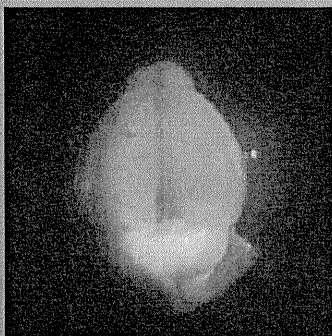
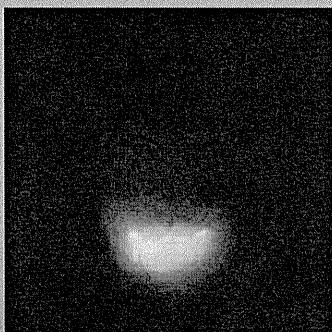


# 脊髄小脳変性症1型モデルマウスのHMGB1による治療実験

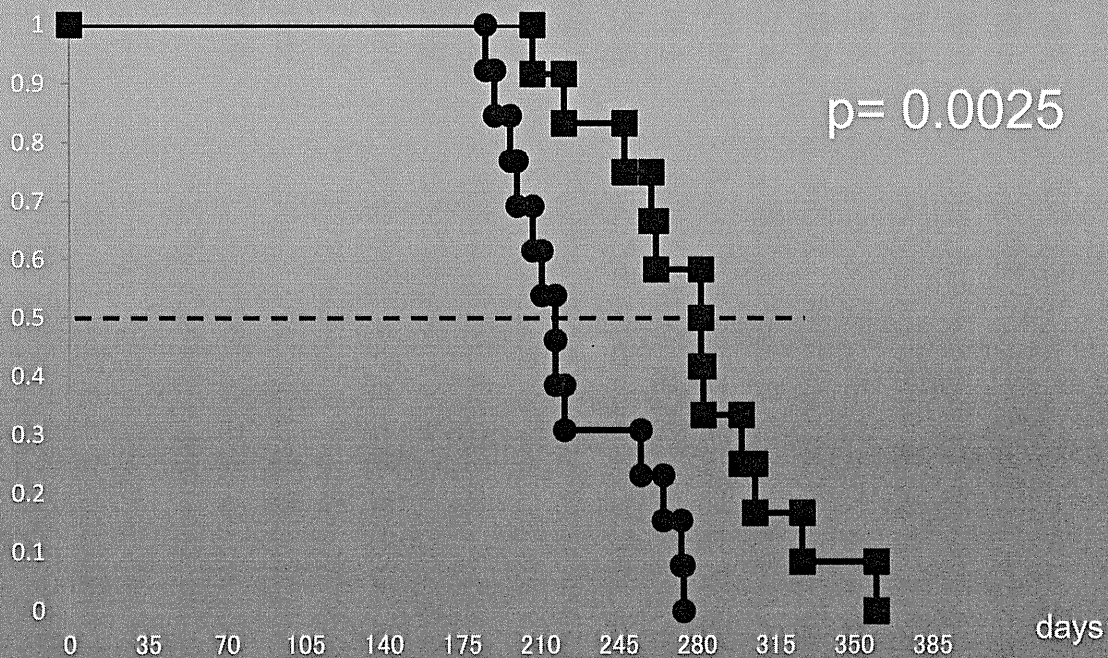
トランスジェニックマウスで確認されたHMGB1の治療効果をウイルスベクターで再現出来る。

AAV1-GFP



## Lifespan

● Atx1-KI (n=13)    ■ Atx1-KI; HMGB1 (n=12)



モデルマウスにHMGB1を発現すると寿命が顕著に延長する

## SCA3 モデルマウスの電気生理学的解析と AAV9 経静脈投与による神経機能回復の検討

研究分担者 中村 和裕（群馬大学大学院医学系研究科神経生理学分野）

共同研究者 平井 宏和（群馬大学大学院医学系研究科神経生理学分野）

### 研究要旨

異常伸張ポリグルタミン鎖をもつ短縮 ataxin-3 をプルキンエ細胞に発現し、顕著な小脳萎縮と運動失調を示す遺伝性脊髄小脳変性症 3 型モデルマウス（SCA3 マウス）の小脳プルキンエ細胞を、電気生理学的および形態学的に解析した。生後 13 週の SCA3 マウスプルキンエ細胞の樹状突起は顕著に萎縮していたが、平行線維および登上線維からの AMPA 受容体を介する速いシナプス伝達は比較的保たれていた。これに対し、平行線維を頻回刺激したときに見られる代謝型グルタミン酸受容体（mGluR）を介する遅いシナプス伝達とシナプス可塑性（synaptically-evoked suppression of excitation; SSE）は完全に失われていた。アデノ随伴ウイルス血清型 9（AAV9）経静脈投与により治療用遺伝子（CRAG）が導入されたプルキンエ細胞では、樹状突起の伸張・分枝が不完全ではあるが回復しており、mGluR を介するシナプス可塑性（SSE）も認められた。

### A. 研究目的

以前我々は、顕著な小脳萎縮と運動失調を示す SCA3 マウスを作成した。このマウスは、小脳プルキンエ細胞特異的 L7 プロモーター制御下で、異常伸張ポリグルタミン鎖（Q69）をもつ短縮 ataxin-3 を発現し、核内に異常タンパク質の凝集体を形成する。SCA3 マウスの小脳は著しく小さく、生後 2 週頃から顕著な運動失調を示す。生後 25 日の SCA3 マウスの小脳に、レンチウイルスベクターを注射し、ユビキチンプロテアソーム系を賦活する CRAG 遺伝子をプルキンエ細胞に発現させることで凝集体が消失し、運動機能が回復する。しかし SCA3 マウスのプルキンエ

細胞にはどのような機能障害があり、CRAG 発現によりその障害が、どの程度、回復するのかが明らかになっていない。またレンチウイルスベクターを用いた場合、注射部位に遺伝子発現が限局するため、脊髄・脳幹・小脳と広範囲に障害が及ぶ SCA3 の治療に用いたとしても、十分な効果が得られない可能性が高い。本研究ではまず、SCA3 マウスのプルキンエ細胞における形態異常とシナプス伝達異常を明らかにした。次に、広範囲に遺伝子導入が期待できるアデノ随伴ウイルス血清型 9（AAV9）の経静脈投与によって、導入した遺伝子の脳内の発現様式を調べた。さらに CRAG 発現 AAV9 の経静脈投与

によってプルキンエ細胞内に CRAG を発現させることで、プルキンエ細胞の形態およびシナプス伝達異常が回復するのかを検討した。

## B. 研究方法

生後 13 週の SCA3 マウスのプルキンエ細胞に対する形態的及びホールセルパッチクランプ法による電気生理学的解析を行った。また AAV を用いて SCA3 マウスの異常の回復を試みた。

### 【SCA3 マウスプルキンエ細胞形態評価】

樹状突起の形態は、膜容量で評価するとともに、ホールセル電極から biocytine を注入し、電気生理解析後に固定、免疫染色して観察した。

### 【SCA3 マウスプルキンエ細胞のパッチクランプ解析】

プルキンエ細胞をホールセルパッチし、平行線維 EPSC、登上線維 EPSC、平行線維バースト刺激後のシナプス前抑制（エンドカンナビノイド産生を介する短期の可塑性、synaptically-evoked suppression of excitation; SSE）を測定した。

### 【AAV 静脈注射を用いたレスキュー実験】

生後 1 日の SCA3 マウスに CRAG 発現 AAV9 を静脈注射した。3 週間後から 2 週おきに生後 13 週になるまで、ロータロッドを用いて運動能力を評価した。その後、マウスは電気生理学的解析および免疫組織学的解析に用いた。SCA3 マウスのプルキンエ細胞に発現している変異 ataxin-3 の N 末端には HA タグが付加されているため、抗 HA 抗体で免疫染色することで、変異 ataxin-3 を定量した。

## （倫理面への配慮）

実験に使用する動物には、十分な麻酔を施し、苦痛を感じないようにした。またできる限り動物を使用しない方法を考え、使用する動物数を可能な限り減らす工夫を行った。

## C. 研究結果

### 【SCA3 マウスプルキンエ細胞の形態】

生後 13 週の SCA3 マウスのプルキンエ細胞の樹状突起を免疫染色して観察したところ、著しい形態異常（萎縮）が認められた。プルキンエ細胞の膜容量は、野生型マウスで約 600pF であったのに対し、SCA3 マウスでは約 100pF しかなかった。

### 【SCA3 マウスプルキンエ細胞のパッチクランプ解析】

SCA3 マウスプルキンエ細胞の樹状突起は著しく萎縮していたが、平行線維 EPSC と登上線維 EPSC にはそれほど大きな変化なく記録することができた。これに対し、代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) を介する遅いシナプス伝達と短期シナプス可塑性、SSE は完全に失われていた。

### 【AAV 静脈注射を用いたレスキュー実験】

CRAG と GFP の両方を発現する AAV を、生後 1 日の野生型および SCA3 マウスの頸静脈から注射し、生後 13 週の時点で環流固定し小脳における GFP の発現を観察した。野生型マウスでは GFP は小脳虫部の全小葉に広く発現していた。これに対し、SCA3 マウス小脳では、GFP 発現は主に第 10 小葉に局限していた。

AAV9 により GFP (および CRAG) が導入されたプルキンエ細胞では、樹状突起の伸張・分枝が不完全ではあるが回復してい

た。またパッチクランプ解析では、mGluRを介するシナプス可塑性 (SSE) も認められた。これに対し、運動失調の回復は見られなかった。これは、AAV9 感染範囲が野生型マウスでは小脳全域にわたっていたものの、SCA3 マウスでは第 10 小葉に限局していたことが原因と思われた。

#### D. 考察

今回の研究で、変異 ataxin-3 を発現する SCA3 マウスでは、平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおける mGluR を介する伝達がほぼ消失していることが明らかとなった。mGluR1 の産生障害は SCA1 モデルマウスでも報告されていることから、mGluR の機能障害は SCA1 と SCA3 の両方に共通しているのかもしれない。ノックアウトマウスの研究から、プルキンエ細胞の mGluR1 が欠損すると顕著な小脳失調が起こることが明らかになっていることから、SCA の小脳失調を考える上で重要な情報が得られたと考えている。

AAV9 の静脈注射では、野生型マウスにおいては小脳皮質に広く遺伝子導入が見られたのに対し、SCA3 マウスでは第 10 小葉に発現が限局していた。この原因は不明であるが、SCA1 では VEGF 産生減少により乏血管となっていることが報告されていることから、SCA3 マウスでも乏血管のため遺伝子導入があまり見られなかった可能性がある。一方、第 10 小葉は脈絡層に近く、ここから滲み出す AAV の感染によって遺伝子導入されたと考えられる。

#### E. 結論

SCA3 マウスのプルキンエ細胞は樹状突

起の顕著な萎縮に加えて、mGluR シグナルに障害があることが明らかとなった。また、AAV9 を用いた CRAG 遺伝子導入により、これらの異常が、少なくとも個々の神経細胞レベルでは回復することが示された。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

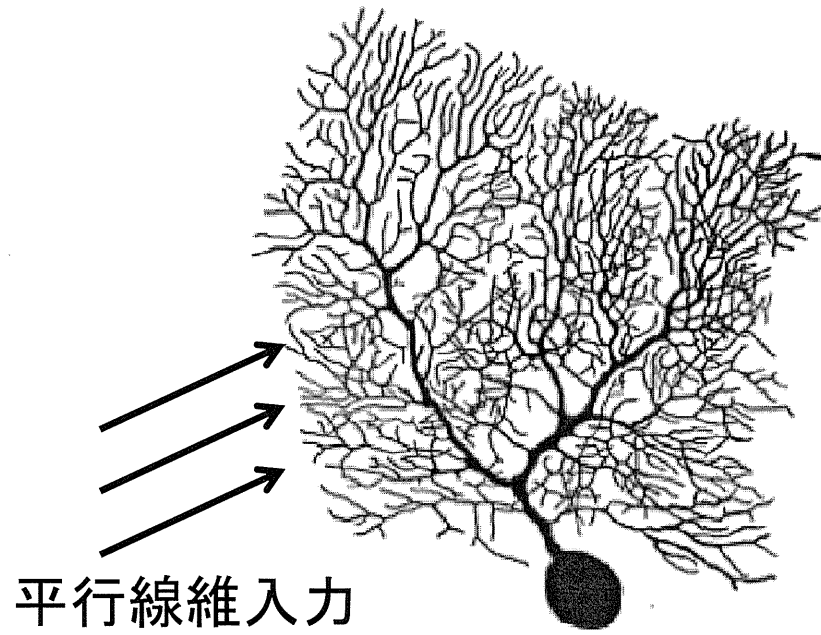
##### 1. 論文発表

- 1) Hirai H: Basic research on cerebellar gene therapy using lentiviral vectors. *Cerebellum*, 2012; 11(2):443-445
- 2) Goenawan H, Hirai H: Modulation of lentiviral vector tropism in cerebellar Purkinje cells in vivo by a lysosomal cysteine protease cathepsin K. *Journal of NeuroVirology*, 2012;18(6):521-531

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特記事項なし

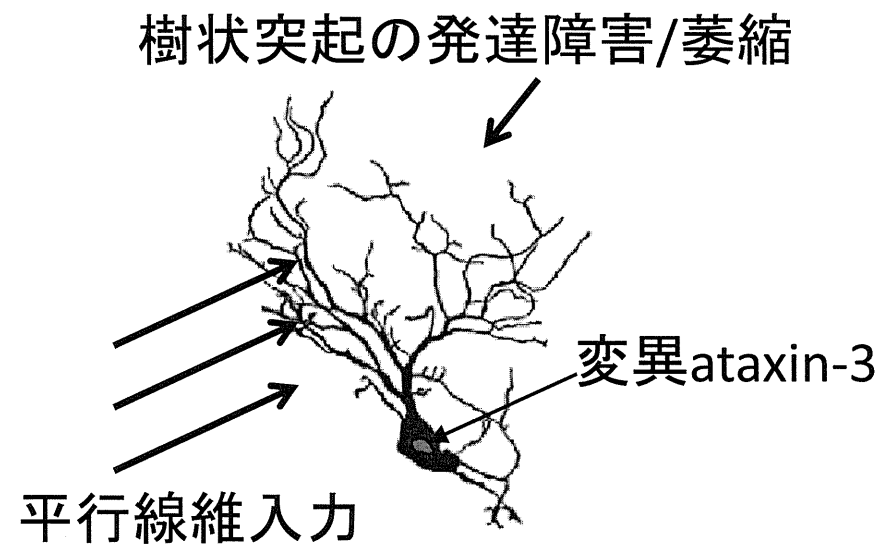
### 野生型



平行線維入力

グルタミン酸受容体	
イオン透過型	○
代謝型	○

### SCA3モデル



樹状突起の発達障害/萎縮

変異ataxin-3

平行線維入力

グルタミン酸受容体	
イオン透過型	○
代謝型	×

## Exome 解析による多系統萎縮症の疾患関連遺伝子の探索

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	三井 純	(東京大学医学部附属病院神経内科)
	松川 敬志	(東京大学医学部附属病院神経内科)
	Budrul Ahsan	(東京大学医学部附属病院神経内科)
	吉村 淳	(東京大学大学院新領域創成科学)
	土井 晃一郎	(東京大学大学院新領域創成科学)
	市川 弥生子	(東京大学医学部附属病院神経内科)
	後藤 順	(東京大学医学部附属病院神経内科)
	森下 真一	(東京大学大学院新領域創成科学)

### 研究要旨

多系統萎縮症 (multiple system atrophy, MSA) は原則として孤発性の神経変性疾患である。一方、人種による病型の頻度の違い、家族性 MSA の存在などから、遺伝因子の関与が考えられている。我々はこれまでに、家族性 MSA・血族婚のある MSA 家系・MSA・PD 多発家系に対して連鎖解析・全ゲノム配列解析を施行、また孤発性 MSA に対して頻度の高い多型を用いたゲノムワイド関連解析を施行してきた。いくつかの疾患関連遺伝子の候補を同定し、機能解析や病態研究に発展している。さらなる遺伝因子を同定するため、exome 解析により翻訳領域内で網羅的に変異同定を行い、患者・対照群で関連解析を行うことを計画している。

#### A. 研究目的

MSA 患者・対照群のゲノム DNA を exome 解析して、翻訳領域内で網羅的な変異同定を行うことで、疾患と関連する変異・遺伝子を同定して、MSA の遺伝因子を明らかにしたい。

#### B. 研究方法

SureSelect v4+UTR キットによるキャプチャー後に、HiSeq2000 にて 1 レーンあたり 4 サンプルのシーケンス量でシーケ

ンスを行った。現在までに MSA 患者 232 例、健常者 326 例までデータ解析を完了した。ヒトゲノム参照配列 hg19 に対して Burrows-Wheeler Aligner software にてアライメントを行い、SAMtools にて変異の検出を行った。翻訳領域内の非同義置換変異のみを抽出した上で、phred-scaled quality score, minor allele frequency (MAF), PolyPhen-2 による機能評価などを考慮に入れたフィルターを検討し、カイ 2 乗検定によって患

者・対照群で関連を検定した。

#### (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

MSA 患者 232 例、健常者 326 例の Exome シーケンスの結果、154,220 個の非同義置換変異を同定した。フィルタリングの結果、残った 4,306 個の変異について関連解析を行った。P<0.05 を満たす変異は 105 個あった。Bonferroni の多重検定補正で有意な関連を示す変異は得られなかったが、 $10^{-4}$ ~ $10^{-3}$  の p 値を示す変異をいくつか得た。

MAF の小さい rare variants を対照にする場合、現時点でのサンプルサイズを考慮すると、有意差を検出する力は十分には高くないと考えられる。今後もサンプル規模を拡大していくと同時に、機能的変異を抽出する (in silico の機能予測や in vitro の機能解析)、変異を遺伝子ごとに検定する統計手法、病態から予想されるパスウェイ解析などを併用して、MSA の遺伝因子を検索していくことが必要であると考えられる。

### D. 結論

MSA 患者 232 例、健常者 326 例の Exome シーケンスを行い、網羅的な変異同定による関連解析を行った。現時点の解析規模では、疾患と明確に関連する変異は得

られなかったものの、サンプル規模の拡大と変異の絞り込みによって、MSA の遺伝因子を明らかにできると考えている。

また、我々はこれまでに、家族性 MSA・血族婚のある MSA 家系・MSA・PD 多発家系に対して連鎖解析・全ゲノム配列解析を施行、また孤発性 MSA に対して頻度の高い多型を用いたゲノムワイド関連解析を施行しており、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てきている。それらの候補遺伝子、およびそれから予想される疾患パスウェイの仮説などから、MSA の遺伝因子の全容を明らかにしていきたい。

### E. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし (投稿準備中)

#### 2. 学会発表

- 1) 三井 純, 石浦 浩之, 市川 弥生子, 後藤 順, 辻 省次: 家族性 MSA および MSA・PD 多発家系の全ゲノム解析. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 26 日, 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

なし

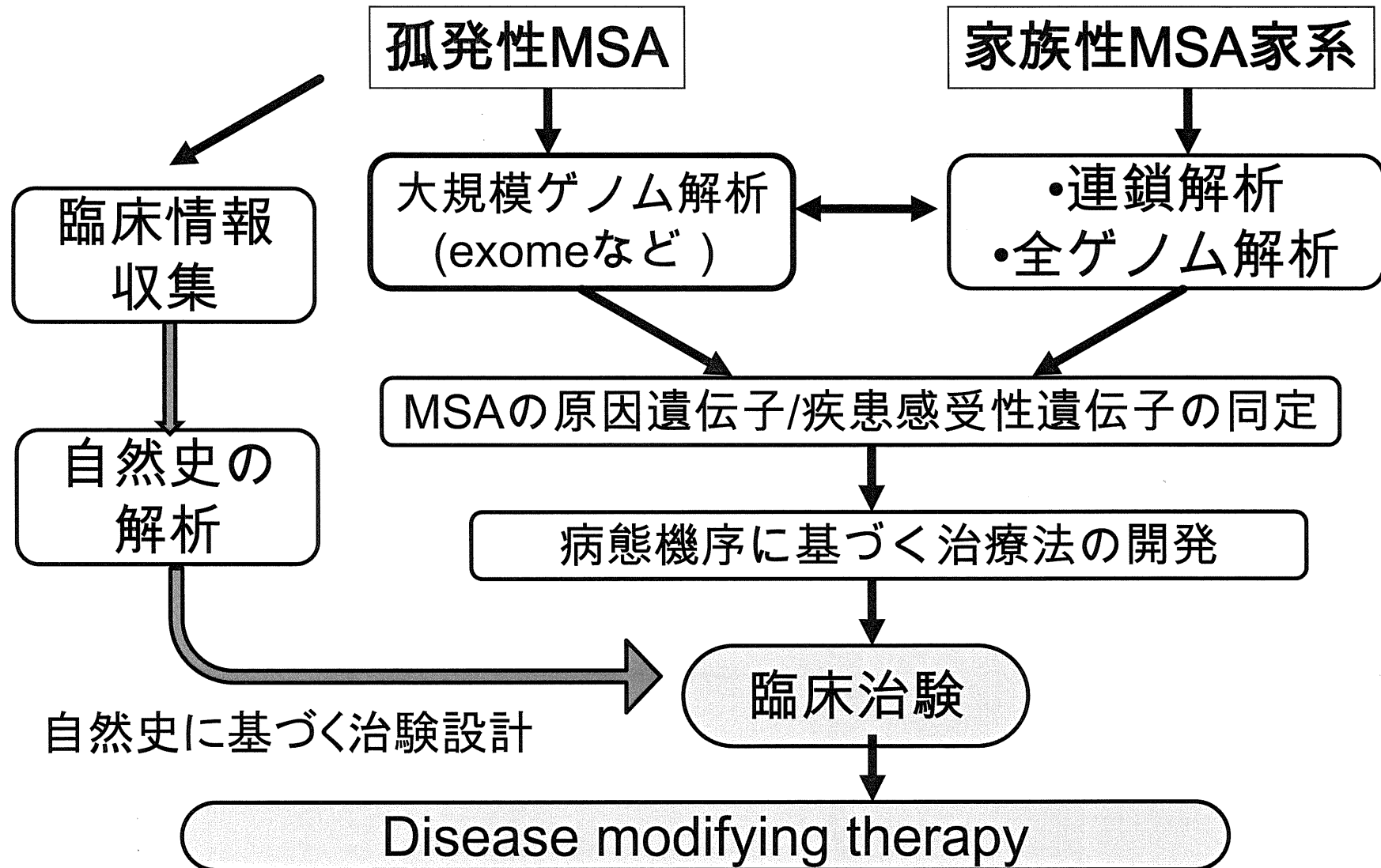
#### 2. 実用新案登録

なし

3. その他  
なし



# 治療実現化に向けたJAMSACのロードマップ



## 南九州地域の脊髄小脳変性症-臨床的、遺伝学的検討-

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

### 研究要旨

南九州地域（鹿児島、宮崎、沖縄）、東九州地域（大分）における常染色体優性遺伝性の小脳失調を呈した家系について分子疫学的検討を行った。沖縄県で DRPLA と SCA2 の重症型が多く、それ以外の地域では SCA6 と SCA31 の軽症型が多い傾向であった。鹿児島県では GSS と診断される例が増加傾向にあり、小脳失調の鑑別として重要と考えられた。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, 23, 27, 28, 35）を構築し、2 症例で、それぞれ SCA5, SCA11 の原因遺伝子にアミノ酸置換を伴う新規の 1 塩基置換を確認し病原性について検討中である。特徴的な家系として、SCA31 のリピート挿入部位に (TGGAA)<sub>n</sub> を含まないリピートをもつ 1 家系を認め、報告した。宮崎県の南部地域に認められた SCA36 の 2 家系について、自律神経障害と錐体外路症状の合併を報告し、SCA36 の臨床的多様性について検討した。

#### A. 研究目的

南九州地域（鹿児島、宮崎、大分、沖縄）における遺伝性の小脳失調を呈する症例において、トリー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 9 つの既知の AD-SCD、すなわち SCA5, SCA11, SCA13, SCA14, SCA15, SCA23, SCA27, SCA28, SCA35 の遺伝的原因を同定するため、Roche 社 GS junior Genome sequencer または Illumina 社 MiSeq を使用した診断システムを構築し、変異の有無を調べる。

#### B. 研究方法

遺伝子検査に同意した優性遺伝性小脳

失調症 190 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、Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群 (GSS) の P102L は RFLP またはシーケンス解析により解析、SCA36 遺伝子異常については repeat primed PCR 法により解析を行った。原因未同定 AD-SCD 症例について、SCA5, 11, 13, 14, 15, 23, 27, 28, 35 の原因遺伝子 (それぞれ *SPTBN2*, *TTBK2*, *KCNC3*, *PRKCG*, *ITPRI*, *PDYN*, *FGF14*, *AFG3L2*, *TGM6*) のコーディング領域およびスプライス部位をターゲット領域とし、PCR 法にて増幅させ、次世代ゲノムシーケンサー (Roche 社 GS junior genome sequencer または Illumina 社 MiSeq) を用いて、リシーケンスを行い、変異 (点変異、欠失、挿入など) の有無を調べた。

SCA31 の挿入部位に (TGGAA)<sub>n</sub> を含まない長いリピートを持つ南九州の家族例については、PCR-based Southern blot 法で (TGGAA)<sub>n</sub> リピート配列の有無を調べた。宮崎県南部に常染色体優性の多系統萎縮症が疑われる家系を認めていたが SCA36 であることが判明した。その臨床型の多様性について既報告と比較検討した。

#### (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. 研究結果および考察

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 GSS であった。GSS はこの 1 年間で新規 6 家系を診断し、そのすべてが P102L 変異であった。沖縄県では、DRPLA と SCA2 が圧倒的に多かった。また SCA31 の家系が初めて認められた。宮崎県では SCA31, SCA3, SCA6 が多く、大分県では SCA6, SCA31, SCA3 の順で、軽症の小脳失調症の頻度が高い。

昨年度は、SCA31 の挿入部位にこれまで報告されているリピート長より長く、6.8-7KB の挿入配列を認めた高齢発症 AD-SCA の 1 家系を報告した。本リピートの配列をゲノムシーケンサーにより解析したところ、(TAAAA)<sub>n</sub> および (TAAAATAGAA)<sub>n</sub> のリピート配列を確認したが、病原性があるとされる (TGGAA)<sub>n</sub> 配列は認めなかった。さらに PCR-based Southern blot 法により (TGGAA)<sub>n</sub> 配列がないことを確認した。SCA31 の発症機序は (TGGAA)<sub>n</sub> の転写産物がヘアピン構造をとりやすいことによる、いわゆる RNA gain-of-function メカニズムが提唱されているが、それ以外のメカニズムも存在する可能性が考えられた。また、本症例のような長い挿入は通常の PCR 法では増幅できないことから、これまで見逃されている可能性があるため注意が必要と考える。

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変性疾患の家系を昨年度報告したが、repeat primed PCR の結果、2 家系が SCA36 であることが判明した。これらの家系は SCA36 に典型的症状とされる小脳失調や舌萎縮に加え、パーキンソニズムで発症し起立性低血圧や排尿障害を呈する

など、既報告とは異なる症状が認められた。芦田川流域に集積が認められる SCA36 とこれらの家系が共通の祖先に由来するものなのか、また臨床型の相違がリピートの長さや内容によるものなのかについて今後の検討が必要である。

「原因未同定」AD-SCD 症例について、SCA5, 11, 13, 14, 15, 23, 27, 28, 35 の遺伝子解析を行った。対象となった全エクソン数は 169 exons あり、設計した Primer 数は 187 組であった。GS junior、MiSeq ともに、解析対象とした領域の約 90% はスクリーニングとして十分なリード長とリード数を得ることができた。20 症例の解析を行ったが、そのうち 2 症例で、それぞれ SCA5, SCA11 の原因遺伝子にアミノ酸置換を伴う新規の 1 塩基置換を確認し、Sanger 法でも確認した。その病原性について検討中である。GS junior では 1 ランで約 10 症例を、MiSeq では 1 ランあたり数百人の検体を解析できるパフォーマンスを持っており、短期間かつ低コストでの解析が実現可能となった。

#### D. 結論

南九州地域の優性遺伝性小脳失調症は、地域によって病型に明らかな差が存在する。SCA31 が疑われるが (TGGAA)<sub>n</sub> リピートを持たない AD-SCA の 1 家系を報告した。宮崎県南部に SCA36 の 2 家系を報告した。原因未同定の SCA 症例について、次世代ゲノムシーケンサーを用いて、低コストかつ迅速に診断し得るより効果的な網羅的遺伝子スクリーニング法を構築し、SCA5, SCA11 の原因遺伝子にアミノ酸置換を伴う新規の 1 塩基置換を確認した。原

因未同定の AD-SCD について、今後はエクソーム解析などの手法により新規の原因遺伝子の同定が必要であろう。

#### E. 健康危険情報

特になし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S, Kubota R: Reduced Tim-3 expression on human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in HTLV-I infection. *J Infect Dis*, 2011; 203(7): 948-959
- 2) Nakamura T, Hashiguchi A, Suzuki S, Uozumi K, Tokunaga S, Takashima H: Vincristine exacerbates asymptomatic Charcot-Marie-tooth disease with a novel EGR2 mutation. *Neurogenetics*, 2012; 13(1): 77-82
- 3) Inamori Y, Higuchi I, Inoue T, Sakiyama Y, Hashiguchi A, Higashi K, Shiraishi T, Okubo R, Arimura K, Mitsuyama Y, Takashima H: Inclusion body myositis coexisting with hypertrophic cardiomyopathy: An autopsy study. *Neuromuscul Disord*, 2012; 22(8): 747-754
- 4) Zhao Z, Hashiguchi A, Hu J, Sakiyama Y, Okamoto Y, Tokunaga S, Zhu L, Shen H, Takashima H: Alanine-tRNA synthetase mutation in a family with dominant distal hereditary motor

- neuropathy. *Neurology*, 2012; 78(21): 1644-1649
- 5) Saiga T, Tateishi T, Torii T, Kawamura N, Nagara Y, Shigeto H, Hashiguchi A, Takashima H, Honda H, Ohyagi Y, Kira J: Inflammatory radiculoneuropathy in an ALS4 patient with a novel SETX mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2012; 83(7): 763-764
- 6) Shiga K, Noto Y, Mizuta I, Hashiguchi A, Takashima H, Nakagawa M: A novel EGR2 mutation within a family with a mild demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*, 2012; 17(2): 206-209
- 7) Kawabata T, Higashimoto I, Takashima H, Izumo S, Kubota R. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ cells accumulate in the lungs of patients infected with HTLV-I with pulmonary involvement. *J Med Virol*, 2012; 84(7): 1120-1127
- 8) Tokunaga S, Hashiguchi A, Yoshimura A, Maeda K, Suzuki T, Haruki H, Nakamura T, Okamoto Y, Takashima H: Late-onset Charcot-Marie-Tooth disease 4F caused by periaxin gene mutation. *Neurogenetics*, 2012; 13(4): 359-365
- 9) Iguchi M, Hashiguchi A, Ito E, Toda K, Urano M, Shimizu Y, Takeuchi C, Saito K, Takashima H, Uchiyama S: Charcot-marie-tooth disease type 4C in Japan: Report of a case. *Muscle Nerve*, 2013; 47(2): 283-286
- 10) Miki Y, Tomiyama M, Haga R, Nishijima H, Suzuki C, Kurihara A, Sugimoto K, Hashiguchi A, Takashima H, Baba M: A family with IVIg-responsive Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol*, 2012; Dec 12. [Epub ahead of print]
- 11) Arimura A, Deguchi T, Sugimoto K, Uto T, Nakamura T, Arimura Y, Arimura K, Yagihashi S, Nishio Y, Takashima H: Intraepidermal nerve fiber density and nerve conduction study parameters correlate with clinical staging of diabetic polyneuropathy. *Diabetes Res Clin Pract*, 2013; 99(1): 24-29
- 12) Yuan J, Higuchi Y, Nagado T, Nozuma S, Nakamura T, Matsuura E, Hashiguchi A, Sakiyama Y, Yoshimura A, Takashima H: Novel mutation in the replication focus targeting sequence domain of DNMT1 causes hereditary sensory and autonomic neuropathy IE. *J Peripher Nerv Syst*, in press
- 13) Yuan J, Matsuura E, Higuchi Y, Hashiguchi A, Nakamura T, Nozuma S, Sakiyama Y, Yoshimura A, Izumo S, Takashima H: Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type IID Caused by an SCN9A Mutation. *Neurology*, in press

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特になし

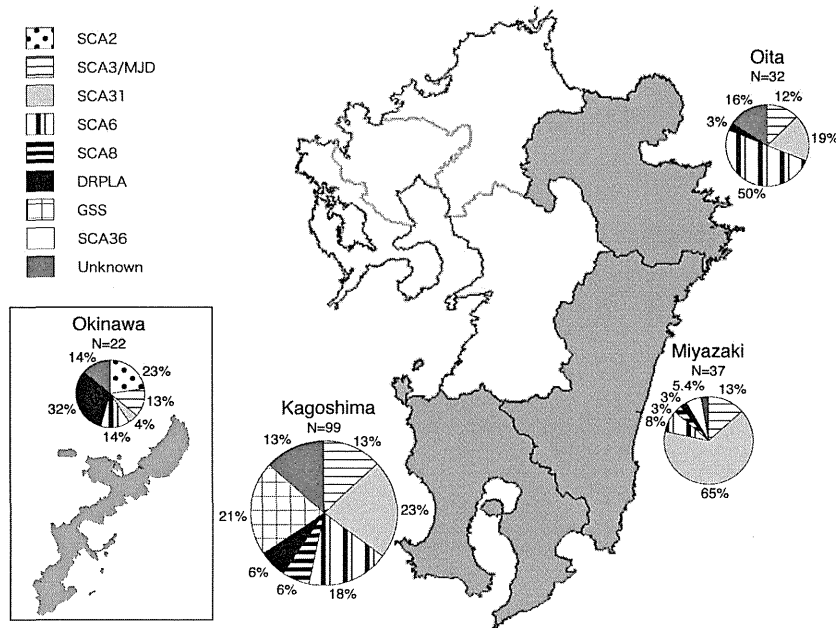
# 南九州地域の遺伝性小脳失調症の遺伝子学的研究および次世代シーケンス法による遺伝子診断の構築

班員 高嶋 博 鹿児島大学 神経内科、老年病学

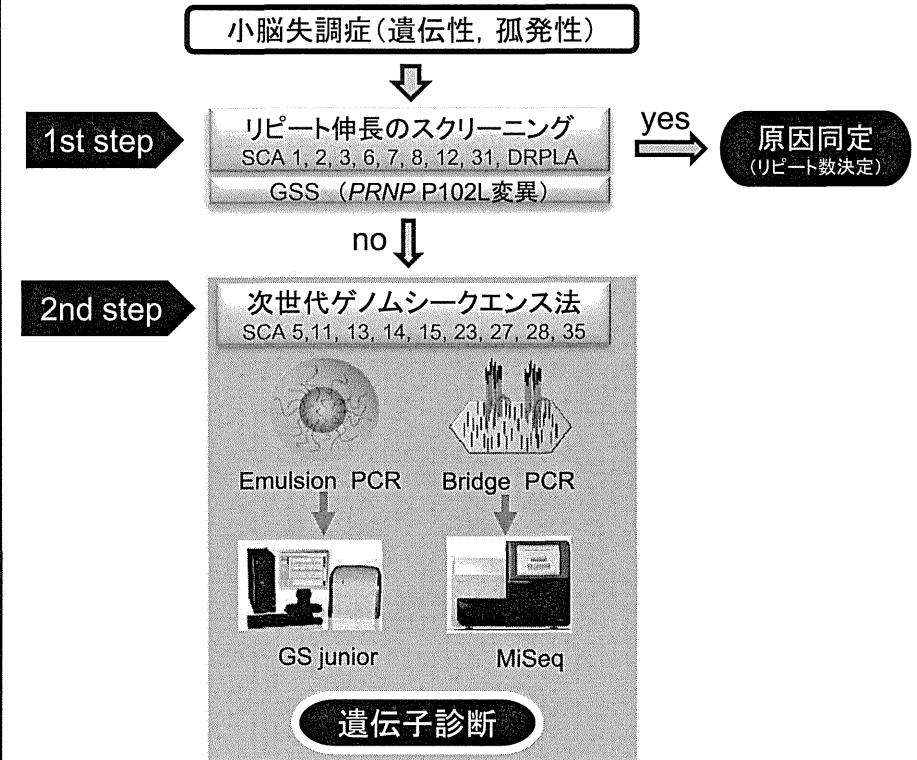
【目的】南九州地域における常染色体優性遺伝性の小脳失調を呈した家系について、疫学的検討を行う。特に全国に多発する脊髄小脳変性症SCA31の研究およびSCAの包括的な遺伝子診断を行った。また、新しい包括的な遺伝子診断システムを構築する。

【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した。

## 南九州地域の遺伝性小脳失調症の分子疫学



## SCDの網羅的遺伝子解析フローチャート



## 原因未同定 S C A の遺伝子探索

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)）  
尾崎 心（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)）  
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)）  
佐藤 望（東京医科歯科大学大学院脳神経病態学(神経内科)）  
三井 純（東京大学神経内科）  
石浦浩之（東京大学神経内科）  
辻 省次（東京大学神経内科）

### 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。東京医科歯科大学の集積家系では、SCA患者の約20%が原因不明である。これらのSCAの原因解明は脊髄小脳変性症を含む神経難病の研究に重要な進歩をもたらすと考えられる。昨年度、我々はまずこの20%の家系の臨床的評価を行い、1:若年発症型・緩徐進行性・純粋小脳型の病型、2:多系統障害型の病型、3:高齢発症・純粋小脳型の病型、があることを報告した。本年度はこれらの連鎖解析を完了させ、1と2の病型について、マイクロアレーでの連鎖解析と次世代シーケンサーを用いた遺伝子探索を進めた。その結果、1、2の病型それぞれで非常に特異性が高く、原因である可能性も期待される遺伝子変化を見出した。今後本研究班班員の協力を仰ぎ早急に類似の家系を発掘し、原因解明を果たすことで本研究課題を達成したい。

### 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が大きい。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。そのために昨年度、我々は東京医科歯科大学で集積し

た家系群を臨床的に解析した。その結果、表1のように少なくとも3つの病型が存在することを明らかにした。

	病型	家系数	発症年齢	特徴
1	若年発症・ 純粋小脳型	4	30歳代	① 時に錐体路徴候、(軽度) 外眼筋麻痺。 ② 頭部MRIは小脳萎縮のみ。
2	多系統障害型	1	40歳頃	① 排尿障害、起立性低血圧、 眼球運動制限。 ② 頭部MRIはMSAIに類似。
3	高齢発症・ 純粋小脳型	1	60歳頃	



## B. 研究方法

本年度、これらの家系についてハイスループット遺伝子探索を目指し、microarrayによる連鎖解析を進めた。そのうえで各家系について発症者2名を選び全ゲノム・エクソームシーケンス解析を行った。なお、研究に関する倫理的側面は、ヒトゲノム研究に関する倫理指針に則って研究の計画を立案し、研究計画は東京医科歯科大学および東京大学の両方で承認を受けた。そのうえで患者に口頭と文書で本研究の趣旨などを説明し、同意を得て研究に参加頂き、血液の採取とゲノムDNAの解析を行った。

## C. 研究結果

1) 病型1 についての臨床的検索：臨床的に一つの病型として暫定的にまとめた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進行は緩徐、⑤頭部MRIでは脳幹はよく保たれる、といった特徴を認めた。なお、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。

2) 病型1 の原因遺伝子探索：この家系群についてDNAマイクロアレイ(Affymetrix社 Genome-Wide Human SNP Array 6.0)で genotyping とコンピュータソフトウェアを用いた連鎖解析を行った。その結果、もしこれら4家系が原因を同一とした場合、連鎖するはずの領域が4染色体領域に絞られた。このうち、特に情報量の多い家系Aがこの領域に連鎖することに大

きく寄与していることが判明した。残る3家系はこの方法では、家系Aの連鎖結果を緩く指示する結果であった。このため、さしあたっては家系Aに遺伝子探索の焦点を絞ることとした。

一方、各家系から2名ずつエクソームシーケンスを行った。十分なカバレッジでシーケンスを行えたと判断でき、各家系の2名で共通する新規非同義置換を100程度検出した。

このうち、家系Aで候補遺伝子座4領域に存在する新規非同義置換は20個であった。これらについて逐次家系A内での発症者と遺伝子変化の分離(segregation)を検証した。また、対照健康日本人集団20名で、各遺伝子変化が本当に「新規」変化であるかをも検証した。その結果、20個中同一遺伝子座に存在する2つの遺伝子で新規変化を見出した。このうちの1つは同一遺伝子の別の部位に新規遺伝子変化を有する疾患患者があることなどから、遺伝子変異である可能性は低いと考えられた。一方、残る1つはある重要なチャネル遺伝子のアミノ酸置換を起こすことが推定された。このアミノ酸は、ヒトから線虫まで種を越えて保存されるチャネル孔に位置しており、コンピュータプログラム予測でもこの遺伝子変化は疾患を起こす「変異」であることが支持された。さらに、この家系Aはミオクローヌスを呈する臨床的特徴を有し、他の3家系とは異なっていた。実はこのチャネル遺伝子はミオクローヌス発現との関連が提唱されており、今回検出した遺伝子変化が、真の変異である可能性をさらに指示するとも考えることが

出来る．今後、この遺伝子変化が真の変異であることを証明する一つの方法として、類似家系の集積と解析を進める．

ところで病型 1 の他の 3 家系には同一遺伝子内の変化はなく、ミオクロノスも認められない．つまり、病型 1 としたものがさらに異質な疾患の集合であることを示唆している可能性が挙げられた．

3) 多系統萎縮型の病型について：この家系も病型 1 と同様の探索を進めた．連鎖解析の結果、病型 1 とは別の 4 つの染色体の合計 240 メガベース領域が候補領域として示唆される結果であった．並行して発症者 2 名のエクソームシーケンスを行った結果、発症者 2 名間に共通する新規遺伝子変化を 133 個同定した．このうち、候補 240 メガベース領域には 18 個存在し、日本人に認められない新規性と家系内の分離が確認できたものは、異なる 2 つの染色体に存在する 3 つの遺伝子変化であった．

この家系は特徴的な脳 MRI 所見(図 1)を示す．この様な特徴的な MRI を手掛かりに、本研究班に類似の家系を募ったところ、班会議終了後に 1 研究施設から類似の家系が存在するという情報を頂いた．今後このような類似家系でエクソームシーケンスを行い、allelic な変化を探索する．

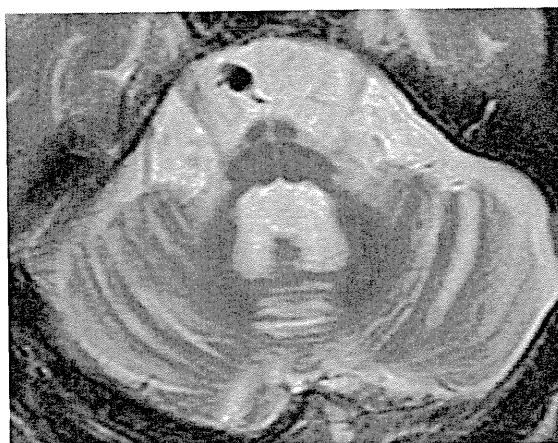


図 1 多系統障害型 SCA 患者の頭部 MRI T2 強調画像． MSA に似た橋の十字サインと中小脳脚高進号を認める．

#### D. 結論

- ①若年 (20~30 歳代) 発症、緩徐進行性の小脳失調症主体で、ミオクロノスを伴う病型の家系では、あるチャンネル遺伝子に種を越えて保存されている箇所に異常を見出した．
- ②MSA 類似の画像を示した家系では、3 つの特異的遺伝子変化を見出した．
- ③国内の多施設に類似家系を募り、同じ遺伝子に allelic な変異を探索することで、原因遺伝子の同定を果たしたい．

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Unno T, Wakamori M, Koike M, Uchiyama Y, Ishikawa K, Kubota H, Yoshida T, Sasakawa H, Peters C, Mizusawa H, Watase K: Development of Purkinje cell degeneration in a knockin mouse model reveals lysosomal involvement

- in the pathogenesis of SCA6. Proc Natl Acad Sci USA. 2012; 109(43): 17693-17698
- 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, 2012; 57 (3): 202-206
  - 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, 2012; 32(6): 595-603
- ## 2. 学会発表
- 1) 石黒太郎, 石川欽也, 藤掛伸宏, 永井義隆, 水澤英洋: SCA6 トランスジェニックショウジョウバエによる Ca<sub>v</sub>2.1 の CTF 毒性の検証. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 25 日, 東京
  - 2) 新美祐介, 高橋 真, 大林正人, 佐藤望, 網野猛志, 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) の分子病態の探索. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 25 日, 東京
  - 3) 大林正人, 石川欽也, 佐藤 望, 橋本祐二, 太田浄文, 新美祐介, 松浦 徹, 阿部康二, 水澤英洋: Non-coding repeat 病の日本の脊髄小脳失調症患者に占める割合. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 25 日, 東京
  - 4) 山下 力, 李 元哲, 船山 学, 吉野浩代, 富山弘幸, 市川 忠, 江原義郎, 石川欽也, 水澤英洋, 服部信孝: 日本人 Parkinson 病患者における polyglutamine (polyQ) 鎖リピート数の調査. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 25 日, 東京
  - 5) 高橋 真, 大林正人, 石黒太郎, 新美祐介, 佐藤 望, 石川欽也, 水澤英洋: SCA6 の原因タンパクである  $\alpha$ 1A カルシウムチャネルの C 末端断片の細胞内局在と CREB 依存性転写に与える影響. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 25 日, 東京
  - 6) 橋本祐二, 石川欽也, 太田浄文, 新美祐介, 大林正人, 石黒太郎, 佐藤 望, 水澤英洋: 原因未同定優性遺伝性脊髄小脳変性症 (SCA) における SCA8 遺伝子異常伸長の頻度. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 25 日, 東京
  - 7) 太田浄文, 橋本祐二, 新美祐介, 大林正人, 石黒太郎, 佐藤 望, 石川欽也, 水澤英洋: 脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31) における小脳歯状核の MRI 信号変化と病理学的対応. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 24 日, 東京
  - 8) 石川欽也, Dürr A, Klopstock T, 佐

- 藤 望, Stevanin G, Brice A, 水澤英洋: 欧州人での SCA31 遺伝子 5 塩基リピート. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 23 日, 東京
- 9) 古木美紗子, 三條伸夫, 石川欽也, 横田隆徳, 水澤英洋: 肥厚性硬膜炎 5 症例の臨床的検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 23 日, 東京
- 10) 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 型の分子遺伝学的診断法についての検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 23 日, 東京
- 11) 尾崎 心, 三條伸夫, 石川欽也, 池田篤平, 服部高明, 加藤 剛, 横田隆徳, 大川 淳, 山田正仁, 水澤英洋: 表層シデローシス (superficial siderosis) に対する治療法の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 23 日, 東京
- 12) 石川欽也, 高橋 真, 大林正人, 佐藤 望, 山田光則, 高橋 均, 加藤丈夫, 江石義信, 水澤英洋: 脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) における転写因子 CREB に関する研究. 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2012 年 6 月 29 日, 新潟
- 13) 石川欽也, 太田浄文, 大林正人, 新美祐介, 佐藤 望, 水澤英洋: 多系統萎縮症における自然歴とリファンピシン内服療法. 厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 運動失調症に関する調査研究班. 夏のワークショップ, 2012 年 8 月 24 日, 東京
- 14) Niimi Y, Ishikawa K, Sato N, Mizusawa H: RNA-mediated cell death is important in a cultured cell model of spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31). The 2<sup>nd</sup> Japan-Korea Neural Tissue Culture Seminar. 2012. 6. 16, Tokyo
- 15) Ishikawa K, Sato N, Ozaki K, Mitsui J, Ishiura H, Hashimoto J, Obayashi M, Matsuo H, Tsuji S, Mizusawa H: A gene search for a new cerebellar ataxia. The 62<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 2012. 11. 7, San Francisco, California, USA
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
- なし