

初発症状が欧米ではパーキンソニズムであるが日本人では運動失調であることによる。実際、MSA剖検例の検討、北海道でMSAとしての特定疾患受給者を対象とした疫学調査結果は、現在のMSA診断基準に課題のあることを示している。このような背景から、研究班ではMSAの早期診断をめざして、診断基準の再検討に取り組んでいるところである。

ところで我が国の自然歴研究では、企画とデータ管理を単独の研究者もしくは施設に依存しているために、欧米のような大規模な調査研究ができていない。今後は生物統計の専門家とweb登録システムの構築等、調査研究の基盤整備が必要である。MSAについては診断基準の問題と、焦点を発病早期と全経過把握に置くかにより自然歴調査のためのデータフォーマットの設計が異なる。そこで実態の把握を優先して、診断基準作成へ向けて作業を進めてきた。自然歴研究にはMSAも含めて国際的に通用する症例数を確保するためには、今後の特定疾患web登録システムを活用した調査体制の再構築が必要である

## 2) 生体試料収集

MSAについてはJAMSAC、痙性対麻痺についてはJASPACにより、前研究班より試料の集積を継続している。本年度に報告されたMSA素因遺伝子の解析、痙性対麻痺の分子疫学の成果はその基盤による成果である。

## 3) 病因究明

①皮質性小脳萎縮症(CCA)：孤発性SCDの35%を占める。CCAと臨床診断された一群については、実態が不明であった。異な

った施設からの報告を総合すると、この一群には、遺伝性小脳失調症、自己免疫性小脳炎、多系統萎縮症(MSA-C)などが含まれていた。これらを除外して残った変性疾患としての孤発性CCAの頻度は従来の統計より低かった。治療可能な疾患が含まれているので、CCAの診断基準を作成する必要がある。②多系統萎縮症(MSA)：素因遺伝子として*COQ2*変異を同定した。素因遺伝子を同定したこと、それに由来する機能障害が治療得可能であるので、画期的な成果である。この変異は日本人MSAの9%に認められるので、他の素因遺伝子の同定を推進中である。③遺伝性運動失調症の及び痙性対麻痺：SCA31がゲノムより転写された(UGGA)<sub>n</sub>にあることが明らかにされた。さらにSCA36(Asidan)の遺伝子異常を解明し、臨床像と病理所見を明らかにした。この二疾患は共に転写されたRNAが核内因子と結合して凝集体を形成する。これ以外に稀な疾患複数について、新規の当該遺伝子と変異が同定された。家族性痙性対麻痺については、新たな当該遺伝子と病原性変異が同定された。次世代シーケンサによる多数例の効率的解析による成果である。既知の変異を認めない例も多い。痙性対麻痺をきたす疾患は多彩であり、今後の解析継続が必要である。

## 3) 重症度・治療評価系：

研究班では既存の評価スケールの感度の検討に加えて、定量可能な客観的指標として画像マーカー、生理学的検査、分子マーカーの開発に取り組んできた。①評価スケール：MSAを対象に症候学とADL障害に基づいた評価スケールについて、

感度の検討を行なっている。既存の6ヶ月間で進行度を評価できるものが望ましい。

②画像マーカー：画像マーカーには、鑑別診断に加えて、進行度を反映する病態評価という質的に異なった2つの可能性がある。既に萎縮の定量、<sup>1</sup>H-MRSと<sup>31</sup>P-MRSは進行度を反映することを示した。今後、治療介入の実用化を考慮すると、早期鑑別診断が求められるが、既存の画像診断技術は十分確立していない。そこで研究班ではMSAの早期鑑別診断ならびに類縁疾患との鑑別を目的として新たなMRI撮像技術の開発、疾患病理を反映した部位（上小脳脚交叉）の描出に取り組んでいる。特にMSAの早期診断には汎用機MRIを用いた画像解析が必要である。 $\alpha$ シヌクレイン蓄積を評価できるBF-227 PETの開発に期待したい。③生理検査マーカー：小脳は環境へ順応する機能を有するが、臨床の現場ではあまり注目されていない。小脳性運動失調の臨床評価尺度として従来の評価法は、評価者が被験者の運動遂行能力を観察して半定量的に評価する方法である。臨床試験を想定した場合、鋭敏性に乏しく、評価者間変動が大きい欠点がある。その意味では、研究班が開発に取り組んできたリズム評価試験、上肢機能、リズム順応に関する試験はいずれもが鋭敏で連続変数として定量可能であり、タスクも簡便であることから開発の趣旨に沿ったものである。心理物理検査に関しては現在の症候学では検出されていない小脳機能障害を検出できる可能性がある。④分子マーカー：分子病態機序を反映する指標として髄液や血漿などから定量可能な分子マーカーは必要であり、

臨床的価値も高い。同定された候補分子については、今後の検証を要する。

#### 4) 病態機序・疾患モデル・創薬候補

分子病態解析では、MSAとポリグルタミン病など蛋白が蓄積する疾患ではオートファジー系の障害が根底に有ること、SCA1ではDNAの修復障害のあること、その制御が治療法開発に繋がる可能性の有ることを明らかにした。RNAの核内凝集を認めるSCA31、SCA36では親和性を有する核内転写調節因子が同定されている。それを起点として病態解析が進行している。SCA1ではモデル系が開発されて病態解析研究が進展している。SCA1モデルマウスでの幹細胞髄注療法の効果、ポリグルタミン病線虫モデルによる治療候補化合物のスクリーニングは特筆すべき成果である。幹細胞髄注の効果は、何らかの液性因子が有効成分であることを示唆している。MSAにおいてはcoenzyme Q10による治療法の可能性を見出した。

#### 5) リハビリテーション

間歇的集中リハ、在宅療養患者の訓練プログラムが共に有効である事が示された。前者は独歩可能な病期であり、後者は在宅療養中の患者でより進行期の患者を対象としている。今後は、病院と家庭療養ともに、連携したプログラムと、この機能低下阻止を目指したモニタリング体制の整備を念頭に入れた検討が求められる。

三年間にわたる研究で、MSAの素因遺伝子、遺伝性脊髄小脳変性症の新規起因変異の解明、小脳障害の定量的評価、分子病態機構の解明、疾患モデルの開発と創薬標的分子の探索、ポリグルタミン病の

治療薬候補スクリーニング系の開発等、いずれも先駆的な成果を上げる事ができた。MSAの遺伝素因は複数あると予想されるので、今後の研究継続が必要である。皮質性小脳萎縮症とされている一群には免疫介在性失調症が含まれている。この一群は鑑別診断して治療の可能性を検討する価値がある。SCDやMSAなど慢性進行性疾患には、早期診断と各種重症度評価系の開発を特に重視した。治療介入は早期が望ましく、その可能性も視野に入りつつある。もう一つの柱は慢性療養期のリハビリテーションである。後者については機能低下阻止を目指して医療施設と連携した在宅療養の体制を構築することは意義ある取り組みである。

#### E. 結論

MSAと脊髄小脳変性症について、素因遺伝子、病因解明、自然歴、重症度の客観的評価系の開発、画像解析、分子病態機構の解析、疾患モデルの開発と創薬候補化合物のスクリーニング系の開発、リハビリテーションの各分野において、国際的に通用する成果をあげた。また皮質性小脳萎縮症と診断されている一群の基礎疾患を調査して治療可能な一群の在ることを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

特記すべきもの無し

#### G. 研究成果発表

各分担研究者の報告書参照  
論文は巻末にまとめて記載

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 各分担研究者の報告書参照

## Ⅱ. 研究報告（研究分担者）

### 多系統萎縮症の発症素因、バイオマーカー、及び北海道における疫学調査

研究分担者 佐々木秀直（北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野）  
共同研究者 松島 理明、佐久嶋 研、浜 結香、高橋育子、佐藤和則、  
廣谷 真、加納崇裕、矢部一郎  
（北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野）  
西本尚樹、大庭幸治、佐藤典宏  
（北海道大学病院高度先進医療支援センター）  
瀧川一学（北海道大学 創成研究機構研究部）  
野島正寛、森 満（札幌医科大学公衆衛生）  
内海 潤（公益財団法人 がん研究会）  
Khin Khin Tha, 濱口裕行、寺江 聡  
（北海道大学大学院医学研究科神経放射線医学分野）  
森 文秋、若林孝一（弘前大学医学研究科脳神経病理学講座）  
加藤丈夫（山形大学第三内科）

#### 研究要旨

三年間の研究で以下を明らかにした；1) 単一行政地域である北海道において MSA として特定疾患個人調査票を申請した患者 1,092 名について、主治医への質問表による調査を行った。回収率は 81%であった。その回答をもとに MSA の疫学的実態を明らかにした；2) MSA 患者を対象に 6 ヶ月毎に UMSARS、SARA、BBS、MSA-QoL、SCOPA-AUT を評価した結果、UMSARS part2 & part4、SARA、BBS は早期の重症度評価に有用な指標であることを明らかにした；3) 孤発性 MSA と片方のみ MSA を発病した一卵性双生児について精製した dsDNA を用いて 400K aCGH 解析を行い対照群と比較することにより、MSA 群に有意に頻度の高い CNV 領域を複数同定した；4) 血漿、CSF、剖検脳組織 FFPE の miRNA 発現プロファイルの解析とインフォマティクス解析により疾患関連因子の絞り込みが技術的に可能であることを示した。同じく血中 MMP-3 MMP-3/TIMP-1 比が男性の MSA 重症度と負の相関を示すことを示した；5) 脳の <sup>31</sup>P-MRS や <sup>1</sup>H-MRS による指標は MJD の重症度と相関することから、画像マーカーとして有望であることを明らかにした。

#### A. 研究目的

脊髄小脳変性症の早期診断、重症度スケール及びバイオマーカー、発症素因に

ついて検討する。具体的には以下について検討した；1) 北海道における前向きのコホート HoRC-MSA 構築のために、多系統

萎縮症 (MSA) の疫学的実態調査を行なう; 2) MSA において発病早期に進行度を評価できるスケールとして適切なものを検討する; 3) MSA 発病素因としてのゲノムコピー数多型 (CNV) を検討する; 4) 髄液、血液から MSA の重症度と相関する定量可能な分子マーカーを探索する; 5) ボリグルタミン病の重症度と相関する画像マーカーを検討する。

## B. 研究方法

MSA の疫学調査: 対象は北海道において平成 18 年度から平成 23 年度の間 MSA として特定疾患個人調査票申請のあった登録患者である。平成 25 年 2 月に患者担当医へ、患者一人につき 1 枚の調査票を記入する形の郵送による質問紙調査を行った。調査票は調査時点での最終確認年月、最終確認年月時点での転帰、最終確認年月時点での主たる症状、最終確認時点での UMSARS part4、全経過中の神経内科医による診断の有無とした。

MSA 評価スケール: MSA 患者 85 名 (平均年齢  $63.8 \pm 8.22$  歳、男性 38 名、女性 47 名、MSA-C 60 名、MSA-P 25 名) について、6 ヶ月毎に各種重症度スケール (UMSARS、SARA、BBS、MSA-QoL、SCOPA-AUT) を評価した。各スケール点数の変化を Standardized Response Mean (SRM) で現し、各種相関を検討した。

MSA 素因遺伝子: 対象は成人対照群、MSA 患者、片方のみ MSA を発病している一卵性双生児である。400K CNV アレイ (Agilent) により全ゲノム網羅的解析を行なった。白血球より抽出したゲノム 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% に精製した。候補領域のコピー数解析は TaqMan probe とリアルタイム PCR により行なった。

分子マーカー: MSA と ALS の患者より同時採取した血漿と CSF、及び剖検脳組織ホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE) から RNA を抽出し、3D-Gene チップ (東レ) を用いて miRNA 発現プロファイル解析を行い、対照群と比較検討した。髄液の LC/MS/MS 解析により検出された候補の中から、MMP-3 及びその抑制蛋白である TIMP-1 について、ELISA 法により末梢血で定量し、臨床指標との相関を検討した。画像マーカー: MJD 患者について、3T-MRI を用いて中枢神経系の各領域について  $^{31}\text{P}$ -MRS により PCr/Pi と V/Vmax を、 $^1\text{H}$ -MRS により NAA/Cr を検討し対照群と比較した。

### (倫理面への配慮)

本研究は北海道大学医学部医の倫理委員会及び北海道大学附属病院自主臨床研究事務局の審査・承認を得て行なった。

## C. 研究結果

MSA の疫学調査: 調査対象は 1092 例、885 例について返送が得られた (回収率 81%)。無効回答及び臨床的に MSA ではないと判断された例を除いた 839 例を解析対象とした。男女比は男性 413 例、女性 426 例でほぼ等しかった。平均発症年齢は  $62.1 \pm 10.4$  (SD) 歳であった。診断は神経内科によるものが 746 例 (89%) であった。調査時点での転帰は通院中が 382 例 (46%)、死亡が 264 例 (31%)、転医が 150 例 (18%)、不明が 43 例 (5%) であった。診断の確実性を考慮し 30 歳以下で発症した患者を除いた解析では、初発症状は失調症状が 516

例、パーキンソニズムが 186 例、自律神経障害が 73 例であった。年齢カテゴリー別の初発症状では、高齢になるほどパーキンソニズム発症の割合が高かった。

MSA 評価スケール: 対象患者で初回評価後に 2 回目(6 ヶ月後)、3 回目(12 ヶ月後)の評価をそれぞれ 69 名、57 名で行った。12 ヶ月後評価で SRM>0.8 を示したものは、UMSARS part2 と part 4、SARA、BBS であった。

MSA 素因遺伝子: 高純度 dsDNA を精製して再構築した 400K アレイデータを基に、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 領域について検討した。再構築した 400K データでは、同領域に MSA に有意な CNV 変化を再現できなかった。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に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 の結果は一致しなかった。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 Agilent CytoGenomics®と北大独自のアルゴリズム解析により解析したところ、MSA に有意差を示す領域が複数選択されたが、両者は必ずしも一致はしなかった。

分子マーカー: 血漿からは約 1200 種、CSF からは約 900 種、FFPE からは約 1000 種の miRNA が検出された。一定の発現量がある数百種の miRNA に絞り、標的となる遺伝子を web-tool で予測解析した。FFPE から同定された miRNA には MSA に特徴的な因子にまで絞り込まれていないが、ALS においては SOD1 や TDP-43 など病態に関与し

ている遺伝子を制御すると想定される miRNA が同定できた。血漿、CSF、FFPE の 3 試料で共通して見出された miRNA に関しては、由来試料によりその挙動は異なっていた。血中濃度は TIMP-1 濃度に性差を認めず、MMP-3 は男性が女性より 2 倍以上の高値を示した。血中 MMP-3 濃度及び MMP-3/TIMP-1 比は重症度 UMSARS と、とくに男性患者で有意に高い負の相関を示した。

画像マーカー: 患者群と対照群の比較では小脳と橋の NAA/Cr が患者群で有意な低下を認めた。小脳半球の NAA/Cr 及び橋の V/Vmax と SARA は有意な相関を認めた。

#### D. 考察

MSA の疫学調査: 特定疾患個人調査票データを活用して、北海道における MSA の疫学的実態を調査することができた。調査を単一行政単位に限定したことにより、特定疾患個人調査票の記載が神経内科医により確認されていることが担保され、地域の神経内科医より協力を得て高い回収率となった。最終転帰不明の患者が 2 割いたこと、高齢発症者の鑑別診断の質など、今後の課題である。

MSA 評価スケール: 本研究結果より UMSARS part2 & part4、SARA、BBS が症状の変化を捉えるのに適していることを示した。ADL の保たれている早期例に限定するとその変化は更に明瞭となるので、臨床研究において歩行可能レベルの患者を登録していくことが重要性である。

MSA 素因遺伝子: 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。最新の解析技術による新たなアレ

イ解析により複数の候補領域を検出できた。今後は更に、対象を増やして詳細な解析を行なうと共に、異なった解析手技を併用して検証を行なう必要が有る。

分子マーカー: 剖検組織 FFPE を用いた解析により ALS では疾患特異的因子を標的とする miRNA が含まれていたことから、本アプローチが未知の病態解析に有用である可能性を示唆している。オミックス解析の一環として、miRNA 解析は MSA の疾患関連因子の絞り込みにも有用な手法であると思われた。血中 MMP-3 濃度及び MMP-3/TIMP-1 比は MSA の重症度と相関する分子マーカー候補である。MMP-3 濃度の性差の機序については文献的にも知られていない。女性では濃度が低いことが相関の弱い～認められなかった原因と考えられる。

画像マーカー:  $^{31}\text{P}$ -MRS や  $^1\text{H}$ -MRS は MJD の重症度を反映するバイオマーカー候補である。多数例での検証が必要である。

## E. 結論

三年間の研究で以下を明らかにした；  
1) 特定疾患個人調査票を活用した疫学調査により、北海道における MSA の疫学的実態を明らかにした；  
2) UMSARS part 2 & part 4、SARA、BBS は早期の重症度評価に有用な指標である；  
3) MSA 群に有意に頻度の高い CNV 領域を複数同定した；  
4) 血漿、CSF、剖検脳組織 FFPE の miRNA 発現プロファイルの解析により疾患関連因子の絞り込みが可能であることを示した。同じく血中 MMP-3 MMP-3/TIMP-1 比が MSA 重症度の分子マーカー候補であることを示した；  
5) 脳の  $^{31}\text{P}$ -MRS や  $^1\text{H}$ -MRS による

指標は MJD の重症度と相関することを明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(和文)

- 1) 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 2012; 29:395-400
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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

(英文)

- 1) Sasaki H, Emi M, Iijima H, Ito N, Sato H, Yabe I, Kato T, Utsumi J, Matsubara K: Copy number loss of (src homology 2 domain containing)-transforming protein 2 (SHC2) gene: discordant loss in monozygotic twins and frequent loss in patients with multiple system atrophy. Mol Brain 2011; 4: 24
- 2) Mori F, Tanji K, Odagiri S, Toyoshima Y, Yoshida M, Ikeda T, Sasaki H, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K: Ubiquilin immunoreactivity in cytoplasmic and nuclear inclusions in synucleinopathies, polyglutamine diseases and intranuclear inclusion body disease.



Acta Neuropathol 2012;125:149-51

- 3) Martins S, Soong BW, Wong VC, Giunti P, Stevanin G, Ranum LP, Sasaki H, Riess O, Tsuji S, Coutinho P, Amorim A, Sequeiros J, Nicholson GA: Mutational origin of Machado-Joseph disease in the Australian Aboriginal communities of Groote Eylandt and Yirrkala. Arch Neurol 2012;69:746-51
- 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. Neurology and Clinical Neuroscience 2013; 1: 69-77

## 2. 学会発表

(国内全国学会)

- 1) 佐々木秀直, 矢部一郎, 加藤丈夫, 江見 充, 飯島 啓, 伊藤紀子, 佐藤秀則: 一卵性双生児 CNV 解析による多系統萎縮症のゲノムコピー数異常の同定. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 18 日~20 日, 名古屋
- 2) 佐々木秀直: 【教育セミナー4】多系統萎縮症の自律神経障害について. 第 65 回日本自律神経学会総会, 2012 年 10 月 26 日, 東京
- 3) 矢部一郎, 緒方昭彦, 佐々木秀直: 一卵性双生児で片方に非罹者を有する多系統萎縮症の 2 例. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 25 日, 東京
- 4) 佐々木秀直, 矢部一郎, 佐久嶋 研, 浜 結香, 内海 潤, 高橋育子, 佐藤和則, 松島理明: 多系統萎縮症における血中 matrix metalloproteinase 3 (MMP3) と tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) の意義. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 25 日, 東京
- 5) 佐々木秀直: 脊髄小脳変性症 最近の進歩. 第 110 回日本内科学会講演会, 2013 年 4 月 12 日, 東京
- 6) 松島理明, 矢部一郎, 佐久嶋 研, 大庭幸治, 水戸泰紀, 武井麻子, 保前英希, 津坂和文, 吉田一人, 丸尾泰則, 佐々木秀直: 多系統萎縮症における症状評価スケールの比較 (中間報告). 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013 年 5 月 29 日-6 月 1 日, 東京
- 7) 佐々木秀直, 松島理明, 矢部一郎, 浜 結香, 中村雅一, 佐久嶋 研, 大庭幸治, 丹治邦和, 森 文秋, 若林孝一, 柿田明美, 高橋 均, 内海 潤: 多系統萎縮症における MMP-3, MMP-9, TIMP-1 の検討 (第二報). 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013 年 5 月 29 日-6 月 1 日, 東京
- 8) 松嶋藻乃, 伊藤さやか, 吉田篤司, Sergey Kurkin, 矢部一郎, 佐々木秀直, 田中真樹: 知覚的予測における小脳の役割 (Contribution of the

- cerebellum to perceptual prediction) . 第 36 回日本神経科学大会-Neuro2013, 2013 年 6 月 20 日-23 日, 京都
- 9) 松島理明, 矢部一郎, 廣谷 真, 加納崇裕, 佐々木秀直: SCOPA-AUT 日本語版の信頼性の検討. 第 31 回日本神経治療学会総会, 2013 年 11 月 21 日~23 日, 東京
- 10) 若林孝一, 森 文秋, 柿田明美, 高橋 均, 佐々木秀直, 内海 潤: ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた神経変性疾患の microRNA 解析. 第 55 回日本神経病理学会総会, 2014 年 6 月 3-5 日, 東京
- 11) 松島理明, 矢部一郎, 佐久嶋研, 大庭幸治, 水戸泰紀, 武井麻子, 保前英希, 津坂和文, 吉田一人, 丸尾泰則, 佐々木秀直: 多系統萎縮症における症状評価スケールの比較 第 2 報. 第 55 回日本神経学会学術大会, 2014 年 5 月 21~24 日, 福岡  
(国際学会)
- 1) Sasaki H: Genetic news in multiple system atrophy. 16<sup>th</sup> International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Jun 21, 2012, Dublin, Ireland.
- 2) Matsushima M, Yabe I, Sakushima K, Oba K, Mito Y, Takei A, Hozen H, Tsuzaka K, Yoshida K, Maruo Y, Sasaki H: Comparison of different symptom assessment scales for multiple system atrophy, The 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, June 17, 2013, Sydney.
- 3) Matsushima M, Yabe I, Sakushima K, Oba K, Mito Y, Takei A, Houzen H, Tsuzaka K, Yoshida K, Maruo Y, Sasaki H: Comparison of different symptom assessment scales for multiple system atrophy -second report. 18th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Jun 8-12, 2014, Stockholm.
- 4) Matsushima M, Yabe I, Sakushima K, Oba K, Mito Y, Takei A, Houzen H, Tsuzaka K, Yoshida K, MaruoY, Sasaki H: Comparison of different symptom assessment scales for multiple system atrophy in 1 year. 14<sup>th</sup> Asian & Oceanian Congress of Neurology, Mar 2-5, 2014, Macao, China.
- 5) Sakushima K, Nishimoto N, Nojima M, Matsushima M, Yabe I, Sato S, Mori M, Sasaki H: Epidemiology of Multiple System Atrophy in Hokkaido - the northern most island of Japan: HoRC-MSA project: 14<sup>th</sup> Asian & Oceanian Congress of Neurology, Mar 2-5, 2014, Macao, China.
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
- 1) 特願 2012-217823 : 神経系の変性疾患の検出方法 (2012 年 9 月 28 日出願)
- 2) 特願 2012-289082 ; 神経変性疾患の検査と治療に対する miRNA 又はその標的遺伝子の利用 (2012 年 12 月 28 日出願)

願)

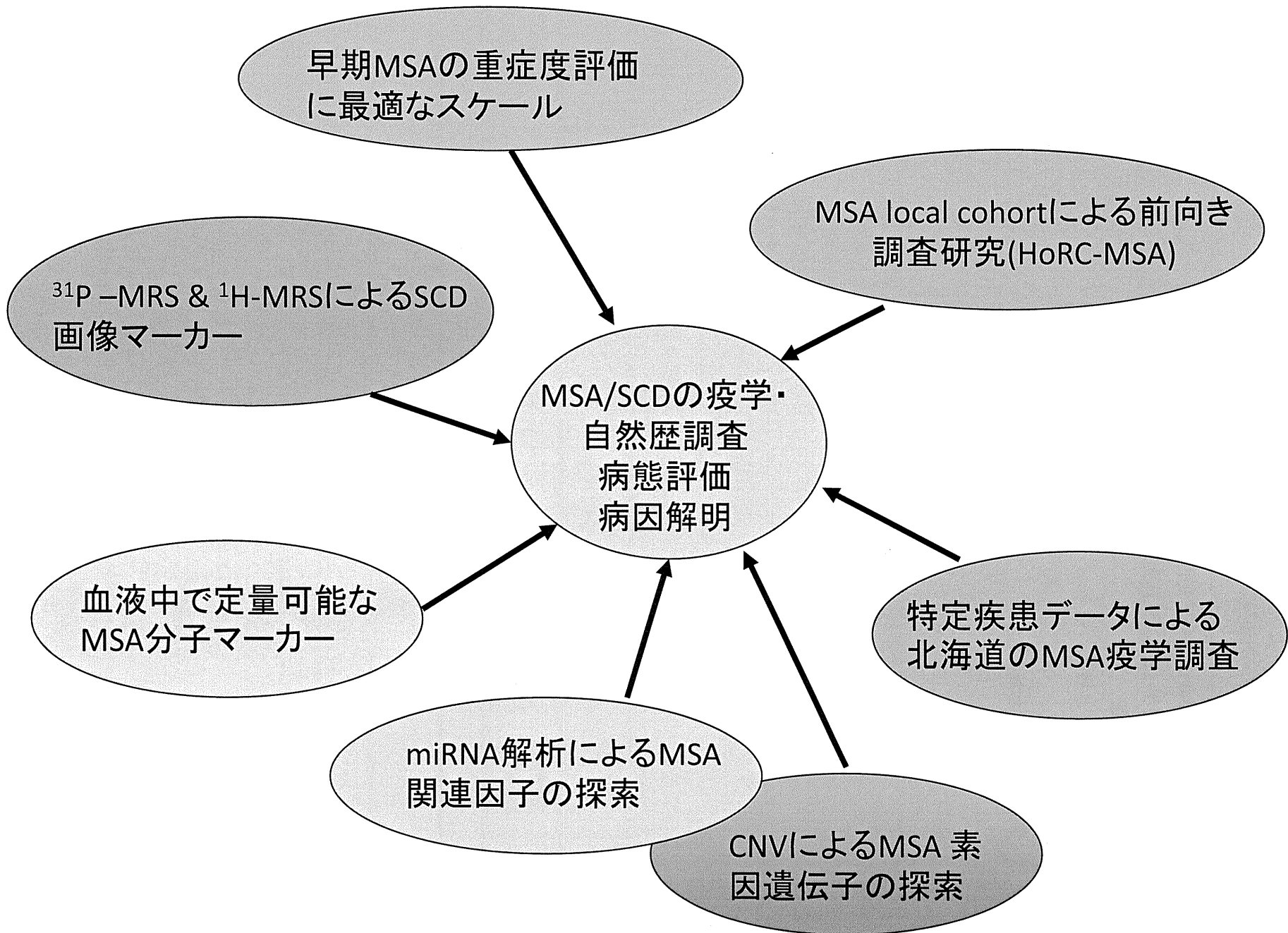
3) 特願 2012-289083 ; 神経変性疾患の制御因子(2012年12月28日出願)

2. 実用新案登録

特記すべきこと無し。

3. その他

特記すべきこと無し。



## プリズム適応によるヒト小脳環境適応機能障害の検出

研究分担者 宇川義一（福島県立医大神経内科）  
共同研究者 花島律子、大南伸也、堤 涼介  
（東京大学医学部附属病院神経内科）  
井上雅仁（順天堂大学第一生理）  
内村元昭、北澤 茂（大阪大学大学院生命機能研究科）

### 研究要旨

小脳的环境に適応する機能は臨床症状としては捕えにくく、これまであまり評価されていない。プリズム順応には小脳機能の関与が知られているため、これを用いて脊髄小脳変性症患者での適応機能障害の検出ができないか試みた。純粋小脳型の脊髄小脳変性症(SCD)患者において、プリズム順応の aftereffect などの評価項目が健常ボランティアよりも少なく異常が検出できた。プリズムによる視覚の外乱を急に与える方法と徐々に与える方法を比較したが、両方法でSCDのプリズム順応の aftereffect は減少し、順応の限界量は増大しており異常が検出できた。また、プリズム順応の障害の程度は従来の運動失調症の評価スケールとは相関せず、運動調節機能とは異なる機序の小脳障害をみていると考えた。以上、プリズム順応の検査により、従来の小脳症状として評価される症状とは異なる小脳的环境適応機能を検出できる可能性がある。

### A. 研究目的

小脳には、運動の時間や場所の調節機能だけではなく、環境の変化に運動を順応させ学習する機能がある。しかし、臨床現場では小脳性運動失調については、主として測定異常や共同運動障害などの運動自体の調節障害が症状として捉えられ評価されている。実際には、小脳には環境に適応し学習しながら適切な運動を遂行するために重要な、feedforwardな調節機能や、環境に応じた運動のプランを形成する能力があると動物実験では知られている。このような運動適応・学習に

おける小脳機能を臨床の場で評価する方法の開発を本研究では目指した。

### B. 研究方法

環境への適応能力を評価する方法の一つとして、視覚誤差を与えた環境下での運動適応を検討する方法がある。今回は、プリズムメガネで視野を水平方向に偏倚させた場合の手の動きの適応能を用いて、小脳入力系機能を脊髄変性症で検出できないか試みた。1) 1年目は、1.5 m先の標的に向かってボールを投げる課題を行い15度のプリズムメガネを装着して行っ

た。2) 2年目は25cm先のタッチパネルに出現する標的に向かって指を当てるタスクを行った。プリズムの外乱は、急な外乱として20度のプリズム眼鏡を装着する方法(abrupt法)と、段階的に少しずつプリズムの度数を上げていく方法(gradual法)の二種類であたえた。プリズム順応の限界と、プリズム順応の完成度を示すプリズム離脱後の aftereffect を評価の対象とした。正常ボランティアと、SCA6などの純粋小脳型の脊髄小脳変性症(SCD)患者でこれらの指標を比較した。3) 3年目はこれらのプリズム順応の指標と、従来の小脳症状を評価するスケールである運動失調国際評価尺度(International Cooperative Ataxia Scale Rating: ICARS)との相関関係を検討した。また、プリズム装着前の単純に指を対象にあてるときの距離の誤差のばらつき程度と ICARS の関係も評価した。

#### (倫理面への配慮)

東京大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を得て行っている。自由参加、いつでも中止の要望が可能なこと、プライバシーの保護、データの管理に留意している。

### C. 研究結果

1) 正常者において、プリズムメガネ装着直後にはボールと標的の位置はずれがみられるが、施行を繰り返している間に徐々に距離は縮まり標的の位置にボールを投げられるようになり、プリズム適応が起こっていた。その後プリズムを外すと、ボールの位置はプリズムで偏倚したのと逆方向へ偏倚するという適応の

after effect が検出できた。これに対して、SCD患者ではプリズム装着後に標的からのずれが減少する程度が少なく完全に標的に行きつくようにならない例もみられた。また、プリズムを外したあとの after effect も正常者よりも少なかった。2) 健常ボランティアにおいて、abrupt法と gradual法で同等の aftereffect が得られ、両方法の間に有意な違いはなかった。SCDでは両方法のプリズム順応において、aftereffect は減少し、順応の限界量は増大していた。両方法の間に有意差はなかった。

3) 両方法の aftereffect 量および順応の限界などの指標は、ICARSとは相関しなかった。反面、プリズム装着前の施行における測定誤差のばらつきの大きさは ICARS と相関した。

### D. 考察

SCDではプリズム順応の充分でないことが示唆された。プリズム適応は、これまでの動物実験や脳梗塞患者における検討の報告から、小脳入力系による feedforward な調節機能に関係すると考えられている。SCD患者で、プリズム適応に遅延があったことは、小脳の入力系を介する環境適応能力の低下が起きていることを示していると考えた。

また、外乱を与えた場合の運動順応課題では、abrupt法では外乱が意識に上りやすく大脳皮質レベルの意識的な補正が加わり、小脳以外の調節も加わってしまうため、小脳機能のみの順応障害が検出できなくなる可能性があり、gradual法の方が純粋な小脳の学習機能を評価できる

のではないかとされている。このため、今回は両方法でプリズム順応を検討したが、abrupt法でもSCDにおける順応の障害が検出できた。

また、これらの順応の指標とICARSとの相関を検討したところ相関はなく、ICARSはプリズム装着前の施行における測定誤差のばらつきと相関を示した。このことから、プリズム順応に関与する小脳機能は、従来の小脳症状を評価する運動調節機能とは異なる機能を見ている可能性が示唆された。従来の評価法では評価できない小脳の順応機能を、プリズム順応検査を用いることにより評価できる可能性がある。

## E. 結論

プリズム順応により脊髄小脳変性症患者における環境への適応能力の障害が検出できると考えられる。このプリズム順応で評価している小脳機能は、従来臨床で小脳性運動失調として評価されている運動調節機能とは異なる機能と考えられる。そこで、プリズム順応により、これまで評価法されなかった機能の検出が可能になるのではないかと。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) 大南伸也, 代田悠一郎, 堤 涼介, 北澤 茂, 内村元昭, 井上雅仁, 松田俊一, 市川弥生子, 後藤 順, 辻 省次, 宇川義一, 寺尾安生, 花島律子: プリ

ズム順応課題を用いた脊髄小脳変性症の生理学的解析. 第53回神経学会総会, 2012年5月22日-25日, 東京

- 2) 大南伸也, 代田悠一郎, 堤 涼介, 北澤 茂, 内村元昭, 井上雅仁, 松田俊一, 市川弥生子, 後藤 順, 辻 省次, 宇川義一, 寺尾安生, 花島律子: プリズム順応課題を用いた脊髄小脳変性症の生理学的解析. 第6回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres, 2012年10月11日-13日, 京都
- 3) 大南伸也, 代田悠一郎, 堤 涼介, 北澤 茂, 内村元昭, 井上雅仁, 松田俊一, 市川弥生子, 後藤 順, 辻 省次, 宇川義一, 寺尾安生, 花島律子: 脊髄小脳変性症におけるプリズム順応課題. 第42回臨床神経生理学会, 2012年11月8日-10日, 東京
- 4) Ohminami S, Ugawa Y, et al: Prism adaptation in spinocerebellar ataxia. The movement disorder society's 16<sup>th</sup> international congress of Parkinson's disease and movement disorders, Jun 17-21, 2012, Dublin
- 5) Ohminami S, Ugawa Y, et al: Prism adaptation in spinocerebellar ataxia 2<sup>nd</sup> Workshop on Synaptic plasticity from Bench to Bed Side, Sep 29-Oct 1, 2012, Tarmina

## G. 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

### 従来の小脳症状

- 四肢小脳性運動失調
  - 運動の距離の測定障害
  - 共同運動の障害
  - 運動のタイミングの調節の障害
- 構音障害
- 筋tonusの低下
- 体幹バランス障害
- 企図振戦
- 眼球運動障害 など



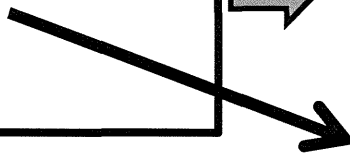
International Cooperative Ataxia Rating Scale (ICARS), Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA)などの評価スケールで評価

### これまで評価されていない小脳機能

- 小脳的环境への適応機能
- 運動プログラムの作成
- 高次機能? など



評価・検査法が必要



プリズム順応で一部は評価可能



## 『ポリグルタミン病の核機能病態に基づく治療開発』に関する研究

研究分担者 岡澤 均（東京医科歯科大学 神経病理学分野）  
共同研究者 田川一彦（東京医科歯科大学 神経病理学分野）  
田村拓也（東京医科歯科大学 神経病理学分野）  
伊藤日加瑠（東京医科歯科大学 神経病理学分野）

### 研究要旨

脊髄小脳失調症1型、7型、ハンチントン病を初めとするポリグルタミン病の核機能病態を明らかにし、その分子病態を基盤とした治療開発を目的として研究を行った。この結果として以下の結果を得た。1) 複数のポリグルタミン病タンパクの結合因子としてVCPを同定し、VCP補充がDNA損傷修復を通じてショウジョウバエモデルの寿命延長につながることを示した。2) ショウジョウバエを用いた *in vivo* スクリーニングにより、SCA1病態において重要性の高い修復関連遺伝子としてRpA1とChk1を同定した。それぞれの活性調節により、ショウジョウバエモデルの寿命延長に成功した。3) DNA構造制御タンパク質HMGB1のSCA1ノックインマウスに対する顕著な治療効果について、トランスジェニックマウス、さらに、アデノ随伴ウイルスを用いた方法論で証明した。4) ataxin-7の生理機能の一つが微小管安定化であることを明らかにした。凝集体形成により細胞質 ataxin-7が不足すると、神経突起の不安定性につながることを示した。

#### A. 研究目的

脊髄小脳失調症1型、7型、ハンチントン病を初めとするポリグルタミン病は、核内封入体を形成することが共通した病理像であり、また、変異タンパクの核移行阻害が症状の緩和につながることを示されている。したがって、ポリグルタミン病核機能病態を明らかにし、特定された核機能異常を正常化させることによって、新たな治療開発が期待出来る。

#### B. 研究方法

VCPのDNA修復を介した治療効果：VCP

のDNA損傷修復に対する機能は既に示されている。本研究では、免疫沈降法、免疫染色などによりVCPと各種ポリグルタミン病タンパク質の結合ならびに共局在を細胞、遺伝子組み換えマウス、ヒト疾患脳で検討した。さらに、UVレーザー照射によりU2OS細胞に核DNA損傷を誘導し、VCPタンパク質の損傷部位集積に対する変異ポリグルタミン病タンパク質の影響を定量的に観察した。VCP補充による治療効果の検討は、OK6ドライバーを用いた運動ニューロン特異的Ataxin-1発現トランスジェニックショウジョウバエを用いて、

寿命と DNA 損傷に対する影響を検討した。

HMGB1 の治療効果：neuron-specific enolase(NSE)エンハンサー／プロモーター制御のラット hmgbl トランスジェニックマウスを作成し、F3 を SCA1 モデルマウス (Atxn1-154Q KI マウス) と交配してダブルトランスジェニックマウスを得た。一方、AAV1 ベクターは自治医大・村松教授より供与押されたプラスミド (pAAV-1) にラット hmgbl 遺伝子を組み込みウイルス化した。

ショウジョウバエスクリーニング：変異型 Ataxin1 の運動ニューロン発現モデルショウジョウバエの寿命短縮を指標に DNA 修復関連遺伝子を *in vivo* でスクリーニングした。UAS プロモーターランダム挿入による遺伝子過剰発現ライブラリー (GS 系統) から、入手可能な 39 系統をテストした。

インフォマティクス解析：BIND、BIO GRID、Cognia 等のタンパク質間相互作用データベース (PPI) 情報を利用し、IPA (Ingenuity Pathways Analysis) による遺伝子ネットワーク/パスウェイ解析を行い、寿命に関わる遺伝子がどのような病態ネットワークを形成しているかを推定した。

Ataxin-7 新規機能：蛍光タンパク融合 Ataxin-7 の発現細胞のライブイメージングを行い、経時的变化を観察した。また、Ataxin-7 発現系で、免疫染色および免疫沈降法を用い、微小管との結合を示し、結合サイトの推定も行った。重合阻害剤であるノコダゾールによる処理や siRNA による Ataxin-7 のノックダウンによる微小管の脱重合及び再構成を観察した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験および組み替え DNA 実験は所轄官庁の指針に従い、東京医科歯科大学承認を得た。

#### C. 研究結果

VCP の DNA 修復を介した治療効果：Ataxin-1, Ataxin-7, Huntingtin, Androgen receptor と VCP の結合関係が、基本的に確認された。ポリグルタミン病タンパク質の正常型と異常型で、結合の強さに大きな差はなく、異常型が凝集などの機序を介して VCP の細胞内ダイナミズムを妨げていることが、VCP の DNA 修復機能低下につながると考えられた。

HMGB1 の治療効果：HMGB1 のポリグルタミン病における病態機能は既に報告している (Nat Cell Biol 2007)。ダブルトランスジェニックマウスでは +30% 以上の寿命延長効果とロタロッド試験等での運動機能改善を認め、AAV ウィルスの遺伝子治療では +60 から +100% のさらに顕著な寿命延長を認め、プルキンエ細胞の DNA 損傷改善を確認した。

ショウジョウバエスクリーニング&インフォマティクス解析：寿命を回復する 8 遺伝子、寿命をさらに短縮する 13 遺伝子を発見した。寿命延長遺伝子では一本鎖切断修復、二本鎖切断修復、塩基/ヌクレオチド除去修復等、複数の修復機構が関与することが示唆された。そして、寿命延長遺伝子ネットワークにおいては RpA1 が、短縮遺伝子では Chk1 が中心的役割を果たすことが示された。gammaH2AX の免疫染色等から RpA1 は DNA 損傷を抑制すること、を示した。さらに、変異 Ataxin1

と RpA1 の結合が RpA1 の DNA 損傷部位集積を阻害することを細胞レベルで明らかにした。一方、Chk1 阻害剤は寿命の短縮を回復した。

Ataxin-7 新規機能: Ataxin-7 が核のみならず細胞質においても機能を有し、その一つは微小管の安定化に関わる可能性が示唆された。正常、変異 Ataxin-7 で微小管結合や安定化の程度に差は見られなかったが、モデルマウスの小脳染色においては、変異 Ataxin-7 が凝集体に取り込まれ、細胞体、樹状突起における染色性は低下していた。したがって凝集体に取り込まれることで、Ataxin-7 の機能が低下する可能性が考えられる。

#### D. 考察

複数のアンバイアストな網羅的アプローチに基づく病態分子探索により、ポリグルタミン病に DNA 損傷修復が関わっていることが示されたと考える。これらの分子の病態への貢献度は慎重な評価が必要であるが、最も信頼度の高いノックインマウスへの寿命延長が +60-100% であること（従来の報告では +10-15% 程度）などは極めて寄与度が高いことを示唆している。また、臨床応用を考えた時にも価値が高いものと考えられる。その他の分子も、顕著な延長効果があり、複数分子をターゲットとする複合療法も考えられる。

#### E. 結論

SCA1 を含むポリグルタミン病態に関与する複数の DNA 修復因子を同定し、それらの病態下の機能改善を通じて、ノック

インマウスを含むモデル動物の寿命、運動機能を顕著に改善出来ることを示した。今後、臨床応用を視野に慎重かつ早急に研究を進展していく予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fujita K, Nakamura Y, Oka T, Ito H, Tamura T, Tagawa K, Sasabe T, Katsuta A, Motoki K, Shiwaku H, Sone M, Yoshida C, Katsuno M, Eishi Y, Murata M, Taylor JP, Wanker EE, Kono K, Tashiro S, Sobue G, La Spada AR, and Okazawa H: A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA damage repair in multiple polyglutamine diseases. *Nature Commun* 2013;4:1816
- 2) Barclay SS, Tamura T, Ito H, Fujita K, Tagawa K, Shimamura T, Katsuta A, Shiwaku H, Sone M, Imoto S, Miyano S and Okazawa H: Systems biology analysis of *Drosophila in vivo* screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1. *Hum Mol Genet* in press
- 3) Nakamura Y, Tagawa K, Oka T, Sasabe T, Ito H, Shiwaku H, La Spada AR and Okazawa H: Ataxin-7 associates with microtubules and stabilizes the cytoskeletal network. *Hum Mol Genet* 2012;21(5):1099-110

##### 2. 学会発表

- 1) Ito H, Tagawa K, Okazawa H: "HMGB1 as a therapeutic molecule candidate

- for spinocerebellar ataxia type1 (SCA1).” Neuro2013, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Tokyo, 2013.6.20-23 (6/21)
- 2) Sam S. Barclay, 田村 拓也, 伊藤 日加瑠, 島村 徹平, 勝田 明寿香, 曾根 雅紀, 塩飽 裕紀, 田川 一彦, 井元 清哉, 宮野 悟, 岡澤 均:「脊髄小脳変性症1型におけるDNA損傷修復遺伝子の効果: in vivo スクリーニング」第35回日本神経科学大会, 名古屋国際会議場 名古屋 2012.9.18-21
  - 3) 岡澤 均:「DNA損傷修復からみた神経変性機序」. 第52回日本神経学会学術大会, 名古屋国際会議場 名古屋 2011.5.18-20
  - 4) Okazawa H, Tamura T: Single strand annealing of DNA double strand breaks is involved in the SCA1 pathology. CAG Triplet Repeat Disorders II, Italy, 2011.6.5-10

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特願 2013-214155『脊髄小脳変性症1型を予防又は治療するための薬剤』出願者：国立大学法人 東京医科歯科大学、  
発明者：岡澤 均

2. 実用新案登録

3. その他

プレスリリース 2件