

Alexander 病における GFAP 遺伝子変異：promoter 領域の検索

分担研究者 滑川 道人 自治医科大学医学部 神経内科
研究協力者：直井 為任¹⁾，迫江 公己¹⁾，本多 純子¹⁾，嶋崎 晴雄¹⁾，中野 今治¹⁾，
瀧山 嘉久²⁾

1) 自治医科大学医学部 神経内科，2) 山梨大学医学部 神経内科

研究要旨

GFAP 遺伝子の promoter 領域の変異が，アレキサンダー病 (AxD) の臨床型の修飾因子となりうるかを検討した。成人型 AxD 群 (11 例) では，既知の SNP: rs2070935 において全例 A/A (4 例) もしくは A/C (7 例) であり，C/C は 1 例もなかった。C 型であると，*GFAP* 翻訳量が増加すると予想され，この SNP が modifier の可能性が考えられた。また臨床症状・画像所見は AxD に矛盾はしないが，通常の直接シーケンス法で *GFAP* 遺伝子の exon 内変異が検出できない 1 例において，新規の SNPs を 2 個同定した。in silico analysis にていずれも転写因子結合に変化を与えると予想される変異であり，今後，その機能を検討予定である。

A. 背景および研究目的

かつてはきわめてまれな疾患と思われていた Alexander 病 (AxD) であるが，2001 年に AxD の責任遺伝子が *GFAP* であることが判明して以来，報告が相次いでおり，現在までに 150 例以上の報告がある。ただしほぼ全ての報告例の診断は *GFAP* 遺伝子変異の同定のみでなされている。

現時点では典型的な臨床症状を呈しながらも *GFAP* 遺伝子変異を有さない症例が約 1 割存在する。その理由として，1) 別の遺伝子の異常，2) *GFAP* 遺伝子の exon 内の点変異以外の異常 (splicing 異常，promoter 領域の異常，遺伝子の重複など) などの可能性が考えられる。

そこで本研究では *GFAP* 遺伝子の promoter 領域の変異が，AxD の臨床型の修飾因子となりうるか，またそれのみで AxD 病の疾患責任変異となりうるかを検討する。

B. 研究方法

成人型 AxD 11 例 (A 群)，および臨床症状・画

像所見は AxD に矛盾はしないが，通常の直接シーケンス法で *GFAP* 遺伝子の exon 内変異が検出できない 10 例 (B 群) において，*GFAP* 遺伝子の promoter 領域の変異の有無を直接シーケンス法で確認した。

C. 研究結果

1) A 群では，既知の SNP: rs2070935 において全例 A/A (4 例) もしくは A/C (7 例) であり，C/C は 1 例もなかった。

2) B 群では，1 例 (臨床診断：1 次進行型多発性硬化症) において新規の SNPs を 2 個同定した。in silico analysis にていずれも転写因子結合に変化を与えると予想される変異であった。

D. 考察

SNP: rs2070935 の日本人における頻度は C: 64.05% / A: 35.95% とされる (JSNP database)。C の場合には AP-1 結合能が上昇するという報告があり (Bachetti et al, 2010)，これに伴って

GFAP 翻訳量が増加すると予想される。我々の検討では、乳児型より軽症である成人型には C/C 型が 1 例も存在せず、この SNP が modifier である可能性がある。

また B 群で同定された 2 つの新規の SNP については、今後これが実際に転写因子活性に影響を与えるか否かを、Luciferase assay 法などを用いて検討する予定である。

E. 結論

GFAP の promoter 領域の SNP は AxD の modifier となりうる可能性が否定できない。

また、GFAP の promoter 変異により、神経変性疾患を引き起こす可能性があり、更なる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Namekawa M, et al. A novel adult case of juvenile-onset Alexander disease: complete remission of neurological symptoms for over 12 years, despite insidiously progressive cervicomedullary atrophy. *Neurol. Sci.* 2011 Dec 24. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- ・ Namekawa M, Naoi T, Sakoe K, Honda J, Shimazaki H, Takiyama Y, Nakano I. Adult Alexander disease in Tochigi, Japan caused by a founder mutation p.R276L in the *GFAP* gene. 15th congress of the European Federation of Neurological Societies. September 10-13, 2011, Budapest, Hungary. (abstract, *Eur. J. Neurol.* in press)

- ・ 滑川道人, 直井為任, 迫江公己, 本多純子, 嶋崎晴雄, 瀧山嘉久, 中野今治. GFAP 遺伝子の R276L 変異を有する Alexander 病 (1) 臨床神経学的検討. 第 52 回日本神経学会学術集会, 2011 年 5 月 18-20 日, 東京. (臨床神経, 印刷中)

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

Alexander 病における GFAP 遺伝子変異が細胞内局在に与える影響

分担研究者 滑川 道人 自治医科大学医学部 神経内科
研究協力者：◎直井 為任¹⁾，迫江 公己¹⁾，本多 純子¹⁾，嶋崎 晴雄¹⁾，
瀧山 嘉久²⁾ 中野 今治¹⁾

1) 自治医科大学医学部 神経内科， 2) 山梨大学医学部 神経内科

研究要旨

GFAP 変異が疾患責任変異か否かを評価するシステムの確立するため，tag の有無による野生型と変異型間の違い，各変異型間における特徴を検討した．tag(-)では aggregation は全くみられず C 末における tag の存在自体が GFAP の filament 形成において障害となり，細胞内局在を評価する際には tag(-)であることが観察する上で有用であると考えられた．そしてこのシステムを用いて，遺伝子変異型と臨床型と細胞内局在の関連を検討した．臨床型と細胞内局在とは相関がみられ，これは変異が疾患責任変異であるかを評価するよいシステムとなり得る可能性がある．

A.研究目的

Alexander 病は乳児型・若年型・成人型に分類され，各々特徴的な臨床像を呈する．病理学的には Rosenthal fiber 形成が特徴的であり，培養細胞においては変異型 GFAP を過剰発現させることで凝集体(aggregation)を形成するが，過剰発現させた野生型においても aggregation の形成がみられる．そのため現状では，野生型と変異型との区別は aggregation が出現する割合で判定しなければならない．我々は GFAP 変異が疾患責任変異か否かを評価するシステムの確立するため，tag の有無による野生型と変異型間の違い，各変異型間における特徴を検討した．

B.研究方法

pcDNA3.1 vector に GFAP (α -isoform)の野生型全長を導入し C 末に V5-tag をつけたものにつけない construct を作成した．乳児型・若年型・成人型・及びこれらの type が混合して報告されている変異型は mutagenesis により作成した．こ

れらの construct を，GFAP をはじめとした中間径 filament が発現していない培養細胞株(SW13)に導入し，48 時間後で各々の細胞内局在を観察，野生型と変異型，および変異型間の違いを比較検討した．

C.研究結果

tag の有無にかかわらず aggregation を有する細胞の割合は乳児型と若年型で多く，成人型では比較的少ない傾向があった．しかし tag(+)では野生型でもわずかながら aggregation の形成が観察されたが，tag(-)では aggregation は全くみられなかった (図 1)．

またこのシステムでは，成人型において tag(+)では見られなかった短い特徴的な filament を形成することが確認され，変異型間においては隣接する 3 つの変異 p.D78N (成人型)・p.R79C (乳児型/若年型)・p.F80S(新生児型)をも含め，GFAP の細胞内局在と臨床像との相関がみられた (図 2)．

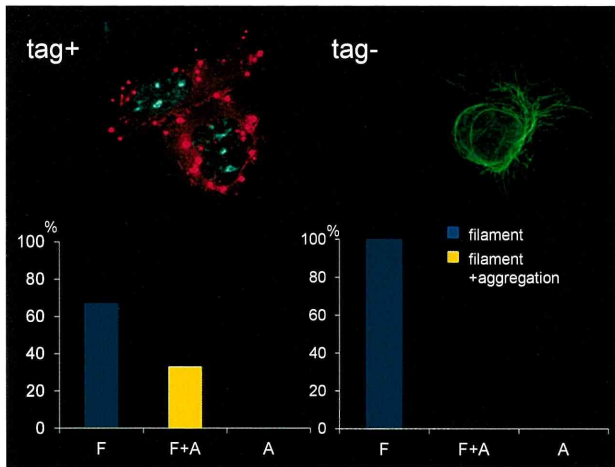


図 1 : SW13 (vim-) における tag の有無による細胞内局在の違い

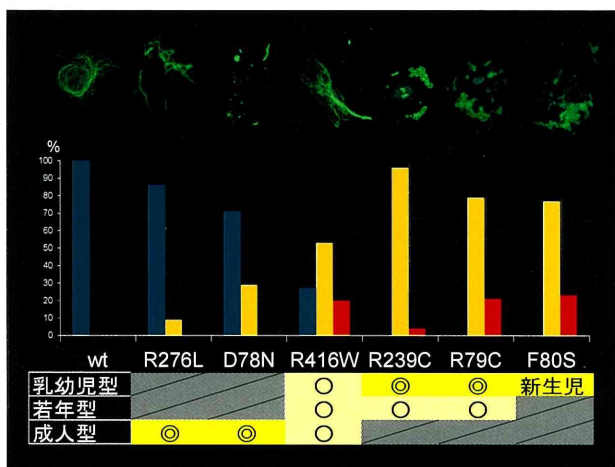


図 2 : SW13 (vim-) における遺伝子変異型と臨床型と細胞内局在の関連

D. 考察

C 末における tag の存在自体が GFAP の filament 形成において障害となり、細胞内局在を評価する際には tag(-)であることが野生型と変異型の違いを観察する上で有用であった。

また培養細胞については他の内在する中間径 filament によって細胞骨格が修飾・補完されるとの報告もあり、内在 vimentin のない SW13 細胞が有用であると考えられる。SW13 細胞に tag(-) の GFAP を導入する系は、変異が疾患責任変異であるかを評価するよいシステムとなり得る可能性がある。

F.健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (投稿準備中)

2. 学会発表

- 直井為任, 滑川道人, 迫江公己, 本多純子, 嶋崎晴雄, 瀧山嘉久, 中野今治: GFAP 遺伝子の R276L 変異を有する Alexander 病 (2) 細胞生物学的検討. 第 52 回日本神経学会学術集会, 2011 年 5 月 18-20 日, 東京. (臨床神経, 印刷中)

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

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

アレキサンダー病の診断基準および治療・ケア指針の作成、病態解明・治療法開発のための研究

(分担)研究報告書

Alexander 病ショウジョウバエモデルを用いた drug screening

分担研究者 中川正法 京都府立医科大学大学院 神経内科学

研究協力者 笹山博司¹⁾、山口政光²⁾、島村真依²⁾

1)京都府立医科大学大学院 神経内科学 2)京都工芸繊維大学大学院 応用生物学

研究要旨

昨年樹立した複眼特異的に GFAP を発現する Alexander 病のショウジョウバエモデルを用いて、薬物スクリーニングを行った。薬物はバルプロ酸 Na、ゾニサミド、抑肝散、セフトリアキソンを用いた。今回の検討ではいずれの薬物に対しても複眼構造の回復を認めなかった。今後薬剤濃度の調整および組織切片での検討が必要である。

A. 研究目的

ショウジョウバエはヒトと生物としての基本的仕組みに大きな違いはないこと、世代が短い、産卵数が多い、飼育しやすいなど遺伝学的研究には利点が多い。昨年度、われわれは変異 *GFAP* を導入し、複眼特異的に発現させたショウジョウバエモデルを作成した。本研究では 4 種類の薬剤に対して薬物スクリーニングを行い、複眼構造の変化を観察した。

B. 研究方法

アレキサンダー病の病態モデルとして GMR-GAL4 driver と野生型、R239C 変異 *GFAP*、R416W 変異 *GFAP* を導入して複眼原基特異的に GFAP を発現させるショウジョウバエモデルを作成した。交配させたショウジョウバエの次世代で産まれてきた幼虫に薬物(バルプロ酸 Na、ゾニサミド、抑肝散、セフトリアキソン)を混ぜた食餌を与え、

成虫の異常複眼構造の回復の有無を観察した。

C. 研究結果

野生型、R239C 変異 *GFAP*、R416W 変異 *GFAP* 各系統に対して、100nM のバルプロ酸 Na、ゾニサミド、セフトリアキソンと 100ug/ml の抑肝散にて drug screening を試みたが、複眼構造の回復はみとめられなかった。

D. 考察

今回の検討では複眼構造の改善は認められなかったが、薬剤濃度の調整および組織切片での凝集体の変化についてさらなる検討が必要と考えられた。

バルプロ酸 Na は GABA トランスアミナーゼ阻害薬であり、直接凝集体形成や抑制には関与しないと思われるが、比較的アレキサンダー病のてんかんの治療に使用され

ている薬剤である。ゾニサミドはアストロサイトの増殖作用によりグルタミン酸トランスポートの発現を増加させ、間接的に内在性抗酸化防御因子増加に作用するとされており、アレキサンダー病に関しては異常なアストロサイトの増殖という負の効果をもたらすことも予測される。セフトリアキソンは変異 GFAP の異常凝集を抑制する作用が報告(Bachetti T, et al. Exp Cell Res 2010)されている。抑肝散は患者での使用例の報告はないが、グルタミン酸トランスポートの活性化作用が示されている。アレキサンダー病の病態については GFAP の凝集体抑制だけでなく、ニューロンとグリア細胞の相互作用の改善が必要と考えられており、本モデルが正確に病態を把握できるものか否かについては更なる検討が必要と思われる。

E. 結論

確立したアレキサンダー病ショウジョウバエモデルを用いて drug screening を行った。今後の病態解明研究へ一歩前進した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida T, Nakagawa M. Clinical aspects and pathology of Alexander disease, and morphological and functional alteration of astrocyte induced by *GFAP* mutation. *Neuropathology* 2011 published online.

2. Yoshida T, Sasaki M, Yoshida M, Namekawa M, Okamoto Y, Tsujino S, Sasayama H, Mizuta I, Nakagawa M. Nationwide survey of

Alexander disease in Japan and proposed new guidelines for diagnosis. *J Neurol* 2011; 258: 1998-2008.

3. Yoshida T, Sasayama H, Mizuta I, Okamoto Y, Yoshida M, Riku Y, Hayashi Y, Yonezu T, Takata Y, Ohnari K, Nakagawa M. Glial fibrillary acidic protein mutations in adult-onset Alexander disease: Clinical features observed in 12 Japanese patients. *Acta Neurol Scand* 2011; 124: 104-108.

4. Shiihara T, Yoneda T, Mizuta I, Yoshida T, Nakagawa M, Shimizu N. Serial MRI changes in a patient with infantile Alexander disease and prolonged survival. *Brain & Development* 2011; 33: 604-607.

5. Suzuki H, Yoshida T, Kitada M, Ichihashi J, Sasayama H, Nishikawa Y, Mitsui Y, Nakagawa M, Kusunoki S. Late-onset Alexander disease with a V87L mutation in glial fibrillary acidic protein (GFAP) and calcifying lesions in the sub-cortex and cortex. *J Neurol* 2011. Published online.

H. 知的所有権の取得状況

なし

IV. 班會議會議錄・抄錄集

平成 23 年度厚生労働科研費補助金 難治性疾患克服研究事業
アレキサンダー病研究班 平成 23 年度 第 1 回班会議

(アレキサンダー病の診断基準および治療・ケア指針の作成、病態解明・治療法開発のための研究)

平成 23 年 7 月 1 日(金) 12:30-15:00 京都府立医科大学 基礎学舎 3F 会議室

プログラム

昼食 午後 12 時 30 分～13 時
班会議 13 時 ～15 時

議題

1. 班長挨拶
2. ホームページ作成についての討論(全員)
3. その他
4. 次回の班会議について(12 月上旬予定)

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

「アレキサンダー病の診断基準および治療・ケア指針の作成、病態解明・治療法開発の
ための研究」班

研究代表者 吉 田 誠 克

〒602-0841

京都市上京区河原町広小路上る梶井町 465

京都府立医科大学 神経内科

TEL 075-251-5793/FAX 075-211-8645

平成23年度厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業
アレキサンダー病研究班 平成23年度 第1回班会議
(アレキサンダー病の診断基準および治療・ケア指針の作成、病態説明・治療後フォローのための研究)

アレキサンダー病に関する ホームページの作成について

平成23年7月1日(金) 12:30-15:00 京都府立医科大学 基礎学舎 3F会議室

内 容

- ① トップページ (疾患概要含む) (吉田誠克)
- ② 診断指針 (チャート、詳細) (吉田誠克)
- ③ 臨床病型
 - 1) 大脳優位型 (佐々木先生、辻野先生)
 - 2) 延髄・脊髄優位型 (滑川先生)
 - 3) 中間型 (中川先生、佐々木先生)
- ④ 病理学的特徴 (吉田真理先生)
- ⑤ GFAP遺伝子検査 (水田先生、辻野先生)
遺伝子検査可能施設 →リンク(京都府立医大、自治医大)
- ⑥ 研究体制(研究メンバー)
- ⑦ 研究成果
- ⑧ リンク
難病センターホームページ、Waisman Center、難病研究資源
バンク

平成 23 年度厚生労働科研費補助金 難治性疾患克服研究事業
アレキサンダー病研究班 平成 23 年度 第 2 回班会議
(アレキサンダー病の診断基準および治療・ケア指針の作成、
病態解明・治療法開発のための研究)

主任研究者 京都府立医科大学 吉田誠克

平成 23 年 12 月 2 日(金) 12 : 30-15 : 30 京都府立医科大学 基礎学舎 3F 会議室

研究発表 13 : 00~15 : 30

1. 「Alexander 病乳児型と若年型の長期経過」

国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科 佐々木征行、小牧宏文、
丸山慎介
群馬県立小児医療センター 神経内科 渡辺美緒

2. 「Alexander 病における GFAP 遺伝子変異 : GFAP promoter 領域の検索」

自治医科大学 神経内科 滑川道人、直井為任、迫江公己、本多純子
嶋崎晴雄、中野今治
山梨大学医学部 神経内科 瀧山嘉久

3. 「Alexander 病患者における GFAP プロモーター遺伝子多型解析」

京都府立医科大学大学院 神経内科 吉田誠克、水田依久子

4. 「成人発症アレキサンダー病におけるアストロサイトのタウ発現」

愛知医科大学加齢医科学研究所研 吉田眞理、三室マヤ、辰己新水、岩崎靖
国立東名古屋病院 神経内科 饗場郁子
名古屋医療センター 神経内科 奥田聡
福祉村神経病理研究所 橋詰良夫
京都府立医科大学大学院 神経内科 中川正法

5. 「Alexander 病における GFAP 遺伝子変異が細胞内局在に与える影響」

自治医科大学 神経内科 直井為任、滑川道人、迫江公己、本多純子
嶋崎晴雄、中野今治
山梨大学医学部 神経内科 瀧山嘉久

6. 「Alexander 病ショウジョウバエモデルを用いた drug screening」

京都府立医科大学大学院 神経内科 笹山博司、中川正法
京都工芸繊維大学大学院 応用生物学、昆虫バイオメディカルセンター
山口政光、島村真衣

演題 1 Alexander 病乳児型と若年型の長期経過

分担研究者：国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科 ●佐々木征行

研究協力者：同上 小牧宏文，丸山慎介

群馬県立小児医療センター神経内科 渡辺美緒

【はじめに】現在当科では 3 例の Alexander 病女児例の経過を追っている。3 例いずれも頭部 MRI と遺伝子検査により診断した。これらの症例の臨床経過と頭部 MRI 画像所見の変化について報告する。

【症例 1】1 歳 4 か月女児（初診時） 主訴：精神運動発達退行，けいれん発作
家族歴異常なし。満期正常出生。出生時頭囲 36cm (+2.2SD)。頸定 3 か月，坐位 6 か月，以降発達軽度遅れ，這い這い 9 か月，伝い歩き 1 歳 3 か月（ピーク）。1 歳 0 か月で熱性けいれん。1 歳 3 か月より運動退行。頭囲：49cm (+2.2SD)。深部腱反射亢進。病的反射陽性。頭部 MRI で Alexander 病が疑われ，遺伝子検査で GFAP 遺伝子変異：heterozygous R239C (715C>T) を認め確定。

その後の経過：2 歳には痙性が強くなり，常時臥床。知的退行も進行し有意語消失した。2 歳から 4 歳まで年に 2～3 回全般性間代けいれん重積を起こした。以降は CBZ+CZP でコントロールされた。5 歳より経管栄養併用。7 歳で嚥下困難のため全面的に経管栄養。8 歳頃から口蓋ミオクローヌスが出現。9 歳より体重減少。10 歳で喉頭気管分離術施行。現在も在宅で外来フォロー中。

・現在 12 歳。症状は進行性，痙性四肢麻痺で常時臥床，脳幹障害による嚥下障害あり経管栄養。8 歳ごろから出現した口蓋ミオクローヌスが続けている。

【症例 2】1 歳 8 か月女児（初診時） 主訴：精神運動発達遅滞，けいれん発作
満期正常出生。出生時頭囲 34.5cm (+1.2SD)。頸定 4 か月。坐位 7 か月，つかまり立ち 1 歳 4 か月，独歩未。単語 1 歳 8 か月，有意語 6 歳。1 歳 5 か月で無熱性けいれん初発。止まるまでに 1 時間以上続いた。頭囲：48cm (+0.9SD)。深部腱反射亢進。頭部 MRI で Alexander 病が疑われ，遺伝子検査で GFAP 遺伝子変異：heterozygous R239C (715C>T) を認め確定。

その後の経過：けいれんコントロールは良好。知的にはゆっくり改善し 6 歳で二語文を獲得した。運動では独歩は獲得せず，車椅子を使用していた。

・現在 8 歳。明らかな遅れはあるが，精神運動退行はない。簡単な会話が可能である。

【症例 3】3 歳 8 か月女児（初診時） 主訴：熱性けいれん
満期正常分娩。頭囲 33cm（正常）。頸定 4 か月，坐位 11 か月，独歩 1 歳 5 か月と遅めだった。有意語 1 歳 6 か月，二語文 2 歳。その後の知的発達・運動発達は正常範囲。3 歳 5 か月で熱性けいれんがあった。頭囲 48cm (-0.6SD)。発達指数 (DQ):110。深部腱反射ごく軽度亢進。頭部 MRI で Alexander 病が疑われ，遺伝子検査で GFAP 遺伝子変異：

heterozygous R88C (262C>T) を認め確定.

その後の経過: 4歳では走るのが遅い程度. 5歳で熱性けいれん 1回. 6歳普通小学校入学. 勉強・運動ともに遅れなし. 7歳発音やや不明瞭. 知能検査 (WISC-III) で全 IQ82 (言語性 96, 動作性 79 と解離あり). 8歳勉強の遅れあり. 食事量減少し体重減少. 9歳発音不明瞭, 食事摂取少量. 経管栄養未施行.

・現在 10歳. 体重 14kg 台. 歩行は可能. 舌の動き悪いが, 口蓋ミオクロウヌスは認めない.

【頭部画像所見】初診時の頭部 MRI 画像所見は 3例ともよく似ていた. 前頭部優位の白質信号異常と白質量の増大, 脳室周囲の縁取り, 基底核と視床の T2 高信号, 歯状核に T2 高信号を認めた.

画像変化: 症例 1 では大脳白質は嚢胞化. 延髄から橋および中小脳脚などが萎縮し異常信号を呈していた. 症例 2 はほとんど変化なし. 症例 3 では延髄が萎縮し T2 高信号を呈していた.

【考察】頭部 MRI での脳幹異常信号は 3例とも病初期よりわずかに認めていた. しかしその後の症状および頭部 MRI での進行経過は 3例でかなり異なっている. 臨床的に症例 1 は典型的な乳児型の経過であり, 症例 2 では明らかな進行を認めていない. 頭部 MRI の変化と臨床症状の変化が一致していた. 症例 1 と 2 は同じ遺伝子変異であるが, 臨床症状の進行程度はかなり異なっていた. 若年型と診断した症例 3 は, 知的退行や運動退行はほとんどないものの脳幹症状の進行が顕著であった.

演題 2 Alexander 病における GFAP 遺伝子変異：promoter 領域の検索

自治医科大学 神経内科：

●滑川 道人, 直井 為任, 迫江 公己, 本多 純子, 嶋崎 晴雄, 中野 今治

山梨大学医学部 神経内科：

瀧山 嘉久

【背景】

かつてはきわめてまれな疾患と思われていた Alexander 病 (AxD) であるが, 2001 年に AxD の責任遺伝子が *GFAP* であることが判明して以来, 報告が相次いでおり, 現在までに 150 例以上の報告がある. ただしほぼ全ての報告例の診断は *GFAP* 遺伝子変異の同定のみでなされている.

現時点では典型的な臨床症状を呈しながらも *GFAP* 遺伝子変異を有さない症例が約 1 割存在する. その理由として, 1) 別の遺伝子の異常, 2) *GFAP* 遺伝子の exon 内の点変異以外の異常 (splicing 異常, promoter 領域の異常, 遺伝子の重複など) などの可能性が考えられる.

【目的】

GFAP 遺伝子の promoter 領域の変異が, AxD の臨床型の修飾因子となりうるか, またそれのみで AxD 病の疾患責任変異となりうるかを検討する.

【方法】

成人型 AxD 11 例 (A 群), および臨床症状・画像所見は AxD に矛盾はしないが, 通常の方法で直接シーケンス法で *GFAP* 遺伝子の exon 内変異が検出できない 10 例 (B 群) において, *GFAP* 遺伝子の promoter 領域の変異の有無を直接シーケンス法で確認した.

【結果】

1) A 群では, 既知の SNP: rs2070935 において全例 A/A (4 例) もしくは A/C (7 例) であり, C/C は 1 例もなかった.

2) B 群では, 1 例 (臨床診断: 1 次進行型多発性硬化症) において新規の SNPs を 2 個同定した. *in silico analysis* にていずれも転写因子結合に変化を与えると予想される変異であった.

【考察】

SNP: rs2070935 の日本人における頻度は C: 64.05% / A: 35.95% とされる (JSNP database). C の場合には AP-1 結合能が上昇するという報告があり (Bachetti et al, 2010), これに伴って *GFAP* 翻訳量が増加すると予想される. 我々の検討では, 乳児型より軽症である成人型には C/C 型が 1 例も存在せず, この SNP が modifier である可能性がある.

また B 群で同定された 2 つの新規の SNP については, 今後これが実際に転写因子活性に影響を与えるか否かを, Luciferase assay 法などを用いて検討する予定である.

演題3 Alexander病患者におけるGFAPプロモーター遺伝子多型解析

京都府立医科大学 神経内科 吉田誠克、水田依久子

【目的】GFAP 遺伝子の転写開始部位上流 250bp(-250bp)のプロモーター遺伝子多型はGFAP の発現量を変化させることが *in vitro* の実験で示されており、アレキサンダー病の表現型を修飾する因子の候補とされているが、実際の患者での検討は行われていない。今回われわれはアレキサンダー病患者のGFAPプロモーター遺伝子多型解析を行い、臨床表現型との関連について検討した。

【方法】対象はGFAP変異を伴うアレキサンダー病患者10名(大脳優位型(1型)1例、延髄・脊髄優位型(2型)5例、中間型(3型)4例)。直接シーケンス法にてGFAP遺伝子上流2kbの塩基配列を決定した。さらに-250bp遺伝子多型においてC/Aのホモ接合体を認めた症例についてサブクローニング法にてプロモーター遺伝子多型とGFAP変異が同一遺伝子上に存在するかどうかを調べた。

【結果】-250bp遺伝子多型は4例がC/C、1例がA/Aのホモ接合体、5例がC/Aのヘテロ接合体であった。ヘテロ接合体症例においてはいずれのアレルがGFAP遺伝子変異と同一遺伝子上に存在するかにより臨床表現型の差は認めなかった。また、歩行不能例においてCアレルをホモ接合体でもつ症例が多い傾向にあった。

【結論】GFAPプロモーター遺伝子多型がアレキサンダー病の臨床表現型を修飾する可能性はあるが、その影響はGFAP遺伝子変異と比較すると非常に小さいものと推測する。

演題4 成人発症アレキサンダー病におけるアストロサイトのタウ発現

研究分担者 吉田眞理¹⁾

研究協力者 三室マヤ¹⁾、辰己新水¹⁾、岩崎靖¹⁾、饗場郁子²⁾、奥田聡³⁾、橋詰良夫⁴⁾、中川正法⁵⁾ 1) 愛知医科大学加齢医科学研究所、2) 国立東名古屋病院神経内科、3) 名古屋医療センター神経内科、4) 福祉村神経病理研究所 5) 京都府立医科大学大学院神経病態制御学

【目的】

高齢発症の Alexander 病 (A 病) では小児期発症例に比して病変の進展や大脳白質変性に相違がみられ、脳室周囲や脳幹部、脊髄に散在性にタウの発現を認める。タウの発現の分布と局在、タウアイソフォームの特徴を神経病理学的に検討し、その意味づけと A 病の病態との関連性を考察する。

【症例】死亡時 73 歳女性。

【既往歴】29 歳時に両側網膜剥離のため光覚弁となる。

【家族歴】熊本県出身。弟、長男に類似症状あり。

【臨床病理像】59 歳時過換気、62 歳時より幻覚、幻聴、64 歳時より歩行障害、65 歳時注視麻痺、頸部後屈、易転倒性、体軸性固縮、前頭葉徴候、認知症などより進行性核上性麻痺を疑われた。MRI では初期から著明な脳幹、特に延髄の萎縮および前頭側頭葉の萎縮を認め、IMP-SPECT では前頭側頭葉の血流低下を認めた。徐々に無動、発話量低下、嚥下障害が進行し全経過 14 年で死亡。神経病理学的に大脳白質の変性、延髄の萎縮、脳幹部を主体に Rosenthal fiber の出現を認め、遺伝子診断で GFAP exon 4 の Arg258Cys が確認された。

【タウの発現】前頭葉の脳室周囲白質、小脳の第 IV 脳室周囲、脳幹部、脊髄に AT8 陽性像を認める。AT8 陽性像は神経細胞にはみられず、主として軟膜下、脳室上衣下、血管周囲の astrocyte の足突起に一致して認める。変性の強い脳幹部や脊髄では多巢性に散在する。大脳の辺縁系は Braak NFT stage I に相当し、PSP や CBD、AGD など他のタウオパチーの所見はみられない。

【考察】二次性のタウの発現は慢性の感染症、外傷、血管障害などに観察されるが、本例のタウの発現は astrocyte 主体にみられ、A 病における astrocyte の機能障害を二次的に反映している可能性がある。

演題 5 Alexander 病における GFAP 遺伝子変異が細胞内局在に与える影響

自治医科大学 神経内科：

●直井 為任, 滑川 道人, 迫江 公己, 本多 純子, 嶋崎 晴雄, 中野 今治

山梨大学医学部 神経内科：

瀧山 嘉久

【目的】

Alexander 病は乳児型・若年型・成人型に分類され、各々特徴的な臨床像を呈する。病理学的には Rosenthal fiber 形成が特徴的であり、培養細胞においては変異型 GFAP を過剰発現させることで凝集体(aggregation)を形成するが、過剰発現させた野生型においても aggregation の形成がみられる。そのため現状では、野生型と変異型との区別は aggregation が出現する割合で判定しなければならない。我々は GFAP 変異が疾患責任変異か否かを評価するシステムの確立するため、tag の有無による野生型と変異型間の違い、各変異型間における特徴を検討した。

【方法】

pcDNA3.1 vector に GFAP (α -isoform)の野生型全長を導入し C 末に V5-tag をつけたものにつけない construct を作成した。乳児型・若年型・成人型・及びこれらの type が混合して報告されている変異型は mutagenesis により作成した。これらの construct を、GFAP をはじめとした中間径 filament が発現していない培養細胞株(SW13)に導入し、48 時間後で各々の細胞内局在を観察、野生型と変異型、および変異型間の違いを比較検討した。

【結果と考察】

tag の有無にかかわらず aggregation を有する細胞の割合は乳児型と若年型で多く、成人型では比較的少ない傾向があった。しかし tag(+)では野生型でもわずかながら aggregation の形成が観察されたが、tag(-)では aggregation は全くみられなかった。このことから C 末における tag の存在自体が GFAP の filament 形成において障害となっていると考えられ、細胞内局在を評価する際には tag(-)であることが野生型と変異型の違いを観察する上で有用であった。さらにこのシステムでは、成人型において tag(+)では見られない短い特徴的な filament を形成することが確認され、変異型間においては隣接する 3 つの変異 p.D78N (成人型)・p.R79C (乳児型/若年型)・p.F80S(新生児型)をも含め、GFAP の細胞内局在と臨床像との相関がみられた。

また培養細胞については他の内在する中間径 filament によって細胞骨格が修飾・補完されるとの報告もあり、内在 vimentin のない SW13 細胞が有用であると考えられる。以上より SW13 細胞に tag(-)の GFAP を導入する系は、変異が疾患責任変異であるかを評価するよいシステムとなり得る可能性がある。

演題6 Alexander病ショウジョウバエモデルを用いたdrug screening

京都府立医科大学大学院 神経内科 笹山博司、中川正法
京都工芸繊維大学大学院 応用生物学、昆虫バイオメディカルセンター
山口政光、島村真依

[目的] 現在までに、Alexander病のモデルとして培養細胞、マウスを使った研究が行われてきたが、まだあまり成果が得られていない。そのため別の動物モデルでの解析が必要になる。ショウジョウバエもヒトも生物としての基本的仕組みにそれほど違いはない。われわれは Alexander 病ショウジョウバエモデルを作製しそれを用いて病態解明および治療の研究を試みている。

[方法] 複眼原基特異的に発現させる GMR-GAL4 driver と GFAP(wild-type, R239C, R416W)の遺伝子を導入したショウジョウバエと交配させた。交配させたショウジョウバエの次世代で生まれてくれる幼虫を用いて drug を混ぜた食餌を与え、成虫の複眼の異常を観察する。Drug は抗てんかん薬であるバルプロ酸Na、アストロサイトの機能に作用するゾニサミドおよび抑肝散、ローゼンタル細胞の凝集抑制効果が報告されているセフォタキシムを用いた。

[結果] 100nM のバルプロ酸ナトリウム、ゾニサミド、ロセフィンと 100ug/ml の抑肝酸にて drug screening を試みたが、複眼構造の回復はみとめられなかった。今後、薬剤を高濃度にしてさらに複眼の構造変化を観察する予定である。

V. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果刊行に関する一覧表

* 雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年 (西暦)
<u>Yoshida T, Sasaki M, Yoshida M, Namekawa M, Okamoto Y, Tsujino S, Sasayama H, Mizuta I, Nakagawa M.</u>	Nationwide survey of Alexander disease in Japan and proposed new guidelines for diagnosis.	J Neurol	258	1998-2008	2011
<u>Yoshida T, Nakagawa M.</u>	Clinical aspects and pathology of Alexander disease, and morphological and functional alteration of astrocyte induced by <i>GFAP</i> mutation.	Neuropathology		In press	2011
<u>Yoshida T, Sasayama H, Mizuta I, Okamoto Y, Yoshida M, Riku Y, Hayashi Y, Yonezu T, Takata Y, Ohnari K, Nakagawa M.</u>	Glial fibrillary acidic protein mutations in adult-onset Alexander disease: Clinical features observed in 12 Japanese patients.	Acta Neurol Scand	124	104-108	2011
<u>Shiihara T, Yoneda T, Mizuta I, Yoshida T, Nakagawa M, Shimizu N.</u>	Serial MRI changes in a patient with infantile Alexander disease and prolonged survival.	Brain & Development	33	604-607	2011
<u>Suzuki H, Yoshida T, Kitada M, Ichihashi J, Sasayama H, Nishikawa Y, Mitsui Y, Nakagawa M, Kusunoki S.</u>	Late-onset Alexander disease with a V87L mutation in glial fibrillary acidic protein (GFAP) and calcifying lesions in the sub-cortex and cortex.	J Neurol		In press	2011
<u>Saito H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi J, Hamada K, Yamashita A, Shibayama H, Shiina M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Doi H, Ogata K, Inoue K, Matsumoto N.</u>	Mutations in <i>POLR3A</i> and <i>POLR3B</i> encoding RNA polymerase III subunits cause an autosomal-recessive hypomyelinating leukoencephalopathy.	Am J Hum Genet	89	644-651	2011
<u>Namekawa M, Takiyama Y, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Shimazaki H, Yamagata T, Momoi M. Y., Nakano I.</u>	A novel adult case of juvenile-onset Alexander disease: Complete remission of neurological symptoms for over 12 years, despite insidiously progressive cervicomedullary atrophy.	Neurol. Sci.		In press	2012

VI. 研究成果の刊行物・別刷