

6. Kato K, Kojima Y, Kobayashi C, Mitsui K, Nakajima-Yamaguchi R, Kudo K, Yanai T, Yoshimi A, Nakao T, Morio T, Kasahara M, Koike K, Tsuchida M. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic granulomatous disease with inflammatory complications and severe infection. *Int J Hematol*. 2011 Nov. 94(5): 479-82.
 7. Ishimura M, Takada H, Doi T, Imai K, Sasahara Y, Kanegane H, Nishikomori R, Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga T, Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T. Nationwide survey of patients with primary immunodeficiency diseases in Japan. *J Clin Immunol*. 2011 Dec. 31(6): 968-76.
 8. Nakajima K, Hayashi M, Tanuma N, Morio T. An autopsy case of polymicrogyria and intracerebral calcification with death by intracerebral hemorrhage. *Neuropathology*. 2012 Apr; 32(2): 207-10.
 9. Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D, Nagamura-Inoue T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara T, Kato S. Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. Japanese Cord Blood Bank Network. *Br J Haematol*. 2011 154(3): 363-72.
 10. Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients. *Clin Immunol*. 2011 138(2): 172-7.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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. T-Cell Development Failure At beta-Selection Checkpoint and TCR alpha/delta Locus Break Formation Associated with Chromosome 14 Translocation in Ataxia-Telangiectasia Mutated Deficient Mice. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. the 53rd ASH(The American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition (Oral). San Diego. CA. Dec. 12, 2011
 2. 遺伝性毛細血管拡張性小脳失調症の Double Negative 期における T リンパ球分化異常と発がんメカニズムの関係. 磯田健志, 高木正稔, 朴今花, 増田喬子, 伊川友活, 東みゆき, 森尾友宏, 河本宏, 水谷修紀. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 口演. 2011 年 11 月 25 日 群馬
 3. T-cell development failure in Ataxia Telangiectasia (AT). Isoda T, Takagi T, Piao J, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. 第 73 回日本血液学会学術集会 口演. 2011 年 10 月 16 日 名古屋
 4. 毛細血管拡張性小脳失調症 (Ataxia Telangiectasia) における T 細胞分化異常の解析. 磯田健志, 高木正稔, 森尾友宏, 水谷修紀. 第 39 回日本臨床免疫学会総会 MWS ワークショップ 口演. 2011 年 9 月 15 日 新宿

5. Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. The 52nd ASH Annual Meeting. Orlando, Florida, USA. Dec. 2010.
6. Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, 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.
7. 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.
8. Morio T. Immunomonitoring and T-cell immunotherapy in CBT. The Second Korea-Japan Cord Blood Transplantation Symposium. Yokohama in Japan. Sep. 2010.
9. Okamoto K, Iwai Y, Oh-hora M, Yamamoto M, Morio T, Jetten A M, Akira S, Muta T, Takayanag H. WS/PP-014-02 - IκBζ is required for the transcriptional program in Th17 development. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. Aug. 2010.
10. 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.
11. Honda F, Ikeda Y, Takahashi1 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.
12. 大坪善教, 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
13. 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
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
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」

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・講師)

研究要旨：毛細血管拡張性運動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。

毛細血管拡張性小脳失調症(AT)の神経症状発症メカニズム解明、及び新規治療開発を目的に、AT 患者由来 iPS 細胞から神経幹細胞を分化誘導した。正常 iPS 細胞および、AT iPS 細胞の双方から誘導した細胞において、網羅的遺伝子発現解析で、未分化マーカーが発現低下し、神経系マーカーの発現上昇を認めた。また、神経幹細胞の各種マーカーが陽性となっていることを確認した。

A. 研究目的

毛細血管拡張性運動失調症は、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。

毛細血管拡張性運動失調症(AT)における、進行性運動失調、不随意運動、眼球運動障害などの神経症状の病態を解明するとともに、新規治療に結びつく新たな知見を得ることが目的である。AT の原因遺伝子 ATM をノックダウンした ATM 欠損マウスは疾患研究のモデル動物として、AT の免疫不全や高発がん性などの症状に焦

点を当てた研究に有用であるが、その神経症状はヒト患者と比較して軽症、もしくはほとんど認められず、研究モデルとしては不十分である。ヒトの神経細胞を研究で使用することは、技術的および倫理的な観点から課題が多い。

AT 患者の線維芽細胞から樹立した iPS 細胞を神経系細胞に分化誘導し、その分化過程や誘導した神経細胞の機能を解析することで、乳児期後半から発症する病態のメカニズムや有効な治療開発に大きく寄与することができると考えられる。

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。

正常線維芽細胞および AT 患者由来線維芽細胞を JCRB 細胞バンクより入手し、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-Myc の 4 因子をレトロウイルスにより導入し iPS 細胞を樹

立した。また国立成育医療研究センター生殖細胞治療研究部より健全な胎児肺線維芽細胞から樹立した MRC5 iPS 細胞および AT 患者由来 AT iPS 細胞の供与を受け、神経細胞分化の研究を行った。

iPS 細胞に、bone morphogenic protein (BMP) inhibitor である Noggin と、TGFβ/activin/nodal シグナル経路を阻害する低分子化合物である SB431542 を投与し、feeder 細胞なしで 6 日間培養し (Chambers et al. nature biotech 2009;vol27:275-80)、神経幹細胞のマーカーである SOX1、SOX2、Nestin、Pax6 に対する免疫染色と RT-PCR を行った。

AT iPS 細胞と MRC5 iPS 細胞、及び各々から誘導した神経幹細胞について、網羅的遺伝子発現解析を行った。

(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。

iPS 細胞の樹立はヒト iPS 細胞又はヒト組織幹細胞からの生殖細胞の作成を行う研究に関する指針に準拠し、東京医科歯科大学倫理委員会の承認を得て行われ、研究に用いた細胞は、公的細胞バンクから入手可能なものを使用した。

C. 研究結果

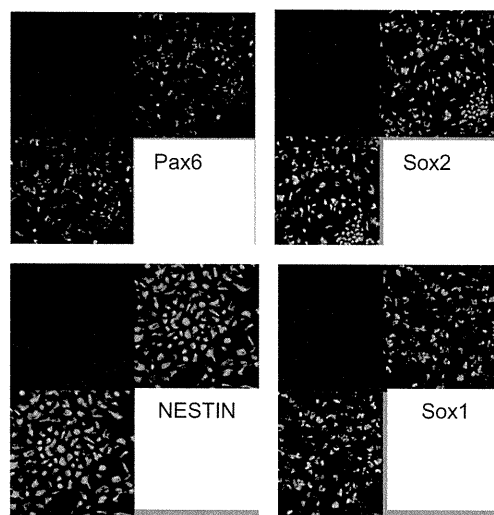
80 検体を解析しアミノ酸置換を伴う ATM の SNP を 7 例から 8 個検出し。うち一つは報告のある rare SNP で残りは報告のない新規のものだった。本方法を用いることにより ATM の SNPs を多数検体を一度にスクリーニングすることが可能であることが明らかとなった。

正常線維芽細胞および AT 患者由来線維芽細胞を JCRB 細胞バンクより入手し、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-Myc の 4 因子をレトロウイルスにより導入し iPS 細胞を樹立した。形態的には双方に差は見られず、また未分化マーカーである Alkary phosphatase 染色、Oct3/4、Nanog、SSEA-4、TRA-1-60 発現も陽性であった。

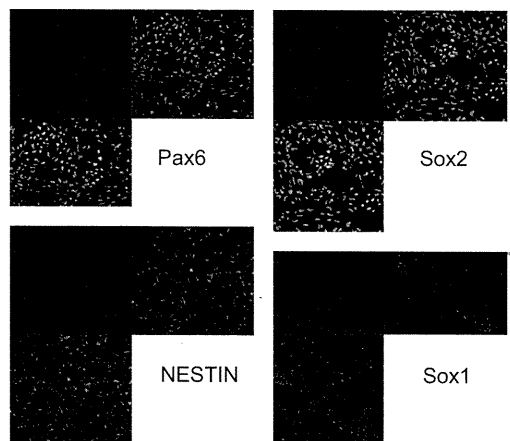
AT iPS 細胞、正常 iPS 細胞の両方とも、神経幹細胞に分化誘導を行うことができた。分化誘導後の免疫染色では、神経幹細胞のマーカーである SOX1、SOX2、Nestin、Pax6 が認められた。

分化誘導後の細胞の形態は、顕微鏡観察下で明らかな違いを認めなかったが、AT iPS 細胞から分化誘導した細胞の方が、継代時の細胞死が多かった。

網羅的遺伝子解析では、分化誘導前の iPS 細胞と誘導後の細胞は、神経系遺伝子についてのクラスタリングが可能であり、神経系への誘導が出来ていることを確認した。



(A) MRC5 iPS 細胞から誘導したもの



(B) AT iPS 細胞から誘導したもの

図 1 分化誘導した神経幹細胞の免疫染色 (上段左は DAPI、上段右はマーカー、下段

左は merge)

いずれも、SOX1、SOX2、Pax6 は核が染色され、Nestin は細胞質が染色されている。

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。

AT iPS 細胞と MRC5 iPS 細胞の両方とも神経幹細胞の誘導に成功したことから、ATM は神経幹細胞までの分化誘導には関与しないことが示唆された。一方で、AT iPS 細胞由来の神経幹細胞においては、継代初期は細胞死の割合が多く、ATM 機能との関連が考えられるが、継代が進むと細胞死に差は認められない。

A-T 患者では、小脳失調の他に、ミオクローヌスやジストニアなどの不随意運動が出現する。一般に不随意運動に関与すると考えられる基底核や中脳黒質の異常についての剖検報告は多くはないが存在し (Koeppe et al. *Movement Disorders* 1994; vol9: 455-9)、本研究班でも基底核におけるドーパミン神経の指標である tyrosine hydroxylase (TH) の染色性が低下している結果が得られている。

近年、これまでは線維連絡がないと考えられていた、基底核と小脳のシナプス経路の存在も明らかになっており、小脳プルキンエ細胞のみならず、ドーパミンニューロンの検討も病態解明に有用である可能性が考えられる。神経幹細胞から、更にニューロンへの分化誘導を行い、検討を進める必要があると考えられた。

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。

AT 患者由来 iPS 細胞から神経幹細胞を

分化誘導した。今後、患者の神経変性の機序を明らかにするため、更なる分化誘導実験が必要である。

F. 健康危惧情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Honda F, Hane Y, Toma T, Yachie A, Kim ES, Lee SK, Takagi M, Mizutani S, Morio T. Transducible form of p47phox and p67phox compensate for defective NADPH oxidase activity in neutrophils of patients with chronic granulomatous disease. *BBRC*. 2012 Jan 6; 417(1): 162-8.
2. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsui N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood*. 2011 117(10): 2887-90.
3. Takagi K, Kawaguchi Y, Kawamoto M, Ota Y, Tochimoto A, Gono T, Katsumata Y, MD, Takagi M, Hara M, Yamanaka H. Activation of the Activin A-ALK-Smad Pathway in Systemic Sclerosis. *J Autoimmunity*. 2011 36(3-4): 181-8.
4. 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.
5. 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.
6. 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

7. 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.
 8. 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. T-Cell Development Failure At beta-Selection Checkpoint and TCR alpha/delta Locus Break Formation Associated with Chromosome 14 Translocation in Ataxia-Telangiectasia Mutated Deficient Mice. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. the 53rd ASH(The American Society of Hematology) Annual Meeting and Exposition (Oral). San Diego, CA. Dec. 12, 2011.
 2. 遺伝性毛細血管拡張性小脳失調症の Double Negative 期における T リンパ球分化異常と発がんメカニズムの関係. 磯田健志, 高木正稔, 朴今花, 増田喬子, 伊川友活, 東みゆき, 森尾友宏, 河本宏, 水谷修紀. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 口演. 2011 年 11 月 25 日 群馬
 3. ATM 欠損 T 細胞分化における T 細胞受容体遺伝子転座をもつ白血病リンパ腫の発症機構. 磯田健志, 高木正稔, 河本宏, 水谷修紀. 平成 23 年度第 2 回 JPLSG 全体会議・合同班会議 口演. 2011 年 11 月 4 日 名古屋
 4. 毛細血管拡張性小脳失調症 (Ataxia Telangiectasia) における T 細胞分化異常の解析. 磯田健志, 高木正稔, 森尾友宏, 水谷修紀. 第 39 回日本臨床免疫学会総会 MWS ワークショップ 口演. 2011 年 9 月 15 日 新宿
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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 日 京都
 10. Takagi M, Uno H, Sugimoto M, Yasuda A, Mizutani S. ATM regulates adipocyte differentiation. ATW2010. USA. Los Angeles. Apr.11-14 2010.
 11. 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
- 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

「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」

研究分担者 熊田 聡子

(財団法人東京都医学研究機構東京都立神経病院・小児神経学・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。AT の神経症状に対するステロイド(ベタメサゾン)少量療法の長期的効果を検討する臨床研究を計画し、開始した。ベタメタゾン 0.02mg/kg/日の内服を、14 日間投薬、14 日間休薬のサイクルで、4 年間繰り返す。神経症状は 2 つの評価尺度を用いて半定量的に評価し、ビデオ記録による比較検討も行っている。同時に長期投与の安全性検証のため、免疫及び内分泌機能に対する影響を含む副作用の検討を行っている。平成 23 年は AT 患者 2 例を登録し、臨床試験を開始した。うち一例では開始後 9 ヶ月までの観察期間中、神経症状の改善は見られなかったが、症状の進行を緩和させる可能性や不随意運動を軽減させる可能性が示唆され、さらに検討を要する。経過中明らかな有害事象は見られなかった。

A. 研究目的

毛細血管拡張性小脳失調症(AT)は、進行性の小脳失調をはじめとする神経症状に加え、免疫不全症、高頻度の腫瘍発生、内分泌異常症、毛細血管拡張症などの多臓器障害を生じる遺伝性疾患である。治療法は無く、神経症状についても、運動障害や嚥下障害に対するリハビリテーションが行われているのみである。多くの患者が 10 歳前後に車いす移動となり、その後も症状は進行し、日常生活動作(ADL)全般に介助を要するようになる。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、平成 22 年度より本研究分担者も加わった。最近イタリアの研究グループが、AT の小脳失調に対するステロイド(ベタメサゾン)少量療法の短期的な有効性を報告した。AT の神

経変性には酸化ストレスの関与が推定されているので、抗炎症作用及び抗酸化作用を有するステロイドによる神経症状の改善は大いに期待できる。一方、ステロイドには免疫抑制作用や内分泌作用もあるので、これらの機能にも障害のある AT 患者への投与にあたっては、副作用に対する十分な検討が必要である。平成 23 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)投与の治験開始にあたり、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。本研究班では本年より、AT 患者に対する少量ベタメサゾン長期投与の有効性と安全性を検討する臨床研究を開始した。

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

治験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)」も用い、両者を比較した。

2. 患者に見られた特異な不随意運動について解析した。

3. AT患者に対する少量ステロイド(ベタメサゾン)投与の臨床試験

神経症状が比較的軽度でADLが軽介助下保たれ、かつ、他の臓器の重篤な障害を認めない20歳未満のAT患者を対象とした。11歳男児と8歳女児を登録して治療前評価を行い投薬を開始している。

投与量はベタメサゾン0.02mg/kg/日、1日1回内服。14日間投薬、14日間休薬のサイクルを、4年間の投薬期間中繰り返す。

治療効果判定と副作用の監視を目的として、治療開始前及び開始後3ヶ月毎に、神経学的所見の評価と採血検査を施行した。神経学的評価は次の2つの評価尺度を用いて半定量的に行った。

(1) Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA)：小脳失調の重症度評価のために国際的に用いられている尺度で、最高40点、得点が高いほど重症。

(2) A-T neuroexamination scale toolkit

(AT NEST)：本研究分担者も所属するATに関する国際委員会が2010年に作成した尺度で、小脳失調の他、眼球運動障害、構音障害、不随意運動、筋力、末梢神経障害といったATの神経症状を項目毎に評価する。最高100点、得点が低いほど重症。

評価尺度による点数化に加え、所見を経時的にビデオ記録し、比較検討した。

治療開始前及び開始後1年毎には、神経学的検査(頭部MRI・脳波・筋電図・嚥下検査・知能検査)と、さらに詳細な副作用の評価(網羅的ウイルス探索・内分泌負荷試験・骨量検査・眼科検診)を行う。またステロイド投与による酸化ストレスの変化を検討するため、1年毎に尿中酸化ストレスマーカーを測定する。

全観察期間は5年を予定している。

(倫理面への配慮)

本研究は、厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針あるいは疫学研究に関する倫理指針を遵守して実施する。被験者の選定においては人権保護の観点から適否を慎重に検討し、施行においては被験者の安全性を最重視し、機密保護に十分な配慮をする。研究実施計画書は、東京医科歯科大学治験等審査委員会の審査を受け、承認を得た。本研究に利益相反は存在しない。

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。

3. AT 患者に対する少量ステロイド(ベタメサゾン)投与の臨床試験を開始した。そのうちの1例11歳男児における現在まで9ヶ月の経過は下記の通りである。

1) 神経症状に対する改善効果

2つの神経学的評価スケールの得点は下表のように推移した。

治療開始前		治療開始後		
		3ヶ月	6ヶ月	9ヶ月
SAR A	22	21.5	21.5	23.5
AT NEST	55.5	53.5	54	51.5

AT NESTの項目別検討及びビデオによる所見の比較では、小脳失調の中で、体幹及び歩行失調の重症度が経過中増悪している。これに対して、頸部・体幹・上肢に見られる不随意運動(ミオクローヌス)の頻度には減少傾向があり、これは特に投薬期間中に明らかであった。眼球運動障害、構音障害、筋力、末梢神経障害には明らかな変化を認めなかった。

2) 有害事象

9ヶ月の経過中に、自覚的ならびに他覚的有害事象は見られなかった。臨床検査上も、免疫機能低下や、耐糖能異常・副腎機能低下などの内分泌的異常所見を認めなかった。今後、治療開始1年後の詳細な免疫機能検査、骨量評価、内分泌負荷試験、眼科検診を施行する。

もう一人の登録者である8歳女児は、治療前評価を施行した後にATに伴う舌の悪性リンパ腫を生じたため本治療の開始を延期したが、その後抗腫瘍療法により悪性リンパ腫が寛解、平成23年10月より臨床試験を開始している。今後治療後の神経学的所見ならびに検査値を評価する。

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。

ATでは、進行性小脳失調に加え、眼球運動障害、構音・嚥下障害、不随意運動症、末梢神経障害など、多様な神経症状を生じる。これらは、免疫不全症や高発癌性以上に、AT患者の生活の質を低下させ、生命予後を悪化させるので、治療法の開発が待たれている。2008-10年にかけて、イタリアのPignataらのグループが、ATの小脳失調に対するベタメサゾン少量療法の有効性を報告した。これは、AT患者6例に対して、ベタメサゾン0.01mg/kg/日及び0.03mg/kg/日をそれぞれ20日間投与し、投与前、投与終了直後、投与終了20日後の小脳失調の重症度をSARAを用いて比較したものである。両投与量いずれにおいても、投与終了直後にはSARAの改善が認められた。ただし、投与終了20日後にはSARAの再増悪傾向が示され、効果が一時的である可能性が示唆された。今回我々は、同治療の長期効果の評価を目的に臨床研究を開始した。評価尺度としてSARAに加えAT NESTを採用し、小脳失調以外の神経症状に対する効果も検討した。また、長期投与の安全性を検討するため、副作用の詳細な調査を行っている。

今回治療を開始した第1例では、9ヶ月の観察期間中、2つの評価尺度の得点は軽度ながら悪化した。項目別評価では、小脳失調の中の体幹及び歩行失調に悪化傾向が強かった。悪化の程度がATの自然経過

と比較して軽度と言えるのか、すなわち、ステロイド投与が進行性疾患であるATの症状増悪を緩和させるのか、については、さらに長期間の検討が必要である。一方、投薬期間中には不随意運動の減少が見られた。AT患者に見られる不随意運動は、振戦、舞踏運動、ミオクローヌス、バリスム、ジストニア、チックなど種々に表現され、その本態及び発現機序は未だ明らかでない。本例に見られた不随意運動は皮質下(大脳基底核や脳幹)由来のミオクローヌスと推定される。ステロイドが皮質下の興奮性にどのように作用するのか、これがATの神経学的予後を改善させるのか、についても今後の検討が必要である。また、ATにおける酸化ストレスと神経変性の関係、これに対するステロイドの影響について検討するため、近日治療開始1年後の尿中酸化ストレスマーカーを測定する。

AT患者へのステロイド長期投与にあたっては、免疫及び内分泌機能などに対する副作用に十分な注意が必要である。本例では今までの経過中に明らかな副作用を認めていないが、今後さらに長期の安全性を確認していく。

来年以降は、本年の2例に加え新たな症例の参加を促し、検討を進める予定である。

E. 結 論

1. 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。
2. 今回の症例では、ベタメサゾン少量療法によるAT神経症状の改善を示すことはできなかった。しかし、神経症状の進行を緩和させる可能性や不随意運動を減少させる可能性について、今後症例を増やして検討する価値がある。観察期間中、免疫・内分泌機能に対する影響を含み明らかな有害事象は認められず、本治療の安全性が示唆された。

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

1. 上肢の動作時ミオクローヌスと体幹優位の同期性ミオクローヌスを来した2例. 京都立神経病院神経小児科 笠井恵美, 熊田聡子 他. 第5回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres. 2011年10月6~8日 品川

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

「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」

研究分担者 林 雅晴

(財団法人東京都医学総合研究所・脳発達/神経再生研究分野・プロジェクトリーダー)

研究要旨：毛細血管拡張性小脳失調症(A-T)の神経変性機序を解明することを目的に、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。また A-T2 剖検例の小脳と大脳基底核で DNA・脂質の酸化ストレスマーカーの表出を解析したところ、小脳皮質の顆粒細胞で脂質の酸化ストレスの亢進が疑われた。また、A-T での大脳基底核病変を明らかにするため、種々の機能マーカーに関する免疫染色を行ったところ、カテコールアミン合成系律速酵素の表出が障害されていた。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。さらに日本での A-T 家族会樹立に向けて A-T メーリングリストに所属する 3 家族が研究者と初めて会合を持った。

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。

A-T 剖検脳の小脳皮質病変を、GABA 系介在神経指標である glutamate decarboxylase とカルシウム結合蛋白に対する免疫組織化学染色(免疫染色)により再評価した。一般に A-T モデル動物の小脳変性では酸化ストレスの関与が推定されているが、ヒト脳では十分解析されていない。本年度は、剖検例の小脳と大脳基底核での酸化ストレスを検

討した。一方、A-T 患者では、小脳失調に加えて、大脳基底核病変に起因する不随意運動がみられるが、ヒトの大脳基底核での詳細な免疫組織化学的検討は行われてこなかった。そこで A-T での大脳基底核病変の病態を明らかにするため、種々の神経・グリア細胞の機能マーカーに関する免疫染色を行った。さらに昨年度、立ち上げた A-T 患者のメーリングリスト(ML)を利用して、家族会設立を目指して、研究班活動の一環として、3 家族と研究者が初めて一堂に会した。

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. A-T2 剖検例(19 歳女性、31 歳男性)、神経系に著変を認めない年齢相当対照において、小脳と大脳基底核の連続切片を作成、DNA・脂質の酸化ストレスマーカー 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)・4-hydroxy nonenal (4-HNE)、脳内の主たる抗酸化酵素である superoxide dismutase(SOD) (Cu/ZnSOD、MnSOD) に対する免疫染色を行い、視察的に評価した。

3. A-T2 剖検例(19 歳女性、31 歳男性)の大脳基底核、視床の連続切片において、神経細胞・アストロサイト・ミクログリアのマーカーである MAP2・GFAP・CD68、カテコールアミン合成系律速酵素でドーパミン神経の指標である tyrosine hydroxylase (TH)、レンズ核介在神経の指標であるカルシウム結合蛋白(calbindin-D28K、parvalbumin)と dopamine receptor 2、大脳基底核の投射神経マーカーである calcineurina、大脳基底核の介在神経と淡蒼球内節・外節の機能マーカー substance P・methionine-enkephalin、さらには神経細胞内に凝集物を構成し成人の神経変性疾患で神経変性を惹起することが知られるリン酸化タウ、リン酸化 α -シヌクレイン、リン酸化 TDP43 に対する免疫染色を行った。

4. A-T ML に所属する 3 家族による東京ディズニーランド内サンルートプラザ東京での会合を企画した。

(倫理面への配慮)

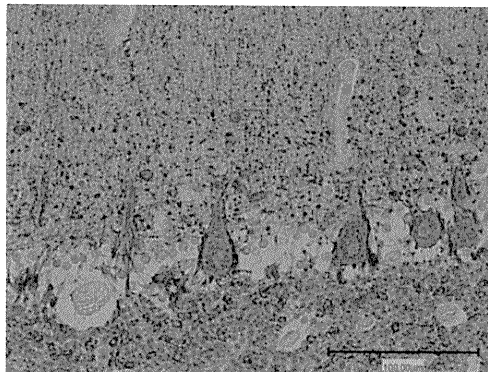
剖検脳を用いた神経病理学的解析は、財団法人東京都医学総合研究所の倫理委員会の承認を得て行った。また、A-T 患者家族会関連の活動は個人情報保護に留意して進めた。

C. 研究結果

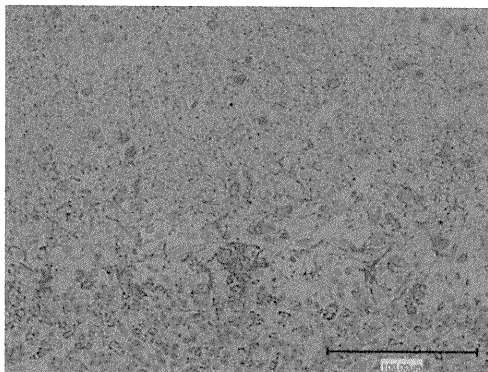
1. ①GAD 染色 : AT 例では Purkinje 細胞周囲で hairy baskets が明瞭化(対照は顆粒状)、分子層の染色性も coarse だった(図 1)。

図 1

対照



AT 例

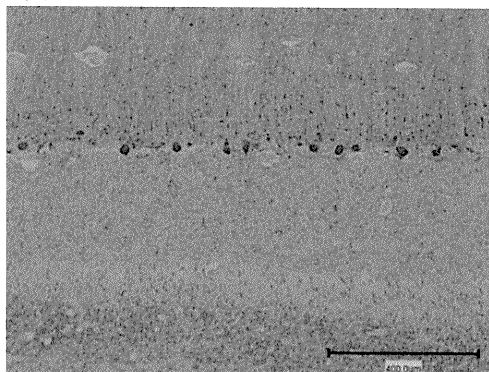


小脳皮質での GAD 染色
顆粒層 cerebellar glomeruli は保たれていた。

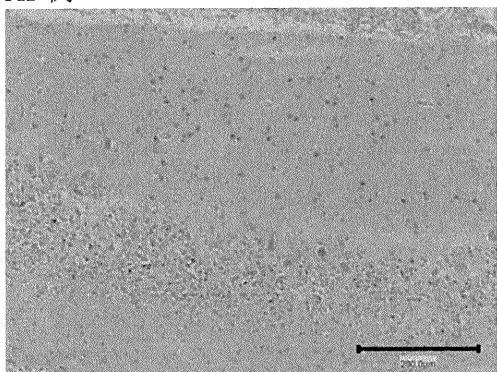
②CD 染色 : AT 例では Purkinje 細胞脱落、分子層の樹状突起の減少・異常分枝がみられ、folia 白質陽性線維も減少していた(図 2)。

図 2

対照



AT 例

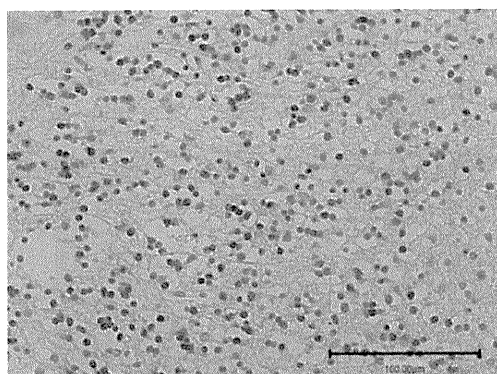


小脳皮質での CD 染色

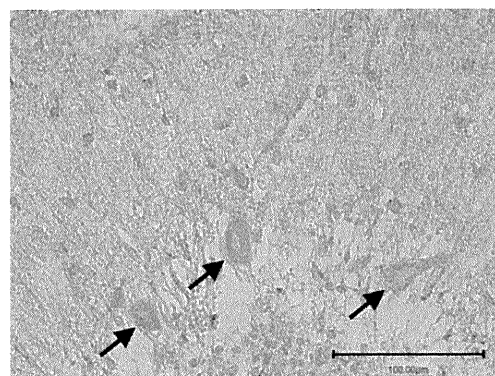
③PV 染色：AT 例では CD 染色と同様な Purkinje 細胞関連の変化と、分子層菲薄化に伴う stellate/basket cell 密集化が認められた。
④CR 染色：AT 例では分子層と顆粒層の染色性が低下していたが、Golgi cell は保たれていた。

2. 酸化ストレスマーカーの免疫染色では、19 歳女性例の小脳皮質で一部の顆粒細胞胞体が脂質酸化ストレスマーカーの 4-HNE で濃染していた。一方、31 歳男性の小脳皮質、両例の小脳歯状核、さらには両例の大脳基底核+視床に陽性所見を認めなかった。抗酸化酵素である Cu/ZnSOD・MnSOD に対する免疫染色では、両例ともに、小脳皮質の残存 Purkinje 細胞、小脳分子層・白質のグリア細胞に、対照と同様な陽性所見が確認された(図 3)。

図 3 小脳皮質の酸化ストレス関連染色



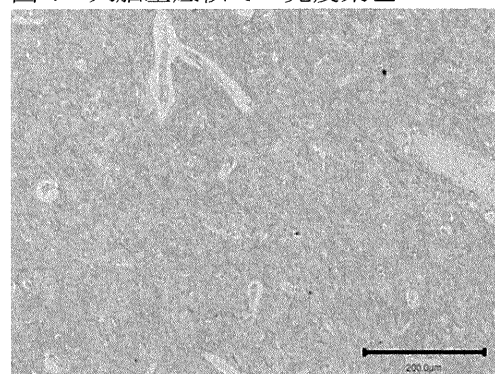
19 歳女性例：小脳皮質顆粒層の 4-HNE 陽性所見(褐色に染まった細胞)



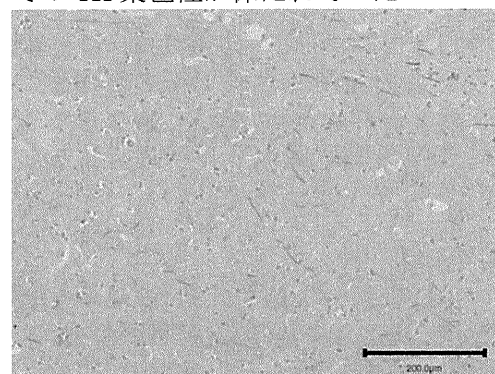
31 歳男性例：残存する Purkinje 細胞(矢印)で MnSOD 染色性を認めた

3. 大脳基底核、視床では、A-T2 剖検例(19 歳女性、31 歳男性)ともに MAP2 陽性の神経細胞が保たれ、GFAP 陽性アストロサイトと CD68 陽性ミクログリアの増加を認めなかった。TH 染色では、19 歳女性例の線条体の神経線維・neuropil とレンズ核束、視床下部室傍核の神経細胞において、他染色では構造が保たれているにもかかわらず、染色性が低下していた(図 4)。

図 4 大脳基底核での免疫染色



31 歳男性例：被殻の神経線維・neuropil での TH 染色性が保たれていた



19 歳女性例：被殻の神経線維・neuropil での TH 染色性が低下していた

介在神経指標のカルシウム結合蛋白と dopamine receptor 2、投射神経マーカー calcineurin α 、淡蒼球内節・外節の substance P・methionine-enkephalin の表出は、いずれも対照同様に、比較的保たれていた。さらに3種類のリン酸化蛋白の免疫染色では異常な凝集体を同定できなかった。

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。2011年の夏休みを利用して、A-T ML に所属する3家族(患者、両親または母親、同胞)が、それぞれ長崎県、東京都(島部)、群馬県から東京ディズニーランドに集合し、8月27日、サンルートプラザ東京のレストランにおいて研究者を含め歓談した(いずれも初対面)。同集まりにおいて、「A-T 患者家族の会」の名称として「シェアザハート(Share the Heart)」が提案され、今後、ML で議論を深めることとした。

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 患者由来の細胞、モデル動物で酸化ストレスの亢進が報告されている。平成21年度の本研究班において、A-T 同様にゲノム修復機構の遺伝的障害から小脳変性が生じる AT-like disorder 同胞例の剖検脳で、DNA 酸化ストレスが Mre11 欠損と相まって小脳変性を惹起することを明らかにした(Acta Neuropathol 2010; 119: 513-20)。今回、A-T2 剖検例のうち、19歳例の小脳

皮質顆粒細胞で脂質の酸化ストレス亢進が疑われた。一方、脳内の主たる抗酸化酵素 SOD の表出は比較的保たれており、抗酸化システムの障害による酸化ストレス亢進は考えにくかった。今後、剖検例の数を増やして同様な解析を進めるとともに、今回、検討した小脳、大脳基底核、視床以外の部位に関しても酸化ストレスに関する免疫染色を行う。

3. A-T 患者では以前より不随意運動などの錐体外路症状がしばしば認められることが知られており、剖検脳の大脳基底核において通常染色標本を用いて検討されてきたが、有意の変化を見出すことはできなかった。今回、2剖検例中の1例において、基底核機能で重要な役割をなすドーパミンを含むカテコールアミン合成系の律速酵素である TH の表出が、他染色で構造が保たれているにもかかわらず、障害されていた。このような TH 染色性低下は、瀬川病など大脳基底核に神経細胞脱落を認めないジストニアで認められ、A-T 患者にみられる不随意運動も大脳基底核の機能異常と関連している可能性が示唆された。一方、小脳皮質とは異なり、酸化ストレスの亢進、リン酸化蛋白の凝集は認められず、TH 染色性低下の原因は不明だった。酸化ストレス研究と同様に、今後、剖検例を増やして検討を進める必要性が示唆された。

4. 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。A-T 患者家族会の設立に向けて、昨年度は ML を整備し、本年度は ML を利用して、患者・家族による会合を初めて持つことができた。さらに家族会の名称に関して案が提案された。今後、毎年、同様な集まりを繰り返し持つことにより、家族に負担とならない形で、A-T 患者家族会の設立を目指す予定である。

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. A-T2 剖検例中 1 例の小脳皮質顆粒細胞で脂質の酸化ストレスの亢進が疑われ

た。一方、抗酸化酵素 SOD の表出は比較的保たれていた。今後、剖検例の数を増やして同様な解析を進め、A-T 患者由来細胞、モデル動物で確認されている酸化ストレスの小脳変性への関与を明らかにする。

3. A-T2 検例中 1 例の大脳基底核において、その機能に重要な役割をなすカテコールアミン合成系律速酵素 tyrosine hydroxylase の表出が障害され、臨床的な錐体外路症状との関連が示唆された。

4. 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。そして A-T 患者家族会の設立に向けて、ML を利用した患者・家族による会合を初めて持った。今後、集まりを繰り返すことにより、家族会の設立を目指す。

F. 健康危惧情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Hayashi M, et al. Lesions of cortical GABAergic interneurons and acetylcholine neurons in xeroderma pigmentosum group A. *Brain Dev.* 2012 Apr; 34(4): 287-92.
- Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Takahashi Y. Focal encephalopathy having recurrent episodes of epileptic status and cluster mimicking hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome. *Brain Dev.* 2012 May; 34(5): 360-3.
- Hayashi M, et al. Brain vascular changes in Cockayne syndrome. *Neuropathology.* 2012 Apr; 32(2): 113-7.
- Tanaka R, Iwasaki N, Hayashi M, et al. Abnormal brain MRI signal in 18q⁻ syndrome not due to dysmyelination. *Brain Dev.* 2012 Mar; 34(3): 234-7.
- Nakajima K, Hayashi M, Tanuma N, Morio T. An autopsy case of polymicrogyria and intracerebral calcification dying the intracerebral hemorrhage. *Neuropathology.* 2012 Apr; 32(2): 207-10.
- Miyata R, Hayashi M, et al. Oxidative stress in mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenic lesion (MERS). *Brain Dev.* 2012 Feb; 34(2): 124-7.
- Shioda M, Hayashi M, et al. Lesions in the central tegmental tract in autopsy cases of developmental brain disorders. *Brain Dev.* 2011 33(7): 541-7.
- Hayashi M, Miyata R, Tanuma N. Decrease in acetylcholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus in a patient with Prader-Willi syndrome. *Neuropathology.* 2011 31(3): 280-5.
- Saito T, Hayashi M, et al. Neocortical layer-formation of human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific marker expression. *Cerebral Cortex.* 2011 21(3): 588-96.
- 林雅晴. 色素性乾皮症の神経病変. *Visual Dermatology.* 2011 10(5): 456-8.
- 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.
- 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.
- Hayashi M, Tanuma N, Miyata R. Oxidative stress in developmental brain disorders. In: Ahmad S, ed. Neurodegenerative diseases. *Austin: Landes Bioscience.* 2012; 724: 278-90. (レビュー)

2. 学会発表

- 林雅晴. 大脳基底核疾患の画像と病理: 最近の話題. 第 6 回小児神経放射線研究会. 2011 年 10 月 29 日 京都

2. 林雅晴. こどもの脳の発達における環境因子と神経伝達物質代謝の影響. 東京都医学研開所記念シンポジウム. 2011年7月20日 東京
3. Segawa M, Nomura Y, Hayashi M. An autopsy on 90 year old female of Segawa disease. 15th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. Jun 8, 2011. Toronto, Canada
4. 林雅晴, 宮田理英, 田沼直之. 毛細血管拡張性運動失調症の小脳皮質病変. 第52回日本神経病理学会総会学術研究会. 2011年6月4日 京都
5. 林雅晴, 宮田理英, 田沼直之. 色素性乾皮症におけるモノアミン神経病変に関する解析. 第53回日本小児神経学会総会. 2011年5月28日 横浜
6. 大場大樹, 林雅晴 他. 進行性の小脳失調症とFanconi症候群を呈し診断のついていない1例. 第16回小児神経症例検討会(蔵王セミナー). 2011年2月11日 山形・上山
7. 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. 2010年10月21日 福岡

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

「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」

研究分担者 金子 英雄

(独立行政法人国立病院機構長良医療センター・臨床研究部・部長)

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。片方のアレルの *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。しかし、PCR を基にした方法では、ヘテロに欠失または重複を有していた場合、検出できない。そこで、MLPA(Multiple Ligation Probe Amplification)法を用いて片方のアレルの変異のみ検出されている A-T 患者とその両親の全エクソン領域の欠失または重複について検討した。対象とした A-T 患者と両親の *ATM* 遺伝子には欠失または重複が存在しないことが明らかになったが、今後、さらに多くの症例での検討が必要と考えられた。

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。今までに、500 以上の遺伝子変異が報告されている。我々が、以前報告したように本邦 AT 患者に比較的共通する変異は存在するが、多くの変異は

ATM 遺伝子の全域に、散在している。H22 年度に、我々は、本邦の毛細血管拡張性小脳失調症 10 症例の *ATM* 遺伝子変異について報告した。その結果、片方のアレルの *ATM* 遺伝子変異しか検出できない症例が 10 症例中 5 症例存在していた。変異の解析は、一般的に PCR で増幅した DNA 断片を基にして、塩基配列を決定する。この方法では、片方のアレルに、大きな欠失または重複が存在する場合検出できないという問題がある。近年、Multiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法とよばれる、標的とする遺伝子のプライマーをライゲースを用いて標識することで、エクソンの欠失や重複を検出する方法が進歩してきた。今回、我々は、臨床的には AT と考えられる 1 症例につき、MLPA 法を用いて、*ATM* 遺伝子の欠失、

重複の解析を行った。

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。

PCR を基に塩基配列を決定したところ、片方のアレルには、cDNA 上は 7883del5、ゲノム上は、exon53 TTATA の 5bp の欠失 (Ensembl ATM-201:108203583-108203587) が存在した。もう片方のアレルの変異は検出できなかった。

MLPA は、ファルコバイオシステムズ、SALSA®ATM P041,042 のキットを用いた。

(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子解析を行った結果、10 家系の 20 alleles 中、7883del5 は 5 alleles に、IVS+2 (T>A) の変異は、5 alleles に検出され、7883del5 と IVS+2 (T>A) の変異をあわせると解析した 20 alleles 中 10 alleles とほぼ半数を占め、本邦症例における比較的共通の変異である可能性が示唆された(表 1)。一方、片方のアレルの ATM 遺伝子変異しか、検出されない症例が 10 症例中 5 症例存在した。

表 1 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

Case	mRNA sequence alteration	Genomic sequence alteration	Predicted protein alteration
1	Exon 38 skip/5319 ins9	5319→A in exon 38	Frameshift; truncation/truncation
2	Exon 38 skip/5319 ins9	5319→A in exon 38	Frameshift; truncation/truncation
3	7883del5	5-bp deletion in exon 55	Frameshift; truncation
4	Unknown	5749A→T	R190X
5	Exon 33 skip	IVS33+2T→A	Deletion of 55aa
6	8725A→G	8725A→G in exon 62	R2309G
7	Unknown	IVS33+2T→A	Deletion of 55aa
8	Exon 33 skip	IVS33+2T→A	Deletion of 55aa
9	7883del5	5-bp deletion in exon 55	Frameshift; truncation
10	Unknown	7471T→C in exon 52	W2491R
	Unknown	5-bp deletion in exon 55	Frameshift; truncation
	Unknown	5-bp deletion in exon 55	Frameshift; truncation
	Unknown	IVS33+2T→A	Deletion of 55aa
	Unknown	IVS33+2T→A	Deletion of 55aa
	Unknown	IVS33+2T→A	Deletion of 55aa
	Unknown	5-bp deletion in exon 55	Frameshift; truncation

対象とした患者 GAT2 は表 1 に示すように、頸部のリンパ腫を合併した。比較的典型的な A-T の症状を示していた。IgA 8.3mg/dl と低値を示し、ConA、PHA に対する反応性も低下していた。免疫不全の状態であり、AFP も高値を示し、毛細血管拡張性小脳失調症に合致する所見であった。

リンパ腫を合併した Ataxia-telangiectasia 症例 (GAT2)

症例 12歳 男児
主訴 頸部リンパ節腫脹
家族歴 特記すべきことなし
既往歴 在胎33週、2100gにて出生。周産期は特に異常は認められなかった。生後18ヶ月ごろまでは、正常範囲内の発達を示した。その後、動揺性歩行と言語発達遅延が出現。易感染も認められた。そのため、7歳時に精査が行われ、臨床症状、IgA、IgEの低値、リンパ球幼若化反応が低値であり、A-Tと診断された。
現病歴 平成6年11月(12歳2ヶ月時)ごろより、頸部リンパ節の腫脹に気づかれていたが、抗生剤投与などにより、縮小したため経過観察されていた。しかし、平成7年4月中旬から再び頸部リンパ節の増大が認められたため、同年4月25日精査目的で入院となった。
 身体所見 身長128cm(-3SD)、体重28kg(-1.7SD) 体温 36.5°C 脈拍 70/min。扁桃およびアデノイドの腫脹あり。両側眼球結膜の毛細血管拡張あり。頸部リンパ節: 左: 径2cmおよび1cmを2個触知。右: 1.5cmを1個触知。腋下および鼠径リンパ節触知せず。
 腹部平坦、軟。動揺歩行および企図振戦あり

入院時検査所見

表 2

末梢血				
RBC	534×10 ⁴ / μl	T.bil	0.2 mg/dl	EB-VCA IgG X640
Hb	13.6 g/dl	AST	29 IU/ml	EB-VCA IgM X10未満
Ht	42.3 %	ALT	20 IU/ml	EB-VCA IgA X10未満
Plt	36.1×10 ³ / μl	LDH	587 IU/L	EB-DR IgG X10
WBC	10000 / μl	Ca	4.2 mEq/L	EB-DR IgA X10未満
Neutrophil	81.6 %	Amylase	191 IU/L	EB-EBNA X10未満
Eosino	3.4 %	CPK	62 IU/L	
Baso	0.8 %	BS	81 mg/dl	Gaシンチ 頸部および縦隔に異常集積像
Mono	5.1 %	CRP	0.35 mg/dl	
Ly	8.4 %	ESR	11 mm/hr	
生化学		免疫		
Na	142 mEq/L	IgG	1155 mg/dl	
K	3.9 mEq/L	IgA	8.3 mg/dl	
Cl	100 mEq/L	IgM	318 mg/dl	
BUN	9.3 mg/dl	IgE	0.1 IU/L以下	
Cre	0.5 mg/dl	C3	112 mg/dl	
TP	7.2 g/dl	C4	30.6 mg/dl	
Alb	4.1 g/dl	PHA	12910 cpm	
		ConA	16895 cpm	
		CH50	38.6 U/ml	
		AFP	298.9 ng/dl	

そこで、MLPA 法により、ATM の全 63 エクソンにつき解析した。その結果、図 1 に示すように患者その父、母とも全エクソンが検出された。本患者、父、母ともに ATM の遺伝子欠失または重複は存在しないと考えられた。

GAT-2

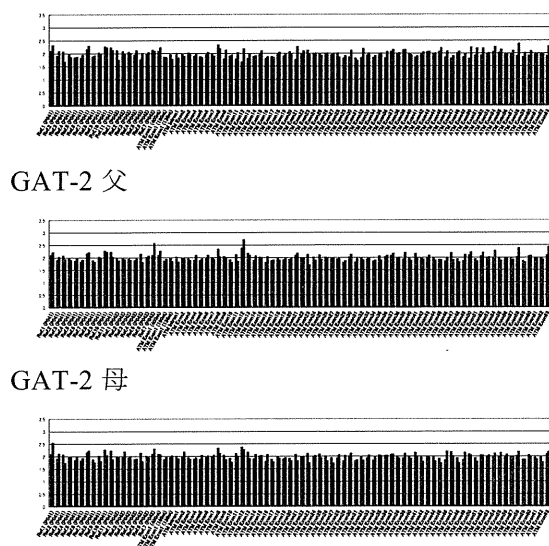


図1 MLPA法による *ATM* 遺伝子解析

D. 考察

毛細血管拡張性小脳失調症の診断には、臨床の観点からの、小脳失調症、 α -フェトプロテイン高値、毛細血管拡張、発癌などの組み合わせが重要である。特徴的な症状がそろえば、临床上、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、遺伝子変異の同定によりなされる。*ATM* 遺伝子変異を解析したところ 7883del5、IVS33+2T が、本邦の毛細血管拡張性小脳失調症における比較的共通の変異と考えられた。また、片方の allele の変異しか同定されない症例もあり、そのような症例には、今後、MLPA 法で、*ATM* 遺伝子の大きな欠失の有無について検索が必要と考えられた。

そこで毛細血管拡張性小脳失調症患者の *ATM* 遺伝子の欠失、重複について検討した。MLPA 法は、*ATM* 遺伝子の再構成に関して、早く、効果的に検出できる方法と考えられた。本患者では、*ATM* 遺伝子の欠失、重複は検出されず、本患者が毛細血管拡張性小脳失調症の表現型を示したこと、*ATM* 遺伝子変異との関連については、さらに検討が必要と考えられた。

MLPA 法の注意すべき点として、テンプレートとして用いる DNA の純度により、量的な解釈を誤る可能性が指摘されているが、今回の結果は、全エクソンとも明瞭

に検出されており、本プロトコールで、欠失、重複について検出は可能と考えられた。また、MLPA 法では、逆位に関しては、検出できないが、その頻度は少ないと考えられる。

Cavalieri らは、21 人のイタリア人の毛細血管拡張性小脳失調症患者の *ATM* 遺伝子変異を解析し、4 人に欠失または重複があったと報告している。我々が報告した毛細血管拡張性小脳失調症患者の *ATM* 遺伝子が検出されていない症例の中に、欠失または重複を有する患者が存在すると考えられ、今後、さらに症例を増やして検討する予定である。

E. 結論

本邦の毛細血管拡張性小脳失調症の *ATM* 遺伝子変異を解析した。その結果、7883del5、IVS+2 (T>A) が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、検出されない症例も多く、そのような症例では *ATM* 遺伝子の比較的大きな欠失が存在する可能性が示唆された。

MLPA 法は毛細血管拡張性小脳失調症の病因遺伝子 *ATM* の欠失または重複を簡便に検出するのに有用であると考えられた。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

- 論文発表
- Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kubota K, Yamamoto T, Matsui E, Teramoto T, Fukao T, Kasahara K, Kondo N. Structural property of soybean protein P34 and specific IgE response to recombinant P34 in patients with soybean allergy. *Int J Mol Med.* 2012 Feb; 29(2): 153-8.
- Ohnishi H, Miyata R, Suzuki T, Nose T, Kubota K, Kato Z, Kaneko H, Kondo N. A rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2012 Feb; 129(2): 578-80.