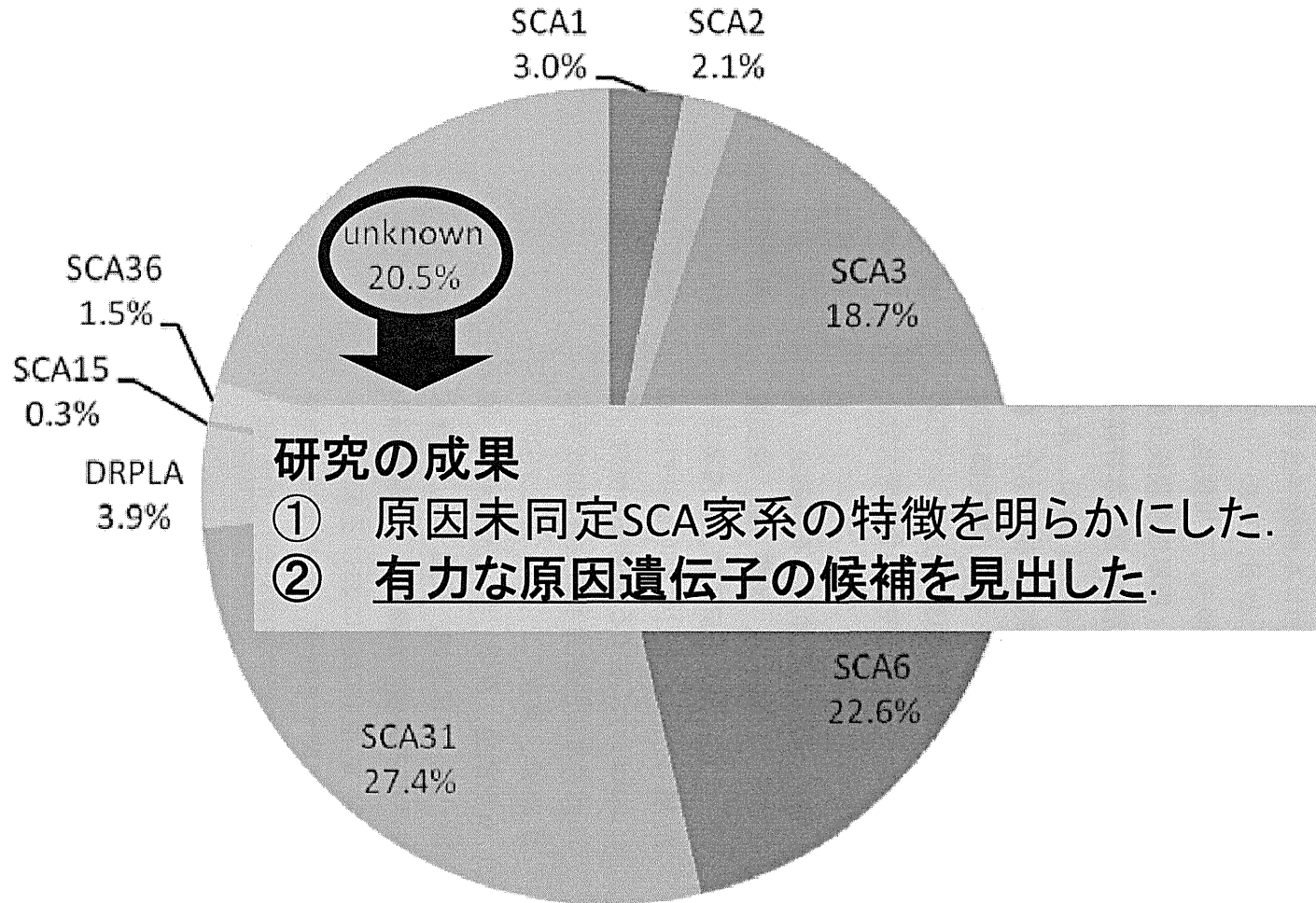


研究テーマ:「原因未同定SCAの遺伝子探索」 (日本のSCA中、原因未同定は20.5%を占める)



東京医科歯科大学での332家系

エクソーム解析を用いた *ATL1* の新規 *de novo* 変異の検出

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 高 紀信（山梨大学神経内科）
森下真一（東京大学新領域創成科学研究科）
石浦浩之、三井 純、後藤 順、辻 省次（東京大学神経内科）

研究要旨

健常な両親から出生した発端者と発端者以降の世代において、若年発症の遺伝性痙性対麻痺を呈する家系を得た。健常な両親を持つ発端者において若年発症の遺伝性痙性対麻痺を呈していたことより、*de novo mutation* によって疾患が発症したと考えた。そのため発端者を含む親子3人のトリオにおいてエクソーム解析を行い、原因遺伝子の検出を試みた。エクソーム解析において検出した *variation* について、dbSNP などを用いてフィルターにかけた後に、Sanger 法による直接塩基配列決定を行い2つの *de novo mutation* を検出した。そのうちの 하나가 SPG3A の原因遺伝子である *ATL1* の c.1259A>C p.Q420P 変異であり、この変異のみが共分離を認めた。また臨床系も SPG3A として矛盾しないためにこの遺伝子が病因と判断した。

Variation については Sanger 法によって解析を行ったが、今後の *de novo mutation* を仮定した解析のための検討を行い、coverage や strand bias による絞込みが有効である可能性を得た。

A. 研究目的

我々は若年発症の純粋型遺伝性痙性対麻痺の1家系3症例について、原因遺伝子の検出を試みた。健常な両親から出生した発端者以降において若年発症の優性遺伝性痙性対麻痺を呈していたことより、発端者において *de novo mutation* が発生したと考えた。*De novo mutation* を仮定したアプローチにおいては自閉症や統合失調症などの原因遺伝子の解析において成果を挙げており有用な方法ではないかと考えられる。

一方、過去の報告においては、類似症例を多数例集めての絞込みを行っていることが多く、遺伝性痙性対麻痺のような類似疾患でありながら病因遺伝子が多数報告されているような例では結果を得にくいことも考えられた。そこで、得られた *variation* の絞込みに有用な方法についても検討を行い、今後のエクソーム解析における原因遺伝子の絞込みに有用なフィルタリングの方法についても検討を行った。

B. 研究方法

(1) 検体試料

本家系の患者、家族のうち発端者（矢印）の兄を除く3世代7名から採血を行い、DNAの抽出を行った。

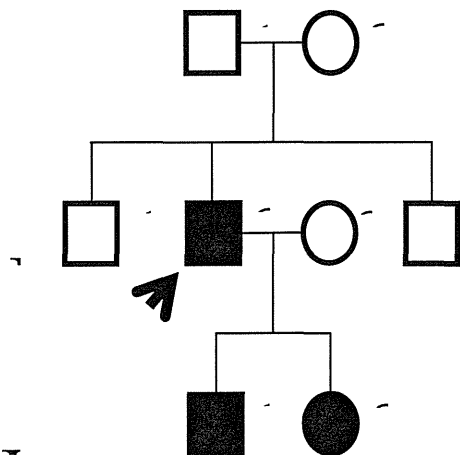


Fig.1 家系図

(2) 解析対象

両親と発端者におけるエクソーム解析を行い病因遺伝子の検出を試みた。また候補遺伝子についてはSanger法を用いて家族内の共分離を確認した。

(3) 解析方法

抽出したDNAからAgilentのSureSelect 50Mb Kitを用いてexon配列のキャプチャーを行った。解析にはilluminaのHiSeq2000においてpair end 100bで行った。得られた配列に関してはBurrows-Wheeler Alignerを使用してマッピングを行い、variationのcallにはsamtoolsを使用した。

(倫理面への配慮)

患者と両親に対して、書面にてインフォームドコンセントを行った上でDNAの採取を行った。

C. 研究結果

(1) mapping rates and coverages

エクソーム解析の結果、父、母、発端者において以下のようなデータを得た。総 read:140,606,140、116,931,610、85,656,114。ユニーク配列の平均 coverage:235.5、196.2、143.0。ユニーク配列の平均 mapping rate:86.8、87.0、86.6。

(2) 変異候補の絞込み

Samtoolsによるvariationのコールの結果、父、母、発端者においてそれぞれ10,502、10,541、10,667個のvariationを抽出した。そのうち発端者のみにおいてcallされているものは390個であった。390個のvariationのうちからdbSNPに登録のないもの、類似配列のためにalignmentの信頼性の低いものを除いたところ60の候補が残った。

(3) *de novo* mutationの検出

60個の候補についてSanger法による解析を行ったところ2つの*de novo* mutationを検出した。1つはPLBI遺伝子におけるc.3601T>A p.C1201S変異、もう一つはATL1遺伝子におけるc.1259A>C p.Q420P変異であった。

(4) 共分離の確認

2つの*de novo* mutationについて家系内の共分離を確認したところ、ATL1の変異のみで共分離を確認できた。またATL1は純粋型の若年性遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子であるので、臨床的にも矛盾はないと考え、この遺伝子が病因と考えた。

(5) 候補領域について

60個の候補領域についてSanger法によって確認したところ、2つの*de novo*

mutation、8つの親での call のエラー、50 個のエラーがあることがわかった。エラーにおいては read 数が十分ではない例がほとんどであった。また read 数で絞り込んだ後に、strand bias による絞込みを行うことで *de novo* mutation を落とすことなく、Sanger 法で確認する候補の数を 60 個から 3 個に絞り込むことに成功した。

D. 考察

本研究結果から、この若年性の遺伝性痙性対麻痺家系においては *ATLI* 遺伝子変異による SPG3A として矛盾しない結果を得た。SPG3A においては過去に *de novo* mutation による発症が報告されており矛盾はないものと考えた。また日本において、孤発例としての報告もあり、ある程度の頻度によって *ATLI* 遺伝子異常は発生しているものと考えられた。今回の研究においては、検出された遺伝子が既知の遺伝子であったために病因遺伝子であると考えられ、*de novo* mutation を仮定した解析により十分に病因遺伝子を絞り込める可能性を示した。今後 *de novo* mutation を考える家系において、本アプローチは有効であると考えられる。

一方、エクソーム解析においてはそれ自体の能力の限界として、現在でも約 10% の領域については全くカバーされていない現状がある。また今回の症例のように 10 read をきるような領域では、エラーが出現し解析結果に影響を与えてしまう場合が多く認められる。過去の研究では、10x や 16x、20x といったフィルターをかけることによって候補領域の絞込

みが行われていることが多い。今回の研究においても 10x 以下には 1 つの mutation しか認めなかったため、本方法はスクリーニングとして有用な方法ではないかと考えられる。

また、今回 10x 以下をきった後にも複数のエラーが検出されていたので、strand bias にも注目した。Strand bias を認めた場合のエラー率については、今回の研究においては 100% であり、今後の解析の一助になるのではないかと考えられる。

E. 結論

De novo mutation を想定したエクソーム解析において検出した *ATLI* 遺伝子の変異は、本家系における病因遺伝子であると判断した。

また、*de novo* mutation を想定したトリオのエクソーム解析において、read 数や strand bias による絞込みは候補遺伝子の検出において有効であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimazaki H, Takiyama Y, et al: Middle cerebellar peduncles and pontine T2 hypointensities in ARSACS. J Neuroimaging, 2013; 23(1): 82-85
- 2) Shimazaki H, Takiyama Y, et al: A homozygous mutation of C12orf65 causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). J Med Genet.

49: 777-784, 2012

- 3) Ohta E and Takiyama Y: MRI findings in neuroferritinopathy. *Neurol Res Int.* 2012; 2012: 197438. Epub 2011 Jul 21
- 4) Shimazaki H, Takiyama Y: Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS): Clinical, Radiological and Epidemiological Aspects. In: *Spinocerebellar Ataxia* (Gazula J, ed), p155-172. InTech Book, Rijeka, Croatia, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

2. 学会発表

- 1) 瀧山嘉久：遺伝性痙性対麻痺の最近の話題. 第 53 回日本内科学会東海支部生涯教育講演会, 2012 年 6 月 16 日, 浜松
- 2) 嶋崎晴雄、石浦浩之、福田陽子、本多純子、迫江公己、直井為任、滑川道人、高橋祐二、後藤 順、辻 省次、後藤雄一、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家系の原因遺伝子同定. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 23 日, 東京
- 3) Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Tsuji S, Goto J, Nakano I: Homozygous nonsense mutations of C12orf65 in patients with spastic paraplegia, optic atrophy and neuropathy (SPG55). The 137th Annual Meeting of the American Neurological Association, 2012.10.7, Boston

トリオの解析によって見出したATL1遺伝子の新規de novo変異

健常両親から発症した若年性の常染色体優性遺伝性痙性対麻痺

↓

病因遺伝子は発端者におけるde novo mutationが想定された

↓

両親および発端者のトリオにおいてエクソーム解析を実施

↓

多数の候補から絞込みを行うことでATL1遺伝子に変異を確認
また臨床型との一致を確認した

↓

エクソーム解析の結果を見直したところ候補遺伝子の絞込みにおいて

- read数
- strand bias

に注目することによって効率的に絞込みを行うことが可能であった

結論

de novo mutationを想定したアプローチは原因遺伝子の検出に有用である

劣性遺伝性パーキンソニズム-痙性対麻痺家系の新規原因遺伝子探索

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 舩山 学、李 元哲(順天堂大学老人性疾患病態・治療研究センター)
森 聡生、久保紳一郎、富山弘幸、服部信孝
(順天堂大学医学部脳神経内科)

研究要旨

劣性遺伝性パーキンソン病の新規原因遺伝子を単離するため血族婚のあるパーキンソン病家系について分子遺伝学的解析を行った結果、1家系の同胞発症例においてホモ接合体の1塩基挿入変異を同定した。新規候補遺伝子変異が見出された患者は、51歳時にレボドパ反応性のジストニアパーキンソニズムで発症し、16年経過した現在の所見ではレボドパ反応性のジストニアパーキンソニズムはなく四肢深部腱反射が亢進しており、痙性対麻痺の臨床所見を呈していた。新規原因遺伝子が痙性対麻痺の原因となりうるかを検討する目的で、Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC)の痙性対麻痺患者DNA検体を用いて本遺伝子の変異解析を行った結果、1例から発端家系と同じ1塩基挿入変異をヘテロ接合体で見いだした。新規原因遺伝子は痙性対麻痺の原因となる可能性があり、さらに多くの症例で検討する必要がある。

A. 研究目的

パーキンソン病 (PD) の多くは孤発性であるが、その約 5-10%は遺伝性に発症するとされる。現在までに *PARK1-18* の遺伝子座が判明し、そのうち 11 の原因遺伝子が単離された。我々はこれまで約 3000 例の PD について既知原因遺伝子の変異解析を行ってきた。その結果、常染色体劣性遺伝性 PD (ARPD) の約 35%から *parkin* (*PARK2*) 変異が同定されている。一方、原因遺伝子不明の家系も全 ARPD の 6割以上存在する。我々は既知の原因遺伝子変異を認めない症例から血族婚

のある家系を選出し、オート接合性マッピングを行い新規遺伝子座及び新規原因遺伝子を同定するため研究を進めてきた。

血族婚があり且つ同胞発症者が2人以上存在する14家系(22症例)について全ゲノム90万のSNPタイピングを行った結果、4家系において1番染色体に共通のオート接合性領域を見出した。さらに、SureSelect Target Enrichment System (Agilent) を用いて候補遺伝子コーディング領域を精製し、次世代シーケンサーを用いて変異解析を行った結果、1家系の同胞

発症例において機能不明の遺伝子 A にホモ接合体の 1 塩基挿入変異を同定した。この変異は家系内発症兄弟において共分離しており、サンガー法での変異の再現性を確認した。この遺伝子について健常群 (100 人) および ARPD 500 家系について変異解析を実施したが、発端家系から見出された変異や同じ遺伝子内の別の変異のいずれについても同定されていない (図 1)。

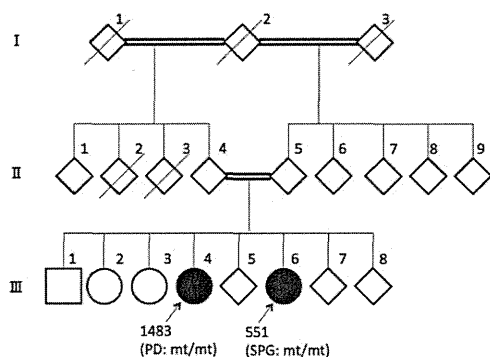


図 1. 発端家系の家系図

両親が従兄弟婚の同胞発症例 (1483 および 551) はいずれも新規遺伝子変異をホモ接合体で認めた (mt/mt)。1483 は 55 歳発症の PD、551 は痙性対麻痺 (SPG) である (下記)。

新規候補遺伝子変異が見出された患者 551 の臨床像は、51 歳時にレボドパ反応性のジストニアパーキンソニズムで発症し、16 年経過した現在の所見ではレボドパ反応性のジストニアパーキンソニズムはなく、四肢深部腱反射が亢進しており、痙性対麻痺の臨床所見を呈している。また、本家系は家族性痙性対麻痺の原因遺伝子および原因遺伝子座 (*SPG1-55*) が原因でないことが全エクソン解析および

ゲノムワイド SNP chip の連鎖解析結果から明らかになっている。

上記の様に劣性遺伝性パーキンソニズム-痙性対麻痺家系から新規候補原因遺伝子を見出し、500 家系の家族性 PD には変異が無いことから、本研究では遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子である可能性を検討する目的で、Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC) の痙性対麻痺 DNA 検体を用いて本遺伝子の変異解析を行った。

B. 研究方法

(1) 検体試料

JASPAC から提供された遺伝性痙性対麻痺患者 202 例のゲノム DNA。

(2) 遺伝子変異解析

PCR 増幅した新規遺伝子 A の全エクソンおよびスプライス部位を BigDye Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ) を用いてサンガー法で配列決定した。

(3) ハプロタイプ解析

創始者効果の有無を検討するため、新規遺伝子 A の近傍に位置する 14 種類のマイクロサテライトの遺伝子型を蛍光標識した PCR プライマーを用いたフラグメント解析により決定し、患者のハプロタイプを比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は順天堂大学医学部倫理委員会の承認 (順大医倫 2012157 号) を受けており、すべての患者に事前の十分な説明を行い自由意思に基づく書面による同意

(インフォームド・コンセント)を受けている。個人情報保護のため、全ての DNA サンプルは通し番号のみで管理し、また特定の個人を識別することができる情報は記載していない。個人と当該情報を連結し得る対応表は個人情報管理責任者のみが管理している。

C. 研究結果

(1) 遺伝子変異解析

JASPAC から提供された遺伝性痙性対麻痺 202 例について新規遺伝子 A の変異解析を行った結果、1 例から発端家系と同じ変異をヘテロ接合体で同定した (図 1)。この患者は 20 歳発症で母親・兄・妹に類症を認める優性遺伝性痙性対麻痺であった。現在家系メンバーのゲノム DNA の有無や詳細な臨床像を調査中である。

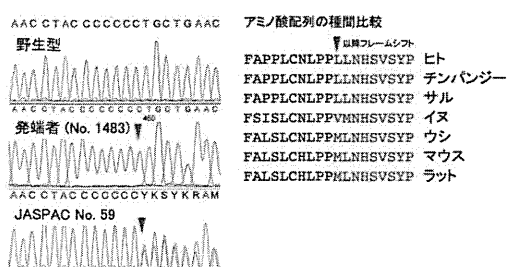


図 2. 新規遺伝子 A の変異概要

発端者はホモ接合体, JASPAC 患者はヘテロ接合体で同じ一塩基 (C) 挿入変異を認めた。変異の結果種間で高度に保存されているアミノ酸配列においてフレームシフトが生じることが予想された。

(2) ハプロタイプ解析

JASPAC 患者から発端家系と同じ変異を認めたため、同一の創始者から変異が遺伝されている可能性がある。これを検討

するため、ハプロタイプ解析を行い創始者効果の有無を検討した。その結果、新規遺伝子 A 近傍のハプロタイプが一部一致している可能性が示唆された (表 1, 斜線部分)。

表 1. ハプロタイプ解析

Microsatellite	発端者 (No.1483)		JASPAC No. 59	
MS1	198	205	205	200
MS2	220	224	214	218
MS3	86	106	106	100
MS4	256	256	251	266
MS5	225	225	206	210
MS6	154	154	154	152
MS7	137	137	137	137
MS8	125	125	125	119
Gene A	CC	CC	CC	C
MS9	241	241	241	241
MS10	198	198	208	208
MS11	266	266	266	273
MS12	149	149	149	139
MS13	232	232	238	242
MS14	277	277	277	297

D. 考察

本研究により、パーキンソニズムと痙性対麻痺の両疾患に関与する可能性がある新規遺伝子を見出した。しかしながら発端家系では 2 名の患者のみの遺伝子検査であり、家系内健常者における変異の有無を明らかにし、本遺伝子変異が疾患と共分離しているか検討する必要がある。また、JASPAC 患者からは変異をヘテロ接合体で認めたが、発症年齢は 20 歳と発端家系に比し若年であり、臨床的・分子遺伝学的に乖離を認めた。今後遺伝子量検査や家系解析などを詳細に行い、本遺伝子が疾患特異的であるか検討する必要がある。さらに痙性対麻痺とパーキンソニズムを合併する症例において本遺伝子の変異解析を行い、また本遺伝子の機能を検討する必要がある。

E. 結論

オート接合性マッピングと次世代シーケンサーによる高速シーケンスによりパーキンソニズムと痙性対麻痺に関与する可能性のある機能不明の遺伝子を見いだした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa KI, et al: Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord*, 2013; 19(1): 15-20
- 2) Ando M, Funayama M, Li Y, et al: VPS35 Mutation in Japanese Patients with Typical Parkinson's Disease. *Mov Disord*, 2012; 27(11): 1413-7
- 3) Ogaki K, Li Y, Atsuta N, Tomiyama H, et al: Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*, 2012; 33(10): 2527e11-16
- 4) Funayama M, Yoshino H, Li Y, Kusaka H, et al: Pseudo-heterozygous rearrangement mutation of parkin. *Mov Disord*, 2012; 27(4): 552-5
- 5) Hatano T, Kubo SI, Niiijima-Ishii Y, et al: Levodopa-responsive Parkinsonism following bilateral putaminal hemorrhages.

Parkinsonism Relat Disord, 2012; Nov 22. doi: 10.1016/j.parkreldis.2012.10.021. [Epub ahead of print]

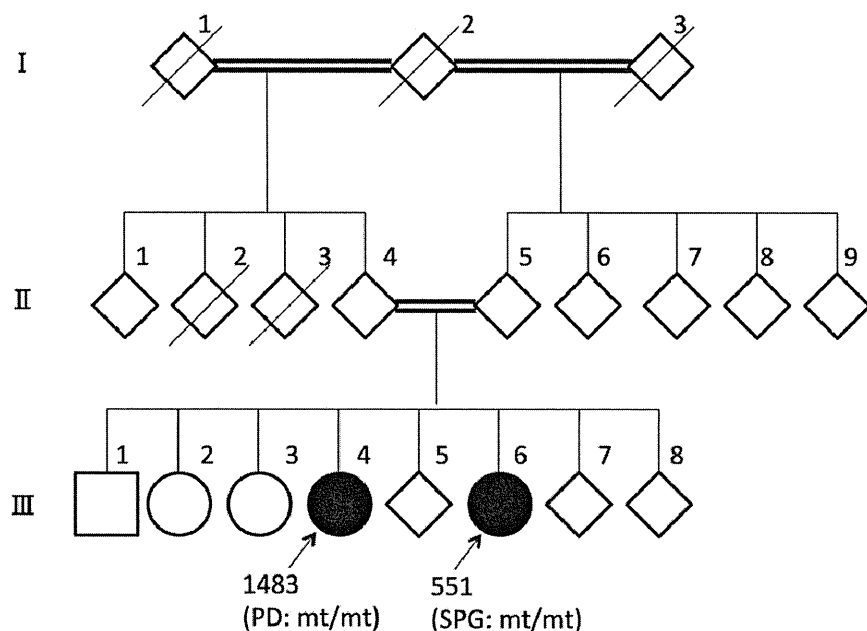
2. 学会発表

- 1) ASHG. Li Y, et al: Genetic analysis of the *GBA* gene in Japanese familial Parkinson's disease. 2012.10.9, San Francisco

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

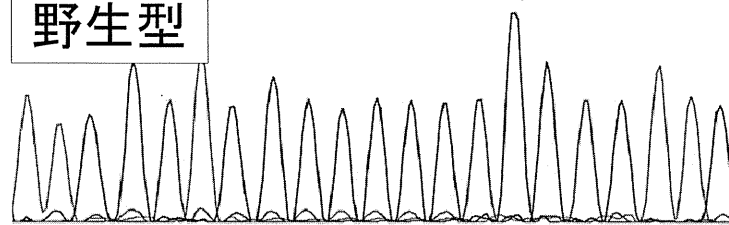
なし

痙性対麻痺 (SPG) とパーキンソン病 (PD) が混在する家系の新規原因遺伝子



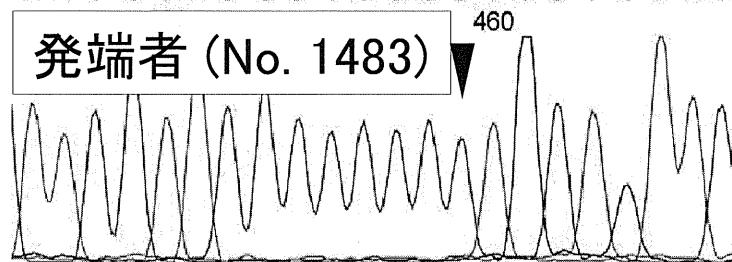
AAC CTAC CCCCCCT GCT GAAC

野生型



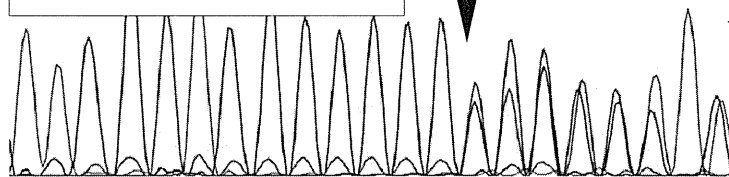
AAC CTAC CCCCCCT GCT GAAC

発端者 (No. 1483)



AAC CTAC CCCCCCYKSYKRAM

JASPAC No. 59



新規原因遺伝子をJASPAC症例 (202例) で解析→

JASPAC症例1例から発端家系から同定された変異と同じ変異を見いだした。

小脳失調，末梢神経障害を伴った遺伝性痙性対麻痺家系の遺伝子解析

研究分担者 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，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
（東京大学神経内科）
矢崎正英，中村勝哉，吉田邦広，池田修一
（信州大学脳神経内科リウマチ・膠原病内科）
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

小脳失調，末梢神経障害を伴った常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺家系の原因遺伝子変異検索を行った．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．発症者のエクソーム解析で候補領域内に，Chediak-Higashi 症候群(CHS)の原因である *LYST* 遺伝子の新規ミスセンス変異をホモ接合体で同定した．同変異は同胞患者にはホモ接合体で存在し，家系内で共分離していた．また，正常コントロールには認められず，種を超えて高度に保存されたアミノ酸を変異させるため，本疾患の原因遺伝子変異である可能性が高い．また，患者2名には CHS 患者に認められる，白血球内の巨大顆粒を認めた．以上より，本家系の患者は成人発症の CHS の可能性が高いと考えた．複合型劣性遺伝性痙性対麻痺の鑑別疾患として，CHS も念頭に置く必要がある．

A. 研究目的

遺伝性痙性対麻痺(Hereditary Spastic Paraplegia:HSP)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 SPG1～56 まで同定されており，そのうち30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，我々は小脳失調，末梢神経障害

を伴う遺伝性痙性対麻痺家系の遺伝子解析を行い，原因遺伝子変異を同定することを目的とした．

B. 研究方法

両親が従兄弟婚で，錐体路徴候，小脳失調，末梢神経障害を呈した同胞2例と健常者2名の1家系を対象とした(図1)．

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。次に、

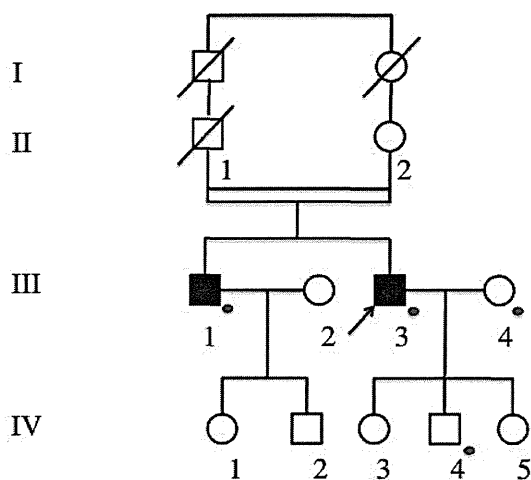


図 1. 家系図. 矢印は発端者. 点は採血に同意が得られた方々.

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。また、同定された遺伝子の変異が、同胞の患者や 2 名の健常者と共分離す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いについても十分に配慮した。

C. 研究結果

本家系の臨床症状：発端者は 48 歳頃より歩行障害で発症し、53 歳時当科入院。痙性対麻痺とアキレス腱反射以外の腱反射亢進を認め、両側 Babinski 反射陽性であった。また、軽度の小脳失調と、両側下肢近位筋の筋力低下を認めた。また、発端者の兄は 58 歳頃より歩行障害で発症。63 歳時の所見では、四肢の腱反射低下、両側 Babinski 反射陽性、軽度の小脳失調、下肢近位筋の筋力低下と筋萎縮を認めた。両者とも表在、深部感覚とも正常であった。MRI では、軽度の小脳萎縮を認めた。

本家系の遺伝子解析：連鎖解析の結果、4 つの染色体 (1, 2, 11, 17) の一部にロッドスコアが 1.8 程度まで上昇している領域があり、候補領域と考えられた (図 2)。

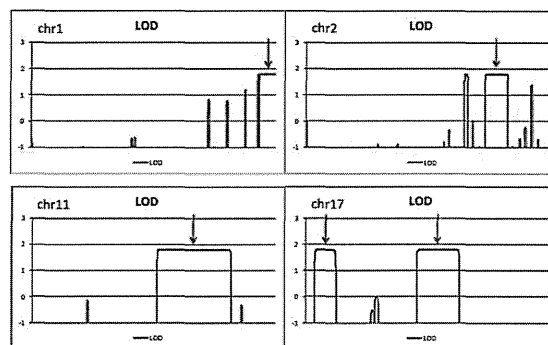


図 2. SNP を用いた連鎖解析. 矢印で示す部分に弱い連鎖を認めた。

この 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。発端者のエクソーム解析 (平均 coverage 106.24) を行った。候補領域内に存在する遺伝子がすべて解読できているか確認中

であるが、候補領域内に3つのアミノ酸変異を伴う新規ミスセンス変異を、ホモ接合体で同定した。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、2つ以上のタンパク質機能変化予測プログラムから、正常多型と考えられた。残る1つは、Chediak-Higashi 症候群 (CHS) の原因遺伝子である、*LYST* の変異 (c.4189T>G, p.F1397V) であった。

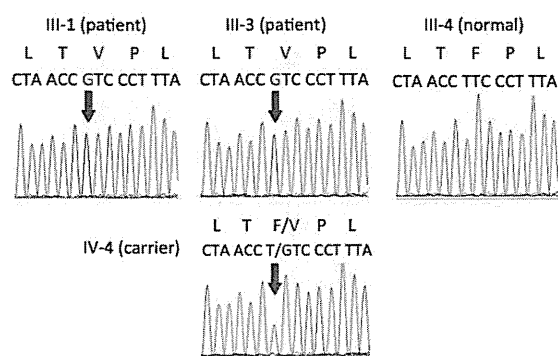


図3. サンガー法による *LYST* 遺伝子のミスセンス変異 (矢印) 確認と家系内共分離。

その変異は、同胞患者 DNA ではホモ接合体で認められたが、発端者の妻には無く、子にヘテロ接合体で認められた (図3)。また、種を超えて保存されたアミノ酸を変化させていた (図4)。

species	match	AA alignment
Human	1397	D T T M S P S Q Y L T F P L L H A P N L S N G
Chimp	1398	D T T M S P S Q Y L T F P L L H A P N L S N G
Rhesus	1397	D T T M S P S Q Y L T F P L L H T P N L S N G
Cat	1333	D I A M S P S Q Y L T F P L L H T P N S S N G
Mouse	1390	D F T M S P S Q C L T F P F L L H T P S L S N G
Chicken	312	N V D M N P L Q Y L A F P L L H G T N L S S -
Fugu	1366	N M N L E P L H L L T F P V I L G A T P G S V

図4. *LYST* 変異部位周囲のアミノ酸配列。変異部位は種を超えて保存されている。

さらに、正常コントロール200名のDNA

には認められず、原因遺伝子とその変異である可能性が高いと考えられた。

患者の血液学的検査:患者2名ともCHSで認められる、末梢血の多形核球内にペルオキシダーゼ陽性の巨大顆粒と、NK細胞活性の低下を認めた (図5)。

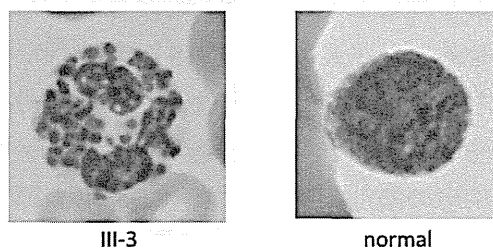


図5. 末梢血顆粒球のペルオキシダーゼ染色。発端者 (左) では正常者 (右) と比較し巨大な顆粒が認められた。

D. 考察

CHS は稀な常染色体劣性遺伝性疾患で、白血球その他の体細胞の原形質に巨大顆粒を有する免疫不全症である。食細胞 (特に好中球) の減少や機能異常 (主に食細胞内での殺菌低下) の為、乳児期より感染症を反復する。また、体細胞にメラニン分布異常が存在し、皮膚、毛髪、眼などに部分的白子症がみられる、大半が幼児期までに死亡する予後不良の疾患とされている。少数ではあるが成人例の報告もあり、易感染性を伴うものは少なく、神経症状を主徴とする場合が多い。これまで報告された成人例の神経症状は、末梢神経障害、小脳失調、知能障害、病的反射陽性が多いが、パーキンソニズム、痙攣性対麻痺の報告も稀にある。

本家系の症例では、臨床的に明らかな易感染性や部分的白子症は認められなかったが、白血球の巨大顆粒や末梢神経障

害、小脳失調などの神経症状を認め、それらはCHSの症状である可能性が高いと考えられた。

常染色体劣性遺伝性の、小脳失調、末梢神経障害を伴ったHSP家系の遺伝子解析を行い、*LYST* 遺伝子の新規ミスセンス変異を同定した。血液学的検査結果も合わせると、成人発症のCHSの可能性が高いと考えられた。劣性遺伝性の痙性対麻痺や小脳失調、末梢神経障害などを呈する疾患の鑑別疾患として、CHSも念頭に置くことが必要であると考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 2012; 114: 746-747
- 2) Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Sakai C, Matsushima Y, Hatakeyama H, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Namekawa M, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Goto Y, Nakano I. A homozygous mutation of *C12orf65* causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). *J Med Genet* 2012; 49: 777-84

- 3) 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 Neuro-imaging* 2013; 23: 82-85

2. 学会発表

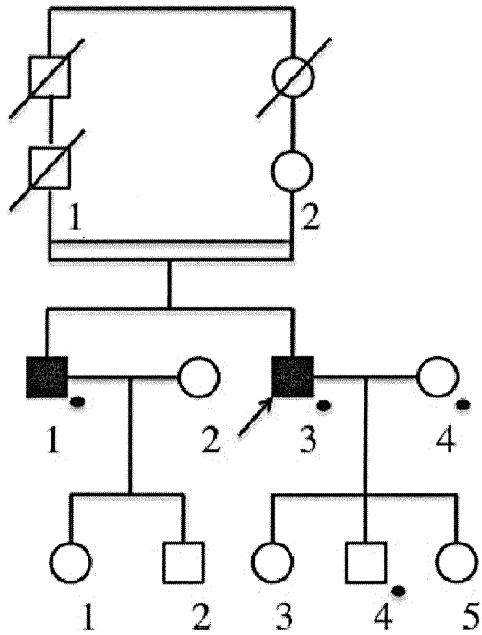
- 1) 嶋崎晴雄, 石浦浩之, 福田陽子, 本多純子, 迫江公己, 太田京子, 直井為任, 滑川道人, 高橋祐二, 後藤順, 辻省次, 後藤雄一, 瀧山嘉久, 中野今治: 視神経萎縮, 末梢神経障害を伴う遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子同定. 第53回日本神経学会総会, 2012年5月23日, 東京
- 2) Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Tsuji S, Goto Y, Nakano I: Homozygous nonsense mutations of *C12orf65* gene in patients with spastic paraplegia, optic atrophy and neuropathy (SPG55). 2012 Annual Meeting of American Neurological Association, 2012.10.7, Boston

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

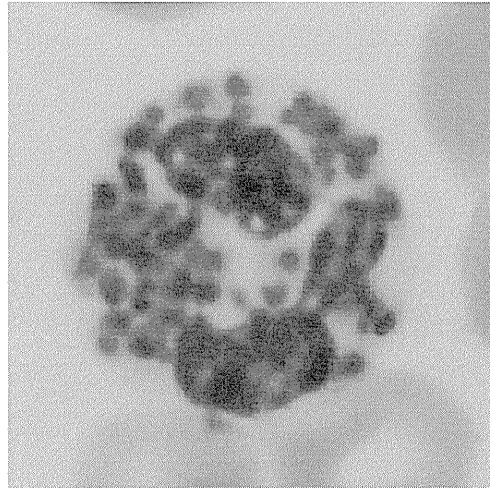
なし

小脳失調，末梢神経障害を伴った遺伝性痙攣性対麻痺家系の遺伝子解析で，*LYST*遺伝子の新規ミスセンス変異を同定

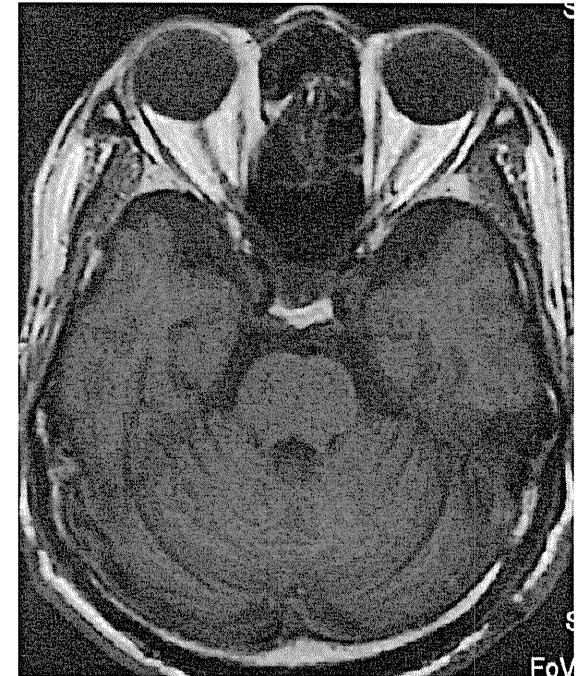
家系図



白血球の巨大顆粒

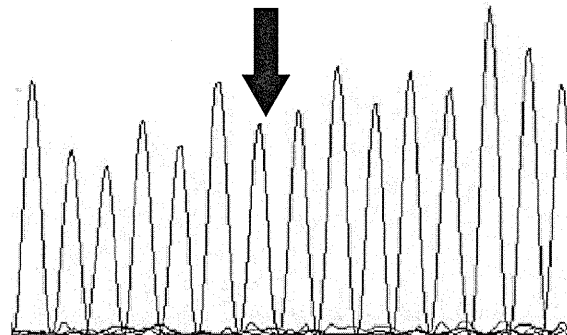


小脳萎縮



L T V P L
CTA ACC GTC CCT TTA

*LYST*遺伝子変異



IV. 小脑研究会

2012 年度 小脳研究会 学術集会・総会

2013 年 1 月 9 日（水）、16：10～18：10、班会議終了後、都市センターホテル 6 階 606 号室において開催された。

別添のプログラムに従って、まず発起人を代表して水澤英洋教授より、小脳研究会の目的と歩みについて説明と入会案内があり、引き続き、（公財）東京都医学総合研究所運動失調プロジェクトの笥 慎治教授より、小脳障害の定量的評価-feedforward 障害と feedback 障害を分離して評価する一と題して、講演 1 が行われ、活発な質疑応答がなされた（座長：水澤英洋教授）。次いで、慶応義塾大学大学院医学系研究科生理学の岡野栄之教授から、iPS 細胞を用いた神経変性疾患の病態解明と治療法開発と題して講演 2 が行われ、引き続き、活発な討議がなされた（座長：佐々木秀直教授）。総会では、当面研究班と協力して、このような形で講演会を中心とした活動を続けて会員の増加をめざし、十分な力がついた段階でより充実した活動をめざすという方針が承認された。参加者は約 80 人であった。

（文責 水澤英洋）

2012 年度 小脳研究会 学術集会・総会

日時：2013 年 1 月 9 日（水）、16：10～18：10

会場：都市センターホテル 6階 606号室

東京都千代田区平河町 2-4-1

プログラム

16：10～16：20 小脳研究会の目的と歩み

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学 水澤英洋

16：20～17：10

講演 1：小脳障害の定量的評価—Feedforward 障害と feedback 障害を分離して評価する—

（公財）東京都医学総合研究所 運動失調プロジェクト 笥 慎治

17：10～18：00

講演 2：iPS 細胞を用いた神経変性疾患の病態解明と治療法開発

慶応義塾大学大学院医学系研究科生理学 岡野栄之

18：00～18：10 総会

発起人：佐々木秀直、祖父江元、辻 省次、西澤正豊、水澤英洋

狩野方伸、川人光男、北澤 茂、杉原 泉、三品昌美

顧問：伊藤正男、金澤一郎、篠田義一

連絡先：〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45

東京医科歯科大学大学院脳神経病態学（神経内科学）分野

電話：03-5803-5233、 F A X：03-5803-0134

e-mail：h-mizusawa.nuro@tmd.ac.jp

* 本学術集会は、小脳研究会と運動失調症の病態解明と治療法開発に関する
研究班との共催です。

V. 研究成果の刊行に関する一覧表