

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月29日現在

機関番号：17701  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590939  
 研究課題名(和文) 本邦オリジナルの遺伝性神経3疾患の分子生物学的研究  
 研究課題名(英文) molecular genetic analysis of the three hereditary neurodegenerative disorders specifically in Japan  
 研究代表者  
 大窪 隆一(OHKUBO RYUICHI)  
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師  
 研究者番号：50381166

## 研究成果の概要(和文)：

本邦オリジナルの遺伝性神経変性3疾患の原因検索を行った。沖縄型神経原性筋萎縮症(HMSN-P)については、TRK-fused gene に原因を同定。他グループからも同変異が確認された。都城に多い遺伝性白質脳症(HDLS)について、1997年に臨床像を報告したが、2011年にメイヨー大学により、原因遺伝子CSF1Rが発見され、同変異を確認した。16q-ADCA(SCA31)については、原因とされる2.5-3.1kbのリPEAT挿入変異を確認した。南九州ではリPEAT長と臨床症状に相関なく、変異のない家系も認めた。

## 研究成果の概要(英文)：

We studied molecular genetics of the three hereditary neurodegenerative disorders specifically in Japan. TRK-fused gene mutation with hereditary motor and sensory neuropathy (HMSN-P) in Okinawa was identified. Clinical features of hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids (HDLS) in Miyakonojo were established in detail in 1997. Accordingly CSF1R gene mutation was identified by Mayo medical school group in 2011. We identified 2.5-3.1kb repeat insertion with 16q-ADCA(SCA31). Otherwise, repeat length is not correlated with clinical feature in southern kyusyu. Furthermore, 16q-ADCA case without repeat insertion are determined. It is expected for the clarification of the pathogenesis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：神経内科学・臨床神経分子遺伝学

キーワード：HMSN-P, HDLS, SCA31, 次世代シーケンサー, 白質脳症, 若年性認知症

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝学的研究方法の進歩により、遺伝性神経疾患の原因の同定が進んでいる。これらは、我々自身も取り組んできたポジショナルクローニング法とヒトゲノム配列にもとづいた、候補領域の遺伝子異常の検索により達成されてきた。しかしながら、現在ヒト遺伝子マッピングが終了しているにもかかわらず、候補領域内の遺伝子（エクソンとその近辺には）異常が無い場合原因の発見ができない疾患も多く、新しいアプローチが必要となってきた。

これまでに我々は、3 疾患(CMT4F(Am J Hum Genet 2000、高嶋;共同筆頭著者), Schimke immuno-osseous dysplasia(Nat Genet 2002、高嶋;2nd 著者), ニューロパチーを伴う脊髄小脳変性症 SCAN1(Nat Genet, 2002; 高嶋; 筆頭著者)の原因を世界で初めて報告した。

一方、優性遺伝性の Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement (HMSN-P) (Ann Neurol 1997) や 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (16q-ADCA type III) (J Hum Genet, 2009 大窪、高嶋、2, 3rd 著者)は、Autosomal dominant Leukoencephalopathy with spheroid bodies (*J Neurol Sci*, 1997) (ADLES 仮名)の原因同定は、きわめて困難である。しかし、マイクロアレイ技術および近年開発された最新技術である次世代ゲノムシーケンサーを有効に活用し、今まで不可能であった大規模シーケンスを短期間に、低コストで行うことが可能となった。これにより、これまで従来の方で取り組んできた日本オリジナルの3 疾患について、同定不可能とされたいくつかの疾患の遺伝的原因を導くという研究を計画した。

### 2. 研究の目的

HMSN-P、16q-ADCA type III、ADLES、3 疾患は日本オリジナルの疾患であり、分類として遺伝性ニューロパチー、脊髄小脳変性症、若年性認知症に属する。これらの原因を同定し、遺伝子診断を可能とすることで、疾患の発症機序の解明を行う。さらに病態から見た治療へのストラテジーを明らかにする。筋萎縮、小脳失調、認知症をしめす重要な疾患であり、病態の解明は、難病の発症機序の理解にブレークスルーを与えうる。遺伝的原因を同定するため、マイクロアレイ技術および次世代ゲノムシーケンサーを使用した診断システムを構築し、変異の有無を調べる。

### 3. 研究の方法

遺伝子検査に同意を得た3 疾患の遺伝子異常を検討した。16q-ADCA type III については遺伝子座の同定は、終了しており、約1メガベースの範囲。HMSN-P、ADLES については、継続して行ってきたリピートマーカによる解析に加え、180 万の多型マーカーを搭載した Affymetrix 社製 Genome-Wide Human SNP Array 6.0 でのマッピングも行った。患者 DNA および正常兄弟 (1 疾患あたり 4-6 名) について、末梢血リンパ球または芽球化リンパ球を用い、患者 DNA 断片から候補領域の BAC ライブラリを作製する。その選択された BAC クローンの配列をゲノムシーケンサーで完全に決定し、比較を行う。解析は、性質の異なる2 種類の次世代シーケンサー (AB SOLiD, Roche LFX) で行った。ゲノムには、多数の個人差があり、有意でない SNP やその他の構造変化を出来る限り排除する目的で、同胞非罹患患者との配列比較、同一疾患患者での比較、さらに状況によっては、日本人 BAC クローンとの配列比較をおこなう。

さらにコーディング領域およびスプライス部位をターゲット領域とし、PCR 法にて増幅させ、次世代ゲノムシーケンサー (Roche 社 GS junior genome sequencer または Illumina 社 MiSeq) を用いて、リシーケンスを行い、変異 (点変異、欠失、挿入など) の有無を調べた。

SCA31 の挿入部位に (TGGAA)<sub>n</sub> を含まない長いリピートを持つ南九州の家族例については、PCR-based Southern blot 法で (TGGAA)<sub>n</sub> リピート配列の有無を調べた。

(倫理面への配慮)

これらの実験に使用する DNA 検体の使用については、鹿児島大学のヒトゲノム使用研究に関する倫理委員会で承認され、患者または家族全員から文書で遺伝子検査に関する同意書を得ている。

その結果、原因の同定が行われれば、各原因タンパクの機能解析を行い、疾患の発症メカニズムを明らかにし、さらに類似疾患の病態解析に発展させる。

### 4. 研究成果

HMSN-P については、3 番染色体長腕に TRK-fused gene に Pro285Leu 変異をヘテロ接合で同定した。この変異は、沖縄と大阪の症例で共通して確認され、正常日本人では認められなかった。この変異により運動神経細胞質内に、TFG を含む封入体形成と TDP-43 との関連により細胞変性を促進するメカニズムが予想され、この疾患と筋萎縮性側索硬化症との病理学的に共通の背景がある可能性が

示唆されている。

16q-ADCA type III (SCA31) については、2004年に我々が報告した宮崎県西部地域の常染色体優性脊髄小脳変性症 (AD-SCA) の大家系を中心に検討を続けた。この家系が SCA31 であることが 2005 年に確認され、当時の SCA31 の遺伝マーカーである Puratrophin-1 (-16C>T) 変異でスクリーニングしたところ、遺伝性家系のみならず、孤発例にもこの変異が認められた。これについては、2009 年に疾患の原因として BEAN と TK2 の共通のイントロンにペンタヌクレオチド挿入が明らかになった。SCA31 は他の AD-SCA と比較して高齢発症であるため、保因者が未発症で死去した場合には家族歴がはっきりしなくなることや、浸透率が 100% でない可能性が考えられている。一般的にリピート伸長により引き起こされる疾患は、リピートの延長が長いほど、重症病型になることは知られているが、南九州の SCA31 症例において、リピートの長さや発症年齢、杖歩行開始年齢や車椅子開始年齢について、南九州地域の症例で検討した。その結果、どの項目も明らかな関連は認めなかった。長野県の症例でも、重症度とリピート長については相関なしと報告されており当科の結果と一致していたが、発症年齢とは逆相関するとの報告もあり、更なる検討が必要である。

また、このペンタヌクレオチド挿入が認められないにも関わらず、同部位に連鎖する家系も認められており、継続して発症機序に関する検討を行っている。

ADLES については、我々が、都城地域に多発する Autosomal dominant early onset dementia and leukoencephalopathy の 1 家系を MRI 上の進行する深部白質の T2 高信号域と大脳萎縮より CADASIL の類似疾患だが異なる疾患であるとして詳細な臨床像を報告した (J Neurol Sci、1997)。その後、我々の 2007-9 年の神経病理学的検討で、CADASIL の様な血管障害が主体の疾患ではなく、多数の spheroid body の出現に特徴づけられる新しい特殊な神経変性疾患であることが明らかとなってきた。平均 45.2 歳で発症し、認知症状と運動障害が、急速に進行し、数年で寝たきり状態になってしまうという、重篤な若年性認知症である。

2011 年にメイヨー大学により、エクソームシーケンシングにより GWAS (ゲノムワイド関連解析) を行い、常染色体優性を示す Hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids (HDLS) の 14 の家族において、colony stimulating factor receptor 1 (CSF1R) のチロシンキナーゼドメインに影響を与える 14 個の異なる変異を同定した原因遺伝子 CSFR1 が発見され、我々の家系においても同変異を確認した。CSF1R はミクログ

リアの増殖と分化に必須の分子であり、HDLS の病態にミクログリアの機能不全が重要な役割を果たしていることが示唆された。また CSF1R については、de novo 変異も報告され、日本においても報告例が認められている。今後の白質脳症の病態解明に有効な知見と考えられる。

今回、日本オリジナルと考えられた 3 疾患について、原因遺伝子については同定できた。また発症機序の解明についても関連する知見を得ることができた。HMSN-P については、運動神経障害に関して ALS と共通のメカニズムが考えられ、本疾患の発症機序の解明が、日本でも 9000 人以上とされる ALS 患者の治療に寄与すると予想される。また ADLES と考えられた遺伝性白質脳症については、孤発例を含めて世界的に分布していることが判明し、改めて HDLS と同定できた。神経障害の機序に、神経細胞とミクログリアの関連が想定されており、今後の治療法確立へ繋がる可能性が高い。SCA31 については、関連が強い遺伝子異常は判明しているが、発症機序については、依然として不明な点も多く、今後の研究の進展が期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Yuan J, Matsuura E, Higuchi Y, Hashiguchi A, Nakamura T, Nozuma S, Sakiyama Y, Yoshimura A, Izumo S, Takashima H: Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type IID Caused by an SCN9A Mutation. Neurology 2013 ; 80(18):1641-9 doi: 10.1212/WNL.0b013e3182904fdd. 査読有
2. Yuan J, Higuchi Y, Nagado T, Nozuma S, Nakamura T, Matsuura E, Hashiguchi A, Sakiyama Y, Yoshimura A, Takashima H: Novel mutation in the replication focus targeting sequence domain of DNMT1 causes hereditary sensory and autonomic neuropathy IE. J Peripher Nerv Syst 2013 18(1):89-93 doi: 10.1111/jns5.12012. 査読有
3. Iguchi M, Hashiguchi A, Ito E, Toda K, Urano M, Shimizu Y, Takeuchi C, Saito K, Takashima H, Uchiyama S. : Charcot-marie-tooth disease type 4C in Japan: Report of a case. Muscle Nerve, 2013; 47(2):283-286 doi: 10.1002/mus.23540. 査読有
4. Arimura A, Deguchi T, Sugimoto K, Uto T, Nakamura T, Arimura Y, Arimura K,

Yagihashi S, Nishio Y, Takashima H.: Intraepidermal nerve fiber density and nerve conduction study parameters correlate with clinical staging of diabetic polyneuropathy. *Diabetes Res Clin Pract*, 2013; 99(1):24-29 doi: 10.1016/j.diabres.2012.09.026. 査読有

5. Tokunaga S, Hashiguchi A, Yoshimura A, Maeda K, Suzuki T, Haruki H, Nakamura T, Okamoto Y, Takashima H.: Late-onset Charcot-Marie-Tooth disease 4F caused by periaxin gene mutation. *Neurogenetics*, 2012;13(4):359-365. doi: 10.1007/s10048-012-0338-5. 査読有

6. Inamori Y, Higuchi I, Inoue T, Sakiyama Y, Hashiguchi A, Higashi K, Shiraishi T, Okubo R., Arimura K, Mitsuyama Y, Takashima H.: Inclusion body myositis coexisting with hypertrophic cardiomyopathy: An autopsy study. *Neuromuscul Disord*, 2012; 22(8):747-754 doi: 10.1016/j.nmd.2012.03.011. 査読有

7. Saiga T, Tateishi T, Torii T, Kawamura N, Nagara Y, Shigeto H, Hashiguchi A, Takashima H., Honda H, Ohyagi Y, Kira J.: Inflammatory radiculoneuropathy in an ALS4 patient with a novel SETX mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2012;83(7):763-764 doi: 10.1136/jnnp-2012-302281. 査読有

8. Shiga K, Noto Y, Mizuta I, Hashiguchi A, Takashima H., Nakagawa M.: A novel EGR2 mutation within a family with a mild demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*, 2012; 17(2):206-209 doi: 10.1111/j.1529-8027.2012.00403.x. 査読有

9. Zhao Z, Hashiguchi A, Hu J, Sakiyama Y, Okamoto Y, Tokunaga S, Zhu L, Shen H, Takashima H.: Alanyl-tRNA synthetase mutation in a family with dominant distal hereditary motor neuropathy. *Neurology*, 2012;78(21):1644-1649 doi: 10.1212/WNL.0b013e3182574f8f. 査読有

10. Nakamura T, Hashiguchi A, Suzuki S, Uozumi K, Tokunaga S, Takashima H.: Vincristine exacerbates asymptomatic Charcot-Marie-tooth disease with a novel EGR2 mutation. *Neurogenetics*,

2012;13(1):77-82 doi: 10.1007/s10048-012-0313-1. 査読有

[学会発表] (計3件)

1. 大窪隆一、橋口昭大、荒田 仁、徳永章子、高嶋 博、平野隆城、西郷隆二、田代雄一

家族性筋萎縮性側索硬化症(SOD1;H46R)の進行期臨床像に関する検討  
第53回日本神経学会総会 2012.5.24 東京

2. 大窪隆一、樋口逸郎、稲森由恵、岡本裕嗣、田代雄一、橋口昭大、高嶋 博、徳永章子 平野隆城

嚢胞肺、腎不全、脳卒中様発作を合併したミトコンドリアミオパチー家系の検討  
第52回日本神経学会総会 2011.5.19 名古屋

3. 崎山佑介、大窪隆一、西郷隆二、徳永章子、平野隆城、山下秀一、塩見一剛、高嶋 博 宮崎県南部に集積する「家族性多系統変性症」の臨床的特徴について  
第52回日本神経学会総会 2011.5.19 名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大窪 隆一 (OHKUBO RYUICHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：50381166

### (2) 研究分担者

高嶋 博 (TAKASHIMA HIROSHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80372803