

プロジェクト名：ALS

プロジェクトリーダー名：祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学

A.研究目的

前頭側頭葉変性症（FTLD）には病理学的に TDP-43 proteinopathy に分類される病型があり（FTLD-TDP）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）との関係が議論されている。連続剖検例を用いて、FTLD-TDP と ALS の脊髄病変を比較・検討した。

B.研究方法

愛知医科大学加齢医科学研究所において病理学的に TDP-43 関連病理の確認された 260 例中、後方視的な検討により問題行動や明らかな認知症を認めた 50 例を対象とした。病理学的に顔面神経核、舌下神経核、脊髄において、神経細胞脱落、グリオシスの程度を評価するとともに、抗リン酸化 TDP43 抗体などを用いた免疫染色を行った。さらに、臨床的に運動ニューロン症状を認めなかった 10 例（FTLD without MND）、認知機能低下で発症後に運動ニューロン障害の加わった 8 例（FTLD-MND）、運動ニューロン障害で発症後に認知機能低下の加わった 26 例（MND-FTLD）の臨床・病理所見を比較・検討した。

C.研究結果

脊髄が採取されていた FTLD without MND 7 例全例で、脊髄前角運動神経細胞にリン酸化 TDP-43 陽性封入体(skein like inclusion) を認めた。神経細胞脱落は 5 例、グリオシスは 5 例、マクロファージの出現は 6 例に認め、Bunina 小体も 5 例に認めた。脊髄前角神経細胞の脱落の程度は ALS よりも明らかに軽度であり、また FTLD-MND、MND-FTLD よりも軽度であった。顔面神経核や舌下神経各の病変が軽度ながら脊髄病変を認める症例も認めた。予後の検討では、気管切開もしくは死亡をエンドポイントとした場合、FTLD without MND の中央値は 6 年（95%

CI 4.6-7.4）、FTLD-MND は 2.3 年（95% CI 1.7-3.0）、MND-FTLD は 1.8 年（95% CI 1.1-2.6）であり、FTLD の予後は FTLD-MND、MND-FTLD よりも有意に良好であった（ $p < 0.001$ ）。

D.考察

臨床的に明らかな運動ニューロン障害を指摘出来ない FTLD-TDP 症例においても全例で脊髄にはリン酸化 TDP-43 陽性封入体を認め、Bunina 小体やマクロファージの出現も認めたことから、ALS 病理との連続性が示された。一方、ALS に比して FTLD without MND の脊髄病変は軽度であり、比較的良好な予後と関連している可能性が考えられた。死因では、FTLD without MND で感染症が主体であるのに対し、FTLD-MND や MND-FTLD では呼吸不全が中心であり、脊髄病変に伴う呼吸筋麻痺の有無が生命予後に影響している可能性が考えられた。

E.結論

①FTLD-TDP は MND と病理学的に連続した疾患と考えられる。

②臨床的に MND 症候を呈さなかった FTLD の症例は ALS 症例に比して脊髄病変が軽度であり、比較的良好な予後と関連している可能性が考えられた。

F.研究発表

1.論文発表 Riku Y, Watanabe H, Yoshida M, et al.. Lower Motor Neuron Involvement in TAR DNA-Binding Protein of 43 kDa-Related Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. JAMA Neurol. 2014;71:172-9.

G.知的所有権の取得状況 特記なし。

プロジェクト名：JaCALSによるコホート研究

プロジェクトリーダー名：祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学

A.研究目的

- ①筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者の多施設共同コホートを構築し、前向き縦断的自然歴を把握する。
- ②ALS患者の臨床像、進行、予後の多様性に関する臨床的因子を探索する。
- ③前向き自然歴情報とリンクしたALS患者大規模遺伝子リソースを構築する。
- ④ALS患者の発症、臨床像、進行、予後の多様性に関する遺伝的因子を探索する。

B.研究方法

各研究参加施設において、文書でのインフォームドコンセントを得て症例を登録し、臨床調査票および血液検体はすべて各施設内で連結可能匿名化を行い、名古屋大学内に設置した臨床データベースおよびゲノム遺伝子保存センターに保管する体制とした。全国30施設で登録体制を整備した。医師による臨床評価は、病型、初発症状、肺活量、各種神経所見、重症度、各処置の導入時期などにつき行い、日常生活活動度(ADL)の評価は日本版ALSFRS-Rを用いた。経管栄養導入や呼吸器装着などの病気の進行を示す重要なイベントおよびALSFRS-Rについて、3ヶ月に一度、臨床研究コーディネーター(CRC)から患者もしくは主介護者に対して電話インタビューによる調査を行った。臨床データベースとリンクした匿名化された遺伝子検体は、広く活用できるようにし、本研究参加施設の中から組織した運営委員会において研究計画の審査、管理を行うこととした。(倫理面への配慮)

すべての参加施設で倫理委員会承認を得て、関連倫理指針を遵守して実施した。

C.研究結果

2014年1月末の段階で、ALS患者905例を登録し、ゲノム遺伝子および不死化リンパ球を保存

した。正常コントロール遺伝子検体も273例登録した。これらのリソース活用により、孤発性ALS関連遺伝子多型の同定(Hum Mol Genet 2011)、家族性ALS原因遺伝子変異の我が国における孤発例での頻度検証(Neurobiol Aging 2012, Neurol Res Int 2011)、家族性ALS新規遺伝子の検証(Am J Hum Genet 2013)、頸部筋力低下が重要なALS予後因子であることの提示(JNNP 2013)、他の変性疾患関連遺伝子の検証(N Engl J Med 2013, Neurology 2014)といった研究活用がなされた。さらに、ゲノムワイド塩基多型(SNPs)との関連解析により、ALS患者の進行・予後にp値 10^{-9} ~ 10^{-8} 台で関連を示すSNPsを10個以上見出した。

D.考察およびE.結論

900例規模のALS患者前向きコホートの構築に成功しており、合わせてゲノム遺伝子、不死化リンパ球の蓄積がなされている。これらは世界的にも有数の研究リソースである。既に多彩な研究活用がなされ、今後も我が国のALSの病態解明、治療法開発研究の重要な基盤となる。

F.研究発表

1.論文発表 Nakamura R, et al. Neck weakness is a potent prognostic factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013; 84: 1365-71

Ogaki K, et al. ; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS). Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol Aging. 2012;33:2527.e11-6.

G.知的所有権の取得状況 特記なし。

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

プロジェクト名：パーキンソン病および関連疾患分科会

プロジェクトリーダー名：戸田 達史 神戸大学大学院医学研究科神経内科学

研究課題：多因子遺伝病としてのパーキンソン病危険因子の探索

A.研究目的

我々は、一塩基多型 SNP を解析したゲノムワイド関連解析を行い、4つの孤発性PD遺伝子(*PARK16*, *BST1*, *α-synuclein*, *LRRK2*)を報告した(Satake *et al*, *Nature Genet* 2009)。しかし一方、これらだけでは本症の遺伝背景は説明できず、他にも孤発性PD遺伝子は存在する。

B.研究方法

715例のPD患者ゲノムから、全エクソン(エクソーム)を抽出、HiSeq2000シーケンサーで超高速・並列シーケンスをおこなった。

(倫理面への配慮)

検体収集に際しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、文章によるインフォームドコンセントを得た。

C.研究結果

PARK16, *α-synuclein*, *LRRK2*には、遺伝子エクソン領域内に有意なSNVは検出しなかった。*BST1*には比較的有意なSNVを検出したが(図2: $P=0.0005$)、アレル頻度は患者群で46%、対照群で37%であり、強い疾患リスクをもつrare variantではなかった。よって、これら孤発性PD遺伝子エクソンには強いrare variant riskは存在せず、イントロンなどのSNVが発症リスクとなっていると考えた。

D.考察

孤発性PDの発症ゲノム因子には、

(1)強い疾患リスクをもつエクソン領域の rare variant

(2)リスクとしては強くはないが頻度は高い一塩基多型

(3)非常に強い疾患リスクであり家族性PDを引き起こすような変異の孤発性群への混入がある。

E.結論

今後、本データを非患者対照群と比較する全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の強いRare variantリスク発見を目ざす。

F.研究発表

1.論文発表

Mizuta I *et al*, YY1 binds to *α-synuclein* 3'-flanking region SNP and stimulates antisense noncoding RNA expression. *J Hum Genet* 58, 711-719, 2013.

Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in *COQ2* in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med* 369, 233-244, 2013.

2.学会発表

Satake W *et al*, Exome sequencing of Parkinson's disease in order to identify genetic variants with high disease-risk. American society of human genetics, 2013, Boston, USA.

Satake W *et al*, Search for rare-variant risks of Parkinson's disease by sequencing of candidate genes and exome sequencing. Movement disorder society, 2013, Sydney, Australia.

G.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

3.その他 なし

プロジェクト名：パーキンソン病および関連疾患分科会

プロジェクトリーダー名： 中島健二 鳥取大学医学部脳神経内科学分野

研究課題：パーキンソン症候群の多施設共同研究による生体試料収集と保存体制整備に関する研究

研究要旨

パーキンソン症候群 (PS) には、進行性核上性麻痺 (PSP) や大脳皮質基底核変性症 (CBD) などの神経変性疾患が含まれる。これらの神経変性疾患は、原因不明で根治療法は未だない。希少疾患であることから多数例の生体試料収集は困難であり、更なる臨床研究を進めるには、詳細な臨床情報が整った生体試料の収集とともに生体試料バンクの設立が要望されている。本研究では、全国共同研究による PS の生体試料収集体制を整備した。

A. 研究目的

パーキンソン症候群 (PS) には、パーキンソン病 (PD) ならびに、進行性核上性麻痺 (PSP)、大脳皮質基底核変性症 (CBD)、多系統萎縮症などの神経変性疾患が含まれる。これらの変性疾患は原因不明であり、根治療法は未だになく、疾患によって治療法、予後も異なり、鑑別診断が重要であるが、臨床的に鑑別が困難な場合が少なくない。各疾患の関連や相違など詳細な研究の推進が待たれている。

PS の多数例の生体試料収集は困難であり、正確な臨床情報の整った PS 生体試料の収集とともに研究にすぐに活用できる PS 生体試料のバンク設立が要望される。本研究においては、多施設共同研究によって、PS の中でも臨床的に PSP・CBD を疑う症例を主な対象として詳細な臨床情報を経時的に把握しながら、血液、髄液などの生体試料の収集を行う。

B. 研究方法

本研究班の班員、ならびに、研究班には属さないが、PS 研究を積極的に進めている施設にも協力を依頼し、全国共同研究による PS 生体試料収集体制の整備を行った。

(倫理面での配慮)

個人情報の保護、臨床研究に関しては、鳥取大学医学部倫理委員会に諮り承認された。動物実験においては、鳥取大学動物実験指針に則り行った。

C. 研究結果

1) 倫理委員会申請

PS の生体試料収集とその収集・保存体制整備に関する全国共同研究に関して鳥取大学医学部倫理委員会に申請して承認を受け、参加各施設の倫理委員会で本研究の承認を進めている。

本研究には、28 施設が参加し、11 施設において倫理委員会の承認を受けている。

2) JALPAC の設立

本研究に参加している主なメンバー (中野今治 [都立神経病院]、森田光哉 [自治医科大]、饗庭郁子 [NHQ 東名古屋病院]、小野寺理 [新潟大学]、池内健 [新潟大学]、下畑享良 [新潟大学]、徳田隆彦 [京都府立医

大]、村山繁雄 [健康長寿医療センター]、瀧川洋史 [鳥取大]) を構成員として多施設での PS の臨床情報・画像情報・生体試料を収集する多施設共同前向き研究を行う研究組織として JALPAC (Japanese Longitudinal Biomarker Study in PSP and CBD) を設立した。

3) JALPAC 会議の開催

関係者による 7 回の会議を重ねた。

・第 1 回会議 (平成 25 年 2 月 24 日開催)
生体試料収集、バイオマーカー開発研究について議論した。

・第 2 回会議 (平成 25 年 4 月 14 日開催)
対象疾患の診断基準、臨床情報チェックシート、検体採取・取り扱いのプロトコール、JALPAC の名称について議論した。

・第 3 回会議 (平成 25 年 6 月 1 日開催)
対象疾患の診断基準、臨床情報チェックシート、検体採取・取り扱いのプロトコール、収集した試料の活用ルールについて議論した。

・第 4 回会議 (平成 25 年 7 月 19 日開催)
対象疾患の診断基準、臨床情報チェックシート、画像データ収集、生体試料の匿名化、保管・管理、JALPAC 規約について議論した。

・第 5 回会議 (平成 25 年 11 月 23 日開催)
臨床情報チェックシート、研究説明書・同意書、検体匿名化、収集・保存、患者家族会への案内文について議論した。

・第 6 回会議 (平成 25 年 12 月 20 日開催) 患者説明用パンフレット、臨床情報チェックシート、検体採取・保存、JALPAC 規約について議論した。

・第 7 回会議 (平成 26 年 2 月 11 日開催)
画像情報収集、臨床情報チェックシート、JALPAC マニュアルについて議論した。

D. 考察および E. 結論

全国共同研究による PS の生体試料収集に向けて研究協力体制が概ね整備された。今後、本研究をさらに推進することにより、多数例での生体試料収集が望まれる。

研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

プロジェクト名：ハンチントン病

プロジェクトリーダー名： 長谷川一子 国立病院機構相模原病院神経内科

研究課題： パーキンソン症候群の多施設共同研究による生体試料収集と保存体制整備に関する研究

研究要旨

ハンチントン病 Huntington's disease: HD の疫学、治療薬開発、療養生活改善を目的に研究を行った。疫学調査として自験例、特定疾患臨床個人票を用い有病率は人口 10 万人あたり 0, 7 人であること、病状、療養状況について調査し、有病率依然として HD が精神・神経学的に重篤であり、社会資源の利用が不十分であることを示した。治療薬開発に先立ち日本語版 UHDRS: unified Huntington's disease rating scale の信頼性の確認試験を行い、企業とテトラベナジンの臨床試験を行い、テトラベナジンは舞踏運動の改善に有効であることが確認し、平成 24 年度にわが国でも使用可能となった。療養生活改善については平成 25 年度に「ハンチントン病と生きる」を発行した。

A. 研究目的

ハンチントン病 Huntington's disease: HD の疫学、治療薬開発、療養生活改善を目的に研究を行った。

B. 研究方法

疫学調査は難病センターおよび平成 23 年度の特定疾患臨床診断個人票をもとに、治療薬開発を目的として、平成 22 年度に日本語版 UHDRS: unified Huntington's disease rating scale の信頼性試験を行った。療養生活改善を目指した療養手帳については平成 25 年度をめどに発行することとし、HD 研究部ループを組織した。なお、すべての研究は臨床試験倫理指針、個人情報保護法を遵守して行った。

C. 結果

1. 疫学研究：ハンチントン病個人票による全国調査では、HD 患者数は 687 名で男性 293 名、女性 394 名で、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 HD の有病率は 0.7 人/10 万人で、平成 16 年度の 0.53 人よりも微増した。HD の自然歴についても検討し、HD の自然歴は多様であること、病状が重篤であることにより、社会保障の更なる拡充が望まれた。なお、臨床調査個人票の詳細な検討からは、前回調査した平成 16 年度と比較した結果、HD の療養状況についてはこの 9 年

間に、大きな変化はなかったが、現行の社会医療制度の利用が依然として不十分であることを再認識できた。

2. 治療薬開発：日本語版 UHDRS の信頼性を確認した後、企業とテトラベナジンの臨床試験を行った。その結果、テトラベナジンは舞踏運動の改善に有効であることが確認でき、平成 24 年度にわが国でも使用可能となった。

3. 療養生活改善：HD 研究グループと患者会で共同し Q&A 方式で「ハンチントン病と生きる」平成 25 年度に発行した。班長と協議し、患者会、神経変成班班員と関連施設、医学部のある大学に配布した。

E. 結論

HD の有病率、臨床症状の現状調査、テトラベナジンの上市、療養手帳の発行を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表 13 報、学会発表 89 回を行った。

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

I. 3年間（2011年度～2013年度）の 研究総括

3. 研究分担者・研究協力者

神経変性疾患に関する調査研究班

研究代表者 中野今治

研究要旨

この3年間における研究成果としては、成人発症の運動ニューロン疾患に関与する遺伝学背景を解析し、いわゆる脊髄性筋萎縮症/進行性筋萎縮症と臨床診断される症例が多様な疾患群を包含する症例群であることを明らかとしたことである。また筋萎縮性側索硬化症において、*ZNF512B* 遺伝子内の SNP が臨床経過に影響をおよぼし、リスクアレルを有する群では累積生存率が有意に低下し、予後不良となることを示した。

研究分担者：中野 今治

所属機関名：東京都立神経病院

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成人型脊髄性筋萎縮症（SMA）と診断し得る一群での臨床・遺伝学的背景を解析し、成人型 SMA の位置付けを検討する。さらに筋萎縮性側索硬化症症例で、*ZNF512B* 遺伝子内の SNP が臨床経過にいかに関与しているのかを検討する。

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。まず、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の原因遺伝子である *SMN1* および *NAIP* の変異を検索した。

さらに1995年から2010の間にALSと診断された6例に対しては網羅的遺伝子解析の同意がとれた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スクリーニングおよびエクソームシーケンスを行った。

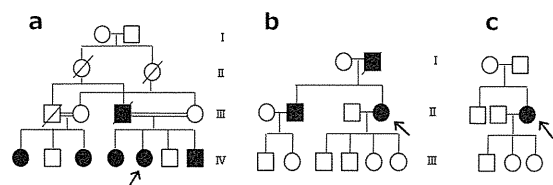
れた176名について *ZNF512B* 遺伝子内の ALS 関連リスクアレル(C allele)の有無を調査し、ALS 患者の生存期間、発症時年齢、初発部位等の臨床像を retrospective に解析した。
(倫理面への配慮)

遺伝子解析研究については事前に当施設の遺伝子解析倫理委員会へ申請し、各患者より書面にて informed consent を得ている。

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6例中3例にそれぞれ *MFN2* P456L、*DCTN1* R1127Q、および *HSPB1* T151I 変異が確認

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



された。

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
発症から診断までの期間(年)	7	2	1.5	3	0.3	3	0	0.1	4	3	0.1
運動失調特徴	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
初発時の筋力低下部位	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
損傷						損傷					
SMN1 or N1P	-	-	-	-	-	-	-	-	NA	NA	-
遺伝性ニューロパチー関連遺伝子	DCTN1 R1127Q	HSPB1 T151I	MFN2 P456L						NA	NA	NA

新規SNPのリスクアレル (rs2275294, C allele) は、調査したALS患者176名中、128名 (72.4%)にて認められた。発症時の平均年齢、初発部位、症状の発症から診断に至るまでの期間、リルゾールの内服率をリスクアレル有無で検討したが、有意差は認められなかった (表2)。

表2. Baseline characteristics of ALS patients.

Characteristic	Without allele (n=48)	With allele (n=128)	P value
Sex (male/female)	30/18	67/61	0.23
The mean age at onset (SD) (year)	62.7 (±11.1)	63.8 (±10.7)	0.56
The site of onset (bulbar/spinal)	19/29	43/85	0.46
Riluzole (+/-)	25/23	67/61	0.98
The mean time from onset to diagnosis (SD) (month)	16.8 (±14.2)	13.1 (±9.3)	0.32

解析したALS患者176名中、72名においてend pointを確認することができた。その72名の両群間の生存期間を解析したところ、リスクアレルありにて平均24.3(±13.8)ヵ月、リスクアレルなしにて平均36.6(±19.7)ヵ月で、有意にリスクアレルありの方が、生存期間が短かった。

また、両群間における累積生存率について、Kaplan-Meier生存曲線(log-rank test)にて比較検討した。その結果リスクアレルを有している群が、他の予後規定因子に独立して、累積生存率が有意に低下していた(図2, log-rank test, P < 0.01)。

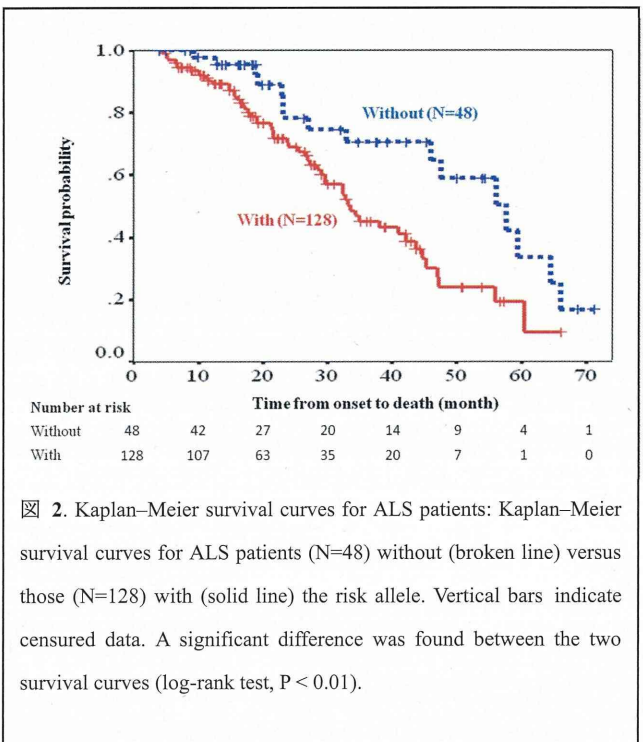


図2. Kaplan-Meier survival curves for ALS patients: Kaplan-Meier survival curves for ALS patients (N=48) without (broken line) versus those (N=128) with (solid line) the risk allele. Vertical bars indicate censored data. A significant difference was found between the two survival curves (log-rank test, P < 0.01).

今回我々は、成人型SMAとして11例を抽出し、SMN1/N1Pの変異を検索したが、異常は認められなかった。また臨床症状についても、文献上検索できたSMN1遺伝子変異を有する症例の初発症状が対称性下肢近位筋優位の筋力低下を示し比較的均一であるのとは異なり、自験例では、1例のみが対称性下肢近位筋優位の筋力低下で、その他の症例は遠位筋優位等と様々な分布で発症し、症候学的な多様性を示していた。また6例における遺伝性運動ニューロパチーの原因遺伝子の網羅的スクリーニングにて、3例にMFN2 P456L, DCTN1 R1127Q, およびHSPB1 T151I変異がそれぞれ確認され、成人型SMAと臨床的に診断される症例には、運動ニューロパチーが包含されてくることを示した。

運動ニューロン疾患の大多数は未だ原因不明であるが、その発症および病態に遺伝学的背景が深く関与していることが推測されており、我々の研究結果は、ALSの臨床経過にZNF512B遺伝子内のSNPが影響を及ぼしていることを明らかとした。

E. 結論

今回我々は臨床的に成人型SMAと診断される症例は遺伝性運動ニューロパチーなど多様な疾患群を含むことを示し、またALSの臨床経過にZNF512B遺伝子のSNPが影響することを報告した。運動ニューロン疾患

での遺伝子解析は、その診断や病像を明らかにする上で有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Akimoto C, Morita M, Atsuta N, Sobue G, Nakano I: High-Resolution Melting (HRM) Analysis of the Cu/Zn Superoxide Dismutase (SOD1) Gene in Japanese Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (SALS) Patients. *Neurol Res Int.* 2011;165415.

Iida A, Takahashi A, Deng M, Zhang Y, Wang J, Atsuta N, Tanaka F, Kamei T, Sano M, Oshima S, Tokuda T, Morita M, Akimoto C, Nakajima M, Kubo M, Kamatani N, Nakano I, Sobue G, Nakamura Y, Fan D and Ikegawa S: Replication analysis of SNPs on 9p21.2 and 19p13.3 with amyotrophic lateral sclerosis in East Asians. *Neurobiology of Aging*, 32(4), 2011, 757.e13-14

Iida A, Takahashi A, Kubo M, Saito S, Hosono N, Ohnishi Y, Kiyotani K, Mushiroda T, Nakajima M, Ozaki K, Tanaka T, Tsunoda T, Oshima S, Sano M, Kamei T, Tokuda T, Aoki M, Hasegawa K, Mizoguchi K, Morita M, Takahashi Y, Katsuno M, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Kaji R, Nakano I, Kamatani N, Tsuji S, Sobue G, Nakamura Y, Ikegawa S: A functional variant in ZNF512B is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. *Hum Mol Genet.*, 20(18), 2011, 3684-3692.

Ogaki K, Li Y, Atsuta N, Tomiyama H, Funayama M, Watanabe H, Nakamura R, Yoshino H, Yato S, Tamura A, Naito Y, Taniguchi A, Fujita K, Izumi Y, Kaji R, Hattori N, Sobue G ; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS). Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging.* 2012; 33(10):2527.e11-16.

Tetsuka S, Morita M, Iida A, Uehara R, Ikegawa S,

Nakano I. ZNF512B gene is a prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 2013. 324(1-2) 163-166.

2. 学会発表

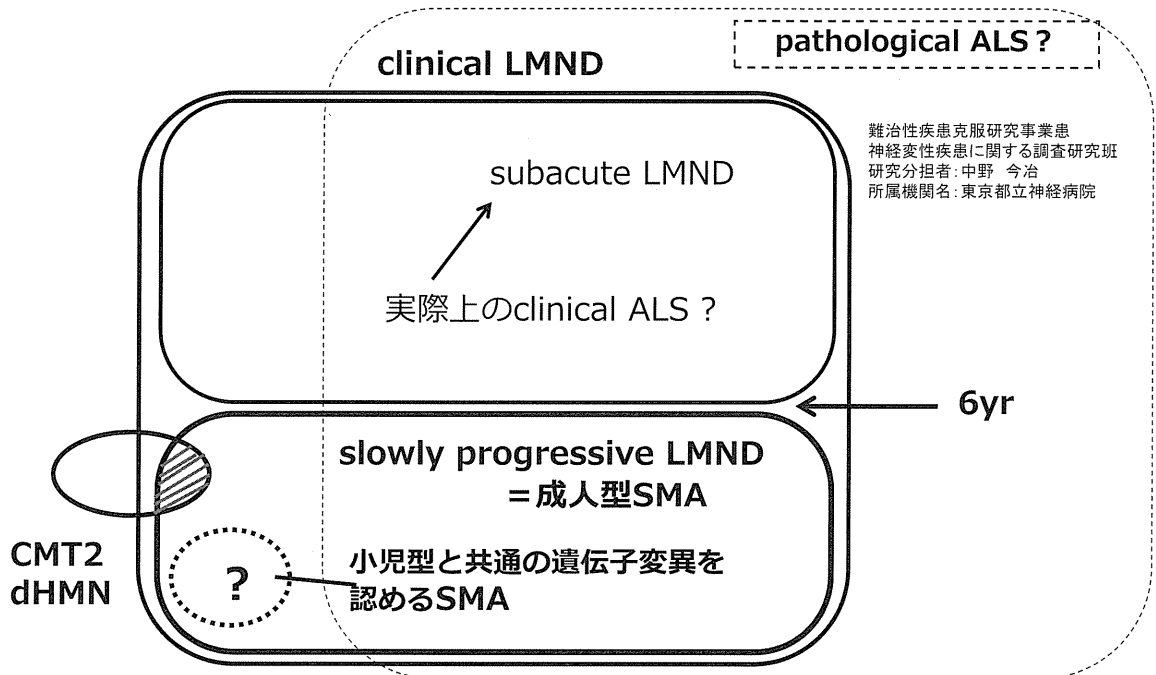
Tetsuka S, Morita M, Iida A, Uehara R, Ikegawa S, Nakano I: ZNF512B gene is a prognostic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. 23rd international symposium ALS/MND, 5-7 December 2012, Chicago, USA

Mashiko T, Morita M, Tetsuka S, Akimoto C, Higuchi Y, Hashiguchi A, Takashima H, Nakano I
Genetic backgrounds of adult onset lower motor neuron syndrome. 24th international symposium ALS/MND, 6-8 December 2013, Milan, Italy

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- | | |
|-----------|---|
| 1. 特許取得 | 無 |
| 2. 実用新案登録 | 無 |
| 3. その他 | 無 |

成人型SMAの位置付け



難治性疾患克服研究事業
神経変性疾患に関する調査研究班
研究分担者: 中野 今治
所属機関名: 東京都立神経病院

ALS: amyotrophic lateral sclerosis LMND : lower motor neuron disease
CMT: Charcot-Marie-Tooth disease dHMN: distal hereditary motor neuropathy

神経変性疾患に関する調査研究
研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

研究要旨

- ① 視床下核脳深部刺激術 (STN-DBS) を施行したパーキンソン病 (PD) 患者を対象に、言語機能を中心とした横断的な評価を実施した。STN-DBS 後の PD 患者では、PD 固有の運動低下性構音障害に加え、リズム障害、声帯・呼吸障害、吃音、痙性構音障害の病態が様々な程度で加わることによって、特有の言語障害を呈していると考えられた。
- ② 前頭側頭葉変性症 (FTLD) には病理学的に TDP-43 proteinopathy に分類される病型があり (FTLD-TDP)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) との関係が議論されている。剖検例を用い、FTLD-TDP と ALS の脊髄病変を比較・検討した。臨床的に明らかな運動ニューロン障害を指摘出来ない FTLD-TDP 症例においても全例で脊髄にはリン酸化 TDP-43 陽性封入体を認め、ALS 病理との連続性が示された。一方、ALS に比して FTLD without MND の脊髄病変は軽度であり、比較的良好的な予後と関連している可能性が考えられた。
- ③ 多施設 ALS 患者前向きコホートである JaCALS で集積された経時的臨床情報およびゲノム遺伝子を用いて、ALS 患者の進行パターンを類型化し、それに関連する遺伝子多型の網羅的探索を行った。その結果、p 値 10^{-8} 台で急速進行型と関連する一塩基多型 (SNPs) を複数見出し、それらが連鎖不平衡状態にあることを確認した。進行と関連する遺伝的素因の同定は病態抑止治療の分子標的の同定などを通して、創薬に寄与できる可能性がある。

研究分担者：祖父江 元

所属機関名：名古屋大学大学院医学系研究科

神経内科学

A. 研究目的

① 進行期のパーキンソン病 (PD) において、視床下核脳深部刺激術 (STN-DBS) の運動機能障害改善に対する有効性は確立されている。一方で、術後に副作用として言語障害を生じることがあり、患者の QOL を低下させる要因となっているが、その言語障害の病態は未だ解明されていない。この STN-DBS 後の言語障害の病態を解明するために多数例での言語機能の解析を施行した。

② 前頭側頭葉変性症 (FTLD) には病理学的に TDP-43 proteinopathy に分類される病型があり (FTLD-TDP)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) との関係が議論されている。今回我々は剖検例を用い、FTLD-TDP と ALS の脊髄病変を比較・検討した。

③ 多施設共同の ALS 患者経時的臨床情報収集、ゲノム遺伝子収集システムである Japanese

Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCALS) は、本研究班をベースに構築され、ALS 患者の登録、遺伝子検体蓄積を行ってきた。名古屋大学神経内科が事務局を担当している。孤発性 ALS の病態には多くの遺伝子が関与していることが想定されるが、遺伝子多型情報と JaCALS において蓄積された多彩な前向き臨床情報との関連を解析、検証することにより、ALS の進行や予後に関連する遺伝子・分子の同定につなげられる可能性がある。前向き臨床像として蓄積された ALS 臨床データを用いて、ALS 患者の多彩な臨床像と遺伝子多型との関連を解析した。

B. 研究方法

① 名古屋大学脳神経外科で STN-DBS を施行した 72 症例のパーキンソン病患者を対象に、言語機能を中心とした横断的な評価を実施した。

② 愛知医科大学加齢医科学研究所において病理学的

に TDP-43 関連病理の確認された 260 例中、後方視的な検討により問題行動や明らかな認知症を認めた 50 例を対象とした。病理学的に顔面神経核、舌下神経核、脊髄において、神経細胞脱落、グリオシスの程度を評価するとともに、抗リン酸化 TDP43 抗体などを用いた免疫染色を行った。さらに、臨床的に運動ニューロン症状を認めなかった 10 例 (FTLD without MND)、認知機能低下で発症後に運動ニューロン障害の加わった 8 例 (FTLD-MND)、運動ニューロン障害で発症後に認知機能低下の加わった 26 例 (MND-FTLD) の臨床・病理所見を比較・検討した。

③2006 年 2 月から 2012 年 10 月までに JaCALS に登録され、孤発性で、改訂 El Escorial 診断基準で possible 以上、登録時呼吸器未装着であり、発症から 5 年までの ALSFRS-R 推移データが得られている ALS 患者 465 例を対象とした。混合分布モデルを用いた解析により、ALSFRS-R の経時的変化パターンの分類を行い、得られた分類と発症年齢、性別、発症部位および遺伝子多型との関連解析を行った。遺伝子多型関与のモデルとして、Dominant model: メジャーアレルホモの例に対するマイナーアレル保有例のオッズ比、Recessive model: メジャーアレル保有例に対するマイナーアレルホモ例のオッズ比、Additive model: マイナーアレルが一つ増えることに対するオッズ比、以上の 3 パターンを用いた。SNP アレイは、70 万 SNPs+25 万 exome chip を搭載した Illumina 社製 HumanOmniExpressExome BeadChip を使用した。

(倫理面への配慮)

PD 患者の構音障害研究については名古屋大学医学部倫理委員会によって承認されており、すべての患者において文書による同意を取得した。

ALS 患者コホートの構築、網羅的ゲノム解析については、研究に参加するすべての施設で倫理委員会承認を得た。研究対象者には倫理委員会にて承認された説明書・同意書を用いて十分な説明を行い、文書同意を得て参加いただいた。検体・資料を分析する際には、氏名・住所・生年月日などの個人情報を取り除き、匿名符号をつけ、連結可能匿名化して厳重に管理した。

C.研究結果

①言語の指標に基づく因子分析により、声帯・呼吸障害、吃音、運動低下性構音障害、痙性構音障害、リズム障害を表していると解釈される 5 つの因子が得られた。さらに、因子分析の因子スコアを用いたクラスター解析により、72 例の患者は 5 つのクラスターに分類された。各群の比率は、運動低下性群 34.7%、リズム障害群 26.4%、声帯・呼吸障害群 16.7%、吃音群 13.9%、痙性群 8.3%であった。リズム障害群では電極位置と言語障害に相関は見出されず、PD に起因するリズム障害が病態の中心と考えられた。運動低下性群は PD 固有の小声で単調な運動低下性構音障害が主体の群であった。声帯・呼吸障害群では、喉頭ファイバー所見にて、声帯の弓状化、声帯閉鎖不全を観察全例で認めた。また、左刺激のバッテリー切れ時に気息性嘔声の著明な改善を認めた症例があった。

②脊髄が採取されていた FTLD without MND 全例で、脊髄前角運動神経細胞にリン酸化 TDP-43 陽性封入体(skein like inclusion) を認めた。神経細胞脱落、グリオシス、脊髄前角でのマクロファージの集簇、Bunina 小体は約半数の症例に認めた。脊髄前角神経細胞の脱落の程度は ALS よりも明らかに軽度であり、また FTLD-MND、MND-FTLD よりも軽度であった。予後の検討では、気管切開もしくは死亡をエンドポイントとした場合、FTLD without MND の中央値は 6 年、FTLD-MND は 2.3 年、MND-FTLD は 1.8 年であり、FTLD の予後は FTLD-MND、MND-FTLD よりも有意に良好であった。

③混合分布モデルにより、ALSFRS-R の経時的変化は急速進行型、シグモイド型、単調減少型、緩徐型の 4 型に分類された。これら 4 つの類型と関連する臨床的因子 (発症年齢、性別、発症部位、リルゾールの有無) には有意なものを認めなかった。類型と遺伝子多型との関連解析においては、急速進行型と関連する SNPs が Recessive model において見出され、そのうち 7 つが p 値 10^{-8} 台であった。Haplotype 解析でこれらの SNPs は強い連鎖不平衡状態にあることが示された。

D. 考察

①PD に起因する声帯・呼吸障害に加えて、DBS 刺激が声帯運動に影響を与えていると考えられた。吃音群では認知機能が有意に不良であり、PD の進行に伴う皮質病変の影響が推測されるとともに、DBS 刺激によって吃音が誘発されている可能性もあると考えられた。痙性群では全例で電極が錐体路もしくはその近傍に位置しており、錐体路障害に伴う麻痺性構音障害が起こっていると考えられた。

②臨床的に明らかな運動ニューロン障害を指摘出来ない FTLD-TDP 症例においても全例で脊髄にはリン酸化 TDP-43 陽性封入体を認め、Bunina 小体やマクロファージの出現も認めたことから、ALS 病理との連続性が示された。一方、ALS に比して FTLD without MND の脊髄病変は軽度であり、比較的良好な予後と関連している可能性が考えられた。

③本研究では多彩な前向きに蓄積された ALS 患者臨床像を基に解析を行った点が特徴である。ALS 患者の進行を左右する遺伝的因子の同定を行うことで、病態抑止治療法開発のための分子標的を見出せる可能性がある。また、ALS を初めとする神経変性疾患の進行抑制に対する治験においては、自然歴の多彩さから β エラー、すなわち本来有効な薬剤の効果を検出できない可能性があることが課題の一つとされてきた。進行を左右する遺伝的因子は治験の割り付け因子として活用するなど、治験デザインの改善に寄与できる可能性がある。今回の解析で有意なレベルの SNPs が存在することを示せた意義は大きいと考えられる。

E. 結論

①STN-DBS 後の PD 患者では PD 固有の運動低下性構音障害に加え、リズム障害、声帯・呼吸障害、吃音、痙性構音障害の病態が様々な程度で加わることによって、特有の言語障害を呈していると考えられた。さらに、各群に応じて治療法が異なる可能性があり、病態に応じた治療法の開発が重要である。

②FTLD-TDP は MND と病理学的に連続した疾患と考えられる。臨床的に MND 症候を呈さなかった FTLD の症例は ALS 症例に比して脊髄病変が軽度であり、比較的良好な予後と関連している可能性が

考えられた。

③大規模 ALS 患者前向きコホートと蓄積された遺伝子を基に、病因（発症）に関わる遺伝子のみならず、病態（経過、予後、病型など）に関わる遺伝子の探索が可能である。これらは孤発性 ALS 病態解明の重要な糸口になりえると同時に、創薬に向けた分子標的となりえる。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Riku Y, Watanabe H, Yoshida M, et al. Lower motor neurons are commonly involved in TDP-43-related frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis JAMA neurology 2013 (in press).

Nakamura R, Atsuta N, Watanabe H, et al. Neck weakness is a potent prognostic factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013;84:1365-71. Kato S, Watanabe H, Senda J, et al. Widespread cortical and subcortical brain atrophy in Parkinson's disease with excessive daytime sleepiness. J Neurol. 2012;259:318-26.

Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, et al. Naratriptan mitigates CGRP1-associated motor neuron degeneration caused by an expanded polyglutamine repeat tract. Nat Med. 2012;18:1531-8.

Katsumata R, Ishigaki S, Katsuno M, et al. c-Abl inhibition delays motor neuron degeneration in the G93A mouse, an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. PLoS One. 2012;7:e46185.

Miyazaki Y, Adachi H, Katsuno M, et al. Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. Nat Med. 2012;18:1136-41.

Ikenaka K, Katsuno M, Kawai K, et al. Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13:1225-38.

Nakamura T, Hirayama M, Hara T, et al. Does cardiovascular autonomic dysfunction contribute to fatigue in Parkinson's disease? *Mov Disord.* 2011;26:1869-74.

Hirayama M, Nakamura T, Watanabe H, et al. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine correlate with hallucinations rather than motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011;17:46-9.

2.学会発表

Nakamura R, Atsuta N, Watanabe H et al. Neck weakness is a potent prognostic factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. 24th International Symposium on ALS/MND, December, 2013, Milan, Italy

Senda J, Riku Y, Sobue G, et al. Brain degeneration in ALS patients as detected by VBM and DTI: similarities with FTLN. 19th Human Brain Mapping, June, 2013, Seattle, USA.

中村亮一、熱田直樹、渡辺はづき、ほか. 頸部屈筋の筋力低下は ALS における独立した予後予測指標である. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 2013. 5.

渡辺はづき、熱田直樹、中村亮一、ほか. ALS 患者の症状進行パターン: 多施設共同 ALS コホートの解析から. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 2013. 5.

千田 謙, 坪井 崇, 祖父江 元他. 筋萎縮性側索硬化症に対する脳容積・拡散テンソル Voxel-Based Analysis 法を用いた検討. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 2013. 5.

梶田道人、陸 雄一、祖父江 元他. 脳容積・拡散テンソル Voxel-Based Analysis MRI 画像による前頭側頭葉変性症 (FTLD) 大脳病変の特徴. 第 54 回日本神経学会学術大会, 東京, 2013. 5.

梶田道人、陸 雄一、祖父江 元他. 脳容積・拡散テンソル Voxel-Based Analysis MRI 画像による前頭側頭葉変性症 大脳病変の特徴. 第 32 回日本認知症学会学術集会, 松本, 2013. 11.

坪井崇, 田中康博, 原一洋, ほか. 視床下核脳深部刺激術後のパーキンソン病患者における言語障害の解析. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012. 5

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。

神経変性疾患に関する調査研究

研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

研究要旨

エクソンに存在する Rare ながら強いパーキンソン病(PD)ゲノム因子を発見するため、とくに孤発性PD患者を中心に、全エクソン塩基配列解読(エクソーム解析)をおこなった。715例のPD患者ゲノムから、全エクソン(エクソーム)を抽出、HiSeq2000シーケンサーで超高速・並列シーケンスをおこなった。BWAソフトウェアでヒト参照配列hg19へマップし、GATKソフトウェアで、参照配列とことなるSNV(single nucleotide variant)を約30万個検出した。715検体のエクソームデータの平均被覆は126.1xであり、全エクソン配列の94.9%のエリアが10x以上で被覆された。これは、孤発性PD患者755人について、全遺伝子の全エクソン塩基配列のほぼすべてが解読できたことを意味する。本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の強いRare variantリスクを発見する。

α -synuclein(*SNCA*)は孤発性パーキンソン病(PD)の感受性遺伝子であるが、多型が疾患感受性に関与する機序については未だに解明されていない。我々は、*SNCA* 3'-flanking SNP rs356219において、in vitroでallele特異的な効果を見だし、protective alleleに結合する転写因子を同定した(平成22年度本班会議)。本研究では、この転写因子をSH-SY5Y細胞に強制発現して*SNCA*および*SNCA*下流に存在するantisense noncoding RNA(ncRNA)の発現をreal-time RT-PCRで解析した。その結果、*SNCA*発現レベルはほとんど変化しないが、ncRNA発現レベルは数十倍に上昇した。さらに剖検脳(前頭葉:Lewy body群21例、対照群18例)における*SNCA*、ncRNAの発現レベルとrs356219 genotypeとの関連を調べた。rs356219のdisease alleleが増えるほど*SNCA*発現レベルは上昇する傾向を示したが、ncRNAについてはalleleとの関連性は殆ど見られなかった。*SNCA*とncRNAのcoexpressionは、両者の間に機能的関連があることを示唆するが、さらなる実験による解明が必要である。

ALSでは一般に馬尾神経の造影効果はないとされているが、近年馬尾神経に造影効果を認めたALSが2件報告された。今回我々はALSの馬尾神経がどの程度造影されるのを半定量的に評価して検討した。ALS群19名(E1 Escorial probable以上:男性13名、女性6名、平均年齢62歳)および対照群9名(男性5名、女性4名、平均年齢50歳)の腰椎造影MRIを撮影。水平断で左右のL4、L5、S1神経根を同定しそれぞれの造影前と造影後でのT1強調画像でのMR信号値を測定した。複数の部位の信号変化を用いて標準化し、信号変化量を造影率として算出し比較した。全神経根の造影率の平均値は、ALS群が対照群と比較して有意差を持って造影率が高い結果が得られた(0.18 ± 0.1 vs 0.01 ± 0.1 : $p=0.029$)。髄液タンパクの値や、発症からMRI撮影までの期間との間に明らかな相関は見られなかった。特にALS群のすべての神経根のうち臨床的或いは筋電図所見にて「脱神経あり」とされた神経根の群では「脱神経なし」とした群と比較して、有意差を持って造影率が高い結果が得られた(0.24 ± 0.2 vs 0.10 ± 0.2 : $p=0.0019$)。ALSの馬尾神経は目視で判別できる程度ではないが、半定量的には造影剤による信号変化が増強される傾向にあることが示された。またこの変化は障害が確認されている神経根においてより強い傾向があった。この所見は運動ニューロン死に関連した血液神経関門の破綻を反映したものと考えられ、早期診断の一助となる可能性もある。今後計測法の再検討と同一症例における経時的評価、病理学的検討が必要である。

研究分担者: 戸田 達史

所属機関名: 神戸大学大学院医学研究科 神経内科学

A.研究目的

我々は、一塩基多型SNPを解析したゲノムワイド関連解析を行い、4つの孤発性PD遺伝子(*PARK16*, *BST1*, α -synuclein, *LRRK2*)を報告した(Satake et al, *Nature*

Genet 2009)。これらは、その後の白人での大規模解析でも結果が再現された、確実な孤発性PD遺伝子である(表1: IPDGC, *Lancet* 2011; Lill et al, *PLoS Genet* 2012, Do et al, *PLoS Genet* 2011 etc)。また、最近、機能的な面

からも、*PARK16* 遺伝子 *RAB7L1* の、細胞内輸送の PD 病態への重要性・*LRRK2* との相互作用がしめされた (MacLeod *et al*, *Neuron* 2013)。

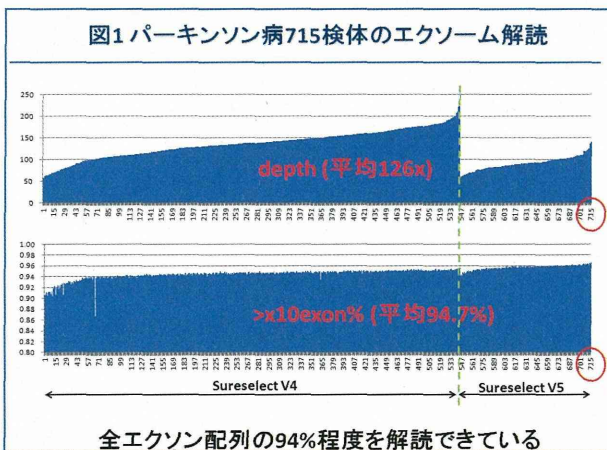
表1	
日本人GWAS (Satake <i>et al</i> , <i>Nature Genet</i> 2009) で同定された4つの孤発性PD遺伝子座	PARK16 P=7.29x10 ⁻⁹ (Sanchez <i>et al</i> , <i>Nature Genet</i> 2009) P=1.00x10 ⁻¹² (IPDGC & WTCCC, <i>PLoS Genet</i> 2011) P=1.27x10 ⁻⁷ (Do <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2011) P=8.00x10 ⁻¹⁰ (Lil <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2012)
	BST1 P=1.79x10 ⁻⁹ (Saad <i>et al</i> , <i>Hum Mol Genet</i> 2011) P=1.85x10 ⁻⁹ , 2.43x10 ⁻⁹ (IPDGC, <i>Lancet</i> 2011) P=2.3x10 ⁻⁹ (Do <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2011) P=1.87x10 ⁻⁹ (Lil <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2012)
	α-synuclein P=2.24x10 ⁻¹⁶ (Sanchez <i>et al</i> , <i>Nature Genet</i> 2009) P=7.60x10 ⁻²⁵ , 4.23x10 ⁻²⁵ (IPDGC, <i>Lancet</i> 2011) P=2.82x10 ⁻⁹ (Saad <i>et al</i> , <i>Hum Mol Genet</i> 2011) P=2.29x10 ⁻⁹ (Do <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2011) P=6.06x10 ⁻¹⁰ (Lil <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2012)
	LRRK2 P=1.55x10 ⁻¹⁶ (Sanchez <i>et al</i> , <i>Nature Genet</i> 2009) P=1x10 ⁻⁶ (Saad <i>et al</i> , <i>Hum Mol Genet</i> 2011) P=3.23x10 ⁻⁵ , 1.09x10 ⁻⁹ (IPDGC, <i>Lancet</i> 2011) P=1.6x10 ⁻⁷ (Do <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2011) P=6.44x10 ⁻¹⁵ (Lil <i>et al</i> , <i>PLoS Genet</i> 2012)
白人集団の数万規模の大規模研究でPDへの関連が繰り返し再現 ⇒東アジア人・白人共通の確実な孤発性PD遺伝子である	

しかし一方、これらだけでは本症の遺伝背景は説明できず、他にも孤発性 PD 遺伝子は存在する。そこで本研究では、エクソンに存在する Rare ながら強い PD ゲノム因子を発見するため、とくに孤発性 PD 患者を中心に、全エクソン塩基配列解読 (エクソーム解析) をおこなった。

B.研究方法 C.研究結果

本研究は遺伝子研究倫理委員会の承認をえて行った。

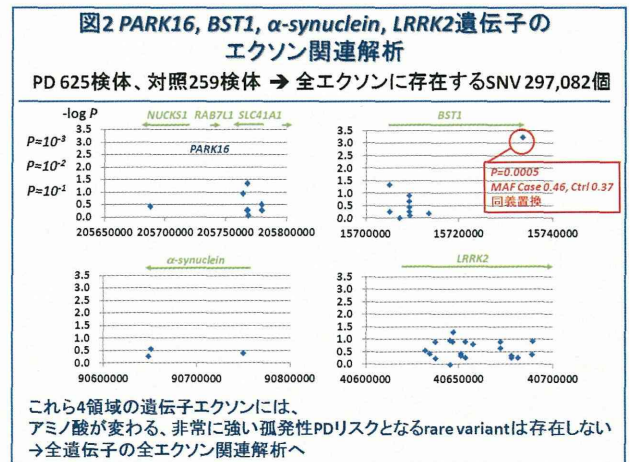
715 例の PD 患者ゲノムから、全エクソン (エクソーム) を抽出、HiSeq2000 シークエンサーで超高速・並列シークエンスをおこなった。BWA ソフトウェアでヒト参照配列 hg19 へマップし、GATK ソフトウェアで、参照配列とことなる SNV (single nucleotide variant) を検出した。715 検体のエクソームデータの平均被覆は 126x であり、全エクソン配列の 94.7% のエリアが 10x 以上で被覆された (図 1)。これは、孤発性 PD 患者 715 人について、全遺伝子の全エクソン塩基配列のほぼすべてが解読できたことを意味する。



さらに、われわれが以前ゲノムワイド関連解析で報告

した4つの孤発性PD遺伝子 (*PARK16*, *BST1*, α -*synuclein*, *LRRK2*; Satake *et al*, *Nature genet* 2009) に強い疾患リスクをもった rare variant が存在するかを明らかにするため、PD 患者 625 検体 (上述データの一部) と非患者対照 259 検体のエクソン配列データを比較した。具体的には、PD 患者 625 検体と非患者対照 259 検体の全エクソン配列データからエクソン領域に存在する SNV (single nucleotide variant) を抽出し、患者・対照群間で、SNV 頻度を Fisher's exact test で有意差検定した。

PARK16, α -*synuclein*, *LRRK2* には、遺伝子エクソン領域内に有意な SNV は検出しなかった (図 2: すべて $P > 0.01$)。 *BST1* には比較的有意な SNV を検出したが (図 2: $P = 0.0005$)、アレル頻度は患者群で 46%, 対照群で 37% であり、強い疾患リスクをもつ rare variant ではなかった。また、この多型は、我々が以前報告した孤発性 PD 遺伝子 *BST1* の SNP (Satake *et al*, *Nature genet* 2009) とほぼ連鎖不平衡の多型であった。よって、これら孤発性 PD 遺伝子エクソンには強い rare variant risk は存在せず、イントロン



などの SNV が発症リスクとなっていると考えた。

D.考察 E.結論

孤発性 PD の発症ゲノム因子には、

- (1) 強い疾患リスクをもつエクソン領域の rare variant
 - (2) リスクとしては強くはないが頻度は高い一塩基多型
 - (3) 非常に強い疾患リスクであり家族性 PD を引き起こすような変異の孤発性群への混入
- がある。

今後、本データを非患者対照群と比較する、全エクソン関連解析をおこない、孤発性パーキンソン病の強い Rare variant リスク発見を目ざす。さらにこれまで蓄積した一塩基多型によるゲノムワイド関連解析データや、家族歴をもつ PD 患者データと比較することにより、孤発性

PD の遺伝背景を解明する。

α-synuclein 3' -flanking SNP の孤発性パーキンソン病感受性への機序に関する研究

A. 研究目的

α-synuclein(*SNCA*)は孤発性パーキンソン病(PD)の確実な感受性遺伝子であるが(Mizuta et al., Hum Mol Genet, 2006; Satake et al., Nat Genet, 2009; 表 1)、多型が疾患感受性に関与する機序については未だに解明されていない。我々は、*SNCA* 3' -flanking SNP rs356219 において、ルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイで allele 特異的な効果を見だし、protective allele に結合する転写因子を同定した(平成 22 年度本班会議)。本研究は、我々の得た新しい知見をもとに、rs356219 の PD 感受性への機序を解明することを目的とする。

B. 研究方法

rs356219 に結合する転写因子を SH-SY5Y 細胞に強制発現して *SNCA* mRNA の発現を定量する。なお、rs356219 の位置は、最近データベースに登録された antisense noncoding RNA の intron にも相当するので、この ncRNA についても同様の解析を行った。剖検脳(前頭葉: Lewy body 群 21 例、対照群 18 例)における *SNCA*、ncRNA の発現レベルを real-time RT-PCR で定量し、rs356219 の genotype との関連を調べた。剖検脳は匿名化し、その研究使用に関しては、神戸大学大学院および東京都健康長寿医療センター研究所の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

我々が同定した rs356219 結合転写因子の強制発現により、SH-SY5Y における *SNCA* 発現レベルはほとんど変化しなかったが、*SNCA* 下流の ncRNA 発現レベルは数十倍に上昇した(図 1)。剖検脳においては、rs356219 の disease allele が増えるほど *SNCA* 発現レベルは上昇する傾向を示したが、ncRNA については allele との関連性は殆ど見られなかった。しかしながら、*SNCA* と ncRNA の発現レベルは強い正の相関を示した(図 2)。

D. 考察

SH-SY5Y の実験結果と、既報告のルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイの結果を合わせると、転写因子が rs356219 の protective allele に結合して ncRNA の発現

を刺激したと推測される。剖検脳において ncRNA 発現レベルと genotype との関連性が見いだせなかった点については、剖検脳では転写因子を強制発現するような動的な変化を調べるのが困難であり、そのため allele との関連性が検出できない可能性があると考えられる。antisense ncRNA に関する最近の知見によると(Nat Rev Mol Cell Biol 10:637;2009)、今回解析対象とした ncRNA が *SNCA* 発現に何らかの影響を及ぼす可能性は十分にある。剖検脳における *SNCA* と ncRNA の coexpression は、両者の間に機能的関連があることを示唆するが、さらなる実験による解明が必要である。

E. 結論

rs356219 は ncRNA/*SNCA* の発現調節を介して PD 感受性に関与する可能性がある。

ALS における馬尾神経造影 MRI についての検討

A. 研究目的

ヒトの腰椎造影 MRI において、通常血液神経関門を欠く脊髄神経節は造影されるものの馬尾神経(脊髄神経根)は造影されない。一方で炎症性ニューロパチー(GBS, CIDP)では炎症による血液神経関門の破綻を

反映して造影効果を認める場合がある。また腰髄部脊髄梗塞やポリオなどでも前角細胞障害に伴う前根の Waller 様変性を反映して馬尾神経の前根に造影効果を認める場合がある。ALS では一般に馬尾神経の造影効果はないとされているが、近年馬尾神経に造影効果を認めた ALS が 2 件報告された(Young NP, ALS 11: 207, 2010, Luigetti M, ALS 11: 412, 2010)。今回我々は ALS の馬尾神経がどの程度造影されるのを半定量的に評価して検討した。

B. 研究方法

ALS 群 19 名(EI Escorial probable 以上: 男性 13 名、女性 6 名、平均年齢 62 歳)および対照群 9 名(男性 5 名、女性 4 名、平均年齢 50 歳)において通常の単純および造影の腰椎 MRI を施行(Philips 社製 1.5T の MRI 装置を用いて fast SE 法での T1 強調画像および T2 強調画像と、0.2 ml/kg の Gadolinium 造影剤(マグネビスト注®)注射後 T1 強調画像を撮影)。水平断で左右の L4, L5, S1 神経根を同定。複数のスライスで各神経根あたり 3ヶ所に関心領域(ROI)において、それぞれの造影前と造影後での T1 強調画像での MR 信号値を測定した。通常造影されない部位である腰髄部と、通常造影される部位である脊髄神経

節の造影前後での MR 信号値を用いて、馬尾神経の信号変化量を標準化した造影率(enhancement ratio : ER)を求めた. 造影率は馬尾神経の MR 信号値を C(x), 脊髄神経節の MR 信号値を D(x), 腰髄部の MR 信号値を S(x), 造影前を b, 造影後 a としたとき, 次の式で定義した.

$$ER = \frac{\frac{C(a)}{C(b)} - \frac{S(a)}{S(b)}}{\frac{D(a)}{D(b)} - \frac{S(a)}{S(b)}}$$

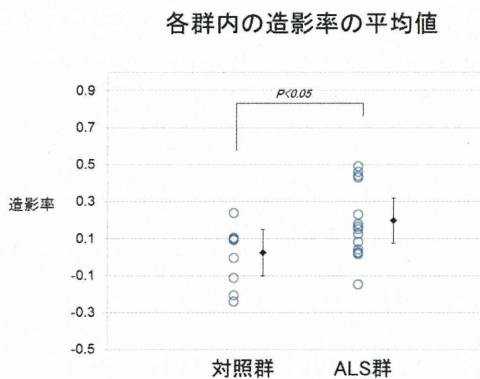
ALS 群と対照群における, すべての神経根の造影率の平均値に差があるかどうかを検討した. また, ALS 群の患者におけるすべての神経根を障害がある(脱神経あり)か, 障害がない(脱神経なし)かによって 2 群に分け, 両群の造影率の平均値に差があるかどうかを検討した. 検定は対応のある t 検定を用いた.

障害の有無については, 臨床的に当該神経根支配筋に筋萎縮を伴う筋力低下を認めるか, 針筋電図にて安静時放電を認める場合に「脱神経あり」とした.

C. 研究結果

全神経根の造影率の平均値は, ALS 群が対照群と比較して有意差を持って造影率が高い結果が得られた (0.18 ± 0.1 vs 0.01 ± 0.1 : $p=0.029$).

Fig. 1



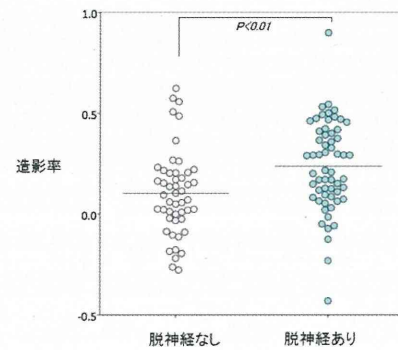
髄液タンパクの値や, 発症から MRI 撮影までの期間との間に明らかな相関は見られなかった.

ALS 群におけるすべての神経根のうち「脱神経あり」とした神経根の群では「脱神経なし」とした群と比較して, 有意差を持って造影率が高い結果が得られた

(0.24 ± 0.2 vs 0.10 ± 0.2 : $p=0.0019$).

Fig. 2

各神経根の脱神経所見の有無による比較



D. 考察

今回の検討で, 通常造影効果はないとされる ALS の馬尾神経が, 目視で判別できる程度ではないが, 半定量的には造影剤による信号変化が増強される傾向にあることが示された. またこの変化は障害が確認されている神経根においてより強い傾向があった. この結果は ALS の前角運動ニューロン死の過程における, 前根の変性を反映している可能性がある. SOD1 変異 ALS モデルマウスの高磁場 MRI を使った検討でも前根に造影効果が見られている (Cowin GJ, *Neuroimage* 58: 69, 2011). 前根が造影効果を受ける機序に関しては明確にされていないが, ヒヒの実験的脊髄神経損傷モデルにおいて, MRI で造影効果を認めた神経根の病理所見を確認し, Waller 様変性に伴う神経血液関門の破綻があることを証明した報告 (Nguyen C, *AJNR* 116: 265, 1995) や SOD1 変異 ALS モデルマウスで運動ニューロン脱落に先行して血液脊髄関門が破綻するという報告 (Zhong Z, *Nat Neurosci*. 11: 420, 2008, Miyazaki K, *J Neurosci Res*. 89: 718, 2011) などから考えると, 運動ニューロン死に関連した血液神経関門の破綻を反映したものと考えられる. 近年, ALS の細胞死のプロセスが “Dying-back” 型変性であり, 細胞脱落に先行して神経根変性が起こるとする仮説の報告も増えてきており (Fischer LR, *Exp Neurol*. 185: 232, 2004), 今回の前根の造影効果が運動ニューロン死に先行するものであるとすると, ALS の早期診断の一助となる可能性もある. 今後計測法の再検討と同一症例における経時的評価, 病理学的検討が必要である.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Taniguchi-Ikeda M et al, Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 478:127-31, 2011
2. Sharma M et al, Role of sepiapterin reductase gene at the PARK3 locus in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 32:2108.e1-5, 2011
3. Chihara N et al, Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci* 108:3701-6.
4. Sun H et al, Genetic and clinical analysis in a Chinese parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 family. *J Hum Genet* 56:330-4, 2011
5. Kruger R et al, A large-scale genetic association study to evaluate the contribution of Omi/HtrA2 (PARK13) to Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 32:548.e9-548.e18, 2011
6. Sharma M, Hattori N, Murata M, Toda T et al (GEOPD consortium). A multi-centre clinico-genetic analysis of the VPS35 gene in Parkinson disease indicates reduced penetrance for disease-associated variants. *J Med Genet.* 49:721-6 ;2012
7. Sharma M, Toda T et al (GEOPD consortium). Large-scale replication and heterogeneity in Parkinson disease genetic loci. *Neurology* 79:659-667; 2012.
8. Lill CM, Satake W, Toda T et al., Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet* 8:e1002548;2012
9. Mizuta I *et al*, YY1 binds to α -synuclein 3'-flanking region SNP and stimulates antisense noncoding RNA expression. *J Hum Genet* 58, 711-719, 2013.
10. Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med* 369, 233-244, 2013

2. 学会発表

1. Satake W et al, Japanese subsequent GWAS identifies strong association at a novel risk locus and MCCC1 for Parkinson's disease. The American society of Human Genetics 61st Annual Meeting, 2011, Montreal, Canada.
2. 佐竹 渉 孤発性パーキンソン病遺伝子の同定 日本人類遺伝学会第56回大会 2011年、千葉
3. 西岡 竜也, 佐竹 渉, 安藤 祐子, 小路 紘平, 山本 光利, 村田 美穂, 服部 信孝, 戸田 達史 候補遺伝子リシーケンスによるパーキンソン病の Rare Variant リスクの探索 第34回日本分子生物学会年会 2011年、横浜
4. 佐竹渉, 山本光利, 村田美穂, 服部信孝, 戸田達史、他 候補遺伝子とエクソームシーケンスによるパーキンソン病の rare variant リスクの探索 日本人類遺伝学会第57回大会 2012年、東京
5. 関口 兼司, 福田 明、永田 格也、内藤 絢、上中 健、横田 一郎、大塚 喜久、安井 直子、久我 敦、濱口 浩敏、古和 久朋、荻田 典生、戸田 達史 運動ニューロン病における馬尾神経造影 MRI についての検討 第53回日本神経学会総会 2012年、東京
6. Satake W et al, Exome sequencing of Parkinson's disease in order to identify genetic variants with high disease-risk. American society of human genetics, 2013, Boston, USA.
7. Satake W et al, Search for rare-variant risks of Parkinson's disease by sequencing of candidate genes and exome sequencing. Movement disorder society, 2013, Sydney, Australia.

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

神経変性疾患に関する調査研究
研究代表者 中野 今治 東京都立神経病院

研究要旨

1. レム期睡眠行動異常症 (RBD) が、パーキンソン病 (PD) 患者の臨床症状や予後に与える影響を検討した。RBD はパーキンソン症状の増悪因子であると共に認知症のリスクとなることを明らかにした。
2. レビー小体型認知症 (DLB) の血液バイオマーカーを探索した。その候補物質として、thymosin β 4, retinol binding protein 4 を同定した。
3. グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF), インスリン様成長因子 (IGF-1), 肝細胞増殖因子 (HGF) を導入した骨髄間葉系幹細胞を樹立した。本細胞の筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルマウスでの有効性を示した。
4. 前頭側頭葉変性症 (FTLD) の鳥取県の人口を基本とした粗有病率は 10 万人あたり男性が 9.2 人, 女性が 12.9 人, 男女合わせて 11.2 人であることを明らかにした。

研究分担者：中島 健二

所属機関名：鳥取大学医学部医学科脳神経医科学
講座脳神経内科学分野

A.研究目的

- ① レム期睡眠行動異常症 (RBD) が、パーキンソン病 (PD) 患者の臨床症状や予後に与える影響を検討する。
- ② レビー小体型認知症 (DLB) において、血液を利用したバイオマーカーを探索し、その有用性を検討する。
- ③ グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF), インスリン様成長因子 (IGF-1), 肝細胞増殖因子 (HGF) を導入した骨髄間葉系幹細胞を樹立し、本細胞を筋萎縮性側索硬化症 (ALS) モデルマウスでの有効性を検討する。
- ④ 鳥取県における前頭側頭葉変性症 (FTLD) の患者数を調査する。

B.研究方法

- ① PD 患者に RBD 症状に関する質問と PSG を施行し、REM sleep without atonia (RWA) の有無を確認の上 3 群 (PD with clinical RBD, PD with subclinical RBD, RBD with normal REM sleep) に分けて臨床症状の比較を行う。その後フォロー調査も施行する。
- ② DLB 症例と対照の血液サンプルを用いて SELDI-TOF-MS 解析法で血中蛋白の網羅的検討を行う。DLB で有意に高値となっている候補蛋白のターゲットピークを精製し、マスコットサーチにて候補蛋白の同定する。DLB 群, PD 群, Alzheimer 病 (AD) 群, 対照群の保存血清を用いて、ELISA kit で同定した蛋白を測定し、診断の有用性を ROC

解析で検討する。

- ③ マウス第四脳室より細胞懸濁液を穏徐に注入する。SOD1^{G93A} 高発現マウスは同腹、同性、体重をマッチさせた 2 群に分類し、一方を細胞移植群、他方を PBS のみを移植する群として比較する。細胞移植に適した時期を検討するため 60, 80, 100, 120 日齢の各時期に細胞移植を行う。
- ④ 鳥取県全域および島根県東部地域の医療機関 (精神科・神経内科) に対して診療中の前頭側頭葉変性症の有無について一次調査アンケートを実施する。診療歴のある医療機関に対して、症状を含めた臨床経過や画像検査を含む検査所見の調査を行うとともに、依頼のあった医療機関については神経内科専門医が直接患者を診察し診断確定した。

(倫理面への配慮)

- ① 本研究は臨床研究に関する倫理指針を遵守し、研究を実施した。
- ② 本研究は臨床研究に関する倫理指針を遵守し、研究を実施した。検体採取にあたっては、鳥取大学医学部倫理委員会の承認を得て、研究者に対しては研究内容や倫理的配慮を詳細に説明した後に書面による同意を得て研究を実施している。
- ③ 組換え DNA 実験, 動物実験および動物の取り扱いに関しては、鳥取大学の当該委員会での承認を得てこれを遵守して行った。
- ④ 鳥取大学医学部倫理委員会の承認を得た後、「疫