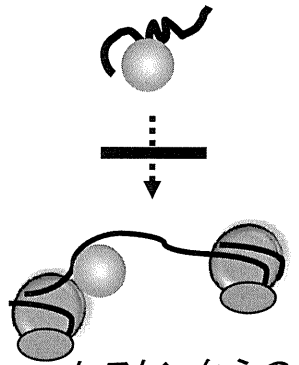


神経変性疾患におけるDNA修復機能障害

多疾患共通病態

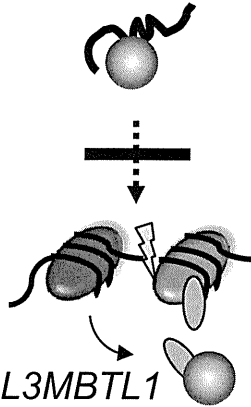
HMGB



ヒストンからの
DNA解きほぐし

DNA高次構造変換

VCP



L3MBTL1
の引き抜き

DNA二本鎖切断
修復

関連性

SCA1, SCA7, SBMA, HD, (FTLD)

KIマウス

160
~
200%

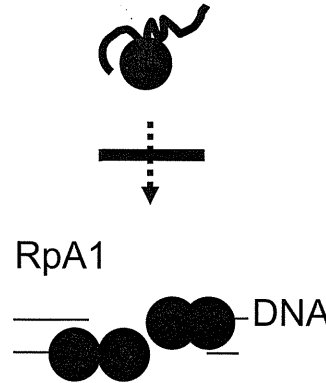
Tgハエ

120
~
150%

モデル動物(KI
マウスなど)で
の寿命延長治
療効果

疾患特異的病態

RpA1



1本鎖安定化

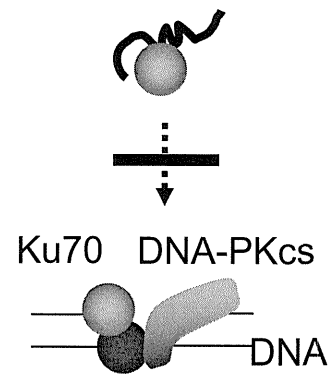
DNA二本鎖切断
修復

SCA1

Tgハエ

150
~
180%

Ku70



NHEJ

DNA二本鎖切断
修復

HD

Tgマウス

130%

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 総合研究報告

ヒト疾患脳におけるポリグルタミン病重合体の検出

SCARB2 変異を認めた進行性ミオクローヌスてんかん剖検例の臨床病理・生化学的解析
疾患モデル線虫を用いたポリグルタミン病の新規治療薬の開発

研究分担者	小野寺 理（新潟大学脳研究所 分子神経疾患資源解析学分野）
共同研究者	他田 正義（新潟大学脳研究所 神経内科）
	高橋 俊昭（新潟大学医学部 保健学科）
	徳永 純（新潟大学脳研究所 神経内科）
	藤田 菜摘（新潟大学脳研究所 神経内科）
	石平 悠（新潟大学脳研究所 神経内科）
	付永娟（新潟大学脳研究所 病理学分野）
	他田 真理（新潟大学脳研究所 病理学分野）
	豊島 靖子（新潟大学脳研究所 病理学分野）
	会田 泉（国立病院機構新潟病院 神経内科）
	中島 孝（同 神経内科）
	武田 茂樹（新潟脳外科病院 病理部門）
	内藤 明彦（松浜病院 精神科）
	山中 邦俊（熊本大学発生医学研究所 分子細胞制御分野）
	高橋 均（新潟大学脳研究所 病理学分野）
	西澤 正豊（新潟大学脳研究所 神経内科）

研究要旨

本研究では、ポリグルタミン病において原因蛋白の重合体形成が強い細胞障害性を有し神経変性を惹起するという「重合体毒性仮説」に基づき、(1) 病態研究として、初めてヒト剖検脳組織において変異蛋白の重合体を検出し、重合体蓄積と神経変性との関連を明らかにした。(2) 創薬研究として、培養細胞システムおよびポリグルタミン病モデル線虫を用いて、重合体の形成阻害を分子標的とした新規治療薬のスクリーニングを行い、既に臨床使用されている内服薬の中から治療効果を有する候補薬を同定した。一方、(3) 進行性ミオクローヌスてんかんの一型で、小脳性運動失調を呈する常染色体劣性遺伝性疾患 Action Myoclonus-Renal Failure syndrome (AMRF) の臨床・病理像の確立と病態解明を目的に、*SCARB2* 変異を認める AMRF 2 剖検例を解析し、臨床・病理像、遺伝子異常、生化学的特徴を明らかにした。

A. 研究目的

アルツハイマー病, パーキンソン病, ポリグルタミン (polyQ) 病など多くの神経変性疾患において, 原因蛋白の構造変化とそれに引き続く凝集体形成は中核的な初期分子病態と考えられている. この凝集体形成カスケードの最終産物である封入体形成は保護的な細胞動態の結果であり, 中間体である可溶性重合体に強い細胞毒性があるという「重合体毒性仮説」が, 多くの先行研究で示されてきた.

ポリグルタミン病における重合体毒性仮説は, 従来から培養細胞での解析がほとんどで, 組織レベルでの検証は乏しい. 私たちは, ポリグルタミン病モデルマウス脳組織において重合体が封入体形成に先行し病初期から出現することを確認した. しかし, これまで, ヒト脳組織を用いて重合体毒性仮説を検証した報告はない.

(1) ヒト剖検脳における重合体蓄積と神経変性との関連解析: ヒト剖検脳組織において変異蛋白の重合体を解剖部位別に検出し, 重合体蓄積 (生化学的解析) と神経変性 (病理学的解析) との関連を明らかにする. また, 重合体蓄積と臨床項目 (発症年齢, グルタミン鎖伸長数, 罹病期間など) との相関を解析する.

(2) 重合体形成阻害を分子標的とした新規治療薬の開発: 私たちはこれまでに, protein-fragment complementation assay という手法を用いて変異 polyQ 蛋白の重合体形成を生細胞内で検出する培養細胞システムを樹立し, アメリカ食品医薬品局 FDA 認可の小化合物ライブラリーを用いて大規模薬剤スクリーニングを

行った. その結果, 2,140 を越える薬剤の中で, 51 剤が 80%以上の重合体形成阻害効果を示し, 302 剤が 50%以上の阻害効果を示した. 本研究では, この候補薬の中から既に臨床使用されている薬剤トップ 25 を抽出し, ポリグルタミン病モデル線虫を用いて治療効果を検討した.

(3) AMRF 剖検例の臨床・病理, 遺伝, 生化学的解析: Action Myoclonus-Renal Failure syndrome (AMRF) は劣性遺伝性の進行性ミオクローヌスてんかんで, 思春期発症, 小脳失調, 腎不全を特徴とする. 2008 年に原因遺伝子として β -glucocerebrosidase (β GC) の結合蛋白である *SCARB2* が同定されたが, 剖検例の報告は乏しく, 臨床・病理像は十分明らかでない. 本研究では, AMRF 2 剖検例の臨床・病理・遺伝・生化学的特徴を明らかにする.

B. 研究方法

(1) ヒト剖検脳における重合体蓄積と神経変性との関連解析: 新潟大学脳研究所病理学分野の病理献体から提供を受けた DRPLA 症例 6 例および対照 9 例 (アルツハイマー病 2 例, パーキンソン病 2 例, 他に非変性疾患 4 名) の脳組織凍結標本の大脳皮質, 被殻, 淡蒼球, 小脳歯状核を検討した. 各組織から蛋白を弱変性状態で抽出した. 重合体の検出は, モデルマウス脳組織での検出方法と同様に, 弱変性条件下でのアガロースゲル電気泳動法を用い, Western blot 法にて重合体をスメアバンドとして検出した. 神経変性の解析は, パラフィン切片の HE 染色標本を用いて神経細胞脱落とグリオーシスを

4段階で半定量評価した。臨床項目として、発症年齢、グルタミン鎖伸長数、罹病期間、死亡時年齢を調べた。重合体蓄積と神経変性、または臨床項目との相関を解析した。

(2) 重合体形成阻害を分子標的とした新規治療薬の開発：線虫の培養：異常伸長した polyQ 鎖 (40 リピート) を有する断片型 DRPLA 蛋白を体壁筋に恒常発現するモデル線虫 (Q 40 線虫) を用いた。組換え蛋白は蛍光蛋白 GFP が融合され、蛍光顕微鏡により線虫の体壁に封入体を観察することができる。通常の方法で同調培養を実施した。日齢 1 日に線虫を分散し、薬剤を 2 段階の濃度で餌に混ぜて投与した。表現型解析：成虫に達する日齢 4 日に線虫を回収し、まず封入体数・面積を解析した。封入体数・面積の減少が認められた薬剤については、運動能 (液体中の 30 秒あたりの虫体の屈曲回数) を解析し、寿命測定を実施した。生化学的解析：虫体を溶解して蛋白を抽出し、生化学的に変異蛋白の総量および重合体量を解析した。寿命測定以外は日齢 4 日に解析を行った。統計解析は SPSS ver. 12.0 を使用した。

(3) AMRF 剖検例の臨床・病理、遺伝、生化学的解析：臨床像は診療録を後方視的に解析した。脳・脊髄、一般内蔵器の病理学的検索、SCARB2 の免疫組織化学的解析を行った。凍結脳組織由来の DNA、蛋白を用い、遺伝子解析、生化学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験、動物実験は、本学の当該委員会の承認を得た上で、関係省庁

の法令および本学の安全管理規定を遵守して実施した。遺伝子検査・病理検査は被験者・家族から書面での同意を得た上で行った。

C. 研究結果

(1) ヒト剖検脳における重合体蓄積と神経変性との関連解析：DRPLA 患者由来サンプルにおいて重合体を表す高分子のスメアバンドを検出した (図 1A)。大脳皮質では 5 例中 2 例、被殻では 4 例中 2 例、淡蒼球では 3 例中 1 例、小脳歯状核では 5 例中 1 例で重合体の蓄積を認めた。一方で、神経変性疾患以外の対照患者由来サンプルでは、いずれの解剖部位においても重合体の蓄積を認めなかった。

DRPLA 症例間における神経細胞障害の程度について病理組織 HE 標本をもとに比較した。重合体の蓄積が顕著であった DRPLA 症例 #3 の淡蒼球では、蓄積を認めなかった DRPLA 症例 #1 に比較して、神経細胞脱落と細胞体萎縮等の変性所見がより高度であった (図 1B)。

伸長ポリグルタミン鎖重合体の蓄積量と臨床パラメータ (グルタミン伸長数、死亡時年齢、罹病期間、脳重量) との相関を解剖部位別に検討した。大脳皮質における重合体の蓄積量とグルタミン伸長数 ($r=0.978$, $p<0.01$)、小脳歯状核における重合体の蓄積量と罹病期間 ($r=0.989$, $p<0.01$) との間に正の相関を認めた (図 1C)。

(2) 重合体形成阻害を分子標的とした新規治療薬の開発：候補薬 25 剤を対象とした封入体解析において、6 つの薬剤が Q40 線虫の封入体面積 (および総数) を

有意に減少させた。この 6 候補薬の中で PolyQ Aggregation Inhibitor 39095 (QAI-39095) に着目し、解析を進めた。日齢 4 日の封入体面積は、非投与群に比べ QAI-39095 低濃度投与群で 6.2%減少し、高濃度投与群で 17.6%減少した ($p < 0.01$, 図 2A)。運動能は、非投与群 (31.9 回/30 秒) に比して高濃度投与群 (34.8 回/30 秒) で改善した ($p = 0.018$, 図 2B)。さらに、寿命は、非投与群に比して低濃度投与群・高濃度投与群において延長した ($p < 0.01$, $p = 0.043$, 図 2C)。生化学的解析では、非投与群に比して高濃度投与群において、polyQ 蛋白の総量に有意な変化を認めなかったが (図 2D)、一方、重合体量の減少が認められた ($p < 0.01$, 図 2E)。また、非投与群に比して高濃度投与群において熱ショック蛋白 HSP70 の発現亢進を認めた ($p < 0.01$)。

(3) AMRF 剖検例の臨床・病理、遺伝、生化学的解析：臨床所見：症例 1 は両親がいとこ婚で、45 歳発症。進行性の小脳失調、動作性ミオクローヌス、認知症を呈し、全経過 14 年で死亡。症例 2 は 20 歳発症。けいれん発作、進行性の小脳失調、動作性ミオクローヌス、認知症を呈し、全経過 8.5 年で死亡。両症例とも腎不全なし。認知機能障害を伴った点、症例 1 の発症年齢が高い点 (既報 14-23 歳) が既報と異なる特徴であった。病理所見：小脳上葉、橋被蓋、淡蒼球の軽度萎縮を認めた。光顕では、神経変性を小脳皮質、淡蒼球、橋被蓋に認め、系統的神経変性の存在を初めて示した (図 3A)。本症に特徴的な所見として、小脳・大脳皮質、基底核、黒質に広汎に褐色顆粒の出現を認

めた (図 3A)。遺伝子変異：SCARB2 の新規遺伝子変異 (フレームシフト変異 (症例 1)、ナンセンス変異 (症例 2)) をホモ接合性に認めた (図 3B, C)。生化学的特徴：SCARB2 mRNA・蛋白はナンセンス変異例において高度に、フレームシフト変異例において中等度に減少し、これに一致して β GC の減少と糖鎖修飾異常を認めた (図 3D)。

D. 結論と展望

(1) ヒト剖検脳における重合体蓄積と神経変性との関連解析：患者脳組織から伸長ポリグルタミン鎖重合体を初めて検出した。伸長ポリグルタミン鎖重合体は、疾患特異的に蓄積し、重合体蓄積 (生化学的評価) と神経変性 (病理学的評価) の程度に関連を認めた。従来、*in vitro* 実験系で推察されてきた重合体の存在とその病態への関わりを、ヒト疾患脳において証明し得た点で重要と考えられる。症例間によるポリグルタミン重合体蓄積には差違があり、罹病期間、ポリグルタミン鎖長、封入体形成の程度などの因子と重合体蓄積との関連の検討が今後の課題となる。

(2) 重合体形成阻害を分子標的とした新規治療薬の開発：PolyQ 病モデル線虫を用いた表現型解析および生化学的解析により、重合体形成阻害効果を示す薬剤 QAI-39095 を同定した。本薬剤により封入体数・面積の減少、運動能の改善、寿命の延長、重合体量の減少が認められ、その効果発現に HSP の発現誘導が関係している可能性が示唆された。QAI-39095 は高血圧治療薬として既に広く臨床使用され

ている薬剤であり、長期内服が可能で副作用が少ないという利点がある。動物実験で血液脳関門を通過することも示されている。今後、他の候補薬についても効果の検討を行い、有望な薬剤についてはモデル動物を用いて治療効果を検討する。

(3) AMRF 剖検例の臨床・病理, 遺伝, 生化学的解析: *SCARB2* 変異を認める AMRF 2 剖検例の臨床・病理像, 遺伝子異常, 生化学的特徴を明らかにした。認知機能障害を伴った点、症例 1 の発症年齢が高い点 (既報 14-23 歳) が既報と異なる臨床的特徴であった。また, 病理学的に系統的神経変性の存在を初めて示した。さらに, ヒト剖検脳において *SCARB2* 蛋白の減少, β GC の減少・糖鎖修飾異常を初めて示し, これら異常が中枢神経病態に関与することが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ozawa T, Saji E, Yajima R, Onodera O, Nishizawa M. Reduced bowel sounds in Parkinson's disease and multiple system atrophy patients. *Clin Auton Res* 2011;21:181-184
- 2) Yamazaki H, Nozaki H, Onodera O, Michikawa T, Nishizawa M, Mikoshiba K: Functional characterization of the P1059L mutation in the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor type 1 identified in a Japanese SCA15 family. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;410:754-758
- 3) Yokoseki A, Ishihara T, Koyama A, Shiga A, Yamada M, Suzuki C, Sekijima Y, Maruta K, Tsuchiya M, Date H, Sato T, Tada M, Ikeuchi T, Tsuji S, Nishizawa M, Onodera O: Genotype-phenotype correlations in early onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminaemia. *Brain* 2011;134:1387-1399
- 4) Ozawa T, Revesz T, Paviour D, Lees AJ, Quinne N, Tada M, Kakita A, Onodera O, Wakabayash K, Takahashi H, Nishizawa M, Holton JL: Difference in MSA Phenotype Distribution Between Populations: Genetics or Environment? *J Parkin Dis* 2012;2:7-18
- 5) Toyoshima Y, Onodera O, Yamada M, Tsuji S, and Takahashi H: Spinocerebellar Ataxia Type 17. *GeneReviews*
- 6) Onodera O: [What is ataxia? - Towards developing a new scale for ataxia]. *Rinsho Shinkeigaku* 2012;52(11):988-9
- 7) Fu YJ, Aida I, Tada M, Tada M, Toyoshima Y, Takeda S, Nakajima T, Naito H, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Takahashi H: Progressive myoclonus epilepsy: extraneuronal brown pigment deposition and system neurodegeneration in the brains of Japanese patients with novel *SCARB2* mutations. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013 doi:10.1111/nan.12057.
- 8) Tada M, Nishizawa M, Onodera O: IP3 Receptors in Neurodegenerative

Disorders: Spinocerebellar Ataxias and Huntington's and Alzheimer's Diseases. In Pathologies of Calcium Channels. Springer-Verlag Berlin Heidelberg ed. 2014

- 9) 他田正義, 小野寺理: 劣性遺伝性小脳失調症: アクチュアル脳・神経疾患の臨床「小脳と運動失調 小脳はなにをしているのか」。西澤正豊編集。p200-214, 中山書店 2013
- 10) 徳永純, 他田正義, 永井貴大, 西澤正豊, 小野寺理: 【小脳の神経学】治療研究に向けた小脳機能評価法の将来. 神経内科 2013;78:687-694.

2. 学会発表

- 1) 高橋俊昭, 小野寺理ほか: ヒト疾患脳におけるポリグルタミン病重合体の検出. 第52回日本神経学会学術大会, 2011/5/18 名古屋
- 2) 他田正義, 高橋俊昭, 小野寺理, 西澤正豊: Paulson H L. 重合体形成障害を標的としたポリグルタミン病の新規治療法開発. 第52回日本神経学会学術大会, 2011/05/18, 名古屋
- 3) 安井 建一(鳥取大学 脳神経内科), 矢部 一郎, 佐々木 秀直, 新井 公人, 金井 数明, 桑原 聡, 吉田 邦広, 伊藤 瑞規, 祖父江 元, 児矢野 繁, 小野寺理, 西澤 正豊, 中島 健二: 特定疾患臨床調査個人票を用いた脊髄小脳変性症6型の自然史調査第53回日本神経学会総会 2012/5
- 4) 他田正義, 徳永純, MAKSIMOVA N, VARLAMOVA M, 堅田慎一, 高橋俊昭, NIKOLAEVA I, SUKHOMYASOVA A, 土屋

美由紀, 池内健, 小野寺理, 西澤正豊: ロシア・ヤクート人との比較によるSCA1発症に関わる環境・遺伝学的要因の検討. 第53回日本神経学会総会 2012/5

- 5) 小野寺理: 進化する脊髄小脳変性症治療 新たなステージへ 脊髄小脳変性症の治療薬開発に向けて 本邦の治験の歴史から学ぶ. 第31回日本神経治療学総会, 2013/11/22 東京
- 6) 徳永純, 他田正義, 永井貴大, 小野寺理, 西澤正豊: 等速直線運動の速度変動に着手した小脳性運動失調の新たな定量評価法. 第54回日本神経学会学術大会, 2013/05/30, 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

とくになし。

図1. ヒト脳組織における重合体の検出

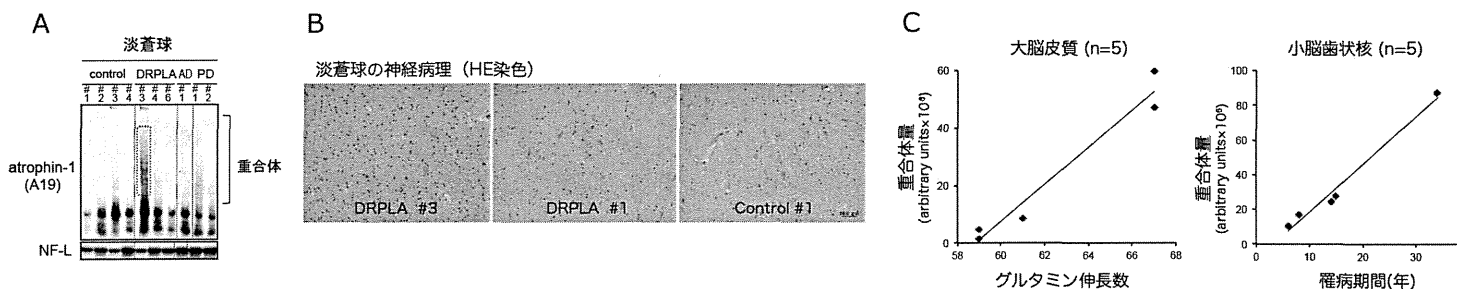


図2. モデル線虫を用いた重合体形成阻害薬の効果の検討

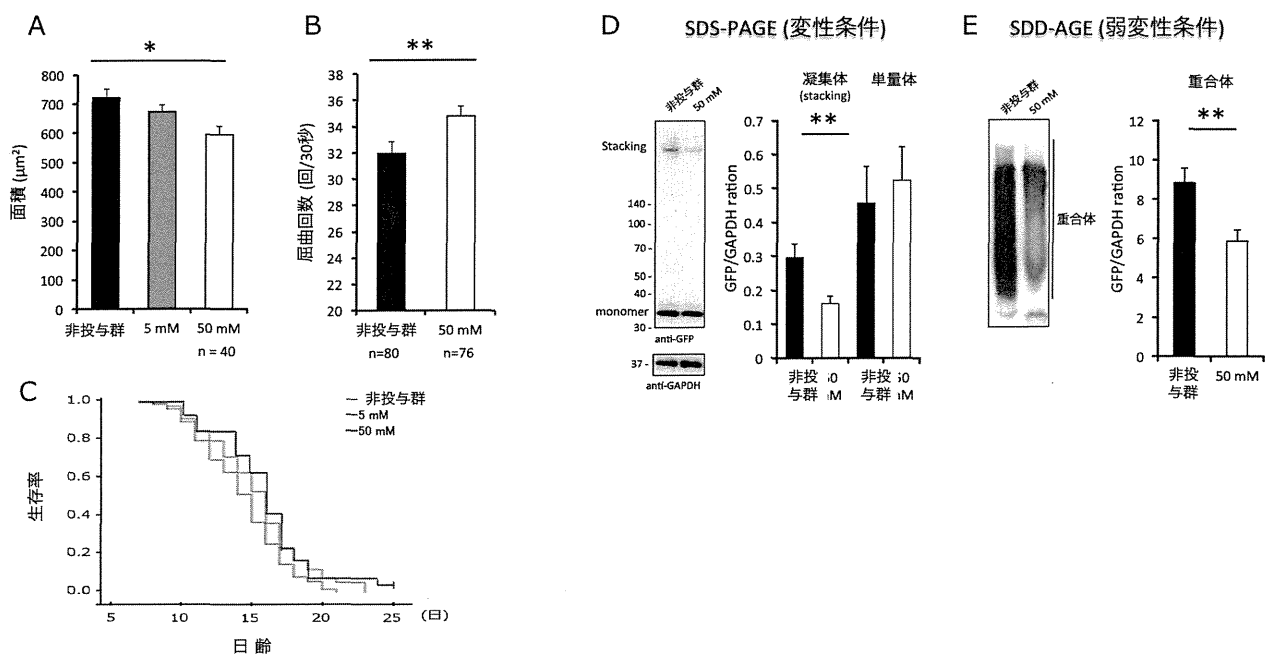
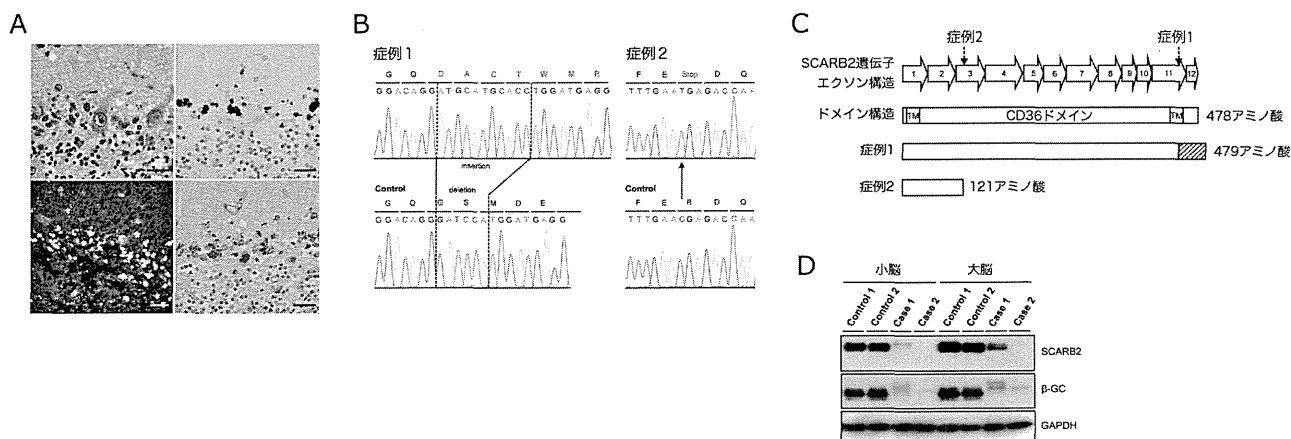


図3. AMRFの病理学的, 遺伝学的, 生化学的解析



多系統萎縮症と脊髄小脳変性症の鑑別における髄液サイトカインの意義

研究分担者	吉良 潤一	（九州大学大学院医学研究院	神経内科学）
共同研究者	松下 拓也	（九州大学大学院医学研究院	神経内科学）
	山崎 亮	（九州大学大学院医学研究院	神経治療学）
	樋渡 昭雄	（九州大学大学院医学研究院	臨床放射線科学）
	山口 浩雄	（九州大学大学院医学研究院	神経内科学）
	吉浦 敬	（九州大学大学院医学研究院	臨床放射線科学）
	大八木 保政	（九州大学大学院医学研究院	神経治療学）

研究要旨

運動失調型多系統萎縮症 (MSA-C) と脊髄小脳変性症 (SCD) の初発症状は類似しているため罹病初期の鑑別診断が困難である。我々は、患者髄液中炎症性サイトカインレベルを測定することで診断のためのバイオマーカーおよび疾患進行とともに変動する代用マーカーを検索した。疾患進行度との関連性評価のため、髄液採取時の罹病期間に加えて MRI 画像をもとに小脳および脳幹部のサイズを測定した。単項目比較では、髄液中 IL-8 および IP-10 が MSA-C で上昇していた。また IL-13 と IP-10 の同時測定では感度 0.90、特異度 0.81 の高精度で MSA-C と SCD とを鑑別した。さらに MSA-C 患者髄液中 MCP-1 レベルは罹病期間に伴って減少し、橋底部前後径と比例することから、疾患初期の炎症性機序と慢性化に伴う炎症の沈静化が示唆され、MSA に対する疾患初期の末梢性炎症細胞を標的とした抗炎症治療が有効である可能性が考えられた。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症 (SCD)、運動失調型多系統萎縮症 (MSA-C)、パーキンソン病 (PD) ならびに健常対照者 (HC) 髄液中の炎症性サイトカイン 27 種を同時測定し、各疾患におけるサイトカインプロファイルの特徴を把握する (H23 年度)。また、初期症状の類似した MSA-C と SCD とを鑑別する上で有用な炎症性サイトカインを同定する (H24 年度)。さらに、これらの炎症性サイトカインレベルと罹病期間との関連性、

MRI 画像所見との関連性を検討し、疾患の病態生理の解明および代用マーカーとしての利用の可能性を探る (H25 年度)。

B. 研究方法

SCD、MSA-C、PD および HC におけるサイトカインプロファイルの解析および MSA-C と SCD の鑑別診断に有用なバイオマーカーの探索は、SCD12 例、MSA17 例、PD10 例および HC16 例の髄液中サイトカインレベルを磁気ビーズサスペンション

アレイアッセイシステムによって測定した。測定項目は炎症性サイトカイン 27 種類 (IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-12 (p70)、IL-13、IL-15、IL-17A、IFN- γ 、TNF- α 、CXCL8/IL-8、CXCL10/IP-10、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1 α 、CCL4/MIP-1 β 、CCL5/RANTES、CCL11/eotaxin、G-CSF、GM-CSF、PDGFbb、bFGF、VEGF、IL-1ra)。炎症性サイトカインレベルと罹病期間や MRI 所見との比較については、新たに採取した SCD24 例、MSA-C20 例について、上記と同様に 27 種のサイトカインレベル測定と同時に、当時撮像されている頭部 MRI 像の小脳虫部上下最大径、小脳虫部前後径、橋最大前後径、延髄前後径、延髄横径を測定した。統計学的解析には、student-t 検定、ANOVA with Tukey's post hoc analysis、linear regression model、段階的多変量ロジスティック回帰分析、ROC 曲線解析を用いた。**(倫理面への配慮)**

本研究は、九州大学医系地区部局臨床研究倫理委員会にて承認されている (許可番号 24-218)。

C. 研究結果

SCD、MSA、PD、HC の 4 群間比較では、MSA において IL-8、IP-10 レベル高値を認めた (H23 年度)。複数項目同時測定による SCD と MSA との鑑別に有用なサイトカインの組み合わせに関しては、IL-13/IP-10 の組み合わせが感度 0.90、特異度 0.81 で有用であることが示唆された (H24 年度)。MSA-C と SCD 間の各種サイトカイン単項目比較では、MIP-1 β (p=0.0550)、IFN- γ (0.0749)、IL-1Ra (p=0.0980) 等の

サイトカインレベルが MSA-C で高い傾向がみられた。また、SCD を遺伝性 (原因遺伝子同定もしくは明確な家族歴あり) と孤発性に分けて比較すると、孤発性 SCD は遺伝性 SCD と比較し IL-1 β (p=0.0039**), IL-1Ra (p=0.0110*) が有意に高値で、IFN- γ (p=0.0549) も高い傾向があった。これをふまえて MSA-C と遺伝性 SCD を比較すると、IL-1 β (p=0.00343*)、IL-1Ra (p=0.00213*)、IFN- γ (p=0.0361*) が MSA-C で有意に高値であった。MSA-C と孤発性 SCD ではサイトカインレベルに有意差はみられなかった。また、興味深いことに、髄液中 MCP-1 レベルは、各疾患間で有意差はみられなかったものの、MSA-C では罹病期間と逆相関する傾向が著明であった ($R^2=0.32$ 、p=0.0088**)。この傾向は孤発性 SCD ではみられなかった。MRI 画像解析では、MSA-C 群で橋底部前後径が SCD と比較し有意に萎縮していた (p<0.01**)。また、MSA-C の橋底部前後径は髄液中 MCP-1 レベルと正の相関傾向 ($R=0.617$) がみられた。

D. 考察

今回の研究により、SCD と比較し MSA における炎症性の病態が明らかとなった。同じ α -シヌクレインの蓄積がみられる PD と比較しても炎症性所見が強かったことに関しては、病変の広がり MSA においてより顕著であることを示す。また、今回上昇していた炎症性サイトカインのうち、IL-8 や IP-10 は単球系細胞や血管内皮細胞から放出され、血管内皮への末梢血炎症細胞の接着増加を介した組織内浸潤の促進を行うケモカインである。ま

た、平成 25 年度にみられた髄液中 IL-1 β は単球や血管内皮細胞から放出される代表的な炎症性サイトカインであり、IFN- γ は T 細胞から放出され単球の活性化を促すことから、髄液中のこれら炎症性サイトカイン、ケモカインの上昇は末梢からの炎症細胞浸潤を強く示唆する結果であった。また、罹病期間に逆相関する MCP-1 は、単球の遊走を促す最も重要なケモカインであり、本ケモカインが発病初期に強いことは末梢血単球の浸潤が MSA-C 病態形成に深く関わっていることを示唆するものであった。また、MCP-1 レベルと MRI における橋底部前後径の相関関係は、MSA-C の発症期で萎縮が軽度である時期に MCP-1 レベルが高値で、疾患が慢性化し萎縮が進行するに従って低下していくことを示唆し、MSA-C 発病初期における炎症性機序の関与を指示する結果であった。

これらの結果をふまえ、MCP-1 の治療に視点を移すと、治療標的として末梢血活性化阻止・遊走阻止が有用である可能性が浮かび上がってくる。MSA-C に対する抗炎症治療はこれまでにいくつか報告があるが、ミノサイクリンによる脳内ミクログリアのみを標的とした治療は失敗におわり、免疫グロブリン静注による非特異的免疫抑制治療が奏功したことからも、末梢性炎症の抑制が重要であることが示唆される。さらに、MCP-1 の罹病期間との逆相関は、本ケモカインが代用マーカーとしても有用であることが示唆された。

E. 結論

本研究班で我々が得た結果から、SCD

と MSA との鑑別において髄液中の炎症性サイトカイン・ケモカインレベルが有用であること、MCP-1 は疾患に伴って低下する代用マーカーとなりうること、末梢血炎症細胞浸潤抑制治療が MSA の治療に有用である可能性が考えられた。今後は、更なる症例の蓄積と、同一患者における各々のサイトカインレベルの経時的変化の観察が必要と思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

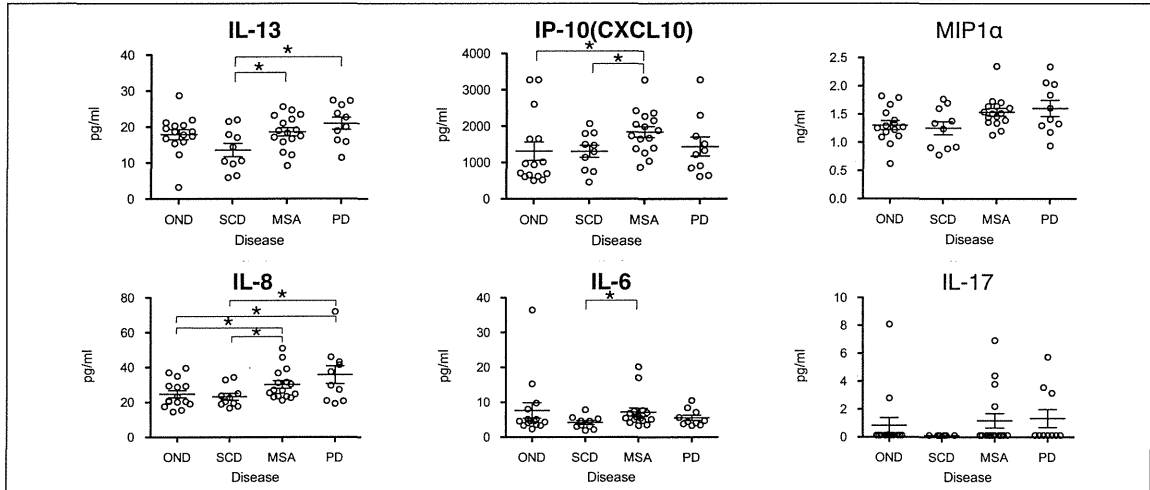
2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

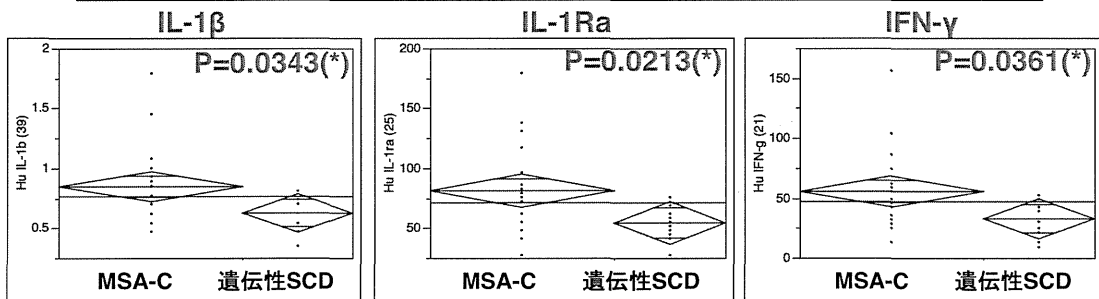
各疾患における髄液中炎症性サイトカインプロファイル



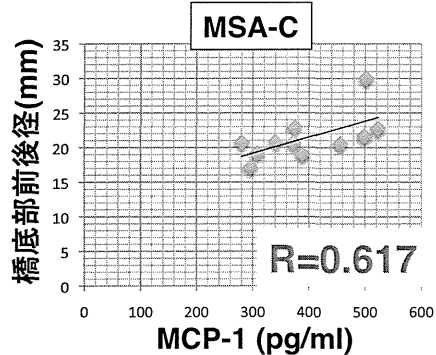
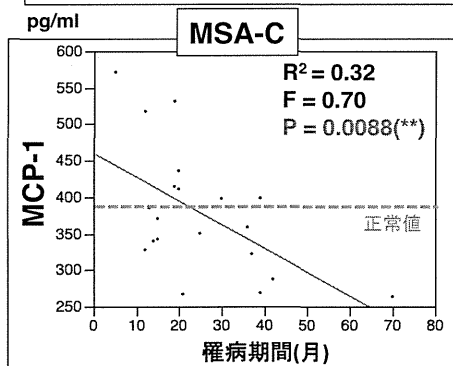
SCDとMSAの鑑別における各種サイトカインの組み合わせと感度・特異度

	特異度	感度	AUC
IL-13 / IP-10	0.81	0.90	0.84
IL-6 / IL-13	0.75	0.80	0.83
IL-13 / IL-17	0.75	0.80	0.86
IL-8 / IL-17	0.81	0.80	0.86
IL-6 / IL-13 / IL-17	0.81	0.94	0.94

MSA-Cは遺伝性SCDよりも髄液中の炎症性サイトカインレベル高値



MSA-C髄液中MCP-1(CCL2)濃度は罹病期間と逆相関し、橋前後径と相関する



多系統萎縮症の診断および病期把握に有用なバイオマーカーの開発

研究分担者 祖父江 元（名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学 教授）
共同研究者 原 一洋、伊藤瑞規、熱田直樹、千田 譲、中村亮一、渡辺はづき、
坪井 崇、米山典孝（名古屋大学大学院医学系研究科 神経内科学）
渡辺宏久（名古屋大学 脳とこころの研究センター）
長縄慎二（名古屋大学大学院医学系研究科 放射線医学）
岩崎 靖、辰己新水、三室マヤ、吉田眞理
（愛知医科大学加齢医科学研究所）
饗場郁子（東名古屋病院神経内科）

研究要旨

多系統萎縮症（MSA）はパーキンソン症候群、小脳失調、自律神経障害などが様々な程度で組み合わさり、複雑な症状を呈する神経難病の一つであるが、その複雑な症状のために、その診断や病期を正確に評価できる指標（バイオマーカー）は存在しない。そこで我々は新しい MRI の撮像方法である Voxel-based morphometry（VBM）、Mean diffusivity（MD）、Fractional Anisotropy（FA）や Readout segmentation of long variable echo trains（RESOLVE）などを用い多系統萎縮症の診断ならびに病期の把握のためのバイオマーカーとなり得るかを検討し、また発症早期例の病理解剖から診断の難しい発症早期の臨床情報や病理学的特徴を検討した。その結果、MSA の診断および病期把握のために VBM、MD、FA、RESOLVE などの新しい頭部 MRI の技術はバイオマーカーとして有用である可能性が示された。また、MSA の中には早期に臨床診断基準を満たさないが、明らかな自律神経障害を認め、突然死をする一群があり、早期から感度の高い診断基準を作成していく必要があると考えられた。

A. 研究目的

多系統萎縮症（MSA）はパーキンソン症候群、小脳失調、自律神経障害などが様々な程度で組み合わさり、複雑な症状を呈する神経難病の一つであるが、その複雑な症状のために、その診断や病期を正確に評価できる指標（バイオマーカー）は存在しない。しかしながら、MSA は他の脊

髄小脳変性症（SCA）に比べ、病気の進行が速く、今後の診療方針の決定や治験などに際し、正確な診断、病期、進行の程度を把握することは、極めて重要である。

そこで我々は、新しい MRI の撮像方法である Voxel-based morphometry（VBM）、Mean diffusivity（MD）、Fractional Anisotropy（FA）や Readout segmentation

of long variable echo trains (RESOLVE) などを用い多系統萎縮症の診断ならびに病期の把握のためのバイオマーカーとなり得るかを検討し、また発症早期例の病理解剖から診断の難しい発症早期の臨床情報や病理学的特徴を検討した。

B. 研究方法

まず、頭部 MRI の撮影方法として VBM、MD、FA を MSA 患者とコントロール群に対して半年毎に 2 年間撮影した。

次に頭部 MRI の撮影方法として RESOLVE を、当院に受診した MSA、SCA、パーキンソン病 (PD)、核上性進行性麻痺 (PSP) 患者とコントロールに行った。

また、MSA の剖検例連続 102 例中 6 例でオリブ小脳系および線条体黒質系の病理学的異常所見が極めて軽いもしくはほとんど認めない極めて早期と考えられる症例が存在し、そのうち合併症を伴わなかった 4 名で臨床病理学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

臨床研究に関する倫理指針を遵守し、研究対象者に対する人権擁護上の配慮を行った。

C. 研究結果

VBM と MD ではコントロールと登録時の比較で、脳幹および小脳に萎縮を認めた。半年後には前頭葉から側頭葉、頭頂葉へ萎縮が広がり、半年ごとにその範囲は拡大し後頭葉にも萎縮が広がっていった。

FA ではコントロールと登録時の比較で、脳幹および小脳に変性を認めた。半年後には大きな変性の広がりを認めなかったが、1 年後に前頭葉から側頭葉、頭頂葉へ

変性が急激に広がり、後頭葉にも変性が広がっていった。

次に、RESOLVE を用いて上小脳脚交叉を評価したところ、コントロール、PD、MSA では上小脳脚交叉が高信号に描出されており正常であると考えられたが、PSP では半数で上小脳脚交叉の高信号が消失しており、SCA は病型により描出される群とされない群がみられた。

また、MSA の極早期と思われる剖検例の検討では、臨床的に全例 Shy-Drager 症候群の診断を受けており、全例病初期から排尿障害を含む 2 つ以上の明らかな自律神経障害 (4 例で排尿障害、3 例で起立性低血圧、2 例で呼吸機能異常) を認めた。また、全例突然死により 2 年以内に死亡されており、他のタイプの MSA よりも罹病期間が短かった。病理学的には、オリブ小脳系および線条体黒質系の病理学的異常所見は極めて軽かったが、自律神経障害と関連があると思われる、迷走神経背側運動核や延髄腹外側野、胸髄中間外側核、Onuf 核では著明な神経細胞脱落とグリオシスを認めた。また、いずれの症例も大脳にも神経細胞の脱落は認めなかったが、GCI は認められ、早期から大脳も障害されている可能性も示唆された。

D. 考察

VBM、MD、FA は MSA における半年ごとの経時的な変化を鋭敏に捉えることができ、特に登録時から変性が強く認められる小脳、脳幹での変化は乏しく、大脳において前頭葉から側頭葉、頭頂葉へ広がり、最後に後頭葉へ変性の広がりを認めた。これらの指標をバイオマーカーとして用

いる場合、小脳や脳幹は変化に乏しいため適当ではなく、前頭葉を中心とした大脳を評価部位として選択する必要があると考えられた。

RESOLVE を用いた上小脳脚の評価では、上小脳脚が障害されやすい PSP、SCA の一部は明瞭に異常をきたしており、上小脳脚の障害が軽い MSA の初期～中期、PD、SCA の一部、コントロールでは全例で正常所見を認めた。RESOLVE は上小脳脚病変の有無を明瞭に判断できる可能性があり、多系統萎縮症の診断や小脳失調における遠心路の障害を判断することに有用である可能性があると考えられた。

病理学的には早期から運動機能に関連する部位の異常をほぼ認めず、自律神経諸核の異常を認め、自律神経障害のみで突然死された症例を認めたが、現在の MSA の臨床診断基準では、運動機能障害と自律神経機能障害を同時に認めることが必要で、現行の診断基準で MSA と診断することはできない。MSA を早期に診断するためにも、早期から感度の高い診断基準を作成していく必要があると考えられた。

E. 結論

MSA の診断および病期把握のために VBM、MD、FA、RESOLVE などの新しい頭部 MRI の技術はバイオマーカーとして有用である可能性が示された。また、MSA の中には臨床診断基準を満たさないが、明らかな自律神経障害を認め、突然死をする一群があり、早期から感度の高い診断基準を作成していく必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hara K, et al: Potential of a new MRI for visualizing cerebellar involvement in progressive supranuclear palsy. Parkinsonism and Related Disorders. 2013 [Epub ahead of print]
- 2) Multiple-System Atrophy Research Collaboration: Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. N Engl J Med 2013;369(3):233-44
doi: 10.1056/NEJMoa.1212115.
- 3) Watanabe H, et al: A milestone on the way to therapy for MSA. Lancet Neurol 2013;12(3):222-3
doi:10.1016/S1474-4422(13)70023-1
- 4) Miyai I, et al: Cerebellar ataxia rehabilitation trial in degenerative cerebellar diseases. Neurorehabil Neural Repair 2012; 26(5):515-22
- 5) Kato S, et al: Widespread cortical and subcortical brain atrophy in Parkinson's disease with excessive daytime sleepiness. J Neurol 2012; 259:318-26

2. 学会発表

- 1) 原一洋他: 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
- 2) 伊藤瑞規他: 多系統萎縮症における volumetry・拡散テンソル像を用いた

大脳病変の広がり．第 53 回日本神経学会学術大会，2012 年 5 月，東京

- 3) 伊藤瑞規他：多系統萎縮症における経時的な volumetry・拡散テンソル像の検討（第 3 報）．第 52 回日本神経学会学術大会，2011 年 5 月，名古屋

G. 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

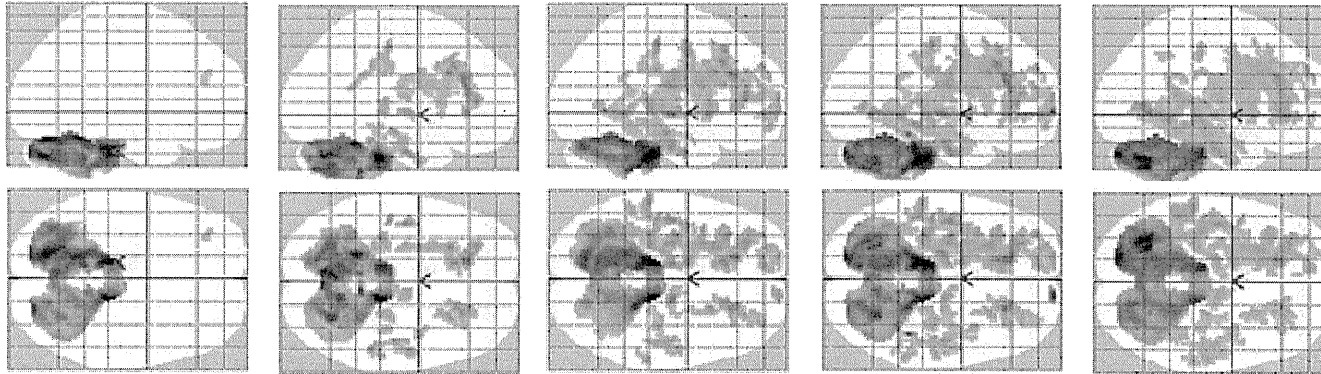
特になし．

3. その他

特になし．

多系統萎縮症の診断および病期把握に有用なバイオマーカーの開発

病期診断バイオマーカー



登録時

半年後

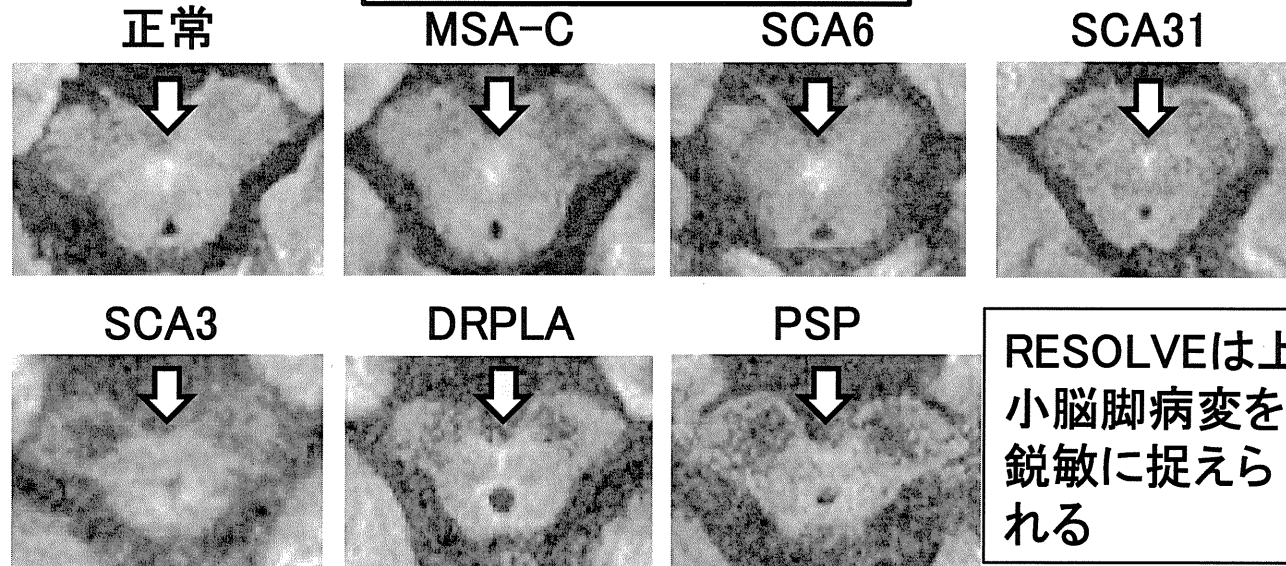
1年後

1年半後

2年後

VBM、MD、FAは鋭敏に経時的変化を捉えられる

疾患診断バイオマーカー



正常

MSA-C

SCA6

SCA31

SCA3

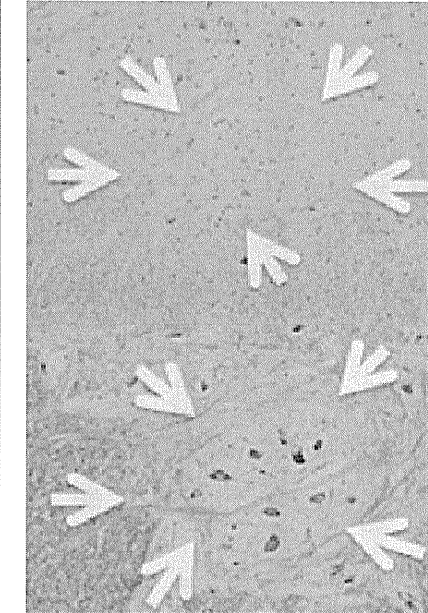
DRPLA

PSP

RESOLVEは上小脳脚病変を鋭敏に捉えられる

早期例の臨床病理学的検討

Onuf 核



MSA

正常

病理学的特徴

- 自律神経核の著明な神経細胞脱落を認める
- 運動に関連する核はほぼ正常所見

臨床的特徴

- 2年以内に突然死で死亡
- 排尿障害を含む2つ以上の自律神経障害を認める

南九州地域の小脳失調症の遺伝子学的研究および臨床的解析

研究分担者	高嶋 博	（鹿児島大学大学院 神経内科・老年病学講座）
共同研究者	平野隆城	（鹿児島大学大学院 神経内科・老年病学講座）
	西郷隆二	（藤元総合病院 神経内科）
	樋口雄二郎	（鹿児島大学大学院 神経内科・老年病学講座）
	崎山佑介	（鹿児島大学大学院 神経内科・老年病学講座）
	東 桂子	（鹿児島大学大学院 神経内科・老年病学講座）
	大窪隆一	（鹿児島大学大学院 神経内科・老年病学講座）
	岡本裕嗣	（鹿児島大学大学院 神経内科・老年病学講座）

研究要旨

南九州地域（鹿児島、宮崎、沖縄）、東九州地域（大分）における常染色体優性遺伝性の小脳失調を呈した家系について分子疫学的検討を行った。沖縄県で DRPLA と SCA2 の重症型が多く、それ以外の地域では SCA6 と SCA31 の軽症型が多い傾向であった。鹿児島県では GSS と診断される例が増加傾向にあり、小脳失調の鑑別として重要と考えられた。原因未同定の家族性・優性遺伝性小脳失調症（AD-SCD）については、次世代シーケンシング法を用いた遺伝子スクリーニング法（SCA5, 11, 13, 14, 15, 23, 27, 28, 35）を構築した。特徴的な家系として、SCA31 のリピート挿入部位に (TGGAA)_n を含まないリピートをもつ 1 家系および宮崎県の南部地域に認められた SCA36 の 2 家系を報告した。また、鹿児島大学病院に入院歴のある小脳失調症患者について臨床像、原因、治療について臨床的解析を行い、特に治療反応性の小脳失調症（treatable ataxia）の頻度、原因、治療およびその有効性を明らかにした。

A. 研究目的

南九州地域（鹿児島、宮崎、大分、沖縄）における遺伝性の小脳失調を呈する症例において、トリープレットリピート病である SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA8, SCA12, DRPLA に加え、GSS や SCA31 を含めた詳細な遺伝子診断を行い、その結果に基づいた疫学調査を行う。さらに、これらの遺伝子検査で原因未同定の症例

について、伸長以外の変異（主に点変異）で発症する 9 つの既知の AD-SCD、すなわち SCA5, SCA11, SCA13, SCA14, SCA15, SCA23, SCA27, SCA28, SCA35 の遺伝的原因を同定するため、次世代シーケンサーを使用した診断システムを構築し、変異の有無を調べる。また、小脳失調を呈する疾患の多様性を明らかにし、免疫性小脳失調症に代表されるような“治療可

能な小脳失調症 (treatable ataxia)” の頻度、原因、治療およびその有効性を明らかにする。

B. 研究方法

遺伝子検査に同意した優性遺伝性小脳失調症 236 家系について、SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA8, SCA12, DRPLA, SCA31 遺伝子のリピートの延長を PCR 法で調べた。また、Gerstmann-Sträussler-Scheinker 症候群 (GSS) の P102L は RFLP またはシーケンス解析により解析、SCA36 遺伝子異常については repeat primed PCR 法により解析を行った。原因未同定 AD-SCD 症例について、SCA5, 11, 13, 14, 15, 23, 27, 28, 35 の原因遺伝子 (それぞれ SPTBN2, TTBK2, KCNC3, PRKCG, ITPR1, PDYN, FGF14, AFG3L2, TGM6) のコーディング領域およびプライム部位をターゲット領域とし、PCR 法にて増幅させ、次世代ゲノムシーケンサー (Roche 社 GS junior genome sequencer または Illumina 社 MiSeq) を用いて解析を行った。

SCA31 の挿入部位に (TGGAA)_n を含まない長いリピートを持つ南九州の家族例については、PCR-based Southern blot 法で (TGGAA)_n リピート配列の有無を調べた。

宮崎県南部に常染色体優性の多系統萎縮症が疑われる家系を認めていたが SCA36 であることが判明した。その臨床型の多様性について既報告と比較検討した。

2004 年 4 月～2013 年 11 月の間に鹿児島大学病院に入院した患者の中から、小脳失調を呈する患者 152 例を選出・対象とし、その臨床像、原因、治療について

診療録ベースで後方視的に調査した。原因については、変性疾患、遺伝性疾患、炎症性・自己免疫性疾患、代謝・中毒性疾患、ミトコンドリア異常症、腫瘍性疾患、その他疾患の 7 つに分類し、それぞれの頻度を調査した。また、その中で特に treatable ataxia に着目し、その頻度、臨床像、治療の有用性について検討した。

(倫理面への配慮)

これらの実験に使用する DNA 検体の使用については、鹿児島大学のヒトゲノム使用研究に関する倫理委員会で承認され、患者または家族全員から文書で遺伝子検査に関する同意書を得ている。

C. 研究結果および考察

網羅的遺伝子解析による変異同定率は 236 例中 189 例の 80% で、その内訳は SCA31 が最も多く、次いで、SCA6、SCA3、GSS の順であった。地域別にみると、鹿児島県においては SCA31 が最も多く、次いで GSS、SCA6、SCA3 であった。宮崎県では SCA31 が半数以上を占め、南部地域には SCA36 の 2 家系を確認した。大分県では SCA6 が半数を占め、SCA31、SCA3 の順であった。沖縄県では、九州にはほとんど見られない DRPLA と SCA2 が圧倒的に多かった。南九州地域における遺伝性小脳失調症の原因には地域差がありことが判明し、歴史的な経緯や地形的な往来のしづらさがこのような隔たりを引き起こしていると推察された。

特徴的な家系として、宮崎県西部地域の高齢発症の SCA31 が疑われる大家系を確認した。この家系は SCA31 のリピート挿入部位に既報告のリピート長より長く、

6.8-7KBの挿入配列を認めた。本リピートの配列をゲノムシーケンサーにより解析したところ、(TAAAA)_n および (TAAATAGAA)_n のリピート配列を確認したが、病原性があるとされる(TGGAA)_n 配列は認めなかった。さらに PCR-based Southern blot 法により(TGGAA)_n 配列がないことを確認した。SCA31の発症機序は(TGGAA)_nの転写産物がヘアピン構造をとりやすいことによる、いわゆる RNA gain-of-function メカニズムが提唱されているが、それ以外のメカニズムも存在する可能性が考えられた。また、本症例のような長い挿入は通常の PCR 法では増幅できないことから、これまで見逃されている可能性があるため注意が必要と考える。

宮崎県南部地域に確認された SCA36 の 2 家系は、典型的な症状とされる小脳失調や舌萎縮に加え、パーキンソニズムで発症し起立性低血圧や排尿障害を呈するなど、既報告とは異なる症状が認められた。芦田川流域に集積が認められる SCA36 とこれらの家系が共通の祖先に由来するものなのか、また臨床型の相違がリピートの長さや内容によるものなのかについて今後の検討が必要である。

リピート伸長異常以外の原因で引き起こされる他の AD-SCD (SCA5, 11, 13, 14, 15, 23, 27, 28, 35) については次世代シーケンサーを用いた解析法を構築することができた。現在、使用している機種 (MiSeq) では 1 回の実験で数十人の検体を解析可能であり、1 例あたりにかかる費用も 2 万円弱と従来の Sanger 法シーケンスと比較すると数十分の 1 で済み、

短期間かつ低コストでの解析が実現可能となった。「原因未同定」AD-SCD の 31 症例を対象に解析を行ったが、そのうち 4 症例で 4 つの新規変異 (dbSNP、1000genomes など公共のデータベースには登録のない変異) を確認した。これらの変異は日本人コントロールに非常に稀に存在する rare variant である可能性もあり、segregation 解析を含め病的意義についての検討が今後必要である。

小脳失調症を呈する症例 152 例を原因別にみると、変性疾患が 74 例 (49%)、遺伝性疾患が 32 例 (21%)、炎症性・自己免疫性疾患が 22 例 (14%)、代謝・中毒性疾患が 9 例 (6%)、ミトコンドリア異常症が 5 例 (3%)、腫瘍性疾患が 4 例 (3%)、その他疾患が 6 例 (4%) であった。treatable ataxia に着目すると 30 例が治療により症状の改善もしくは自然軽快を認めた (全体の 24%)。特に、橋本脳症を含む免疫性小脳失調症では 22 例中 18 例で免疫療法が有効であった。また、代謝・中毒性疾患ではビタミン剤補充や食事指導などの治療により改善がみられ、ミトコンドリア異常症では 5 例中 2 例がアルギニン製剤投与により改善が見られた。

D. 結論

南九州地域の優性遺伝性小脳失調症の 80% に遺伝的原因を同定することができた。地域によって病型に明らかな差が存在した。特殊な家系として、(TGGAA)_n リピートを持たない SCA31 疑いの 1 家系および宮崎県南部の SCA36 の 2 家系を報告した。原因未同定の SCA 症例について、次世代シーケンサーを用いて、低コス