

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)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

研究要旨

本研究開始から約2年半、平成25年3月20日現在、原因不明の両側性脳内石灰化症患者登録数は180名である。しかし、登録後の調査で、副甲状腺機能低下症、Aicardi-Goutières症候群、Cockayne症候群といった何らかの原因も判明した疾患もあった。また、その他の原因の不明な idiopathic bilateral ganglionic calcification (IBGC)患者の中にはほとんど無症状、あるいは軽度の頭痛、軽度の認知症を呈し、頭部CT検査で偶発的に見つかった登録症例も少なくなく、我々の行った岐阜、新潟の2大学での1年間の全例頭部CT画像検索の結果からも、本邦における患者総数はこの登録数の少なくとも数倍はいると推定している。

本研究におけるIBGC患者の遺伝子検査で、*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IBGC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、同一遺伝子異常とは思われないほど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、同じphenotypeを有すると考えられた。今後、さらなる分子、遺伝子に基づいた診断法、分類法の開発が望まれる。

また、今後は遺伝子変異の見出されていない家系例などで次世代シーケンサーを駆使した原因遺伝子の解明が進む。リン酸トランスポーターであるPiT-2、PiT-1の機能解析を軸に、IBGC発症のメカニズムの解明が進んでいく。さらに、患者のiPS細胞を作製し、神経細胞や血管内皮細胞に分化させることで、ここ数年で、病態の解明や病態に合致した創薬の開発が急進展するものと予測される。

研究分担者

平成22年度

犬塚 貴 岐阜大学医学部神経内科 教授

林 祐一 岐阜大学医学部神経内科 助教

香村彰宏 岐阜大学医学部神経内科 医員

平成23年度

下澤伸行 岐阜大学生命科学ゲノム 教授

柴田敏之 岐阜大学医学部口腔病態学 教授

犬塚 貴 岐阜大学医学部神経内科 教授

平成24年度

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

A. 研究目的

フェール病は慣例的に、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、類似の頭部CT画像を呈したり、類似の病態を指す疾患名も多数存在し、混乱も多い[2]。近年、国際的には idiopathic bilateral ganglionic

calcification (IBGC)の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。

平成 22 年 7 月からの班研究の開始の年は我が国における患者の実態調査を行うこと、疾患の分子病態の解明を進めることを目的とした。

平成 23~24 年度は、班研究は、フェール病という範疇には種々の病態が存在することから、分子、遺伝子レベルでの診断方法の確立、病態解明に基づく創薬の開発を目的とした。

B.研究方法

1) 実態調査

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) について一次アンケート調査を実施した。一次アンケート調査による登録から、二次、三次アンケート調査を行い、臨床情報の収集、毛髪、髄液、血液 (DNA 抽出のため) の検体の収集を行った。

2) 全国疫学調査

班研究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った。

岐阜大学と新潟大学の附属病院を拠点とした頭部 CT 画像全例調査を行った。

3) 毛髪中の元素分析

収集できた患者の毛髪中の元素を高感度の誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) を用いて元素分析し、正常コントロール群と比較検討する。

4) 髄液中の重金属分析、疾患特異的タンパ

ク質の検索

収集できた患者の髄液中の重金属を ICP-MS を用いて元素分析し、正常コントロール群と比較検討する。また、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。

5) 患者 DNA の遺伝子解析

収集できた患者の血液から DNA を抽出し、既報の遺伝子変異について検索を行う。変異が認められなかった DNA については全例エキソーム解析を行う。

6) PiT-2 の機能解析

遺伝子変異の頻度の最も高い *SLC20A2* が code するタンパク質 type III sodium-dependent phosphate transporter 2 (PiT-2) の機能解析を行う。

7) 患者の iPS 細胞の作製

外来受診患者の不要となった智歯から iPS 細胞を作製し、病態の解明を行う。

8) 患者と家族のインタビューに基づく心のケア、質的分析

患者と家族の面談と病の語りに基づく質的分析を行い、心情の把握と適切なケアの在り方を見出す。

(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た。DNA の検索は岐阜大学、岐阜薬科大学および東京大学それぞれの倫理審査委員会の承認のもとに実施した。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。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。すべての検索は個人情報取り扱いについて十分に配慮しながら、研究を遂行した。

C. 研究結果

1) 実態調査

全国の日本神経学会認定施設に、平成 22 年 9 月 3 日、756 通の往復葉書によるアンケートを発送し、299 件の返信を得た(返却 3 件、返信率 40.0%)。信頼性がある患者登録総数として 69 症例(40 歳以下が 12 症例、41 歳以上が 57 症例)あった。また日本小児神経学会に協力を依頼し、小児神経専門医に、平成 22 年 9 月 3 日、1063 通の往復葉書によるアンケートを発送し、455 件の返信を得た(返却 13 件、返信率 43.3%)。登録総数として 35 症例の登録が得られた。その後の登録や岐阜大学病院専門外来のホームページを見て受診された方を含め、平成 25 年 3 月 20 日現在で総数 180 名である。

2) 全国疫学調査

全国疫学調査として、正確なフェール病の患者数、臨床疫学像の把握のため、「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、中村好一教授)との合同研究を開始した。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、平成 22 年 12 月 9 日に一次アンケートが発送

された。しかし、残念ながら検索の手間等から解析に十分な数の返信は得られなかった。

そこで、実態調査で得られた全国分布図から患者数の多かった岐阜の岐阜大学病院、また剖検例も含め患者数が少ないと思われた新潟の新潟大学病院で、1 年間に撮影した頭部 CT の脳内石灰化の頻度を検索した。検索した患者総数は、岐阜で 2526 症例、新潟で 2573 症例であった。検索では淡蒼球に点状の石灰化を認める症例は岐阜大学 17.2%、新潟大学で 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。研究成果は Geriatr Gerontol Int に掲載した[3]。

3) 毛髪中の元素分析

収集され解析された毛髪検体数は、53 検体であった。その中で、Diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNFC=小阪・柴山病) [4]を除外し、診断的にフェール病、IBGC として均一な 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。研究成果は Biol Trace Elem Res に掲載した [5]。

4) 髄液中の重金属分析、疾患特異的タンパク質の検索

我々はすでに 22~76 歳の IBGC3 症例の髄液中の重金属を ICP-MS を使って検索し、3 症例とも Ca 代謝は正常であったが、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ている [6]。これらの上昇値は我々が検索したアルツハ

イマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)などの他の神経変性疾患と比較しても顕著であった [7]。

IBGC 患者の髄液を用いて、二次元電気泳動法による疾患特異的マーカーの検出を試みたが、有意なものは見出されなかった。

今後、金沢大学神経内科との共同研究にて、タウ、リン酸化タウについて、DNTC との鑑別も踏まえ、詳細に検討を行う予定である。

5) 患者 DNA の遺伝子解析

これまでその原因遺伝子座として、

IBGC1 (14q) [8]

IBGC2 (2q37)2q37 [9]

IBGC3 (8p11.21) 8p11.21 [10]

IBGC4 (5q32) [11]

が報告されてきた。

IBGC1 で効率に認められる MGEA6 遺伝子 p.P521A 多型に関して、IBGC 24 症例で検索を行ったが、1 例もその多型は認められなかった。

IBGC3 の原因遺伝子 *SLC20A2* を検索し、家族例 9 家系中 4 家系で (44.4%)、孤発例 47 例中 3 例で(6.4%)と、既報[12]と同様、高頻度に変異を認めた。これらはいずれも新規変異であった。Neurology に投稿準備中である。

IBGC4 の原因遺伝子 *PDGFRB* の変異の検索を開始した。

6) PiT-2 の機能解析

PiT-2 の immunopositivity は線状体、小脳を含め遍く脳内に認められ、細胞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。J.Neurol Sci に投稿準備中

である。

7) 患者の iPS 細胞の作製

6 人の IBGC 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 細胞を作製した。

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 (IBGC) は 6 個/10mm dish と著明に低い結果であった。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、フェ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。

8) 患者と家族のインタビューに基づく心のケア、質的分析

IBGC3 例の患者と家族のインタビューを行い、解析し、患者や家族の悩みの実態がより明らかとなった。研究成果の詳細は「臨床看護」に掲載した[13]。さらに症例数を増やし、質的分析ソフト MAXQDA を活用し、詳細な分析を行っている。

D. 考察

平成 25 年 3 月 20 日現在、班研究における患者登録数は 180 名である。しかし、その中には副甲状腺機能低下症、Aicardi-Goutières 症候群、Cockayne 症候群といった疾患も含まれていた。また患者の中にはほとんど無症状、あるいは軽度の頭痛、軽度の認知症を呈し、頭部 CT 検査で偶発的に見つかった症例も少なくなく、本邦における患者総数は登録数の数倍はいるのではないかと推定している。

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 IBGC 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、遺伝子変異の見出されていない家系例など次世代シーケンサーを駆使した原因遺伝子の解明が進む。

リン酸トランスポーターPiT-2、PiT-1 の機能解析を軸に、IBGC 発症のメカニズムの解明が進むものと考えられる。

患者の iPS 細胞を作製し、細胞を神経細胞や血管内皮細胞に分化させることで、病態の解明や病態に合致した創薬の開発が期待できる。

E. 結論

本邦の IBGC において、*SLC20A2* は頻度の高い原因遺伝子であり、今後、その翻訳タンパク質であるリン酸トランスポーター PiT-2 や PiT-1 の機能解析を軸に病態の解明、創薬の開発が急展開すると予測される。

【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. (Fahr Disease). Am. J. Hum. Genet. 1999; 65: 7 64-772.
- [3] 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.

- [4] Kosaka K. Diffuse neurofibrillary tangles with calcification: a new presenile dementia. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994;57:594-596.
- [5] 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.
- [6] Hozumi I, Kohmura A, Kimura A, et al. High Levels of Copper, Zinc, Iron and Magnesium, but not Calcium, in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Fahr's Disease. Case Rep Neurol.2010;2:46-51.
- [7] Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, et al. Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. J. Neurol. Sci. 303: 95-99, 2011.
- [8] Geschwind DH et al. Identification of a Locus on Chromosome 14q for Idiopathic Basal Ganglia Calcification
- [9] Volpato CB et al. 2q37 as a susceptibility locus for idiopathic basal ganglia calcification (IBGC) in a large South Tyrolean family. J Mol Neurosci. 2009; 39: 346-353.
- [10] 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.

[11] 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.

[12] 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.

[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.

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

* Hozumi I, Kohmura A, Kimura A, Hasegawa T, Honda A, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Sakurai T, Tanaka Y, Satho M, Inuzuka T. High levels of copper, zinc, iron and magnesium but not calcium, in the CSF of patients with ‘Fahr’s disease’. Case Report in Neurology. 2:46-51, 2010.

* Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, Ozawa K, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Kimura A, Tanaka Y, Satoh M, Inuzuka T. Patterns of levels of heavy metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. J Neurol Sci. 303:95-99, 2011.

* 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 38(13):1907-1912, 2012.

* 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. Dec. 21, 2012.

* 保住 功 進む Fahr 病の病態解明 医学のあゆみ 243(4)323-324, 2012.

* 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. 151(1) 9-13, 2013.

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

2. 学会発表

* 新潟脳神経研究会特別例会
神経変性疾患におけるメタロチオネインと重金属の役割と創薬への応用
保住 功

日時：平成22年7月27日

場所：新潟大学脳研究所

* 日本薬学会東海支部特別講演
神経変性疾患（ALS、ハンチントン病、Fahr病）の治療戦略 –メタロチオネインとiPS細胞を活用して–

保住 功

日時：平成22年7月28日

- 場所：岐阜薬科大学
- * 第17回東海メタロチオネイン研究会
ヒトメタロチオネイン遺伝子のSNP検索
林 祐一、橋本和宜、犬塚 貴、保住 功
日時：平成22年12月23日
場所：岐阜薬科大学
 - * 第52回日本神経学会総会
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
- * 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 ー次世
代シーケンサー、iPS細胞を活用してー」
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