

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、健康人の末梢血単核球から無血清凝集浮遊培養法（SFEBq 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

健康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 マウスをネンブータ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。

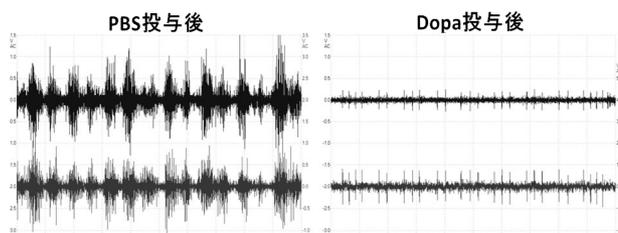


図 1 . 野生型マウス(上)と *Spr*-KO マウス(下)の写真

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(*TORIA*、*THAP1*、*GCH1*、*PRRT2*、*SGCE*、*PANK2*、*TH*、*DRD2*)について変異解析を行った。その結果、*GCH1* 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(*TORIA*、*THAP1*、*GCH1*、*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。

TORIA 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。

TORIA、*GCH1*、*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*TORIA*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

ATPIA3 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

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。
長谷川一子：Huntington 病と認知障害。
神経内科 80：24-33，2014
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。
長谷川一子：神経変性疾患 ハンチントン病。Brain Nursing 30：85-87，2014

2. 学会発表

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
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
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
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

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

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

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

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- (Beck Depression Inventory Ver.)・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

- 論文発表
なし
- 学会発表
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 平 孝臣

（東京女子医科大学 脳神経外科）

A. 研究目的

ジストニアの外科治療の改善と新たな開発。

B. 研究方法

既存の治療法の効果・副作用などのデータ解析に基づいて、ジストニアの外科治療の適応、手技、効果を改善できるか可能性を検討する。

C. 研究結果

脳深部刺激(DBS)がジストニアの治療として定着し 15 年程度になるが、一次性ジストニアでの長期効果はおおむね良好である。中には刺激を中止しても症状の再発しない場合がある。しかし DBS の機器に関連した問題点、すなわち機器の破損、感染、異物反応などが、治療後長期になるほど問題となってくる。ジストニアの淡蒼球内節(GPi) DBS は、GPi の凝固術よりも効果が勝っており副作用も少ないことから選択されたのではなく、パ - キンソン病での時代的流れの中で移行していった。このためジストニアにおいては GPi の凝固術と DBS の科学的比較検討はなされていない。感染した DBS 装置を抜去せざるを得ない場合、GPi の凝固術を行うことが重症例のマネージメントでは有用であった。

動作特異性局所ジストニアでは従来通り視床 Vo 核の手術が有効である。ただし侵襲的な治療であり限られた施設のみでしか行いにくいという問題点があげられる。今後外傷に続発する fixed dystonia ではバクロフェン髄腔内投与、脳深部刺

激、Vo 核手術など、様々な手法を患者の症状、状態に応じて選択するが効果は一定しない。

D. 考察

一次性ジストニアの DBS の長期予後は良好であるが、長期での機器にまつわる問題点を解決していかなければならない。たとえば 20 歳で全身性ジストニアに対して DBS を行った場合、今後 50-60 年に渡って DBS が良好に動作していく必要がある。はたしてこのような DBS がベストの治療なのか、GPi の凝固術の実地臨床における意義などを科学的に検討していく必要がある。動作特異性局所ジストニアは視床 Vo 核の効果が確立されたと言ってもよいが、症状による社会的障害度、手術の侵襲性とリスクのバランスから適応を考え、今後は集束超音波治療などより低侵襲な治療法を模索していく必要がある。fixed dystonia に関しては、その概念、病態、治療法などが混沌とした状況であるが、患者の状況は悲惨であり、本領域に特化した取り組みが必要と考えられる。10 年あまりの経過で、特に凝固術の場合には長期にわたり無症状の状態が持続し、外見や症状からは治癒と呼んでいい判断しても状態となる例が少なくなく、「ジストニアに治癒はない」という既存の概念を再検討していく必要がある。

E. 結論

この 10 年余りでジストニアの外科的治療は飛躍的に進歩した。しかし今後非常に長期の治療効

果を良好に維持するための手法を考えていくこと、より低侵襲な方法を開発・普及させていく段階に来ている。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1. 論文発表

平 孝臣 脳深部刺激療法 (deep brain stimulation: DBS)においてマイクロコーディングは必要? 「No」の立場から *Frontiers in Parkinson Disease* 7 巻 3 号 Page142-145 (2014.08)

相場 彩子, 旭 雄士, 梶本 裕之, 佐藤 未知, 大山彦光, 平 孝臣, 林 明人 携帯筋電計の音フィードバックを用いた痙性斜頸に対するボツリヌス治療およびハンガー反射の応用 *運動障害* 24 巻 1 号 Page13-18(2014.07)

平 孝臣, 竹田 信彦 DBS のジストニア、振戦、過運動障害に対する効果 *神経内科* 5 号 Page536-540(2014.05)

Takaomi Taira: Deep brain stimulation for dystonia Itakura T eds, *Deep Brain Stimulation for Neurological Disorders: Theoretical Background and Clinical Application*, Springer 2014 pp121-134

2. 学会発表

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

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)

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)

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)

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・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

研究分担者 横地 房子

（都立神経病院脳神経内科）

研究要旨

ジストニア・パーキンソニズムは希な疾患である。4例のジストニア・パーキンソニズムにDBSを施行した。4例の臨床症状、L-dopaやDBSによる症状改善などについて検討した。

A.研究目的

ジストニア・パーキンソニズムは希な疾患であり、その症状や治療についてまだ十分な検討は行われていない。遺伝子検査による診断がついているDYT3を除き、確定診断未定例の症状やDBSの効果などについて報告する。

B.研究方法

患者4例(男/女：3/1、平均年齢46才)の臨床的特徴、およびMIBG、DATスキャンなどの結果を表に提示した。両側GPiDBSを3例に施行した。GPiDBS施行例中1例ではパーキンソニズム改善のためにSTNDBSを行った。1例はSTNDBSを施行した。

C.研究結果

DYT16, DYT12, Park2, Park6, Park7は陰性であった。4例とも初期症状は体軸ジストニアであった。パーキンソニズムは3/4例で左側、ジストニアは4/4例で左側であった。4例ともDA uptakeは低下していた。MIBGは境界値2例、低下2例であった。Pt1&2: MIBG境界値2例ではL-dopaによる臨床改善がなく、GPiDBSの効果も明らかではなかった。1例ではSTNDBSを施行し、パーキンソニズムが改善した。Pt3: GPiDBS後に著しいすくみ、動作緩慢が出現したが筋固縮はなかった。L-dopaが有効で、早期から日内変動が出現した。

Pt4: STNDBSでパーキンソニズムは改善し、ジストニアは軽度残存した。

D.考察

パーキンソニズムとジストニア発現側が同じであり、DA低下がジストニア発現にかかわっている可能性がある。また4例ともドパミン欠乏の状態であるにもかかわらず、L-dopaの効果は一様でなかった。DBSの効果もDYT3で認めた効果と異なり、病態の違いを示唆した。

E.結論

ジストニア・パーキンソニズムは非常に多様な症状を呈した。

pt	DBS	Dys	PD	DATscan	MIBG	Ldopa
1	GPi STN	left	left	↓↓	border	none
2	GPi	left	left	↓↓	border	none
3	GPi	left	left	↓↓	↓	good
4	STN	left	right	↓↓	↓	good

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

1. 論文発表

1:Kato K, Yokochi F, et al. Bilateral coherence between motor cortices and subthalamic nuclei in patients with Parkinson's disease. Clin Neurophysiol. 2014

2: Yokochi F. [Hereditary dystonia -- phenotype of DYT1]. Rinsho Shinkeigaku. 2012;52(11):1071-3.

3: Uyama N, Yokochi F, et al. Primary progressive apraxia of speech (AOS) in a patient with Pick's disease with Pick bodies: a neuropsychological and anatomical study and review of literatures. Neurocase 2013

5: MDS-UPDRS Japanese Validation Study Group. Official Japanese Version of the Movement Disorder Society-Unified Parkinson's Disease Rating Scale: validation against the original English version. Mov Disord Clin Pract. 2014;1:200-21

2. 学会発表

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

Japan Dystonia Consortium の構築

瓦井俊孝¹⁾、宮本亮介¹⁾、梶 誠兒¹⁾、野寺 裕之¹⁾、宮崎 由道¹⁾、塚本-宮城 愛¹⁾、
小泉 英貴¹⁾、松井 尚子¹⁾、和泉 唯信¹⁾、森垣 龍馬²⁾、後藤 恵²⁾、松本 真一³⁾
坂本 崇⁴⁾、梶 龍兒¹⁾

- 1) 徳島大学大学院 HBS 臨床神経科学
- 2) 徳島大学大学院 HBS 先端運動障害治療学講座
- 3) 神鋼病院 神経内科
- 4) 国立精神・神経医療研究センター 病院 神経内科

研究要旨

オールジャパンでジストニアの病態解明を行うために、学会、ホームページで不随意運動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。その結果、約 3 割の症例において、既知のジストニア遺伝子に変異が認められた。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ことを再確認した。さらに、孤発例ジストニア症例において、エピジェネティクスに関係する遺伝子に於いてフレームシフト変異を認め、新規ジストニア遺伝子の候補と考え、さらなる解析を進めている。

A. 研究目的

ジストニアは、海外ではパーキンソン症候群の約4分の1の有病率といわれる決してまれではない病態で、重症化すると著しい日常生活上の障害をきたす重要な病態である。ジストニアの病態解明は、正確な診断ならびに治療開発に重要であり、喫緊の課題である。遺伝性ジストニアでは、他の神経疾患以上に症状の多様性(static, tonic, dystonia plus など) 浸透率の変化により家族歴が明らかでないことが多い、特徴的な画像診断はなく、また正確な Phenomenology の評価も難しいなどが病態解明を難しくしている原因である。近年の遺伝子解析技術の発展により、遺伝子異常に基づくジストニア研究が進み、Striosome-matrix pathology が明らかとなっている。しかし、それだけでは病態全てを説明できず、さらなく解明のためにはジストニア遺伝子解析を中心に研究を推し進める必要がある。我々は、Japan Dystonia Consortium を立ち上げ、ホームページや各研究会を通して周知し、オールジャパンの態勢で病態に取り組んでいる。

B. 研究方法

患者に対する説明と同意の取得法、サンプル採取のプロトコル・患者の個人情報保護は、徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会において審議され承認されている(平成23年7月12日付け、「神学病院臨床研究倫理審査委員会において審議され承認されている(平成23年7月12日付け、「神経・筋疾患における遺伝子解析」)。本研究ではその申請に従って行われ、ヘルシンキ宣言に従い患者の書面による同意を得られた場合のみ実施した。また、参加施設で承認された同意書も必要に応じて取得した。さらに、同意を得た上で、症状のビデオ撮影を行い、正確な Phenomenology の評価も行った。症状、家族歴より既知のジストニア遺伝子異常が疑われた場合、PCR-ダイレクトシーケンス法で解析を行った。既知のジストニア遺伝子が除外

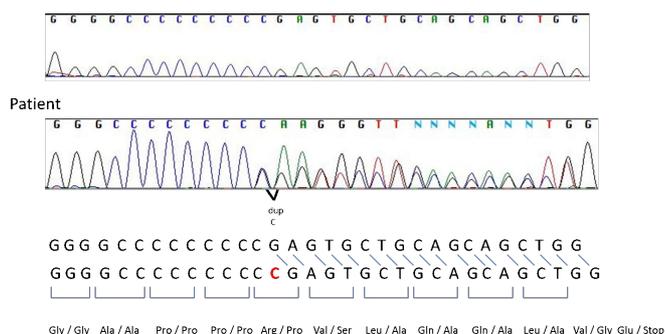
されたものに関しては、サンプルパワーを考慮して全ゲノムエクソーム解析を行い、さらにバイオインフォマティクスを駆使して候補遺伝子の絞り込みを行った。

C. 研究結果

臨床病型	依頼件数	遺伝子異常検出件数	内容
全身性ジストニア	28	6	DYT1, DYT5, DYT6
発作性運動起原性ジスキネジア (PKD)	8	4	DYT10
発作性非運動起原性ジスキネジア (PKND)	2	0	-
ミオクローヌス・ジストニア	5	5	DYT11
痙性斜頸・Meige症候群	12	2	DYT25
分類不能	9	1	新規DYT遺伝子 (de novo変異)
合計	64	18	
		28.10%	

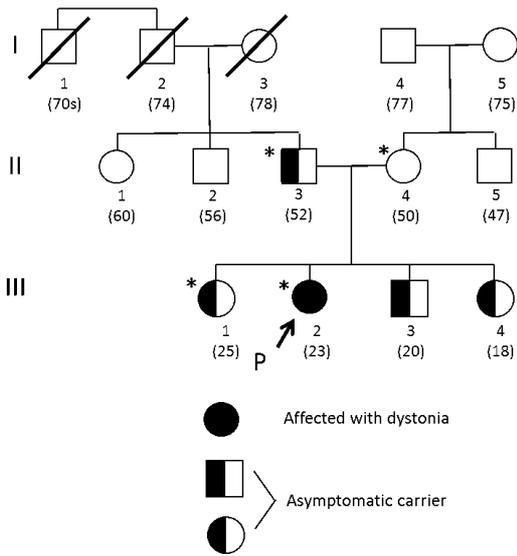
64症例のうち18症例(28.1%)においてジストニア遺伝子異常が見出された。遺伝子異常と臨床表現型は一致しており、特にSGCE-DYT11では全例において変異が認められた(表)。またPRRT2-DYT10では半数に於いて遺伝子異常を認めた。全例、フレームシフト変異のc.649dupCであった。

図1. DYT10-PRRT2 exon 2

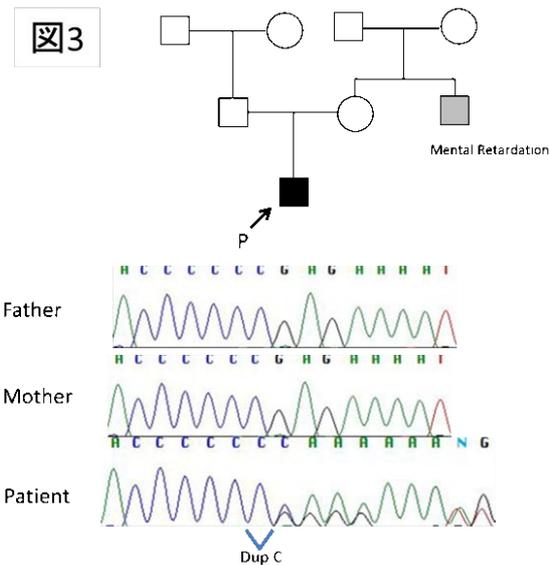


孤発例と思われた全身性ジストニアにおいて、GCH1-DYT5に変異を認めた(図2)。父親、同胞3名にも同変異を認めたが、発症してはいなかった。プロモーター領域のシーケンス解析、ハプロタイプ解析を行ったが、発症者1人に特有の変化は認められなかった。miRNAの標的配列などの3'末端の非翻訳領域(3' UTR)が遺伝子発現に与える影響や体細胞モザイク(黒質線条体ニューロン)などの可能性が考えられた。

図2. GCH1-DYT5, c.325T>C (p.Y109H)



軽度の精神発育遅滞を伴う全身性ジストニア症例において、既知のジストニア遺伝子には変異は認められず、両親、患者を対象に exome 解析 (trio 解析) を行ったところ、エピジェネティクスに関する遺伝子において、de novo の frameshift 変異を見出した (図 3)。



変異の影響として、既知のジストニア遺伝子を含め、数多くの遺伝子発現調整に影響が出ると思われる。現在、モデルマウスを作製し、transcriptome 解析を行っている。また、他の原因不明の全身性ジストニアにおいて、同遺伝子に

遺伝子異常がないかをスクリーニングしている。さらに線条体でのみ候補遺伝子を削除した conditional knock-out マウスを作製し、解析を行っている。

D. 考察

遺伝子異常と臨床表現型は一致しており、Phenomenology の正確な決定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と考えられる。また、遺伝性ジストニアでは、家族歴は明らかでないことは珍しいことではなく、本研究においても再確認された。そして、新規ジストニア遺伝子候補は、エピジェネティクスに關与しており、ジストニア病態の多様性を考える。今後、ジストニア原因遺伝子の数は増加することが予想され、Phenomenology から原因遺伝子推察できたとしても、解析に多大の労力の時間がかかることが予想される。ターゲットエクソーム解析などの技術を駆使する必要があると考える。

E. 結論

Phenomenology の正確な決定、遺伝子検査によりジストニアの病態が明らかになり、臨床の現場にフィードバックすることが可能である。また、遺伝子異常を突破口に、未知のジストニア病態を明らかにできる可能性があり、これまで判明したジストニア関連遺伝子とのインタラクトーム解析、さらに治療法の開発に役立つ。

F. 健康危険情報

無

G. 研究発表

1. 論文発表

Mure H, Morigaki R, Koizumi H, Okita S, Kawarai T, Miyamoto R, Kaji R, Nagahiro S, Goto S. Deep Brain Stimulation of the Thalamic Ventral Lateral Anterior Nucleus for DYT6 Dystonia. **Stereotact Funct Neurosurg.** 2014;92:393-396.

Kimura Y, Mihara M, Kawarai T, Kishima H, Sakai N, Takahashi PM and Mochizuki H. Efficiency of deep brain stimulation in an adolescent patient with DYT11 myoclonus-dystonia. **Neurology and Clinical Neuroscience** 2014;(2):57-59

Kishore R Kumar, Katja Lohmann, Ikuo Masuho, Ryosuke Miyamoto, Andreas Ferbert, Thora Lohnau, Meike Kasten, Johann Hagenah, Norbert Brüggemann, Julia Graf, Alexander Münchau, Vladimir S Kostic, Carolyn M Sue, Aloysius R Domingo, Raymond L Rosales, Lilian V Lee, Karen Freimann, Ana Westenberger, Youhei Mukai, Toshitaka Kawarai, Ryuji Kaji, Christine Klein, Kirill A Martemyanov and Alexander Schmidt. Mutations in GNAL: a novel cause of craniocervical dystonia. **JAMA Neurology**, 2014;71:490-494.

Kawarai T, Miyamoto R, Murakami N, Miyazaki Y, Koizumi H, Sako W, Mukai Y, Sato K, Matsumoto S, Sakamoto T, Izumi Y, Kaji R. Dystonia genes and elucidation of their roles in dystonia pathogenesis. **Rinsho Shinkeigaku**. 2013;53:419-429.

Morigaki R, Nakataki M, Kawarai T, Lee LV, Teleg RA, Tabuena MD, Mure H, Sako W, Pasco PM, Nagahiro S, Iga J, Ohmori T, Goto S, Kaji R. Depression in X-linked dystonia-parkinsonism: A case-control study. **Parkinsonism Relat Disord**. 2013;19:844-846

2. 学会発表

瓦井俊孝、宮本亮介、村上永尚、小泉英貴、宮城愛、宮崎由道、藤田浩司、佐藤 健太、松井尚子、松本真一、向井洋平、坂本崇、和泉唯信、梶龍兒

遺伝性ジストニアの臨床遺伝学的研究 **第54回 日本神経学会学術大会**（東京）2013

H.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

3.その他

