

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591009

研究課題名(和文) 本邦遺伝性痙性対麻痺の遺伝疫学と新規遺伝子変異の同定

研究課題名(英文) Genetic epidemiology of hereditary spastic paraplegia (HSP) in Japan and Identification of novel mutations in HSP genes

研究代表者

嶋崎 晴雄 (SHIMAZAKI HARUO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：30316517

研究成果の概要(和文)：

本邦の遺伝性痙性対麻痺(HSP)症例の臨床情報とDNA 260検体を収集し、既報のHSP遺伝子について網羅的遺伝子解析を行ない、新規遺伝子変異を同定した。本邦HSPの研究リソース基盤を確立し、遺伝疫学が明らかになりつつある。また、視神経萎縮と末梢神経障害を伴う、新たな常染色体劣性HSP病型の遺伝子座を連鎖解析にて見出し、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析にて新規候補遺伝子変異を同定した。

研究成果の概要(英文)：

We have corrected 260 clinical findings and DNAs from Japanese hereditary spastic paraplegia (HSP) families. We could identify several novel mutations of reported HSP genes using our comprehensive genomic analysis systems. Genetic epidemiological finding of HSP in Japan has been becoming clearer. We also revealed new type of HSP with optic atrophy and peripheral neuropathy. Linkage study disclosed that genetic locus of this HSP was assigned to different from other HSP loci. Exome sequencing could identify novel candidate gene mutations for this HSP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

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：遺伝性痙性対麻痺，多施設共同研究，遺伝子解析，連鎖解析。

1. 研究開始当初の背景

近年、原因不明であった、遺伝性痙性対麻痺(HSP)の遺伝子座あるいは原因遺伝子が解明されてきていた。この病気は、皮質脊髄系の運動神経軸索遠位部の変性による、進行性の両下肢の麻痺を特徴とする。遺伝形式は、常染色体優性(AD)・常染色体劣性(AR)・X連鎖性劣性(XR)の3種類が知られている。当時

遺伝子座は、SPG3AからSPG29まで30箇所染色体上にマッピングされていた。これらのうち遺伝子異常の判明していたものは17種類で、ADでは、Spastin, Atlastin, NIPA1, KIAA0196, KIF5A, HSPD1(Heat-shock 60-kD protein 1), BSCL2(Seipin), REEP1, ZFYVE27(Protrudin), ARではParaplegin, KIAA1840(spatacsin), Spartin, Maspardin, Sacsin, Alsin,

XRではL1CAM, Proteolipid proteinであった。我々も spastin の変異のある 2 家系と, saccin の変異を持つ 1 家系を日本ではじめて報告し (Namekawa et al, 2001,2002. Ogawa et al. 2004), その後 spastin の細胞生物学的解析を継続していた(Sakoe et al. 2008). 上記のうち Spastin, Paraplegin は AAA(ATPases associated with diverse cellular activities)蛋白質ファミリーに属し, 前者は微小管ダイナミクスに関係し (Errico et al. 2002), 後者はミトコンドリアに局在する膜結合型 AAA メタロプロテアーゼである(Casari et al. 1998). また, KIF5A はキネシン重鎖であり, 微小管に沿った物質輸送のモーター蛋白複合体を構成する(Reid et al. 2002). Atlastin は GTPase であり, ダイナミンファミリーに属し, 細胞内の小胞輸送に関与しているとされる(Zhu et al. 2003). Spartin も微小管結合領域の存在がアミノ酸配列上, 予想されている(Ciccarelli et al. 2003). 以上のことから, 優性遺伝性痙性対麻痺(ADHSP)の分子病態には, 神経軸索内の微小管を介した物質輸送が大きく関与していると考えられる。また, 現在までのところ, 遺伝性痙性対麻痺に関して発症頻度や有病率などの日本全国規模の疫学調査は報告されていない。

2. 研究の目的

そこで, 我々は, 全国の神経内科並びに小児神経科約 1200 箇所に対し, アンケート調査をおこない, 遺伝性痙性対麻痺症例を集積し。我が国における遺伝性痙性対麻痺の有病率など疫学的事実を明らかにすることを目的とした。また, それらの症例のうち, 既報の遺伝子異常の認められない HSP の家系について, 微小管関連遺伝子の解析を行い, その変異の有無と, 変異が認められる場合は, それによる微小管の動態や神経軸索への影響を検討することをもう一つの目的とした。解析対象も厚生労働省運動失調研究班に所属する全国の施設よりの症例を集積しており, 日本における発症頻度も推定可能となっている。

3. 研究の方法

(1) 遺伝性痙性対麻痺症例に関する全国施設よりの検体収集と既存遺伝子の変異解析

全国の神経内科医の常勤している日本神経学会教育施設, 教育関連施設と, 小児神経学会評議員の常勤されている施設 1232 箇所に, 遺伝性痙性対麻痺患者の数, 遺伝形式, 遺伝子解析の希望があるかなどについてのアンケートを送付した。2006 年度に 572 の返事があり, 常染色体優性遺伝のものは 135 家系 207 名 (内遺伝子異常の判明した例が 21 家系), 常染色体劣性は 55 家系 84 名, X 連鎖性劣性 4 家系 4 例, 孤発例 377 例であった。遺伝子解析の希望が少なくとも 90 家系あった。そ

の返事を元に, 各遺伝形式別の有病率, 発症頻度を算出し, 日本における遺伝性痙性対麻痺の疫学的事実を明らかにする。また, アンケートより遺伝子解析の希望のある家系に関しては, 症例登録を行う。インフォームドコンセントを得た上で採血し, DNA を抽出した。既存の遺伝子変異の有無を, 平成 19 年度より東大神経内科と協力の上, マイクロアレイを用いた遺伝子解析を行っているが, 20 年度以降も引き続き行う。また, 当科でも Autosomal Recessive Spastic Ataxia Charlevoix-Saguenay(ARSACS)が疑われる家系について, 直接シーケンスによる遺伝子解析を行う。遺伝子解析で異常のあった家系に対し, 主治医宛に再調査依頼票を送り, 詳細な臨床情報の収集に努める。

(2) 候補遺伝子解析

既存の遺伝子変異が無く, 連鎖解析が不可能な家系の患者よりインフォームドコンセントを得, 患者白血球由来 DNA を用いて, 候補遺伝子のシーケンスを行う。Katanin p60 遺伝子の 12exon, MPP1 遺伝子の 33exon を各々挟むように設定した primer pair にて, PCR を行う。PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動後, 分離精製し, 直接シーケンスを行い, ABI310 にて解析し, 正常のシーケンスと比較し変異の有無を決定する。また, 上記の方法では変異が同定されなくても, 大きな欠失変異が存在する可能性がある。その場合は, Realtime PCR 法または array CGH 法で遺伝子のコピー数に違いのある領域がないか検討する。

変異が見つかった場合は, その遺伝子異常による遺伝性痙性対麻痺(HSP)が全国でどの程度存在するのか, また HSP 全体のうちどのくらいの割合をしめるかを検討する。

(3) 新しい HSP 病型の家系における連鎖解析と, 遺伝子解析

両親が従兄弟婚で常染色体劣性遺伝性の痙性対麻痺, 視神経萎縮, 末梢神経障害を伴った兄弟例において, インフォームドコンセントを得, 患者白血球由来 DNA を用いて SNP6.0 アレイによる連鎖解析を行う。連鎖を認めた部位に遺伝子コピー数の異常がないか array CGH による検討を行う。(東大神経内科との共同研究)

連鎖部位が短い領域の場合は, 連鎖する染色体領域内に存在する候補遺伝子の直接シーケンスを計画する。微小管, ミトコンドリア, シャペロン関連遺伝子を候補とする。また, 連鎖部位が長い領域か複数ある場合は, 連鎖領域もしくは全エクソン部位のゲノムを濃縮して, 次世代シーケンサーを用いて遺伝子解析する。結果を正常データベースと比較し, 連鎖部位内にある, 新規アミノ酸変

異を伴う遺伝子を候補遺伝子として同定する。また、その変異をサンガー法によるシーケンスで確認する。

4. 研究成果

(1) 遺伝性痙性対麻痺症例に関する全国施設よりの検体収集と既存遺伝子の変異解析

全国の施設より、2011年4月22日現在、42都道府県、135施設よりHSP 359家系が登録され、インフォームドコンセントを得た上で採血し、DNAを抽出し、260検体を収集している。また、検体だけでなく、臨床症状や画像検査結果なども併せて集積しており、本邦の遺伝性痙性対麻痺家系のリソースが形成されている。

既存の遺伝子変異の有無を、東大神経内科に現在まで233検体を送付し解析を依頼した。結果が判明したもののうち、常染色体優性遺伝(AD)HSPでは、SPG4 (47%), SPG31 (4%), SPG3A (3%), SPG8 (1%), SPG10 (1%)であった。また、常染色体劣性 (AR) HSPでは、SPG11 (10%), ARSACS (5%)であった。(瀧山嘉久、第52回日本神経学会総会、2011) また、当科では、ARSACSが疑われる13家系について遺伝子解析を行い、3家系で新たな変異を見出した。(Tsugawa et al. 13th International congress of Parkinson's disease and Movement disorders 2009, 羽賀理恵、他、第87回日本神経学会東北地方会、2010)

(2) 候補遺伝子解析

当科の家族性痙性対麻痺症例で、網羅的遺伝子解析により既報告遺伝子の変異が無かった6家系例で、候補遺伝子と考えた、katanin p60 と MPP1 遺伝子の遺伝子解析を行った。その結果、エクソン内、エクソンとイントロン接合部に遺伝子変異は同定されなかった。

(3) 新しいHSP病型の家系における連鎖解析と、遺伝子解析

両親が従兄弟婚で常染色体劣性遺伝性の痙性対麻痺、視神経萎縮、末梢神経障害を伴った兄弟例において、インフォームドコンセントを得、患者白血球由来 DNA を用いて SNP6.0 アレイによる連鎖解析を行った。染色体 2, 6, 12, 13 の一部分に原因遺伝子と連鎖した部位を同定した。これらの領域は、既存の遺伝性痙性対麻痺の遺伝子座位とは一致せず、新たな遺伝性痙性対麻痺の遺伝子座を有する病型と考えられた。連鎖部位が広いため、発端者の遺伝子を用いて exome 解析を行い、連鎖する染色体領域内に存在する遺伝子変異を検索した。その結果、第12番染色体の3つの遺伝子に、新規アミノ酸変異を来す遺伝子変異を同定した。(嶋崎晴雄、他、平成22年度運動失調に関する調査及び病態機序に関する研究班会議、2011) サンガー法に

よるシーケンスでもこれらの遺伝子変異は確認され、現在、同胞や正常コントロールに同じ変異が無いか確認中である。3つの遺伝子のうち2つはミトコンドリア関連遺伝子であった。現在患者皮膚線維芽細胞を用いてミトコンドリア機能の解析を行っている。

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12件)

- ① Namekawa M, Shimazaki H, et al. Adult-onset Alexander disease with typical "tadpole" appearance of the brainstem and unusual involvement of bilateral basal ganglia: a case report and review of the literature. *BMC Neurology* 10:21, 2010. 査読有
- ② Katsuno M, Shimazaki H, et al. Efficacy and safety of leuprorelin in patients with spinal and bulbar muscular atrophy (JASMITT study): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurology*. 9:875-884, 2010. 査読有
- ③ 嶋崎晴雄、他。経過中に Posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES) と甲状腺癌を合併した視神経脊髄炎の47歳女性例。日本内科学会雑誌 . 99:1913-1915, 2010. 査読有
- ④ 中村優子, 嶋崎晴雄、他。A型ボツリヌス中毒の82歳男性例。 *Neuroinfection* 15 : 46-50, 2010. 査読無
- ⑤ 嶋崎晴雄。常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺の臨床—SPG11, ARSACSを中心に。神経内科 74:127-134, 2011. 査読無
- ⑥ 瀧山嘉久, 嶋崎晴雄、他。遺伝性痙性対麻痺の疫学。神経内科 74:141-145, 2011. 査読無
- ⑦ Shimazaki H, et al. Reversible limbic encephalitis with antibodies against the membranes of neurons of the hippocampus. *BMJ Case Reports*. doi:10.1136, 2009. 査読有
- ⑧ 嶋崎晴雄、他、当科における抗 NMDA レセプター抗体関連脳炎 3 症例の検討。 *Neuroinfection* 14:89-97, 2009. 査読無
- ⑨ Ouyang Y, Shimazaki H, et al. Novel S ACS mutation in a Belgian family with s acsin-related ataxia. *J Neurol Sci*. 264:73-76, 2008. 査読有
- ⑩ Shimazaki H, et al. A large family with spinocerebellar ataxia type 6 in Iran: clinical and genetic study. *Arch Iran Med*. 11:459-462, 2008. 査読有
- ⑪ Shimazaki H, et al. Inverse ocular bobbing

in a patient with encephalitis associated with antibodies to the N-methyl-D-aspartate receptor. *Arch Neurol.* 65:1251, 2008. 査読有

- ⑫ 池田将樹, 嶋崎晴雄, 他. 大脳にび慢性脳血流低下を認めた孤発性 AOA1 (ataxia with ocular apraxia type 1) - 末梢神経障害を伴う脊髄小脳変性症の 1 例. 群馬県核医学研究会誌. 23 : 17-19, 2008. 査読有

[学会発表] (計 1 2 件)

- ① 嶋崎晴雄, 他. 当科における常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症 (ARSCD) の遺伝子解析. 第 51 回日本神経学会総会, 2010/5/22, 東京.
- ② 羽賀理恵, 嶋崎晴雄, 他. Charlevoix-Saguenay 型劣性遺伝性痙性失調症の 1 例. 第 87 回日本神経学会東北地方会, 2010/9/11, 山形.
- ③ 嶋崎晴雄, 他. 視神経萎縮, 末梢神経障害を伴う遺伝性痙性対麻痺症例の臨床像と, その候補遺伝子解析. 第 55 回日本人類遺伝学会, 2010/10/28, 大宮.
- ④ 嶋崎晴雄, 他. 視神経萎縮 末梢神経障害を伴う遺伝性痙性対麻痺症例の臨床像と原因遺伝子検索. 平成 22 年度運動失調に関する調査及び病態機序に関する研究班会議. 2011/1/14, 東京.
- ⑤ 嶋崎晴雄, 他. SPG17 の原因遺伝子 seipin のナンセンス変異をヘテロ接合で認めた痙性対麻痺の 1 家系. 第 50 回日本神経学会総会, 2009/5/21, 仙台.
- ⑥ 石浦浩之, 嶋崎晴雄, 他. 遺伝性痙性対麻痺の大規模分子疫学の解明. 第 50 回日本神経学会総会, 2009/5/20, 仙台.
- ⑦ Tsugawa J, Shimazaki H, et al. Novel compound heterozygous mutations in a family with Sacsin-related ataxia. 13th International congress of Parkinson's disease and Movement disorders, 2009/6/11, Paris.
- ⑧ 嶋崎晴雄, 他. 非ケベック ARSACS 症例の臨床・分子遺伝学的検討. 第 54 回日本人類遺伝学会大会, 2009/9/24, 東京.
- ⑨ 嶋崎晴雄, 他. Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) の頭部 MRI 所見. 平成 21 年度運動失調に関する調査及び病態機序に関する研究班会議. 2010/1/14, 東京.
- ⑩ 嶋崎晴雄, 他. ARSACS の MRI, SPECT 所見. 第 49 回日本神経学会総会. 2008/5/15, 横浜.
- ⑪ 嶋崎晴雄, 他. 当科における抗 NMDA レセプター抗体関連脳炎 3 症例の検討. 第 13 回日本神経感染症学会総会. 2008/10/11, 東京.
- ⑫ 嶋崎晴雄, 他. Seipin 遺伝子のナンセンス変異をホモ接合で認めた家族性痙性対

麻痺の 1 家系. 平成 20 年度運動失調に関する調査及び病態機序に関する研究班会議. 2009/1/16, 東京.

[図書] (計 2 件)

- ① 嶋崎晴雄, 他. 日本臨床社、医薬品副作用ハンドブック 第 2 版. pp.279-281, 2010
- ② Shimazaki H, Takiyama Y, et al. Research Signpost, SCA6, EAOH/AOA1 in Research Advances in Spinocerebellar Ataxia and Spastic Paraplegia. pp.31-45, pp.81-98, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋崎 晴雄 (SHIMAZAKI HARUO)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 3 0 3 1 6 5 1 7

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし