

## Spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) の臨床像, 画像所見 —Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) との小脳外症候の比較検討—

榊原 聡子<sup>1)\*</sup> 饗場 郁子<sup>1)</sup> 齋藤由扶子<sup>1)</sup>  
犬飼 晃<sup>1)</sup> 石川 欽也<sup>2)</sup> 水澤 英洋<sup>2)</sup>

要旨：近年原因遺伝子の判明した spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) と、同様に純粋小脳失調型である spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) との共通点と相違点を明らかにするため両病型の臨床像と MRI 所見について各 6 例を後方視的に比較検討した。小脳症候は両者に共通したが、小脳症候以外の神経症候は SCA31 では難聴のみをみとめたのに対し、SCA6 では錐体路症候、精神症状など多岐にわたりより高頻度であった。MRI 画像の検討では SCA31 は罹病期間に沿って小脳虫部前葉を中心に萎縮が緩徐に進行するのに対し、SCA6 では小脳虫部の萎縮に加え経過 10 年以下の比較的初期から第 4 脳室の拡大がめだった。これらの症候や画像所見の特徴は遺伝子診断以前の鑑別の手掛りとなる可能性がある。

(臨床神経 2014;54:473-479)

Key words：脊髄小脳失調症 (SCA), spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31), spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6), MRI

### はじめに

Spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) は 2000 年に 16q22.1-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (16q-ADCA) として疾患概念が確立し<sup>1)</sup>、2009 年に原因となる遺伝子が明らかとなった新しい SCA である。その発症機序は 16 番染色体上に存在する 2 つのことなる遺伝子 BEAN1 と TK2 がイントロンとして共有する位置に異常伸長した (TGGAA)<sub>n</sub> の 5 塩基リピートが挿入され、小脳 Purkinje 細胞の核内に RNA 凝集体が蓄積することと判明しており<sup>2)</sup>、CAG リピートを原因とする他の多くの SCA とことなる。

これまで本邦で純粋小脳失調を示す遺伝性脊髄小脳変性症 (ADCA type III) の鑑別診断を考える上では spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) が筆頭にあげられていたが、SCA31 の遺伝子診断が可能となってからは SCA31 もまた大きな割合を占めることが判明してきた。従来 SCA6 はほぼ純粋な小脳失調症を呈するとされるのが一般的ではあるものの、実際にはめまい感、深部腱反射異常、足底反射陽性、痙縮、深部感覚 (振動覚) 減弱、ジストニーなどの不随意運動、認知機能低下などを呈したという報告も多数みられる<sup>3)~9)</sup>。一方 SCA31 における小脳外症候は少なく、もっとも最近の総説<sup>10)</sup>においても、臨床的には純粋小脳失調の範疇の患者が多いと報告されている。

最近、当院で今まで病型不明だった純粋型小脳失調症 6 例が、遺伝子検査で SCA31 であることが判明した。ともに ADCA type III に分類される SCA6 と SCA31 との鑑別は一面難しいように思われる。そこで本稿では、SCA31 と SCA6 の臨床像を小脳症候以外の神経症候をふくめ検討し、両者の鑑別にこれらの症候が寄与するか否かを検討した。

### 対象と方法

対象は 2007 年から 2012 年の間に当院にて診療をおこなった SCA31, SCA6 各 6 例である。通院中の症例は神経内科医による診察を、過去の症例は神経学的診察記録、診察を記録したビデオ画像をもとに、臨床症候を比較し経過中 1 回でもあれば陽性と判断した。なお SCA6 症例の半数は現在通院中でなく、欠損データとなっており、全 6 例でしらべられなかった項目はしらべた症例中何例という記述としている。解析には年齢、罹病期間、合併する小脳外症候の数には Mann-Whitney 検定を、症候の頻度の比較には Fisher 検定をもちいた。画像は SCA31 と SCA6 それぞれ 6 例の MRI T<sub>2</sub> 強調画像水平断、矢状断 (SCA31 はすべて T<sub>2</sub> 強調画像、SCA6 は 2 例が T<sub>2</sub> 強調画像、4 例が T<sub>1</sub> 強調画像) を撮像し経験年数 25 年以上の神経内科専門医 2 名が独立に判定し、平均化した。病型をふくめ、個々の患者情報を隠して全症例について小脳萎縮、第 4 脳室拡大、中小脳脚萎縮の有無を評価し所見が

\*Corresponding author: 国立病院機構東名古屋病院神経内科 [〒 465-8620 名古屋市名東区梅森坂 5-101]

<sup>1)</sup> 国立病院機構東名古屋病院神経内科

<sup>2)</sup> 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学

(受付日：2013 年 4 月 9 日)

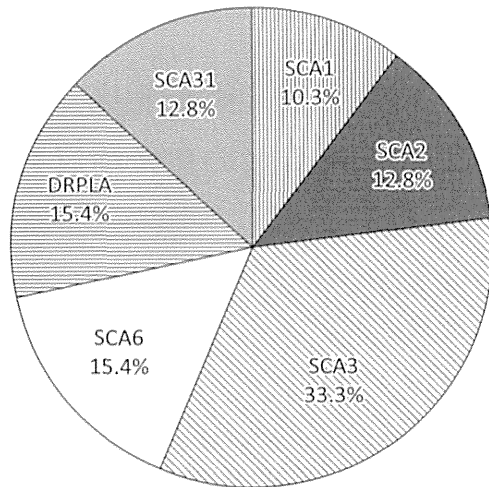


Fig. 1 Percentage of SCA types in our hospital (1998-2012).

The graph shows that SCA3 is the most frequent (33.3%) subtype in our hospital. The second most frequent subtypes are DRPLA and SCA6 at the same percentage (15.4%), followed by SCA31 and SCA2 at the same percentage (12.8%) and SCA1 (10.3%). The percentage is calculated with the number of family.

「明らかにあり」、「おそらくあり」、「おそらくなし」、「明らかになし」の4段階の順序変数もちい、順に+2点、+1点、-1点、-2点と点数化して両病型における平均点を Mann-Whitney 検定で比較した。遺伝子検査は SCA31 の全例と SCA6 の 1 例は東京医科歯科大学で、SCA6 の 5 例は名古屋大学でおこなった。失調の評価に Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA) を、認知機能評価に改訂版長谷川式簡易知能スケール (HDS-R) をもちいた。

## 結 果

### 1. 当院における SCA の病型の割合 (Fig. 1)

最初に当院において、1998 年～2012 年に診療をおこない遺伝子診断で判明した遺伝性脊髄小脳変性症の内訳を示す。病型の判明した 39 家系のうち当院では SCA3 がもっとも多く 13 家系 (33.3%) を占め、2 番目に DRPLA と SCA6 が同率で各 6 家系 (15.4%)、続いて SCA31 と SCA2 が同率で各 5 家系 (12.8%)、SCA1 が 4 家系 (10.3%) であった。

### 2. SCA31, SCA6 の臨床症候の比較 (Table 1)

#### a. 発症年齢

SCA31 の発症年齢は平均 63.8 歳 (57～67 歳)、SCA6 の発症年齢は平均 40.7 歳 (28～60 歳) で有意差をみとめた。

#### b. 発症時の症候

SCA31 の初発神経症候は歩行障害が 4 例、言語障害が 1 例、その両者を同時期に自覚したものが 1 例であった。SCA6 の初発神経症候は歩行障害が 2 例、歩行障害および言語障害を同時期に自覚したものが 2 例、めまい感が 1 例、手の震えによる書字障害が 1 例であった。

#### c. 神経症候

脳神経の所見は、水平方向の眼振は SCA31 で全例にみとめたのに対し、SCA6 では 1 例のみにみとめた。下向き眼振は SCA31 ではみとめず、SCA6 の 2 例でみとめた。難聴は SCA31 では確認できた 4 例中 3 例あり、そのうち 1 例は小脳症候出現より 20 年以上前の 40 代から難聴を自覚し、73 歳の検査時に両側性に高音域になるにしたがって強い難聴を示した。もう 1 例では片側の全音域の伝音性難聴と、両側の高音域の難聴がみとめられた。これらの症例の聴性脳幹反応 (ABR) の I～V 波の潜時はすべて正常であった。SCA6 では 1 例検索したが正常であった。

運動系の所見は、SCA6 で四肢筋力低下および筋萎縮をみとめたものが 5 例中 1 例あった。SCA31, SCA6 とともに全例で経過中に体幹、四肢の小脳失調を呈し、小脳性言語障害をみとめた。筋トヌスは SCA31 の 5 例で低下していたが、SCA6 では低下、正常、亢進がそれぞれ 2 例ずつ存在した。不随意運動は SCA31 では 1 例のみ振戦をみとめ、SCA6 では 3 例に振戦を、別の 1 例にミオクローヌスをみとめた。

感覚系では表在覚は全例で正常であった。深部感覚では、振動覚の低下は SCA31 の 3 例、SCA6 の 5 例中 4 例でみとめ、関節位置覚の障害は SCA6 の 5 例中 1 例でみとめた。

精神神経症候として、認知機能は SCA31 の全例で正常であり、SCA6 の 3 例中 1 例で低下していた。精神症候として、SCA31 の 6 例では精神症状を示すものはみられなかったが、SCA6 では幼稚性、パニック発作、自殺、抑鬱および攻撃性がそれぞれ 1 例ずつみられ、頻度に有意差をみとめた。

その他の症候として、腱反射は SCA31 では低下、正常、亢進がそれぞれ 2 例ずつ存在したのに対し、SCA6 では 5 例中 5 例で亢進し有意差をみとめた。Babinski 徴候は SCA6 の 4 例中 1 例のみで陽性であった。自律神経症状は SCA6 の 1 例で排尿障害をみとめた。SCA6 ではめまい感を訴えるものが 3 例中 2 例存在したが、SCA31 では皆無であった。

みとめられた小脳外症候すなわち小脳症状以外の神経症候の数の患者毎の平均値は、SCA31 では平均 1.5 個 (0～3 個)、SCA6 では平均 4.5 個 (2～9 個) で有意差をみとめた。

#### d. 罹病期間と ADL の関係 (Fig. 2)

SCA31 では罹病期間が長いほど ADL が低下していた。SCA6 では罹病期間と ADL は一定の傾向を示さず、罹病期間が短くても移動に車いすを必要とする患者もみられた。

### 3. 画像所見 (Fig. 3)

画像所見を 2 名の判定者で定性的に検討した。判定者間の一致度は重み付け  $\kappa$  係数 = 0.94 と高値であった。小脳はいずれの病型でも萎縮をみとめたが、萎縮の程度、部位に差異をみとめなかった。両者とも、とくに小脳虫部の上方で山頂や山腹に相当する部位に萎縮が強い傾向があった。一方、第 4 脳室の拡大、中小脳脚の萎縮については、SCA6 で有意にみとめた。大脳にいずれの病型とも萎縮をみとめなかった。

Table 1 Clinical features of SCA31 and SCA6 patients.

	SCA31		SCA6		Mann-Whitney test
Age at examination	75.33 ± 2.8		55.33 ± 12.7		$p < 0.05^*$
Male/Female	M4/F2		M3/F3		—
Age at onset	63.8 ± 4.9		40.7 ± 10.3		$p < 0.05^*$
Duration of disease	11.5 ± 5.2		14.7 ± 8.0		$p > 0.05$
Initial symptoms	Unsteadiness of gait	5	Unsteadiness of gait	4	
	Dysarthria	2	Dysarthria	2	
			Vertigo	1	
			Tremors	1	
Fisher's exact test					
Family history	6/6		4/6		0.23
Consanguinity	1/6		0/2		0.75
No. of family	5		6		
<Cerebellar function>					
Upper limb ataxia	6/6		6/6		—
Truncal ataxia	6/6		6/6		—
Lower limb ataxia	6/6		6/6		—
<Cranial nerves>					
Gaze evoked nystagmus					
	Horizontal	6/6	1/6		0.0076**
	Vertical	0/6	2/6		0.23
Oculomotor disturbance	0/6		0/5		—
Dysarthria	6/6		6/6		—
Dysphagia	3/6		1/6		0.24
Hearing impairment	3/4		0/1		0.5
<Motor functions>					
Muscle weakness	0/6		1/5		0.45
Amyotrophy	0/6		1/4		0.4
Muscular hypotonus	5/6		2/4		0.33
Spasticity	0/6		2/4		0.13
Involuntary movements					
	Tremors	1/6	3/6		0.24
	Myoclonus	0/6	1/6		0.5
<Sensory>					
Impaired thermal sense	0/6		0/5		—
Reduced vibration sense	3/6		5/5		0.12
Impaired kinesthesia	0/6		2/5		0.18
<Reflexes>					
Deep tendon reflex					
	Increased	2/6	5/5		0.045*
	Decreased/Lost	2/6	0/5		0.27
Positive Babinski reflex	0/6		1/4		0.4
<Autonomic function>					
Orthostatic hypotension	0/6		0/4		—
Urinary incontinence	0/6		1/4		0.4
<Other symptoms>					
Cognitive impairment	0/6		1/3		0.33
Psychiatric symptoms	0/6		4/5		0.015*
Vertigo	0/6		2/3		0.083
Mann-Whitney test					
No. of extracerebellar symptoms	1.5 ± 0.96		4.5 ± 2.22		$p < 0.05^*$

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

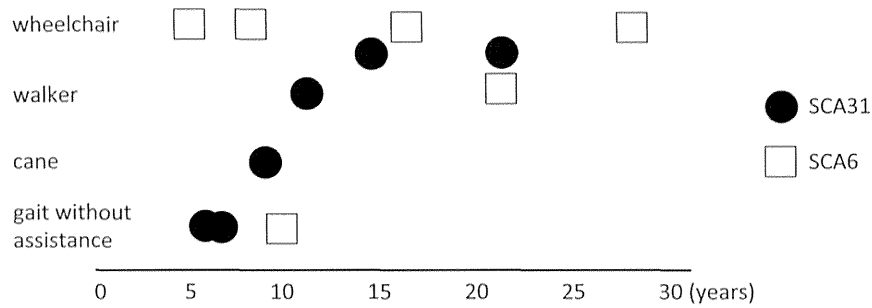
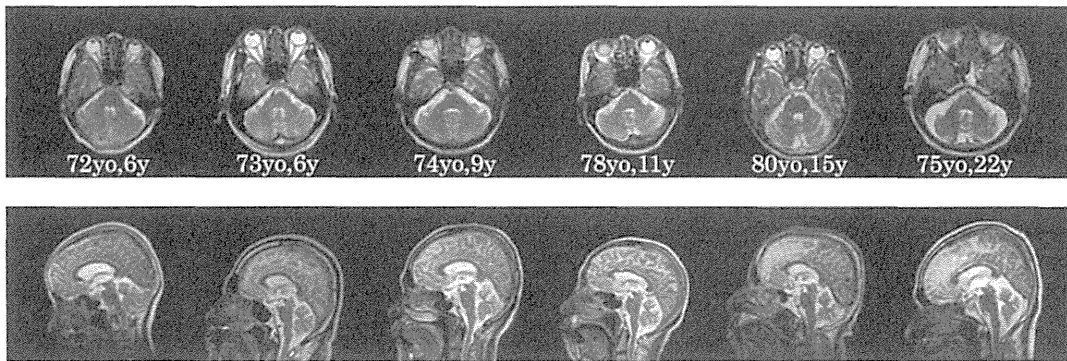


Fig. 2 Clinical course of SCA31 and SCA6.

Gait disturbance slowly progresses with disease duration in SCA31 patients. This trend is unclear in SCA6 and the clinical course varies in each case. A mark indicating patient using both wheelchair and walker is placed in the middle of them.

SCA31



SCA6

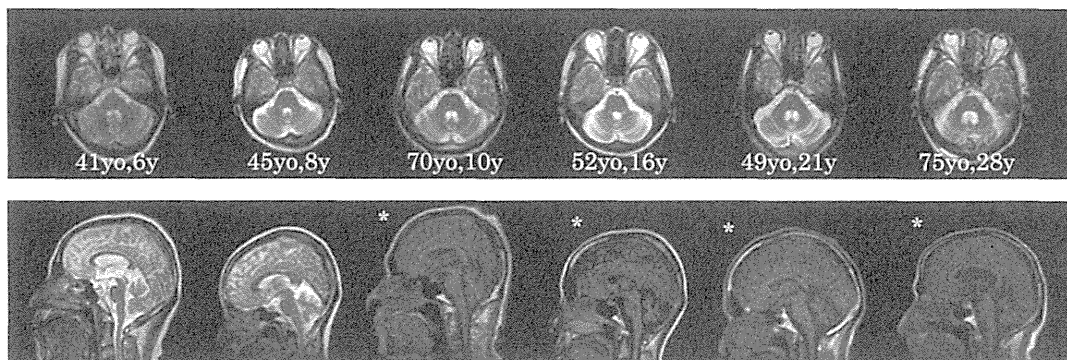


Fig. 3 MRI T<sub>2</sub> weighted image (axial, sagittal 1.5 T; TR 4,600 ms, TE 85 ms) of six SCA31 patients (upper rows) and six SCA6 patients (lower rows). T<sub>1</sub> weighted image (sagittal, TR 520 ms, TE 15 ms) were shown in four SCA6 patients (\*).

The numbers in the figure show each patient's age and disease duration at the study. Cerebellar atrophy starts from the upper vermis in SCA31, whereas the 4th ventricle becomes enlarged in SCA6 even in the early stage of disease.

考 察

従来、SCA6は純粋小脳失調を示す例が多いSCAであるといわれてきたが、錐体路症状、錐体外路症状、認知機能低下、

めまい感の自覚などを合併したという報告も多い<sup>3)~9)</sup>。今回当院で検討したSCA6においても、Table 1に示すように小脳失調のみを示すものはむしろ少なく、めまい感、深部腱反射異常、足底反射陽性、痙縮、深部感覚(振動覚)低下、不随

意運動、精神症状などの小脳外症候を示した。その点を考慮して、SCA31とSCA6とを比較したところ、患者ごとの小脳外症候の数はSCA31では平均1.5個(0~3個)、SCA6では平均4.5個(2~9個)で有意差があった。症候別の検討で有意差をみとめたものは水平性眼振と精神症状の頻度であった。有意差のなかったものも既報告と比較して以下に相違点を述べる。

第1に水平性眼振は当院で経験したSCA31では全例でみとめ、SCA6にくらべて有意に多かった( $p = 0.0076$ )。一方、SCA6では下向き眼振を呈するものが2例あり、過去の報告にもみられるとおりSCA6に特徴的な所見である。SCA6の水平性眼振については一般に68~94%と高頻度でみとめるとされている<sup>6,11,12</sup>。既報告ではSCA31の水平性眼振は5~55%と当院のものよりも低頻度であった<sup>11,13,15</sup>。また同一家系についてしらべた報告では、眼振のめだたない家系も存在するようである<sup>16</sup>。これについては今後当地域の症例をさらに集積し、かつ長期に観察して再度検討したいと考えている。

第2に今回SCA31の4例中3例で難聴がみられた。SCA31の難聴の頻度は3.8~42.9%とされ、SCA31の数少ない小脳外症候であるといわれ<sup>13,16,17</sup>、両側性の感音性難聴を示すとされている<sup>18</sup>。難聴はSCA31に特異的ではないとする報告<sup>19</sup>や、高齢発症の型であることから老人性難聴の合併ではないかと考察している報告<sup>11</sup>もあるが、今回の検討では小脳症候を発症するより20年以上前の40歳頃に原因不明の難聴で現在まで両側性に持続している症例がみられ、老人性難聴とはことなる経過である。SCA31を発症後に難聴の合併が確認された症例は一定の割合で存在するが、このような難聴の先行を記載しているものは文献を検索しても見当たらなかった。また他の1例では片側の中耳炎の既往によると考えられる伝音性難聴は容易に理解できるが、他側は高音域に強い難聴を示した。ABRの結果からは2例とも脳幹機能、蝸牛の異常は否定的と考えられた。一方、SCA6では難聴の合併は一般的ではない<sup>11</sup>。

第3に深部感覚(振動覚)障害についてはSCA31、SCA6ともに共通してみられたが、解釈はことなる。SCA31の振動覚障害は半数にみとめられ文献的には10%で合併すると報告がある<sup>14</sup>が、高齢発症ゆえに年齢による影響が否定できない。これに対しSCA6では比較的若年であるにもかかわらず全例にみとめられた。文献的にも4.3~58%で合併することが指摘されている<sup>6,8</sup>。

第4に、認知機能低下はSCA6で3例中1例でみとめられたがSCA31では6例ともまったくみとめなかった。従来ほとんどの報告でSCA31において認知機能低下をきたす頻度は診察時年齢が66.9~74.5歳と高齢であるにもかかわらず0~6.1%と低頻度<sup>11,13,14,20</sup>であった。当院でも診察時平均年齢75.3歳の6例全例で正常であったことは従来報告に合致しており、SCA31では認知機能低下をきたしにくいと思われる。これに対しSCA6では認知機能低下<sup>5</sup>やうつ症状を中心とした精神神経症状を示すこと<sup>4</sup>が報告されている。当

院では精神症状の頻度はSCA6で有意に高かった( $p = 0.015$ )。認知機能低下や精神症状をともなうSCA6症例での病理学的検索の報告は少ないが、SCA6の原因遺伝子であるCACNA1AのmRNAが小脳のみならず大脳をふくむ中枢神経全体に発現していること<sup>7</sup>はその原因として考えうるかもしれない。

さらに、SCA6では痙性対麻痺やBabinski徴候などの錐体路徴候や不随意運動など錐体外路症候を示すことも報告されており<sup>3,6</sup>、その頻度は多く、SCA6で純粋小脳失調を呈するのはごく一部の症例に限られ、多くの症例では発症初期に小脳失調のみを呈しても、進行した病像は多彩な症候が加わるとされる。小脳外症候が出現する時期やその内容、多寡が患者毎にことなることがFig.2で示したように罹病期間とADLレベルが一定の傾向をもたない理由の一つとなっていると考えた。先にも述べたようにSCA6の病理学的所見は小脳のほか、大脳、脳幹から脊髄にいたるまでほぼ均等に分布しているとされ<sup>7</sup>、これが小脳外症候を様々な程度で合併する原因となっている可能性について剖検症例を集積し臨床症候と照らし合わせて検討したい。また今回検討した6例のSCA6のCAGリピート数は過去の遺伝子検査結果に記載されていない症例が複数あり、本論文ではリピート数と関連した考察はできなかったが、SCA6ではCAGリピートが多い例で小脳外症候が出やすいという報告<sup>21</sup>がある一方で関連はないとしているものもみられる<sup>6</sup>。このような小脳外症候の修飾を受けにくいSCA31では患者間で症候が類似し経過も一定の傾向をもつと考えられる。

つぎに画像について考察する。今回検討したSCA31のMRI画像は、小脳虫部の上方で山頂や山腹に相当する部位から萎縮が進行する点はSCA6と共通の特徴であるが、脳幹の萎縮をみとめない点で経過10年以下の比較的初期から第4脳室の拡大や中小脳脚の萎縮をみとめるSCA6の6例とはことなつた所見を呈していた。小脳に限局した萎縮をきたし脳幹は保たれるとする既存のSCA31についての記述とも一致するが<sup>11,13</sup>、小脳上方の萎縮は他のSCAでもきたしやすい所見であり<sup>22</sup>、これのみでSCA31を診断することは困難であると考えられる。SCA6についてはこれまでの報告でも虫部の中等度から高度の萎縮、小脳半球の軽度な萎縮をきたすとされており、小脳以外の構造については意見がわかれ、中小脳脚・橋・その他の後頭蓋窩の構造には萎縮はみられないとしているもの<sup>8,23,24</sup>と、橋の前後径と中小脳脚の径にSCA1, 2, 3, 7には匹敵しない軽度の萎縮を指摘するものがあり<sup>25</sup>、後者が当院の症例と共通する。しかし、いずれの報告においても画像所見は罹病期間によってことなる可能性があり、今後、縦断的な解析の必要があると思われる。

以上より、SCA31はSCA6に比して、高齢発症で、精神症状、錐体路症候や不随意運動などの小脳以外の症候が少なく均一な臨床群であった。またMRIではSCA6に比して第4脳室拡大や中小脳脚の萎縮の所見が乏しい点が特徴的であった。小脳外症候を注意深く観察し、検討することが両者の鑑別に有用である可能性を提案する。

本報告の要旨は、第 133 回日本神経学会東海・北陸地方会で発表し、会長推薦演題に選ばれた。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれもありません。

## 文 献

- 1) Nagaoka U, Takashima M, Ishikawa K, et al. A gene on SCA4 locus causes dominantly inherited pure cerebellar ataxia. *Neurology* 2000;54:1971-1975.
- 2) Sato N, Amino T, Kobayashi K, et al. Spinocerebellar ataxia type 31 is associated with "inserted" penta-nucleotide repeats containing (TGGAA)<sub>n</sub>. *Am J Hum Genet* 2009;85:544-557.
- 3) Kim JM, Lee YL, Kim HJ, et al. The wide clinical spectrum and nigrostriatal dopaminergic damage in spinocerebellar ataxia type 6. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:529-532.
- 4) Klinka I, Minnerop M, Schmitz-Hübsch T, et al. Neuropsychological features of patients with spinocerebellar ataxia (SCA) types 1, 2, 3, and 6. *Cerebellum* 2010;9:433-442.
- 5) Suenaga M, Kawai Y, Watanabe H, et al. Cognitive impairment in spinocerebellar ataxia type 6. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:496-499.
- 6) Schöls L, Krüger R, Amoiridis G, et al. Spinocerebellar ataxia type 6: genotype and phenotype in German kindreds. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:67-73.
- 7) 水澤英洋. 純粋小脳失調症 脊髄小脳失調症 6 型を中心に. *運動障害* 2005;15:77-90.
- 8) Takahashi H, Ishikawa K, Tsutsumi T, et al. A clinical and genetic study in a large cohort of patients with spinocerebellar ataxia type 6. *J Hum Genet* 2004;49:256-264.
- 9) Watanabe H, Tanaka F, Matsumoto M, et al. Frequency analysis of autosomal dominant cerebellar ataxias in Japanese patients and clinical characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Clin Genet* 1998;53:13-19.
- 10) 石川欽也, 水澤英洋. 脊髄小脳失調症 31 型 (SCA31). *神経内科* 2013;78:253-256.
- 11) Yoshida K, Shimizu Y, Morita H, et al. Severity and progression rate of cerebellar ataxia in 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (16q-ADCA) in the endemic Nagano area of Japan. *Cerebellum* 2009;8:46-51.
- 12) Ikeuchi T, Takano H, Koide R, et al. Spinocerebellar ataxia type 6: CAG repeat expansion in alpha1A voltage-dependent calcium channel gene and clinical variations in Japanese population. *Ann Neurol* 1997;42:879-884.
- 13) Onodera Y, Aoki M, Mizuno H, et al. Clinical features of chromosome 16q22.1 linked autosomal dominant cerebellar ataxia in Japanese. *Neurology* 2006;67:1300-1302.
- 14) Nozaki H, Ikeuchi T, Kawakami A, et al. Clinical and genetic characterizations of 16q-linked autosomal dominant spinocerebellar ataxia (AD-SCA) and frequency analysis of AD-SCA in the Japanese population. *Mov Disord* 2007;22:857-862.
- 15) 石川欽也, 融 衆太, 大和田潔ら. 第 16 番染色体長腕に連鎖する優性遺伝性純粋小脳失調症. *神経内科* 2004;60:462-468.
- 16) Owada K, Ishikawa K, Toru S, et al. A clinical, genetic, and neuropathologic study in a family with 16q-linked ADCA type III. *Neurology* 2005;65:629-632.
- 17) Ouyang Y, Sakoe K, Shimazaki H, et al. 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia: a clinical and genetic study. *J Neurol Sci* 2006;247:180-186.
- 18) Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, et al. An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domains. *Am J Hum Genet* 2005;77:280-296.
- 19) Ikeda Y, Nagai M, Kurata T, et al. Comparisons of acoustic function in SCA31 and other forms of ataxias. *Neurol Res* 2011;33:427-432.
- 20) Basri R, Yabe I, Soma H, et al. Spectrum and prevalence of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in Hokkaido, the northern island of Japan: a study of 113 Japanese families. *J Hum Genet* 2007;52:848-855.
- 21) Sailer A, Houlden H. Recent advances in the genetics of cerebellar ataxias. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012;12:227-236.
- 22) Döhlinger S, Hauser TK, Borkert J, et al. Magnetic resonance imaging in spinocerebellar ataxias. *Cerebellum* 2008;7:204-214.
- 23) Satoh JI, Tokumoto H, Yukitake M, et al. Spinocerebellar ataxia type 6: MRI of three Japanese patients. *Neuroradiology* 1998;40:222-227.
- 24) Butteriss D, Chinnery P, Birchall D. Radiological characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Br J Radiol* 2005;78:694-696.
- 25) Murata Y, Kawakami H, Yamaguchi S, et al. Characteristic magnetic resonance imaging findings in spinocerebellar ataxia 6. *Arch Neurol* 1998;55:1348-1352.

**Abstract****Clinical features and MRI findings in spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) comparing with spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6)**

Satoko Sakakibara, M.D.<sup>1)</sup>, Ikuko Aiba, M.D.<sup>1)</sup>, Yufuko Saito, M.D.<sup>1)</sup>,  
Akira Inukai, M.D.<sup>1)</sup>, Kinya Ishikawa, M.D.<sup>2)</sup> and Hidehiro Mizusawa, M.D.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Neurology, National Hospital Organization Higashi Nagoya National Hospital

<sup>2)</sup>Department of Neurology and Neurological Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

Since the discovery of spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) gene, we identified 6 patients whose SCA type had been unknown for a long period of time as having SCA31 in our hospital and realized that SCA31 is not a rare type of autosomal dominant spinocerebellar ataxia in this region. We examined and compared the clinical details of these six SCA31 patients and the same number of SCA6 patients, finding that some SCA31 patients had hearing loss in common while there are more wide range and complicated signs of extra cerebellum in SCA6 such as pyramidal signs, extrapyramidal signs, dizzy sensations or psychotic, mental problems. There is a significant difference in the number of extracerebellar symptoms between SCA31 and SCA6. There are differences also in MRI findings. Cerebellar atrophy starts from the upper vermis in SCA31, as well as some SCA types, whereas the 4th ventricle becomes enlarged in SCA6 even in the early stage of disease. We suggest that these differences in clinical and MRI findings can be clues for accurate diagnosis before gene analysis.

(Clin Neurol 2014;54:473-479)

**Key words:** spinocerebellar ataxia (SCA), spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31), spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6), MRI

---

原著

脊髄小脳変性症の画像診断における  
voxel-based morphometry の有用性

田 中 伸 幸   南 里 和 紀   田 口 丈 士   田 中 紀 子  
藤 田 恒 夫   三 苫   博   川 田 明 広   水 澤 英 洋

**BRAIN and NERVE**

第 66 卷 第 6 号 別刷  
2014 年 6 月 1 日 発行

医学書院



## 脊髄小脳変性症の画像診断における voxel-based morphometry の有用性

田中伸幸<sup>1)\*</sup> 南里和紀<sup>1)</sup> 田口丈士<sup>1)</sup> 田中紀子<sup>1)</sup>  
藤田恒夫<sup>2)</sup> 三苫博<sup>3)</sup> 川田明広<sup>4)</sup> 水澤英洋<sup>5)</sup>

脊髄小脳変性症における voxel-based morphometry (VBM) を用いた画像診断の有用性について検討した。多系統萎縮症小脳型 (MSA-C) 9 例では、小脳半球・虫部に広範な灰白質萎縮を、中小脳脚・脳幹・小脳に著明な白質萎縮所見を認めた。SCA3 6 例では灰白質の萎縮は目立たず、中小脳脚・脳幹・小脳の著明な白質萎縮を認めた。DRPLA 2 例では脳幹、歯状核周辺の軽度白質萎縮所見を認め、小脳灰白質の萎縮は目立たなかった。SCA6 3 例、SCA31 2 例では小脳半球・虫部の灰白質萎縮が顕著であったが、中小脳脚・脳幹の白質萎縮は認められず、小脳半球歯状核近傍に対称性の白質萎縮を認めた。いずれの疾患についても VBM 所見は各疾患で知られている特徴的な病理学的な萎縮部位を反映すると考えられ、VBM は脊髄小脳変性症の診断に有用と考えられた。

voxel-based morphometry, MRI, 多系統萎縮症, 脊髄小脳変性症, 小脳失調

### はじめに

小脳萎縮をきたす疾患としては、多系統萎縮症、遺伝性脊髄小脳変性症、皮質性小脳萎縮症、その他、アルコール性、甲状腺機能低下、ビタミンE欠乏、自己免疫性小脳萎縮症などの二次性皮質性小脳萎縮症が挙げられる。このように小脳萎縮をきたす疾患・原因はさまざまであり、病理所見もそれぞれ異なる。

小脳萎縮症の診断は病歴、家族歴、神経診察、遺伝子検査、MRI (magnetic resonance imaging) や SPECT (single photon emission computed tomography) などの画像検査結果から総合的に行われる。しかし、通常の MRI 画像では診断が困難な場合が多い。Voxel-based morphometry (VBM) は MRI 脳画像か

ら灰白質と白質を分離・抽出し、それぞれの萎縮を定量的に評価することが可能である。筆者らは既に VBM と SPECT (easy Z-score imaging system : eZIS) を組み合わせることが、脊髄小脳変性症の診断に有用であることを報告している。今回、筆者らは多系統萎縮症小脳型 (cerebellar variant of multiple system atrophy : MSA-C) 9 例、脊髄小脳失調症 (spinocerebellar ataxia : SCA) 3 6 例、SCA6 3 例、SCA31 2 例、歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (dentatorubral-pallidoluyian atrophy : DRPLA) 2 例に VBM を施行したところ、特徴的な萎縮部位の差異を認め、VBM が脊髄小脳変性症の診断に有用と考えられたので報告する。

- 1) 東京医科大学八王子医療センター神経内科 (〒193-0998 東京都八王子市館町 1163)
- 2) 日立総合病院神経内科
- 3) 東京医科大学医学教育学
- 4) 東京都立神経病院脳神経内科
- 5) 東京医科歯科大学脳神経病態学

\*[連絡先] tanabu@nms.ac.jp

受付日：2013年7月24日、受理日：2013年10月25日

Table Summary of 22 patients with spinocerebellar degeneration

		Age (years)	Gender (Male/Female)	Duration of disorder (years)	Gait disorder
MSA-C	Probable	82	M	3	Walking impossible
		57	F	7	Walking only with accompanying person
		66	F	8	Walking only with accompanying person
	Possible	56	M	2	Walking impossible
		65	M	2	Walking without support
		73	M	3	Walking without support
		50	F	2	Walking without support
		70	F	3	Walking without support
		74	F	5	Walking without support
SCA3	55	M	5	Walking without support	
	61	M	8	Walking only with accompanying person	
	44	F	9	Walking without support	
	74	F	18	Walking without support	
	76	F	18	Walking impossible	
	78	F	11	Walking only with accompanying person	
SCA6	62	M	4	Walking without support	
	71	M	6	Walking without support	
	70	F	28	Walking impossible	
SCA31	70	M	10	Walking without support	
	80	F	10	Walking without support	
DRPLA	55	M	0	Walking without support	
	70	M	4	Walking without support	

## I. 対象と方法

対象は2005年以降、当院および関連施設を受診した小脳萎縮症患者のうち、遺伝子検査により遺伝性脊髄小脳変性症と診断された13例（SCA3 6例、SCA6 3例、SCA31 2例、DRPLA 2例）、また、MSA-C 9例である。MSA-Cの診断については、Gilmanら<sup>2)</sup>の診断基準でprobableの症例、またはpossible症例でMRI画像上明らかな橋の十字サインを認めるものとした。

上記患者において、VBM画像を用い灰白質萎縮、白質萎縮について検討した。VBM画像は、1.5テスラのMRIにて撮像し、撮像パラメータはスライス厚1mm、TR (repetition time) 11 msec、TE (echo time) 4.76 msec、加算回数1回とした。VBM画像解析については、早期アルツハイマー型認知症診断支援システムとして多用されているソフトウェアVoxel-based Specific Regional Analysis System for Alzheimer's Disease (VSRAD) advanceを利用した。VSRAD advanceでは、被験者のMRI脳画像の灰白質と白質を分離・抽出し、灰白質、白質それぞれで健常者平均画像と統計比較し、平均値からどれだけの標準偏差分離れて

いるかをZスコアで表している。例えばZスコアが2より大きい場合、平均値から標準偏差の2倍を超えた値を示し、Zスコアの程度は色調で表示される<sup>3)</sup>。

各疾患グループにおけるVBM画像における萎縮の差異の検討については、疾患グループ別にVBM画像をスーパーインポーズしそれぞれの平均像を比較した。また、わが国の小脳萎縮症患者の中で比較的患者数も多く、臨床上鑑別が困難なことも多いMSA-CとSCA3のVBM画像の比較を行うため、MSA-C 9例、SCA3 6例については、橋レベル、中脳レベルのスライスを用い、Zスコア「2」以上の萎縮を示す領域の面積（萎縮域面積）を比較した。統計処理についてはマン・ホイットニーのU検定により行い、 $P < 0.05$ を有意とみなした。

本研究は厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針に従い臨床計画書を作成し、学内倫理審査委員会で承認を得た。

## II. 結 果

各症例のMRIの撮像時における罹病期間、歩行重症度はTableに示した。MSA-C群（平均年齢65.9歳、平均罹病期間3.89年、重症度：独歩可能5人、介助歩

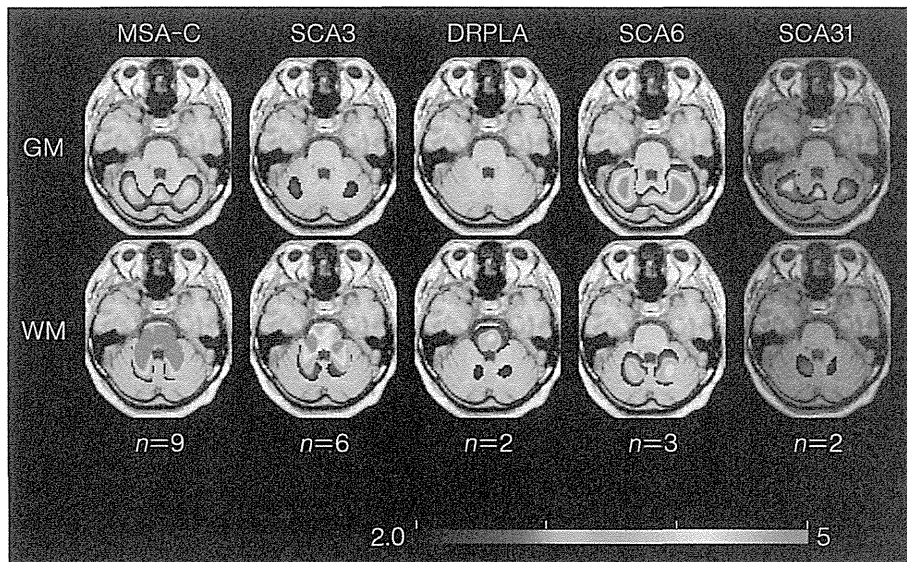


Fig. 1

Superimposed VBM findings at the cerebellopontine level for each disease. GM: gray matter, WM: white matter. The lower scale indicates the Z score.

In the MSA-C group ( $n=9$ ), gray matter atrophy in the cerebellum and prominent white matter atrophy in the brainstem and cerebellar hemispheres were observed. In the SCA3 group ( $n=6$ ), gray matter atrophy was not obvious in the cerebellum, whereas intense white matter atrophy was visual in the brainstem and cerebellar hemispheres. In both cases of DRPLA ( $n=2$ ), white matter atrophy was observed in the brainstem and surrounding the dentate nucleus, whereas gray matter atrophy of the cerebellum was not remarkable. In both the SCA6 group ( $n=3$ ) and the SCA31 group ( $n=2$ ), gray matter atrophy was prominent in the cerebellum; however, white matter atrophy was not found in the brainstem, whereas symmetric atrophy of white matter was found near the dentate nucleus.

行 2 人, 歩行不能 2 人) では, 小脳半球・虫部に広範な灰白質萎縮を認め, 萎縮の程度は虫部で強く, 特に前葉から後葉にかけて広範な灰白質萎縮が顕著であった。また, 中小脳脚・脳幹・小脳にかけて著明な白質萎縮所見を認めた。一方, SCA3 群 (平均年齢 64.7 歳, 平均罹病期間 11.5 年, 重症度: 独歩可能 3 人, 介助歩行 2 人, 歩行不能 1 人) では小脳半球・虫部の灰白質の萎縮は目立たず, 中小脳脚・脳幹・小脳の白質萎縮が著明であった。DRPLA 群 (平均年齢 67.5 歳, 平均罹病期間 2 年, 独歩可能 2 人) では, 脳幹, 歯状核周辺の軽度白質萎縮所見がみられたが, 小脳灰白質の萎縮は目立たなかった。SCA6 群 (平均年齢 67.7 歳, 平均罹病期間 12.7 年, 独歩可能 2 人, 歩行不能 1 人), SCA31 群 (平均年齢 75 歳, 平均罹病期間 10 年, 独歩可能 2 人) では小脳半球・虫部の灰白質萎縮が顕著であったが, 中小脳脚・脳幹の白質萎縮はみられず, 小脳半球歯状核近傍に対称性の白質萎縮を認めた (Fig. 1, 2)。

MSA-C 群, SCA3 群についての, 中小脳脚・脳幹・

小脳の白質萎縮域面積の比較では, 萎縮域面積は MSA-C 群  $975.8 \pm 109.5 \text{ mm}^2$ , SCA3 群  $840.8 \pm 123.7 \text{ mm}^2$  で有意差を認めなかった。しかし, 橋レベル, 中脳レベルの小脳灰白質萎縮域面積の比較では, 橋レベルで MSA-C 群  $1,462 \pm 262.0 \text{ mm}^2$ , SCA3 群  $473.2 \pm 129.5 \text{ mm}^2$ , 中脳レベルで MSA-C 群  $472.3 \pm 151.7 \text{ mm}^2$ , SCA3 群  $61.0 \pm 31.4 \text{ mm}^2$  であり, MSA-C 群で有意に灰白質萎縮が高度であった (Fig. 3)。また, 中小脳脚・脳幹・小脳の白質萎縮域面積については有意差を認めなかったが, 萎縮の程度については MSA-C 群では中小脳脚・脳幹・小脳に Z スコア 5 の高度萎縮を示したのに対し, SCA3 では Z スコア 3~4.5 程度の中等~高度萎縮所見であった (Fig. 1)。

### III. 考 察

小脳萎縮症の鑑別・病型分類には MRI, 脳血流シンチグラフィが有用とされるが, 通常の撮像法では小脳

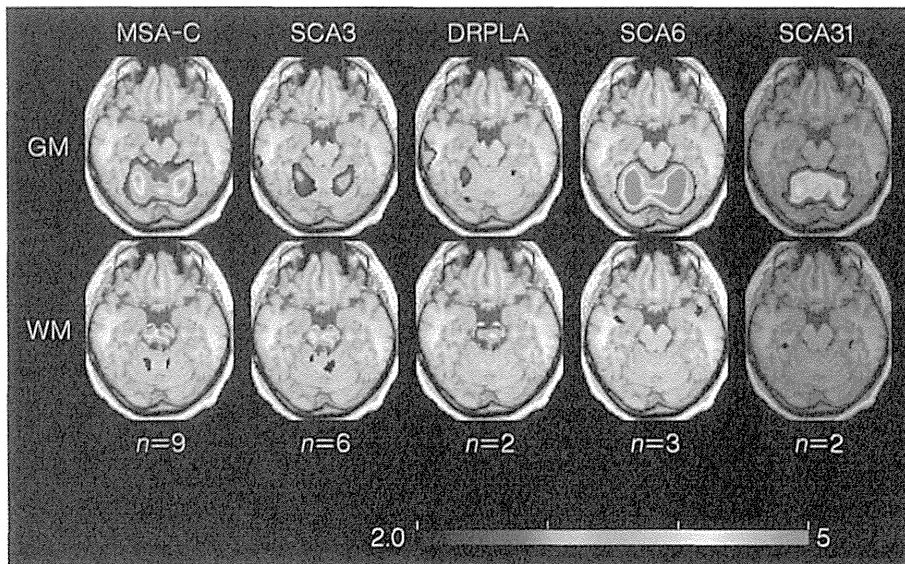


Fig. 2

Superimposed VBM findings at the midbrain level for each disease (9 patients with MSA-C, 6 with SCA3, 3 with SCA6, 2 with SCA31, and 2 with DRPLA). GM: gray matter, WM: white matter. The scale at the bottom of the figure indicates the Z score. In MSA-C, SCA6, and SCA31 groups, intense GM atrophy was observed in the anterior lobe of the cerebellum.

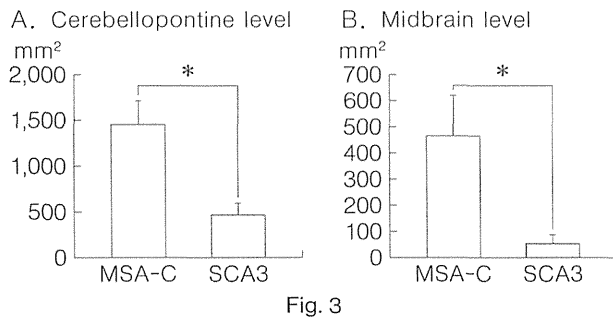


Fig. 3

Atrophic area of cerebellar gray matter in the MSA-C and SCA3 patient groups. A: At the level of the pons. B: At the level of the midbrain. The atrophic area of cerebellar gray matter in the MSA-C group is significantly larger than that in the SCA3 group at the level of the pons and midbrain. \*:  $P < 0.05$

萎縮の診断・病型分類が困難な場合も多く、初期には予後良好な皮質性小脳萎縮症と診断された患者が、のちに予後不良な MSA-C と診断が変更されることもある。このため、小脳萎縮症の診断をより正確に行うことができる画像診断法を確立することが重要である<sup>1)</sup>。

VSRAD advance は、早期アルツハイマー型認知症診断支援システムとして、MRI 三次元 T<sub>1</sub> 強調画像で灰白質の萎縮を数値解析することができるソフトウェアであるが、対象部位の容積を測定するには VBM が

利用されている。VBM では MRI 脳画像から灰白質と白質を分離・抽出し、それぞれの萎縮を定量的に評価することが可能であり、脊髄小脳変性症の病型により所見が異なると報告されている<sup>1)</sup>。Hauser ら<sup>4)</sup> は MSA-C 患者において VBM で萎縮所見を検討したところ、延髄、橋を含めた脳幹部、小脳虫部、小脳半球に広範な萎縮所見を認めたと報告し、Lukas ら<sup>5)</sup> は SCA6 9 例、SCA3 9 例について検討し、SCA6 では小脳半球・虫部の灰白質萎縮を認めたと報告したが白質萎縮を認めず、SCA3 では橋・中小脳脚の白質萎縮を認めたと報告している。また、Goel ら<sup>6)</sup> は SCA1, SCA2, SCA3 について検討し、SCA1, SCA2 は SCA3 に比し小脳半球の灰白質萎縮が高度であることを示し、これら脊髄小脳変性症の萎縮所見は罹病期間や CAG リピート数と相関しなかったと述べている。

筆者らは脊髄小脳変性症各病型について、VSRAD advance による VBM を用い萎縮所見を検討した。MSA-C, SCA3 について比較したところ、萎縮面積については両群間で中小脳脚・脳幹・小脳に同程度の著明な白質萎縮を認めた。また、小脳灰白質萎縮については、SCA3 は軽度であったが MSA-C では SCA3 に比べ有意に広範な萎縮を呈した。両群間で、年齢、重症度には有意な差はなく、罹病期間は SCA3 が MSA-C に比し長期であるにもかかわらず、MSA-C では SCA3 より

も高度な小脳灰白質萎縮所見を認めた。

また、症例数が少なく参考所見ではあるが、DRPLAでは脳幹・小脳の白質萎縮所見を、SCA6, SCA31では、小脳半球・虫部の上面に強い灰白質萎縮、小脳半球の白質萎縮所見を認めるなど、各病型により特徴的な所見を捉えることができた。

以下に、今回検討した脊髄小脳変性症各病型の報告されている病理所見についてまとめ、今回のVBM所見と対比する。

MSA-Cの病理については、橋核小脳求心系変性により脳幹・中小脳脚に白質の萎縮が起こり、かつプルキンエ細胞の変性による灰白質萎縮も起こるが、萎縮の程度は灰白質よりも白質のほうに強く<sup>7)</sup>、また灰白質萎縮については小脳半球に比し虫部に強いと報告されている<sup>4)</sup>。VBMでは、著明な脳幹・中小脳脚・小脳にかけての白質萎縮所見を認め、かつ、小脳灰白質にも白質萎縮よりは軽いが明瞭な萎縮所見を認めており、MSA-Cに特徴的な病理学的所見を反映していると考えられた。

SCA3の病理所見については、下オリブ核変性を伴わない脊髄小脳求心系変性があり、小脳萎縮は小脳虫部に目立ち、これは、そこに投射する脊髄小脳求心系線維群によって構成される小脳白質の変性による萎縮であり、灰白質の萎縮は軽度であると報告されている<sup>8)</sup>。歯状核、橋核、歯状核赤核系、黒質、淡蒼球（特に内節）、視床下核の軽度から中等度の神経細胞脱落を特徴とし<sup>9)</sup>、また、軽度から中等度の橋核小脳求心系変性も加わる<sup>10)</sup>。VBMでは、MSAほどではないが、脳幹・中小脳脚・小脳にかけての白質萎縮所見を認めるが、小脳灰白質の萎縮所見は極軽度であり、やはり病理所見を反映していた。しかし、VBMでは、橋核、黒質などの脳幹灰白質の萎縮所見は描出されなかった。

DRPLAについては、病名が示すように、歯状核-赤核系および淡蒼球-ルイ体（視床下核）系の変性を基本病変とするものであり、特に歯状核と淡蒼球外節に高度な変性像を示し、脳幹被蓋の萎縮を伴ってくる。小脳歯状核では、神経細胞の脱落が明らかであるが、歯状核の周囲および小脳半球白質には明らかな変化はみられない。脳幹部は中脳水道や第四脳室の拡大を伴って明らかに萎縮性であるが、組織所見は乏しく軸索萎縮が主体をなすもので軸索変性は生じていない<sup>11,12)</sup>。VBMでは、中小脳脚の萎縮を認めず、歯状核周囲の白質萎縮所見も軽度であり、かつ小脳灰白質萎縮所見を認めず、上記病理所見を反映していると思われた。

SCA6はプルキンエ細胞の変性が主体であり、小脳系の変性はほぼ小脳皮質に限られ、そこでは虫部優位の病

変分布をとることが多く、半球外側にいくほど病変は軽くなり、上面に強い萎縮像を示す。また、随伴して歯状核にも軽度の病理変化が生じる<sup>13)</sup>。SCA31においてもプルキンエ細胞の変性は小脳前葉に強く、後葉の上面は軽度である。また歯状核の中等度のアストログリオシスが起ると報告されている<sup>14)</sup>。VBM所見では、小脳灰白質の著明な萎縮、また歯状核周囲の白質萎縮所見を認めるなど、病理所見を反映していた。

本研究では、VSRAD advanceによるVBMを用い、脊髄小脳変性症各疾患の萎縮所見について比較検討した。同画像解析はMSA-CとSCA3の鑑別に有用であることが示され、各疾患群における病理所見を反映した萎縮像を呈し、脊髄小脳変性症の診断・病型分類に有用である可能性が示された。今回の検討で用いた症例数は少数であり、今後、症例数を増やし、さらに詳細な検討を行うことが望まれる。

## 文 献

- 1) Nanri K, Koizumi K, Mitoma H, Taguchi T, Takeguchi M, et al: Classification of cerebellar atrophy using voxel-based morphometry and SPECT with an easy Z-score imaging system. *Intern Med* 49: 535-541, 2010
- 2) Gilman S, Wenning GK, Low PA, Brooks DJ, Mathias CJ, et al: Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 71: 670-676, 2008
- 3) Hirata Y, Matsuda H, Nemoto K, Ohnishi T, Hirao K, et al: Voxel-based morphometry to discriminate early Alzheimer's disease from controls. *Neurosci Lett* 382: 269-274, 2005
- 4) Hauser TK, Luft A, Skalej M, Nägele T, Kircher TT, et al: Visualization and quantification of disease progression in multiple system atrophy. *Mov Disord* 21: 1674-1681, 2006
- 5) Lukas C, Schöls L, Bellenberg B, Rüb U, Przuntek H, et al: Dissociation of grey and white matter reduction in spinocerebellar ataxia type 3 and 6: a voxel-based morphometry study. *Neurosci Lett* 408: 230-235, 2006
- 6) Goel G, Pal PK, Ravishankar S, Venkatasubramanian G, Jayakumar PN, et al: Gray matter volume deficits in spinocerebellar ataxia: an optimized voxel based morphometric study. *Parkinsonism Relat Disord* 17: 521-527, 2011
- 7) 永井真貴子, 佐久間良: 非遺伝性SCD (OPCA・SDS・SND・LCCA). 阿部康二 (編): 新しいSCDの臨床——脊髄小脳変性症の臨床. 新興医学出版社, 東京, 1996, pp 39-45
- 8) Seidel K, Siswanto S, Brunt ER, den Dunnen W, Korff HW, et al: Brain pathology of spinocerebellar ataxias.

- Acta Neuropathol 124: 1-21, 2012
- 9) 渡辺光法: Machado-Joseph 病. 阿部康二 (編): 新しい SCD の臨床 — 脊髄小脳変性症の臨床. 新興医学出版社, 東京, 1996, pp15-22
- 10) 高橋昭喜: 脊髄小脳変性症の MRI. 阿部康二 (編): 新しい SCD の臨床 — 脊髄小脳変性症の臨床. 新興医学出版社, 東京, 1996, pp68-80
- 11) 今野秀彦: 遺伝性脊髄小脳変性症の病理. 阿部康二 (編): 新しい SCD の臨床 — 脊髄小脳変性症の臨床. 新興医学出版社, 東京, 1996, pp59-67
- 12) Koide R, Onodera O, Ikeuchi T, Kondo R, Tanaka H, et al: Atrophy of the cerebellum and brainstem in dentatorubral pallidolusian atrophy: influence of CAG repeat size on MRI findings. *Neurology* 49: 1605-1612, 1997
- 13) Ishikawa K, Watanabe M, Yoshizawa K, Fujita T, Iwamoto, H et al: Clinical, neuropathological, and molecular study in two families with spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67: 86-89, 1999
- 14) Owada K, Ishikawa K, Toru S, Ishida G, Gomyoda M, et al: A clinical, genetic, and neuropathologic study in a family with 16q-linked ADCA type III. *Neurology* 65: 629-632, 2005

---

BRAIN and NERVE 66(6): 699-704, 2014 *Original Article*

**Title**                    **The Utility of Voxel-based Morphometry in the Diagnosis of Spinocerebellar Degeneration**

**Authors**                Nobuyuki Tanaka<sup>1)\*</sup>, Kazunori Nanri<sup>1)</sup>, Takeshi Taguchi<sup>1)</sup>, Noriko Tanaka<sup>1)</sup>, Tsuneo Fujita<sup>2)</sup>, Hiroshi Mitoma<sup>3)</sup>, Akihiro Kawata<sup>4)</sup>, Hidehiro Mizusawa<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Neurology, Tokyo Medical University Hachioji Medical Center, 1163 Tatemachi, Hachioji, Tokyo 193-0998, Japan; <sup>2)</sup>Department of Neurology, Hitachi General Hospital; <sup>3)</sup>Department of Medical Education, Tokyo Medical University; <sup>4)</sup>Department of Neurology, Tokyo Metropolitan Neurological Hospital; <sup>5)</sup>Department of Neurology and Neuroscience, Tokyo Medical and Dental University

\*E-mail: tanabu@nms.ac.jp

**Abstract**                We evaluated atrophic sites in the brainstem and cerebellum in the patients with spinocerebellar degeneration by using voxel-based morphometry (VBM). Gray matter atrophy was found extensively in both the cerebellar hemispheres and vermis of subjects presenting the cerebellar variant of multiple system atrophy (MSA-C;  $n=9$ ). In addition, remarkable white matter atrophy was observed in the middle cerebellar peduncle, brainstem, and cerebellar hemispheres. In contrast, gray matter atrophy was not apparent in the cerebellar hemispheres or vermis of subjects in the SCA3 group ( $n=6$ ), whereas intense white matter atrophy was visible in the middle cerebellar peduncle, brainstem, and cerebellar hemispheres. White matter atrophy was also observed in the brainstem and surrounding the dentate nucleus in both cases of dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) ( $n=2$ ), whereas gray matter atrophy of the cerebellum was not remarkable. In both the SCA6 group ( $n=3$ ) and the SCA31 group ( $n=2$ ), gray matter atrophy was prominent in the cerebellar hemispheres and vermis; however, white matter atrophy was not found in the middle cerebellar peduncle and brainstem, whereas symmetric atrophy of white matter was found in the vicinity of the dentate nucleus. In each of these diseases, VBM findings were consistent with the pathological findings; therefore, VBM can be considered a useful tool for the diagnosis of spinocerebellar degeneration.

**Key words**              **voxel-based morphometry, magnetic resonance imaging (MRI), multiple system atrophy, spinocerebellar ataxia (SCA), cerebellar ataxia**

(Received July 24, 2013; Accepted October 25, 2013; Published June 1 2014)

---

# Characteristic RNA foci of the abnormal hexanucleotide GGCCUG repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 36 (Asidan)

W. Liu<sup>a</sup>, Y. Ikeda<sup>b</sup>, N. Hishikawa<sup>a</sup>, T. Yamashita<sup>a</sup>, K. Deguchi<sup>a</sup> and K. Abe<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama; and

<sup>b</sup>Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Gunma University, Gunma, Japan

## Keywords:

Asidan, hexanucleotide GGCCUG expansion, RNA foci, spinocerebellar ataxia

Received 21 January 2014

Accepted 5 May 2014

**Background and purpose:** Spinocerebellar ataxia type 36 (SCA36), also called Asidan, is an autosomal-dominant neurodegenerative disorder identified as a hexanucleotide GGCCTG repeat expansion in the first intron 1 of the *NOP56* gene. In the present study, for the first time an autopsy sample from an Asidan patient was examined and cytoplasmic inclusions and (GGCCUG)<sub>n</sub> repeat RNA foci were detected.

**Methods:** Hematoxylin and eosin staining, immunohistochemical staining, as well as fluorescence *in situ* hybridization were used to investigate the cytoplasmic inclusions of ubiquitin and p62 and the (GGCCUG)<sub>n</sub> repeat RNA foci.

**Results:** The present study showed both ubiquitin- and p62-positive inclusions in the cytoplasm of the inferior olivary nucleus of the Asidan patient, (GGCCUG)<sub>n</sub> RNA foci in neuronal nuclei of the cerebrum, cerebellum, inferior olive, spinal cord and temporal muscle, and three types of RNA foci, i.e. single small, multiple small and giant. Of interest is that the giant RNA foci, nearly 10 μm in diameter, that were detected in Purkinje cells, spinal motor neurons and most frequently in the inferior olivary nucleus, may be responsible for pivotal clinical symptoms of Asidan.

**Conclusions:** The present study is the first report to show neuronal cytoplasmic inclusion bodies and giant RNA foci in an Asidan patient. The relationships between the giant RNA foci and neurodegeneration have yet to be studied.

## Introduction

Spinocerebellar ataxia (SCA) is a heterogeneous group of autosomal-dominant neurodegenerative disorders and consists of more than 30 subtypes [1]. SCA type 36 (SCA36) is a novel dominant disorder which was recently identified as a hexanucleotide GGCCTG repeat expansion in the first intron 1 of the nucleolar protein 56 (*NOP56*) gene [2]. Because most patients were originally found along the Asida River located in the western part of Japan, the disorder was named 'Asidan'. Other than Japan, the same mutation has also been reported in northwestern Spain [3].

The mean onset of an Asidan patient is at 53.1 years of age with spinocerebellar symptoms starting in truncal ataxia, followed by progressive dysarthria, limb ataxias, hyperreflexia, and tongue fasciculation and atrophy [2,4]. It was recently reported by us that Asidan patients also showed unique cognitive and affective characteristics different from other hereditary SCAs [5]. It was previously shown that the number of GGCCTG repeats in Asidan patients ranged from 1700 to 2300, and that (GGCCUG)<sub>n</sub> RNA foci were observed in their lymphoblastoid cell lines [2].

Although the detailed pathogenic mechanism of the (GGCCUG)<sub>n</sub> RNA repeat expansion in Asidan is not yet fully elucidated, the presence of RNA foci may be related to an interaction with RNA-binding proteins. In the present study, an autopsy sample from an Asidan patient was examined mainly by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to detect the (GGCCUG)<sub>n</sub> repeat RNA foci.

Correspondence: K. Abe, Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 2-5-1 Shikatacho, Okayama 700-8558, Japan (tel.: +81 86 235 7365; fax: +81 86 235 7368; e-mail: gmd422020@s.okayama-u.ac.jp).

## Patients and methods

### Subjects and tissue samples

The present Asidan (SCA36) patient developed truncal ataxia at 57 years of age and died when 86 years old (29 years' duration), corresponding to case II-4 in Pedigree E in our previous report [4]. His cerebrum, cerebellum, brainstem, upper spinal cord and temporal muscle were obtained for subsequent analyses. Four healthy subjects served as negative control for the Asidan mutation.

The family members of both the Asidan patient and the control subject provided informed written consent prior to enrollment in the study, which was approved by the Ethics Committees/Institutional Review Board of Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences.

### Neuropathology

For neuropathological examination, paraffin-embedded sections of 4.5  $\mu\text{m}$  thickness were visualized by hematoxylin and eosin (HE) staining. Immunohistochemical staining was performed with ubiquitin (1:2000; Dako, Glostrup, Denmark) and p62 (1:1000; BD Transduction Laboratories, Sparks, MD, USA). The number of nerve cells in the inferior olivary nucleus per 1  $\text{mm}^2$  was counted in 10 microscopic fields (200 $\times$  magnification) of tissues from the Asidan patient and three healthy controls (who died when 85 or 86).

### Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

To detect the repeated RNA sequence of GGCCUG in the tissues of the Asidan patient, FISH was carried out as per our previous report [2]. To reduce autofluorescence in the sections of frozen tissues, these were pretreated with Sudan Black B [6]. Whether the (GGCCUG)<sub>n</sub> foci appeared in the nuclei was assessed using a Cy3-labeled C(CAGGCC)<sub>2</sub>CAG LNA oligonucleotide probe (probe A). Two other Cy3-labeled oligonucleotide probes served as negative controls: G(CAGGCG)<sub>2</sub>CAG (probe B) with one nucleotide different from probe A; CUG(GGCCUG)<sub>2</sub>G (probe C) to detect the antisense sequence of (GGCCUG)<sub>n</sub>.

For DNase treatment, tissues were pre-hybridized and then treated with 1 U/ $\mu\text{l}$  of RNase-free DNase I recombinant (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) in incubation buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.9)

for 1.5 h at 37°C. For RNase treatment, tissues were pre-hybridized and then treated with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of DNase-free RNase (Roche Applied Science) in 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) for 1.5 h at 37°C. After a wash with 1 $\times$  PBS/diethylpyrocaborate, the sections were treated with 1 ng/ $\mu\text{l}$  of oligonucleotide probe A, B or C overnight at 37°C. On the next day, the sections were washed with 30% formamide/2 $\times$  saline sodium citrate (SSC) for 30 min at 65°C, and then washed again with 1 $\times$  SSC for 30 min at room temperature. The sections were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). To calculate the percentage of RNA-foci-positive nuclei, 10 contiguous microscope fields (630 $\times$  magnification) in each tissue were used, the number of RNA-foci-positive nuclei and total cells were counted, and finally the percentage of RNA-foci-positive nuclei per 1  $\text{mm}^2$  in Asidan patient tissues was computed.

### Combination of FISH and immunofluorescent analysis (IFA)

To combine FISH with IFA, the sections were first washed with 1 $\times$  SSC and then blocked with blocking buffer (3% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100 in PBS) for 1 h. They were incubated overnight at 4°C with primary antibodies in the blocking buffer. To ascertain the types of RNA-foci-positive cells in the cerebrum, a combination of FISH and IFA was performed in frontal cortex tissues using several nerve markers: anti-NeuN antibody for neurons, anti-GFAP antibody for astrocytes, anti-Iba1 antibody for microglia and anti-CNPase antibody for oligodendrocytes. The primary antibodies used in this study were monoclonal anti-mouse NeuN antibody (1:500; Millipore, Billerica, MA, USA), monoclonal anti-mouse CNPase antibody (1:100; Millipore), polyclonal anti-goat Iba1 antibody (1:100; Abcam, Tokyo, Japan), polyclonal anti-rabbit ubiquitin antibody (1:200; Dako) and monoclonal anti-mouse p62 (1:1000; BD Transduction Laboratories). On the following day, sections were washed three times with PBS and incubated with a secondary antibody, namely Alexa Fluor 488 labeled donkey anti-mouse IgG (1:500), donkey anti-goat IgG (1:500) or donkey anti-rabbit IgG (1:500), for 2 h at room temperature. The sections were then rinsed three times with PBS and the nuclei were stained with DAPI. A confocal microscope equipped with argon and HeNe1 lasers (Zeiss LSM 510; CarlZeiss, Jena, Germany) was used to capture fluorescent images.



## Results

### HE and immunohistochemical staining

A neuropathological examination showed that the brain weighed 1080 g. The cerebrum and cerebellum were especially atrophic. Microscopically, neuronal loss with astrogliosis was observed in the Purkinje cell layer and the dentate nuclei of the cerebellum, hypoglossal nucleus and anterior horn at the upper cervical cord. In the cerebral frontal cortex and cerebellum, no neuronal inclusion was observed in nerve cell bodies (Fig. 1A, a, b), whilst eosinophilic neuronal inclusions were observed in the inferior olivary nucleus where neuronal cells were preserved (Fig. 1A, c, black arrowheads). There were fewer nerve cells in the inferior olivary nucleus of the Asidan patient than in the healthy controls (Fig. 1B).

Immunohistochemical staining of ubiquitin and p62 in the cerebrum, cerebellum and inferior olivary nucleus is shown in Fig. 1A, d–f, g–i, respectively. In the cerebral frontal cortex and cerebellum, neither ubiquitin-positive (Fig. 1A, d, e) nor p62-positive (Fig. 1A, g, h) inclusions were observed. In the inferior olivary nucleus, however, eosinophilic neuronal cytoplasmic inclusions were positive for both ubiquitin (Fig. 1A, f, black arrowhead) and p62 (Fig. 1A, i, black arrowhead), but no intranuclear inclusion was found in the central nervous system.

### Probe specificity

Figure 2 shows the FISH results in Asidan patient and control human brains (cerebral frontal cortex). In the Asidan brain (Fig. 2A), RNA foci were observed with probe A in the frontal cortex cell nuclei (Fig. 2A, top panels, left, arrow), whilst such RNA foci were not detected with probes B (Fig. 2A, middle panels, left) or C (Fig. 2A, bottom panels, left). No RNA foci were detected with probes A, B and C in control human brain frontal cortex cell nuclei (Fig. 2A, right).

Similar to the DNase- or RNase-free study with probe A (Fig. 2B, top, arrows), DNase-treated Purkinje cell nuclei still displayed RNA foci with probe A (Fig. 2B, middle panels, arrows) but they were lost after treatment with RNase (Fig. 2B, bottom panels).

### FISH analyses of Asidan patient

As shown in Fig. 3, (GGCCUG)<sub>n</sub> RNA foci were observed in a variety of Asidan patient tissues. In addition to the cerebrum (frontal and occipital cortices) and three layers of the cerebellum (molecular,

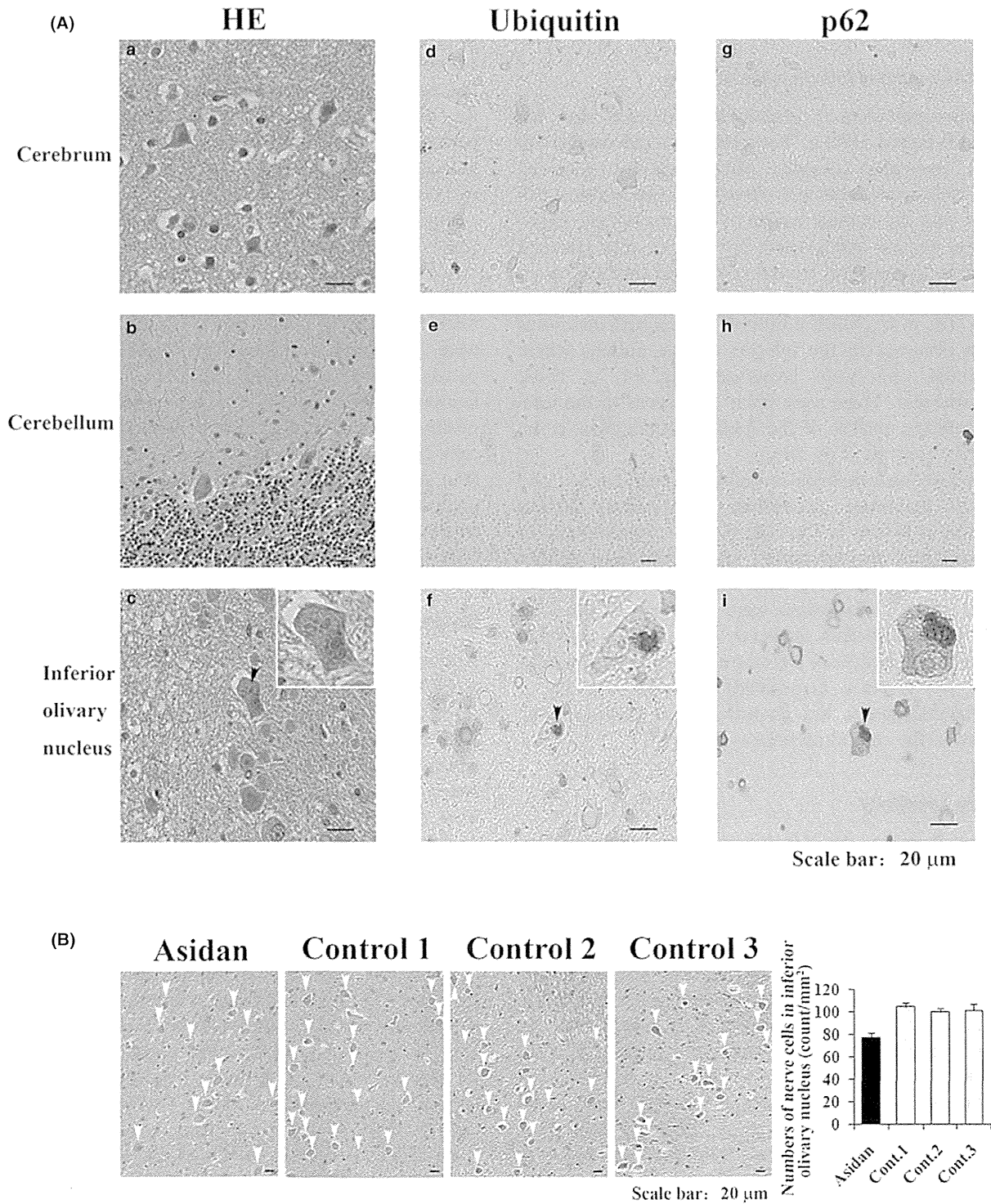
Purkinje and granular), RNA foci were also detected in inferior olivary neurons, spinal motor neurons and temporal muscles (Fig. 3, arrows). Table 1 shows the percentage of RNA-foci-positive nuclei. Amongst the tissues, Purkinje cell nuclei showed the highest percentage of RNA foci (33.3%), followed by muscular nuclei (18.4%) and cerebral frontal cortex (6.7%).

Figure 4 shows the double staining of probe A (red) with nerve cell markers (Fig. 4A, green) in the cerebral frontal cortex, and ubiquitin (Fig. 4B, green) and p62 (Fig. 4C, green) in the inferior olivary nucleus of the Asidan patient. (GGCCUG)<sub>n</sub> RNA foci were colocalized with NeuN and DAPI (Fig. 4A, top panels, arrows), suggesting that RNA foci appeared in neuronal cells. No RNA foci were detected in GFAP-positive cells (Fig. 4A, second panels), Iba1-positive cells (Fig. 4A, third panels) or CNPase-positive cells (Fig. 4A, bottom panels), indicating that no RNA foci appeared in astrocytes, microglia or oligodendrocytes. Moreover, there was no colocalization of RNA foci in cells with ubiquitin (Fig. 4B) or p62 (Fig. 4C).

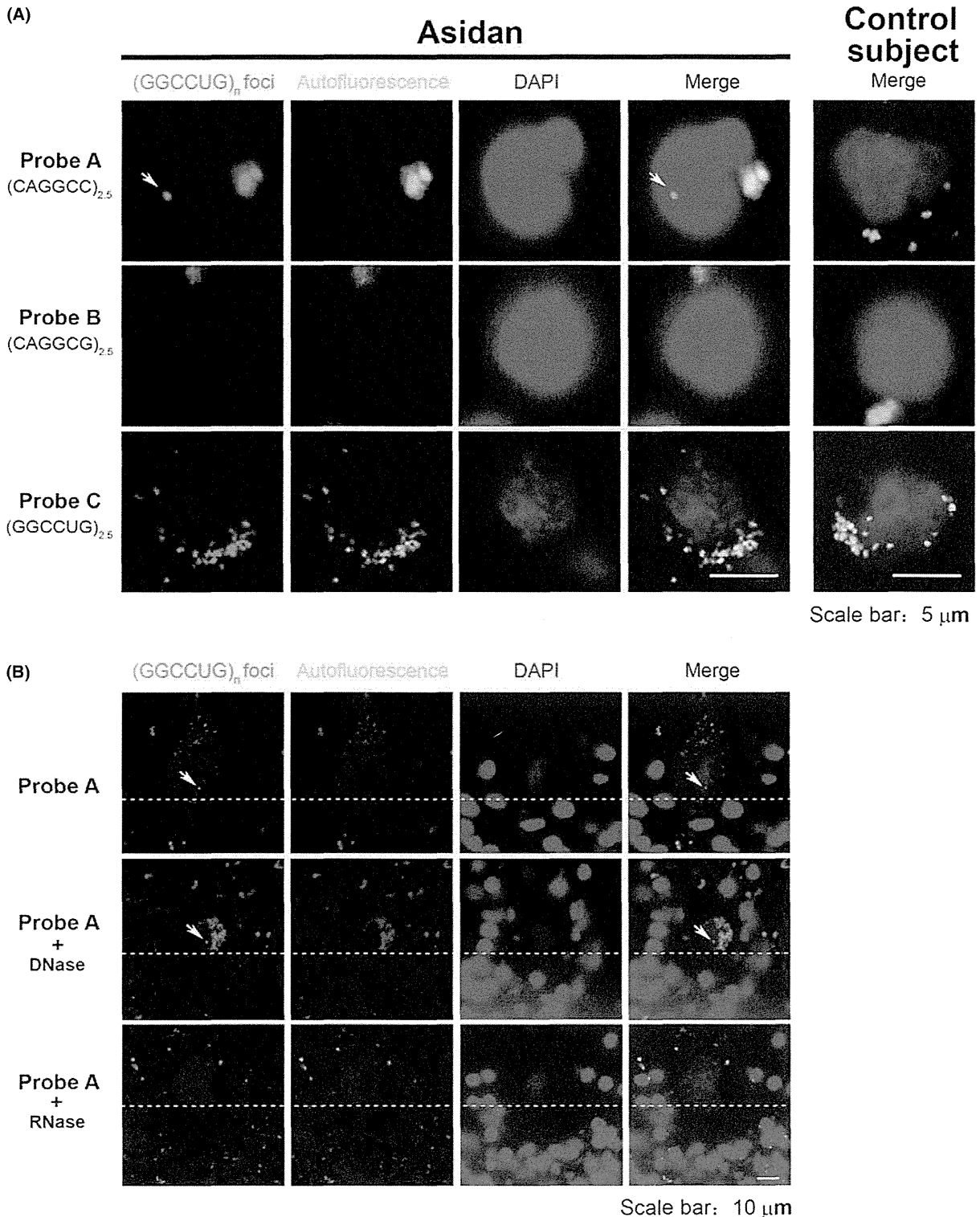
### Morphology of (GGCCUG)<sub>n</sub> RNA foci

Asidan tissues showed a variety of morphologies of (GGCCUG)<sub>n</sub> RNA foci which were classified into three types, i.e. single small, multiple small and giant (Fig. 5A). Most small foci were <1 µm in diameter, whilst the giant foci were more than 3–4 µm and nearly 10 µm in diameter within the nuclei. There were three to seven multiple small RNA foci in one nucleus. In the Asidan cerebellum, all three types of RNA foci were observed in Purkinje cells (Fig. 5A, top panels, arrows). However, only single small foci were found in molecular and granular layers but not multiple small or giant RNA foci. These three types of RNA foci were also observed in spinal motor neurons (Fig. 5A, middle panels, arrows) and in the inferior olivary nucleus (Fig. 5A, bottom panels, arrows). The Asidan cerebral frontal cortex and temporal muscle mostly showed single small or multiple small RNA foci in a single nucleus. Giant foci were most frequently observed in inferior olivary neurons.

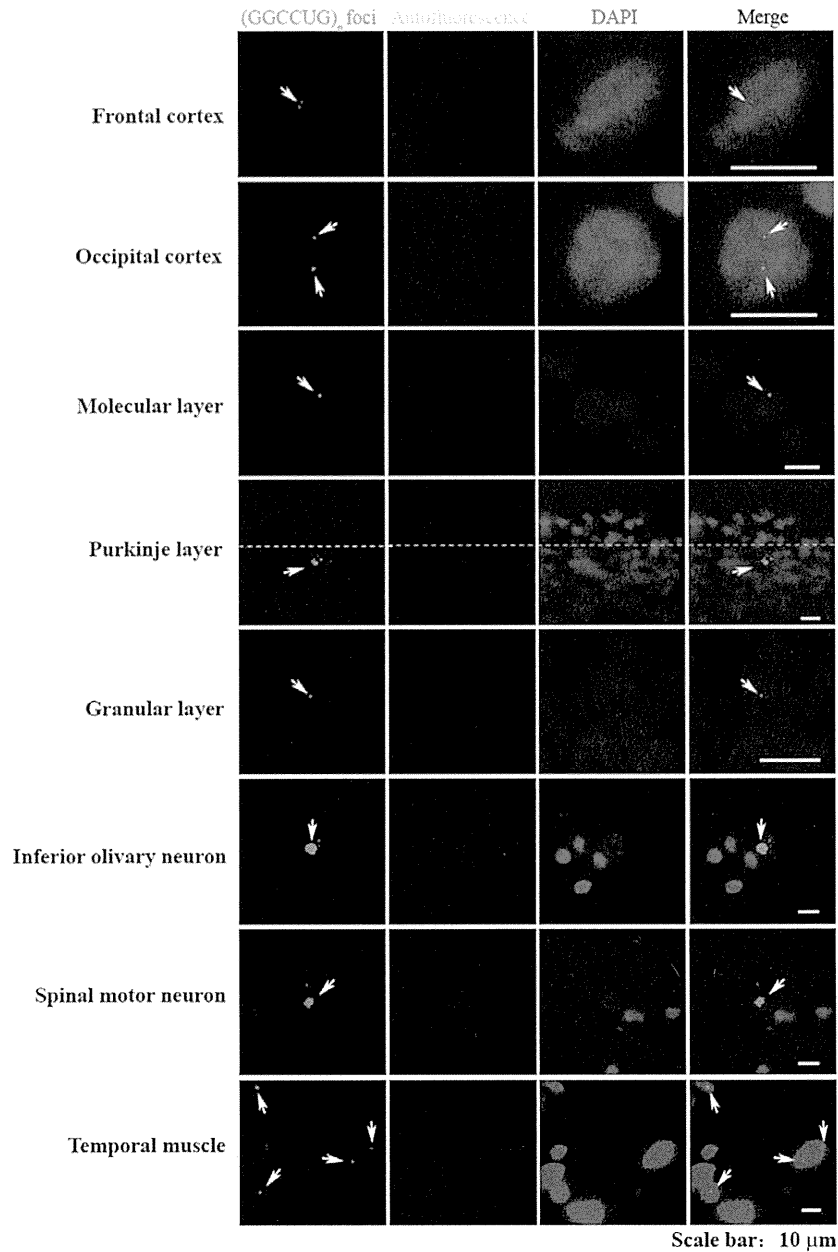
In order to confirm whether the giant foci that appeared in the nuclei were actually RNA foci or not, FISH analysis with DNase and RNase was once again performed with probe A in tissue sections of the inferior olive. As shown in Fig. 5B (arrows), giant foci were still positive in inferior olivary neurons after DNase treatment (middle panels) but disappeared completely following treatment with RNase (bottom panels). Thus, giant signals corresponded to RNA foci.



**Figure 1** HE and immunohistochemical staining for the Asidan patient and healthy controls. (A, a–c) HE staining of the cerebrum, cerebellum and inferior olivary nucleus of the Asidan patient. Black arrowheads indicate eosinophilic neuronal inclusions. (A, d–f) Ubiquitin staining of the cerebrum (d), cerebellum (e) and inferior olivary nucleus (f) of the Asidan patient. Black arrowheads indicate ubiquitin-positive staining. (A, g–i) p62 staining of the cerebrum (g), cerebellum (h) and inferior olivary nucleus (i) of the Asidan patient. Black arrowheads indicate p62-positive staining. (B) Quantitative analysis of the number of nerve cells in the inferior olivary nucleus in the Asidan patient and in three healthy controls. White arrowheads indicate typical nerve cells in the tissues. Scale bar 20  $\mu$ m.



**Figure 2** RNA FISH in the Asidan patient and control subject (cerebral frontal cortex). (A) Cy3-labeled antisense probe A detects RNA foci in the Asidan patient (top panels, left, arrows). No RNA foci were detected in the Asidan patient with a different probe, probe B (middle panels, left), or with a sense probe C (bottom panels, left). No RNA foci were detected with probe A, B or C (right) in the control subject frontal cortex. Scale bar 5  $\mu$ m. (B) Cy3-labeled probe A detected RNA foci in Purkinje cell nuclei of the Asidan patient (top panels, arrows), also after treatment with DNase (middle panels, arrows), but no positive signals existed after RNase treatment (bottom panels). Scale bar 10  $\mu$ m.



**Figure 3** Disposition of (GGCCUG)<sub>n</sub> RNA foci in the Asidan patient. Localization of (GGCCUG)<sub>n</sub> RNA foci in the nuclei of the cerebrum, cerebellum, brainstem, inferior olive, spinal cord and temporal muscle in the Asidan patient (arrows). Scale bar 10 μm.

**Table 1** Percentage of RNA-foci-positive nuclei in Asidan patient tissues

Area		Percentage of RNA-foci-positive nuclei
Cerebrum cortex	Frontal cortex	6.7% (in all nuclei)
	Occipital cortex	5.4% (in all nuclei)
Cerebellum cortex	Molecular layer	6.3% (in all nuclei)
	Purkinje layer	33.3% (in all Purkinje nuclei)
	Granular layer	3.9% (in all nuclei)
Muscle	Temporal muscle	18.4% (in all nuclei)

### Discussion

This is the first report to show neuronal cytoplasmic inclusion bodies in an Asidan patient. These eosinophilic inclusions were immunoreactive for ubiquitin and p62 (Fig. 1A). The site of predilection was the inferior olivary nucleus. On the other hand, RNA FISH analysis showed (GGCCUG)<sub>n</sub> RNA foci in the nuclei of the cerebrum, cerebellum, brainstem, spinal cord and temporal muscle. Within nerve cells, RNA foci were predominantly located