

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15441

研究課題名（和文）脂肪酸伸長酵素異常による脊髄小脳失調症の病態解明

研究課題名（英文）Research on spinocerebellar ataxia caused by mutations in elongases

研究代表者

尾崎 心 (Ozaki, Kokoro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：10754765

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脂肪酸伸長酵素ELOVL4の遺伝子変異による脊髄小脳失調症34型の剖検脳の神経病理学的解析を行った。橋、小脳、大脳などの特徴的な神経組織の変性を明らかにした。大脳の白質と呼ばれる神経線維が密な領域では、微小な空胞が観察され、これらの空胞性病変は、オリゴデンドロサイトと呼ばれる神経線維を形成する重要な細胞の変性像であると考えられ、重要な所見であった（論文として発表）。

日本人の未診断の小脳変性症のコホート（患者の集団）について、脂肪酸伸長酵素ELOVL4の変異頻度と、その変異によるSCA34の臨床的な特徴を調査し、低頻度ながらSCA34が存在していることが明らかにした（論文として発表）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではSCA34という稀ながら非常に特徴のある神経変性疾患の患者さんを対象とした病理学的解析や、日本国内における患者さんの頻度調査を実施し、それぞれ一定の成果を挙げ、いずれも論文として国際誌に発表し、解析の結果では、非常に示唆に富んだ発見があり、脂質代謝異常に基づく本疾患の病態解明に資するのみならず、比較的頻度の高い疾患である進行性核上性麻痺という別の疾患に似た病理学的な特徴もあり、今後さらに本研究を深めることでこれまで知られていなかった一般的な神経変性疾患（例えばアルツハイマー病やパーキンソン病など）の知見に繋がっていく可能性もある。

研究成果の概要（英文）：We studied the neuropathological basis of spinocerebellar ataxia typ34, which is caused by ELOVL4, coding a very-long fatty acid elongating enzyme for the first time. We revealed the distinctive neuropathological features including marked neuronal loss in specific brain regions, which are very important not only in this disease but also general neurodegenerative disorders. We published this work in [Ozaki et al., Acta Neuropathologica Commun 2021]. We also revealed disease frequency of SCA34 in an ataxia cohort in Japan. We described the clinical features in the pedigree and published in [Ozaki et al., Parkinsonism. Relat. Disord. 2019].

研究分野：神経学、遺伝学

キーワード：脊髄小脳変性症 脂質代謝異常 神経変性疾患 神経病理 遺伝性疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は遺伝性疾患においては未知のものがまだ多く、また原因遺伝子が解明されているものも病態については不明な点が多く、治療法まで確立しているものは殆ど無い。脊髄小脳失調症 34 型は最近我々やカナダの研究グループにより同定された脂肪酸伸長酵素 **ELOVL4** の変異による顕性遺伝性疾患であり、小脳・橋といった脳部位を中心とした病態があると患者さんの脳 MRI 所見からは考えられてきたが、神経病理学的な解析はなされたことが無く、正確な病像が不明であった。また **ELOVL4** の変異によりどのような病態を経てどの脳部位がどのように変性するか、またどのようなメカニズムで神経変性につながるかは未知であり、治療法も全く無い。また、同時期に同定された同じグループの遺伝子 **ELOVL5** による別の脊髄小脳失調症、**SCA38** についても、小脳を中心とした神経組織の障害があることは推測されているがこちらもこれまで神経病理学的解析がなされておらず、これら疾患は脂質代謝酵素の異常から神経変性につながる経路を考察する上で非常に重要なモデルケースでもあると考えられる。最近、脂質分子と病態の中心にかかわる分子との相互作用が示されつつあるパーキンソン病など、より高頻度な神経変性疾患の病態を解明するうえでも本研究は重要であると考えられる背景が存在する。また、脂質分子は生理的に非常に特徴的な分布をしておりその機序は不明であった。本疾患では脂肪酸伸長酵素 **ELOVL4** はマウスなどにおける過去の報告から脳全体に発現していると考えられるにも関わらず限局した脳部位への障害が発生する。アルツハイマー型認知症やパーキンソン病、ハンチントン病など多くの神経変性疾患で見られる疾患特異的な病変局在のメカニズムを解明するうえでも本疾患の脳病理を脂質分布と結びつけて解析することは重要と考えられる。

2. 研究の目的

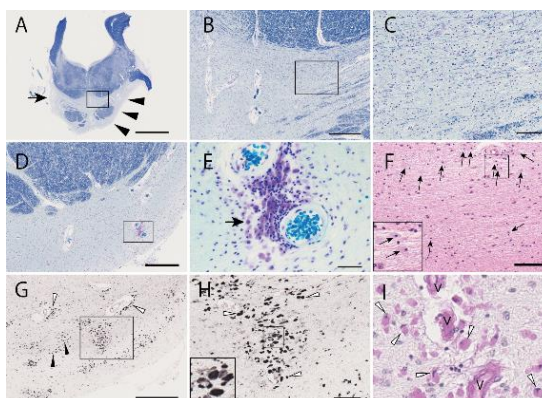
神経病理学的解析を世界初の **SCA34** 剖検症例 (脳組織) について行い、その病態機序の解明をすること、また、脂質の生理的な分布と疾患 (**SCA34**) における病変分布との関連性について分子的な知見を得ることで、**SCA34** を題材とした神経変性疾患のメカニズムについて機序的洞察を得ること・治療標的候補の今後の探索・開発につなげること、培養細胞系などを用いて **ELOVL4** の相互作用などを解明し、病態解明を進めること、遺伝疫学的調査を行ない疾患頻度・変異スペクトラムなどの解明をすることが目的である。

3. 研究の方法

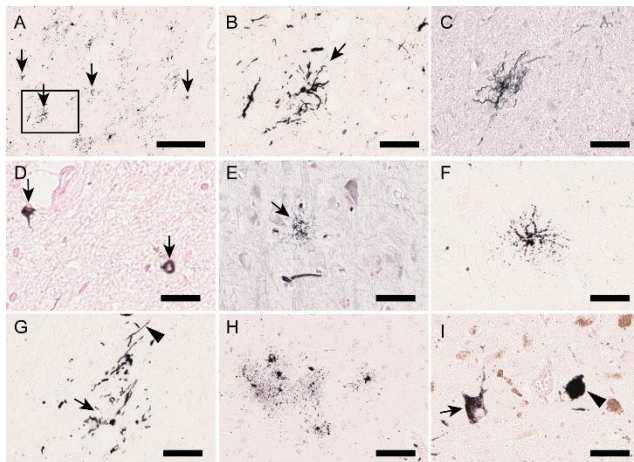
SCA34 の剖検例について一般的な神経病理学的解析 (HE 染色・KB 染色など) を行なった。さらに、その過程で、関心ある分子について免疫組織染色 (**Iba1**, **CD68**, **Olig2**)・蛍光顕微鏡観察 (fluoromyelin によるミエリン染色, neurofilament 抗体による染色)・電子顕微鏡観察を行なった。脂質の蓄積物の有無を評価するため、oil red 染色, Sudan-Black 染色, オスミウム染色を行なった。**SCA34** では臨床的には多系統の障害を来し、脳 MRI 所見も橋十字サイン・小脳・橋底部の萎縮などを呈することから多系統萎縮症 (比較的高頻度な孤発性疾患) に類似する面もあることから、多系統萎縮症で病態の中心であり病理学的に必須の所見である α シヌクレインの病的蓄積の有無について検討した。具体的には抗リン酸化 α シヌクレイン抗体による免疫染色と、Gallyas 染色 (silver impregnation) を施行した。結果として見られたニューロン・グリアのタウ病変について、**RD3**, **RD4** 抗体を用いてそれぞれ 3、4 リポートタウの免疫染色、リン酸化タウ抗体 **AT8** による免疫染色を行なった。また、脂質の脳内での分布を既報データを参照し病変分布との相関から分子レベルでの知見を得るべく検討を加えた (現在も継続中)。また脂質解析の専門家とも相談し、広範な解析は困難な点が多く、十分意味のある解析対象となる部位の選定が (従来の神経病理学的所見の結果から選定する) 必要との結論に至り、これを進めている (継続中)。また、並行して本疾患における変異一臨床症候のスペクトラムを把握するため **SCA34** の国内失調症コホートにおける有病率の調査などを行った。培養細胞系を用いて **ELOVL4** の発現実験を行い局在変化を観察した。

4. 研究成果

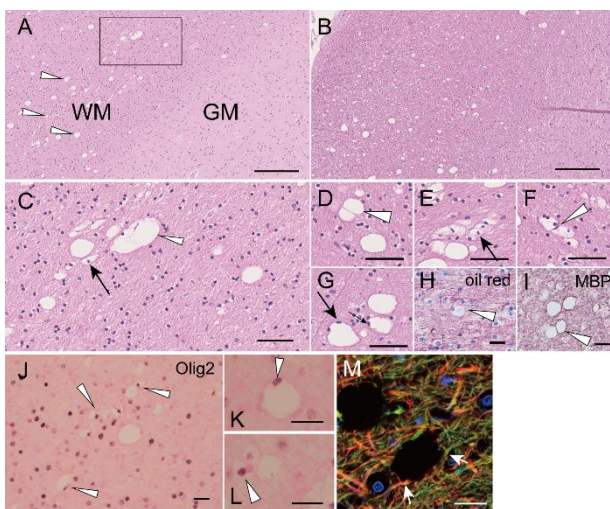
SCA34 の病理解析では、橋底部における著明な神経喪失を認めた (右図、A、B、C: KB 染色)。また脱ミエリン (横走線維と呼ばれる橋一小脳神経線維の萎縮・染色性低下) が見られた。この所見は、生前の神経症候との関連が明確であり、主症状である小脳失調をよく説明できるものと思われた。また、橋底部では **CD68** 陽性・**Iba1** 陰性の単球系細胞が主に血管周囲優位に集簇している像があり (左図 D、E: KB 染色)、PAS 染色で細胞が陽性像を呈し、何らかの糖質が蓄積していると考えられ、特徴的な所見であった (右図 I: PAS 染



色、G,H : CD68 染色)。



ウ抗体染色)。解釈としては、高齢者における偶発所見の可能性、あるいは SCA34 病態と関連



の崩壊と思われる所見が散見された。

これらの所見は SCA34 の世界初の剖検例として非常に貴重な情報であり、国際専門誌にて発表した (Ozaki et al., *Acta Neuropathologica Commun*, 2021)。

さらに、HEK293 細胞にて ELOVL4 野生型・変異型コンストラクトをそれぞれ発現する一連の実験を行い、蛍光顕微鏡にて局在の観察を行なった (解析中)。

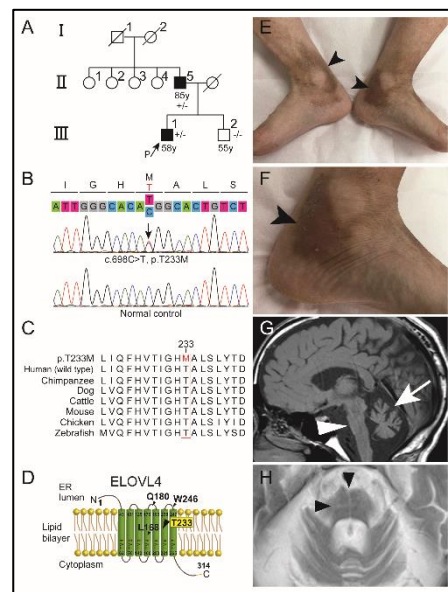
また、国内の小脳失調症コホートの解析を行い、153 症例の未診断小脳変性症のサンガーシーケンシングによる SCA34 のスクリーニングを行ない、新たに 1 家系を同定した。この家系では p.T233M という既報で 1 例のみ報告のあった variant を家系内で保有しており、この variant が原因変異であることが本研究により確かになった。またこの家系では脳 MRI で橋十字サインや橋底部の萎縮といった、我々のグループが SCA34 の特徴として考えている画像所見をやはり有していた。本調査成果は有病率を調べた貴重な報告であり、やはり国際専門誌にて発表した (Ozaki et al., *Park Rel Dis*, 2019 ; 右図)。

脂質分布との関連、および分子解析による疾患特徴的な分子の同定は専門家とも相談し現在進行中である。先に述べたとおり脂質の異常は最近パーキンソン病を始めとして神経変性疾患との関連性が指摘されるようになり、注目を集めつつあり、SCA34 のような稀な疾患の研究により、高頻度に見られる別の神経変性疾患への病態解明・治療薬開発への糸口になる可能性がある。

総じて、本研究では SCA34 の神経病理学的な解析から予想された成果と予想外の学術的に興味深い結果を得ており、また依然進行中の内容もあり引き続き研究を進める方針である。

また、それ以外の神経喪失はあまり顕著ではなかったが、Gallyas 染色で陽性像を呈する細胞が予想外に多いことから脳の核部位を詳細に検討したところ、大脳前頭葉、基底核 (視床下核、被殻・淡蒼球)、中脳 (黒質、被蓋) などに広範に 4 リPEAT タウ優位の neurofibrillary tangle (左図 D)/pretangle, glial fibrillary tangles (特に tuft-shaped astrocytes(B, C, E, F), coiled body(左図 D)等に類似する)が見られ、孤発性疾患の進行性核上性麻痺に矛盾しない所見であった (左図 A,B,E,G : 4 リPEAT タウ染色、C, E : Gallyas 染色、D, H, I : AT8 リン酸化タウ

抗体染色)。今後の症例蓄積や実験的な検証が必要である。また、大脳白質を中心に白質に 20-50um 程度の空胞性病変が散発していた (左下図 A-M)。連なって存在し、なかには細胞質が膨化したと思われるオリゴデンドロサイトとみられる細胞も散見されたことから、オリゴデンドロサイトの変性像を疑った。オリゴデンドロサイトの核を染色する Olig2 抗体にて免疫染色を行なうと、空胞性病変で核が残っているところではしばしば Olig2 で陽性となる像が確認された。電子顕微鏡では (検体の状態から限界はあると思われるが)、空胞近傍のミエリンに破壊と思われる像があり、また空胞内部には特に特徴的な封入体や構造物は明らかではなく、ミエリン



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kokoro Ozaki, Ayaka Ansai, Kouji Nobuhara, Toshihiko Araki, Takayuki Kubodera, Takashi Ishii, Miwa Higashi, Nozomu Sato, Kazumasa Soga, Hidehiro Mizusawa, Kinya Ishikawa, Takanori Yokota	4. 巻 -
2. 論文標題 Prevalence and clinicoradiological features of spinocerebellar ataxia type 34 in a Japanese ataxia cohort	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parkinsonism & Related Disorders	6. 最初と最後の頁 238-242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parkreldis.2019.05.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ozaki Kokoro, Irioka Takashi, Uchihara Toshiki, Yamada Akane, Nakamura Ayako, Majima Takamasa, Igarashi Susumu, Shintaku Hiroshi, Yakeishi Mayumi, Tsuura Yukio, Okazaki Yasushi, Ishikawa Kinya, Yokota Takanori	4. 巻 9
2. 論文標題 Neuropathology of SCA34 showing widespread oligodendroglial pathology with vacuolar white matter degeneration: a case study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 172-172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-021-01272-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾崎心, 安斉綾香, 延原幸嗣, 荒木俊彦, 久保寺隆行, 石井俊, 東美和, 曾我一将, 入岡隆, 三井純, 石浦浩之, 辻省次, 馬嶋貴正, 土井宏, 岡崎康司, 田中章景, 水澤英洋, 石川欽也, 横田隆徳
2. 発表標題 脂肪酸伸長酵素ELOVL4の変異による脊髄小脳失調症34型
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎心, 安斉綾香, 石井俊, 東美和, 佐藤望, 大北倫, 曾我一将, 水澤英洋, 石川欽也, 横田隆徳
2. 発表標題 本邦におけるSCA34の遺伝疫学的調査
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎心, 安斉綾香, 延原幸嗣, 荒木俊彦, 久保寺隆行, 石井俊, 東美和, 佐藤望, 曾我一将, 水澤英洋, 石川欽也, 横田隆徳
2. 発表標題 SCA34の遺伝疫学
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎心、入岡隆、内原俊記、山田茜、中村綾子、延原幸嗣、馬嶋貴正、五十嵐奨、新宅洋、矢毛石真由美、津浦幸夫、岡崎康司、石川欽也、横田隆徳
2. 発表標題 SCA34の病理報告：オリゴデンドロサイト異常と空胞性白質変性、PSP様タウ病理
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kokoro Ozaki, Takashi Irioka, Toshiki Uchihara, Akane Yamada, Ayako Nakamura, Takamasa Majima, Susumu Igarashi, Hiroshi Shintaku, Mayumi Yakeishi, Yukio Tsuura, Yasushi Okazaki, Kinya Ishikawa, Takanori Yokota
2. 発表標題 The neuropathology of SCA34: widespread vacuolar white matter degeneration with oligodendroglipathy
3. 学会等名 第63回日本神経病理学会総会学術研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾崎心、入岡隆、内原俊記、山田茜、中村綾子、馬嶋 貴正、五十嵐奨、東 美和、曾我一将、新宅洋、矢毛石真由美、津浦幸夫、岡崎康司、水澤英洋、石川 欽也、横田隆徳
2. 発表標題 脊髄小脳失調症34型の神経病理：脂肪酸伸長酵素ELOVL4異常による神経グリア変性
3. 学会等名 第14回CBIR・ONSA大学院セミナー共催若手インスパイアシンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------