

トかつ迅速に診断し得るより効果的な網羅的遺伝子スクリーニング法を構築した。小脳失調症の原因が多岐にわたることを自験入院症例にて示した。treatable ataxia の頻度は全体の 24%であり、4人に1人はそれぞれの原因・病態にあわせた適切な治療により改善していたことが分かった。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishikawa N, Nagai M, Tsujii T, Tanabe N, Takashima H, Nomoto M: Three SCA2 siblings with Ataxia, Parkinsonism, and Motor Neuronopathy. Intern Med. 2011;50(13):1429-32
- 2) Sakiyama Y, Okamoto Y, Higuchi I, Inamori Y, Sangatsuda Y, Michizono K, Watanabe O, Hatakeyama H, Goto Y, Arimura K, Takashima H: A new phenotype of mitochondrial disease characterized by familial late-onset predominant axial myopathy and encephalopathy. Acta Neuropathol 2011;121:775-783
- 3) 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, Sobue 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, 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, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Trojanowski JQ, Ozelius L, Foroud T, Tsuji S: Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. N Engl J Med 2013;369(3):233-44

- 4) 平野 隆城, 樋口 雄二郎, 西郷 隆二, 大窪 隆一, 高嶋 博: 南九州地域の遺伝性脊髄小脳変性症－疾患の特徴と遺伝子診断－. 神経内科 2013;78(3):257-264

2. 学会発表

- 1) Higuchi Y, Yuan J, Yoshimura A, Sakiyama Y, Saigo R, Hirano R, Hashiguchi A, Okamoto Y, Okubo R, Takashima H: Comprehensive genetic analysis of autosomal dominant spinocerebellar ataxia using a next generation sequencer. 第54回日本神経学会学術大会(2013), East Asian Neurology Forum
- 2) 樋口 雄二郎, 吉村 明子, 袁 軍輝, 崎山 佑介, 西郷 隆二, 平野 隆城, 岡本 裕嗣, 大窪 隆一, 高嶋 博: 脊髄小脳変性症の次世代シーケンス

法による網羅的遺伝子解析. 第 54 回
日本神経学会学術大会(2013)

- 3) 大窪 隆一, 平野 隆城, 崎山 佑介,
西郷 隆二, 井上 輝彦, 三山 吉夫,
高嶋 博: 宮崎県南西部に集積する
SCA36 (Asidan) の臨床病理学的検討.
第 54 回日本神経学会学術大会(2013)
- 4) Higuchi Y, Hirano R, Yoshimura A,
Yuan J, Sakiyama Y, Saigo R,
Hashiguchi A, Okamoto Y, Okubo R,
Takashima H: Comprehensive genetic
analysis of autosomal dominant
spinocerebellar ataxia using the
next generation sequencing system.
American Society of Human Genetics,
63rd Annual Meeting (Boston, 2013);

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む。）

特になし

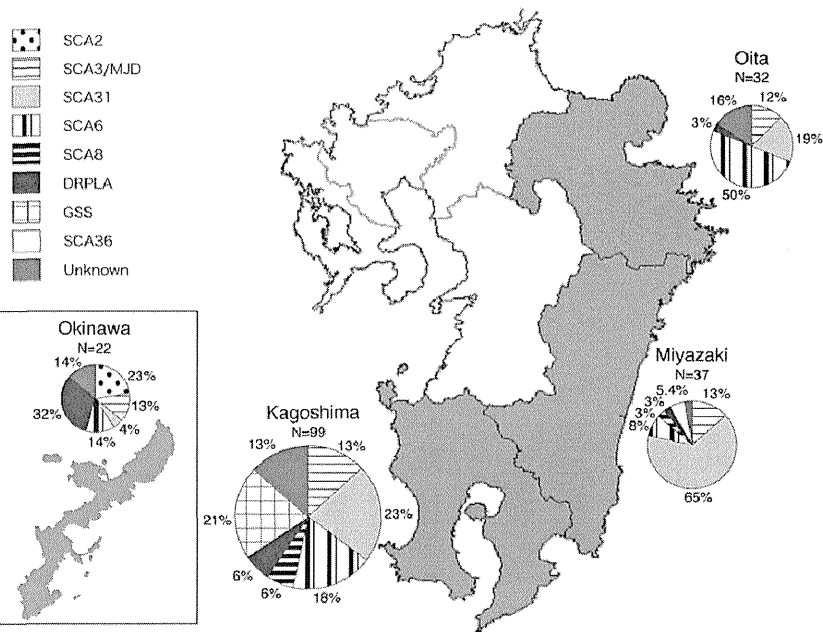
南九州地域の遺伝性小脳失調症の遺伝子学的研究および次世代シーケンス法による遺伝子診断の構築

班員 高嶋 博 鹿児島大学 神経内科、老年病学

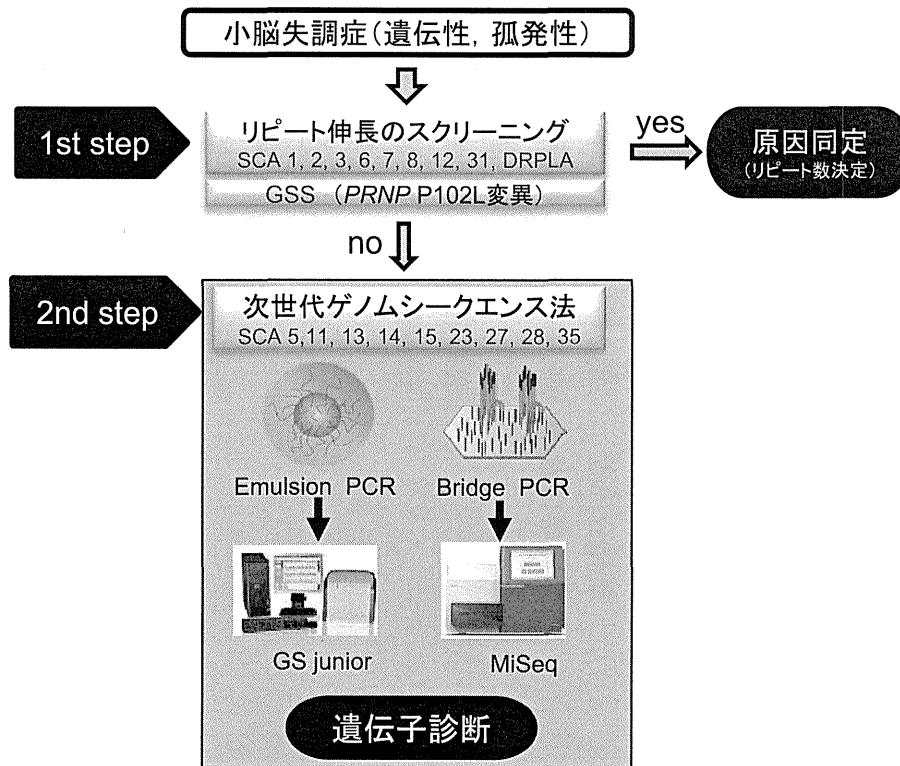
【目的】南九州地域における常染色体優性遺伝性の小脳失調を呈した家系について、疫学的検討を行う。特に全国に多発する脊髄小脳変性症SCA31の研究およびSCAの包括的な遺伝子診断を行った。また、新しい包括的な遺伝子診断システムを構築する。

【結果】南九州、大分、沖縄、愛媛県の常染色体優性遺伝形式の小脳失調症の分子疫学が明らかとなり、地域でかなり分布が異なっていた。新しい遺伝子診断システムを構築した。

南九州地域の遺伝性小脳失調症の分子疫学



SCDの網羅的遺伝子解析フローチャート



遺伝性痙性対麻痺の臨床・分子遺伝学的研究

研究分担者 瀧山嘉久（山梨大学大学院医学工学総合研究部神経内科学講座）
共同研究者 高 紀信、小林史和、三輪道然、長坂高村、新藤和雅
（山梨大学大学院医学工学総合研究部神経内科学講座）
嶋崎晴雄、中野今治（自治医科大学内科学講座神経内科学部門）
石浦浩之、三井 純、後藤 順、辻 省次
（東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学）
坂井千香、畠山英之、後藤雄一
（国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第二部）
船山 学、李 元哲、富山弘幸、久保紳一郎、服部信孝
（順天堂大学医学部脳神経内科）

JASPAC

研究要旨

本研究班が母体となり構築された JASPAC の活動を継続した。臨床研究では、これまで本邦では作成されていなかった痙性対麻痺の診断基準（案）を提唱した。分子遺伝学的研究では、遺伝性痙性失調症および脊髄小脳変性症の新規原因遺伝子を同定した（SPG55、Boucher-Neuhäuser 症候群）。加えて、SPG3A の新規 de novo 変異を見いだし、劣性遺伝性パーキンソニズム-痙性対麻痺の候補遺伝子を抽出した。

A. 研究目的

- (1) JASPAC: 本邦の遺伝性痙性対麻痺 (HSP) について、多施設共同研究体制により臨床・研究のリソース基盤を構築する。HSP の自然史やゲノム解析研究を行い、原因究明と治療法の開発を目指す。
- (2) 臨床研究: これまで本邦では診断指針のなかった痙性対麻痺 (SP) について、他疾患との鑑別や特定疾患申請時に参考となる診断基準を作成する。
- (3) 分子遺伝学的研究: HSP と脊髄小脳変性症 (SCD) の新規原因遺伝子を同定す

る。

B. 研究方法

- (1) JASPAC: 2006 年から引き続き事務局を担当した (2011 年に自治医大から山梨大学に事務局を異動)。東大で網羅的遺伝子解析を、自治医大で ARSACS の遺伝子解析を行った。
- (2) 臨床研究: 文献や European Federation of Neurological Societies のガイドラインを参考に SP の診断基準 (案) を作成した。

(3) 分子遺伝学的研究 : a. 視神経萎縮と末梢神経障害を伴った ARHSP の 1 家系、
b. Boucher- Neuhäuser 症候群の 1 家系、
c. 健常な両親を持つ若年発症 HSP の 1 家系、
d. 劣性遺伝性パーキンソニズム-SP の 1 家系について、ホモ接合体マッピング、エクソーム解析を用いて候補遺伝子を抽出し、Sanger 法にて塩基配列を確認、原因タンパクの機能解析を行った。

(倫理面への配慮)

研究への参加については、患者と健常者から文書にて同意を得た。なお、本研究は山梨大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

(1) JASPAC: 2014 年 1 月 9 日現在、全国 46 都道府県、198 施設から HSP 556 家系の登録があり、index patient 429 名の DNA が収集されている。うち遺伝子診断が施行された 296 名のうち 145 名 (49.0%) につき病型が決定できた。内訳は、SPG4 54.5%、SPG3A 7.6%、SPG31 7.6%、SPG11 6.9%、SPG10 2.8%、SPG46 2.8%、SPG15 1.4%、SPG28 1.4%、SPG55 1.4%、SPG7 0.7%、SPG8 0.7%、SPG12 0.7%、SPG35 0.7%、SPG52 0.7%、SPG54 0.7%、SPG57 0.7%、ARSACS 0.7%、その他 8.0%であった。

(2) 臨床研究 : 主要徴候を定め、参考所見として、随伴症状、遺伝性、初発症状、検査所見、鑑別診断を列記して SP の診断基準 (案) を作成した。診断の判定は、主要徴候を認め鑑別診断ができるものとし、病型診断は遺伝子診断により行うこととした (診断の表は、平成 25 年度分担研究報告書を参照のこと)。

(3) 分子遺伝学的研究

a. 視神経萎縮と末梢神経障害を伴った ARHSP: *CI2orf65* 遺伝子にナンセンス変異 (c.394C>T, p.R132X) を同定した。患者細胞では、mtDNA の翻訳活性と呼吸鎖酵素活性がコントロールに比し低下していることを示した。

b. Boucher-Neuhäuser 症候群: エクソーム解析の結果、候補となる新規のホモ接合体変異を 4 カ所 3 遺伝子、複合ヘテロ接合体変異を 8 遺伝子に認めた。Human Genome Variation Database などによる検討により、最終的に *PNPLA6* 遺伝子の複合ヘテロ接合体変異 (c.2923A>G/c.3517insTGCCG, p.T795A/p.1173insCP) が原因であると考えられた。

c. 健常な両親を持つ若年発症 HSP: de novo 変異を想定したエクソーム解析により、*ATL1* 遺伝子変異 (c.1259A>C, p.Q420P) を同定した。

d. 劣性遺伝性パーキンソニズム-SP: 新規遺伝子 A のホモ接合体変異を 1 家系の同胞例に見いだした。JASPAC 患者のスクリーニングにより、ADHSP 1 例にこの遺伝子のヘテロ接合性変異が認められた。

D. 考察と結論

(1) JASPAC: 解析依頼家系の約半数で病型が決定できたが、そのうち SPG4 が 54.5%を占めており、群を抜いて頻度が高かった。今後、病型が決定できなかった家系について、新規原因遺伝子の同定を行いたい。

(2) 臨床研究 : 臨床の現場で役立つように SP の診断基準 (案) を作成したが、今

後、感度と特異度を検証する必要がある。

(3) 分子遺伝学的研究

a. 視神経萎縮と末梢神経障害を伴った ARHSP: 本症例においては、ナンセンス変異が存在し、そのために C12orf65 の不良タンパク質、あるいはタンパク質が形成されないことで、本タンパク質が持つ peptide chain releasing factor としての機能を喪失し、mtDNA の翻訳活性を顕著に低下させたと思われた。本疾患は HUGO により SPG55 と命名されたが、C12orf65 遺伝子変異により、ミトコンドリア脳筋症を呈することが既に知られている。

我々の家系との表現型の違いが何に由来しているのか、今後の検討が必要である。

b. Boucher-Neuhäuser 症候群: 我々は、本症候群の原因遺伝子として PNPLA6 遺伝子を同定したが、時期を同じくして、Brain 誌 (2013 年 12 月 19 日、Epub ahead of print) に PNPLA6 が Gordon-Holmes 症候群、Boucher-Neuhäuser 症候群、SPG39 の共通の原因遺伝子であることが報告された。我々の家系は、PNPLA6 変異を認めた、世界で 11 番目の家系、そして本邦では初めての家系である。今後、本邦において Boucher-Neuhäuser 症候群に限らず、小脳失調や SP、性腺機能以上といった幅広い症例において PNPLA6 遺伝子変異を持つ症例のスクリーニングが必要である。

c. 健常な両親を持つ若年発症 HSP: 本研究では、検出された遺伝子が既知の ATLI であったために病因遺伝子であると考えられ、de novo 変異を想定したトリオのエクソーム解析により十分に病因遺伝子を絞り込めると思われた。また、read 数や strand bias による絞り込みは候補遺伝

子の検出に有効であると思われた。

d. 劣性遺伝性パーキンソニズム-SP: パーキンソニズムと SP の両疾患に關与する可能性のある新規候補遺伝子 A を見いだした。今後、この遺伝子変異が家系内健常者も含めて共分離しているかどうかを確かめる必要がある。同じ原因遺伝子がヘテロ接合体とホモ接合体とで表現型の異なる疾患を呈することは、TFG 遺伝子 (HMSN-P と SPG57 を呈する) において知られており、新規候補遺伝子 A の機能解析についても詳細に検討する必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Prust M, Wang J, Takiyama Y, et al: GFAP mutations, age of onset and clinical subtypes in Alexander disease. Neurology 2011;77: 1287-1294
- 2) 瀧山嘉久, 石浦浩之ら: 遺伝性痙性対麻痺-JASPAC-. 神経内科 2011;74: 141-145
- 3) 瀧山嘉久: わが国における遺伝性痙性対麻痺の現状. 臨床神経 2011;51: 1125-1128
- 4) Namekawa M, Takiyama Y, et al: A novel adult case of juvenile-onset Alexander disease: complete remission of neurological symptoms for over 12 years, despite insidiously progressive cervicomedullary atrophy. Neurol Sci 2012; 33: 1389-1392
- 5) Haga R, Miki Y, Funamizu Y, Kon T, Suzuki C, Ueno T, Nishijima H, Arai

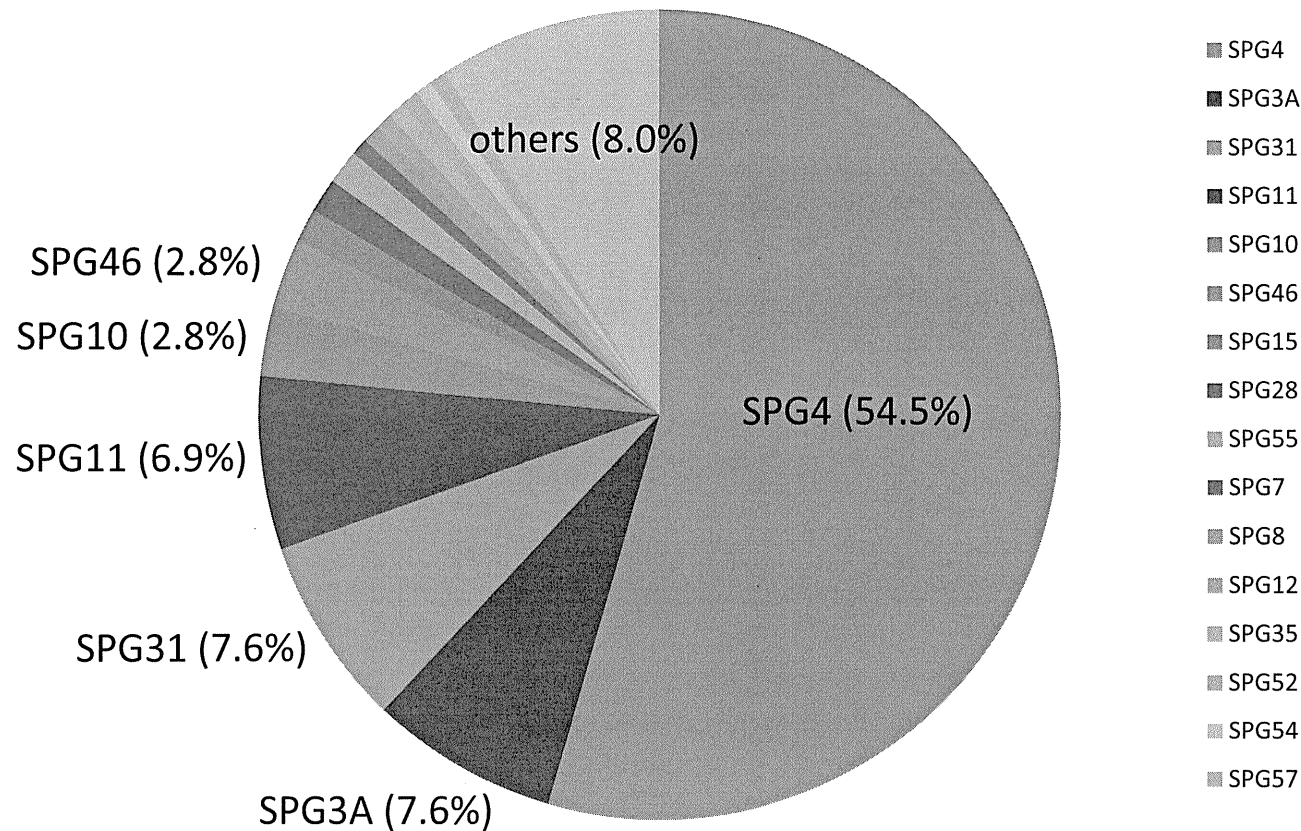
- A, Tomiyama M, Shimazaki H, Takiyama Y, Baba M: Novel compound heterozygous mutations of the SACS gene in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay. Clin Neurol Neurosurg 2012; 114: 746-747
- 6) Shimazaki H, Takiyama Y, et al: A homozygous mutation of C12orf65 causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). J Med Genet 2012; 49: 777-784
- 7) 瀧山嘉久: シャルルヴォア・サグネ型痙性失調症. 最新医学
- 8) Shimazaki H, Takiyama Y, et al: Middle cerebellar peduncles and pontine T2 hypointensities in ARSACS. J Neuroimaging 2013; 23: 82-85
- 9) Koh K, Ishiura H, Miwa M, Doi K, Yoshimura J, Mitsui J, Goto J, Morishita S, Tsuji S, Takiyama Y: Exome sequencing reveals a novel de novo mutation in ATL1. Neurology and Clinical Neuroscience (in press)
- 10) Shimazaki H, Honda J, Naoi T, Namekawa M, Nakano I, Yazaki Y, Nakamura K, Yoshida K, Ikeda S, Ishiura H, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, and Takiyama Y: Autosomal recessive complicated spastic paraplegia with lysosomal trafficking regulator gene mutation. J Neurol Neurosurg Psychiatry (in press)
- 11) 三輪道然, 高紀信, 植松晶子, 羽田貴礼, 一瀬佑太, 小野原亜希子, 福元恵, 高木隆助, 山城亘央, 小林史和, 長坂高村, 新藤和雅, 瀧山嘉久: 山梨大学神経内科における遺伝性痙性対麻痺の臨床・分子遺伝学的検討. 山梨医学 2013; 41: 48-51
2. 学会発表
- 1) 瀧山嘉久: わが国における遺伝性痙性対麻痺の現状. 第 52 回日本神経学会大会シンポジウム -脊髄小脳変性症 update-, 2011 年 5 月 20 日, 名古屋
- 2) 瀧山嘉久: 遺伝性痙性対麻痺の最近の話題. 第 53 回日本内科学会東海支部生涯教育講演会, 2012 年 6 月 16 日, 浜松
- 3) 嶋崎晴雄, 瀧山嘉久ら: 視神経萎縮、末梢神経障害を伴う遺伝性痙性対麻痺家系の原因遺伝子同定. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 23 日, 東京
- 4) 高 紀信, 瀧山嘉久ら: トリオのエクソーム解析により ATL1 の新規 de novo 変異を見出した家族性痙性対麻痺家系. 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013 年 5 月 31 日, 東京
- 5) 三輪道然, 瀧山嘉久ら: 遺伝性痙性対麻痺における髄腔内バクロフェン投与療法の治療効果の検討. 第 31 回日本神経治療学会総会, 2013 年 11 月 23 日, 東京
- F. 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

Japan Spastic Paraplegia Research Consortium (JASPAC)

全国46都道府県、198施設からHSP 556家系の登録
Index patient 429名のDNAを収集 (2014.1.9現在)

145家系について病型が決定できた



シヌクレイノパチーの病理進展メカニズム

研究分担者 武田 篤

（東北大学大学院医学系研究科 神経・感覚器病態学講座神経内科学分野／
国立病院機構 仙台西多賀病院神経内科）

共同研究者 長谷川 隆文、大嶋 龍司、菅野 直人、今野 昌俊、三浦 永美子、
菊池 昭夫、青木 正志

（東北大学大学院医学系研究科 神経・感覚器病態学講座神経内科学分野）
田中 伸幸（宮城県立がんセンター研究所 がん先進治療開発研究部）
小林 和人（福島県立医科大学 生体機能研究部門）

研究要旨

パーキンソン病や多系統萎縮症などのシヌクレイノパチーに於いて、異常凝集タンパクが神経-神経あるいは神経-グリア細胞間を伝播し周辺細胞に変性をもたらす可能性が報告され注目を集めているが、そのメカニズムについては未知の点が多い。本研究では PD と関連疾患における α シヌクイレン細胞間伝播の背景にある分子機構を明らかにすると共に、異常タンパク伝播阻止を基軸とした新たな治療介入の可能性について細胞生物学的検討を行った。さらに最近小胞輸送の主要な制御機構である ESCRT がリソソーム-オートファジー系の制御を介し異常凝集蛋白の分解処理に積極的に関与していることが明らかとなってきたが、シヌクレイノパチーに於いても、ESCRT 障害による脳内オートファジー・蛋白質分解系の破綻が、神経変性疾患を誘導する可能性を明らかとした。

A. 研究目的

多くの変性疾患において異常タンパクが細胞間を伝播する現象が相次いで示され、所謂プリオン仮説として注目を集めている。我々も BF227 による分子 PET イメージングを用いた多系統萎縮症患者の経時的観察において、大脳白質や被殻における α シヌクイレン (α S) 沈着物が時間と共に周辺部位へ拡大する現象を確認している。そこで α S 細胞間伝播の背景にある α S 取り込み・分泌を制御する分

子機構を解明することを目的に細胞生物学的解析を行った。さらに ESCRT 複合体が制御している脳内オートファジー・蛋白質分解系の破綻が、如何なる機序により α シヌクイレン蓄積と神経細胞死を惹起するかについて、新たに作成した神経組織特異的 ESCRT-0/Hrs 欠損モデルマウスおよび培養細胞モデルを用い、行動解析、病理組織学的・生化学的手法による検討を行った。

B. 研究方法

SH-SY5Y 神経細胞、初代培養ラット大脳皮質神経細胞およびKG1Cオリゴデンドログリア (ODG) 細胞の培地に野生型ならびに A53T・A30P 変異型組み換え α S (1-10 μ M) を一定時間添加後、免疫染色法および細胞分画サンプルを用いたウェスタンブロット法 (WB) により細胞内 α S 取り込みを観察した。取り込まれた α S の小胞輸送系における存在を確認するため、エンドソーム・リソソームマーカーとの共局在について共焦点レーザー顕微鏡を用い観察した。また α S 取り込み過程におけるエンドサイトーシスの関与を確認するため、同過程の key molecule である内因性ダイナミン 1 を K44A ドミナントネガティブ (DN) 変異体あるいは siRNA 発現により抑制すると共に、ダイナミン GTP hydrolysis 阻害剤 (sertraline) 投与の影響についても検討した。次に CaMKII-Cre マウスを用い前脳特異的に ESCRT 複合体の最上流分子 (ESCRT-0/Hrs) を欠損させたマウス (Hrsflox/flox; CaMKII-Cre) を作製した。同マウスを用い、経時的に運動機能障害を観察すると共に、病理組織学的・生化学的手法による解析を行った。

C. 研究結果

培地に添加した α S は経時的かつ濃度依存的に神経・ODG 細胞へ取り込まれ、SDS 抵抗性オリゴマーを形成すると同時に細胞内凝集体を形成した。細胞内取り込みは 3 種類のシヌクレインファミリー分子の中で α S に特異な現象であり、凝集傾向は家族性 PD 変異型 α S でより顕

著であった。また putative lipid-binding domain とされる N 末端配列の欠損により α S の細胞内取り込みが有意に減少することが確認された。取り込まれた α S の一部は エンドソームマーカー Rab5A およびリソソームマーカー Lamp-1 と共局在を示し、リソソーム阻害剤である bafilomycin 投与により細胞内において SDS 不溶性 α S オリゴマー蓄積が誘導された。さらに神経・ODG 細胞内への α S 取り込みは DN 変異体・siRNA による内因性ダイナミン 1 抑制ならびにダイナミン阻害剤である sertraline の培地内投与により顕著に減少することが確認された。

前脳特異的 ESCRT-0/Hrs コンディショナルノックアウトマウスでは加齢に伴う体重減少と運動障害が誘発され、全例が生後 8 週間以内に死亡した。ノックアウトマウス脳内において海馬 CA3・CA1 および大脳皮質を中心に、著明な神経細胞脱落と残存神経細胞内の K48・K63-ユビキチン化タンパク、選択的マクロオートファジーの基質である p62/SQSTM1、 α -synuclein 陽性の凝集蛋白蓄積が確認され、リソソーム-オートファジー系の障害が示唆された。脳組織を用いたウェスタンブロット解析ではノックアウトマウス群において Triton X-100 不溶性・urea 可溶性画分を中心に α -synuclein オリゴマー、PHF-Tau、Huntingtin、および TDP-43 蛋白の蓄積・増加、ならびに VDAC、TIMM44、Tom20 といったミトコンドリア構成蛋白の増加が認められた。さらに ESCRT-0/Hrs ノックアウトマウス脳組織では酸化ストレスマーカー (8-OHdG) 蓄積とストレス

キナーゼ活性化が生じていた。

D. 考察

細胞外 α S は数分間という短時間で神経・ODG 細胞内へ移行し、凝集化することが確認された。内在性 α S を有さない ODG においても SDS 不溶性の α S 蓄積がみられたことから、 α S 凝集・蓄積には内在性 α S の存在が必須ではないことが予想され、ODG では神経細胞とは別に内在化した α S が凝集しやすい細胞内環境が存在する可能性も推定された。 α S は N 末端に両親媒性の配列を有し脂質膜と親和性をもつと考えられているが、今回の実験においても N 末配列の存在が α S 細胞内移行において重要であることが確認された。さらに神経・ODG 細胞 両者において α S の取り込みはダイナミン発現抑制および機能阻害により顕著に減少することから、ダイナミン分子が関与するエンドサイトーシスが同過程において重要であることが推察された。

また ESCRT-0/Hrs の前脳特異的ノックダウンマウスにおいて、神経細胞内の K48-・K63-ユビキチン化タンパク、選択的マクロオートファジー基質である p62/SQSTM1、 α S 陽性の凝集蛋白蓄積が生じると共に顕著な神経細胞脱落が観察されたことから、ESCRT 系が制御するオートファジー・蛋白質分解系の破綻が、シヌクレイノパチーの病態に深く関与している可能性が示唆された。

E. 結論

α S 取り込みにはダイナミンが関与するエンドサイトーシス機構が重要であり、細胞内へ侵入した α S はエンドソーム、リ

ソソームへと運搬され分解処理されることが示された。さらに ESCRT 系は神経細胞において α SYN を含めた異常凝集蛋白のオートファジー-リソソーム分解を制御しており、その機能破綻は細胞毒性を有する凝集蛋白蓄積・神経変性過程と密接に関与する可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hasegawa T, et al: The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of alpha-synuclein. PLoS ONE 2011; 6(12): e29460
- 2) Baba T, et al: Severe olfactory dysfunction is a prodromal symptom of dementia associated with Parkinson's disease: a 3 year longitudinal study. Brain 2012; 135: 161-169
- 3) Konno M, et al: Suppression of dynamin GTPase decreases alpha-synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy. Mol Neurodegener 2012; 7(1): 38
- 4) Hasegawa T, et al: Pathogenesis of Multiple system atrophy. Neurol Clin Neurosci 2013; 1(6): 189-194
- 5) Kikuchi A, et al: Hypometabolism in the supplementary and anterior cingulate cortices is related to dysphagia in Parkinson's disease: a cross-sectional and 3-year

longitudinal cohort study. *BMJ Open* 2013; 3: e002249

2. 学会発表

- 1) Hasegawa T, et al: The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal Targeting of alpha-synuclein. NRF-JSPS Asian Science Seminar-New Prospectives in the Neuroscience of Psychiatric and Neurological Disorders, 2012. 02. 13, Seoul, Korea
- 2) Hasegawa T, et al: The AAA-ATPase VPS4 regulates extracellular secretion and lysosomal targeting of α -synuclein. 16th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, 2012. 06. 17, Dublin, Ireland
- 3) Hasegawa T: Regulation of α -synuclein internalization and secretion: what do we know, and where are we headed? 7th International Conference on alpha-Synuclein in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Diseases: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. (March 2, 2013, Dubai, UAE ; 招待講演)
- 4) Hasegawa T: Molecular mechanisms of cell-to-cell transmission of protein misfolding in synucleinopathy. Hertie-Institute for Clinical Brain Research, Research Seminar, (March 5, 2013, Tübingen, Germany ; 招待講演)
- 5) Hasegawa T, et al: RNAi-mediated knockdown of *VPS35* impairs α -synuclein degradation by inhibiting the maturation of cathepsin D. The 11th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Disease. (March 6-10, Florence, Italy)
- 6) Hasegawa T: Recent progress in multiple system atrophy- "Pathogenesis of multiple system atrophy." 54th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, (May 29, 2013, Tokyo, Japan ; 招待講演)
- 7) Hasegawa T, et al: RNAi-mediated silencing of *VPS35* exacerbates phenotypic and locomotor abnormalities in α -synuclein transgenic *Drosophila*. The 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. (Jun 17, Sydney, Australia)
- 8) Miura E, et al: Retromer disruption induces α -synuclein accumulation via improper maturation of cathepsin D. The 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. (June 17, Sydney, Australia)
- 9) Sugeno N, et al: The E3 ligase Nedd4 facilitates the endosomal targeting of extracellular alpha-synuclein. Neuroscience 2013 Annual Meeting

(Nov 13, San Diego, USA)

- 10) Hasegawa T, et al: RNAi-mediated knockdown of *VPS35* impairs α -synuclein degradation by inhibiting the maturation of cathepsin D. XX World Congress on Parkinson's Disease and related Disorders. (Dec 8-11, Geneva, Switzerland)

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

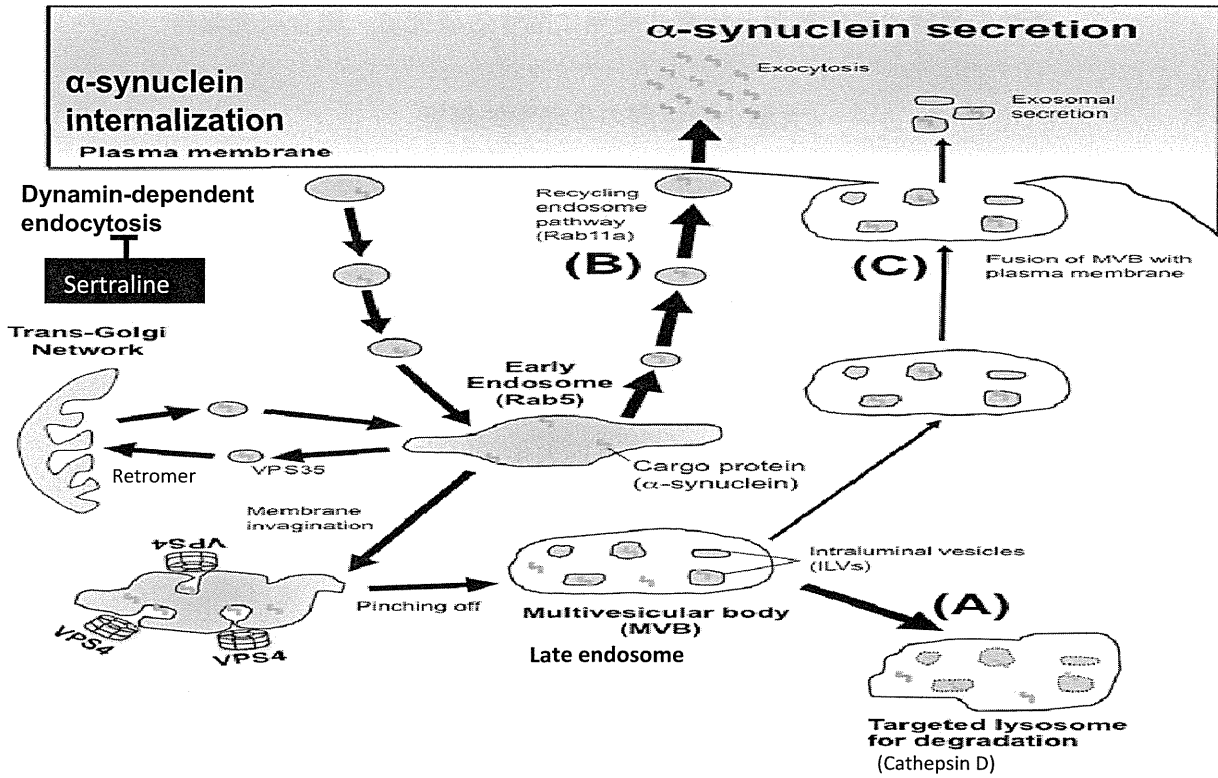
2. 実用新案登録

なし

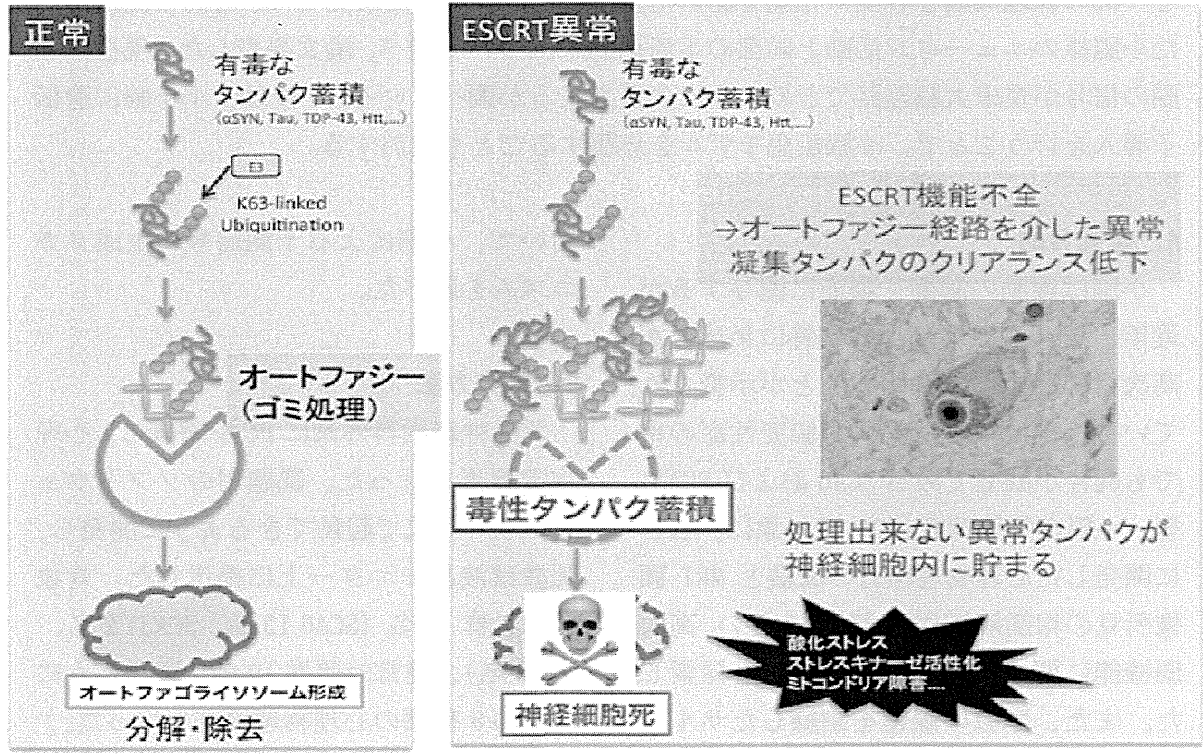
3. その他

なし

シヌクレイノパチーの病理伝播メカニズム



ESCRT異常による毒性タンパク分解障害→神経変性を惹起



大脳小脳連関の生理学的解析

研究分担者	田中 真樹（北海道大学神経生理学分野）
共同研究者	松嶋 藻乃（北海道大学神経生理学分野）
	吉田 篤司（北海道大学神経生理学分野）
	伊藤さやか（北海道大学神経内科学分野）
	Sergey Kurkin（北海道大学神経生理学分野）
	矢部 一郎（北海道大学神経内科学分野）
	佐々木秀直（北海道大学神経内科学分野）

研究要旨

脊髄小脳変性症を対象に種々の心理物理検査を行い、高次機能障害を抽出して小脳の新たな機能評価法を開発することを目指して研究を行った。また、類似の行動課題を訓練したサルを用いてその脳内メカニズムを調べるとともに、大脳小脳連関に関わる脳各部への薬理的な操作によって小脳変性症と同様の障害を生じさせることを試みた。北大神経内科外来に置いた Windows 端末で 8 種類の心理物理検査を行い、感覚予測を必要とする課題の一部で臨床所見との相関を認めた。また、脳画像解析によって、crus の萎縮と一部の課題成績との間に相関を認めた。実験動物を用いた研究では、時間予測に関した小脳核のニューロン活動と同部の不活化効果について調べ、論文発表した。現在は小脳の信号が視床大脳経路でどのように変換されるか調べている。今後はサル小脳に遺伝子導入を行うことで、小脳疾患モデルを作製することも検討する。

A. 研究目的

小脳は運動の制御や調節に関与するが、近年、これに加えて小脳の特に半球部が高次認知機能に関与することが示唆されている。本研究では脊髄小脳変性症の中でも純粹小脳型である SCA6 および SCA31 型、小脳皮質萎縮症 (CCA) を対象に、独自に開発した心理物理検査の成績と MRI 画像所見の相関解析 (VBM 解析) を行い、高次脳機能に関与する小脳皮質領域を探索した。また、類似の課題を訓練したサルを

用いて、小脳による予測信号の生成メカニズムを調べた。

B. 研究方法

北大神経内科外来に PC を設置し、心理物理検査を行った。課題用のソフトウェアは exe 形式で起動できるように開発し、刺激は液晶モニター上に提示した。対象は患者群 17 名 (SCA6 12 名、SCA31 2 名、CCA 3 名)、健常対照群 19 名。両群ともに以下の 8 種類の心理物理検査を行った。

①オドボール検出課題では、一定の周期で提示される視聴覚刺激が不意に一拍抜けるので、それに気づいたら素早くボタンを押す。②スイッチ課題では、両人差し指を左右のボタン上にそれぞれ置き、いずれかのボタンが赤色に光るとそれを押し(congruent 条件)、緑色ならば反対側のボタンを押す(incongruent 条件)。③注意追跡課題では、画面上に6～8つの同形同色の視覚刺激が呈示され、数秒間動きまわったのちに停止する。事前に3つが標的として指定されるので、被験者はそれらを内的に追跡し、運動停止後に同定する。④Color-lag 課題では、赤から青、または青から赤へと連続的に色調が変化する輪の中心に、中間色である紫色の刺激を短時間提示し、両者の相対的な色の違いを答える。⑤順序判断課題では、近づいてくる2つの視覚刺激が衝突する前または後に短い音を鳴らし、どちらが先であったか判断する。⑥リズム課題では、一定間隔で点灯するボタンをそのタイミングに合わせて押す。⑦Flash-lag 課題では、回転する棒の周りに現れる棒の相対的な角度を答える。⑧軌道予測課題では、直線的に進む物体が物体の後ろを通り、再度出現する位置を予測する。

サルを用いた研究に関しては、上記①と類似のオドボール課題を用いて、小脳核と運動性視床の神経活動記録と不活化を行った。

(倫理面への配慮)

臨床研究に関しては、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得て行った。すべての被験者から事前に書面によるインフォームド・コンセントを得た。

動物実験に関しては、北海道大学動物実験委員会の審査と承認を受けて行った。

C. 結果と考察

行動上は、①、②、③、⑥の課題で患者群に意味のある有意な変化がみられ、⑤、⑧では行動と臨床所見(SARA/BBS)の間に相関が認められた。VBM解析では、①、②で反応時間と有意に相関する領域(lobule IV-VI, VIII, Crus I, II)を認めた。以上の結果から、小脳半球がリズム学習によるタイミング予測やルールに基づいた行動の切り替えに関与していることが示唆された。いずれの検査でも前頭連合野と強い結合が知られているCrusに有意な相関を認め、前頭前野と小脳とのネットワークが上記の機能に関与している可能性がある。

動物実験に関しては、オドボール課題を行っている際に、刺激間隔と比例して感覚応答を増大させる小脳核ニューロンを発見し、同部の不活化によって検出時間の遅延を認めた。現在、投射先の運動性視床の活動を記録しており、視床大脳経路では単に情報の伝達を行うのみではなく、積極的な情報変換が行われていることが明らかになりつつある。

D. 結論

運動を伴わない知覚判断の成績が小脳変性症で低下しており、高次機能の軽度の障害が示唆された。これには小脳皮質crus葉から歯状核、運動性視床、前頭葉皮質に至る経路が関与している可能性がある。今後はこれらの情報処理を生理実験で調べるとともに、ウイルスベクター

を用いてサル小脳への遺伝子導入を行い、
脊髄小脳変性症で得られた検査データを
サルでさらに深く検証する。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka M and Kunimatsu J :
Contribution of the central
thalamus to the generation of
volitional saccades. Eur J Neurosci
2011; 22: 2046-2057
- 2) 國松 淳, 田中真樹: 眼球運動制御か
らみた視床大脳経路の機能解析. 脳と
神経 (Brain and Nerve) 2011;
63:871-877
- 3) Tanaka M and Kunimatsu J : Thalam
ic roles in eye movements . Oxford
Handbook on Eye Movements (SP
Liversedge, ID Glichrist, S
Everling, Eds) , 2011; Oxford
University Press, UK: 235-256
- 4) Matsushima A & Tanaka M : Neuronal
correlates of multiple top-down
signals during covert tracking of
moving objects in macaque
prefrontal cortex. J Cogn Neurosci
2012; 24:2043-2056
- 5) Kunimatsu J & Tanaka M : Alteration
of the timing of self-initiated but
not reactive saccades by electrical
stimulation in the supplementary
eye field. Eur J Neurosci 2012; 36:
3258-3268
- 6) Matsushima A & Tanaka M :
Retrospective and prospective
information coding by different

neurons in the prefrontal cortex.
NeuroReport 2013; 24: 73-78

- 7) Matsushima A & Tanaka M: Manipulation
of object choice by electrical
microstimulation in macaque frontal
eye fields. Cereb Cortex, in press
- 8) 國松 淳, 田中真樹: 視床大脳経路に
よる運動の制御: ニホンザルの眼球運
動を指標とした研究. 比較生理生化学
会誌 2012; 29: 235-241
- 9) Ohmae S, Uematsu A & Tanaka M :
Temporally specific sensory signals
for the detection of stimulus
omission in the primate deep
cerebellar nuclei. J Neurosci 2013;
33:15432-15441
- 10) 田中真樹, 國松 淳, 大前彰吾: 時
間の測り方 —脳による時間の符号化.
脳と神経 (Brain and Nerve) 2013; 65:
941-948

2. 学会発表

- 1) 田中真樹: 小脳機能の生理学的解析.
第52回日本神経学会学術大会 シ
ンポジウム「脊髄小脳変性症:update」,
2011年5月20日, 名古屋
- 2) Tanaka M: Neural mechanism of timing:
a role for the cerebellum. Columbia
University David Mahoney Center
Laboratory Seminar, 2011年11月17
日, New York
- 3) Tanaka M : Multiple components of
prefrontal signals for covert
tracking of moving object. The 3rd
International Symposium on
Prefrontal Cortex, 2012年11月30

日，京都

- 4) Tanaka M: Role of the cerebellum in temporal prediction. CiNet seminar, 2013年10月15日，吹田
- 5) Tanaka M: Neural basis of temporal processing: a role of the cerebellum. 第91回日本生理学会シンポジウム, 2014年3月17日，鹿児島

F. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

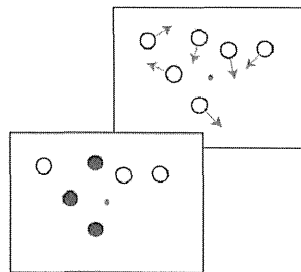
該当なし

小脳変性症の新しい認知機能検査

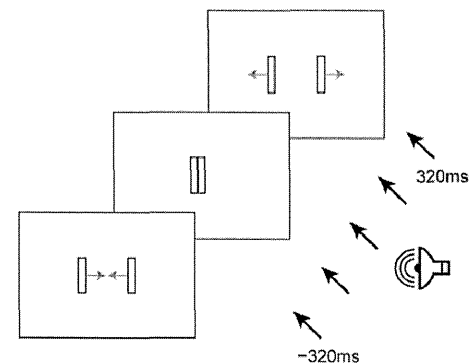
Cognitive task set

- Rhythm
- Color-lag
- Simultaneity
- Anti-reaching
- Inferred motion
- Missing oddball
- Multiple object tracking

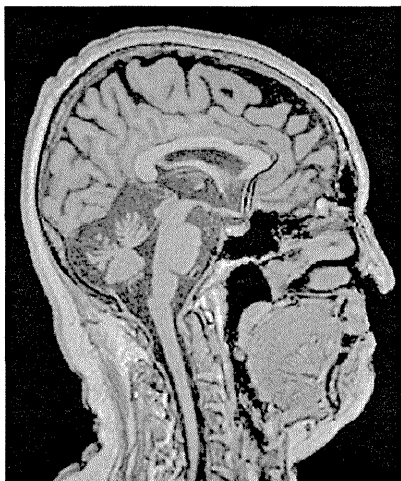
<Multiple object tracking>



<Simultaneity>



MRI画像のVBM解析



認知機能障害と
小脳各部の容積
との相関解析

動物実験

認知機能障害の
神経基盤の解明

