

9:00-10:05 セッションIV

座長：中島健二（鳥取大学脳神経内科）

9:00-9:05

セッションの概要

9:05-9:20

15. 脊髄小脳変性症および多系統萎縮症患者のリハビリテーションに関するアンケート調査○中馬孝容¹、二村直伸²、松村隆介³、高柳哲也⁴滋賀県立成人病センターリハビリテーション科¹、国立病院機構兵庫中央病院神経内科²、
国立病院機構奈良医療センター神経内科³、奈良県立医科大学名誉教授⁴

9:20-9:35

16. MJD・SCA6の自然史に関する多施設共同研究（まとめ）中島健二¹、○安井建一¹、矢部一郎²、佐々木秀直²、新井公人³、金井数明⁴、
吉田邦広⁵、伊藤瑞規⁶、祖父江 元⁶、小野寺 理⁷、西澤正豊⁸鳥取大学神経内科¹、北海道大学神経内科²、千葉東病院神経内科³、千葉大学神経内科⁴、
信州大学第三内科⁵、名古屋大学神経内科⁶、
新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター⁷、新潟大学神経内科⁸

9:35-9:50

17. Machado-Joseph 病におけるライフイベントの自然史○金井数明¹、山本達也¹、新井公人²、桑原 聡¹千葉大学医学研究院 神経内科¹、国立病院機構千葉東病院 神経内科²

9:50-10:05

18. ロシア・ヤクート人との比較による SCA1 発症に関わる環境・遺伝学的要因の検討○他田正義²、Maksimova Nadezda⁵、Varlamova M⁵、高橋俊昭¹、徳永 純¹、
堅田慎一¹、Nikolaeva Irina⁶、Sukhomyasova Aitalina⁶、土屋美由紀²、池内 健³、
小野寺 理²、西澤正豊¹新潟大学脳研究所 神経内科学分野¹、同 生命科学リソース研究センター²、
新潟大学研究推進機構 超域学術院³、新潟大学医学部保健学科⁴、
Yakut Scientific Center of Complex Medical Diseases of RAMS⁵、
Republican Hospital N1-National Center of Medicine⁶

10:05-10:15

【休憩】

10:15-11:35 セッションV

座長：水澤英洋（東京医科歯科大学神経内科）

10:15-10:20

セッションの概要

10:20-10:35

19. Ataxin-7 は微小管に結合し、細胞骨格を安定化する

○中村蓉子¹、田川一彦¹、岡 努¹、笹邊俊和¹、伊藤日加瑠¹、塩飽裕紀¹、
Albert R. La Spada^{2,3}、岡澤 均^{1,4}

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 神経病理学分野¹、

Departments of Pediatrics, Cellular & Molecular Medicine, and Neurosciences,

Division of Biological Sciences, and the Institute for Genomic Medicine, University of

California²、Rady Children's Hospital³、CREST 日本科学技術振興機構⁴

10:35-10:50

20. Hsp40 はエクソソーム分泌を介してポリグルタミン病モデルに対する non-cell autonomous な治療効果を発揮する

○永井義隆、武内敏秀、ポピエル ヘレナ明子、藤掛伸宏、和田圭司

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部

10:50-11:05

21. ヒト疾患脳におけるポリグルタミン病重合体の検出

○高橋俊昭¹、石平 悠¹、徳永 純¹、堅田慎一¹、他田真理¹、他田正義²、佐藤俊哉³、
柿田明美⁴、高橋 均⁵、小野寺 理²、西澤正豊¹

新潟大学脳研究所 神経内科¹、

新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター 分子神経疾患資源解析学²、

新潟大学脳研究所 動物資源開発研究分野³、

新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター 脳疾患標本資源解析学⁴、

新潟大学脳研究所病態神経科学部門 病理学⁵

11:05-11:20

22. レビー小体病および多系統萎縮症におけるオートファゴソーム関連タンパク質の変化

○丹治邦和¹、森 文秋¹、柿田明美²、高橋 均³、若林孝一¹

弘前大学医学研究科脳神経病理学講座¹、

新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター²、新潟大学脳研究所病理学分野³

11:20-11:35

23. オートファジーによる異常タンパク質蓄積を制御するための標的探索

○貫名信行、松本 弦、和田浩司、奥野弥佐子、黒沢 大
理研脳科学総合研究センター構造神経病理研究チーム

11:35-11:40

【事務連絡】

11:40-12:30

【昼食】

12:30-14:05 セッションVI

座長：西澤正豊（新潟大学脳研究所神経内科）

12:30-12:35

セッションの概要

12:35-12:50

24. 脊髄小脳失調症 31 型における(TGGAA)_n・(UGGAA)_n 結合蛋白の探索

○吉田邦広^{1,2}、鈴木佳代³、石川えり³、小柳清光⁴、池田修一²
信州大学神経難病学講座 分子遺伝学¹、信州大学脳神経内科、リウマチ・膠原病内科²、
信州大学ヒト環境科学研究支援センター³、信州大学神経難病学講座 分子病理学⁴

12:50-13:05

25. 培養細胞モデルを用いた SCA31 の分子病態検索

水澤英洋、○新美祐介、佐藤 望、石黒太郎、高橋 真、太田浄文、石川欽也
東京医科歯科大学大学院脳神経病態学分野

13:05-13:20

26. 新しい SCA/ALS crossroad mutation Asidan

○池田佳生¹、小林 果²、松浦 徹¹、人見敏明²、土生敏行³、小泉昭夫²、阿部康二¹
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学¹、
京都大学大学院医学研究科環境衛生学分野²、京都大学放射線生物研究センター³

13:20-13:35

27. Exome 解析にて同定された SCAR1 (AOA2) の一家系

○市川弥生子¹、小林俊輔²、石浦浩之¹、三井 純¹、高橋祐二¹、後藤 順¹、
金澤一郎³、辻 省次¹
東京大学医学部附属病院 神経内科¹、福島県立医科大学 神経内科²、
国際医療福祉大学大学院³

13:35-13:50

28. 視神経萎縮，末梢神経障害を伴う遺伝性痙性対麻痺家系の原因遺伝子同定

○嶋崎晴雄¹、本多純子¹、迫江公己¹、直井為任¹、滑川道人¹、中野今治¹、石浦浩之²、
福田陽子²、高橋祐二²、後藤 順²、辻 省次²、後藤雄一³、瀧山嘉久⁴

自治医科大学 内科学講座 神経内科学部門¹、東京大学医学部附属病院 神経内科²、
国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第二部³、山梨大学 神経内科⁴

13:50-14:05

29. 視神経萎縮と末梢神経障害を伴った ARHSP の新規原因遺伝子の機能解析

○坂井千香¹、畠山英之¹、嶋崎晴雄²、石浦浩之³、後藤 順³、中野今治²、辻 省次³、
後藤雄一¹、瀧山嘉久⁴

国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第二部¹、
自治医科大学内科学講座神経内科学部門²、
東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学³、
山梨大学大学院医学工学総合研究部神経内科学講座⁴

14:05 閉会の挨拶

【お知らせ】

14時30分より同会場にて2011年度小脳研究会が予定されています。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究
分担研究報告

未同定 S C A の家系集積と原因遺伝子探索

研究分担者 水澤英洋 (東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科))
共同研究者 石川欽也 (東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科))
佐藤 望 (東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科))
太田浄文 (東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科))
尾崎 心 (東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科))
関口輝彦 (東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科))

研究要旨

優性遺伝性脊髄小脳変性症(SCA)の原因は、本班の世界的研究成果も在り多数の原因が同定された。しかし未だ10-20%のSCAは原因が不明とされている。近年の遺伝子探索技術の革新的進歩により、原因の同定はかつてほど困難ではなくなったと言われている。本研究では、東京医科歯科大学で集積した臨床的に特徴のある若年発症型・緩徐進行性・純粋小脳型の家系に着目し、連鎖解析を進めた。その結果、候補遺伝子座を幾つかに限定化した。今後、本班の多くの研究者に協力を求め、類似家系の集積を行いつつ、次世代シーケンサーなどを用いた遺伝子探索を進める。

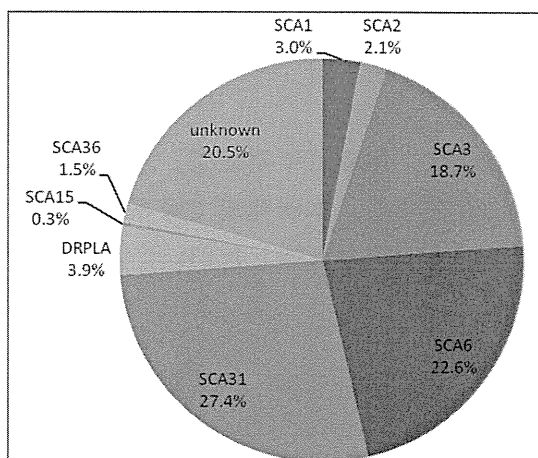
A. 研究目的

優性遺伝性脊髄小脳変性症(SCA)の原因は多数同定され、その成果には本班の貢献も大きい。しかし、未だ原因が不明のSCA([未同定SCA])の家系も多く存在する。本研究の究極の目的は、未同定SCAの原因を同定することであるが、本年度は東京医科歯科大学で集積した、臨床的特徴を有する家系群を紹介し、集積を促進することである。

B. 研究方法

東京医科歯科大学において7年間で集積した332家系について、既知SCAの原因探索からSCA1, 2, MJD/SCA3, SCA6, 8, 10, 12, 15,

17, 31, 36, DRPLA を検索し、陰性であった家系を集積した。暫定的に「未同定SCA」と判断した家系は全体の20.5%を占めた(図。[unknown]と表示)。



その中で特徴的な4家系の臨床像を解析した。可能な限り多くの発症者およびご家族に、本研究の趣旨と遺伝子探索の意義をご説明し、同意を頂いた方々から末梢血液採取を行った。ハイスループット遺伝子探索を目指し、microarrayによる連鎖解析を試みた。

C. 研究結果

1) 臨床的に4家系は、①20～30歳代程度の比較的若年発症；②基本的には純粋小脳失調症であるが、③腱反射亢進・筋トーヌス亢進（痙縮）および④外眼筋は軽度外転制限を同一家系内でも認める症例と認めない症例があり注意を要する、⑤進行は緩徐、⑥頭部MRIでは脳幹はよく保たれる、といった特徴を認めた。

2) 可能な限り連鎖解析を行った。その結果、もしこれら4家系が原因を同一とした場合、連鎖する筈の領域が絞られ、エクソームシーケンシングで解析可能な範疇に絞られた。しかし、確実に原因を同定するためには、より多数の家系を集積する努力を並行して進める必要があることも判明した。このため、今後本研究班を中心に、類似家系の集積を呼び掛けて共同研究体制も強化してゆくべきであると考えられた。

D. 結論

小脳症状主体の若年発症型、未同定SCAが確かに存在する。本研究班で家系の集積を進めて、原因同定を目指したい。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishikawa K, Dürr A, Klopstock T, Müller S, De Toffol B, Vighetto A, Marelli C, Wichmann HE, Illig T, Niimi Y, Sato N, Amino T, Stevanin G, Brice A, Mizusawa H: Pentanucleotide repeats at the spinocerebellar ataxia type 32 (SCA31) locus in Caucasians. *Neurology*, 2011; 77 (20): 1853-1855
- 2) Obayashi M, Ishikawa K, Izumi Y, Takahashi M, Niimi Y, Sato N, Onodera O, Kaji R, Nishizawa M, Mizusawa H: Prevalence of inositol 1, 4, 5 - triphosphate receptor type 1 gene (*ITPRI*) deletion, the mutation for spinocerebellar ataxia type 15 (SCA15), in Japan screened by gene dosage. *J Hum Genet*, in press
- 3) Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, Yamada M, Toyoshima Y, Takahashi H, Kato T, Takao M, Murayama M, Mori O, Eishi Y, Mizusawa H: Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. *Neuropathology*, in press

2. 学会発表

- 1) 石川欽也, 水澤英洋. 「脊髄小脳変性症の分子病態」. シンポジウム 4-S-5-3 (シンポジウム4. ころと神経: 「神経変性疾患の病態と治療 (脊髄小脳変性症を含む)」) 第28回日本医学会総会 (震災の

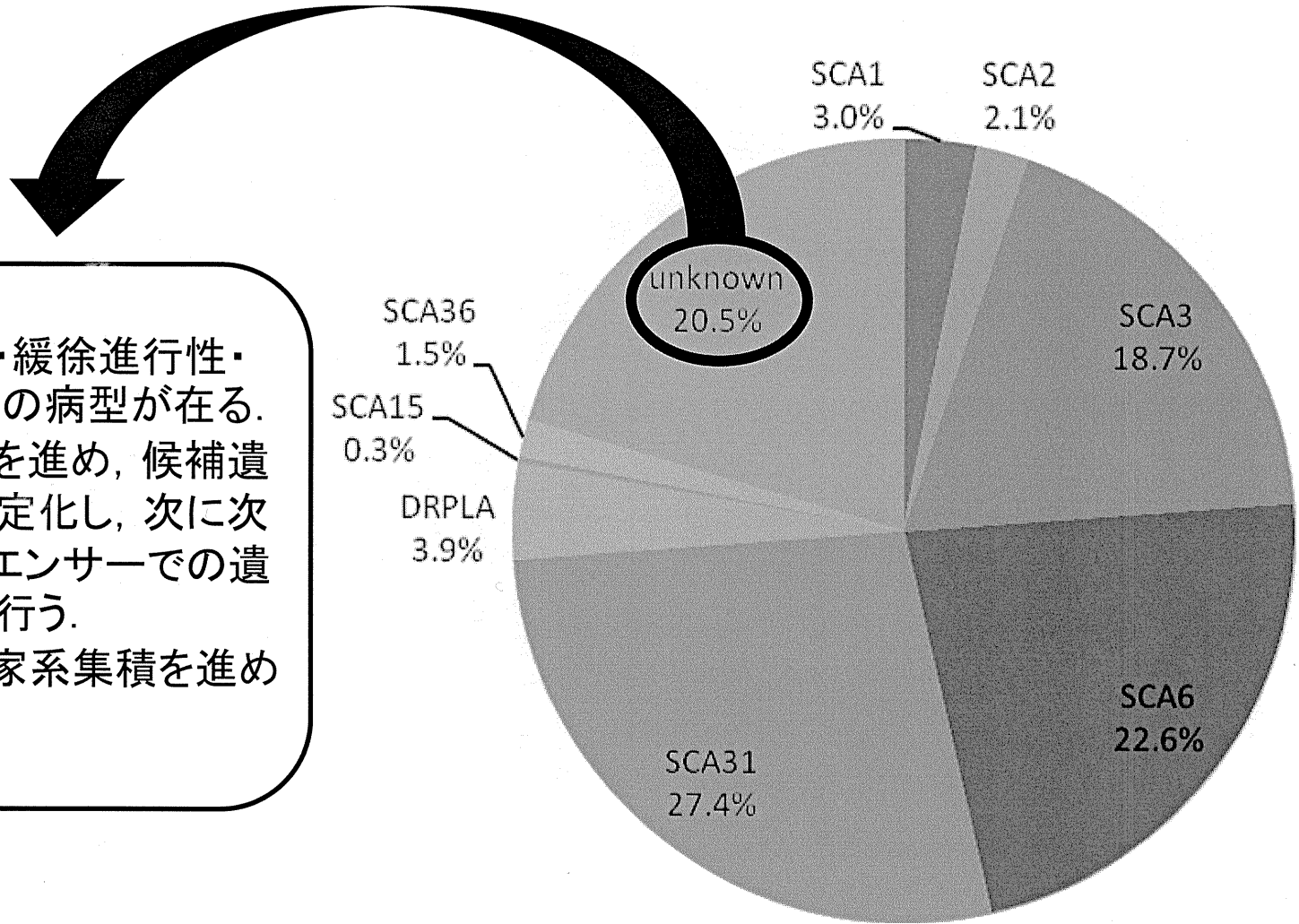
ため抄録発表のみ).

- 2) Brookes Rachel S., Ishikawa K, Mizusawa H: Cathepsin D and myosin IIB colocalize in spinocerebellar ataxia type 6 and other polyglutamine diseases. The 63rd American Academy of Neurology Annual Meeting, 2011. 4. 13, Honolulu
- 3) Ishikawa K, Ota K, Sato N, Mizusawa H: Open-labeled clinical trial of rifampicin in multiple system atrophy. The 63rd American Academy of Neurology Annual Meeting, 2011. 4. 14, Honolulu
- 4) 佐藤 望, 石川欽也, 新美祐介, 網野猛志, 水澤英洋: 脊髄小脳失調症 31 型の挿入配列 RNA 結合タンパクの探索. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 18 日, 名古屋
- 5) 新美祐介, 佐藤 望, 網野猛志, 高橋 真, 大林正人, 石黒太郎, 石川欽也, 水澤英洋: 細胞モデルを用いた脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) の病態探索. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 18 日, 名古屋
- 6) 石川欽也, 太田浄文, 大林正人, 新美祐介, 高橋 真, 石黒太郎, 佐藤 望, 柴野 健, 水澤英洋: 多系統萎縮症に対するリファンピシン内服療法. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 20 日, 名古屋
- 7) Ishikawa K: Various penta-nucleotide repeat expansions at the SCA31 locus in human. Late Breaking Session. The cerebellum. Gordon Research Conference, 2011. 8. 22, New London, NH, USA
- 8) Ishikawa K, Furuki H, Matsuo H, Yamashita T, Mizusawa H. Screening ANO10 mutations in a Japanese cohort of cerebellar ataxia. The 12th International Congress of Human Genetics & the 61st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2011. 10. 12, Montreal, Canada
- 9) Obayashi M, Takahashi M, Niimi Y, Sato N, Onodera O, Ishikawa K, Nishizawa M, Mizusawa H: Prevalence of spinocerebellar ataxia type 15 in Japan screened with TaqMan PCR assay. The 12th International Congress of Human Genetics & the 61st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2011. 10. 12, Montreal, Canada
- 10) Takahashi M, Obayashi M, Ishiguro T, Sato N, Niimi Y, Mogushi K, Mahmut Y, Tanaka H, Ishikawa K, Mizusawa H. A polyglutamine expansion in α 1A calcium channel C-terminal exerts toxicity in the cytoplasm with CREB transcriptional activation. The 12th International Congress of Human Genetics & the 61st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2011. 10. 14, Montreal, Canada

F. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)
なし

G. 健康危険情報
なし

東医歯大での未同定SCAは、全SCAの20%



- 若年発症・緩徐進行性・純粋小脳型の病型が在る.
- 連鎖解析を進め, 候補遺伝子座を限定化し, 次に次世代シーケンサーでの遺伝子探索を行う.
- 本班内で家系集積を進める

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究
分担研究報告

脊髄小脳変性症および遺伝性痙性対麻痺の病態解明に向けたシーケンス拠点の整備

研究分担者 辻 省次 (東京大学医学部附属病院神経内科)
共同研究者 石浦浩之 (東京大学医学部附属病院神経内科)
三井 純 (東京大学医学部附属病院神経内科)

研究要旨

次世代シーケンサーを駆使した大規模ゲノム配列解析拠点を整備し、難治性疾患克服研究事業の研究班との連携のもとに、1. 神経疾患の病因・病態機序の解明、2. 診断未確定の疾患の遺伝子診断を支援するシステムを構築した。本シーケンス拠点は、本研究班における、脊髄小脳変性症・遺伝性痙性対麻痺に関連する遺伝子の探索と診断確定のための遺伝子診断に役立てていく。

A. 研究目的

次世代シーケンサーを駆使した大規模ゲノム配列解析拠点を整備し、難治性疾患克服研究事業の研究班との連携のもとに、1. 神経疾患の病因・病態機序の解明、2. 診断未確定の疾患の遺伝子診断を支援するシステムを構築する。

ファイルサーバ 17 台 (ストレージ容量 計 1,029 TB) を導入し、大規模ゲノム配列解析拠点を構築した。

セキュリティ確保のため、情報処理に関するプライベートネットワークを構築した。

難治性疾患克服研究事業の研究班との連携のもと、いくつかの神経疾患について、大規模サンプルリソースの収集に着手した。

B. 研究方法

東京大学医学部附属病院内にゲノム医学センターを設立し、次世代シーケンサー (HiSeq2000 2 台, GAIIX 1 台, 5500XL 1 台, PacBio RS system 1 台) を導入した。

(倫理面への配慮)

本研究については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、東京大学医学系研究科・医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会からの承認を受けて実施する。

情報解析のため、ログインサーバ 10 台 (CPU 8 コア, メインメモリ 48 GB, ローカル HDD 2 TB), 並列計算サーバ 68 台 (CPU 12 コア, メインメモリ 96 GB, ローカル HDD 2 TB), 大規模計算用サーバ 3 台 (CPU 24/48 コア, メインメモリ 256/512 GB, ローカル HDD 2 TB),

C. 研究結果および考察

本年度、ゲノム医学センターにおいて、4 件の全ゲノム配列解析、76 件の exome 解析を

実施した。

病因遺伝子未知の遺伝性疾患に対しては、DNA microarray を用いたハイスループット連鎖解析システム (SNP-HiTLink) と、exome 解析あるいは全ゲノム配列解析を組み合わせることにより、いくつかの病因遺伝子の同定が迅速に実施できた。その中で、Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa の原因遺伝子 FLVCR1 は既に報告した (Ishiura *et al.* Neurogenet 2011)。その他の同定された疾患の原因遺伝子についても機能解析などを進めている。

痙性対麻痺や脊髄小脳変性症など、遺伝的異質性の高い疾患・臨床病型については、既知の原因遺伝子を網羅的に解析することは多くの労力を要し、ルーチンに行うことは難しい。このような症例に対して、スクリーニング検査 (痙性対麻痺に対する SPG4 解析、脊髄小脳変性症に対するリピート伸長変異スクリーニングなど) を行った後、exome 解析を行うことによって、簡便で効率のよい網羅的な遺伝子診断が可能になる。実際に、常染色体劣性脊髄小脳変性症、白質脳症を伴う家族性認知障害について、exome 解析によって遺伝子診断を行うことができた。

既知の病院遺伝子について遺伝子解析を網羅的に行うことによって、システムティックに病因遺伝子未知の遺伝性疾患を抽出することが可能になり、新たな原因遺伝子同定による神経疾患の病因・病態機序の解明につながるものと考えられる。

孤発性疾患に対しても、パイプラインの構築により、大規模 exome 解析が実施できる体制を整えた。孤発性患者の中にも家族性疾患の原因遺伝子変異が見つかることも稀ではないため、このパイプラインによつて的確な診

断と管理が可能になる。また、従来行われている頻度の高い多型による関連解析では抽出が難しいと考えられている疾患感受性変異、すなわち稀で遺伝的影響度の高い変異についても解明が期待される。

D. 結論

今後、ロボティクスの導入を含めたサンプル調製の効率化を図り、本年度中にさらにスループットを向上させる予定である。また、日本人参照配列の構築と日本人の variation database の構築を別に目指しており、これらの整備によってさらに病因遺伝子探索の効率が改善されると期待される。

また、ゲノムインフォマティクスに関しては、上記の次世代シーケンサーから得られる short read のデータを用いて構造変異やリピート伸長変異を検出するためのアルゴリズムの作成は急務と考えられる。

次世代シーケンサーを用いたゲノム解析のスループットの大きさを最大限に活用するためには、正確な臨床診断に基づく、ゲノムリソースの収集が重要となる。

本シーケンス拠点は、本研究班における、脊髄小脳変性症・遺伝性痙性対麻痺に関連する遺伝子の探索と診断確定のための遺伝子診断に役立てたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishiura H, Fukuda Y, Mitsui J, Nakahara Y, Ahsan B, Takahashi Y, Ichikawa Y, Goto J, Sakai T, Tsuji S: Posterior column ataxia with retinitis pigmentosa in a Japanese family with a novel mutation in FLVCR1. Neurogenet, 2011;

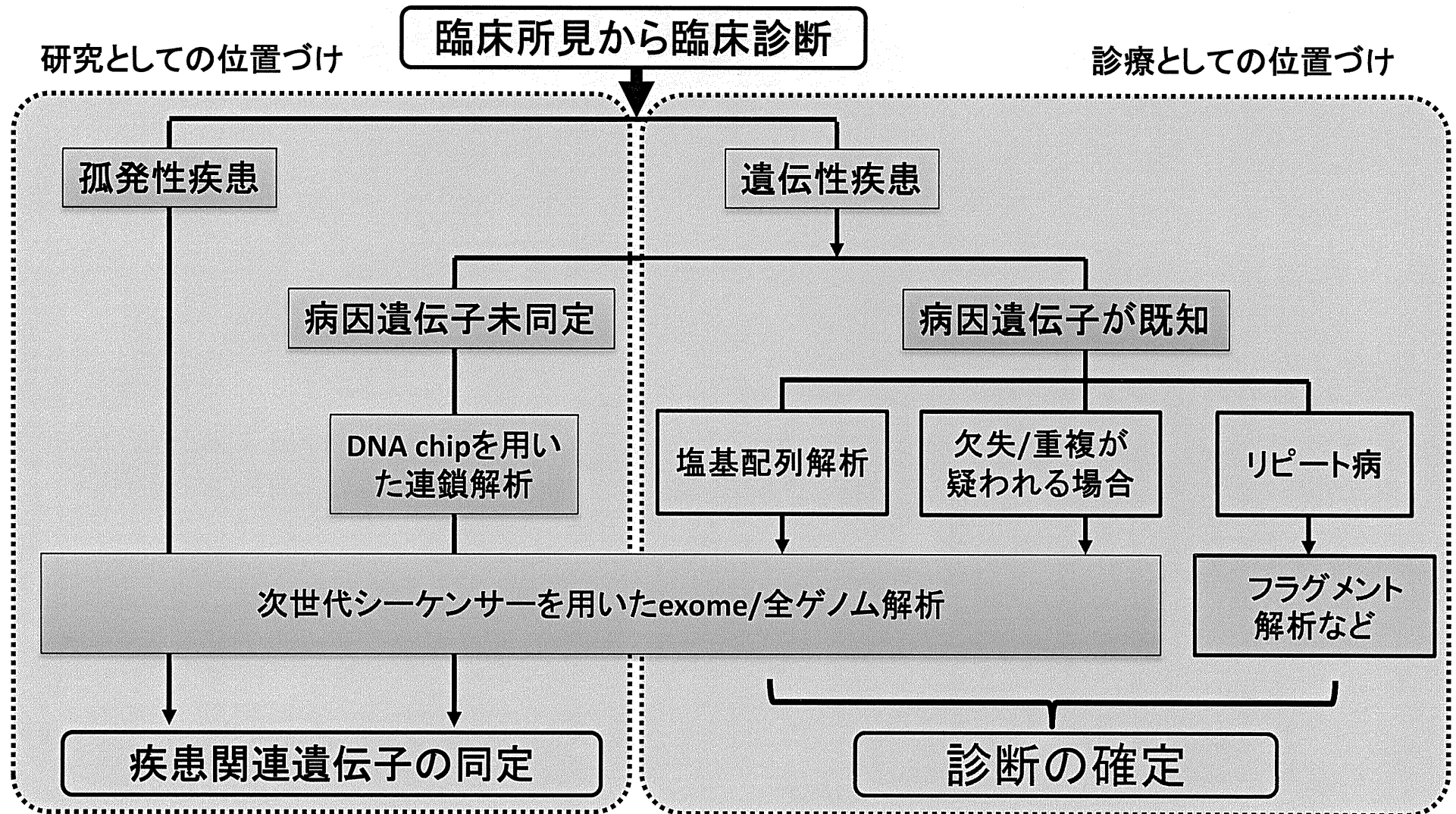
12: 117-21

2. 学会発表

- 1) S. Tsuji: Elucidating the molecular basis of neurodegenerative diseases based on personal genome analysis. 第34回日本分子生物学会, 横浜
- 2) 辻 省次: パーソナルゲノム解析に基づく疾患の分子病態機構の解明. 第84回日本生化学会, 京都

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

脊髄小脳変性症および遺伝性痙性対麻痺の病態解明に向けたシーケンス拠点の整備



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究
分担研究報告

南九州地域の遺伝性小脳失調症の遺伝子学的研究および
次世代シーケンス法による遺伝子診断の試み

南九州地域の常染色体優性脊髄小脳変性症の分子疫学、病態および新規疾患の確立に関する研究

研究分担者 高嶋 博 (鹿児島大学大学院 神経内科・老年病学講座)
共同研究者 西郷隆二 (鹿児島大学大学院 神経内科・老年病学講座)
樋口雄二郎 (鹿児島大学大学院 神経内科・老年病学講座)
崎山佑介 (鹿児島大学大学院 神経内科・老年病学講座)
岡本裕嗣 (鹿児島大学大学院 神経内科・老年病学講座)
平野隆城 (藤元早鈴病院 神経内科)
大窪隆一 (鹿児島大学大学院 神経内科・老年病学講座)

研究要旨

南九州地域(鹿児島、宮崎、沖縄)、東九州地域(大分)、愛媛における常染色体優性遺伝性の小脳失調を呈した211家系について分子疫学的検討を行った。鹿児島ではSCA31が22%と最も多く、次いでSCA6、Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS)、SCA3の順であった。鹿児島ではGSSが18%と他地域では類をみない頻度であり小脳失調症の鑑別として重要である。他の地域については、各々疾患集積性に違いを認めた。リピート伸長変異が確認できなかった原因未同定の家族性・優性遺伝性小脳失調症(AD-SCD)については、次世代シーケンス法を用いた遺伝子スクリーニング法(SCA5, 11, 13, 14, 15, 16, 23, 27, 28, 35)を構築し、試験的にはおよそ良好な配列が得られた。今後、多症例でのスクリーニングが可能となる。SCA31のpenta-nucleotide repeats挿入は、通常の2.5~3.8 kbの挿入を認めなかった南九州症例の家族例については、同部位に約7.0 kbの挿入を認めた。宮崎県の南部地域に小脳失調、パーキンソン症、自律神経障害、軽度の認知障害を伴う優性遺伝性のMSA様の変性疾患の家系を認めた。

A. 研究目的

南九州地域(鹿児島、宮崎、大分、沖縄)および愛媛県における遺伝性の小脳失調を呈する症例において、トリプレットリピート病であるSCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA8, SCA12, DRPLAに加え、GSSやSCA31を含めた

詳細な遺伝子診断を行い、その結果に基づいた疫学調査を行う。さらに、これらの遺伝子検査で原因未同定の症例について、伸長以外の変異(主に点変異)で発症する10つの既知のAD-SCD、すなわちSCA5, SCA11, SCA13, SCA14, SCA15, SCA16, SCA23, SCA27, SCA28,

SCA35 の遺伝的原因を同定するため、Roche 社 GS junior Genome sequencer を使用し、効果的な診断方法の構築を行う。

B. 研究方法

遺伝子検査に同意した優性・家族性遺伝性小脳失調症 192 家系について、SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA8, SCA12, DRPLA, SCA31 遺伝子のリピートの延長を PCR 法で調べた。また、GSS の P102L 変異は RFLP またはシーケンス解析により解析した。また、原因未同定の症例については、GS junior genome sequencer を用いて、スクリーニングを行い、SCA5, SCA11, SCA13, SCA14, SCA15, SCA16, SCA23, SCA27, SCA28, SCA 35 の全エクソンの塩基配列を解析し、点変異、欠失、挿入の有無を確認した。解析対象となる全エクソン数は 191 exons あり、設計した Primer 数は 211 組であった。

通常の 2.5~3.8 kb の挿入を認めなかった SCA31 の南九州の家族例については、PCR 法を変更し延長の同定、GS junior genome sequencer でリピート配列の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

これらの実験に使用する DNA 検体の使用については、鹿児島大学のヒトゲノム使用研究に関する倫理委員会で承認され、患者または家族全員から文書で遺伝子検査に関する同意書を得ている。

C. 研究結果

地域別にみると、鹿児島県においては SCA31 が最も多く、次いで SCA6、GSS、SCA3(MJD)が多い。その他、DRPLA や SCA8 の症例を認めた。GSS の多さは、他地域にお

いて類をみない。沖縄県では、DRPLA と SCA2 の重症型の小脳失調症が多かったが、SCA31 は認めなかった。宮崎県では SCA31、SCA6、SCA3 の順で多く、大分県では SCA6、SCA31 SCA3、の順で、軽症の小脳失調症の頻度が高かった。

また、原因未同定の家族性 SCD 患者 2 例については、GS junior システムを用いて試験的に遺伝子スクリーニング(SCA5, 11, 13, 14, 15, 16, 23, 27)を行った。複数箇所点変異を確認できたが、すべて synonymous codon であった。今回、解析で得られた塩基配列はスクリーニングに耐え得るだけの正確性とリード数であった。GS junior システムの処理能力を考慮すると、1 ランで約 10 症例の検体を同時に解析することが可能であり、今後、短期間かつ低コストでの解析が実現可能となるだろう。

Puratrophin 変異を持たずその他の SNPs を多数有しており、通常の 2.5-3.8Kb のリピートの挿入を持たない家族例については、既報告部位に約 7.0kb の挿入変異を確認した。GS junior genome sequencer での延長リピート解析においては、TAAAA、TAAAATAGAA のリピートが検出されたが、疾患関連性が疑われる TGGAA のリピートの検出には成功していない。

宮崎県の南部地域に小脳失調、パーキンソニズム、軽度の認知障害を伴う優性遺伝性の変性疾患の家系を認めた。臨床的に MSA にやや近い臨床像であった。

宮崎県南部の新しい小脳失調症については、これまでの疾患と合致せず、新しい疾患である可能性がある。今後さらなる調査を行う予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakiyama Y, Takashima H et al: A new phenotype of mitochondrial disease characterized by familial late-onset predominant axial myopathy and encephalopathy. *Acta Neuropathol*, 2011;121(6):775-783
- 2) Okamoto Y, Takashima H et al: A new mitochondria-related disease showing myopathy with episodic hyper-CKemia. *Ann Neurol*, 2011;70(3):486-492
- 3) Nishikawa N, Takashima H, Nomoto M: Three SCA2 siblings with Ataxia, Parkinsonism, and Motor Neuronopathy. *Intern Med*, 2011; 50(13): 1429-1432

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

特になし

F. 健康危険情報

特になし

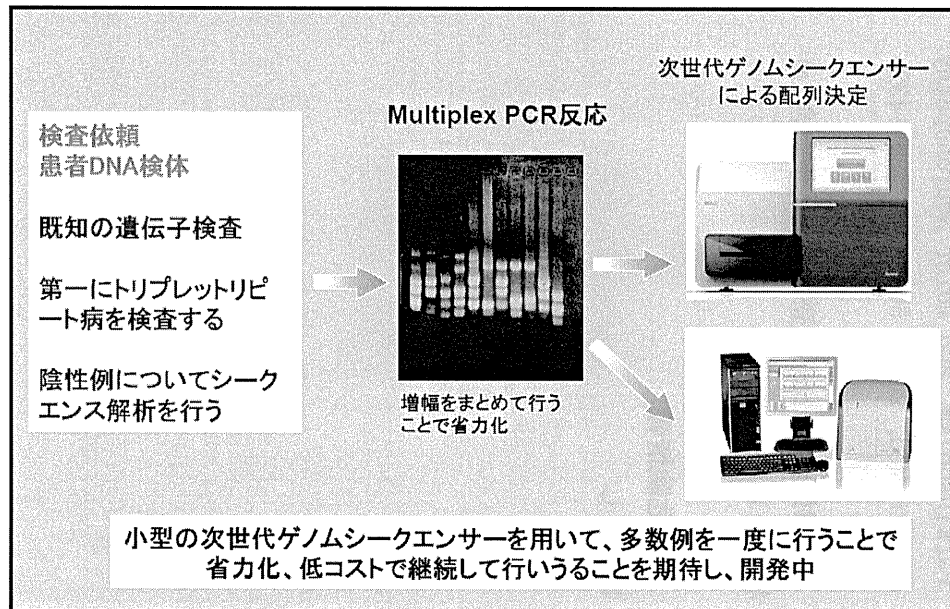
南九州地域の遺伝性小脳失調症の遺伝子学的研究および 次世代シーケンス法による遺伝子診断の試み

班員 高嶋 博 鹿児島大学 神経内科、老年病学

【目的】南九州地域における常染色体優性遺伝性の小脳失調を呈した211家系について、疫学的検討を行う。特に全国に多発する脊髄小脳変性症SCA31の研究およびSCAの包括的な遺伝子診断を行った。また、新しい包括的な遺伝子診断システムを構築する。

【結果】南九州、大分、沖縄、愛媛県の常染色体優性遺伝形式の小脳失調症の分子疫学が明らかとなり、地域でかなり分布が異なっていた。新しい遺伝子診断システムを構築中。

優性遺伝性小脳失調症 遺伝子診断システム 省力化、高速化、コスト低減したプロトコル



新しい遺伝子診断システムの構築に向けて

脊髄小脳変性症の遺伝子診断の多くはトリプレットリピートと呼ばれる繰り返し配列の延長でおこっています。しかし、それ以外の原因の場合には、膨大な遺伝子配列の決定が必要で、これまで手つかずになっていました。それを一度に解析する方法を開発しています。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究
分担研究報告

CNV 解析による MSA 素因遺伝子の探索

研究分担者	佐々木秀直	(北海道大学医学研究科神経内科学)
共同研究者	濱 結香、矢部一郎	(北海道大学医学研究科神経内科学)
	飯島 寛、江見 充	(DNA チップ研究所)
	加藤丈夫	(山形大学第三内科)
	森 文秋、若林孝一	(弘前大学医学研究科脳神経病理学講座)
	内海 潤	(北海道大学医学研究科神経内科学 非常勤講師)

研究要旨

第一世代の CNV57K アレイを用いて MSA に得意的な CNV 変化を検討した。対照は非血縁の MSA 患者 33 例、非神経疾患成人 100 例である。うち 1 組は一卵性双生児で片方のみ MSA を発病している discordant twin である。解析の結果複数の領域で MSA に限定して CNV 減少領域を認めた。双生児例について 400KG3 array を用いて解析を進めたところ、非血縁者と同じ 19p13.3 領域にコピー数減少領域を認めた。候補領域についてさらに高密度のカスタムアレイを設計して解析したところ、MSA33 例中 11 例にコピー数減少を認めたが、対照 25 例には減少を認めなかった。減少領域の重複から SHC2 が MSA 素因遺伝子候補と考えられた。凍結脳組織のウエスタンブロット解析では 5 例中 3 例で発現量の低下を認めた。今後、多数例での検証と共に、他の候補領域の検索が必要である。

A. 目的

多系統萎縮症は成年期に発症する非遺伝性疾患である、何らかの過環境因子と個人の発病素因の相乗効果で発症すると考えられているが、その実態は不明である。本研究では遺伝子を探索することを目的とした。

B. 対象

Consensus criteria により臨床診断した MSA32 例、対照群として非神経成人例 99 例につ

て CNV57K array (deCODE/ ILLumina) を用いて CNV 多型を解析した。二群間でコピー数多型に差の見られた領域について、カスタムアレイ (Agilent) を作製して MSA32 例、対照 20 例について候補領域をさらに詳しく解析した。候補領域の絞り込みは、片方のみ MSA を発病している一卵性双生児によった。双生児 2 組 (1 組は男性例、他の 1 組は女性例) について、全ゲノム網羅的 CNV 解析を行った (Agilent 3G 400K CNV array)。一卵性の遺伝学的検証は 300K SNP

array (Illumina HumanCytoDNP-12)、もう一組は 620K SNP array (Illumina Human 610 Quad) により検証した。素因遺伝子候補は、候補領域内で神経組織に発現している遺伝子を中心に探索した。ゲノム遺伝子地図は NCBI データベースを用いた。候補遺伝子の脳組織発現は、剖検凍結組織を用いてウエスタンブロットにより解析した。

(倫理面での配慮) 本研究は医の倫理委員会で審査承認を得た。被験者には口頭に加えて文章で説明し文書で同意を得た。

C. 結果

MSA 群と対照群の比較で、Odds 比 >4 で MSA 群にコピー数減少を示した領域は 17 領域あった (Odds 比範囲: 4~264)。双生児 2 組とも SNP 一致率 $>>99\%$ 以上あり、遺伝学的にも一卵性であることを確認した。一卵性双生児男性例の間で検出された欠失領域と、MSA vs. 対照群の比較により選択された候補領域との重複領域は 19p13.3 であった (図 1)。一卵性双生児 1 組では発症者 (HK33) 同領域のコピー数減少を認め (図 2)。同領域のカスタムアレイの詳細な解析により、MSA 患者に限定して SHC2 遺伝子のコピー数減少を MSA33 例中 11 例 (33%) に認めたが、対照群 25 例中にはコピー数減少を認めなかった。上記の解析の後に経験したもう一組の一卵性双生児例の 3G400K arrayt 解析では、同部分にはコピー数減少を認めなかった。

凍結組織のウエスタンブロット解析では、SHC2 発現は MSA5 例中 3 例に認められたが、他の 2 例、コントロール 5 例には発現低下を認めなかった。

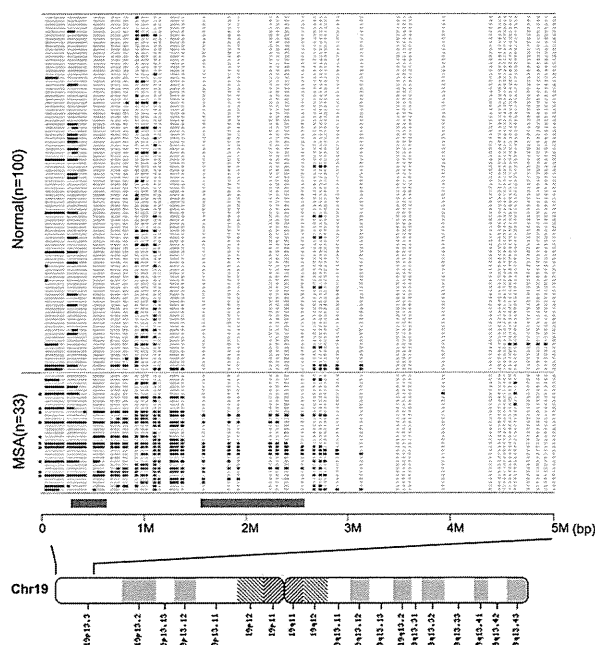


図 1. 19p13.3 領域の CNV の変化。

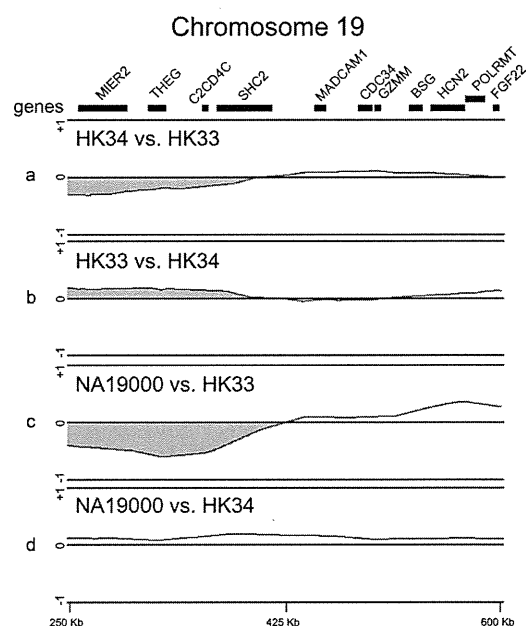


図 2. 一卵性双生児間に認められたコピー数の変化 (HK34 は非発症者、HK33 は発症者、NA19000 は正常対照)。

D. 考察

今回の解析により、CNVの共通部分にはSHC2のゲノム遺伝子の一部が共通している。SHC2は神経栄養因子の膜受容体のアダプタータンパクである。対象としたMSAの1/3に認められたことから、MSAの発症に関与していることが推定されるが、コピー数減を伴わない例が2/3もあるためその役割は少決定的なものではない。より多数例での検証が必要である。

MSA素因遺伝子は複数あると想定される。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sasaki H, Emi M, Iijima H, Ito N, Sato H, Yabe I, Kato T, Utsumi J, Matsubara K: Copy number loss of (src homology 2 domain containing)-transforming protein 2 (SHC2) gene: discordant loss in monozygotic twins and frequent loss in patients with multiple system atrophy. Mol Brain, 2011;4:24
- 2) 佐々木秀直, 江見 充: 多系統萎縮症の新しい発症メカニズム. 医学のあゆみ, 2011; 239:1216-1217

2. 学会発表

- 1) 佐々木秀直, 矢部一郎, 加藤丈夫, 江見 充, 飯島 寛, 伊藤紀子, 佐藤秀則: 一卵性双生児CNV解析による多系統萎縮症のゲノム

コピー数異常の同定. 第52回日本神経学会
学術大会, 2011年5月18日~20日, 名古屋

- 2) 石井美穂, 江見 充, 飯島 寛, 伊東紀子, 佐藤秀則, 加藤丈夫, 矢部一郎, 佐々木秀直: 多系統萎縮症 (MSA) における SHC2 遺伝子コピー数 (CNV) 異常. 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 2011 年 11 月 9 日~23 日, 千葉

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含)

特記すべきことなし

CNV解析の作業仮説と手順

