

## ＜シンポジウム 9—1＞ポリグルタミン病への分子生物学的アプローチ

### 脊髄小脳変性症への分子遺伝学的アプローチ

石川 欽也    石黒 太郎    高橋 真    佐藤 望  
網野 猛志    新美 祐介    水澤 英洋

(臨床神経, 49 : 907—909, 2009)

Key words : 脊髄小脳変性症, 脊髄小脳失調症, ポジショナルクローニング, 遺伝子変異

#### 1. はじめに

本シンポジウムではポリグルタミン病の原因と病態の解明, 治療法の開発ということが話題になりますので, 私の演題ではどのようにして原因を究明するかについて, とくに私達のおこなってきた純粋小脳型脊髄小脳変性症の分子遺伝学的アプローチをお話しします。

#### 2. 脊髄小脳失調症 6 型 (SCA6) 同定の経緯

私が研究を開始した平成 4 年当時, 優性遺伝型失調症は多系統障害型の SCA1, SCA2, Machado-Joseph 病 (MJD), 齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA) が代表格としてすでに知られておりましたが, いわゆる Holmes 型失調症と呼ばれていた純粋小脳型は大家系での解析研究は少なく<sup>1)</sup>, 実際にどの程度まで「純粋」な小脳失調として経過するのか, 病理像はどうか, 何が原因遺伝子であるかなどほとんど不明なままでした。さらに原著の Holmes 型失調症家系は常染色体劣性遺伝型に矛盾せず, 性腺機能低下をとまうなど<sup>2)</sup>, 日本での Holmes 型とは違いもあることが指摘されておりました。当時私が居りました筑波大学には中西孝雄初代教授, 金澤一郎第二代教授をはじめ, 諸先輩方のご尽力の御蔭で常染色体優性遺伝型の Holmes 型失調症家系が多数集積されており, 水澤英洋先生のご指導の下, 家系のさらなる集積と連鎖解析を開始しました。

最初に比較的大きな 8 家系を解析した結果, 日本には優性遺伝性純粋小脳型脊髄小脳変性症 (Harding 分類; ADCA III<sup>3)</sup>) が確かに多数存在することがわかり, 雑誌 Brain から報告いたしました<sup>4)</sup>。その臨床像は平均 46 歳程度で発症し, 10 年以上経過しても小脳症状以外にめだつた小脳性以外の神経症候がない, という病像でした。また, SCA5 遺伝子座にわれわれの家系は連鎖しないこともみだし, 独自に遺伝子座を究明する必要があることを認識しました。さらに家系

を集積し 15 家系に達した時点で全染色体の連鎖解析を完了し, その約半数が第 19 番染色体短腕 19p13.1~p13.2 に連鎖することをみだしました<sup>5)</sup>。これには当時新潟大学に居られた辻 省次先生をはじめ, 多数の先生方にご協力をいただきました。

しかし草稿中に, 米国 Baylor 医科大学 C. C. Lee, H. Zoghbi らのグループからポリグルタミン鎖をコードする CAG くりかえし配列をプローブに小脳に発現する遺伝子を探索するアプローチから, 19p13.1 に位置するヒト  $\alpha 1A$ -カルシウムチャンネル遺伝子が同定され, その CAG リピートに異常伸長がある優性遺伝型脊髄小脳変性症を SCA6 と命名し, Nature Genetics 誌に報告されました<sup>6)</sup>。私達の家系をしらべたところ, 19p13.1~p13.2 に連鎖した家系はすべて, この CAG リピート伸長を有しており, さらに伸長が長いほど発症年齢が若くなる重要な特徴をみとめました。つまり, 私達が集積した 15 家系の半数である 8 家系は SCA6 であることがわかりました。後に本邦の多くの施設から SCA6 が報告され, 本疾患が MJD と並んで代表的優性遺伝性失調症であることが知られております。

#### 3. SCA6 の分子病態

SCA6 では中枢神経系のうち, 小脳 Purkinje 細胞が変性脱落しやすいことが知られています。私達は SCA6 の病態を探るべく,  $\alpha 1A$ -カルシウムチャンネル蛋白に対する抗体を作製し患者脳で蛋白の発現を研究しました。その結果, Purkinje 細胞の細胞質に同チャンネル蛋白が凝集していることをはじめてみだしました [Fig. 1]<sup>7)</sup>。これと同様の封入体が Watase らの開発した knock-in マウスにもみとめられました<sup>8)</sup>。最近の研究では, ポリグルタミン鎖が存在する同チャンネル蛋白のカルボキシル端 75kDa 領域が患者小脳で凝集しやすいことをみだしています (Ishiguro ら投稿中)。今後, SCA6 の病態を解明するに当たり, この 75kDa 長の蛋白の発現・凝集機序の解明が重要な課題になると考えております。

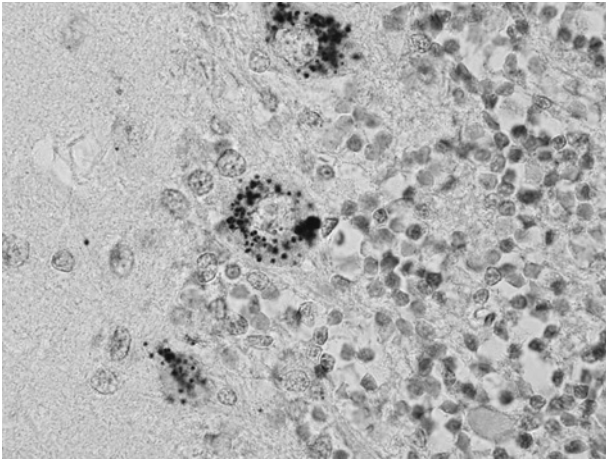


Fig. 1

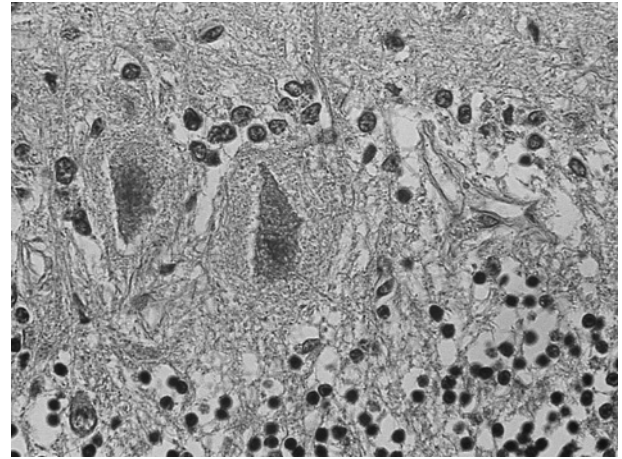


Fig. 2

#### 4. 第16番染色体長腕連鎖型優性遺伝型脊髄小脳変性症 (16q-ADCA)

1997年に報告した15家系のうち、SCA6に相当する家系を除く6家系の原因を究明するために、東京医科歯科大学に移動後、再度連鎖解析を開始しました。その結果2000年に第16番染色体長腕16q22.1に遺伝子座をみいだしました<sup>9)</sup>。この疾患も臨床的には純粋小脳型ですが、SCA6より高齢の55歳から60歳程度で発症することが多く、進行も緩徐です。神経病理学的には、小脳Purkinje細胞が変性しますが、この細胞体の周囲にeosin好性の顆粒状構造物、いわゆるHalo-like amorphous materialsをみとめることが特徴で、本疾患の神経病理学的マーカーであります [Fig. 2]。

16q-ADCAは遺伝学的に、出身地がことなっても発症者が同じハプロタイプを示す強い創始者効果を有します。私達は当初2メガベース (Mb) 領域にわたった創始者ハプロタイプを、全国の神経内科専門医の先生方からご協力をいただいてSCA6が否定された純粋小脳型の患者検体をご供与いただき、共通ハプロタイプ領域を限定化してゆき、2005年にはこの領域に存在した唯一の遺伝子変化、すなわち *puratrophin-1* 遺伝子5'非翻訳領域内のC>T塩基置換をみいだしました<sup>10)</sup>。この変化は現在でも99%以上の高い特異度で16q-ADCAの診断を可能にしています。しかし、後に信州大学の吉田邦広准教授らの家系にこの変化を有さない発症者をみいだし、この変化自体は変異ではないことがわかりました。このため私達は、共通ハプロタイプをホモ接合として有する患者ゲノムをもちいて、サザンブロット解析や、array-based comparative genomic hybridization (aCGH) 解析、それに患者ゲノム由来のBAC/fosmidライブラリーからの候補領域の完全シーケンシングを敢行しました。その結果、患者に特有の塩基配列を300カ所程度みとめ、健常対照者との比較でこれらの大部分が多型性変化であることから変異候補群から除外し、最終的に3つの遺伝子変化が患者特異的であることまで

限定化しました。現在、このうちの一つが真の遺伝子変異である可能性を強くうたがっており、今後さらにその意義を追求しているところであります。

#### 5. 最後に

私達がおこなってきた常染色優性遺伝型純粋小脳型脊髄小脳変性症の家系は大部分がSCA6と16q-ADCAでありました。SCA6の原因は $\alpha 1A$ -カルシウムチャネル遺伝子のCAGリピート伸長であることが解明され、病態にはC末端75kDa領域を中心とした蛋白凝集が関与していると思われます。16q-ADCAは強い創始者効果があり遺伝子同定には困難が強いられましたが、漸く同定されつつあります。一方、SCA6、16q-ADCA以外の類似の病型もみいだされており、原因が未だ同定されていない家系もふくめて分子遺伝学的アプローチによる更なる原因と病態の解明が重要であると痛感しています。

謝辞：これまでの長くにわたりご指導を下された先生方、貴重な検体をお送りくださった多数の先生、それに協力を惜しまなかった患者さんとそのご家族に深く感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) 水澤英洋, 吉澤和朗, 金澤一郎ら: Holmes型小脳皮質萎縮症の1家系。臨床的および神経病理学的研究。神経内科 1987; 26 : 257—264
- 2) Holmes G: A form of familial degeneration of the cerebellum. Brain 1907; 30: 466—489
- 3) Harding AE: The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of 'the Drew family of Walworth'. Brain 1982; 105: 1—28
- 4) Ishikawa K, Mizusawa H, Saito M, et al: Autosomal dominant pure cerebellar ataxia. A clinical and genetic analysis of eight Japanese families. Brain 1996; 119: 1173—1182

- 5) Ishikawa K, Tanaka H, Saito M, et al: Japanese families with autosomal dominant pure cerebellar ataxia map to chromosome 19p13.1-p13.2 and are strongly associated with mild CAG expansions in the spinocerebellar ataxia type 6 gene in chromosome 19p13.1. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 336—346
- 6) Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, et al: Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the  $\alpha$ 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nature Genetics* 1997; 15: 62—69
- 7) Ishikawa K, Fujigasaki H, Saegusa H, et al: Abundant expression and cytoplasmic aggregations of alpha 1 A-voltage-dependent calcium channel protein associated with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 6. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1185—1193
- 8) Watase K, Barrett CF, Miyazaki T, et al: Spinocerebellar ataxia type 6 knock-in mice develop a progressive neuronal dysfunction with age-dependent accumulation of mutant Cav 2.1 channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 11987—11992
- 9) Nagaoka U, Takashima M, Ishikawa K (3 equal contribution), et al: A gene on SCA4 locus causes dominantly-inherited pure cerebellar ataxia. *Neurology* 2000; 54: 1971-1975
- 10) Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, et al: An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domain. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 280—296

### Abstract

#### Molecular genetic approach to spinocerebellar ataxias

Kinya Ishikawa, Taro Ishiguro, Makoto Takahashi, Nozomu Sato,  
Takeshi Amino, Yusuke Niimi and Hidehiro Mizusawa

Department of Neurology and Neurological Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Spinocerebellar ataxia (SCA) is a group of degenerative ataxias with autosomal dominant inheritance. The most common form of mutation that causes SCA is the expansion of trinucleotide (CAG) repeat encoding polyglutamine. These “polyglutamine disorders” are, SCA1, SCA2, Machado-Joseph disease, SCA6, SCA7, SCA17 and DRPLA. Another dynamic mutation, yet a non-coding one, has been identified as the cause of SCA8, SCA10 and SCA12. This mutation includes, trinucleotide (CAG/CTG) expansion causing SCA8 and SCA12, and pentanucleotide (ATTCT) expansion leading SCA10. In addition to these dynamic mutations, static mutations, such as missense mutations and deletions, have been identified to cause SCA5, SCA11, SCA13, SCA14, SCA15 and SCA27.

Since 1992, authors have been involved in identifying the mutation (s) of autosomal dominant cerebellar ataxia with rather pure cerebellar syndrome (ADCAIII). About a half of our cohort with ADCAIII were SCA6, caused by a small CAG repeat expansion in the  $\alpha$ 1A-voltage-dependent calcium channel gene. Recent study in patients' brains suggested that a small polyglutamine expansion leads a portion of this channel protein to aggregate in the Purkinje cell. Another type of ADCAIII is the chromosome 16q22.1-linked ADCA. By a comprehensive positional cloning strategy, we have found a genetic change that segregate with the disease. Identifying the mutation of 16q-ADCA is imperative for understanding molecular basis of this disease.

(*Clin Neurol*, 49: 907—909, 2009)

**Key words:** spinocerebellar degeneration, spinocerebellar ataxia, positional cloning, gene mutation

---