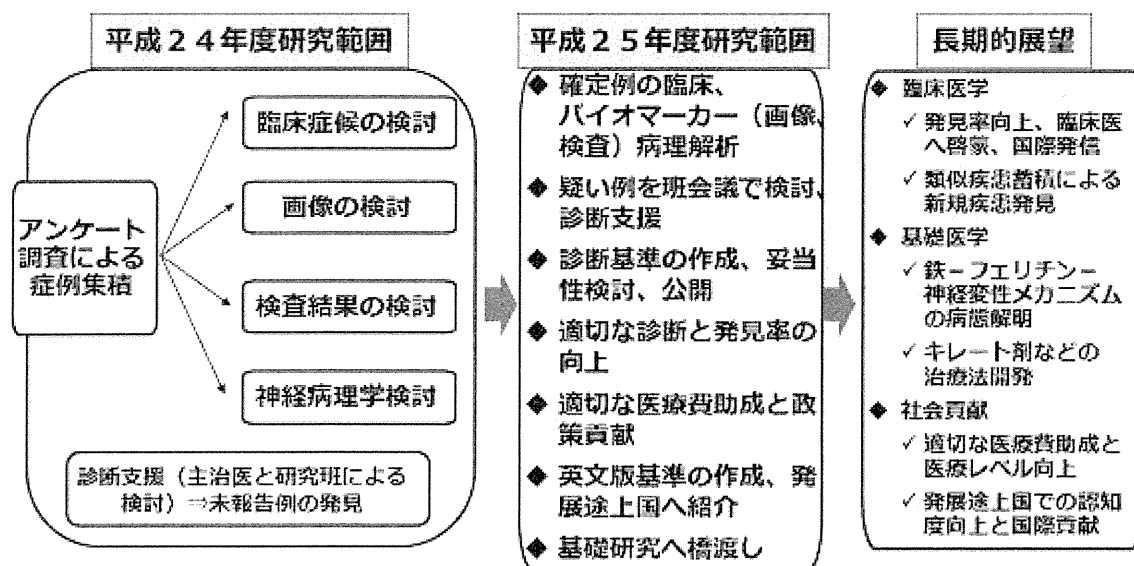


(資料1) 研究のロードマップ (研究期間、中期的 (5年後)、長期的 (10年後))

「神経フェリチン症の本邦における実態調査と診断基準の構築に関する研究班」における中長期的ロードマップ



(資料2) 研究の流れ図



(資料3) 平成24年度アンケート調査票 (改訂診断指針を含む)

平成24年11月1日

「神経フェリチン症」に関するアンケート調査のお願い

平成24年度難治性疾患等克服研究事業「神経フェリチン症の診断基準の構築と調査に関する研究班」

拝啓、

秋冷の候、先生方におかれましては、大変お忙しい日々をお過ごしのことと存じます。

さて、平成24年度難治性疾患等克服研究事業として、「神経フェリチン症の実態調査と診断基準の構築に関する研究班 (H24-難治等(難) 一般-063)」が立ち上がり準備をして参りました。先生方におかれましてはすでにご承知のとおり、本症は、フェリチン軽鎖遺伝子の変異により、様々な神経症候を呈する疾患で、近年認識されるようになっております。特に、臨床的にはMRIにより診断されるケースが徐々に多くなっている印象がありますが、類似する臨床症候や画像所見を呈する疾患も存在し、また過去の論文報告などをみても、その報告数は必ずしも多いものではありません。

本年度の研究班としての目標は、1) 実地臨床に携わられている先生方が、ご経験されている神経フェリチン症あるいはその疑い例がどの程度存在するのかを確認すること、2) 我々が試案として考えている診断指針は妥当なものであるのか、を検討させていただき、その上で、特に疑い症例の主治医であられる先生と研究班とで一緒に検討をさせていただき、必要であれば遺伝子診断のご案内まで検討させていただきたいと考えております。

先生方におかれましては、大変お忙しいこととは存じますが、アンケートにご協力いただけると幸いです。

アンケートはできるだけ簡便な形式とし、患者様あるいは先生方を特定できる個人情報などが含まれないよう配慮したものといたしました。まずは、このアンケートの結果によりまして、それぞれの先生方とご連絡をさせていただきたいと考えております。期日を(平成25年1月15日)としており時間が大変少なくなっておりますが、何卒ご協力のほどよろしくお願い申し上げます。返信は同封の封筒にてお願い申し上げます。またメールでも結構です。もし電子媒体がご入り用であれば、ご連絡くだされば幸いです。

また、すでに学会、論文等でご発表になられている症例がございましたら、参考とさせていただきますたく存じますので、アンケートの最後に雑誌名、発行年、ページなどご教示くだされば幸いです。

末筆ではありますが、先生方の益々のご発展、ご健勝をお祈り申し上げます。

敬具

代表 高尾昌樹、東京都健康長寿医療センター
分担研究者 百島祐貴、慶應義塾大学医学部放射線診断科
山脇健盛、広島大学大学院 脳神経内科

連絡先：高尾昌樹

東京都健康長寿医療センター高齢者ブレインバンク 専門研究部長

〒173-0015 東京都板橋区栄町3-5-2

E-mail: mtakao@tmig.or.jp、電話: 03-3964-3241 内線 3048

神経フェリチン症の診断指針（試案）として以下の内容を検討しております。

以下の診断指針（試案）をご参照の上、アンケートにご協力くださいますようお願い申し上げます。

概念：神経フェリチン症は、フェリチン軽鎖遺伝子変異により、変異フェリチンと正常フェリチンからなる封入体が、神経細胞やグリア細胞を中心に蓄積し、多彩な錐体外路徴候、錐体路徴候、認知障害な多彩な神経症候を長期にわたり認める。頭部 MRI で両側基底核の変性所見（添付図）（特に病期が進行すると嚢胞性変化を来す）が特徴的である。

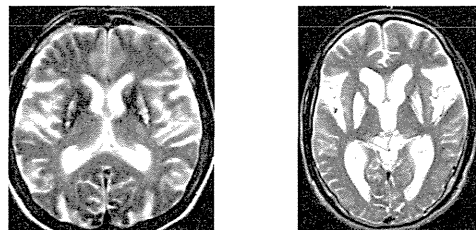
臨床症候

1. 振戦、小脳失調、錐体路徴候、錐体外路徴候、認知障害を認める
2. 20歳代から発症することがある（一部10歳代での発症もある）
3. 1の症状は、数十年にわたり、緩徐に、様々な程度で出現する
4. 家族歴があることがあるので、慎重に確認する

画像診断

1. 頭部 MRI の T2 強調画像で、大脳基底核に中心が高信号、周囲が低信号の病変を認め（2例の参考画像を呈示しました）、周囲の低信号病変は T2* 強調画像あるいは磁化率強調画像(SWI)で明瞭となることがある。（→パントテン酸キナーゼ関連神経変性症に含まれる NBIA1 などと異なり、神経フェリチン症では淡蒼球、被殻、視床、歯状核など広範に低信号となることが多いとされています）。

（参考：頭部 CT だけしか施行できない場合、基底核に対称性の低吸収域を認めることが考えられます）



病理診断

1. 神経病理学的にフェリチンの神経細胞内、グリア細胞内、神経細胞内での沈着を確認する。

遺伝子診断

1. フェリチン軽鎖遺伝子変異が確認できればほぼ確定できる。

その他

1. 血清フェリチン値の低下(文献的には20 ng/ml以下となっている可能性が高い)。
2. ヘモグロビン値、血清鉄は正常であることが一般的である。

質問 1 先生のご専門の分野をお選びください。

神経内科

脳神経外科

放射線科

その他 ()

質問 2 上記診断基準（試案）をご参考にしていただき、神経フェリチン症と考えられる症例を経験されたことがありますか？（あり、なし、MRI が施行できないので判定不可）

① 「なし」→アンケートは終了です。何らかのご意見があれば最後のページにご記入ください。ご協力ありがとうございました。

② 「MRI がなくて判定不可」 → 頭部 CT が撮像されていれば、ご記入の上、質問 3～へお進みください。

()

③ 「あり」 の場合 質問 3～へお進みください。

質問 3 上記診断基準に照らし合わせて、ご経験症例に関して可能な範囲で以下の表にご記入ください。

症例	発症年齢／ 現在の年齢 ／死亡年齢 (死亡されてい れば)	性別	初発症状 (該当するものに○をつけて ください。その他の場合は具 体的に)	その他の神経症候 (該当するものに○をつけて ください。複数選択可)	血液検査	脳脊髄液検査
1	発症 歳 現在 歳 死亡 歳	男・女	振戦・小脳失調・ 錐体路徴候・錐体外路徴候・ 高次機能障害・その他 ()	振戦・小脳失調・ 錐体路徴候・錐体外路徴候・ 高次機能障害・その他 ()	Hb 血清フェリチン値 Fe TIBC その他	細胞数 総蛋白 糖 フェリチン その他
2	発症 歳 現在 歳 死亡 歳	男・女	振戦・小脳失調・ 錐体路徴候・錐体外路徴候・ 高次機能障害・その他 ()	振戦・小脳失調・ 錐体路徴候・錐体外路徴候・ 高次機能障害・その他 ()	Hb 血清フェリチン値 Fe TIBC その他	細胞数 総蛋白 糖 フェリチン その他
3	発症 歳 現在 歳 死亡 歳	男・女	振戦・小脳失調・ 錐体路徴候・錐体外路徴候・ 高次機能障害・その他 ()	振戦・小脳失調・ 錐体路徴候・錐体外路徴候・ 高次機能障害・その他 ()	Hb 血清フェリチン値 Fe TIBC その他	細胞数 総蛋白 糖 フェリチン その他
4	発症 歳 現在 歳 死亡 歳	男・女	振戦・小脳失調・ 錐体路徴候・錐体外路徴候・ 高次機能障害・その他 ()	振戦・小脳失調・ 錐体路徴候・錐体外路徴候・ 高次機能障害・その他 ()	Hb 血清フェリチン値 Fe TIBC その他	細胞数 総蛋白 糖 フェリチン その他
5	発症 歳 現在 歳 死亡 歳	男・女	振戦・小脳失調・ 錐体路徴候・錐体外路徴候・ 高次機能障害・その他 ()	振戦・小脳失調・ 錐体路徴候・錐体外路徴候・ 高次機能障害・その他 ()	Hb 血清フェリチン値 Fe TIBC その他	細胞数 総蛋白 糖 フェリチン その他

質問4 診断に用いた MRI に関しておわかりになる範囲でご記入ください。

- ① 診断のために用いた MRI 機種、磁場強度 (T)
- ② 診断のために用いた MRI シーケンス (T2、 T2*、 SWI)
- ③ 診断根拠となった画像所見を、ご自由にご記入ください

[]

質問5 上記の症例は遺伝子診断が施行されていますか (はい、いいえ)

① 「はい」の場合は、遺伝子変異の有無、その詳細を可能な範囲でご教示ください。

② 「いいえ」の場合は、今後遺伝子検査を希望されますか。 (希望する、希望しない)

希望される場合、当研究班でも遺伝子検査の紹介を行っております。ご連絡をくだされば、責任を持ってアレンジいたします。

質問6 何らかの治療を施行されましたでしょうか (はい、いいえ)

① 「はい」の場合は、その詳細を可能な範囲でご教示ください (内服薬、手術、リハビリなど)

[]

② その他ご意見などあれば、ご自由にご記入ください。

--	--

質問7 当研究班では、先生のご経験症例に関し、診断困難例を含め、先生とともに検討を行う機会を設けております。検討会への参加を希望されますでしょうか。

(はい、いいえ)

「はい」の場合は、おって、当方からご連絡をさせていただきます。

質問8 学会、論文等でご発表になられている場合、雑誌名、発行年、頁をご教示ください。

--	--

以上で、アンケートは終了です。お忙しい中、お手数をおかけいたしました。アンケートの結果をふまえ、再度ご意見を募りたいと考えております。

先生方のご協力に深謝いたします。

(資料4)

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
神経フェリチン症の実態調査と診断基準の構築に関する研究班
（H24-難治等（難）—一般—063）
第1回 研究班会議 プログラム

日時 平成24年9月21日 15:00から17:30

場所 東京都健康長寿医療センター 会議室

- | | | |
|-------------------------------|--|-------------|
| 1. 本研究班の経緯、状況 | 15:00～15:30 | |
| 高尾 昌樹 | 東京都健康長寿医療センター
神経病理学研究（高齢者ブレインバンク）
専門研究部長 | |
| 2. 神経フェリチン症に関して | 15:30～15:50 | |
| 太田恵美子 | 富士温泉病院 神経内科 | |
| 3. 神経フェリチン症の確定診断が得られている症例に関して | 15:50～16:10 | |
| 杉山美紀子 | 横浜市立大学医学部神経内科 | |
| 4. 神経フェリチン症が疑われる症例に関して | 16:20～16:40 | |
| 西田勝也 | 国立病院機構兵庫中央病院神経内科 | |
| 5. 総合討論 | 16:40～17:10 | |
| 山脇健盛 | 広島大学 脳神経内科学・神経内科 | |
| 百島祐貴 | 慶應義塾大学放射線診断科 | |
| 4. 連絡事項、文部科学省研究班との共同研究に関して | | |
| 高尾昌樹 | 東京都健康長寿医療センター | 17:10～17:30 |

(資料5)

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
神経フェリチン症の実態調査と診断基準の構築に関する研究班
（H24-難治等（難）一一般-063）
第2回 研究班会議 プログラム

日時 平成25年2月8日 15:30 から 19:00

場所 東京都健康長寿医療センター 談話室

- | | |
|-------------------------------|-------------|
| 1. 本研究班の状況と24年度アンケート調査の報告 | 15:00～15:30 |
| 高尾 昌樹 東京都健康長寿医療センター
専門研究部長 | |
| 2. 新規症例の検討と報告 | |
| 神経フェリチン症が疑われた症例についての報告 | 15:30～16:00 |
| 西田 勝也 国立病院機構兵庫中央病院神経内科 | |
| 神経フェリチン症が疑われる症例についての報告 | 16:00～16:30 |
| 中田 るか 長崎大学第一内科 | |
| 神経フェリチン症が疑われる症例についての報告 | 16:30～17:00 |
| 隅蔵 大幸 東京都健康長寿医療センター | |
| 神経フェリチン症が疑われる症例についての報告 | 17:00～17:30 |
| 黒田 龍 静岡赤十字病院 神経内科 | |
| 5. 神経放射線診断の立場から | 17:30～18:00 |
| 百島 祐貴 慶應義塾大学放射線診断科 | |
| 6. 総合討論 | 18:00～18:50 |
| 山脇 健盛 広島大学 脳神経内科学・神経内科 | |
| 太田恵美子 富士温泉病院 神経内科 | |
| 杉山美紀子 横浜市立大学医学部神経内科 | |
| 8. 連絡事項 | 18:50～19:00 |
| 高尾 昌樹 東京都健康長寿医療センター | |

(資料6) 研究班により、確認された神経フェリチン症確定例 (平成24年度)

症例1, 2, 4は本研究班により直接確認された症例。症例1, 2は生存しており、各主治医によりフォロー中。症例4は死亡が確認されたが、剖検が施行出来なかった症例。

症例	発症年齢/ 現在の年齢 /死亡年齢 (死亡されて いれば)	性別	初発症状 (該当するものに○を付けて ください。その他の場合は具体的 に)	その他の神経症候 (該当するものに○を付けて ください。複数選択可)	血液検査	脳脊髄液検査
1 c439_44 2dupGA CC	発症60歳 現在64歳 死亡歳	男	錐体外路徴候 (不随意運動, 左上肢, 舞踏運 動)	錐体外路徴候 (不随意運動, 左上肢, 舞踏運 動), 軽度認知機能障害	Hb 正常範囲 血清フェリチン値 13 ng/ml (37-281ng/ml) Fe WNL TIBC WNL その他	細胞数 1 鉄蛋白 55 糖 ? フェリチン? その他
2 c468_48 3dupTG GCCGG GAGGCT GGG	発症44歳 現在45歳 死亡歳	女	摂食障害	嘔吐, 小脳失調・ 錐体外路徴候	Hb すべて正常範囲 血清フェリチン値 20ng/ml Fe 152 TIBC 246 その他	細胞数 1 鉄蛋白 29 糖 フェリチン その他
3 c439_44 2dupGA CC	発症41歳 現在歳 死亡45歳	男	錐体外路徴候 (不随意運動, 舌, 左上肢, 舞 踏運動)	摂食・錐体外路徴候 (DTR亢進), 錐体外路徴候, 精神症状, う つのため自殺	hb 15.7 血清フェリチン値 70 ng/ml Fe 144 ug/dl TIBC 263 その他	細胞数 2 鉄蛋白 21 糖 66 フェリチン 未測定 その他
4 c409_48 4dupGG CCCGA GGCTGG GC	発症5歳 死亡歳	男	歩行障害	筋緊張低下, 錐体外路徴候 (DTR亢進), 認知機能障 害	血清フェリチン 6ug/l	

(資料7) 疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた神経フェリチン症の病態研究への申請書類

(様式5) ※課題ごとに作成してください(1課題あたり3~5ページ程度にまとめてください)。

課題別研究計画

1. 疾患名	神経フェリチン症 (Neuroferritinopathy)	2. 共同研究代表研究者名	高尾 昌樹
3. 共同研究代表研究者所属機関	地方独立行政法人 東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)		
4. 共同研究課題名	疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた神経フェリチン症の病態研究		
5. 共同研究代表研究者の所属する難治性疾患研究班名および研究班代表研究者名 神経フェリチン症の実態調査と診断基準の構築に関する研究班 (H24-難治等(難) 一般-063) 研究班代表研究者名: 高尾 昌樹			
6. 研究の背景、目的、研究方法の概要(疾患特異的 iPS 細胞を使用するメリットを含めて)、予想される成果(いつまでにどのようなことを明らかにするのか、具体的な到達目標)等を具体的に記載ください。特に創薬等の出口に至る道筋について明確かつ具体的に記載してください。			
<p>[研究の背景]</p> <p>神経フェリチン症は新しく認識された疾患で、フェリチン軽鎖遺伝子変異により、振戦、小脳失調、錐体路徴候、錐体外路徴候、認知障害など様々な症状が多様に出現し、数十年の経過をとる常染色体優性遺伝性の難病である(J Neuropathol Exp Neurol. 2004;63:363-80)。神経病理学的に、変異フェリチン軽鎖と正常フェリチン軽鎖および重鎖が一定の比率で重合した封入体が、神経細胞(特に小脳神経細胞を含み)やグリア細胞の細胞質や核内に多数かつ広範に出現する。また、本症に関する認識がひろまり、本邦においても新規遺伝子変異を含めた報告が増加している。臨床的には上記に示す臨床症候に加え、頭部MRIにおける基底核病変が特徴的報告されているが、いまだ確立された診断基準(指針)はないため、難治性疾患克服等研究事業研究班において本邦における実態の調査が開始された段階である。</p> <p>神経フェリチン症では、変異したフェリチン軽鎖を含む封入体が蓄積した後、どのように神経細胞やグリア細胞死に繋がるのか、なぜ多くの神経変性疾患に比し長期経過をとるのかなど、解明されていない点が多い。さらに神経系だけでなく広く全身臓器にフェリチン封入体所見を認めるが、ヒトでは各臓器によりフェリチン軽鎖と重鎖の比率が異なること、よい動物モデルが存在しないことなどから、まだ研究途上である。近年、上記研究班の協力者であり、本疾患研究の世界的リーダーである米国のVidalらによれば、本症は、gain of toxic functionとloss of toxic functionが発症原因と考えられ、特に鉄代謝障害に伴う、活性酸素種の過剰な発生により神経細胞死やグリア細胞死に陥るものと考察している(Free Radic Biol Med. 2012;52:1692-7)。</p> <p>本症の責任遺伝子が明確になっていることから、確定診断を行うことは臨床的に可能である。しかし発症すると、本症の進行を止めたり、遅らせたりできる可能性のある治療法はない。また、神経系以外の組織(臓器)にも、変異フェリチンが蓄積すること(但し、それに対応する臨床的症候はまだ確立されてい</p>			

ない)もふまえ、発症早期あるいは発症前に介入できる治療方法を見いだすことは極めて重要である。しかし稀少疾患であることから、罹患患者の全身臓器の検索も経時的に施行することは困難である。したがって、ヒトにおける正確な病態解析と新規治療法の開発のために、患者由来の細胞を用い、実際の病態に即した疾患モデル構築を行うことは有用であると考えられる。さらに剖検による検討だけでは、本症のような長期にわたる臨床経過を呈する疾患の、最終像だけを見ることになるので、疾患の進行過程を検討するには、実態にそぐわない点もある。しかし、動物モデルは必ずしもヒト疾患を反映するわけではなく、剖検による病理学的検討と、疾患特異的 iPS 細胞由来の細胞病理を比較検討することは、本研究の有効性や特性を検討する上で欠かせない。

疾患特異的 iPS 細胞技術を駆使し、本症における神経細胞死のメカニズムを解明できれば、実際の病態に即した疾患モデルを構築することが可能となり、新たな治療ターゲットの開発も可能となる。さらに、ひろく、鉄代謝に関連する他の神経疾患の治療法開発にも繋がるものと推察される。

[目的]

神経フェリチン症における、疾患特異的ヒト iPS 細胞から誘導した患者由来小脳系神経細胞、アストロサイトを用いて、変異フェリチン軽鎖由来の封入体(凝集体)形成の過程を検討する。また、異なる遺伝子変異に対する表現形の違いなども検討する。また、現在、本症に対する治療薬剤の候補は発見されていないので、活性酸素種の抑制などを踏まえた、既存治療薬の効果、あるいは新規治療薬の開発、スクリーニングを行う。患者剖検組織における組織学的表現形と、疾患特異的ヒト iPS 細胞から誘導した患者細胞との比較検討も行い、神経フェリチン症における iPS 細胞の特性などを併せて検討する。

[研究方法の概要]

1. 疾患特異的ヒト iPS 細胞の樹立

研究班で同定している遺伝子診断により確定されている神経フェリチン症症例から皮膚線維芽細胞を採取し、エピゾーマルベクターを用いて、*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *shP53*を導入し、神経フェリチン症特異的ヒト iPS 細胞を樹立する。樹立したヒト iPS 細胞クローンは、外来遺伝子のゲノムへの挿入、未分化マーカーの発現、疾患感受性細胞への分化能解析などにより、各患者由来ヒト iPS 細胞ごとに、良質なクローンを2-3クローン選択する。また、選択したヒト iPS 細胞クローンについては、染色体解析、aCGHによるゲノム異常の有無等により、末梢血や、iPS 細胞樹立前の線維芽細胞での解析結果と比較検討する。

2. ヒト iPS 細胞からプルキンエ細胞、小脳顆粒細胞とアストロサイトへの分化誘導と純化

小脳顆粒細胞、プルキンエ細胞への分化は現在方法が確立されていないため、共同研究拠点(慶應義塾大学)と共同開発を行い誘導を試みる。共同研究拠点の慶應義塾大学生理学教室では、これまでマウス ES 細胞においてはプルキンエ細胞の誘導に成功しており、この方法に準じて、また、必要に応じて小脳特異的な転写因子を導入し効率的な誘導を試みる。アストロサイトは共同研究拠点ですでに確立されている神経幹細胞の誘導を経て誘導することが可能である。GFAP-GFPなどのレポーターを用いて純化を試みる。

3. 疾患特異的 iPS 細胞から誘導した小脳神経細胞とアストロサイトを用いた病態解析

3.1 変異フェリチン軽鎖による封入体の解析

疾患特異的ヒト iPS 細胞から小脳神経細胞とアストロサイトへ分化誘導し、長期間、成熟分化誘導を行い、抗変異フェリチン軽鎖抗体、抗フェリチン軽鎖抗体、抗フェリチン重鎖抗体、抗ユビキチン抗体、さらに抗カルビンディン抗体、抗 GFAP 抗体、抗ビメンチン抗体などの免疫染色を行い、核内封入体あるいは細胞質内封入体の細胞病理学的形成について評価する。その結果封入体が、ヒト疾患と同様に変異フェリチン軽鎖、正常フェリチン軽鎖と重鎖から構成されるものであるのか、電子顕微鏡（免疫電子顕微鏡を含む）を用いて、封入体の性状が従来報告されているフェリチンと一致するのかがまで検討する。

3.2 神経フェリチン症 iPS 細胞由来小脳系細胞とアストロサイトを用いたトランスクリプトーム解析

上記で得られた細胞組織学的表現型の分子病態を明らかにするために、患者および健常者由来 iPS 細胞から分化誘導・純化した小脳神経細胞とアストロサイトから mRNA を抽出してトランスクリプトーム解析（マイクロアレイまたは次世代シーケンサーによる mRNA seq）を行い、健常者と患者由来との間で発現に差のある遺伝子に着目し、病態と関与する因子（特定の分子やパスウェイ、シグナルカスケード）を同定する。また、このトランスクリプトーム解析で得られた新規の病態関連遺伝子は、強制発現やノックダウン実験による機能解析を行う。

3.3 神経フェリチン症患者由来分化細胞を用いた薬剤スクリーニング

小脳神経細胞とアストロサイトにおける変異フェリチン軽鎖を含む核内あるいは細胞質内封入体、あるいは新規に同定したターゲットを指標として、新規治療候補薬のスクリーニングを行う。これらの検討は、既存の薬剤ライブラリーに加え、拠点において、他疾患の iPS 細胞を用いた共同研究を開始している製薬企業との協力もふまえ開発を目指す。患者 iPS 由来細胞で治療効果を示した薬剤については、さらに動物モデルでの有効性、副作用および薬効動態の検証を行う。特に神経フェリチン症における最新の検討から、活性酸素種を抑制する既存承認薬剤を含めたスクリーニングも行い、効果が認められる場合は、早期に臨床応用を目指す。

4. ヒト表現形との対応と剖検による検討

神経フェリチン症における、変異フェリチンを中心に構成される封入体は、神経系細胞やアストロサイトに種々の形態で蓄積するので、疾患特異的 iPS 由来細胞における組織学的変化とヒト組織の変化を比較検討することは、iPS 細胞を疾患モデルとして活用する上で重要な点である。したがって、ある遺伝子変異を持つ患者からの iPS 樹立後、その細胞病理学的変化と、現存保有している剖検例の組織所見を比較検討する。さらに生前 iPS を樹立した患者が、基礎疾患の進行あるいは他の理由により死亡した場合、剖検により臨床病理表現形を明らかにし、iPS 由来の細胞との相違を検討する。そのために、iPS 樹立の際に、可能であれば剖検生前同意も取得する。神経フェリチン症に関しては、現在までに発見されたすべての遺伝子変異に対して、その神経病理所見が確定しているわけではなく、変異による表現形に違いが明らかでないことから、極めて重要な検討である。さらに、iPS 細胞樹立前に、研究班でフォローする症例が死亡し、剖検が得られた場合は、その際に iPS 樹立を含めた承諾を取得し、組織の採取を行う。その際には、皮膚以外からの採取も念頭に置くこととする。

[予想される成果]

本研究において疾患特異的 iPS 細胞由来神経系細胞やアストロサイトを確立することで、実際の患者における病態を正確に捉えることが可能となる。特に、本症は数十年にわたり神経症候が進行する疾患であることから、異常フェリチンの蓄積もかなり初期に生じることが推定される。本症以外の、異常蛋白が蓄

積する一部の神経変性疾患の検討でも、臨床症候が出現するかなり以前から、神経系の病理変化は始まっていることが確認されており、少なくともその時点から治療介入ができれば、神経症候の出現を抑制することは難しい。疾患関連遺伝子保因者を、経時的に組織診断を行うことは現実的には不可能であり、iPSを使用した研究により、発症前からのどこの神経組織から病的変化が始まるのかといった変化を捉えることも可能となる。

さらに神経系におけるフェリチンの機能・役割も明らかになり、治療・創薬のターゲットともなり得るだけでなく、分子病態を明らかにすることができる。また、鉄と神経変性が関連する神経疾患は多く、その関連疾患の病態解明や治療法の開発にも、本疾患の解析は重要である。

既に iPS が樹立された症例が死亡した場合、剖検システムが確立していることから、剖検により組織情報を得ることが可能である。あるいは iPS 樹立前の症例が死亡したときには、剖検時に iPS 樹立のための手技もすでに確立しており、iPS 由来細胞と剖検により得られた神経病理学的表現形との比較検討を可能とし、疾患特異的 iPS 細胞の有効性、特性の検討も可能となる。

7. 年次計画（年度別に具体的に記載してください。）

1 平成24年度

1.1. 疾患特異的ヒトiPS細胞の樹立と品質評価

1.2. 遺伝子診断により確定した神経フェリチン症患者から採取した線維芽細胞にエピゾーマルベクターを用いてリプログラミング因子を導入し、ヒトiPS細胞を樹立。樹立したiPS細胞は、外来遺伝子のゲノムへの挿入、未分化マーカーの発現、分化能解析に加え、染色体・ゲノム解析による品質評価を行い、実際に解析に使用するiPS細胞を選択。

1.3. ヒトiPS細胞から小脳神経細胞とアストロサイトへの分化誘導とレポーターシステムを用いた純化。

2 平成25年度

2.1. 平成24年度に引き続き、疾患特異的ヒトiPS細胞の樹立と品質評価。

2.2. 患者由来ヒトiPS細胞から誘導した小脳神経細胞とアストロサイトを用い、フェリチンの核内、細胞質内封入体形成の組織学的解析を施行。

2.3. 樹立したiPS細胞の組織学的所見と、ヒト疾患における組織学的所見との比較検討。

3. 平成26年度

3.1. 患者由来ヒトiPS細胞から誘導した小脳神経細胞とアストロサイトにおいて、各種薬剤がフェリチン封入体形成に与える影響を解析。

3.2. 純化した小脳神経細胞とアストロサイトにおけるトランスクリプトーム解析。

4. 平成27年度

4.1. トランスクリプトーム解析の結果に基づき、病態に関与する新規候補因子を同定し、強制発現実験、ノックダウン実験により、その機能解析を行う。

4.2. 患者由来神経細胞を用い、封入体形成、あるいはトランスクリプトーム解析により同定した新規因子を指標に薬剤スクリーニングを施行。

5. 平成28年度

5.1. 平成27年度に引き続いて薬剤スクリーニングを進め、さらに、有効であった薬剤については、動物

モデルを用いて、その有効性、副作用および薬効動態を検証。

5.2. 臨床試験に向けての準備。

5.3. 年度を通じて、剖検症例がある場合、神経病理所見とiPS由来細胞との比較、疾患モデルとしての有効性、特性を検討。

8. 24年度における成果の目標、業務の内容 (業務項目別に具体的に記載してください。)

1. 疾患特異的ヒト iPS 細胞の樹立

拠点である慶應義塾大学と連携する研究班との共同で、神経フェリチン症患者の皮膚生検を行い、iPS細胞作成のための皮膚線維芽細胞の培養を行う。エピゾーマルベクターを用いて、*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *shP53*を導入し、神経フェリチン症特異的ヒト iPS 細胞を樹立。樹立したヒト iPS 細胞クローンについて、外来遺伝子のゲノムへの挿入、未分化マーカーの発現(免疫染色、定量的RT-PCR法)、疾患感受性細胞への分化能解析などを行い、良質なクローンを2-3クローン選択。また、染色体解析、aCGHによるゲノム異常の有無等により、選択したクローンの評価を行う。

2. ヒト iPS 細胞から小脳神経細胞とアストロサイト分化誘導と純化

分化誘導法を用いてヒト iPS 細胞から小脳神経細胞とアストロサイトへの分化誘導法の開発と純化方法の確立

9. 製薬企業の参加	<input type="checkbox"/> 有	<input type="checkbox"/> 無
有の場合、企業名、担当者所属・氏名・連絡先		

10. テーマに関連してこれまで受けた研究費と成果等

平成24年度	厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)(平成24年度~)	
	神経フェリチン症の実態調査と診断基準の構築に関する研究班(代表)	5,400,000円
	成果:神経フェリチン症の診断指針の準備、新規症例確認、日本神経学会におけるシンポジウム開催	
平成24年度	科学研究費補助金(新学術領域研究(生命科学系3分野支援活動)(平成22年度~26年度)包括型脳科学研究推進支援ネットワーク(分担)	2,000,000円
	成果:神経変性疾患の剖検症例をブレインバンクネットワーク構築、診断及び研究者への試料提供(現在、供与可能な凍結脳は約1000例)。	
平成24年度	長寿医療研究開発費(平成23年度~)	
	老化・認知症克服のためのブレインバンクの構築(分担)	15,900,000円

成果：ひろく神経変性疾患の剖検症例をブレインバンクとして蓄積し、研究者へ提供。
(現在、供与可能な凍結脳は約 1000 例)

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

脳表ヘモシデリン沈着症の診断基準の構築と調査に関する研究班 (代表) 5,750,000 円

成果：脳表ヘモシデリンの実態調査、診断指針の構築、神経フェリチン症研究班への発展

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

大脳皮質基底核変性症由来 iPS 細胞の樹立と

タウオパチーの新規治療戦略の確立 (分担)

300,000 円

成果：タウオパチーの iPS を剖検症例からも樹立、その後の剖検例の病理学的評価

II 分担研究報告