

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

特発性両側性脳内石灰化症（ファール病を含む）の

i P S 細胞を活用した診断と治療法の確立

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 保住 功

平成 26（2014）年 3 月

目次

・総括研究報告

特発性両側性脳内石灰化症（ファール病を含む）の iPS 細胞を活用した 診断と治療法の確立	・・・・・・・・ 1
岐阜薬科大学 薬物治療学 保住 功	

・分担研究報告

1. <i>SLC20A2</i> 遺伝子変異の検索	・・・・・・・・ 8
岐阜大学 神経内科・老年科 犬塚 貴 他	
2. <i>PDGFRB</i> / <i>PDGFB</i> 遺伝子変異の検索	・・・・・・・・ 11
岐阜薬科大学 薬物治療学 保住 功 他	
3. ファール病及び関連疾患における原因遺伝子の探索	・・・・・・・・ 13
東京大学 神経内科 辻 省次 他	
4. <i>SLC20A2</i> が code するリン酸トランスポーターPiT の機能解析	・・・ 15
岐阜薬科大学 薬物治療学 保住 功 他	

・研究成果の刊行に関する一覧表	・・・・・・・・ 18
-----------------	-------------

・研究成果の刊行物・別冊	・・・・・・・・ 19
--------------	-------------

・参考資料	・・・・・・・・
-------	----------

- ・班会議のポスター
- ・岐阜大学病院神経内科専門外来のご案内
- ・ファール病ホームページ
- ・ファール病診療ガイドライン

特発性両側性脳内石灰化症（ファール病を含む）の iPS 細胞を活用した 診断と治療法の確立に関する研究

研究代表者： 保住 功（岐阜薬科大学薬物治療学）

研究分担者： 犬塚 貴（岐阜大学医学部神経内科・老年科）

辻 省次（東京大学医学部神経内科）

研究要旨

特発性両側性脳内石灰化症として全国から登録された患者数は 200 名を超え、約 80 名の DNA が収集された。遺伝子検索を行い、*SLC20A2* 遺伝子変異が 5 例、*PDGFRB* 遺伝子変異が 1 例、*PDGFB* 遺伝子変異が 4 例、すべて新規の変異として見出した。さらに、これらの変異が認められなかった症例において、次世代シーケンサーで解析し、Aicardi-Goutières 症候群等の遺伝子変異を見出した。機能解析では、*SLC20A2* のミスセンス変異を導入した CHO 細胞で、リン酸トランスポーターの著明な機能低下が認められた。PDGF に関する機能解析も進行中である。変異を認めた全例の患者および数名の孤発例患者で、血液および不要となった智歯から iPS 細胞の作製が進行している。*SLC20A2* 変異を認めた患者の歯髄細胞からの iPS 細胞作製において初期化抵抗性を認めている。iPS 細胞を血管内皮細胞、神経細胞に分化させ、上記の機能異常の再現とそのレスキュー実験を行う準備が進んでいる。また変異を認めた患者を主に、患者と家族の語りに基づく質的分析を行い、真のメンタルケアを模索しており、患者、各主治医、班研究と連携し、一体となった医療体制、そして一方では、前述の次世代シーケンサーと iPS 細胞技術による研究体制を築き上げている。

A. 研究目的

原因不明の両側性脳内石灰化症は、従来‘ファール病’と呼称されてきた。脳内の石灰化は比較的頻回に認められるものであり、全国 2 施設（岐阜、新潟大学病院）で行った頭部 CT 検査の年間全例調査では、点状をふくめた淡蒼球の石灰化を約 20%に認めた。原因が不明で、形状や程度、随伴症状等から大脳基底核の石灰化が明らかに病的と見なされる症例に対しては、現在、国際的には idiopathic basal ganglia calcification (IBGC) という名称が提唱されている。当研究室では現在ま

で、この IBGC に適合すると考えられる症例は、当初の予想を超えて、200 症例を超える登録があり、そのうち約 80 症例について DNA の収集が行われた。また家族例が疑われる 11 家系が存在した。患者の毛髪検索では、髄液同様、重金属の蓄積異常を確認した。2012 年 2 月、Nature Genetics(44:254-265)に中国から、家族例でリンの輸送蛋白（type-sodium-dependent phosphate transporter 2 (PiT2)）の遺伝子 *SLC20A2* の変異が報告された。この *SLC20A2* 遺伝子について、我々が収集した症例について検索したところ、9 家系

中4家系、孤発例3症例において新たな部位に変異を認め、この発見は病因、病態の解明、疾患の分類にとって極めて重要なものとなった。我々はこの *SLC20A2* 遺伝子以外の遺伝子変異の検索に、次世代シーケンサー (NGS) を用いた網羅的遺伝子解析を行い、すでに他疾患の原因候補遺伝子異常も見出している。今後もさらなる遺伝子検索を進める。

一方、剖検で脳内石灰化と共にびまん性に神経原線維変化 (NFT) を認め、初老期に認知症を呈する、Diffuse Neurofibrillary Tangles with Calcification (DNFC) がわが国から報告され (JNNP 57:594-596, 1994)、国外からも報告され、小阪・柴山病と呼称されている。平成25年度からは、剖検で確定された小阪・柴山病の症例のパラフィン切片からDNAを抽出し、遺伝子検索を行い、IBGCとの関連性を明らかにする。また、患者の不要となった歯牙組織より iPS 細胞を7症例で作製してきたが、ファール病の歯髓幹細胞は細胞初期化抵抗性であることが示唆されている。今後、上記、遺伝子変異を見出した症例を重点的に患者 iPS 細胞の樹立・蓄積に努める。遺伝子変異を導入した Chinese hamster ovary (CHO) 培養細胞を用いて、リン酸輸送等の機能異常の解析を行う。機能回復作用を持つ薬剤スクリーニングを行い、また、iPS 研究事業の「共同研究拠点」(笹井班)の下で、iPS 細胞を血管内皮細胞、神経細胞に分化させ、機能解析を行って、創薬を提言する計画である。これだけの IBGC 患者の DNA, iPS 細胞を有する施設は世界でも唯一である。我々は同時に、これまで全国から受診した患者を対象にカウンセリングを行い、ケアの方向性をまとめた。情報不足で不安を感じて暮らす患者と家族を支援する目的で、IT を活用した心のケアシステムの構築と「患者の語り」に基づく質的分析を行っており、平成25年度内には10症例を目標に施行し、英文誌に投稿

する。同時に、患者会の設立に向けた支援にも努める。

B. 研究方法

1) 次世代シーケンサー (NGS) を活用したゲノム解析

(1) 患者血液 DNA の遺伝子解析

これまで収集した70症例を超える DNA 検体において、*SLC20A2* 遺伝子の exon すべてをサンガー法にて検索を行う。また最近報告のあった *PDGFRB*、*PDGFB* 遺伝子についても検索を行う。家族例で、上記の遺伝子に異常が見つからず、DNA がすでに手元にある5家系については次世代シーケンサー (NGS) を用いたエクソーム解析にて原因遺伝子の検索を行う。また孤発例47症例の中で上記の遺伝子異常が見つからなかった45症例については、より厳しい診断基準で、できるだけ症例の均質化を行い、NGS を用いたエクソーム解析にて、原因遺伝子ないし疾患感受性遺伝子の検索を行う。見出された候補遺伝子に関してはサンガー法にて確認を行う。

(2) 遺伝子異常に基づく機能異常の解析

SLC20A2 遺伝子の変異が見つかった症例では、その変異遺伝子を CHO 培養細胞に導入し、ナトリウム (Na) 依存性のリン酸輸送能の機能を検索する。*SLC20A2* 遺伝子が code するタンパク質 PiT-2 の結合タンパク質を超高感度蛋白質相互作用ネットワーク解析システムを活用して検索する。得られたタンパク質と変異 PiT-2 との結合能の差異を調べ、下流の細胞内情報伝達系の相違を見出す。結合に関与する低分子化合物を合成し、創薬を行う。

(3) 剖検確診症例のパラフィンブロック、切片からの遺伝子解析

パラフィン切片からはすでに遺伝子が上手く採取が来ている。剖検にて、DNFC (目標10症例)、IBGC (目標5症例) と診断が確定した症例におけるパラフィン切片から採取した DNA を用いて、上記の患者血液 DNA の検索

と同様、*SLC20A2* 遺伝子の解析、NGS を用いたエクソーム解析を行う。

(4) 剖検確診症例のパラフィン切片の免疫組織学的検討

遺伝子異常が見つかった *SLC20A2* がコードするタンパク質 PiT-2 に対する抗体、関連するリン酸トランスポーター PiT-1 に対する抗体を上記症例のパラフィン切片を用いて、免疫組織学的検討を行う。

2) iPS 細胞を活用した機能解析・創薬に関する研究

(1) 患者の iPS 細胞の樹立

外来受診患者で、協力が得られた患者において、不要となった歯牙組織から iPS 細胞を樹立する。特に我々が *SLC20A2* に新たな遺伝子異常を見出した家族例については重点的に iPS 細胞の樹立に努める。京都大学と共同で、血液細胞から iPS 細胞を作製する。

(2) iPS 細胞の血管内皮細胞・神経細胞への分化と機能解析

患者の iPS 細胞を神経細胞、血管内皮細胞に分化させ(具体的方法の詳細は非公開)、リン酸の輸送の他、薬剤、酸化ストレス等の負荷をかけ、コントロールと比較する。また DNA マイクロアレイを用いて発現遺伝子の差異を調べる。1) の(2)で行った機能解析を iPS 細胞で行い、低分子化合物から創薬を見出す。

3) 患者と家族の語りに基づく質的分析

(1) 外来受診患者の面談と質的分析

外来受診患者で、協力が得られた患者と主たる介護者(目標数各 10 例)の面談と病の語りに基づく質的分析を行い、患者の思いの把握と適切なケアの在り方を見出す。

(2) IT 機器を活用し、心のケアシステムの構築

IT 機器を活用した心のケアと医療相談を引き続き行う。

(3) 患者会の設立に向けた支援

患者のニーズに基づいた患者会の設立に向けて支援する。

(倫理面への配慮)

患者、家族の遺伝子解析は、岐阜大学、隣接する岐阜薬科大学の両方の倫理委員会(ヒトゲノム・遺伝子解析研究)の承認を得て、施行されている。東京大学における NGS による解析は東京大学、岐阜大学双方の倫理委員会の承諾を得て、施行されている。「ヒト歯由来細胞からの iPS 細胞誘導研究」については岐阜大学倫理審査委員会の承認を得て、神経変性疾患患者を含めてすでに 300 数名の患者において、同意書を得て、施行されている。倫理指針に従い、本人もしくは本人とその代諾者に十分な説明を行い、患者側の自由意思によって同意を得た上で行っている。また、この時、本研究では研究協力を拒否した場合でも、なんら不利益を受けることのないこと、同意した後の同意の撤回は随時可能であることを説明している。患者の協力により得られた成果は学会発表や学術雑誌に公表する予定であるが、患者本人や家族の氏名等個人が特定できる情報が明らかになることが無いように配慮している。さらに、我々が樹立した細胞株については、細胞バンクへの供与も同意の対象としており、保有および樹立する株については、細胞バンクを介して供与可能なものとなっている。また iPS 細胞から神経細胞等への誘導も岐阜大学倫理委員会の承認を得ているが、本研究計画では、岐阜大学、京都大学の両方の倫理委員会の承認を得て行う。収集された貴重な検体は、今後の検索のため、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すでに得ているが、本研究計画は iPS 研究事業の「共同研究拠点」(笹井班)との連携が行われるため、樹立したフェール病患者の iPS 細胞

は京都大学に保管される計画である。個人情報の管理は、紙媒体のものは施錠した保管庫に管理し、PCでの情報分析とデータ管理はインターネットに接続されていない専用のものを使用し、大学外へのデータの持ち出しはしない。常時個人情報の管理に留意する。

C. 研究結果

1) 次世代シーケンサー (NGS) を活用したゲノム解析

(1) 患者血液 DNA の遺伝子解析

日本全国から収集した 69 症例 (家族例 11 家系 23 症例、孤発例 46 家系) の特発性基底核石灰化症 (IBGC) について、遺伝子 *SLC20A2* の変異を検索した。6 つの新しい変異を見出した。4 つはミスセンス変異、1 つはナンセンス変異、1 つはフレームシフト変異であった。6 つの新しい変異のうち、4 つは家族例であり、2 つは孤発例であった。よって、日本における家族性 IBGC (FIBGC) において *SLC20A2* 変異を認める頻度は 50% であり、他国での報告と同様、高頻度であった。*SLC20A2* 変異を認めた患者の臨床症状は非常に多様性に富んでいたが、*SLC20A2* 変異内で S637R に変異を認めた 2 家族例は、臨床経過、臨床症状、神経学的所見、画像所見において類似性が認められた。検索した中では、*SLC20A2* に変異を認めた全症例において脳内石灰化を認めた。家族例内には症候性の者と非症候性の者とが認められた。これらの所見は、American Academy of Neurology の学会誌 *Neurology* (平成 26 年 2 月 25 日) に掲載された。

また、我々は症例の収集と遺伝子解析を進めた。13 家系を含む 93 症例について遺伝子変異の報告のあった *PDGFRB*、*PDGFB* 遺伝子について解析を行った。*PDGFRB* については 1 症例 c.C2493G、p.Asn831Lys の変異を認めた。また *PDGFB* については、7 個の exon をサンガー法で検索し、5 つの変異を認めたが、

1 つは SNP であることが、判明し、残り 4 つについて mRNA の解析を行っている (Brain に論文投稿準備中)。

さらに、我々は既報の遺伝子異常が認められなかった全症例において、次世代シーケンサーを駆使して、全 exome 解析を施行した。これまでの中で、2 症例でアイカルディー・ゴートイエ症候群の原因遺伝子 *RNASEH2B* に変異があることを見出した。

(2) 遺伝子異常に基づく機能異常の解析

SLC20A2 に認められた変異である c.1909A>C, c.344C>T, c.1399C>T, c.152C>T を Flp-In system を用いて CHO 細胞に導入し、リン酸輸送能を測定した。これらの変異を有した CHO 細胞では、コントロールに比べて、Na 依存性に極めて顕著に輸送能低下が認められた。ちなみに、今回の IBGC の診断基準から除外された神奈川の症例で、遺伝子変異 c.388A>G が認められたが、PolyPhen 解析で normal であった。さらに、Na 依存性のリン酸輸送能の機能解析でも有意な低下は認められなかった。

SLC20A2 が code する PiT-2 の機能解析を行うにあたって、ラット脳内の局在について検索を行った。PiT-2 immunoreactivity はラット脳内では、線状体、小脳を含め、あまねく認められたが、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たが、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。

(Brain Res 1531:75-83, 2013 に報告した。)

(3) 剖検確診症例のパラフィンブロック、切片からの遺伝子解析

全国の剖検報告のあった施設に依頼中、また倫理審査待ちである。

(4) 剖検確診症例のパラフィン切片の免疫組織学的検討

新潟大学脳研研究所等に依頼中である。

2) iPS 細胞を活用した機能解析・創薬に関する研究

(1) 患者の iPS 細胞の樹立

本疾患と診断された 8 人の患者より細胞株を樹立した(3 例が歯髄、5 例が歯肉より樹立した)。このうち孤発例が 5 例、家族例が 3 例であった。我々はまず孤発例の GF 株を用いて従来のレトロウイルス法で iPS 細胞の誘導を行った。樹立した iPS 細胞は容易に増殖でき、我々がすでに樹立している健常者由来の iPS 細胞と同様の性質を示した。次に 16 歳の孤発例の患者由来 DPC 株 (DP276) を用いて、センダイウイルス法で iPS 細胞誘導を試みた。これまでの解析から、DP276 のような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歯の形成段階由来の DPC 株 (DP31) を選び用いた。その結果、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 (健常者由来) が 270 個/10mm dish に対し、DP276 (ファール病患者由来) は 6 個/10mm dish と著明に低い結果となった。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。現在他のファール病患者由来の細胞株からも iPS 細胞の誘導を行っており、ファール病と iPS 細胞の誘導効率に何らかの関連性があるかどうか評価検討をしている。またすでに *SLC20A2* に遺伝子変異が認められている家族例の 3 例 (c.1399C>T, c.1848G>A, c.1909C>A) についても、iPS 細胞への誘導を行っている。

(2) iPS 細胞の血管内皮細胞・神経細胞への分化と機能解析

樹立後はこの 3 例の iPS 細胞株を用いて神経細胞・内皮細胞への分化誘導を確立した手順に従い速やかに施行し、ファール病の病態解明に用いる予定である。

3) 患者と家族の語りに基づく質的分析

(1) 外来受診患者の面談と質的分析

家族性 (*SLC20A2* に変異を認めた症例) 2 症例、中国(上海)人例 1 症例の患者と家族との面談を 1~1.5 時間にわたって実施し、身体・心理・社会面を含めた実態把握を行なった。面談は IC レコーダーで録音し、逐語録として紙面に書き起こして、内容の信頼性を得るために本人へのフィードバックをした。4 症例についてまとめて、近々、質的分析ソフト (MaxQDA) を用いて内容分析を行う。また孤発例 8 症例の面談を終了し、紙面への書き起こしをおこなっている。

(2) IT 機器を活用し、心のケアシステムの構築

IT 機器を活用した心のケアと医療相談を継続して行っている。

(3) 患者会の設立に向けての支援

上記のように個々の患者、家族とは緊密に連絡を取り合っているが、全体として患者会の設立までには至っていない。

4) 総括

(1) 診断基準の作成、特定疾患への申請

昨年作成した診断基準については、平成 26 年 2 月 1 日に開催する今年度の班会議にても再検討し、診療ガイドラインについてファール病の Web 上に公開した。

D. 考察

遺伝子検索については、全国疫学調査からさらに二次、三次調査を行い、日本全国から送られた 69 症例で *SLC20A2* に関して行われた。同一の変異を認める家系内の患者においては脳内の石灰化の pattern が類似しており、症候性の患者では類似した臨床症状を呈していた。また *PDGF/PDGFRB* の遺伝子変異についても検索が進んでいる。残りの遺伝子変異が認

められない症例においても、次世代シーケンサーを駆使した全 exome 解析によって、逐次遺伝子異常が解明されるものと予想される。

iPS 細胞の作製については、今回我々は 2 人のフェール病患者の iPS 細胞を樹立した。特にセンダイウイルスベクターを用いて樹立した iPS 細胞株は、誘導の際にゲノムへの変異が生じ無いため、今後 iPS 細胞を用いたフェール病の病態解析には非常に有用である。今後は *SLC20A2* に遺伝子変異がある家族例の患者についてもセンダイウイルス法で iPS 細胞を樹立していく予定である。また、DP276 と DP31 の iPS 細胞の樹立効率にこれまで観察されたことのないほど著しい違いが見出された。これまでの研究で、DP31 の様な形成段階が未熟な歯牙組織由来の DPCs は誘導効率が高く、株間で誘導効率に著明な差は認められなかった。今回 DP276 と DP31 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。今後は作製した iPS 細胞から神経細胞、血管内皮細胞に誘導を行いフェール病の病態解析を行う。同時に、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とすることが重要と考えられた。

患者と家族の語りに基づく質的研究においては、今回 *SLC20A2* 遺伝子変異を認めた家族例 4 症例において、まもなく成果がまとまり、論文とする。また孤発例 8 症例について面談を終えたが、さらに 2 症例を加え、孤発例 10 症例として同様の質的分析を行う。これらは情報不足で不安を感じて暮らす患者と家族を支援する全く新しい試みであり、個別的なケアの在り方が明らかとなり、今後の医療の向上に大いに寄与するものである。

E. 結論

新規 *SLC20A2* 遺伝子変異を家族例を中心に高率に見出し、American Academy of Neurology の学会誌 Neurology に Neurology に報告した。また *PDGF/PDGFRB* 遺伝子変異に関しても検索を終えて、機能解析が行われている。さらに全く新規の原因遺伝子についても NGS を駆使して検索中である。すでに、その中の 2 症例に、アイカルディー・ゴートイ工症候群の原因遺伝子 *RNASEH2B* に変異があることを見い出している。*SLC20A2* 遺伝子変異をもった家族例 3 症例の歯牙組織と血液細胞から iPS 細胞の作製を試みた。歯牙組織より試みた症例で初期化抵抗性が認められ、細胞初期化機序の解明に繋がる可能性がある。また *PDGFB/PDGFRB* 変異を認めた患者や未だ遺伝子異常が見い出されていない孤発例患者での iPS 細胞の作製も順次行われており、各群間での比較、検討も含めて、病態解明に向けて研究は逐次進んでいる。日本発の iPS 細胞技術を駆使し、創薬に向けて現在、日々邁進している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表	2 件
原著論文による発表	0 件
それ以外（レビュー等）の発表	0 件

そのうち主なもの

学会発表

(1) 関根信一郎、位田雅俊、金子雅幸、竹谷豊、保住 功 家族性の特発性基底核石灰化症（フェール病）に関連した変異 *SLC20A2* におけるリン酸トランスポート活性の検討 メタルバイオサイエンス研究会
2013.9.27 . 静岡（学生優秀賞受賞）

(2) 入山真先、位田雅俊、金子雅幸、保住 功
特発性基底核石灰化症（ファール病）と関連
したリン酸トランスポーターPiT-2 のマウス
脳内における局在の検討 メタルバイオサイ
エンス研究会 2013.9.27 . 静岡

2) 海外

口頭発表 1件
原著論文による発表 4件
それ以外（レビュー等）の発表 1件

そのうち主なもの

論文発表

(1) Yamada M, Tanaka M, Takagi M, Kobayashi S, Taguchi Y, Takashima S, Tanaka K, Touge T, Hatsuta H, Murayama S, Hayashi Y, Kaneko M, Ishiura H, Mitsui J, Atsuta N, Sobue G, Shimozawa N, Inuzuka T, Tsuji S, Hozumi I, Genetic and clinical spectrum of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan. Neurology 2014;82:705-712.

(2) Inden M, Iriyama M, Takagi M, Kaneko M, Hozumi I. Localization of type-III sodium-dependent phosphate transporter 2 in the mouse brain. Brain Res. 2013;1531: 75-83.

(3) 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. 2013;13:706-710.

(4) 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.

2013;151:9-13.

(5) Hozumi I. Roles and Therapeutic Potential of Metallothionein in Neurodegenerative Diseases. Curr PharmBiotechnol. 2013;14:408-413.

学会発表

(1) Hozumi I. Roles of biological trace elements in neurodegeneration (ALS and Fahr's disease (IBGC) From molecular mechanisms to therapeutic strategies, Symposium 12:Frontier of Neurometals, Xth ISTERH 2013, 2013. 11.20. Tokyo.

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

- 1) 特許取得
特になし
- 2) 実用新案登録
特になし
- 3) その他
特になし

SLC20A2 遺伝子変異の検索

研究分担者： 犬塚 貴（岐阜大学医学部神経内科・老年科）

研究協力者： 山田 恵、林 祐一（岐阜大学医学部神経内科・老年科）

小林清樹（札幌医科大学精神神経科）

田口芳治、高嶋修太郎、田中耕太郎（富山大学医学部神経内科）

峠 哲男（香川大学医学部看護学科健康科学）

山田 恵、高木麻里、金子雅幸、保住 功（岐阜薬科大学薬物治療学）

研究要旨

2012 年リン酸トランスポーター遺伝子である *SLC20A2* (PiT-2) が特発性基底核石灰化症：IBGC、ファール病)の原因遺伝子として同定された。当研究班での全国調査で収集した症例では、家族例の約 50%に同遺伝子の変異が認められ、この結果は *Neurology* に報告した (*Neurology* 82, 705-712.2014)。その後の症例検索で、さらに 1 家系新たに同遺伝子の新規変異をみとめた。また昨年度弧発例として報告していた症例の血縁者の遺伝子検索を行ったところ、家族例と判明した。

SLC20A2 は本邦の家族性ファール病(FIBGC)の主要な原因遺伝子である。多数例の検討では、*SLC20A2* 変異を有する群において、変異を持たない群と比較して、臨床上特徴的な所見は認めなかった。

A. 研究目的

2012 年リン酸トランスポーター遺伝子である *SLC20A2* (PiT-2) がファール病の原因遺伝子として同定された。当研究班での全国調査で収集した症例での検索では、家族例の約 50%に同遺伝子の変異が認められ、*Neurology* に報告した (*Neurology* 82, 705-712.2014)。

その後、さらに追加された症例の *SLC20A2* 検索を行うとともに、昨年度報告した *SLC20A2* 変異症例について、臨床情報の再検討を行うと共に、*SLC20A2* 変異を有する弧発例の血縁者の遺伝子検索を施行した。また、ファール病全体の中で *SLC20A2* 変異群全体としての臨床学的特徴の有無について

も検討を行った。

(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、岐阜大学大学院医学系研究科医学研究等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、研究を行った。

B. 研究方法

昨年度と同じく、ファール病を疑う症例は以下のような基準とした（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) 両側対称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、感染症やその他の疾患が除外できる)。新たに症例提供があった家族例1例と、昨年度孤発例として報告した2例の血縁者につき、臨床学的検討と *SLC20A2* 遺伝子の直接塩基配列決定法による解析を行った。また、ファール病の中で *SLC20A2* 変異群での臨床学的特徴の有無に関する検討も行った。

C. 研究結果

新たに症例提供があった家族例の発端者において、c.1848G>A (W616X) という nonsense 変異を認めた。これは既知の報告のいずれとも重ならない新規変異であった。本症例は13歳頃発症の Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis (PKC) がみられ、その他の症状や神経所見は認めなかった。頭部CTでは基底核、視床、大脳深部白質、小脳歯状核に両側性に石灰化を認め、同様の石灰化を祖母、叔母、姪に認めた。

さらに、昨年度孤発例として報告した2例のうち、PKCを呈する24歳男性例は、母に同様の脳内の石灰化を認めた。遺伝子検索を行ったところ、c.1399C>T (R467X) という nonsense 変異を認め、家族例と判明した。また、てんかん、精神発達遅滞を呈する5歳男児例は、脳炎の既往があり、それ以前の頭部CTを確認すると、石灰化はみられなかった。これはファール病 (IBGC) の診断基準を満たさず、他の要因による脳内石灰化が否定できないと考えられた。さらに *in silico* の検討では、本症例でみられた変異はタンパクの構造変化に影響を与えないと推測されるものであり、病的に意義のある可能性は少ないと考えた。

最終的に、本調査で *SLC20A2* 遺伝子の新規変異を認めた症例は、家族例6家系 (東大

症例1家系)であった。

SLC20A2 変異を有する群と変異をもたない群において、性差、症状出現年齢、臨床症状、神経学的所見を比較検討したが、有意な差はみとめなかった。

D. 考察

本調査で *SLC20A2* 遺伝子の新規変異をみとめたのは、家族例6家系であった。*SLC20A2* はファール病の主要な原因遺伝子と考えられる。

nonsense 変異をみとめた2家系では、発端者がいずれも PKC を呈していた。*SLC20A2* が PKC の関連遺伝子である可能性は否定できないと考えられ、PKC 症例での *SLC20A2* の検索が必要と考えられる。

また、*SLC20A2* 変異を有する群と変異をもたない群において、臨床所見上、有意な差はみとめず、診断には同遺伝子変異の有無の検索が必要である。

E. 結論

SLC20A2 変異は家族性ファール病において主要な原因遺伝子である。ファール病全体では、*SLC20A2* 変異の有無により臨床上、有意な差はみられず、診断には遺伝子変異の検索が重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 (東京大学と共同で執筆)
Evaluation of *SLC20A2* mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan. *Neurology* 82, 705-712 2014.

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 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

PDGFRB / PDGFB 遺伝子変異の検索

研究分担者：保住 功（岐阜薬科大学薬物治療学）

研究協力者：金子雅幸、山田 恵、位田雅俊（岐阜薬科大学薬物治療学）

研究要旨

昨年、血小板由来成長因子の受容体 *PDGFRB* とそのリガンド *PDGFB* に関して、相次いでファール病（特発性基底核石灰化症：IBGC）患者の遺伝子変異が報告されたことから、私たちは本邦におけるこれら遺伝子の変異について検討を行った。その結果、*PDGFRB* において 1 例、*PDGFB* において 4 例変異を見いだした。

A．研究目的

一昨年、ファール病研究においてリン酸トランスポーター遺伝子である *SLC20A 2*（PiT-2）が同定され、家族例の約 50%に認められた。当研究室でも検索を行い、その結果は *Neurology*（82,705-712,2014）に報告している。さらに昨年、血小板由来成長因子の受容体 *PDGFRB*（*PDGFR- α* ）とそのリガンド *PDGFB*（*PDGF-B*）に関して、相次いで IBGC の原因遺伝子として報告されたことから、私たちは本邦におけるこれら二つの遺伝子の変異について検討を行った。

B．研究方法

変異の検索では、76 症例の患者のゲノム DNA について、*PDGFB* および *PDGFRB* の各エクソンとその近傍領域を増幅するよう設計したプライマーで PCR を行い、得られた PCR 産物でサンガー法によるダイレクトシーケンスを行った。同定した変異のタンパク質への影響について、Polyphen-2 でダメージ予測を行った。

スプライスサイトにおける変異に関しては、患者の血液から total RNA を抽出し、スプラ

イスサイトをまたぐ領域を RT-PCR 法により増幅した。その後、電気泳動およびダイレクトシーケンスを行い、配列を確認した。

（倫理面への配慮）

本研究では、岐阜大学ならびに岐阜薬科大学倫理委員会の許可の下、全国のファール病患者に文書での同意を得た上で提供された血液より、ゲノム DNA および total RNA を抽出した。

C．研究結果

PDGFB では、フレームシフト変異 c.33_34delCT（p.Leu11Leufs*19）、ミスセンス変異 c.316A>G（p.Ile106Val）、スプライスサイト変異 c.160+2T>A、c.457-1G>T が同定された。ミスセンス変異 c.316A>G について Polyphen-2 で解析した結果、影響は benign と判定された。一方、スプライスサイト変異 c.160+2T>A に関して、2つのエクソンの間をシーケンスにより確認したところ、170bp ほどイントロンが挿入されていることが判明した。

PDGFRB では、ミスセンス変異

c.2493C>G (p.Asn831Lys) を同定し、Polyphen-2 で解析した結果、影響は Probably Damaging と判定された。

D . 考察

フレームシフト変異 c.33_34delCT は、欠損によるフレームシフトの影響が翻訳領域のほぼ全体に及ぶので、タンパク質の機能および分泌に大きく影響することが考えられる。また、スプライスサイト変異 c.160+2T>A、c.457-1G>T もイントロンの一部挿入により、多くのアミノ酸残基の挿入およびフレームシフトにより、分泌異常や機能の欠失が起これると考えられる。今回同定した *PDGFB* のタンパク質コード領域のミスセンス変異についても、実際に変異の影響があるか調べるため、リコンビナントタンパク質を作成し、活性を評価する必要がある。

また、*PDGFRB* のミスセンス変異 c.2493C>G については、変異がある家系内で変異に関係なく脳内の石灰化が確認された。さらに、dbSNP に登録のある変異が他に多くあったが、その中に probably damaging と予測されるものも存在する。また、乳幼児筋線維腫症 (infantile myofibromatosis) においても、*PDGFRB* の変異が報告されている。以上から、*PDGFRB* の変異 c.2493C>G がファール病の発症に関与するか疑問が残る。現在、これらの変異と受容体活性への影響に関して、検証中である。

E . 結論

現時点で、*PDGFB* は *SLC20A2* に次ぐ頻度で見られるファール病の原因遺伝子である。*PDGFRB* に関しては、ファール病の原因遺伝子として議論の余地がある。

G . 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中

2. 学会発表

1. Hozumi I, Roles of biological trace elements in neurodegeneration (ALS and Fahr's disease (IBGC)) From molecular mechanisms to therapeutic strategies. ISTERH2013 (International Society of Trace Element Research in Human) (2013/11/20, Tokyo)

ファール病及び関連疾患における原因遺伝子の探索

研究分担者： 辻 省次（東京大学医学部神経内科）

研究協力者： 田中真生，三井純，石浦浩之（東京大学医学部神経内科）

初田裕幸，村山繁雄（東京都健康長寿医療センター研究所）

研究要旨

ファール病患者 9 例のうち *SLC20A2* 遺伝子変異が陰性であった 5 例について，*PDGFRB* 遺伝子，*PDGFB* 遺伝子の直接塩基配列決定法による解析を行い，*PDGFB* 遺伝子の変異を 1 例で認めた．同変異はこれまでに報告のない新規変異であった．*SLC20A2* 変異陽性例との比較では，臨床像および石灰化のパターンについて，明確な違いは見いだされなかった．

また，ファール型石灰化を有し，直接塩基配列決定法で *SLC20A2* 変異が陰性であった 56 例について，リン酸トランスポーター遺伝子，Aicardi-Goutières 症候群の原因遺伝子など，15 種類の遺伝子を候補として絞り込み，次世代シーケンサーを用いて解析を行った．リン酸トランスポーター遺伝子についての解析では，*SLC17A1* 遺伝子に 2 例に共通する変異を認めたが，病原性変異であるかどうかについては今後さらなる検討を要すると考えられる．また，Aicardi-Goutières 症候群の原因遺伝子については，*RNASEH2B* 遺伝子の変異を 1 例で認め，成人のファール型石灰化を有する患者においても，本遺伝子の変異を念頭に置いて診断を行う必要があると考えられる．

A. 研究目的

ファール病患者の診断に関して，新たに原因遺伝子として報告された *PDGFRB* 遺伝子および *PDGFB* 遺伝子について，本邦のファール病患者に占める頻度および臨床的特徴を明らかにする．

また，これまでに報告の無いファール病の新規原因遺伝子を明らかにするため，ファール型石灰化を有し，直接塩基配列決定法で *SLC20A2* 変異が陰性であった症例について，複数の候補遺伝子について検索を行う．

（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、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，研究を行った．

B. 研究方法

当院および協力施設においてファール病が疑われ 9 症例のうち，*SLC20A2* 変異が陰性であった 5 症例について，*PDGFRB* 遺伝子・*PDGFB* 遺伝子の直接塩基配列決定法による解析を行った．

また，ファール型石灰化を有し，直接塩基配列決定法で *SLC20A2* 変異が陰性であった 56

例について、リン酸トランスポーター遺伝子、Aicardi-Goutières 症候群の原因遺伝子など、15 種類の遺伝子を候補として絞り込み、次世代シーケンサーを用いて解析を行った。

C. 研究結果

直接塩基配列決定法による解析では、*SLC20A2* 遺伝子変異が陰性であったファール病患者 5 例のうち 1 例で、*PDGFB* 遺伝子の変異を認めた。臨床像および石灰化のパターンに関して、同変異を有する症例と、これまでに見出した *SLC20A2* 変異陽性例との比較を行ったが、明確な違いは見いだされなかった。

次世代シーケンサーを用いた候補遺伝子の解析に関しては、リン酸トランスポーター遺伝子に関しての検討では、*SLC17A1* 遺伝子に各種データベース (dbSNP, 1000Genomes, exome variant server, Human Genetic Variation Browser) に登録が無く、2 例に共通するヘテロ接合性変異を認めた。

また、Aicardi-Goutières 症候群の原因遺伝子に関しての検討では、*RNASEH2B* 遺伝子のホモ接合性変異を 1 例で認めた。

D. 考察

直接塩基配列決定法による解析で見出した *PDGFB* 遺伝子変異は、これまでに報告の無い新規変異であるが、ナンセンス変異であることから病原性変異と考えられる。*SLC20A2* 遺伝子変異より頻度としては低いと考えられるが、本邦におけるファール病原因遺伝子の一つとして重要であると考えられる。

次世代シーケンサーを用いた候補遺伝子の解析では、リン酸トランスポーター遺伝子の一つである *SLC17A1* 遺伝子に 2 例に共通する変異を見出したが、本変異が病原性変異であるかどうかについては今後さらなる検討を要すると思われる。

また、Aicardi-Goutières 症候群の原因遺伝子の一つである *RNASEH2B* 遺伝子の変異を 1 例で認めたが、本変異は以前に当院にてエキソーム解析を行った、ファール型石灰化を有する一家系の変異と共通する変異であり、病原性変異と考えられる。他の症例と比較して小児期発症、点状の石灰化など臨床的・画像的な違いがあり、特徴と考えられる。

E. 結論

直接塩基配列決定法による解析で *PDGFB* 遺伝子変異が 1 例で認められ、*SLC20A2* 遺伝子変異より頻度としては低いものの、本邦におけるファール病原因遺伝子の一つとして重要であると考えられる。

次世代シーケンサーを用いた候補遺伝子の解析で、*SLC17A1* 遺伝子に 2 例に共通する変異を認めたが、病原性変異であるかどうかについては今後さらなる検討を要する。

また、ファール型石灰化を有する成人症例において、Aicardi-Goutières syndrome の原因遺伝子である *RNASEH2B* 遺伝子変異をこれまでに 2 例認めており、原因遺伝子の候補の一つとして、念頭に置く必要があると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表 (岐阜大学と共同で執筆)

Evaluation of *SLC20A2* mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan. *Neurology* 82:705-712, 2014.

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 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

SLC20A2 が code するリン酸トランスポーターPiT の機能解析

研究分担者：保住 功（岐阜薬科大学薬物治療学）

研究協力者：位田雅俊、金子雅幸、山田 恵（岐阜薬科大学薬物治療学）

竹谷 豊（徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部臨床栄養学）

研究要旨

近年、フェール病の原因遺伝子として *SLC20A2* (*PiT-2*) が同定された。*PiT-2* はナトリウム依存性リン酸トランスポーターとして、生体内のリン恒常性維持に関与していると考えられている。しかし、詳細な *PiT-2* の脳内における発現分布などは不明である。未だ原因不明であるフェール病の発症機序を考える上でも、*PiT-2* の脳内分布に関する知見は非常に重要である。一方で、他のリン酸トランスポーターについても脳内分布などは不明な点が多い。そこで、マウス脳やヒト剖検脳を用いて網羅的なリン酸トランスポーターmRNAs の発現解析を行った。結果、フェール病における石灰化領域である基底核や小脳を含む脳内全体に *SLC20A1*, *SLC20A2* は分布し、特に小脳での発現が高かった。他のリン酸トランスポーターの発現は非常に低いものであり、脳内のリン酸ホメオスタシスは *SLC20A1*, *SLC20A2* が担っていると考えられる。そこで、それらの遺伝子のコードする *PiT-1* と *PiT-2* の発現細胞に関して、その発現が高かった小脳において免疫組織学的に解析した。*PiT-1*, *PiT-2* とも神経細胞、アストロサイト、血管内皮細胞に発現していることを明らかにした。これらの成果は、フェール病の治療法確立の基盤となり、フェール病の発症分子機序の理解が進んだ。

A. 研究目的

原因遺伝子として報告された *PiT-2* を含むリン酸トランスポーターに関する mRNA 発現を網羅的に解析し、未だ不明な点が多い脳内でのリン酸トランスポーターの発現領域や発現細胞を明らかにし、フェール病の分子発症機序の基盤を構築する。

（倫理面への配慮）

ヒト剖検脳に関する研究は、岐阜大学および岐阜薬科大学の倫理審査委員会の承認のもとに実施した。動物実験に関する研究は、岐阜薬科大学動物実験委員会の承認のもとに実施

した。

B. 研究方法

各リン酸トランスポーター（*SLC20A1*, *SLC20A2*, *SLC17A1*, *SLC17A3*, *SLC34A1*, *SLC34A2*, *SLC34A3*）に特異的なプライマーを作成し、マウスおよびヒトの各脳部（大脳皮質、線条体、小脳）における各リン酸トランスポーターmRNAs の発現解析を行った。また、*SLC20A1*, *SLC20A2* においては、TaqMan プローブを用いて各脳部位における発現解析をリアルタイム PCR 法にて実施した。*PiT-1* と *PiT-2* を認識する抗体を用いて、

マウス脳およびヒト剖検脳における小脳を免疫組織学的に解析した。

C. 研究結果

各リン酸トランスポーター-mRNAs の発現解析をマウスおよびヒトの各脳部を用いて実施した結果、大脳皮質、線条体および小脳のいずれの部位においても *SLC20A1* と *SLC20A2* の発現が確認できた。一方で、他のリン酸トランスポーター (*SLC17A1*, *SLC17A3*, *SLC34A1*, *SLC34A2*, *SLC34A3*) の発現は非常に低いか、もしくは確認できなかった。さらに *SLC20A1* と *SLC20A2* の脳内の mRNA 発現の差異を検証する目的で、マウスおよびヒトの各脳部位における特異的プローブを用いたリアルタイム PCR 法を実施した。結果、マウスおよびヒト脳においても、*SLC20A1* と *SLC20A2* のいずれの遺伝子も小脳において高発現していた。*SLC20A1* と *SLC20A2* はそれぞれリン酸トランスポーターである PiT-1 と PiT-2 をコードしている。そこで、小脳における PiT-1 と PiT-2 の発現細胞を明らかにするため、免疫組織学的な解析を実施した。結果、フェール病における石灰化領域である小脳歯状核の神経細胞に PiT-1 および PiT-2 が共発現していた。さらに同じ部位で、PiT-1 および PiT-2 と GFAP 陽性のアストロサイトや CD31 陽性の血管内皮細胞との共局在も確認できた。また、プルキンエ細胞のマーカーである calbindin と PiT-1 および PiT-2 との共局在を確認した。今回の検討では、ミクログリアやオリゴデントロサイトとの共局在は確認できなかった。

D. 考察

SLC20A2 遺伝子の変異が報告され、フェール病発症に PiT-2 の機能破綻によるリン代謝調節機構の異常が、その発症に関与すると考えられる。興味深いことに PiT-2 の発現はこ

れまで考えられてきたアストロサイトや血管内皮細胞以外にも、多く神経細胞に発現していることが明らかとなった。一方で、ナトリウム依存性リン酸トランスポーターには *SLC20A2* 以外にも、同じファミリー内の *SLC20A1* (PiT-1) を含め *SLC17A1*, *SLC17A3*, *SLC34A1*, *SLC34A2*, *SLC34A3* などがある。今回の検討で、脳内に広く *SLC20A1* と *SLC20A2* が発現していること、一方で、*SLC17A1*, *SLC17A3*, *SLC34A1*, *SLC34A2*, *SLC34A3* の遺伝子発現は非常に低いか、もしくは確認できなかった。さらに *SLC20A1* と *SLC20A2* の発現はフェール病における主要な石灰化領域である小脳において高かった。この成果は、現在進行中である iPS 細胞を活用した PiT-2 機能解析の結果と共に、PiT-2 の機能破綻とフェール病発症機序とをつなぐメカニズムの解明を伸展させるものであり、今後の診断方法の確立と治療法の開発研究の基盤になる。

E. 結論

PiT-2 は広く脳内に分布し、これまで PiT-2 の発現細胞として考えられていた、アストロサイトや血管内皮細胞だけでなく、神経細胞にも発現していた。PiT-1 も PiT-2 の発現と同様な結果であったが、脳内では他のリン酸トランスポーターの発現が非常に低いことが明らかとなった。この結果は、他の神経変性疾患と同様にフェール病発症に PiT-2 の機能破綻によるリン代謝調節機構の異常が、その発症に関与すると考えられ、今後の機能解析も含めた詳細な検討が必要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Inden M, Iriyama M, Takagi M, Kaneko M, Hozumi I. Localization of type-III

sodium-dependent phosphate transporter 2
in the mouse brain. *Brain Res.* **1531**:75-83
(2013).

2. 学会発表

入山真先，位田雅俊，金子雅幸，保住功．特発生
基底核石灰化症（ファール病）と関連したリン酸
トランスポーターPiT-2 のマウス脳内における局
在の検討．メタルバイオサイエンス研究会 2013
（2013/9/27，静岡）

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の shu編集者 タ	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
保住 功	Fahr病	水澤英洋	神経症候群V	日本臨床社	東京	2014	準備中

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.	Roles and Therapeutic Potential of Metallothioneins in Neurodegenerative Diseases.	Curr Pharm Biotechno	14	408-413	2013
Inden M, Iriyama M, Takagi M, Kaneko M, and Hozumi I.	Localization of type-II sodium-dependent phosphate transporter 2 in the mouse brain.	Brain Reserach	1531	75-83	2013
Megumi M, Tanaka M, MD, Takagi M, Kobayashi S, Taguchi Y, Takashima S, Tanaka K, Touge T, Hatsuta H, Murayama S, Hayashi Y, Kaneko M, Ishiura H, Mitsui J, Atsuta N, Sobue G, Shimozawa N, Inuzuka T, Tsuji S, and Hozumi I.	Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan.	Neurology	82	705-712	2014