

201128262A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

フール病(特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症)
の診断方法の確立と治療法の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 保住 功

平成24(2012)年 5月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

フール病(特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症)の診断方法の確立と治療法の開発に関する研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 保住 功

平成 24 (2012) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告

フール病(特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症)
の診断方法の確立と治療法の開発に関する研究 1

保住 功

(資料) 専門外来の紹介

II. 分担研究報告

1. 特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症の
遺伝子変異の同定に関する研究 7

下澤伸行

2. 特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症
からの iPS 細胞樹立と病態解析に関する研究 9

柴田敏之

3. 特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症
患者髄液のプロテオーム解析 13

犬塚 貴

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 17

IV. 研究成果の刊行物・別冊 19

V. 参考資料 25

班会議等

本田英輔先生講演資料

フール病（特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症）の診断方法の
確立と治療法の開発研究班

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研究代表者	保住 功	岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野	准教授
研究分担者	下澤伸行	岐阜大学生命科学総合実験センターゲノム研究分野	教授
	柴田敏之	岐阜大学大学院医学系研究科口腔病態学分野	教授
	犬塚 貴	岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野	教授
研究協力者	青木正志	東北大学病院神経内科	講師
	浅野隆彦	岐阜大学医学部附属病院放射線科	講師
	上原里程	自治医科大学公衆衛生学	准教授
	岡本浩一郎	新潟大学脳研究所脳神経外科学分野	准教授
	小澤和弘	岐阜県立看護大学看護研究センター	准教授
	木村暁夫	岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野	助教
	小阪憲司	横浜ほうゆう病院	院長
	佐藤雅彦	愛知学院大学薬学部衛生薬学講座	教授
	鈴木直輝	東北大学病院神経内科	助教
	高橋 均	新潟大学脳研究所病理学分野	教授
	中村好一	自治医科大学公衆衛生学	教授
	西澤正豊	新潟大学脳研究所神経内科学分野	教授
	長谷川達也	山梨県環境科学研究所環境生化学研究室	主任研究員
	林 祐一	岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野	助教
	堀川幸男	岐阜大学医学部附属病院医療連携センター	准教授
本田晶子	愛知学院大学薬学部衛生薬学講座	助教	
吉田真理	愛知医科大学加齢医科学研究所	教授	
事務局	丹羽智子	岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野 〒501-1194 岐阜県岐阜市柳戸1-1 T E L 058-230-6251 F A X 058-230-6256 e-mail tomokoni@gifu-u.ac.jp	
経理事務担当者	松浦克行	岐阜大学 医学部 管理課 T E L 058-230-6081 F A X 058-230-6060 e-mail gjme00014@jim.gifu-u.ac.jp	

(年度始め)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

フェール病（特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症）の診断方法の確立と治療法の開発

研究代表者 保住 功

岐阜薬科大学薬物治療学 教授

研究要旨

原因不明の(特発性)、両側性に脳内に石灰化を来す症例 (Idiopathic Bilateral Calcification (IBiC)) という診断基準で、収集した患者登録総数は 151 例である (平成 24 年 5 月 5 日現在)。頭部 CT 画像を、岐阜大学と新潟大学で行った全例調査では、淡蒼球に約 20%と高頻度に点状の石灰化が認められ、斑状でも 2%に、かつ加齢とともにその頻度は増加した。また毛髪中の金属測定では患者群においてコントロール群と比較して、リン (P)、銅 (Cu) 等の低下が認められ、何らかの金属におけるホメオスターシスの異常があることが示唆された。髄液中の診断マーカーをプロテオーム解析により検索を行ったが、これまで有意なものは見出されていない。遺伝子解析ではこれまで報告のあった *BGCI* についてはその変異は認められなかった。ごく最近、平成 24 年 2 月の *Nature Genetics* に報告のあったリン酸トランスポーピT2 の遺伝子 *SLC20A2* の変異に関して全エクソンのシーケンスを進めている。一方、外来受診患者の不要となった歯牙組織から iPS 細胞を作製した。分子、遺伝子を切り口とした新たな診断基準、分類を目指している。

研究分担者

下澤伸行 岐阜大学生命科学総合研究支援センター ゲノム研究分野 教授

柴田敏之 岐阜大学大学院医学系研究科 口腔病態学分野 教授

犬塚 貴 岐阜大学大学院医学系研究科 神経内科・老年学分野 教授

A. 研究目的

原因不明の両側性の大脳基底核と小脳歯状核に石灰化を認める疾患は、従来‘フェール病’と通称されてきた。これまで、その臨床症状、頭部 CT 所見の多様性から、全国の患者数やその実態は明らかでなく、また頭部 CT 以外の診断法、また治療法に関して、全く説明の糸口すらつかめていなかった。我々は脳内に石灰化を来した 3 症例の髄液中の重金属を高感度の誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) を使って検索し、Ca 代謝は正常で

あったが、3 症例とも銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、鉄 (Fe)、マグネシウム (Mg) の上昇が著明であることを見出し、本疾患の病態解明への方向性を示した。本研究の目的は、まず、日本における患者の実態について明らかにする。そして、登録された症例患者の毛髪、髄液中の重金属を測定し、より病態を明らかにする。また、髄液中のタンパク質の網羅的プロテオーム解析を行うことで、疾患に特異的なマーカーを見出す。さらに、家族例も含めた患者の DNA の解析から、原因遺伝子、疾患感受性遺伝子を見出す。また一方で、患者のいらなくなった歯牙組織から iPS 細胞を作製し、病態の解明、将来的な治療法に役立てたいと考えた。以上の総括的検索結果ら、脳内石灰化の原因、機序を解明し、疾患の治療や進展を抑制する薬物治療薬を開発することを本研究班の最終目的とする。

B. 研究方法

(1) 実態調査

我々は、日本神経学会教育施設、さらに日本小児神経学会専門医を対象に、原因不明の、両側性の脳内石灰化症をきたす症例に関する一次アンケート調査を行う。回答がえられた症例に対して、2次調査として、画像、血液検査データ等の収集調査を行い、さらに毛髪、血清、DNA 採取のための血液、髄液の検体提供を3次調査と共に依頼する。全国疫学調査を行うため、「特定疾患の疫学に関する研究班」(自治医科大学上原里程准教授)との合同調査研究を開始する。全国の放射線科のある病院の放射線科を対象に、班会議で確立された全国疫学調査マニュアル法に基づき、調査対象機関を階層化し、無作為抽出し、アンケート調査を行う。また、地域重点的に岐阜大学附属病院と新潟大学附属病院における1年間に撮影した頭部CT画像全例について脳内石灰化の有無を調査する。

(2) 検体解析

得られた毛髪重金属の測定を行う。また髄液は網羅的プロテオーム解析を行い、診断マーカーの検索を行う。遺伝子はこれまで報告ある *IBGCI*、*SLC20A2* の解析、また特に家族例を主に、原因遺伝子、疾患感受性遺伝子の検索を行う。尚、データの管理、マネージメント、倫理的妥当性に関しては当大学の倫理審査委員会の定期的な監査を受ける。外来受診患者の同意を得て、不要となった歯牙組織から iPS 細胞を作製する。

(3) まとめ

実態、病態が明らかになった時点で、明確な診断基準の作成、細分類、検査項目を明らかにし、今後、効率的・効果的に研究を行なう。治療法について検討する。またこれらの研究事業と並行して、岐阜大学附属病院を受診した患者については面談を行い、カウンセリングとその後もインターネットを活用した心のケア通信を行っていく。

(倫理面への配慮)

全国疫学調査は、岐阜大学の倫理委員会の承認を

得て、施行した。岐阜大学と新潟大学の附属病院を拠点とした頭部CT画像調査は両大学の倫理委員会の承認をそれぞれ得て、実施した。収集された患者の毛髪・血液・髄液等の検体を使用した検査は、岐阜大学の倫理委員会の承認を得て、患者の同意を文書で得た上で行った。個人情報保護の観点から、連結可能匿名化を行った。遺伝子検査は、岐阜大学の倫理委員会(ヒトゲノム・遺伝子解析研究)の承認を得て、患者の同意を文書で得た上で行なった。収集された貴重な検体は、今後の更なる検索のため、二次利用ができるよう説明書と同意書内に明確に文章化し、患者の署名による同意を得た。患者や家族との面談、IT機器を活用した心のケアは、それぞれ岐阜大学の倫理委員会の承認を得て、同意を文書で得た上で行った。

C. 研究結果

(1) 実態調査

全国の日本神経学会教育施設を対象に行ったアンケート調査の回収率は39.7%、小児神経専門医を対象に行ったアンケート調査の回収率は49.7%であった。岐阜大学附属病院への直接の外来受診者も含めて、患者登録総数として151例の登録が得られた(平成24年5月5日現在)。その中には年齢、性別も明らかでない症例が23例、経過から副甲状腺機能亢進症が明らかとなった症例、Cockayne 症候群、Aicardi-Goutières 症候群がより強く疑われた症例も含まれた。

全国疫学調査として、全国の放射線科のある病院の放射線科を対象に行ったアンケート調査では解析に十分な回答数が収集できなかった。

岐阜大学附属病院で1年間に撮影した頭部CTにおいて、淡蒼球に点状の石灰化を認める症例は全体の17.2%、新潟大学附属病院で20.6%であった。さらに斑状のものは各1.3%、1.9%であったが、65歳以上となると2.1%、3.1%と増加した。小脳歯状核となると0.28%、0.16%とその頻度は低かった。

(2) 解析

収集され解析された毛髪検体数は、53 検体であった(平成 24 年 5 月 5 日現在)。その中で、28 検体に関して、24 種の金属種について、ICP-MS を用いて測定した。各症例の年齢・性を対応させたコントロール群 3 例を対照に SPSS を用いて、解析した結果では、患者群の毛髪で、リン (P)、銅 (Cu)、ゲルマニウム (Ge)、セレンウム (Se) 含量が有意に低下していた。

収集した DNA は総数 72 (平成 24 年 5 月 5 日現在)。遺伝子検索ではまず、BGC1 で高率にみられる MGEA6 遺伝子 p.P521A 変異を、家族歴のある 2 家系の患者 7 名および孤発性 21 例で検索したが、1 例も認められなかった。平成 24 年 2 月 Nature Genetics に報告のあった *SLC20A2* 遺伝子変異に関しては *SLC20A2* の全エクソンのシーケンス解析を進めている(Nature Genetics 44, 254–256 (2012))。岐阜大学附属病院の外来を直接受診された患者の不要となった歯牙組織から iPS 細胞を複製したが、細胞初期化抵抗性である可能性が示唆された。患者と家族に対して、同意を得て、インタビューや IT 機器を活用した心のケアに関するメール通信を行った。3 症例のインタビューについて分析を行い、その成果を心理的支援に活用した。

(3) まとめ

収集した検体は分析中であり、分子、遺伝子を切り口とした分類を行う。臨床データと多変量解析等の統計学的解析を専門家と共に行う。それらをもとに新たな診断基準、分類の作成に活用する。

D. 考察

原因不明の、病的な脳内石灰をきたす症例の登録は、アンケート調査は途中ではあるが、100 症例を超える予想以上の症例数であった。脳内石灰化は、副甲状腺機能低下症、ミトコンドリア脳筋症、SLE などの膠原病、白質脳症、先天代謝異常症に伴って原因の明らかな場合もあるが、通常の検索

では何ら異常を認めない症例も多い。また、全くの無症状で、たまたま頭部外傷などで頭部 CT を撮った際に脳内の異常な石灰を指摘され発見された症例、軽い頭痛があり、頭部 CT を撮った際に脳内の異常な石灰を指摘され発見された症例もあった。これまで病気に対する一般情報が少なく、正面から病気に取り組む体制もできておらず、見放されてしまうことも少なくなかった。そのため、病気の進行に対する今後の予測がつかず、その不安が極めて大きい方もあった。小児例においては、重度精神発達遅滞、てんかん、発作性片麻痺、思春期早発、痙性四肢麻痺、緻巧運動障害、小頭症、眼振、高アンモニア血症など他にも際立った臨床徴候、症状を呈する症例も登録され、背景に何らかの先天代謝異常症が存在することが推定される症例も少なからず認められた。初老期の症例では、緩徐進行性の認知症を呈し、剖検で著明な NFT、小血管周囲の石灰化を認める Kosaka-Shibayama Disease (DNCT) が診断として考えられる症例もあった。剖検報告を見ても淡蒼球の石灰化の程度と脳内も小血管周囲の石灰化の程度とは必ずしも平行していない。NFT や小血管周囲の石灰化を PET、SPECT で検出する方法は見出されていない。髄液における診断マーカーの検索が必要と考えられ、プロテオーム解析を行ったが、現在まで、有意なマーカーは見出されていない。

前述のごとく、家族性特発性基底核石灰化症 (IBGC) に罹患した多くの家系において、III 型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター 2 (PiT2) をコードする *SLC20A2* の変異が同定された。アフリカツメガエルの卵母細胞を用いて調べたすべての PiT2 変異体のアッセイにおいて、リン酸輸送活性が大きく障害されていることが報告された。これは病因にリン酸ホメオスタシスの変化が関与していることを示唆している。我々もこの *SLC20A2* の変異を全例で解析する。この遺伝子以外の変異についても、東京大学との共同研究において、次世代シーケンサーを駆使した全ゲ

ノム解析を行う計画である。

分子、遺伝子を切り口とした新たなファール病の病態解明、分類を行う予定である。

E. 結論

IBiC は神経内科医、小児神経内科を対象としたアンケート調査で、100 症例を超える症例が集積され、現在も症例の登録が進行している。小児の症例では背景に何らかの先天代謝異常症が存在すること、初老期以降の症例には DNTC が存在することが推測される。IBGC に関する新たな遺伝子 *SLC20A2* の変異が報告されたことで、ファール病の病態解明に関して新たな展開が予想される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

* I. Hozumi. Roles and Therapeutic Potential of Metallothioneins in Neurodegenerative Diseases. Current Pharmaceutical Biotechnology. submitted.

* Yamada M, Asano T, Okamoto K, Hayashi Y, Kanematsu M, Hoshi H, Akaiwa Y, Shimohata K, Nishizawa M, Inuzuka T, Hozumi I. High frequency of calcification in basal ganglia on brain CT images in Japanese elderly people. Geriatr Gerontol Int. submitted.

* Takagi M, Ozawa K, Douke M, Hashimoto K, Hayashi Y, Inuzuka T, Yasuda H, Hozumi I. Bioelements content of hair in Fahr's disease. J Trace Elements Med Biol. Submitted.

* 堀田 みゆき、保住 功、「希少神経難病ファール病 3 例の患者と家族のインタビューから得られたもの」臨床看護 投稿中

2. 学会発表

* 第 52 回日本神経学会学術大会

頭部 CT による脳内石灰化の臨床的検討

山田 恵、浅野隆彦、林 祐一、星 博昭、犬塚 貴、保住 功

日時：平成 23 年 5 月 18 日

場所：名古屋国際会議場

* 第 57 回日本薬学会東海支部総会・大会

特発性両側性脳内石灰化症における毛髪中ミネラル量の解析

高木麻里、橋本和宜、道家光子、林 祐一、保住 功

日時：平成 23 年 7 月 9 日

場所：金城大学薬学部

* 第 22 回日本微量元素学会

神経変性疾患におけるメタルの役割と代謝

保住 功

日時：平成 23 年 7 月 2 日

場所：京都テレサ

* 第 38 回富山県臨床神経研究会（特別講演）

特発性脳内石灰化症 (IBiC) の現状と課題

ーファール病～小阪・柴山病 (DNTC、非アルツハイマー型認知症) 」

日時：平成 23 年 10 月 28 日

場所：富山電気ビルディング

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 特記事項なし

 岐阜大学大学院 医学系研究科
神経内科・老年学分野

[HOME](#) | [ご挨拶](#) | [教室構成](#) | [外来診療](#) | [受診をお考えの皆様へ](#) | [医療関係者の皆様へ](#) | [研究](#) | [後期研修](#) | [Link](#)

ファール病

受診をお考えの皆様へ

Consultation

[HOME](#)>[ファール病・関連脳内石灰化症のため受診をお考えの皆様へ](#)

ファール病・関連脳内石灰化症のため、受診をお考えの皆様へ Consultation on Fahr's disease or Calcification

是非、御相談ください

- ・ 岐阜大学神経内科・老年科では、「ファール病(特発性両側性大脳基底核・小脳歯状石灰化症)の分子病態の解明」研究班の事務局を担当しております。
- ・ 「ファール病」、「原因不明の脳内石灰化症」などの診断を受けて、お悩みの方、一度検査を受けたい方、セカンド・オピニオンを受けたい方、遺伝カウンセリングを受けたい方は、遠慮なく、下記へご相談ください。

・ 担当者:客員臨床教授 保住 功

・ 連絡方法:

1. 電話で連絡: 058-230-8121 (直通)
(不在の際は、お名前と電話番号をお伝えください。折り返しお電話させていただきます)
2. メールで連絡: hozumi@gifu-pu.ac.jpまで
3. ファックスで連絡: 058-230-8121



[こちらからお問い合わせ](#)



[▶ リイトマップ](#) | [▶ お問い合わせ](#)

岐阜大学大学院 医学系研究科 神経内科・老年学分野

[ご挨拶](#) | [教室構成](#) | [外来診療](#) | [受診をお考えの皆様へ](#) | [医療関係者の皆様へ](#) | [研究](#) | [後期研修](#) | [リンク](#)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症の遺伝子変異の同定

研究分担者：下澤伸行（岐阜大学生命科学総合研究支援センター ゲノム研究分野）
研究協力者：林 祐一（岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野）
山田 恵（岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野）
高木麻理（岐阜薬科大学薬物治療学）
保住 功（岐阜薬科大学薬物治療学）

研究要旨

本邦のフェール病（特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症）患者を対象にとした遺伝子バンクを昨年設立し、現在、50例（うち弧発例34例、家族例7家系16例）の末梢血DNAをバンクに登録している。IBGC1で高率にみられるMGEA6遺伝子p.P521A変異は、家族歴のある2家系の患者7名および弧発性21例で1例も見られなかった。IBGC3で報告のあるSLC20A2遺伝子変異に関しては全エクソンのシーケンスを行い検索を進めている。

A. 研究目的

フェール病（特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症）の原因遺伝子、疾患感受性遺伝子はいまだ不明である。そのため、本邦の患者を対象に本疾患の遺伝子バンクを昨年設立した。そのバンクDNAを用いて遺伝子変異を同定する目的で本研究を行った。

B. 研究方法

フェール病（特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症）50例の末梢血からDNAを分離した。MGEA6に関しては、2家系の家族性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症例および弧発性21例を対象にLemosらの報告¹⁾に従い、プライマーを設定し、ABI 3100を用いてdirect sequence法を行い、P521A遺伝子変異の有無を確認した。

（倫理面への配慮）

特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症遺伝子バンク登録患者の個人情報には十分配慮した。岐阜大学大学院医学系研究科の研究倫理委員会の承認をえて、遺伝子解析を行った。

C. 研究結果

本疾患遺伝子バンク登録患者は、2012年3月現在、50例（うち家族性は7家系16名、弧発性34例）を遺伝子バンクに登録した。2家系（大阪、札幌家系）7名および弧発例21例でMGEA6 P521A遺伝子変異に関してdirect sequence法を用いて検索したところ、そのような多型を持つ患者はいなかった。これらの患者は、特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症の北米家系（IBGC1）²⁾以外のIBGCである可能性があり、最近報告されたIBGC3の原因遺伝子SLC20A2の変異³⁾を有するかについて現在、direct sequence法により検討

している。

D. 考察

特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症の遺伝子バンクを設立し、原因遺伝子の同定に関して研究を進めている。

IBGC1²⁾で、MGEA6 遺伝子の p. P521A 変異との関連を示唆する報告があり、まず、IBGC1 に関連する MGEA6 P521A 遺伝子変異の有無について、本邦の孤発性患者 21 例、家族例 2 家系 7 例で検討したが、このような変異はみられなかった。

また、2012 年 2 月に IBGC3 の原因遺伝子として、SLC20A2 遺伝子が報告された³⁾。我々は、バンクに登録された DNA を対象に SLC20A2 の全エクソンのシーケンスを進めている。

次年度は、SLC20A2 遺伝子のシーケンスとバンク DNA に登録されている常染色体優性遺伝形式をとる札幌大家系の発症者、非発症者を対象としてエクソーム解析を行い、原因遺伝子の同定を行う予定である。

E. 結論

IBGC1 で報告されている MGEA6 P521A 変異に関しては、今回研究対象とした患者群では変異がなかった。IBGC3 で報告されている SLC20A2 遺伝子の変異に関して direct sequence 法で変異の有無を検討することとした。また、札幌の家系の発症者、非発症者の DNA サンプルを用いてエクソーム解析を行い、原因遺伝子の同定をすすめる。

[参考文献]

1) Lemos RR, et al. Population and computational analysis of the MGEA6 P521A variation as a risk factor for familial idiopathic basal ganglia calcification

(Fahr's disease). J Mol Neurosci 2011; 43: 333-336.

2) Oliveira JR, et al. Analysis of candidate genes at the IBGC1 locus associated with idiopathic basal ganglia calcification (Fahr's disease) J Mol Neurosci 2007;33:151-154.

3) Wang C, et al. Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. Nature Med Feb 12, 2012 (in press) doi:10.1038/ng.1077.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (2011/4/1~2012/3/31 発表)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 高木麻理、橋本和宜、道家光子、林 祐一、保住 功. 特発性両側性脳内石灰化症における毛髪中のミネラル量の解析. 第 57 回日本薬学会東海支部 (2011/7)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症からの iPS 細胞樹立と病態解析

研究分担者：柴田 敏之 岐阜大学大学院医学系研究科口腔病態学分野

研究協力者：畠山 大二郎 玉置 剛也

岐阜大学大学院医学系研究科口腔病態学分野

研究要旨

フェール病（特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症）の病態解析材料を得るために同患者から iPS 細胞の樹立を行った。研究協力の承諾が得られた 3 例の方の抜去智歯歯髄細胞（歯髄幹細胞）を樹立し、この内の 1 例の歯髄幹細胞にセンダイウイルスをベクターとして山中因子（c-Myc・L1f4・Oct4・Sox2）を遺伝子導入し iPS 細胞の作製を図った。尚、我々が既に樹立している健常者からの歯髄幹細胞バンク（約 200 例）から本例と同年齢で同じ智歯発育段階の胞株を対照として iPS 細胞誘導を行った。最終的にフェール病患者からの iPS 細胞様コロニーは得られたが、その樹立効率は対照（健常）270 個/10mm dish に対しフェール病 6 個/10mm dish と著しく低く、フェール病の歯髄幹細胞は細胞初期化抵抗性である可能性が示唆された。この現象は注目に値しフェール病の病態解明のみならず現在ほとんど不明となっている細胞初期化機序を解析する糸口になる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

我々は、種々の形成段階にあるヒト抜去歯より歯髄組織幹細胞(Dental Pulp Stem Cell: DPSC)を既に 250 ライン程樹立・保有し、個体差の検証を行って来ている。その結果、より未熟な形成期の歯から得られる DPSC は高い増殖・分化能（ステムネス性：幹細胞性）を持つが、継代培養により喪失することを明らかにして来た (Takeda et al. J Dent Res. 2008) ¹⁾。また、京都大学山中研究室と共同で、DPSC からの iPS 細胞誘導を試み、iPS 細胞を高率にかつ Oct・Sox の 2 因子の導入でも樹立可能であることを見出し、DPSC が iPS 細胞の供給源として有用であることを示して来ている (Tamaoki et al. J Dent Res. 2009)

²⁾。更に、遺伝子導入のためのベクターとしてゲノムに組み込みの無いセンダイウイルスやエピソーマルプラスミドでも樹立可能であることを示して来ている (Nature methods 2011) ³⁾。

そこで、本研究では、我々が保有する種々の年齢・発生段階から得られている豊富なヒト DPSC を対照としてフェール病（特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症）の方から DPSC を樹立後 iPS 細胞を作製し、病態解析（疾患モデル）に資することを目的として本研究を行った。

B. 研究方法

ヒト歯髄幹細胞 (DPSC) は、比較的容易に採

取・樹立可能であり、先に述べた様にゲノムに組み込まれないセンダイウイルスやエピソーマルプラスミドでも高率に iPS 細胞が樹立可能である利点を有している。また、健常者からのバンク化も出来ていることより病態解析のための比較対照を容易に得られることより、DPSC をフェール病患者さんからの iPS 細胞のリソースとして選択した。

iPS 作製方法には現在の所、レトロウイルス、アデノウイルス、センダイウイルス、エピソーマルプラスミドなどがあるが、iPS 細胞樹立後の病態解析、特に分子生物学的解析を行う場合にゲノムに影響を残すレトロウイルスによる遺伝子導入は、その解析を困難にする可能性があると考え、本研究では操作も容易なセンダイウイルスを用いる方法を選択した。導入遺伝子は山中 4 因子 (c-Myc・L1f4・Oct4・Sox2) で行い、これらを組み込んだ SeVp (Mp+Myc, DM::KLF4, DF::Oct4, DHN::Sox2) を間葉系培地で培養中の DPSC に加え、1 日培養後 ES 培地に播き ES (iPS) 細胞様コロニーの形成を観察した。約 2 週間後に形成されたコロニーを pick up しこれにセンダイウイルスを除去するための siRNA を加え SeV(-) の iPS 細胞を樹立した。

(倫理面への配慮)

特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症遺伝子バンク登録患者の個人情報には十分配慮し、本研究への承諾と共に、iPS 細胞樹立およびその後の遺伝子解析に関する説明を行い、承諾の得られた方から DPSC の樹立・iPS 細胞の誘導を行った。

C. 研究結果

本疾患と診断された中で比較的若年者 3 名 (29 歳・16 歳・15 歳) の方から DPSC を樹立した。この内、最も若く、歯の形成段階も未熟な 15 歳の方の DPSC を用い iPS 細胞誘導を

行った (これまでの経験より若年者で歯の形成段階の未熟な DPSC の誘導効率が高ことが判っているため、この様な選択を行った)。尚、対照としてバンクから同年齢で同発育段階の DPSC を選び用いた。その結果、最終的にフェール病患者さんからの iPS 細胞は得られたものの樹立効率は対照 (健常) 270 個/10mm dish に対しフェール病 6 個/10mm dish と著しく低く、フェール病の歯髄幹細胞は細胞初期化抵抗性である可能性が示唆された。

D. 考察

特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症の DPSC からセンダイウイルスベクターを用いた SeVp (Mp+Myc, DM::KLF4, DF::Oct4, DHN::Sox2) にてゲノムに組み込まない iPS 細胞を樹立した。この iPS 細胞は、ゲノムに遺伝子変異が無いため今後の分子生物学的解析が容易と考えられた。また、iPS 細胞の誘導過程において樹立効率にこれまで観察されたことのない程著しい違い (健常: 270 個/10mm dish に対しフェール病: 6 個/10mm dish) が見出された。この相違は注目に値すると考えられ、フェール病の病態解明のみならず現在ほとんど不明となっている細胞初期化機序を解析する糸口になる可能性があると考えられた。今後は作製した iPS 細胞を用いて神経誘導等を行いフェール病の病態解析を行うと共に、今回見出された樹立効率の著しい違いが単に個体差によるものか、疾病に由来するものかを明らかとすることが重要と考えられた。

E. 結論

フェール病 (特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症) の方から 3 ラインの DPSC を採取し、内 1 例から iPS 細胞を誘導し、今後の病態解析に資する材料を得た。また、この過程においてフェール病 DPSC の iPS 細胞誘導効率は極めて低くフェール病の病態解析と

伴に現在不明となっている細胞初期化機序解明の糸口となる可能性のある現象を見い出した。

[参考文献]

1) Characterization of stem cell in dental pulp of human wisdom tooth germ. T Takeda, Y Tezuka, M Horiuchi, K Hosono, K Ikeda, D Hatakeyama, S Miyaki, T Kunisada, T Shibata, K Tezuka
J Dental Research 87 (7): 676-681, 2008.

2) Dental pulp stem cells as source for iPS cell bank. Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, Ichisaka T, Aoki H, Takeda-Kawaguchi T, Iida K, Kunisada T, Shibata T, Yamanaka S, Tezuka K.
J Dent Res 89 773-778 2010

3) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells

Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M,

Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S.
Nature Methods 8(5) 409-412 2011.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表 (2010/4/1～2011/3/31 発表)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症患者の髄液を用いた二次元電気泳動法による疾患特異的マーカーの検出

研究分担者：犬塚 貴（岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野）

研究協力者：橋本和宣（岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野）

木村暁夫（岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野）

保住 功（岐阜薬科大学薬物治療学）

研究要旨

ファール病 (FA) は、大脳基底核および小脳歯状核に非動脈硬化性の石灰化をきたす疾患である。本研究において、FA 患者の髄液から診断マーカーを見出すことを目的に、FA、コントロール群（心身症、正常圧水頭症）の脳脊髄液を用いたプロテオーム解析を行った。我々は、FA において発現量が増加していた 13 スポット中 4 スポットのタンパク質を同定した。Western blot 法を用いて各疾患を個別に検討したが、統計学的に FA に有意な差を認めるマーカー蛋白は見出し得なかった。残りの未検索のスポットの解析を進めている。

A. 目的

ファール病 (FA) は、大脳基底核(線条体、淡蒼球)、小脳歯状核に石灰化をきたす疾患である。FA の確定診断は病理学的診断に基づく。初老期認知症の中で、FA 同様の石灰化とともに、病理学的に大脳皮質にびまん性に多数の神経原線維変化を認める疾患が日本から報告されている (Diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNFC) Kosaka et al. 1994)。本研究では、FA の髄液に診断マーカーを見出すことを目的に、脳脊髄液を用いたプロテオーム解析を行った。

B. 方法

対象

脳脊髄液は FD: n=10、対照群(心身症(PSD): n=6、正常圧水頭症(iNPH): n=13) (Table 1)を用いた。

プロテオーム解析

FD および対照群の脳脊髄液それぞれプールし、

two dimensional difference gel electrophoresis DIGE (2D DIGE)を用い解析した。関心スポットを LC-MS/MS を用いて分析し、Mascot データベースにて解析、同定した。

Western blot 法による各疾患の個別別解析

同定されたたんぱく質の抗体を用いて、FD、PSD、iNPH、アルツハイマー病患者の髄液を用いて、Western blot 法にて、個別別に半定量を行った。

C. 結果

2D-DIGE による解析の結果 (Figure 1)、240 スポットを解析し、±1.5 倍変動した 13 スポットを見出した (Figure 2)。今回、4 スポットについて解析を行い、Apolipoprotein A4, E, J が同定された。

D. 考察

スポットの解析により同定した Apo J は、FD

群と、PSD、iNPH で有意な差は認めなかったが、アルツハイマー病群では有意な上昇が認められた。アルツハイマー病患者の脳脊髄液での Apo J の増加はすでに報告されている。今後も未検索のスポットの解析、タンパク質の同定を行う。

E. 結論

FD 患者の脳脊髄液を用いた二次元電気泳動法による検索から、変動の大きい 13 スポットを見出し、4 スポットについて解析を行った。Apolipoprotein A4, E, J が同定されたが、各疾患群における Western blot 法による個別別検索からは、FD における特異的なマーカーとは言えなかった。

[参考文献]

1) Wu ZC, Yu JT, Li Y, Tan L. Clusterin in Alzheimer's disease. Adv Clin Chem. 2012;

56:155-73.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

	age	gender
Fahr	16	M
	16	F
	23	M
	31	M
	32	M
	33	F
	38	F
	59	F
	62	M
	61	M

	age	gender
iNPH	66	M
	69	M
	73	M
	75	F
	75	F
	76	F
	77	M
	77	M
	81	M
	83	F
	75	M
	76	M
	77	M
	PSD	31
34		M
70		M
24		M
40		F
	42	M

Table 1. 2D-DIGEに用いた検体

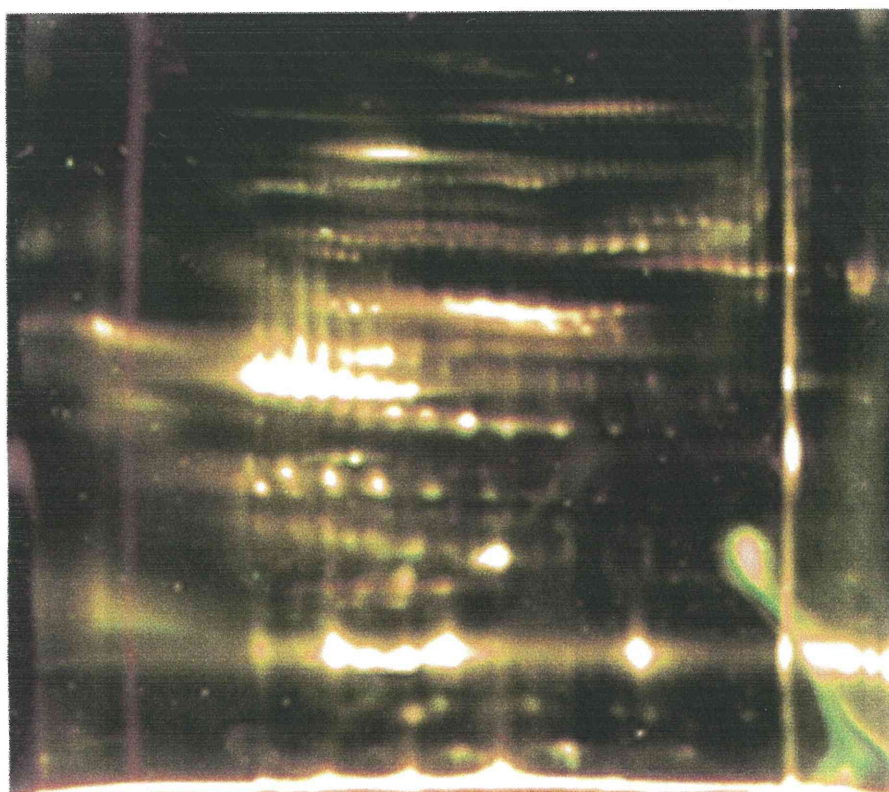


Figure 1. 2D-DIGEのMerge画像 (green:Fahr, red: control)

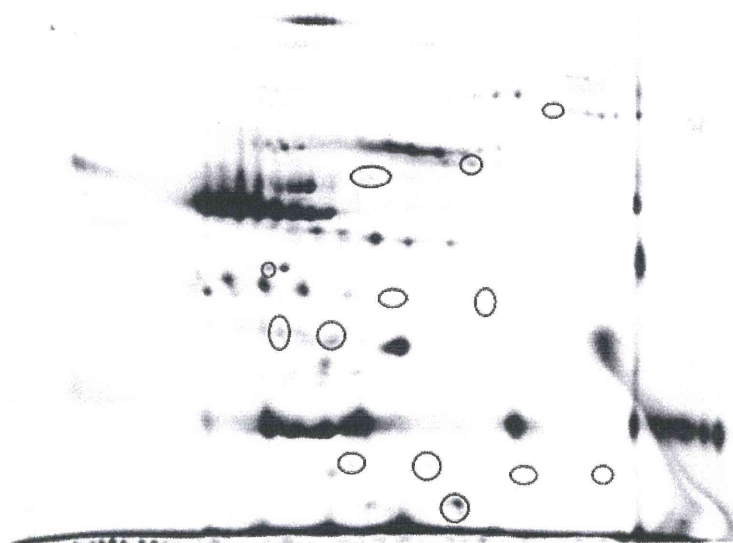


Figure 2. 2D-DIGEにおいて1.5倍以上の発現変化を認めたスポット

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍： なし

雑誌：

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山田 恵、浅野隆彦、林 祐一、星博昭、犬塚 貴、保住 功	頭部 CT による脳内石灰化の臨床的検討	第 52 回日本神経学会学術大会抄録集 (Geriatr Gerontol Int に投稿中)	抄録集	P.320	2011
高木麻里、橋本和宜、道家光子、林祐一、保住 功	特発性両側性脳内石灰化症における毛髪中ミネラル量の解析	第 57 回日本薬学会東海支部総会・大会抄録集 (Current Pharmaceutical Biotechnology に投稿中)	抄録集	P.C.1530	2011
保住 功	神経変性疾患におけるメタルの役割と代謝	Biomed Res Trace Elements	22(2)	81	2011
保住 功、下澤伸行、柴田敏之、犬塚 貴	小児フェール病(特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症)の分子病態の解明	脳と発達	第 44 巻	S153	2012

IV. 研究成果の刊行物・別冊

P1-203

頭部 CT による脳内石灰化の臨床的検討

¹岐阜大学神経内科・老年学分野, ²岐阜大学放射線医学分野

山田 恵¹, 浅野隆彦², 林 祐一¹, 兼松雅之², 星 博昭²,
犬塚 貴¹, 保住 功¹

目的：頭部 CT における大脳基底核部の石灰化の頻度, 原因, 臨床所見について明らかにする. 方法：2009年10月から2010年9月の一年間で施行した頭部 CT にて, 大脳基底核部に石灰化像と思われる点状・斑状の高吸収域をみとめる症例につき, 出現頻度, 原疾患を検討した. 結果：0歳から96歳にわたる2526例中435例 (17.2%) にみとめられた. 65歳以上では24.4%と加齢に伴い頻度の上昇がみられた. 石灰化の多発部位は淡蒼球であり, 両側性が大半を占めた. また, 斑状の大脳基底核部石灰化に限ってみると, 全体の1.3%にみられ, 65歳以上では2.1%と頻度の上昇をみとめた. 斑状石灰化例の原疾患は, 副甲状腺機能低下症, フェール病, 白質ジストロフィーなどがみられたが, 頭痛, めまい, 認知症, 転移性腫瘍のスクリーニングなどで, 偶然発見された例が大部分であった. 考察：過去の報告では, 大脳基底核部の石灰化の頻度は0.3から10%程度といわれている. 今回の検討での頻度が高いのは, 高齢者の比率が高いこと, CT の精度向上により微細な濃度変化もとらえられるようになったこと等が考えられた. 65歳以上の高齢者では, 65歳未満の群と比し, 生理的沈着の範囲を上回る斑状の石灰化をきたす例が有意に増加していた ($p < 0.0005$). これら高齢者例では, 石灰化を伴う神経原線維変化型認知症も含まれていると考えられ, 神経症状との関連, 地域性について検討を行う.