と、病態評価に関する研究

目 次

I.	班員名簿	1
II.	総括研究報告	2
	毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と、病態評価に関する研究	
	水谷修紀（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野）	
III.	分担研究報告	
	森尾友宏（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野）	7
	高木正稔（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野）	10
	熊田聡子（東京都立神経病院）	13
	林 雅晴（東京都神経科学総合研究所）	15
	金子英雄（岐阜大学）	18
IV.	研究成果に関する刊行の一覧表	21

班員名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	水 谷 修 紀	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	教 授
研究分担者	森 尾 友 宏	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	准 教 授
	高 木 正 稔	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 発生発達病態学分野	講 師
	熊 田 聡 子	東京都立神経病院 神経小児科	医 長
	林 雅 晴	東京都神経科学総合研究所・小児神経学/神経 病理学	副参事研究員
	金 子 英 雄	岐阜大学医学部地域医療医学センター	教 授

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
（総括）研究報告書

「毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と、病態評価に関する研究」

研究代表者 水谷 修紀

（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学・教授）

研究要旨：毛細血管拡張性小脳失調症(AT)の診断方法の確立、東京医科歯科大学を中心とした診療ネットワークの構築、AT に関する情報を集約したホームページによる情報提供、情報を広く発信し、AT の診療にかかわるであろう医療関係者および患者、患者家族にとって有意義なシステムを構築した。また AT の小脳失調改善を目的とした臨床試験を開始した。一方基礎研究として AT における免疫不全症発症の機構を検討した。

研究分担者氏名

森尾 友宏・東京医科歯科大学・准教授

高木 正稔・東京医科歯科大学・講師

熊田 聡子・東京都立神経病院・医長

林 雅晴・東京都神経科学総合研究所

副参事研究員

金子 英雄・岐阜大学・教授

A. 研究目的

この研究では毛細血管拡張性小脳失調症(AT)患者を対象とした早期診断・早期診療を目指した簡易診断法や、AT患者の呼吸・嚥下・神経機能評価法を開発し、AT責任遺伝子産物ATMの新たな機能を探索することから、ATの診断・治療に還元することを目的とする。得られた結果は、新たな患者診療の手引きとして提供する。またAT患の小脳失調改善のための臨床試験を行い、その有効性を評価する。

B. 研究方法

研究班を中心とした共同研究体制によって実施する。また原発性免疫不全症班とは連携により、情報や検体の共有を行う。

基礎研究

1) ATにおける免疫の評価

ATにおける免疫不全症発症の機構を明らかにするためモデルマウスを用いリンパ球分化過程を検討する。

2) ATMの腫瘍発生防御機構における役割の検討

AT患者での腫瘍発生は大きな問題であり、化学療法に対する副作用も顕著で予後も著しく不良である。ATMによる腫瘍発生監視機構とその破綻を、分子、細胞、個体レベルで解析する。特にATM異常と小児

腫瘍発生について重点的に解明を試みる。

3) ATにおける糖尿病発症機構の研究

るい瘦や耐糖能異常はAT患者における問題の一つである。ATMの脂肪細胞の分化における役割や、ATM欠損における耐糖能異常について、詳細な検討を行い、その基礎病態を明らかにする。

4) ATにおける小脳失調の研究

AT剖検例の小脳連続切片において、GAD、calbindin-D28K (CD)、parvalbumin (PV)、calretinin (CR) に対する免疫組織化学染色を行い、視察的に評価する。

基礎からの橋渡し研究

AT簡易診断法の確立と検証

High resolution melting curve解析を用いた簡便なATMのSNPs (一塩基多型)同定方法を検討した。

本府における比較的共通な遺伝子変異と考えられるものについてPCR-RFLP法を検討した。

ATおよびその類縁疾患診断のためのDNA損傷応答関連蛋白質の網羅的な評価方法を検討する。

臨床研究

1) ATにおける呼吸器機能、嚥下機能、神経機能などの評価法の確立とその応用

ATでは進行性神経障害に伴い、様々な機能障害を呈するが、誤嚥を回避する気道・食道の機能、呼吸機能、神経・運動・高次脳機能の正確な評価は困難である。海外施設及び国外患者支援団体との共同体制の中で、神経専門医を中心に、情報を収集し、

機能評価法を確立した。これをもとに実際のAT患者を評価し、その有用性を検討する。

2) ATに関する情報発信環境の整備

ホームページを作成し、医療者、患者家族への情報の発信を行う。

3) ATに関する診療中核施設の整備

ATに関する知識の豊富な医師を持つ施設を中核として専門性の高い連携体制を整える。また治療法の指針を作成する。

4) ATにおける神経症状改善のための少量

ステロイド療法の臨床試験

少量のステロイドを投与し、神経症状の改善が認められるか、またその副次的影響がないか検討する。

5) AT患者会の設立

患者間の情報共有をめざし患者会の設立を促す。

(倫理面への配慮)

疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守した。実験上必要とされる遺伝子資料、動物の取り扱い、「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書」に基づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律」を遵守し、また東京医科歯科大学内動物実験規則、組み換えDNA実験安全管理規則に準拠した。

C. 研究結果

基礎研究

1) ATにおける免疫の評価

A-Tにおける発がん機構の解明に関しては白血球リンパ腫の発症頻度が高い点からリンパ球分化とがん遺伝子によるゲノム不安定性発症機構に注目し研究を行った。

マウスES細胞を用いた研究からAT責任遺伝子 ATM の機能が欠損することにより、Tリンパ球分化が double negative 2 (DN2)ステージで止まることを明らかにした。

2) ATMの腫瘍発生防御機構における役割の検討

ハイドロキシウレアによるDNA複製停止が起こった後、問題が解決されない時 Artemis 依存的に DNA2 重鎖切断が起こり、ATM-p53 を介した細胞死誘導機構が起こることを明らかにした。細胞が ATM 依存的に発がんを抑制する方法としての Artemis-ATM を発見したことにより、腫瘍発生抑制の一端を明らかにできたと考える。

3) ATにおける糖尿病発症機構の研究

昨年度までの研究で ATM の機能が欠損することにより脂肪細胞の分化が障害され、その結果インスリン感受性に働くアディポネクチンが分泌されないため、AT個体でインスリン抵抗性が生じ、その結果2型糖尿病が発症することが明らかとしたが、その分子生物学的機構として ATM がヒストンのアセチル化を介して脂肪細胞分化に必須な遺伝子 C/EBP α の

発現を調節していることを明らかにした。

4) ATにおける小脳失調の研究

glutamate decarboxylase とカルシウム結合蛋白に対する免疫組織化学染色により小脳変性での Purkinje 細胞障害の詳細を明らかにした。

基礎からの橋渡し研究

AT簡易診断法の確立と検証

HRM 解析を用いた ATM SNPs 検出方法を確立した。80 検体を解析しアミノ酸置換を伴う ATM の SNP を 7 例から 8 個検出し、うち一つは報告のある rare SNP で残りは報告のない新規のものだった。比較的共通な遺伝子変異と考えられる 7883del5, IVS+2 (T>A) を PCR-RFLP 法を用いて簡便に診断できる検査系を確立した。

臨床研究

1) ATにおける呼吸器機能、嚥下機能、神経機能などの評価法の確立とその応用

A-T 患者のための適切なリハビリテーションプログラムを構築し、また神経障害に対する治療薬の効果を的確に評価するためには、神経症状の客観的評価基準が不可欠である。最近 A-T 診療に携わる各国の小児神経科医による国際委員会が発足し、患者の神経症状を半定量的に評価するスケールを作成した。本年度より本スケールを用いた国内患者の評価を開始した。またその評価方法は後述する、臨床試験に応用した。

2) ATに関する情報発信環境の整備

昨年度研究でA-T患者の会の設立と患者の疾患に対する理解促進のため、ホームページの作成を行った。これを有意義にするために東京医科歯科大学、岐阜大学、都立神経病院を中心としたA-T診療基盤を整備し、後述する臨床試験実施体制を構築した。

3) ATにおける神経症状改善のための少量ステロイド療法の臨床試験

東京医科歯科大学治験等審査委員会、都立神経病院倫理委員会の承認を得て、AT患者の小脳失調改善を目指して少量のステロイドの有効性を検討する臨床試験「少量ベタメタゾンの毛細血管拡張性運動失調症に対する運動失調改善に関する研究」を開始した。現時点で患者1名をリクルートし、ベタメタゾンの投与を始めた。今後、前述した患者の神経症状を半定量的に評価するスケールを用いて有効性の評価、および副次的影響の評価を行う。

4) AT患者会の設立

2010年5月、九州AT家族とともに、関東甲信越地区の2家族を加えたFreemlサービスを利用しメーリングリストML(A-T ML)を立ち上げた。医療関係者として参加するとともに、2010年7月九州の患者・家族を直接訪問し、打ち合わせを行った。

D. 考察

AT患者診療を今後展開していくに必要な基礎研究、臨床面での土台を作ることができた。基礎研究ではATの主要症状である神経症状、免疫不全、糖尿病の発症要因、易発がん性の機構について分子生物学的

に迫り、将来の治療法開につながる研究を行えた。なかでも免疫不全がどの予様な機序によっておこってくるかを明らかにできた。従来から言われているT細胞受容体 α 鎖の再構成の失敗によるリンパ球分化の障害以外にもT細胞受容体 β 鎖の再構成の段階で障害があることが明らかとなった。これら発見からリンパ球分化と免疫不全との関連でDNA障害応答機構にかかわる分子がどのように免疫を調整しているか、解明するための糸口を導きだしたと考えられる。またDNA複製機構に安全な進行のための監視機構にArtemisとATMが関与することを明らかにし、血液腫瘍細胞の制御用いられるヒドロキシウレアの作用機序を明らかにしたことは薬物の安全な投与を行ううえでより重要な情報を提供できると考える。

ATの診療を行っていく上でより正確な診断が非常に重要な位置を占めていることは間違いない。昨年度までの研究で診断の手引きを公開してきたが、より分子生物学的な方法で遺伝子診断を確実にしていく必要がある。ATMは遺伝子が非常に巨大で、現在まで遺伝子解析のための様々な試みがなされてきたが、いずれも一長一短であった。今回開発したHRM法による診断方法はPCRのみでSNPsのスクリーニングができることで、より多数検体を一度に解析することができる。多数の検体の中からATMのSNPsを比較的簡単に見つけだすことができ、易発がん性や放射線や抗がん剤に高感受性を示すヒトの中からATMのSNPsを比較的簡便に見つけだし、放射線や抗がん剤に高感受性を示すヒトをあらかじめ同定しておくことで放射線療法や

化学療法など治療を安全に行う上で非常に有用であると考えられる。現在までの研究で小脳失調を呈し、また免疫不全症の中から、A-T類似の疾患で診断のつかない様々な例のあることがわかってきた。こういった疾患の中には比較的まれなATLDやSeckel症候群、Nijmegen症候群、眼球運動失行を伴う失調症などが含まれる可能性がある。こういった疾患を一度にスクリーニングするシステムは現在までなかったが本研究で開発したウェスタンブロット法を用いた方法でナンセンス変異であれば同定できるのではないかと考えられる。今後の研究で症例を蓄積していきたい。

昨年度までの研究でA-Tに関する情報を発信するホームページを作成した。これらにより医療従事者、また患者家族の受ける利益は非常に大きいと考えられた。本年度は東京医科歯科大学、都立神経病院、岐阜大学を拠点とした診療基盤を整備し、AT患者が安心して受信できる環境ができたと考えられる。しかし実際は地方在住のA-T患者は神経症状のため遠方への受診は困難であることが考えられる。今後、地域でA-Tの診療に携わる医師をサポートする体制をホームページを中心に充実させていきたい。

また本年度研究の大きな成果は免疫不全症に対する免疫グロブリン製剤の投与以外、治療法のなかったA-Tに対して神経症状の改善を期待した少量ステロイドの臨床試験を行えたことである。これには昨年までの研究で行ってきた神経症状評価のスコアリングシステムが重要な位置を占めることに間違いはなく、今後の研究

でその有用性を明らかにしていきたい。少量ステロイド療法が副次的影響が軽微で神経症状の改善が見られれば、患者のQOLを大きく上げることができる。

また患者のサポートは医療関係者というよりは患者家族の献身的な介護によっている部分が非常に大きい。しかし、患者を抱える家族は一方で非常に大きな精神的、肉体的ストレスを持っていることは明らかである。患者会の設立による情報の共有は、こういったストレスの緩和に十分な影響を持つと考えられ、さらに患者会の発展を期待したい。

E. 結論

本研究を通して基礎研究、橋渡し研究、臨床研究をバランスよく行うことができ、AT患者のための医療レベルの底上げができたと考えられる。特に今年度より開始した臨床試験によりATの神経症状に対する新たな治療法開発に直結するデータを得る可能性が出てきた。

F. 健康危険情報

特に該当するものはない。

G. 研究発表

巻末に記載のとおり。

H. 知的所有権の出願・所得状況

1. 特許取得 該当なし。
2. 実用新案登録 該当なし。
3. その他 該当なし。

「毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法の確立と病態評価に関する研究」

研究分担者 森尾 友宏

（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野・准教授）

研究要旨：毛細血管拡張性小脳失調症(AT)は毛細血管拡張性小脳失調症様疾患(ATLD)や眼球運動失行を伴う失調症(AOA1、AOA2)との鑑別が必要である。ATMの変異はナンセンス変異による蛋白質合成早期停止により、不安定になりその発現が見られないことが多い。ウェスタンブロット法を用いてこれら類縁疾患を効率的にスクリーニングする方法を開発した。またはA-Tは免疫不全を示すが、その機構としてリンパ球分化がCD4、CD82重陰性のTリンパ球分化の段階で遅滞することが明らかとなった。

A. 研究目的

毛細血管拡張性小脳失調症は、進行性の小脳失調、毛細血管拡張、免疫不全を特徴とする常染色体劣性の遺伝性疾患である。ほとんどのATMの変異はナンセンス変異による蛋白質合成早期停止により、不安定になりその発現が見られないので、蛋白質発現量をウェスタンブロット法で検討することにより、診断を確定できる。また小脳失調を示す疾患は多数あり毛細血管拡張性小脳失調症様疾患(ATLD)や眼球運動失行を伴う失調症(AOA1、AOA2)との鑑別が必要となってくる。免疫不全がA-Tの特徴的な症状の一つであるがどのような機序により免疫不全を発症するのか不明な点も多い。

B. 研究方法

末梢血をIL2添加下-CD3固相化プラス

コを用いて増幅し、ウェスタンブロット法により、蛋白質発現量を検討した。野生型およびATMノックアウトマウスを用いて胸腺におけるリンパ球分化を表面抗原の発現によりフローサイトメトリーを用いて検討した。

（倫理面への配慮）

本研究では診療施設、患者、あるいは保因者より情報提供を受け、問題点の抽出等の作業を行うため、患者（保因者）の人権擁護のために、情報管理などに十分の配慮を行う。これは基本的に臨床研究に関する倫理指針に準拠して進める。小児及び成人が主な対象となるために、小児及び成人の両者に配慮した説明書、同意書を作成する。動物の取り扱いは、「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書」に基

づく「遺伝子組み換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律」を遵守する。また東京医科歯科大学内動物実験規則、組み換え DNA 実験安全管理規則に準拠する。

C. 研究結果

一つの検体から網羅的に ATM、ATR、DNA-PK、Ku70/80、Mre11、NBS1、Rad50、XRCC4、LIG4、Aprataxin、Senataxin、XLF、Artemis 一度にスクリーニングする系を確立した。この方法を用いて 9 例の A-T 疑い症例を解析し 1 例の A-T を同定した。

A-T はその特徴として免疫不全を示すが、その機構としてリンパ球分化が CD4、CD8 2 重陽性 T リンパ球分化の段階で遅滞することが知られており、これは T 細胞受容体 α 鎖再構成の失敗に元づくものと推定されていた。本研究で ATM 欠損マウスでは CD4、CD8 2 重陰性の T リンパ球分化の段階においても分化が遅滞することが明らかとなり、この複合的な現象によってリンパ球減少が起こることが明らかとなった。

D. 考察

毛細血管拡張性小脳失調症の診断に有用なウェスタンブロット法を用いた解析方法を確立した。本方法は毛細血管拡張性小脳失調症類縁疾患の中から A-T を診断するのみならず、ATLD などの疾患の診断にも有用と考えられる。A-T における免疫不全症はその生命予後を考えるうえでも重要な位置を占めている。現時点では B 細胞機能不全による抗体産生障害に

対して免疫グロブリンの補充を行うのが唯一の治療法であるが、病因が明らかになることにより、治療法の開発に向けた展開が期待できる。

E. 結論

A-T およびその類縁疾患を効果的に同定する方法を開発した。また A-T における免疫不全症発症の要因を T 細胞主体に解析し明らかにした。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shin MJ, Shim JH, Lee JY, Chae WJ, Lee HK, Morio T, Park JH, Chang EJ, Lee SK. Qualitative and quantitative differences in the intensity of Fas-mediated intracellular signals determine life and death in T cells. *Int J. Hematol.* 2010; 92(2) : 262-70.
2. Okamoto K, Iwai Y, Ohhora M, Yamamoto M, Morio T, Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. I κ B ζ regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature.* 2010; 464(7293) : 1381-5.
3. Okamoto K, Iwai Y, Ohhora M, Yamamoto M, Morio T, Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. I κ B ζ regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature.* 2010; 464(7293) : 1381-5.
4. Oba D, Hayashi M, Minamitani M, Hamano S, Uchisaka N, Kikuchi A, Kishimoto H, Takagi M, Morio T, Mizutani S. Autopsy study of cerebellar degeneration in siblings with

ataxia-telangiectasia-like disorder. 2010, *Acta Neuropathol.* 2010; 119 (4) : 513-20.

2. 学会発表

1. Okamoto K, Iwai Y, Oh-hora M, Yamamoto M, Morio T, Jetten A M, Akira S, Muta T, Takayanag H. WS/PP-014-02 - $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$ is required for the transcriptional program in Th17 development. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. Aug. 2010.
2. Shin M J, Shim J, Lee J, Chae W, Lee H, Morio T, Park J H, Chang E, Lee S. PP-059-37 - Functional analysis of Fas-mediated activation signaling pathways in T cells. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. Aug. 2010.
3. Honda F, Ikeda Y, Takahashi N, Lee S, Mizutani S, Morio T. WS/PP-034-04 - Btk controls ROS production and apoptosis in human neutrophil. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. Aug. 2010.
4. Morio T. Immunomonitoring and T-cell immunotherapy in CBT. The Second Korea-Japan Cord Blood Transplantation Symposium. Yokohama in Japan. Sep. 2010.
5. Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Isutanbul, Republic of Turkey. Oct. 2010.
6. Morio T. Btk Controls ROS Production and Apoptosis in Human Neutrophils. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Isutanbul, Republic of Turkey. Oct. 2010.
7. Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. The 52nd ASH Annual Meeting. Orlando, Florida, USA. Dec. 2010.
8. 大坪善数, 徳富友紀, 合田裕治, 角至一郎, 上玉利彰, 中下誠郎, 森内浩幸, 森尾友宏. 慢性活動性 EBV 感染症を合併する毛細血管拡張性小脳失調症の 1 幼児例 第 113 回日本小児科学会学術集会 2010 年 4 月 23 -5 日 盛岡
9. 森尾友宏, 富澤大輔, 梶原道子, 水谷修紀, 熱田由子, 加藤剛二, 原 寿郎, 加藤俊一. 日本における先天性免疫不全症に対する臍帯血移植成績 第 113 回日本小児科学会学術集会 2010 年 4 月 23 -5 日 盛岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし。
2. 実用新案登録 該当なし。
3. その他 該当なし。

「毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法の確立と病態評価に関する研究」

研究分担者 高木 正稔

（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野・教授）

研究要旨：毛細血管拡張性小脳失調症は進行性の小脳失調、毛細血管拡張、免疫不全を特徴とする遺伝性の疾患である。確定診断は病因遺伝子 ATM の変異の同定によりなされる。しかしながら ATM は 9168bp のコーディングシーケンス、66 のエクソンからなり、その変異同定に非常に労力を必要とする。近年開発された High resolution melting curve analysis (HRM)法を用いて、効果的に遺伝子変異をスクリーニングする方法を開発した。

A. 研究目的

毛細血管拡張性小脳失調症は、進行性の小脳失調、毛細血管拡張、免疫不全を特徴とする常染色体劣性の遺伝性疾患である。その病因遺伝子 ATM は11q22.3上に位置し、全長150Kb で66エクソンから成る巨大な遺伝子である。DNA の二本鎖切断修復に重要な働きをする。確定診断は病因遺伝子 ATM の変異の同定によりなされる。しかしながら ATM は9165bp のコーディングシーケンス、66のエクソンからなり、その変異同定に非常に労力を必要とする。効果的な遺伝子変異検索法の開発が望まれる。

B. 研究方法

細胞株、末梢血より定法により DNA を抽出し 66 のエクソンの中からコーディングシーケンスを規定するものを PCR 法で増幅し HRM 解析を行った。

（倫理面への配慮）

遺伝子変異解析に関しては、「小児期発症疾患に対する網羅的遺伝子解析」として、東京医科歯科大学医学研究等倫理委員会の承認を既に得ている。十分なインフォームドコンセントを行ったのち、書面にて署名を得て行った。

C. 研究結果

80 検体を解析しアミノ酸置換を伴う ATM の SNP を 7 例から 8 個検出し、うち一つは報告のある rare SNP で残りは報告のない新規のものだった。

D. 考察

毛細血管拡張性小脳失調症の遺伝子診断に有用な HRM 法を用いた解析方法を確立した。本方法は多数のサンプルの解析に適していると考えられる。細胞の腫瘍化を考えるうえで ATM がどのような役割を担っているのか腫瘍ゲノム解析が重要になっ

てくる。本方法を用いれば多数の検体を一度にスクリーニングすることができ、診断のための遺伝子検索のみならず発がんにおける DNA 損傷応答の役割を明らかにしていく研究にとって有用と考えられる。

E. 結論

ATM の遺伝子変異を効果的にスクリーニングする方法を開発した。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagasawa M, Mitsui N, Ono T, Takagi M, Oda H, Yasuhara M, Mizutani S. Pharmacokinetic monitoring is still required for intravenous busulfan in SCT for small children. *Int J Hematol.* 2010 91(4):728-30.
2. Kawagishi H, Mizutani S, Takagi M, Sugimoto M. ARF Suppresses Tumor Angiogenesis through Translational Control of VEGF mRNA. *Cancer Res.* 2010;70(11):4749-58.
3. Sakasai R, Teraoka H, Takagi M, Tibbetts RS. Transcription-dependent activation of ataxia telangiectasia-mutated prevents DNA-dependent protein kinase-mediated cell death in response to topoisomerase I poison. *J Biol Chem.* 2010;285(20):15201-8
4. Oba D, Hayashi M, Minamitani M, Hamano S, Uchisaka N, Kikuchi A, Kishimoto H, Takagi M, Morio T, Mizutani S. Autopsy study of cerebellar degeneration in siblings with ataxia-telangiectasia-like disorder. *Acta Neuropathol.* 2010;119(4):513-20.
5. Ichijima Y, Yoshioka K, Yoshioka Y, Shinohe K, Fujimori H, Unno J, Takagi M, Goto H, Inagaki M, Mizutani S, Teraoka H. DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and

tetraploidy development. *PLoS One.* 2010 Jan 21;5(1):e8821.

2. 学会発表

1. Takagi M, Uno H, Sugimoto M, Yasuda A, Mizutani S. ATM regulates adipocyte differentiation. ATW2010. USA. Los Angeles. Apr.11-14 2010.
2. 高木正稔. DNA複製障害時の重傷複合型免疫不全症責任遺伝子 Artemis の持つ役割についての解析. 第3回日本免疫不全症研究会 2010年1月30日 東京
3. 高木正稔. DNA損傷応答機構と白血病. 第53回日本放射線影響学会大会 シンポジウム 2010年10月20 京都
4. 佐藤正樹, 高木正稔, 朴 今花, 本田博章, 安田章夫, 水谷修紀. T細胞リンパ腫と Atm ハプロ不全~BCRABLトランスジェニックマウスを用いた解析~. 第33回分子生物学会年会第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月8日 神戸
5. 鳥野初萌, 高木正稔, 杉本昌隆, 安田章夫, 水谷修紀. ATM regulate adipocyte differentiation. 第33回分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月9日 神戸
6. Takagi M, Uno H, Isoda T, Sugimoto M, Yasuda A, Mizutani S. ATM regulates cell differentiation. 第33回分子生物学会年会第83回日本生化学会大会 合同大会 ワークショップ 2010年12月9日 神戸
7. 佐藤正樹, 高木正稔, 朴 今花, 本田博章, 安田章夫, 水谷修紀. T細胞リンパ腫と Atm ハプロ不全~BCRABLトランスジェニックマウスを用いた解析~. 第52回日本小児血液学会・第26回日本小児がん学会総会 2010年12月17-19日 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし。
2. 実用新案登録 該当なし。
3. その他 該当なし。

「毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と病態評価に関する研究」

毛細血管拡張性小脳失調症患者に対する神経症状評価尺度の検討

研究分担者 熊田 聡子（東京都立神経病院・神経小児科・医長）

研究要旨：毛細血管拡張性小脳失調症(AT)患者の神経学的評価に関する国際委員会で現在作成中の神経症状評価尺度を用いて、本邦 AT 患者を評価し、その有用性と問題点を検証した。AT 患者に見られる不随意運動についても検討を加えた。

A. 研究目的

神経疾患における治療薬の効果判定のためには、治療前後の神経症状を客観的に評価するための尺度が必要である。最近、毛細血管拡張性小脳失調症(AT)患者の神経症状を半定量的に評価するための尺度作成を目的とした国際委員会が発足し、昨年度より本研究分担者も加わった。今年度は、本研究班における AT 患者に対する少量ステロイド(ベタメサゾン)投与の治療開始にあたり、この尺度を用いた患者評価を行って、その有用性と問題点を検討した。併せて AT 患者に見られる不随意運動の解析も行った。

B. 研究方法

1. 国際委員会においてほぼ完成した A-T NEURO EXAMINATION SCALE TOOLKIT (AT NEST)の日本語版を作成。これを用いて治療開始前の患者を評価した。小脳性失調の評価には、2006年に欧州の神経内科グループより提唱された「小脳性運動失調の重症度評価尺度(SARA)」も使い、両者を比較した。

2. 患者に見られた特異的な不随意運動について解析した。

C. 研究結果

1. AT NEST は、AT 患者の中核的な神経症状を、構音/書字障害、眼球運動障害、小脳性失調、不随意運動、筋力低下、末梢神経障害の 6 項目に大別。さらに、補足項目として、摂食/嚥下障害、成長障害、学習/認知障害の 3 項目を加え、この各々を半定量的評価により点数化するものである(中核症状計 100 点、補足項目 計 15 点)。今回この尺度を実際の国内患者評価に用いたところ、下記のような有用性と問題点が明らかになった。

①AT NEST は、AT 患者に見られる多彩な神経症状を網羅しており、疾患特異的な評価尺度としての有用性は高い。

②評価項目が細分化されている。このため詳細な評価が可能であるが、反面、煩雑で施行に 1 時間以上を要し、患者の疲労を招いた。

③半定量的評価をめざしているが、採点基準の曖昧な項目がなお多い。

④Body mass index のパーセンタイル値など日本人の基準値の得られない項目があり、本邦での使用においては一部改変が必要で

ある。

2. 今回評価した患者では、小脳性失調以上に、頭部・体幹・上肢の不随意運動が随意運動を阻害していた。この不随意運動は、表面筋電図上ミオクローヌスとジストニアの混在したものと考えられた。頭部 MRI では小脳皮質の萎縮を認めたが、大脳皮質及び基底核には明らかな異常を認めなかった。また、ミオクローヌスに先行する脳波上の発作波や巨大感覚神経誘発電位など、大脳皮質の易興奮性を示唆する所見は得られなかった。

D. 考察

AT NEST は、AT 患者に見られる神経症状を網羅的かつ詳細に評価しうる優れた尺度であると考えた。ただし、小脳性失調症の評価尺度としてすでに国際的な評価を得ている SARA と比較すると、簡便性と定量性においては劣る。今後、評価の再現性、評価者間での差異、疾患の進行や重症度を測る他の尺度との相関性などを、より多数例で検討する必要がある。

AT 患者では多彩な不随意運動が見られるが、従来の報告では大脳皮質や基底核に明らかな病変を認めず、その本態は未だ不明である。今回の検討でも、画像及び電気生理学的に、大脳皮質や基底核の異常を示唆する所見は得られなかった。最近、ヒトの脊髄小脳変性症やジストニア動物モデルの研究から、従来基底核に起因すると考えられていた不随意運動の発現に小脳も関与している可能性が示唆され、注目されている。独立した回路と考えられていた小脳-皮質ループと基底核-皮質ループの間に直接的な線維連絡の存在することも明らかにされた。AT 患者に見られる不随意運動の発現にも小脳変性が直接関与している可能性が考えられ、今後のさらなる検討が必要である。

E. 結論

現在国際委員会で作成中の神経症状評価尺度の有用性と問題点を検証できた。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし。
2. 学会発表 該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 該当なし。
2. 実用新案登録 該当なし。
3. その他 該当なし。

「毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法の確立と病態評価に関する研究」

毛細血管拡張性小脳失調症の神経障害に関する臨床神経病理学的解析

研究分担者 林 雅晴

（東京都神経科学総合研究所・小児神経学/神経病理学・副参事研究員）

研究要旨：毛細血管拡張性小脳失調症(AT)剖検例での glutamate decarboxylase とカルシウム結合蛋白に対する免疫組織化学染色により小脳変性での Purkinje 細胞障害の詳細を明らかにした。さらに日本での AT 家族会樹立に向けてメーリングリスト ML (A-T ML) を立ち上げた。

A. 研究目的

毛細血管拡張性小脳失調症 (AT) の神経変性機序を解明する。患者家族会と協働し、神経症状に関して標準的評価法の確立と新規治療法の開発を目指す。AT 小脳皮質病変として、Purkinje 細胞と顆粒細胞の脱落、Purkinje 細胞樹状突起の異常が知られているが、その詳細は明らかではない。小脳皮質では顆粒細胞を除く神経細胞が GABA 作動性であり、剖検脳において、GABA 系介在神経指標である glutamate decarboxylase (GAD) とカルシウム結合蛋白に対する免疫組織化学染色を施行し、AT 小脳病変の再評価を試みた。

B. 研究方法

1. AT の 2 剖検例 (10 歳代)、神経系に著変を認めない 4 対照 (5 歳~82 歳) の小脳連続切片において、GAD (Purkinje 細胞周囲、分子層、顆粒層 cerebellar glomeruli を染色)、calbindin-D28K (CD) (Purkinje 細胞、分子層 Purkinje 細胞樹状突起、folia 白質

Purkinje 細胞軸索を染色)、parvalbumin (PV) (Purkinje 細胞・樹状突起・軸索、分子層 stellate/ basket cell を染色)、calretinin (CR) (分子層、顆粒層、Purkinje 細胞近傍の Golgi cell を染色) に対する免疫組織化学染色を行い、視察的に評価した。

2. コアとなる患者家族と AT 患者家族のメーリングリスト確立を目指した。

C. 研究結果

1. ①GAD 染色：AT 例では Purkinje 細胞周囲で hairy baskets が明瞭化（対照は顆粒状）、分子層の染色性も coarse だった（図 1）。顆粒層 cerebellar glomeruli は保たれていた。②CD 染色：AT 例では Purkinje 細胞脱落、分子層の樹状突起の減少・異常分枝がみられ、folia 白質陽性線維も減少していた（図 2）。③PV 染色：AT 例では CD 染色と同様な Purkinje 細胞関連の変化と、分子層菲薄化に伴う stellate/basket cell 密集化が認められた。④CR 染色：AT 例では分子層

と顆粒層の染色性が低下していたが、Golgi cell は保たれていた。

2. 2010年5月、九州AT家族とともに、関東甲信越地区の2家族を加えたFreemlサービスを利用しメーリングリストML (A-T ML) を立ち上げた。医療関係者として参加するとともに、2010年7月九州の患者・家族を直接訪問し、打ち合わせを行った。

D. 考察

1. 通常染色で指摘されていたPurkinje細胞脱落、分子層内の樹状突起の異常、顆粒細胞減少が再確認された。さらにGAD染色で、本態性振戦や成人発症の神経変性疾患での出現が知られているhairy basketsが同定された。一方、stellate/basket cell、cerebellar glomeruli、Golgi cell は保たれていた。AT小脳変性ではPurkinje細胞が主として障害されることが推定される。今後、DNA損傷修復蛋白、酸化ストレス、神経栄養因子に対する解析を進める。

2. A-T MLでの交流から、2011年東京での定例会開催を目指す。さらに他AT家族にA-T MLの周知を図る。

E. 結論

1. GADとカルシウム結合蛋白に対する染色によりAT小脳変性でのPurkinje細胞障害の詳細が明らかになった。

2. 日本でのA-T家族会樹立に向けて、3家族によるメーリングリストML (A-T ML) を確立した。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hayashi M, Hachiya Y, Arai N. An autopsy report of case showing

repetitive hypoglycemia and unique cortical dysplasia. *Brain Dev.* 32(4): 289-92, 2010.

2. Miyata R, Sasaki T, Hayashi M, et al. Low dose of levodopa is effective for laryngeal dystonia in xeroderma pigmentosum group A. *Brain Dev* 32(8): 685-7, 2010.
3. Hayashi M, Tanuma N, Miyata R. Oxidative stress in developmental brain disorders. In: Ahmad S, ed. *Neurodegenerative diseases*. Austin: *Landes Bioscience* (in press) (レビュー)

2. 学会発表

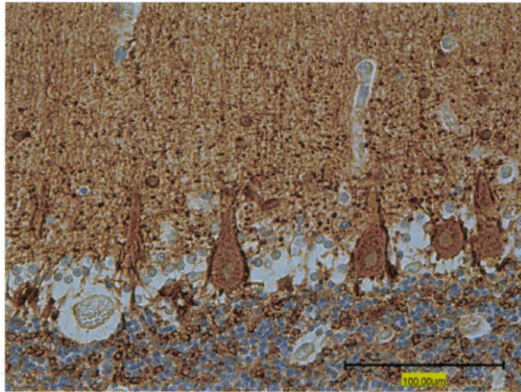
1. 林 雅晴ら. A群色素性乾皮症とCockayne症候群の剖検脳でのThymidine glycolの蓄積. 第52回日本小児神経学会総会, 福岡 (2010, 5.21).

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 該当なし。
2. 実用新案登録 該当なし。
3. その他 該当なし。

図1 小脳皮質での GAD 染色

(A) 対照



(B) AT 例

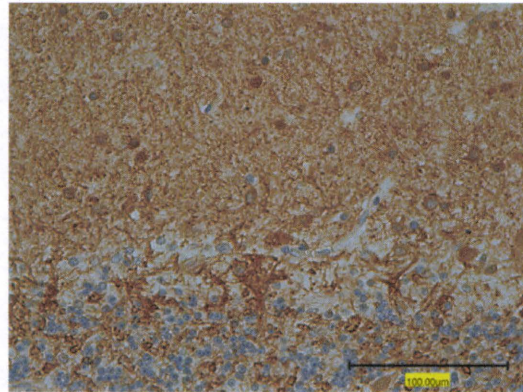
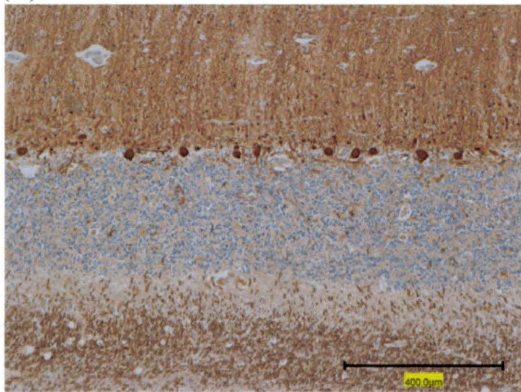
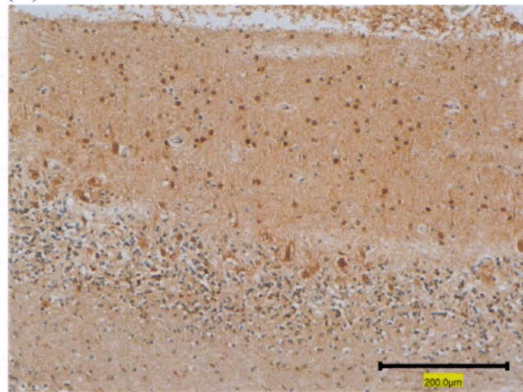


図2 小脳皮質での CD 染色

(A) 対照



(B) AT 例



「毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法の確立と病態評価に関する研究」

研究分担者 金子 英雄

（岐阜大学大学院医学系研究科・医学部地域医療医学センター・教授）

研究要旨：毛細血管拡張性小脳失調症は進行性の小脳失調、毛細血管拡張、免疫不全を特徴とする遺伝性の疾患である。特徴的な症状がそろえば、临床上、比較的容易に診断される場合もあるが、非典型的な場合は診断に苦慮する場合も少なくない。そのような場合、確定診断は、病因遺伝子 ATM の変異の同定によりなされる。そこで、本邦の毛細血管拡張性小脳失調症における ATM 遺伝子変異つき検討した。解析した 10 家系 20 alleles のうち、7883del5, IVS+2 (T>A) が 10 alleles に認められ、本邦の症例において、比較的共通な遺伝子変異と考えられた。片方の allele の ATM 遺伝子変異しか検出されない症例が、10 症例中 5 症例存在し、そのような症例では、ATM 遺伝子の比較的大きな欠失の有無につき、検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

毛細血管拡張性小脳失調症は、進行性の小脳失調、毛細血管拡張、免疫不全を特徴とする常染色体劣性の遺伝性疾患である。神経、免疫など多彩な症状を示すこと、放射線感受性の亢進、高率な悪性腫瘍の合併などの多岐にわたる表現型が特徴である。その病因遺伝子 ATM は11q22.3上に位置し、全長150Kb で66エクソンから成る巨大な遺伝子である。DNA の二本鎖切断修復に重要な働きをする。毛細血管拡張性小脳失調症の確定診断は、ATM 遺伝子の異常を検出することによりなされる。そこで、本邦の毛細血管拡張性小脳失調症の ATM 遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

RT-PCR はリンパ球から RNA を抽出し、

cDNA のオープンリーディングフレーム 9168 塩基を 18 の断片にわけて PCR にて増幅し、プラスミドに組み込んだのち、塩基配列を決定した。変異が明らかになった場合は、ゲノムからそのエクソン周囲を増幅し確認した。また、それぞれの変異をゲノムで増幅後、制限酵素の切断の有無で、簡便に検出する方法を確立した。

（倫理面への配慮）

遺伝子変異解析に関しては、「先天性免疫不全症の原因遺伝子同定および病態形成機序の解明」として、岐阜大学医学研究等倫理委員会の承認を既に得ている。十分なインフォームドコンセントを行ったのち、書面にて署名を得て行った。

C. 研究結果

本邦の毛細血管拡張性小脳失調症の遺伝