

201324123A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

Perry(ペリー)症候群の実態、病因・病態の解明と
治療法開発研究

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者：
服部信孝

分担研究者：
坪井義夫
今居 讓
富山弘幸
波田野琢
斉木臣二

平成26(2014)年5月

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業

Perry(ペリー)症候群の実態、病因・病態の解明と
治療法開発研究

平成 25 年度総括研究報告書

研究代表者：服部信孝

分担研究者：

坪井義夫

今居 讓

富山弘幸

波田野琢

斉木臣二

平成 26(2014)年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

- Perry(ペリー)症候群の実態、病因・病態の解明と治療法開発研究…………… 1
服部信孝

II. 分担研究報告

1. Perry(ペリー)症候群の診断および治療方法の更なる推進に関する研究…………… 7
坪井義夫
2. Perry(ペリー)症候群の実態、病因・病態の解明と治療法開発研究…………… 10
今居 譲
3. Perry(ペリー)症候群の臨床遺伝学的検討および診断基準の作成について…………… 13
富山弘幸
4. ペリー症候群責任遺伝子産物によるアポトーシス制御機構…………… 17
波田野琢
5. ペリー症候群責任遺伝子産物によるオートファジー調節機構についての検討…………… 20
斉木臣二

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷…………… 31

Perry（ペリー）症候群の診断および治療方法の

更なる推進に関する研究

研究代表者：服部信孝（順天堂大学脳神経内科教授）

研究要旨

Perry 症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたす予後不良の遺伝性疾患であり，2009 年に *DCTN1* が原因遺伝子として報告されたが，更に解析が進み我が国の 5 家系を含む世界で 15 家系と極めて稀な疾患である．本疾患の分布や頻度，臨床像は明らかにされておらず，L-Dopa 反応性の症例もあり，パーキンソン病との異同が問題となる．そこで本研究は，本症候群を臨床疫学的，分子遺伝学的に明らかにし，臨床診断基準を作成することを目的とする．研究代表者の施設にはパーキンソニズムを中心とした国内外からの約 3000 例の DNA バンクが確立できており，大規模解析により変異頻度を明らかにし，早晚疫学調査に繋げ得る点で意義がある．

日本人パーキンソニズム 973 例中 5 家系 24 人と，日本にも少なからず症例が存在することが判明した．新規変異も 2 つ同定した．ハプロタイプ解析から創始者効果が存在すること，九州地方一円に多発していることを確認した．これら臨床症状を中心に Mayo clinic の Wasolek らと診断基準を論文発表する予定である．国際的な臨床診断基準を作成し，国内および国際学会やインターネットを通じて，広くこの疾患の存在を啓蒙活動していく予定である．我が国の臨床症状の解析から中枢性呼吸障害は必須であることが判明した．これまでの睡眠ポリグラフをまとめると全例に睡眠時の不規則呼吸や呼吸停止がみられ，この疾患の診断における中核的所見と考えられた．よって突然死の予防のためにも今後，早期診断と治療指針の確立の必要性があると言える．

神経病理学的特徴としては TDP-43 の蓄積を示し，*DCTN1* 変異は TDP-43 プロテイノパチーとしての筋萎縮性側索硬化症 (ALS) を引き起こすことも知られ，その機能解析は封入体形成機構を明らかに出来る可能性を秘めている．

最終年度は，モデル動物の作製も進み，病態解明にその成果が得られた．実際野生型 *dynactin* は *alpha-tubulin* と共局在し，微小管輸送に関与するが，変異型 *dynactin* の強制発現は *dynactin* 凝集物を細胞質内に形成させ，オルガネラ（特にリソソーム）の分布を変化させ，内因性経路活性化によるアポトーシス，オートファジー不全状態を誘導することがわかった．更に *DCTN1* ショウジョウバエモデルも樹立できており，ドーパミン神経特異的に *Glued* をノックダウンしたハエは睡眠覚醒リズムに異常が見られた．すなわち，夜間の活動量が増加し，睡眠量が減る傾向にあった．Perry 症候群同様多くの神経変性疾患には睡眠障害を呈しており，ショウジョウバエモデルはその解明に有効なモデルとなり得ることが明らかになった．

尚，本解析は順天堂大学倫理委員会の承認に基づき行った．

研究代表者： 服部信孝^{1),3)}

分担研究者： 坪井義夫²⁾，今居 譲³⁾，富山弘幸^{1) 3)}，波田野琢¹⁾，斉木臣二¹⁾

¹⁾順天堂大学脳神経内科，²⁾福岡大学神経内科，

³⁾順天堂大学大学院医学研究科神経変性疾患病態治療探索講座

A. 研究目的

Perry症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたす予後不良の稀な遺伝性疾患とされる。2009年坪井らのグループにより *DCTN1* が原因遺伝子として報告された (Farrer et al. Nat Genet) が，本邦5家系を含む世界で17家系のみで報告で，分布や頻度，臨床像は明らかでない。L-Dopa 反応性の症例もあり，パーキンソン病との異同が問題である。

このような背景の中，その診断基準を作成し，世界及び本邦での疾患の分布，頻度およびその実態を明らかにすることを本研究の主目的とした。

最長寿国である日本においては，高齢化社会のなか医療費公費負担も年々増加していくものと予想される。また介護保険制度改革の中，介護の人材不足とともに介護保険もますます負担が増えるものと予想され，さらにALSにおいては医療費公費負担とともに，24時間体制で介護が必要なことも多く，人工呼吸器管理患者の療養先，高額医療がますます問題となると予想される。臨床症状からは中枢性呼吸障害のため突然死などの原因になることが予想されるため早期診断の必要性がある。よって世界共通した診断基準の必要性は焦眉の急と言える。

更に本研究は難病の医療費公費負担，介護保険制度，療養型病床の利用など医療と介護の制度につき，より広く発展した形で社会的成果をもたらす，厚生労働行政の課題の解決の一助になる可能性をがある。このように本研究は，医学の向上から，間接的には行政及び国民の保健・医療・福祉の向上等社会へ貢献することを究極の目的とした。

B. 研究方法

研究目的の達成のため，約3000例のDNAバンク症例中，日本の973例に対し，*DCTN1* の変異解析を行った。正常対照の解析も行い，解析可能な家系では家系内での変異の共分離も確認し，病的変異としての意義を確認した。変異陽性家系については同意を得た上で実地診療に赴き，変異陽性患者を実際に診察の上，検査所見を検討，解析した。

その情報に基づき，臨床診断基準 (案) を世界のPerry症候群患者の担当医，世界のPerry症候群患者の研究者とともに作成した。

また，機能解析は細胞をもちいた実験で *DCTN1* の凝集の確認，凝集体の局在の確認，免疫組織化学・生化学的検討を行った。DCNT1の野生型，変異型を発現させたlineや *Drosophila* のDNCT1のオルソログである *Glued* をノックダウンした各lineの樹立を行い，睡眠のリズムの検討した。

運動神経細胞死・黒質神経細胞死の共通メカニズムを解明すべく，初年度に同定した変異型 p150glued 強制発現によって誘導されたアポトーシスの性質について分子病態を検討した。凝集体形成とアポトーシス誘導との関係を詳細に解明すべく，変異型 p150glued が十分に発現した細胞のみを評価する必要があるため，全ての実験はフローサイトメーターを用いて評価した。

(倫理面への配慮)

本課題は，個人の遺伝情報を取り扱うので，

DNA，RNA検体採取にあたっては研究対象者，研究協力者の不利益・危険性が排除されるよう十分な説明と同意を得た。各試料はランダムイズし，研究者は個人個人の特定ができないように配慮するとともに，得られた個人情報については人権擁護のため法令等を遵守のうえ厳重に管理し，漏洩等のないように十分注意して研究を遂行した。遺伝子解析については順天堂大学倫理委員会の承認に基づいた。

本研究ではモデル動物として，ハエの作製を行ったが，動物実験計画に基づき研究を進めた。動物の取り扱いについては学内倫理委員会の承認を得て，SPF内でP2レベルの安全管理のもとに実験を行い，実験が終了した動物は速やかに焼却処分し拡散の防止に努めた。

C. 研究結果

1. 新規変異，新規家系を複数同定し，世界の中で本邦での疫学を明らかにした。その中で新規家系を含み本邦家系症例の特徴は，平均発症年齢が48.5歳 (範囲：35-70歳)，平均罹病期間が5.4年 (範囲2-14年) で，孤発性パーキンソン病より若年発症で経過が速い点では変わりがなかった。治療効果はほぼ全例でみられ，早期の運動合併症が見られる症例が散見された。体重は1~2年以内に10kg以上の減少がみられる例が多く，左右対称性の筋固縮，動作緩慢，姿勢反射障害がみられた。不眠，中途覚醒は多くの頻度でみられ，精神症状としては治療による衝動性制御障害が多くみられた。検査所見では頭部MRIは前頭萎縮を示すものと正常なものがあり，脳血流SPECT検査では前頭葉における血流低下が特徴であり，レビー小体病とは異なった。肺活量，胸部CTなどの異常は見られず，睡眠ポリグラフでは検査を行った6例全例に中枢性の呼吸異常が認められた。死因は突然死あるいは呼吸不全が5例と最も多く，肺炎等の合併症や自殺でなくなる例もみられた。

世界の17家系中5家系が本研究によるものであり，本研究の国際的成果，影響力も大きなものであった。その中で新規家系を含み本邦家系症例の特徴は，平均発症年齢が48.5歳 (範囲：35-70歳)，平均罹病期間が5.4年 (範囲2-14年) で，孤発性パーキンソン病より若年発症で経過が速い点では変わらない。肺活量，胸部CTなどの異常は見られず，眠ポリグラフでは検査を行った6例全例に中枢性の呼吸異常が認められた。死因は突然死あるいは呼吸不全が5例と最も多く，肺炎等の合併症や自殺でなくなる例もみられた。

2. 国際臨床診断基準を作成，公表した。

この結果が得られたことにより，臨床像の評価に基づき，国際臨床診断基準を作成し公表することができた (国内外の7つの学会)。今後も，日本人のみならず人種を超えた多数例での臨床症状，MRI，

SPECT, MIBG心筋シンチ, 電気生理学的所見, 認知機能やうつ病スケールなどの検査所見, 経過などに基づき, 診断基準の改定を繰り返し, よりよいものにupdateしていく必要がある。

3. 細胞実験により変異型dynactin細胞質内凝集物形成からアポトーシス, 細胞死に至る機序を確認した。

以下に診断基準を示す。

主要徴候:

A). L-dopa反応性のparkinsonism (対称性の固縮, 無動など)

B). うつ, Apathy

C). 中枢性低換気

D). 体重減少

に加え,

支持項目:

a). 家族歴 (パーキンソニズム, うつ, 突然死)

b). 急激な進行

c). 50歳以前の若年発症

d). 夜間呼吸困難/無呼吸

e). 日中の過度な眠気

f). 自殺年慮, 企図

g). 自律神経障害

h). ポリソムノグラフィ: 中枢性無呼吸/低換気, stage 3/4 とREM睡眠の減少

を加え,

確定: A) の他に2つの主要症状, および2つ以上の支持項目に加え, 遺伝子診断もしくは病理診断がされていること

疑い: A) の他に2つの主要症状, および2つ以上の支持項目

可能性あり: A) の他に1つの主要症状, および3つ以上の支持項目を満たすこととしている。

ただし, Perry症候群の症例数はまだまだ少ないと言え, 今後は, 日本人のみならず人種を超えた多数例での臨床症状, MRI, SPECT, MIBG心筋シンチ, 電気生理学的所見, 認知機能やうつ病スケールなどの検査所見, 経過などに基づき, 診断基準の改定を繰り返し, よりよいものにupdateしていく必要がある。尚, PSGに関しては, 検査そのものが一泊する必要があるためQuestionnaireで対応できるようPostumaらの論文によりスクリーニングする予定である。

3. 機能解析研究では運動神経細胞死・黒質神経細胞死の共通メカニズムを解明すべく, 病因変異を持ったdynactinの強制発現による細胞死への影響が検討できた。変異型dynactin細胞質内凝集物を形成した細胞では細胞死が有意に高頻度で惹起されており, cleaved caspase3陽性, 核濃縮・核断片化が進行しており, アポトーシスが誘導されていると考えられた。同アポトーシスはcaspase阻害薬にて抑制された。以上の結果より細胞質内凝集物が, 細胞死に対して重要な役割を果たすことが示唆され, 誘導される細胞死はアポトーシスであることから, アポトーシス阻害 (caspase-9, caspase-3のノックダウン, 抗アポトーシス剤の添加) などが有力な細胞死抑制手段として候補に挙がると考えられた。

4. ショウジョウバエモデル動物を作製し, 解析を

行った。Perry症候群の変異型や野生型, 或いはショウジョウバエのオルソログであるGluedをノックダウンさせ睡眠のリズムを検討し, 睡眠覚醒リズムに異常が存在することが判明した。

総じて研究結果は研究計画に沿って予定通り出てきたといえる。

ただし診療指針の作製, 治療法開発に至るまでの成果は本研究期間では達成できなかったため, 今後解決されるべき大きな課題として残った。

D. 考察

日本人973例の解析で, 本邦に少なくとも5家系24人の患者の存在が確認され, 地域特異性, 創始者効果の有無, 有病率, 分布など疫学調査を進めることができたことは, これまで世界で他に12家系だったことを考えると大きな進歩である。新規変異も2家系で同定できていることは, 変異例ごとの臨床像の違いを検討しつつ, 機能解析へ応用することにおいても重要な意義をもたらしている。得られた結果をもとに日本人での臨床症状, MRI, SPECT, MIBG心筋シンチ, 電気生理学的所見, 認知機能やうつ病スケールなどの検査所見, 経過など臨床像の評価も進んできており, その知見に基づき, 臨床診断基準を作成することができてきている。2010年, 分担者の坪井らは起立性低血圧, 自律神経機能異常を呈し, MIBG心筋シンチの取り込み低下をきたす症例が存在したことをParkinsonism Relat Disor誌に報告したが, Perry症候群とPDとの類似点がさらに示された。このように当初の計画通りに順調に研究は進み, 実績が残せてきている一方, PDとの異同, 鑑別がますます重要になり, 今後の研究の重要性が増してきている。これまでMIBG心筋シンチでの心筋への取り込み低下の結果は, synucleinopathyのスペクトラムとしてLewy小体, α -synucleinの蓄積の広がりやを反映しているとも考えられてきているが, 本疾患の病理像としてはTDP-43プロテインオパチーを呈しており両蛋白凝集機構のメカニズムの類似点を示していると推定される。更に, 症例を獲得出来るようであれば, 臨床病理学的診断基準も付帯することも重要事項と考えられる。研究代表者のグループの施設では海外からの症例も豊富であるため, 日本人以外の症例の解析を進め, 全世界的規模でPerry症候群の実態を明らかにしていく予定である。

平成23年度2月22-23日東京において国際シンポジウムInternational Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome in Tokyoでの診断基準作成のための国際会議を開催し, 本邦を含めた国際的な診断基準を作成し, 論文, 日本神経学会, ホームページなどを通じて広く発表していくことができた。この国際会議では, Perry症候群の最初の変異家系群を発表したMayo Clinicのグループをはじめとした世界の最先端の研究者や臨床家が来日し, ALS/Motor Neuron DiseaseとPerry症候群に共通な分子メカニズムであるTDP-43プロテインオパチーの最先端の研究者とともに, 遺伝子, 分子レベルの発症機序の解明から, 本邦発のiPSを用いた治療の開発戦略にまで焦点をあてて議論し, 本研究の成果を確認するとともに, 今後の方向性を協議することができた。このことは研究計画以上に

本研究が進んだことを示している。今後も世界最先端の連携体制の中で情報交換を続けながら、Perry症候群、ALS/Motor Neuron DiseaseそしてPD、パーキンソン症候群といった神経変性疾患に対しての広い視点で、研究を進めていく体制をさらに確立していくことは大変重要なことと考えられた。

国際臨床診断基準については、国際学会を含む7つの学会、会議で発表した。今後も講演、学会誌上、インターネットなどを通じ広く公表を続けていく予定である。

機能解析において、これまでの培養細胞の実験では、Perry症候群の変異をもつp150蛋白はtubulinとの親和性がより低下することが判明しており、これら変異をもつ動物モデルの作製は病態の解明に必須である。これらの作製は容易であり、また中枢神経に病変を持つモデル動物が生まれる可能性も高いと思われ、今後の研究の成果が期待される。野生型・変異型DCTN1をショウジョウバエに発現させ、すでに各lineの樹立を完了したことは、本研究において同モデルの行動学的解析（主にclimbing testなどの運動機能）、睡眠覚醒リズムおよび形態的異常・病理学的異常の詳細な検討をし、一部結果が得られており、モデル動物を用いたDCTN1の機能解析として極めて重要な結果をもたらすものと考えられ、各種運動機能評価や免疫組織化学による凝集体の形成やドパミン細胞死の有無の検討、さらにはp150と相互作用する蛋白質の網羅的な解析等を行っている。PDにしてもよいモデルマウスが存在しない現在、Perry症候群の変異を持つTgマウス・ショウジョウバエは本疾患に限らず広く神経変性疾患の凝集体形成やドパミン神経細胞死の病態解析に有益となると予測される。同モデルの行動学的解析（主にclimbing testなどの運動機能）および形態的異常・病理学的異常の詳細な検討を継続していくことが必要であり、その結果が期待された。更に我々のグループによりドパミン放出機構をlive imagingする技術を確立出来ており、様々な遺伝性PDのドパミン放出機構をショウジョウバエで明らかに出来るものと考えている。

また、それらの知見の臨床応用から、診療指針の確立、国内さらには世界の患者の福利に役立てていくことを目指して研究を継続できた。このように医療費、制度等に関し、厚生労働行政の課題の解決の一助になる可能性をも広げてきており、遺伝診療、遺伝カウンセリング、病名告知、人工呼吸器装着から入院・介護など診療指針の検討・策定による行政政策への提言を可能なものとしてきている。

E. 結論

DCTN1変異例はPDとの異同が問題になる臨床症候を呈するとともに、TDP-43プロテインパチーとしての筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こすことも知られ、動物モデルを含むDCTN1の機能解析は封入体形成機構、神経変性機構を明らかに出来る可能性を秘めている。本研究は、特殊と考えられている疾患の研究から広く主要な神経変性疾患の根本的病態解明に繋げることを究極の目標として独創的で意義深い成果を生むことができた。

本研究から得られた多くのデータに基づき、今後も遺伝子解析による診断のみならず蛋白機能解析、免疫組織学的解析も並行し、分子遺伝学の知見、病

理的知見も反映したより集学的に完成された形での国際臨床診断基準、さらには診療指針の確立を目指すとともに、難治性疾患、神経変性疾患の病態解明、克服にむけて研究がさらに推進されることが期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Hattori N, Imai Y: PINK1-mediated phosphorylation of Parkin boosts Parkin activity in *Drosophila*. *PLoS Genet.* in press.
- 2) Ishikawa K, Saiki S, Furuya N, Yamada D, Imamichi Y, Li Y, Kawajiri S, Sasaki H, Koike M, Tsuboi Y, Hattori N. p150^{glued}-associated disorders are caused by activation of intrinsic apoptotic pathway. *PLOS ONE* 9:e94645, 2014
- 3) Li Y, Sekine T, Funayama M, Li L, Yoshino H, Nishioka K, Tomiyama H, Hattori N. Clinicogenetic study of GBA mutations in patients with familial Parkinson disease. *Neurobiol Aging* 2014;35:935.e3-8.
- 4) Furuya N, Ikeda SI, Sato S, Soma S, Ezaki J, Trejo JA, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy*. 2014 Jan 21;10(4). [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24451648.
- 5) Matsui H, Sato F, Sato S, Koike M, Taruno Y, Saiki S, Funayama M, Ito H, Taniguchi Y, Uemura N, Toyoda A, Sakaki Y, Takeda S, Uchiyama Y, Hattori N, Takahashi R. ATP13A2 deficiency induces a decrease in cathepsin D activity, fingerprint-like inclusion body formation, and selective degeneration of dopaminergic neurons. *FEBS Lett.* 2013 May 2;587(9):1316-25.
- 6) Ogaki K, Li Y, Takanashi M, Ishikawa K, Kobayashi T, Nonaka T, Hasegawa M, Kishi M, Yoshino H, Funayama M, Tsukamoto T, Shioya K, Yokochi M, Imai H, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Motoi Y, Tomiyama H, Hattori N. Analyses of the MAPT, PGRN, and C9orf72 mutations in Japanese patients with FTL, PSP, and CBS. *Parkinsonism Relat Disord.* 2013 ;19:15-20
- 7) Yoritaka A, Shimo Y, Takanashi M, Fukae J, Hatano T, Nakahara T, Miyamoto N, Urabe T, Mori H, Hattori N. Motor and non-motor symptoms of 1453 patients with Parkinson's disease: prevalence and risks. *Parkinsonism Relat Disord.* 2013 Aug;19(8):725-31.

2.学会発表

- 1) Hattori N. Impaired Mitochondrial Dynamics and Function in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. International Symposium on Mitochondria 2013. 2013. 11. 7. Tokyo.
- 2) Umezaki Y, Yoshii T, Helfrich-Förster C, Tomioka K, Hattori N., Imai Y: Analysis of rest-activity rhythms of aged flies and Parkinson's disease model. Neuro2013. Kyoto, 22 Jun. 2013
- 3) 梅崎勇次郎、吉井大志、今居 譲、Charlotte Helfrich-Förster、富岡憲治、服部信孝: パーキンソン病モデルショウジョウバエの睡眠覚醒リズム異常の検討. 第54回日本神経学会学術大会ポスター 東京、2013年5月29日
- 4) 吉野浩代、富山弘幸、今道洋子、李元哲、大垣光太郎、安藤真矢、船山学、水野美邦、服部信孝. 日本人パーキンソン病における網羅的遺伝子解析. 第54回日本神経学会学術大会、2013年5月31日、東京.
- 5) 大垣光太郎、李元哲、熱田直樹、富山弘幸、船山学、渡邊はづき、中村亮一、吉野英夫、谷藤誠司、田村麻子、内藤寛、谷口彰、藤田浩司、和泉唯信、梶龍兒、祖父江元、服部信孝、JaCALS. Analysis of C9orf72 repeat expansion in Japanese patients with ALS. 第54回日本神経学会学術大会、2013年5月31日、東京.
- 6) 船山学、安藤真矢、李元哲、柏原健一、村上善勇、石津暢隆、豊田千純子、野口克彦、橋本貴司、中野直樹、佐々木良元、小久保康昌、葛原茂樹、大垣光太郎、山下力、吉野浩代、波田野琢、富山弘幸、服部信孝. 日本人パーキンソン病における VPS35 D620N 変異の同定. 第54回日本神経学会学術大会、2013年5月31日、東京.
- 7) 服部信孝. CN1-2 パーキンソン病の動物モデルは有用か・No, Controversy, 第7回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres、2013年10月10日~12日、京王プラザホテル、東京

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：特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
（分担）研究報告書

Perry（ペリー）症候群の診断および治療方法の更なる推進に関する研究

分担研究者：坪井 義夫 福岡大学医学部神経内科学・教授

研究要旨

家族性パーキンソン病である Perry 症候群は稀な疾患であるが、その原因として DCTN1 遺伝子内に変異が発見された。この疾患は臨床的にはパーキンソンニズム、うつ、体重減少を認め、中枢性呼吸不全により死亡する予後不良の疾患である。病理学的に ALS あるいは前頭側頭型認知症にみられる TDP-43 蛋白の細胞質内封入体がみられ、Lewy 小体パーキンソン病とは異なる病態が考えられている。2009 年の遺伝子変異発見以降に、新たな Perry 症候群家系の報告が多くなり、現在までに本邦の 5 家系を含む、17 家系が確認された。新規家系である OMT 家系はこれまでの家系に比べ、進行が緩徐で病初期は孤発性パーキンソン病に類似していた。しかし、例外なく中枢性呼吸障害は必発であり、これまでの睡眠ポリグラフをまとめると全例に睡眠時の不規則呼吸や呼吸停止がみられ、この疾患の診断における中核的所見と考えられた。今後早期診断と治療指針の確立を目指したい。

A. 研究目的

1975年に初めて報告された Perry 症候群は、パーキンソンニズム、うつ、体重減少、中枢性低換気をきたし、進行の速い予後不良の疾患である。常染色体優性遺伝形式をとり、2002年になり本邦にもその疾患の存在が明らかにされた(1)。2009年にこの家系を含む8家系の Perry 症候群家系発症者から DCTN1 遺伝子変異が発見された(2)、病理学的に Lewy 小体は認めず、TDP-43 蛋白細胞質内封入体が認められ(3)、臨床、病理そして遺伝学的にも独立した疾患であることが判明した。

DCTN1 遺伝子変異の発見以降、新規家系の報告が相次ぎ、本邦で FUK-1 以外にも 4 家系が発見され、これらを含み 17 家系の存在が明らかになっている。この研究の目的は、Perry 症候群の疫学を明らかにするために、本疾患の臨床診断基準の作成を行い、さらにこの疾患の発見と家系の分布、頻度

を明らかにすることである。

B. 研究方法

全 Perry 症候群 17 家系の臨床症状、検査所見、病理所見の情報を収集し、同疾患の疫学の確立及び、臨床症状、画像、生理検査、経過をから感度、特異度の高い診断基準の作成し、さらに標準的治療指針を確立することを目的とする。

（倫理面の配慮）

本研究の対象患者および患者家族に対して十分に説明を行い、理解を得た上で同意された患者にのみ本治療研究は実施された。本治療研究に対して同意を得る場合は人権保護の立場から慎重に検討し、安全の確保に充分配慮し、対象患者のプライバシー保護には十全の配慮を行われた。同意が得られない場合でも何ら差別なく疾患に対して必要な治療を行うことを原則とし、患者の個人情報については慎重に対応した。

C. 研究結果

疫学的には本邦の Perry 症候群家系は 5 家系 (FUK-1、FUK-4、OMT、MZK+北海道家系) 存在することが明らかになった。また報告例および学会報告等の情報より全部で 17 家系の存在が確認されて、今後もその認知により報告が増加することが予測される (表)。

その中で新規家系を含み本邦家系症例の特徴は、平均発症年齢が 48.5 歳 (範囲:35-70 歳)、平均罹病期間が 5.4 年 (範囲 2-14 年) で、孤発性パーキンソン病より若年発症で経過が速い点では変わりがない。治療効果はほぼ全例でみられ、早期の運動合併症が見られる症例が散見された。体重は 1~2 年以内に 10kg 以上の減少がみられる例が多く、左右対称性の筋固縮、動作緩慢、姿勢反射障害がみられた。不眠、中途覚醒は多くの頻度でみられ、精神症状としては衝動性制御障害が多くみられた。検査所見では頭部 MRI は前頭萎縮を示すものと正常なものがあり、脳血流 SPECT 検査では前頭葉における血流低下が特徴であった。肺活量、胸部 CT などの異常は見られず、眠ポリグラフでは検査を行った 6 例全例に中枢性の呼吸異常が認められた。死因は突然死あるいは呼吸不全が 5 例と最も多く、肺炎等の合併症や自殺でなくなる例もみられた。

1. Tsuboi et al. Neurology 2002
2. Farrer et al. Nat Genet 2009
3. Wider C, et al. Parkinsonism Relat Disord. 2009

D. 考察

Perry 症候群はまれな疾患であるが、臨床的に興味深い症候を呈する。さらに DCTN1 遺伝子変異の発見は、パーキンソン病における神経変性の選択性、特に黒質に強い障害をもたらす機序を解明するための新たな分子の関与を示唆した。脳病理において Lewy 小体の存在が認められず、TDP-43 病

理を認める点は他の TDP-43 プロテインopathy である FTL-D-U や ALS などの変性疾患と病態を共有する可能性を示唆している。今後さらに Perry 症候群の診断基準が固まりその論文化により、この疾患の認知を高め新たな家系の発掘していくことと、基礎研究との橋渡しの中からパーキンソン病の病態解明および治療法の確立を目指す方向性が次の段階として必要である。

E. 結論

Perry 症候群の疾患概念が固まり、その臨床像、検査所見、病理所見、そして遺伝子変異の全体像が確立し、“Perry 病”の概念を提唱する。

F. 研究発表

論文発表

1. Perry 症候群 / 【神経症候群(第 2 版)-その他の神経疾患を含めて-】変性疾患/ 坪井義夫 日本臨床 別冊神経症候群 II 124-128
2. 【遺伝子・再生医療研究から学ぶパーキンソン病】 その他の遺伝子研究 DCTN1/Perry 症候群 / 坪井義夫, 三嶋崇靖. 医学のあゆみ 2013; 247: 1092-1096
3. Perry 症候群の臨床遺伝学的検討及び診断基準の作成について / 坪井義夫 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 Perry 症候群の診断および治療方法のさらなる推進に関する研究 平成23年度~24年度総合研究報告書 pp 5-6.
4. Perry 症候群の臨床遺伝学的検討及び診断基準の作成について / 坪井義夫 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 Perry 症候群の診断および治療方法のさらなる推進に関する研究 平成24年度総括研究報告書 pp 6-7.
5. p150glued-Associated Disorders Are Caused by Activation of Intrinsic Apoptotic Pathway. / Ishikawa K, Saiki S, Furuya N, Yamada D, Imamichi Y, Li Y, Kawajiri

S,Sasaki H, Koike M, **Tsuboi Y**, Hattori N.
 PLoS One. 2014 Apr 10;9(4):e94645.

Mishima T, Oka T, Hara H, Fukae J, Farrer
 MJ.Mov Disord. 2014

6. A Novel DCTN1 mutation with
 late-onset parkinsonism and frontotemporal
 atrophy. / Araki E, **Tsuboi Y**, Daechsel J,
 Milnerwood A, Vilarino-Guell C, Fujii N,

表. Perry 症候群家系: 2009 年の DCTN1 遺伝子変異発見以降、報告が増えている

Authors	year	country	DCTN1 mutations
Perry et al.	1975	Canada	G71R (c.211G>A)
Purdy et al.	1979	Canada	Unknown
Roy et al.	1988	USA	T72P (c.214A>C)
Lechevalier et al.	1992	France	G71E (c.212G>A)
Bhatia et al.	1993	UK	G71A (c.212G>C)
Elibol et al.	2002	Turkey	G71R (c.211G>A)
Tsuboi et al.	2002	Japan (Fukuoka)	G71A (c.212G>C)
Farrer et al.	2009	USA (Hawaii)	G71A (c.212G>C)
Ohshima	2010	Japan (Fukuoka)	Q74P (c.221A>C)
Newsway et al.	2010	UK	G71R (c.211G>A)
Aji et al.	2013	UK	G67D (c.200G>A)
Araki et al.	2014	Japan (Fukuoka)	F52L (c.156T>G)
Caroppo et al.	2014	France	G71E (c.212G>A)

以上の 13 家系に論文化されていない日本の 2 家系（宮崎、北海道）および米国、コロンビア、ニュージーランドに家系が存在する(personal communication)

Perry（ペリー）症候群の実態、病因・病態の解明と治療法開発研究

研究分担者 今居 謙

順天堂大学大学院医学研究科神経変性疾患病態治療探索講座 先任准教授

研究要旨

モデル動物を用いて DCTN1 の疾患型変異による神経変性病態機序の解明を行うことを目的とする。DCTN1 は逆行性微小管輸送を制御するダイニンモーター複合体の一つであるが、Perry 症候群の変異により微小管との結合能が失われる。すなわち、逆行性微小管輸送の機能異常が、本疾患の病態の原因となると考えられる。ショウジョウバエモデルによる本疾患の病態の再現と、病態の緩和を目的とした遺伝子操作を試み、神経機能への影響を行動解析と組織化学的解析により検討した。

A. 研究目的

これまでにドーパミン神経特異的に Perry 症候群の病因変異体 DCTN1 を発現するトランスジェニックショウジョウバエおよび DCTN1 のノックダウンハエを作製し、活動リズムの異常、入眠障害を検出していた。この観察は、DCTN1 の病因変異体がドーパミン神経機能に影響を及ぼすことにより生じると考えられた。

病因変異体 DCTN1 が神経機能に及ぼす影響を行動レベル、分子レベルで明らかにするために、睡眠覚醒リズムの測定、幼虫運動神経の神経軸索および神経筋接合部位を用いての神経終末の形態変化、オルガネラ、神経分泌顆粒の分布の変化を明らかにすることを目的とした。

さらに TDP-43 の蓄積が神経変性の本態であるかどうかを遺伝学的に解明することを目指した。

B. 研究方法

ヒトおよびハエ DCTN1 の野生型および病因変異体のトランスジェニックショウジョウバエを作製した。ヒト DCTN1 がハエで生理的に機能するかどうかは、DCTN1 のノックアウトハエにヒト DCTN1 を導入し、その致死表現型を抑制するかどうかで評価した。

ショウジョウバエの活動リズムは、Drosophila activity monitoring system を用いて、3 日分の平均値として計測した。

ショウジョウバエ三齢幼虫の神経筋接合部位の免疫組織学的解析により、病因変異発現ハエのミトコンドリア、エンドソーム、リソソームの局在変化の有無を観察した。

C. 研究結果

ハエに導入したヒト DCTN1 は、DCTN1 ノックアウトハエの致死性を抑圧できなかったことから、生理的に機能しない可能性が考えられた。そこで、以降はハエの DCTN1 オルソログ Glued とその病因変異体を用いて病態機序の解明を行った。

DCTN1 の病的変異により DCTN1 の微小管結合能が喪失するため、本疾患はハプロ不全に起因する可能性が考えられ、ノックダウンショウジョウバエの解析も同時に進めた。その結果、ドーパミン神経特異的に Glued をノックダウンしたハエは睡眠覚醒リズムに異常が見られた。すなわち、夜間の活動量が増加し、睡眠量が減る傾向にあった（図 1）。ハエ TDP-43 ホモログ TBPH をドーパミン神経特異的にノックダウンしたハエにおいても日中の活動量が増加した（図 2）。また、ドーパミン神経特異的に DCTN1 の野生型、Perry 型変異（G50R）、MND 型変異（G38S）を発現したハエにおいても、日中の活動量が増加した（図 2）。TBPH のドーパミン神経特異的な強制発現は致死となった。

Glued Perry 型変異体、野生型 TBPH を強制発現した神経筋接合部位において、神経終末の肥大・ボタンの数の増加、ミトコンドリア分布の異常を認めた（図 3）。これは、正常な神経軸索輸送が阻害されたためと考えられ、正常な神経伝達が行われていない可能性が組織学的にも明らかとなった。また、Glued G50R が内在性の Glued を阻害するドミナントネガティブ変異体としても、病態機序に関与する可能性が示唆された。

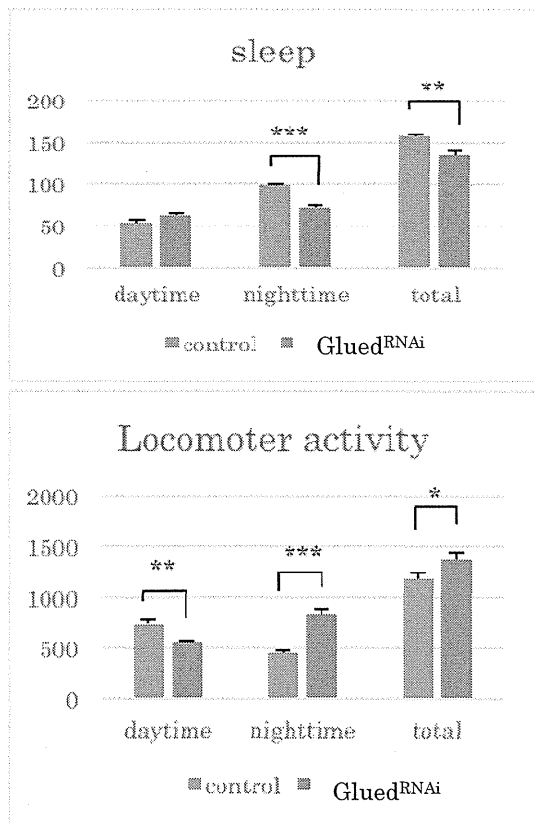


図1. DCTN1のハエホモログであるGluedのドーパミン神経特異的なノックダウンは、睡眠の低下および活動量の増加を導く。上段：5分以上活動がない状態を睡眠と定義しその総時間を縦軸として示す。下段：測定容器内の赤外線を横切る回数を活動量とし、縦軸に示す。***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

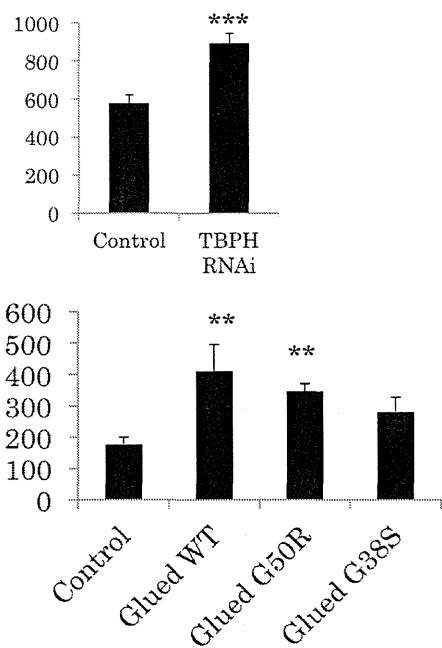


図2. ハエTDP-43ホモログTBPHノックダウンおよび野生型および疾患型Gluedのドーパミン神経特

異的な発現による明期の活動量の変化
測定容器内の赤外線を横切る回数を活動量とし、縦軸に示す。***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$ vs. Control.

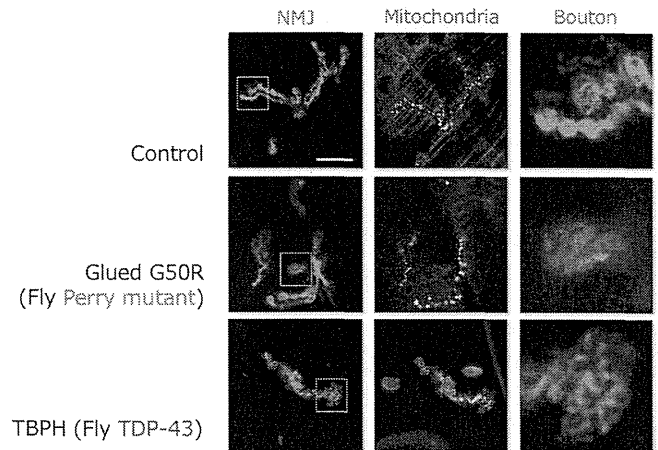


図3. 神経筋接合部位 (NMJ) における神経終末ボタンの形態とミトコンドリアの分布
ハエDCTN1病因変異体 (Glued G50R) およびハエTDP-43 (TBPH) の強制発現により、ボタンの肥大 (Glued G50R) およびボタンの異常増殖 (TBPH) が観察された。ボタンの形態異常とともにミトコンドリアの分布異常も観察された。

(倫理面への配慮)

本研究ではモデル動物としてハエを作製したが、動物実験計画、動物愛護上の配慮に基づき研究を進めた。動物の取り扱いについては学内倫理委員会の承認を得て、P1Aレベルの安全管理のもとに実験を行い、実験が終了した動物は速やかにオートクレープ処分し拡散の防止に努めた。

D. 考察

ショウジョウバエモデルを解析することにより、培養細胞だけでは明らかにすることが困難であった、行動解析、神経組織学的、遺伝学的解析が可能となった。DCTN1 病因変異体を導入した培養細胞の結果から、神経軸索輸送の障害は、ミトコンドリアのみならずリソソーム、後期エンドソームの分布異常とオートファジー不全を引き起こす可能性が考えられる。現在、この可能性を検討するためにリソソーム、後期エンドソームの分布とオートファジー異常、TDP-43の蓄積との関係性に関して、ショウジョウバエモデルの神経組織学的、分子遺伝学的解析を進めている。

E. 結論

ハエDCTN1病因変異体を導入したハエにより、行動異常、神経機能異常など病態を反映する表現型を観察した。ハエTDP-43オルソログは、遺伝子の発現を増大・減少、いずれの場合も神経機能に重篤な影響を及ぼすことが明らかとなった。遺伝学的にTDP-43がDCTN1と相互作用をするかどうか、相互作用する場合は遺伝学的な位置関係を明らかにする必要はある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 今居 譲. パーキンソン病up date モデルショウジョウバエを用いた遺伝性若年性パーキンソン病の研究、自律神経 50: 13-15, 2013
- 2) 澤田知世, 今居 譲, 高橋 良輔. 特集2、細胞内小器官と神経難病 -ミトコンドリア病としてのパーキンソン病, 脳21 16: 65-70, 2013
- 3) Kahori Shiba-Fukushima, Tsuyoshi Inoshita, Nobutaka Hattori, Yuzuru Imai: PINK1-mediated phosphorylation of Parkin boosts Parkin activity in *Drosophila*. *PLoS Genet.* in press.

2. 学会発表

- 1) Umezaki Y, Yoshii T, Helfrich-Förster C, Tomioka K, Hattori N, Imai Y: Analysis of rest-activity rhythms of aged flies and Parkinson's disease model. Neuro2013. Kyoto, 22nd Jun. 2013
- 2) 梅崎勇次郎、吉井大志、今居 譲、Charlotte Helfrich-Förster、富岡憲治、服部信孝: パーキンソン病モデルショウジョウバエの睡眠覚醒リズム異常の検討. 第 54 回日本神経学会学術大会 ポスター 東京、2013 年 5 月 29 日

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。

Perry（ペリー）症候群の臨床遺伝学的検討および 診断基準の作成について

研究分担者：富山弘幸

（順天堂大学脳神経内科、神経変性疾患病態治療探索講座）

研究要旨

Perry 症候群はパーキンソニズム，うつ，体重減少，低換気をきたす予後不良の遺伝性疾患であり，2009年に *DCTN1* が原因遺伝子として報告されたが，世界で9家系のみ報告と極めて稀な疾患である．本疾患の分布や頻度，臨床像は明らかにされておらず，L-Dopa 反応性の症例もあり，パーキンソン病との異同が問題となる．そこで本研究は，本症候群を臨床疫学的，分子遺伝学的に明らかにし，臨床診断基準を作成することを目的とした．研究代表者の施設にはパーキンソニズムを中心とした国内外からの3000例を超えるDNAバンクが確立できており，大規模解析により変異頻度を明らかにし，早晚疫学調査に繋げ得る点で意義があると考えられた．

これまでの研究で，日本人パーキンソニズム978例中5家系24人と，日本にも少なからず症例が存在することが判明した．新規変異も2つ同定した．本年度までに，さらに未報告の新規変異をもつ九州地方の1家系および他地域の1家系の情報を追加で得ることができたが，これまでのPerry 症候群の臨床像と若干異なる部分もあり，臨床像のまとめを行ってきている．家系は九州に集中していたが，他地域でも患者が同定され，地域性，創始者効果が存在することが確認でき，論文を修正投稿予定である．世界の研究者と共に国際会議を開催，本邦のみならず国際的な臨床診断基準を作成できてきており，これまで7つの国内外の学会，国際会議で発表したが，今後も講演，学会誌上，インターネットなどを通じ広く公表していく予定である．また，Perry 症候群の遺伝カウンセリングにも焦点を当てて学会発表を行ってきた．

Perry 症候群は，うつやL-dopaの反応性のパーキンソニズムで発症し，数年から5年前後のうちにも急激に低換気となり突然死に至る臨床経過から，その診断，治療法の確立のための研究の意義は極めて高い．これまで同定されたPerry 症候群の数十症例の検討から，30-50歳くらいの比較的若年発症で，パーキンソン病と同様の症状を呈しながら，短い経過の中で認知症も合併しにくい中，突然呼吸障害から突然死に至ることがわかったので，臨床診断基準に基づき早期診断をし，ALSと同様，病名告知をして人工呼吸管理をするか否か選択していく必要性も考慮されるべきであると考えられた．その際，遺伝カウンセリングの果たす役割が大変大きなものであり，診断および治療の選択においても大変重要であると考えられた．

Perry 症候群は低換気を呈するとともにTDP-43の蓄積を示し，その凝集蓄積機構からも新しいTDP-43プロテノパチーであるという概念が示唆されてきている．*DCTN1* 変異はパーキンソン病と似たPerry 症候群とともに，TDP-43プロテノパチーとしての筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こすことも報告されているため，その機能解析から封入体形成機構，神経変性機序を明らかに出来る可能性がある．最近，新規変異家系が同定されてきており，臨床診断基準から病理学的診断基準，さらには診療指針の策定に繋がっていくことが期待された．また，細胞実験に加えモデル動物の作製および解析もできてきており，病態解明にその成果が期待された．

以上のように本研究は，特殊と考えられている疾患の研究から広く主要な神経変性疾患の根本的病態解明に繋げることを究極の目標とする独創的で意義深いものとしていくことができてきた．また医療費，制度等に関し，厚生労働行政の課題の解決の一助になる可能性を広げることができてきた．今後も本研究で得られた成果を生かし，発展させることで，パーキンソニズム，ALS，TDP-43プロテノパチーの病態解明，治療法の開発から難治性神経変性疾患に苦しむ人々の福利に繋がることを期待される．

尚，本解析は順天堂大学倫理委員会の承認に基づき行った．

A. 研究目的

Perry症候群はパーキンソニズム、うつ、体重減少、低換気をきたす予後不良の稀な遺伝性疾患とされる。2009年TsuboiらのグループによりDCTN1が原因遺伝子として報告された(Farrer et al. Nat Genet)が、本邦2家系を含む世界で9家系のみで報告で、分布や頻度、臨床像は明らかでない。L-Dopa反応性の症例もあり、パーキンソン病(PD)との異同が問題である。DCTN1は筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子であることも報告されていた。

このような背景の中、その診断基準を作成し、世界及び本邦での疾患の分布、頻度およびその実態を明らかにすることを本研究の主目的とした。

最長寿国である日本においては、高齢化社会のなか医療費公費負担も年々増加していくものと予想される。また介護保険制度改革の中、介護の人材不足とともに介護保険もますます負担が増えるものと予想され、さらにALSにおいては医療費公費負担とともに、24時間体制で介護が必要なことも多く、人工呼吸器管理患者の療養先、高額医療がますます問題となると予想される。

そのため本研究は難病の医療費公費負担、介護保険制度、療養型病床の利用など医療と介護の制度につき、より広く発展した形で社会的成果をもたらす、厚生労働行政の課題の解決の一助になる可能性を秘めている。このように本研究は、医学の向上から、間接的には行政及び国民の保健・医療・福祉の向上等社会へ貢献することを究極の目的とした。

B. 研究方法

研究目的の達成のため、DNAバンク症例中、家族歴や臨床像を考慮し、日本の978例に対してDCTN1の変異解析を行った。正常対照の解析も行い、解析可能な家系では家系内での変異の共分離も確認し、病的変異としての意義を確認した。変異陽性家系については同意を得た上で実地診療に赴き、変異陽性患者を実際に診察の上、検査所見を検討、解析した。G71A変異についてはジェノタイプピングを行い推定ハプロタイプから創始者効果の有無を検証した。

その情報に基づき、国際臨床診断基準(案)を世界のPerry症候群患者の担当医、世界のPerry症候群患者の研究者とともに作成した。新規家系の情報も調査を行い、追加検討した。

業務は研究分担者が分担し遂行した。

(倫理面への配慮)

本研究では個人の遺伝情報を取り扱うので、DNA、RNA検体採取にあたっては研究対象者、研究協力者の不利益・危険性が排除されるよう十分な説明と同意を得た。各試料はランダムイズし、研究者は個人の特長ができないように配慮するとともに、得られた個人情報については人権擁護のため法令等を遵守のうえ厳重に管理し、漏洩等のないように十分注意して研究を遂行した。遺伝子解析については順天堂大学倫理委員会の承認に基づいた(H22.2.1承認、第21081号)。

C. 研究結果

DCTN1の直接シーケンス解析結果により日本に

少なくとも5家系24人の患者が存在することが明らかとなり、地域特異性、創始者効果の有無、有病率、分布など疫学調査を進めることができてきた。新規変異も2家系で同定できた。5家系とも九州に存在したが、G71A変異についてはジェノタイプピング、推定ハプロタイプの解析により共通祖先からの創始者効果であることが推定された。実地診療に基づく臨床dataの蓄積もできてきた。

これらの結果が得られたことにより、臨床像の評価に基づき、臨床診断基準の作成・再検討を行った。

また、今年度までに、さらに新規変異をもつ九州地方の1家系および他地域出身の1家系の情報を収集することができたが、これまでのPerry症候群の臨床像と若干異なる部分もあり、診断基準に反映していくよう、診断基準に関する論文を修正中である。

国際臨床診断基準としては、

4 主要徴候：

A). L-dopa反応性のparkinsonism (対称性の固縮、無動など)

B). うつ、Apathy

C). 中枢性低換気

D). 体重減少

に加え、

支持項目：

a). 家族歴 (パーキンソニズム、うつ、突然死)

b). 急激な進行

c). 50歳以前の若年発症

d). 夜間呼吸困難/無呼吸

e). 日中の過度な眠気

f). 自殺年慮、企図

g). 自律神経障害

h). ポリソムノグラフィ:中枢性無呼吸/低換気、

stage 3/4 とREM睡眠の減少

を加え、

確実： A) の他に2つの主要症状、および2つ以上の支持項目に加え、遺伝子診断もしくは病理診断がされていること

疑い： A) の他に2つの主要症状、および2つ以上の支持項目

可能性あり： A) の他に1つの主要症状、および3つ以上の支持項目

を満たすこととしている。

ただし、Perry症候群の症例数はまだまだ少ないと言え、今後は、日本人のみならず人種を超えた多数例での臨床症状、MRI、SPECT、MIBG心筋シンチ、電気生理学的所見、認知機能やうつ病スケールなどの検査所見、経過などに基づき、診断基準の改定を繰り返し、よりよいものにupdateしていく必要がある。

D. 考察

これまでの日本人978例の解析で、本邦に少なくとも5家系24人の患者の存在が確認され、地域特異性、創始者効果の存在、有病率、分布など疫学調査を進めることができてきていることは、これまで世界で他に7家系だったことを考えると大きな進歩である。G71A変異については、これまでハワイの日系人からも同定されているが、おそらく同じ創始者効果である可能性が考えられる。新規変異も2家系

で同定できていることは、変異例ごとの臨床像の違いを検討しつつ、機能解析へ応用することにおいても重要な意義をもたらしている。得られたdataをもとに日本人での臨床症状、MRI、SPECT、MIBG心筋シンチグラフィ、電気生理学的所見、認知機能やうつ病スケールなどの検査所見、経過など臨床像の評価も進んできており、その知見に基づき、臨床診断基準を作成することができてきている。2010年、Tsuboiらは起立性低血圧、自律神経機能異常を呈し、MIBG心筋シンチの取り込み低下をきたす症例が存在したことをParkinsonism Relat Disord誌に初めて報告したが、この知見によりPerry症候群とPDとの類似点がさらに示された。このように当初の計画通りに順調に研究は進み、実績が残せてきている一方、PDとの異同、鑑別がますます重要になり、今後の研究の重要性が増してきている。これまでMIBG心筋シンチでの心筋への取り込み低下の結果は、synucleinopathyのスペクトラムとしてLewy小体、 α -synucleinの蓄積の広がりやを反映しているとも考えられてきたため、本年度以降、病理像も得られるようであれば、臨床病理学的診断基準も付帯することも重要事項と考えられる。研究代表者のグループの施設では海外からの症例も豊富であるため、日本人以外の症例の解析を進め、全世界的規模でPerry症候群の実態を明らかにしていく予定である。同時に、その臨床的特徴や診断基準に沿って全国の医療機関にどれだけ患者が存在しているのか関連施設の実地調査が可能になることが望ましい。

当初の研究計画が順調に進み、平成23年度2月22・23日東京において開催されたInternational Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome in Tokyoでの診断基準作成のための国際会議を通じ、国際診断基準を作成し、国内外の学会などを通じて発表することができた。今年中には論文を通じて発表の予定である。この国際会議では、一緒にNature Genet誌にPerry症候群の最初の変異家系群を発表したMayo Clinicのグループをはじめとした世界の最先端の研究者や臨床家が来日し、ALS/Motor Neuron DiseaseとPerry症候群に共通な分子メカニズムであるTDP-43プロテノパチーの最先端の研究者とともに、遺伝子、分子レベルの発症機序の解明から、本邦発のiPSを用いた治療の開発戦略にまで焦点をあてて議論し、本研究の成果を確認するとともに、今後の方向性を協議することができた。今後も世界最先端の連携体制の中で情報交換を続けながら、Perry症候群、ALS/Motor Neuron DiseaseそしてPD、パーキンソン症候群といった神経変性疾患に対しての広い視点で研究を進めていく体制をさらに確立することは大変重要なことと考えられた。

Perry症候群は、うつやL-dopaの反応性のパーキンソニズムで発症し、数年から5年くらいのうちにも急激に低換気となり突然死に至る臨床経過から、その診断、治療法の確立のための研究の意義は極めて高い。これまで同定されたPerry症候群の数十症例の検討から、30-50歳くらいの比較的若年発症で、PDと同様の症状を呈しながら、短い経過の中で認知症も合併しにくい中、突然呼吸障害から突然死に至ることがわかったので、早期診断し、ALSと同様、病名告知をして人工呼吸管理をするか否か選択していく必要性も考慮されるべきであると考えられた。その際、遺伝カウンセリングの果たす役割が大

変大きなものであり、診断および治療の選択においても大変重要であると考えられた。

Perry症候群は低換気を呈するとともにTDP-43の蓄積を示し、その凝集蓄積機構からも新しいTDP-43プロテノパチーであるという概念が示唆されてきている。DCTN1変異はPDと似たPerry症候群とともに、TDP-43プロテノパチーとしての筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こすことも報告されている。したがってその機能解析は広く封入体形成機構、神経変性機序を明らかに出来る可能性を秘めている。実際、本研究グループでハエの動物モデルの作製・評価ができており、興味深い結果も出てきているため、その可能性は具体化されてきているともいえる。

E. 結論

DCTN1変異例はパーキンソン病との異同が問題になる臨床症候を呈するとともに、TDP-43プロテノパチーとしての筋萎縮性側索硬化症(ALS)を引き起こすことも知られ、動物モデルを含むDCTN1の機能解析は封入体形成機構、神経変性機構を明らかに出来る可能性を秘めている。したがって特殊と考えられている疾患の研究から広く主要な神経変性疾患の根本的病態解明に繋げることを究極の目標とする本研究は、疾患に対する臨床的、分子遺伝学的観点から独創的で意義深い成果を生むことができてきている。

これまでに本研究から得られた多くのdataに基づき、今後も遺伝子解析による診断のみならず蛋白質機能解析、免疫組織学的解析も並行し、分子遺伝学の知見、病理学的知見も反映したより集学的に完成された形での国際臨床診断基準、さらには診療指針の確立を目指すとともに、難治性疾患、神経変性疾患の病態解明、克服にむけて動物モデルも含めた研究をさらに進めていく必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

研究分担者 富山弘幸

- 1) Tomiyama H. Intronic *C9orf72* mutation expanding on neurodegenerative disorders and other diseases (Editorial). *J Neurol Disord Stroke* 2013;1:1009.
- 2) Li Y, Sekine T, Funayama M, Li L, Yoshino H, Nishioka K, Tomiyama H, Hattori N. Clinicogenetic study of GBA mutations in patients with familial Parkinson disease. *Neurobiol Aging* 2014;35:935.e3-8.
- 3) 富山弘幸. 運動ニューロン疾患の遺伝学：update 『わが国のALSにおける*C9ORF72*』 *臨床神経学* 2013;53:1074-6.
- 4) Yamashita C, Tomiyama H, Funayama M, Inamizu S, Ando M, Li Y, Yoshino H, Araki T, Ichikawa T, Ehara Y, Ishikawa K, Mizusawa H, Hattori N. The evaluation of polyglutamine repeats in autosomal dominant Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* (in

press)

5) 大垣光太郎, 富山弘幸. 『日本のALSにおけるC9ORF72遺伝子解析と現在までのC9ORF72研究』. 難病と在宅ケア 2014年5月号特集: ALSの現状 (in press)

2.学会発表

研究分担者 富山弘幸

1) Ryoichi Kurisaki, Hiroyuki Tomiyama, Tetsuro Sakamoto, Kazutoshi Uekawa, Yoshio Tsuboi. The first case report describing the moment of sudden respiratory arrest in a patient with Perry syndrome. MDPD 2013. April 2013. Seoul, Korea.

2) 富山弘幸, 大垣光太郎, 熱田直樹, 李元哲, 船山学, 渡辺はづき, 中村亮一, 吉野英夫, 谷藤誠司, 田村麻子, 内藤寛, 谷口彰, 藤田浩司, 和泉唯信, 梶龍兒, 服部信孝, 祖父江元, Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis research (JaCAL S). ALS/FTDにおけるC9orf72遺伝子診断について. 第58回日本人類遺伝学会大会. 2013年11月23日, 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: 特になし

研究要旨

本分担研究では、運動神経細胞及びドパミン神経細胞の選択的な細胞死を呈するペリー症候群の分子病態を解明するため、2種類の培養細胞ライン（HeLa 細胞、SH-SY5Y 細胞）へのペリー症候群責任遺伝子産物 p150glued の細胞死への影響を検討した。

まず、ペリー症候群責任遺伝子 p150glued をコードした野生型及び変異型プラスミド DNA（哺乳類細胞発現ベクター使用）を作製し、培養細胞に導入し、核形態およびトリパンブルー exclusion 試験により細胞死を検討し、ウェスタンブロッティングにて各種アポトーシス関連蛋白の活性化を評価した。同様の実験を p150glued siRNA ノックダウン条件下でも施行した。以上の実験から、変異型 p150glued 強制発現では、caspase-9/caspase-3 の活性化および Annexin V/propidium iodide 陽性細胞の増加を認めたことから、内因性カスケードの活性化によるアポトーシス誘導を確認した。また p150glued siRNA ノックダウンでは、caspase-8 の活性化を認め、同現象は pan caspase inhibitor である zVAD および caspase-8 inhibitor にて著明に抑制されたことから、外因性アポトーシス経路の活性化が示唆された。さらに同条件を同時に施行したところ、変異型 p150glued の単独過剰発現に比し、更なるアポトーシスの増加を認めたことから本疾患では gain-of-toxic function および loss-of-function の両者が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

p150glued の野生型、変異型遺伝子をコードするプラスミドを培養細胞に導入し、細胞死を評価することにより、ペリー症候群の病態生理を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

I. 蛍光顕微鏡観察による細胞死評価

変異型 GFP-p150glued construct を作製し、HeLa 細胞への導入を行う。細胞死は下記に示す様々な方法で行った。まず、野生型 p150glued、変異型 p150glued (G59S、G71R) を 6-well plate に播いた HeLa 細胞に、lipofectamine 2000 (1 ul/1ug plasmid DNA) を用いて遺伝子導入した。

24 時間後にトリプシン処理し、トリパンブルー染色を施行しトリパンブルー陽性細胞を細胞死陽性とカウントした。さらに GFP 陽性細胞の中で、核型の変化により細胞死を評価した。

II. フローサイトメーターによる細胞死評価

GFP でタグされた変異型 p150glued を HeLa 細胞に導入し、24 時間後に Annexin V/PI 染色を用いてアポトーシスの評価を行った。

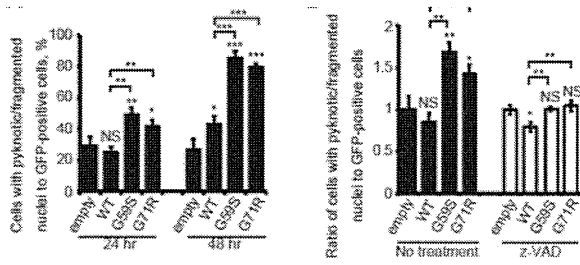
III.

(倫理面への配慮)

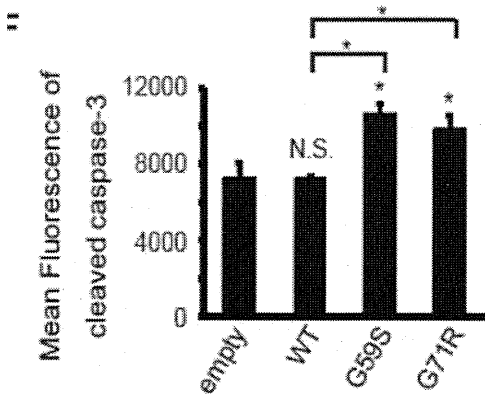
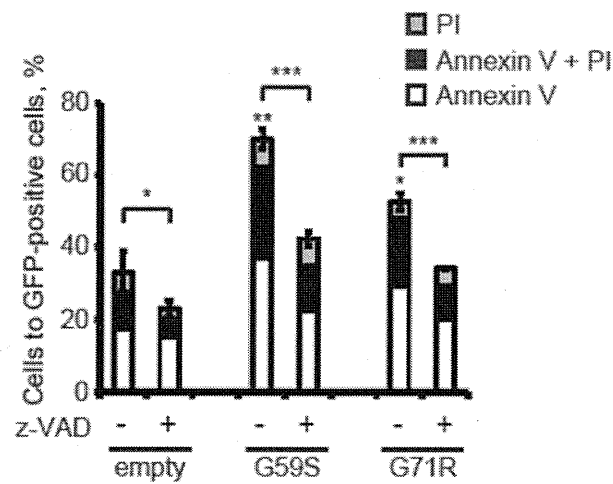
遺伝子組み換え実験については順天堂大学倫理委員会より承認を得、行った。

C. 研究結果

結果 1 :



上図 A のように変異型 p150glued 過剰発現により、24 時間後の細胞核の変形に基く細胞死の著

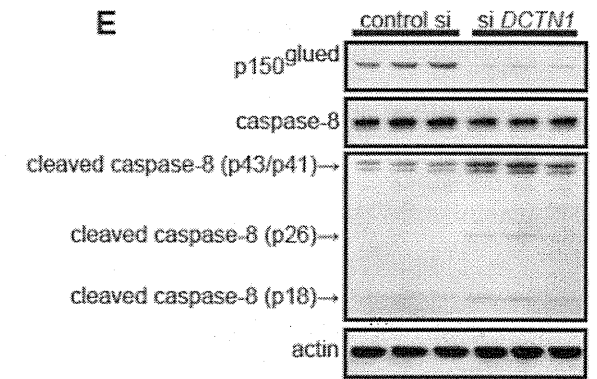
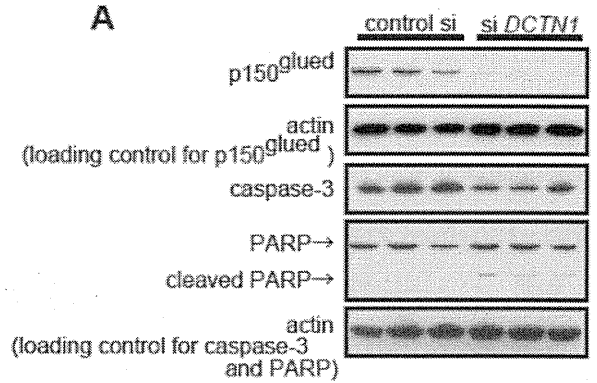


明な増加を認める。

フローサイトメーターによる評価。上図は Annexin V/PI 染色結果であり、G59S または G71R の強制発現により著明なアポトーシス陽性細胞を認めるが、zVAD 投与により有意に抑制される。さらにアポトーシスの有無を確認するため、cleaved caspase-3-Alexa594 染色を行い、GFP 陽性細胞での cleaved caspase-3 の平均蛍

光強度を測定したところ、変異型 p150glued 導入細胞にて有意な上昇を認めた。

結果 2 :



上図は p150glued siRNA ノックダウンによるアポトーシス関連蛋白の活性化を評価したもの。siDCTN1(p150glued)により有意に caspase-3 level が減少し、cleaved PARP が上昇している。さらに cleaved caspase-8 level が著明に上昇している。

結果 3 :

