

## 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 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591066

研究課題名（和文）神経変性疾患の分子遺伝学的研究

研究課題名（英文）Clinical and genetic analysis on neurodegenerative disorders

研究代表者

矢部 一郎（YABE ICHIRO）

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60372273

研究成果の概要（和文）：本研究では、以下の3つの課題について明らかにした。1）ポリグルタミン病における筋エネルギー代謝の解析を行い、マシャドジョセフ病において筋エネルギー代謝が有効性判定の生化学的指標になり得る可能性を見出した。2）SCA14 モデルマウスの作製を試み、ヒト PRKCG ノックインマウスを作製した。3）外眼筋麻痺を伴うパーキンソニズムについて遺伝子解析研究を行い、本邦の進行性外眼筋麻痺を伴うパーキンソニズムには複数の要因が関与していることと、未知の原因による進行性外眼筋麻痺を伴うパーキンソニズムにおいても mtDNA 修復機能の障害が関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to determine if muscle energy metabolism, as measured by  $^{31}\text{P}$ -magnetic resonance spectroscopy (MRS), is a metabolic marker for the efficacy of treatment of Machado-Joseph disease (MJD). The data showed that there was a significant difference between the groups in terms of the PCr/(Pi + PCr) ratio at rest ( $p = 0.03$ ) and the maximum rate of mitochondrial ATP production ( $V_{\max}$ ) ( $p < 0.01$ ). In addition,  $V_{\max}$  was inversely correlated with the scale for the assessment and rating of ataxia (SARA) score ( $r = -0.34$ ,  $p = 0.04$ ). The MJD group also showed a reduction in  $V_{\max}$  over the course of two years ( $p < 0.05$ ). These data suggest that non-invasive measurement of muscle energy metabolism may represent a surrogate marker for MJD.

In addition, in order to define the molecular basis of progressive external ophthalmoplegia and parkinsonism, we screened for mutations in *PEO1*, *ANTI*, *POLG* genes and the whole mitochondrial genome in two families. In results, we identified a compound heterozygous *POLG* substitutions in one of the families. In the other family, no mutations were detected in any of the three genes and the whole mitochondrial genome in the blood sample, although mitochondrial DNA deletions were observed in the muscle biopsy sample. Progressive external ophthalmoplegia and parkinsonism are genetically heterogenous disorders, and part of this syndrome may be caused by mutations in other, unknown genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・臨床神経分子遺伝学

キーワード：脊髄小脳変性症、PRKCG, Machado-Joseph disease,  $^{31}\text{P}$ -MRS, POLG, パーキンソン病, ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症(SCA)は10万人あたりの有病率20人程度と本邦に多い難治性神経変性疾患である。しかしその発症病態は十分に解明されていない。我々はその中で、以前より遺伝性脊髄小脳変性症の診療と研究を精力的に行ってきた。その過程で新しいSCAの遺伝子座を決定し、SCA14として世界で初めて報告した。次いで、その原因遺伝子がprotein kinase C gamma (PRKCG)遺伝子であることを解明するに至った。しかしながら、どのような機序で、SCA発症に導くのかはまだ明らかにはされていない。protein kinase C (PKC)はイノシトールリン脂質を介する情報伝達系において重要な役割を担っているが、加えて、その上流に位置するphospholipase C- $\beta$  (PLCB)のアイソザイムで、小脳に発現するPLCB4ノックアウトマウスにおいて小脳失調を呈することも知られている。これらの事実より、この情報伝達系は小脳機能を維持する重要な役割を担っていることは明らかであるが、SCAの発症病態においてのみならず、小脳機能におけるこの情報伝達系の機能は未解明である。

また近年、遺伝性SCAのモデル動物においては、治療研究が進展しており、新規治療薬の開発も期待されている。しかしながら疾病の性質上、新規薬剤が開発されたとしても、症候と重症度による効果の判定には年単位の時間がかかることが予想される。そのため、短期間で効果を評価できる指標の開発が急務である。こうした現状において、脊髄小脳変性症の大部分はグルタミン鎖の異常伸長に伴うポリグルタミン病であるが、そのポリグルタミン病に属するハンチントン病や歯状核赤核ルイ体萎縮症などでは、骨格筋での安静時および運動負荷時におけるミトコンドリアでのATP産生能が低下していること、即ち筋エネルギー代謝が障害されている可能性があることが報告されている。また、ポリグルタミン病とは異なるが、常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症であるフリードライヒ失調症においても同様の所見が示され、その筋エネルギー代謝を有効性判定の生化学的指標として用いて抗酸化療法が試みられその薬物治療効果としてミトコンドリアでのATP産生能が増加していることが確認されている。

## 2. 研究の目的

小脳機能におけるイノシトールリン脂質を介する情報伝達系の機能は未解明である。我々はこの情報伝達系のSCA発症における病態機序の解明と、小脳を含む中枢神経系全体におけるこの情報伝達系の機能について明

らかにすることと、ポリグルタミン病における筋エネルギー代謝異常につき検討し、バイオマーカー候補になり得るかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

我々が発見したPRKCG遺伝子変異を導入したヒトcDNAを組み込んだベクターを用いノックインマウスと、ヒトPRKCGの影響も考慮し、野生型ヒトcDNAを導入したノックインマウスを作製し、この系統を繁殖維持し、神経病理学的解析、および神経症候学的解析を行う。また、筋エネルギー代謝測定には磁気共鳴装置(MRIシーメンス社製、1.5Tおよび3T)を用い $^{31}\text{P}$ -MRSを行う(図1)。測定は仰臥位にて腓腹筋にて行う。足関節屈曲運動を行い、運動前、運動中(4分)、運動後に測定する。全測定時間は20分程度を予定している。実際の測定はLodi Rらの報告に従い、安静時に64スキャン行う。次に脂肪除去体重の10%程度の重り負荷を足底加えて、足関節屈曲運動を約4分間行い、その運動中に16スキャンと運動終了間際に8スキャン測定する。運動終了後、8スキャンを4回、16スキャンを4回、32スキャンを3回、64スキャンを2回測定する。測定データとして無機リン酸{inorganic phosphate (Pi)}を得た後、運動後のPCr/Pi比やミトコンドリアにおける最大ATP産生能を示す $V_{\max}$ を指標として評価する。患者データと対照データについて、統計学的手法を用いて比較検討し、その有効な生化学的指標となりうるか否か検討する。また、本研究過程で見出した外眼筋麻痺を伴うパーキンソンニズムの研究においても、臨床的および分子遺伝学的に検討する。

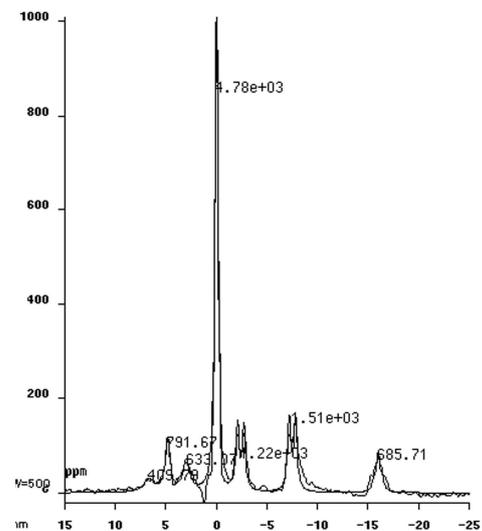


図1；安静時の $^{31}\text{P}$ -MRS

#### 4. 研究成果

ポリグルタミン病における筋エネルギー代謝の解析については、汎用機である 1.5T MRI を用いて <sup>31</sup>P-MRS による筋エネルギー代謝測定を行い、ポリグルタミン病である Machado-Joseph 病 (MJD) において、その測定法を試行した。その結果、筋エネルギー代謝が MJD において有効性判定の生化学的指標になり得る可能性が示唆された。

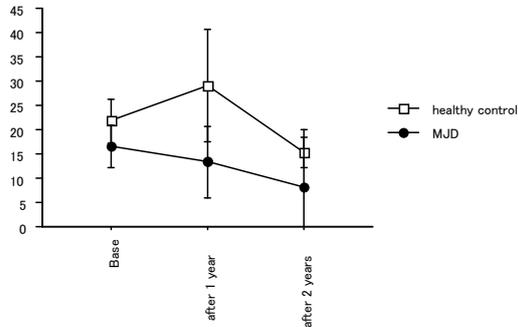


図2 Vmax の一年間の推移 (MJD 5 名, control 5 名)

また Vmax 値は SARA 総点数と逆相関していた ( $r = 0.34$ ,  $P = 0.035$ )。

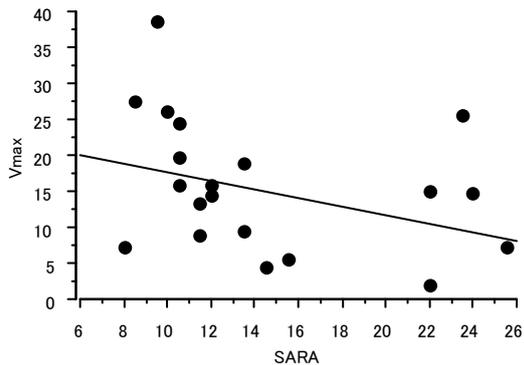


図3 Vmax と SARA の相関

SCA14 モデルラットについては、ヒト野生型と変異型 PRKCG を組み込んだノックインマウスが完成し、現在繁殖作業および行動観察を行っている。

外眼筋麻痺を伴うパーキンソンニズムの研究においては、臨床所見としては、本邦の患者のパーキンソンニズムはパーキンソン病によるものとして矛盾しないことと、遺伝子解析においては、筋組織での mtDNA 欠失は認めないものの、*POLG1* 遺伝子の複合ヘテロ接合変異を認めるものと、mtDNA 欠失は認めるが、いずれの候補遺伝子にも変異を認めないものがあることを報告し(図4)、本邦の進行性外眼筋麻痺を伴うパーキンソンニズムには複数の要因が関与していることと、未知の原因による進行性外眼筋麻痺を伴うパーキ

ンソンニズムにおいても mtDNA 修復機能の障害が関与していることを明らかにした。

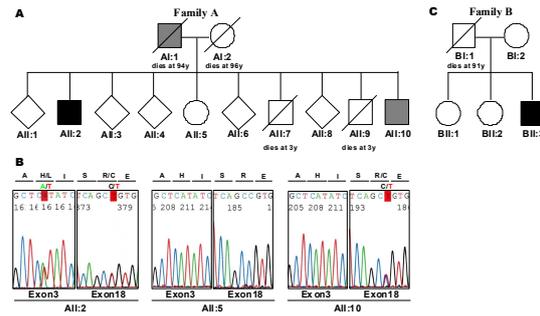


図4 遺伝子解析結果

#### 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 50 件)

1. Yabe, I., Tsuji-Akimoto, S., Shiga, T., Hamada, S., Hirata, K., Otsuki, M., Kuge, Y., Tamaki, N., Sasaki, H. Writing errors in ALS related to loss of neuronal integrity in the anterior cingulate gyrus. *J Neurol Sci.* 査読有, 315, 2012, 55-59.

2. Kazunori Sato, Ichiro Yabe, Hiroaki Yaguchi, Fumihito Nakano, Yasuyuki Kunieda, Shinji Saitoh, Hidenao Sasaki. Genetic analysis of two Japanese families with progressive external ophthalmoplegia and parkinsonism. *J Neurol.* 査読有, 258, 2011, 1327-32.

3. Ichiro Yabe, Khin K. Tha, Takashi Yokota, Kazunori Sato, Hiroyuki Soma, Asako Takei, Satoshi Terae<sup>2</sup>, Koichi Okita, Hidenao Sasaki. Estimation of skeletal muscle energy metabolism in Machado-Joseph disease using <sup>31</sup>P-MR spectroscopy. *Mov Disord.* 査読有, 26, 2011, 165-8.

[学会発表] (計 57 件)

1. 矢部一郎、秋本幸子、大槻美佳、志賀哲、玉木長良、佐々木秀直、ALS における 11C-フルマゼニル (FMZ)-PET 所見、第 52 回日本神経学会学術大会、2011 年 5 月 18 日、名古屋国際会議場、愛知

2. 佐藤和則、矢口裕章、加納崇裕、矢部一郎、佐々木秀直、國枝保幸、進行性外眼筋麻痺を伴ったパーキンソンニズムの遺伝子解析、第 52 回日本神経学会学術大会、2011 年 5 月 20 日、名古屋国際会議場、愛知

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢部 一郎 (YABE ICHIRO)  
北海道大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：60372273

(2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者

佐々木 秀直 (SASAKI HIDENAO)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：80281806

秋本 幸子 (AKIMOTO SACHIKO)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：60374328