

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

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。

Long PCR法を用いて*SMN1*遺伝子のみを特異的に単離・シーケンスする方法を開発し、1 copyの*SMN1*遺伝子を有するSMA III型3症例に対し、共通する新規 missense 変異を同定した。この*SMN1*遺伝子解析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。

しかしながら、成人発症のSMA IV型では、原因遺伝子である*SMN1*遺伝子の変異を示さないことが多く、臨床的にも遺伝子的にも heterogeneous である。*SMN1*遺伝子の変異を示さないSMA IV型2症例について、次世代シーケンサーにより全エクソーム解析を行い、SMAを引き起こす新規原因遺伝子の探索を行った。共通するアミノ酸置換を伴うヘテロの新規遺伝子変異を54個同定し、さらにSMN蛋白質と関連する蛋白質、また脊髄で発現する新規 SNP を6つに絞り込み、候補遺伝子とした。

*SMN1*遺伝子の変異を示さないSMA IV型の発症原因を解明するために、SMA IV型患者、健常者（合計152例）について、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法を用いて*SMN*遺伝子と近傍の遺伝子の copy 数を解析した。*SMN*遺伝子の copy 数をSMA IV型患者、健常者間で比較したところ、SMA IV型患者において、*SMN1*遺伝子の copy 数の重複傾向は確認できた。しかし control 群との有意な差が見られるほどではなかった。このような*SMN1*遺伝子の copy 数の変化がSMA発症のリスクになりうるか、今後も検証が必要であった。

研究分担者：齋藤 加代子

所属機関名：東京女子医科大学附属遺伝子医療センター

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塩基の違いしかいないため*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、②Long-Range PCR (LR-PCR) 法による*SMN1*遺伝子を単離する方法では exon2 から exon7 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。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*

遺伝子変異を同定することを目的とした。

成人発症の脊髄性筋萎縮症（SMA IV型）では、原因遺伝子である*SMN1*遺伝子の変異を示さないことが多く、臨床的にも遺伝子的にも heterogeneous である。*SMN1*遺伝子の変異を示さないSMA IV型2症例について、次世代シーケンサーにより全エクソーム解析を行い、SMAを引き起こす新規原因遺伝子の探索を行った。

また、筋萎縮性側索硬化症（ALS）に上位運動ニューロン徴候がない例が存在し、SMA IV型との異同が論議されている。1998年にSMA IV型がセントロメア側 copy の*SMN2*遺伝子欠失と相関があると報告され、2012年に筋萎縮性側索硬化症（ALS）と*SMN1*遺伝子重複に相関があるという報告など、*SMN*遺伝子と成人発症 motor neuron disease（MND）の関連について議論がある。今回、成人発症のSMA IV型患者において Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法を用いて、*SMN*遺伝子 copy 数を解析したので報告する。

B.研究方法

1. 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 SMA III 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。

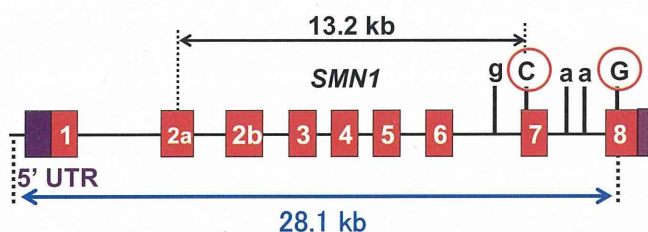


図 1 nLR-PCR により増幅する *SMN1* 遺伝子領域 (28.1 kb)

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。

2. 次世代シーケンサーを用いた新規原因遺伝子探索

次世代シーケンサー SOLiD4 システム (ABI 社) による全エクソーム解析を施行した。ゲノム DNA からのエクソンのキャプチャには、Agilent SureSelect Human All Exon Kit (Agilent 社) を使用した。データ解析には、Mapping に Bioscope 1.3.1、Reference には hg19 を使用した。得られた解析結果に対し、これらの症例で共通の新規遺伝子変異が存在するかを調査した。

Patients: SMA 遺伝子診断の指標である *SMN* 遺伝子の変異を示さない症例 (IV 型 3 例、うち 2 人は親子関係)

3. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法を用いた *SMN1* 遺伝子解析

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。

解析対象遺伝子: *SMN1*、*SMN2*、*NAIP*、*SERF1A* (H4F5)、*GTF2H2* (p44t)、*RAD17*

SMA 群と control 群の間で copy 数の分布に違いがないかを統計的に解析した。本研究では、Cochran-Armitage 傾向検定を使用した。

Patients: 自治医科大学神経内科、名古屋大学神経内科にて同意の得られた SMA IV 型患者 82 例 (SMA 群)、健常者 70 例 (control 群)。

(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

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、PC サンプルにおいて *SMN1* 遺伝子上に点変異 (c. 275G>C) が存在するを確認できた。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 (data not shown)。

1 copy の *SMN1* 遺伝子を示す SMA III 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 2)

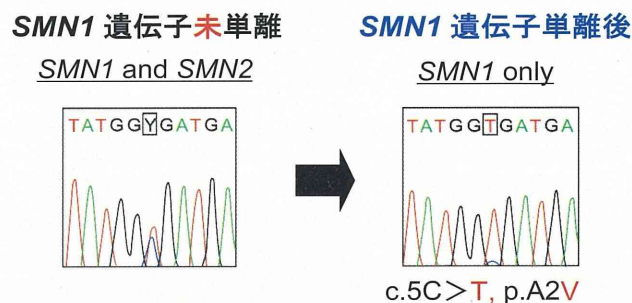


図 2 SMA III 型における新規 *SMN1* 遺伝子変異 in silico analysis の結果、c.5C>T 変異はすべてのプログラムにおいて "DAMAGING" を示した。

2. 次世代シーケンサーを用いた新規原因遺伝子探索

次世代シーケンサーの結果、3 例に共通するアミノ酸置換を伴うヘテロの新規遺伝子変異を 14 個同定したが、SMA の要因になりうる遺伝子はなかった。

<対象患者: SMA IV 型 (2例1家系)>					
sample No.	AGE	ONSET	MAX機能	呼吸障害	左右対称性
18	56y	20y	階段昇降介助なし	—	—
19	79y	72y	階段昇降介助なし	—	—

【家系図】			近位優位	CK (IU/l)	CK正常値 (IU/l)
			+	174	14-170
			+	382	12-144

SMA IV 型
遺伝形式: 常染色体優性遺伝
X連鎖性遺伝

図 3 親子関係にある 2 例について

また、図 3 に示すような親子関係にある 2 例に着目したところ、共通するアミノ酸置換を伴うヘテロの新規遺伝子変異を 54 個同定することができた。

この親子関係にある 2 例について、さらに「SMA 機能関連遺伝子の解析」を行い候補遺伝子の絞込みを行った。

SMN 遺伝子は脊髄の神経細胞の核内・細胞質で RNA の代謝に関与する遺伝子である。また、ヒストン脱アセチル化阻害剤との関わりについての報告もある。そこで *SMN* 遺伝子に似た機能をもつ遺伝子や脊髄で発現する遺伝子に注目して候補遺伝子の絞込みを行った。

その結果、histone deacetylase である *HDAC* 遺伝子や RNA splicing factor である *XAB2* 遺伝子など *SMN* protein の近傍で作用している可能性がある遺伝子が含まれていた (表 1)。

表 1 SMA 機能関連遺伝子の解析

※以下の結果は novel SNP、nonsynonymous、hetero mutation である。

GENE	POINT	chr
1 <i>A4AS</i>	achalasia, adrenocortical insufficiency, alacrimia (triple-A syndrome) function: normal development of the peripheral and central nervous system	12
2 <i>HDAC5</i>	histone deacetylase 5 function: transcriptional regulation, etc..	17
3 <i>XAB2</i>	pre-mRNA-splicing factor SYF1	19
4 <i>MAST1</i>	microtubule associated serine/threonine kinase 1 high expression: adult brain, spinal cord and testis	19
5 <i>CASK</i>	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase expression: synapses in the brain, other: FG syndrome 4, mental retardation, microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia	X
6 <i>MAOB</i>	monoamine oxidase B function: metabolism of neuroactive and vasoactive amines in the central nervous system and peripheral tissues	X

3. MLPA 法を用いた *SMN1* 遺伝子解析

SMN1 遺伝子 exon 7 の copy 数解析結果について着目すると、control 群は 66 例 (94.3%) が 2 copies で 3 例 (4.3%) が 3 copies を示したのに対し、SMA 群では 74 例 (90.2%) が 2 copies、6 例 (7.3%) が 3 copies、2 例 (2.4%) が 4 copies を示した (表 2)。control 群と比較して SMA 群は *SMN1* 遺伝子 exon 7 領域の copy 数増加が確認できた。Cochran-Armitage 傾向検定を行ったところ、 $P=0.087$ となり *SMN1* 遺伝子 exon 7 領域の copy 数の増加傾向は確認できたが control 群との有意な差が確認できるほどではなかった (表 2)。

SMN1 遺伝子 exon 8 領域については、 $P=0.680$ となり、copy 数の増加傾向は確認できなかった (表 2)。また、*SMN2* 遺伝子については control 群と SMA 群の間で差は確認できなかった (data not shown)。

表 2 *SMN1* 遺伝子 copy 数の比較

copy数	SMA IV型 (n = 82) n (%)	Controls (n = 70) n (%)	Cochran-Armitage 傾向検定
SMN1 遺伝子 Exon7			
0	0 (0.0)	0 (0.0)	P= 0.087
1	0 (0.0)	1 (1.4)	
2	74 (90.2)	66 (94.3)	
3	6 (7.3)	3 (4.3)	
4	2 (2.4)	0 (0.0)	
SMN1 遺伝子 Exon8			
0	0 (0.0)	0 (0.0)	P = 0.680
1	2 (2.4)	1 (1.4)	
2	75 (91.5)	66 (94.3)	
3	4 (4.9)	3 (4.3)	
4	1 (1.2)	0 (0.0)	

D. 考察

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

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。

2. 次世代シーケンサーを用いた新規原因遺伝子探索

図 3 の家系図より、疾患の遺伝形式は優性遺伝もしくは X 連鎖性遺伝形式が考えられる。そこで SMA 機能関連遺伝子の解析では、常染色体上にある 4 個の遺伝子と X 染色体上にある 2 個の遺伝子、計 6 個の新規 SNP を候補遺伝子とした (表 1)。この 2 症例について注目すべき点は、発症年齢に差がある点である。発症年齢は、症例 18 (長男) は 20 歳で、症例 19 (母親) は 72 歳であり、症例 18 において疾患発症の若年化が見られた。このことから、この家系が優性遺伝形式の場合、共通する原因遺伝子変異の他に症例 18 特有の遺伝子の影響が考えられた。

3. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法を用いた *SMN1* 遺伝子解析

SMA 群 (SMA IV型) は *SMN1* 遺伝子の重複という点で ALS の既報告と一致したが、*SMN1* 遺伝子の exon 7 のみ重複する症例 (図 4) や *SMN1* 遺伝子が 4 copies 持つ特徴的な症例が存在した。exon 7 のみ重複する症例は、*SMN1* 遺伝子 exon 7 の copy 数が増え、*SMN2* 遺伝子

exon 7 の copy 数が減っていることより、図 4 に示すような gene conversion (*SMN2* exon 7⇒*SMN1* exon 7) 起こったことが考えられた。

Rare variation

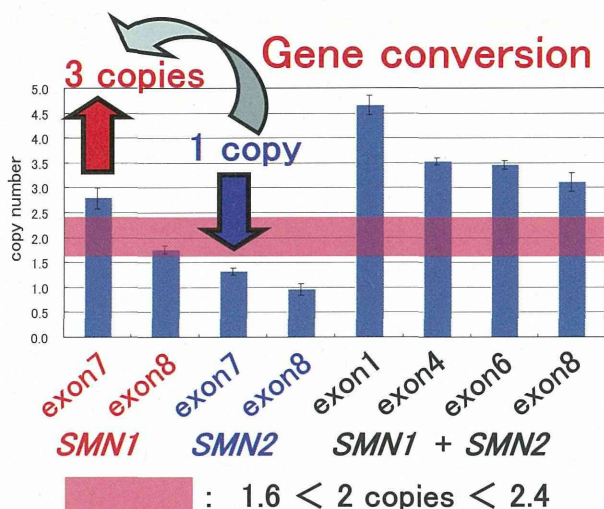


図 4-1 exon 7 のみ重複する症例

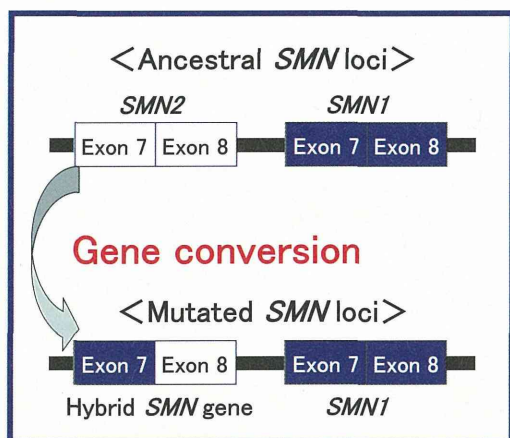


図 4-2 gene conversion

SMN1 遺伝子を 3 copies 持つ症例は、図 4 の症例とは異なり、exon 7、8 を含めた広い *SMN* 遺伝子領域で gene conversion が起こったと考えられた。また、4 copies 持つ症例は、gene conversion が起こっていると考えられるが、+α で何かしらのイベント (gene conversion や組み換えなど) が起こったと考えられた。

SMN1 遺伝子 exon 7 を 4 copies 持つ特殊な症例は、*SMN1* 遺伝子 exon 7、*SMN2* 遺伝子 exon 7 がともに copy 数が増えていることより、gene conversion では説明がつかない。おそらく不均衡な組み換えが起こったためと考えられた。

本項で示したような *SMN* 遺伝子の copy 数が増加している症例は SMA IV 型発症のリスクになる可能性がある。今後は *SMN* 遺伝子の copy 数の変化が SMA IV 型に対してどのような影響を及ぼすかを調べる必要がある。

また、SMA IV 型は 50、60 歳で発症するケースも報告されているが、本研究では control 群は 20-40 歳代がもっとも多かった。今後は 50、60 歳中心の control 群とも比較していきたい。

E. 結論

- missense 変異が同定された SMA III 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。
- 共通するアミノ酸置換を伴うヘテロの新規遺伝子変異を 54 個同定し、さらに SMN 蛋白質と関連する蛋白質、また脊髄で発現する新規 SNP を 6 つに絞り込み、候補遺伝子とした。
- SMA IV 型は *SMN1* 遺伝子の重複という点で ALS の既報告と一致したが、*SMN1* 遺伝子の exon 7 のみ重複する症例や *SMN1* 遺伝子が 4 copies 持つ特徴的な症例が存在した。SMA 群において、*SMN1* 遺伝子の copy 数の重複傾向は確認できたが control 群との有意な差が見られるほどではなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 斎藤加代子、荒川玲子. 遺伝カウンセリング. 総合臨床 2011;60(4):599-600.
- 斎藤加代子. 遺伝学的検査 表 176 遺伝学的検査情報 脊髄性筋萎縮症. 臨床検査データブック 2011-2012 (高久史磨監、黒川清・春日雅人・北村聖編). 2011;675, 医学書院, 東京.
- 斎藤加代子、荒川玲子. ウェルドニッヒ・ホフマン病. (井村裕夫総編、福井次矢・辻省次編), 症候群ハンドブック. 2011;72-73, 中山書店, 東京
- Endo M, Fujii K, Sugita K, Saito K, Kohno Y, Miyashita T. Nation wide survey of nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan revealing the low frequency of basal cell carcinoma. Am J Med Genet Part A 2012;158(A):351-357.
- Kondo E, Nishimura T, Kosho T, Inaba Y, Matsuhashi S, Ishida T, Baba A, Koike K, Nishino I,

- Nonaka I, Furukawa T, Saito K. Recessive *RYR1* mutations in a patient with severe congenital nemaline myopathy with ophthalmoplegia identified through massively parallel sequencing. *Am J Med Genet A* 2012;158(A):772-778.
- 6) Arakawa R, Aoki R, Arakawa M, Saito K. Human first-trimester chorionic villi have a myogenic potential. *Cell Tissue Res* 2012;348(1):189-197.
- 7) Ono S, Yoshiura K, Kinoshita A, Kikuchi T, Nakane Y, Kato N, Sadamatsu M, Konishi T, Nagamitsu S, Matsuura M, Yasuda A, Komine M, Kanai K, Inoue T, Osamura T, Saito K, Hirose S, Koide H, Tomita H, Ozawa H, Niikawa N, Kurotaki N. Mutations in *PRRT2* responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions. *J Hum Genet* 2012; 57:338-341.
- 8) van Kuleburg A B.P, Dobritzsch D, Meijer J, Krumpel M, Selim L A., Rashed M S., Assmann B, Meinsma R, Lohkamp B, Ito T, Abeling N G.G.M, Saito K, Eto K, Smitka M, Engvall M, Zhang C, Xu W, Zoetekouw L, Hennekam R C.M. 8-Ureidopropionase deficiency: Phenotype, genotype and protein structural consequences in 16 patients. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822(7):1096-1108.
- 9) Akizawa Y, Nishimura G, Hasegawa T, Takagi M, Kawamichi Y, Matsuda Y, Matsui H, Saito K. Prenatal diagnosis of osteogenesis imperfecta type II by three-dimensional computed tomography: The current state of fetal computed tomography. *Congenital Anomalies* 2012; 52(4):203-206.
- 10) 斎藤加代子、浦野真理、佐藤裕子. 遺伝カウンセリング. *精神科* 2012; 20(1): 33-37.
- 11) 岡本健太郎、斎藤加代子、佐藤孝俊、石垣景子、舟塚真、大澤真木子. 脊髄性筋萎縮症 0 型の 1 例. *脳と発達* 2012;44(5):31-35.
- 12) 斎藤加代子、近藤恵里、青木亮子. 筋疾患の診断における遺伝子検査の役割. *小児内科* 2012;44(9):1442-1448.
- 13) 荒川玲子、松尾真理、斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症の診断とケア. *難病と在宅ケア* 2012;18(9):40-43.
- 14) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症. *小児科診断・治療指針* 2012;764-766, 中山書店, 東京.
- 15) 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.
- 16) 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, Koderia 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.

22) 伊藤万由里、斎藤加代子、大澤真木子. 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.

23) 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.

24) 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

25) 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

26) 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) 斎藤加代子. PGx 講義とロールプレイ. 第 21 回遺伝医学セミナー第 21 回 遺伝医学セミナー, 2011.9.2-4, 千葉

2) 近藤恵里、西村貴文、稲葉雄二、古庄知己、西野一三、埜中征哉、古川徹、斎藤加代子. 先天性ミオパチー原因遺伝子の包括的スクリーニング解析にて診断し得た RYR1 遺伝子変異による乳児重症型ネマリンミオパチーの 1 例, 日本人類遺伝学会第 56 回大会・第 11 回東アジア人類遺伝学会, 2011.11.11, 幕張

3) 斎藤加代子. 脊髄性筋萎縮症 (SMA) 診療と研究の最前線, SMA 家族の会関西支部第 20 回定例会, 2012.8.4, 京都

4) 斎藤加代子. 解析から応用へ、そして未来への飛躍, 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012.10.24-27, 東京

5) 近藤恵里、斎藤加代子小児神経筋疾患の遺伝医学, 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012.10.24-27, 東京

6) 久保祐二、相楽有規子、森田光哉、中野今治、斎藤加代子. 成人発症の脊髄性筋萎縮症における SMN 遺伝子コピー数の解析. 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012.10.24-27, 東京

7) 久保祐二、相楽有規子、斎藤加代子, 小児期発症脊髄性筋萎縮症の家系における MLPA 法を用いた SMN 遺伝子解析, 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012.10.24-27,

東京

8) 益子貴史、手塚修一、秋本千鶴、森田光哉、橋口昭大、高嶋博、相楽有規子、斎藤加代子、中野今治. 成人発症脊髄性筋萎縮症の臨床像と遺伝学的背景の解析. 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012.10.24-27, 東京

9) 伊藤万由里、斎藤加代子、浦野真理、相楽有規子、大澤真木子, 日本における脊髄性筋萎縮症 (SMA) の臨床・疫学調査, 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012.10.24-27, 東京

10) 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学会への応用. 第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2013.6.21, 川崎

11) 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ー当センターの経験からー, 第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2013.6.22, 川崎

12) 久保祐二、山本友人、森川悟、西尾久英、中島秀樹、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. 第 20 回日本遺伝子診療学会大会, 2013.7.20, 浜松

13) 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

14) 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

15) 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 遺伝子コピー数がパルプロ酸投与時の 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

16) 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 |

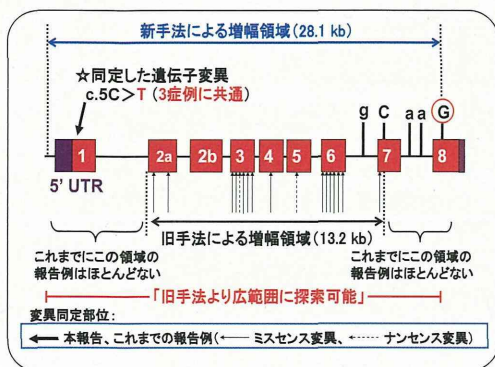
脊髄性筋萎縮症 (SMA) の臨床・遺伝子分析、治療法の開発

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: 斎藤加代子 所属機関名: 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター

概要

1. Long PCR法を用いてSMN1 遺伝子のみを特異的に単離・シーケンスする方法を開発し、1 copyのSMN1 遺伝子を有するSMA III型3症例に対し、共通する新規変異を同定した。
2. SMN1 遺伝子の変異を示さないSMA IV型2症例について次世代シーケンサーにより全エクソーム解析を行い、SMAを引き起こす新規原因遺伝子の探索を行ったところ、SMN蛋白質と関連する蛋白質、また脊髄で発現する新規SNP 6つを候補遺伝子とした。
3. SMN 遺伝子のcopy数をSMA IV型患者、健常者間で比較したところ、SMA IV型患者においてSMN1 遺伝子のcopy数の重複傾向を示した。

1. 新規SMN1 遺伝子解析法

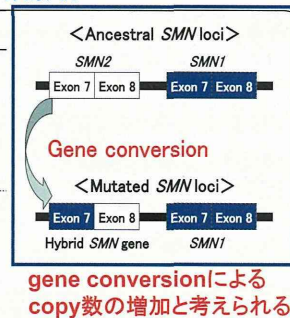


2. 次世代シーケンサーによる全エクソーム解析

新規SNP 6つを候補遺伝子とした。

3. SMN1 遺伝子copy数解析

copy数	SMA IV型 (n = 82) n (%)	Controls (n = 70) n (%)	Ookhran-Armitage 傾向検定
SMN1 遺伝子 Exon7			
0	0 (0.0)	0 (0.0)	P = 0.087
1	0 (0.0)	1 (1.4)	
2	74 (90.2)	66 (94.3)	
3	6 (7.3)	3 (4.3)	
4	2 (2.4)	0 (0.0)	
SMN1 遺伝子 Exon8			
0	0 (0.0)	0 (0.0)	P = 0.680
1	2 (2.4)	1 (1.4)	
2	75 (91.5)	66 (94.3)	
3	4 (4.9)	3 (4.3)	
4	1 (1.2)	0 (0.0)	



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

課題 1. パーキンソン病患者は転倒リスクが高く、排尿障害がその要因となる。そこで過活動膀胱症状質問表をもちいて、パーキンソン病患者 86 名に対して、外来通院 6 ヶ月間の自己記入式記録を行なった。その結果転倒は 45%であり、排尿回数よりは頻尿切迫感・尿失禁と転倒との関連が示唆された。

課題 2. 神経栄養因子 NRG1 type III SMDF に血漿及び髄液中濃度を測定して、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多系統萎縮症、対照群で比較した。その結果パーキンソン病群でのみ有意な低下を示した。しかし、パーキンソン病重症度との相関は認めなかった。

課題 3. キアリ奇形 1 型を伴う脊髄空洞症 5 例、成人対象例 20 例について、Agilent 400K CNV アレイにより 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 例に共通したコピー数 loss を示す CNV 領域を 5 カ所同定した。しかし、空洞症患者全例に共通した領域は同定されなかった。

研究分担者：佐々木秀直

所属機関名：北海道大学大学院医学研究科神経内科学

A. 目的

転倒研究：転倒は骨折などを生じ入院や寝たきりの原因となるため、その予防は社会健康医学的に重要である。特にパーキンソン病患者は転倒のリスクが高く、二次的外傷も多い。近年、排尿障害が転倒のリスクを上昇させるとの報告がある。過活動膀胱の症状を日中尿回数、夜間尿回数、尿意切迫感、尿失禁の 4 個の要素でスコア化する過活動膀胱症状質問票 (OABSS) が排尿障害の評価に使われるようになってきた。そこでパーキンソン病において、OABSS を用いた排尿障害の各要素と転倒との関連性について検討を行った。

パーキンソン病の分子マーカー：パーキンソニズムをきたす変性疾患の鑑別診断、重症度と関連する分子候補について解析した。

空洞症素因遺伝子：脊髄空洞症は、脊髄に空洞を形成する慢性疾患である。キアリ奇形 1 型に伴うものが約半数を占める。原因は未だ解明されていない。空洞症には家族例のあること、後頭蓋窩脊柱移行部には種々の奇形の伴うこと、一般に発達障害や形成障害には何らかの遺伝子変異に因る場合の稀でないこと、遺伝的要因の一つとしてゲノム構造多型 (CNV)

は変異率が高いなどを考慮して、キアリ奇形の原因の一つとして CNV の関与を検討した。

B. 方法

転倒研究：北大病院神経内科外来に通院するパーキンソン病患者を対象に、自己記入式転倒記録ノートを用いて、前向きに 6 ヶ月間の転倒記録を行った。排尿障害は調査開始時及び終了時に OABSS による評価を行った。転倒に関連する要因として、性別・年齢などの身体的情報、パーキンソン病の ADL、認知機能、うつ症状、生活環境の整備状況などを調査期間中に収集した。転倒記録データについては、外来通院の度に確認し、信頼性が確保されるよう留意した。

パーキンソン病の分子マーカー：片方のみ MSA を発病した一卵性双生児 1 組、非血縁の MSA 患者 2 名、及び正常対照群 3 名について白血球の mRNA 発現解析を 44K マイクロアレイで行なった。正常対照群とパーキンソン病群（各 3 例）の CSF を LC-MS/MS で分析し、検出された蛋白質をパルスウェイク解析した。結果より標的となりうる因子である neuregulin-1 (NRG1)、その中でも神経細胞にのみ発現しているアイソフォームの type III (SMDF) に着目し、血中での蛋白発現を WB

法、血中濃度を ELISA 法により測定した。WB 及び ELISA は市販抗体により行なった。SMDF の特異性は市販抗原ヒト EGF, betacellulin, HB-EGF, TGF α 、NRG α -1/HRG1- α EGF ドメイン、NRG1- β /HRG1- β 細胞外ドメインの各ペプチドとの交差性も検討し最大<0.5%の交差率で特異性を確認した。ELISA 法で末梢血 SMDF 定量を行なった対象は、正常対照群 30 例、パーキンソン病 45 例、対照疾患として ALS38 例、MSA51 例である。各疾患群及び正常対照群とパーキンソン病群との群間比較及びパーキンソン病重症度との相関解析を行った。さらに、ホルマリン固定剖検脳組織を用いて NRG1 SMDF の蛋白発現を免疫染色法で確認した。

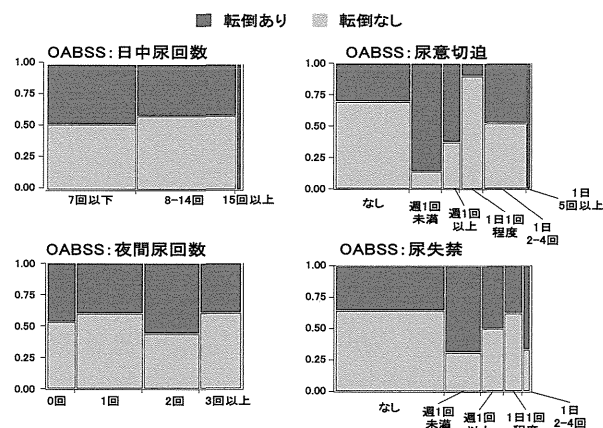
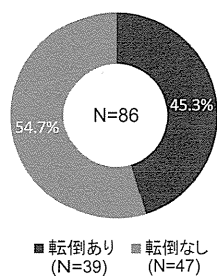
空洞症素因遺伝子: 健常者 20 名、キアリ 1 型脊髄空洞症 5 名の末梢血白血球よりゲノム DNA を抽出した。DNA に断片化のないことを確認し、再精製して Agilent 2x400k CNV アレイを用いて測定した。測定値を Agilent Feature Extraction を用いて数値化したのち、網羅的 CNV 解析をおこなった。CNV は連続して 3 プローブ以上の変換を認めた領域とした。

(倫理面への配慮)

いずれの研究も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。

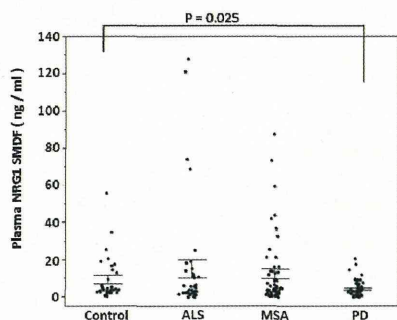
C. 結果

転倒研究: パーキンソン病 86 名(男性 33 名、女性 53 名)について 6 ヶ月間の転倒記録が得られた。平均年齢は 71.0 $\pm$ 7.5 歳(SD)、Hoehn-Yahr 分類は I : 18 名、II : 18 名、III : 32 名、IV : 17 名、V : 1 名であった。6 ヶ月間で 1 回以上転倒した患者(転倒者)は 39 名(46.4%)であった。

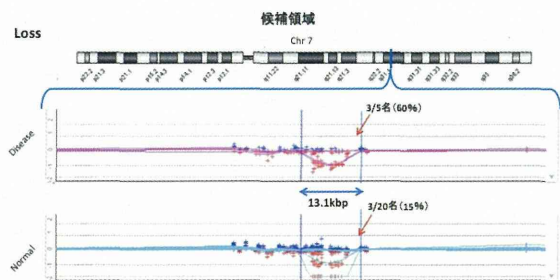


HY 分類では重度であるほど転倒者の割合が多い傾向がみられた。転倒あり患者の転倒回数の分布では、5 回未満の患者が多かったが、6 ヶ月間で 99 回以上の転倒が認められた高頻度転倒者が 2 名認められた。OABSS 各項目と転倒との関連では、日中尿回数及び夜間回数と転倒とは明らかな傾向は認めず、尿意切迫感及び尿失禁では週に 1 回未満及び週 1 回程度の群で転倒者が多い傾向がみられた。

分子マーカー: 白血球のトランスクリプトーム解析では NRG1 を認識する probe のみ、MSA で発現量が亢進していた。この probe で認識される NRG-1 から神経系に発現しているものとして最初に type I を末梢血で定量測定したが、各疾患で差を認めなかった。そこで、ニューロンに特異的に発現している NRG1SMDF を定量測定する事にした。ウエスタンブロットにより NRG1 SMDF が血中に存在することを確認した上で、対照群の血中濃度を測定した。その結果、年齢($r = 0.098, p = 0.605$)、性別($p = 0.866$)には相関・有意差を認めなかった。次いで、パーキンソン病群と各疾患及び正常対照群との比較検討 (t 検定) では、パーキンソン病群のみ他の群より有意に低い値を呈した($p < 0.05$)。HY 分類や UPDRS とは相関を認めなかった。脳組織免疫染色では、レビー小体が陽性を示した。PD のみ対照群、他の疾患と比較して有意に低値を示した。



空洞症素因遺伝子: 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 名全例に共通し、かつ健常者では認められない Mb 単位の CNV 領域は確認できなかった。



D 考察

転倒研究: パーキンソン病における転倒と排尿障害の関連においては、日中及び夜間の尿回数とは明らかな関連はなく、尿意切迫感・尿失禁との関連が示唆された。夜間のトイレへの往復は一つの転倒リスクが高い場面であるが、今回の結果では夜間の尿回数と転倒には直接的な相関は認められなかった。また、尿意切迫感と尿失禁においても週に 1 回未満及び週 1 回程度の群で転倒者が多く、症状なし及び 1 日 1 回程度の群では少ないという U 字型の分布が認められた。これらは排尿障害の症状が強い患者では生活環境整備状況や介助者などの転倒を減らす要因が加わっている可能性があることを示唆している。これらについては、各要因の関連を考慮した分析をしていくことが必要と考えられる。

分子マーカー: NRG1 family は神経栄養因子の一つであり、N 末端の構造により 6 種類の isoform が知られ

ている。全て EGF-like domain 及び膜貫通ドメインを有している。その中でニューロンに特異的に発現している NRG-1SMDF は血中に CSF より高濃度で存在している。SMDF は中脳黒質ドパミン産生細胞の分化と機能維持に関与しているとされることから、パーキンソン病の発現に何らかの関与が推定される。少なくともパーキンソン病患者で特異的に認められた血漿中の低値は、個々の例の前向き経過観察によりパーキンソン病の発病と関係があるのか、今後検討を要する課題である。

空洞症素因遺伝子: 今回の解析では病気の素因となりうる Mb 単位の CNV は確認できなかった。一般的な測定法では検出にくい 1kb 前後の比較的短い構造変化について解析を進めている。また、発症年齢、性別など臨床指標と構造変化との相関性も考慮した解析も進めていく予定である。

E 結論

転倒研究: 今回の結果から、パーキンソン病患者における排尿障害の要素では尿意切迫感と尿失禁が転倒と関連することが示唆された。転倒には、排尿障害以外の転倒に影響する要因が複雑に絡んでいるので、今後も分析・研究が必要である。

分子マーカー: NRG1 SMDF はパーキンソン病で有意に低値を示したが、その濃度はパーキンソン病の進行度とは相関がなくバイオマーカーとしての有用性は低い。しかし、NRG1 SMDF は成人脳でも発現が見られ、神経細胞の保護や脳ドパミン産生神経細胞に作用してドパミンの産生を促す神経栄養因子としての作用があることから、NRG1 SMDF はパーキンソン病の発症に何らかの役割を果たしていると推定される。

空洞症: 家族例のあることから素因遺伝子の存在が示唆される。診断基準に準じた症例の集積と解析により、キアリ奇形に関与する CNV 領域を特定できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記すべき事無し

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
- 3) Sakushima K, Tsuboi S, Yabe I, Hida K, Terae S, Uehara R, Nakano I, Sasaki H.: Nationwide survey on the epidemiology of syringomyelia in Japan. J Neurol Sci. 2012;313(1-2):147-52
- 4) Yabe I, Tsuji-Akimoto S, Shiga T, Hamada S, Hirata K, Otsuki M, Kuge Y, Tamaki N, Sasaki H: Writing errors in ALS related to loss of neuronal integrity in the anterior cingulate gyrus. J Neurol Sci 2012; 315: 55-9
- 5) Sato K, Yabe I, Yaguchi H, Nakano F, Kunieda Y, Saitoh S, Sasaki H: Genetic analysis of two Japanese families with progressive external ophthalmoplegia and parkinsonism. J Neurol 2011; 258(7): 1327-32
- 6) 寺江 聡、飛騨一利、佐々木秀直: 病態を考慮した脊髄空洞症の診断. BRAIN and NERVE 2011; 63(9): 969-977.
- 7) Tsuji-Akimoto S, Hamada S, Yabe I, Tamura I, Otsuki M, Kobashi S, Sasaki H: Writing errors as a result of frontal dysfunction in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol 2010; 257: 2071-7

2. 学会発表

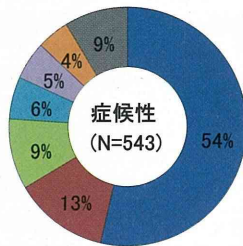
- 1) 矢部一郎、秋本幸子、大槻美佳、志賀 哲、玉木長良、佐々木秀直; ALS における ^{11}C -フルマゼニル (FMZ) -PET 所見. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011
- 2) 佐久嶋 研、山崎 新、林野泰明、福原俊一、矢部一郎、佐々木秀直: パーキンソン病における排尿障害と転倒の関連について. 第53回日本神経学会学術大会, 東京, 2012
- 3) 伊藤さやか、佐々木秀直、矢部一郎、秋本幸子、大槻美佳; 筋萎縮性側索硬化症および進行性核上性麻痺における注意機能についての検討. 第53回日本神経学会学術大会, 東京, 2012
- 4) 矢部一郎、谷野美智枝、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
- 5) 浜 結香、矢部一郎、若林孝一、加納崇裕、廣谷真、大庭幸治、岩倉百合子、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. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

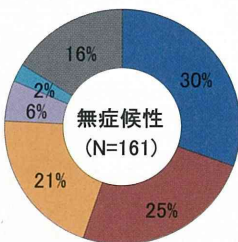
1. 特許取得
2. 実用新案特許
3. その他
いずれも該当無し

脊髄空洞症

2009年全国疫学調査



- Chiari奇形 I 型
- 特発性
- 外傷
- 癒着性くも膜炎
- 脊髄腫瘍
- Chiari奇形 II 型
- その他



発症原因

妊娠中の環境要因

出生時の外傷

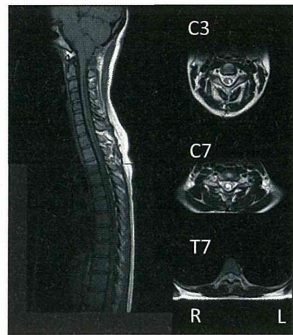
+

CVJ発達異常
家族例



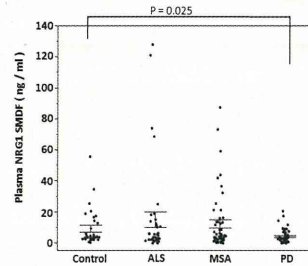
遺伝的素因の検索

例: ゲノム CNV

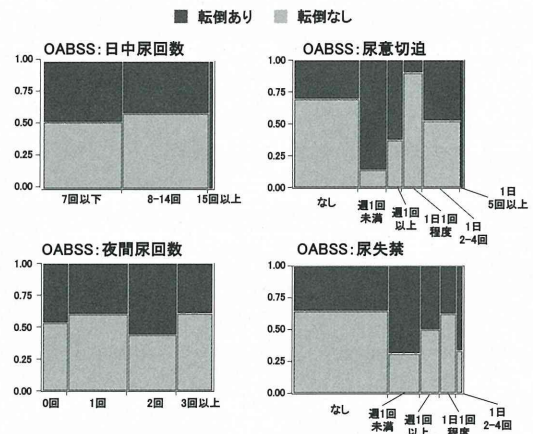


パーキンソン病

パーキンソン病患者では血漿NRG1 type III(SMDF)が有意に低い



過活動膀胱症状質問票(OABSS)と転倒の関連



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
研究分担者:
佐々木秀直
所属機関名:
北海道大学大学院医学研究科
神経内科学

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

大脳皮質変性を伴う神経疾患の臨床像は多様である。特に前頭側頭葉変性症においては、神経病理学的にタウ陽性封入体を伴う前頭側頭型認知症(FTD)や進行性核上性麻痺(PSP)などの病型がある一方、TDP-43 陽性封入体あるいは FUS 陽性封入体を伴う前頭側頭型認知症(FTD)や筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの病型をも呈する。われわれはまず、前頭側頭葉変性症のうち、PSP と ALS を対象に高次脳機能障害とくに注意機能について解析を行った。その結果、PSP において注意障害が顕著であったが、その一方、ALS では注意機能は保持されていた。また、PSP 患者の書字では、脱字や文字ミスは軽度である傾向にあったことより、ALS の書字障害は注意機能障害に起因している可能性は低いものと推定された。ついで、*DNAJB6* 遺伝子変異により FTD が発症する可能性を報告し、病理学的解析により、その発症機序については Tau、TDP-43、FUS などの既知の分子が関連しないことを報告した。最後に、本邦にも遺伝性 PSP 家系が存在することを報告し、この家系を対象に遺伝子解析を行った。その結果、既知の候補遺伝子変異を認めず、候補領域にも連鎖しないことから既知の疾患に合致しない未知の疾患であることを報告した。

研究分担者：佐々木 秀直

所属機関名：北海道大学大学院医学研究科神経内科

A. 研究目的

大脳皮質変性を伴う神経疾患の臨床像は多様である。特に前頭側頭葉変性症においては、神経病理学的にタウ陽性封入体を伴う前頭側頭型認知症(FTD)や進行性核上性麻痺(PSP)などの病型がある一方、TDP-43 陽性封入体あるいは FUS 陽性封入体を伴う前頭側頭型認知症(FTD)や筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの病型をも呈する。そこでわれわれは、そのような背景に基づき下記の研究を行った。

I. 高次脳機能障害について

おもに ALS においては認知障害や失語、書字障害などの多彩な前頭葉機能障害に由来する高次脳機能障害を呈することが報告されている。そのうち書字障害については、いわゆる失語の部分症状としての失書であるのか、注意機能障害による書字ミスなのかについては、議論の余地がある。われわれは以前、この ALS における書字障害がフルマゼニル(FMZ)-PET を用いた研究により、前部帯状回の神経脱落による可能性があることを報告し、その病態機序の考察として前部帯状回は注意機能の中核であるので、注意障害による書字ミスである可能性を指摘した(Yabe I et al. J Neurol Sci 2012; 315: 55-59)。また、前頭葉機能低下を伴う代表的疾患である進行性核上性麻痺についても注意機能障害については十分に検討されていない。そこでわれわれは、これらの疾患の注意機能障害について検討することを目的に本研究を行った。

II. *DNAJB6* 変異を伴う FTD の病理学的検討

前頭側頭葉変性症の神経病理学的重要分子として、TDP-43、TauやFUSなどが知られているが、*DnaJ homolog subfamily B member 6 (DNAJB6)*遺伝子変異により発症することが報告された優性遺伝性肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)の1病型であるLGMD1Dの筋病理所見においてrimmed vacuoleと壊死再生線維に加えて、核および細胞質にTDP-43の凝集が見られることが本年報告された。我々は最近、このLGMD1DにFTDを併発した剖検例を経験したので、その病態を解明するために、病理学的解析を行った。

III. PSP 類似の臨床症状を呈する遺伝性神経疾患家系の遺伝子解析研究

PSPは前頭側頭葉変性症の1病型であり、体幹部に強いパーキンソニズム、認知機能障害、垂直性の核上性眼球運動障害を主徴とする疾患であり、パーキンソニズムを呈する疾患のなかではパーキンソン病、多系統萎縮症に次いで頻度の高い疾患である。孤発性疾患ではあるが、まれに家系内に複数の発症者をみた家系も報告されている。われわれは最近、常染色体優性遺伝性形式で発症するPSP類似の臨床症状を呈する家系を経験した。本疾患の原因遺伝子の同定を目指し遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

I. 高次脳機能障害について

北大病院神経内科に通院または入院中の9名のALSおよび6名のPSP患者について、以下の高次脳機能検査を施行した。1. MMSE (Mini mental state examination)、2. TMT (Trail Making Test)、3. RCPM (Raven 色彩マトリックス検査)、4. FAB (Frontal assessment battery)、5. CAT (Clinical assessment for attention; 標準注意機能検査)を行った。同時に疾患対照として5名のAlzheimer病(AD)患者にも同様の検査を施行した。統計学的解析は、群間の比較検定にはWilcoxon順位検定を用い、相関解析にはSpearman相関解析を用いた。

II. DNAJB6変異を伴うFTDの病理学的検討

DNAJB6遺伝子変異を伴うFTD症例の剖検例において病理学的解析を行った。症例の詳細を呈示する。剖検時76歳男性。61歳時に四肢の筋力低下を主訴に当科初診。父と4名の同胞中2名に同様の症状を認める。四肢近位筋筋力低下を認め、筋生検でLGMDと診断された。その後、症状は徐々に増悪していたが、74歳頃より極めて頑固になり、易怒性となるなど性格変化が目立つようになり、脳MRIで前頭葉萎縮を認めFTDと診断された。家族による介護が困難となり、他院療養型病棟に入院した。76歳時に肺腫瘍が見つかるも緩和ケアの方針となり、肺炎に敗血症を併発し死亡した。

III. PSP類似の臨床症状を呈する遺伝性神経疾患家系の遺伝子解析研究

PSP類似の神経徴候を呈する家系を対象に遺伝子解析研究を行った。臨床症状の詳細を呈示する。発端者は61歳男性。43歳頃よりもの忘れが出現し、徐々に増悪。近医精神神経科で若年性認知症と診断され経過観察されていた。52歳頃より動作緩慢や易転倒性が出現し、53歳時に当科初診。認知機能障害(MMSE 12/30)、垂直性核上性眼球運動障害、頸部に強い筋強剛、強度の姿勢反射異常、両側把握反射、吸引反射が認められた。脳MRIでは側頭葉萎縮に加えて脳幹部特に中脳被蓋部の萎縮が顕著であり、加えて橋にhot cross bun徴候を認めた。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歳で発端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。

(倫理面への配慮)

本研究は北海道大学医学研究科医の倫理委員会または北海道大学病院自主臨床研究として承認された研究である。遺伝子解析研究においては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

I. 高次脳機能障害について

一般的な認知機能の指標であるMMSEやRCPMについては、他群に比べてAD群で有意に低下していたが($P < 0.01$)、ALS群とPSP群の比較では有意差は認められなかった。前頭葉機能の指標であるFABにおいても、他群に比べてAD群で有意に低下していたが($P < 0.01$)、ALS群とPSP群で有意差は認められなかった。注意機能の要素を含む前頭葉機能指標であるTMTについてはALS群がPSP群より有意に良好な結果であった($P < 0.05$)。CATにおいては下位検査のうちtapping span、visual cancellation、auditory detection、symbol digit modalities testの各試験において他群と比較し、ALS群において有意に良好な結果であった($P < 0.05$)。これらの結果はPSPには注意障害を顕著に伴うことを示している。また、PSPにおける注意機能障害の重症度と罹病期間との相関については、visual cancellationのみ有意な相関を認めたが($P < 0.05$)、その他の試験では相関を認めなかった。また、PSPにおいては、誤字や脱字などの書字ミスは軽度である傾向にあった。

II. DNAJB6変異を伴うFTDの病理学的検討

DNAJB6遺伝子解析ではミスセンス変異 c.279C>G (p.Phe93Leu)を認めた。この変異は既に病的変異として報告されているものであった。病理学的解析では右肺に扁平上皮癌と小細胞癌の重複腫瘍を認め、副腎に小細胞癌転移を認めた。死因は肺炎と敗血症に起因する呼吸不全と判断された。筋病理ではrimmed vacuoleと壊死再生線維に加えて、DNAJB6の凝集を細胞質に、TDP-43の凝集を核と細胞質に認めた。中枢神経病理では、脳重 1,338gで脳溝は開大し、前頭葉萎縮および軽度の側頭葉萎縮を認めるも、海馬の萎縮は目立たなかった。組織学的には神経細胞の脱落は軽度で、大脳白質や基底核を中心に軽度のspongy change、血管周囲腔の拡大を認めた。神経原線維変化、老人斑、Pick body、Lewy bodyは認められなかった。免疫組織学的検討ではTDP-43、Tau、FUS染色いずれにおいても、陽性封入体は認められなかったものの、ubiquitin陽性凝集体が散見された。DNAJB6染色ではその染色性が著

明に低下していた（図1）。

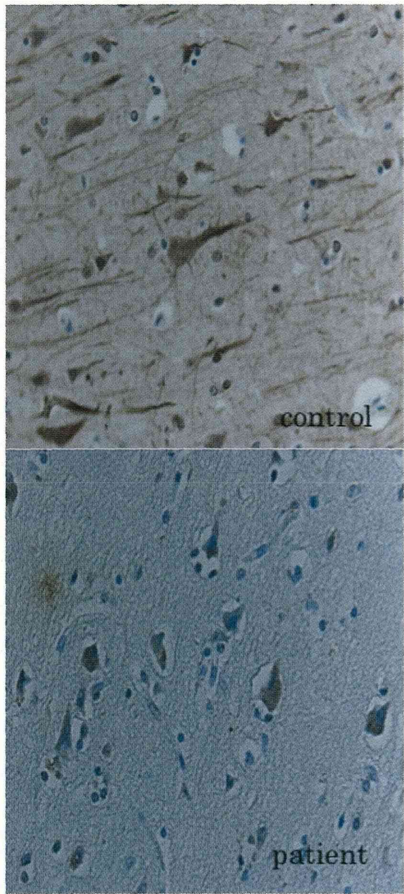


図1. DNAJB6染色（X400）；健常者に比べて本症例の大脳皮質で著明にその染色性が低下している。

III. PSP 類似の臨床症状を呈する遺伝性神経疾患家系の遺伝子解析研究

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）。解析した候補遺伝子の一覧を表1に示す。

次いで、連鎖解析および発端者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
	LRKK2	Omi/HTRA2	EIF4GI
	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	RGPDS
	UBQLN1	ATXN3	RAN

表1. 候補遺伝子一覧

D. 考察

I. 高次脳機能障害について

今回の結果では、ALS 群では注意障害を認めない一方で、PSP 群では顕著な注意障害が認められた。また、PSP 患者では書字障害は目立たない傾向にあった。以上の結果より ALS における書字障害は注意障害に起因しない可能性が高いと推定される。

FMZ-PET を用いた脳機能画像解析では、ALS 患者の前部帯状回の神経細胞におけるベンゾジアゼピン受容体結合能と書字機能障害の重症度が有意に相関しており、同部位の神経変性が書字障害に関与している可能性が報告されている。そして、その病態機序の仮説として ALS 患者における注意機能障害の可能性が指摘されていた。しかしながら、今回の結果は注意機能障害以外の病態機序に起因することを示すものであり、前部帯状回が担う書字に関する脳機能については、今後の検討が必要である。

ALS や PSP における注意機能障害の有無は両疾患の療養体制構築を計画する上でも重要な指標であると考えますが、今回の検討は少数例による検討であるので、今後より多数例で詳細に検討する必要がある。

II. DNAJB6 変異を伴う FTD の病理学的検討

本例は LGMD1D の世界初の剖検例である。筋病理所見は既報と同様の結果であり、TDP-43 の凝集を認めたが、FTD に関する中枢病理では TDP-43 を含め既知の病理変化は認められなかった。DNAJB6 は 染色体7q36 に位置する DNAJB6 遺伝子にコードされ、heat shock protein 40 (HSP40) ファミリーに属するシャペロンタンパクである。過去の研究では、ポリグルタミン凝集や Lewy body 形成に関与することが報告されている。本症例では LGMD1D に FTD が合併していたが、それが偶発的なものなのか、DNAJB6 遺伝子変異が FTD 発症にも関与しているのかについては、症例

の蓄積を含めて今後慎重に検討する必要がある。しかし、*VCP*変異に伴う *IBMPFD* の例もあることや、*DNAJB6* は中枢神経系に高発現していること、*DNAJB6* が *wnt signaling system* に関与していることなどから、*DNAJB6* 遺伝子変異が中枢神経病変に関与している可能性は高いと推定される。

Ⅲ. PSP 類似の臨床症状を呈する遺伝性神経疾患家系の遺伝子解析研究

現在のところ 19 家系の遺伝性 PSP 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 PSP 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 PSP 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ともに、同様の症例を蓄積する必要がある。

E. 結論

Ⅰ. 高次脳機能障害について

1. PSP では強く注意機能障害を認める一方で、ALS では注意機能は障害されない。
2. ALS において高率に認められる書字障害は注意機能障害以外の病態機序による可能性が高い。

Ⅱ. *DNAJB6* 変異を伴う FTD の病理学的検討

3. FTD を伴った LGMD1D の 1 剖検例を報告した。
4. 免疫組織学的検討により Tau、TDP-43、FUS などの既知の FTD 関連分子が発症に関与している可能性は低いことが明らかとなった。
5. *DNAJB6* や *wnt signaling system* の中枢神経系での機能を考察する上で重要な症例と考えられる。

Ⅲ. PSP 類似の臨床症状を呈する遺伝性神経疾患家系の遺伝子解析研究

6. PSP 類似の臨床症状を呈する神経疾患家系を報告した。

7. 臨床像は PSP に類似するが、神経放射線学的には PSP に合致しない。
8. 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
3. Sakushima K, Tsuboi S, Yabe I, Hida K, Terae S, Uehara R, Nakano I, Sasaki H: Nationwide survey on the epidemiology of syringomyelia in Japan. J Neurol Sci 2012; 313: 147-52
4. Yabe I, Tsuji-Akimoto S, Shiga T, Hamada S, Hirata K, Otsuki M, Kuge Y, Tamaki N, Sasaki H: Writing errors in ALS related to loss of neuronal integrity in the anterior cingulate gyrus. J Neurol Sci 2012; 315: 55-9
5. Sato K, Yabe I, Yaguchi H, Nakano F, Kunieda Y, Saitoh S, Sasaki H: Genetic analysis of two Japanese families with progressive external ophthalmoplegia and parkinsonism. J Neurol 2011; 258(7): 1327-32
6. 寺江 聡, 飛騨一利, 佐々木秀直: 病態を考慮した脊髄空洞症の診断. BRAIN and NERVE 2011; 63(9): 969-77
7. Tsuji-Akimoto S, Hamada S, Yabe I, Tamura I, Otsuki M, Kobashi S, Sasaki H: Writing errors as a result of frontal dysfunction in Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol 2010; 257: 2071-7

2. 学会発表

1. 佐久嶋 研、矢部一郎、佐々木秀直、坪井 聡、上原里程、中野今治；脊髄空洞症の第二次全国調査. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011
2. 矢部一郎、秋本幸子、大槻美佳、志賀 哲、玉木長良、佐々木秀直;ALS における ^{11}C -フルマゼニル (FMZ) -PET 所見. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011
3. 佐久嶋 研、山崎 新、林野泰明、福原俊一、矢部一郎、佐々木秀直：パーキンソン病における排尿障害と転倒の関連について. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012
4. 伊藤さやか、佐々木秀直、矢部一郎、秋本幸子、大槻美佳；筋萎縮性側索硬化症および進行性核上性麻痺における注意機能についての検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 東京, 2012
5. 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
6. 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. 知的所有権の取得状況（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

前頭側頭葉変性症における高次脳機能障害についての検討とその病態についての病理学的および遺伝学的解析研究

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：佐々木秀直
所属機関名：北海道大学大学院 医学研究科神経内科学

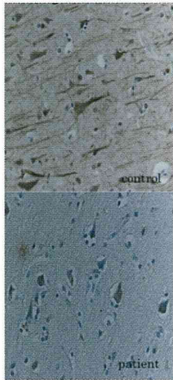
I. 高次脳機能障害について

進行性核上性麻痺(PSP)と筋萎縮性側索硬化症(ALS)を主な対象として検討したところ、以下の結論を得た。
1. PSPでは強く注意機能障害を認める一方で、ALSでは注意機能は障害されない。
2. ALSにおいて高率に認められる書字障害は注意機能障害以外の病態機序による可能性が高い。

II. DNAJB6変異を伴う前頭側頭型認知症の病理学的検討

- 1. DNAJB6変異を伴う前頭側頭型認知症(FTD)の1剖検例を報告した。
- 2. 免疫組織学的検討によりTau、TDP-43、FUSなどの既知のFTD関連分子が発症に関与している可能性は低いことが明らかとなった。
- 3. DNAJB6やwnt signaling systemの中核神経系での機能を考察する上で重要な症例と考えられる。

DNAJB6染色(X400);健康者に比べて本症例の大脳皮質で著明にその染色性が低下している。



III. PSP類似の臨床症状を呈する遺伝性神経疾患家系の遺伝子解析研究

発症者3名の臨床症状の要約

	症例1(発症者)	症例2(発症者)	症例3(発症者)
発症年齢	43	52	50
初発症状	もの忘れ	もの忘れ	手足麻痺、もの忘れ
発症から歩行障害発症までの期間(年)	18	12	9
発症から歩行障害発症までの期間(月)	9	11	3
認知症検査	+++	+++	+
姿勢反射異常	+++	+++	++
垂直性眼球運動障害	+	+	±
前頭葉萎縮	+++	+++	+
脳幹萎縮	+++	+++	±
Hot cross bun sign	+	+	±
脳血流SPECT	低下	低下	低下
MIBG心筋シンチ	正常	正常	正常

解析を行った候補遺伝子

候補遺伝子	症例1	症例2	症例3
PSEN1	+	+	+
PSEN2	+	+	+
APP	+	+	+
MAPT	+	+	+
CHMP2B	+	+	+
ANKK1	+	+	+
MAPK1	+	+	+
MAPK2	+	+	+
MAPK3	+	+	+
MAPK4	+	+	+
MAPK5	+	+	+
MAPK6	+	+	+
MAPK7	+	+	+
MAPK8	+	+	+
MAPK9	+	+	+
MAPK10	+	+	+
MAPK11	+	+	+
MAPK12	+	+	+
MAPK13	+	+	+
MAPK14	+	+	+
MAPK15	+	+	+
MAPK16	+	+	+
MAPK17	+	+	+
MAPK18	+	+	+
MAPK19	+	+	+
MAPK20	+	+	+
MAPK21	+	+	+
MAPK22	+	+	+
MAPK23	+	+	+
MAPK24	+	+	+
MAPK25	+	+	+
MAPK26	+	+	+
MAPK27	+	+	+
MAPK28	+	+	+
MAPK29	+	+	+
MAPK30	+	+	+
MAPK31	+	+	+
MAPK32	+	+	+
MAPK33	+	+	+
MAPK34	+	+	+
MAPK35	+	+	+
MAPK36	+	+	+
MAPK37	+	+	+
MAPK38	+	+	+
MAPK39	+	+	+
MAPK40	+	+	+
MAPK41	+	+	+
MAPK42	+	+	+
MAPK43	+	+	+
MAPK44	+	+	+
MAPK45	+	+	+
MAPK46	+	+	+
MAPK47	+	+	+
MAPK48	+	+	+
MAPK49	+	+	+
MAPK50	+	+	+
MAPK51	+	+	+
MAPK52	+	+	+
MAPK53	+	+	+
MAPK54	+	+	+
MAPK55	+	+	+
MAPK56	+	+	+
MAPK57	+	+	+
MAPK58	+	+	+
MAPK59	+	+	+
MAPK60	+	+	+
MAPK61	+	+	+
MAPK62	+	+	+
MAPK63	+	+	+
MAPK64	+	+	+
MAPK65	+	+	+
MAPK66	+	+	+
MAPK67	+	+	+
MAPK68	+	+	+
MAPK69	+	+	+
MAPK70	+	+	+
MAPK71	+	+	+
MAPK72	+	+	+
MAPK73	+	+	+
MAPK74	+	+	+
MAPK75	+	+	+
MAPK76	+	+	+
MAPK77	+	+	+
MAPK78	+	+	+
MAPK79	+	+	+
MAPK80	+	+	+
MAPK81	+	+	+
MAPK82	+	+	+
MAPK83	+	+	+
MAPK84	+	+	+
MAPK85	+	+	+
MAPK86	+	+	+
MAPK87	+	+	+
MAPK88	+	+	+
MAPK89	+	+	+
MAPK90	+	+	+
MAPK91	+	+	+
MAPK92	+	+	+
MAPK93	+	+	+
MAPK94	+	+	+
MAPK95	+	+	+
MAPK96	+	+	+
MAPK97	+	+	+
MAPK98	+	+	+
MAPK99	+	+	+
MAPK100	+	+	+

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

有棘赤血球舞蹈病(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。我々は、chorein 安定強発現細胞を用いて、chorein とマイトファジー、飢餓誘発性オートファジー、細胞骨格系タンパク質との関連について解析した。chorein はミトコンドリア障害や飢餓による細胞死を抑制することが示唆された。脱共役剤添加によるミトコンドリア障害時に、chorein は myosin や β -actin と結合が強まり、ミトコンドリアに集積する。また、chorein は α -tubulin やヒストン脱アセチル化酵素 6 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に関与することが示唆された。これらの結果から chorein 機能欠損はマイトファジーを含むオートファジーの細胞内クリアランス機能の障害を引き起こし、ChAc の神経変性に関与することが示唆された。

研究分担者：佐野 輝

所属機関名：鹿児島大学大学院医歯学総合研究科社会・

行動医学講座精神機能病学

A.研究目的

有棘赤血球舞蹈病(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。これまでに我々が行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、赤血球膜分画のウェ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とミトコンドリア障害との関連が示唆されてきており、最近では常染色体劣性遺伝性若年パーキンソンニズムの責任タンパク質である parkin とミトコンドリア障害との関連が注目されている。また、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も示唆されている。我々は chorein を強制発現させた培養細胞を用いて、chorein とマイトファジーや飢餓誘発性オートファジー、相互作用タンパク質などとの関連について検討した。

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) Cell viability の解析

同細胞と Mock 細胞の培地に終濃度 5 μ M、10 μ M、20 μ M の CCCP を添加し、それぞれ添加後 1 時間、4 時間に cell viability を MTS アッセイにより解析した。また、それぞれの細胞に対して無血清培地を用いて飢餓状態とし、経時的に MTS 活性を測定し、cell viability を比較した。

2) 免疫沈降

CCCP 添加前の細胞と添加後 1 時間経過した chorein-myc-Flag 安定発現細胞を用いて Tag タンパクの myc と FLAG の両抗体を用いて chorein の免疫沈降を行った。免疫沈降後、SDS-PAGE 展開し、クマシー染色を行い、CCCP 処理前後で染色性の異なるバンドを切り出し、質量分析によりそのバンドを構成するタンパク質を同定した。また、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。

3) 免疫蛍光染色

質量分析で同定されたタンパク質について、CCCP 添加前後で chorein-myc-Flag 安定発現細胞を用いて免疫蛍光染色を行い chorein の局在との関連の有無を観察した。また、同細胞についてミトコンドリア外膜に存在する Tom20 に対する抗体を用いて免疫染色を行い、CCCP 添加前後で chorein の局在との関連の有無を観察した。

4) 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。

5) 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。

5) chorein とヒストン脱アセチル化酵素 6HDAC6 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。

6) 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)。

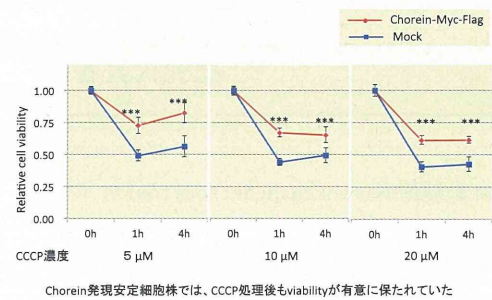
C. 研究結果

1) CCCP によるミトコンドリア障害時の cell viability

chorein 安定強発現細胞は、5 μ M, 10 μ M および 20 μ M の CCCP を添加 1 時間後、4 時間後いずれにおいても mock 細胞と比較して cell viability が有意に高かった (図 1)。

図 1

CCCP 添加後の cell viability

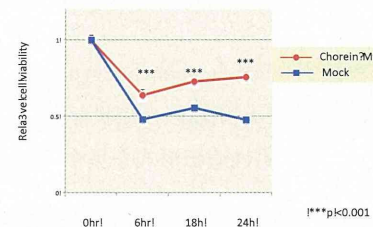


(2) 飢餓誘発時の cell viability

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 (図 2)。

図 2

飢餓状態下の cell viability



(3) CCCP 刺激後の chorein 免疫沈降と質量分析

CCCP 添加前後と添加後 1 時間に経過した chorein-myc-Flag 安定発現細胞について、抗 myc 抗体および抗 Flag 抗体を用いて chorein 免疫沈降を行った。沈降したタンパク質を SDS-PAGE 展開シクマシー染色を行ったところ、両抗体を用いた免疫沈降に共通して CCCP 添加後 1 時間の細胞に強く染まるバンドが 200kDa を超えるところと 40kDa と 50kDa の間に存在した。それぞれのバンドについて質量分析を行ったところ、200kDa を超えるバンドは non-muscle myosin heavy chain であり、40kDa と 50kDa の間のバンドが β -actin であることが同定され、それぞれについてウェスタンブロット法により確認した (図 3)。