

戦略を立てる上において考慮に入れる必要がある。現在我々はリルゾールに加え持続性 Na 電流抑制作用のある塩酸 mexiletine を用いたランダム化群間比較試験を、3 施設共同試験（千葉大学、東京都立神経病院、京都府立医科大学）として行っており、平成 23 年 12 月から開始された 60 例の 30 : 30 ランダム化群間比較試験であり。平成 26 年度中に結果が得られる見通しである。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Sekiguchi T, Kanouchi T, Shibuya K, Noto Y, Yagi Y, Inaba A, Abe K, Misawa S, Orimo S, Kobayashi T, Kamata T, Nakagawa M, Kuwabara S, Mizusawa H, Yokota T. Spreading of amyotrophic lateral sclerosis lesions--multifocal hits and local propagation? J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2014 Jan;85(1):85-91.
2. Shibuya K, Misawa S, Nasu S, Sekiguchi Y, Mitsuma S, Beppu M, Ohmori S, Iwai Y, Ito S, Kanai K, Sato Y, Kuwabara S. Split hand syndrome in amyotrophic lateral sclerosis: different excitability changes in the thenar and hypothenar motor axons. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013 Sep;84(9):969-72.
3. Konno T, Shiga A, Tsujino A, Sugai A, Kato T, Kanai K, Yokoseki A, Eguchi H, Kuwabara S, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013 Apr;84(4):398-401.

2. 学会発表

1. 岩井雄太、澁谷和幹、三澤園子、関口縁、那須彩子、別府美奈子、三津間さつき、金井数明、桑

原聡。 筋萎縮性側索硬化症の利き手発症における末梢神経軸索興奮性の関与。第 54 回日本神経学会学術大会。2013 年、東京。

2. 澁谷和幹、三澤園子、関口縁、岩井雄太、三津間さつき、別府美奈子、渡辺慶介、桑原聡。 筋萎縮性側索硬化症における四肢筋複合筋活動電位振幅の比較。第 43 回日本臨床神経生理学会学術大会。2013 年、高知。

3. 岩井雄太、澁谷和幹、三澤園子、関口縁、別府美奈子、三津間さつき、渡辺慶介、桑原聡。 末梢運動神経軸索興奮性検査を用いた筋萎縮性側索硬化症における病態進展の解析。第 43 回日本臨床神経生理学会学術大会。2013 年、高知。

H.知的所有権の取得状況

- 1.特許取得：なし
- 2.実用新案登録：なし

神経反復刺激試験（RNS）による筋萎縮性側索硬化症（ALS）と 頸椎症性筋萎縮症（CSA）の鑑別

研究分担者 園生 雅弘¹⁾

研究協力者 畑中 裕己¹⁾，千葉 隆司¹⁾，小川 剛¹⁾ 東原 真奈²⁾

1) 帝京大学神経内科，2) 東京都健康長寿医療センター

研究要旨

我々は以前本研究班で、ALS患者の神経反復刺激試験（RNS）について検討し、三角筋、僧帽筋などの近位筋で、高率に漸減応答（decrementing response；以下Decr）が見られることを報告した。また、ALSと頸椎症性筋萎縮症（CSA）との鑑別に僧帽筋の針筋電図が有用であることを示した。本研究ではこれらの結果に基づいて、僧帽筋を含むRNSのALS診断、特にCSAとの鑑別における有用性について前向き研究で検討した。短母指外転筋（APB）、僧帽筋（Trap）、三角筋（Del）の3筋についてRNS検査を施行した。ALS 44例、CSA 32例がエントリーされた。有意なDecrは、ALS症例ではAPBで29%、Trapで36%、Delで59%に認められたが、CSA症例ではAPBで3%、Trapで0%、Delで12%にとどまった。本研究から、少なくともCSAとの鑑別において、RNSでのDecrは特異度が高いこと。特に僧帽筋でのDecrは、感度は36%にとどまるが、特異度が100%であることが示された。侵襲の少ない僧帽筋RNSはCSAとALSとの鑑別において有用な診断手段となる可能性がある。

A. 研究目的

針筋電図はALS診断に必須であり、汎用されているが、侵襲性が高いことが欠点である。その他、安静時活動（fibrillation potential, fasciculation potential）の観察時に筋によっては安静を得るのが難しいこと、随意収縮時活動の評価が経験に依存することなども問題点として挙げられる。

我々は平成21年度本研究班で、ALSにおける神経反復刺激試験（RNS）を検討し、筋別のDecr陽性率を検討した。その結果、漸減応答（decrementing response；以下Decr）が83%の患者で見られること。特に、三角筋、僧帽筋などの近位筋で陽性率が高いことを見出した¹⁾。

また平成20年度の本研究班では、ALSの針筋電図診断に関して僧帽筋に着目し、CSAとの鑑別において、僧帽筋の安静時活動の感度63%、特異度100%と高い有用性を示している²⁾。

本研究では、非侵襲的なRNSが針筋電図の役割の一部を代替するものとして、ALS診断に応用できないかと着想し、CSAとの比較検討を行った。

B. 研究方法

帝京大学医学部附属病院及び関連施設で、2013年の1月より12月まで、ALSないしCSAの連続症例についての前向き研究を行った。本研究については帝京大学倫理委員会の承認を得、また検査の目的と方法については患者に事前に説明し同意を得た。

ALSのエントリー基準は、臨床症候及び針筋電図からALSと確信できた症例で、改訂El Escorial基準（R-EEC）とAwajiアルゴリズムに基づいて、診断カテゴリーを分類した。CSAのエントリー基準は、感覚障害が欠如ないし軽度で、上肢遠位または近位に髄節性の筋萎縮・筋力低下を来とし、その原因が頸椎症と診断された症例とした。

被験筋としては、有用性が期待される Trap、以前の検討でもっとも感度が高かった Del、遠位筋の代表として遠位筋の中では感度が高かった APB の3筋を選択した。これらの筋で、3Hz 10回（ただし Deltoid では6回）の連続刺激を施行、CMAPの頂点間振幅で、4発目で5%を超える Decrが見られた例を異常と判定した。

C. 研究結果

ALS 44例（男性28例、女性16例、29-86歳）、CSA 32例（男性28例、女性4例、32-80歳）がエントリーされた。ALSの診断カテゴリーの内訳は表1の通りで、PMA (progressive muscular atrophy)が43%と比較的多い結果となった。CSAは、近位型14例、遠位型14例、遠位と近位合併例が4例であった。

ALS (n=44)	R-EEC	%	Awaji	%
Definite	2	5%	3	7%
Probable	5	11%	9	20%
Pro Lab sup	7	16%	0	
Possible	11	25%	13	30%
PMA	19	43%	19	43%

表1 ALSエントリー症例の診断カテゴリー内訳

ALS・CSA両群でのRNSの陽性率を表2に示す。APBやDelではCMAP著明低下によるRNS施行不能症例が一部にあった。

	APB	Trap	Del
ALS (n=44)	12/42*	16/44	26/44
感度	29%	36%	59%
CSA (n=32)	1/31*	0/32	3/25*
感度	3%	0%	12%
(特異度)	(97%)	(100%)	(88%)

表2 各疾患群のDecr陽性率筋別比較

*CMAP著明低下によるRNS施行不能症例あり

表に示すように、一般にALSの方でDecrを高頻度に認めた。ただし、APBやDelではCSAでも少数例、Decr

を認める症例があった。これは、CSAでも亜急性期にはdecrementが出現しうると考えられる。これに対して、Trapでは、CSAでDecrがみられる例は1例もなく、ALSとCSAの鑑別での特異度は100%であった。Trapの感度は36%とそれほど高くはないが、100%の優れた特異度を有する事から、ALSの診断において有用であることが示唆された。各被験者での実際のDecrの値を図1に示した。TrapではCSAが全例正常であることがわかる。

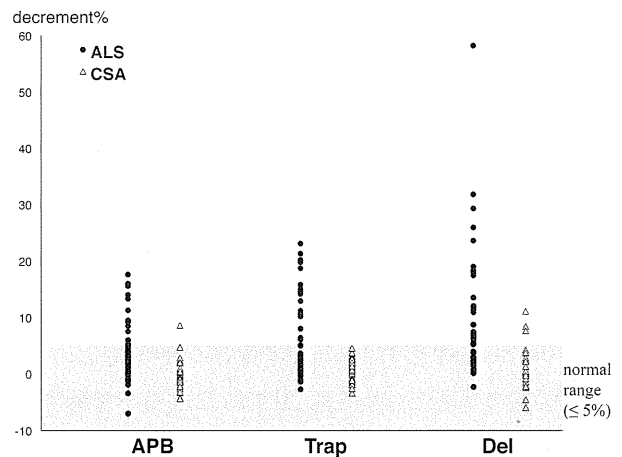


図1 個々の被験者のDecrの値

D. 考察

ALSでのRNS異常は古くから記載されているが³⁾、それをALS診断に応用しようという観点の研究はこれまでになかった。

既に述べたように、我々はALSで特に僧帽筋を含む近位筋優位にDecrを高頻度に認めること、また僧帽筋での針筋電図異常はCSAでは見られず、ALSに特異的な所見であることを見出してきた。このことから僧帽筋を含むRNSをALS診断に応用することを着想したのだが、僧帽筋RNSは技術的にpseudofacilitation現象を生じ易い問題がある。我々は、臥位にて肩を受動的に挙上することで、安定したRNS波形を得ることができることを報告した。本研究での僧帽筋RNSもすべてこの方法で施行したものである⁴⁾。

RNSの利点としては、痛み少ないこと、良好な再現性が期待できることなどが挙げられる。従って、

針筋電図の役割の一部を RNS で代替できないかを考えることには意義がある。例えば上肢の一つ筋で安静時活動+随意収縮の神経原性の基準が満たされる時、もう1筋として僧帽筋 RNS を用いる方法が考えられる。これは、針筋電図と臨床症候のような異なる modality の LMN 障害の証拠を自由に併用して構わないという Awaji 基準のコンセプトを援用したものである。即ち、RNS での Decr は、少なくとも臨床症候よりも客観的で確実な LMN 障害の証拠と考えられるため、このような方法が考慮できるものと考えられる。

E. 結論

- 1) RNS 異常の存在は CSA よりも ALS を示唆する所見となる。
- 2) 特に僧帽筋の RNS は、感度はさほど高くないが、CSA との鑑別における特異度は 100% であり、この筋での decrement の存在は ALS を強く示唆する。
- 3) 侵襲の少ない RNS は、ALS における下位運動ニューロン障害の検出手段として針筋電図を代替できる可能性が示唆された。
- 4) 特に上肢の他筋で安静時活動+随意収縮の神経原性の基準が満たされる時、もう1筋として僧帽筋 RNS を用いる方法など考えられる (Awaji 基準の援用)。

文献

- 1) Iwanami T, Sonoo M, Hatanaka Y, et al: Decremental motor responses to repetitive nerve stimulation (RNS) in motor neuron disease. Clin neurophysiol, 122: 2530-2536, 2011.
- 2) Sonoo M, Kuwabara S, Shimizu T. et al: Utility of Trapezius EMG for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve, 39: 63-70, 2009.
- 3) Mulder DW, Lambert EH, Eaton LM. Myasthenic syndrome in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 9: 627-631, 1959.
- 4) Ogawa G, Sonoo M, Hatanaka Y, et al: A new Maneuver for repetitive nerve stimulation for

trapezius muscle. Muscle Nerve, 47: 668-672, 2013.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

準備中

2. 学会発表

1) Hatanaka Y, Chiba T, Kuwabara M, et al. Diagnostic utility of repetitive nerve stimulation test of the trapezius muscle in amyotrophic lateral sclerosis, 66th annual meeting of American Academy of Neurology, Philadelphia, 2014(予定).

2) 畑中裕己, 千葉隆司, 小川剛他: 第 55 回日本神経学会総会, 福岡, 2014 (予定)

H. 知的所有権の取得状況

なし

長期 TPPV(気管切開下陽圧換気療法)施行の孤発性 ALS 患者における機能予後

研究分担者 饗場郁子¹⁾，
研究協力者 田村拓也¹⁾，榊原聡子¹⁾，片山泰司¹⁾，見城昌邦¹⁾，横川ゆき¹⁾，
後藤敦子¹⁾，齋藤由扶子¹⁾，犬飼晃¹⁾

1) 国立病院機構 東名古屋病院 神経内科

研究要旨

ALSFRS-R が TPPV 導入後の ALS 患者の機能予後の予測因子となり得るかについて、長期 TPPV 施行 ALS 患者 23 名を対象に後方視的検討を行った。進行期における機能評価尺度には東京都立神経病院から提唱されているコミュニケーション障害のステージ分類を用い、各患者の発症からステージ III (nonverbal yes/no response only)、IV (uncertain yes/no responses)、V (Totally Locked-in State : TLS) への移行までの期間と ALSFRS-R の 4 つのサブスコア及び総スコアが 0 になるまでの期間、 Δ ALSFRS-R [発症から TPPV 導入までの ALSFRS-R 総スコアの減少値 / 発症から TPPV 導入までの期間(月)] の関連について Kaplan-Meier 法・log-rank 検定、Cox 比例ハザードモデルを用いて統計学的解析を行った。結果、ステージ III・IV・V すべてのステージ移行と統計学的に有意な相関がみられたのは Δ ALSFRS-R のみであった。[III・HR:2.33 (95%CI:1.03-5.24)、IV・HR:2.74 (95%CI:1.08-6.93)、V・HR:3.90 (95%CI:1.01-14.99)] 今回の結果から発症年齢、性別、発症部位、TPPV 継続期間にかかわらず、発症から運動機能障害が急速に進行する ALS 患者は TPPV 導入後、長期生存し得た場合には重篤なコミュニケーション障害をきたし、最終的に TLS にまで至るリスクが相対的に高いことが示唆され、 Δ ALSFRS-R は TPPV 導入後の機能予後の予測因子となる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis : ALS) の一部の患者においては、気管切開下陽圧換気療法 (Tracheostomy Positive Pressure Ventilation : TPPV) 導入後、眼球運動を含めたすべての随意運動機能が障害され、重篤なコミュニケーション障害をきたし、QOL (Quality of Life) が著しく損なわれる場合がある。よって、できるだけ早期から機能予後の予測を立てることは TPPV 導入後の ALS 患者の療養計画を考える上では重要である。ALS 患者の運動機能の評価尺度として広く用いられている ALSFRS-R (Amyotrophic Lateral Sclerosis Functional Rating Scale-Revised) スコアの変化

量は死亡または TPPV 導入をエンドポイントとした生命予後に関連することが報告されているが、今回、我々はこの ALSFRS-R スコアの変化が TPPV 導入後長期生存し得た ALS 患者の機能予後にも関連するか否かについて検討した。

B. 研究方法

対象：1998 年～2013 年において国立病院機構東名古屋病院で診療を行った TPPV を施行した ALS 患者全
40 名から follow up が不能となった患者、経過中に
重度の認知症、低酸素性虚血性脳症などをきたし

て評価困難となった患者 9 名を除いた 31 名中、死亡時または観察打ち切り点と設定した 2013 年 7 月 1 日までに TPPV 施行期間が 2 年を超えていた 23 名〔男性 15 名：女性 8 名、発症年齢：57.7±9.4(平均±標準偏差)歳、罹病期間：133.6±67.5 ヲ月、TPPV 施行期間：91.3±47.5 ヲ月〕を対象とした。

方法：対象患者の臨床記録、動画記録をもとに後方視的・縦断的検討を行った。TPPV 導入後の進行期における機能評価尺度としては、東京都立神経病院の林らによって提唱されているコミュニケーション障害のステージ分類を用い、各患者の発症からステージⅢ (nonverbal yes/no response only)、Ⅳ (uncertain yes/no responses)、Ⅴ (Totally Locked-in State : TLS) への移行の有無と各ステージ移行までの期間を調査した。また、各患者の発症時からの運動機能障害の進行を ALSFRS-R の 4 つのサブスコア (①bulbar, ②fine motor, ③gross motor, ④respiratory) 及び、⑤総スコアが 0 になるまでの期間、⑥ ΔALSFRS-R = 発症から TPPV 導入までの ALSFRS-R 総スコアの減少値 / 発症から TPPV 導入までの期間 (月) によって評価し、これらとコミュニケーション障害進行との関連について以下のように統計学的手法を用いて検討を行った。

統計学的解析：コミュニケーション障害のステージⅢ、Ⅳ、Ⅴの各ステージへの到達をエンドポイントとし、上記①～⑥の各項目において、その中央値で患者を 2 群に分け、Kaplan-Meier 生存曲線を作成し、2 群の差を log-rank 検定を用いて比較した。続いて 2 群間で有意差 (p 値 < 0.05 を有意差ありと定義) が認められた項目に対して、Cox 比例ハザードモデルを用いて、性別、発症年齢、発症部位 (球麻痺、上肢、下肢、呼吸筋)、TPPV 施行期間で調整した多変量解析を行った。

C. 研究結果

多変量解析の結果、Respiratory サブスコアが 0 に至るまでの期間 (= 発症から TPPV 導入までの期

間)、ALSFRS-R 総スコアが 0 に至るまでの期間、ΔALSFRS-R はいずれもステージⅢ・Ⅳへの移行と有意な相関 (p 値 < 0.05 を有意差ありと定義) がみられ、発症から Respiratory サブスコアが 0 になるまでの期間、ALSFRS-R 総スコアが 0 になるまでの期間が短い程、また、ΔALSFRS-R が大きい程、ステージⅢ・Ⅳへの移行リスクが大きくなる傾向にあった。(Table. 1) (Table. 2)

一方、ステージⅤ (TLS) への移行と有意な相関がみられたのは ΔALSFRS-R (p < 0.05, HR: 3.90 95%CI: 1.01-14.99) のみであった。(Table. 3)

Table. 1

Association of ALSFRS-R declining intervals and ΔALSFRS-R with communication disability (Stage III), from Cox proportional hazard models adjusting for age at onset, sex, region of onset (bulbar, upper extremity, lower extremity and respiratory), duration time with TPPV (n = 23)

Model	Variable	Hazard ratio (95% CI)	p Value
1	Interval from onset to Bulbar subscore: 0	0.77 (0.60-1.00)	$p = 0.06$
2	Interval from onset to Fine motor subscore: 0	0.94 (0.88-1.01)	$p = 0.11$
3	Interval from onset to Gross motor subscore: 0	0.88 (0.74-1.05)	$p = 0.17$
4	Interval from onset to Respiratory subscore: 0	0.75 (0.57-0.99)	$p < 0.05$
5	Interval from onset to Total score: 0	0.87 (0.76-0.99)	$p < 0.05$
6	ΔALSFRS-R	2.33 (1.03-5.24)	$p < 0.05$

Table. 2

Association of ALSFRS-R declining intervals and ΔALSFRS-R with communication disability (Stage IV), from Cox proportional hazard models adjusting for age at onset, sex, region of onset (bulbar, upper extremity, lower extremity and respiratory), duration time with TPPV (n = 23)

Model	Variable	Hazard ratio (95% CI)	p Value
1	Interval from onset to Bulbar subscore: 0	0.82 (0.64-1.05)	$p = 0.12$
2	Interval from onset to Fine motor subscore: 0	0.88 (0.81-0.97)	$p < 0.05$
3	Interval from onset to Gross motor subscore: 0	0.72 (0.50-1.03)	$p = 0.07$
4	Interval from onset to Respiratory subscore: 0	0.79 (0.66-0.95)	$p < 0.05$
5	Interval from onset to Total score: 0	0.77 (0.62-0.95)	$p < 0.05$
6	ΔALSFRS-R	2.74 (1.08-6.93)	$p < 0.05$

Table. 3

Association of ALSFRS-R declining intervals and ΔALSFRS-R with communication disability (Stage V: Totally Locked-in State), from Cox proportional hazard models adjusting for age at onset, sex, region of onset (bulbar, upper extremity, lower extremity and respiratory), duration time with TPPV (n = 23)

Model	Variable	Hazard ratio (95% CI)	p Value
1	Interval from onset to Bulbar subscore: 0	0.76 (0.55-1.05)	$p = 0.10$
2	Interval from onset to Fine motor subscore: 0	0.71 (0.46-1.12)	$p = 0.15$
3	Interval from onset to Gross motor subscore: 0	0.77 (0.42-1.41)	$p = 0.40$
4	Interval from onset to Respiratory subscore: 0	0.78 (0.60-1.02)	$p = 0.07$
5	Interval from onset to Total score: 0	0.71 (0.41-1.23)	$p = 0.23$
6	ΔALSFRS-R	3.90 (1.01-14.99)	$p < 0.05$

D. 考察

我々が定義した ΔALSFRS-R は発症から TPPV 導入までの月当たりの ALSFRS-R スコア減少率であり、これは ALS における運動機能障害の進行速度の指標となり、ΔALSFRS-R 値が大きいほど運動機能障

害の進行が急速であるということを示している。今回の結果から患者の発症年齢、性別、発症部位（球、上肢、下肢、呼吸筋）、TPPV 継続期間にかかわらず、発症からの運動機能障害の進行が比較的急速である ALS 患者は TPPV 導入後、長期生存し得た場合には重篤なコミュニケーション障害をきたし、最終的に TLS にまで至るリスクが相対的に高いということが示唆された。

コミュニケーション障害のステージ分類を提唱した東京都立神経病院の林らはその報告（臨床神経 2013;53:98-103）の中で、早期に TPPV 導入となるような疾患の進行の速い症例ほど TLS を含めた重篤なコミュニケーション障害をきたすリスクが高いと述べており、今回の我々の研究結果はそれと一致する。また、林らはこの報告の中で、家族性 ALS であること、あるいは既知の ALS 遺伝子変異を持つ孤発例であることも TLS の予測因子であると述べている。今回我々が対象とした症例はすべて孤発例であったが、全例に遺伝子検査を行なってはいないので、当院の TLS に至った症例の中に遺伝子変異を持つ症例が含まれていることは否定できない。今後、病初期から急速に進行し、TPPV を導入しても最終的に TLS を含んだ重篤なコミュニケーション障害をきたすに至る ALS 症例について、未知の原因遺伝子の検索を含め、遺伝子レベルでの機序の解明が望まれる。

E. 結論

ALS の運動機能障害の進行速度の指標、 Δ ALSFRS-R（発症から TPPV 導入までの ALSFRS-R 総スコアの減少値／発症から TPPV 導入までの期間）は TPPV 導入後の機能予後の予測因子となる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表(本研究に関連するもの)

1. 論文発表

長期 TPPV 施行の ALS 患者の臨床像

田村 拓也(国立病院機構東名古屋病院 神経内科)

難病と在宅ケア 19 巻 7 号 P9-12 (2013. 10)

2. 学会発表

長期 TPPV 施行 ALS 患者の臨床像についての検討

田村拓也, 榊原聡子, 片山泰司, 見城昌邦, 横川ゆき, 後藤敦子, 齋藤由扶子, 饗場郁子, 犬飼晃
(国立病院機構東名古屋病院 神経内科)

第 54 回日本神経学会学術大会 (2013. 5)

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

特記事項なし。

ALS マウスモデルにおけるコネクシンの神経病理学的検討

研究分担者 吉良潤一

研究協力者 真崎勝久¹⁾、崔訳文¹⁾、山崎亮²⁾、今村志穂子¹⁾、鈴木諭³⁾、
林信太郎¹⁾、佐藤真也¹⁾、長柄祐子¹⁾、河村真実¹⁾、吉良潤一¹⁾

1) 九州大学大学院医学研究院神経内科学 2) 同神経治療学寄附講座 3) 同神経病理学

研究要旨

近年、グリア細胞が筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態進行や運動ニューロン障害に積極的に関与することが報告されている。コネクシン(Cx)蛋白はグリア細胞間で gap junction を形成し、細胞間情報伝達に重要な役割を持つ。Cx の脱落は細胞間連絡障害を引き起こすが、ALS ではまだ詳細な検討はない。今回我々は ALS モデルマウスを用い、グリア細胞における Cx 蛋白の経時的変化を解析し、病態への関与を検討した。mSOD1-Tg マウスの進行期および末期では、脊髄前角で肥大した反応性アストロサイトが増加するとともに Cx43、Cx30、AQP4 の染色性も増加していた。一方、EAAT2 の染色性は脊髄前角で低下していた。Nogo-A 陽性オリゴデンドロサイトの細胞膜上で Cx47 と Cx32 の発現は著明に低下しており、Cx47 は細胞質への内在化も認められた。残存するオリゴデンドロサイトには形態的異常も認められ、これらの変化は特に SOD1 が異常に蓄積したオリゴデンドロサイトで顕著であった。Western blot や定量 PCR を用いた検討では、免疫染色と同様の傾向が確認された。mSOD1-Tg マウスでは、病期の進行とともに Cx gap junction を介するグリア細胞間情報伝達の破綻が生じており、病態進行に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、SOD1 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルマウスを用いた一連の研究により、ミクログリアやアストロサイトといったグリア細胞が病態進行や運動ニューロン死に積極的に関与することが報告されてきた。さらにごく最近では、ヒト ALS や SOD1 変異マウスではオリゴデンドロサイトに発現する乳酸トランスポーター MCT1 を介した軸索への栄養供給障害が生じている可能性が報告され、ALS の病態におけるグリア細胞の重要性がより注目されてきている。コネクシン(Cx)蛋白はグリア細胞間で gap junction を形成し、細胞間情報伝達に重要な役割を持つ。Cx はイオン交換やグルコース、乳酸、グルタミン酸、ATP の直接的な細胞間移動に必須な蛋白であり、

電氣的活動や栄養供給の観点からも中枢神経系の恒常性維持に重要と考えられる。Cx の脱落は細胞間連絡障害を引き起こすが、ALS ではまだ詳細な検討はない。今回我々は SOD1 変異 ALS モデルマウスを用い、グリア細胞における Cx 蛋白の経時的変化を解析し、病態への関与を明らかにする。

B. 研究方法

mSOD1-Tg(G93A)と Non-Tg マウスの発症前(12週)、進行期(18週)、末期(20週)の腰髄標本を用い、オリゴデンドロサイト/ミエリン蛋白である Cx32、Cx47、MOG、Nogo-A、アストロサイト蛋白である Cx30、Cx43、AQP4、GFAP、EAAT2、ニューロンや軸索マーカーである NeuN、Neurofilament、ミクログリアマーカー Iba-1、および SOD1 の組織

免疫染色を施行した。さらに、腰髄組織を用いた定量 western blot と定量 PCR を施行した。

C. 研究結果

mSOD1-Tg マウスでは、病期の進行とともに運動ニューロンの脱落や軸索数の減少とミクログリアの活性化が認められた。発症前では Cx の発現に明らかな変化を認めなかったが、進行期および末期では、脊髄前角で肥大化した GFAP 陽性反応性アストロサイトが増加するとともに Cx43、Cx30、AQP4 の染色性も増加していた。一方、EAAT2 の染色性は脊髄前角で低下していた。進行期および末期の mSOD1-Tg マウスの脊髄前角では、Nogo-A 陽性オリゴデンドロサイトの細胞膜上で Cx47 と Cx32 の発現は著明に低下しており、Cx47 は細胞質への内在化も認められた。残存するオリゴデンドロサイトには細胞体の形態的異常も認められた。SOD1 と Cx47 および Cx32 の蛍光二重染色では、とくに SOD1 蛋白が蓄積したオリゴデンドロサイトで Cx47 と Cx32 の発現低下が認められた。定量 Western blot では、Cx47 と Cx32 の発現量は進行期や末期 mSOD1-Tg マウスで有意に低下していた。定量 PCR では、進行期で Cx47 の mRNA 発現低下、末期で Cx32 と Cx47 の mRNA 発現低下が認められた。Cx43 の mRNA は発症前と末期で増加していた。Cx30 の mRNA はいずれの病期でも Non-Tg と mSOD1-Tg マウスで有意差は得られなかった。

D. 考察

以前から、SOD1 変異マウスではオリゴデンドロサイトにも異常 SOD1 蛋白が細胞内に蓄積することが報告されており、オリゴデンドロサイトの障害が示唆されてきた。一方、オリゴデンドロサイトの Cx47/Cx32 を double knockout したマウスでは、ミエリンの菲薄化やオリゴデンドロサイトの細胞死、さらに軸索の脱落が生じることが報告されている。従って、SOD1 蛋白蓄積によりオリゴデンドロサイトの Cx 発現異常が生じ、その結果、

アストロサイトからオリゴデンドロサイトに Cx gap junction を介して供給される乳酸などの栄養が遮断され、最終的に軸索への栄養供給が障害される可能性が推測された。

他方、gap junction 破綻から生じうる神経障害の可能性として、ヘミチャネルとなったアストロサイトの Cx から細胞外へ放出される毒性物質によるものが考えられる。アストロサイトから細胞外に放出される ATP やグルタミン酸が運動ニューロンや神経細胞に毒性をもつことは *in vitro* の実験で報告されている。さらに、Cx ヘミチャネル阻害薬を SOD1 変異マウスに投与することで、生存期間延長などの治療的効果が報告されており、Cx ヘミチャネルが神経障害性に作用している可能性も推測された。

E. 結論

SOD1 変異マウスでは、病期の進行とともにオリゴデンドロサイトの Cx32、Cx47 の mRNA、蛋白発現とも低下しており、一方でアストロサイトの Cx43 や Cx30 は発現が保持もしくは亢進していた。Cx gap junction を介するグリア細胞間情報伝達の破綻が ALS の病態に寄与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masaki K, Suzuki SO, Matsushita T, Yonekawa T, Matsuoka T, Isobe N, Motomura K, Wu XM, Tabira T, Iwaki T, Kira J: Extensive loss of connexins in Baló's disease: evidence for an auto-antibody-independent astrocytopathy via impaired astrocyte-oligodendrocyte/myelin interaction. *Acta Neuropathol* 123: 887-900, 2012.

- 2) Masaki K, Suzuki SO, Matsusita T, Matsuoka T, Imamura S, Yamasaki R, Suzuki M, Suenaga T, Iwaki T, Kira J: Connexin 43 astrocytopathy linked to rapidly progressive multiple sclerosis and neuromyelitis optica. PLoS ONE. 2013 e72919.
- 3) Kawamura MF, Yamasaki R, Kawamura N, Tateishi T, Nagara Y, Matsushita T, Ohyaigi Y, Kira J. Impaired recruitment of neuroprotective microglia and T cells during acute neuronal injury coincides with increased neuronal vulnerability in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Exp Neurol* 234: 437-45, 2012.
- 4) Nagara Y, Tateishi T, Yamasaki R, Hayashi S, Kawamura M, Kikuchi H, Iinuma KM, Tanaka M, Iwaki T, Matsushita T, Ohyaigi Y, Kira J. Impaired cytoplasmic-nuclear transport of hypoxia-inducible factor-1 α in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol* 23:534-46, 2013.

2. 学会発表

- 1) 崔訳文ら：ALS マウスモデルのグリア炎症におけるコネキシン蛋白と病態への関与. 第54回日本神経学会学術大会, 2013. 東京. (ポスター)
- 2) Masaki K et al. Connexin gap junction pathology in the SOD1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Neuro2013. Kyoto. (Oral)
- 3) 崔訳文ら：ALS マウスモデルのグリア炎症におけるコネキシン蛋白と病態への関与. 第25回日本神経免疫学会学術集会. 下関. (口演)

H. 知的所有権の取得状況

特記事項なし

ALS マウス脊髄運動ニューロンでは Asidan 関連遺伝子 NOP56 蛋白は発病初期から減少する

研究分担者 阿部康二

研究協力者 山下 徹、宮崎一徳、佐藤恒太、倉田智子、菱川望、

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学

研究要旨

近年我々が報告した Asidan は、脊髄小脳変性症様の小脳障害に加え、ALS に類似した運動ニューロン障害を呈する新たなタイプの遺伝性神経変性疾患であり、その原因が 20 番染色体の NOP56 遺伝子内の GGCCTG リピート延長であることを既に報告している。この NOP56 は、家族性 ALS の原因遺伝子として近年注目を集めている TDP43 や FUS などと同様 RNA プロセシングに関与していることが知られている。そこで今回我々は ALS モデルマウスの脊髄運動ニューロンにおける NOP56 蛋白の発現を TDP43、FUS 蛋白と比較検討をした。実験方法としては ALS マウス 10 週齢を運動障害発症前、14 週齢を発症初期、18 週齢を発症末期のモデルとし、免疫染色ならびにウェスタンブロット法で TDP-43、FUS、NOP56 の蛋白発現をそれぞれ検討した。結果としては TDP43、FUS はともに 18 週齢になってはじめて頸腰髄の残存運動ニューロンで有意な減少を認めたのに対し、NOP56 は発病早期 14 週齢の時点から、明らかな蛋白発現の減少を認めた。

以上のことから ALS モデルマウスの脊髄では Asidan 関連遺伝子である NOP56 は病初期から発現量が減少しており、NOP56 が ALS 病態になんらかの関与していることが示唆された。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は選択的運動ニューロン変性により四肢筋力低下、球麻痺、呼吸筋麻痺を来し死に至る致死的な疾患である。一方、脊髄小脳変性症（SCA）は小脳の神経細胞が変性・脱落することにより小脳失調を来す疾患の総称である。近年我々が報告した ALS/SCA crossroad mutation Asidan (SCA36)は、脊髄小脳変性症に特徴的な小脳障害に加え、病状の進展にともない筋萎縮性側索硬化症に類似した運動ニューロン障害を呈する新たなタイプの遺伝性神経変性疾患である。その原因は 20 番染色体上に存在する NOP56 遺伝子のイントロン上にある GGCCTG の 6 塩基の繰り返し配列が数千個に増

えていることであることが分かっている。この NOP56 は、ALS の原因遺伝子として近年注目を集めている

TDP43 や FUS などと同様に RNA プロセシングと関与していることが知られている。そこで今回我々は ALS モデルマウスの脊髄運動ニューロンにおける NOP56 蛋白の発現を詳細に検討したので報告する。

B. 研究方法

実験には ALS のモデル動物である G93ASOD1 トランスジェニックマウスを用いた。10 週を運動障害発症前、14 週を発症初期、18 週を発症末期のモデルとし、コントロールとして野生型マウスを

用いた。

各週齢での頸髄、腰髄、舌下神経核、大脳皮質、小脳皮質を免疫組織学的検討ならびウエスタンブロット法により NOP56 蛋白の発現を検討した。

(図 1)。

(倫理面への配慮)

本研究は岡山大学動物実験委員会の審査承認を受けた。

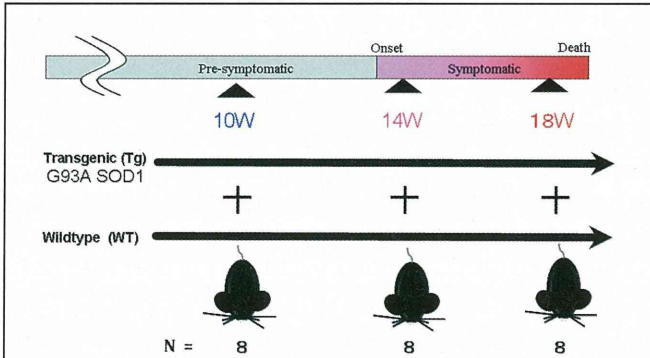


図 1. ALS マウスの病期 3 期と検討数

本研究では、ALS マウス 10 週齢を運動障害発症前、14 週齢を発症初期、18 週齢を発症末期のモデルとし、免疫染色ならびにウエスタンブロット法で TDP-43、FUS、NOP56 をそれぞれ検討した。

C. 研究結果

TDP43 に対する免疫染色学的検討の結果、ALS モデルマウスの腰髄、頸髄では、発症後期の 18 週齢になってはじめて残存運動ニューロンあたりの TDP43 陽性率の減少を認めた (図 2)。

同様に FUS に対する免疫染色学的検討では、ALS モデルマウスの腰髄、頸髄で、発症後期 18 週齢で残存運動ニューロンあたりの FUS 陽性率の減少を認めた (図 3)。

一方、NOP56 に対する免疫組織学的検討の結果では、ALS モデルマウスの頸腰髄では、発症初期 14 週齢で既に有意に残存運動ニューロンあたりの NOP56 陽性率の有意な減少を認めた。

ウエスタンブロット法を用いて、TDP43、FUS、NOP56 蛋白を検討したが、免疫染色の結果と同様の結果が確認された。

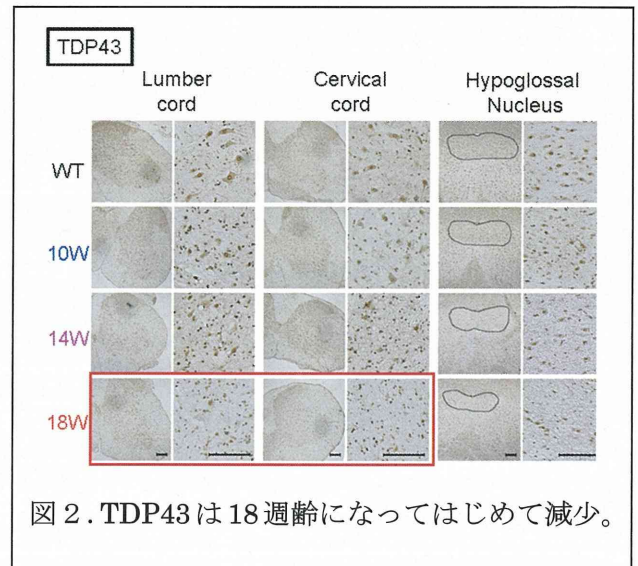


図 2. TDP43 は 18 週齢になってはじめて減少。

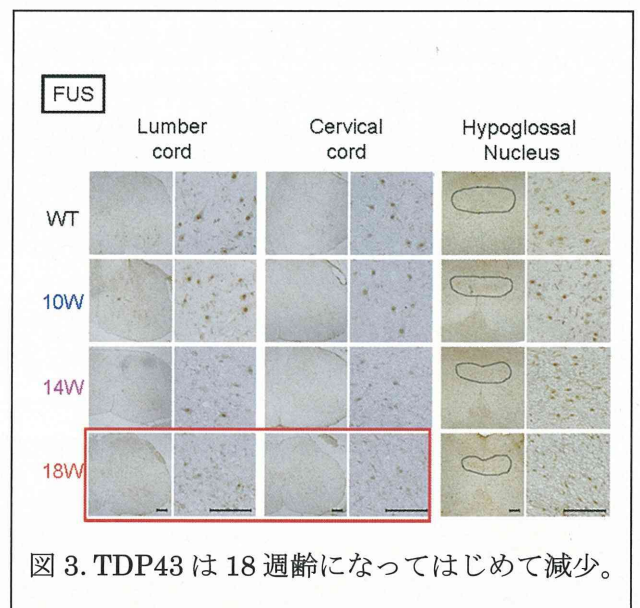


図 3. TDP43 は 18 週齢になってはじめて減少。

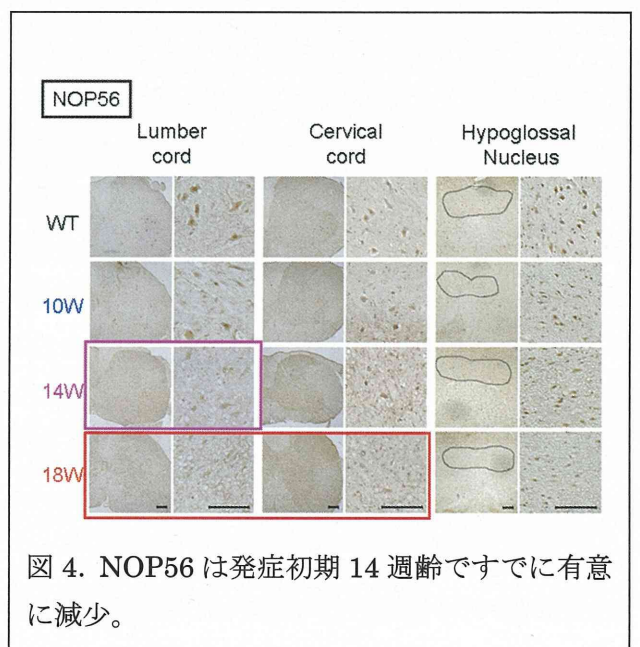


図 4. NOP56 は発症初期 14 週齢ですでに有意に減少。

D. 考察

ALS における運動ニューロン変性に RNA 代謝異常が関わっていると推定されているが、今回新たに注目された NOP56 についても、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

E. 結論

ALS マウス脊髄運動ニューロンにおいて、Asidan 関連遺伝子 NOP56 蛋白は発病初期から減少する。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyazaki K, Yamashita T, Morimoto N, Sato K, Mimoto T, Kurata T, Ikeda Y, Abe K. 2013. Early and selective reduction of NOP56 (Asidan) and RNA processing proteins in the motor neuron of ALS model mice. *Neurol Res* 35(7):744-754.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

なし

脊髄性筋萎縮症における新規 *SMN1* 遺伝子解析法による遺伝子変異の同定

研究分担者 斎藤加代子^{1),2)}

研究協力者 久保祐二^{1),2),3)}、山本友人⁴⁾、森川悟⁴⁾、西尾久英⁴⁾、
中嶋秀樹⁵⁾、大下智彦⁶⁾、倉重毅志⁷⁾

1) 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター

2) 東京女子医科大学先端生命医科学専攻遺伝子医学分野 3) 凸版印刷株式会社 総合研究所

4) 神戸大学大学院医学研究科地域社会医学・健康科学講座疫学分野

5) 長崎大学病院 第一内科（神経内科）6) 翠清会梶川病院 脳神経内科 7) 広島大学 脳神経内科

研究要旨

小児期発症の脊髄性筋萎縮症（SMA）の原因遺伝子（*SMN1*）は第5染色体長腕5q13に存在し、同領域に向反性に重複した配列の *SMN2* 遺伝子も存在する。*SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子には5塩基の違いしかないため *SMN1* 遺伝子のみシーケンスをする際には、*SMN1* 遺伝子を単離する必要がある。これまでに報告されている *SMN1* 遺伝子の単離方法にはいくつかの問題点が存在する。本研究では、この問題点を克服する *SMN1* 遺伝子単離方法を開発し、SMAを引き起こす新規 *SMN1* 遺伝子変異を同定することを目的とした。*SMN2* 遺伝子と異なる exon 8 上の1塩基の違いを利用し、exon 1 の614 bp 上流領域からの Long PCR により *SMN1* 遺伝子を特異的に増幅できた。1 copy の *SMN1* 遺伝子を有する症例に対し、今回開発した Long PCR 法を利用し *SMN1* 遺伝子の全 exon 領域のシーケンスを行ったところ、exon 1 に新規 missense 変異を同定した。この症例は *SMN1* 遺伝子欠失との複合ヘテロ変異が原因であった。この変異は他の SMA III 型 2 症例においても同様の変異が検出された。今回開発した *SMN1* 遺伝子単離方法を用いることで、従来の方法では診断がつかなかった症例における変異同定が可能になった。

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症（SMA）は脊髄前角細胞の変性による筋萎縮と進行性筋力低下を特徴とする常染色体劣性遺伝性疾患である。小児期発症の SMA の原因遺伝子は survival motor neuron 1 (*SMN1*) 遺伝子であり、5番染色体長腕5q13に存在し、同領域に向反性に重複した配列の *SMN2* 遺伝子も存在する。*SMN1* 遺伝子と *SMN2* 遺伝子には5塩基の違いしかないため *SMN1* 遺伝子のみシーケンスをする際には、*SMN1* 遺伝子を単離する必要がある。

その方法には、① *SMN1* 遺伝子の mRNA を利用する方法では、mRNA の発現量が少ない場合単離が困難であり、② Long-Range PCR (LR-PCR)

法による *SMN1* 遺伝子を単離する方法では exon 2 から exon 7 の限られた領域（13.2 kb）しか単離できないなどの問題点が存在する。本研究では、これらの問題点を克服する *SMN1* 遺伝子単離方法を開発し、SMAを引き起こす新規 *SMN1* 遺伝子変異を同定したので報告する。

B. 研究方法

Patients: 関連のない SMA 患者 4 例（I 型 1 例、III 型 3 例）を対象とした。SMA I 型 1 例は先行研究で 1 copy の *SMN1* 遺伝子を示し、その *SMN1* 遺伝子上に点変異（c. 275G>C、p.W92S）が同定された症例であり（Nishio et al., 2007）、本研究で開発した方法を評価するためのポジティブ

コントロール (PC) とした。

SMN copy number analysis using the MLPA method : MLPA 法を用いて *SMN* 遺伝子と近傍の遺伝子の copy 数を測定した。

MLPA : MRC-Holland 社製造の Salsa® MLPA® kit を使用。

New Long-Range PCR (nLR-PCR)を用いた SMN1 遺伝子解析 : *SMN1* 遺伝子の単離は、*SMN2* 遺伝子と異なる exon 8 上の 1 塩基の違いを利用し、exon 1 の 614 bp 上流領域からの nLR-PCR 法により *SMN1* 遺伝子領域 (28.1 kb) を特異的に増幅した (図 1)。遺伝子診断の指標である *SMN1* 遺伝子の欠失を示さない SMAⅢ型 3 症例に対し、MLPA 法を用いて *SMN1* 遺伝子 copy 数を測定し、*SMN1* 遺伝子の全 exon 領域のシーケンスを行った。

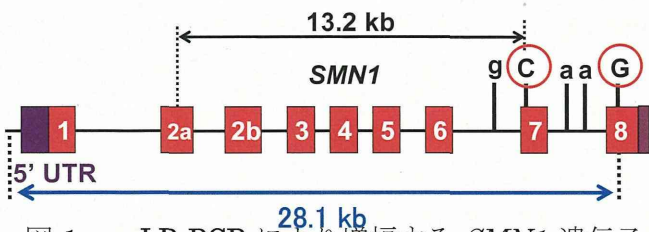


図 1 nLR-PCR により増幅する *SMN1* 遺伝子領域 (28.1 kb)

In silico analysis : アミノ酸の変化がタンパク質の機能に影響があるかどうかを調べるために、Polyphen-2、SIFT、Align-GVGD classification tools を用いて評価した。

(倫理面への配慮)

本研究の脊髄性筋萎縮症の遺伝子解析について、東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. New Long-Range PCR (nLR-PCR)を用いた *SMN1* 遺伝子解析法の評価

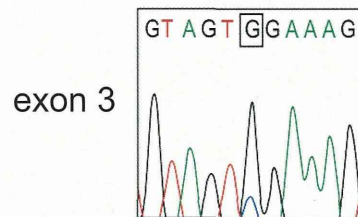
MLPA 法により PC サンプルは *SMN1* 遺伝子が 1copy、*SMN2* 遺伝子が 3 copies であることを示した。

SMN 遺伝子 (*SMN1*、*SMN2* 遺伝子) の全

exon 領域のシーケンスを行ったところ、G と C を示す 2 つのシグナルを検出した (図 2A)。メイン (強度の高い) シグナルは G を示すシグナルであった。また nLR-PCR 法により *SMN1* 遺伝子を単離し *SMN1* 遺伝子特異的な全 exon 領域のシーケンスを行ったところ、G と C を示す 2 つのシグナルを検出したが、メイン (強度の高い) シグナルは C を示すシグナルであった (図 2B)。つまり *SMN1* 遺伝子上に点変異 (c. 275G>C) が存在することを示していた。

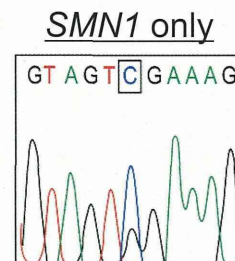
(A) *SMN1* 遺伝子未単離

SMN1 and *SMN2*



(B) *SMN1* 遺伝子単離

SMN1 only



c.275G>C, p.W92S

図 2 nLR-PCR を用いた PC サンプルの *SMN1* 遺伝子解析

また、nLR-PCR 法により得られた産物について exon 7 領域の塩基配列を調べたところ、*SMN1* 遺伝子特異的な配列を示した (図 3)。

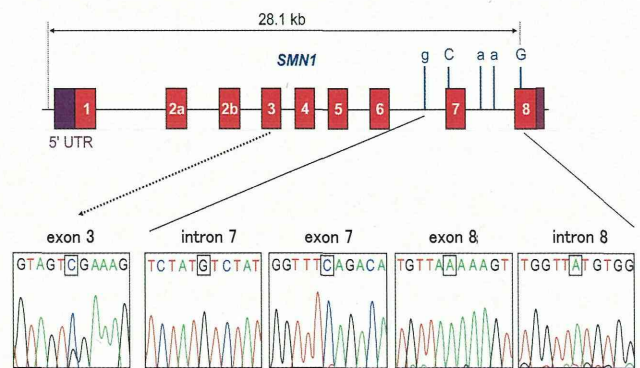


図 3 *SMN1* 遺伝子特異的な配列

2. 新規 *SMN1* 遺伝子変異の同定

MLPA 法により片アレルの *SMN1* 遺伝子欠失を示した SMAⅢ型 3 症例において、nLR-PCR 法を用いて *SMN1* 遺伝子の全 exon 領域シーケンスをしたところ、3 例に共通した exon 1 missense 変異 (c.5C>T) を同定した (図 4)。

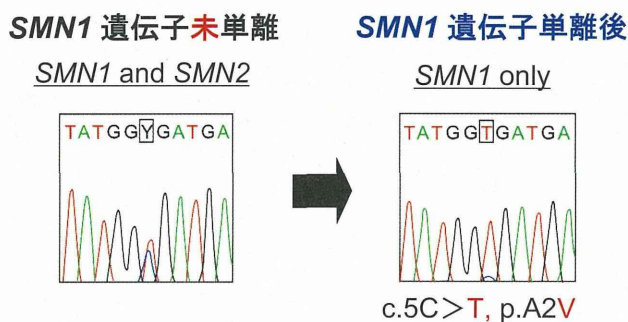


図 4 SMAⅢ型における新規 *SMN1* 遺伝子変異

3. In silico analysis

in silico analysis の結果、c.5C>T 変異はすべてのプログラムにおいて“DAMAGING”を示した。

D. 考察

図 2 のように nLR-PCR 法を用いることで、mRNA を用いることなしに、*SMN1* 遺伝子領域 28.1 kb を特異的に増幅できた。また PC サンプルのような *SMN1* 遺伝子よりも *SMN2* 遺伝子の copy 数の方が多いような場合でも、特異的に *SMN1* 遺伝子のみを増幅できた。さらには全 exon、intron 領域、5'、3'UTR 領域、プロモーター領域、insertion や deletion における変異についても検出可能にした。

本研究で同定された *SMN1* 遺伝子変異 (c.5C>T) は in silico analysis の結果より有害であると評価された。この変異を有すると比較的軽症型の SMA 症状を呈することが確認された。

E. 結論

missense 変異が同定された SMAⅢ型 3 症例は *SMN1* 遺伝子欠失との複合ヘテロ変異が原因であった。今回開発した *SMN1* 遺伝子解析法

(nLR-PCR 法) を用いることで、従来の方法では診断がつかなかった症例における変異同定が可能になった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Akizawa Y, Kanno H, Kawamichi Y, Matsuda Y, Ohta H, Fujii H, Matsui H, Saito K. Enhanced expression of myogenic differentiation factors and skeletal muscle proteins in human amnion-derived cells via the forced expression of *MYOD1*. *Brain Dev* 2013;35(4):349-355.

2) Toyota K, Ogino D, Hayashi M, Taki M, Saito K, Abe A, Hashimoto T, Umetsu K, Tsukaguchi H, Hayasaka K. INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease complicated with focal segmental glomerulosclerosis. *J Peripher Nerv Syst* 2013;18:97-98.

3) Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano T, Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Koder H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito K, Hayasaka K, Matsumoto N, Saito H. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by *KCNQ2* mutation. *Epilepsia* 2013;54(7):1282-1287.

4) Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Shotelersuk V, Tekin M, Ochi N, Kubota M, Ito N, Ihara K, Hara T, Tonoki H, Ohta T, Saito K, Matsuo M, Urano M, Enokizono T, Sato A, Tanaka H, Ogawa A,

Fujita T, Hiraki Y, Kitanaka S, Matsubara Y, Makita T, Taguri M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saito H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A* 2013;161(9):2234-2243.

5) Nurputra DK, Lai PS, Harahap NI, Morikawa S, Yamamoto T, Nishimura N, Kubo Y, Takeuchi A, Saito T, Takeshima Y, Tohyama Y, Tay SK, Low PS, Saito K, Nishio H. Spinal Muscular Atrophy: From gene discovery to clinical trials. *Ann Hum Genet* 2013; 77(5):435-463.

6) Iwasaki N, Fukawa K, Matsuo M, Urano M, Watanabe M, Ono Y, Tanabe K, Tanizawa Y, Ogata M, Ide R, Takizawa M, Nagata S, Osawa M, Uchigata Y, Saito K. A sibling case of Wolfram syndrome with a novel mutation Y652X in *WFS1*. *Diabetol Int.* 2013; in press.

7) Sato Y, Yamauchi A, Urano M, Kondo E, Saito K. Corticosteroid therapy for duchenne muscular dystrophy: improvement of psychomotor function. *Pediatr Neurol.* 2013; in press.

8) Yamamoto T, Sato H, Lai PS, Nurputra DK, Harahap NI, Morikawa S, Nishimura N, Kurashige T, Ohshita T, Nakajima H, Yamada H, Nishida Y, Toda S, Takanashi J, Takeuchi A, Tohyama Y, Kubo Y, Saito K, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H. Intragenic mutations in *SMN1* may contribute more significantly to clinical severity than *SMN2* copy numbers in some spinal muscular atrophy (SMA) patients. *Brain Dev* 2013; in press

9) 伊藤万由里、斎藤加代子、大澤眞木子. 日本における脊髄性筋萎縮症の臨床実態調査. *東女医大誌* 2013;83 (臨時増刊) :E52-E57.

10) 浦野真理、斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症の遺伝カウンセリング. *東女医大誌* 2013;83 (臨時増

刊) :E651-E655.

11) 斎藤加代子、浦野真理. 神経筋疾患における小児医療から成人医療への移行: 遺伝子診断および遺伝カウンセリングを通じた介入. *診断と治療.* 2013;101(12):1887-1890.

12) 斎藤加代子、久保祐二. 脊髄性筋萎縮症. すべてがわかる ALS・運動ニューロン疾患. 2013; 116-124, 中山書店, 東京

13) 斎藤加代子、松尾真理. 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, 2013

14) 斎藤加代子. 第23章神経筋疾患. 標準小児科学第8版 (内山聖監、原寿郎・高橋孝雄・細井創編). 2013; 671-689, 医学書院, 東京.

2.学会発表

1) 久保祐二、伊藤万由里、青木亮子、斎藤加代子, 脊髄性筋萎縮症における *SMN* 遺伝子の copy 数の解析と遺伝カウンセリングへの応用, 日本遺伝カウンセリング学会第37回大会, 2013.6. 22, 川崎 若手奨励賞最優秀賞 受賞

2) 浦野真理、斎藤加代子. 出生前診断に関わる遺伝カウンセリング—当センターの経験から—. 日本遺伝カウンセリング学会第37回大会, 2013.6. 22, 川崎

3) 久保祐二、山本友人、森川悟、西尾久英、中嶋秀樹、大下智彦、倉重毅志、斎藤加代子, 脊髄性筋萎縮症患者における新たな *SMN1* 遺伝子単離法による新規遺伝子変異の同定, 日本遺伝子診療学会第20回大会, 2013.7.19, 浜松 若手奨励賞 受賞

4) 斎藤加代子. 遺伝医療の現在と将来. 第4回遺伝カウンセリング研修会, 2013.7.13, 京都

5) 斎藤加代子, SMA 患者登録, 稀少性疾患登録/国際ワークショップ, 2013.7.25, 東京

6) 荒川玲子、久保祐二、青木亮子、斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症患者の *SMN2* 遺伝子コピー数がバルプロ酸投与時の *SMN* タンパク質発現量に与える影響. 日本人類遺伝学会第58回大会, 2013.11.22,

仙台

7) 浦野真理、斎藤加代子. 神経筋疾患をもつ子どもたちの思春期の課題. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 2013.11.22, 仙台

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

下位運動ニューロン症候のみを呈し、予後良好な経過を示した症例で

みいだされた遺伝子変異

研究代表者 中野今治¹⁾

研究協力者 益子貴史²⁾、手塚修一²⁾、秋本千鶴²⁾、森田光哉²⁾、
齋藤加代子³⁾、樋口雄二郎⁴⁾、橋口昭大⁴⁾、高嶋博⁴⁾

1) 東京都立神経病院 脳神経内科 2) 自治医科大学 内科学講座 神経内科学部門

3) 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター

4) 鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 神経病学講座 神経内科・老年病学

研究要旨

成人発症の運動ニューロン疾患症例のうち、初診時より6年以上下位運動ニューロン症候のみを呈し、呼吸筋麻痺など急激な進行をとることなく経過した予後良好な症例について、その遺伝学的背景を検討した。当科において過去15年間に運動ニューロン疾患と診断された302例について、後方視的に調査すると成人型脊髄性筋萎縮症(SMA)は11例であった。その臨床像は性別、遺伝様式、発症年齢、症候いずれにおいてもヘテロな集団であった。遺伝子解析の同意が得られた9症例では*SMN1*、*NAIP*遺伝子の異常はなく、また遺伝性運動ニューロパチー関連遺伝子の網羅的解析の同意が得られた6例中3例で*MFN2* P456L、*DCTN1* R1127Q、および*HSPB1* T151I変異がそれぞれ確認された。*MFN2*はCMT2Aの原因遺伝子として知られているが、自験症例は孤発例でありP456Lの病的意義については今後検討する必要がある。*DCTN1* R1127Qは新規変異であるが家系内でのco-segregationが確認され、また*HSPB1* T151Iは遠位型遺伝性運動ニューロパチーの原因変異として既に報告されており、病因となっている可能性が示唆された。臨床的に成人型SMAと診断される症例群は遺伝性ニューロパチーを含み、遺伝子解析がその診断の一助となることが示された。

A. 研究目的

成人発症の運動ニューロン疾患のうち、下位運動ニューロン症候のみを呈し、急激な進行をとることなく経過する予後良好な症例での遺伝学的背景を解析し、成人型SMAの位置付けを検討する。

B. 研究方法（倫理面への配慮も含む）

1997年から2011年までの15年の間、当科で運動ニューロン疾患が疑われた患者302例についてカルテを元に後方視的に解析した。初診時の上位あるいは下位運動ニューロン症候の有無で3群に振り分けた。初診時に下位運動ニューロン症候のみを呈した108例について、そ

の後の観察期間中、上位運動ニューロン症候を呈さず、呼吸筋麻痺や嚥下困難など予後不良徴候を示すことなく6年以上フォロー可能であった11症例を暫定的に成人型SMAとして抽出した。

これら11例中同意を得られた9例に対して、多くの小児型脊髄性筋萎縮症症例で原因となる*SMN1*および*NAIP*の変異を検索した。また同意の得られた6例に対しては遺伝性運動ニューロパチーの原因遺伝子について、マイクロチップアレイでの網羅的スクリーニング(*PMP22*, *MPZ*, *SIMPLE*, *EGR2*, *NEFL*, *SOX10*, *GDAP1*, *MTMR2*, *SBF2/MTMR13*, *KIAA1985*, *NDRG1*, *PRX*, *GJB1*, *MFN2*, *RAB7*, *GARS*, *HSPB1*, *HSPB8*, *LMNA*, *GAN1*, *KCC3*, *APTX*, *SETX*,

TDPI, DNM2, DHH, YARS) およびエクソームシーケンスを行った。

C. 研究結果

成人型 SMA 11 例の臨床像 (性別、遺伝形式、発症時年齢、初診時からの観察経過年数、初発部位) を表 1 に示す。男性 4 例、女性 7 例で、発症時年齢は中央値 55 歳 (29-72 歳)、遺伝形式は常染色体優性形式が 3 例、孤発性が 8 例であった。初診時の筋力低下部位は遠位筋優位非対称性筋力低下が 7 例、遠位筋優位対称性筋力低下例が 1 例あった。近位筋優位対称性下肢筋力低下例も 1 例あった。SMN1、NAIP 変異について検索した 9 例はいずれも変異を認めなかった。遺伝性運動ニューロパチーの原因遺伝子の網羅的解析では 3 例にそれぞれ異なる遺伝子変異を認めた。

患者 1 ; 66 歳女性。発症年齢は 41 歳、常染色体優性遺伝形式 (図 1-a)。初発症状は手指のふるえで、下肢優位、四肢近位筋優位左右対称性の筋力低下を認めた。25 年経過後でも自力起立および短い歩行可能で ADL は自立していた。本症例に *DCTN1* の R1127Q 変異を認めた。さらに、発症者である姉と弟に同遺伝子変異を確認し、非発症者である母には遺伝子変異がないことから変異の co-segregation を確認した。

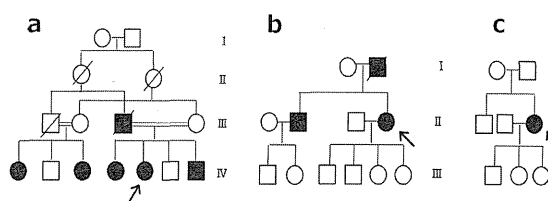
患者 2 ; 61 歳女性。発症年齢は 52 歳、常染色体優性遺伝形式 (図 1-b)。左下垂足が初発症状で、初診時片側下肢遠位筋優位筋力低下を示した。観察期間終了時にも杖歩行可能で自立した ADL が保たれていた。*HSPB1* に T151I を認めた。

患者 3 ; 56 歳女性で発症年齢 50 歳。孤発例 (図 1-c)。一側手関節の伸展困難で発症し、緩徐進行性に経過し、その後両側性に肘関節屈曲困難、肩関節外転困難を示した。経過中多巣性運動ニューロパチーを疑い、ステロイド治療、IVIG 療法を施行したが、反応はなかった。発症後 6 年経過した時点でも、筋力低下は両上肢に限局し、hang arm 様で手内筋は MMT 4/5 程度に保たれていた。この症例では *MFN2* に P456L 変異を認めた。

表 1 成人型 SMA 11 例の臨床像

患者No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
性別	F	F	F	F	M	F	M	F	M	M	F
発症年齢	41	52	50	38	66	45	70	72	29	64	55
発症から初診までの年数	7	2	1.5	3	0.3	3	0	0.1	4	3	0.1
観察経過年数	25	9	6	15	17	18	13	10	41	7	32
遺伝形式	AD	AD	sporadic	sporadic	sporadic	AD	sporadic	sporadic	sporadic	sporadic	sporadic
初診時の筋力低下部位	対称性	非対称性	非対称性	非対称性	非対称性	対称性	非対称性	非対称性	非対称性	非対称性	非対称性
	近位	遠位	遠位	近位	遠位	遠位	遠位	遠位	遠位	遠位	近位
	下肢	下肢	上肢	下肢	上肢	上肢	下肢	上肢	上肢	上肢	上肢
	振戦					振戦					
SMN1 or NAIP	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-
遺伝子変異	<i>DCTN1</i> R1127Q	<i>HSPB1</i> T151I	<i>MFN2</i> P456L					NA	NA	NA	NA

図 1 遺伝子変異を認めた3症例の家系図
a : 患者1, b:患者2, c:患者3



D. 考察

今回我々は、成人型 SMA として 11 例を抽出したが、その抽出過程の予備的データを示す。初診時下位運動ニューロン症候のみを示した 108 例の中で成人型 SMA としての基準を満たさず除外された 97 例の内訳についてみると、上位運動ニューロン症候を示し、臨床的に ALS と診断された症例は 2 例であった。さらに 63 例は呼吸不全や死亡など予後不良な経過をたどり、ALS と診断するのが妥当と考えられた。一方、転医のためフォローができず除外した症例も 30 例あり、残りの 2 例については観察期間終了時点で発症より 5 年以下であったために除外となった。また今回暫定的に“6 年以上”を緩徐に進行し予後良好を示す期間とした妥当性について、初診時既に上位運動ニューロン症候および下位運動ニューロン症候を同時に示した臨床的 ALS 症例 188 例と下位運動ニューロン症候のみの 108 例を比較した予備的データから示す (表 2)。2 群の性別や発症年齢、発症から初診までの年数、初診時の障害部位といった臨床像には何れも有意差がなかった。そして、これらの 2 群について、発症時からの生存月数についての生存曲線を描くと (図 2) およそ 70 ヶ月までは下位運動ニューロン症候のみの群 (LMN 群) が予後良好であるものの、80 ヶ月で二つの曲線は交わる。これは Kim ら (*Neurology*, 2009) が ALS および PMA の 2 群についての生存曲線を示した結果