

表 2

	type 1 (n=12)	type 2 (n=16)	type 3 (n=7)
Age at onset	3m~5y	26y~61y	9m~30y
muscle weakness	33.0% (1/3)	87.5% (14/16)	60.0% (3/5)
tendon reflex abnormality	77.8% (7/9)	93.8% (15/16)	83.3% (5/6)
hyperreflexia	77.8% (6/9)	93.8% (15/16)	83.3% (5/6)
hyporeflexia or areflexia		12.5% (2/16)	
Babinski sign	33.0% (1/3)	81.3% (13/16)	80.0% (4/5)
parkinsonism	0.0% (0/3)	25.0% (4/16)	20.0% (1/5)
sensory disturbance	0.0% (0/3)	18.8% (3/16)	0.0% (0/5)
dysarthria	100.0% (8/8)	87.5% (14/16)	100.0% (7/7)
dysphonia	63.8% (7/11)	68.8% (11/16)	42.9% (3/7)
dysphagea	54.5% (6/11)	87.5% (14/16)	57.1% (4/7)
nystagmus	0.0% (0/8)	68.8% (11/16)	0.0% (0/7)
limb ataxia	14.3% (1/7)	33.3% (4/12)	42.9% (3/7)
truncal ataxia	0.0% (0/7)	50.0% (6/12)	83.3% (5/6)
palatal myoclonus	0.0% (0/8)	40.0% (6/15)	0.0% (0/6)
orthostatic hypotension	0.0% (0/3)	7.7% (1/13)	50.0% (1/2)
sphincter abnormalities	27.3% (3/11)	53.8% (7/13)	28.6% (2/7)
sleep disorder	0.0% (0/2)	30.8% (4/13)	50.0% (1/2)
convulsions	90.9% (10/11)	0.0% (0/15)	100.0% (7/7)
mental retardation	90.0% (9/10)	0.0% (0/15)	100.0% (7/7)
/psychomotor developmental delay			
dementia		26.7% (4/15)	0.0% (0/1)
macrocephaly	80.0% (8/10)		50.0% (3/6)
scoliosis	45.5% (5/11)	13.3% (2/15)	50.0% (3/6)

### Ⅲ. 分担研究報告書 (平成 22 年～23 年)

## 小児型 Alexander 病の多様性

佐々木征行<sup>1)</sup>、小牧宏文<sup>1)</sup>、丸山慎介<sup>1)</sup>、榊原崇文<sup>1)</sup>、渡辺美緒<sup>2)</sup>、沢石由記夫<sup>3)</sup>、又吉 慶<sup>4)</sup>

1) 国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科

2) 群馬県立小児医療センター

3) 秋田県立医療療育センター

4) 沖縄県立中部病院小児科

### 研究要旨

小児期発症 Alexander 病の 5 例について検討した。2 例は新生児期発症で、3 例は小児期発症である。いずれも頭部 MRI が診断に有用であった。臨床経過は新生児型で急速に進行した。小児期発症例は 5 例共に大脳型で、1 例 1 例臨床像が異なっていた。小児期発症の 3 例は、ともに大脳から橋・延髄に病変部の進行が下方へ広がっていくことが共通点であった。

### A.研究目的

(1) Alexander 病新生児期発症例については、まだ詳しくは知られていない。新生児期発症例について臨床的特徴を明らかにする。

(2) Alexander 小児期発症大脳型の 3 例について臨床経過と頭部 MRI 画像所見の変化について比較・検討する。

### B.研究方法

(1) 新生児期発症した 2 例について、臨床症状や神経画像学的特徴について検討した。

(2) 3 例の臨床経過と頭部 MRI 画像変化を比較した。

(倫理面への配慮) 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て研究を行った。

### C.研究結果

(1) 新生児期発症例

症例 1. 男児。満期出生で仮死なし。大頭 (35.2 cm; +2.0SD) を指摘された。この時点で脳室拡大を指摘され、先天性水頭症として日齢 15 で VP シャント手術が施行された。生後 3 か月にな

って、チアノーゼを伴うけいれん発作を発症した。以後けいれん発作のコントロールが困難となり、経管栄養を要した。生後 8 か月には中枢性呼吸不全となり人工呼吸管理を必要とし、生後 9 か月でけいれん重積のため死亡した。

頭部 MRI は、日齢 10、3 か月、7 か月で施行した。日齢 10 より、脳室周囲の T1 高信号・T2 低信号があり、periventricular rim と考えられた。7 か月の画像で明らかな髄鞘化の遅れと小脳および脳幹の髄鞘化異常を認めた。

遺伝子診断が施行され、GFAP 遺伝子の 716G → A 変異がヘテロで確認された (R239H)。

症例 2. 女児。在胎 36 週、双胎第 1 子として帝王切開で出生。体重 2,220 g、頭囲 30cm。出生後 1 週間くらいから哺乳力低下。生後 2 週間で近医受診。哺乳障害が続くため生後 3 週間で入院した。嚥下障害を認めたため経管栄養となった。発達は全く認めず、生後 45 日で呼吸停止をきたした。人工呼吸管理されたが、生後 6 か月で敗血症のため死亡した。

頭部 MRI は、日齢 23 と 54 に施行された。日齢 23 の T1 強調画像で脳室周囲の高信号が強いこと (periventricular rim) と T2 強調画像で尾状

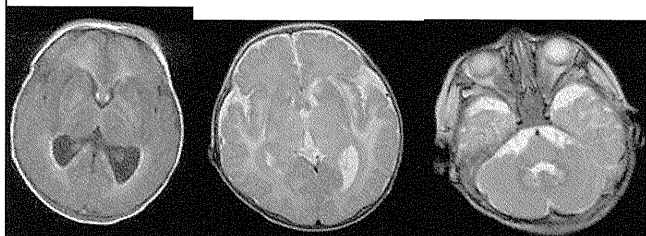
核高信号を認め、Alexander病が疑われた。

GFAP遺伝子の1055T→G変異をヘテロで認め確定診断された(L352R)。

2例の頭部MRI画像所見をまとめると、以下の5点が共通点であった。

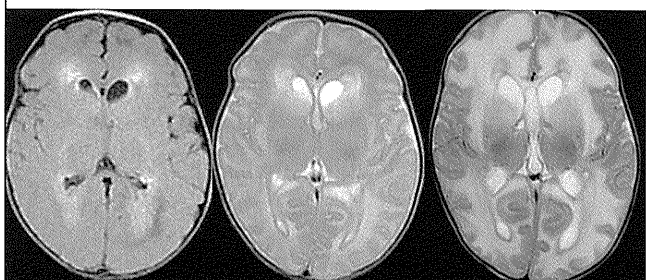
1. periventricular rim
2. 小脳(白質・歯状核)、脳幹のT2高信号
3. 尾状核・被殻のT2高信号
4. 側脳室拡大
5. 大脳白質の容積増加とT1低信号・T2高信号

図1 症例1. 左より、2生日、3か月、3か月



T1強調画像 T2 T2

図2. 症例2. 左より、26生日、同、54生日



T1強調画像 T2 T2

## (2) 小児期発症例

症例3. 初診時1歳4か月女児。

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された。

・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。

図3. 症例3の頭部MRI画像変化(1)

初期は前頭葉優位の大脳白質異常信号と基底核の異常信号。経過と共に大脳白質の容積は増大し，脳脊髄液に近い信号強度の嚢胞に変化する。基底核は萎縮し，シルビウス裂が開大した。

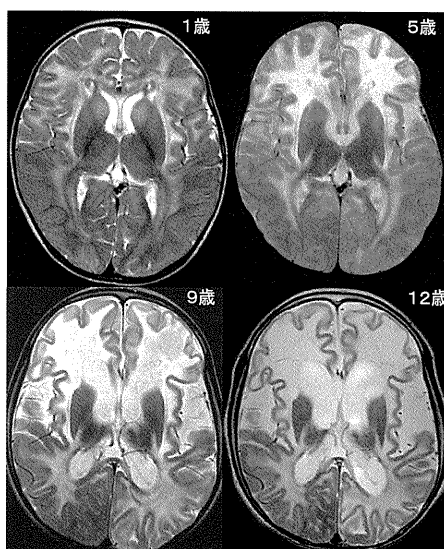
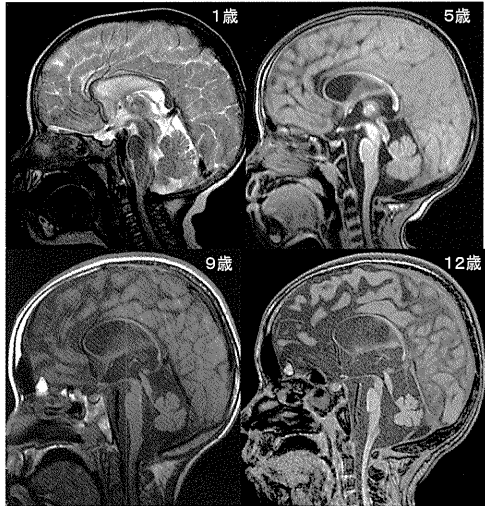


図4. 症例3の頭部MR I画像変化(2)  
 脳幹(中脳・橋・延髄)および小脳の進行性萎縮。



症例4. 初診時1歳8か月女児。

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.

図5. 症例4の頭部MR I画像変化(1)  
 軽度脳室開大と小脳・橋萎縮を認める。

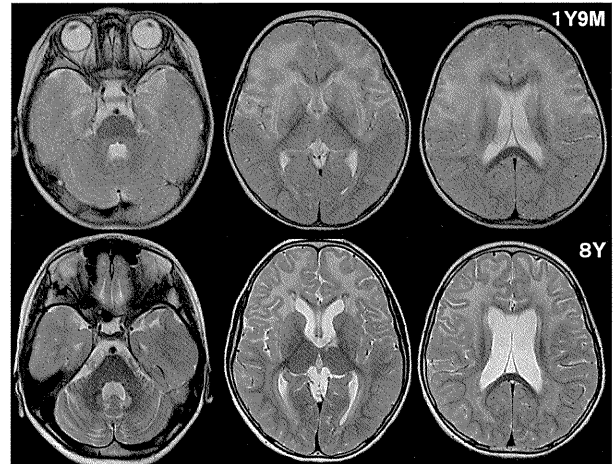


図6. 症例4の頭部MR I画像変化(2)  
 矢状断で延髄の萎縮を認める。



症例5. 初診時3歳8か月女児。

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.

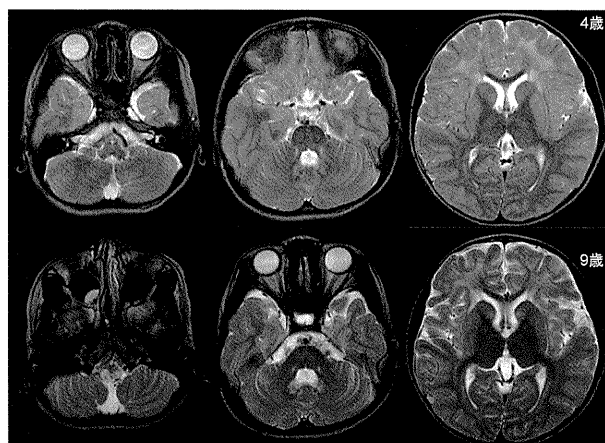
・3歳5か月で熱性けいれんがあった. 頭囲 48cm (-0.6SD). 発達指数 (DQ): 110. 深部腱反射ごく軽度亢進. 頭部MRIでAlexander病が疑われ, 遺伝子検査で *GFAP* 遺伝子変異: heterozygous R88C (262C>T) を認め確定.

- ・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, 口蓋ミオクローヌスは認めない.

図 7. 症例 5 の頭部 MR I 画像 (延髄での高信号)



症例 3 から 5 のまとめを表にした. 1 例 1 例臨床経過も画像変化も異なっていた.

### 小児期発症例のまとめ

	発症年齢	初発症状	精神運動遅滞	精神運動退行	嚥下障害	頭部 MRI	
						大脳	脳幹
症例 3 12 歳	1 歳 0 か月	熱性けいれん	あり	あり 1 歳 3 か月より	あり	前頭部優位の広範な白質変性(進行性)	延髄・橋とも高信号
症例 4 8 歳	1 歳 5 か月	無熱性けいれん	あり	なし	なし	前頭部優位の広範な白質変性(緩徐進行性)	延髄萎縮
症例 5 10 歳	3 歳 5 か月	熱性けいれん	なし	なし	あり	前頭部優位の広範な白質変性(非進行性)	延髄信号異常

#### D. 考察

(1) 今回報告した新生児期発症の 2 例は, いずれも哺乳力障害と呼吸障害を呈し, 乳児期に死亡した. 新生児期発症例は, 非常に予後が悪いと考えられる. 大頭は 1 例で認めたが, 他例では認めず診断的価値は高くない.

いずれも早期診断には頭部 MRI が有用であった. とくに periventricular rim が, 初期より 2 例

で共通して認められた異常所見であった. この他に小脳歯状核と尾状核の T2 強調画像による高信号, 大脳白質容積の増大などの異常所見も共通して認められた. これらの異常所見は, Alexander 病の診断的価値が高いと考える.

一方で乳児期前半においては, 大脳白質の髓鞘化の異常を MRI で的確に捕らえることは困難であり, 「大脳白質異常症」としての診断は早期には難しいと言える.

これまでのところ, 新生児期発症例に特有の遺伝子変異は知られていない.

(2) 小児期発症 Alexander 病大脳型の 3 症例について, 臨床経過と頭部 MR I 画像変化を比較したところ, それぞれ異なる臨床経過および頭部 MR I 画像変化を示した.

発症時期や発症時の頭部 MR I 画像では酷似していた症例 3 と 4 は, 遺伝子変異も全く同じであるにもかかわらず, その後の臨床的進行程度や脳画像の進行程度も大きく異なっていた. このことは, Alexander 病の臨床症状を規定する因子は単に GFAP 遺伝子変異だけでなく, 他の要因もあることを示唆している.

#### E. 結論

(1) Alexander 病は新生児期からでも発症する. 新生児期発症例は, 哺乳障害・呼吸障害を早期から呈し, 予後も不良である可能性が高い. 診断には頭部 MRI 所見が有用である.

(2) 小児期発症 Alexander 病大脳型 3 例の臨床経過と頭部 MR I 画像変化を検討した. それぞれ異なる臨床経過を示しており, 臨床症状も画像変化も多様であることがわかった. これらの変化を規定する因子が遺伝子変異以外にも存在することを示唆していた.

#### F. 健康危険情報

なし.

## G.研究発表

### 1. 論文発表

1) Yoshida T, Sasaki M, Yoshida M, Namekawa M, Okamoto Y, Tsujino S, Sasayama H, Mizuta I, Nakagawa M.: The Alexander disease study group in Japan. Nationwide survey of Alexander disease in Japan and proposed new guidelines for diagnosis. J Neurol 2011;258:1998-2008.

2) 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. Mutations in *POLR3A* and *POLR3B* encoding RNA polymerase III subunits cause an autosomal-recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. Am J Hum Genet 2011;89:644-651.

3) Shimojima K, Inoue T, Hoshino A, Kakiuchi S, Watanabe Y, Sasaki M, Nishimura A, Takeshita-Yanagisawa A, Tajima G, Ozawa H, Kubota M, Tohyama J, Sasaki M, Oka A, Saito K, Osawa M, Yamamoto T. Comprehensive genetic analysis of PLP1 in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease applied by array-CGH and fiber-FISH analyses identified new mutations and variable sizes of duplications. Brain Dev 2010;32:171-179..

4) Sasaki M, Takanashi J, Tada H, Sakuma H, Furushima W, Sato N. Diffuse cerebral hypomyelination with cerebellar atrophy and hypoplasia of the corpus callosum. Brain Dev 2009;31:582-587.

## 2.学会発表

佐々木征行、野々田豊、榊原崇文、佐久間啓、須貝研司：口蓋ミオクローヌスを呈した乳児型 Alexander 病の1例。第52回日本小児神経学会総会。福岡国際会議場。2010年5月22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

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（総合）研究報告書

## 成人発症アレキサンダー病の臨床病理学的研究

吉田眞理<sup>1)</sup> 三室マヤ<sup>1)</sup>、辰己新水<sup>1)</sup>、岩崎靖<sup>1)</sup>、饗場郁子<sup>2)</sup>、奥田聡<sup>3)</sup>、橋詰良夫<sup>4)</sup>、中川正法<sup>5)</sup>

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

### 研究要旨

Alexander 病(A病)は小児期に発症し、Rosenthal fiber (RF)が出現し leukodystrophy をきたす疾患として知られているが、近年 GFAP 遺伝子異常が明らかになり、成人発症例も少数報告されている。成人発症のA病は RF の形成は小児例に比して少なく、大脳白質のアストロサイトの密度の減少、突起消失、血管周囲の終足の減少が顕著で、小児期発症例に比して臨床病理像、白質病変の進展に差があり、アストロサイトの機能障害と細胞死が長い時間をかけておこっている可能性が示唆された。

### A.研究目的

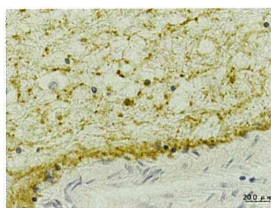
Alexander 病(A病)は小児期に発症し、Rosenthal fiber (RF)が出現し leukodystrophy をきたす疾患として知られているが、近年 GFAP 遺伝子異常が明らかになり、成人発症例も少数報告されている。成人発症A病の病理像を小児期発症例と対比した。

### B.研究方法

成人発症のA病（死亡時73歳女性例）と乳児期発症A病の病理像を対比した。

（倫理面への配慮）剖検時に家族より遺伝子検索、病理学的検索の同意を得ている。

### C.研究結果



成人発症例の大脳白質のアストロサイトと血管周囲の終足の減少 GFAP 免疫染色

大脳白質の髄鞘淡明化は小児例では広範で高度であったが、成人例はより軽度で、RFは成人例では大脳皮質・白質には乏しく、脳室上衣下、脳幹部に認められた。成人例ではアストロサイトにタウの発現を認めた。

### D.考察

成人例の大脳白質変性は出現時期が遅く程度も軽く、RFの形成は小児例に顕著で、成人例ではより軽度であった。成人例は白質のアストロサイトの密度自体の減少、突起の減少、タウの発現を認めた。

### E.結論

成人発症A病は小児期発症例に比してアストロサイトの機能障害が緩徐に進行する可能性が示唆された。

### F.健康危険情報 特記事項なし

### G.研究発表

#### 1. 論文発表

1) Yoshida T, et al. Glial fibrillary acidic protein mutations in adult-onset Alexander disease: clinical features observed in 12 Japanese patients. Acta Neurol Scand. 2011; 124: 104–108

2) Yoshida T, et al. Nationwide survey of Alexander disease in Japan and proposed new guidelines for diagnosis. The Alexander Disease Study Group in Japan J Neurol 2011 [Epub ahead of print]

#### 2. 学会発表

Neuropathology of glia in neurodegenerative diseases. Yoshida M. Neuro2010 2010年9月神戸

### 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



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（総合）研究報告書

## GFAP 遺伝子の p.R276L 変異を有する Alexander 病：

### 臨床像，創始者効果および細胞生物学的検討

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<sup>1)</sup>，迫江 公己<sup>1)</sup>，本多 純子<sup>1)</sup>，嶋崎 晴雄<sup>1)</sup>，中野 今治<sup>1)</sup>，  
瀧山 嘉久<sup>2)</sup>

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 遺伝子変異 (p.R276L) を有するアレキサンダー病 (AxD) の臨床像および細胞生物学的検討について報告した。同変異を有する AxD は、3 家系 6 名。すべて栃木県東部の出身で、創始者効果が確認された。症候性 3 例 (全て男性)，無症候性 3 例 (全て女性) であった。無症候性の 2 例は 60 歳以上であり、浸透率は高くない。性差が関与している可能性も考えられた。MRI 画像では、萎縮は延髄～頸髄からはじまり、無症候性でもすでに萎縮がみられる。信号変化を伴わないこともある。経過とともに萎縮は橋～中脳被蓋へと進行し、橋底部は保たれる”tadpole” brainstem atrophy を呈する。細胞生物学的手法を用いて、野生型および変異型 GFAP を過剰発現させると、本変異での異常は乳児型 (p.R239C) 変異でみられる異常より軽症であった。

#### A.研究目的

自治医大で診断されたアレキサンダー病 (AxD) について、臨床像、画像所見といった臨床像、その遺伝子変異、創始者効果の有無といった分子遺伝を検討した。さらにこの変異が GFAP 機能の及ぼす影響を細胞生物学的に検討する。

#### B.研究方法

対象は GFAP 遺伝子の p.R276L 変異を有する 3 家系 6 例。3 家系とも T 県東部半径 20km 以内の出身。GFAP 遺伝子を中心に、5.7cM に広がる 9 個の遺伝子多型マーカーを用いて haplotype 解析をした。また V5-tag ベクターに組み込んだ野生型、p.R239C、p.R416W、p.R276L 変異型 GFAP 遺伝子を培養細胞 (HEK293, U251MG, Becker,

B2-17, SW13) に導入し、48 時間後に Western Blot による解析、および細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### C.研究結果

##### 1) 臨床学的検討：

症候性は 3 例とも男性。発症年齢は 30～40 歳台。痙性麻痺、球症状および眼振がみられた。痙性麻痺は対麻痺ではなく、片麻痺で発症し、四肢麻痺へと拡大した。失調は痙縮のため評価困難であった。また乳児型/若年型でみられるけいれん、認知機能障害はみられなかった。なお 2 例は発症前に頭部外傷歴が確認された。

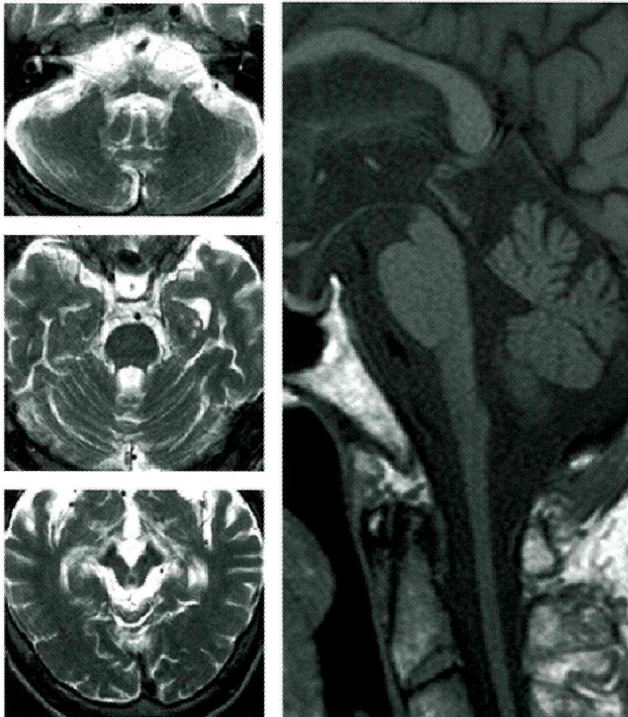
無症候性は 3 例とも女性。うち 2 例は 64 歳および 61 歳の女性。無症状だが、四肢腱反射亢進

を認めた。

## 2) 頭部 MRI 画像検討：

頭部 MRI では、信号変化を伴わない延髄～頸髄の著明萎縮と、小脳歯状核の信号変化 (T2 および FLAIR 画像で高信号) がみられた。これは無症候性例でもすでに確認された。

経時的变化を追跡できた症例の検討によって、萎縮は延髄から始まり、橋底部のふくらみは保たれたままで信号変化を伴わずに橋から中脳被蓋部へと萎縮が拡がり、最終的には「おたまじゃくし」様の奇妙な萎縮像 ("tadpole" brainstem atrophy) が完成することが判明した (図)。



図：典型的な "tadpole" appearance

著明な延髄～頸髄の萎縮がみられ、矢状断像であたかも「おたまじゃくし」のような脳幹像を呈するのが特徴である。

## 3) ハプロタイプ解析：

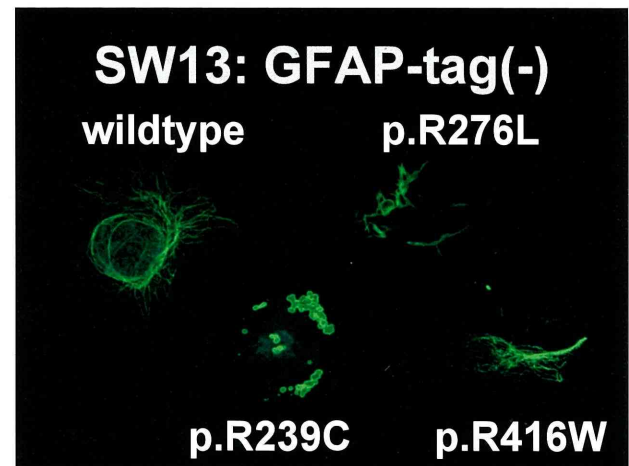
*GFAP* 遺伝子を挟む形での 5.8cM にわたる領域において、3 家系とも同一アレルを有していた。

## 4) 細胞生物学的検討：

Western Blot 解析では、p.R416W は NP-40 可

溶性分画が際立って少なかったが、野生型と p.R239C, p.R276L は同傾向だった。

細胞内局在の検討では、野生型は filamentous 構造を呈した。一方成人型まで幅広い表現型を呈する p.R416W は比較的 filamentous 構造を呈したが、乳児型の p.R239C 変異では核周囲への蓄積がみられ、凝集体形成像もみられた。本研究の p.R276L 変異では、線維が針状 (needle-like) の filament が観察された。



## D. 考察

p.R276L 変異は、女性の方が軽症の可能性がある。また 3 家系には創始者効果が確認された。細胞生物学的検討では、内在性 *GFAP* が存在しなくとも、強制発現させた *GFAP* のみで filamentous 構造をとりうることから、*vimentin* をはじめとした *GFAP* 以外の中間径フィラメントの関与が考えられた。病因となる変異を明らかにするモデルとして、今後は内在性 *vimentin* などの中間径フィラメントを欠いた細胞における発現実験が必要である。

## E. 結論

1) *GFAP* 遺伝子の p.R276L 変異を有する AxD は現在のところ 3 家系 6 例が確認され、創始者効果があることが確認された。

2) 症状の修飾因子として、頭部外傷の既往および性差が考えられた。

3) 発症前からすでに延髄～頸髄の萎縮が先行し、発症後は経時的に脳幹背側を萎縮が信号変化を伴わずに進行, "tadpole" brainstem atrophy を呈するようになる。

4) p.R276L 変異は細胞生物学的にも, すでに確定している病因変異と矛盾しない結果を得た。

## 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

1. **Namekawa M**, Takiyama Y, Honda J, Shimazaki H, Sakoe K, Nakano I. Adult-onset Alexander disease with typical "tadpole" brainstem atrophy and unusual bilateral basal ganglia involvement: a case report and review of the literature. BMC Neurol. 10: 21, 2010.
2. Ayaki T, Shinohara M, Tatsumi S, **Namekawa M**, Yamamoto T. A case of sporadic adult Alexander disease presenting with acute onset, remission and relapse. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 81: 1292-1293, 2010.
3. **Namekawa, M.**, Takiyama, Y., Honda, J., Sakoe, K., Naoi, T., Shimazaki, H., Yamagata, T., Momoi, M. Y., Nakano, I.: 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).

### 2.学会発表

1. 滑川道人, 嶋崎晴雄, 本多純子ら. GFAP 遺

伝子の missense 変異(R276L)を有する成人型 ALX の新たな 2 症例: 当変異が疾患責任変異である更なる臨床的証拠. 第 54 回日本人類遺伝学会総会. 2009年9月23日,東京. (抄録集 p.200)

2. 滑川道人, 嶋崎 晴雄, 本多 純子, 中野 今治, 迫江 公己, 瀧山 嘉久: 成人型 Alexander 病の特徴的画像所見: Tadpole appearance. (第 51 回日本神経学会総会, 2010 年 5 月 20-22 日, 東京)
3. 吉田誠克, 笹山博司, 佐々木征行, 吉田眞理, 滑川道人, 岡本裕嗣, 辻野精一, 中川正法: アレキサンダー病の全国有病者数調査および臨床的特徴に関する二次調査結果の報告. 第 51 回日本神経学会総会, 2010 年 5 月 20-22 日, 東京. (臨床神経, 50: 1145, 2010)
4. 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)
5. 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

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

(総合)研究報告書

## 変異 *GFAP* 導入による Alexander 病ショウジョウバエモデル

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<sup>1)</sup>、山口政光<sup>2)</sup>、島村真依<sup>2)</sup>

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

Alexander 病の病態モデルとして変異 *GFAP* を導入したショウジョウバエモデルを作成、野生型 3 系統、R239C 変異 *GFAP5* 系統、R416W 変異 *GFAP6* 系統を樹立した。複眼原基特異的な GAL4 driver 系統 (GMR-GAL4) と野生型および変異 *GFAP* 導入ショウジョウバエ系統をそれぞれ交配し、次世代について電子顕微鏡ならびに蛍光染色にて観察した。免疫染色では各ショウジョウバエ系統において幼虫の複眼原基での *GFAP* の発現を確認した。複眼構造においては野生型では明らかな複眼構造の変化は見られなかったものの、各単眼における剛毛の発現がみられなかった。一方、変異 *GFAP* 導入ショウジョウバエでは明らかな複眼構造の破壊がみられた。これらのショウジョウバエモデルに対してバルプロ酸 Na、ゾニサミド、セフトリアキソン、抑肝散を用いて薬物スクリーニングを行った。

### A. 研究目的

これまで Alexander 病の動物モデルとしてマウスモデルの作成が試みられてきた。1998 年に Messing らは *GFAP* を over-expression させたトランスジェニックマウスを作成、*GFAP* の発現量に応じて寿命が短縮することを明らかにし、Alexander 病の病態に *GFAP* が主要な役割を担うことが示された。このことはのちに原因遺伝子として *GFAP* が同定されるきっかけとなった。その後より変異 *GFAP* を導入したトランスジェニックマウスの作成が

試みられ、アストロサイト内に Alexander 病の hallmark でもある Rosenthal fibers の形成がみられたり、カイニン酸投与により致死性けいれんが誘発されやすい、変異 *GFAP* に加えて  $\alpha$ B-クリスタリンの発現量が寿命に大きな役割を果たすなどの成果は得られたものの、臨床表現型の再現としては不十分であることは否めない。そこでわれわれは新たな Alexander 病の動物モデルとしてショウジョウバエに注目した。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。今回われわれは変異 *GFAP* を導入したショウジョウバエモデルを作成し、Alexander 病の原因究明、治療法開発の可能性を示す。

## B. 研究方法

最初に遺伝子導入をさせるための *GFAP* 発現ベクター(wild-type、R239C、R416W)を作成した。この発現ベクターはW 遺伝子をマーカーとしてもつがヒト *GFP* 遺伝子も同時に導入した。作成したベクターをショウジョウバエの受精卵にマイクロインジェクションを行い遺伝子導入させた。*GFAP* が導入された赤眼のショウジョウバエとバランス染色体を持つショウジョウバエを交配させて、*GFAP* が導入されている染色体を決定した。様々な *GAL4 driver* 系統と野生型および変異 *GFAP* 導入ショウジョウバエ系統を交配させて、次世代のショウジョウバエの表現型を観察した(図1)。

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、成虫の複眼の異常を観察した。

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ターの発現を増加させ、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ターの活性化作用が示されている。

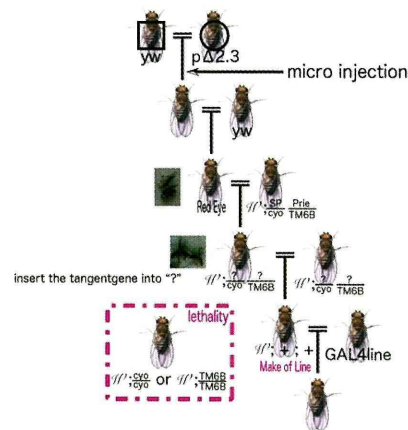


図1 ショウジョウバエの交配図

## C. 研究結果

スクリーニングにて変異 *GFAP* を導入したショウジョウバエに赤眼がみられた(wild-type、R239C、R416W)。赤眼を呈するショウジョウバエを1匹ずつ回収し、バランス染色体をもつショウジョウバエ系統と交配し、次世代で生まれてくるショウジョウバエでline化を行い、野生型 *GFAP* 導入ショウジョウバエを3系統、R239C *GFAP* 導入ショウジョウバエを5系統、R416W *GFAP* 導入ショウジョウバエを6系統樹立した。複眼原基特異的な *GAL4 driver* 系統(*GMR-GAL4*)と野生型 *GFAP* 導入ショウジョウバエ系統および変異 *GFAP* 導入ショウジョウバエをそれぞれ交配し、次世代について電子顕微鏡ならびに蛍光染色にて観察した。免疫染色では各シ

ヨウジヨウバエ系統において幼虫の複眼原基での GFAP の発現を確認した(図 2)。複眼構造においては野生型では明らかな複眼構造の変化は見られなかったものの、各単眼における剛毛の発現がみられなかった(図 3)。一方、変異 GFAP 導入シヨウジヨウバエでは明らかな複眼構造の破壊がみられた。

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。

#### D. 考察

GFAP 導入シヨウジヨウバエ系統を樹立した。変異 GFAP 導入シヨウジヨウバエにおいては明らかな複眼構造の破壊が認められた。

本モデルを用いて、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。さらに薬剤濃度の調整および組織切片での検討が必要である。

また、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

GFAP 導入シヨウジヨウバエ系統を樹立した。今後、遺伝学的スクリーニングおよび薬物スクリーニングなどを行うことにより、病態解明および治療法の開発が期待さ

れる。

#### 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.

6. Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, Varghese S, Shehab SA, Kasai T, Ishigami N, Tamaoka A, Nakagawa M, El-Agnaf OM. Detection of Elevated levels of alpha-Synuclein Oligomers in CSF from Parkinson's Disease Patients. *Neurology*. 75(20):1766-1770, 2010

7. Tatebe H, Watanabe Y, Kasai T, Mizuno T, Nakagawa M, Tanaka M, Tokuda T. Extracellular neurosin degrades alpha-synuclein in cultured cells. *Neurosci Res*. 67:341-346, 2010

8. Yamada K, Akazawa K, Yuen S, Goto M, Matsushima S, Takahata A, Nakagawa M, Mineura K, Nishimura T. MR imaging of ventral thalamic nuclei. *AJNR Am J Neuroradiol*. 31(4):732-735, 2010

9. Fukumoto H, Tokuda T, Kasai T, Ishigami N,

Hidaka H, Kondo M, Allsop D, Nakagawa M. High-molecular-weight  $\beta$ -amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *FASEB J*. 24(8):2716-2726, 2010

H. 知的所有権の取得状況

なし

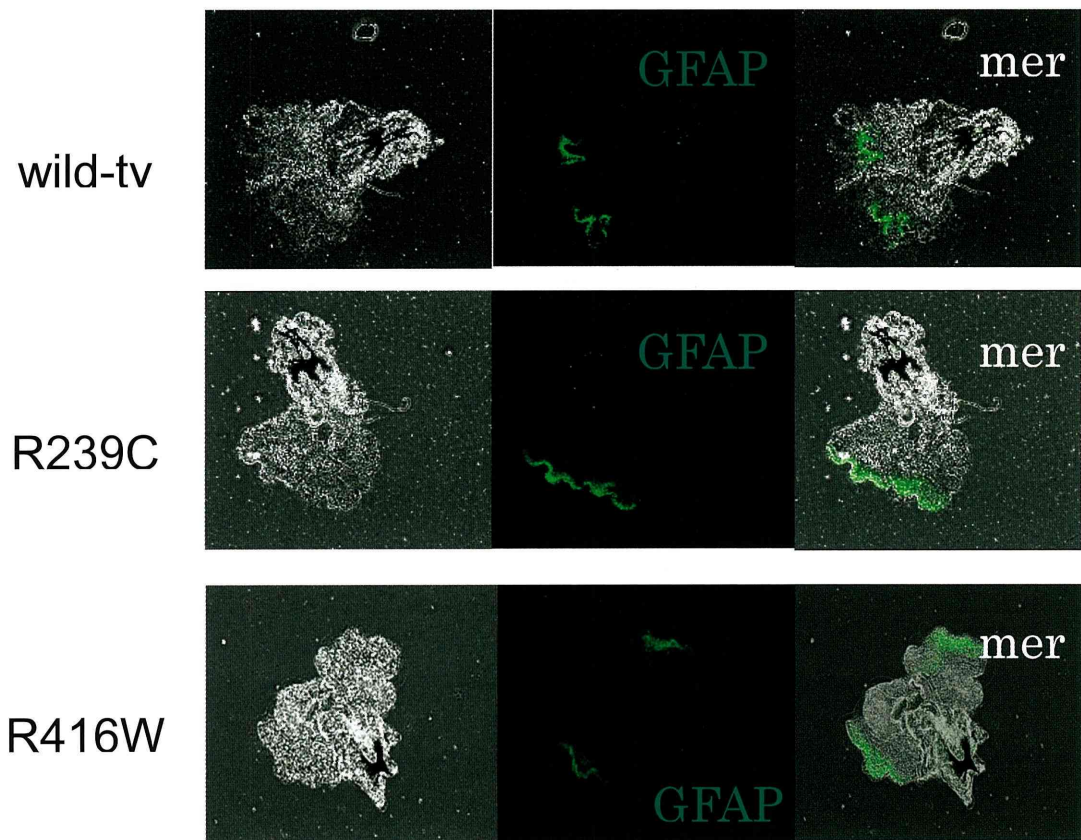
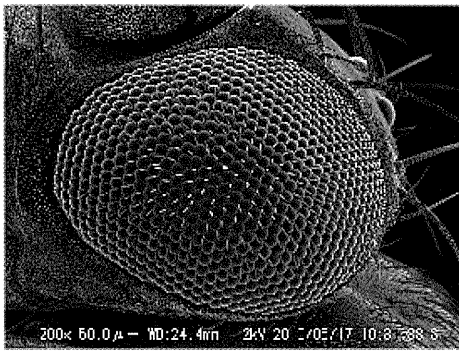
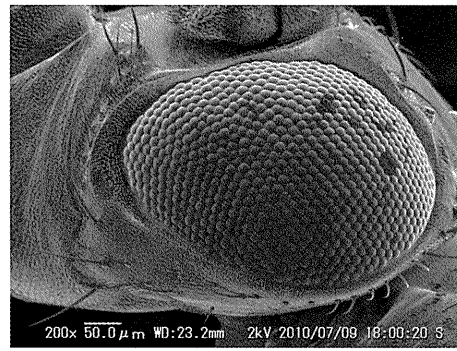


図2 *GFAP*導入ショウジョウバエの複眼原基(免疫染色)

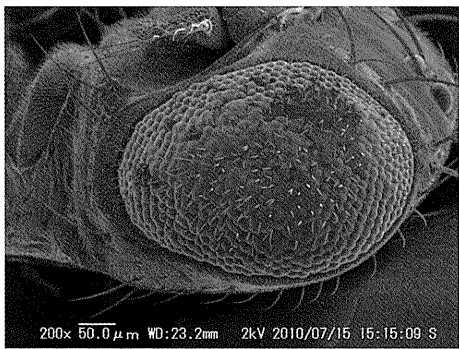




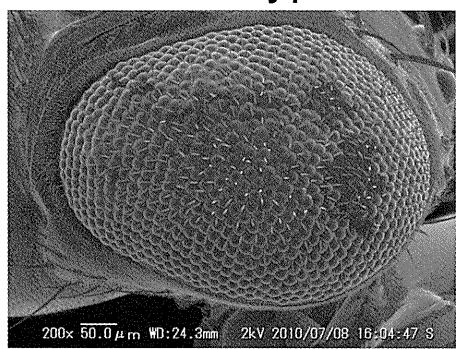
control



wild-type



R239C

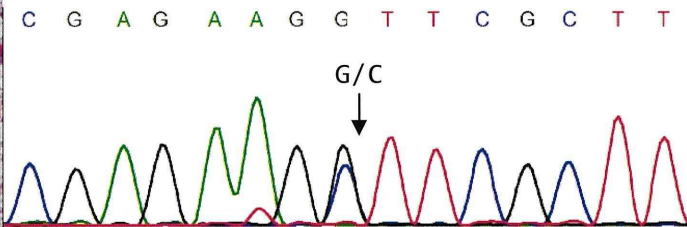
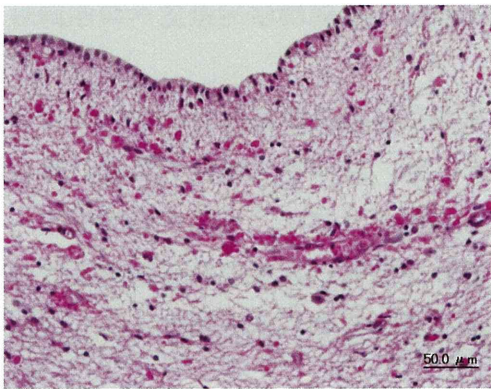
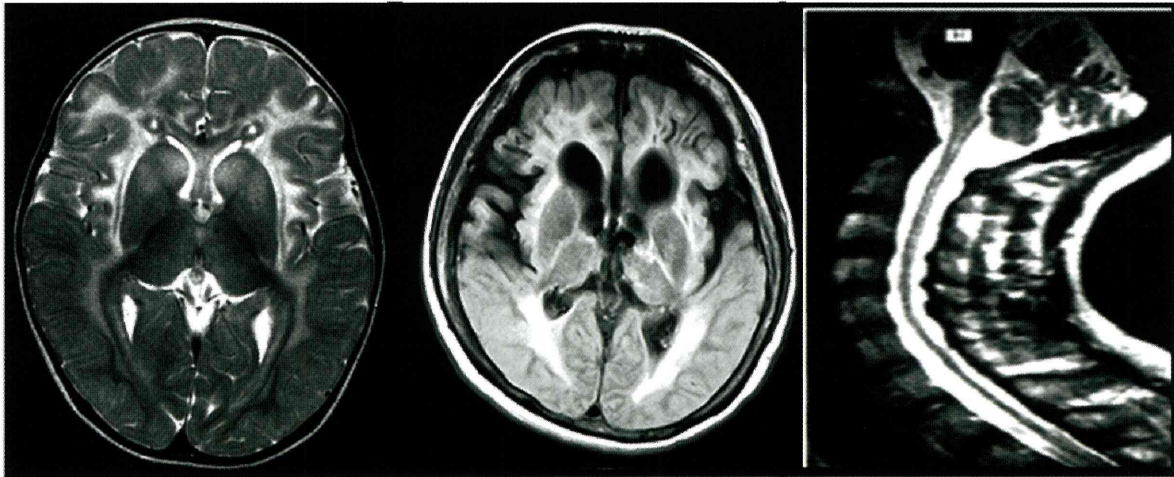


R416W

図3 *GFAP*導入ショウジョウバエ(成虫)の複眼構造(電子顕微鏡)

## IV. アレキサンダー病の臨床 診断指針（パンフレット）

# アレキサンダー病の臨床診断指針



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

ホームページ：<http://www.alexanderdisease-japan.com/>

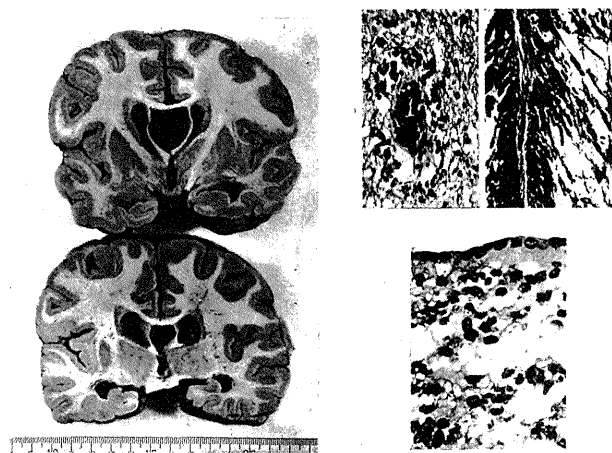
アレキサンダー病は、1949年にW.S.Alexanderが難治性けいれん、水頭症、精神発達遅滞を呈した15カ月男児の病理報告(下図)にはじまり、病理学的にグリア線維酸性蛋白 glial fibrillary acidic protein (GFAP)等から構成されるローゼンタル線維を星状膠細胞に認める難治性の神経変性疾患です。Alexanderの報告から約50年間は病理学的にしか確定診断ができず、臨床的には主に乳児期発症で前頭部優位の大脳白質病変を特徴とする予後不良の疾患と認識されていました。しかし、2001年に原因遺伝子としてGFAP遺伝子が報告されて以降、本病は乳児から成人まで広い年齢層で見られる遺伝性疾患であることが判明しました。

ただ、稀少疾患であることに加えて、成人期発症例では乳児期発症例とまったく異なる臨床症状、神経放射線学的所見を呈すること、さらには多様な臨床所見を呈する症例が存在することなどから臨床の現場では本病を念頭に置くことさえ困難な状況にあるものと推測します。

われわれは2009年度に厚生労働科学研究費の補助を受けて、全国実態調査を行い、その調査をもとに2010年度に臨床診断指針を作成しました。この指針は従来の乳児型、若年型、成人型という年齢別の分類にとらわれず、神経学的所見と神経放射線学的所見からアレキサンダー病を分類し、確定診断であるGFAP遺伝子検査や病理学的検査への手掛りにできることを重視いたしました。

今回、広く臨床の現場で診断の参考にしていただくために医療従事者向けに本パンフレットを作成させていただきました。アレキサンダー病は“超”稀少難病疾患の部類に属すると思われませんが、未診断の例も少なからず存在すると推測されます。今後の病態解明・治療法開発の発展のためにはより多くの医療施設、患者様の協力による臨床情報の蓄積が必要となります。今後とも変わらぬご支援を賜りますようお願い申し上げます。

研究代表者 吉田誠克



W.Stewart Alexander. Brain 1949: 72:  
373-381