

を認めた。脳血流 SPECT では前頭葉内側、側頭葉、脳幹の血流低下が顕著であった。問診上、同様の家族歴を母、母方叔母と叔父、兄に認めた。母方叔母と叔父は既に死亡しており詳細不明であったが、母と兄については診察する機会を得た。兄は現在 64 歳で発症者とはほぼ同様の臨床経過と神経徴候を認めていた。母は現在 87 歳で 80 歳頃よりパーキンソニズムで発症しており、認知機能障害の程度は子等のそれより軽度であった。

	症例1(発症者)	症例2(兄例)	症例3(母例)
発症年齢	43	52	80
初発症状	もの忘れ	もの忘れ	不安不眠、もの忘れ
罹病期間(年)	18	12	9
発症から歩行障害発症までの期間(年)	9	11	3
頭部筋強剛	+++	+++	+
姿勢反射異常	+++	+++	++
垂直性眼球運動障害	+	+	±
側頭葉萎縮	+++	+++	+
脳幹萎縮	+++	+++	±
Hot cross bun sign	+	+	±
脳血流SPECT	側頭葉～脳幹の血流低下	側頭葉～脳幹の血流低下	側頭葉～脳幹の血流低下
MIBG心筋シンチ	正常	正常	正常

表 1. 発症者 3 名の臨床症状の要約

倫理面での配慮：本研究は北海道大学医学研究科医の倫理委員会の承認の下、対象者には研究の趣旨を文書で説明し、文書にて同意を得た。

C. 研究結果

インフォームドコンセントをご家族より得て血液より DNA を抽出した。アルツハイマー病や前頭側頭葉変性症を初めとする認知症関連の原因遺伝子 11 遺伝子、家族性パーキンソン病の原因遺伝子 15 遺伝子、その他神経変性や同様の神経症状を呈し得る可能性のある 17 遺伝子、孤発性進行性核上性麻痺を対象とした GWAS 研究にて関連が示唆されている 3 遺伝子の合計 46 遺伝子とミトコンドリア遺伝子を候補遺伝子として解析したが、それらの遺伝子には原因となる変異を認めなかった (Hoglinger GU, et al. Nat

Genet 2011; 43: 699-705 & Stamelou M, et al. Mov Disord 2013; 28: 1184-99)。候補遺伝子の一覧を表 2 に示す。

次いで、連鎖解析および発症者 3 名のエクソーム解析を行い、原因遺伝子の同定を試みたところ、186 箇所の原因変異候補が認められたが、原因変異同定には至らなかった。

認知症関連遺伝子	APP	TDP-43	DNAJB6	
	PSEN1	FUS	PRNP	
	PSEN2	VCP	CSF1R	
	MAPT	PRGN		
	C9ORF72	CHMP2B		
	パーキンソン病関連遺伝子	SNCA	DJ1	FBXO7
		PARKIN	ATP13A2	NUCKS1
UCHL1		GIGYF2	VPS35	
LRRK2		Omi/HTRA2	EIF4G1	
PINK1		PLA2G6	DCTN1	
ミトコンドリア関連遺伝子	mtDNA	POLG2	ANT1	
	POLG1	PEO1		
	PSPのGWAS候補遺伝子	STX6	EIF2AK3	MOBP
その他の候補遺伝子		GBA	UBQLN2	ATN1
		NPC1	SQSTM1	TBP
	CYP27A1	ATXN1	GFAP	
	TNPO1	ATXN2	RGPD5	
	UBQLN1	ATXN3	RAN	

表 2. 候補遺伝子一覧

D. 考察

現在のところ 19 家系の遺伝性進行性核上性麻痺が報告されている (Fujioka S et al. Neurodegener Dis 2013 DOI: 10.1159 /000354975)。そのうち MAPT 遺伝子変異により発症する家系が存在することは知られているが、本家系では MAPT 遺伝子変異は認められなかった。また、1 番染色体長腕に連鎖している家系も報告されているが、本家系においては同領域への連鎖は認められなかった。また、最近 DCTN1 遺伝子変異による進行性核上性麻痺家系も報告されているが、DCTN1 遺伝子変異も認められなかった。臨床的には進行性核上性麻痺に矛盾しない臨床症状を呈するが、神経放射線学的には側頭葉内側の萎縮が顕著であることや hot cross bun 徴候を認めることなど進行性核上性麻痺としては

非典型的な所見もある。以上のことより本家系は既知の疾患に合致しない新規疾患である可能性が高いと考えられた。

今後、原因遺伝子同定のためには発症者および非発症者のエクソーム解析および家系を対象とした連鎖解析を行うと共に、同様の症例を蓄積する必要がある。

E. 結論

1. 進行性核上性麻痺類似の臨床症状を呈する神経疾患家系を報告した。
2. 臨床像は進行性核上性麻痺に類似するが、神経放射線学的には進行性核上性麻痺に合致しない。
3. 既知の遺伝子変異を認めず、既報の候補領域にも連鎖しないため、新規疾患である可能性が高い。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 矢部一郎, 佐々木秀直: 染色体構造変化: 多系統萎縮症でのアプローチ. 臨床神経 2013; 53(11): 1333-5
- 2) Sakushima K, Hida K, Yabe I, Tsuboi S, Uehara R, Sasaki H: Different surgical treatment techniques used by neurosurgeons and orthopedists for syringomyelia caused by Chiari I malformation in Japan: clinical article. J Neurosurgery Spine 2013; 18(6): 588-92

2. 学会発表

- 1) 矢部一郎、谷野美智枝、矢口裕章、瀧山晃弘、蔡華英、林由起子、田中伸哉、佐々木秀直; *DNAJB6* 遺伝子変異による LGMD に伴った前頭側頭型認知症の病理学的検討. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 2013
- 2) 濱結香、矢部一郎、若林孝一、加納崇裕、廣谷真、大庭幸治、岩倉由合子、内海潤、佐々木秀直: パーキンソン病における血中 Neuregulin-1 SMDF の検討. Neuro2013, 京都, 2013

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得; 該当なし
2. 実用新案登録; 該当なし
3. その他; 該当なし

MSA の発症機序に関する免疫組織化学的検討

研究分担者 望月 秀樹^{1,2,3)}

研究協力者 早川 英規²⁾，永井 真貴子^{2,3)}，仁平 友子²⁾，西山 和利³⁾，水野 美邦²⁾，

1) 大阪大学神経内科学，2) 北里大学神経再生医療学講座，3) 北里大学神経内科学

研究要旨

MSA において、尾状核より被殻で細胞障害が強い事が知られている。カルシウム結合タンパクである calbindin (CALB) は、線条体に不規則に分布しており尾状核より被殻で発現が低いことから、MSA 患者の剖検脳を用いてにおいて CALB の発現、 α -synuclein (Syn) の蓄積と細胞障害の関連について検討した。全 MSA 剖検脳線条体において、GCI を確認した。DARPP-32 (D-32) と CALB は被殻で著しく発現が低下しており、神経変性も高度であった。尾状核でもそれらの発現低下が見られたが、神経変性は軽度であった。また早期病変で D-32 と CALB の発現が保たれているにもかかわらず、GCI が確認された。以上より MSA では、GCI すなわち Syn がオリゴドンドロサイトに蓄積後に、神経細胞で D-32、CALB の発現低下をきたして、神経変性が促進すると考えられた。

A. 研究目的

多系統萎縮症 (multiple system atrophy: MSA) の病理学的特徴のひとつは α -synuclein (Syn) がオリゴドンドロサイトの細胞内に glial cytoplasmic inclusion (GCI) と呼ばれる封入体を形成することである。現在、syn がオリゴドンドロサイトに蓄積するメカニズムは不明である。

Calbindin (CALB) は、脳を含む多くの器官で発現するカルシウム結合タンパクであり、CALB の重要な機能の一つはグルタメートレセプターのカルシウム流入刺激の緩衝である。カルシウムの細胞内濃度は細胞外のおよそ 100 から 1000 分の 1 である。従って CALB の乱れはカルシウム毒性に起因する変性を引き起こす。CALB は線条体に不規則に分布し、caudate head、anterior putamen で高く、posterior putamen で低いと報告されている。また MSA 患者の線条体の変性は、caudate head、anterior putamen で軽度、posterior putamen で高度と報告されている。今回、CALB の発現低下が MSA の発症に関与するか、GCI の蓄積、神経細胞変性重症度と臨床所見及び病理学的な関連について比較検討した。

B. 研究方法

今回我々は、MSA 患者 6 例と対照群として中枢神経系に病気の無い患者 5 例、disease control cases として MSA 患者と age-matched した amyotrophic lateral sclerosis (ALS) の 6 例を用いた。MSA 患者の線条体 (caudate head、anterior putamen、posterior putamen) の含まれたパラフィン包埋ブロックから厚さ 6 μ m の切片を作製し、免疫組織化学的手法を用いて神経変性の程度にスコアを付け、半定量的に比較した。

C. 研究結果

MSA 群において、MSA の特徴である GCI を線条体において全例で認めた。control 群においては、全例で GCI を認めなかった。

Table 1. Immunostaining intensity in the caudate head and putamen

0: 正常。1: 軽度な神経変性 (HE)、軽度な蓄積 (Syn、P-syn)、免疫染色性の軽度な低下 (D-32, CALB, TH)。

Case no and DX	Posterior putamen						Anterior putamen						Caudate head					
	HE	Syn	P-syn	D-32	CALB	TH	HE	Syn	P-syn	D-32	CALB	TH	HE	Syn	P-syn	D-32	CALB	TH
Control 1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Control 2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control 4	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
Control 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ALS 1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
ALS 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ALS 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ALS 4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ALS 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ALS 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MSA 1	3	3	3	3	2	3	1	1	3	3	2	3	1	1	3	3	2	3
MSA 2	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	2	2	1	0	3	3	2	2
MSA 3	3	1	2	3	3	3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MSA 4	3	3	0	3	3	3	2	2	3	3	3	3	1	1	0	3	3	2
MSA 5	1	3	3	3	3	3	0	0	0	2	1	2	0	0	1	2	1	2
MSA 6	0	3	3	2	2	2	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	1	0

2: 中程度の神経変性 (HE)、中程度の蓄積 (Syn、P-syn)、免疫染色性の中程度の低下 (D-32, CALB, TH)。

3: 高度な神経変性 (HE)、高度な蓄積 (Syn、P-syn)、免疫染色性の高度な低下 (D-32, CALB, TH)。

ns: no specimen. Dx: diagnose, Syn: α -synuclein, P-syn: phosphorylated α -synuclein, D-32: DARPP-32, CALB: calbindin.

HE 染色において線条体での神経変性の程度を検討したところ、Posterior putamen では、MSA1-4 で高度な変性、anterior putamen では2例で中程度の変性、1例で軽度な変性、caudate head では5例の内3例で軽度の変性を認めた。Posterior putamen では変性が強く、anterior putamen、caudate head に行くにつれて神経変性が軽度になる傾向を認めた。

DARPP-32 (D-32) の発現は、MSA6 の anterior putamen、caudate head を除いて高度な低下か、中程度の低下を認めた。CALB 発現はMSA5-6 の anterior putamen、caudate head を除いて高度

な低下、もしくは中程度の低下を認めた。

TH 発現はMSA6 の anterior putamen、caudate head を除いて高度な低下か、中程度の低下を認めた (Table 1)。MSA6 では、posterior putamen において D-32 と CALB の低下が見られるが HE 染色で観察される神経変性は見られない。

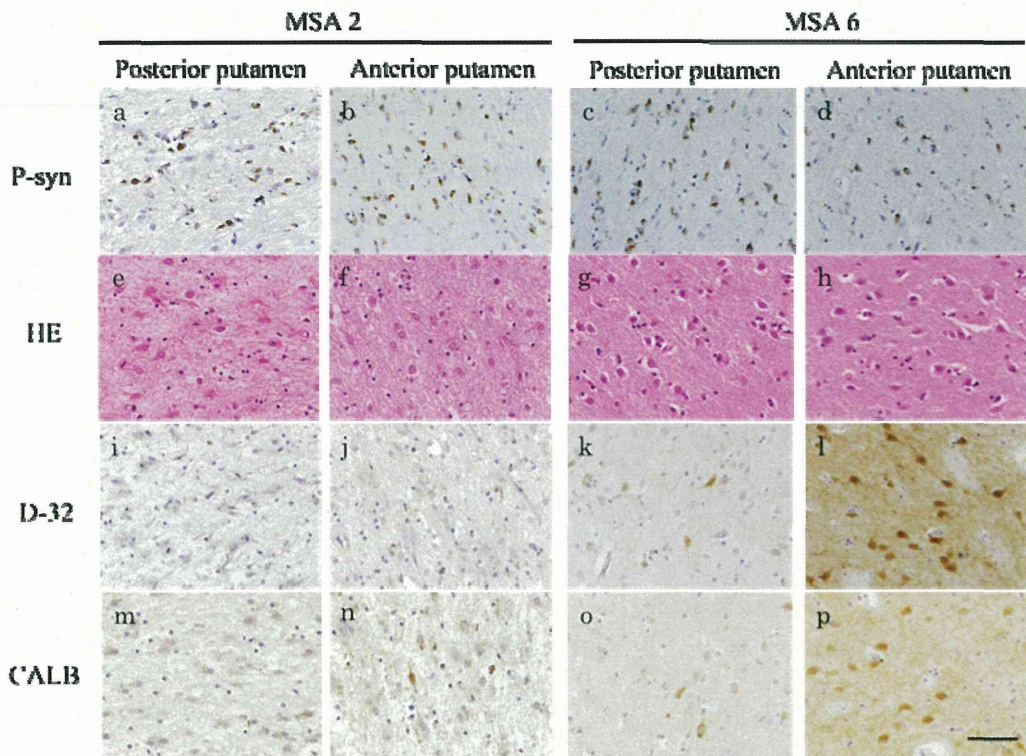


Fig. 1 Loss of immunostaining in MSA. MSA2 において Posterior putamen、anterior putamen において p-syn の高度な蓄積を示す(a, b)。Posterior putamen では HE 染色において高度な変性(e)、anterior putamen では中程度の変性を示す(f)。Posterior putamen、anterior putamen において D-32 の高度な変性を示す(i, j)。Posterior putamen では CALB 染色において高度な低下(m)、anterior putamen では中程度の低下を示す(n)。MSA6 において P-syn は Posterior putamen では高度な蓄積(c)、anterior putamen では中程度の蓄積を示す(h)。HE 染色において Posterior putamen、anterior putamen は正常(g, h)。Posterior putamen において D-32 の中程度な変性(k)、anterior putamen では正常を示す(l)。Posterior putamen では CALB 染色において中程度の低下(o)、anterior putamen では正常を示す(p)。

また anterior putamen では、D-32、CALB の低下が見られない時期にリン酸化 α -synuclein (p-syn) の蓄積を認めた(Fig. 1)。

D. 考察

CALB は脳を含む多くの組織で発現しており、運動ニューロン以外の多くのニューロンや小脳プルキンエ細胞でその発現を認める。基底核において細胞体、樹状突起、線条体中型有棘神経細胞の棘突起で発現する。MSA の線条体において CALB 陽性中型有棘神経細胞の著しい変性を認めることが報告されている。今回の我々の検討でも、MSA の putamen で CALB の発

現低下を認めた。特に、HE 染色でまだ変性所見が出現する前のステージにおいても、CALB の発現が低下している所見も確認している。しかし、神経変性が生じている部位において CALB の発現が保たれている部位はなく、CALB の低下が神経変性の助長に関連した可能性は否定出来ない。CALB が低下し、細胞内 Ca 流入が増加した際に calpain が活性化する。calpain の基質である spectrin で、calpain が活性化される際に spectrin fragment が発現する。今回、150-kDa spectrin fragment の抗体を用いて免疫組織化学を行ったが、その発現は認められなかった。

今回 MSA6 を除くすべての MSA 症例線条体において、

Syn、p-syn の蓄積がオリゴデンドロサイト (GCI) で早期から確認された。GCI の出現は、HE 染色による神経変性や、CALB、D-32 の発現低下よりも以前から確認されており、MSA の病態変化としては Syn の蓄積が初期のイベントと考えられた。頻度は少ないが、アストロサイトやニューロンにおいてもその発現が見られた。それらの変化は、病初期の症例では確認できず、進行例での変化と思われる。何故ニューロン特異的タンパクがオリゴデンドロサイトで最初に蓄積するか、その機序は不明であり、その解明が今後の重要な課題である。

線条体中型有棘神経細胞において、D-32 は高発現しており、cAMP-signal pathway を調節している。D-1 レセプターニューロンと D-2 レセプターニューロンにおいても、D-32 を発現しており、D-32 は線条体中型有棘神経細胞のマーカーとして使用される。今回の免疫組織化学的解析から MSA の線条体ニューロンの変性よりも先に D-32 発現の低下を認めた。

E. 結論

以上のことから MSA の線条体では、Syn、p-syn の蓄積がオリゴデンドロサイトに最初に蓄積し、その後神経細胞の D-32 や CALB の発現低下し、タンパクのリン酸化基質の乱れやカルシウム毒性などにより神経変性が促進、増悪される可能性が考えられた。本研究は、すべて北里大学医学部で行われた。

F. 健康危険情報

(なし)

G. 研究発表

1. 論文発表

Hayakawa et al. J Neural Transm.
2013;120(12):1689-98

2. 学会発表

第7回パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS

H. 知的所有権の取得状況 (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)

レビー小体病死後脳リソース構築

研究分担者 村山繁雄^{1,2}

研究協力者 隅蔵大幸²、初田裕幸²、野上茜²、内野彰子²、中野雄太²、高尾昌樹²、齊藤祐子³

- 1) 東京都健康長寿医療センター神経内科、2) 同高齢者ブレインバンク
3) 国立精神・神経医療研究センター病院臨床検査部

研究要旨

〔目的〕 高齢者ブレインバンク登録例を、レビー小体蓄積連続過程解明のリソースとして構築した。
〔方法〕 中枢神経系・末梢自律神経系を、リン酸化 α シヌクレイン免疫染色 (psyn#64) で一次スクリーニングし、陽性所見がある場合は二次スクリーニングを網羅的に行った。それに基づき、レビー小体病理なし (Stage 0)、レビー小体はあるが黒質変性なし (incidental Lewy body disease, Stage 1)、黒質変性あるがパーキンソン症状の記載なし (preclinical LBD: Stage 2)、認知症を伴わないパーキンソン病 (PD, Stage 3)、3rd DLB consensus Guideline で辺縁型に分類され、1年ルールで認知症を伴うPD (PDD)/ レビー小体型認知症 (DLB) に分類 (limbic PDD/ DLB, Stage 4)、同皮質型 (neocortical PDD/ DLB, Stage 5) に分類した。〔結果〕 連続開頭剖検例205例中75例 (36.6%) において、何れかの臓器でレヴィー病理を確認した。臨床病理学的にPD/ PDD/ DLB と診断されたのは、17例 (8.3%) で、28.3%は偶発的、あるいは発症前LBD に分類された。Parkinson Progression Marker Initiative (Michael J Fox 財団) にリソース提供で参加するが、本邦研究者の利用を希望する。

A.研究目的

本研究では、パーキンソン病 (PD)、認知症を伴うパーキンソン病 (PDD)、レビー小体型認知症 (DLB)、純粹自律神経不全症 (PAF) を総称し、レビー小体病の名称を用いる。レビー小体病理出現解明のため、発症前からを含め、中枢神経系・末梢自律神経系を含む、包括的ティッシュリソースの構築を試みた。

B.研究方法

方法概要

剖検時中枢神経系は半脳凍結保存、半脳は中性ホルマリン固定後神経病理学的に検索した。脊髄は第4, 8 頸髄、第4, 8, 12 胸髄、第2, 5 腰髄、第2 仙髄、馬尾、交感神経節をパラフォルム固定し、残りを髄節毎に迅速凍結保存した。末梢神経

系は、嗅粘膜、交感神経節、胃・食道吻合部、副腎、左室前壁、皮膚を採取、一部凍結保存した。系は全て、中枢神経系は胸髄、嗅球、延髄、橋、黒質、扁桃核を抗リン酸化 α シヌクレイン抗体 (psyn#64) 免疫染色で一次スクリーニングし、いずれかの部位に陽性所見があった症例については、海馬・嗅内野、梨状葉皮質 (前頭葉部・側頭葉部)、橋脚間被蓋核、前帯状回、第二前頭回、第二側頭回、縁上回を二次スクリーニングし、 α シヌクレイノパチーの分布を明らかにした。同様のスクリーニングはタウ、アミロイド β 、TDP43 に、についても行った。

(2) 方法

当施設連続開頭剖検例で、2008年10月から2012年3月までの205例を対象とした。男性129例、女性76例で、51-104歳、平均死亡年

齢82+/- 9.2 歳、平均死後時間14:46、死後冷蔵庫への移行は全て2 時間以内であった。

病歴の検討を後方視的に行い、パーキンソン症状、認知症、PAF の臨床診断を受けている症例を抽出した。

レビー小体病理の検出には、パラフィンブロックより、6 μ m 厚連続切片を作製し、通常染色としてH&E 染色を、免疫組織化学染色として、一次抗体に抗リン酸化 α シヌクレイン抗体 (psyn#64 単クローン抗体)を用い、ベンタナ社ベンチマークGX 自動免疫染色装置を使用した。末梢自律神経系については、抗リン酸化ニューロフィラメント抗体、抗チロシン水酸化酵素抗体を追加し、疑わしい場合は別の抗リン酸化 α シヌクレイン抗体 (PSer64 多クローン抗体)での確認を行った。

DLB の病理診断基準は、末梢神経系、辺縁系・新皮質、嗅球扁桃核系に加え、海馬CA2 病変、嗅内野に海綿状変化を伴うレビー小体病理が存在する場合とした。PD の病理診断基準は、臨床的にパーキンソン症状を伴うこと、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、多系統萎縮症が存在する場合は、末梢自律神経系、脊髄病変に加え、青斑核の色素脱失を含む、脳幹のレビー小体病理が高度であるものとした。

レビー小体病理ステージ分類には高齢者ブレインバンク分類を用いた。

グレード分類には、DLB 3rd Consensus Guideline を一部改変したもの(論文業績1 に詳述)を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京都健康長寿医療センター研究所倫理委員会の承認を得た。

C.研究結果

レビー小体病理陽性例は75 例(36.6%)であった。末梢自律神経系のみ陽性 5 例、中枢のみ陽性27 例、両者陽性43 例(20.5%)であった。

末梢自律神経系にのみ陽性所見を認めた 6 例

は男4 例、女2 例、平均年齢83.0 歳であり、全体年齢との有意差はないが、老人斑 Braak Stage A であり、全てアルツハイマー病変化が微小であった。

陽性部位別では嗅球77 例が、迷走神経背側核 61 例より多かった。また交感神経節が61 例と同数であった。

末梢自律神経系が陰性であった27 例中25 例が嗅球・扁桃核系陽性であった。

全体の結果を表1 に示す。

表1 の説明：レビー小体病理を0-4 にグレードし、陽性部位を表示した。臨床症状を呈していたのは、赤矢印以下の症例である。

略語：AD: Alzheimer disease; SC: spinal cord; NFT: neurofibrillary tangles; SP: senile plaque; AG: argyrophilic grains; LB: BBAR Lewy stage; ECJ: esophago-cardiac junction; DMNX: dorsal motor nucleus of vagus; LC: locus ceruleus; SN: substantia nigra; T. Ento: transentorhinal; A. Cing: anterior cingulate; TE: temporal; FA: frontal; Spuram.: supramarginal; Hip: hippocampus ; PD: Parkinson disease; DLB: dementia with Lewy bodies;

D.考察

今回の検討で、末梢自律神経系のみ陽性所見を呈するものが一定の数存在し、古くから言われて来た通り、交感神経節優位であることを示すことが出来た。これは、Braak 仮説が実証を伴っていない点への反論となる。

また嗅球がBraak 上行仮説での脳幹よりも頻度が高い点については、PD プリオノパチー仮説についてはさらなる検討が必要であることを示す結果である。

しかし、嗅球陰性例と末梢自律神経系陰性例は、2 例の例外を除き除外関係にある点は、dual hit theory を支持する所見である。本研究を 2013 Movement Disorder Society International Conference で発表したところ、

preclinical Lewy body disease の死後脳リソースとして、国際共同研究に協力するよう申し入れを受け受諾した。出来れば本邦研究者の利用を希望する。

E.結論

レビー小体病の蓄積に関するリソースを、コントロール、偶発性、発症前、発症後にわたり、中枢・末梢を総合するかたちで構築できた。

F.健康危険情報

報告すべきものなし。

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1.論文発表

1. Funabe S, Takao M, Saito Y, Hatsuta H, Sugiyama M, Ito S, Kanemaru K, Sawabe M, Arai T, Mochizuki H, Hattori N, Murayama S: Neuropathologic analysis of Lewy- related alpha- synucleinopathy in olfactory mucosa. *Neuropathology* 2013; 33: 47-58
2. Miyakawa S, Ogino M, Funabe S, Uchino A, Shimo Y, Hattori N, Ichinoe M, Mikami T, Saegusa M, Nishiyama K, Mori H, Mizuno Y, Murayama S, Mochizuki H: Lewy body pathology in a patient with a homozygous Parkin deletion. *Mov Disord* 2013; 28(3): 388-391

2.学会発表

- 1) Murayama S, Takao M, Hatsuta H, Sumikura H, Itoh S, Nogami A, Uchino A, Saito Y,: Systemic distribution of Lewy body pathology in an aging cohort. 17th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, Australia Sydney, June 16-20 2013

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- 1.特許取得
- 2.実用新案登録
- 3.その他

パーキンソニズムを主症状とした

遺伝性プリオン病(P105L)4家系の臨床及び分子遺伝学的研究

研究分担者 辻省次¹

研究協力者 興かがり¹, 松川敬志¹, 三井純¹, 石浦浩之¹, 高橋祐二¹, 市川弥生子¹, 長島優¹,
寺尾安生¹, 清水潤¹, 濱田雅¹, 吉村淳², 土井晃一郎², 森下真一², 後藤順¹,

1) 東京大学医学部附属病院 神経内科 2) 東京大学新領域創成科学研究科

研究要旨

常染色体優性遺伝形式の家族性パーキンソニズムと診断されていた家系の発症者3名の Exome 解析結果から *PRNP* P105L 変異を見いだした。その後、同家系1症例に加え、類似した臨床的特徴を有する3家系5症例において、直接塩基配列決定法により同遺伝子変異が確認された。これまで、同遺伝子変異は痙性対麻痺と認知症を主症状とする遺伝性プリオン病の原因遺伝子として位置づけられてきた。今回の結果により *PRNP* P105L 変異による遺伝性プリオン病では、認知症に伴ってあるいは、先だって多様な運動症状が認められ、その中でパーキンソニズムも主要な運動症状のひとつであることが示唆された。非典型的なパーキンソニズムを来す常染色体優性遺伝形式の症例においては *PRNP* P105L 変異の遺伝性プリオン病を鑑別としてあげておく必要があると考えられる。また、今回認められた4家系では haplotype 解析により創始者効果が認められた。

A. 研究目的

常染色体優性遺伝形式を示し、パーキンソニズムを主症状とする4家系おける臨床像及び分子遺伝学的特徴を明らかにする。

B. 研究方法

家族性パーキンソニズムと診断された1家系の発症者3例に対して、Exome 解析を行った。この家系で見出された病原性変異について、類似した臨床像を家族性に呈する3家系の発症者5例に対して、直接塩基配列決定法による解析を行った。創始者効果の有無を調べるために、全4家系の発症者9人に対して、Affymetrix SNP6.0 を用いて、高密度 SNP タイピングを行った。家系メンバーが発症者1人の場合は homozygosity haplotyping 法を用いて、複数存在する場合は家系メンバーの

SNP データも考慮してハプロタイプを再構成し、ハプロタイプ解析を行った。さらに4家系における臨床的特徴をまとめた。

(倫理面への配慮)

書面によるインフォームドコンセントを得て、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、所属機関の研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

発端家系の発症者3例が共有し、健常者373例に認められないヘテロ接合性変異は10個抽出され、既知の病原性変異として *PRNP* P105L 変異が認められた。さらに同家系の発症者1例、および類似3家系の発症者5例においても *PRNP* P105L 変異が認められた。ハプロタイプ解析を行った結

果、同変異を含む 2.9Mbp の領域が全家系間で共有されるハプロタイプが認められ、創始者効果を有すると考えられた。

D. 考察

プリオン遺伝子 (*PRNP*) P105L 変異における既報告は、本邦より 6 家系 11 症例なされている。その臨床病型としては痙性対麻痺 (9 例) や失調 (1 例) で、認知症を 10 例に認め、初期からパーキンソニズムを主体とした症例が 1 例報告されている。一方、自験例 10 例のうち 6 例はパーキンソニズムを主体とし、うち 5 例で経過中に認知症を合併した。パーキンソニズムに対しては L-Dopa を始めとした抗パーキンソン病治療薬が使用されていたがいずれの症例においても効果は認められなかった。その他、自験例では、錐体路症候 (5 例)、失調 (2 例)、ミオクローヌス (4 例) の合併を認めた。*PRNP* P105L 変異による遺伝性プリオン病では、認知症に伴ってあるいは、先だって多様な運動症状が認められ、パーキンソニズムも主要な運動症状のひとつである。遺伝子診断がなされる前の臨床診断は、認知症を伴う遺伝性パーキンソン病、前頭側頭型認知症、大脳基底核変性症、脊髄小脳変性症、ハンチントン病と様々であった。

E. 結論

典型的なパーキンソン病とは合致しない遺伝性のパーキンソニズムと認知症を認める症例においては、*PRNP* P105L 変異を伴う遺伝性プリオン病を念頭に置き検査を行う必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的所有権の取得状況 (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

特定疾患調査表からみたハンチントン病

研究分担者 長谷川一子¹⁾

研究協力者 猿渡めぐみ¹⁾ 中村聖悟¹⁾, 横山照夫¹⁾, 堀内恵美子¹⁾, 福山渉²⁾

1)国立病院機構相模原病院神経内科 2)さがみはらカウンセリングルーム

研究要旨

平成 23 年度の特定疾患申請書を元に、ハンチントン病の療養実態を各項目について調査した。これと平成 16 年度の調査結果との比較もおこなった。調査表に入力が済んでいたのは 687 名（男性 293 名、女性 394 名）であった。このうち平成 23 年度の新規申請は 72 名であった。以前に比較して未入力の都道府県は減少していた。難病センターによる登録患者数は 846 名で、これを元に有病率を求めると人口 10 万人あたり 0.7 人であった。

発症年齢は 30～60 歳代が多くを占め、遺伝子診断の実施実態は未施行：施行が 2:3 であった。生活状況は在宅療養、入院が大多数を占め、自立度は全介助、部分介助が 2/3 をであった。しかし、介護保険の利用は依然として少なく 40%程度利用率であった。介護度は 4, 5 が大多数を占め、自立度が低く、重症であった。身体障害者手帳の取得状況も依然として低く、身体障害者手帳保持者では 1, 2 級が大多数であった。ケアに関しては経鼻チューブ使用者が 31 名、胃瘻増設者が 129 名で、気管切開 19 名、人工呼吸器療法 2 名であった。経管栄養では胃瘻増設利用期間が最長 17 年であった。

ハンチントン病の有病率は微増していた。自立度が低く、介護度が高い症例が多く、平成 25 年にテトラベナジンが上市されたが、舞踏運動の改善のみでは不十分であり、さらに有効な治療薬の開発が望まれる。

A.研究目的

平成 16 年度にハンチントン病の療養状況を報告した。平成 25 年度から難病行政の変更が見込まれること、平成 24 年度にハンチントン病の舞踏運動に関する治療薬が上市されたことにより、これまでの療養状況を鑑みることが必要と考え、厚生労働科学研究、難治性疾患克服研究事業「神経変性疾患に関する研究」班、班長の了承の元、厚生労働省よりハンチントン病受給診断書のデータの供与を受け、平成 23 年度のハンチントン病患者の療養状況を調査した。患者数、有病率については難病センターホームページからデータを取得した。本研究の目的は今後のハンチントン病の療養環境の整備、治療指針の策定に向けての予備調査にある。

B.研究方法

研究目的に記載した如くにハンチントン病患者の特定疾患受給者証診断書の匿名化された原本、および難病センターホームページから都道府県別患者数を得た。それぞれのデータについて統計学的な解析を行い、ハンチントン病患者の有病率、病状、療養状態について検討した。

(倫理面への配慮)

厚生労働省から供与された個人情報には匿名化されており、個人の同定はし難い。しかし、患者数が少ないことから、患者同定ができない様な工夫を加えた。

C.研究結果

1. 有病率

都道府県疾病対策課の入力によるハンチントン病患者数は 687 名で男性 293 名、女性 394 名

であった。平成 23 年度新規申請患者は 72 名であった。一方、難病センターによる患者登録数は 846 名で 150 症例程度が未入力であった。都道府県による入力状況は平成 16 年よりも改善されているといえる。難病センターによる患者登録数からみたハンチントン病の有病率は 0.7 人/10 万人で、平成 16 年度の 0.53 人よりも微増を認めた。県別の有病率を図 1 に示す。

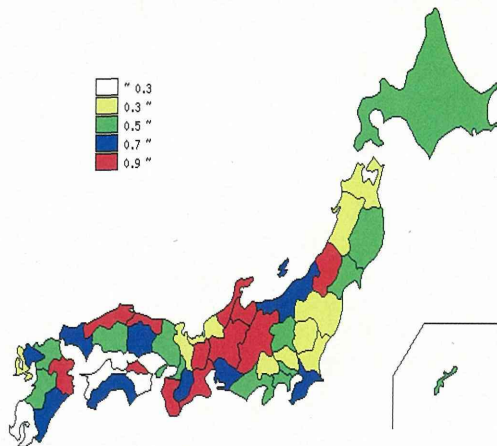


図 1. 平成 23 年度の県別ハンチントン病有病率
平成 16 年度に比較して北海道、岩手、宮城、茨城、長野、岐阜、京都、奈良、福井、島根で微増している。一方、岡山、愛媛、鹿児島では減少傾向がみられた。

2. 臨床像

初発症状は不随意運動、性格変化、次いで知的障害、パーキンソニズムであった。経過を見る上で不随意運動なしが 21 名あり、他疾患の混入、もしくは若年型が含まれていることが推定された。不随意運動では舞踏運動が 82%をしめ、次いで振戦、アテトーシス、バリズムであった。自咬症は 4 名有り、neuroacanthocytosis と思われる。

運動障害の他の項目ではパーキンソニズム有りが 621 名中 117 例にあり、仮面様顔貌、固縮がありの症例の 2/3 にみられ、次いで無動が 1/3 の症例でみられた。歩行障害は 621 名中 544 名にみられ、介助 9 歩行、車いす、臥床状態がほぼ 1/3 ずつであった。いずれも平成 16 年度の臨床像とは著変はなかった。

精神症状では性格変化が 677 名中 476 名にみられ、内訳は反社会的行動、脱抑制が多かった。自殺企図の頻度が高く、671 名中 38 症例でみられ

た。知的障害は 677 名中 541 例でみられた。精神症状についても平成 16 年度の調査とは著変なかった。

3. 画像所見

画像所見では尾状核萎縮を 390 名中 346 名大脳皮質萎縮は 298 名に認めた。

4. 検査所見

遺伝子診断は本人施行 348 名、家族施行 71 名、未施行 348 名であった。遺伝子診断の保険収載、神経学会の遺伝子診断指針の制定によるものと思われるが、遺伝子診断施行例の頻度が平成 16 年度よりも増加した。

5. 療養状況

不随意運動、運動持続困難による嚥下障害の頻度が高いため、経鼻チューブ、胃瘻増設症例の頻度が増した。特に胃瘻増設患者数の増加がみられ、胃瘻増設後 1~6 年の症例が多いが、最長で 18 年の症例もみられた。気管切開は有りが 19 症例、人工呼吸器管理下にある症例が 1 例であった。

身体障害手帳の取得状況は有りが 34%、無しが 61%であった。身体障害手帳の等級は 1 級が 45%、2 級が 35%、3 級が 12%と、障害の程度が高い症例が多かった。介護保険載り様状況は図 2 に示す用に、要介護が 232 名、要支援が 13 名でそれぞれ 39%、2%であった。介護度は V 度が 49%を占め、重症度の高い症例が多い事が明らかであった。しかし、平成 16 年度同様に介護保険乗り様状況は低い傾向にあった。障害者自立支援法を利用している症例もみこまれ、調査表にはない項目であるため、実態が十分に示されていない可能性もある。

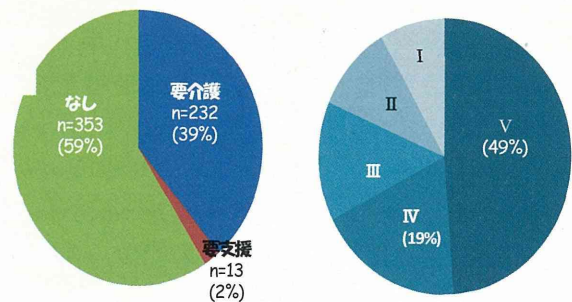


図 2. ハンチントン病患者の介護保険利用状況。

生活状況では平成 16 年に比較して就労、家事

労働者の頻度が増したが、依然として在宅療養、入院療法を行っている症例が多かった。また、社会福祉施設の拡充によるものか、施設入所者の頻度が増した。

日常生活状況は平成 16 年度とほぼ道標で、全介助、部分介助が 3/4 をしめた。日常生活自立度も平成 16 年度と 23 年度はほぼ同様の自立度を示し、何らかの介助が必要な症例が 2/3 をしめた。認知障害による日常生活自立度も平成 16 年度と 23 年度には大きな変化はなく、Ⅱ以上の患者が 2/3 をしめた。

D. 考察

特定疾患受給者交付件数からみるとハンチントン病の有病率は 0.7 人/10 万人と平成 16 年に比較して微増を認めた。診断率の向上などが有病率の増加に関与していることが推定される。また、一部には neuroacanthocytosis とと思われる症例も混在しているが少数例に留まる。依然として精神・身体症状ともに重度障害の症例が多く、在宅療養、入院、入所生活を送っている症例が多くみられた。一方、身体障害手帳取得率や介護保険利用率は依然として低く何らかの行政の介入が必要と思われる、身体障害、精神障害、全般を視野に入れた平成 24 年度に施行された障害者支援法により、包括的な支援がなされていくことが期待される。また、テトラベナジンの使用は可能となったが、テトラベナジンは舞踏運動の治療薬であり、精神、身体機能を改善する様な薬物の開発が望まれる。現在、研究が開始された iPS 細胞による新薬の開発、病態改善のための対象薬の発見などにも期待したい。

E. 結論

ハンチントン病の有病率、臨床症状の現状について特定疾患受給者証から検討した。有病率は微増していることを示すことができた。また、療養状況は相変わらず障害度が高く、今後の薬物療養の発展に期待したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. ハンチントン病研究グループ：ハンチントン病と生きる～よりよい療養のために～. 神経変性疾患に関する研究班編
2. 長谷川一子：ハンチントン病；疫学，臨床症状，検査，診断，治療・効果判定・リハビリテーション，経過・予後，患者・家族への指導・アドバイス，看護師・コメディカルなどへの指導・アドバイス. 認知症ハンドブック. 中嶋健二，天野直二，下濱俊，富本秀和，三村将編 医学書院 2013

3.

2. 学会発表

平成 25 年度日本神経学会総会で発表予定

H. 知的所有権の取得状況（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

有棘赤血球舞踏病の分子病態：chorein の機能解析

研究分担者 佐野 輝

研究協力者 中村雅之，佐々木なつき，出口晃子，
鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 精神機能病学分野

研究要旨

有棘赤血球舞踏病(chorea-acanthocytosis; ChAc)は有棘赤血球症と Huntington 病類似の神経精神症状を呈する神経変性疾患であり、常染色体劣性遺伝形式を呈する。病因は *VPS13A* 遺伝子変異であり遺伝子産物 chorein の欠損が生じることによる。chorein の機能についてはいまだ明らかでなく、ChAc の分子病態も不明である。我々はこれまでに chorein は細胞骨格系タンパク質と相互作用し、飢餓状態やミトコンドリア障害による細胞死を抑制する機能と関連することが示唆される結果を得ていた。今回の研究で chorein はヒストン脱アセチル化酵素 6 (HDAC6) と相互作用し、 α -tubulin の脱アセチル化を促進し、微小管の安定化や細胞骨格形成やオートファジーやマイトファジーなどを介した細胞内小器官クリアランスに関与することが示唆された。この結果から chorein 機能欠損によってこれらの機能が破綻することが ChAc の分子病態の一つであることが示唆された。

A. 研究目的

有棘赤血球舞踏病(chorea-acanthocytosis; ChAc)は有棘赤血球症と Huntington 病類似の症状を呈する神経変性疾患であり、常染色体劣性遺伝形式を呈する。責任遺伝子は *VPS13A* 遺伝子変異であり、塩基数は約 250kb で 73 エクソンからなり、mRNA は約 10kb である。これまでに我々がやってきた遺伝子解析を含めて、変異は *VPS13A* 遺伝子上に点変異や CNV など多岐にわたり広範囲に存在することが示されている。遺伝子産物 chorein の推定分子量は約 360kDa の大きなタンパク質であるが、赤血球膜分画のウエスタンブロットでは ChAc 患者は truncated protein を含めて chorein のバンドは認めておらず、ChAc 患者では chorein が欠損していることが示されている。chorein は脳などの臓器に豊富に発現しているが、その詳細な機能についてはいまだ明らかでなく、ChAc の分子病態も不明である。近年、多くの神経変性疾患において原因となる異常タンパク質のクリアランスとオートファジーとの関連が示唆されている。我々はこれまでに chorein が細胞骨格系タンパク質と相互作用し、飢餓誘発性オートフ

アジーやマイトファジーに関与することが示唆される結果を得ている。今回 chorein 安定強発現細胞において α -tubulin の脱アセチル化の亢進を認め、 α -tubulin の脱アセチル化に関与するヒストン脱アセチル化酵素 6 (HDAC6) と chorein との相互作用について検討した。

B. 研究方法

完全長 *VPS13A* cDNA をライゲーションした発現ベクターを HEK293 培養細胞にトランスフェクションし、chorein-myc-Flag 安定強発現細胞株を作成した上で以下の研究を行った。

1) chorein と α -tubulin の免疫沈降

chorein 安定強発現細胞から抽出したタンパク質について抗 Tag 抗体のビーズや抗 α -tubulin 抗体ビーズによって免疫沈降を行った。それらの共沈物に対して chorein や α -tubulin、 β -tubulin の western blot を行った。

2) 微小管脱重合剤による細胞障害

Chorein 安定発現細胞と Mock 細胞に対して Nocodazole 処理を行い経時的に MTS assay によって cell viability を比較した。

3) α -tubulin のアセチル化の検討

Chorein 安定強発現細胞と Mock 細胞を用い、acetylated tubulin の western blot 法による免疫反応の比較を行った。

4) chorein と HDAC6 の免疫沈降

chorein 安定強発現細胞から抽出したタンパク質について抗 Tag 抗体のビーズや抗 HDAC6 抗体ビーズで免疫沈降を行い共沈物に対して chorein や HDAC6 の Western blot を行った。

5) HDAC6 阻害剤による飢餓誘発性オートファジーと chorein の関連

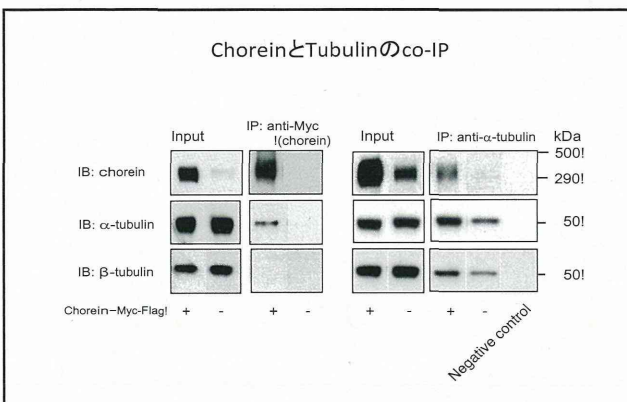
Chorein 安定強発現細胞と Mock 細胞に無血清培地を用いて飢餓状態とし、経時的に MTS assay によって cell viability を検討し、HDAC6 の tubulin への作用を特異的に阻害する tubacin による cell viability の変化を確認した。

(倫理面への配慮)

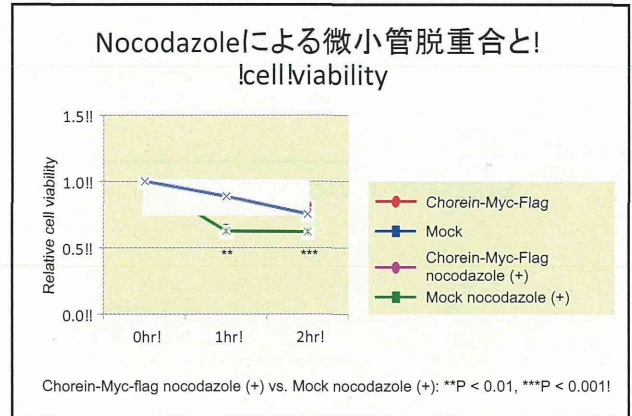
遺伝子組換え実験を必要とするため、鹿児島大学遺伝子組換え実験倫理委員会の承認を得て行った(承認番号 19059 平成 21 年 3 月 16 日)。

C. 研究結果

1) chorein 安定強発現細胞から抽出したタンパク質について抗 myc 抗体のビーズや抗 α -tubulin 抗体ビーズによって免疫沈降を行った。Western blot で chorein は α -tubulin と共沈している事が示された。

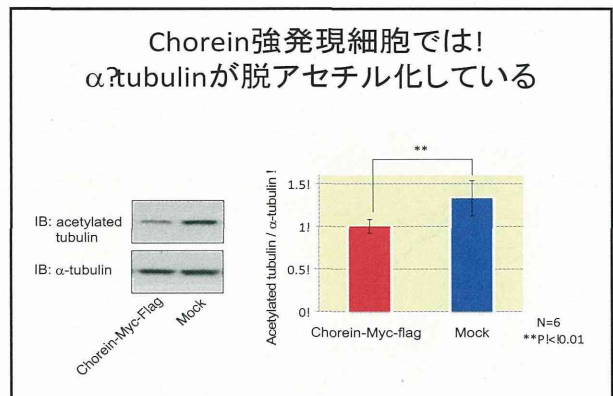


2) Chorein 安定強発現細胞と Mock 細胞に対して微小管脱重合剤である Nocodazole を培地に添加し、経時的に MTS assay によって cell viability を比較した。Nocodazole 添加1時間後、2時間後において chorein 安定強発現細胞は Mock 細胞と比較して、cell viability が有為に高かった。

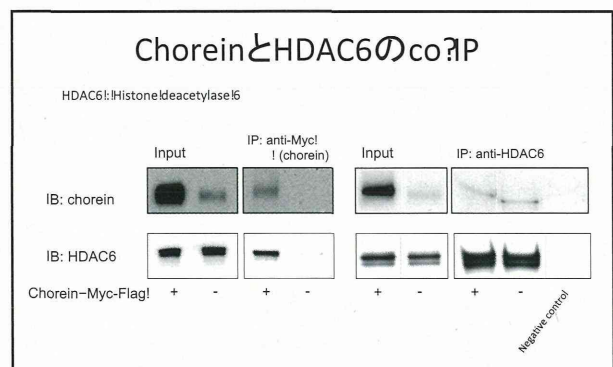


3) α -tubulin のアセチル化の検討

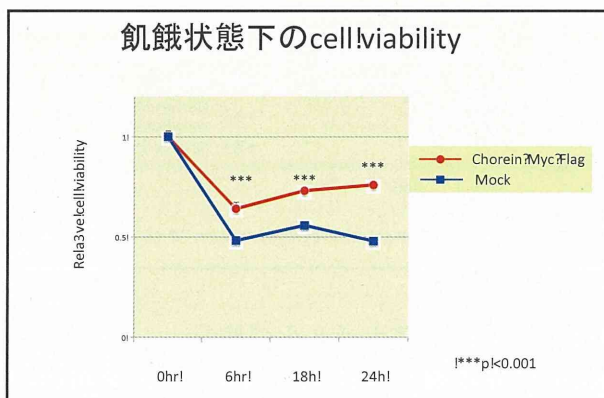
Chorein 安定強発現細胞と Mock 細胞を用い、acetylated tubulin の Western blot 法による免疫反応の比較を行ったところ、chorein 強発現細胞では Mock 細胞と比較して acetylated tubulin の免疫反応が有意に低く、chorein 安定強発現細胞では α -tubulin の脱アセチル化が亢進している事が示唆された。



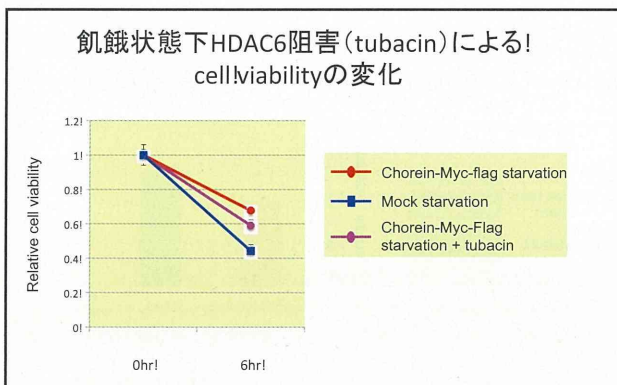
4) α -tubulin の脱アセチル化に關与する HDAC6 と chorein について免疫沈降を行い、共沈物のウェスタンブロットを行った所、HDAC6, chorein のバンドを認め、両タンパク質が共沈していることが示された。



5) chorein 安定強発現細胞は、無血清培地による飢餓誘発 6 時間後、18 時間、24 時間後の cell viability は mock 細胞と比較して有意に高かった。



α -tubulin に対する HDAC6 特異的阻害剤である tubacin を添加した培地を用いて飢餓誘発 6 時間後の cell viability を比べると, tubacin を添加した chorein 安定強発現細胞は加えていない chorein 安定強発現細胞に比べて有意に cell viability が低かった。



D. 考察

chorein は免疫沈降によって α -tubulin や HDAC6 と共沈し、chorein 安定強発現細胞株で脱アセチル化が亢進していることから chorein は α -tubulin、HDAC6 と相互作用しており、 α -tubulin の脱アセチル化に関与している可能性が示唆された。 α -tubulin はアセチル化を受けることによって β -tubulin とヘテロ二量体を形成し、この二量体が重合して微小管形成に関与する。逆に脱アセチル化を受けることによって微小管、ヘテロ二量体が脱重合し、可逆的に細胞遊走や細胞骨格形成に関与していることも知られている。chorein 強発現細胞は微小管脱重合阻害剤による細胞障害に対して耐性を持つことから、chorein

は微小管の安定化作用を有する事が示唆された。chorein 強発現細胞は飢餓誘発性細胞死に対して rescue に働くが、HDAC6 の α -tubulin に対する作用を特異的に阻害する tubacin によってこの作用が弱まる事から chorein は HDAC6 の α -tubulin に対する脱アセチル化を促進することによって細胞に飢餓誘発性細胞死に対する耐性を持たせることが示唆される。HDAC6 は、オートファジーやマイトファジーとも関わる事が報告されており、chorein は α -tubulin や HDAC6 との相互作用によって、細胞骨格形成やオートファジーを介した不良細胞内小器官のクリアランスに関与する事が示唆された。

E. 結論

chorein は、 α -tubulin や HDAC6 と相互作用することが示唆され、細胞骨格形成やオートファジーやマイトファジーなどを介した細胞内小器官クリアランスに関与しており、ChAc の分子病態のひとつは、これらの機構の破綻による可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sangatsuda Y, Nakamura M, Tomiyasu A, Deguchi A, Toyota Y, Goto Y, Nishino I, Ueno S, Sano A: Heteroplasmic m.1624C>T mutation of the mitochondrial tRNA^{Val} gene in a proband and his mother with repeated consciousness disturbances, *Mitochondrion.*, 12: 617-622, 2012

Shiokawa N, Nakamura M, Sameshima M, Deguchi A, Hayashi T, Sasaki N, Sano A: Chorein, the protein responsible for chorea-acanthocytosis, interacts with β -adducin and β -actin. *Biochem Biophys Res Commun.* 441: 96-101, 2013

2. 学会発表

Deguchi A, Nakamura M, Shiokawa N, Sasaki N,

Sano A: Chorein interacts with cytoskeletal proteins in HEK293 cells treated with a chemical inhibitor of oxidative phosphorylation. The 56th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, June 20-23, 2013, Kyoto Japan

Shiokawa N, Nakamura M, Deguchi A, Sasaki N, Sano A: Identification of binding partners of chorein.

The 56th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, June 20-23, 2013, Kyoto Japan
Sasaki N, Nakamura M, Shiokawa N, Deguchi A, Sano A: Chorein interacts with cytoskeletal proteins on nutrient starvation in HEK293 cells. The 56th Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, June 20-23, 2013, Kyoto Japan

H. 知的所有権の取得状況（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

脊髄空洞症のゲノム構造多型 (CNV) 解析

研究分担者 佐々木 秀直¹⁾

研究協力者：浜 結香¹⁾、佐久嶋 研¹⁾、加納崇裕¹⁾、廣谷 真¹⁾、矢部一郎¹⁾、瀧川一学²⁾

1) 北海道大学大学院医学研究科神経内科 2) 同 創成研究機構研究部

研究要旨

キアリ奇形 1 型を伴った脊髄空洞症 5 例、成人対象例 20 例について、Agilent 400K CNV アレイを用いて CNV 解析を行い、空洞症素因遺伝子の探索的解析を行なった。患者 5 例中 3 例に共通した CNV コピー数 loss を示す領域を 5 か所同定した。しかし、空洞症患者に特異的な CNV 変化を示す領域は現時点では同定されなかった。

A. 目的

脊髄空洞症は、脊髄に空洞を形成する慢性進行性の疾患であり、MRI の普及に伴い診断される患者数が増加している。キアリ奇形 1 型に伴うものが約半数を占めており、この基礎疾患に伴う空洞症に限定すると女性の割合が多いとされている。この先天性キアリ奇形を伴う脊髄空洞症の発症原因はいまだ解明されておらず、妊娠中の環境要因、出生時の外傷、遺伝的素因などが考えられている。後頭蓋窩脊柱移行部には種々の奇形の伴うこと、一般に軽度発達障害や形成障害には遺伝的要因の関与が多いこと、遺伝的要因の中でも CNV は塩基配列置換よりも変異率が高いこと等の理由から、まれに家族内発症をみる空洞症のあることなどから、キアリ奇形の原因の一つとしてゲノム構造多型 (CNV) が関与している可能性について検討した。CNV は個体発生の超早期である腸胚形成の時期に生じやすく、その後は安定すると考えられている。

B. 方法

対象は健常者 20 名、キアリ 1 型脊髄空洞症 5 名

の血液より白血球を分離してグアニジンにてゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA は断片化のないことを確認し、再精製して DNA 純度を測定したのち Agilent 2x400k CNV アレイを用いて測定した。測定値を Agilent Feature Extraction を用いて数値化したのち、網羅的 CNV 解析をおこなった。CNV は連続して 3 プローブ以上の変換を認めた領域とした。

(倫理面への配慮)

研究は医の倫理委員会の承認を得た。被検者には口頭に加えて文書で説明して同意を得た。

C. 結果

対照群 20 例に対して患者 5 例中 3 例に共通した CNV 領域は gain で 4 か所、loss で 5 か所認められた。また、若年者 (22 歳以下) 3 名に限ってみると共通する CNV 領域は gain に 1 領域、loss に 4 領域認められた。キアリ 1 型脊髄空洞症 5 名に共通して検出され、かつ健常者に検出できない Mb 単位の DNA 特定構造変化領域は確認できなかった。