

## MSA と ALS における患者試料由来の microRNA 解析 — 共通性と個別性 —

研究分担者 佐々木秀直 （北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野）  
共同研究者 内海 潤  
（北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野、がん研究会がん研究所）  
廣谷 真、加納崇裕、矢部一郎、濱 結香  
（北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野）  
若林孝一 （弘前大学医学研究科脳神経病理学講座）

### 研究要旨

髄液、末梢血に加えてホルマリン固定剖検脳組織のパラフィン包埋標本 (FFPE) より、miRNA の発現解析を多系統萎縮症 (MSA) で行なった。血漿からは約 1200 種、CSF からは約 900 種、FFPE からは約 1000 種の miRNA が検出された。一定量以上発現のある miRNA については、標的遺伝子を web-tool で解析した。検出された miRNA の挙動は検体の種類により異なっていた。特に、病巣の FFPE より解析した miRNA の挙動は、生前には評価困難な疾患特異的な病態を反映している可能性があり、興味深い。

### A. 研究目的

多系統萎縮症 (MSA) 並びに ALS 患者の剖検脳組織 FFPE、脳脊髄液 (CSF)、血漿におけるマイクロ RNA (miRNA) を分析し、その挙動から疾患関連タンパク質の発現制御を推定する。

### B. 研究方法

MSA 並びに ALS 患者 3 名より同時採取した血漿と CSF、及び剖検脳組織ホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE) から、それぞれ RNA を抽出し、miRNA 発現プロファイル解析を行った。FFPE からの miRNA 抽出にあたっては、抽出条件を検討し、最適条件を採用した。miRNA 解析は 3D-Gene

チップ (東レ) を用いて行った。また、得られた miRNA の標的遺伝子の予測解析ツールは、web-base の TargetScan 並びに miRanda を用いた。対照群として FFPE は非神経疾患剖検例より、血漿は正常対照群より、髄液は腰椎麻酔時に同意を得て提供されたものを用いた

### (倫理面への配慮)

研究は医の倫理委員会、病院の自主臨床研究審査委員会の承認を得て行なった。

### C. 研究結果

血漿からは約 1200 種、CSF からは約 900 種、FFPE からは約 1000 種の miRNA が検出された。一定の発現量がある数百種の

miRNA に絞り、標的となる遺伝子を web-tool で予測解析した。FFPE から同定された miRNA には MSA に特徴的な因子にまで絞り込まれていないが、ALS においては SOD1 や TDP-43 など病態に関与している遺伝子を制御すると想定される miRNA が同定することができた。また、血漿、CSF、FFPE という由来の異なる 3 種の試料に共通する miRNA でありながら、MSA と ALS で増減の挙動が異なるものも見出された。FFPE で増大していた miRNA の標的予測とその機能解析を行うと、増大した miRNA は神経系の制御に関与していることが示唆された。さらに、血漿、CSF、FFPE の 3 試料で共通して見出された miRNA に関しては、由来試料によりその挙動は異なっていた。

#### D. 考察

本研究は転写・翻訳の調節因子である miRNA について、MSA の分子病態に関与するものを同定し、その制御タンパク質のネットワーク解析により病態分子機構を推論することを目的としている。特に MSA などの神経変性疾患では、生前に CNS の病態を検討することは現実的には困難である。その意味で、剖検組織 FFPE を用いた解析で検討することとした。この方法論では、疾患コントロールとして解析した ALS では疾患特異的因子を標的とする miRNA が含まれ、本アプローチが未知の病態解析に有用である可能性を示唆していると考えられる。同一 miRNA の挙動が血漿、CSF、FFPE で異なっていた理由として、FFPE では中枢神経局所状態の反映、血漿では全身状態が強く反映がされているこ

とによると考えられる。標的遺伝子の絞り込み等、今後さらに解析を進める余地があるが、オミックス解析の一環として、miRNA 解析は MSA 並びに ALS の疾患関連因子の絞り込みに有用な手法であると思われた。

#### E. 結論

血漿、CSF、剖検脳組織 FFPE より miRNA 発現プロファイルの解析を行なった。特に FFPE で増大した miRNA は、その標的予測と機能解析から、神経系因子を制御していることが示唆された。また、由来試料により miRNA の挙動は異なっており、由来組織を反映した挙動と考えられた。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sasaki H, Matsushima M, Hama Y, Sakushima K, Nakamura M, Yabe I, Oba K, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J: Plasma matrix metalloproteinase-3 correlates with the clinical severity in men with multiple system atrophy. *Neurology and Clinical Neuroscience*, 2013, in press
- 2) Mori F, Tanji K, Odagiri S, Toyoshima Y, Yoshida M, Ikeda T, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: Ubiquilin immunoreactivity in cytoplasmic and nuclear inclusions in synucleinopathies,

polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease. Acta Neuropathol, 2012; 124(1): 149-51

- 3) 矢部一郎, 佐々木秀直: 脊髄小脳変性症の治療の進歩. 神経治療学, 2012; 29:395-400

## 2. 学会発表

- 1) Sasaki H: Genetic news in multiple system atrophy. 16<sup>th</sup> International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, 2012. 6. 21, Convention Centre Dublin, Dublin, Ireland
- 2) 佐々木秀直:【教育セミナー4】多系統萎縮症の自律神経障害について. 第65回日本自律神経学会総会, 2012年10月26日, 都市センターホテル, 東京
- 3) 矢部一郎, 緒方昭彦, 佐々木秀直: 一卵性双生児で片方に非罹者を有する多系統萎縮症の2例. 第53回日本神経学会学術大会, 2012年5月25日, 東京国際フォーラム, 東京
- 4) 佐々木秀直, 矢部一郎, 佐久嶋 研、浜 結香, 内海 潤, 高橋育子, 佐藤和則, 松島理明: 多系統萎縮症における血中 matrix metalloproteinase 3 (MMP3) と tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1)の意義. 第53回日本神経学会学術大会, 2012年5月25日, 東京国際フォーラム, 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

- 1) 特願 2012-289082; 神経変性疾患の検査と治療に対する miRNA 又はその標的遺伝子の利用
- 2) 特願 2012-289083; 神経変性疾患の制御因子

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当無し

# miRNA

- Noncoding RNAの一種で生物界に広く存在
- 遺伝子発現を制御し、ヒトで約1700種
- 細胞内ではフリー、細胞外にはエクソゾームとして分泌
- がんなどの病態に関与

髄液 (CSF)、血漿  
剖検組織のホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE)

miRNA 分析・プロファイリング

神経変性疾患に特異的に変動するmiRNA

標的遺伝子のネットワーク解析

バイオインフォマティクス

疾患の分子病態機構の解析

バイオマーカー、創薬標的分子候補の探索

## 本邦の SCA19/22 症例の臨床遺伝学的検討。ー海外の報告例との比較ー

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）  
後藤 順（東京大学神経内科）  
増田直樹（東京共済病院 神経内科）  
三浦義治  
（がん・感染症センター 都立駒込病院 脳神経内科）

### 研究要旨

[目的]同一遺伝子座にある SCA19, SCA22 の原因遺伝子が共に *KCND3* であることが明らかとなった。SCA19/22 について、本邦の常染色体優性遺伝子脊髄小脳失調症 (ADCA) 家系において臨床遺伝学的検討を行う。[対象・方法]原因遺伝子未同定の自験例 ADCA54 家系を対象に *KCND3* の遺伝子変異について検討した。[結果]ADCA54 家系のうち 2 家系において *KCND3* のミスセンス遺伝子変異を認めた (p.G345V, p.T377M)。いずれの変異も *KCND3* の膜貫通部位に位置していた。日本人正常対照者 96 名では、これら 2 変異は認められなかった。p.G345V 家系、p.T377M とともに発症年齢の若年化を認めた。緩徐進行性の小脳性運動失調が主体であった。[まとめ]本邦の 2 家系の臨床像は、台湾から報告されていた小脳性運動失調主体の SCA22 の家系の臨床像に類似していた。オランダの SCA19 として報告されていた家系では、認知機能障害、不随意運動を伴う家系が報告されており、SCA19/22 は多彩な臨床像を呈する。今後の症例の蓄積により本邦の SCA19/22 症例の詳細な臨床像を明らかにしていく必要がある。

### A. 研究目的

染色体 1p21-q21 に位置する常染色体優性遺伝子脊髄小脳失調症 (ADCA) として、これまでオランダから SCA19 (Schlhaas HJ et al., *The Cerebellum*, 2005)、台湾から SCA22 の家系が報告されていた (Chung MY et al., *Brain*, 2003)。SCA19、SCA22 とともに緩徐進行性の小脳運動失調症で、発症年齢が世代を経るに従って若年化する

傾向がみられた。SCA19 の家系では、SCA22 とは異なり、認知機能障害、不随意運動を伴うことが多く、両疾患が同一疾患であるかどうか注目されていた。このたび、SCA19 および SCA22 の原因遺伝子が共に *KCND3* (電位依存性カリウムチャンネル Kv4.3 をコードする遺伝子) であると同定され、両疾患は同一疾患であることが示された。

本研究は本邦の遺伝子未同定脊髄小脳失調症において、SCA19/22について検索し、SCA19/22 症例について臨床遺伝学的特徴を明らかにすることを目的に行った。

## B. 研究方法

ADCAの自験例450家系のうちSCA1, SCA2, MJD, SCA6, SCA7, SCA8, SCA12, SCA17, SCA31, SCA36の遺伝子変異を認めなかった54家系について*KCND3*の遺伝子変異について検討した。*KCND3*の各exonについてPCRを行い、direct nucleotide sequenceにて変異を検索した。プライマー配列およびPCR条件については、*KCND3*に関する既報告(Postma AV et al., Hum Genet, 2000)に従った。

### (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

遺伝子変異が未同定であったADCA54家系のうち2家系において*KCND3*のミスセンス遺伝子変異を認めた(p.G345V, p.T377M)。いずれの変異も*KCND3*の膜貫通部位に位置していた。日本人正常対照者96名を同様の方法で検索した結果、これら2変異は認められなかった。

p.G345V変異をもつ本邦家系の発端者は50代後半から構音障害、ふらつきを自覚。小脳性運動失調を主徴とし、緩徐進行性の経過をとっている。発端者の親は90代でふらつき、同胞は50代からふらつきを自覚している。MRI画像では小脳

半球・虫部の萎縮を認めた。p.G345V変異は海外のAshkenazi Jewish Americanの家系にもみられた変異と同一であった。Ashkenazi Jewish家系でも発端者は50代で発症し、緩徐進行性の小脳性運動失調を主徴とする臨床像を呈していた。

p.T377Mの家系は、親が40代発症、発端者およびその同胞はそれぞれ10代後半、10代前半の発症と発症年齢の若年化がみられた。発端者は30代の診察時、小脳性運動失調、構音障害、注視方向性眼振を認めた。深部反射の亢進はみられたが病的反射は明らかではなく、小脳性運動失調が前景にたつ臨床像であった。WAIS-Rでは認知機能低下は明らかではなかった。MRI画像では小脳半球・虫部の萎縮はみられたが、脳幹の萎縮はみられなかった。同変異を認めた親および同胞においても、小脳性運動失調を主徴とする臨床像であった。現時点で、発端者は50代であるが、立ち上がり時のふらつきは強いものの独歩可能で、認知機能低下もなく経過している。

## D. 考察

本邦、台湾、フランス、Ashkenazi Jewish America、オランダの家系で同定された変異はいずれも*KCND3*の膜貫通部位に位置していた。

本邦の家系も含め、報告されているSCA19/22の家系では世代間での発症年齢の若年化がみられ、SCA19/22の臨床遺伝学的特徴の一つと考えられた。

SCA19/22の臨床像は、緩徐進行性の小脳性運動失調が主体であるが、欧州(オランダ、フランス)からは認知機能障害、

不随意運動(振戦、ミオクローヌス)、rigidity, 末梢神経障害を伴う家系が報告され、多彩な臨床像を呈する。画像所見はいずれも小脳半球および虫部の萎縮が主体である。

臨床情報が得られた本邦の 2 家系については、緩徐進行性の小脳性運動失調を主徴とする臨床像で、台湾からの報告例と類似した臨床像であった。

## E. 結論

本邦の ADCA においても SCA19/22 の家系が存在することが明らかとなった。SCA19/22 は発症年齢の若年化を特徴とし、経過は長く、緩徐進行性である。小脳性運動失調を主徴とする疾患であるが、欧州からの報告例では多彩な臨床像を呈している。

今後の症例の蓄積により本邦の SCA19/22 症例の詳細な臨床像を明らかにしていく必要がある

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Lee YC, Durr A, Majczenko K, Huang YH, Liu YC, Lien CC, Tsai PC, Ichikawa Y, Goto J, Monin ML, Li JZ, Chung MY, Mundwiller E, Shakkottai V, Liu TT, Tesson C, Lu YC, Brice A, Tsuji S, Burmeister M, Stevanin G, Soong BW: Mutations in *KCND3* cause spinocerebellar ataxia type 22. Ann Neurol, 2012; 72(6): 859-869

## 2. 学会発表

なし

## 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

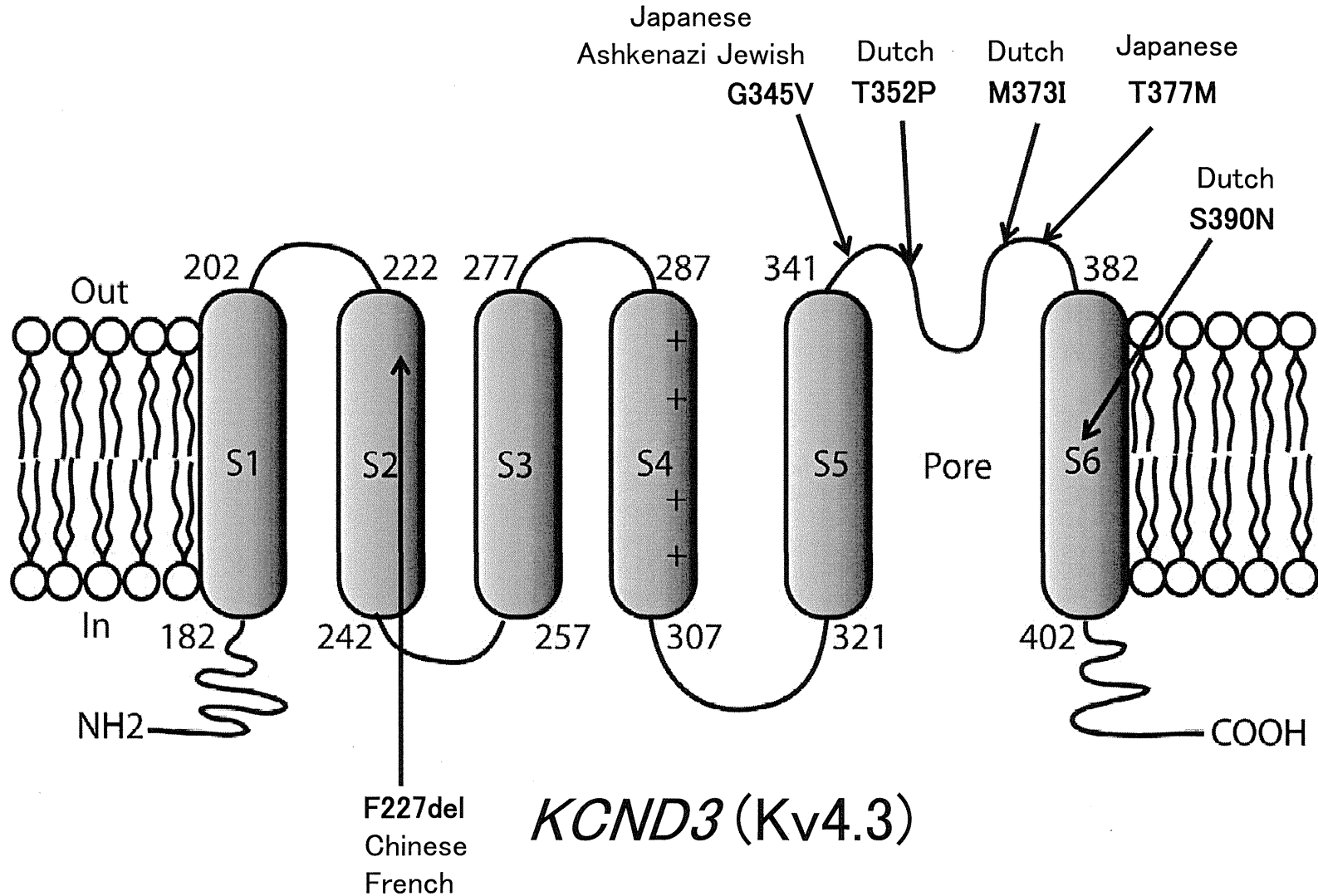
なし

### 3. その他

なし



# SCA19/22における遺伝子変異



## 脊髄小脳失調症 31 型小脳病変の神経病理学的再検討

研究分担者 吉田 邦広（信州大学医学部神経難病学講座）

共同研究者 浅川 美果、鈴木 絵美、小柳 清光

（信州大学医学部神経難病学講座）

新宅 雅幸（大阪赤十字病院病理部）

田畑 賢一（佐久総合病院神経内科）

池田 修一（信州大学医学部脳神経内科、リウマチ・膠原病内科）

### 研究要旨

SCA31 に特徴的なプルキンエ細胞周囲の coat-like 構造について、共焦点二重免疫染色によりプルキンエ細胞の樹状突起の増生 (somatic sprouting) とシナプス終末、さらにはアストロサイトの突起が絡まりあった構造物であることが示された。プルキンエ細胞変性の早期から核の変形が見られ、coat-like 構造の形成と並行して、さらに細胞体の萎縮や核の変形が進行する様子が観察された。Coat-like 構造の構成要素の一つである somatic sprouting の成因として、プルキンエ細胞核やミトコンドリアの異常が関与する可能性が考えられた。

### A. 研究目的

脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) では過去にいくつかの神経病理学的所見が報告されている。それらに共通する所見として、変性したプルキンエ細胞周囲の halo-like、あるいは coat-like 構造が記載されている。過去の報告では、この構造物はプルキンエ細胞の樹状突起に、basket 細胞や他の部位の神経細胞からの軸索終末に由来する synaptophysin 陽性顆粒が混在したものとされている。本研究では SCA31 剖検脳 2 症例を用いて、小脳病変の特徴を解明することを目的とした。

### B. 研究方法

対象は遺伝学的検査により確定された SCA31 患者剖検脳 2 例 (死亡時年齢 77 歳男性および 81 歳男性)。これらに加えて、年齢相応の対照 4 例の小脳のホルマリン固定パラフィン薄切切片を用いて、hematoxylin-eosin 染色、Klüver-Barrera 染色、Bodian 染色など通常の組織染色を行った。また、抗 calbindin-D28K 抗体、抗 parvalbumin (PV) 抗体、抗 synaptophysin (SYP) 抗体、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体、抗リン酸化 neurofilament (SMI-31) 抗体などを用いた免疫染色、種々の組み合わせによる二重免疫染色 (明視野光顕、共

焦点顕微鏡観察)を行った。さらに SCA31 の 1 例で、グルタル固定エポン包埋材料の電子顕微鏡観察を行った。

#### (倫理面への配慮)

特に配慮すべき事項なし。

### C. 研究結果

SCA31 の 2 症例では、頻度や程度には大きな差異があるものの共通して既報の通りプルキンエ細胞の脱落と残存プルキンエ細胞周囲の coat-like 構造が見られた。残存プルキンエ細胞は萎縮し、細胞体から多数の calbindin-D28K、PV 陽性の樹状突起が coat-like 構造内に突出していた (somatic sprouting)。また、分子層内には calbindin-D28K、PV 陽性の cactus 様変化が多く見られた。

coat-like 構造内には一部、GFAP 陽性のアストロサイトの突起が混入していたが、Iba1 陽性マクローファージ/ミクログリアはほとんど見られなかった。また coat-like 構造内には SYP 陽性顆粒が多数見られた。Bodian、SMI-31、SMI-32 免疫染色では、coat-like 構造の周囲を取り巻く索状構造が陽性であった。

coat-like 構造内のプルキンエ細胞は極度に萎縮して、核の変形が顕著であった。また周囲の coat-like 構造がまだ十分に完成していないプルキンエ細胞においても核の変形が見られた。一方で明らかな coat-like 構造を形成せず、プルキンエ細胞体の高度の萎縮、核の萎縮・濃縮が見られる細胞も観察された。電顕的観察では、萎縮したプルキンエ細胞の細胞質は、細胞内小器官の condensation のために全体に暗色調を呈

し、特にクリステの形態異常を示すミトコンドリアが目立った。

### D. 考察

プルキンエ細胞周囲の coat-like 構造は既報の通り、プルキンエ細胞の樹状突起の増生 (somatic sprouting) とシナプス終末、さらにはアストロサイトの突起が絡まりあった構造物であると考えられた。この構造物内へは周囲からの軸索の侵入が乏しく、SYP 陽性顆粒の由来は不明であった。また、プルキンエ細胞の変性の早期—おそらく coat-like 構造の形成に先んじて—から核の変形が始まり、coat-like 構造の形成に並行して、細胞体の萎縮、核の変形が進行する可能性が示唆された。

### E. 結論

somatic sprouting は SCA31 に特徴的なプルキンエ細胞周囲の coat-like 構造の構成要素の一つであるが、その背景にはプルキンエ細胞の内在性の要因 (核、ミトコンドリアの異常、など) が考えられた。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 吉田邦広：リピート伸長病 (repeat expansion disease) —トリプレットリピート病を中心に—。SRL 宝函, 2012; 32 (4): 20-29
- 2) 吉田邦広：皮質性小脳萎縮症 (CCA) (脊

髄小脳変性症 (SCD) の Up-To-Date) .  
最新医学, 2012; 67 (5): 1071-1076

- 3) 吉田邦広, 樋口京一, 池田修一. 神経変性疾患は個体間伝播するか? —アミロイドーシス・モデルからの推論—. Brain& Nerve, 2012; 64 (6): 665-674

## 2. 学会発表

- 1) 吉田邦広, 鈴木佳代, 石川えり, ら. 脊髄小脳失調症 31 型における  $(TGGA)_n \cdot (UGGA)_n$  結合蛋白の探索. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 25 日, 東京
- 2) 小柳清光, 吉田邦広, 山田光則, ら: 構音障害、運動失調、認知症状を示し、クラーク柱神経細胞脱落とレビー小体とを呈したポリグルタミン封入体陽性 85 歳例. 第 53 回日本神経病理学会総会, 2012 年 6 月 30 日, 新潟

## 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

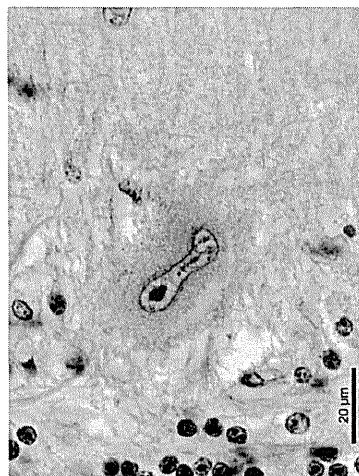
なし

### 3. その他

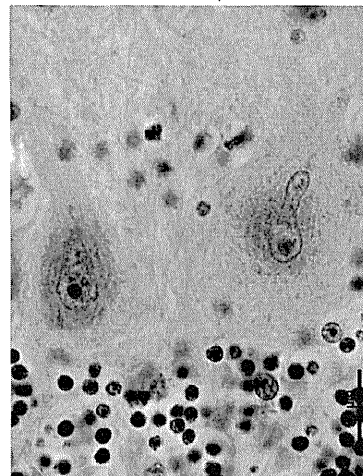
なし

SCA31 — Purkinje細胞変性のchronology(仮説) —

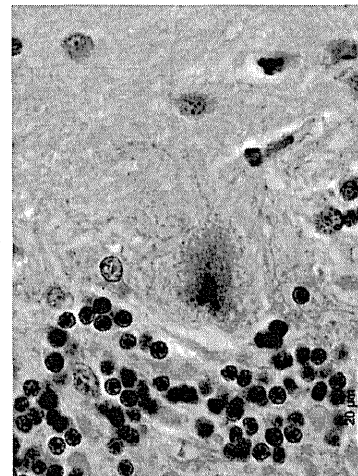
coat-like構造の形成



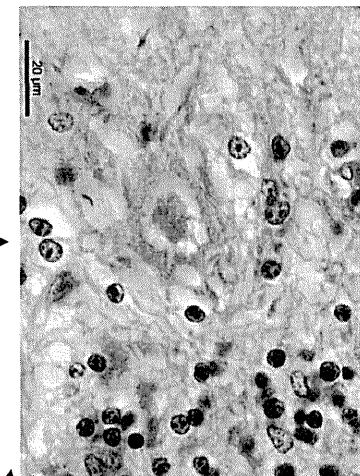
核の変形  
細胞体の萎縮



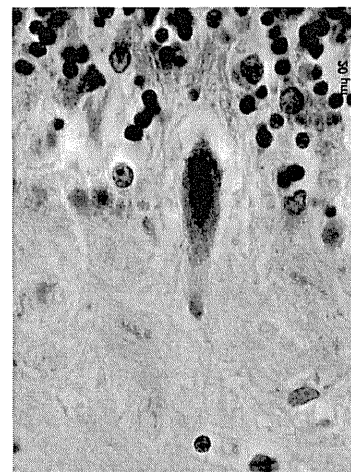
somatic sprouting  
cactus-like change



細胞体の萎縮  
核の変性→消失  
細胞膜の不鮮明化



細胞体の消失  
周囲の軸索の増生  
(empty basketの形成)



細胞体・核の萎縮  
coat-like構造の形成(-)

樹状突起へのシナプス形成(シナプス顆粒)  
アストロサイトの突起の侵入

## 新しい SCA/ALS crossroad mutation Asidan の臨床的特徴と病態

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、小泉昭夫（京都大学大学院医学研究科 環境衛生学分野）

### 研究要旨

GGCCTG リピート異常延長を認めた 9 家系 14 名の Asidan/SCA36 患者を臨床遺伝学的に検討した。全患者が小脳失調で発症し、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。さらに、本疾患の臨床的特徴として聴力低下や前頭葉機能障害を認めた。剖検例の病理学的解析では臨床所見を裏付けるように小脳のプルキンエ細胞および舌下神経核や頸髄前角の運動ニューロン脱落を認めたが、残存神経細胞に TDP-43 または ataxin-2 陽性の封入体形成を認めなかった。

#### 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、小脳失調症と運動ニューロン疾患の特徴を併せ持つ新たな遺伝性神経変性疾患 Asidan (spinocerebellar ataxia type 36: SCA36) の臨床病理学的特徴と病態を明らかにする。

#### B. 研究方法

NOP56 遺伝子イントロン 1 における GGCCTG リピート異常延長を認めた Asidan/SCA36 の 9 家系 14 名の患者の神経学的所見、電気生理学的検査、筋生検所見、聴覚機能検査、嚥下機能検査、頭部 MRI や脳血流 SPECT などの脳画像検査、認知機能検査につき解析した。また、1 例の

Asidan/SCA36 剖検例の神経病理学的検討を行った。

#### （倫理面への配慮）

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究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

Asidan/SCA36 患者の延長 GGCCTG リピート数はサザンブロット解析にて 1700-2300 リピートであった。平均発症年齢は 53.1 歳で、殆どの患者は小脳失調で発症し、体幹失調、構音障害、四肢失調は 100% の患者に、四肢の腱反射亢進は 79% に認めた。舌萎縮・線維束性収縮は 71% に、四肢の筋萎縮・線維束性収縮は 57% に認め、これらの下位運動ニューロン徴

候は罹病期間10年以上の患者で特に目立っていた。筋電図では脱神経所見を認め、筋生検では群集萎縮や小角化線維などの神経原性所見を認めた。また聴力低下の頻度も高く(69%)、オーディオグラム解析での平均聴力レベル(PTA)は42.9dBであり、MSA-Cなど他の小脳失調症と比べて有意な聴力低下を認めた。聴性脳幹誘発電位では聴覚系の末梢部の障害を示す所見であった。嚥下造影検査(VF)と舌圧測定器を用いた嚥下機能検査では、Asidan/SCA36患者の嚥下障害度はALS患者やSBMA患者よりも軽度であった。脳画像検査では発症早期には比較的小脳に限局した萎縮を呈し、罹病期間の長い患者においては脳幹萎縮や前頭葉を主とした大脳萎縮を認めた。認知機能検査では前頭葉機能低下を認めた。神経病理学的には、プルキンエ細胞や小脳歯状核ニューロンの顕著な脱落を認めたが、橋底部および下オリーブ核の神経細胞は比較的保たれていた。また、舌下神経核や脊髄前角の運動ニューロンの顕著な脱落も認めた。NOP56/TDP-43/ataxin-2免疫染色では残存神経細胞に細胞質内もしくは核内の封入体形成を認めなかった。

#### D. 結論

Asidan/SCA36は臨床的に緩徐進行性の小脳失調症を主症状として、舌や四肢・体幹の筋萎縮や線維束性収縮などの運動ニューロン徴候を高率に合併するこれまでに報告の無い新たな遺伝性疾患である。Asidan/SCA36の臨床病理学的特徴とその分子病態を明らかにすることは小脳失調症と運動ニューロン疾患の両者の克服へ

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) Abe K, Ikeda Y, Kurata T, Ohta Y, Manabe Y, Okamoto M, Takamatsu K, Ohta T, Takao Y, Shiro Y, Shoji M, Kamiya T, Kobayashi H, Koizumi A: Cognitive and affective impairments of a novel SCA/MND crossroad mutation Asidan. *Eur J Neurol*, 2012; 19: 1070-1078
- 2) Ikeda Y, Ohta Y, Kobayashi H, Okamoto M, Takamatsu K, Ota T, Manabe Y, Okamoto K, Koizumi A, Abe K: Clinical features of SCA36: a novel spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (Asidan). *Neurology*, 2012; 79: 333-341
- 3) Ikeda Y, Ohta Y, Kurata T, Shiro Y, Takao Y, Abe K.: Acoustic impairment is a distinguishable clinical feature of Asidan/SCA36. *J Neurol Sci*, 2013; 324: 109-112
- 4) Morimoto N, Yamashita T, Sato K, Kurata T, Ikeda Y, Kusuhara T, Murata N, Abe K: Assessment of swallowing in motor neuron disease and Asidan/SCA36 patients with new methods. *J Neurol Sci*, 2013; 324: 149-155
- 5) 阿部康二, 池田佳生: SCA36 (新しいALS/SCA crossroad mutation Asidan).

神経内科, 2012; 77: 104-108

- 6) 阿部康二, 池田佳生: SCA36 (別名 Asidan) . BRAIN and NERVE, 2012; 64: 937-941
- 7) 松浦徹, 池田佳生, 阿部康二: 非翻訳リピート異常伸長による脊髄小脳失調症 (SCA8, SCA10, SCA12, SCA36) . 最新医学, 2012; 67: 1122-1130

## 2. 学会発表

- 1) 池田佳生ら: 新しい ALS/SCA crossroad mutation Asidan の臨床病理学的特徴. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 23 日, 東京
- 2) 池田佳生ら: 小脳失調症と運動ニューロン疾患の特徴を併せ持つ新たな遺伝性疾患 Asidan の臨床病理学的特徴. 第 106 回日本内科学会中国地方会, 2012 年 6 月 2 日, 島根
- 3) 池田佳生ら: 岡山大学神経内科における SCD/MSA 症例 313 例の検討. 第 92 回日本神経学会中国四国地方会, 2012 年 7 月 7 日, 徳島

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

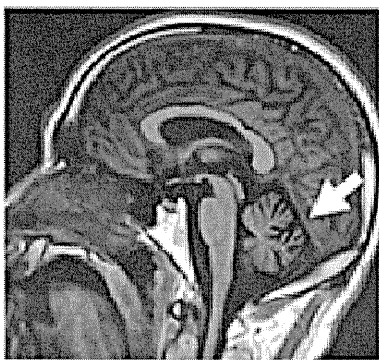
なし



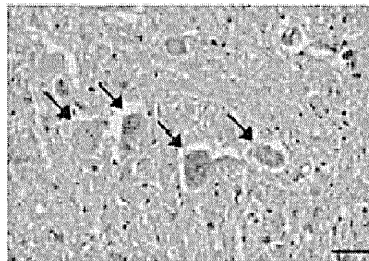
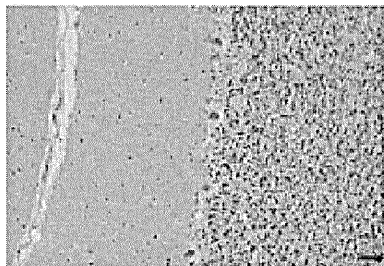
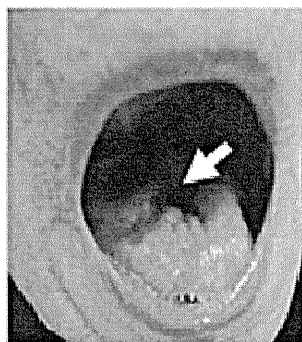
# 新しいSCA/ALS crossroad mutation Asidanの臨床的特徴と病態

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

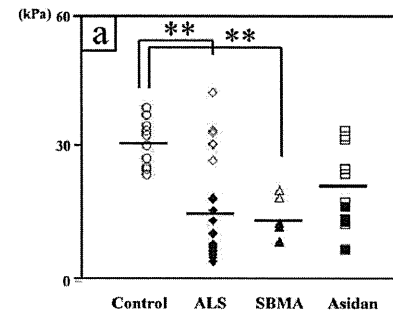
小脳失調症で発症し



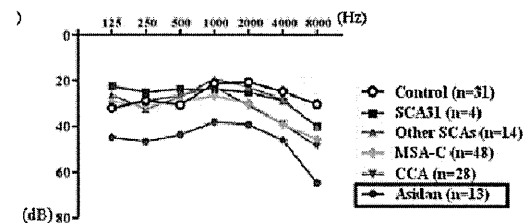
罹病期間が進むと運動ニューロン障害が明らかになる



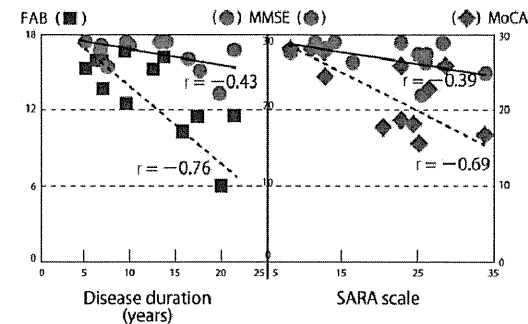
Asidan患者の舌圧はALSやSBMAほど低下せず機能的予後良好



高頻度に聴力低下を認める



進行期に前頭葉機能障害を認める



## Action Myoclonus-Renal Failure syndrome (AMRF) とライソゾーム異常： 新規 SCARB2 遺伝子変異を認めた 2 剖検例の臨床・病理・遺伝学的解析

研究分担者	小野寺 理（新潟大学脳研究所 分子神経疾患資源解析学分野）
共同研究者	他田正義（同 分子神経疾患資源解析学分野）
	付永娟（同 病理学分野）
	他田真理（同 病理学分野）
	豊島靖子（同 病理学分野）
	会田 泉（国立病院機構新潟病院 神経内科）
	中島 孝（同 神経内科）
	武田茂樹（新潟脳外科病院 病理部門）
	内藤明彦（松浜病院 精神科）
	高橋 均（新潟大学脳研究所 病理学分野）
	西澤正豊（同 神経内科）

### 研究要旨

Action myoclonus-renal failure syndrome (AMRF) は、思春期発症の進行性ミオクローヌスてんかん、小脳性運動失調、腎不全を特徴とする常染色体劣性遺伝性疾患である。2008年に原因遺伝子としてライソゾーム膜蛋白をコードする SCARB2 が同定された。遺伝子診断例の報告により腎不全は必須の症候でないことが判明したが、SCARB2 変異の確認された剖検例の報告は極めて少なく、臨床・病理像の全貌は依然明らかでない。本研究では、AMRF の臨床・病理像の確立と病態解明を目的とし、当施設で経験した SCARB2 変異を認める AMRF 2 剖検例の臨床・病理像、遺伝子異常、生化学的特徴を明らかにした。

#### A. 研究目的

Action myoclonus-renal failure syndrome (AMRF) は、思春期発症の進行性ミオクローヌスてんかん、小脳性運動失調、腎不全を特徴とする常染色体劣性遺伝性疾患である。2008年に原因遺伝子としてライソゾーム膜蛋白をコードする SCARB2 が同定された。遺伝子診断例の報

告により腎不全は必須の症候でないことが判明したが、SCARB2 変異の確認された剖検例の報告は極めて少なく、臨床・病理像の全貌は依然明らかでない。本研究では、AMRF の臨床・病理像の確立と病態解明を目的とし、当施設で経験した SCARB2 変異を認める AMRF 2 剖検例の臨床・病理像、遺伝子異常、生化学的特徴

を明らかにした。

## B. 研究方法

**対象：**症例 1 は血族婚・家族内類症者のある死亡時 59 歳の男性。症例 2 は家族歴のない死亡時 28 歳の女性。**病理学的解析：**脳・脊髄，一般内蔵器の病理学的検索，SCARB2 の免疫組織化学，電顕による細胞内微細構造の解析を行った。**遺伝子解析：**凍結組織から抽出したゲノム DNA を用い，直接塩基配列決定法および酵素制限処理法により SCARB2 遺伝子を解析した。**生化学的解析：**凍結脳組織から抽出した蛋白および mRNA サンプルを解析した。**(倫理面への配慮)**

病理学的解析および遺伝子解析を含む本研究は，学内倫理委員会の承認を受け，対象者家族から書面での同意を得た上で実施した。

## C. 研究結果

**臨床所見：**症例 1 は 45 歳時に歩行障害で発症し，緩徐進行性の小脳性運動失調，姿勢時振戦，企図振戦，動作性ミオクローヌスを認めた。発症 10 年で歩行不能，認知機能障害を呈し，全経過 14 年で肺炎により死亡した。症例 2 は 20 歳時に歩行障害で発症し，初期から全身けいれん発作を繰り返し，進行性ミオクローヌステんかんと診断された。緩徐進行性の小脳性運動失調，動作性ミオクローヌス，認知機能障害を認め，全経過 8.5 年で肺炎により死亡した。両症例とも腎不全を伴わなかった。両症例で認知機能障害を認めた点，症例 1 の発症年齢が高い（既報では 14-23 歳）点が，既報と異なっ

いた。

**病理所見：**肉眼的に，両症例で小脳上葉，橋被蓋の軽度萎縮，症例 2 で淡蒼球の軽度萎縮を認めた。光顕所見では，神経変性を小脳皮質，淡蒼球，橋被蓋に認めた。神経変性は，症例 2 に比して症例 1 で軽度であった。AMRF に特徴的な所見として，小脳・大脳皮質，基底核，黒質に広汎に褐色顆粒の出現を認めた。電顕では，褐色顆粒は膜で囲まれた電子密度の高い成分で構成される卵円形小体またはその複合体で，主としてアストロサイト胞体内に局在した。細胞内褐色顆粒の出現と神経変性の特徴的分布は安楽らの既報例（安楽ら．九州神経精神医学 1966）に合致するが，AMRF 診断確定例において神経変性の存在を明らかにしたのは初めてである。

**遺伝子変異：**両症例で SCARB2 の新規遺伝子変異（症例 1，フレームシフト変異；症例 2，ナンセンス変異）をホモ接合に認めた。

**生化学的特徴：**小脳・大脳において，症例 1 で SCARB2 蛋白の中等度の減少，症例 2 で高度の減少を認めた。SCARB2 mRNA 量は，症例 1 では対照例と同程度に保たれ，症例 2 で高度に減少していた。この SCARB2 蛋白の減少は，症例 1 では蛋白不安定性によるもの，症例 2 ではナンセンス介在性 mRNA 崩壊機構による mRNA 分解のためと推察された。SCARB2 蛋白量に一致して， $\beta$ -glucocerebrosidase ( $\beta$ -GC) 蛋白量は症例 1 で中等度に，症例 2 で高度に減少していた。さらに，両症例で  $\beta$ -GC 糖鎖修飾の異常を認めた。ライソゾーム酵素  $\beta$ -GC の運び屋であるライソゾ

一膜蛋白 SCARB2 の減少が,  $\beta$ -GC の減少と糖鎖修飾異常を引き起こすことをヒト脳組織において初めて検証した.

#### D. 結論と展望

新規 SCARB2 変異を認めた 2 剖検例の解析から, AMRF では臨床的に認知症を呈しうること, 40 歳代の中年発症もありうること, 病理学的に細胞内褐色顆粒のみならず系統的神経変性も生じうることを明らかにした. さらに, SCARB2 蛋白の減少, mRNA の減少 (症例 2 のみ),  $\beta$ -GC 蛋白の減少と糖鎖修飾異常の存在を, 初めてヒト剖検脳組織において確認した. 今後, 臨床・病理像の確立と病態解明のために, 遺伝子診断の確定した剖検例の蓄積が重要である.

#### E. 健康危険情報

とくになし.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Onodera O: What is ataxia? - Towards developing a new scale for ataxia. Rinsho Shinkeigaku, 2012; 52(11): 988-9
- 2) Toyoshima Y, Onodera O, Yamada M, Tsuji S, and Takahashi H: Spinocerebellar Ataxia Type 17. GeneReviews, 2012

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

とくになし.