

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

フール病(特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症)の分子病態の解明、ならびに診断方法の確立と治療法の開発に関する研究

平成 22～24 年度 総合研究報告書

平成 25 (2013) 年 3 月

研究代表者 保住 功

目次

I. 総合研究報告

フェール病(特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症)に関する研究

代表研究者 保住 功 岐阜薬科大学 薬物治療学 1

II. 資料

1. フェール病(特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症)

の分子病態の研究 (平成 22 年度)

班員名簿・総括報告書・班会議ポスター

2. フェール病(特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症)

の診断方法の確立と治療法の開発に関する研究 (平成 23 年度)

班員名簿・総括報告書・班会議ポスター

3. フェール病(特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症)

の診断方法の確立と治療法の開発に関する研究 (平成 24 年度)

班員名簿・総括報告書・班会議ポスター

4. フェール病 (特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症)

からの iPS 細胞樹立と病態解析 (平成 23-24 年度)

分担研究者 柴田敏之 岐阜大学 口腔病態学分野

付) 新聞記事

5. その他

a. 岐阜大学病院神経内科専門外来の案内

b. 診断基準の提案

c. eメールによる患者さんへの医療情報提供

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別冊

フェール病(特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症)に関する研究

研究代表者： 保住 功

岐阜薬科大学薬物治療学 教授

研究要旨

本研究開始から約2年半、平成25年3月20日現在、原因不明の両側性脳内石灰化症患者登録数は180名である。しかし、登録後の調査で、副甲状腺機能低下症、Aicardi-Goutières症候群、Cockayne症候群といった何らかの原因も判明した疾患もあった。また、その他の原因の不明な idiopathic bilateral ganglionic calcification (IBGC)患者の中にはほとんど無症状、あるいは軽度の頭痛、軽度の認知症を呈し、頭部CT検査で偶発的に見つかった登録症例も少なくなく、我々の行った岐阜、新潟の2大学での1年間の全例頭部CT画像検索の結果からも、本邦における患者総数はこの登録数の少なくとも数倍はいると推定している。

本研究におけるIBGC患者の遺伝子検査で、*SLC20A2*の変異は家族例9家系中4家系の44.4%に、孤発例47例中3例の6.4%に認められた。本邦のIBGCにおいて、頻度の高い原因遺伝子であると考えられた。*SLC20A2*変異例間では一定のタイプは認めず、臨床症状、石灰化の程度は、同一遺伝子異常とは思われないほど多様性に富んでいた。一方で、同一遺伝子変異を持つ症例間では臨床症状、画像所見に類似点が多く、同じphenotypeを有すると考えられた。今後、さらなる分子、遺伝子に基づいた診断法、分類法の開発が望まれる。

また、今後は遺伝子変異の見出されていない家系例などで次世代シーケンサーを駆使した原因遺伝子の解明が進む。リン酸トランスポーターであるPiT-2、PiT-1の機能解析を軸に、IBGC発症のメカニズムの解明が進んでいく。さらに、患者のiPS細胞を作製し、神経細胞や血管内皮細胞に分化させることで、ここ数年で、病態の解明や病態に合致した創薬の開発が急進展するものと予測される。

研究分担者

平成22年度

犬塚 貴 岐阜大学医学部神経内科 教授

林 祐一 岐阜大学医学部神経内科 助教

香村彰宏 岐阜大学医学部神経内科 医員

平成23年度

下澤伸行 岐阜大学生命科学ゲノム 教授

柴田敏之 岐阜大学医学部口腔病態学 教授

犬塚 貴 岐阜大学医学部神経内科 教授

平成24年度

犬塚 貴 岐阜大学医学部神経内科 教授

辻 省次 東京大学医学部神経内科 教授

A. 研究目的

フェール病は慣例的に、原因が不明で、両側淡蒼球に顕著な石灰化を来す疾患として呼称されてきた[1]。しかし、類似の頭部CT画像を呈したり、類似の病態を指す疾患名も多数存在し、混乱も多い[2]。近年、国際的には idiopathic bilateral ganglionic

calcification (IBGC)の名称が通用されている。孤発例のほか、家族例 (familial IBGC (FIBGC)) の存在が知られている。

平成 22 年 7 月からの班研究の開始の年は我が国における患者の実態調査を行うこと、疾患の分子病態の解明を進めることを目的とした。

平成 23~24 年度は、班研究は、フェール病という範疇には種々の病態が存在することから、分子、遺伝子レベルでの診断方法の確立、病態解明に基づく創薬の開発を目的とした。

B.研究方法

1) 実態調査

全国一次アンケート調査でフェール病が疑われる症例 (症例基準: 1) 頭部 CT にて大脳基底核 and/or 小脳歯状核に石灰化あり、2) 両側対象性の脳内石灰化病変を有する、3) 脳内石灰化をきたしうる代謝性疾患、外傷の既往、感染症やその他の疾患が除外できる) について一次アンケート調査を実施した。一次アンケート調査による登録から、二次、三次アンケート調査を行い、臨床情報の収集、毛髪、髄液、血液 (DNA 抽出のため) の検体の収集を行った。

2) 全国疫学調査

班研究で確立された全国疫学調査マニュアル法に基づき、調査対象機関を階層化し、無作為抽出し、アンケート調査を行った。

岐阜大学と新潟大学の附属病院を拠点とした頭部 CT 画像全例調査を行った。

3) 毛髪中の元素分析

収集できた患者の毛髪中の元素を高感度の誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) を用いて元素分析し、正常コントロール群と比較検討する。

4) 髄液中の重金属分析、疾患特異的タンパ

ク質の検索

収集できた患者の髄液中の重金属を ICP-MS を用いて元素分析し、正常コントロール群と比較検討する。また、網羅的プロテオーム解析を行い、診断マーカーの検索を行う。

5) 患者 DNA の遺伝子解析

収集できた患者の血液から DNA を抽出し、既報の遺伝子変異について検索を行う。変異が認められなかった DNA については全例エキソーム解析を行う。

6) PiT-2 の機能解析

遺伝子変異の頻度の最も高い *SLC20A2* が code するタンパク質 type III sodium-dependent phosphate transporter 2 (PiT-2) の機能解析を行う。

7) 患者の iPS 細胞の作製

外来受診患者の不要となった智歯から iPS 細胞を作製し、病態の解明を行う。

8) 患者と家族のインタビューに基づく心のケア、質的分析

患者と家族の面談と病の語りに基づく質的分析を行い、心情の把握と適切なケアの在り方を見出す。

(倫理面への配慮)

全国疫学調査は、岐阜大学の倫理委員会の承認を得て、施行した。岐阜大学と新潟大学の附属病院を拠点とした頭部 CT 画像調査は両大学の倫理委員会の承認をそれぞれ得て、実施した。収集された患者の毛髪・血液・髄液等の検体を使用した検査は、岐阜大学の倫理委員会の承認を得て、患者の同意を文書で得た上で行った。個人情報保護の観点から、連結可能匿名化を行った。遺伝子検査は、岐阜大学の倫理委員会 (ヒトゲノム・遺伝子解析研究) の承認を得て、患者の同意を文書で得た上で行なった。収集された貴重な検体は、

今後の更なる検索のため、二次利用ができるよう説明書と同意書内に明確に文章化した。DNA の検索は岐阜大学、岐阜薬科大学および東京大学それぞれの倫理審査委員会の承認のもとに実施した。また共同研究についても両施設において倫理委員会の承認を得た。患者や家族との面談、IT 機器を活用した心のケアは、それぞれ岐阜大学の倫理委員会の承認を得て、同意を文書で得た上で行った。すべての検索は個人情報取り扱いについて十分に配慮しながら、研究を遂行した。

C. 研究結果

1) 実態調査

全国の日本神経学会認定施設に、平成 22 年 9 月 3 日、756 通の往復葉書によるアンケートを発送し、299 件の返信を得た(返却 3 件、返信率 40.0%)。信頼性がある患者登録総数として 69 症例(40 歳以下が 12 症例、41 歳以上が 57 症例)あった。また日本小児神経学会に協力を依頼し、小児神経専門医に、平成 22 年 9 月 3 日、1063 通の往復葉書によるアンケートを発送し、455 件の返信を得た(返却 13 件、返信率 43.3%)。登録総数として 35 症例の登録が得られた。その後の登録や岐阜大学病院専門外来のホームページを見て受診された方を含め、平成 25 年 3 月 20 日現在で総数 180 名である。

2) 全国疫学調査

全国疫学調査として、正確なフェール病の患者数、臨床疫学像の把握のため、「特定疾患の疫学に関する研究班」(自治医科大学上原里程准教授、中村好一教授)との合同研究を開始した。全国の放射線科のある病院の放射線科を対象に、班会議で確立された全国疫学調査マニュアル法に基づき、調査対象機関を階層化し、無作為抽出し、平成 22 年 12 月 9 日に一次アンケートが発送

された。しかし、残念ながら検索の手間等から解析に十分な数の返信は得られなかった。

そこで、実態調査で得られた全国分布図から患者数の多かった岐阜の岐阜大学病院、また剖検例も含め患者数が少ないと思われた新潟の新潟大学病院で、1 年間に撮影した頭部 CT の脳内石灰化の頻度を検索した。検索した患者総数は、岐阜で 2526 症例、新潟で 2573 症例であった。検索では淡蒼球に点状の石灰化を認める症例は岐阜大学 17.2%、新潟大学で 20.6%であった。さらに斑状のものは各 1.3%、1.9%であったが、65 歳以上となると 2.1%、3.1%と増加した。小脳歯状核となると 0.28%、0.16%とその頻度は低かった。研究成果は Geriatr Gerontol Int に掲載した[3]。

3) 毛髪中の元素分析

収集され解析された毛髪検体数は、53 検体であった。その中で、Diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNFC=小阪・柴山病) [4]を除外し、診断的にフェール病、IBGC として均一な 28 検体に関して、24 種の金属種について、ICP-MS を用いて測定した。各症例の年齢・性に対応させたコントロール群 3 例を対照に SPSS を用いて、解析した結果では、患者群の毛髪で、リン (P)、銅 (Cu)、ゲルマニウム (Ge)、セレンウム (Se) 含量が有意に低下していた。研究成果は Biol Trace Elem Res に掲載した [5]。

4) 髄液中の重金属分析、疾患特異的タンパク質の検索

我々はすでに 22~76 歳の IBGC3 症例の髄液中の重金属を ICP-MS を使って検索し、3 症例とも Ca 代謝は正常であったが、銅 (Cu)、亜鉛(Zn)、鉄(Fe)、マグネシウム (Mg) の上昇が著明であることを見出している [6]。これらの上昇値は我々が検索したアルツハ

イマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)などの他の神経変性疾患と比較しても顕著であった [7]。

IBGC 患者の髄液を用いて、二次元電気泳動法による疾患特異的マーカーの検出を試みたが、有意なものは見出されなかった。

今後、金沢大学神経内科との共同研究にて、タウ、リン酸化タウについて、DNTC との鑑別も踏まえ、詳細に検討を行う予定である。

5) 患者 DNA の遺伝子解析

これまでその原因遺伝子座として、

IBGC1 (14q) [8]

IBGC2 (2q37)2q37 [9]

IBGC3 (8p11.21) 8p11.21 [10]

IBGC4 (5q32) [11]

が報告されてきた。

IBGC1 で効率に認められる MGEA6 遺伝子 p.P521A 多型に関して、IBGC 24 症例で検索を行ったが、1 例もその多型は認められなかった。

IBGC3 の原因遺伝子 *SLC20A2* を検索し、家族例 9 家系中 4 家系で (44.4%)、孤発例 47 例中 3 例で(6.4%)と、既報[12]と同様、高頻度に変異を認めた。これらはいずれも新規変異であった。Neurology に投稿準備中である。

IBGC4 の原因遺伝子 *PDGFRB* の変異の検索を開始した。

6) PiT-2 の機能解析

PiT-2 の immunopositivity は線状体、小脳を含め遍く脳内に認められ、細胞では特にニューロン、血管内皮細胞に強く、アストロサイトには弱く認められ、オリゴデンドロサイトやミクログリアには認められなかった。

また *SLC20A2* に認められた変異を導入した CHO 細胞を培養中であり、今後の機能解析に用いる。J.Neurol Sci に投稿準備中

である。

7) 患者の iPS 細胞の作製

6 人の IBGC 患者の口腔組織 (歯髄、歯肉) から細胞株を樹立した。この内の 1 例の歯髄細胞株 (DP276、歯根形成期) に、山中 4 因子を組み込んだセンダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞を作製した。

患者由来 DPC 株から iPS 細胞株は樹立できたが、そのコロニー誘導率は DP31 (健常) が 270 個/10mm dish に対し、DP276 (IBGC) は 6 個/10mm dish と著明に低い結果であった。これまでの解析で、DP31 のような智歯発育段階が未熟である歯冠完成期や歯根形成期より樹立した歯髄細胞株では、通常誘導効率が高いことが分かっており、フェール病の歯髄細胞は細胞初期化抵抗性である可能性が示唆された。

8) 患者と家族のインタビューに基づく心のケア、質的分析

IBGC3 例の患者と家族のインタビューを行い、解析し、患者や家族の悩みの実態がより明らかとなった。研究成果の詳細は「臨床看護」に掲載した[13]。さらに症例数を増やし、質的分析ソフト MAXQDA を活用し、詳細な分析を行っている。

D. 考察

平成 25 年 3 月 20 日現在、班研究における患者登録数は 180 名である。しかし、その中には副甲状腺機能低下症、Aicardi-Goutières 症候群、Cockayne 症候群といった疾患も含まれていた。また患者の中にはほとんど無症状、あるいは軽度の頭痛、軽度の認知症を呈し、頭部 CT 検査で偶発的に見つかった症例も少なくなく、本邦における患者総数は登録数の数倍はいるのではないかと推定している。

本研究で、*SLC20A2* の変異は家族例 9

家系中 4 家系の 44.4%に、孤発例 47 例中 3 例の 6.4%に認められた。本邦の IBGC において、頻度の高い原因遺伝子であると考えられた。*SLC20A2* 変異例間では一定のタイプは認めず、臨床症状、石灰化の程度は多様性に富んでいた。一方で、同一遺伝子変異を持つ症例間では臨床症状、画像所見に類似点が多く、phenotype を有する可能性があると考えられた。

今後、遺伝子変異の見出されていない家系例など次世代シーケンサーを駆使した原因遺伝子の解明が進む。

リン酸トランスポーターPiT-2、PiT-1 の機能解析を軸に、IBGC 発症のメカニズムの解明が進むものと考えられる。

患者の iPS 細胞を作製し、細胞を神経細胞や血管内皮細胞に分化させることで、病態の解明や病態に合致した創薬の開発が期待できる。

E. 結論

本邦の IBGC において、*SLC20A2* は頻度の高い原因遺伝子であり、今後、その翻訳タンパク質であるリン酸トランスポーター PiT-2 や PiT-1 の機能解析を軸に病態の解明、創薬の開発が急展開すると予測される。

【参考文献】

- [1] 葛原茂樹 ファール病と特発性基底核・小脳石灰化症 P.516-517. 神経内科学書 第2版 朝倉書店 (豊倉康夫総編集)
- [2] Manyam BV. What is and what is not 'Fahr's disease'. Parkinsonism Relat Disord. 2005;11:73-80. (Fahr Disease). Am. J. Hum. Genet. 1999; 65: 7 64-772.
- [3] Yamada M, Asano T, Okamoto K, et al. High frequency of calcification in

basal ganglia on brain computed tomography images in Japanese older adults. Geriatr Gerontol Int. Epub 2012 Dec 21.

- [4] Kosaka K. Diffuse neurofibrillary tangles with calcification: a new presenile dementia. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994;57:594-596.
- [5] Takagi M, Ozawa K, Yasuda H, et al. Decreased bioelements content in the hair of patients with Fahr's disease (Idiopathic bilateral calcification in the brain). Biol Trace Elem Res. 2013;159: 9-13.
- [6] Hozumi I, Kohmura A, Kimura A, et al. High Levels of Copper, Zinc, Iron and Magnesium, but not Calcium, in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Fahr's Disease. Case Rep Neurol.2010;2:46-51.
- [7] Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, et al. Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. J. Neurol. Sci. 303: 95-99, 2011.
- [8] Geschwind DH et al. Identification of a Locus on Chromosome 14q for Idiopathic Basal Ganglia Calcification
- [9] Volpato CB et al. 2q37 as a susceptibility locus for idiopathic basal ganglia calcification (IBGC) in a large South Tyrolean family. J Mol Neurosci. 2009; 39: 346-353.
- [10] Wang C, Li Y, Shi L, Ren J, et al. Mutations in *SLC20A2* link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. Nat

Genet. 2010; 44: 254–256.

[11] Nicolas G, Pottier C, Maltête D et al. Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. Neurology. 2013;80:181-187.

[12] Hsu SC, Sears RL, Lemos RR, et al. Mutations in SLC20A2 are a major cause of familial idiopathic basal ganglia calcification. Neurogenetics. 2013;14:11-22.

[13] 堀田みゆき、保住 功 希少神経難病ファール病3例の患者と家族のインタビューから得られたもの 臨床看護 2012. 38(13)1907-1912.

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

* Hozumi I, Kohmura A, Kimura A, Hasegawa T, Honda A, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Sakurai T, Tanaka Y, Satho M, Inuzuka T. High levels of copper, zinc, iron and magnesium but not calcium, in the CSF of patients with ‘Fahr’s disease’. Case Report in Neurology. 2:46-51, 2010.

* Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, Ozawa K, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Kimura A, Tanaka Y, Satoh M, Inuzuka T. Patterns of levels of heavy metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. J Neurol Sci. 303:95-99, 2011.

* 堀田 みゆき、保住 功. 「希少神経難病ファール病3例の患者と家族のインタビューから得られたもの」 臨床看護 38(13):1907-1912, 2012.

* Yamada M, Asano T, Okamoto K, Hayashi Y, Kanematsu M, Hoshi H, Akaiwa Y, Shimohata K, Nishizawa M, Inuzuka T, Hozumi I. High frequency of calcification in basal ganglia on brain CT images in Japanese elderly people. Geriatr Gerontol Int. Dec. 21, 2012.

* 保住 功 進む Fahr 病の病態解明 医学のあゆみ 243(4)323-324, 2012.

* Takagi M, Ozawa K, Douke M, Hashimoto K, Hayashi Y, Inuzuka T, Yasuda H, Hozumi I. Bioelements content of hair in Fahr’s disease. J Trace Elements Med Biol. 151(1) 9-13, 2013.

* I. Hozumi. Roles and Therapeutic Potential of Metallothioneins in Neurodegenerative Diseases. Curr Pharm Biotechnol. in press, 2013.

2. 学会発表

* 新潟脳神経研究会特別例会
神経変性疾患におけるメタロチオネインと重金属の役割と創薬への応用
保住 功

日時：平成22年7月27日

場所：新潟大学脳研究所

* 日本薬学会東海支部特別講演
神経変性疾患（ALS、ハンチントン病、Fahr病）の治療戦略 –メタロチオネインとiPS細胞を活用して–

保住 功

日時：平成22年7月28日

- 場所：岐阜薬科大学
- * 第17回東海メタロチオネイン研究会
ヒトメタロチオネイン遺伝子のSNP検索
林 祐一、橋本和宜、犬塚 貴、保住 功
日時：平成22年12月23日
場所：岐阜薬科大学
 - * 第52回日本神経学会総会
頭部CTによる脳内石灰化の臨床的検討
山田 恵、浅野隆彦、林 祐一、星 博昭、
犬塚 貴、保住 功
日時：平成23年5月18日
場所：名古屋国際会議場
 - * 第52回日本神経学会学術大会
頭部CTによる脳内石灰化の臨床的検討
山田 恵、浅野隆彦、林 祐一、星 博昭、
犬塚 貴、保住 功
日時：平成23年5月18日
場所：名古屋国際会議場
 - * 第57回日本薬学会東海支部総会・大会
特発性両側性脳内石灰化症における毛髪
中ミネラル量の解析
高木麻里、橋本和宜、道家光子、林 祐一、
保住 功
日時：平成23年7月9日
場所：金城大学薬学部

- * 第22回日本微量元素学会
神経変性疾患におけるメタルの役割と代
謝
保住 功
日時：平成23年7月2日
場所：京都テレサ
- * 第38回富山県臨床神経研究会（特別講演）
特発性脳内石灰化症（IBiC）の現状と課題
ーフェール病～小阪・柴山病（DNTC、非
アルツハイマー型認知症）
日時：平成23年10月28日
場所：富山電気ビルディング
- * 岐阜健康長寿・創薬推進機構 第5回異分
野交流研究会
「神経難病治療への新たな挑戦 ー次世
代シーケンサー、iPS細胞を活用してー」
保住 功
日時：平成24年11月22日（木）
場所：岐阜薬科大学

H.知的財産権の出願・登録状況 (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

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

平成 22 年度総括研究報告書

フェール病 (特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症) の分子病態の解明の研究

研究代表者 保住 功

岐阜大学大学院医学系研究科神経内科・老年学分野 准教授

研究要旨

原因不明の両側性の大脳基底核と小脳歯状核に石灰化を認める疾患は、従来‘フェール病’と通称されてきたが、頭部 CT 画像所見から、原因不明の(特発性)、両側性に脳内に石灰化を来す症例 (Idiopathic Bilateral Calcification (IBiC)) という診断基準で、神経内科医、小児神経内科を対象としたアンケート調査を行った。アンケート途中にも関わらず、100 症例を超える症例の登録があった。小児の症例では背景に何らかの先天代謝異常症が存在すること、初老期以降の症例には Kosaka-Shibayama disease (= Diffuse Neurofibrillary Tangles with Calcification (DNTC)) が存在することが推測され、IBiC の多様性が明らかとなった。DNTC に認められる神経原線維変化 (Neurofibrillary Tangles: NFT)、小血管周囲の石灰化を画像検査で検出することは、現在困難で、重金属を含め、髄液マーカーの確立が必要である。また、疾患の遺伝学的な背景を調べる必要があると、金属結合タンパクであるメタロチオネイン (MT) 遺伝子の解析を開始した。淡蒼球、小脳歯状核といった脳内の特定の部位にカルシウム (Ca) 他重金属の蓄積を認めることは、なんらかの金属結合蛋白の異常が想定され、そのメカニズムを明らかにすることは、病気の治療法、進展の抑制につながるものと考えられた。

研究分担者

林 祐一 岐阜大学大学院医学系研究科 神経内科・老年学分野 助教

香村彰宏 岐阜大学医学部附属病院 神経内科・老年科 医員

犬塚 貴 岐阜大学大学院医学系研究科 神経内科・老年学分野 教授

A. 研究目的

原因不明の両側性の大脳基底核と小脳歯状核に石灰化を認める疾患は、従来‘フェール病’と通称されてきたが、症候群として、海外では idiopathic bilateral striatopallidodentate calcinosis (IBSPDC) という名称も提唱されている。これまで臨床症状、頭部 CT 所見の多様性から、全国患者数やその病態は明らかでなく、また原因、

治療法に関して全く解明の糸口すらつかめず、疾患に対する十分な研究はほとんどなされてこなかった。このような現状の中、我々は 22~76 歳のいわゆるフェール病 3 症例の髄液中の重金属を高感度の誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) を使って検索し、3 症例とも Ca 代謝は正常であったが、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、鉄 (Fe)、マグネシウム (Mg) の上昇が著明であることを見出した。そして、共通した重金属代謝異常の存在を推測し、本疾患の病態解明、治療法へ方向性を提示した。本研究の目的は、全国フェール病患者数を明らかにし、臨床データおよび検体を収集し、その病態解明に迫ることによって、明確な診断基準を作ることにある。フェール病はいくつかの感受性遺伝子が関与する多因子疾患と考えられる。本研究では、全国一次調査、二次調査また論文、学会報告を通して

患者数やその実態を把握する。その後、患者の同意書を得て、血液、髄液、毛髪を収集し、Cu, Zn, Mg, Mn, Fe, Ni, Cd, Cr, Li, V, Co, Pb の 12 種類の重金属、金属結合蛋白であるメタロチオネイン(MT)等を測定する。また、MT-IIA 等の候補遺伝子から疾患感受性遺伝子を明らかにする。収集する検体は今後の更なる検索と治療法の開発のため、二次利用できるよう同意書に明文化し、予め、同意を得ておく(分析に半年を計画)。わが国における実態、病態、疾患感受性遺伝子を明らかにし、欧米と比較検討する。ファール病の名称にはその多様性から議論があり、より明確な病態を解明することによって、疾患の診断基準の作成し、細分類し、個別の病態を明らかにする。

B. 研究方法

(1) 実態調査

1) 全国一次調査：全国の神経内科専門医、放射線科専門医にアンケートを行う(あらかじめ、臨床研究倫理指針を遵守し、倫理委員会の承認を得た上で郵送する)。これまで遭遇したいわゆるファール病すなわち、原因不明の家族性を含めた、両側脳内石灰症 (Idiopathic Bilateral Calcification (IBiC)) についてアンケートを行なう。性別、年齢、臨床症状・徴候(認知症、錐体外路症状、小脳症状、副甲状腺機能、頭部 CT 所見)の調査を行なう(無記名)。

2) 二次、三次調査：上記の全国一次調査で協力の得られた症例、文献、学会における発表症例を調査し、当大学の倫理委員会の承認の下、あらかじめ研究の内容、無費用であること、ほとんど身体的侵襲のない検査であることを文書にて説明し、患者の同意書を得て、血液、髄液、頭髪を収集する。収集した血液、髄液の Cu, Zn, Mg, Mn, Fe, Ni, Cd, Cr, Li, V, Co, Pb の 12 種類の重金属および MT (MT-I/II, MT-III) の濃度を測定する。毛髪の重金属濃度も測定する。測定法は重金属は ICP-MS や高分解能 ICP-MS (HR-ICP-MS) を用いて測定し、MT-I/II の測定は測定キットを使用し、MT-III の測定は新たに開発した two-sandwich ELISA 法、毛髪の重金属測定については外注する。

3) 候補疾患感受性遺伝子の検索：重金属代謝に重要な MT のアイソフォームの MT-IIA、MT-III 遺伝子の SNP を調べる。その他、候補遺伝子として、これまで欠損の報告があった biotinidase、carbonic anhydrase II とまた我々が DNLC-MS/MS を用いたプロテオミクス解析から初めて見つけた MT-III の結合蛋白 (P, F, N (未公開)) の SNP 検索を行なう。

(2) 検体解析

上記のアンケートで得た臨床データ、血液・髄液・毛髪の測定結果、候補疾患感受性遺伝子の SNP 検索結果を集計し、多変量解析等の統計学的解析を行ない、IBiC の病態を明らかにするとともに、疾患感受性遺伝子を明らかにする。尚、データの管理、マネージメント、倫理的妥当性に関しては当大学の倫理審査委員会の定期的な監査を受ける。

(3) まとめ

明確な診断基準の作成、細分類、検査項目を明らかにし、今後、効率的・効果的に研究を行なう上での研究、治療法の方向性を提示する。わが国における IBiC の実態を明らかにし、その後、人種差、疾患感受性遺伝子など欧米等との比較検討を行なう。

(倫理面への配慮)

すべての全国疫学調査は当大学の倫理委員会の承認を得た上で郵送(患者名は無記名)・実施する。収集された患者の血液、髄液、毛髪は、個人情報保護の観点から、連結可能匿名化を行う。髄液は患者の同意を文書で得た上で、原則として入院検査に際して行なわれた検査検体の一部を使用する。重金属、MT 等の測定も、当大学の倫理委員会の承認を得て、患者の同意を文書で得た上で行なう。また患者の遺伝子における疾患感受性遺伝子の SNP 解析は、改めて当大学の倫理委員会(ヒトゲノム・遺伝子解析研究)の承認を得てから、患者の同意を文書で得た上で行なう。収集された貴重な検体は、今後の更なる検索のため、二次利用ができるよう説明書と同意書内に明確に文章化し、患者の署名による同意を得ておく。

C. 研究結果

(1) 実態調査

頭部 CT にて原因不明の両側性脳内石灰化を認めた症例 (IBiC) のアンケート調査を行った。まず、全国の日本神経学会認定施設に、岐阜大学倫理審査委員会の承認を得て、平成 22 年 9 月 3 日、756 通の往復葉書によるアンケートを発送した。平成 22 年 12 月 17 日までに、299 件の返信を得た (返却 3 件、返信率 40.0%)。信頼性のある登録総数として 69 症例 (40 歳以下が 12 症例、41 歳以上が 57 症例) あった。

小児症例が少ないことを懸念し、日本小児神経学会に協力を依頼し、小児神経専門医に、岐阜大学倫理審査委員会の承認を得て、平成 22 年 9 月 3 日、1063 通の往復葉書によるアンケートを発送した。平成 22 年 12 月 17 日までに、455 件の返信を得た (返却 13 件、返信率 43.3%)。登録総数として 35 症例の登録が得られた (現在も登録症例数は増加中)。

さらに、全国疫学調査として、正確なフェール病の患者数、臨床疫学像の把握のため、「特定疾患の疫学に関する研究班」(自治医科大学上原里程准教授、中村好一教授) との合同研究を開始した。全国の放射線科のある病院の放射線科を対象に、班会議で確立された全国疫学調査マニュアル法に基づき、調査対象機関を階層化し、無作為抽出し、平成 22 年 12 月 9 日に一次アンケートが発送され、その回収待ちである。

登録症例は現在も日々増えている現状であるが、平成 22 年 12 月 17 日までの年齢別 (図 1)、県別 (図 2) の症例数を棒グラフに示す。

登録された症例で、二次調査を行い、各症例において、臨床現場にコンサルトも行った。それにより 1 例、副甲状腺機能低下症が判明した。また登録された小児の症例には Aicardi-Goutières 症候群といった大脳基底核石灰化症を伴う先天代謝異常症と考えられる症例もあった。また初老期の症例では、緩徐進行性の認知症を呈し、剖検で著明な神経原線維変化 (NFT) と小血管周囲の石灰化が認められる Kosaka-Shibayama Disease (= Diffuse Neurofibrillary Tangles with Calcification (DNFC)) と考えられる症例も含ま

れた。病態の多様性から、個々の症例における詳細な検討が重要であると考えられた。

三次調査においては登録症例で、可能な検体 (血清、DNA、髄液、毛髪) の提供を依頼し、現在まで DNA 13 症例、血清 10 症例、髄液 8 症例、毛髪 10 症例の収集が済み (検体数は増加中)、下記の解析が進行中である。

(2) 解析

遺伝子検索ではまず、メタロチオネイン (MT) 遺伝子の SNP の検索を行った。正常コントロール 206 例において、ヒト MT で最も発現量の多い MT-IIA の (-5) に A/A が A/G, G/G の既報告にほぼ同じ 16% の SNP を認めたが、現在までの検索では上記の IBiC 症例で SNPs は認めていない。また、MT-III 遺伝子では、JSNP でプロモーター上流 3 か所に SNP が報告されているが、正常コントロール 34 例において、その SNP を確認するとともに、その近傍に NCBI の Data Base で Sahara-African にのみ報告されていた SNP を日本人でも確認できた (SNP 頻度 4.4%)。正常症例数を増やすとともに、上記患者において検索する予定である。ほか順次、関連遺伝子、SNP については検索してゆく。上記の髄液については、湿式灰化を行い、重金属を分析中である。毛髪については 10 例重金属の分析が終了したが、特記すべき異常は認めていない。

(3) まとめ

収集した検体は分析し、臨床データと多変量解析等の統計処理を専門家と共に行う。それらを診断基準の検査項目に活用する。

D. 考察

原因不明の、病的な脳内石灰をきたす症例の登録は、アンケート調査は途中ではあるが、100 症例を超える予想以上の症例数であった。脳内石灰化は、副甲状腺機能低下症、ミトコンドリア脳筋症、SLE などの膠原病、白質脳症、先天代謝異常症に伴って原因の明らかな場合もあるが、通常の見出しでは何ら異常を認めない症例も多い。また、全くの無症状で、たまたま頭部外傷などで頭部 CT を撮った際に脳内の異常な石灰を指摘され発見された症例、軽い頭痛があり、頭部 CT を撮った際に

脳内の異常な石灰を指摘され発見された症例もあった。これまで一般医療機関では、原因が不明で、特別な治療法も見出されていないため、数年おきに定期的に頭部 CT を撮るか、そのまま放置されていた。そのため、患者や家族の中はつらい十字架を背負わされた気持ちとなっていた方もおられ、その悲痛と将来に対する不安が多大な方もあった。小児例においては、重度精神発達遅滞、てんかん、発作性片麻痺、思春期早発、痙性四肢麻痺、緻巧運動障害、小頭症、眼振、高アンモニア血症など他にも際立った臨床徴候、症状を呈する症例も登録され、背景に何らかの先天代謝異常症が存在することが推定される症例も少なからず認められた。初老期の症例では、緩徐進行性の認知症を呈し、剖検で著明な NFT、小血管周囲の石灰化を認める Kosaka-Shibayama Disease (DNTC) がむしろ診断として考えられる症例もあった。剖検報告を見ても淡蒼球の石灰化の程度と脳内小血管周囲の石灰化の程度とは必ずしも平行していない。NFT や小血管周囲の石灰化を PET、SPECT で検出する方法はまだ見出されておらず、今後、髄液中の何らかの診断マーカーの確立が必要と考えられた。全国アンケート調査から IBiC の多様性が明らかとなった。

できるだけ臨床的に均質な、いわゆる古典的なファール病の症例で、全ゲノム解析による原因遺伝子、関連遺伝子検索が必要である。また家族例と考えられる症例も少なからず報告され、ホモ接合マッピング法を用いた関連遺伝子解析もその病態解明に役立つ。我々が見出した髄液における多種重金属の増加は、ファール病、DNTC の原因は、Ca の代謝異常ではなく、基底核など脳内の特定の部位における血管の内皮に障害があり、その透過性から重金属が蓄積することによると考えられる。金属結合蛋白の異常などのメカニズムを明らかにすることは病気の治療、進行の抑制につながるものと考えられる。

E. 結論

IBiC は神経内科医、小児神経内科を対象としたアンケート調査で、アンケート途中にも関わらず、

100 症例を超える症例が集積された。小児の症例では背景に何らかの先天代謝異常症が存在すること、初老期以降の症例には DNTC が存在することが推測された。NFT や小血管周囲の石灰化を画像検査で検出することは、現在困難で、何らかの髄液マーカーの確立が必要と考えられる。臨床的に均質な古典的ファール病をまとめ、遺伝学的な背景を調べることが必要である。また淡蒼球、小脳歯状核等の脳内の特定の部位に Ca 他の重金属の蓄積を認めることは、なんらかの金属結合蛋白の異常なども想定され、そのメカニズムを明らかにすることは、病気の治療法、進展抑制につながると思われる。

F. 健康危険情報

本疾患は緩徐進行性であり、すぐに国民の生命や健康に重大な影響を及ぼす研究結果や情報は本研究班において得られていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- * Hozumi I, Kohmura A, Kimura A, Hasegawa T, Honda A, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Sakurai T, Tanaka Y, Satho M, Inuzuka T. High levels of copper, zinc, iron and magnesium but not calcium, in the CSF of patients with 'Fahr's disease'. Case Report in Neurology. 2:46-51,2010.
- * Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, Ozawa K, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Kimura A, Tanaka Y, Satoh M, Inuzuka T. Patterns of levels of heavy metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. J Neurol Sci. 303:95-99, 2011.
- * I. Hozumi. Roles and Therapeutic Potential of Metallothioneins in Neurodegenerative Diseases. Current Pharmaceutical Biotechnology. submitted.

2. 学会発表

- * 新潟脳神経研究会特別例会
神経変性疾患におけるメタロチオネインと重金属の役割と創薬への応用

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

平成 23 年度総括研究報告書

フェアル病（特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症）の診断方法の確立と治療法の開発

研究代表者 保住 功

岐阜薬科大学薬物治療学 教授

研究要旨

原因不明の(特発性)、両側性に脳内に石灰化を来す症例 (Idiopathic Bilateral Calcification (IBiC))という診断基準で、収集した患者登録総数は 151 例である (平成 24 年 5 月 5 日現在)。頭部 CT 画像を、岐阜大学と新潟大学で行った全例調査では、淡蒼球に約 20%と高頻度に点状の石灰化が認められ、斑状でも 2%に、かつ加齢とともにその頻度は増加した。また毛髪中の金属測定では患者群においてコントロール群と比較して、リン (P)、銅 (Cu) 等の低下が認められ、何らかの金属におけるホメオスターシスの異常があることが示唆された。髄液中の診断マーカーをプロテオーム解析により検索を行ったが、これまで有意なものは見出されていない。遺伝子解析ではこれまで報告のあった *BGCI* についてはその変異は認められなかった。ごく最近、平成 24 年 2 月の *Nature Genetics* に報告のあったリン酸トランスポーター *PiT2* の遺伝子 *SLC20A2* の変異に関して全エクソンのシーケンスを進めている。一方、外来受診患者の不要となった歯牙組織から iPS 細胞を作製した。分子、遺伝子を切り口とした新たな診断基準、分類を目指している。

研究分担者

下澤伸行 岐阜大学生命科学総合研究支援センター ゲノム研究分野 教授

柴田敏之 岐阜大学大学院医学系研究科 口腔病態学分野 教授

犬塚 貴 岐阜大学大学院医学系研究科 神経内科・老年学分野 教授

A. 研究目的

原因不明の両側性の大脳基底核と小脳歯状核に石灰化を認める疾患は、従来‘フェアル病’と通称されてきた。これまで、その臨床症状、頭部 CT 所見の多様性から、全国の患者数やその実態は明らかでなく、また頭部 CT 以外の診断法、また治療法に関して、全く解明の糸口すらつかめていなかった。我々は脳内に石灰化を来した 3 症例の髄液中の重金属を高感度の誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) を使って検索し、Ca 代謝は正常であったが、3 症例とも銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、鉄 (Fe)、

マグネシウム (Mg) の上昇が著明であることを見出し、本疾患の病態解明への方向性を示した。本研究の目的は、まず、日本における患者の実態について明らかにする。そして、登録された症例患者の毛髪、髄液中の重金属を測定し、より病態を明らかにする。また、髄液中のタンパク質の網羅的プロテオーム解析を行うことで、疾患に特異的なマーカーを見出す。さらに、家族例も含めた患者の DNA の解析から、原因遺伝子、疾患感受性遺伝子を見出す。また一方で、患者のいらなくなった歯牙組織から iPS 細胞を作製し、病態の解明、将来的な治療法に役立てたいと考えた。以上の総括的検索結果ら、脳内石灰化の原因、機序を解明し、疾患の治療や進展を抑制する薬物治療薬を開発することを本研究班の最終目的とする。

B. 研究方法

(1) 実態調査

我々は、日本神経学会教育施設、さらに日本小

児神経学会専門医を対象に、原因不明の、両側性の脳内石灰化症をきたす症例に関する一次アンケート調査を行う。回答がえられた症例に対して、2次調査として、画像、血液検査データ等の収集調査を行い、さらに毛髪、血清、DNA 採取のための血液、髄液の検体提供を3次調査と共に依頼する。全国疫学調査を行うため、「特定疾患の疫学に関する研究班」（自治医科大学上原里程准教授）との合同調査研究を開始する。全国の放射線科のある病院の放射線科を対象に、班会議で確立された全国疫学調査マニュアル法に基づき、調査対象機関を階層化し、無作為抽出し、アンケート調査を行う。また、地域重点的に岐阜大学附属病院と新潟大学附属病院における1年間に撮影した頭部CT画像全例について脳内石灰化の有無を調査する。

（2）検体解析

得られた毛髪重金属の測定を行う。また髄液は網羅的プロテオーム解析を行い、診断マーカーの検索を行う。遺伝子はこれまで報告ある *IBGC1*、*SLC20A2* の解析、また特に家族例を主に、原因遺伝子、疾患感受性遺伝子の検索を行う。尚、データの管理、マネージメント、倫理的妥当性に関しては当大学の倫理審査委員会の定期的な監査を受ける。外来受診患者の同意を得て、不要となった歯牙組織から iPS 細胞を作製する。

（3）まとめ

実態、病態が明らかになった時点で、明確な診断基準の作成、細分類、検査項目を明らかにし、今後、効率的・効果的に研究を行なう。治療法について検討する。またこれらの研究事業と並行して、岐阜大学附属病院を受診した患者については面談を行い、カウンセリングとその後もインターネットを活用した心のケア通信を行っていく。

（倫理面への配慮）

全国疫学調査は、岐阜大学の倫理委員会の承認を得て、施行した。岐阜大学と新潟大学の附属病院を拠点とした頭部CT画像調査は両大学の倫理委

員会の承認をそれぞれ得て、実施した。収集された患者の毛髪・血液・髄液等の検体を使用した検査は、岐阜大学の倫理委員会の承認を得て、患者の同意を文書で得た上で行った。個人情報保護の観点から、連結可能匿名化を行った。遺伝子検査は、岐阜大学の倫理委員会（ヒトゲノム・遺伝子解析研究）の承認を得て、患者の同意を文書で得た上で行なった。収集された貴重な検体は、今後の更なる検索のため、二次利用ができるよう説明書と同意書内に明確に文章化し、患者の署名による同意を得た。患者や家族との面談、IT機器を活用した心のケアは、それぞれ岐阜大学の倫理委員会の承認を得て、同意を文書で得た上で行った。

C. 研究結果

（1）実態調査

全国の日本神経学会教育施設を対象に行ったアンケート調査の回収率は39.7%、小児神経専門医を対象に行ったアンケート調査の回収率は49.7%であった。岐阜大学附属病院への直接の外来受診者も含めて、患者登録総数として151例の登録が得られた（平成24年5月5日現在）。その中には年齢、性別も明らかでない症例が23例、経過から副甲状腺機能亢進症が明らかとなった症例、Cockayne 症候群、Aicardi-Goutières 症候群がより強く疑われた症例も含まれた。

全国疫学調査として、全国の放射線科のある病院の放射線科を対象に行ったアンケート調査では解析に十分な回答数が収集できなかった。

岐阜大学附属病院で1年間に撮影した頭部CTにおいて、淡蒼球に点状の石灰化を認める症例は全体の17.2%、新潟大学附属病院で20.6%であった。さらに斑状のものは各1.3%、1.9%であったが、65歳以上となると2.1%、3.1%と増加した。小脳歯状核となると0.28%、0.16%とその頻度は低かった。

（2）解析

収集され解析された毛髪検体数は、53検体であ

った（平成 24 年 5 月 5 日現在）。その中で、28 検体に関して、24 種の金属種について、ICP-MS を用いて測定した。各症例の年齢・性に対応させたコントロール群 3 例を対照に SPSS を用いて、解析した結果では、患者群の毛髪で、リン (P)、銅 (Cu)、ゲルマニウム (Ge)、セレンウム (Se) 含量が有意に低下していた。

収集した DNA は総数 72（平成 24 年 5 月 5 日現在）。遺伝子検索ではまず、BGC1 で高率にみられる MGEA6 遺伝子 p.P521A 変異を、家族歴のある 2 家系の患者 7 名および孤発性 21 例で検索したが、1 例も認められなかった。平成 24 年 2 月 Nature Genetics に報告のあった *SLC20A2* 遺伝子変異に関しては *SLC20A2* の全エクソンのシーケンス解析を進めている (Nature Genetics 44, 254–256 (2012))。岐阜大学附属病院の外来を直接受診された患者の不要となった歯牙組織から iPS 細胞を作製したが、細胞初期化抵抗性である可能性が示唆された。患者と家族に対して、同意を得て、インタビューや IT 機器を活用した心のケアに関するメール通信を行った。3 症例のインタビューについて分析を行い、その成果を心理的支援に活用した。

(3) まとめ

収集した検体は分析中であり、分子、遺伝子を切り口とした分類を行う。臨床データと多変量解析等の統計学的解析を専門家と共に行う。それらをもとに新たな診断基準、分類の作成に活用する。

D. 考察

原因不明の、病的な脳内石灰をきたす症例の登録は、アンケート調査は途中ではあるが、100 症例を超える予想以上の症例数であった。脳内石灰化は、副甲状腺機能低下症、ミトコンドリア脳筋症、SLE などの膠原病、白質脳症、先天代謝異常症に伴って原因の明らかな場合もあるが、通常の検索では何ら異常を認めない症例も多い。また、全くの無症状で、たまたま頭部外傷などで頭部 CT を

撮った際に脳内の異常な石灰を指摘され発見された症例、軽い頭痛があり、頭部 CT を撮った際に脳内の異常な石灰を指摘され発見された症例もあった。これまで病気に対する一般情報が少なく、正面から病気に取り組む体制もできておらず、見放されてしまうことも少なくなかった。そのため、病気の進行に対する今後の予測がつかず、その不安が極めて大きい方もあった。小児例においては、重度精神発達遅滞、てんかん、発作性片麻痺、思春期早発、痙性四肢麻痺、緻巧運動障害、小頭症、眼振、高アンモニア血症など他にも際立った臨床徴候、症状を呈する症例も登録され、背景に何らかの先天代謝異常症が存在することが推定される症例も少なからず認められた。初老期の症例では、緩徐進行性の認知症を呈し、剖検で著明な NFT、小血管周囲の石灰化を認める Kosaka-Shibayama Disease (DNTC) が診断として考えられる症例もあった。剖検報告を見ても淡蒼球の石灰化の程度と脳内も小血管周囲の石灰化の程度とは必ずしも平行していない。NFT や小血管周囲の石灰化を PET、SPECT で検出する方法は見出されていない。髄液における診断マーカーの検索が必要と考えられ、プロテオーム解析を行ったが、現在まで、有意なマーカーは見出されていない。

前述のごとく、家族性特発性基底核石灰化症 (IBGC) に罹患した多くの家系において、III 型ナトリウム依存性リン酸トランスポーター 2 (PiT2) をコードする *SLC20A2* の変異が同定された。アフリカツメガエルの卵母細胞を用いて調べたすべての PiT2 変異体のアッセイにおいて、リン酸輸送活性が大きく障害されていることが報告された。これは病因にリン酸ホメオスタシスの変化が関与していることを示唆している。我々もこの *SLC20A2* の変異を全例で解析する。この遺伝子以外の変異についても、東京大学との共同研究において、次世代シーケンサーを駆使した全ゲノム解析を行う計画である。

分子、遺伝子を切り口とした新たなファール病

の病態解明、分類を行う予定である。

E. 結論

IBiCは神経内科医、小児神経内科を対象としたアンケート調査で、100症例を超える症例が集積され、現在も症例の登録が進行している。小児の症例では背景に何らかの先天代謝異常症が存在すること、初老期以降の症例にはDNTCが存在することが推測される。IBGCに関する新たな遺伝子*SLC20A2*の変異が報告されたことで、ファール病の病態解明に関して新たな展開が予想される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- * I. Hozumi. Roles and Therapeutic Potential of Metallothioneins in Neurodegenerative Diseases. Current Pharmaceutical Biotechnology. submitted.
- * Yamada M, Asano T, Okamoto K, Hayashi Y, Kanematsu M, Hoshi H, Akaiwa Y, Shimohata K, Nishizawa M, Inuzuka T, Hozumi I. High frequency of calcification in basal ganglia on brain CT images in Japanese elderly people. Geriatr Gerontol Int. submitted.
- * Takagi M, Ozawa K, Douke M, Hashimoto K, Hayashi Y, Inuzuka T, Yasuda H, Hozumi I. Bioelements content of hair in Fahr's disease. J Trace Elements Med Biol. Submitted.
- * 堀田 みゆき、保住 功. 「希少神経難病ファ

ール病3例の患者と家族のインタビューから得られたもの」臨床看護 投稿中

2. 学会発表

- * 第52回日本神経学会学術大会
頭部CTによる脳内石灰化の臨床的検討
山田 恵、浅野隆彦、林 祐一、星 博昭、
犬塚 貴、保住 功
日時：平成23年5月18日
場所：名古屋国際会議場
- * 第57回日本薬学会東海支部総会・大会
特発性両側性脳内石灰化症における毛髪中ミネラル量の解析
高木麻里、橋本和宜、道家光子、林 祐一、
保住 功
日時：平成23年7月9日
場所：金城大学薬学部
- * 第22回日本微量元素学会
神経変性疾患におけるメタルの役割と代謝
保住 功
日時：平成23年7月2日
場所：京都テレサ
- * 第38回富山県臨床神経研究会（特別講演）
特発性脳内石灰化症（IBiC）の現状と課題
ーファール病～小阪・柴山病（DNTC、非アル
ツハイマー型認知症）
日時：平成23年10月28日
場所：富山電気ビルディング

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 特記事項なし

ファール病（特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症）の 診断方法の確立と治療法の開発に関する研究

研究代表者： 保住 功（岐阜薬科大学薬物治療学教授）

研究分担者： 犬塚 貴（岐阜大学医学部神経内科教授）

辻 省次（東京大学医学部神経内科教授）

研究要旨

岐阜薬科大学、岐阜大学、東京大学との共同研究にて、ファール病（特発性両側性大脳基底核石灰化症（idiopathic bilateral ganglionic calcification (IBGC)）の患者 69 例について、*SLC20A2* 遺伝子の直接塩基配列決定法による解析を行った。家族例 9 家系中 4 家系で、孤発例 47 例中 3 例で同遺伝子の変異を認めた。これら全て、これまでに報告のない新規変異であった。*SLC20A2* 変異例間では一定のタイプは認めず、臨床症状、石灰化の程度は多様性に富んでいたが、同一遺伝子変異を持つ症例間では臨床症状、画像所見に類似点が多く、類似した phenotype を有する可能性があると考えられた。

SLC20A2 が code するタンパク質である type III sodium-dependent phosphate transporter 2 (PiT-2) の機能解析のため、まず、PiT-2 の polyclonal と monoclonal の抗体を用いて、ラット脳を検索した。PiT-2 の immunopositivity は線状体、小脳を含め遍く脳内に認められ、細胞レベルでは特にニューロン、血管内皮細胞に強く認められることを見出した。さらに患者で認められた *SLC20A2* の遺伝子変異を導入した CHO 細胞を作製し、無機リン(Pi)運搬能を検索している。

A. 研究目的

ファール病は慣例的に、原因が不明で、両側淡蒼球に顕著な石灰化を来す疾患として呼称されてきた[1]。しかし、類似の病態を指す疾患名が多数存在し[2]、最近、国際的には (idiopathic bilateral ganglionic calcification (IBGC) と名称が通用している。孤発例のほか、家族例 (familial IBGC (FIBGC)) の存在が知られている。これまでその原因遺伝子座として、

IBGC1 (14q) [3]

IBGC2 (2q37)2q37 [4]

IBGC3 (8p11.21) 8p11.21 [5]

IBGC4 (5q32) [6]

が報告されてきた。海外における家族例では特に IBGC3 が原因遺伝子として家族性に占める頻度は高いことも報告された [7]。本邦における家族例および孤発例の IBGC 症例における IBGC3 の原因遺伝子 *SLC20A2* の変異の頻度および臨床的特徴について、全国から患者の DNA の収集を行った岐阜薬科大学、岐阜大学、次世代シーケンサーを所有する東京大学との共同研究にて検討した。

さらのこの原因遺伝子である *SLC20A2* が code するタンパク質である type III sodium-dependent phosphate transporter 2 (PiT-2)

の分子病態の解明を行う。

B. 研究方法

全国一次アンケート調査でフェール病が疑われる症例（症例基準：1）頭部 CT にて大脳基底核 and/or 小脳歯状核に石灰化あり、2）両側対象性の脳内石灰化病変を有する、3）脳内石灰化をきたしうる代謝性疾患、外傷の既往、感染症やその他の疾患が除外できる）について情報提供を依頼した。その中で 39 施設 63 例の DNA 検体が提供され、IBGC の診断に適合することを確認できた家族例 8 家系（20 例）、孤発例 41 例につき（合計 37 施設）、*SLC20A2* 遺伝子の直接塩基配列決定法による解析を行った。同時並行して、東京大学神経内科が所有する 8 症例の遺伝子解析が行われ、副甲状腺機能が確認できない 1 症例を除外し、合計 68 症例の臨床情報、遺伝子解析結果について集約し、総合的検討を行った。

今回見出した *SLC20A2* の遺伝子変異を導入した CHO 細胞を作製する。

PiT-2 の polyclonal と monoclonal の抗体を用いて、ラット脳を検索する。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、それぞれ岐阜大学、岐阜薬科大学および東京大学の研究倫理審査委員会の承認のもとに実施した。DNA の採取にあたっては、書面を用いてインフォームド・コンセントを取得した。また、個人情報の取り扱いについて十分に配慮しながら、研究を遂行した。また共同研究についても両施設において倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

家族例 9 家系中 4 家系で *SLC20A2* 遺伝子変異をみとめ（44.4%）、いずれも新規変異で

あった。

家系 1（9 例；6 例で石灰化あり、3 例は石灰化なし）では、脳内石灰化を有する全例で遺伝子変異を認める一方で、石灰化がみられない例では変異はなかった。変異例の臨床症状は、認知機能低下が主であり、運動機能障害はみられなかった。

家系 2、家系 3 は同一の遺伝子変異を認めた。これら 2 家系の症例はいずれも、約 5 年の経過で進行する認知機能低下、パーキンソニズムを呈し、頭部 CT では両側大脳基底核、小脳歯状核を中心に広範囲に著大な石灰化を認めた。

家系 4 74 歳女性、71 歳時、パーキンソニズムで発症した。73 歳時、頭部 CT で淡蒼球に著明な石灰化を認め、また長女にも同様な脳内石灰化が認められた。79 歳時、肺炎で死亡した。興味深いことに、剖検で IBGC に合致する石灰化に、パーキンソン病と合致する病理所見も認められた。

孤発例では 47 例中 3 例（6.4%）で遺伝子変異を認め、症例 1 例は Paroxysmal kinesigenic choreo-athetosis を呈する 24 歳男性例であった。症例 2、3 はそれぞれ 72 歳女性、78 歳男性で、MMSE は両者とも 22 点の軽度認知機能低下が疑われ、PIB-PET でアミロイドの沈着がないことも確認されている。

PiT-2 の immunopositivity は線状体、小脳を含め遍く脳内に認められ、細胞レベルでは特にニューロン、血管内皮細胞に強く、アストロサイトには弱く認められ、オリゴデンドロサイトやミクログリアには認められなかった。

また *SLC20A2* に認められた変異を導入した CHO 細胞を培養中であり、今後の機能解析に用いる。

D. 考察

本研究で、*SLC20A2* の変異は家族例 9 家

系中4家系の44.4%に、孤発例47例中3例の6.4%に認められた。本邦の家族性フェール病において、頻度の高い原因遺伝子であると考えられた。*SLC20A2*変異例間では一定のタイプは認めず、臨床症状、石灰化の程度は多様性に富んでいた。一方で、同一遺伝子変異を持つ症例間では臨床症状、画像所見に類似点が多く、phenotypeを有する可能性があると考えられた。

今後、さらなる研究として、IBGC4の原因遺伝子*PDGFRB*の変異の解析を行う。また*SLC20A2*に変異の認められなかった家族例についてはエキソーム解析を行う。

PiT-2、PiT-1の機能解析を行い、IBGC発症のメカニズムを解明し、病態に合致した創薬開発を目指す。

E. 結論

本邦のFIBGCにおいて、*SLC20A2*は頻度の高い原因遺伝子であり、変異例の臨床症状、石灰化の程度は多様性に富むが、同一遺伝子変異を持つ症例間では臨床的に類似したphenotypeを有する可能性がある。

PiT-2のimmunopositivityはニューロン、血管内皮細胞に強く認められた。

[参考文献]

- [1] 葛原茂樹 フェール病と特発性基底核・小脳石灰化症 P.516-517. 神経内科学書第2版 朝倉書店(豊倉康夫総編集)
- [2] Manyam BV. What is and what is not 'Fahr's disease'. Parkinsonism Relat Disord. 2005;11:73-80.
- [3] Geschwind DH et al. Identification of a Locus on Chromosome 14q for Idiopathic Basal Ganglia Calcification (Fahr Disease). Am. J. Hum. Genet. 1999; 65: 764-772.
- [4] Volpato CB et al. 2q37 as a suscepti-

bility locus for idiopathic basal ganglia calcification (IBGC) in a large South Tyrolean family. J Mol Neurosci. 2009; 39: 346-353.

- [5] Wang C, Li Y, Shi L, Ren J, et al. Mutations in *SLC20A2* link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. Nat Genet. 2010; 44: 254-256.
- [6] Nicolas G, Pottier C, Maltête D et al. Mutation of the *PDGFRB* gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. Neurology. 2013;80:181-187.
- [7] Hsu SC, Sears RL, Lemos RR, et al. Mutations in *SLC20A2* are a major cause of familial idiopathic basal ganglia calcification. Neurogenetics. 2013;14:11-22.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- * Yamada M, Asano T, Okamoto K, et al. High frequency of calcification in basal ganglia on brain computed tomography images in Japanese older adults. Geriatr Gerontol Int. Epub 2012 Dec 21.
- * Takagi M, Ozawa K, Yasuda H, et al. Decreased bioelements content in the hair of patients with Fahr's disease (Idiopathic bilateral calcification in the brain). Biol Trace Elem Res. 2013;159: 9-13.
- * 堀田みゆき、保住 功 希少神経難病フェール病3例の患者と家族のインタビューから得られたもの 臨床看護 2012. 38(13)1907-1912.
- * 保住 功 進むFahr病の病態解明 医学

のあゆみ 2012. 243(4)323-324.

- * Hozumi I. Roles and Therapeutic Potential of Metallothioneins in Neurodegenerative Diseases. Curr Pharm Biotechnol. in press. 2013.

- * 本邦における SLC20A2 の遺伝子解析 Neurology に投稿準備中

- * PiT-2 の脳内局在の検索について J.Neurol Sci に投稿準備中

2. 学会発表 なし

- * 岐阜健康長寿・創薬推進機構 第5回異分野交流研究会

「神経難病治療への新たな挑戦 ー次世代シーケンサー、iP S細胞を活用してー」

保住 功

日時：平成24年11月22日（木）

場所：岐阜薬科大学

H.知的財産権の出願・登録状況

(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

ファール病 (特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症) からの iPS 細胞樹立と病態解析

研究分担者：柴田 敏之 岐阜大学大学院医学系研究科口腔病態学分野

研究協力者：畠山 大二郎 玉置 也剛

岐阜大学大学院医学系研究科口腔病態学分野

研究要旨

ファール病 (特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症) の病態解析材料を得るために同患者から iPS 細胞の樹立を行った。研究協力の承諾が得られた 6 人の患者の口腔組織 (歯髄、歯肉) から細胞株を樹立した。この内の 1 例の歯髄細胞株 (DP276、歯根形成期) に、山中 4 因子を組み込んだセンダイウイルスベクターを用いて iPS 細胞の作製を試みた。この際、当科が保有している健常者より樹立した歯髄細胞バンク (約 250 株) から本例と同年齢で同じ発育段階の智歯より樹立した細胞株 (DP31、歯根形成期) を対照 (ポジティブコントロール) として iPS 細胞誘導を行った。

最終的にファール病患者由来 DPC 株から iPS 細胞株は樹立できたが、そのコロニー誘導率は DP31 (健常) が 270 個/10mm dish に対し、DP276 (ファール病) は 6 個/10mm dish と著明に低い結果となった。これまでの解析で、DP31 のような智歯発育段階が未熟である歯冠完成期や歯根形成期より樹立した歯髄細胞株では、通常誘導効率が高いことが分かっており、ファール病の歯髄細胞は細胞初期化抵抗性である可能性が示唆された。この現象は注目に値しファール病の病態解明のみならず現在ほとんど不明となっている細胞初期化機序を解析する糸口になる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

我々は、種々の形成段階にあるヒト抜去歯より歯髄組織細胞 (Dental Pulp Cell: DPC) を既に 250 ライン程樹立・保有し、個体差の検証を行って来ている。その結果、より未熟な形成期の歯から得られる DPC は高い増殖・分化能を持つが、継代培養により喪失することを明らかにして来た (Takeda et al. J Dent Res. 2008) ¹⁾。また、京都大学山中研究室と

共同で、DPC からの iPS 細胞誘導を試み、iPS 細胞を高率にかつ Oct・Sox の 2 因子でも樹立可能であることを見出し、DPC が iPS 細胞の供給源として有用であることを示して来ている (Tamaoki et al. J Dent Res. 2010) ²⁾。更に、DPC はゲノムへのベクター挿入が生じないセンダイウイルス法やエピソームプラスミド法でも容易に iPS 細胞の樹立が可能であることを示して来ている (Nature methods

2011) ³⁾。

そこで、本研究では、我々が保有する種々の年齢・発生段階から得られている豊富なヒト DPC 株を対照として、フェール病（特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症）患者から DPC 株を樹立し、これらより iPS 細胞株を樹立することで、病態解析（疾患モデル）に資することを目的として本研究を行った。

B. 研究方法

(1) フェール病患者から細胞株を樹立

通法に従い抜去智歯の歯髄より DPC 株を樹立した (Takeda et al. J Dent Res. 2008) ¹⁾。DPC は、比較的容易に採取・樹立可能であり、培養方法がシンプルであることから、センダイウイルス法やエピソーマルプラスミド法でも高率に iPS 細胞が樹立可能である利点を有している。また、健常者からのバンク化も出来ていることから病態解析に必要な比較対照群を容易に得られることで、DPC をフェール病患者からの iPS 細胞のリソースとして選択した。ただし抜去すべき智歯がない患者は、歯肉から細胞株を樹立した。

(2) iPS 細胞の誘導

iPS 細胞の作製方法には現在の所、レトロウイルス、アデノウイルス、センダイウイルス、エピソーマルプラスミドなどがあるが、iPS 細胞樹立後の病態解析、特に分子生物学的解析を行う場合にゲノムに影響を残すレトロウイルス法は、その解析を困難にする可能性があると考え、本研究では操作も容易なセンダイウイルス法を選択した。センダイウイルスは negative strand RNA ウイルスで、細胞質にとどまって RNA を転写、複製して蛋白質を合成することから、宿主染色体に影響を与えず、挿入変異や染色体構造変化の危険性もないなどの特徴がある。また siRNA を用いると宿主細胞からセンダイウイルスベクターを容易に除去することが可能である。我々は

山中 4 因子 (Oct4・Sox2・Klf4・c-Myc) を組み込んだセンダイウイルスベクター（産総研・中西先生より分与）を DPC に感染させ、翌日より ES 細胞の培養条件で培養し、その後 ES (iPS) 細胞様コロニーの形成を観察した。1-2 回の植え継ぎを行い、その際に siRNA 処理をすることで、約 2 週間後にヒト ES 細胞様コロニーが出現した。これらのコロニーをピックアップし、iPS 細胞株として樹立した。また抗センダイウイルスベクター抗体による免疫染色で、センダイウイルスベクターが除去されているかどうかを確認した。

(倫理面への配慮)

特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症遺伝子バンク登録患者の個人情報には十分配慮し、本研究への承諾と伴に、iPS 細胞樹立およびその後の遺伝子解析に関する説明を行い、承諾の得られた方から細胞株の樹立・iPS 細胞の誘導を行った。

C. 研究結果

本疾患と診断された 6 人の患者より細胞株を樹立した (4 例が歯髄、2 例が歯肉より樹立した)。この内、若く、歯の形成段階も未熟な 16 歳の方の DPC 株 (DP276) を用い iPS 細胞誘導を試みた。これまでの解析から、若年者で歯の形成段階が未熟な智歯由来の DPC では、iPS 細胞への誘導効率が高いことが判っているため、DP276 を用いた。尚、対照としてバンクから同年齢で同様の発育段階由来の DPC 株 (DP31) を選び用いた。その結果、最終的にフェール病患者由来 DPC 株から iPS 細胞株は樹立できたが、そのコロニー誘導率は DP31 (健常) が 270 個/10mm dish に対し、DP276 (フェール病) は 6 個/10mm dish と著明に低い結果となった。この結果は、フェール病患者由来の DPC 株は細胞初期化抵抗性である可能性が示唆された。

しかし樹立した iPS 細胞株は、ヒト ES 細胞と同程度の増殖能と性質を有することが分かった。また、現在フェール病患者の歯肉由来細胞株からも iPS 細胞の誘導を行っている。

D. 考察

特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症患者由来 DPC 株からセンダイウイルスベクターを用いて、non-integration iPS 細胞株を樹立した。この iPS 細胞は、ゲノムに遺伝子変異が無いため今後の分子生物学的解析が容易と考えられた。また、iPS 細胞の誘導過程において樹立効率にこれまで観察されたことのない程著しい違いが見出された。この相違は注目に値すると考えられ、フェール病の病態解明のみならず現在ほとんど不明となっている細胞初期化機序を解析する糸口になる可能性があると考えられた。今後は作製した iPS 細胞を用いて神経誘導等を行いフェール病の病態解析を行うと伴に、今回見出された樹立効率の著しい違いが単に個体差によるものか、疾病に由来するものかを明らかにすることが重要と考えられた。

E. 結論

フェール病（特発性両側性大脳基底核・小脳歯状核石灰化症）患者 6 人から細胞株を樹立した。内 1 例から iPS 細胞を誘導し、今後の病態解析に資する材料を得た。また、この過程において、フェール病患者 DPC 株の iPS 細胞誘導効率は極めて低く、フェール病の病態解析と伴に現在不明となっている細胞初期化機序解明の糸口となる可能性のある現象を見出した。

[参考文献]

- 1) Characterization of stem cell in dental pulp of human wisdom tooth germ. T Takeda, Y Tezuka, M Horiuchi, K Hosono, K Ikeda, D Hatakeyama, S Miyaki, T Kunisada, T Shibata, K Tezuka
J Dental Research 87 (7): 676-681, 2008.
- 2) Dental Pulp Cells for Induced Pluripotent Stem Cell Banking. Tamaoki N, Takahashi K, Tanaka T, Ichisaka T, Aoki H, Takeda-Kawaguchi T, Iida K, Kunisada T, Shibata T, Yamanaka S, Tezuka K. J Dent Res 89 773-778 2010
- 3) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, Hong H, Nakagawa M, Tanabe K, Tezuka K, Shibata T, Kunisada T, Takahashi M, Takahashi J, Saji H, Yamanaka S. Nature Methods 8(5) 409-412 2011.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表（2010/4/1～2011/3/31 発表）

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍：なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hozumi I, Kohmura A, Kimura A, Hasegawa T, Honda A, Hayashi Y, Yamada M, Sakurai T, Tanaka Y, Satoh M, Inuzuka T.	High Levels of Copper, Zinc, Iron and Magnesium, but not Calcium, in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Fahr's Disease.	Case Rep Neurol	2	46-51	2010
Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, Ozawa K, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Kimura A, Tanaka Y, Satoh M, Inuzuka T.	Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases.	J Neurol Sci	303	95-99	2011
Yamada M, Asano T, Okamoto K, Hayashi Y, Kanematsu M, Hoshi H, Akaiwa Y, Shimohata T, Nishizawa M, Inuzuka T, Hozumi I.	High frequency of calcification in basal ganglia on brain computed tomography images in Japanese older adults.	Geriatr Gerontol Int	Dec 21		2012
堀田みゆき 保住 功	希少神経難病ファール病3例の患者と家族のインタビューから得られたもの	臨床看護	38(13)	1907-1912	2012
保住 功	進むFahr病の病態解明	医学のあゆみ	243(4)	323-324	2012
Takagi M, Ozawa K, Yasuda H, Douke M, Hashimoto K, Hayashi Y, Inuzuka T, Hozumi I.	Decreased bioelements content in the hair of patients with Fahr's disease (Idiopathic bilateral calcification in the brain).	Biol Trace Elem Res	151(1)	9-13	2013
Hozumi I.	Roles and Therapeutic Potential of Metallothioneins in Neurodegenerative Diseases.	Curr Pharm Biotechno	in press		2013