

1. NBIA の網羅的診断システム構築
2. PD における歩行解析
3. シヌクレイノパチー剖検脳における SYN オリゴマー

[班員] 氏名： 戸田 達史

所属： 東京大学大学院医学系研究科 神経内科学  
神戸大学大学院医学研究科 分子脳科学

## A. 研究目的

Neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA) は希少疾患であり、正確な診断の上での臨床情報収集、バイオマーカー探索が求められる。非典型例も多く存在するため、臨床情報のみでの確定診断は困難であり、網羅的な遺伝子診断システムの構築ができれば有用となる。

パーキンソン病の歩行障害の定量的測定系を構築し定量的に歩行障害の把握のためにどのような測定を行うべきか検討した。

パーキンソン病 (PD) や多系統萎縮症 (MSA) はシヌクレイン ( SYN) の凝集体が神経細胞やグリア細胞に蓄積することにより発症すると考えられている。近年、細胞実験や動物実験において SYNの早期凝集体である SYNオリゴマーの神経毒性が報告されているが、脳組織上において SYNオリゴマーの同定や分布の検討は困難であった。本研究の目的はシヌクレイノパチーの剖検脳における SYNオリゴマーの分布を明らかにすることである。

## B. 研究方法

ターゲットキャプチャーには、疾患遺伝子パネルの中で NBIA 関連の遺伝子を多くカバーしている focused exome (Agilent) を選択した。設計上、CP 遺伝子 exon9、FTL 遺伝子 exon4、および GTPBP2 遺伝子はカバーされていないため、直接シーケンシング法にて補うこととした。MiSeq (Illumina) を用いてシーケンシングを行い、Sure Call (Agilent) を用いて解析を行った。遺伝子解析についてのインフォームドコンセントを全例に行い同意書を取得した。

シート式加重計を用いて、二足歩行、前向き四足歩行、後ろ向き四足歩行を測定した。各トライアルを 3 回ずつ施行し、1 トライアルあたり定常状態の 2 歩行周期 (計 6 周期) を用いて、歩長及び歩行周期の平均を算出した。被験者にはインフォームドコンセントの上同意書を取得し研究を行った。

PD 5 例、MSA 5 例、コントロール 9 例の剖検脳のパラフィン包埋切片で近接ライゲーションアッセイ (proximity ligation assay, PLA) によ

って SYN オリゴマーを可視化し、SYN オリゴマーの脳内分布を検討した。

## C. 研究結果

過去に遺伝子診断されている SENDA2 例および NF1 例について、システムを用いて解析を行い検証した。SENDA2 例については、既知の変異を検出できた。NF 症例については、カバーされていない exon4 に変異が存在するため、エクソーム解析のみでは変異を検出できなかった。また、臨床診断のみであった SENDA1 症例についても解析を行ったところ、WDR45 遺伝子のナンセンス変異 (既報告あり) を検出できた。

パーキンソン病の歩行障害は空間的パラメーターが時間的パラメーターよりも障害を受けやすいが、正常高齢者との比較では差はわずかであったことを確認した。更に後ろ向き四足歩行において正常との差が顕著に表れることを明らかにした。

PD では、大脳皮質に Lewy 小体を欠く Braak stage III の剖検脳において、大脳皮質の神経細胞や神経間網に SYN オリゴマーの蓄積を認めた。MSA では大脳皮質の神経細胞や小脳プルキンエ細胞に広範に SYN オリゴマーの蓄積がみられることを明らかにした。

## D. 考察

今回は既存の疾患遺伝子パネルを用いたため、カバーできない領域もごくわずか存在したが、NBIA を簡易に網羅的に診断することは可能と考えられた。

後ろ向き四足歩行がパーキンソン病の早期から障害されており、進化論的に難しい後ろ向き四足歩行が、パーキンソン病において早期から障害される可能性があると考えた。

パーキンソン病では Lewy 小体の形成に先行して SYNオリゴマー蓄積が広範に生じている可能性が示唆された。MSA では大脳皮質や小脳プルキンエ細胞の SYNオリゴマーが神経細胞脱落や機能障害を引き起こしている可能性が考えられた。

## E. 結論

卓上型の次世代シーケンサーを用いた NBIA の

網羅的診断システムを構築した。今後、NBIA が疑われる症例について、解析を行っていく。

歩行解析の結果、後ろ向き四足歩行がパーキンソン病の早期から障害されている可能性が示唆され今後更に症例を蓄積し、検討していく予定である。

近接ライゲーションアッセイによりシヌクレイノパチーの剖検脳における SYNオリゴマーの同定が可能となり、PD や MSA の発症に SYNオリゴマーが寄与している可能性を示した。今後、症例数を増やしてさらなる検討を進める予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Endo H, Sekiguchi K, Shimada H, Ueda T, Kowa H, Kanda F, Toda T. Low signal intensity in motor cortex on susceptibility-weighted MR imaging is correlated with clinical signs of amyotrophic lateral sclerosis: a pilot study. *J Neurol* 2018 Mar;265(3):552-561. doi: 10.1007/s00415-017-8728-0.
2. Sekiya H, Kowa H, Koga H, Takata M, Satake W, Futamura N, Funakawa I, Jinnai K, Takahashi M, Kondo T, Ueno Y, Kanagawa M, Kobayashi K, Toda T. Wide distribution of alpha-synuclein oligomers in multiple system atrophy brain detected by proximity ligation. *Acta Neuropathol* 2019 Feb; 137:455-466 ..

### 2. 学会発表

- 1) 第 60 回日本神経学会学術大会 2019
- 2) 第 60 回日本神経病理学会総会学術研究会 2019
- 3) The 71st American Academy of Neurology Annual Meeting, 2019
- 4) The 23rd International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress, 2019
- 5) The 3rd Pan American Parkinson's Disease and Movement Disorders Congress, 2020

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

