

Ⅱ-2. ファール病（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）

平成23年度フェール病（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班 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 | 岐阜薬科大学薬物治療学 | 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 | 東北大学大学院医学系研究科神経内科 | 教授 |
| | 浅野隆彦 | 岐阜大学医学部附属病院放射線科 | 講師 |
| | 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 |
| | 小林清樹 | 札幌医科大学医学部神経精神科 | 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 |
| | 柴山獏人 | あさひが丘ホスピタル | 名誉院長 |
| | 高橋 均 | 新潟大学脳研究所病理学分野 | 教授 |
| | 田中恵子 | 金沢医科大学神経内科 | 特任教授 |
| | 田中耕太郎 | 富山大学大学院医学系研究科神経内科 | 教授 |
| | 戸田達史 | 神戸大学大学院医学系研究科神経内科 | 教授 |
| | 豊島 至 | 国立病院機構あきた病院 | 副院長 |
| | 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 |
| | 本田英輔 | 本田労働衛生コンサルタント事務所 | 所長 |
| | 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 |
| | 米田 誠 | 福井大学医学部第二内科 | 准教授 |
| 吉田真理 | 愛知医科大学加齢医学研究所神経病理 | 教授 | |
| 事 務 局 | 道家光子 | 岐阜薬科大学薬物治療学 〒501-1196 岐阜県岐阜市大学西1-25-4 T E L 058-230-8121 F A X 058-230-8121 e-mail koukem@gifu-u.ac.jp | |
| 経理事務担当者 | 長尾 勝広 | 岐阜薬科大学庶務会計課庶務係 T E L 058-230-8100 内線 3584 F A X 058-230-8200 e-mail syomuk@jim.gifu-pu.ac.jp | |

(注) 研究が採択された場合については、当該資料についてはホームページ等で公開する予定で事務局部分の所属等欄については、住所、電話、FAXについても記載すること。
経理事務担当者については、電話、FAX、E-MAILについても記載すること。
事務局と経理事務担当者の所属等欄が同一の場合は、同上と記載すること。
字体はMS明朝で統一すること。
研究班名は「研究課題名＋班」とすること。
表題は14ポイント、表題以外は11ポイントで統一すること。
ホームページ掲載時では「事務局」及「経理事務担当者」は、非公開といたします。

ファール病（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 *BGC1* 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ター *PiT2* 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‘ファール病’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、全く解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 *IBGC1*、*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 細胞を作製したが、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 (DNTEC) 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

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業

ファール病(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 の開発研究班班会議 (代表研究者 保住 功)

日時：平成24年2月4日(土) 13:00~15:00

場所：岐阜薬科大学大学院講義室 (2F, 医学部との連絡橋渡って左)

座長 保住 功

1 ファール病の臨床的、遺伝学的多様性 (症例報告)

- ・ 札幌医科大学 精神神経科 小林清樹先生 (研究協力者)
- ・ 富山大学 神経内科 田口芳治先生 (研究協力者)

2 ファール病患者の歯髄よりのiPS細胞の作製

岐阜大学 口腔病態学 柴田敏之先生 (分担研究者)

座長 木村暁夫 (岐阜大学 神経内科 研究協力者)

3 ファール病患者の髄液のプロテオーム解析

岐阜薬科大学 薬物治療学 / 岐阜大学 神経内科
橋本和宜 (院生) 他

4 総括

(ファール病患者の外来受診、IT機器を活用した心のケアシステム構築)

岐阜薬科大学 薬物治療学 保住 功



研究班班会議の参加をご希望の方は下記へe-メールかfaxでご連絡下さい

e-mail: hozumi@gifu-pu.ac.jp or fax: 058-230-8121

事務局：〒501-1196岐阜市大学西1-25-4 岐阜薬科大学

薬物治療学研究室内 担当：道家 Tel: 058-230-8121

Ⅱ-3. 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に関する研究
(平成24年度)

平成24年度ファール病(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班

| | 氏名 | 所属等 | 職名 |
|---------|-------------|---|------|
| 研究代表者 | 保住 功 | 岐阜薬科大学薬物治療学 | 教授 |
| 研究分担者 | 犬塚 貴 | 岐阜大学医学部神経内科 | 教授 |
| | 辻 省次 | 東京大学医学部神経内科 | 教授 |
| 研究協力者 | 青木正志 | 東北大学医学部神経内科 | 教授 |
| | 位田雅俊 | 立命館大学薬学部臨床薬理学 | 助教 |
| | 岡本浩一郎 | 新潟大学脳研究所脳神経外科 | 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 |
| | 金子雅幸 | 岐阜薬科大学薬物治療学 | 講師 |
| | 木村暁夫 | 岐阜大学医学部神経内科 | 准教授 |
| | 國貞隆弘 | 岐阜大学医学部組織・器官形成 | 教授 |
| | 小阪憲司 | メディカルコートケアクリニック | 院長 |
| | 小林清樹 | 札幌医科大学精神神経科 | 助教 |
| | 柴田敏之 | 岐阜大学医学部口腔外科 | 教授 |
| | 柴山漠人 | あさひが丘ホスピタル | 名誉院長 |
| | 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 |
| | 高橋 均 | 新潟大学脳研究所病理 | 教授 |
| | 田口芳治 | 富山大学医学部神経内科 | 助教 |
| | 田中耕太郎 | 富山大学医学部神経内科 | 教授 |
| | 津田笑子 | 札幌医科大学神経内科 | 助教 |
| | 西澤正豊 | 新潟大学脳研究所脳神経内科 | 教授 |
| | 林 祐一 | 岐阜大学医学部神経内科 | 助教 |
| 山田 恵 | 岐阜大学医学部附属病院 | 助教 | |
| | 本田英輔 | 本田労働衛生コンサルタント事務所 | 所長 |
| | 吉田眞理 | 愛知医科大学加齢医科学研究所 | 教授 |
| 事務局 | 道家光子 | 岐阜薬科大学 薬物治療学 〒501-1196 岐阜市大学西1-25-4 TEL 058-230-8121 FAX 058-230-8121 e-mail doukem@gifu-pu.ac.jp | |
| 経理事務担当者 | 長尾勝弘 | 岐阜薬科大学 庶務会計課政策係 〒501-1196 岐阜市大学西1-25-4 TEL 058-230-8100 内線3584 FAX 058-230-8200 e-mail syomuk@gifu-pu.ac.jp | |

(注) Excelソフトにて作成のこと。
事務局部分の所属等欄については、住所、電話、FAXについても記載すること。
経理事務担当者については、電話、FAX、E-MAILについても記載すること。
事務局と経理事務担当者の所属等欄が同一の場合は、同上と記載すること。
字体はMS明朝で統一すること。
研究班名は「研究課題名+班」とすること。
表題は14ポイント、表題以外は11ポイントで統一すること。

ファール病(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

研究代表者： 保住 功（岐阜薬科大学薬物治療学教授）

研究分担者： 犬塚 貴（岐阜大学医学部神経内科教授）

辻 省次（東京大学医学部神経内科教授）

研究要旨

岐阜薬科大学、岐阜大学、東京大学との共同研究にて、ファール病（特発性両側性大脳基底核石灰化症 (idiopathic bilateral ganglionic calcification)）の患者 69 例について、*SLC20A2* 遺伝子の直接塩基配列決定法による解析を行った。家族例 9 家系中 4 家系で、孤発例 47 例中 3 例で同遺伝子の変異を認めた。これら全て、これまでに報告のない新規変異であった。*SLC20A2* 変異例間では一定のタイプは認めず、臨床症状、石灰化の程度は多様性に富んでいたが、同一遺伝子変異を持つ症例間では臨床症状、画像所見に類似点が多く、類似した phenotype を有する可能性があると考えられた。

SLC20A2 が code するタンパク質である type III sodium-dependent phosphate transporter 2 (PiT-2) の機能解析のため、まず、PiT-2 の polyclonal と monoclonal の抗体を用いて、ラット脳を検索した。PiT-2 の immunopositivity は線状体、小脳を含め遍く脳内に認められ、細胞レベルでは特にニューロン、血管内皮細胞に強く認められることを見出した。さらに患者で認められた *SLC20A2* の遺伝子変異を導入した CHO 細胞を作製し、無機リン(Pi)運搬能を検索している。

A. 研究目的

ファール病は慣例的に、原因が不明で、両側淡蒼球に顕著な石灰化を来す疾患として呼称されてきた[1]。しかし、類似の病態を指す疾患名が多数存在し[2]、最近、国際的には (idiopathic basal ganglia calcification (IBGC) と名称が通用されている。孤発例のほか、家族例 (familial IBGC (FIBGC)) の存在が知られている。これまでその原因遺伝子座として、

IBGC1 (14q) [3]

IBGC2 (2q37) [4]

IBGC3 (8p11.21) [5]

IBGC4 (5q32) [6]

が報告されてきた。海外における家族例では特に IBGC3 が原因遺伝子として家族性に占める頻度は高いことも報告された [7]。本邦における家族例および孤発例の IBGC 症例における IBGC3 の原因遺伝子 *SLC20A2* の変異の頻度および臨床的特徴について、全国から患者の DNA の収集を行った岐阜薬科大学、岐阜大学、次世代シーケンサーを所有する東京大学との共同研究にて検討した。

さらに、この原因遺伝子である *SLC20A2* が code するタンパク質である type III sodium-dependent phosphate transporter

2 (PiT-2)の分子病態の解明を行う。

B.研究方法

全国一次アンケート調査でフェール病が疑われる症例（症例基準：1）頭部 CT にて大脳基底核 and/or 小脳歯状核に石灰化あり、2）両側対象性の脳内石灰化病変を有する、3）脳内石灰化をきたしうる代謝性疾患、外傷の既往、感染症やその他の疾患が除外できる）について情報提供を依頼した。その中で 39 施設 63 例の DNA 検体が提供され、IBGC の診断に適合することを確認できた家族例 8 家系（20 例）、孤発例 41 例につき（合計 37 施設）、*SLC20A2* 遺伝子の直接塩基配列決定法による解析を行った。同時並行して、東京大学神経内科が所有する 8 症例の遺伝子解析が行われ、副甲状腺機能が確認できない 1 症例を除外し、合計 68 症例の臨床情報、遺伝子解析結果について集約し、総合的検討を行った。

今回見出した *SLC20A2* の遺伝子変異を導入した CHO 細胞を作製する。

PiT-2 の polyclonal と monoclonal の抗体を用いて、ラット脳を検索する。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、それぞれ岐阜大学、岐阜薬科大学および東京大学の研究倫理審査委員会の承認のもとに実施した。DNA の採取にあたっては、書面を用いてインフォームド・コンセントを取得した。また、個人情報の取り扱いについて十分に配慮しながら、研究を遂行した。また共同研究についても両施設において倫理委員会の承認を得た。

C.研究結果

家族例 9 家系中 4 家系で *SLC20A2* 遺伝子変異をみとめ (44.4%)、いずれも新規変異で

あった。

家系 1（9 例；6 例で石灰化あり、3 例は石灰化なし）では、脳内石灰化を有する全例で遺伝子変異を認める一方で、石灰化がみられない例では変異はなかった。変異例の臨床症状は、認知機能低下が主であり、運動機能障害はみられなかった。

家系 2、家系 3 は同一の遺伝子変異を認めた。これら 2 家系の症例はいずれも、約 5 年の経過で進行する認知機能低下、パーキンソニズムを呈し、頭部 CT では両側大脳基底核、小脳歯状核を中心に広範囲に著明な石灰化を認めた。

家系 4 74 歳女性、71 歳時、パーキンソニズムで発症した。73 歳時、頭部 CT で淡蒼球に著明な石灰化を認め、また長女にも同様な脳内石灰化が認められた。79 歳時、肺炎で死亡した。興味深いことに、剖検で IBGC に合致する石灰化に、パーキンソン病と合致する病理所見も認められた。

孤発例では 47 例中 3 例 (6.4%) で遺伝子変異を認め、症例 1 例は Paroxysmal kinesigenic choreo-athetosis を呈する 24 歳男性例であった。症例 2、3 はそれぞれ 72 歳女性、78 歳男性で、MMSE は両者とも 22 点の軽度認知機能低下が疑われ、PIB-PET でアミロイドの沈着がないことも確認されている。

PiT-2 の immunopositivity は線状体、小脳を含め遍く脳内に認められ、細胞レベルでは特にニューロン、血管内皮細胞に強く、アストロサイトには弱く認められ、オリゴデンドロサイトやミクログリアには認められなかった。

また *SLC20A2* に認められた変異を導入した CHO 細胞を培養中であり、今後の機能解析に用いる。

D.考察

本研究で、*SLC20A2* の変異は家族例 9 家

系中4家系の44.4%に、孤発例47例中3例の6.4%に認められた。本邦の家族性ファール病において、頻度の高い原因遺伝子であると考えられた。*SLC20A2* 変異例間では一定のタイプは認めず、臨床症状、石灰化の程度は多様性に富んでいた。一方で、同一遺伝子変異を持つ症例間では臨床症状、画像所見に類似点が多く、phenotypeを有する可能性があると考えられた。

今後、さらなる研究として、IBGC4の原因遺伝子*PDGFRB*の変異の解析を行う。また*SLC20A2*に変異の認められなかった家族例についてはエキソーム解析を行う。

PiT-2、PiT-1の機能解析を行い、IBGC発症のメカニズムを解明し、病態に合致した創薬開発を目指す。

E. 結論

本邦のFIBGCにおいて、*SLC20A2*は頻度の高い原因遺伝子であり、変異例の臨床症状、石灰化の程度は多様性に富むが、同一遺伝子変異を持つ症例間では臨床的に類似したphenotypeを有する可能性がある。

PiT-2のimmunopositivityはニューロン、血管内皮細胞に強く認められた。

[参考文献]

- [1] 葛原茂樹 ファール病と特発性基底核・小脳石灰化症 P.516-517. 神経内科学書第2版 朝倉書店(豊倉康夫総編集)
- [2] Manyam BV. What is and what is not 'Fahr's disease'. Parkinsonism Relat Disord. 2005;11:73-80.
- [3] Geschwind DH et al. Identification of a Locus on Chromosome 14q for Idiopathic Basal Ganglia Calcification (Fahr Disease). Am. J. Hum. Genet. 1999; 65: 764-772.
- [4] Volpato CB et al. 2q37 as a suscepti-

bility locus for idiopathic basal ganglia calcification (IBGC) in a large South Tyrolean family. J Mol Neurosci. 2009; 39: 346-353.

- [5] Wang C, Li Y, Shi L, Ren J, et al. Mutations in *SLC20A2* link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. Nat Genet. 2010; 44: 254-256.
- [6] Nicolas G, Pottier C, Maltête D et al. Mutation of the *PDGFRB* gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. Neurology. 2013;80:181-187.
- [7] Hsu SC, Sears RL, Lemos RR, et al. Mutations in *SLC20A2* are a major cause of familial idiopathic basal ganglia calcification. Neurogenetics. 2013;14:11-22.

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

- * Yamada M, Asano T, Okamoto K, et al. High frequency of calcification in basal ganglia on brain computed tomography images in Japanese older adults. Geriatr Gerontol Int. Epub 2012 Dec 21.
- * Takagi M, Ozawa K, Yasuda H, et al. Decreased bioelements content in the hair of patients with Fahr's disease (Idiopathic bilateral calcification in the brain). Biol Trace Elem Res. 2013;159: 9-13.
- * 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 2012. 38(13)1907-1912.
- * 保住 功 進むFahr病の病態解明 医学

のあゆみ 2012. 243(4)323-324.

- * Hozumi I. Roles and Therapeutic Potential of Metallothioneins in Neurodegenerative Diseases. Curr Pharm Biotechnol. in press. 2013.

- * 本邦における SLC20A2 の遺伝子解析 Neurology に投稿準備中

- * PiT-2 の脳内局在の検索について J.Neurol Sci に投稿準備中

2. 学会発表 なし

- * 岐阜健康長寿・創薬推進機構 第5回異分野交流研究会

「神経難病治療への新たな挑戦 ―次世代シーケンサー、iPS細胞を活用して―」

保住 功

日時：平成24年11月22日（木）

場所：岐阜薬科大学

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

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業

ファール病(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班会議 (代表研究者 保住 功)

日時：平成25年2月2日(土) 13:00~15:30

場所：岐阜薬科大学大学院講義室 (2F, 医学部との連絡橋渡って左)

- 1 中国からのSLC20A2変異についての報告 (文献紹介)
岐阜薬科大学 薬物治療学 金子雅幸
- 2 日本の症例におけるSLC20A2変異についての検索
岐阜薬科大学 薬物治療学 / 岐阜大学 神経内科 山田 恵
- 3 PiT2 (SLC20A2) の機能解析について
岐阜薬科大学 薬物治療学 位田雅俊
- 4 ファール病及び関連疾患におけるSLC20A2, RNASEH2Bの解析
東京大学 神経内科 田中真生・辻 省次
- 5 ファール病患者の歯髄よりのiPS細胞の作製と検索
岐阜大学 口腔病態学 柴田敏之
- 6 総括&総合討論 (診断基準・患者・家族の語りによる質的研究)
岐阜薬科大学 薬物治療学 保住 功



研究班班会議の参加をご希望の方は下記へe-メールかfaxでご連絡下さい
e-mail: hozumi@gifu-pu.ac.jp or fax: 058-230-8121
事務局：〒501-1196岐阜市大学西1-25-4 岐阜薬科大学
薬物治療学研究室内 担当：道家 Tel: 058-230-8121

Ⅱ-4. 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）からの
iPS 細胞樹立と病態解析
(平成 23-24 年度)

分担研究者 柴田敏之
岐阜大学 口腔病態学分野

ファール病 (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 也剛

岐阜大学大学院医学系研究科口腔病態学分野

研究要旨

ファール病 (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 6 人の患者の口腔組織 (歯髄、歯肉) から細胞株を樹立した。この内の 1 例の歯髄細胞株 (DP276、歯根形成期) に、山中 4 因子を組み込んだセンダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞の作製を試みた。この際、当科が保有している健常者より樹立した歯髄細胞バンク (約 250 株) から本例と同年齢で同じ発育段階の智歯より樹立した細胞株 (DP31、歯根形成期) を対照 (ポジティブコントロール) として iPS 細胞誘導を行った。

最終的にファール病患者由来 DPC 株から iPS 細胞株は樹立できたが、そのコロニー誘導率は DP31 (健常) が 270 個/10mm dish に対し、DP276 (ファール病) は 6 個/10mm dish と著明に低い結果となった。これまでの解析で、DP31 のような智歯発育段階が未熟である歯冠完成期や歯根形成期より樹立した歯髄細胞株では、通常誘導効率が高いことが分かっており、ファール病の歯髄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ァ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細胞 (Dental Pulp Cell: DPC) 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 DPC は高い増殖・分化能を持つが、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、DPC からの iPS 細胞誘導を試み、iPS 細胞を高率にかつ Oct・Sox の 2 因子でも樹立可能であることを見出し、DPC 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. 2010) ²⁾。更に、DPC はゲノムへのベクター挿入が生じないセンダイウイルス法やエピソーマルプラスミド法でも容易に iPS 細胞の樹立が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 DPC 株を対照として、ファール病(特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症)患者から DPC 株を樹立し、これらより iPS 細胞株を樹立することで、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

(1) ファール病患者から細胞株を樹立

通法に従い抜去智歯の歯髄より DPC 株を樹立した(Takeda et al. J Dent Res. 2008)¹⁾。DPC は、比較的容易に採取・樹立可能であり、培養方法がシンプルである事から、センダイウイルス法やエピソーマルプラスミド法でも高率に 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から病態解析に必要な比較対照群を容易に得られることで、DPC をファール病患者からの iPS 細胞のリソースとして選択した。ただし抜去すべき智歯がない患者は、歯肉から細胞株を樹立した。

(2) iPS 細胞の誘導

iPS 細胞の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法は、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法を選択した。センダイウイルスは negative strand RNA ウィルスで、細胞質にとどまって RNA を転写、複製して蛋白質を合成することから、宿主染色体に影響を与えず、挿入変異や染色体構造変化の危険性もないなどの特徴がある。また siRNA を用いると宿主細胞からセンダイウイルスベクターを容易に除去することが可能である。我々は

山中 4 因子 (Oct4・Sox2・Klf4・c-Myc) を組み込んだセンダイウイルスベクター(産総研・中西先生より分与)を DPC に感染させ、翌日より ES 細胞の培養条件で培養し、その後 ES (iPS) 細胞様コロニーの形成を観察した。1-2 回の植え継ぎを行い、その際に siRNA 処理をすることで、約 2 週間後にヒト ES 細胞様コロニーが出現した。これらのコロニーをピックアップし、iPS 細胞株として樹立した。また抗センダイウイルスベクター抗体による免疫染色で、センダイウイルスベクターが除去されているかどうかを確認した。

(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、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細胞株の樹立・iPS 細胞の誘導を行った。

C. 研究結果

本疾患と診断された 6 人の患者より細胞株を樹立した(4 例が歯髄、2 例が歯肉より樹立した)。この内、若く、歯の形成段階も未熟な 16 歳の方の DPC 株 (DP276) を用い iPS 細胞誘導を試みた。これまでの解析から、若年者で歯の形成段階が未熟な智歯由来の DPC では、iPS 細胞への誘導効率が高いことが判っているため、DP276 を用いた。尚、対照としてバンクから同年齢で同様の発育段階由来の DPC 株 (DP31) を選び用いた。その結果、最終的にファール病患者由来 DPC 株から iPS 細胞株は樹立できたが、そのコロニー誘導率は DP31 (健常) が 270 個/10mm dish に対し、DP276 (ファール病) は 6 個/10mm dish と著明に低い結果となった。この結果は、ファール病患者由来の DPC 株は細胞初期化抵抗性である可能性が示唆された。

しかし樹立した iPS 細胞株は、ヒト ES 細胞と同程度の増殖能と性質を有することが分かった。また、現在フェール病患者の歯肉由来細胞株からも iPS 細胞の誘導を行っている。

D. 考察

特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症患者由来 DPC 株からセンダイウイルスベクターを用いて、non-integration iPS 細胞株を樹立した。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伴に、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に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）患者 6 人から細胞株を樹立した。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、フェール病患者 DPC 株の 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 Cells for Induced Pluripotent Stem Cell Banking. 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

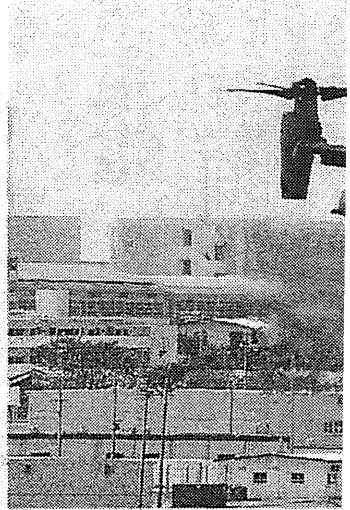
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

日米



このあたりを飛ぶ。オスプレイ操縦士の一人は共同通信に「低空飛行訓練は通常、200㍎(約60㍎)まで下げて飛ぶ」と証言。東京の霞が関ビル(147㍎)の半分よりか

自衛隊法改正「自衛隊」

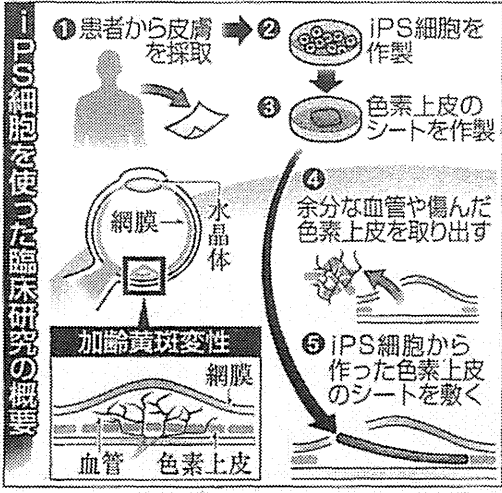
人質事件で邦人救出で明記 検証委報告書

アルジェリア人質事件(偉官房長官)は28日、よる陸上輸送もできず報告書をまとめた。邦人保護担当の迅速な現地派遣に向け外務省

iPS初の臨床申請

理研、網膜再生を研究

理化学研究所は28日、さまざまな細胞に成長する人工多能性幹細胞(iPS細胞)で目の網膜を再生させる臨床申請を、先端医療センター病院(神戸市)で実施する計画を厚生労働省に申請した。



厚労相の了承意見を研究責任者の理化学研究所発生・再生科学総合研究センター(神戸市)の高橋政代(51)シエクトリダー(51)らが同市内で記者会見し、臨床申請の申請を「治療に向けた一歩を踏み出そう」としている。研究生活が終わるまでに標準的な治療にしたい」と意気込みを語った。iPS細胞で懸念

計画では、目の奥にある網膜が傷み、視力が急激に失われる「滲出(しんしゅつ)型加齢黄斑変性」の治療法として移植する。今回の計画では、人間の視力回復を図るのには、より早期の患者に試す次の段階になる。



保住功教授

難病「ファール病」厚労省研究班 保住教授(岐阜)が参加

厚生労働省と文部科学省は28日、難病患者の細胞からiPS細胞を作製し、研究に活用する事業を開始したと発表した。約50の厚労省難病研究班が参加。岐阜薬科大学薬学系薬物治療学の保住功教授が班長を務める、脳内に異常な石灰化が起こる「ファール病」の研究班も参加する。保住教授によると、ファール病は原因不明の疾患で若い人に起こる進行性の病気で、症状は軽い頭痛からパーキンソン病のような運動機能障害、認知症などさまざまという。2010年7月、原因不明や克服を目指す研究班が岐阜大学の神経内科で立ち上がり、保住教授は「同様に有効な治療法がなかった筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの研究で飛躍的発展が期待できると全く違った創薬が期待できる分野」と意

Ⅱ-5. その他