

平成 22 年 6 月 11 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590985

研究課題名（和文） 16 番染色体長腕に連鎖する優性遺伝性脊髄小脳変性症の分子遺伝学的研究

研究課題名（英文） Research on 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (16q-ADCA)

研究代表者

吉田 邦広 (YOSHIDA KUNIHIRO)

信州大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90242693

研究成果の概要（和文）：長野県は脊髄小脳失調症 31 型（SCA31）の好発地域であり（常染色体優性遺伝性脊髄小脳変性症の約 40%強）、現在までに 71 家系を集積した。SCA31 患者 66 名（49 家系）の臨床的な検討では、SCA31 は 6 型（SCA6）と同様に純粋小脳型を呈するが、発症年齢は SCA6 に比べて明らかに高齢であり、また眼振の頻度が低かった。さらに 94 名（71 家系）の患者を対象に最近新たに同定された挿入変異を検証した。患者全員で挿入変異が確認され、その長さは 2.6-3.7 kb であった。一方、健常者にも稀ながら（約 0.7%）当該領域に挿入配列が見られ、その長さは 1.0-3.5 kb であった。患者の挿入配列には(TGGAA)5 塩基繰り返しが見られたが、健常者のそれには(TGGAA)5 塩基繰り返しが見られなかった。SCA31 の発症には挿入配列の部位や長さよりも、挿入内の特異的な 5 塩基繰り返し配列が大きく関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Spinocerebellar ataxia type 31 (SCA31) is the most prevalent subtype of autosomal dominant cerebellar ataxias (ADCAs) in Nagano prefecture. To date, we have collected 71 families with SCA31 in Nagano. We have analyzed clinical features of 66 patients (from 49 families) with SCA31 in detail. Patients with SCA31 showed a pure cerebellar phenotype, as observed in SCA6 patients, but the age at onset in SCA31 patients was much later than SCA6 patients in our cohort. Gaze-evoked nystagmus was less frequently observed in SCA31 patients than SCA6 patients. Molecular genetic analysis revealed all 94 patients (from 71 families) with SCA31 had insertions at the SCA31 critical region of 16q22.1. The insertions ranged from 2.6 to 3.7 kb in length. The insertion in this region was found in healthy control individuals very rarely (3/405, 0.7%), and its length ranged from 1.0 to 3.5 kb. The insertions in SCA31 patients, but not in control individuals, inevitably contained a stretch of (TGGAA) penta-nucleotide repeats. These data indicate the (TGGAA) repeat sequence in the insertion may be critical for the pathogenesis of SCA31.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経遺伝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：脊髄小脳変性症、常染色体優性遺伝、*puratrophin-1*、挿入変異

1. 研究開始当初の背景

かねてより第16番染色体長腕領域に非常に強い創始者ハプロタイプを有する常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症患者・家系群の存在が知られており、16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (16q-ADCA) と称されていた。2005年、16q-ADCAの病因として *puratrophin-1* 遺伝子のC/T塩基置換が報告された (Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, et al. Am J Hum Genet 77: 280-296, 2005)。これにより16q-ADCAの遺伝子診断が容易となり、国内では脊髄小脳失調症6型 (SCA6) や3型 (SCA3/Machado-Joseph病) と並んで高頻度に見られる病型であることが判明した。

申請者らはその当時までに集積していた長野県内のADCA130家系を解析したところ、52家系 (全体の39%) で当該塩基置換が確認され、長野県は16q-ADCAの好発地域であることが判明した (国内の他地域ではADCAの約8-17%)。さらに*puratrophin-1* 遺伝子のC/T塩基置換を持つ患者と持たない患者が混在する16q-ADCA家系を見出したことから、当該塩基置換は真の病因ではなく、疾患に強く関連した多型であること、真の原因遺伝子は*puratrophin-1* 遺伝子からセントロメア側に存在することを報告した (Ohata T, Yoshida K, Sakai H, et al. J Hum Genet 51: 461-466, 2006)。その後、*puratrophin-1* 遺伝子のセントロメア側に *puratrophin-1* 遺伝子のC/T塩基置換と同様に非常に疾患特異性の高い一塩基多型がい

くつか同定された。以上の結果から、16q-ADCAの真の原因遺伝子は*puratrophin-1* 遺伝子のセントロメア側約900kbの領域内に存在することが推察された (Amino T, Ishikawa K, Toru S, et al. J Hum Genet 52: 643-649, 2007)。

2. 研究の目的

本邦の優性遺伝性脊髄小脳変性症の中でも主要な病型である16q-ADCAの原因遺伝子を同定し、その発症機序および分子病態を解明する。また臨床型-遺伝子型の対応を検討する。

3. 研究の方法

当該候補領域に登録された約30の遺伝子につき、患者由来のゲノムDNAを鋳型として全エクソンを個別にPCR法にて増幅し、直接塩基配列解析を行った。

後にSato et al.により同定された挿入変異については、既報に従ってPCR解析にて確認した。挿入配列を含むPCR産物は*Hae*III消化後、アガロースゲル電気泳動にて挿入配列の長さを算定するとともに、*Hae*III未消化のPCR産物をアガロースゲルから切り出して直接塩基配列解析を行った。さらに挿入内に存在する3つの異なる5塩基繰り返し配列を検証するためにビオチンラベルした (TGAA)₅、(TAAAA)₅、(TAGAA)₅をプローブとしてPCR-サザン解析を行った。また挿入サイズと発症年齢、臨床経過、地域集積性との関連を検討した。

4. 研究成果

臨床的には16q-ADCAはSCA6と類似した純粹小脳型に分類されている。そこで申請者らは16q-ADCA患者66名、SCA6患者35名の臨床像を詳細に検討した。その結果、発症年齢は16q-ADCAが 60.2 ± 10.0 歳、SCA6が 41.4 ± 8.9 歳と前者が明らかに高齢発症であった。臨床的にはともに小脳外症状が目立たない純粹小脳型であったが、国際的な小脳失調の評価法であるICARSによれば、眼球運動障害（注視時眼振）は後者が有意に高頻度に見られた。発症からの経年的な小脳失調の進行度に関しては、両者に有意な差異は見られなかった。

申請者らは2010年5月末までに長野県内のADCA170家系を解析したが、そのうち72家系（42%）が16q-ADCAであった。その後、上記の候補領域内に存在する*BEAN*、*TK2*遺伝子（双方向性に転写される）のイントロン内に特異な5塩基繰り返し配列を有する挿入配列が同定され、本病型は脊髄小脳失調症31型（SCA31）と命名された（Sato et al. *Am J Hum Genet* 85: 1-14, 2009）。申請者らはこれまでに集積した長野県内の71家系94名のSCA31患者について、挿入配列の解析を行った。この94名の中には、*puratrophin-1*遺伝子のC/T塩基置換を有さず、そのセントロメア側には患者に共通する創始者ハプロタイプを有する2名の患者も含まれた。この2名を含めて、94名すべての患者で挿入配列が確認され、そのサイズは2.6~3.7 kbに分布していた。挿入配列のサイズと発症年齢は緩やかな逆相関を示した。一方、臨床症候や発症後の小脳失調の進行度は挿入配列のサイズとは関連なく、一様と考えられた。

405名の健常者に対して、挿入配列の有無を調べたところ、3名（0.7%）で挿入配列が

確認され、そのサイズは約1.0~3.5 kbであった。直接塩基配列決定法およびサザンブロット法を用いた解析では、病因と考えられる挿入配列は（TGGAA）および（TAGAA）の5塩基繰り返し配列を有するのに対して、健常者で見られた挿入配列にはこれらの5塩基繰り返し配列が見られなかった。

以上から、当該領域の挿入配列は健常者でも稀ながら見られること（1%以下）、健常者の挿入配列は概してSCA31患者のそれに比べてサイズが短い、挿入配列のサイズのみでは病的かどうかが見極められないこと、病的な挿入配列には（TGGAA）および（TAGAA）の5塩基繰り返し配列が存在すること、が示唆された。すなわちSCA31の発症機序を考えるにあたっては、挿入変異の位置やサイズによる効果よりも挿入内の塩基配列—（TGGAA）および（TAGAA）の5塩基繰り返し配列—がより重要な要因であることが示唆された。

さらに長野県内3ヶ所の集積地ごとに患者集団での挿入配列のサイズ、（TGGAA）繰り返し配列の上流にある（TAGAA）の繰り返し数が比較的均一であり、他の集積地の患者集団とは明らかに異なっていた。このことから集団遺伝学的にもSCA31が強い地域集積性および均一性を有する疾患であることが示された。

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には下線）

〔雑誌論文〕（計6件）

①Sakai H, Yoshida K, Shimizu Y, et al. (計6名) Analysis of an insertion mutation in a cohort of 94 patients with spinocerebellar ataxia type 31 from Nagano, Japan. *Neurogenetics* (in

press). 査読有

②Yoshida K, Shimizu Y, Morita H, et al. (計17名) Severity and progression rate of cerebellar ataxia in 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (16q-ADCA) in the endemic Nagano area of Japan. *Cerebellum* 8, 46-51, 2009. 査読有

③Nakamura K, Yoshida K, Makishita H, et al. (計6名) A novel nonsense mutation in a Japanese family with ataxia with oculomotor apraxia type 2 (AOA2). *J Hum Genet* 54, 746-748, 2009. 査読有

④Nakamura K, Yoshida K, Miyazaki D, et al. (計5名) Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6): Clinical pilot trial with gabapentin. *J Neurol Sci* 278, 107-111, 2009. 査読有

⑤Yoshida K, Wada T, Sakurai A, et al. (計6名) Nationwide survey on predictive genetic testing for late-onset, incurable neurological diseases in Japan. *J Hum Genet* 52, 675-679, 2007. 査読有

⑥Yoshida K, Okano T, Hoshi K, et al. (計9名) Congenital fibrosis of the extraocular muscles (CFEOM) syndrome associated with progressive cerebellar ataxia. *Am J Med Genet* 143A, 1494-1501, 2007. 査読有

[学会発表] (計8件)

- ①清水雄策, 吉田邦広, 安出卓司, (他2名) 純粋小脳型脊髄小脳変性症における臨床像と脳血流シンチグラフィの検討, 第50回日本神経学会総会, 2009. 5. 22, 仙台
- ②吉田邦広, 脊髄小脳変性症の臨床—診断・治療の実際—, 第50回日本神経学会総

会, 2009. 5. 20, 仙台

③吉田邦広, 清水雄策, 森田洋, (他8名) 16番染色体長腕に連鎖する優性遺伝性脊髄小脳変性症(16q-ADCA)の自然史, 第49回日本神経学会総会, 2008. 5. 16, 横浜

④中村勝哉, 吉田邦広, 宮崎大吾, (他2名) 脊髄小脳失調症6型(SCA6)に対するガバペンチン療法, 第49回日本神経学会総会, 2008. 5. 15, 横浜

⑤中村勝哉, 吉田邦広, 宮崎大吾, (他2名) 脊髄小脳失調症6型(SCA6)に対するガバペンチン療法, 第105回日本内科学会講演会, 2008. 4. 11, 東京

⑥吉田邦広, 堺温哉, 大畑尚子, (他4名) 16番染色体長腕に連鎖する優性遺伝性脊髄小脳変性症の病因解析, 第48回日本神経学会総会, 2007. 5. 18, 名古屋

⑦清水雄策, 吉田邦広, 岡野友美, (他1名) puratrophin-1遺伝子-16C>T置換陽性患者の臨床像に関する検討, 第48回日本神経学会総会, 2007. 5. 18, 名古屋

⑧岡野友美, 吉田邦広, 清水雄策, (他2名) 長野県の原因遺伝子未同定SCA患者におけるSCA14遺伝子異常の検討, 第48回日本神経学会総会, 2007. 5. 16, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 邦広 (YOSHIDA KUNIHIRO)
信州大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 90242693

(2) 研究分担者

池田 修一 (IKEDA SHU-ICHI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号: 60135134

松本 直通 (MATSUMOTO NAOMICHI)

横浜市立大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80325638