

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

家族性 MSA および MSA・PD 多発家系の全ゲノム解析

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

多系統萎縮症 (MSA) は孤発性で、原因不明の神経変性疾患である。国内の多施設共同研究体制 (JAMSAC) を基盤にして、家族性 MSA および家系内にパーキンソン病 (PD) 患者のいる MSA・PD 家系を集積してきた。これらの家系においては、遺伝因子の関与が強いと考えられるため、発症者の全ゲノム解析を行い、家族性 MSA の原因遺伝子、および孤発性 MSA の発症につながる感受性遺伝子を探索した。

A. 研究目的

多系統萎縮症 (Multiple system atrophy, 以下 MSA) は原則的に家族歴のない孤発性で、原因不明の神経変性疾患である。MSA の遺伝因子と自然歴を解明するため、国内の多施設共同研究体制 (Japan Multiple System Atrophy Research Consortium, 以下 JAMSAC) が構築され、通常の孤発性 MSA に加えて、家系内に複数の MSA 発症者のいる家族性 MSA (Hara K, et al., Arch Neurol. 2007) や、家系内にパーキンソン病 (以下, PD) 発症者のいる MSA・PD 家系などが集積されている。このような家系では遺伝因子の関与が強いと考えられるため、発症者の全ゲノム解析を行って、複数の家系で共通する遺伝子の変異などを手掛かりに、MSA あるいは MSA・PD に共通する遺伝因子を探索する。

B. 研究方法

対象は、両親が血族婚で発症者同胞 2 例の家族性 MSA 1 家系と、同胞に MSA・PD 発症者の複数いる多発家系 4 家系である。家族性 MSA 1 家系については同胞発症者 2 例、同胞非発症者 1 例について当科で開発した SNP HiTLink (Fukuda Y et al., BMC Bioinformatics. 2009) を用いて連鎖解析を行い、候補領域を定めた。次いで、家族性 MSA の発症者 1 例および、MSA・PD 発症者のうち MSA 発症者、PD 発症者それぞれ 1 例 (3 家系) と MSA のみ 1 例 (1 家系) について、Illumina GAIIx または HiSeq の 100 塩基 paired-end にて、全ゲノム配列再解析を実施した。

(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。

C. 研究結果および考察

全例でアライメント可能な 120~160 Gbp・平均被覆度 40~60 を得た。検出された一塩基置換変異 (single nucleotide variant, SNV) および small insertion/deletion (indel) のうち、エクソン領域・スプライシング領域のアミノ酸置換を伴う変異について既知の多型データベース dbSNP に登録されている SNV を除外した。

両親が血族婚の家族性 MSA については、常染色体劣性遺伝形式を仮定して連鎖解析による候補領域は 70 Mbp となり、同領域内にはデータベースにない SNV は 4 個認められた。

MSA・PD 多発家系については、「データベースに登録されていない」条件でフィルターすると、多発家系 P8 の MSA 患者で 354 個、多発家系 P30 の MSA 患者で 390 個、PD 患者で 379 個、多発家系 P31 の MSA 患者で 372 個、PD 患者で 364 個、多発家系 P33 の MSA 患者で 399 個、PD 患者で 365 個の SNVs/indels を認めた。

これらの変異のうち、「家系内で発症者が共有している」条件でフィルターすると、多発家系 P30 では 154 個、多発家系 P31 では 175 個、多発家系 P33 では 163 個の SNVs/indels を認めた。

これらの変異のうち、「遺伝子内に異なる変異が複数の家系で観察される」条件でフィルターすると、最終的に 14 個の遺伝子が同定された。

複数の家系で発症者がホモ接合性または複合ヘテロ接合性に変異を有する遺伝子は認められなかった。また、家族性 MSA の全ゲノム解析で候補となった変異を含む遺伝子は一致しなかった。

これら 14 個の遺伝子の中には、多様性に富み、データベースに登録されていない変異を多く含む遺伝子など、疾患と関連しない遺伝子も当然あると予想されるが、他の神経変性疾患との関連が示唆される遺伝子も含まれており、候補としてさらに、大規模な孤発性 MSA 症例での検索を含めて評価をしていく必要がある。

D. 結論

家族性 MSA および MSA・PD 多発家系について全ゲノム解析を行い、疾患と関連する可能性のある遺伝子、およびその変異を同定した。今後は、SNV, indel のみならず、構造変異などについても検索の幅を広げるとともに、家族例の追加解析、孤発性 MSA 症例についての大規模 exome 解析を進め、MSA 発症に関与する遺伝的要因の探索を進める。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

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)

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

MIBG 心筋シンチグラフィと嗅覚テストによるパーキンソン病と多系統萎縮症の鑑別

研究分担者 武田 篤 (東北大学大学院医学系研究科 神経感覚器病態学講座神経内科学分野)
共同研究者 菊池昭夫 (東北大学大学院医学系研究科 神経感覚器病態学講座神経内科学分野)
馬場 徹 (東北大学大学院医学系研究科 神経感覚器病態学講座神経内科学分野)
長谷川隆文 (東北大学大学院医学系研究科 神経感覚器病態学講座神経内科学分野)
菅野直人 (東北大学大学院医学系研究科 神経感覚器病態学講座神経内科学分野)
今野昌俊 (東北大学大学院医学系研究科 神経感覚器病態学講座神経内科学分野)
三浦永美子 (東北大学大学院医学系研究科 神経感覚器病態学講座神経内科学分野)

研究要旨

発症早期のパーキンソン病(PD)と多系統萎縮症(MSA)の鑑別に症候以外に脳 MRI など様々な鑑別方法があるが、時に難渋することがある。近年、MIBG 心筋シンチグラフィや嗅覚テストが両疾患の鑑別に有用であるとの報告がある。しかしながら、両検査のどちらが発症早期の PD と MSA の鑑別に有効であるかはまだわかっていない。そこで、発症早期の 42 人の PD 患者と 42 人の MSA 患者(MSA-P/-C: 19/23 人)に MIBG 心筋シンチグラフィと嗅覚テスト(OSIT-J)を施行し比較検討した。両疾患の群間比較において、MIBG の心臓縦隔比(H/M 比)と OSIT-J スコアは有意差を認めた($p < 0.0001$)。また、PD と MSA-P の群間比較では、H/M 比は有意差を認めなかったが、OSIT-J スコアは有意差を認めた($p < 0.0005$)。PD と MSA の鑑別において感度と特異度が、MIBG 心筋シンチグラフィではそれぞれ 85.71%と 76.20%であり、嗅覚テストでは 73.81%と 85.71%であった。このように嗅覚テストは MIBG 心筋シンチグラフィと比べて感度では劣るが特異度では優っており、特に PD と MSA-P の鑑別検査として推奨される。

A. 研究目的

MIBG 心筋シンチグラフィではパーキンソン病(PD)の心臓における MIBG の取り込みは一般的に低下しているが、多系統萎縮症(MSA)では低下は比較的軽度である。同様に嗅覚機能低下は MSA ではなく PD において目立つ傾向がある。MIBG 心筋シンチグラフィと嗅覚テストのどちらがより PD と MSA の鑑別、特に発症早期の鑑別に有効であるかはまだわか

っていない。そこで、MIBG 心筋シンチグラフィと嗅覚テストを PD と MSA 患者に施行し、特異度と感度を比較検討した。

B. 研究方法

発症早期の 42 人の PD 患者(64.6±6.53 歳)と 42 人の MSA 患者(62.9±9.67 歳、MSA-P/-C: 19/23 人)に MIBG 心筋シンチグラフィと嗅覚テスト(OSIT-J)を施行した。対象全患者に

認知症や副鼻腔炎、心臓疾患、糖尿病、自律神経障害、セレギリン投与はなく、2年後に診断が正確であったことを確認している。両群間の年齢、罹病期間に有意差はなかった。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言及び臨床研究に関する倫理指針(厚生労働省)に従って実施された。

C. 研究結果

MIBGの心臓縦隔比(H/M比)とOSIT-Jスコアの平均±標準偏差は、PDでは 1.55 ± 0.30 と 5.12 ± 2.95 、MSAでは 1.99 ± 0.31 と 9.07 ± 2.70 だった。両疾患の群間比較において、H/M比とOSIT-Jスコアは有意差を認めた($p < 0.0001$)。また、PDとMSA-Pの群間比較では、H/M比は有意差を認めなかったが($p > 0.05$)、OSIT-Jスコアは有意差を認めた($p < 0.0005$)。PDとMSAの鑑別において感度と特異度が、MIBG心筋シンチグラフィーではそれぞれ85.71%と76.20%であり、嗅覚テストでは73.81%と85.71%であった。

D. 考察

嗅覚テストはMIBG心筋シンチグラフィーと比べて、感度では劣るが特異度では優っていた。また、嗅覚テストは簡単に検査時間が短く、低コストであり、放射能にも被爆しないという利点があることから、PDとMSAの鑑別、特にPDとMSA-Pの鑑別検査として推奨される。

E. 結論

嗅覚テストは発症早期のPDとMSAの鑑別においてMIBG心筋シンチグラフィーより特異度が高く、特にPDとMSA-Pの鑑別に役立つ。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kikuchi A, Baba T, Hasegawa T, Sugeno N, Konno M, Takeda A: Differentiating Parkinson's disease from multiple system atrophy by [¹²³I] meta-iodobenzylguanidine myocardial scintigraphy and olfactory test. *Parkinsonism Relat Disord*, 2011;17:698-700
- 2) Hasegawa T, Konno M, Baba T, Sugeno N, Kikuchi A, Kobayashi M, Miura E, Tanaka N, Tamai K, Furukawa K, Arai H, Mori F, Wakabayashi K, Aoki M, Itoyama Y, Takeda A: The AAA-ATPase VPS4 Regulates Extracellular Secretion and Lysosomal Targeting of α -Synuclein. *PLoS ONE*, 2011;6:e29460

2. 学会発表

- 1) 菊池昭夫, 長谷川隆文, 小林理子, 菅野直人, 馬場徹, 今野昌俊, 岡村信行, 古本祥三, 谷内一彦, 田代学, 工藤幸司, 糸山泰人, 武田篤: 多系統萎縮症における[¹¹C]BF-227 PETの経時的変化. 第52回日本神経学会総会, 2011年5月18日, 名古屋
- 2) 長谷川隆文, 今野昌俊, 馬場徹, 菅野直人, 菊池昭夫, 武田篤: 培養細胞系を用いた α -synucleinプリオン仮説の分子病態解析. 第84回日本生化学会大会, 2011年9月22日, 京都
- 3) 長谷川隆文, 今野昌俊, 馬場徹, 菅野直人,

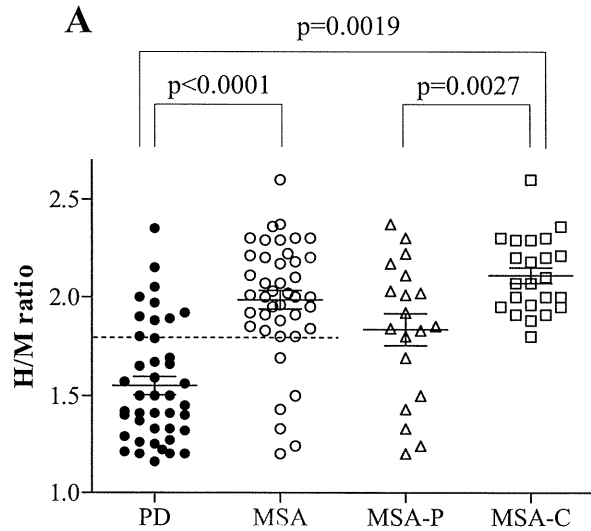
菊池昭夫, 若林孝一, 武田篤 : MVB sorting
機構は α -synuclein 分泌・ライソゾーム移
行に関する. 第5回パーキンソン病・運
動障害疾患コンgres, 2011年10月7日,
東京

- 4) 菊池昭夫, 長谷川隆文, 小林理子, 菅野直
人, 馬場 徹, 今野昌俊, 岡村信行, 古本祥
三, 谷内一彦, 田代 学, 工藤幸司, 糸山泰
人, 武田 篤 : 多系統萎縮症における
 [^{11}C]BF-227 PET の経時的変化. 第5回パ
ーキンソン病・運動障害疾患コンgres,
2011年10月8日, 東京

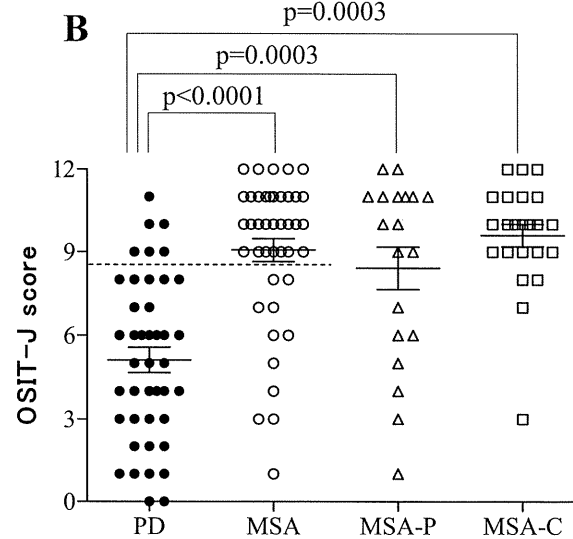
H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)
なし

MIBGとOSIT-J

MIBG

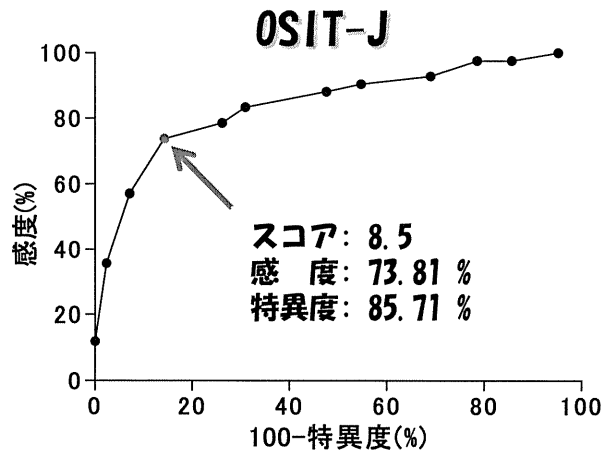
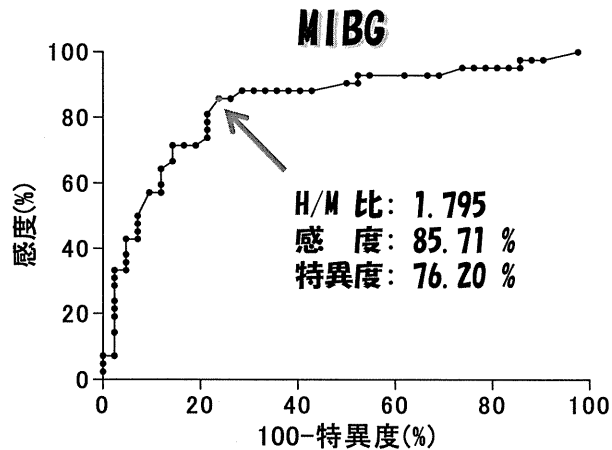


OSIT-J



PDとMSAの群間比較において、
H/M比とOSIT-Jスコアは有意差
を認めた ($p < 0.0001$)。
PDとMSA-Pの群間比較では、
H/M比は有意差を認めなかった
が ($p > 0.05$)、OSIT-Jスコアは
有意差を認めた ($p < 0.0005$)。

ROC曲線 (PD vs MSA)



嗅覚テストはMIBG心筋シンチ
グラフィーと比べて感度では
劣るが特異度では優っていた。

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

多系統萎縮症における Voxel-based morphometry と拡散テンソル像のバイオマーカーとしての可能性

研究分担者 祖父江 元 (名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科 教授)
共同研究者 伊藤瑞規、渡辺宏久、千田 譲、熱田直樹、中村亮一、渡辺はづき、
原 一洋、坪井 崇
(名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科)
長縄慎二 (名古屋大学大学院医学系研究科 放射線科)

研究要旨

多系統萎縮症 (MSA) において Voxel-based morphometry (VBM)、Mean diffusivity (MD)、Fractional Anisotropy (FA) を経時的に検討した。対象は MSA 12 例、コントロール 17 例。コントロールでは登録時、MSA では登録時から 2 年後まで半年ごとに頭部 MRI を撮影し、SPM5/VBM5 を用い、それぞれを比較した。また、近年拡散テンソル画像は撮影場所の違いにより同一の機械、プロトコルを用いても同様の結果が得られない可能性があることが報告されているため、今後治験など多施設で行えるバイオマーカーとなりうるか 2 施設で撮影し比較することを計画した。登録時、MSA ではコントロールと比較し、すべての方法で小脳、脳幹を中心に異常を認め、前頭葉を中心に少数の異常部位を示した。半年ごとの経時的な変化では登録時から変性が強く認められる小脳、脳幹での変化は乏しく、大脳において前頭葉から側頭葉、頭頂葉へ広がり、最後に後頭葉へ広範な変性の広がりを認めた。また、異なる 2 施設で同一機械、同一プロトコルで同一対象者を撮影し評価したところ VBM は有意な違いを認めなかったが、MD、FA は有意に結果が異なる部位が出現していた。VBM、MD、FA はいずれも MSA における病変、進行を明確にとらえることができ、MSA のバイオマーカーになりうる可能性があると考えられたが、多施設で用いるためには更なる検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

多系統萎縮症 (MSA) において、現在病期を正確に、客観的に評価できる指標 (バイオマーカー) は存在しない。しかしながら、今後の診療方針の決定や生活設計、治験などに際し、正確な病期、進行の程度を把握することは、極めて重要である。

Voxel-based morphometry (VBM)、Mean diffusivity (MD)、Fractional Anisotropy (FA) は、新しく開発された頭部 MRI の指標で、数値で表示される客観的な指標である。これまでの我々の検討により、これらの指標はいずれも MSA における脳病変の検出に有用であり、バイオマーカーになりうると考えられた。そこで、

これまでの結果を詳細に解析しバイオマーカーとしての可能性を検討した。

また、近年拡散テンソル画像は撮影場所の違いにより同一の機械、同一プロトコルを同一対象に用いても同様の結果が得られない可能性があることが報告されているため、今後治験など多施設で行えるバイオマーカーとなりうるか検討することも計画した。

B. 研究方法

対象はMSA 12例、コントロール17例。

全例3.0T MRI (Siemens, Germany) を用い、T1 強調画像 (TR/TE : 1570/2.15)、拡散強調画像 (EPI、TR/TE : 7700/75、b 値 : 1000s/mm²、MPG : 12 方向) を撮影した。VBM の解析にはSPM5/VBM5 を用い、標準化を行い、灰白質・白質を分離、平滑化を行い、コントロール、MSA の登録時、半年後から2年後まで半年ごとに比較した。FA、MD の解析はSPM5 を用い、標準化、平滑化を行いコントロール、MSA の登録時、半年後から2年後まで半年ごとに比較した。

また名古屋大学医学部附属病院と他施設の異なる2施設で同一機械、同一プロトコルで同一対象を撮影し、その違いを上記の方法を用い比較、評価した。

(倫理面への配慮)

3.0T MRI は、名古屋大学倫理委員会で承認されたプロトコルに準拠して施行した。全例文書による十分な説明を行い、文書による同意を得た。

C. 研究結果

VBM ではコントロールと登録時の比較で、脳幹および小脳に萎縮を認めた。半年後には前頭葉から側頭葉、頭頂葉へ萎縮が広がり、半年ごとにその範囲は拡大し後頭葉にも萎縮が広が

っていった。

MD でもコントロールと登録時の比較で、脳幹および小脳に変性を認めた。半年後には前頭葉から側頭葉、頭頂葉へ変性が広がり、半年ごとにその範囲は拡大し後頭葉にも変性が広がっていった。MD の変化はVBM と同様の広がりを認めた。

FA ではコントロールと登録時の比較で、脳幹および小脳に変性を認めた。半年後には大きな変性の広がりを認めなかったが、1年後に前頭葉から側頭葉、頭頂葉へ変性が急激に広がり、後頭葉にも変性が広がっていった。最終的な変性の広がりはVBM、MD と同様であった。

また、異なる2施設で同一機械、同一プロトコルで同一対象を撮影し、評価したところVBM は有意な違いのある部位を認めなかったが、MD、FA は有意に違いのある部位が出現していた。

D. 考察

MSA における半年ごとの経時的な変化では、登録時から変性が強く認められる小脳、脳幹での変化は乏しく、大脳において前頭葉から側頭葉、頭頂葉へ広がり、最後に後頭葉へ広範な変性の広がりを認めた。特に前頭葉では前頭前野から変性が始まり、前後へ広がり運動野が最後に変性をきたしていた。これらの指標をバイオマーカーとして用いる場合、小脳や脳幹は変化に乏しいため部位として適当ではなく、前頭葉を中心とした大脳を部位として選択する必要があると考えられた。

また、異なる2施設で撮影したVBM は有意な違いを認めず比較可能であると考えられるが、MD と FA は有意な違いを認めたため直接比較することは難しいと考えられた。将来、MD や FA を治験などのバイオマーカーとして用いるには、これらの誤差を補正するアルゴリズムの開

発が必要と考えられた。

E. 結論

VBM、MD、FA はいずれも MSA における病変、進行をわずか半年という短い期間においても明確にとらえることができ、MSA のバイオマーカーになりうる可能性があると考えられた。しかしながら多施設で用いるためには誤差が生じるため、これらを補正するアルゴリズムなどの開発が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyai I, Ito M, hattori N, Mihara M, Hatakenaka M, Yagura H, Sobue G, Nishizawa M: Cerebellar Ataxia Rehabilitation Trial in Degenerative Cerebellar Diseases. Neurorehabil Neural Repair, 2011 Dec 2 [Epub ahead of print]
- 2) Kato S, Watanabe H, Senda J, Hirayama M, Ito M, Atsuta N, Kaga T, Katsuno M, Naganawa S, Sobue G: Widespread cortical and subcortical brain atrophy in Parkinson's disease with excessive daytime sleepiness. J Neurol, 2012; 259(2): 318-326
- 3) Tsujimoto M, Senda J, Ishihara T, Niimi Y, Kawai Y, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Naganawa S, Sobue G: Behavioral changes in early ALS correlate with voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging. J Neurol Sci, 2011; 307(1-2): 34-40

2. 学会発表

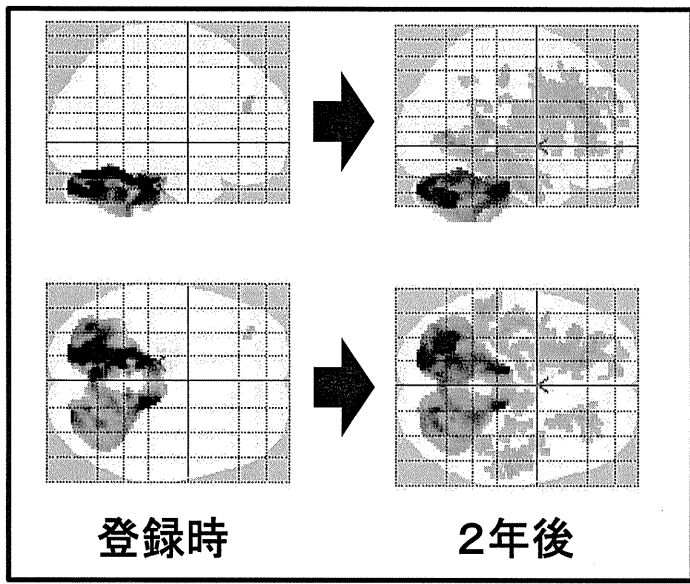
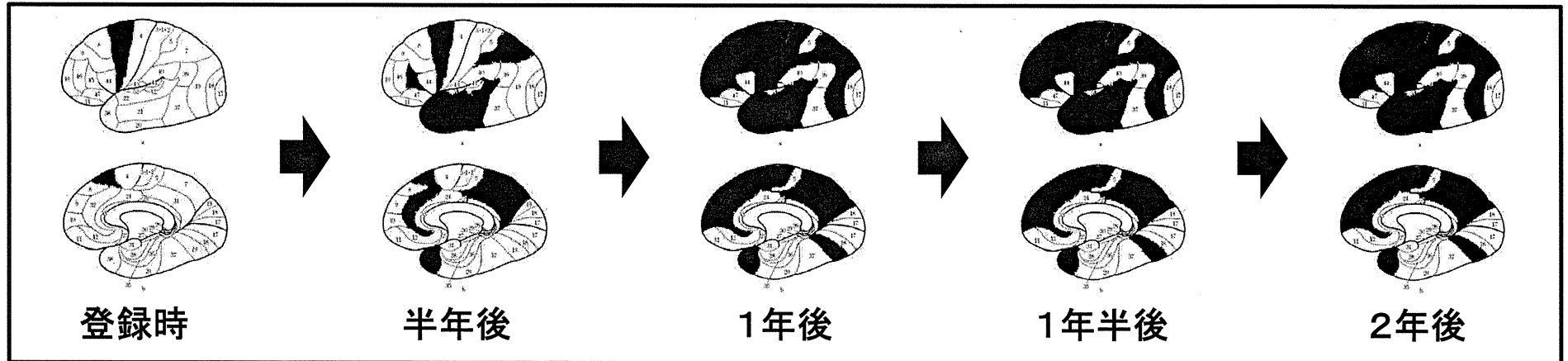
- 1) 伊藤瑞規, 渡邊宏久, 熱田直樹他: 多系統萎縮症における経時的な volumetry・拡散テンソル像の検討 (第3報). 日本神経学会総会, 2011年5月, 名古屋
- 2) 松本慎二郎, 足立弘明, 勝野雅央他: SCA1モデルマウスにおける 17-DMAG の病態抑止と効果およびその機序の検討. 日本神経学会総会, 2011年5月, 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

多系統萎縮症(MSA)は病期の進行を客観的に捉えにくい
 → 今後の治験などのために客観的指標(バイオマーカー)が必要

SPM5を用いたMDの比較



MSA患者の脳病変は、前頭前野から変性が始まり、前後に広がり、頭頂葉、側頭葉を経て、最後に後頭葉へ変性が広がる。

小脳や脳幹は登録時から強い変性が認められるが、短期間での変化は乏しい。

MSAの脳病変
 は短期間で広範囲に変化を来しており、バイオマーカーとなり得る可能性がある

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・多系統萎縮症の髄液サイトカイン・ケモカイン分析

研究分担者 吉良 潤一 (九州大学大学院医学研究院神経内科学)

共同研究者 松下 拓也 (九州大学大学院医学研究院寄附講座臨床神経免疫学)

研究要旨

脊髄小脳失調症 (spinocerebellar ataxia; SCA) では多くの遺伝子変異が明らかになり、診断に際して重要な役割を担っている。しかし日本における孤発性 SCA の頻度は 6 割を超えており、その大半を占める多系統変性症 (multiple system atrophy; MSA) を鑑別する有用なバイオマーカーはない。近年、筋萎縮性側索硬化症やパーキンソン病 (Parkinson's disease; PD) といった変性疾患における炎症機序が注目されており、当研究では脊髄小脳変性症 (spinocerebellar degeneration; SCD)、MSA、PD 患者脳脊髄液中の 27 種のサイトカイン・ケモカインを同時測定した。その結果 MSA 群において IL-8/CXCL-8、IP-10/CXCL10 が高い傾向にあることが明らかとなった。これらの結果は MSA における炎症促進性サイトカイン、ケモカインの関与を示唆している。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症 (SCD)、多系統萎縮症 (MSA)、パーキンソン病患者脳脊髄液中の 27 種のサイトカイン・ケモカインを同時測定し、疾患の鑑別に有用なパターンの存在を明らかにする。

B. 研究方法

SCD 12 例 (遺伝性 8 例、孤発性 4 例)、MSA 17 例 (MSA-C 15 例、MSA-P 2 例)、PD 10 例およびその他の非炎症性中枢神経疾患 (other non-inflammatory neurological disease; OND) 16 例の脳脊髄液を対象に、蛍光ビーズサスペンションアレイシステム

(BioPlex) を用いて 27 種のサイトカイン、ケモカイン、成長因子濃度を同時測定した (IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-12 (p70)、IL-13、IL-15、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α 、CXCL8/IL-8、CXCL10/IP-10、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1 α 、CCL4/MIP-1 β 、CCL5/RANTES、CCL11/eotaxin、G-CSF、GM-CSF、PDGFbb、bFGF、VEGF、IL-1ra)。各サイトカインの群間での比較には Mann・Whitney の U 検定を用いた。

C. 研究結果

SCD、MSA、PD、OND の 4 群間の比較では、MSA では IL-8/CXCL8 が SCD、OND と

比較して高く（それぞれ $p=0.044$ 、 0.049 ）、IP-10/CXCL10 が OND より高かった（ $p=0.020$ ）（図）。IL-6 も有意差には至らなかったが、SCD と比較して MSA で高い傾向がみられた（ $p=0.066$ ）。また PD においても IL-8/CXCL8 は OND より高かった（ $p=0.037$ ）。一方で罹病期間と CXCL-8、CXCL10 の間に有意な相関は確認されなかった。

D. 考察

MSA の病理像ではグリア、ニューロンにおける α -synuclein 陽性の封入体が認められるとともに、ミクログリアの活性化がみられる。こうした活性化ミクログリアは様々な炎症性サイトカイン、ケモカインを産生し、細胞傷害を惹起・促進すると考えられている。

また IL-1A の regulatory region、IL-8 の promoter region の多型により MSA 発症リスクに違いがある事が報告されている。また PD についても黒質線状体における TNF α 、IL-1 β 、IL-6 の上昇が報告されている。

今回、IL-8/CXCL8 が MSA、PD 群で OND より高く、IP-10/CXCL10 が MSA 群で OND より高い結果が得られたが、これらの結果は α -

synucleinopathy における炎症促進性サイトカイン・ケモカインの関与を示唆するものと考えられる。

E. 結論

IL-8/CXCL8 が MSA、PD 群で OND より高く、IP-10/CXCL10 が MSA 群で OND より高かった。MSA における炎症促進性サイトカイン・ケモカインの関与が示唆された。

F. 健康危険情報

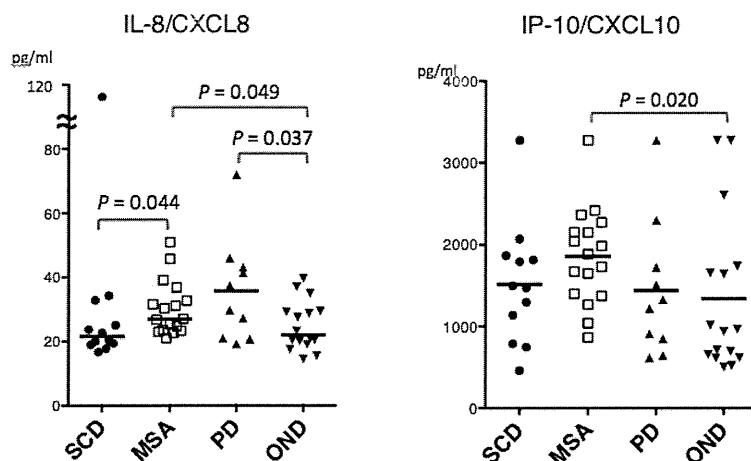
なし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。



• MSAの病態機序

α-synuclein positive
glial cytoplasmic inclusion,
neuronal cytoplasmic inclusion



Microgliaの活性化

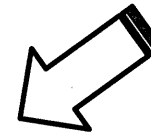


Proinflammatory
cytokines

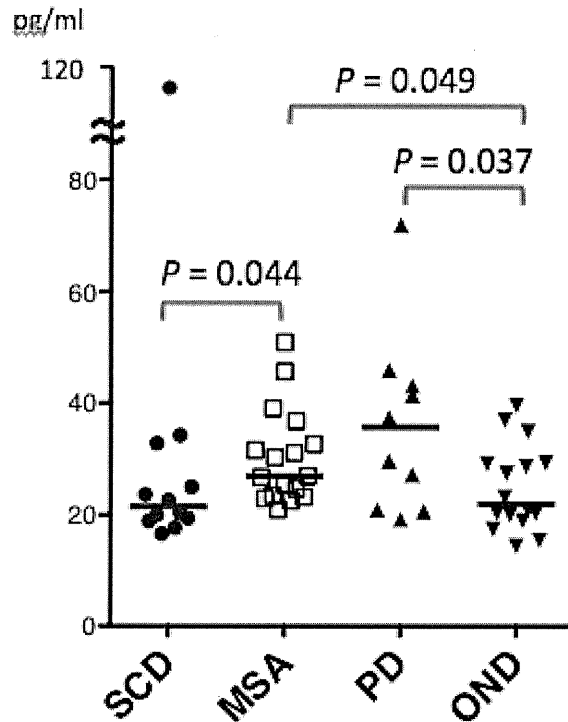
- IL-1A, IL-1B
- IL-6
- TNF-α

Chemokines

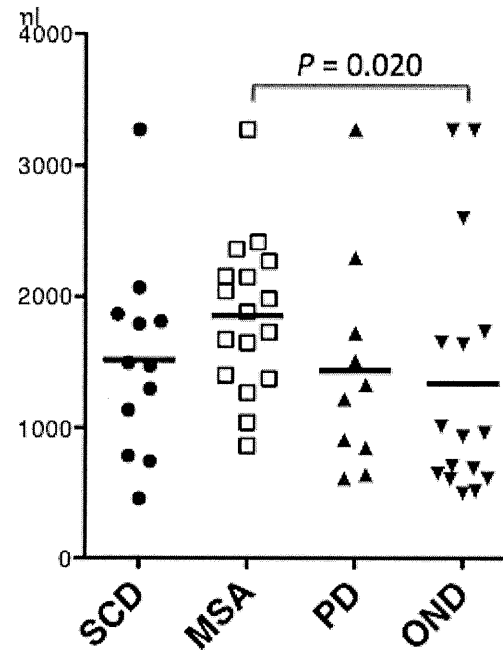
- IL-8, ICAM-1



IL-8/CXCL8



IP-10/CXCL10



Cytotoxicity

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

MSA における血中 MMP3 と TIMP1 の意義

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 矢部一郎、佐久嶋 研、濱 結香
(北海道大学医学研究科神経内科学)
内海 潤 (同 非常勤講師、京都大学大学院薬学研究院)
高橋育子、佐藤和則 (帯広厚生病院神経内科)
松島理明 (市立函館病院神経内科)

研究要旨

髄液の LC/MS/MS 解析により検出されたバイオマーカー候補より、Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP1) 及びそれと共役する matrix metalloproteinase-3 (MMP3) について、血中濃度を ELISA 法により定量し、MSA の病型、SARA、UMSARS との相関性を解析した。対象は MSA 34 人、対照は非神経疾患成人 45 人である。その結果、対照群では TIMP1 濃度に性差をみとめなかったが、MMP3 は女性より男性に有意に高値を示した ($P < 0.0001$)。TIMP1 と MMP3 は共に年齢と相関を認めなかった。40 歳以降の対照群 ($n=36$) と MSA 群 ($n=34$) を比較した結果、TIMP1 は両群で有意差無し；対照群に比して MMP3 は MSA 群全体では有意差はないが、男性群のみ MSA 群で有意に低下；MMP3/TIMP1 比も MSA 男性群で有意に低値を認めた。病型別比較では、TIMP1 に差を認めず、MMP3 は男性群で MSA-C より MSA-P で低下傾向あり。重症度との Spearman 順位相関解析では、TIMP1 は SARA と正の相関あり (MSA 全例)、男性のみ UMSARS part 1 と正の相関あり、MMP3 は男性群のみ SARA、UMSARS part 1&part 2 と有意な負の相関を認めた。MMP3/TIMP1 比は男性群でのみ SARA、UMSARS part1& part2 共により明瞭な負の相関を示した。以上より、TIMP1 と MMP3 は、特に男性例において MSA の重症度と相関する分子マーカー候補として有望であることが示唆された。

A. 研究目的

多系統萎縮症の上昇度を反映する生化学的な指標は知られていない。そこで、MSA の診断及び重症度判定に役立つ分子マーカーを開発することを目標とした。

B. 方法

対照群と各種神経疾患群の脳脊髄液 CSF について予め LC/MS/MS 解析を行い MSA マーカー候補として選別されたペプチド群より、Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP1)、及

びその標的酵素である Stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3: MMP-3) について、ELISA 法により血漿濃度を定量し、臨床病型、SARA、UMSARS との相関性を検討した。採血時時に、重症度も判定した。対象は MSA 例 34 人(男 13 人、女 21 人; 平均 53.9 ± 14.8 歳、範囲 43-80 歳)、対照群は非神経疾患の成人 45 人(男 24 人、女 21 人; 平均、 53.9 ± 14.6 歳、40 歳以上 36 人、39 歳以下 9 人、範囲年齢 28-83 歳)である。候補分子のネットワークは MetaCore により解析した。統計学的検討は StatView を用いた。すなわち、二群間の比較は予め分散検定を行った上で、t 検定を行った。重症度など臨床指標との相関解析は Spearman の順位相関解析による。

(倫理面への配慮)

当研究は医学部医の倫理委員会及び病院の自主臨床研究審査委員会での承認を得た。対象者への説明は口頭と文書で行い、文書で同意を得て行った。

C. 結果

対照群において TIMP1 は女 86.5 ± 25.7 ng/ml、男 87.9 ± 23.4 で性差を認めなかった。一方、MMP3 は女 7.3 ± 3.0 ng/ml、男 17.0 ± 6.6 で有意差を認めた ($P < 0.0001$)。TIMP1 と MMP3 共に年齢との相関を認めなかった (図 1)。

層別解析で 40 歳未満を除いた対照群 36 例と MSA 群で比較した。TIMP-1 は両群間で有意差を認めなかった。MMP3 は男性で対照群 17.3 ± 7.3 ng/ml ($n=17$) に対して MSA 群では 10.1 ± 5.5 ng/ml ($n=13$) と有意に低下していた ($p=0.0043$)。病型間の比較では、発病初期は MSA-C であったが評価時には MSA-P であった群 ($n=4$) と SND ($n=2$)

では、特に MMP-3 は低値であった。

重症度との相関を検討した結果、TIMP-1 と SARA は全体で緩い正の相関があり (相関係数 $\rho = 0.373$, $p=0.0378$)、特に男性で強い相関を示した ($\rho = 0.636$, $p=0.0022$)。TIMP-1 は男性例で UMSARS part1 と正の相関あり ($\rho = 0.678$, $p=0.0146$)、UMSARS part1 とともに正の相関を認めた ($\rho = 0.508$, $p=0.0672$)。

MMP-3 は男性患者のみに有意な負の相関を SARA ($\rho = 0.845$, $p=0.0023$)、UMSARS part1 ($\rho = 0.860$, $p=0.0019$)、UMSARS part2 ($\rho = 0.837$, $p=0.0025$) において認めた。

TIMP-MMP 系で活動度の指標として使われている例に習い MMP3/TIMP1 比と臨床指標との相関性を検討したところ、男性患者においては SARA ($\rho = -0.871$, $p=0.0017$)、UMSARA part 1 ($\rho = -0.901$, $p=0.0011$)、UMSARA part 2 ($\rho = -0.864$, $p=0.0018$) のいずれにも示すように、高い負の相関係数を示した。

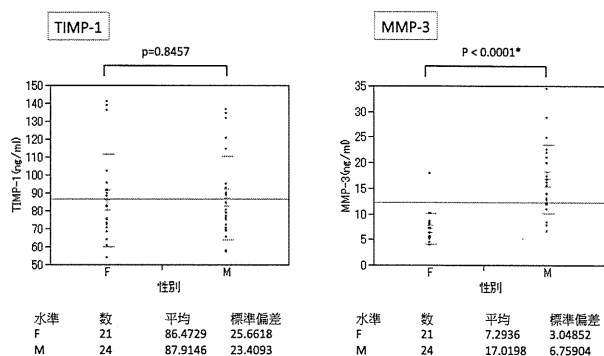


図 1 TIMP-1 と MMP-3 の性差

D. 考察

TIMP1 は Xp11.3 上の synapsin 1 遺伝子の第 6 イントロンにコードされているタンパクで、MMP3 を選択的に阻害する。現在まで 4 種類の

TIMP と 28 種類の MMP が同定されていて、個体発生から何らかの障害と変性に伴う組織修復に関わっているとされる多機能タンパクである。最近の研究では成人の中枢神経系において、TIMP-1 の発現は平時には少ないが、何らかの損傷があると病巣周辺の astrocyte より産生され細胞外に分泌される。TIMP-1 は oligodendrocyte の成長因子であり、かつその前駆細胞 OPC の oligodendrocyte への分化を促進するとされる。MMP3 は主に microglia より産生されて細胞外に分泌される。MMP3 は細胞膜の各種神経栄養因子の受容体を活性化させる。それとともに、細胞外マトリックスを分解するので、脳血管閉塞などは局所的に機能を損なうと推定される。MSA では oligopathy と称されるほどに oligodendrocyte の変性が強いことから重症度が高いほどに TIMP1 が高値であること、そして TIMP1 が活性抑制する MMP3 は重症例程に低値となり MMP3 と重症度が負の相関をなすことは論理的であるようにみえる。MMP3 は microglia の活性化により誘導され、MMP3 の抑制が神経細胞死につながることで、また MMP3 による α シヌクレイン分解物がドーパミン作動性神経細胞に毒性を有すること、さらに TIMP1 の減少が oligodendrocyte の apoptosis を促進することなど、最近の報告は両因子が MSA 病態の分子機構においても関与していることを示唆している。自験例は少ないので、今後多数例での検証が必要である。

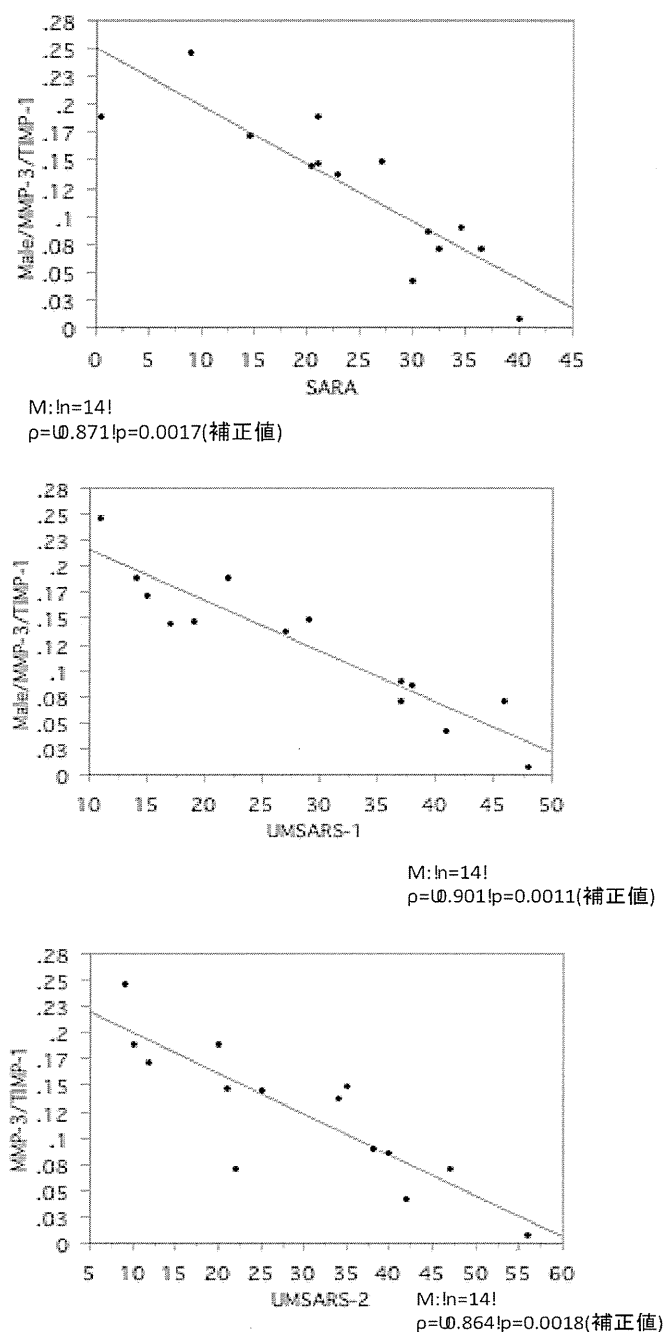


図2 重症度の MMP3/TIMP1 との負の相関

E. 結論

重症度と相関する MMP3 と TIMP1 は、特に男性例において、MSA の分子マーカーとして有望である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

G. 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 啓, 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~12日, 千葉

TIMP1とMMP-3は神経組織の修復、ホメオスターシスに関係している



血中TIMP1は重症度と正の相関



血中MMP3は重症度と負の相関



相関はMMP3/TIMP1比で強くなる



MSA男性例では重症度の指標候補となる。
MSA女性例では相関性は弱い。



性差の原因と意義について検討を要す

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

MSA 発症／非発症の一卵性双生児における
トランスクリプトーム解析による疾患関連因子の探索

研究協力者 内海 潤 (京都大学大学院薬学研究科)
共同研究者 佐々木秀直、濱 結香、矢部一郎
(北海道大学医学研究科神経内科学)
緒方昭彦 (北海道脳神経外科記念病院)

研究要旨

MSA の病態に関与する関連因子をトランスクリプトーム解析で探索する目的で、血縁並びに非血縁の MSA 患者 6 人と対照の健常成人 6 人の末梢白血球のトランスクリプトーム解析を行った。検出された遺伝子群はバイオインフォマティクスソフトでオントロジー解析を行った。その結果、患者群で up regulation していた因子群は、immune response であり、down regulation 因子群は transmission of nerve impulse と neurological system process であった。炎症反応が亢進し、神経伝達の抑制とシナプス伝達の抑制が起きていることが示唆された。二組の双生児の発症と非発症の比較でも同様の傾向であったが、特定因子に絞り込まれている傾向があった。末梢血白血球が全身の遺伝的素因を反映しているとするれば、MSA で発現異常となっている因子の挙動が反映された結果と推察される。

A. 研究目的

MSA の病態に関与する関連因子をトランスクリプトーム解析で探索する。

B. 研究方法

対象は Consensus Criteria により臨床診断された MSA 患者 6 人と対照群としての成人 6 人で、その内訳は、非血縁の MSA 患者 4 人(男性 3、女性 1)、片方のみ MSA を発病している discordant monozygotic twin 2 組(男女、各 1 組; 計 4 人)、及び非血縁の健常な成人照群 4 例(男性 3、女性 1)である。被験者末梢血より leukoLock® (Ambion) で白血球を分離し、

mRNA を抽出して Whole Human Genome 4x44K (Agilent) により発現解析を行った。双子の一卵性の検証は、一組は 620K SNP chip にて、もう一組は 300K SNP array にて一致率の高さから一卵性であることを確認した。発現遺伝子群のバイオインフォマティクス解析は、患者群(n=6)を 1 群として対照群(n=6)と比較し、次に血縁間(双生児)の比較を行った。解析手順は次のとおりである：①遺伝子発現を up regulation/down regulation に分類し、健常人に対する変動率 1.5 倍以上の遺伝子を解析対象とした。②変動遺伝子の機能解析はバイオインフォマティクス・ツール“DAVID”(米国 NIH)

でオントロジー解析 (biological process) を用いた。③統計的有意性で上位のオントロジー群に含まれる遺伝子を疾患関連因子として抽出した。④疾患関連因子の相互関連性解析は、バイオフォマティクス・ツール “MetaCore” (ThomsonReuter) によるネットワーク解析で行った。⑤論理的パスウェイを描いて、疾患関連因子の病態との関係を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床試料は被験者の同意の下に提供され、匿名化のうえ分析された。

C. 研究結果

上位のオントロジー群に含まれる因子群が特徴的な生体内イベントの反映と考えられる。患者群で up regulation していた因子群は、immune response であり、一方、最も有意差が小さく検出された down regulation 因子群は transmission of nerve impulse と neurological system process で、次に検出された down regulation 因子群は血管新生系とイオン輸送系であった。二組の双生児の発症と非発症の比較でも同様の傾向であったが、特定因子に絞り込まれている傾向があった。

D. 考察

検出されたオントロジーで immune response は、補体とサイトカイン系因子が中心で、炎症反応が起きていることを示唆している。一方、down regulation の transmission of nerve impulse と neurological system process は、神経伝達の抑制とシナプス伝達の抑制が起きていることを示唆し、Ca チャネル、ドパミ

ン、ニューロペプチドなどに関連する因子が抽出された。次に検出された down regulation 因子群の血管新生系とイオン輸送系では、酸素補給とイオン供給が抑制され、神経変性に繋がっているイベントの可能性が示唆された。

E. 結論

バイオフォマティクスソフトを駆使した末梢血白血球のトランスクリプトーム解析により抽出された因子は文献上も MSA の病態に関わっているものが多かった。末梢血解析であるので、その解釈は慎重でなければならないが、末梢血白血球が全身の遺伝的素因を反映しているとすれば、MSA で発現異常となっている因子の挙動が反映された結果と推察される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含)

なし