

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461297

研究課題名(和文) GFAP遺伝子異常症であるアレキサンダー病の臨床および病態機序に関する研究

研究課題名(英文) Clinical and pathophysiological studies of Alexander disease caused by GFAP gene mutation

研究代表者

滑川 道人 (NAMEKAWA, Michito)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：30332993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アレキサンダー病(AxD)はGFAP遺伝子に変異をもつ、唯一のmonogenic glial cytopathyである。臨床的には乳児型、若年型、成人型の亜型に分類される。我々は以下の3つの研究を行った。

1) 28例の神経変性疾患患者に遺伝子診断を施行したがGFAP遺伝子変異は同定されなかった。2) 成人発症の白質脳症をともなう痙性対麻痺を呈する1家系に対し、全エクソーム解析を行ったところ、66遺伝子にまで絞り込んだ。3) 培養細胞を用いたGFAPの研究：SW13細胞を用いて、野生型および変異型GFAPを強制発現させたところ、凝集体形成の割合と臨床重症度とに相関関係が確認された。

研究成果の概要(英文)：Alexander disease (AxD) is a unique monogenic glial cytopathy caused by mutations in GFAP, which is a specific marker of astrocytes. AxD is divided into three clinical subtype; 1) infantile type, 2) juvenile type, and 3) adult type. We performed the following three studies.

1. GFAP gene test: We tested 28 patients with neurodegenerative disorders for GFAP mutations, but in vain. 2. Identification of a novel disease-causing gene by whole-exome sequencing (WES): We performed WES in two members in a family with autosomal dominant transmission, adult-onset spastic paraplegia with leukodystrophy, and identified 66 candidate genes. 3. Cell biological study: We expressed wildtype and mutant GFAP with a tag-free vector in SW13 cells without intermediate filaments such as GFAP and vimentin, and observed the intracellular distribution of overexpressed GFAP. We found that more aggregations were formed in the mutation which would causes much severe clinical presentation.

研究分野：神経変性疾患の分子遺伝学

キーワード：アレキサンダー病 アストロサイト GFAP

1. 研究開始当初の背景

アレキサンダー病 (Alexander disease: AxD) はアストロサイト特異的マーカーである GFAP 遺伝子に変異を持つ、唯一の monogenic glial cytopathy である。臨床的には 1) 乳児型 (大脳優位型: 1 型)、2) 若年型 (中間型: 3 型)、そして 3) 成人型 (延髄・脊髄優位型: 2 型) の亜型に分類される。

本邦での有病者数は約 50 人、有病率は 270 万人に 1 人と推定される。現在までに全世界でも遺伝子異常が同定された本症は 150 例弱で、加えて病理まで明らかにされている例は数例しかない。ゆえにこの疾患は臨床的にも未知な点が多く、更なる症例集積による臨床像の解明が重要である。

また本症が脳内のアストロサイトの特異マーカーである GFAP 遺伝子異常であることも非常に興味深い点である。アストロサイトは様々な神経疾患において重要な役割を果たしている。神経変性疾患のみならず、脳血管障害、炎症性疾患、てんかんといった一般的な疾患でもアストロサイトが重要な役割をしていることが判明しつつある。従ってこの稀少疾患である AxD の研究により、各種神経疾患におけるアストロサイトの関与を明らかにし、画期的な治療法の開発に結び付く可能性がありえる。

2. 研究の目的

我々は以下の 3 つの戦略で AxD および GFAP 機能解析を行うこととした。

1). 神経変性疾患患者における GFAP 遺伝子診断:

AxD は稀少疾患であり、臨床像および遺伝子型—表現型連関など未だ不明な点が少なくない。そのため臨床スペクトラムを拡大する目的で、神経変性疾患において積極的に GFAP 遺伝子検査を施行する。

2). 次世代シーケンサーを用いた新規遺伝子同定:

現在のところ臨床的に AxD に矛盾しないものの、約 1 割程度の症例では GFAP 遺伝子変異が同定できない。この中には明らかな家族歴のあるものもある。このような家系に探索し、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析を行い、責任遺伝子を同定する。さらにそれが新規の遺伝子であった場合、その遺伝子の機能解析を培養細胞系を用いて行う。

3). 培養細胞を用いた GFAP の研究:

AxD における責任 GFAP 遺伝子変異は、そのほとんどがアミノ酸置換を起こすミスセンス変異 (non-synonymous missense mutation) である。しかしいくつかの SNPs (single nucleotide polymorphism) も知られており、同定された変異が責任変異であることを確認するには①家系内の co-segregation の確認、②進化上、保たれた場所での変異であること、③in-silico 解析により GFAP 機能に障害を与える部位であること、などにより総合的に判断されてきた。また培養細胞への

強制発現では、変異型では凝集体を形成するが、野生型 GFAP でも割合が低いものの凝集体の形成がみられ、その割合で判定しなければならない。そこで同定された GFAP 遺伝子変異が疾患責任変異であるのか否かを評価するシステムの確立を目指す。

3. 研究の方法

1). 神経変性疾患患者における GFAP 遺伝子診断:

脊髄小脳変性症(SCA)やパーキンソン症候群といった神経変性疾患の患者をリクルートし、はじめに最も疑われる疾患の遺伝子診断を行う。特に SCA においては家族歴の有無にかかわらず CAG リピート病である SCA1, SCA2, Machado-Joseph 病(MJD), SCA6, 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)は網羅的に検索し、また不随意運動が目立つ場合、Huntington 病(HD)も遺伝子検索を追加した。このスクリーニング検査で異常がなかったもののうち、成人型 AxD に矛盾しない臨床像をもつもののほか、痙性対麻痺や白質脳症を呈する場合、発症年齢にかかわらず GFAP の全エクソンおよび exon-intron boundary を直接シーケンス法にて確認した。

2). 次世代シーケンサーを用いた新規遺伝子同定:

GFAP 遺伝子異常が発見されなかった遺伝性神経変性疾患の 1 家系の協力を得て、全エクソーム解析を施行した。対象は長男 (発症者) および父 (健常者) である。イルミナ社 HiSeq2500 を用いて DNA シーケンスを行った。

3). 培養細胞を用いた GFAP の研究:

3)-1. 各種細胞における野生型および変異型 GFAP の強制発現系の検討

C 末に V5-tag を付加した pcDNA3.1 vector に GFAP (α form) の野生型全長を導入し、mutagenesis にて変異型 (p.R239C (乳児型) および p.R276L (成人型)) を作成した。変異型はこれらの construct を lipofectamine で細胞内に導入、48 時間後に V5 抗体で検出したのち、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内局在を観察した。使用細胞は astrocytoma 由来の Becker (内在性 GFAP 含有) および B2-17 細胞 (内在性 GFAP 非含有) を用いた。

3)-2. SW13 細胞における野生型および変異型 GFAP の強制発現系の検討

前実験と同様の手法により tag が付加していない vector に野生型と変異型を導入。48 時間後に GFAP 抗体にて検出し、観察した。

4. 研究成果

1). 神経変性疾患患者における GFAP 遺伝子診断:

3 年間で 28 名の遺伝子診断を施行した。GFAP 遺伝子検索を施行した例は計 8 名であったが、いずれも遺伝子変異は同定されなかった。

一方でスクリーニング検査では SCA1 が 4 例、MJD が 2 例、SCA6 が 1 例、DRPLA が 1 例、HD が 1 例、さらに球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) も 1 例同定された。このうち SCA1 では橋にて十字架徴候陽性であり、報告した。さらに同一患者において、SCA1 と MJD の CAG リピートが延長(double expansion)していた (現在投稿中)。

なお小脳失調に外眼筋麻痺を伴う症例が 2 例あり、CAG リピート病を除外した後、PEOA1-4 (autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia type 1-4; それぞれの責任遺伝子 POLG, ANT1, twinkle, POLG2) の遺伝子検査を施行したが、2 例とも責任変異は同定できなかった。

2). 次世代シーケンサーを用いた新規遺伝子同定:

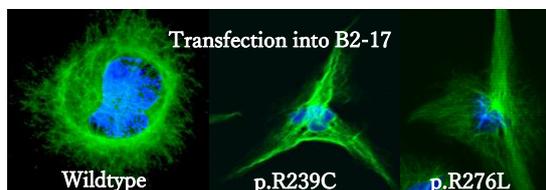
母 (発症者)、長男、長女が発症者である常染色体優性遺伝形式を取る神経変性疾患の家系を発見した。それぞれ発症年齢は 30 代前半、20 代前半、30 代前半であり、臨床症状の中核は四肢および体幹失調、呂律緩慢といった小脳症状および認知機能障害である。頭部 MRI では皮質直下優位の白質脳症およびまん性大脳萎縮、さらに脳幹・小脳萎縮がみられた。母は発症 10 年で寝たきり状態になり、その後植物状態で現在 60 代後半である。長男は現在発症 15 年目で、車椅子レベル。記憶力低下とともに易怒性が目立つ。長女は長男より発症が 10 年近く遅く、現在も独歩可能で高次脳機能障害はみられないが、画像では大脳白質病変や小脳萎縮がみられる。なお次男は無症状である。

エクソーム解析により得られた結果を各種フィルターにて選別し、最終的には 66 遺伝子にまで絞り込むことができた。得られた結果内には、既知の脊髄小脳変性症、遺伝性痙攣性対麻痺、白質脳症の責任遺伝子は認められなかった。一方でアルツハイマー病、うつ病や統合失調症に関連される遺伝子や、細胞骨格の assembly に関与する遺伝子をはじめとした遺伝子が含まれていた。以上のことより、本家系は今まで知られていない遺伝子変異を有する新規疾患であると考えられる。今後更なる検討が必要である。

3). 培養細胞を用いた GFAP の研究:

3)-1. 各種細胞における野生型および変異型 GFAP の強制発現系の検討

内在性 GFAP の有無にかかわらず、強制発現させた GFAP のみで細胞内にて線維状構造を取りうることが判明した。変異型では凝集体形成が多くみられたものの、野生型でも程度は軽いものの同様な凝集体も観察された。

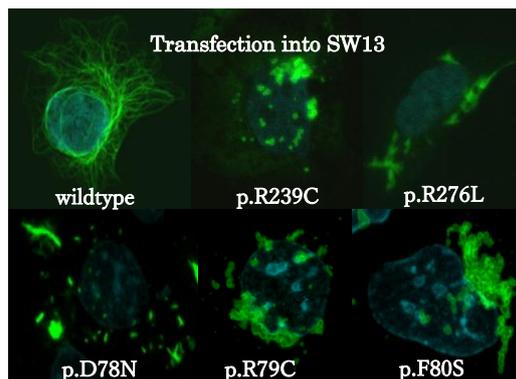


以上から①内在性 GFAP の有無のみならず、他の中間径フィラメントの関与も示唆され、中間径フィラメントを欠損した細胞系での実験が必要であると考えられた。また②tag が影響を与えている可能性があり、tag を付加しない実験系で、強制発現した GFAP タンパクを GFAP 抗体で検出する系の事件が必要であると考えられた。

3)-2. SW13 細胞における野生型および変異型 GFAP の強制発現系の検討

3)-1. の結果に基づき、GFAP のみならず vimentin を含む中間径フィラメントが欠損している SW13 細胞を用いた。すると野生型ではすべてが線維状構造を保つのにに対し、乳児型変異 p.R239C では多くが凝集体を形成、また成人型変異 p.R276L では凝集体の割合が減少することが判った。

これが確実な結果かさらに検討するため、近接しながら、臨床像が異なる 3 つの連続した点変異、p.D78N (成人型)、p.R79C (乳児型)、p.F80S (新生児型) を追加して検討した。結果やはり同様の傾向、すなわち臨床重症度と、凝集体形成の割合が相関していることが明らかになった。



<引用論文>

1. Srivastava S, Naidu S. Alexander disease. in Pagon R, Adam M, Ardinger H, et al. eds. Gene Reviews Vol. 1993-2015. University of Washington, Seattle. [last update 2015] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1172/>
2. Yoshida T, Sasaki M, Yoshida M, et al. Nationwide survey of Alexander disease in Japan and proposed new guidelines for diagnosis. J Neurol 2011;258:1998-2008.
3. Wada Y, Yanagihara C, Nishimura Y, et al. J Neurol Sci 2013;331:161-164.
4. 野崎靖之, 山形崇倫, 木村岳人ら. 新生児期にけいれんで発症した Alexander 病男児例. 脳と発達 2012;44:506
5. Boczek NJ, Sigafos AN, Zimmermann MT, et al. Functional characterization of a GFAP variant of uncertain

significance in an Alexander disease case within the setting of an individualized medicine clinic. Clin Case Rep 2016;4(9):885-895.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者は下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Kameda T, Namekawa M, Shimazaki H, et al. Unique combination of hyperintense vessel sign on initial FLAIR and delayed vasoconstriction on MRA in reversible cerebral vasoconstriction syndrome: A case report. Cephalalgia 2014;34:1093-1096.
2. Hayashi Y, Namekawa M, Ohtani K, et al. Parkinsonism as an initial manifestation of rheumatoid meningitis. Neurol Sci 2014;35:1139-1141.
3. Shimazaki H, Honda J, Naoi T, Namekawa M, et al. Autosomal-recessive complicated spastic paraplegia with a novel lysosomal trafficking regulatory gene mutation. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2014;85:1024-1028.
4. 滑川道人. 中枢神経系における悪性リンパ腫 : Overview . Brain Nerve 2014;66:907-916.
5. Wang Y, Koh K, Namekawa M, et al. Whole-exome sequencing reveals a missense mutation in the KCND3 gene in a patient with SCA19/22. Neurol Clin Neurosci 2015;3:197-199.
6. Namekawa M, Honda J, Shimazaki H. "Hot cross bun" sign associated with SCA1. Intern Med 2015;54:859-860.
7. Namekawa M, Yamashita T, Sakiyama Y. Non-traumatic unilateral intramuscular hematoma in the lower leg. Intern Med 2015;55:1033.
8. Namekawa M, Kondo S. A case of acute spinal subdural hematoma with subarachnoid hemorrhage: Rapid spontaneous remission, relapse, and complete resolution. Interdisciplinary Neurosurgery: Advanced Techniques and Case Management 2017;8:23-25.
9. 柘野佑太, 近田彩香, 滑川道人ら. 抑うつが長期間先行し, 嫉妬・被害妄想を伴ったパーキンソン病の 78 歳女性例. 埼玉県医学会雑誌 2016;51:132-136.

[学会発表] (計 11 件)

1. 滑川道人, 本多純子, 直井為任, 嶋崎晴雄ら. SCA1 の 1 家系 3 名の臨床的考察. 第 55 回日本神経学会学術大会, 2014 年

5 月 21 日~24 日, 福岡市. (臨床神経 2014;54:S164)

2. 林夢夏, 滑川道人, 嶋崎晴雄ら. 末梢神経障害が初発症状であった悪性リンパ腫(neurolymphomatosis)の 4 例. 第 55 回日本神経学会学術大会, 2014 年 5 月 21 日~24 日, 福岡市. (臨床神経 2014;54:S95)
3. 近田彩香, 眞山英徳, 滑川道人ら. 尿閉で発症した好酸球性髄膜炎の 2 例. 第 213 回日本神経学会関東・甲信越地方会, 2015 年 6 月 6 日, 東京. (臨床神経 2015;55:776)
4. 近田彩香, 眞山英徳, 滑川道人ら. 運動ニューロン疾患の症状を呈し, 約半年の経過で呼吸不全により死亡した抗 LRP4 抗体陽性だった 71 歳男性例. 第 215 回日本神経学会関東・甲信越地方会, 2015 年 12 月 5 日, 東京. (臨床神経 2016;56:219)
5. 眞山英徳, 滑川道人, 近田彩香ら. 当初群発頭痛と診断されたが, のちに皮疹が出現し, 診断に至った「急性帯状疱疹による有痛性三叉神経ニューロパチー」の 1 例. 第 20 回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2015 年 10 月 22~23 日, 長野市.
6. 柘野佑太, 近田彩香, 滑川道人ら. 抑うつが長期間先行し, 嫉妬・被害妄想を伴ったパーキンソン病の 78 歳女性例. 第 53 回埼玉県医学会総会, 2016 年 2 月 28 日, さいたま市.
7. 眞山英徳, 近田彩香, 滑川道人ら. クリーゼで発症し, たこつぼ型心筋症を併発した浸潤性胸腺腫合併重症筋無力症の 62 歳男性. 第 216 回日本神経学会関東・甲信越地方会, 2016 年 3 月 5 日, 東京. (臨床神経 2016;56:514)
8. 小野さやか, 藤野悟央, 滑川道人ら. 運動ニューロン疾患を合併した抗 LRP4 抗体陽性重症筋無力症の 61 歳男性例. 第 217 回日本神経学会関東・甲信越地方会, 2016 年 6 月 4 日, 東京. (臨床神経 2016;56:648)
9. 滑川道人, 近田彩香, 眞山英徳ら. 臓器症状を欠き, 非特異的な全身症状で発症した家族歴を有するサルコイドーシスの 1 例. 第 625 回日本内科学会関東地方会, 2016 年 7 月 10 日, 東京. (第 625 回日本内科学会関東地方会抄録集 2016:22)
10. 豊崎瑛士, 眞山英徳, 滑川道人ら. 合併する広範な下部胸椎の椎体炎に対して早期に後方固定術を施行し, 早期離床が可能となった結核性髄膜炎の 1 例. 第 21 回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2016 年 10 月 21~22 日, 金沢市. (Neuroinfection 2016:21:210)
11. 眞山英徳, 藤野悟央, 滑川道人ら. 抗 LRP4 抗体陽性の重症筋無力症様症状を

併発した筋萎縮性側索硬化症の 62 歳男性：第二報．第 219 回日本神経学会関東・甲信越地方会，2016 年 12 月 3 日，東京．（臨床神経 2017;57:192）

〔図書〕（計 2 件）

1. 滑川道人．脊髄小脳変性症．『神経疾患最新の治療 2015-2017』小林祥泰，水澤英洋，山口修平（編），南江堂，2014 年，pp.159-161.
2. 滑川道人．血管内リンパ腫．『別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 30 神経症候群（第 2 版）：その他の神経疾患を含めて』．日本臨牀社，2015 年，pp.487-490.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

滑川 道人 (NAMEKAWA, Michito)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：30332993

(2)研究分担者

嶋崎 晴雄 (SHIMAZAKI Haruo)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30316517

直井 為任 (NAOI Tametou)

自治医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30598694