

脊髄小脳失調症 36 型 (Asidan) の神経病理学的検討

研究分担者 阿部康二 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学)
共同研究者 菱川 望、劉 文涛、山下 徹、出口健太郎
(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学)
池田佳生 (群馬大学大学院 脳神経内科学)
小林 果、人見敏明、小泉昭夫
(京都大学大学院医学研究科 環境衛生学分野)

研究要旨

NOP56 遺伝子イントロン 1 における GGCCTG リピート延長を原因遺伝子変異とし、緩徐進行性の小脳失調症を主症状として運動ニューロン障害を高率に合併する新規の遺伝性疾患 Asidan/SCA36 を見い出した。さらに Asidan 患者の臨床遺伝学的、神経病理学的検討を行った。全患者が小脳失調で発症し、経過とともに舌や四肢の筋萎縮・線維束性収縮などの運動ニューロン障害が明らかとなり、さらに聴力低下や前頭葉機能障害を来す点が本疾患の特徴であることが判明した。病理学的には前頭葉・小脳・脳幹・脊髄前根の萎縮、小脳皮質、歯状核、下オリーブ核、脳幹および脊髄の運動神経核の神経細胞脱落がみられ、また下オリーブ核には ubiquitin/p-62 陽性、TDP-43 陰性の封入体を認めた。さらに核内には GGCCUG リピート転写産物の凝集体である RNA-foci を認めた。本疾患は SCA と MND のそれぞれの疾患スペクトラムの交差点に立脚する臨床的位置づけをもつが、病理学的には固有の特徴をもつことを明らかにした。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症の分子病態解明および新規治療法開発を推進するため、原因遺伝子変異が未同定の常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症の家系解析により新規の原因遺伝子同定を試み、さらにその臨床病理学的特徴と病態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

当施設では世界的にもこれまで報告の

ない、小脳失調症と運動ニューロン疾患を合併した常染色体優性遺伝性疾患が中国地方のある地域に集積していることを見い出し、その臨床的特徴について報告を行ってきた。我々は本疾患をその集積地域名にちなみ、Asidan と命名し、その家系のうち連鎖解析が可能なサンプルサイズの 3 家系において、約 10cM 間隔で設定された 382 個のマイクロサテライトマーカーを用いてゲノムワイド連鎖解析を行った。その結果得られた候補遺伝子座

位について fine mapping とハプロタイプ解析により絞り込みを行った。さらに、最小候補領域に存在する 33 遺伝子のスプライス部位を含む全エクソン領域の DNA シークエンシングを行い、これらの遺伝子内に存在するマイクロサテライト・リピート配列についてはその異常延長の有無についても検討して原因遺伝子変異同定を行った。さらに、同定された遺伝子異常を認めた 9 家系 14 名の患者の神経学的所見、電気生理学的検査、聴覚機能・嚥下機能検査、脳画像検査、認知機能検査につき解析し、剖検例については病理学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、適切な説明と同意を得て行われている。

C. 研究結果

多点連鎖解析の結果、20 番染色体 20p13 領域に 4.60 のロッド値を認めた。また、3 家系に共通した病的ハプロタイプを認め、さらにハプロタイプ解析が可能な Asidan 家系を追加して解析したところ、計 5 家系で共通した病的ハプロタイプを認めたことから、これらの 5 家系には founder mutation が存在することが想定された。

1.8Mb の最小候補領域内にある遺伝子の DNA シークエンシングを進め、シーケンス領域にある SNP haplotyping を行う中で、第 1 および第 3 家系間で nucleolar protein 56 (*NOP56*) 遺伝子内に、共にホモ接合性の、SNP ハプロタイプが異なる領域があることに気づいたのを

契機にして *NOP56* 遺伝子イントロン 1 に存在する GGCCTG の 6 塩基繰り返し配列の異常延長が本疾患の原因遺伝子変異として同定された (SCA36)。

その後、当施設における AD-SCD 例において GGCCTG リピート延長の有無を repeat-primed PCR 解析にてスクリーニングしたところ、さらに 4 例において同遺伝子変異を認め、これらの患者も Asidan 家系と同じ地域の出身であることが明らかとなった。計 9 家系の患者に GGCCTG リピート延長を認め、サザンブロット解析の結果から患者群には 1700～2300 リピートの異常延長を認めた。

また、患者由来リンパ芽球を用いた解析では、*NOP56* の発現は RNA レベル、タンパクレベル共に明らかな低下を認めず、患者 *NOP56* はコントロールと同様のスプライシングを受けて発現していることを明らかにし、*NOP56* 発現量の変化によらない Asidan の分子病態が想定された。

さらに、患者リンパ芽球における RNA-FISH 解析では、核内に延長した GGCCUG リピート転写産物からなる RNA-foci を認め、さらに免疫蛍光染色を組み合わせた解析では、転写因子 SRSF2 との共局在を認めた。以上から、Asidan の分子病態として、他の non-coding 領域のマイクロサテライト・リピート延長による遺伝性疾患と同様に RNA gain-of-function の機序が示唆された。

Asidan の臨床的特徴は、平均発症年齢は 53.1 歳で、小脳失調で発症し、体幹失調、構音障害、四肢失調は 100% の患者に、四肢の腱反射亢進は 79% に認めた。舌萎縮・線維束性収縮は 71% に、四肢の筋萎

縮・線維束性収縮は 57%に認め、これらの下位運動ニューロン徴候は罹病期間 10 年以上の患者で特に目立っていた。筋電図では脱神経所見を認め、筋生検では群集萎縮や小角化線維などの神経原性所見を認めた。また聴力低下の頻度も高く (69%)、MSA-C など他の小脳失調症と比べて有意な聴力低下を認めた。嚥下造影検査 (VF) と舌圧測定器を用いた嚥下機能検査では、Asidan 患者の嚥下障害度は ALS 患者や SBMA 患者よりも軽度であった。脳画像検査では発症早期には比較的小脳に限局した萎縮を呈し、罹病期間の長い患者においては脳幹萎縮や前頭葉を主とした大脳萎縮を認めた。認知機能検査では前頭葉機能低下を認めた。

神経病理学的には前頭葉、小脳、脳幹、および脊髄前根の萎縮を認めた。組織学的には、小脳皮質、歯状核、下オリーブ核、舌下神経核、脊髄前角の神経細胞脱落を認めた。下オリーブ核では残存神経細胞質内に ubiquitin/p-62 陽性、NOP56/TDP-43/ataxin-2 陰性の封入体を認めた。また剖検組織における RNA-FISH 解析でも RNA-foci が中枢神経系に広範に認められた。

D. 考察

小脳失調症と運動ニューロン疾患の両者の臨床的特徴を併せもつ新たな遺伝性疾患 Asidan は、いわばそれぞれの様々な臨床スペクトラムをもつ脊髄小脳変性症と運動ニューロン病の交差点に立脚する臨床的位置づけをもっており、単に SCA の 36 番目という位置づけを超えている。その分子病態においても GGCCUG

RNA-foci やマイクロ RNA (MIR1292) の関与するユニークな病態が想定される。また Asidan に続いて 2 番目の hexanucleotide repeat 延長病である chromosome 9p-linked ALS/FTD における運動ニューロン障害や前頭葉機能障害を生じる分子病態に関して Asidan と共通する部分があるかどうかなど、今後の検討課題も多い。

E. 結論

NOP56 遺伝子イントロン 1 における GGCCUG リピート延長を原因遺伝子変異とし、緩徐進行性の小脳失調症を主症状として運動ニューロン障害を高率に合併する新規の遺伝性疾患 Asidan/SCA36 を見出した。本疾患の分子病態解明は SCA と MND の両疾患の克服へ寄与するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Abe K, Ikeda Y, Kurata T, Ohta Y, Manabe Y, Okamoto M, Takamatsu K, Ohta T, Takao Y, Shiro Y, Shoji M, Kamiya T, Kobayashi H, Koizumi A: Cognitive and affective impairments of a novel SCA/MND crossroad mutation Asidan. *Eur J Neurol* 2012; 19: 1070-1078
- 2) Ikeda Y, Nagai M, Kurata T, Yamashita T, Ohta Y, Nagotani S, Deguchi K, Takehisa Y, Shiro Y, Matsuura T, Abe K: Comparisons of acoustic function in SCA31 and other forms of ataxias. *Neurol Res* 2011; 33: 427-432
- 3) Ikeda Y, Ohta Y, Kobayashi H, Okamoto

- M, Takamatsu K, Ota T, Manabe Y, Okamoto K, Koizumi A, Abe K: Clinical features of SCA36: a novel spinocerebellar ataxia with motor neuron involvement (Asidan). *Neurology* 2012; 79: 333-341
- 4) Ikeda Y, Ohta Y, Kurata T, Shiro Y, Takao Y, Abe K: Acoustic impairment is a distinguishable clinical feature of Asidan/SCA36. *J Neurol Sci* 2013; 324: 109-112
- 5) Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, Ikeda Y, Hitomi T, Akechi Y, Habu T, Liu W, Okuda H, Koizumi A: Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 121-130
- 6) Miyazaki K, Yamashita T, Morimoto N, Sato K, Mimoto T, Kurata T, Ikeda Y, Abe K: Early and selective reduction of NOP56 (Asidan) and RNA processing proteins in the motor neuron of ALS model mice. *Neurol Res* 2013; 37:744-754
- 7) Morimoto N, Yamashita T, Sato K, Kurata T, Ikeda Y, Kusahara T, Murata N, Abe K: Assessment of swallowing in motor neuron disease and Asidan/SCA36 patients with new methods. *J Neurol Sci* 2013; 324: 149-155
- 8) 阿部康二, 池田佳生: SCA36 (新しい ALS/SCA crossroad mutation Asidan). *神経内科* 2012; 77: 104-108
- 9) 阿部康二, 池田佳生: SCA36 (別名 Asidan). *BRAIN and NERVE* 2012; 64: 937-941
- 10) 阿部康二, 池田佳生: 新しい ALS/SCA crossroad mutation Asidan (SCA36) の臨床と分子遺伝学. *神経内科* 2013; 78: 271-276
- 11) 池田佳生, 阿部康二: 神経内科領域の難治性疾患診療. *岡山医学会雑誌* 2011; 123: 227-230
- 12) 池田佳生, 阿部康二: SCA36 の分子病態. *神経内科* 2013; 78: 271-276
- 13) 亀高さつき, 池田佳生, 阿部康二: 岡山大学神経内科における遺伝子検査 1,000 件の臨床疫学的解析. *臨床神経学* 2011; 51: 471-477
- 14) 松浦徹, 池田佳生, 阿部康二: 非翻訳リピート異常伸長による脊髄小脳失調症 (SCA8, SCA10, SCA12, SCA36). *最新医学* 2012; 67: 1122-1130

2. 学会発表

- 1) 池田佳生ら: SCA31 および他の小脳失調症における聴覚障害の検討. 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 19 日, 名古屋
- 2) 池田佳生ら: 新しい ALS/SCA crossroad mutation Asidan の臨床病理学的特徴. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 23 日, 東京
- 3) 池田佳生ら: 小脳失調症と運動ニューロン疾患の特徴を併せ持つ新たな遺伝性疾患 Asidan の臨床病理学的特徴. 第 106 回日本内科学会中国地方会, 2012 年 6 月 2 日, 島根

- 4) 池田佳生ら：岡山大学神経内科における SCD/MSA 症例 313 例の検討. 第 92 回日本神経学会中国四国地方会, 2012 年 7 月 7 日, 徳島
- 5) 阿部康二ら：新しい ALS/SCA crossroad mutation Asidan の認知機能障害. 第 37 回日本神経心理学会総会. 2013 年 9 月, 札幌

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

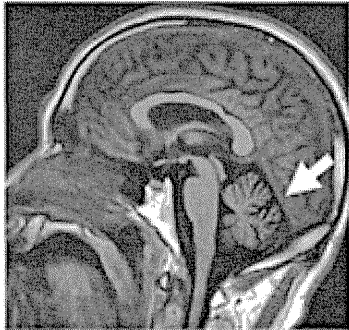
新しいSCA/ALS crossroad mutation Asidan

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
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学 阿部康二

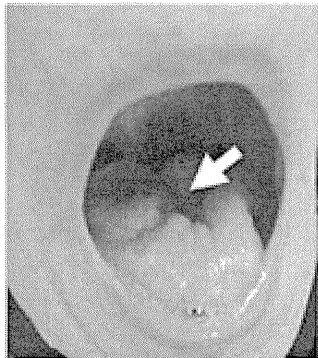
NOP56 (nucleolar protein 56) 遺伝子イントロン1
におけるGGCCTGリピート延長の発見

Asidan/SCA36の臨床像

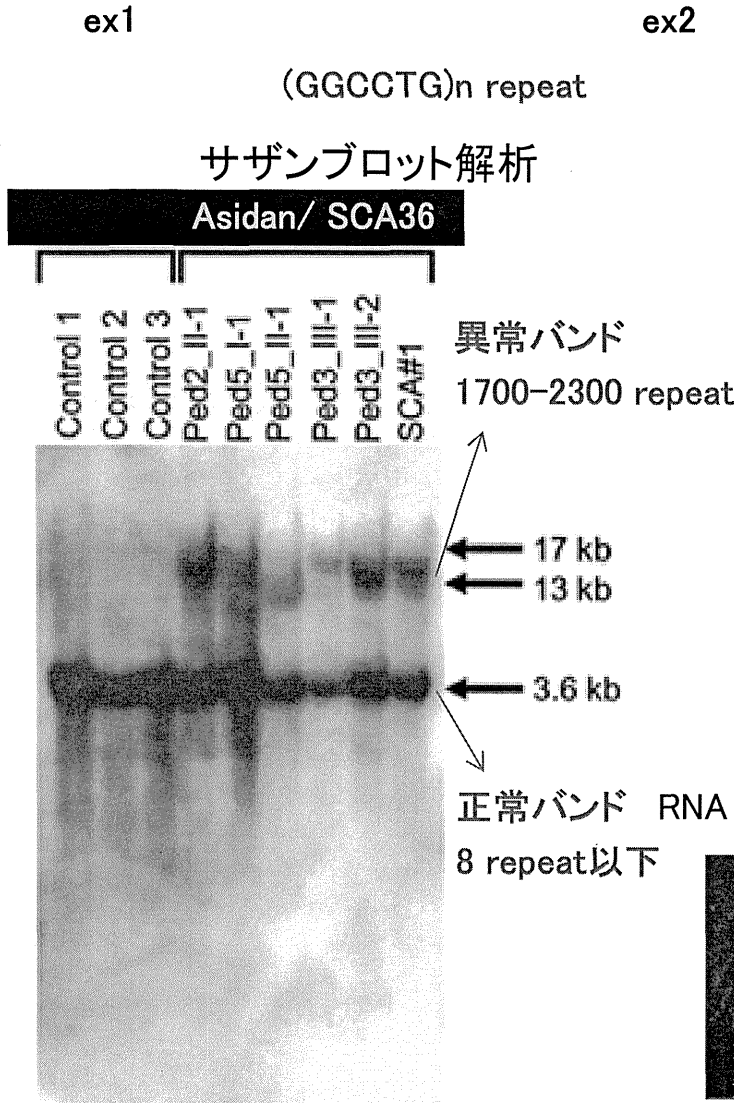
- ・小脳失調症で発症
- ・罹病期間10年を超える頃から運動ニューロン障害が明らかになる



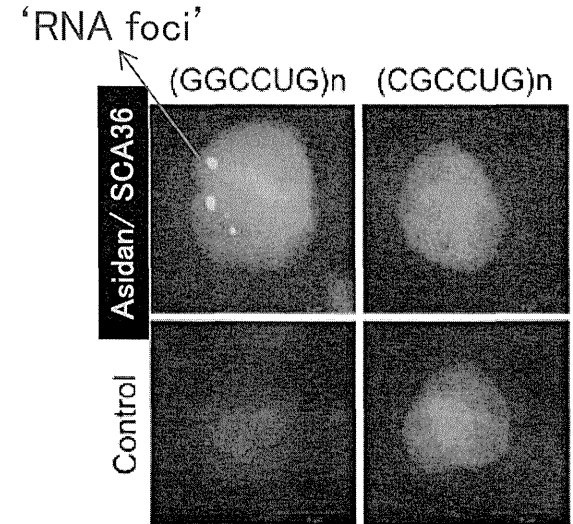
比較的小脳に局限した萎縮



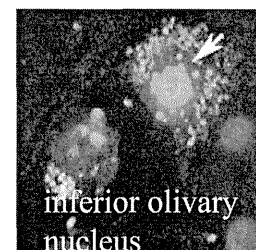
舌萎縮と線維束性収縮



RNA-FISH解析



Asidan/SCA36患者リンパ芽球核内にGGCCUGリピート転写産物由来の'RNA foci'を認めた。またこの'RNA foci'は転写因子SRSF2と共局在していた。



多系統萎縮症における分子バイオマーカーの探索

研究協力者 内海 潤（公益財団法人 がん研究会）
共同研究者 浜 結香、矢部一郎、佐久嶋 研、廣谷 真、加納崇裕、
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）
堀内正隆、藤井清永（北海道大学大学院薬学研究員構造生物学）
瀧川一学（北海道大学創成研究機構研究部）
若林孝一、東海林幹夫（弘前大学医学研究科脳神経病理学講座）
緒方昭彦（北海道脳神経外科記念病院）

研究要旨

多系統萎縮症（MSA）の疾患関連バイオマーカーを探索する目的で、白血球の発現解析及び髄液のプロテオミクス解析を行った。その解析データを非神経疾患対照群もしくは他の神経疾患と比較検討し、発現亢進もしくは低下している因子を抽出し、バイオインフォマティクスツールで解析した。その結果は、変動因子は炎症と神経変性に関わっているものが多かった。

A. 研究目的

多系統萎縮症（MSA）の診断マーカーと病態マーカーを探索するために、白血球発現解析及び髄液プロテオーム解析を行い、変動因子（疾患関連バイオマーカー）の同定を行う。

B. 研究方法

発現解析：対象は非血縁の MSA 患者 4 名と非血縁の成人対象群 4 人（いずれも男性 3 名、女性 1 名）、及び片方のみ MSA を発病した一卵性双生児 2 組（男女各 1 組）である。末梢血白血球から mRNA を抽出して whole Human Genome 4X44K アレイ（Agilent）により発現解析を行なった。一卵性双生児の遺伝的検証は SNP アレイに

より検証した。対照群と比較して変動率 >1.5 倍の遺伝子群を解析対象とした。バイオインフォマティクス・ツール（DAVID functional annotation bioinformatics analysis 及び MetaCore data-mining and pathway analysis）を用いて主としてオントロジー解析により疾患関連因子を抽出し、その相互関係を解析した。

髄液プロテオミクス：アルツハイマー病、MCI、パーキンソン病、MSA、ALS、多発性硬化症、非神経疾患対照群の総数 24 名の髄液を、前処理で過剰蛋白を除いた後、LC-ESI-MS によるプロテオーム解析を行なった。

（倫理面への配慮）

本研究は医の倫理委員会もしくは自主

臨床研究審査委員会で審査・承認を得て行った。

C. 研究結果

患者群で発現亢進していた遺伝子群は immune response (補体とサイトカイン系因子) であり、発現低下していた群は transmission of nerve impulse と neurological system process、血管新生系とイオン輸送系に關与する遺伝子群であった。髄液プロテオミクスでは変性疾患において 154 種類のタンパク質が検出され、オントロジー解析では、高含量のタンパク質 (57 種) は細胞マトリックス外蛋白の再構成と結合組織のタンパク質分解過程に、低含量のタンパク質 (97 種) は神経新生の軸索ガイダンスやシナプス形成に關与するタンパク質であった。

D. 考察

白血球の発現解析では炎症反応の起きていること、神経伝達系の機能抑制ならびに酸素とイオン補給 (代謝機能) の抑制の起きていることが示された。いずれも変性疾患である MSA の病態に矛盾しない結果であった。変性疾患において髄液プロテオミクスで高含量と低含量のタンパク質をオントロジー解析した結果では、同じく、炎症と組織リモデリングに關係する因子が多かった。すなわち、神経変性疾患には、各疾患固有の因子に加えて、共通したイベントのあることが示された。

E. 結論

白血球の遺伝子発現解析及び髄液のプ

ロテオミクス解析により、MSA における炎症と変性に關連する因子が抽出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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) 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

- 1) 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
- 2) 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

- 3) 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

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

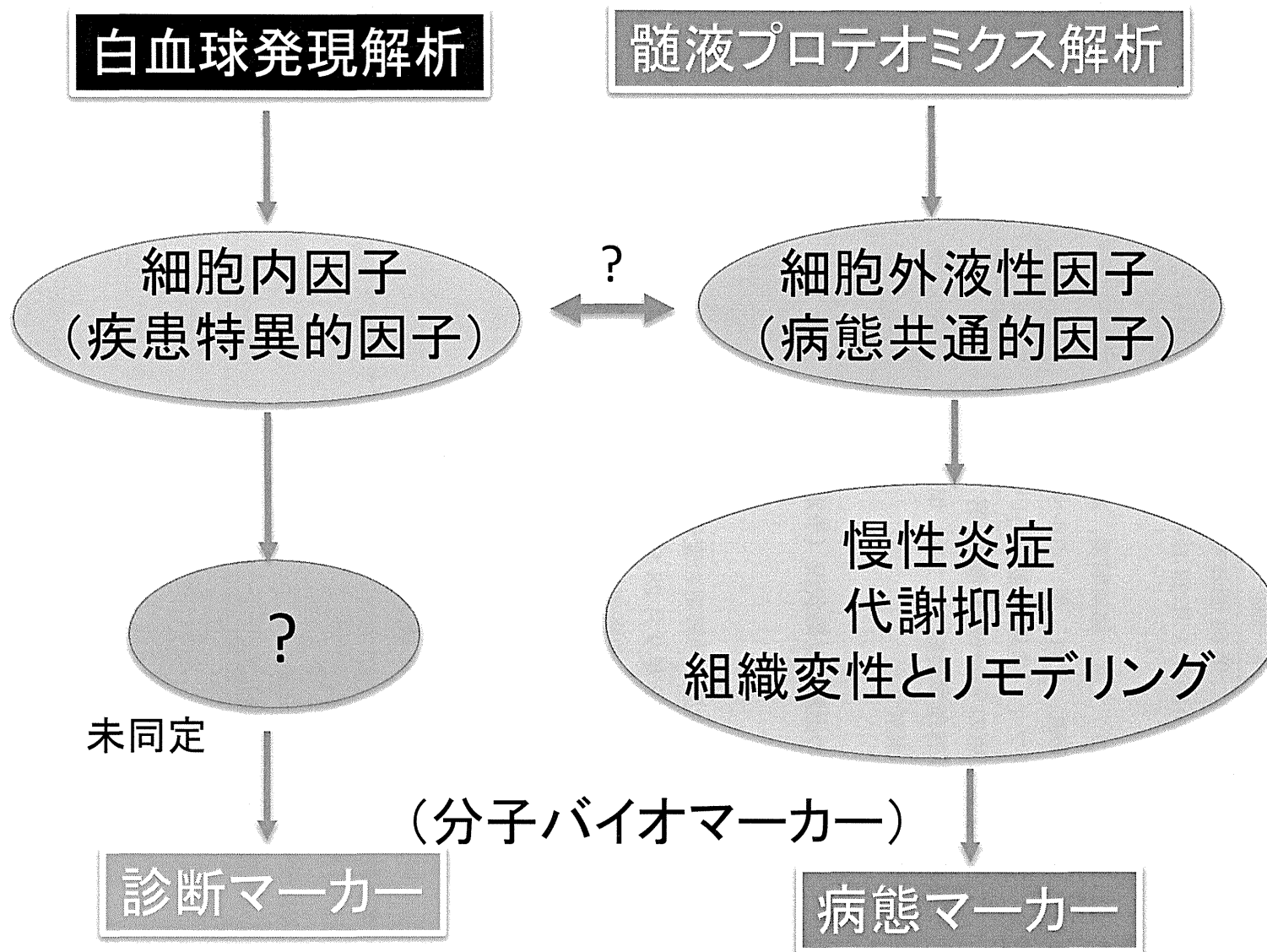
2. 実用新案登録

特記すべきこと無し。

3. その他

特記すべきこと無し。

対象疾患: 多系統萎縮症(MSA)



Machado-Joseph 病および多系統萎縮症の自然史・病像について

研究分担者	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）
	桑原 聡（千葉大学医学研究院 神経内科）
	新井 公人（国立病院機構 千葉東病院）
	山本 達也（千葉大学医学研究院 神経内科）
	高梨 雅史（順天堂大学医学部 脳神経内科）
	城 崇之（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

Machado-Joseph 病 (MJD) や多系統萎縮症 (MSA) の自然史・病像をより明らかにすることにより、これらの疾患での生じ得るライフイベントの予想・予知や、早期診断などを可能にするための臨床的研究を行った。またこれら疾患におけるライフイベントや病像の背景にある遺伝的背景についても併せて検討を行った。初年度は MJD における尿路感染症・誤嚥性肺炎・骨折などの介入可能なライフイベントの出現時期についての研究を行い、骨折が病初期から出現し得るイベントであり注意すべきであることを明らかにした。2 年目では MSA のうち特に MSA-P に焦点を当てその病像の解析を行い、本邦と欧米の MSA-P の病像の違いについて明らかにした。3 年目は MSA の近親者におけるパーキンソニズムの集積についての遺伝学的背景について研究を行った。

A. 研究目的

現在脊髄小脳変性症には根本的治療はなく、対症療法も十分に有効なものは少ない。そういった中で、疾患の自然史や病像の正確な把握に基づいた、ライフイベントの出現時期のより正確な予測や、あるいは多系統萎縮症などの孤発性疾患

における早期診断は、十分な臨床的意義があるものとする。これを可能とするような臨床的背景について研究を行った。

B. 研究方法

初年度は、千葉大神経内科に平成 22 年から平成 23 年に当院外来通院歴がある

MJD 患者 23 名（男性 11 名、女性 12 名；平均年齢 55.1 歳（25-77 歳））。当科ではほぼ半年おきに SCD 患者に対して臨床評価として ICARS の評価を行っている。このため対象患者の医療記録から ICARS の評価記録ならびに外傷性骨折・薬物治療が必要な尿路感染症及び誤嚥性肺炎の有無とあった場合の出現時期と発症からの経過時間について診療録を調査し、当該イベントが発生する直前の ICARS スコア及び各サブスコアを調べた。

2 年目は順天堂大学医学部附属順天堂医院脳神経内科に 2009 年から 2012 年まで入院した MSA 患者 79 名について、その臨床病型を調べた。また MSA-P 患者について臨床症状・ADL・検査所見などを調査し、結果をこれまでの本邦あるいは欧米からの既報告データと比較した。また、当院通院中の Parkinson 病 (PD) 患者や脊髄小脳変性症 (SCD) との患者数比も比較した。

3 年目はパーキンソン病 (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）

千葉大学及び順天堂大学の生命倫理委員会においてすでに承認を受けた研究に従い行った。

C. 研究結果

初年度の研究では、調査した MJD 患者

群において、4 名に尿路感染症の発症を認め、2 名に誤嚥性肺炎の発症を認めた。発症から尿路感染症発症までの経過は平均 17.1 ± 1.5 年 (\pm SEM) であり、誤嚥性肺炎発症までの経過は平均 17.2 ± 3.0 年であり、両者はほぼ同様であった。一方イベント直前の ICARS スコアは尿路感染症発症直前値が平均 65.8 ± 2.2 (range: 61-70) であり、誤嚥性肺炎発症直前値が平均 76.0 ± 5.0 (range: 71-81) であった。また ADL に関しては、尿路感染症発症直前の ICARS の歩行サブスケールの値が 7 (介助歩行) の者が 2 名、8 (歩行不能) の者が 2 名であり、誤嚥性肺炎発症直前の ICARS 歩行サブスケールの値は 2 名とも 8 であった。

一方外傷性骨折に関しては 10 名の患者で 11 回のイベントが観察され、発症から外傷性骨折発生までの期間は平均 12.2 ± 2.1 年であり、ICARS 直前値は平均 44.4 ± 6.8 (range: 13-70) であった。また ADL に関して、骨折直前の ICARS の歩行サブスケールの値は 1 から 8 と大きければつきを認めた。この外傷性骨折は対照群である SCA6 群では認められず、また MSA でも 3 例でのみ認められるのみであり、対照群に比べ MJD 群で有意に高頻度であった。

2 年目の研究では、MSA 患者 79 名中、MSA-P と診断されていたのは 53 名（平均発症 62.3 歳）で MSA-C は 26 名（平均発症 59.9 歳）であった。このため MSA-P と MSA-C の比は約 2:1 であり、これまでの本邦他施設からの報告は MSA-C が多いとするものが大多数であり、それとは異なる結果であった。

結果をまとめると、今回検討した MSA-P 患者群のプロファイルは、抗パーキンソン病薬への部分的な反応性、ADL の観点から見た場合の病勢の進行速度の速さなど、多くの点で欧米・本邦からの既報告と合致していた。しかし、情動失禁の症状の出現頻度など、一部の症状については今回の患者群では欧米からの既報告にくらべ著しく低かった。この結果には、本邦と欧米との遺伝学的背景の差異が反映されている可能性があるものと考えられた。このため、欧米から報告されている MSA-P 早期診断のための疫学研究は、本邦の MSA-P の早期診断には直ちには適応できない可能性が示唆された。このため、本邦における MSA-P 早期診断のためには、独自の疫学研究の必要性が示されたものと考えられた。

3 年目の研究では、*COQ2* variant が MSA/PD 合併の 1 家系で認められた。しかし親が 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

尿路感染症及び誤嚥性肺炎発症については一定期間 ICARS の経時的評価を行うことにより、患者毎の尿路感染症の発症時期を相応の精度で予見できる可能性があることを示すと考えられた。また、尿路感染症発症と誤嚥性肺炎発症に関し、発症からの経過年数にはほとんど差がないにも関わらず ICARS のスコアでは差があったことから、このようなイベントの予測に経過年数ではなく ICARS のスコア変化を利用することが有用である可能性も示された。また、こういった予測が可能になることにより、患者マネジメントの質の向上が図れる可能性が示唆された。

外傷性骨折に関しては、MJD では外傷性骨折は比較的高頻度に認められる症状であり、発症直前の ICARS のスコア及び歩行サブスケールのスコアがバラバラであることから、病期によらず発症するイベントである可能性が高いことが示唆された。また純粋小脳型である SCA6 群では外傷性骨折は認められないことから、外傷性骨折は小脳性運動失調にさらに前庭系障害やパーキンソニズムなど他の系統変性の影響が加わった時に生じやすいイベントである可能性が示唆された。

本邦の MSA-P の臨床像や自然史は、欧米の MSA-P に関する報告と一部を異にすることが示された。このため、MSA-P と PD の病早期での鑑別は難しいとされるが、MSA-P 早期診断のために行われた欧米の

疫学研究の成果は、本邦の MSA-P には直ちには適応できない可能性が示唆された。このため、本邦における MSA-P の早期診断のためには、本邦独自での疫学研究を行っていく必要性が示唆された。

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。

E. 結論

尿路感染症や誤嚥性肺炎は MJD の病後期に認められるイベントであり、またイベントが生じる際の ICARS スコアは比較的各患者間でばらつきが少なく、このため一定期間 ICARS の経時的評価を行うことにより患者毎のイベントの発生時期をある程度予見できる可能性があることが示唆された。一方外傷性骨折は MJD で高頻度に認められかつ病期を通じいつでも発症し得ることが示され、マネジメント上注意が必要であることが示唆された。MSA-P 早期診断のために行われた欧米の疫学研究の成果は、本邦の MSA-P には直ちには適応できない可能性が示唆された。このため、本邦における MSA-P の早期診断のためには、本邦独自での疫学研究を行っていく必要性が示唆された。

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。また家族性 PD においても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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogawa Y, Ito S, Makino T, Kanai K, Arai K, Kuwabara S: Flattened facial colliculus on magnetic resonance imaging in Machado-Joseph disease. *Mov Disord* 2012; 27(8): 1041-6
- 2) Ishige T, Sawai S, Itoga S, Sato K, Utsuno E, Beppu M, Kanai K, Nishimura M, Matsushita K, Kuwabara S, Nomura F: Pentanucleotide repeat-primed PCR for genetic diagnosis of spinocerebellar ataxia type 31. *J Hum Genet* 2012; 57(12): 807-8
- 3) Yamanaka Y, Asahina M, Akaogi Y, Fujinuma Y, Katagiri A, Kanai K, Kuwabara S: Cutaneous sympathetic dysfunction in patients with machado-joseph disease. *Cerebellum* 2012; 11(4): 1057-60
- 4) Yonezu T, Ito S, Kanai K, Masuda S, Shibuya K, Kuwabara S: A case of adult-onset alexander disease featuring severe atrophy of the medulla oblongata and upper cervical cord on magnetic resonance imaging. *Case Rep Neurol* 2012; 4(3): 202-6
- 5) 金井 数明: Machado-Joseph 病 (MJD). *最新医学* 2012; 67(5): 1077-1081

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

2. 学会発表

- 1) 金井数明, 山本達也, 新井公人, 服部信孝, 桑原 聡: Machado-Joseph 病におけるライフイベントの自然史. 第 6 回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres. 2012 年 10 月 12 日. 京都
- 2) 金井数明, 新井 公人, 安井 健一, 平野 成樹, 渋谷 和幹, 藤巻 由美, 能登 祐一, 野村 文男, 中島 健二, 桑原 聡: Machado-Joseph 病において CAG リピート数は疾患進行速度と相関する. 第 5 回パーキンソン病運動障害疾患コンgres, 2011 年 10 月 7 日, 東京
- 3) 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

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

Machado-Joseph病および多系統萎縮症の自然史・病像について

●MJDにおける骨折

疾患	症例数	イベント数	平均罹病期間(yr)	平均最終ICARSスコア
MJD	23	11	14.1±1.5	54.4
SCA6	12	0	19.3±2.4	52.7
MSA	18	3	4.7±0.8	53.3

MJDで骨折を経験する症例の頻度は、他疾患での頻度よりも有意に高かった

特にMJDとSCA6の間では平均罹病期間も重症度(ICARSスコア)もほとんど差がないにも関わらず、骨折の頻度に大きな差を認めた

10名の患者で11回の外傷性骨折が確認された

経過 平均12.2±2.1年(±SEM) 発症前ICARS 40.7

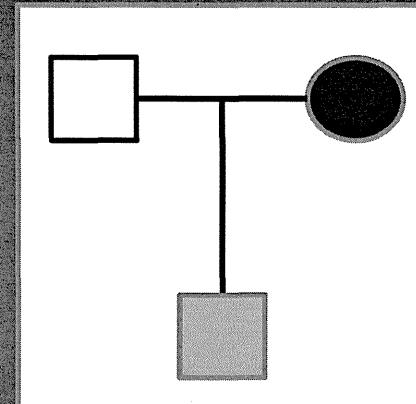
⇒発症前のICARSスコア及び歩行サブスケールに大きなばらつきを認めた

●日本人MSA-P患者での“Red Flags” <()内:欧米の既報>

Early instability	45.3%	(67.9%)
Rapid progression	49.1%	(66.7%)
Camptocormia	18.9%	(32.1%)
Pisa syndrome	11.3%	(42.1%)
首下がり	30.2%	(36.8%)
Severe dysphonia	39.6%	(50.9%)
Severe dysphagia	34.0%	(33.3%)
強制笑い	1.9%	(26.3%)
強制泣き	1.9%	(14.0%)

⇒感情障害の頻度は本邦と欧米間で著しく異なる

●MSA家系におけるPD合併とCOQ2変異



母 58歳: MSA-C
54歳発症
V393A/wt
息子 29歳:
young onset PD
28歳発症
wt/wt

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

常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺 4 家系の新規原因遺伝子同定と探索

研究協力者 嶋崎晴雄（自治医科大学内科学講座神経内科学部門）
共同研究者 本多純子，迫江公己，滑川道人，松浦 徹，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，福田陽子，高橋祐二，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，松島雄一，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）
矢崎正英，中村勝哉，吉田邦広，池田修一
（信州大学脳神経内科リウマチ・膠原病内科）
吉村 淳，土井晃一郎，森下真一
（東京大学大学院新領域創成科学）
瀧山嘉久（山梨大学医学工学総合研究部神経内科学講座）

研究要旨

複合型と純粋型各 2 家系の常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺 4 家系の原因遺伝子同定を行った。複合型 2 家系では，同胞患者で連鎖解析を行い，染色体の一部に候補領域を特定した。発端者のエクソーム解析で同領域内に，1 家系で *CI2orf65* 遺伝子の新規ナンセンス変異と，もう 1 家系で *LYST* 遺伝子の新規ミスセンス変異をホモ接合体で同定した。*CI2orf65* 変異による患者皮膚線維芽細胞のミトコンドリア機能低下を証明し，SPG55 として報告した。また，*LYST* 変異を持つ患者末梢血白血球に巨大顆粒を見出し，Chediak-Higashi 症候群と診断した。

次に，純粋型 2 家系の原因遺伝子変異検索を行った。患者と健常者で連鎖解析を行い，染色体の一部に候補領域を特定した。発端者のエクソーム解析で候補領域内に，それぞれの家系で異なった新規遺伝子のアミノ酸変化を伴う新規ミスセンス変異をホモ接合体で同定した。各変異は家系内で共分離しており，正常コントロールには認められず，原因遺伝子変異である可能性が高いと考えられた。

A. 研究目的

遺伝性痙性対麻痺 (HSP) は，両下肢の痙性対麻痺を中核症状とし，その他様々な症状を合併しうる症候群である。現在ま

でのところ，その遺伝子座は SPG1～57 ま
で同定されており，そのうち 40 近くの原
因遺伝子が単離されている。遺伝形式は
常染色体優性 (AD) のものが多く，半数

以上の例で原因遺伝子変異が同定されるが、常染色体劣性 (AR) のものは少なく、多くは原因遺伝子やその変異が不明である。

我々は、常染色体劣性遺伝と考えられる、両親が近親婚で同胞発症者が存在する 4 家系について、その遺伝子座と原因遺伝子変異同定を試みた。

B. 研究方法

両親が従兄弟婚で、視神経萎縮と末梢神経障害を伴う AR-HSP (家系 1)、末梢神経障害と小脳症状を伴う AR-HSP (家系 2)、純粋型 AR-HSP 2 家系 (家系 3, 4) を対象とした。

同意が得られた発症者 2 名の末梢血より DNA を抽出。患者 1-2 名と協力が得られた健常者の DNA を用いて一塩基多型を用いた連鎖解析を家系毎に行い、候補遺伝子領域を特定した。また、アレイ CGH にて候補領域の遺伝子コピー数異常を検討した。次に、患者 1 名の DNA のエクソン部分のみを濃縮し、次世代シーケンサーを用いてエクソーム解析を行った。さらに、同定された遺伝子の変異が、他の原因未同定の遺伝性痙性対麻痺家系にあるかを直接シーケンス法で検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたり、科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」、文部科学省・厚生労働省・経済産業省「遺伝子解析に関わる倫理問題」を遵守した。

自治医科大学の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する取扱規程」を遵守し、遺伝子解析研究許可申請書と研究計画書

を作成し、生命倫理委員会に申請し、認可されている。

ヒト DNA の提供者には、インフォームドコンセントを受ける手続きとして、十分な理解を得られるように文章を用いて説明し、人権および利益の保護の取扱いについても十分に配慮した。

C. 研究結果

まず、視神経萎縮と末梢神経障害を伴う AR-HSP (家系 1) については、発症者 2 名で連鎖解析を行い、4 つの染色体に連鎖部位を同定した。連鎖部位に遺伝子コピー数の異常は無かった。発症者 1 名のエクソーム解析を行い、連鎖部位内に、核由来のミトコンドリア翻訳関連遺伝子である、*CI2orf65* の新規ナンセンス変異 (c. 394C>T, p. R132X) をホモ接合体で同定した。この変異は同胞患者にもホモ接合体で存在した。発症者の皮膚線維芽細胞を用いて、ミトコンドリア翻訳機能の低下により複合体 I と IV の活性低下を証明した。

次に、末梢神経障害と小脳症状を伴う AR-HSP (家系 2) についても、発症者 2 名で連鎖解析を行い、4 つの染色体に連鎖部位を同定した。発症者 1 名のエクソーム解析を行い、連鎖部位内に、Chediak-Higashi 症候群 (CHS) の原因遺伝子 *LYST* の新規ミスセンス変異 (c. 4189T>G, p. F1397V) をホモ接合体で同定した。この変異は家系内で共分離していた。また患者 2 名の末梢血白血球には、CHS に特徴的な巨大顆粒が認められた。

次に、純粋型 AR-HSP 2 家系 (家系 3, 4) について、原因遺伝子探索を行った。

家系 3 では、発症者 2 名と非発症者 3 名での連鎖解析の結果、4 つの染色体に連鎖部位を同定した。患者 1 名のエクソーム解析により、その領域内の 2 つの遺伝子にそれぞれホモ接合体で新規一塩基置換 (SNV) を同定した。そのうち 1 つの遺伝子 A は中枢神経系に発現しており、その SNV は家系内で共分離しており、正常コントロール 208 名に存在しなかった。さらに AR が疑われる HSP 家系患者 89 例には遺伝子 A の変異は存在しなかった。

家系 4 では、発症者 1 名と非発症者 1 名で連鎖解析の結果、11 の染色体に弱い連鎖部位を認めた。患者 1 名のエクソーム解析により候補領域内の 3 つに遺伝子にホモ接合体の新規 SNV を同定した。うち 1 つの遺伝子 B の SNV が家系内で共分離していた。この変異はコントロール 326 名には存在せず、AR が疑われる HSP 家系患者 89 例と 13 例の近親婚のある HSP 家系にも遺伝子 B に病的変異は同定されなかった。

D. 考察・結論

C12orf65 のナンセンス変異は、視神経萎縮と末梢神経障害を伴った HSP 家系の原因遺伝子変異と考えた。この変異により短い *C12orf65* 蛋白が作られ、ミトコンドリア蛋白生成過程における翻訳停止機構に異常が生じ、ミトコンドリアの機能不全が生じ、疾患を発症したと考えられた。この病型は、HUGO で SPG55 とされ、報告した。(論文 5)

小脳失調、末梢神経障害を伴った HSP 家系の遺伝子解析で *LYST* 遺伝子の新規ミスセンス変異を同定した。成人発症で神

経症状のみを呈していたが、白血球の巨大顆粒を認めたことより、この家系の神経症状は、成人発症の CHS に由来すると考えられた。劣性遺伝性の痙性対麻痺や小脳失調、末梢神経障害を呈する疾患の鑑別疾患として、CHS も念頭に置くことが必要であると考えられた。(論文 10)

純粋型 AR-HSP 2 家系で、それぞれ異なる原因と考えられる遺伝子 A、B とその変異を同定した。

E. 今後の展望

遺伝子 A、B とその変異が真の病的変異であるか検証するため、ネッタイツメガエルなどのモデル動物にて、transcription activator-like effector nucleases (TALEN) を利用した遺伝子編集技術を用いて遺伝子 A、B の相同遺伝子をそれぞれ破壊し、表現形を観察するなどの機能解析を現在行っている。(広島大学理学部 高橋先生、佐久間先生、山本先生との共同研究)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 嶋崎晴雄：常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺の臨床—SPG11, ARSACS を中心に—, 特集／遺伝性痙性対麻痺—update. 神経内科 2011; 74(2): 127-134
- 2) 瀧山嘉久, 石浦浩之, 嶋崎晴雄, 辻省次, 西澤正豊. 遺伝性痙性対麻痺の疫学: JASPAC. 特集／遺伝性痙性対麻痺—update. 神経内科 2011; 74(2): 141- 145
- 3) 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 (6): 746-747
- 4) Namekawa M, Takiyama Y, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Shimazaki H, Yamagata T, Momoi M, Nakano I: 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(6): 1389-92
- 5) Shimazaki H, Takiyama Y, Ishiura H, Sakai C, Matsushima Y, Hatakeyama H, Honda J, Sakoe K, Naoi T, Namekawa M, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Goto Y, Nakano I. A homozygous mutation of *C12orf65* causes spastic paraplegia with optic atrophy and neuropathy (SPG55). J Med Genet 2012; 49 (12): 777-84
- 6) 嶋崎晴雄, 中野今治: 脊髄小脳変性症, 多系統萎縮症, 進行性核上性麻痺. 疾患概念の変遷と, 脊髄疾患ならびにパーキンソン病との鑑別. 脊髄外科 SPINAL SURGERY 2012; 26(3): 278-283
- 7) Shimazaki H, Takiyama Y, Honda J, Sakoe K, Namekawa M, Tsugawa J, Tsuboi Y, Suzuki C, Baba M, Nakano I: Middle cerebellar peduncles and pontine T2 hypointensities in ARSACS. J Neuroimaging 2013; 23 (1): 82-85
- 8) 嶋崎晴雄. 視神経萎縮, 末梢神経障害を伴う常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺 (SPG55). 特集/脊髄小脳変性症の研究の進歩. 神経内科 2013; 78(3):283-9
- 9) Buchert R, Uebe S, Radwan F, Tawamie H, Issa S, Shimazaki H, Henneke M, Ekici AB, Reis A, Abou Jamra R: Mutations in the mitochondrial gene *C12ORF65* lead to syndromic autosomal recessive intellectual disability and show genotype phenotype correlation. Eur J Med Genet 2013; 56 (11): 599-602
- 10) Shimazaki H, Honda J, Naoi T, Namekawa M, Nakano I, Yazaki M, Nakamura K, Yoshida K, Ikeda S, Ishiura H, Fukuda Y, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Takiyama Y: Autosomal recessive complicated spastic paraplegia with a novel *lysosomal trafficking regulator* gene mutation. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2014 (in press)
- 11) 嶋崎晴雄. 常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺. 神経症候群 II-その他の神経疾患を含めて-第2版. 日本臨床 2014, (印刷中)

2. 学会発表

- 1) 嶋崎晴雄, 石浦浩之, 福田陽子, 本多純子, 太田京子, 直井為任, 滑川道人, 迫江公己, 高橋祐二, 後藤順, 辻省次,