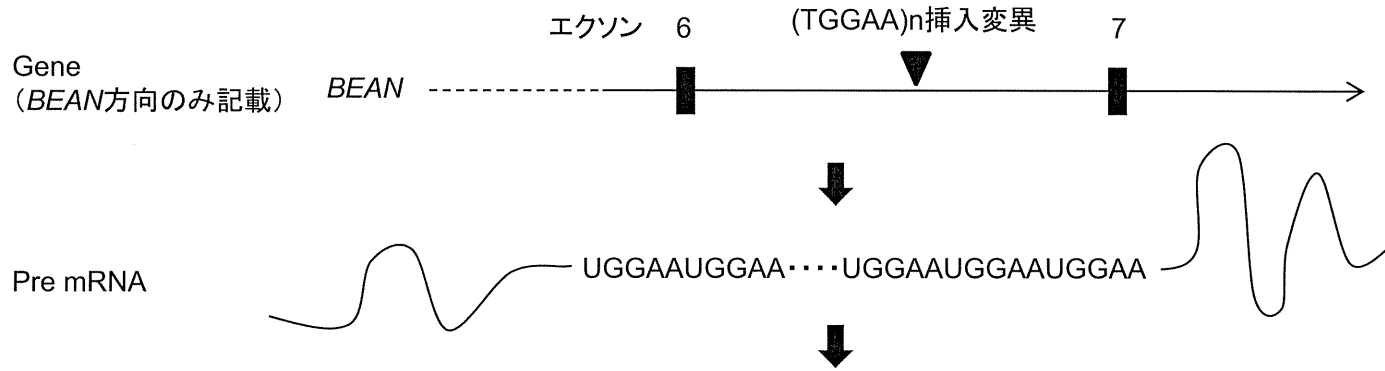
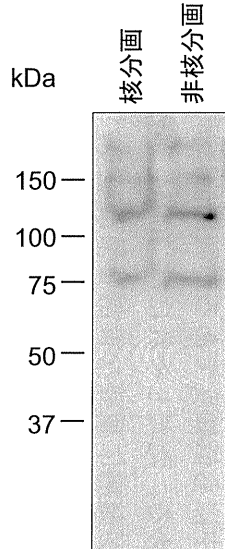


脊髄小脳失調症31型(SCA31)のtoxic RNA gain-of-function仮説の検証

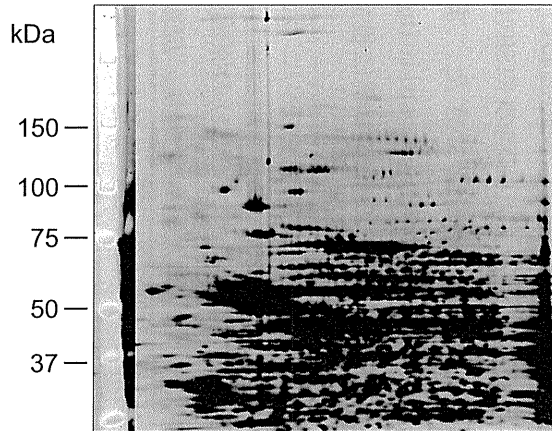


過剰伸長した(UGGAA)nが核内に蓄積, あるいは細胞質内に移行して何らかの蛋白と相互作用し, 神経毒性を発揮する

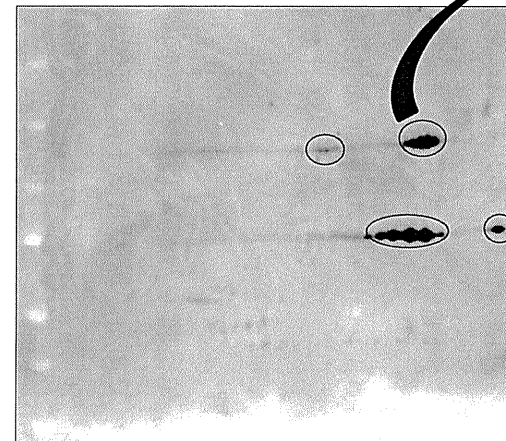
1D-gel North-western blot
biotin-(UGGAA)₅ probe



2D-gel SYPRO Ruby-stained
pH 4.0 pH 7.0



2D-gel North-western blot
biotin-(UGGAA)₅ probe



ゲルから対応するスポットの
切り出し
↓
脱色・脱水, 還元・アルキル化
↓
ゲル内消化(トリプシン)
↓
nanoLC-MS/MS解析
↓
Mascot/ProteinLinx検索
↓
(UGGAA)nに結合する候補蛋
白の同定

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知治療法開発に関する研究

分担研究報告

細胞モデルを用いた脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)の分子病態探索

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))

新美祐介 (東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科))

大林正人 (東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科))

高橋 真 (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

2009年に我々が報告した脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)は日本で頻度の高い脊髄小脳変性症(SCD)である。原因遺伝子は *BEAN* および *TK2* という逆方向に転写される遺伝子の共通したイントロン内の挿入配列であることが分かっているが、発病のメカニズムは不明である。この原因遺伝子の振る舞いを調べるために、挿入配列が発現するような細胞モデルを作製し、生化学的、免疫化学的に解析を行った。細胞においては *BEAN* 方向の転写産物である UGGAA の繰り返しのみが細胞に毒性を与え、また細胞の FISH(fluorescence in situ hybridization)では核内に UGGAA からなる RNA foci が確認できた。また foci の一部はスプライシングファクターである SFRS1(serine/arginine-rich splicing factor1)と共局在を示した。この細胞モデルをさらに解析することで、SCA31 の病態解明に役立つと考えられた。

A. 研究目的

脊髄小脳失調症 31 型(SCA31)の原因遺伝子は 2.5-3.8kb の挿入配列であり、*BEAN*、*TK2* という反対方向に転写される遺伝子に共通したイントロン内に存在する。その配列は TGGAA, TAAAA, TAGAA などの繰り返し配列からなる複雑な構造をしている。一方健常人の中にも低頻度であるが同部位に挿入配列を認める。ただしそれには TGGAA がなく、TGGAA が発病に重要な役割を果たしていると考えている。その機序は不明であるが、患者プルキンエ細胞内では FISH にて核内に UGGAA からな

る RNA foci を認め、また in vitro において UGGAA の繰り返しが SFRS1 と結合することが示されており、RNA を介した機構の可能性はある。この SCA31 および健常人由来の挿入遺伝子を培養細胞へ導入し、一過性発現および安定発現する細胞株を作製することでその影響を評価した。

B. 研究方法

患者 DNA から得た挿入配列を用いて発現用プラスミドベクターを作製し、HEK293T, PC12 細胞にリポフェクション法で導入し一過性発

現および安定発現細胞を作製した。細胞に与える影響を細胞増殖試験(MTS アッセイ)および細胞毒性試験(LDH アッセイ)などで評価した。また TGGAA を検出する RNA プローブを作製し、それを用いて FISH を行い、同時に抗 SFRS1 抗体で蛍光免疫染色を行った。

C. 研究結果

一過性発現, 安定発現細胞ともに MTS アッセイ, LDH アッセイにおいて TGGAA を含む患者由来配列を導入された細胞(SCA31)でのみ毒性が認められた。一方 SCA31 患者の TK2 側配列である TTCCA (Rev. SCA31)や健常人由来である TAAAA, TAGAA の繰り返し配列(control)では毒性は明らかではなかった(図1)。また FISH および蛍光免疫染色では TGGAA を発現する細胞でのみ, UGGAA からなる RNA foci を認め, その一部は SFRS1 と共局在を示していた(図2 矢印)。

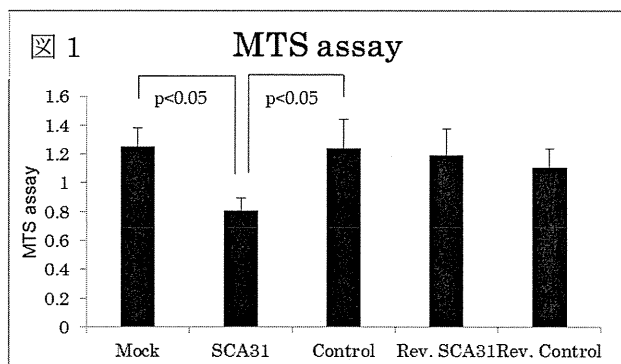
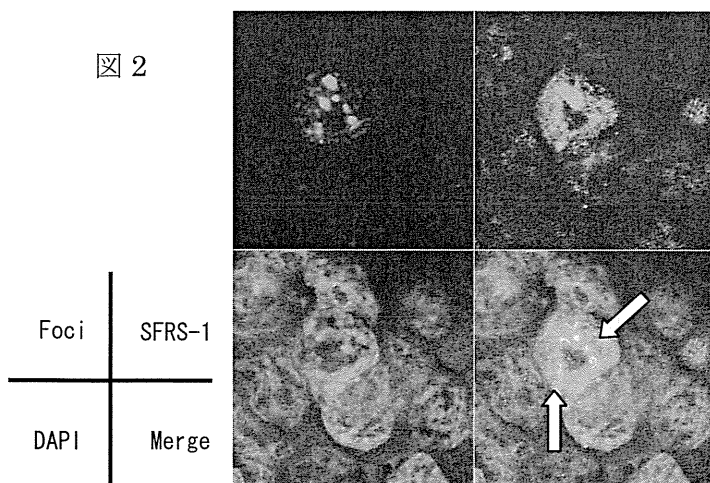


図 2



以上のことから TGGAA の転写産物である UGGAA の繰り返し配列だけが細胞に毒性を与え, 挿入配列内の TGGAA が原因遺伝子であるという考えを裏付ける結果であった。一方 TK2 側の TTCCA や TAAAA, TAGAA などは毒性を示さず, foci の形成も認めなかった。理由は不明だが, RNA としての安定性なども関与しているかもしれない。今後この細胞モデルを用いることで, 発病機序の解明や治療法の開発などに役立つ可能性があると考えている。

D. 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 Nov 15; 77 (20): 1853-5
- 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 (*ITPR1*) 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 $\alpha 1A$ 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
- 11) Niimi Y, Ishikawa K, Sato N, Mizusawa H: RNA mediated neurodegeneration in SCA31, a non-coding pentanucleotide repeat expansion disorder common in

Japan. 4th International Symposium of
the Society for Research on the
Cerebellum, 2011年9月18日, 東京

E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

なし

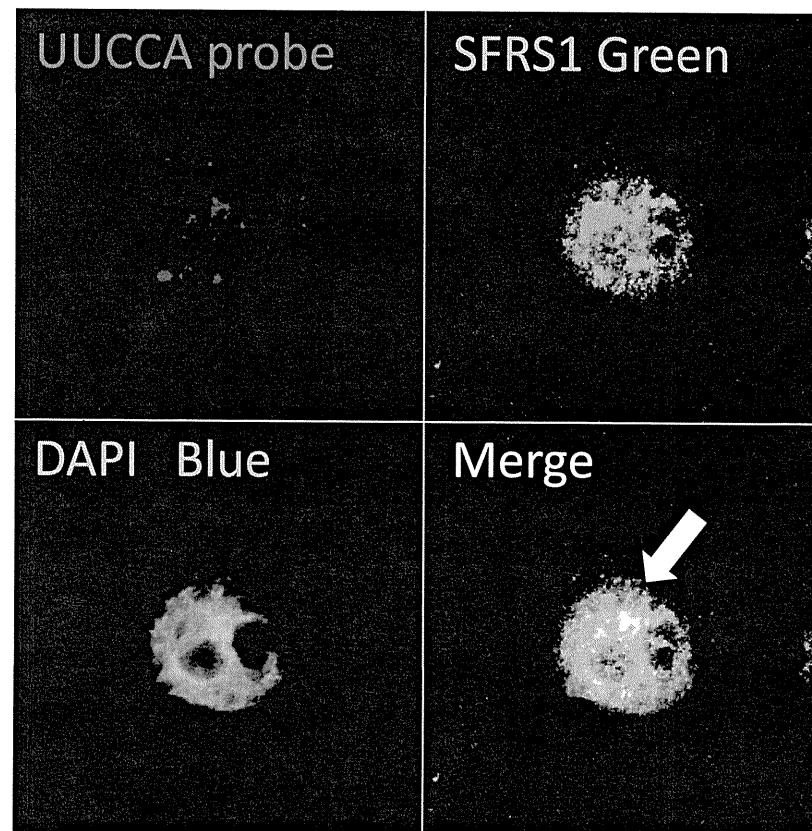
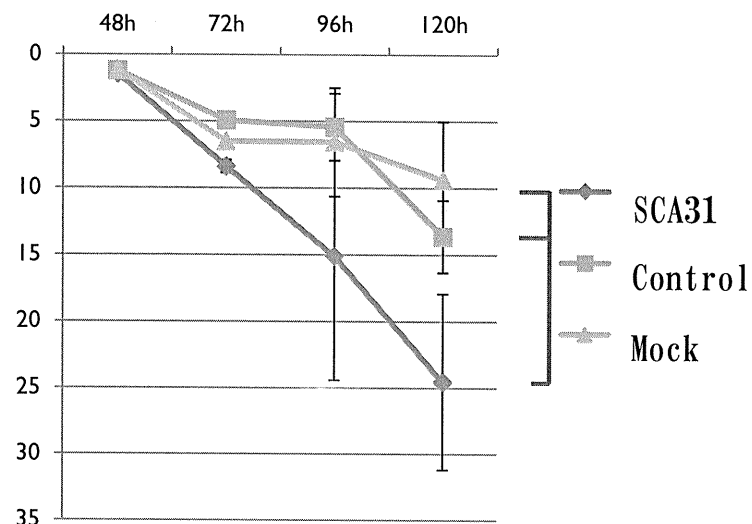
F. 健康危険情報

なし

SCA31の変異配列は RNAで毒性を発揮する

結果①UGGAAを発現するPC12細胞は，RNAとして毒性を示す。

結果②UGGAAを安定発現するPC12細胞ではRNA fociを形成し，スプライス因子SFRS1と共局在する。



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

新しい SCA/ALS crossroad mutation Asidan

研究協力者 阿部康二 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学)

共同研究者 池田佳生、松浦 徹

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学)

小林 果、人見敏明、小泉昭夫

(京都大学大学院医学研究科 環境衛生学分野)

土生敏行 (京都大学放射線生物研究センター)

研究要旨

小脳失調症と運動ニューロン疾患を合併した常染色体優性遺伝性疾患 (Asidan) の3家系における連鎖解析の結果 chr. 20p13 領域に 4.60 のロッド値を認め、さらに fine mapping と最小候補領域に存在する遺伝子の DNA シークエンシングを行い、nucleolar protein 56 (NOP56) 遺伝子イントロン1に存在する GGCCTG の6塩基繰り返し配列の異常延長を原因遺伝子変異として同定した (SCA36)。Asidan/SCA36 の臨床像は小脳失調症で発症し、罹病期間が進むと共に舌や四肢の筋萎縮・線維束性収縮などの運動ニューロン障害が明らかとなる点が従来の SCA では認められない特徴であることが判明した。また、患者リンパ芽球における RNA-FISH 解析では、核内に延長した GGCCUG リピート転写産物からなる RNA-foci を認め、RNA gain-of-function の分子病態が示唆された。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症の分子病態解明および新規治療法開発を推進するため、原因遺伝子変異が未同定の常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症 (AD-SCD) の家系解析により新規の原因遺伝子同定を試みた。

B. 研究方法

当施設では世界的にもこれまで報告のない、小脳失調症と運動ニューロン疾患を合併した

常染色体優性遺伝性疾患が中国地方のある地域に集積していることを見出し、その臨床的特徴について報告を行ってきた。我々は本疾患をその集積地域名にちなみ、Asidanと命名した。

Asidan家系のうち、連鎖解析が可能なサンプルサイズの3家系において、約10cM間隔で設定された382個のマイクロサテライトマーカーを用いてゲノムワイド連鎖解析を行った。また、その結果得られた候補遺伝子座位について fine mapping とハプロタイプ解析により絞り込みを行った。さらに、最小候補領域に存在する

33遺伝子のスプライス部位を含む全エクソン領域のDNAシーケンシングを行い、また、これらの遺伝子内に存在するマイクロサテライト・リピート配列についてはその異常延長の有無についても検討して原因遺伝子変異同定を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守し、適切な説明と同意を得て行われている。

C. 研究結果

多点連鎖解析の結果、20番染色体20p13領域に4.60のロッド値を認めた。また、3家系に共通した病的ハプロタイプを認め、さらにハプロタイプ解析が可能なAsidan家系を追加して解析したところ、計5家系で共通した病的ハプロタイプを認めたことから、これらの5家系には founder mutationが存在することが想定された。

1. 8Mbの最小候補領域内にある遺伝子のDNAシーケンシングを進め、シーケンス領域にあるSNP haplotypingを行う中で、第1および第3家系間でnucleolar protein 56 (*NOP56*) 遺伝子内に、共にホモ接合性の、SNPハプロタイプが異なる領域があることに気づいたのを契機にして *NOP56* 遺伝子イントロン1に存在するGGCCTGの6塩基繰り返し配列の異常延長が本疾患の原因遺伝子変異として同定された (SCA36)。

その後、当施設におけるAD-SCD例においてGGCCTGリピート延長の有無をrepeat-primed PCR解析にてスクリーニングしたところ、さらに4例において同遺伝子変異を認め、これらの患者もAsidan家系と同じ地域の出身であることが明らかとなった。計9家系の患者にGGCCTGリピート延長を認め、サザンブロット解析の結果から患者群には1700~2300リピートの異常

延長を認めた。

Asidan患者の平均発症年齢は52.8歳で、殆どの患者は体幹失調で発症し、構音障害、四肢失調などの小脳失調症を主症状とし、脳MRIでは比較的小脳に限局した萎縮を特徴とする。罹病期間10年を超える頃から運動ニューロン障害の徴候が明らかになり、舌萎縮、舌の線維束性収縮を約70%、四肢の筋萎縮、線維束性収縮を約60%、また四肢の腱反射亢進を約80%に認めることが判明した。

また、患者由来リンパ芽球を用いた解析では、*NOP56*の発現はRNAレベル、タンパクレベル共に明らかな低下を認めず、患者*NOP56*はコントロールと同様のスプライシングを受けて発現していることを明らかにし、*NOP56*発現量の変化によらないAsidan/SCA36の分子病態が想定された。

さらに、患者リンパ芽球におけるRNA-FISH解析では、核内に延長したGGCCUGリピート転写産物からなるRNA-fociを認め、さらに免疫蛍光染色を組み合わせた解析では、転写因子SRSF2との共局在を認めた。以上から、Asidan/SCA36の分子病態として、他のnon-coding領域のマイクロサテライト・リピート延長による遺伝性疾患と同様にRNA gain-of-functionの機序が示唆された。

D. 結論

*NOP56*遺伝子イントロン1におけるGGCCTGリピート延長を原因遺伝子変異とし、緩徐進行性の小脳失調症を主症状として運動ニューロン障害を高率に合併する新規の遺伝性疾患Asidan/SCA36を見出した。本疾患の分子病態解明はSCAとALSの両者の克服へ寄与するものと考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Liu W, Okuda H, Koizumi A: Expansion of intronic GGCCGTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet*, 2011; 89: 121-130
- 2) Ikeda Y, Nagai M, Kurata T, Yamashita T, Ohta Y, Nagotani S, Deguchi K, Takehisa Y, Shiro Y, Matsuura T, Abe K: Comparisons of acoustic function in SCA31 and other forms of ataxias. *Neurol Res*, 2011; 33: 427-432
- 3) 亀高さつき, 池田佳生, 阿部康二:岡山大学神経内科における遺伝子検査 1,000 件の臨床疫学的解析. *臨床神経学*, 2011; 51: 471-477
- 4) 池田佳生, 阿部康二:神経内科領域の難治性疾患診療. *岡山医学会雑誌*, 2011; 123: 227-230

2. 学会発表

- 1) 池田佳生ら: SCA31 および他の小脳失調症における聴覚障害の検討. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 19 日, 名古屋

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含む)

なし

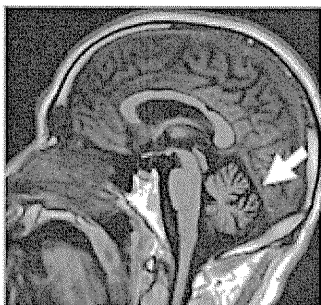
新しいSCA/ALS crossroad mutation Asidan

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班
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学 阿部康二

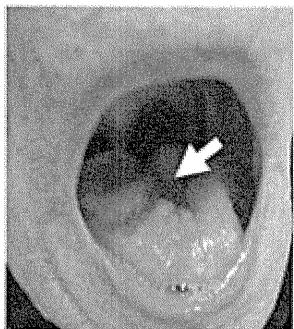
NOP56 (nucleolar protein 56) 遺伝子イントロン1
におけるGGCCTGリピート延長の発見

Asidan/SCA36の臨床像

- ・小脳失調症で発症
- ・罹病期間10年を超える頃から運動ニューロン障害が明らかになる



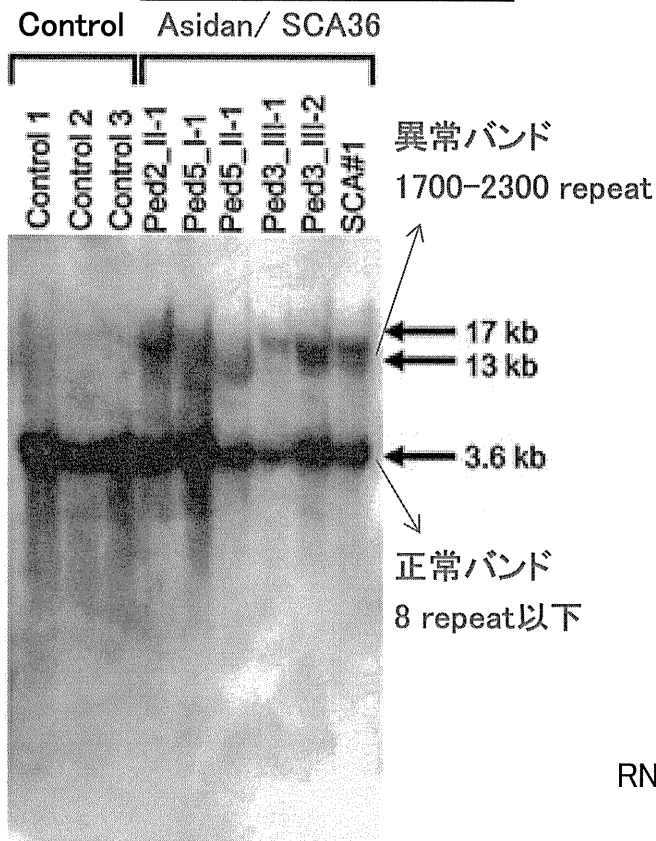
比較的小脳に限局した萎縮



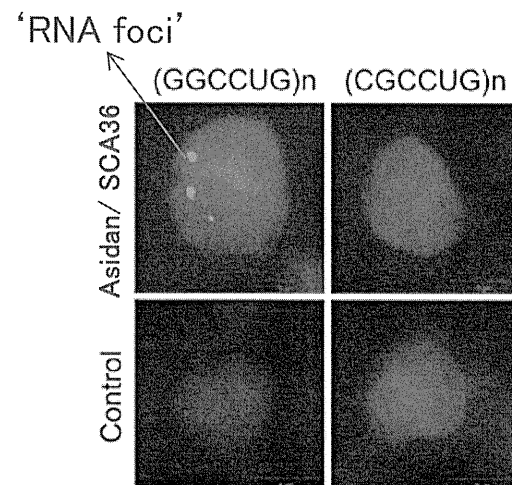
舌萎縮と線維束性収縮



サザンブロット解析



RNA-FISH解析



Asidan/SCA36患者リンパ芽球核内にGGCCUGリピート転写産物由来の'RNA foci'を認めた。またこの'RNA foci'は転写因子SRSF2と共局在していた。

RNA gain-of-functionの分子病態を示唆

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

Exome 解析にて同定された SCAR1 (AOA2) の本邦一家系に関する研究

研究分担者	辻 省次 (東京大学神経内科)
共同研究者	市川弥生子 (東京大学神経内科)
	石浦浩之 (東京大学神経内科)
	三井 純 (東京大学神経内科)
	高橋祐二 (東京大学神経内科)
	後藤 順 (東京大学神経内科)
	清水 潤 (東京大学神経内科)
	小林俊輔 (福島県立医科大学神経内科)
	金澤一郎 (国際医療福祉大学大学院)

研究要旨

[目的] Exome 解析法を用いて、原因遺伝子未同定であった常染色体劣性脊髄小脳失調症 (ARSCA) の日本人一家系について、変異遺伝子を同定し、診断を確定し、その臨床像について検討する。[対象・方法] 対象は ARSCA の 1 家系(Kobayashi *et al.*, J Neurol Sci. 2007)。発症者 2 名(発端者および同胞 1 名)、同胞非発症者 1 名に関して連鎖解析を行い、候補領域を定めた上で、発端者については exome 解析を行った。[結果]連鎖解析・exome 解析の結果、本家系の発症者のみにホモ接合性の *SETX* の既知のミスセンス変異(Q1441X)を同定し、SCAR1(AOA2)であることが明らかとなった。本家系は early onset で、軸索型末梢神経障害を伴う ARSCA の一家系であったが、眼球運動失行を欠き、血清 α フェトプロテイン値が正常であった点が SCAR1 としては非典型的な点であった。[結論] 臨床所見から診断が困難であった本邦の ARSCA 一家系が、SCAR1 であることを見出した。臨床像が多彩で臨床診断が難しい ARSCA において、exome 解析は遺伝子診断の手段として有用性が高いことが明らかとなった。

A. 研究目的

Exome 解析技術を用いて、原因遺伝子が未同定であった常染色体劣性脊髄小脳失調症 (autosomal recessive spinocerebellar ataxia: ARSCA) の一家系について、変異遺伝子診断を確定し、その臨床像について検討する。

B. 研究方法

対象は原因遺伝子未同定の末梢神経障害を伴う ARSCA の一家系(Kobayashi *et al.*, J Neurol Sci. 2007)。発症者 2 名(発端者および同胞 1 名)、同胞非発症者 1 名。パラメトリック多点連鎖解析にて候補領域を定めた。連鎖解析のパラメーターは AR モデル, disease gene frequency: 0.001.

パイプラインは当科で開発した SNP HiTLink (Fukuda *et al.*, BMC Bioinformatics. 2009) を用い、連鎖解析プログラムとしては *allegro v2* を使用した。次いで、発端者について exon enrichment を行い、GAIIX (Illumina) にて 110bp paired end で exome 解析を行った。検出された一塩基置換変異 (single nucleotide variation : SNV)、短い挿入/欠失部位について、最初に、連鎖解析から得られた候補領域で絞り込み、ついで、既知のデータベースを用いて、新規変異を探索した。候補遺伝子変異について、サンガー法にて、変異を確認した。

(倫理面への配慮)

主治医が説明し、同意を得た上で DNA 検体を得た。符号化された検体を用いて解析した。

C. 研究結果

[本家系の臨床所見]

本家系は ARSCA の 1 家系。両親いとこ婚。両親は 90 代で死亡し、類似の症状は認めなかった。同胞 7 名のうち 3 名発症。いずれも 10 代後半に歩行障害にて発症(15、17、18 歳)し、3 例とも小脳性運動失調症状が進行していき、40 歳代には車椅子状態となっていた。また、30 歳代後半から 40 歳代頃より四肢遠位優位の筋力低下が出現し徐々に進行。1990 年代に発端者およびその兄は当科に検査入院。入院時、小脳性運動失調、四肢遠位優位の筋力低下、四肢腱反射消失、手袋靴下型表在覚低下を認めた。眼球運動に関しては、衝動性追従眼球運動の他は特記すべき所見なく、眼球運動失行は二人とも認めなかった。頭部 MRI 検査では、顕著な小脳萎縮を認めたが、大脳皮質や脳幹の萎縮はなし。脊髄後索の信号異常は認めなかった。末梢神経伝導検査では、検査した感覚神経(正中神経、尺骨神経、腓腹神経)すべてで導出不能。運

動神経は振幅の顕著な低下がみられ、軸索型と考えられた。60 代の兄では、CMAP の低下に加えて伝導速度の低下も伴っていた。腓腹神経生検では有髄線維が著明に脱落し、無髄線維も有髄線維と比べると残されてはいるが減少していた。慢性軸索変性が示唆された。60 代で測定した血清 α フェトプロテイン値 (AFP) は正常であった。本家系の臨床像としては、常染色体劣性遺伝 (AR) 形式をとり、early-onset で軸索型末梢神経障害を伴う脊髄小脳失調症と考えられた。

[本家系の遺伝子解析]

発症者 2 名(発端者および同胞 1 名)、同胞非発症者 1 名について連鎖解析を行った。Chromosome 1、3、9、11 においてロッドスコア 1.9 まで上昇しているホモ接合性の領域を認め、候補領域と考えられた。末梢神経障害を伴う ARSCA の原因遺伝子、*APTX*、*ATM*、*TDPI* の locus はいずれも候補領域外であった。発端者について exome 解析施行 (平均 coverage 126.6) した結果、218,820 個の SNV、21,204 箇所の挿入/欠失部位を認めた。218,820 個の SNV のうちスプライシング領域、アミノ酸置換を伴う variation で既知の SNP データベース (dbSNP132, 1,000genome) にない SNV は 309 個であった。このうち、候補領域にある SNV は 7 個であり、7 個の SNV の中で 5 箇所の SNV はホモ接合性の変異は 2 個であったそのうちの 하나가 spinocerebellar ataxia autosomal recessive1: SCAR1 (AOA2) の原因遺伝子 *SETX* における Q1441X 変異であった。残りの 5 箇所については、ヘテロ接合性の SNV であったが、これらに関しては、sequence error、alignment の error、SNV call の際の error の可能性があり、現在 validation を進めている。挿入/欠失に関しては、翻訳領域にあり、かつ既知のデータベ

ースにない挿入/欠失部位は 26 箇所であったが、いずれも候補領域外であった。*SETX* における Q1441X 変異について本家系内で解析を行ったところ、発症者のみ Q1441X 変異を認めており、本家系における病因変異と考えた。Q1441X 変異は本邦の SCAR1(AOA2)家系(群馬大学)の病因変異として報告されている(Moreira *et al.*, Nature Genet, 2004)。

D. 考察

ARSCA については、臨床像が多彩で臨床診断が難しいことが多い。また、近年原因遺伝子が次々と同定されてきてはいるが、private mutation も多く、遺伝子変異の同定は容易ではない。本家系のように、血清 AFP 値の上昇や眼球運動失行といった特徴的な臨床所見を欠いた家系においては、SCAR1 の臨床診断は難しく、exome 解析は遺伝子診断の手段として有用性が高いものであった。

E. 結論

臨床所見から診断が困難であった ARSCA の本邦一家系において、SCAR1 であることを見出した。臨床像が多彩で診断が困難であることが多い ARSCA において、exome 解析は遺伝子診断の手段として有用性が高いことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中

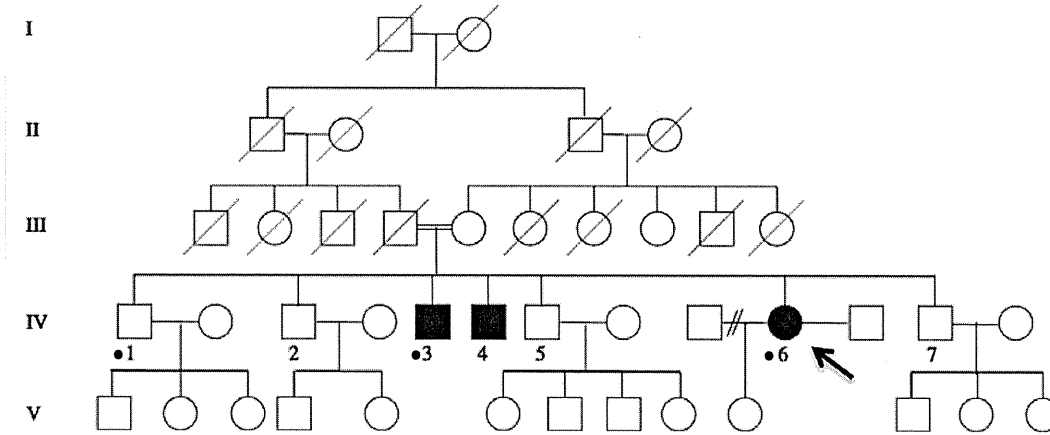
2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含)

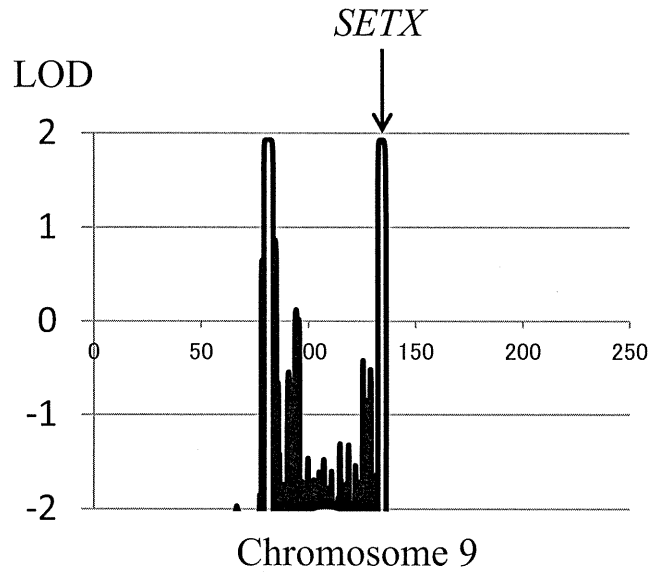
なし

Exome解析にて同定されたSCAR1 (AOA2) の一家系

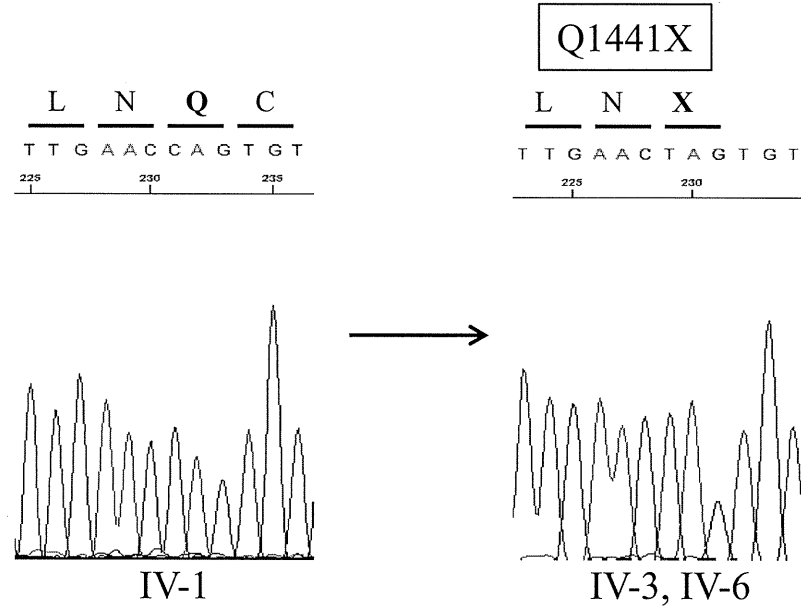


Kobayashi *et al.*, J. Neurological. Sci., 2007

連鎖解析



家系内SETX変異解析



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

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

研究協力者 嶋崎晴雄 (自治医科大学内科学講座神経内科学部門)
共同研究者 本多純子、迫江公己、直井為任、滑川道人、中野今治
(自治医科大学内科学講座神経内科学部門)
石浦浩之、福田陽子、高橋祐二、後藤 順、辻 省次
(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)
後藤雄一 (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)
瀧山嘉久 (山梨大学医学工学総合研究部神経内科学講座)

研究要旨

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を行った。血族婚のある同胞例の末梢血 DNA を用いて連鎖解析を行い，4 つの染色体の一部に候補領域を特定した。候補領域内に病的遺伝子コピー数の異常は無く，発端者のエクソーム解析で同領域内に，Chromosome 12 open reading frame 65 (C12orf65)遺伝子の新規ナンセンス変異を同定した。同変異は同胞患者には存在したが，正常コントロールには認められず，本疾患の原因遺伝子変異である可能性が高いと考えられた。この変異により短い C12orf65 蛋白が作られ，ミトコンドリア蛋白生成の翻訳停止機構に異常が生じ，ミトコンドリアの機能不全により神経障害を来すことが推定された。

また，原因遺伝子未同定の遺伝性痙性対麻痺や視神経萎縮を伴う Charcot-Marie-Tooth 病 75 家系の DNA には C12orf65 変異は認められず，同遺伝子変異を持つ家系は多くないと予想された。

A. 研究目的

遺伝性痙性対麻痺は，両下肢の痙性対麻痺を中核症状とし，その他様々な症状を合併しうる症候群である。現在までのところ，その遺伝子座は SPG1～48 まで同定されており，そのうち 20 余りの原因遺伝子が単離されているが，まだ原因遺伝子が不明のものも多く残されている。

今回，我々は視神経萎縮，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を行った。

B. 研究方法

両親が従兄弟婚で，痙性対麻痺，視神経萎縮，末梢神経障害を呈した同胞 2 例を含む 1 家系を対象とした。

同意が得られた発症者 2 名の末梢血より DNA を抽出。患者 2 名の DNA を用いて一塩基多型を用いた連鎖解析を行い，候補遺伝子領域を特定した。また，アレイ CGH にて候補領域の遺伝子コピー数異常を検討した。次に，患者 1 名の DNA のエクソン部分のみを濃縮し，次世代シーケンサーを用いてエクソーム解析を

行った。さらに、同定された遺伝子の変異が、他の原因未同定の遺伝性痙性対麻痺家系にあるかを直接シーケンス法で検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」、文部科学省・厚生労働省・経済産業省「遺伝子解析に関わる倫理問題」を遵守した。

自治医科大学の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する取扱規程」を遵守し、遺伝子解析研究許可申請書と研究計画書を作成し、生命倫理委員会に申請し、認可されている。

ヒト DNA の提供者には、インフォームドコンセントを受ける手続きとして、十分な理解を得られるように文章を用いて説明し、人権および利益の保護の取扱についても十分に配慮した。

C. 研究結果

連鎖解析の結果、染色体 2 番, 6 番, 12 番, 13 番に弱い連鎖を認める部位を同定し、候補遺伝子の存在領域と考えられた。これらの領域に病的な遺伝子コピー数異常は無かった。尚, 4 つの領域には既報の遺伝性痙性対麻痺の遺伝子座は含まれていなかった。

エクソーム解析の結果を dbSNP131 と比較したところ、候補領域内に 3 つのアミノ酸変異を伴う新規遺伝子変異を同定した。これらの変異はサンガー法によるシーケンスでも確認された。そのうち 2 つは、後に dbSNP134 に登録され、正常多型と判明した。

残る 1 つの遺伝子 Chromosome 12 open reading

frame 65 (*C12orf65*)のナンセンス変異(c.394C>T, p.R132X)は、同胞患者 DNA では認められたが、200 人の正常コントロール DNA には認められなかった。

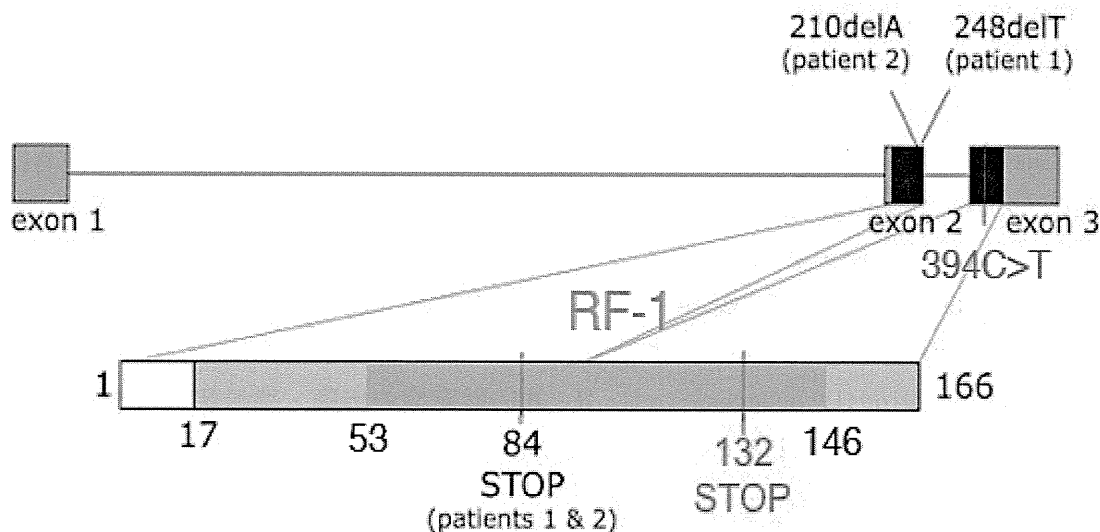
また、原因遺伝子未同定の劣性遺伝性痙性対麻痺 69 家系、視神経萎縮を伴う痙性対麻痺や Charcot-Marie-Tooth 病 6 家系の DNA には、*C12orf65* に変異は認められなかった。

尚、患者と正常者の白血球から mRNA を抽出し、*C12orf65* mRNA を RT-PCR で増幅したが、明らかな増幅レベルの差はみとめず、この変異による機能障害に nonsense-mediated mRNA decay (NMD) の関与は少ないことが示唆された。

D. 考察

C12orf65 蛋白は、核ゲノムにコードされる、ミトコンドリアの翻訳終結因子のうち、終止コドン認識し作成された蛋白質を切り離す I 型解離因子(peptide chain releasing factor-1: RF-1)の一つとされている。

図に示すように、遺伝子は 3 つのエクソンからなり、蛋白コーディング領域は 501bp、蛋白は 166 アミノ酸からなる。尚、53 番から 146 番目までのアミノ酸の部分は、RF-1 domain と呼ばれており、peptidyl-tRNA hydrolase 活性を持つとされ、高度に保存された GGQ motif (アミノ酸番号 71 から 73) を含んでいる。



(図) C12orf65 遺伝子, 蛋白とその変異
(Am J Hum Genet 2010 より改変)

C12orf65 の c.210delA と c.248delT というナンセンス変異により, 84 アミノ酸と短い蛋白となり, combined oxidative phosphorylation deficiency type 7 (COXPD7) というミトコンドリア病を引き起こすことが報告されている(Antonicka H. et al. Am J Hum Genet 2010). この疾患は, 小児期より Leigh 脳症を呈し, 精神発達遅滞, 失調, 視神経萎縮, 外眼筋麻痺, 末梢神経障害, 筋力低下, 筋萎縮, 嚥下障害, 呼吸不全など重篤な症状を来す.

本家系と COXPD7 は, 視神経萎縮と末梢神経障害など一部臨床症状が共通しているが, 本家系の臨床症状がその疾患より軽症であるのは, 本家系の変異で 132 アミノ酸までである C12orf65 蛋白が生成され, その機能が比較的保たれているためと推定される.

E. 結論

C12orf65 のナンセンス変異 (c. 394C>T, p. R132X) は, 視神経萎縮と末梢神経障害を伴った遺伝性痙性対麻痺家系の原因遺伝子変異で

ある可能性が高いと考えられた. この変異により短い C12orf65 蛋白が作られ, ミトコンドリア蛋白生成過程における翻訳停止機構に異常が生じ, ミトコンドリアの機能不全が生じることが推定された. また, この遺伝子に変異を持つ遺伝性痙性対麻痺家系は多くないと予想された.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimazaki H, Takiyama Y, Honda J, Sakoe K, Namekawa M, Tsugawa J, Tsuboi Y, Suzuki C, Baba M, Nakano I: Middle cerebellar peduncles and pontine T2 hypointensities in ARSACS. J Neuroimaging, 2012 Jan 23. [Epub ahead of print]
- 2) Haga R, Miki Y, Funamizu Y, Kon T, Suzuki C, Ueno T, Nishijima H, Arai A, Tomiyama M, Shimazaki H, Takiyama Y, Baba M: Novel compound heterozygous mutations of the SACS gene in autosomal recessive spastic

ataxia of Charlevoix-Saguenay. Clin Neurol Neurosurg, 2011 Dec 30. [Epub ahead of print]

- 3) Namekawa M, Takiyama Y, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Shimazaki H, Yamagata T, Momoi M, 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 2011 Dec 24. [Epub ahead of print]
- 4) 嶋崎晴雄：常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺の臨床－SPG11, ARSACS を中心に－，特集／遺伝性痙性対麻痺－update. 神経内科，2011;74(2):127-134
- 5) 瀧山嘉久，石浦浩之，嶋崎晴雄，辻省次，西澤正豊. 遺伝性痙性対麻痺の疫学：JASPAC. 特集／遺伝性痙性対麻痺－update. 神経内科，2011;74(2):141-145
- 6) 中原圭一，嶋崎晴雄，澤田幹雄，中野今治. 当院における Posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES) 12 症例の検討. 日本神経救急学会雑誌，2011;23(2):24-28
- 7) 松本卓也，松本健二，坂元伸吾，嶋崎晴雄，小林聡幸，加藤敏. 一級症状 (K. Schneider) を呈した抗 NMDA 受容体脳炎の一例. 精神科治療学，2011;26(8):1035-1043

2. 学会発表

- 1) 嶋崎晴雄，石浦浩之，福田陽子，本多純子，太田京子，直井為任，滑川道人，迫江公己，高橋祐二，後藤順，辻省次，瀧山嘉久，中野今治：視神経萎縮，末梢神経障害を伴う

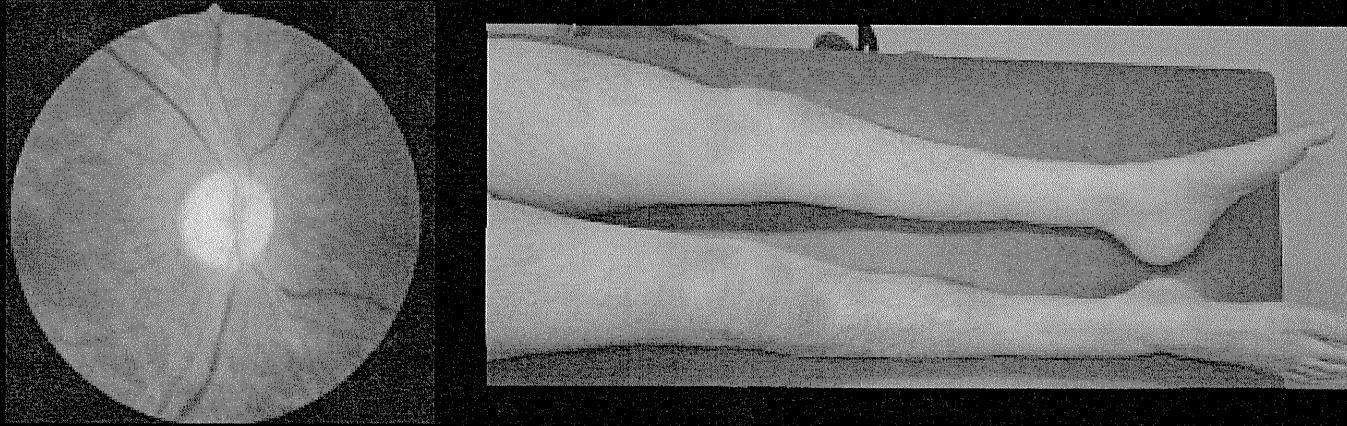
遺伝性痙性対麻痺症例の臨床像と，原因遺伝子検索. 第 52 回日本神経学会総会，2011 年 5 月 20 日，名古屋

- 2) 迫江公己，嶋崎晴雄，滑川道人，直井為任，本多純子，瀧山嘉久，中野今治. SPG4 遺伝子産物 spastin の機能解析. 第 52 回日本神経学会総会，2011 年 5 月 18 日，名古屋

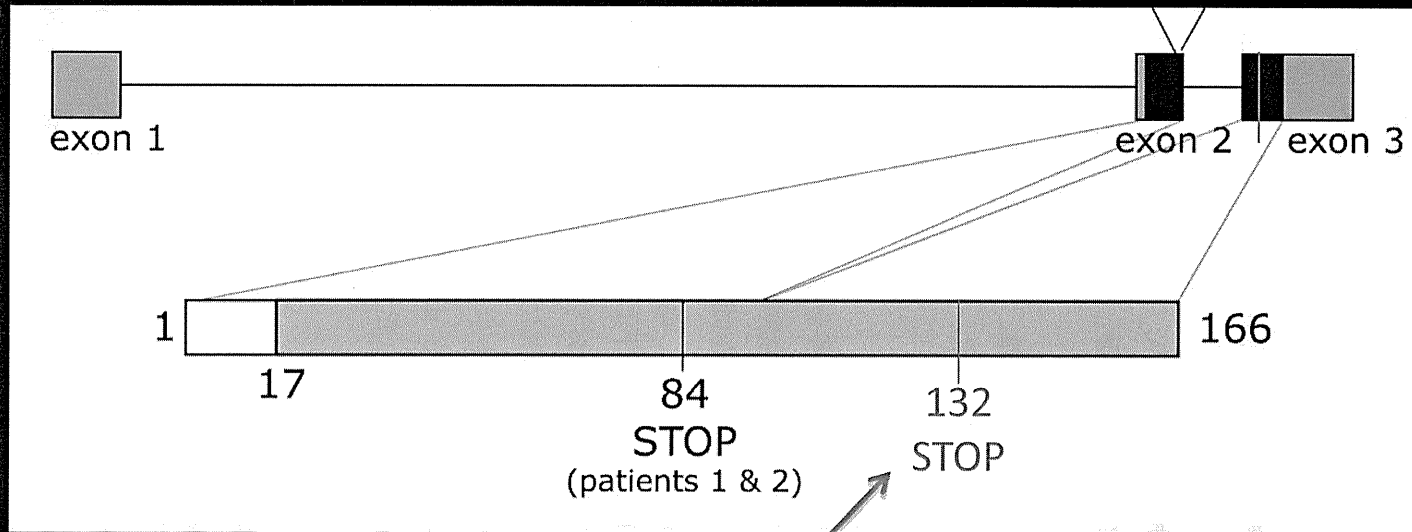
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含）

なし

視神経萎縮と末梢神経障害を伴う遺伝性痙性対麻痺



C12orf65



(Am J Hum Genet 2010より)

原因遺伝子*C12orf65*と、その変異を同定した

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

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

研究分担者 瀧山嘉久 (山梨大学医学工学総合研究部神経内科学講座)

共同研究者 坂井千香、畠山英之、後藤雄一

(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)

嶋崎晴雄、中野今治 (自治医科大学内科学講座神経内科学部門)

石浦浩之、後藤 順、辻 省次

(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)

研究要旨

視神経萎縮と末梢神経障害を伴った常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺 (ARHSP) 患者において、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の翻訳に関与している Chromosome 12 open reading frame 65 (*C12orf65*) 遺伝子中にナンセンス変異を同定した。そこで我々は、本変異の病因確定のために患者のミトコンドリア機能解析を行った。患者細胞を用いた *in vitro* での mtDNA 翻訳活性を調べた結果、コントロールの約 16% 程度に低下していた。呼吸鎖複合体 I、IV のタンパク量がそれぞれコントロールの約 33%、13% に低下しており、呼吸鎖複合体 I、III、IV の会合体であるスーパーコンプレックス量もコントロールの約 30% に低下していた。タンパク量の減少を反映して、呼吸鎖複合体 I、IV の酵素活性もそれぞれコントロールの約 29%、約 13% に低下していた。以上から、*C12orf65* 遺伝子上のナンセンス変異による mtDNA 翻訳異常がミトコンドリアの機能異常を惹起したと考えられ、本疾患の原因であると判断した。

A. 研究目的

我々は、視神経萎縮と末梢神経障害を伴った ARHSP の 1 家系 2 症例について、原因遺伝子の検索を行った。連鎖解析および次世代シーケンサーによるエクソーム解析の結果、第 12 番染色体の候補遺伝子内に 3 つの新規アミノ酸置換を伴う変異をホモ接合体で同定した。そのうち、ナンセンス変異を認めた 1 つの遺伝子は、本疾患とは表現型が異なるものの、ミトコンドリア脳筋症 (Leigh 症候群、視神経萎縮、眼筋麻痺を呈する) 家系の原因遺伝子 *C12orf65* として既に報告されていた (Antonica H, et al. *Am J*

Hum Genet 2010)。そこで我々は、*C12orf65* 遺伝子上のナンセンス変異が本疾患の原因であるかを検討するために、患者のミトコンドリア機能解析、特に本タンパクが mtDNA の翻訳過程に関わることから、その翻訳活性と呼吸鎖酵素活性検討した。

B. 研究方法

(1) 検体試料

本 ARHSP 患者から採取した皮膚組織より線維芽細胞を樹立し解析に用いた。コントロール群としてミトコンドリア病ではない患者 10 症例