

変性症や多系統萎縮症の診断や、求心路と遠心路のどちらに由来する小脳失調であるか、その病態を把握することに有用である可能性がある。

今回我々は、RESOLVE を用い Control、MSA、PD、PSP、SCA 群の上小脳脚病変を評価した。Control・MSA・PD 群では上小脳脚交叉は全て正常に描出されていたが、PSP 群では上小脳脚交叉が半数で描出されず異常所見を呈した。また SCA 群は上小脳脚が主に障害される SCA3、DRPLA では上小脳脚交叉は描出されず異常を呈していたが、上小脳脚が障害されにくい SCA6、SCA31 では正常に描出されていた。そのため、上小脳脚交叉の障害の有無に注目することにより、求心路と遠心路の障害に由来する小脳障害の病態機序を簡便に鑑別出来る可能性があると思われた。

ただし、本研究は SCA 群が少数例での検討であり、また病理学的な裏付けがなされていないため、今後病理学的な裏付けを含め、更なる症例の蓄積が望まれる。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hara K, Watanabe H, Ito M, et al: Potential of a new MRI for visualizing cerebellar involvement in progressive supra-nuclear palsy. *Parkinsonism Relat Disord.* 2013 Oct 16. pii: S1353-8020 (13)00362-3. doi: 10.1016/j.parkreldis.2013.10.007. [Epub

ahead of print]

- 2) Watanabe H, Sobue G: A milestone on the way to therapy for MSA. *Lancet Neurol* 2013;12(3):222-3. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70023-1.
- 3) Mano T, Katsuno M, Banno H, et al. Tongue pressure as a novel biomarker of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology* 2014; 82(3): 255-62. doi: 10.1212/WNL.0000000000000041. Epub 2013 Dec 18
- 4) Watanabe H, Senda J, Kato S, et al: Cortical and subcortical brain atrophy in Parkinson's disease with visual hallucination. *Mov Disord* 2013; 28(12): 1732-6. doi: 10.1002/mds.25641. Epub 2013 Oct 21.
- 5) Nakamura R, Atsuta N, Watanabe H, et al: Neck weakness is a potent prognostic factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84(12):1365-71. doi: 10.1136/jnnp-2013-306020. Epub 2013 Aug 9.

### 2. 学会発表

- 1) 原一洋, 渡辺宏久, 伊藤瑞規他: RESOLVE 法を用いた進行性核上性麻痺における上小脳脚病変の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月, 東京
- 2) 原一洋, 渡辺宏久, 伊藤瑞規他: RESOLVE を用いた進行性核上性麻痺における上小脳脚病変の検討. 第 54 回

日本神経学会学術大会，2013年5月，  
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

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

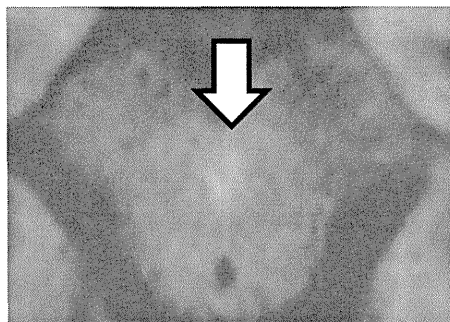
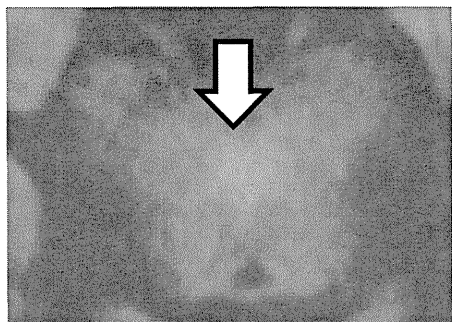
# RESOLVEは上小脳脚病変を鋭敏に検出出来る可能性がある

## 描出される疾患

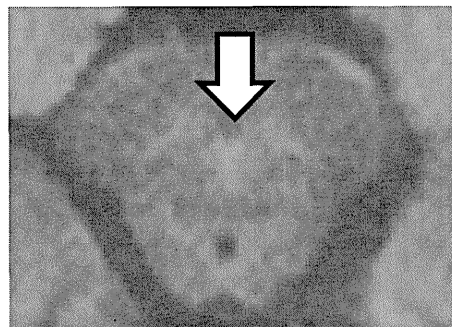
遠心路(上小脳脚)病変は稀

SCA6

MSA-C



SCA31

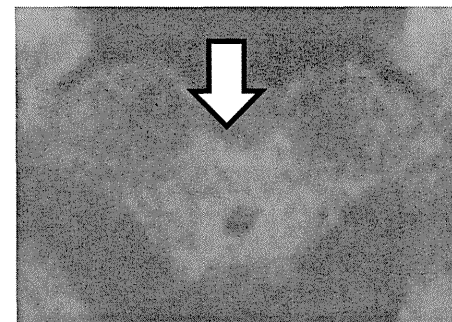
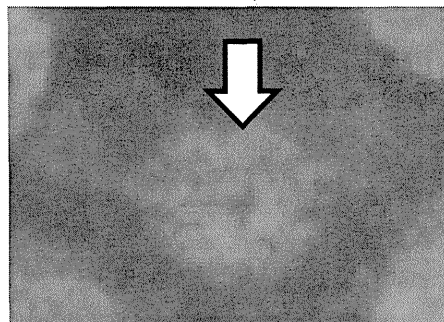


## 描出されない疾患

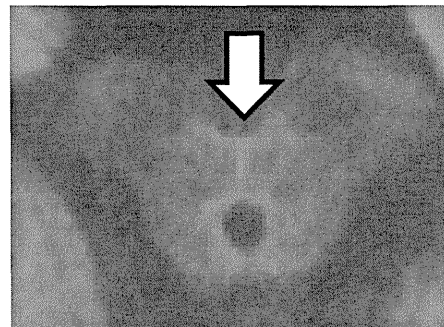
遠心路(上小脳脚)が好発部位

SCA3

PSP



DRPLA



求心路と遠心路の小脳障害を簡便に鑑別出来る可能性がある

## 多系統萎縮症及び脊髄小脳変性症鑑別診断のための MRI 画像撮像法の開発

研究分担者 佐々木 真理（岩手医科大学 教授）

### 研究要旨

運動失調症の早期鑑別診断に関する画像診断技術はまだ十分確立していない。そこで、最新の機能画像である拡散尖度画像(DKI)・定量的磁化率画像(QSM)と自動 ROI 解析法を用いて、本症の発症早期における基底核・脳幹・小脳の微細構造変化の検出および鑑別診断の可能性について検討した。DKI では、早期 PSP において被殻・中脳被蓋・小脳の拡散尖度低下、上小脳脚などの拡散異方性低下、中小脳脚の拡散係数上昇を、早期 MSA の一部において被殻・小脳の拡散尖度低下、橋横走線維・中小脳脚の拡散係数上昇を認めた。QSM では、早期 PSP において被殻の、早期 MSA の一部において被殻・赤核の鉄沈着増加を認めた。DKI・QSM 解析によって発症早期の運動失調症における病理学的変化を反映した軽微な変化を検出することができ、早期鑑別診断の可能性が示唆された。

### A. 研究目的

現在、Parkinson 病 (Parkinson' s disease, PD)、多系統萎縮症 (multiple system atrophy, MSA)、進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy, PSP) など運動失調症の早期鑑別診断に関する画像診断技術は十分確立していない。これまでに拡散テンソル画像 (diffusion tensor imaging, DTI) における神経線維の拡散異方性の変化、T2\*強調画像や磁化率強調画像 (susceptibility weighted image, SWI) における鉄沈着の変化が報告されているが、早期診断能は十分とはいえない状況である。

近年、DTI よりも鋭敏に脳組織の微細変化を検出できる拡散尖度画像 (diffusion kurtosis image, DKI) や、SWI よりも正確に鉄沈着を評価できる定量的磁化率画像

(quantitative susceptibility mapping, QSM) が提唱され、PD や多発性硬化症等に應用されつつある。そこで、本研究では、DKI/DTI と QSM を用いて運動失調症の発症早期における基底核・脳幹・小脳の微細変化の検出を試み、早期鑑別診断の可能性について検討を行った。

### B. 研究方法

2012 年 11 月～2013 年 12 月に運動失調症を疑われ本学附属病院を初診した未治療患者 20 名 (PD 11 例、MSA-P 4 例、MSA-C 1 例、PSP 4 例) を対象に、3 Tesla MRI 装置を用いて DKI/DTI 解析用元画像 (SE-EPI, b = 1000/2500, MPG 20 axes), QSM 解析用元画像 (spoiled GRE, magnitude/phase [I/Q]) を撮像した。

独自ソフトウェアを用い、DKI では mean

kurtosis (MK) 画像を、DTI では fractional anisotropy (FA) 画像と mean diffusivity (MD) 画像を、QSM では mean susceptibility (MS) 画像を算出した。

画像解析では FSL を用い、まず各患者の FA 画像の解剖学的標準化を行い、その変換行列を用いて他の画像の変形・位置合わせを行った。次に、複数の公開アトラスを用いて、MK, FA, MD, MS 画像の自動 ROI 解析(被殻[上部/後部/下部]、中脳被蓋、橋横走線維、上小脳脚、中小脳脚、小脳白質・灰白質、淡蒼球、黒質、赤核)を行った。各指標の群間差異の有無は、Steel-Dwass 法による多重比較で検討した。

#### (倫理面への配慮)

画像解析の際には患者情報を匿名化し、患者情報保護に十分な配慮を行った。

### C. 研究結果

DKI では、主に灰白質において群間差異を認めた。被殻の MK は疾患群で低下し、特に後部で明らかであった。PSP や MSA-P では PD に比しやや低い傾向があった。中脳被蓋の MK は PSP において PD や MSA に比し低下していた。小脳灰白質の MK は PSP において PD に比し有意に低下し、MSA においても低下している例があった。

DTI では、主に白質において群間差異を認めた。上小脳脚の FA は PSP において PD や MSA に比し低下していた。小脳白質の FA は PSP や MSA の一部で PD に比し低下傾向があった。中小脳脚の MD は PSP において PD に比し有意に上昇していた。MSA の一部では、橋横走線維や中小脳脚の MD が上昇していた。

QSM では、深部灰白質の MS は疾患群で全体に上昇していた。被殻の MS は、PSP において PD に比し上昇傾向があった。MSA では 1 例のみで上昇していた。赤核の MS は MSA の一部において PD や PSP に比べ上昇していた。

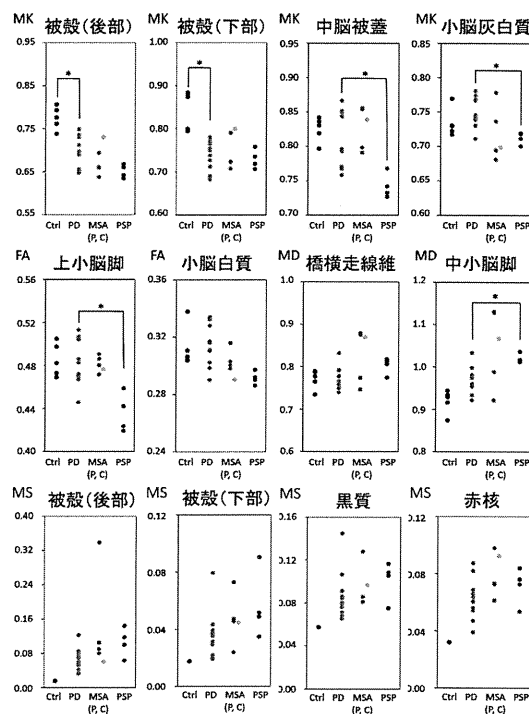


図 1 PD, MSA, PSP における基底核・脳幹・小脳構造の MK, FA, MD, MS 値の変化

(\*  $p < 0.05$ , Steel-Dwass test)

### D. 考察

今回、早期運動失調症において、DKI (MK) では灰白質、DTI (FA/MD) では白質、QSM (MS) では深部灰白質の病理学的変化を反映した軽微な所見を捉えることができた。MK は拡散非正規性、FA/MD は拡散異方性や拡散係数、MS は常磁性体含有量の定量指標であり、MK の低下は神経細胞脱落やグリオーシスを、FA の低下や MD の上昇は脱髄や軸索変性を、MS の上昇は

鉄沈着を反映していると考えられた。中でも、PSP では他群に比し、中脳被蓋、上小脳脚、中小脳脚、小脳灰白質に有意な変化を認め、早期鑑別指標として有望と考えられた。また、MSA の一部では被殻、赤核、橋横走線維・中小脳脚に明瞭な変化を認め、鑑別指標としての可能性が示唆された。

本手法の撮像は多くの装置で平易に行うことができるが、画像処理・解析は特殊で煩雑である。今後、画像処理・解析技術を最適化するとともに、汎用アプリケーションとしての開発を進め、広く公開していく必要があると考えられる。また、今回の検討結果は preliminary であるため、今後症例の蓄積・経過観察を行うとともに、従来の MRI 所見との対比を行い、その意義を明らかにしていく必要がある。

## E. 結論

早期運動失調症において、DKI/DTI および QSM の自動領域解析によって、MK では灰白質、FA・MD では白質、MS では鉄沈着の軽微な変化を検出することができた。DKI/DTI・QSM 解析は、運動失調症の早期変化の検出と鑑別に有望と考えられた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

## 2. 学会発表

- 1) 伊藤賢司, 佐々木真理, 他: 拡散尖度画像を用いたパーキンソン症候群の早期鑑別診断. 第 43 回日本神経放射線学会, 2014 年 3 月 21-23 日, 鳥取 (発表予定)
- 2) 佐々木真理: MRI によるパーキンソニズムの鑑別診断. 第 7 回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS, 2013 年 10 月 11 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

特に無し

### 2. 実用新案登録

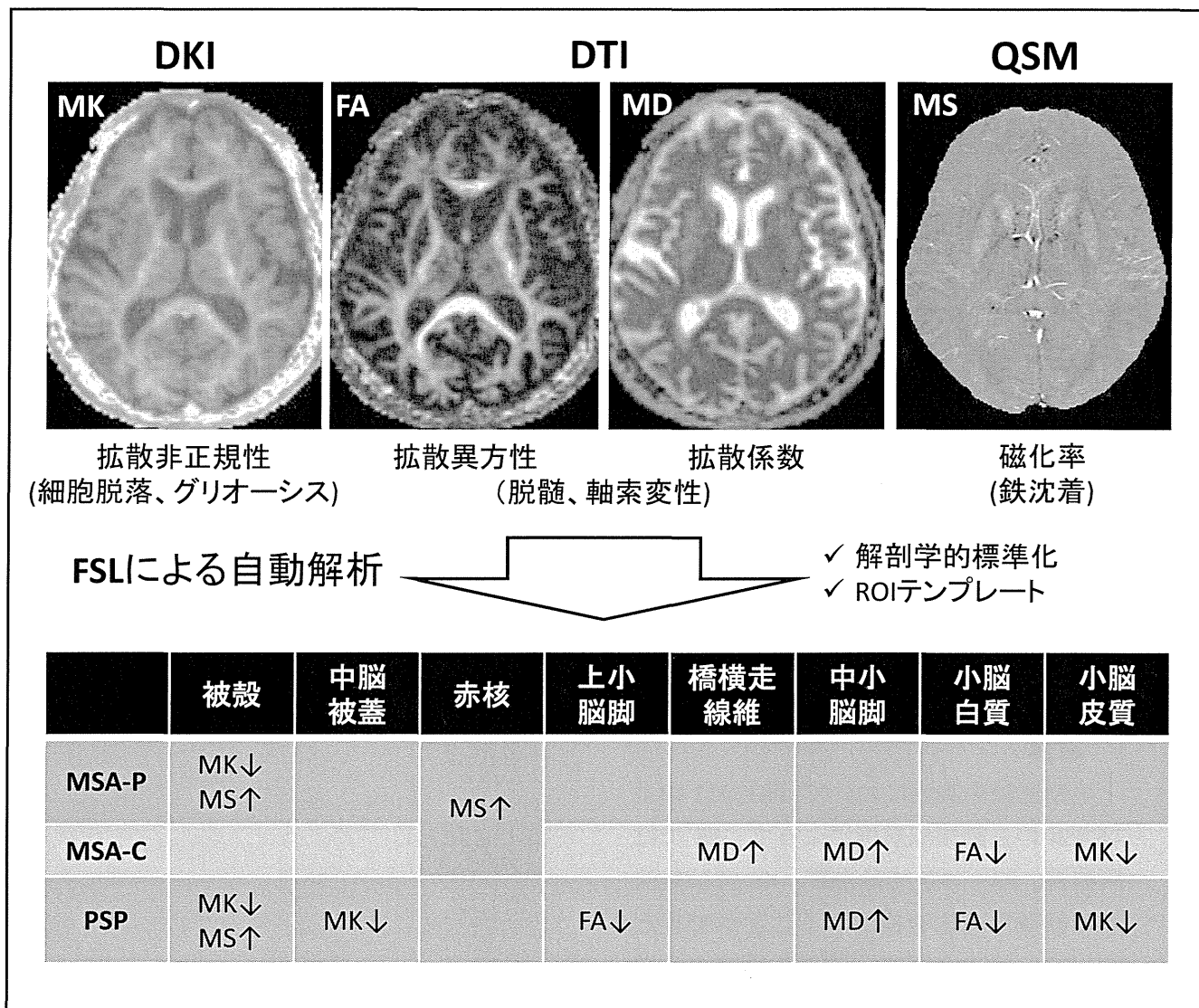
特に無し

### 3. その他

特に無し

## 運動失調症の早期鑑別診断のためのMRI解析法の開発

研究分担者： 岩手医科大学医歯薬総合研究所超高磁場MRI診断・病態研究部門 佐々木真理



### 解 説

1. 新しいMRI検査法である拡散尖度画像(DKI)・定量的磁化率画像(QSM)を用いて、早期運動失調症における軽微な異常を検出して鑑別診断を行う自動解析法を開発しました。
2. 多系統萎縮症(PSP)、進行性核上性麻痺(MSA)において、病理学的変化を反映した神経細胞、神経線維、鉄含有量のわずかな変化をとらえることができ、パーキンソン病との識別が可能です。
3. 本手法は、運動失調症の早期鑑別診断指標として有望と考えられます。

## パーキンソン病の家族歴を有する多系統萎縮症患者における *COQ2* 変異解析

研究協力者	金井 数明（順天堂大学医学部 脳神経内科）
共同研究者	服部 信孝（順天堂大学医学部 脳神経内科）
	三笠 道太（順天堂大学医学部 脳神経内科）
	李 元哲（順天堂大学医学部 脳神経内科）
	西岡 健弥（順天堂大学医学部 脳神経内科）
	舷山 学（順天堂大学医学部 脳神経内科）
	富山 弘幸（順天堂大学医学部 脳神経内科）

### 研究要旨

近年家族性多系統萎縮症（MSA）の責任遺伝子および孤発性 MSA の病態関連遺伝子として *COQ2* が報告された。一方、MSA では一親等以内にパーキンソニズムを呈する家族が多いことが報告されている。既報では *COQ2* は MSA-C により多く見出されるとされるが、パーキンソニズムの家族歴を有する MSA 家系でも *COQ2* 変異がパーキンソニズムの家族内集積に役割を果たしている可能性が考えられ、今回解析を行った。パーキンソン病（PD）患者と MSA の患者が共存する家系、MSA と筋萎縮性側索硬化症が共存する家系、および孤発性 MSA 患者、家族性 PD およびパーキンソニズム患者、孤発性 PD を対象とした。PD と MSA が合併する 1 家系とおよび孤発性 MSA の患者 1 名で *COQ2* p.V393 A ヘテロ変異が認められた。家族性 PD およびパーキンソニズム患者、および孤発性 PD ではアリル頻度は既報と同様コントロールと変わりなかった。*COQ2* 変異が認められた 1 家系では親が MSA-C、子が young onset PD の診断であったが、MSA-C 患者である親でのみ変異が陽性であり、子では変異は陰性であった。今回の検討では *COQ2* 変異は MSA におけるパーキンソニズムの家系内集積を説明するものではないと考えられ、また併せて行った解析を含め、パーキンソニズムと *COQ2* 変異の関係が高くない可能性が改めて示された。

### A. 研究目的

近年家族性多系統萎縮症（MSA）の責任遺伝子および孤発性 MSA の病態関連遺伝子として *COQ2* が報告された。一般的にパーキンソン病（PD）では家族内集積がしばしば認められることが報告されている。

一方、MSA では第 1 度近親以内にパーキンソニズムを呈する家族がコントロールよりも有意に多いことが報告されている。2010 年、Vidal らは MSA の親族におけるパーキンソニズムの出現頻度は 3.7% と正常対照（1.2%）より高く、累積発症率



が優位に高いことを報告している。Mitsui らの報告では *COQ2* は MSA-P と比べ MSA-C により多く見出されると報告されているが、パーキンソニズムの家族歴を有する MSA 家系でも *COQ2* 変異がパーキンソニズムの家族内集積に役割を果たしている可能性が考えられ、今回解析を行った。

## B. 研究方法

パーキンソン病 (PD) の患者と MSA の患者が第 3 度近親以内に共存する家系 8 家系、MSA と筋萎縮性側索硬化症が共存する 1 家系、および孤発性 MSA 患者 13 名、家族性 PD およびパーキンソニズム 184 名、孤発性 PD 13 名を対象とした。*COQ2* 遺伝子の全エクソンをサンガー法にて direct sequencing を行った。

### (倫理面への配慮)

当施設の生命倫理委員会においてすでに承認を受けて研究により行った。

## C. 研究結果

PD と MSA が合併する 1 家系とおよび孤発性 MSA の患者 1 名で *COQ2* p. V393 A ヘテロ接合性に認められた。MSA と筋萎縮性側索硬化症が共存する家系や孤発性 PD では変異は認められなかった。アリル頻度は PD/MSA 合併家系で 6.25%、孤発性 MSA で 4.17%であった。

*COQ2* variant が認められた MSA/PD 合併の 1 家系では親が MSA-C、子が young onset PD の診断であったが、MSA-C 患者である親でのみ変異が陽性であり、子では変異は陰性であった。このため、当家系において *COQ2* p. V393 A は PD 発症に寄与しな

いものと考えられた。

*COQ2* p. V393 A がパーキンソニズム発症の susceptibility factor であるかどうかを検証するために、家族性 PD 患者 184 名 (AD-PD 92 名、AR-PD 92 名) で追加的に検討を行った。その結果、*COQ2* p. V393 A のアリル頻度は AD-PD で 2.70% (5/184)、AR-PD で 1.60% (3/184)、全体で 2.10% (8/368) であった。これは MSA 群での頻度より低く、Mitsui らの既報の値 (2.5%) とほぼ同様であった。またこの値は Mitsui らの既報における正常対照群の頻度 (1.6-2.2%) とほぼ差がなかった。

## D. 考察

Mitsui らの報告で、*COQ2* p. V393 A が MSA の susceptibility factor であることが示されていた。そこでは *COQ2* p. V393 A carrier 群では non-carrier 群に比べ MSA-C の頻度が高いことが報告されていた。その Mitsui らの報告においても、MSA 患者と PD 患者が同一家系内に共存する家系も解析に含められていたが、*COQ2* の variant はその家系内においては見出されていなかった。

今回 MSA と PD が共存する家系で V393A が認められたが、その変異は MSA 患者でのみ認められ、PD 患者では認められなかった。このことは、*COQ2* の変異は MSA 家系におけるパーキンソニズムの家系内集積に寄与していない可能性が示唆が示唆されるものと考えた。

これをさらに検証するため AD-PD / AR-PD で追加解析を行ったが、V393A のアリル頻度は既報と同様正常対照と変化が

ないことが示された。このことは COQ2 p.V393 A がパーキンソニズム発症の susceptibility factor ではないことが示唆されるものと考えられた。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）  
なし

## E. 結論

COQ2 V393A を認める PD と MSA の共存家系において、variant は MSA 患者においてのみ認められた。このことは COQ2 変異は MSA におけるパーキンソニズムの家系内集積に寄与していない可能性を示唆するものと考えられた。また併せて検討した家族性パーキンソン病／パーキンソニズム家系でも COQ2 の変異頻度は対照群と差がなく、パーキンソニズムと COQ2 変異の関係が高くない可能性が改めて示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

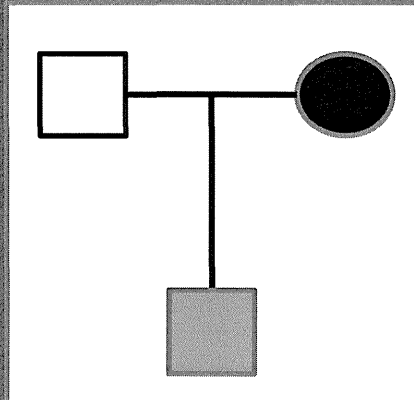
- 1) Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy: Multiple-System Atrophy Research Collaboration (Kanai K; 33th). N Engl J Med 2013; 369(3):233-44

### 2. 学会発表

- 1) 城 崇之, 金井 数明, 西岡 健弥, 高梨 雅史, 波田野 琢, 服部 信孝:MSA-P の臨床像と自然史. 第54回日本神経学会学術大会, 2013年6月1日, 東京

# 多系統萎縮症における パーキンソニズムに対する COQ2変異の寄与

	MSA+PD	MSA+ALS	sMSA	fPD	sPD
wt/wt	7	1	12	16	13
V393A/wt	1	0	1	0	0
Allele freq.	6.25%	0%	4.17%	0%	0%



母 58歳: MSA-C

54歳発症

V393A/wt

息子 29歳:

young onset PD

28歳発症

wt/wt

	AD-PD	AR-PD	Total
wt/wt	87	89	176
V393A/wt	5	3	8
Allele freq.	2.70%	1.60%	2.10%

- COQ2 V393Aのアリル頻度はMSA群より低く既報のPD群の値(2.5%)とほぼ同様
- 既報の正常対照群の頻度(1.6-2.2%)と差なし
- 家族性PDのsusceptibility factorではないことが示唆された

### 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、松川 敬志、石浦 浩之、市川 弥生子、Budrul Ahsan  
（東京大学医学部附属病院神経内科）  
吉村 淳、土井 晃一郎（東京大学大学院新領域創成科学）  
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）  
Japan Multiple System Atrophy Research Consortium (JAMSAC)

#### 研究要旨

多系統萎縮症（MSA）は原則として孤発性であるが、ごく稀に家系例が存在することが報告されるようになった。①家系に対する連鎖解析による病因遺伝子同定と②患者・対照者群に対する関連解析による疾患感受性遺伝子同定の 2 つのアプローチにより疾患関連遺伝子探索を行ってきた。①家系に対する連鎖解析から、COQ2 遺伝子のホモ接合性変異（M78V-V343A/M78V-V343A）および複合ヘテロ接合性変異（R337X/V343A）を 2 家系の発症者で同定した。さらに、COQ2 遺伝子の関連解析から、COQ2 遺伝子変異のキャリアーが、孤発性 MSA 患者の危険因子であることを明らかにした。②患者・対照者群に対する関連解析は、従来の SNP タイピングに加え、エクソーム解析による関連解析を行った。

#### A. 研究目的

家系に対する連鎖解析による病因遺伝子同定と患者・対照者群に対する関連解析による疾患感受性遺伝子同定の 2 つのアプローチにより、MSA の遺伝因子を明らかにしたい。

#### B. 研究方法

①. 家族性 MSA, 6 家系のうち血族婚のある 1 家系について連鎖解析を行い、発症者 1 例の全ゲノム解析を行った。日本（患者 363 例, 対照者 520 例）、欧州（患

者 223 例, 対照者 315 例）、北米（患者 172 例, 対照者 294 例）からのサンプル群に対して COQ2 遺伝子の全エクソン配列解析を行った。同定された変異に対して機能解析を行い、機能障害性変異の関連を検定した。

②. 日本（患者 602 例, 対照者 374 例）からのサンプル群に対してエクソーム解析を行い、変異毎に関連を検定した。

#### （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

①. 6家系のうち、1家系は発症者の両親がいとこ婚であり (FMSA\_1), 連鎖解析により候補領域が 80 Mb の範囲にまで絞り込まれており, 原因変異はホモ接合性であることが予想された. このことから, 原因変異を同定できる可能性が高いと考え, 発症者 1 例に対して全ゲノム解析を行った. 全ゲノム中に参照配列と異なる変異は 3,492,429 個得られ, うち連鎖解析による候補領域中には 54,306 個得られた. この中から, 遺伝子の翻訳領域にあり, アミノ酸置換を伴う変異は 78 個に絞られた. 家族性 MSA の頻度が極めて稀であることから, 原因変異は既存のデータベースに存在しない新規の変異だと考え, 変異データベースである dbSNP130 に登録がない変異を探したところ 4 個の変異に絞り込まれた. さらに日本人の健常者 180 人のサンプルを用いて変異の頻度を確認したところ, COQ2 遺伝子の M78V ホモ接合性変異のみがデータベースにも日本人健常者 180 人にも見られないことが分かった (COQ2 遺伝子には M78V 変異の他, 比較的頻度の低い V343A 変異も同定された). 以上より, COQ2 遺伝子の M78V-V343A 変異が発症に関わっている可能性が最も高いと考えられた. 残りの 5 家系についても, COQ2 遺伝子をシーケンスしたところ, もう 1 家系で発症者 2 例に R337X/V343A の複合ヘテロ接合性変異が独立して確認され, 家系内の共分離も確認された. COQ2

遺伝子は, 体内でコエンザイム Q10 を合成する酵素の一つであり, 実際に M78V-V343A ホモ接合性変異患者の凍結脳組織や R337X/V343A 複合ヘテロ接合性変異患者のリンパ芽球様細胞では, コエンザイム Q10 の組織内濃度が低下していることが確認された.

次に, 家族性 MSA の原因遺伝子である COQ2 遺伝子が, 孤発性の MSA とも関連するかどうかを検討するため, 患者・対照群に対して COQ2 遺伝子をシーケンスして変異の関連解析を行うこととした. 日本国内のコンソーシアム, 北海道大学神経内科, 鹿児島大学神経内科などから提供を受けた MSA 患者群 363 例と対照群 520 例, ヨーロッパのコンソーシアムから提供を受けた MSA 患者群 223 例と対照群 315 例, 北米のコンソーシアムから提供を受けた MSA 患者群 172 例と対照群 294 例を解析対象とした. COQ2 遺伝子の全エクソンをシーケンスしたところ, 患者群・対照群で合わせて 13 種類の変異 (P22L, F29L, P49H, S57T, R69H, I97T, P107S, S113F, T267A, S297C, N336H, R337Q, V343A) が検出された. ほとんどの変異は, 1 例にしか見られない稀な変異であったが, V343A の頻度は比較的高く日本人サンプルにのみ観察された. V343A のアレル頻度で見ると, 患者群で 4.8%, 対照群で 1.6%であり, オッズ比 3.05, p 値  $1.5 \times 10^{-4}$  と有意な関連があることが分かった. また, V343A 変異をヘテロ接合性に持っている MSA 患者と COQ2 変異を持たない健常者のリンパ芽球様細胞からミトコンドリア分画を抽出して酵素活性を比べてみると, V343A 変異キャリアー MSA 患者例の酵素活

性は、変異を持たない健常例と酵素活性と比べて活性が低下していることが確認された。このことから V343A は実際に機能障害性に働く変異であることが分かった。

その他の稀な 12 種類の変異 (P22L, F29L, P49H, S57T, R69H, I97T, P107S, S113F, T267A, S297C, N336H, R337Q) については意義付けが不明であったため、変異体の機能を解析するために酵母を用いた機能補完アッセイを行った。coq2 遺伝子を欠失させた酵母は電子伝達系を利用したエネルギー産生ができなくなるため、グリセロールなど非発酵性炭素源を培地にして培養すると増殖できない。この coq2 欠失酵母に対して、ヒト COQ2 遺伝子の cDNA を用いて形質転換すると、非発酵性炭素源における増殖能力が回復する。このような機能補完現象を利用して、各々の変異体 cDNA を導入した時に機能補完が起きるかどうかを検討した。その結果、9 種類の変異 (P49H, S57T, R69H, I97T, P107S, S113F, T267A, S297C, R337Q) の cDNA を導入した coq2 欠損酵母では、十分な増殖能の回復が見られず、これらの変異は機能が障害されていると考えられた。9 種類の機能障害性変異のうち、8 変異が 8 例の患者に見られ、1 変異が 1 例の対照に見られた。日本、ヨーロッパ、北米の全サンプルを混ぜて検討すると、758 例の MSA 患者中 8 例、1129 例の対照者中 1 例に機能障害性変異がヘテロ接合性に認められたこととなり、オッズ比 11.97, p 値 0.004 と有意な関連があることが分かった。

②. 日本 (患者 602 例, 対照者 374 例)

からのサンプル群に対するエクソーム解析の結果、189,659 個の変異が同定された。いくつかの仮定に基づく条件 (MAF 5% 以下の変異, 患者群に頻度が高い, in silico 機能予測で機能障害性など) を設定し、10,664 個の変異に絞り、変異毎に関連を検定したところ、最大で p 値  $10^{-9}$  オーダーの変異をはじめとする候補変異を得た。

#### D. 考察

①. COQ2 のホモ接合性または複合ヘテロ接合性変異は家族性 MSA の病原性となり、ヘテロ接合性変異は孤発性 MSA の危険因子となることが分かった。

②. エクソーム解析を用いて頻度の低い変異を網羅したゲノムワイドの関連解析を行い、疾患感受性変異の候補をいくつか同定した。ゲノムワイドアプローチによる仮定に基づかない疾患関連遺伝子検索は、遺伝因子の全容解明に必須だが、さらに大規模のサンプルサイズを必要とする。サンプルサイズのいっそうの大規模化を目指すと共に、疾患パスウェイなど、候補や仮定に基づくアプローチを併用することで検討を続ける必要がある。

#### E. 結論

家系に対する連鎖解析による病因遺伝子同定と患者・対照者群に対する関連解析による疾患感受性遺伝子同定の 2 つのアプローチにより、MSA の遺伝因子の一部を明らかにした。同定された遺伝因子を手掛かりにして新たな治療方法の開発につなげていきたい。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項なし.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Iwata A, Goto J, Yamamoto Y, Komata M, Shirahige K, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Takashima H, Kuwano R, Watanabe H, Ito M, Gen SobueSobue G, Soma H, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Hananosato MV, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Shults CW, Tanner CM, Kukull WA, Lee VM, Parkinson U, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Trojanowski JQ, Parkinson U, Ozelius L, Foroud T, Tsuji S: Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med* 2013; 369: 233-44
- 2) Ichikawa Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Kobayashi S, Takuma H, Kanazawa I, Doi K, Yoshimura J,

Morishita S, Goto J, Tsuji S: Exome analysis reveals a Japanese family with spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 1. *J Neurol Sci* 2013; 331: 158-60

### 2. 学会発表

- 1) Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Goto J, Yamamoto Y, Shirahige K, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Kondo T, Murayama S, Japan Multiple System Atrophy Consortium, Japanese Genetic Study Consortium for Alzheimer Disease, Japanese Parkinson Disease Susceptibility Gene Consortium, Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S for NAMSASG, and Tsuj S: Mutations of COQ2 in Familial and Sporadic Multiple System Atrophy. American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting, October 24th 2013, Boston.
- 2) 三井 純, 松川 敬志, 石浦 浩之, 福田 陽子, 市川 弥生子, 伊達 英俊, Budrul Ahsan, 中原 康雄, 百瀬 義雄, 高橋 祐二, 岩田 淳, 後藤 順, The MSA Research Collaboration, 辻省次: COQ2 変異は家族性・孤発性多系統萎縮症と関連する. 第 58 回日本人類遺伝学会, 2013 年 11 月 22 日, 仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

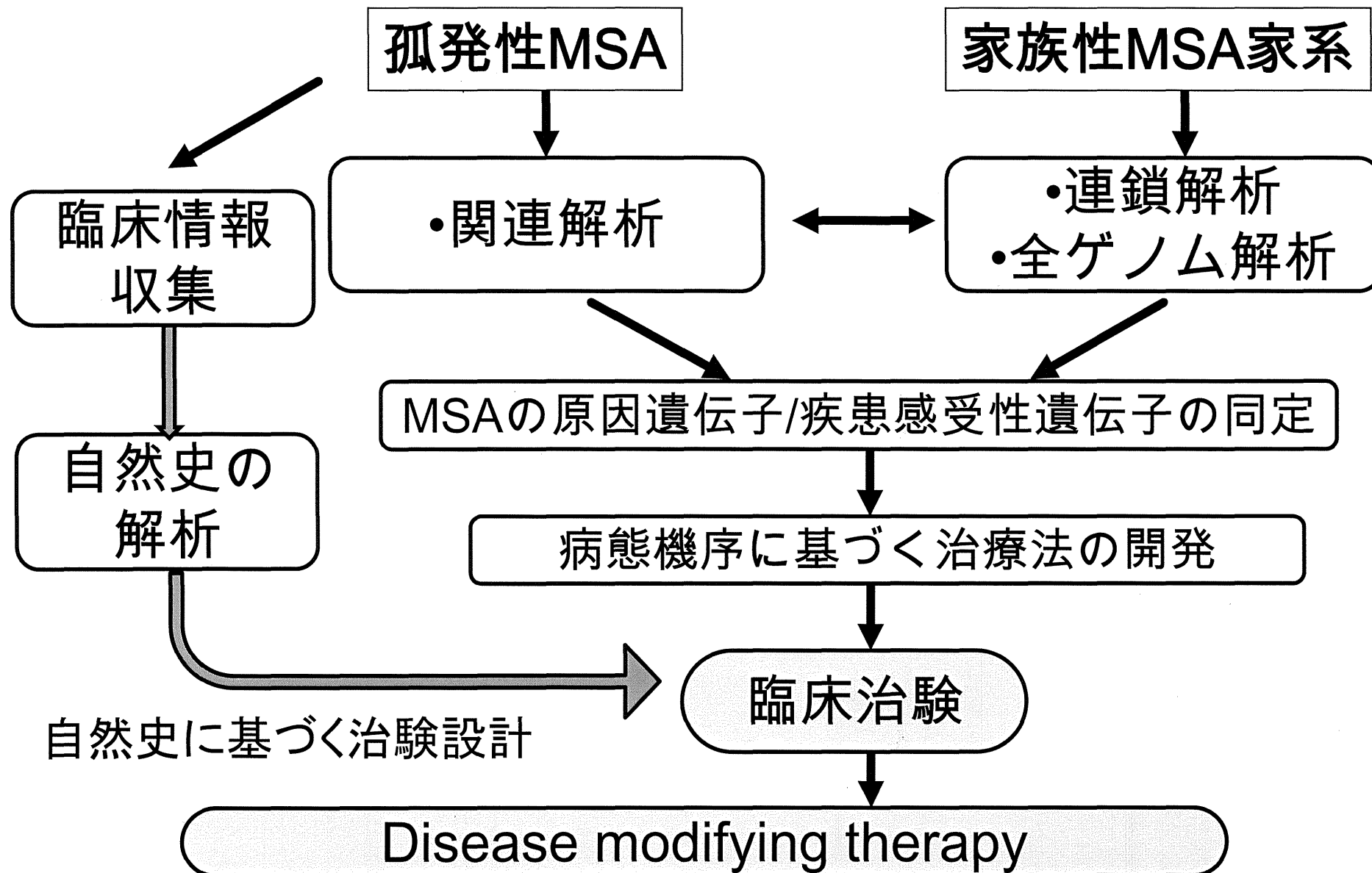
多系統萎縮症リスクの検査方法，検査キット，及び多系統萎縮症の治療又は予防薬（特願 2013-20763）

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



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）  
運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究班 分担研究報告

### ゲノムコピー数多型による多系統萎縮症発症素因の解析

研究分担者 佐々木秀直（北海道大学神経内科）  
共同研究者 浜 結香、松島理明、矢部一郎（北海道大学神経内科）  
灌川一学（同 創成研究機構研究部）  
内海 潤（公益財団法人 がん研究会）

#### 研究要旨

多系統萎縮症(MSA)の素因遺伝子として報告した19p13領域についてqPCRでの定量解析は、同領域の400KCNVアレイデータと一致しなかった。現在、その原因を検討中である。解析手順の見直しの過程で、試料として精製したdsDNAを用いることによりアレイデータのノイズを減らしてCNV解像度を上げることができた。そこで新たに、MSA-C20名と神経疾患に罹患していない正常対照群20名を対象に、400K CNVアレイ解析を行ない、両群を比較検討した。CNV領域の同定にはCytogenomics®(Agilent)に加えて、研究グループで独自に開発したソフトでも解析し、両者を比較検討した。群間比較で $p < 0.06$ で差を示したCNV領域はCytogenomics®で31領域、独自開発のソフトでは13領域が候補として残った。

#### A. 研究目的

多系統萎縮症(MSA)は成年期に発症する非遺伝性の神経変性疾患であり、我が国の脊髄小脳変性症(SCD)の中では最も患者数の多い疾患である。その発症素因の一つとして、*COQ2*変異の関与が報告されている。推定されているのみであり、本研究では、遺伝子のゲノムコピー数多型を解析することにより発症素因の解明を目的とした。

#### B. 研究方法

神経疾患に罹患していない成人対照群22例、MSA患者20例、片方のみMSAを発病している一卵性双子の発症者3例を対

象とし、白血球より抽出したゲノムDNAを用いてTaqMan probe(Life Technologies)でリアルタイムPCRを行い、候補遺伝子のコピー数解析を行なった。さらに、対照群20例とMSA-C患者21例を対象として、SurePrint G3 Human CNV 400Kアレイ(Agilent)により全ゲノム網羅的解析を行なった。ゲノムDNA試料は13%ポリエチレングリコール6,000を用いてdsDNAの純度を90%程度に精製したものを使用した。データ解析にはAgilent CytoGenomics®(ver. 2.7.8.0)及び北大独自に開発したアルゴリズムを用いた。MSAに関係するCNV候補領域は、連続する3つのプローブが群間比較で $p < 0.06$ のレ

ベルで差のあるものを選択した。

また、日本神経学会会員を対象に片方のみ MSA を発症した一卵性双生児の経験について全国調査を行なった。

### (倫理面への配慮)

本研究は医の倫理委員会の承認を得て行なった。被験者には口頭に加えて文書で説明し、文書で同意を得た。

## C. 研究結果

今回のアレイデータは全て高純度 dsDNA を精製して、再構築したものである。それを基に以前に我々が deCODE CNV アレイ解析でコピー数減少が MSA に多いと報告した 19p13 の SHC2 領域 (Mol Med 2013;6:31)につて検討した。再構築した 400K アレイデータでは、MSA 群と対照群を比較して、この領域に CNV 変化を検出できなかった。同領域を qPCR で定量解析した結果では、両群共に短腕末端側よりコピー数減少を示す領域が認められた。その頻度は MSA 群に多い傾向は有るが、400K aCGH の解析結果と qPCR の結果が一致しなかったことが課題として残った。

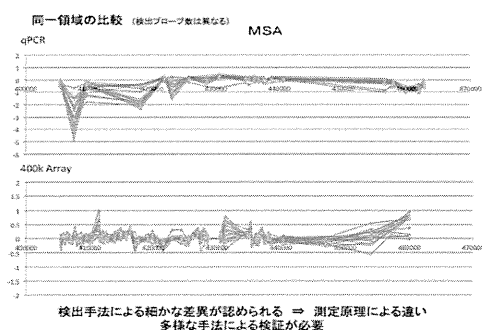


図 1. 19p13 領域の SHC2 近傍のコピー数解析

患者群 (MSA-C, n=21) と成人対照群

(n=20)について 400K aCGH データを 2 つの方法で解析し比較した。Agilent CytoGenomics では常染色体から 31 領域、北大独自のアルゴリズム解析からは 13 領域が選択された。両者は必ずしも一致はしなかった(図 2)。

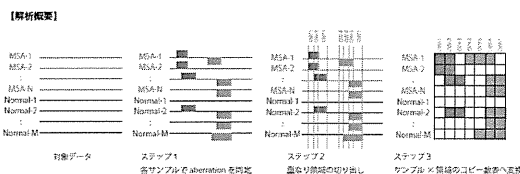


図 2. 北大の CNV 解析アルゴリズムの原理

これまでの研究で、アレイ基盤により結果の異なることを見いだした。これは既に文献的にも指摘されている。解析技術の基盤を見直し、新たなアレイ解析で候補領域の探索を行ない複数の領域を検出することができた。今後は更に、対象を増やして詳細な解析を行なうと共に、複数の異なった解析手技を併用して候補領域の検証を行い、病型など臨床指標との相関解析も行なう予定である。

一卵性双生児の全国調査は昨年度の今年度の二回行った。累計で 4 組の報告が有り、うち 3 組を確認した。

## D. 考察

MSA 素因遺伝子解析の一つの方法として CNV に取り組む契機は、片方のみ MSA を発症した一卵性双生児例の経験である。全国調査で既に 3 組が確認された。このような例は、メンデル遺伝学の理論では非発症者はいずれ発症に至るとされるが、事実は発症していない。それを説明する機序としては MSA 発症の原因には、環境因子、多因子遺伝、エピジェネティクス機

構、そして CNV などの関与が想定される。何らかのゲノム因子が関与するにしても、MSA は通常は非遺伝性疾患であるので、親子の伝達過程で遺伝しないこと説明できる論理的モデルが必要である。これを十分に説明できる仮説はまだ知られていない。

ゲノム構造多型とは一Kb 以上の規模を有するゲノム領域の重複、配列順、挿入、欠失などの個体差を現すゲノム多型の包括的な概念である。その多型の在り方によっては遺伝子発現に様々な影響の有ることが知られつつある。規模の大きさのため次世代シーケンサを含めて通常の塩基配列解析では十分な解析のできていない領域である。ゲノム構造多型 (CNV) は SNP に比べて変異率が高いこと、動原体近傍と染色体末端側近傍に頻度の高いこと、等の特徴が有る。最近の知見では、CNV は個体発生、特に胚発生の早期に起きやすく、三胚葉に分化した後は安定とされている。同様の傾向は iPS 作成の過程でも指摘されている。CNV の安定化、不安定化の機序についてはよくわかっていない。我々は CNV の解析に aCGH を用いている。この解析の再現性と解析精度を向上させるには、試料としてのゲノム DNA に mRNA などの混在をできるだけ少なくして、dsDNA の純度を高めた試料を用いることにより、解析でターの質と再現性を高める事ができた。残された課題として、CNV の解析は使用するアレイ基盤や情報解析ツールによりその検出領域は必ずしも一致しないことが指摘されているので、原理の異なる解析手法を複数組み合わせ確認する必要がある。

## E. 結論

CNV は MSA 素因遺伝子の同定に有力な研究手段である。候補領域は手数例で検証する必要が有る。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 佐々木秀直：多系統萎縮症の自律神経障害について．自律神経 2013;50(4)：255-257
- 2) 佐々木秀直：脊髄小脳変性症 最近の進歩．日本内科学会雑誌 2013;102(9)：2375-2381
- 3) 矢部一郎，佐々木秀直：脊髄小脳変性症の治療の進歩．神経治療学 2013;30(4)：411-415
- 4) The Multiple-System Atrophy Research Collaboration：Mutations in COQ2 in Familial and Sporadic Multiple-System Atrophy. N Eng J Med 2013;369:233-244
- 5) Sasaki H, Matsushima M, Hama Y, Sakushima K, Nakamura M, Yabe I, Oba K, Tanji K, Mori F, Wakabayashi K, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J: Plasma matrix metalloproteinase-3 correlates with the clinical severity in men with multiple system atrophy. Neurol Clin Neurosci 2013; 1(2)：69-77