

201442035A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)

ジストニアの分子病態解明と
新規治療法開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梶 龍兒

平成27(2015)年5月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患実用化研究事業

ジストニアの分子病態解明と新規治療法開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 梶 龍兒

平成27(2015)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

- ジストニアの分子病態解明と新規治療法開発 ----- 1
研究代表者 梶 龍兒 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部臨床神経科学分野)

II. 資料

(分担研究報告書)

1. ジストニアの分子病態解明と新規治療法開発に関する研究 ----- 5
研究分担者 井上 治久 (京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門)
2. セピアプテリン還元酵素ノックアウトマウスの表現型について ----- 8
研究分担者 一瀬 宏 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)
3. ジストニア患者の遺伝子検査 ----- 11
研究分担者 小幡 文弥 (北里大学医療衛生学部免疫学)
4. ジストニア update ----- 14
研究分担者 長谷川 一子 (国立病院機構相模原病院神経内科)
5. ジストニア患者の心理検査と治療介入の試みに関する研究 ----- 16
研究分担者 坂本 崇 (国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科)
6. ジストニアの外科治療の改善と新たな開発 ----- 18
研究分担者 平 孝臣 (東京女子医科大学 脳神経外科)
7. ジストニア・パーキンソニズム・症状の多様性と治療効果に関する研究 ----- 20
研究分担者 横地 房子 (都立神経病院脳神経内科)
8. Japan Dystonia Consortium の構築 ----- 22
研究分担者 瓦井 俊孝 (徳島大学病院神経内科)

(協力研究報告書)

9. 若年発症全身性捻転ジストニアにおけるゾルピデム内服治療の有効性 -----	27
宮崎 由道 (徳島大学病院神経内科)	
10. TUBB4A 遺伝子異常による全身性ジストニアの同胞例 -----	29
宮本 亮介 (徳島大学病院神経内科)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	33

研究課題：ジストニアの分子病態解明と新規治療法開発

課題番号：H25-難治一指-010

研究代表者：所属機関 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部臨床神経科学分野
氏名 梶 龍兒

1 研究目的

厚生労働省精神・神経疾患研究委託事業「ジストニアの疫学・病態・治療に関する研究」（長谷川一子班長）によりジストニアの疫学調査が施行され、1993年に比して2006年では増加している事が判明した。この先行研究によりジストニア患者の実態調査が進み、種々の病型のジストニアの診断基準が作成された。この成果を踏まえ、H26年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）「ジストニアの分子病態解明と新規治療法開発に関する研究」（研究代表者梶）ではこれまでの研究成果を踏まえ、引き続きジストニアに関してその病態解明に向けた研究を進めていくとともに、新規治療法開発に向けた研究を進めていくことを目標とした。

2 研究方法

本年度における各項目の到達目標を下記に示す。

- 1) ジストニア病態解明・治療法開発を行うために、ジストニア関連遺伝子の Knock-out (KO) マウスの作成や解析、また iPS 細胞から大脳基底核作動性 GABA 神経細胞への分化誘導技術の確立開発を目指す。
- 2) 新たに発見されたものも含め、遺伝子検査を行えるシステムを整備し、遺伝子診断に応じた遺伝子相談や治療法の開発、治療ガイドラインの作成を目指す。
- 3) 治療法確立の観点から、内科的/外科的治療についての検討やまた心理面での治療介入など、具体的な症例検討を通じて、ジストニアの臨床、研究に関する情報の交換、検討を行う。

（倫理面への配慮）課題遂行に当たっては、必要に応じて徳島大学、または研究者の所属機関に於いて、倫理委員会による審査を受審し承認を得ている。

3 研究結果

1) KO マウス、iPS 細胞

ジストニアのモデルマウスとして期待される *Spr*-KO マウスの生存期間を延長させることに成功した。成獣となった *Spr*-KO マウスには、胸椎の前屈や眼瞼下垂などいくつかの特徴的なフェノタイプが認められた。また筋電図検査にて、安静時にもリズムカルな上腕二頭筋と上腕三頭筋のほぼ同期した収縮が確認でき、これらの拮抗筋の同期した収縮は L-Dopa 投与により消失することが判明した。

iPS 細胞からの分化誘導技術の開発については、健常ヒト血球細胞より樹立した iPS 細胞から SFEBq 法による分化誘導を行い、大脳皮質神経細胞への分化誘導効率は、皮膚線維芽細胞から作製した iPS 細胞と大きな差がなく、効率良く分化が可能でことが明らかになった。

2) 遺伝子検査

学会、ホームページで不随意運動の症例に関するコンサルテーションを幅広く呼び掛け、寄せられた症例の臨床情報、ビデオファイルを検討し、phenomenology からの評価を行った。さらに表現型から推測される既知のジストニア遺伝子のシーケンス解析を行った結果、61 症例のうち 18 症例 (29.5%) においてジストニア遺伝子異常が見出された。さらに、TUBB4A 遺伝子に変異を持つジストニア兄弟例が見つかり、臨床像を再評価すると、報告されている Hypomyelination

with Atrophy of the Basal ganglia and Cerebellum (H-ABC)に一致していた。

DYT5ジストニアが疑われた患者2名について、DYT5ジストニア原因遺伝子 *GCHI* の変異解析を行った結果、1名の患者から *GCHI* の exon 1 において新規遺伝子変異 (c.T323T/C [Y109H])、残りの1名では *GCHI* の exon 5 において既報遺伝子変異 (IVS5+1g>g/c) をそれぞれ検出した。また同様に、*Sau961* を用いた PCR-RFLP 法においても、患者の *GCHI* の exon 1 に c.T323T/C [Y109H] 変異が確認された。さらに、今回検出された Y109H 変異が SNP でないことを確認するために、健常者群 98 名について *Sau961* を用いた PCR-RFLP 法による変異解析を行った。その結果、今回の新規遺伝子変異は、健常者群からは検出されなかった。DYT4 ジストニア、DYT12 ジストニアおよび DYT16 ジストニアの原因遺伝子 *TUBB4A*、*ATP1A3*、*PRKRA* について変異解析システムを構築し、遺伝性ジストニア患者 8 名について、全エクソンを標的とした変異解析を行った。その結果、*TUBB4A* と *PRKRA* では疾患特異的変異は検出されなかったが、*ATP1A3* の exon 17 において患者 1 名から既報遺伝子変異 (c.G2443G/A[E815K]) を検出した。

3) 研究会

平成 27 年 1 月 24 日に学士会館にて、ジストニアに関する研究会を開催した。疫学調査や遺伝子検査、難治性症例の検討などを含め、厚生労働省精神・神経疾患研究委託事業「ジストニアの疫学・病態・治療に関する研究」(長谷川一子班長)、厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「ジストニアの治療法の確立・治療指針策定のための調査研究」(研究代表者梶) から引き続くジストニアの臨床、研究に関する情報の交換を行った。

4 考察

1) KO マウス、iPS 細胞

KO マウス作成では、長期間生存できるドーパ反応性ジストニアモデル動物の一つである

Spr-KO マウスを作製することが出来た。今後さらに解析を行っていき、*Spr*-KO マウスにおける運動障害について解析することにより、ドーパ反応性ジストニアや、ジストニアとパーキンソニズムとの違いを解明する。これらの研究を通じて、ジストニアの新規治療法開発への応用について検討する。

iPS 細胞からの分化誘導技術の開発では、ヒト血球細胞由来 iPS 細胞から大脳皮質神経細胞への分化誘導は皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞と同様に効率よく作製が可能であることがわかった。今後は基底核 GABA 作動性神経細胞の分化について検討していく。ジストニア患者 iPS 細胞は皮膚線維芽細胞からではなく、末梢血より作製する方針で検討する。

2) 遺伝子検査

61 症例のうち 18 症例 (29.5%) においてジストニア遺伝子異常が見出された。遺伝子異常と臨床表現型は一致しており、Phenomenology の正確な判断のためにはポイントを押さえたビデオ記録が重要である。また、エクソーム解析により稀少疾患の遺伝子診断も可能であることを確認した。

本研究班における遺伝子検査では、多くの遺伝子変異を検出している現状から、今後の方針として、全てのジストニア原因遺伝子を標的とした変異解析が必要と考えられる。また本研究では、遺伝子変異が検出されていない遺伝性ジストニア患者が多数いるため、今後次世代シーケンサーを用いた新規の原因遺伝子の探索を行っていく必要がある。

5 評価

1) 達成度について

概ね目的は達成した。しかしながら、iPS 細胞の作成や KO マウス、新規遺伝子の探索については今後も更なる研究が必要である。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

基礎研究においては、ジストニアモデルマウスや iPS 細胞を作成することで、ジストニアの病態解明や新規治療法開発に向けた研究をより進めることが今後期待できる。また臨床面においては、ジストニア治療ガイドライン作成に向けて、具体的な症例を通じて、内科的/外科的治療についての検討やまた心理面での治療介入などを行うことで、ある程度の治療指針をまとめることができた。

3) 今後の展望について

基礎研究においては、ジストニア患者 iPS 細胞の分化誘導技術の確立に向けた研究を進めていきたい。また作成したジストニアモデルマウスを用いたジストニアの病態解明、新規治療法開発に向けた研究を進めていきたい。

臨床においては、今後も検討例数を増やしていくとともに、個々の症例についても検討を重ね、より詳細にジストニアの実態を解明していきたい。遺伝子検査では、引き続き研究を行い、遺伝子診断に応じた遺伝子相談や治療法の開発、治療ガイドラインの作成を目指していきたい。

4) 研究内容の効率性について

概ね効率的に研究を進めることが出来た。

6 結論

ジストニアは症状が多彩であり、診断を含めて病態が不明な点が多く、治療も困難であることが多い。基礎研究では Ko マウスや iPS 細胞などのジストニアモデルの作成やそれらを用いた病態解明、新規治療法開発に向けた研究の推進、また具体的な症例を通じた薬物・ボツリヌス・DBS などによる治療など臨床面も踏まえて、今後も研究を続けていく必要がある。

7 研究発表

1) 国内

口頭による発表	16 件
原著による発表	13 件
学会発表	

1. 今村恵子、和泉唯信、月田香代子、古谷博和、

江良沢実、中畑龍俊、梶龍兒、山中伸弥、井上治久：家族性筋萎縮性側索硬化症患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデルの作製。第 55 回日本神経学会学術大会。福岡(2014.5.22)

2. Miyamoto R. Case presentation at telemedicine (International session 10). 第 55 回日本神経学会学術大会, 博多, 2014.5.23.

3. 宮本亮介. ボツリヌス治療(臨床研究として). 日本ボツリヌス治療学会第一回学術大会, 東京,

4. 小芝泰、森實飛鳥、菊地哲広、山門穂高、陣上直人、土井大輔、西村周泰、皆川栄子、江川斉宏、井上治久、高橋淳、高橋良輔：iPS 細胞モデルによる LRRK2 I2020T 変異パーキンソン病の研究。第 55 回日本神経学会学術大会。福岡(2014.5.23)

5. 久保田光、知見聡美、本間大悟、高草木薫、一瀬宏、南部篤 (2015) セピアプテリン還元酵素を欠損したドパ反応性ジストニアモデルマウスにおける大脳基底核の異常な活動、第 38 回日本神経科学大会、平成 27 年 7 月 (神戸)

6. 長谷川一子ら：特定疾患調査表からみたハンチントン病。第 55 回日本神経学会学術総会 2014

7. 長谷川一子：ハンチントン病について。第 32 回日本神経治療学会総会 2014

8. 平 孝臣ら：ジストニアに対する DBS - 治療ターゲット再考 日本脳神経外科学会 2014 年

9. 阿部 圭市, 平 孝臣, 笹沼 仁一, 堀 智勝, 村垣 善浩, 渡邊 一夫: 経頭蓋 MR ガイド下集束超音波による本態性振戦に対する視床切除術の安全性、有効性を評価する可能性調査報告 パーキンソン病・運動障害疾患コンgresプログラム・抄録集 8 回 Page90(2014.10)

10. 平 孝臣: 職業性ジストニアの診断と治療 脳神経外科の立場から パーキンソン病・運動障害疾患コンgresプログラム・抄録集 8 回 Page45(2014.10)

11. 阿部 圭市, 平 孝臣, 河本 竹正, 笹沼 仁一, 堀 智勝, 小西 良幸, 村垣 善浩, 渡邊 一夫, 矢

崎 俊二 経頭蓋集束超音波による本態性振戦
視床切除術 神経治療学学会 31 巻 5 号
Page622 (2014.09)

12. 宮崎由道, 松井尚子, 藤田浩司, 大崎裕亮,
森敦子, 丸山恵子, 島谷佳光, 野寺裕之, 梶 龍
兒. ギラン・バレー症候群に対するIVIg 前後の
血清IgG値の変動と治療効果. 第55回日本神経
学会学術大会. 2014.5.21 福岡

13. 宮崎由道, 宮本亮介, 宮城愛, 藤田浩司, 和
泉唯信, 梶龍兒. 塩酸ドネペジルにて歩行障害
の改善を見た iNPH の一例. 第8回パーキンソ
ン病・運動障害疾患コンgres (MDSJ).
2014.10.2-4 京都

14. 宮崎由道, 瓦井俊孝, 中村和己, 大崎裕亮,
野寺裕之, 和泉唯信, 梶龍兒. 家族性脊髄小脳
変性症(SCA15)に対する反復経頭蓋磁気刺激の
治療効果. 第44回神経生理学会, 福岡,
2014.11.19-21.

2) 海外

口頭による発表 2件

原著による発表 15件

原著による発表

1. Takeuchi T, Miyamoto R, Osaki Y, Takasaki
T, Yamamoto N, Sato K, Fujita K, Izumi Y,
Kaji R. Slow Mandibulo-Faciolingual
Wiggling Tremor Associated with Japanese
Encephalitis. *Mov Disord Clin Pract.*
2014;1(4):368-370.

2. Miyamoto R, Koizumi H, Morino H,
Kawarai T, Maruyama H, Mukai Y, Miyashiro
A, Sako W, Izumi Y, Kawakami H, Kaji R.
DYT6 in Japan-genetic screening and clinical
characteristics of the patients. *Mov Disord.*
2014 Feb; 29(2):278-80

3. Miyamoto R, Morino H, Yoshizawa A,
Miyazaki Y, Maruyama H, Murakami N,
Fukada K, Izumi Y, Matsuura S, Kaji R,
Kawakami H. Exome sequencing reveals a
novel MRE11 mutation in a patient with

progressive myoclonic ataxia. *J Neurol Sci.*
2014 Feb 15;337(1-2):219-23.

4. Matsumoto H, Hashida H, Ugawa Y.
Unilateral asterixis caused by an internal
capsule lesion. *Intern Med.* 2014;53(4):341-2.

学会発表

1. Kashiwara K, Kondo T, Mizuno Y, Kikuchi S,
Kuno S, Hasegawa K et al: Official Japanese
Version of the International Parkinson and
Movement Disorder Society-Unified Parkinson's
Disease Rating Scale: Validation Against the
Original English Version. *Mov Disord* 2014

2. Miyamoto R, Sumikura H, Takeuchi T, Fujita K,
Mure H, Morigaki R, Goto S, Murayama S, Izumi Y,
Kaji R. An Autopsy Case of Predominant
Generalized Dystonia in a Patient with Cerebellar
Atrophy. The 18th International Congress of
Parkinson's Disease and Movement Disorders.
Stockholm, June 12, 2014

7 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

国際特許「乳児ボツリヌス症原因菌由来の高度
精製A型ボツリヌス毒素製剤」

国際出願番号: PCT/JP2007/070927 (平成19
年10月26日国際出願)

国際公開番号: WO 2008/050866 (平成20年
5月2日国際公開)

現在、欧州と日本で権利化済み、米国とカナダ
で審査中

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

ジストニアの分子病態解明と新規治療法開発に関する研究

研究分担者 井上 治久

（京都大学 iPS 細胞研究所 増殖分化機構研究部門 教授）

研究要旨

ジストニアは中枢神経系の障害に起因する疾患であり、一部の遺伝性ジストニアが同定されている。遺伝性ジストニアで dystonia3 (DYT3) 変異を有する患者の剖検例では、大脳基底核の GABA 作動性神経細胞が選択的に脱落する。iPS 細胞から大脳基底核 GABA 作動性神経細胞を作製することにより、病態再現及び治療薬の開発ができる可能性がある。

A.研究目的

ジストニアは中枢神経系の障害に起因し、骨格筋の持続のやや長い収縮で生じる症候で、ジストニア姿勢とジストニア運動よりなる。ジストニアにより随意運動の遂行が様々な程度に障害される。ジストニア患者より皮膚線維芽細胞を採取するのは困難が予想される。末梢血より iPS 細胞を樹立し、ジストニア病態解明・治療法開発を行うために、iPS 細胞から大脳基底核作動性 GABA 神経細胞への分化誘導技術の確立を目指す。

B.研究方法

ヒト血球細胞より樹立した iPS 細胞から大脳基底核 GABA 作動性神経の分化誘導を確立するため、第一段階として、健常人の末梢血単核球から無血清凝集浮遊培養法 (SFEB q 法) で大脳神経細胞へ分化誘導を行い、分化誘導効率を含め、皮膚線維芽細胞から作製した iPS 細胞との比較、検討を行う。

（倫理面への配慮）

患者の遺伝子情報の取り扱いに際しては、京都大学倫理審査委員会の承認を受けており、人権及び利益の保護について十分配慮した。また、組換え DNA 実験は京都大学の承認を受けた後、規定

されている封じ込め手段を行った。iPS 細胞作製については、京都大学医学部倫理委員会の承認を受けており、患者の同意・協力を得て行った。

C.研究結果

健常ヒト血球細胞より樹立した iPS 細胞から SFEB q 法による分化誘導を行い、大脳神経細胞への分化誘導効率は、皮膚線維芽細胞から作製した iPS 細胞と大きな差がないことが明らかになった。

D.考察

ジストニアは中枢神経系の障害に起因する疾患であるが、一部の遺伝性ジストニア (DYT3) 患者を除き病理学的に異常所見はないとされている。一方 DYT3 では、GABA 作動性神経細胞の中型有棘神経細胞が選択的に脱落するがその発病機序についてはよくわかっていない。ヒト血球細胞由来 iPS 細胞から大脳神経細胞への分化誘導は皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞と同様に可能であり、今後基底核 GABA 作動性神経細胞の分化について検討を行う。

E.結論

ジストニア患者 iPS 細胞は皮膚線維芽細胞からではなく、末梢血より作製する。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1. 論文発表

● Hirata N, Nakagawa M, Fujibayashi Y, Yamauchi K, Murata A, Minami I, Tomioka M, Kondo T, Kuo T-F, Endo H, Inoue H, Sato Ando S, Kawazoe Y, Aiba K, Nagata K, Kawase E, Chang Y-T, Suemori H, Eto K, Nakauchi H, Yamanaka S, Nakatsuji N, Ueda K, Uesugi M. (2014) A Chemical Probe that Labels Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports* 6(6):1165-1174.

● Kondo T, Funayama M, Tsukita K, Hotta A, Yasuda A, Nori S, Kaneko S, Nakamura M, Takahashi R, Okano H, Yamanaka S, Inoue H, (2014) Focal transplantation of human iPSC-derived glial-rich neural progenitors improves lifespan of ALS mice. *Stem Cell Reports* 3:1-8.

● Inoue H, Nagata, N, Kurokawa H, Yanamaka S. (2014) iPS cells: A game changer for future medicine. *The EMBO Journal*, 33(5):409-417.

● Inoue H. (2014) Regenerative medicine for ALS using human iPS cells. *Research Frontiers*, 4(2):30

● 近藤孝之、井上治久、高橋良輔 (2014) 大脳皮質神経細胞への分化誘導。ES・iPS細胞実験スタンダード 再生・創薬・疾患研究のプロトコールと臨床応用の必須知識 III 217-225.

● 近藤孝之、井上治久 (2014) ヒト多能性幹細胞を用いた疾患研究と創薬開発の展開。ES・iPS細胞実験スタンダード 再生・創薬・疾患研究のプロトコールと臨床応用の必須知識 V 338-344.

● 浅井将、城谷圭朗、近藤孝之、井上治久、岩田修永 (2014) アルツハイマー病における個別化医療の可能性 孤発性および家族性アルツハイマー病患者由来 iPS 細胞を用いたアルツハイマー病の病

態解析。日本薬理学雑誌 143(1),23-26.

● 江川斉宏、井上治久 (2014) iPS細胞を用いた筋萎縮性側索硬化症の病態解析。難病と在宅ケア 19(11),7-9.

● 大原亮、水野敏樹、中川正法、井上治久 (2014) 幹細胞研究と神経変性。BRAIN MEDICAL 26(3),59-66

● 佐藤裕、井上治久 (2014) iPS細胞を用いた神経疾患研究への応用と課題。日本老年医学会雑誌 老年医学の展望 51(6):504-509

2. 学会発表

● 今村恵子、和泉唯信、月田香代子、古谷博和、江良択実、中畑龍俊、梶龍兒、山中伸弥、井上治久：家族性筋萎縮性側索硬化症患者由来 iPS 細胞を用いた疾患モデルの作製。第55回日本神経学会学術大会。福岡(2014.5.22)

● 近藤孝之、舟山美里、月田香代子、堀田秋津、安田明正、海苔聡、金子慎二郎、中村雅也、高橋良輔、岡野栄之、山中伸弥、井上治久：ヒト iPS 細胞由来のアストロサイトを用いた ALS モデルマウスの脊髄移植治療。第55回日本神経学会学術大会。福岡(2014.5.22)

● 関恒慶、小林千浩、八幡直樹、浅井将、岩田修永、井上治久、戸田達史：神経系細胞分化過程の遺伝子解析によるアルツハイマー病病態制御遺伝子の検索。第55回日本神経学会学術大会。福岡(2014.5.23)

● 小芝泰、森實飛鳥、菊地哲広、山門穂高、陣上直人、土井大輔、西村周泰、皆川栄子、江川斉宏、井上治久、高橋淳、高橋良輔：iPS細胞モデルによる LRRK2 I2020T 変異パーキンソン病の研究。第55回日本神経学会学術大会。福岡(2014.5.23)

● 井上治久：患者さんの iPS 細胞を用いた難病の解明と薬の開発。高校生のための iPS 細胞講座。京都(2014.8.8)

● Kondo T, Funayama M, Tsukita K, Hotta A, Yasuda A, Nori S, Kaneko S, Nakamura M, Takahashi R, Okano H, Yamanaka S, Inoue H : Focal Transplantation of Human iPSC-Derived Glial-Rich Neural Progenitors Improves Lifespan

of ALS Mice. 第 18 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム. 大阪(2015.1.15-17)

●Morita T, Koide E, Watanabe K, Kondo T, Asai M, Shirotani K, Inoue H, Iwata N : Autophagy dysfunction in the neuronal cells derived from Alzheimer's mice improves life span. 第 18 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム. 大阪(2015.1.15-17)

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

セピアプテリン還元酵素ノックアウトマウスの表現型について

研究分担者 一瀬 宏

（東京工業大学大学院生命理工学研究科 教授）

研究要旨

ドーパ反応性ジストニアの原因遺伝子の一つは、セピアプテリン還元酵素（SPR）である。SPRは、ドーパミン生合成に必須なテトラヒドロピオプテリン（BH4）の生合成酵素である。ヒト SPR 欠損症は脳内のドーパミン欠乏ばかりでなく認知機能障害が現れる点で、BH4 生合成律速酵素である GTP シクロヒドロラーゼ I（GCH）遺伝子の変異により生じる DYT5 とは異なる。我々は *Spr-KO* マウスの遺伝的背景を変えることにより、成獣になるまで生存できる *Spr-KO* マウスの作製に成功した。このマウスは、胸椎の屈曲、眼瞼下垂などの表現型を示した。さらに、上腕二頭筋と上腕三頭筋の筋電図を記録することから、拮抗筋の同期した収縮が起きていることが判明した。この同期した収縮は L-ドーパの投与により速やかに消失した。現在、このような異常な筋収縮が生じるメカニズムを解明するために、大脳基底核の神経核で細胞外記録を行い野生型マウスと比較検討している。

A. 研究目的

ドーパ反応性ジストニアは、複数の原因遺伝子により発症することが知られている。最も頻度の多いのは、GTP シクロヒドロラーゼ I の変異によるものである。頻度の低い原因遺伝子としては、チロシン水酸化酵素とセピアプテリン還元酵素（SPR）が知られている。GTP シクロヒドロラーゼ I の変異の場合には浸透率の低い優性遺伝形式をとり、1 対の遺伝子の片側のみの遺伝子変異で発症する。それに対して、チロシン水酸化酵素と SPR 遺伝子変異の場合には劣性遺伝形式をとり、患者両親は遺伝子変異に関してヘテロである。

GTP シクロヒドロラーゼ I と SPR は、ドーパミン生合成に必須なテトラヒドロピオプテリン（BH4）の生合成遺伝子である。BH4 は、グアノシン三リン酸（GTP）から 3 段階の酵素反応により合成され、GTP シクロヒドロラーゼ I が第一段階、SPR が第 3 段階の反応を触媒する。

我々は *Spr-KO* マウスの解析をこれまで行ってきた。*Spr-KO* マウスでは前肢の震えや寡動などの運動障害が認められた。*Spr-KO* マウスで生じている運動障害の発症機序を解析するために、長期生存できる *Spr-KO* マウスを作出し、長期生存する *Spr-KO* マウスの表現型を観察し、拮抗筋である上腕二頭筋と三頭筋から筋電図を記録して解析した。

B. 研究方法

Spr-KO マウスをネンブタールまたはイソフルランによる麻酔下に、一部の皮膚を切開して上腕二頭筋および上腕三頭筋に針電極を刺入した。マウスが麻酔から覚醒後に、無拘束の状態で筋電図を計測した。

また、筋電図にドーパ投与の与える影響を解析するために、50 mg/kg の L-DOPA をマウス腹腔に投与して 10 分後における筋電図の変化を解析

した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験は、東京工業大学の動物実験に関わる倫理委員会に申請し、委員会の承認のもとに行った。

C. 研究結果

C57Black/6J の系統で作製した、*Spr*-KO マウスは生後 3 週齢前後で多くのマウスが死んでしまう。このため、運動機能異常などの詳細な解析が困難であった。*Spr*-KO マウスの生存期間を延長させるために、マウスの遺伝的背景を C57Black/6 から Balb/C 系に変えたところ、顕著に生存期間が延長し半数近くのマウスが生後 8 週齢を超えて生存させることができた。さらに、C57Black/6 と Balb/C の F1 世代のマウスを調べたところ、3 ヶ月 (12 週齢) での生存率が約 60% にまで増加し、12 ヶ月齢でも生存しているマウスを得ることができた。

成獣となった *Spr*-KO マウスには、いくつかの特徴的なフェノタイプが認められた。一つは胸椎の前屈である (図 1)。すべての成獣 *Spr*-KO マウスで認められた。また、眼瞼下垂が認められ、目がほとんど開かない状態であった。

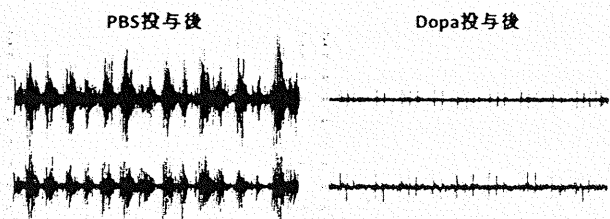


図 1. 野生型マウス (上) と *Spr*-KO マウス (下) の写真

図 1 のように *Spr*-KO マウスの身体は小さくやせこけている。解剖してみると胃の中が餌でいっぱいとなっていたが、胃内に滞留しており胃が膨れた状態となっていた。

BH4 を補酵素として要求する一酸化窒素合成酵素の KO マウスでは、肥厚性幽門狭窄 hypertrophic pyloric stenosis が報告されており、*Spr*-KO マウスでも幽門狭窄が起きている可能性が考えられた。

次に成獣 *Spr*-KO マウスに、麻酔下で上腕二頭筋と上腕三頭筋に電極を刺入し、覚醒後に電気信号を記録した。その結果、*Spr*-KO マウスでは動いていないときにもリズムカルな上腕二頭筋と上腕三頭筋のほぼ同期した収縮が観察された。このような同期した収縮は、野生型マウスでは観察されなかった。さらに、L-Dopa 投与の影響を検討したところ、L-Dopa 投与により拮抗筋の同期した収縮が消失することが判明した (図 2)。この顕著な拮抗筋の同期した収縮が *Spr*-KO マウスで観察される上肢のジストニア様振戦を反映するものであるか、今後さらに脳内での細胞外記録を行うなど電気生理学的手法により解析を進めていく。



上段：上腕二頭筋、下段：上腕三頭筋、1 sec/div

図 2. *Spr*-KO マウスから記録された筋電図の 1 例

D. 考察

2001 年に初めてヒト SPR 欠損症の患者が報告された。SPR 欠損症患者は、筋緊張低下、ジストニア、認知機能障害などを示した。これらの症状のうち、運動障害はドーパ投与により劇的に改善した。一方、肝臓でのフェニルアラニン代謝障害はみられず、血中フェニルアラニン値は高値を示

さなかった。患者脳脊髄液の分析では、ドーパミン代謝産物の HVA とセロトニン代謝産物の 5HIAA が低値で、脳内モノアミンが欠乏していると考えられる。

我々は、ビオプテリン部分欠乏マウスモデルとして Spr-KO マウスの解析を行ってきた。これまでに、Spr-KO マウスではビオプテリン量が野生型のおよそ 4 分の 1 に低下していること、脳内ドーパミンは、新生仔の段階では野生型の約 50% であるが、生後 3 週頃まで野生型でみられるドーパミンとチロシン水酸化酵素 (TH) タンパク質の急激な増加が Spr-KO マウスでは起こらず、生後 3 週齢では KO マウスのドーパミン量は野生型の 20% 程度にとどまることを報告した。

ビオプテリン生合成 2 番目の酵素 (ピルボイルテトラヒドロプテリン合成酵素; PTS) の KO マウスは生後 2 日以内に死んでしまうが、ノルアドレナリンニューロン特異的に *Pts* を発現させることにより生存させることができる *DPS-Pts-KO* マウスでは、Beam テストで四肢協調運動の障害が観察され、線条体ではストリオゾーム優位の TH タンパク質量の減少が認められた。一方、Spr-KO マウスでは *DPS-Pts-KO* マウスのようなストリオゾーム優位な TH タンパク質の減少は観察されず、顕著な運動量の低下と、前肢の震えが観察された。今回観察された拮抗筋の同期した収縮が、どのようなメカニズムにより生じているか多面的に慎重に解析する必要がある。

今後さらに解析を行っていき、Spr-KO マウスにおける運動障害について解析することにより、ドーパ反応性ジストニアや、ジストニアとパーキンソニズムとの違いを解明する。これらの研究を通じて、ジストニアの新規治療法開発への応用について検討する。

E. 結論

長期間生存できるドーパ反応性ジストニアモデル動物の一つである Spr-KO マウスを作製した。成獣 Spr-KO マウスは、胸椎の屈曲や上肢の振戦

様震えを示した。上腕二頭筋と三頭筋の筋電図の解析から、拮抗筋のほぼ同期したリズムカルな異常収縮を認めた。この異常収縮は、ドーパ投与により消失した。今後さらにこのマウスで異常筋収縮を生む脳内機構について解析していく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

久保田光、知見聡美、本間大悟、高草木薫、一瀬宏、南部篤 (2015) セピアプテリン還元酵素を欠損したドーパ反応性ジストニアモデルマウスにおける大脳基底核の異常な活動、第 38 回日本神経科学大会、平成 27 年 7 月 (神戸)

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

ジストニア患者の遺伝子検査

太田悦朗¹⁾、長谷川一子²⁾、一瀬宏³⁾、小幡文弥¹⁾

¹⁾北里大学医療衛生学部免疫学、²⁾国立病院機構相模原病院神経内科、

³⁾東京工業大学大学院生命理工学研究科

研究要旨

本研究では、ジストニア患者における確定診断の補助を目的とし、遺伝性ジストニアの原因遺伝子および関連遺伝子 (*TOR1A*、*THAP1*、*GCHI*、*PRRT2*、*SGCE*、*PANK2*、*TH*、*DRD2*) について変異解析を行った。その結果、*GCHI* 遺伝子において疾患特異的な新規変異と既報変異をそれぞれ検出した。また、近年同定された遺伝性ジストニアの原因遺伝子 *TUBB4A*、*PRKRA*、*ATPIA3* について変異解析システムを構築し、*ATPIA3* 遺伝子の既報変異を検出した。

A. 研究目的

ジストニアは患者により多彩な症状を呈する疾患であり、臨床症状のみでは確定診断の決め手に乏しいことや他の疾患を否定できないことがある。これらの場合において、ジストニアの原因遺伝子および関連遺伝子をターゲットにした遺伝子診断が有用である。当研究室では、2003年厚生労働省の難治性疾患克服研究事業「ジストニア研究班」の発足以来、遺伝子解析部門を担当し、患者の遺伝子検査を行っている。本研究では、ジストニア患者に関して、DYT1～DYT25に分類される遺伝性ジストニアの原因遺伝子 (*TOR1A*、*THAP1*、*GCHI*、*SGCE*、*TH*、*PRRT2*) またはジストニア関連遺伝子 (*DRD2*、*PANK2*) の変異解析を行った。また、近年同定された DYT4、DYT12 および DYT16 の原因遺伝子 *TUBB4A*、*ATPIA3*、*PRKRA* について変異解析システムを構築し、変異解析を行った。

B. 研究方法

全国の各施設のジストニア患者の血液サンプルについて、ゲノム DNA を抽出および濃度測定後、下記の解析を行った。

TOR1A 遺伝子：既報 (NatGent.17,40-48.) に従って PCR-RFLP 法にて既報 GAG 欠失を調べた。

TOR1A、*GCHI*、*THAP1*、*SGCE*、*PANK2*、*PRRT2*、*TUBB4A*、*PRKRA* および *ATPIA3* 遺伝子：全 exon に対して各々特異的なプライマーを作製し、PCR 直接塩基配列決定法により変異解析を行った。

TH および *DRD2* 遺伝子：変異が報告されている exon に限定して、変異解析を行った。

変異解析は、依頼された遺伝子から優先的に解析し、遺伝子異常が認められない場合は、他の遺伝子についても進めた。

(倫理面への配慮)

遺伝子診断を行うにあたり、原則的に文書でのインフォームド・コンセントを行った。同意能力がないと判断された場合はその保護者から同意書を得た。なお本研究は、北里大学医学部・病院倫理委員会にて承認済みである。また、患者の個人情報、すでに連結可能匿名化された状態で、北里大学に送付された。

C. 研究結果

全身性ジストニアを呈する遺伝性ジストニアが疑われた患者1名について、DYT1 ジストニア原因遺伝子 *TOR1A* の既報 GAG 欠失を解析した結

果、GAG 欠失は検出されなかった。また、*TORIA* 遺伝子内の新規変異の可能性を考慮して、全 exon に対する変異解析を行ったが、疾患特異的な変異は検出されなかった。さらに、*DYT1* ジストニアと同様に全身性ジストニアを呈する *DYT6* ジストニア原因遺伝子 *THAPI* の変異解析も行ったが、疾患特異的な変異は検出されなかった。

DYT5 ジストニアが疑われた患者 2 名について、*DYT5* ジストニア原因遺伝子 *GCHI* の変異解析を行った結果、1 名の患者から *GCHI* の exon 1 において新規遺伝子変異 (c.T323T/C [Y109H])、残りの 1 名では *GCHI* の exon 5 において既報遺伝子変異 (IVS5+1g>g/c) をそれぞれ検出した。また同様に、*Sau96I* を用いた PCR-RFLP 法においても、患者の *GCHI* の exon 1 に c.T323T/C [Y109H] 変異が確認された。さらに、今回検出された Y109H 変異が SNP でないことを確認するために、健常者群 98 名について *Sau96I* を用いた PCR-RFLP 法による変異解析を行った。その結果、今回の新規遺伝子変異は、健常者群からは検出されなかった。

DYT4 ジストニア、*DYT12* ジストニアおよび *DYT16* ジストニアの原因遺伝子 *TUBB4A*、*ATPIA3*、*PRKRA* について変異解析システムを構築し、遺伝性ジストニア患者 8 名について、全エクソンを標的とした変異解析を行った。その結果、*TUBB4A* と *PRKRA* では疾患特異的な変異は検出されなかったが、*ATPIA3* の exon 17 において患者 1 名から既報遺伝子変異 (c.G2443G/A[E815K]) を検出した。

D. 考察

全身性ジストニアの鑑別においては、*TORIA*、*THAPI* の変異解析が有効である。今回、変異解析を行ったジストニア患者では、*TORIA*、*THAPI* の遺伝子変異は検出されなかった。この患者は、同胞発症例が家系内にいるため、今後その他のジストニア原因遺伝子の変異解析を行う必要がある。さらに新規の遺伝性ジストニア原因遺伝子が病態に関与している可能性も考えられるため、次世代シーケンサーを用いた解析が必要である。

また *GCHI* の遺伝子解析では、*DYT5* ジストニアが疑われた患者 2 名から、新規の Y109H 変異と既報の IVS5+1g>g/c 変異をそれぞれ検出した。この新規変異は、健常者群 98 名から検出されなかったことから、疾患特異的な変異であると考えられた。さらに、109 番目近傍のアミノ酸配列は、マウス、ラット、アフリカツメガエルなどにおいて高度に保存された領域に存在し、タンパク質の機能に重要な役割を担うと推測され、以前に我々が報告した T106I 変異と同様に *GCHI* 酵素活性の低下が考えられる。

さらに、変異解析システムを構築した *DYT12* ジストニアの原因遺伝子 *ATPIA3* において、既報の E815K 変異を検出した。*ATPIA3* はナトリウムポンプの触媒ユニットであり、細胞膜において Na^+ と K^+ を交換するために ATP 加水分解を行っている。そのため E815K 変異は、ATP 加水分解の機能に影響を及ぼしている可能性がある。また興味深いことに、本来 *DYT12* ジストニアはパーキンソニズムとジストニアの両症状を示すのに対し、この変異が検出された患者は、交代性片麻痺による小児ジストニアであった。したがって、この変異が引き起こす発症メカニズムは、*DYT12* ジストニアの病態を理解する上で新たな情報を提供できるかもしれない。

本研究班における遺伝子検査では、多くの遺伝子変異を検出している現状から、今後の方針として、全てのジストニア原因遺伝子を標的とした変異解析が必要と考えられる。また本研究では、遺伝子変異が検出されていない遺伝性ジストニア患者が多数いるため、今後次世代シーケンサーを用いた新規の原因遺伝子の探索を行っていく必要がある。

E. 結論

ジストニア患者の遺伝子解析から、*DYT5* ジストニア原因遺伝子 *GCHI* から疾患特異的な新規遺伝子変異と既報遺伝子変異をそれぞれ検出した。また同様に、*DYT12* ジストニアの原因遺伝子

ATP1A3 においても疾患特異的な既報遺伝子変異を検出した。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1. 論文発表

1) Miyajima T, Ohta E, Kawada H, Maekawa T, Obata F. The mouse/human cross-species heterodimer of leucine-rich repeat kinase 2: Possible significance in the transgenic model mouse of Parkinson's disease. *Neurosci Lett.*, 588, 142-146, 2015

2. 学会発表

該当なし

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

ジストニア update

報告者氏名 長谷川一子¹⁾

所属： 1) 国立病院機構相模原病院神経内科

研究要旨

ジストニアのガイドライン作成にあたり、海外で定義、分類の再検討があった。このため、国際対応も視野に入れてジストニアの定義、分類の再考を行った。これによりジストニア定義 2004 を改訂し、ジストニアの分類をより実情にあったものに変更した。

A.研究目的

ジストニアの定義と分類については国立精神・精神神経センター委託研究費を受けて研究を行ったジストニア班による研究で策定し、2004年度に班員の承認を受け、出版に至った。その後2013年に国際運動障害学会に於いて、ジストニアの定義、分類に再考があった。国際対応を行った研究を行っていく上で、また、ジストニア診療ガイドラインを策定していくうえで、2004年度の定義と分類を再検討するの必要を感じた。このため、たたき台を策定し、班会議に於いて班員の承認を受けた後、ジストニアガイドラインに提出することを本研究の目的とした。

B.研究方法

海外の現状と我が国の暫定診断指針を元にワーキンググループで検討した。また、ガイドラインについても検討した。

（倫理面への配慮）

文献検索が主体のため、とくに倫理面で問題となることはない。

C.研究結果

1) 診断指針策定：

国際運動障害学会誌に掲載されたジストニアの定義とわが国のジストニア班で策定したジストニアの定義とを診断指針の改訂点について論議が必要であった点を以下に列挙する。（1）ジストニア姿勢は一時的であっても必ずみられる。→削除して良いか？（2）ジストニアは特定の随意運動時に出現、あるいは著しく増強する場合があります、これを動作性ジストニアと呼ぶ。→削除するか？（3）附帯事項1をどう扱うか？分類方法の改変があった。（4）遺伝性ジストニアは DYT シリーズのみとする。→実際的でないため遺伝様式により諸疾患を含めるか？（5）附帯事項4のジストニアの起源に小脳を加えるか？（6）附帯事項5、6→重複があるため削除でよいか？

2) 分類方法の改変：

おおむね国際運動障害に準ずる方向で変更となった。

3) 変更したジストニアの定義 2015 を別紙に添付する。

D. 考察

ジストニア研究の進展二都もない、ジストニアの定義、分類法を改変する必要性が生じ、別紙のように改変した。今後も数年に一度改変することが必要と思われる。

E. 結論

ジストニアの定義と分類を改定し、承認を得た。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 長谷川一子：ハンチントン病 pp860-861. 今日の治療指針 私はこう治療している. 監修 山口徹, 北原光夫, 総編集：福井次矢, 高木誠, 小室一成 医学書院 2014.
- ② 長谷川一子：Huntington 病と認知障害. 神経内科 80：24-33, 2014
- ③ 長谷川一子：Huntington 病の症候・病態から新たな薬物療法まで. 神経治療学 31：552, 2014.
- ④ 長谷川一子：神経変性疾患②ハンチントン病. Brain Nursing 30：85-87, 2014

2. 学会発表

- ① 長谷川一子ら：特定疾患調査表からみたハンチントン病. 第 55 会日本神経学会学術総会 2014
- ② 長谷川一子：ハンチントン病について. 第 32 会日本神経治療学会総会 2014
- ③ Kashihara K, Kondo T, Mizuno Y, Kikuchi S, Kuno S, Hasegawa K et al: Official Japanese Version of the International Parkinson and Movement Disorder Society- Unified Parkinson's Disease Rating Scale: Validation Against the Original English Version. Mov Disord 2014
- ④ 長谷川一子：ジストニアの定義と分類. 神経

症候群（日本臨床）201-206、2014

- ⑤ 長谷川一子：ドパ反応性ジストニア, 芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素欠損症, セピアプテリン還元酵素欠損症, チロシン水酸化酵素欠損症, ピルボイル-テトラヒドロピオプテリン欠損症. 神経症候群（日本臨床）232-239, 2014
- ⑥ 長谷川一子：Neurodegeneration with brain iron accumulation-1 NBIA 1 神経症候群（日本臨床）284-288, 2014
- ⑦ 長谷川一子：脊髄小脳変性症の症状と対応. 難病と在宅ケア 44-48, 2014
- ⑧ 長谷川一子：首下がり症候群：遺伝性脊髄小脳変性症に伴う首沙汰離症候群— Machado-Joseph 病など. 神経内科 81：50-56, 2014.

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 |

ジストニア患者の心理検査と治療介入の試みに関する研究

研究分担者 坂本 崇, 小林 恵

(国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科)

研究要旨

ジストニアの経過・治療効果には患者の心理状態も影響するという。従って安全で効果的な心理的治療介入方法の開発は急務と考えられる。当院ではジストニアの治療効果向上を目指し、ジストニア患者を対象として心理検査を実施し検査結果の分析と検討を行っている。さらに同意を得られた患者を対象として一定回数の心理検査と治療介入を試みた。

A.研究目的

ジストニア患者の心理検査と治療介入の試みを心理検査結果の変化という観点から報告する。

B.研究方法

対象者は専門医によってジストニアと診断された患者1名であった。介入には心理検査と認知行動モデルを用いた。介入前後の心理検査には日本版 NEO-PI-R(Revised NEO Personality Inventory)・新版 STAI(State-Trait Anxiety Inventory)・HADS(Hospital Anxiety and Depression Scale)・GRID-HAMD21(Hamilton Rating Scale for Depression)・BDI-II(Beck Depression Inventory Ver. II)・Numerical Rating Scale(NRS)を用いた。介入期間はX年7月から9月、頻度は週1回、回数は全9回であった。

C.研究結果

NEO-PI-Rでは介入前に比べて神経症傾向次元・開放性次元で得点が低下した。下位尺度得点では不安・審美性・アイディア・価値等で低下しコンピデンスで上昇した。不安・抑うつ尺度では全検査で得点が低下した。NRSでは足の違和感が

10/10から10/8に、痛みが5/10から0/10に低下した。

D.考察

感情の波の低減、拡散傾向の減少と現実感の増加、自己評価の上昇、こだわりの軽減などが考察された。ジストニア症状の改善も認められた。総じて心理検査と治療介入によって適応状態とジストニア症状が改善したと考えられた。

E.結論

心理検査と治療介入はジストニアの治療効果向上に有用である可能性が示唆された。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし