2019(平成31-令和1)年度

精神・神経疾患研究開発費による

研究報告集

Annual Research Report by

Intramural Research Grant for

Neurological and Psychiatric Disorders of NCNP

2019

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター

National Center of Neurology and Psychiatry

目　次

研究報告

（4年度班）

28－6	ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発	武田　伸一	1

（3年度班）

29－1	社会機能／QOL改善と出口戦略を見据えた睡眠障害のクリニカルパスの開発	栗山　健一	61
29－2	心身症・摂食障害の治療プログラムと臨床マーカーの検証	安藤　哲也	89
29－3	筋ジストロフィーの臨床開発促進を目指した臨床研究	小牧　宏文	117
29－4	筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発	西野　一三	187
29－5	ポリグルタミン病モデルマーモセット系統を用いた病態理解と治療法開発	関　和彦	239
29－6	発達障害の治療法の確立をめざすトランスレーショナルリサーチ	一戸　紀孝	255

（2年度班）

30－1	精神疾患のNVS（negative valence system）に対する治療法の開発	中込　和幸	309
30－2	認知行動療法を国民の生活につなげる研究	堀越　勝	329
30－3	認知症・神経変性疾患の病態解明と治療・介護・予防法開発	水澤　英洋	351
30－4	運動障害疾患における疾患進展予測に基づく先制的包括医療モデル構築	坂本　崇	372
30－5	神経変性の病態解明に基づく神経保護的疾患治療法開発研究	荒木　敏之	389
30－6	運動症状を主症状とする小児期発症稀少難治性神経疾患研究	佐々木　征行	403
30－7	精神・神経医療研究センターにおけるバイオバンクの統合的管理と利活用拡大のための基盤研究	後藤　雄一	426
30－8	NCNPブレインバンクの運営および生前登録システムの推進	齊藤　祐子	452
30－9	ゲノム編集技術を用いたモデル動物作出による精神神経筋疾患の病態解明	星野　幹雄	480
30－10	精神・神経疾患での脳画像撮像および解析手法の標準化に関する研究	松田　博史	510

（初年度班）

１－１	危険ドラッグによる有害作用の新規評価法開発に関する研究	舩田　正彦	520
１－２	薬物使用障害に対する多様な治療法の開発	松本　俊彦	530
１－３	重症精神障害者とその家族の効果的な地域生活支援体制に関する基盤的研究	藤井　千代	540
１－４	てんかんの病態解明と併存症を含めた先駆的・包括的診断と治療方法の開発	中川　栄二	548
１－５	難治性神経疾患における免疫病態の解明と診断・治療法開発	山村　隆	581
１－６	精神医療政策への萌芽的取組と行政効果検証に関する研究	山之内　芳雄	608

４　年　度　班

28-6　ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター
武田　伸一

総括研究報告

1. 研究目的

原因が解明されたにもかかわらず進行を抑制する治療法が確立していない Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)については、全身の骨格筋と心筋が障害される疾患であることを考慮すると、全身的な治療法を開発することが最も重要である。そこで、これまで進めてきた研究のうち、DMD に対するアンチセンス核酸を用いたエクソン・スキップ治療法の有効性と安全性を検証し、治験のプロトコルやマニュアルの準備を進めて、社会的、倫理的問題についても充分な検証を進めながら、同治療法を臨床応用することを目標とする。また、筋前駆細胞への分化誘導法を確立する必要がある iPS 細胞を用いた幹細胞移植治療ならびに筋ジストロフィーの病態解明に基づく薬物治療についてもこれまで研究班で開発してきたモデル動物を駆使して研究を進めて臨床に展開することを目標に、以下の構成で研究を進める。

1.　筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発

1-1.エクソン・スキップなど遺伝子発現制御法の開発（武田、松尾、青木、岡田、堀田、萩原、清尾）

1-2.幹細胞の増殖・分化・移植の制御技術の確立（梅澤、櫻井、深田、上住、橋本）

1-3.新たな発想、技術に基づく分子病態、薬物治療研究（橋戸、野口、北條、裏出、湯浅、岩田、田中）

2.　筋ジストロフィーのモデル動物の維持（保田）

3.　新たな治療法を臨床に展開するための倫理的、社会的研究（貝谷）

2. 研究組織

主任研究者
武田　伸一
国立精神・神経医療研究センター

分担研究者
青木　吉嗣
国立精神・神経医療研究センター神経研究所
岩田　裕子
国立循環器病研究センター研究所
上住　聡芳
東京都健康長寿医療センター
梅澤　明弘
国立成育医療研究センター
裏出　良博　筑波大学→
(2018.4～)東京大学　医学部附属病院
岡田　尚巳　日本医科大学→
(2019.4～)東京大学　医科学研究所
貝谷　久宣
日本筋ジストロフィー協会
櫻井　英俊
京都大学　iPS 細胞研究所
清尾　康志
東京工業大学　生命理工学院
田中　廣壽
東京大学　医科学研究所
野口　悟
国立精神・神経医療研究センター神経研究所
萩原　正敏
京都大学　大学院医学研究科
橋戸　和夫
国立精神・神経医療研究センター神経研究所
橋本　有弘(～2018 年 3 月まで)
国立長寿医療研究センター
深田　宗一朗
大阪大学　大学院薬学研究科
北條　浩彦
国立精神・神経医療研究センター神経研究所
堀田　秋津
京都大学　iPS 細胞研究所
松尾　雅文
神戸学院大学　総合リハビリテーション学部
保田　昌彦
実験動物中央研究所
湯浅　慎介
慶應義塾大学　医学部循環器内科

3. 研究成果

a. エクソン・スキップ等の遺伝子発現制御法の開発（武田、松尾、青木、岡田、堀田、萩原、清尾）

本研究班の中心的な課題として追究してきたエクソン・スキップに関しては、ヒト・ジストロフィン遺伝子のエクソン 53 スキップに有効なアンチセンス配列を同定した上で、霊長類とげっ歯類を用いた安全性試験を行い PMDA からの承認を受けて、DMD 患者に対する早期探索的臨床試験を実施した。投与全例で、エクソン 53 スキップが観察され、しかも薬物の最高血中濃度（Cmax）とmRNAレベルでのエクソン・スキップ効率が相関していた。更に、投与例の多くでジストロフィンの発現が確認され、特にその 1 例では、正常対照の 8.1%に達していた。（***Sci Transl Med***, 2018）。この結果、厚労省による「先駆け審査制度」、米国 FDA による fast track 制度の指定を受け、我が国と米国で企業による次相試験が行われ、我が国のⅠ/Ⅱ相試験では、40 mg/kgあるいは 80 mg/kgの週 1 回 24 週の投与を安全に終了したばかりでなく、全例で RT-PCR 上エクソン 53 スキップを認め、80 mg/kgの 24 週投与の後に行われた筋生検で顕著なジストロフィン発現量を達成することができた。同様な結果は、米国での投与例でも得られている他、DMD の自然歴と比較して、良好な臨床評価指標の改善結果も得られている。そこで我が国（2019 年 9 月）と米国（同年 10 月）において当局（PMDA と FDA）に対する承認申請が行われ、同 11 月には厚労省により条件付き早期承認制度の対象とする旨発表があり、承認の日が待ち望まれいる（NSNP 武田主任研究者）。NCNP の武田・青木班員は、エクソン 44 スキップについても開発を進め小牧班とも協力して NCNP 病院における医師主導治験（first in human 試験）が開始された。一方、従来のモルフォリノ核酸では、効果が得られなかった心筋でのエクソン・スキップについて、ペプチドを付加した PPMO を用いて、高い導入効果が得られることを明らかにした（***Proc Natl Acad Sci USA***, 2017）。又、尿中由来細胞を MyoD 遺伝子の導入により筋細胞に変換し、従来の方法よりも迅速かつ簡便にエクソンスキップのスクリーニングが可能であることを明らかにした（***Sci Rep***, 2019）他、DMD における遺伝子変異の hotspot を丸ごと skip し、しかも病状の改善が期待できる exon45-55 について、細胞モデルで大きな進展があった（***Mol Ther***, 2019）。

一方、日本医科大学から東京大学に異動した岡田班員は、長年アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの開発に携わってきたが、同ベクターは遺伝子導入効率は極れているものの、免疫反応性を解決しなければ筋ジストロフィーのような進行性の疾患に応用することは難しいと考え、免疫寛容誘導の方法に着目し、歯髄由来間葉系幹細胞を用いて、着実な成果を挙げている。さらに、遺伝子治療とは近縁の方法論であるゲノム編集に関して、京大 CiRA の堀田班員は、CRISPR-Cas9 を中心とするゲノム編集効率及びエクソンスキップ効率の劇的な向上に成功すると共に、国内研究者と共同で新規 CRISPR-Cas3 を用いたエクソンスキップ効率及びジストロフィンの発現にも成功している（***Nat Commun***, 2019）。

b．幹細胞を用いた研究（梅澤、櫻井、深田、上住、橋本）

本研究班は、幹細胞、筋再生の分野でも画期的な成果を世界に発信してきた歴史を持つ。一つは、筋再生の鍵を握っている筋衛星細胞の遺伝子発現パターンを明らかにしたことであり、もう一つは骨格筋の新しい幹細胞としての間葉系前駆細胞の提唱である。前者に関しては、筋衛星細胞の増殖と分化における Calcitonin Receptor の生理的な意義を阪大の深田班員が共同研究者と共に明らかにした（***Nature,*** 2018）他、本年度は筋衛星細胞の増殖と MyoD 遺伝子の発現を分離したことが特筆される。新たな移植細胞源として注目されるからである。後者の細胞を発見した都健康長寿医療センター・上住班員は、レチノイン酸シグナルが筋の脂肪化、線維化を担う間葉系前駆細胞の機能抑制に重要であることを見出し、レチノイン酸に比べ脂肪分化を数百～千倍の強さで抑制するレチノイン酸受容体作動薬の開発に成功した。更に、間葉系前駆細胞こそが加齢に伴なう筋委縮において決定的な因子であることを明らかにしている。一方で、我が国発で世界をリードする科学技術として開発された iPS 細胞に関しては、筋細胞系譜の幹細胞を誘導しにくいという大きな限界があった。CiRA の櫻井班員は京都府立大学の佐藤博士と協力して研究を進め、筋細胞系譜幹細胞を誘導する上で重要な転写因子群を明らかにした（***Stem Cell Repoerts***, 2019）。NCNP の武田班員は中胚葉誘導法と EG sphere 法に加え、TGFβ シグナルを抑制することにより、誘導方法を確立することができた(***Sci Rep***, 2018) 。今後の課題は、移植法を確立することにある。

c．新たな病態、薬物治療研究（橋戸、野口、北條裏出、福田、岩田、田中）

プロスタグランジン合成酵素阻害剤については、長年に渡る東京大学・裏出班員の基礎研究成果を下に DMD 患者における尿中代謝産物の検索を出発点として、健

常者における first in human 試験に引き続き、DMD 患者における第2相企業治験が行なわれたが、2019年12月、RCT を行うための AMED-Cycle 事業への採択をみた。また、NCVC の岩田班員が長年に渡って進めてきた Ca^{2+}透過チャネル(TRPV2)阻害についての基礎研究に引き続き、NHO 刀根山病院の松村先生を中心として既存の阻害薬による DMD の心筋障害に対する**先進医療B**が開始された。又、岩田班員は TRPV2 阻害抗体の開発を継続した。

一方、武田班員は、ジストロフィン遺伝子のエクソン 45～55 欠失例が例外的に軽微な症状を示すことに着目して研究を進めてきた。殊に 45～55 欠失ジストロフィンのトランスジェニックマウスを作出して mdx マウスと交配して検討を進めたところ、同マウスでは外部膜のぜい弱性は改善していた。一方で筋小胞体膜のリアノジン・レセプターは細胞内の nNOS により産出された NO により、過剰にニトロシル化していた。そのため、細胞内に Ca が漏出していたが、Ca イオンを小胞体に取り込む Ca ポンプ(SERCA)の働きがよく保たれており、それがジストロフィン欠損状態では増加していた Sarcolipin の発現低下によることを突きとめた。現在、Sarcolipin はジストロフィン欠損の新たな治療ターゲットとして注目されている(***BBRC***, 2018)。

d．モデル動物の開発（保田）

本研究班では筋ジストロフィー犬等のモデル動物の開発を介して、ジストロフィンのバイオマーカの提唱を目指してきた。特に本研究班は筋ジストロフィー犬血清の解析をいとぐちとして、miR-1, 133a, 206 が筋ジストロフィーの血清で特異的に増加していることを世界に先駆けて報告した。本年、miR-1 が筋ジス犬の血清で特異的に増加していることを見出し、再生筋及び C2C12 細胞を用いた研究から筋分化制御がそのターゲットであることを明らかにした(***PLos One***, 2019)。また筋ジス犬の走行時の加速度/角速度の変化を継時的に測定し、その低下と MRI でみた筋障害度との間に相関を示すことを見い出した(**特許申請中**)(***PLos One***, 2019)。更にその後の研究で加速度のフーリエ解析を行うことにより、加速度の変化量の上で、健常犬と筋ジス犬の間で大きな隔たりがあることに初めて気付いた。このことはフィジオロジカルなマーカとして日常診療に応用できる可能性を示している。一方、DMD 患者尿中のタイチン高値を認めた神戸学院大の松尾班員(***Sci Rep***, 2016)の研究は小牧班に引き継がれ、福山型など他の病型でも検討が行われている。

e．倫理的、社会的研究（貝谷）

エクソン・スキップなどの新たな治療を DMD 患者に対して行なうためには、患者、家族の皆さんに、病気の理解を高めて頂くことが極めて重要である。その意味では貝谷班員(筋ジストロフィー協会)が長年続けてきたピアカウンセラー養成講座は高く評価される。2019 年度、20 回目を迎えた同養成講座では、参加者の多くが高い満足度を示していた。

4．倫理面における配慮の状況

DNA 組換え実験に関しては、各施設の組換え DNA 実験安全委員会による審査、承認を受けた上で実施した。動物実験については、各施設の動物実験倫理委員会の承認を得て行った。ヒトを対象にした研究については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理方針」及び「ヒトを対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守し、各施設の倫理委員会の承認を得た上で行った。

5．今後の研究の進め方に関する希望事項

筋ジストロフィー難病に指定され、AMED にも治療研究が採択をみている中、本研究班を開発費により継続する根拠はどこにあるのだろうか。1 つは本研究班の努力により NCNP に筋ジストロフィーモデル動物施設が維持され、治療研究の Platform として、内外の研究者により使用されていることが挙げられる。又、治療効果を実証する上での基盤技術においては、ジストロフィンの検出からマウスの運動負荷に至るまで共有化し、我が国のスタンダードとなっている(実験医学, 増刊号 2019)。特にこの研究班ではエクソン・スキップ、幹細胞移植をはじめとして同じ方法論について、複数の研究者を立てて、競合的かつ協調的に研究を進めてきた。また、複数の治療法について同じ研究班の中で長所と短所を比較しながら相補的に研究を進めることができた。このような点は、本研究の成立の意義を提供していると考えられる。今後、同趣旨の研究班の継続を強くお願いしたい。

28-6

Activity Report of a National Research Group Organized by National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP) : Development of New Therapy for Muscular Dystrophy, Based on Animal Models of Dystrophin Deficiency

Shin'ichi Takeda, M.D., Ph.D. (Principal Investigator)
National Center of Neurology and Psychiatry

The causative genes of muscular dystrophies have been largely identified, however neither essential molecular pathogenesis nor curative treatment of the diseases has been found in clinical level. To apply results of laboratory research to clinical medicine, we organized a research group and I briefly summarize the progress between 04/2016 and 03/2020 pursued by our group.

1. Exon skipping toward muscular dystrophies

Dr. Takeda's research group (NCNP) developed exon 53 skipping drug using newly synthesized antisense oligo nucleotides (AOs), NS-065/NCNP-01, Viltoralsen, made by Nippon Shinyaku, Co. Ltd. (NS) and challenged the early phase clinical trial among Duchenne muscular dystrophy (DMD) patients at the NCNP hospital. This trial was finished without a severe adverse events, moreover exon 53 skipping was found in muscle biopsy specimens from all DMD patients treated. Among them, one paticular patient who received intravenous injection of 20 mg/kg of the drug once a week for 12 weeks, showed considerable amounts of dystrophin expression detected by immunohistochemistry and Western blotting after the treatment (***Sci Transl Med***, 2018). This drug was designated as fast track in approval process both in Japan and in US, and this drug was also treated as "Orphan drug" in both countries. Next phase trials have been done in both counties without serious adverse events. We found enough expression of dystrophin and favorable improvement in clinical phenotypes after the treatment. After the careful discussion and preparation, NS submitted this drug to PMDA and its daughter company in US, NS-pharma, asked to FDA. Now, we are waiting for the final approval of the drug in both coutries.

2. Stem cell transfer for muscle diseases

Stem cell transfer is very important as a future treatment of muscular dystrophies. These days, inducible Pluripotent Stem (iPS) cells evoked a lot of attention, since these cells can be applicable to regenerative medicine. Dr. Sakurai and his colleagues in iPS cells Research Institute (CiRA), Kyoto University challenged to establish iPS cells from DMD patients. Dr. Takeda's research group in NCNP tried to differentiate human iPS cells into myogenic precursor cells by using modified EG-sphere method and their attempt was successful (***Sci Rep***, 2018). His group also tried to further establishs the method to induce myogenic cells from human iPS cells.

3. Development of new drug therapy based on elucidation of molecular pathogenesis of muscular dystrophy

Dr. Urade's research group (Tokyo University) is particularly interested in involvement of Prostaglandin D_2 (PGD_2) synthase in dystrophic process. Initial Phase PGD_2 Synthase inhibitors trials has been done among DMD patients at the NCNP hospital. Then, Taiho Co. Ltd, has challenged 2nd phase trial of the drug (TAS-205) in DMD patients. The results were not so favorable, but the company still has a great interest in their drug and has gotten large amounts of grants to carry PhaseⅢ trial in Japan. Dr. Iwata (National Center of Cardiovascular Disorders) has identified involvement of mechanosensitive TRPV2 channel in dystrophic process. Her research group examined the effectiveness of TRPV2 inhibitor, such as Tranilast known as anti-allergic drug. In DMD patients, a clinical study of Tranilast was conducted in Toneyama National Hospital by Dr. Matsumura, and his attempt was accepted by the

agency as "Advanced Medical Treatment B".

4. Development of new animal models for therapeutic approach to muscle diseases

Dystrophic dog (CXMD) reveals severe and progressive phenotypes seen in DMD patients. The research group in NCNP, measured accerelation of movement of dystorophic dogs. The accerelation was decreased, when detected at thorax level at the onest stage of the disease, 2-months-old. On the other hand, the accrelation was slowly decreased, when detected at lumbar level after the onset of the disease, and the group is trying to get relationship between the accrelation of movement and the muscle damage detected by MRI. The accerelation might be useful to measure the progession of the disease, or to measure the improvement of symptoms by the treatment (***PLoS One***, 2018). The research group also pointed out MiR-188 has been participated in the regulation mechanism of muscle regulatory factors such as MRF4 and MEF2 (***PLoS One***, 2019). Very interestingly, the expression of MiR-188 was increased in the serum of dystrophic dogs and regenerating skeletal muscle after the injection of cardiotoxin.

5. Social and medical aspects of muscular dystrophies

Dr. Kaiya (President of Muscular Dystrophy Association of Japan) promoted a research regarding socio-medical issues of Gene Medicine of patients suffering from muscular dystrophy and their families. Dr. Kaiya organized the meeting for peer counselors for patients and families who will make advice for genetic analysis and newly developed diagnostic ways and treatment. It is amazing that patients and their families themselves tried to be peer counselors. It is not so easy for the patients and families to understand the progress of research these days, but their efforts certainly facilitate the understandings of new development. It is obviously very important for researchers, doctors, patients and families to cooperate together and this cooperation have been greatly enhanced by the association of participants from Regulations and Biopharma(s).

ジストロフィン欠損の病態を標的とした治療法の開発

武田　伸一
国立精神・神経医療研究センター

1．microRNA に関する検討

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、DMD 遺伝子変異によるジストロフィンの欠損を原因とする重篤な筋疾患である[1]。DMD の病態に関わる重要な因子として、筋特異的な microRNA（miRNA）が挙げられ、筋原性因子として特徴付けられている[2]。これまでに DMD 患者とそのモデル動物の血清中において、顕著に増加する miRNA が報告されており、これらは筋分化に関わる制御因子であることが明らかになっている[3]。これらの所見は、筋形成に関連する血清 miRNA の探索が、筋障害における骨格筋の病理学的状態を反映するマーカーの確立をもたらし得ることを示唆している。本研究ではイヌ筋ジストロフィーモデル Canine X-linked Muscular Dystrophy（$CXMD_J$）の血清中において高値を示す miRNA、miR-188 を発見し、これが筋分化調節因子として機能する可能性について検討した。また、この miR-188 がその遺伝子座で 4 つの miRNA とクラスターを形成することに注目し、これらと協調して機能する可能性についても検討した。

方法

1)$CXMD_J$ における特異的な miRNA の探索

筋ジストロフィーを発症する 2 か月齢の $CXMD_J$ と対照となる正常犬から採取した血清を用いて、miRNA マイクロアレイ解析を行った。$CXMD_J$ において特異的に高発現する miRNA を検出した後、定量的 PCR で結果を再現できたものを $CXMD_J$ の発症に特異的な miRNA とした。これにより同定された miRNA については、さらにその由来を調べるため組織発現解析を行った。

2)$CXMD_J$ の筋組織における miR-188 の発現

正常犬及び $CXMD_J$ から採材した血清及び前脛骨筋（Tibialis cranialis: TC）における miR-188 発現量を経齢的に測定した。測定時の犬の年齢は、0 日齢、3 週齢、2 か月齢、6 か月齢、9 か月齢及び 1 年齢とした。また、各年齢時の TC を、HE 染色による筋病理像を観察し、miR-188 発現と筋形成との関連性について検討した。また、正常犬の TC、或いは正常マウスの前脛骨筋（TA）にカルジオトキシン（CTX）を筋注し、筋再生誘導による miRNA の発現の変化を、投与後 3、5 及び 7 日後に、測定した。

3)筋分化における miR-188 の機能の解析

マウス筋芽細胞（C2C12 細胞）を用いて骨格筋分化における miRNA の発現変化と筋分化制御因子である MyoD、Myf5、 myogenin、myogenic regulatory factor 4（MRF4）、myocyte enhancer factor 2C（MEF2C）及び筋分化マーカーのクレアチンキナーゼとミオシン重鎖-1、-2、-4 の発現パターンを解析した。また、miR-188 がこれらの筋分化制御因子に与える影響を評価するため、C2C12 細胞に対し、miR-188 の機能を抑制、或いは増強させる合成 RNA（アンチセンス miR-188 と mimic miR-188）を導入し、それぞれの制御因子の mRNA 発現量を測定した。

4)miR-188 とクラスターを形成する miRNA 群の発現の解析

Clcn5 クロライドチャンネル遺伝子のイントロン 3 で miR-188 とクラスターを形成するイヌの miR-532、miR500、miR-362、miR-660、miR-502 について CXMDJ の血清及び骨格筋を含む組織での発現を調べた。またマウスではマウスのクラスター構成メンバー（miR-532、miR500、miR-362、miR-501）について組織での発現を調べた。更に CTX による筋再生誘導での発現を調べると同時に、C2C12 の筋分化における発現の変化を解析した。

結果

1)$CXMD_J$ における発症特異的な miRNA の探索

291 のイヌ miRNA を用いたマイクロアレイ解析の結果、$CXMD_J$ での発現量が正常犬の 2 倍以上増加しており、定量的 PCR での再現性が確認されたものの中で、DMD 患者及びそのモデル動物血清での増加が未だ報告されていない miRNA は 2 種類（miR-188 と-500）検出された。そこでこれら miRNA の組織における発現量を比較したところ、前脛骨筋及び横隔膜において miR-188 のみに有意な増加が認められた。このため miR-188 に焦点を当

て、骨格筋の病態との関連性について検討を進めた。

2)筋再生における miR-188 の発現上昇

血清と筋組織それぞれで経齢的に miR-188 の発現を調べたところ、いずれの場合も筋線維変性と再生が顕著になる 2 ヶ月齢、6 ヶ月齢及び 9 ヶ月齢で CXMD$_J$ での miR-188 発現量が有意に増加していた。また、正常犬を用いたカルジオトキシン（CTX）処置による再生筋誘導においても miR-188 の発現が上昇するのが認められた。この結果は CTX 処置したマウス骨格筋においても再現され、更に、マウスの筋細胞株 C2C12 では分化誘導後 2-3 日で著しく上昇するのが認められた。

3)miR-188 による筋分化制御因子の調節

C2C12 細胞の筋分誘導時における miR-188 と筋分化制御因子の発現を調べたところ、MRF4 及び MEF2C は、miR-188 と共に分化誘導後 3 日から 5 日において有意に増加しており、また、アンチセンス RNA で miR-188 の機能を阻害すると、MRF4、MEF2C、クレアチンキナーゼ、ミオシン重鎖-1、-2、-4 の発現が減少した。これとは逆に、mimic miR-188 を導入し miR-188 の機能を増強すると、これらの分子の発現も増加した。これらの結果は、miR-188 が筋分化における転写制御因子及び筋分化マーカーの発現調節を担うことを強く示唆していた。

4)miR-188 を含む miRNA 群の筋分化における発現

miR-188 の遺伝子座は *Clcn5* クロライドチャンネル遺伝子のイントロン 3 にあり、ここで他の 4 種類の miRNA とクラスターを形成している。そのメンバーである miR-500 はマイクロアレイ解析において CXMD$_J$ 特異的血清 miRNA として検出されており、また、miR-501 は筋分化調節に関わることが報告されている[7]。そこでこのクラスターを形成する miRNA 全てについて筋分化に関わる可能性を検証した。これら 4 種類の miRNA の組織発現パターンを調べたところ、miR-188 に酷似しており、また骨格筋では CTX による筋再生誘導において顕著な発現上昇を示した。FACS 解析ではいずれも主に筋芽細胞に発現していることが確認され、C2C12 細胞を用いた解析では、全てが筋分化誘導開始後 2 日から 3 日にかけて有意な発現上昇が認められ、3 日から 4 日で最大になるという miR-188 と類似したパターンを示していた。

考察

我々は、CXMD$_J$ 血清中において、特異的に増加する miRNA、miR-188 を発見した。これが、骨格筋の再生が盛んな時期に対応して上昇すること、また、正常犬への CTX 投与による骨格筋再生誘導においても上昇すること、更には培養筋細胞の分化誘導後に上昇することから、miR-188 は筋再生において、分化過程にある筋細胞に強く発現するものと考えられた。この知見は、miR-188 が筋ジストロフィー病態において、筋再生マーカーとして有用となる可能性を示していた。一方、C2C12 細胞を用いた解析では、筋分化に伴う miR-188 の上昇が複数の筋分化制御因子を正に調節することが示された。miRNA は mRNA の翻訳を抑制し、その機能を負に調節することから[4),5)]、この分化制御因子に対する miR-188 の効果は間接的なものである。このため今後は直接の標的分子同定が重要な課題になると考えられた。また、これと同時に miR-188 が *Clcn5* 遺伝子のイントロン 3 で形成する miRNA クラスターについて解析したところ、他の 4 種類の miRNA（miR-532、miR-362、miR-501、miR-500）も miR-188 と同様に筋細胞に発現し、筋分化に伴って発現上昇するのが認められた。このうち miR-501 は筋分化におけるミオシン発現の調節因子として報告されており[7]、他の miRNA の機能についても注目される。これら複数の miRNA が協調し、筋分化を調節する可能性があるため更なる検討が必要である。

結論

我々は miR-188 が筋ジストロフィーイヌモデルの血清において顕著に増加し、筋再生に応答して発現が増加することを明らかにした。また、これが筋分化転写因子及び筋分化マーカーを制御する分子であることを示した。これらの結果は、miR-188 が筋分化における新規の調節因子であり、血清における発現量の上昇は筋再生の分子マーカーとして有用となる可能性を示していた[6)]。これに加え、*Clcn5* クロライドチャンネル遺伝子の同一イントロンで miR-188 とクラスター形成をする miRNA が骨格筋分化において互いに酷似した発現パターンを示すことを明らかにし、これら 5 種類の miRNA が協調的に筋分化調節に関与する可能性を示唆した。

参考文献

1) Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, *et al.* ***Genomics.*** 2(1): 90-95, 1988.
2) Horak M, Novak J, Bienertova-Vasku J. ***Dev Biol.*** 410(1): 1–13, 2016.
3) Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, *et al.*, ***PloS One.*** 6: e18388, 2011.
4) Bartel DP. ***Cell.*** 116(2):281–97, 2004.
5) Ambros V. ***Nature.*** 431(7006):350–5, 2004.
6) Shibasaki H, Imamura M, Arima S, *et al.* ***PloS One.*** 14(1):e0211597, 2019
7) Mizbani A, Luca E, Rushing EJ, et al. ***Development*** 143: 4137-4148, 2016

2．筋ジストロフィー犬の加速度に関する検討

緒言

DMD 患者は進行性の歩行障害を呈するが、新規治療の開発と共に、治療効果を鋭敏に判定する臨床評価指標が求められている。これまで用いられてきた運動機能評価法は、DMD 患者の努力を反映している可能性が高く、定量性、再現性に欠ける可能性が高い。一方加速度・角速度パラメータによる運動機能評価は、運動の定量化や身体活動性のモニタリングに優れ、近年では計測デバイスの小型・軽量化によりDMD患者の身体活動性の評価に用いられ始めている[1,2]。そこで、加速度・角速度センサを用いて、イヌ筋ジストロフィーモデル Canine X-linked Muscular Dystrophy in Japan（$CXMD_J$）の走行時の運動機能の評価した。[3]

方法

1)走行時の加速度・角速度による運動機能評価

前回、検討した筋ジストロフィー患犬 5 頭を第一群とし、今回新規に設定した患犬 5 頭を第二群とした。第二群の患犬と対照健常犬 3 頭の走行時における運動を評価するために、加速度・角速度センサ（TSND121; ATR-Promotions）を用いて、3 方向（X;前後、Y;左右、Z;鉛直）の広範囲な加速度（± 8G）、角速度（± 1000 dps）を検出した。イヌ個体の背側の胸・腰部 2 箇所にセンサを装着し、15 m 走行を連続 4 回実施した。発症時期の 2 ヶ月齢から病態進行が停滞する 12 ヶ月齢まで、各月齢で測定を行った。また 12 ヵ月齢のみに限り、頚部にもセンサを装着して、同時に加速度・角速度を測定した。

2)加速度・角速度パラメータと臨床症状の関連解析

上記の患犬で認められる 8 項目の臨床症状（歩様、運動障害、大腿筋萎縮、側頭筋萎縮、流涎、巨舌、嚥下障害、座位姿勢）の 5 段階によるスコア評価[4,5]（正常；1、重症；5）を 2 ヶ月齢から 12 ヶ月齢まで各月齢で実施した。経過における加速度・角速度パラメータとグレーディング・スコアとの関連について、トレンド推定により評価した。

結果

1)臨床症状と歩様パターンの評価

患犬のグレーディング・スコアは、8 ヶ月齢前後まで重症化による増加を示した。各個体間において重症度に違いが認められたが、第一群の患犬と比較して差異は小さかった。また、8 ヵ月齢のグレーディング・スコアについて、5 頭の内の 4 頭は、第一群の患犬 3 頭よりも低い値を示した。2 ヵ月齢から 12 ヵ月齢までの走行試験における歩様パターンを分類すると、5 頭の内の 4 頭は全速力で走るギャロップで 7 割以上を占め、速足のトロットは 2 割以下であった。1 頭はギャロップとトロットで 5 割近くを占めた。一方、第一群の患犬では、5 頭の内の 2 頭のみでギャロップが約 7 割を占め、3 頭はトロットあるいは常歩が 5 割前後を占めた。第二群の患犬は、第一群よりも重症度がやや緩和され、歩様機能を比較的に保持すると考えられた。

2)走行時の加速度・角速度による運動機能評価

患犬の 3 方向軸の加速度・角速度パラメータは、健常犬よりも全体的に低い値を示した。3 方向全体の加速度を指示する加速度マグニチュードは、胸・腰部共に患犬と健常犬の差は 2 ヶ月齢で既に認められた。一方、第一群の患犬でみられた経過に従った減弱は、明確にみられなかった。加速度マグニチュードに対する Y 軸加速度の割合について、患犬では腰部で 5-10 ヵ月齢まで増加する傾向がみられ、腰帯部に左右方向の動揺が生じる可能性が考えられた。また Z 軸加速度の割合については、8-12 ヶ月齢まで患犬で増加していた。12 ヵ月齢の頚部での患犬の 3 方向軸の加速度、加速度マグニチュード、Y 軸、Z 軸の角速度は、健常犬と比較して有意に減

少した。一方、加速度マグニチュードに対するZ軸加速度の割合は有意に増加した。

3) 加速度・角速度パラメータと臨床症状の関連解析

トレンド推定において、グレーディング・スコアの増加にともなう加速度・角速度パラメータの変化量の減少を認めた。ただし、第一群で減少が確認された胸・腰部のZ軸加速度およびZ軸角速度と腰部のY軸角速度では変化しなかった。また、胸・腰部の加速度マグニチュードに対するZ軸加速度の割合で増加がみられた。

考察

加速度・角速度は、重症化にともなう運動機能の低下を検出する有効な評価であるといえる。本研究では、歩様機能が比較的に保持された患犬群において、ギャロップの影響が強く反映された加速度・角速度パラメータの傾向が検出された。特に第一群の患犬でみられた経過に従った減弱は、胸・腰部の加速度マグニチュードで明確にみられなかった。胸部は主として前肢の、腰部は主として後肢の影響を受けると考えられる。本研究の対象とした第二群の患犬では、前後肢の筋機能障害が発症時期である2ヵ月齢には明確に現れるものの、経過に従った段階的な進行が緩徐であった可能性がある。また、頚部の加速度・角速度は、胸・腰部と類似した減少を示すが、左右方向の動揺による影響は少ないと考えられた。臨床症状との関連解析では、重症化に応じて鋭敏に変化しやすいパラメータを呈示出来る可能性がある。今後は、歩様パターンに従った加速度・角速度パラメータの特徴を慎重に検討する必要がある。

結論

加速度・角速度は、多様な情報を提供するアウトカム・メジャーとなる可能性がある。筋ジストロフィーを始めとする神経筋疾患患者での応用を検討するとともに、重症化と密接に連動して変動する有用な評価法として病態解明に役立てたい。

参考文献

1) Jeannet PY, Aminian K, Bloetzer C, *et al.*, ***Eur J Paediatr Neurol.*** 15: 40-47, 2011.
2) Le Moing AG, Seferian AM, Moraux A, *et al.*, ***PLoS One.*** 11: e0156696, 2016.
3) Kuraoka M, Nitahara-Kasahara Y, Tachimori H, *et al.*, ***PLoS One.*** 13:e0208415, 2018.
4) Shimatsu Y, Yoshimura M, Yuasa K, *et al.*, ***Acta Myol.*** 24: 145-154, 2005.
6) Kuraoka M, Kimura E, Nagata T, Am ***J Pathol.*** 186:1302-1312,2016.

エクソン・スキップ治療の効果向上を目的とした、骨格筋・心筋への核酸取り込み機序の解明

青木　吉嗣
国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 遺伝子疾患治療研究部

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィン遺伝子の変異により、骨格筋膜の裏打ちタンパク質であるジストロフィンが欠損して生じる、重篤な遺伝性筋疾患である。これまでステロイド剤以外の治療法がほとんどなかった同疾患を対象に、アンチセンス・モルフォリノ核酸を用いた"エクソン・スキップ治療"の開発が有望視されている。我々は、同疾患のマウスおよび犬モデルを対象に、エクソン・スキップの基盤的研究を実施し、モルフォリノ核酸の用量依存的な効果と高い安全性を実証してきた[1,2]。こうした状況を背景に本手法の臨床応用への期待が高まったことから，DMD患者を対象にしたエクソン53スキップの早期探索的臨床試験が、国立精神・神経医療研究センター病院で実施され、DMD治療剤NS-065/NCNP-01（エクソン53スキップ薬）の治療効果を予測するジストロフィンタンパク質の発現を確認出来た。この有望な結果を受けて、NS-065/NCNP-01は厚生労働省の先駆け審査指定制度の対象に初指定され、2019年9月に製造販売承認申請を完了している。

しかしながら、アンチセンス核酸を用いたエクソン・スキップ治療の課題は、効率的にモルフォリノ核酸を骨格筋線維（核内）および心筋（核内）に送達するシステムがない事であった。本研究では、筋ジストロフィーを対象にしたエクソン・スキップ治療の効果向上のため、ジストロフィン欠損モデル動物を対象に、骨格筋線維・心筋細胞へのアンチセンス・モルフォリノ核酸分子の取り込み分子機序を解明する。

方法

1．筋管収縮時におけるモルフォリノ核酸の取り込み分子機序

1-1. H2K筋管およびH2K-mdx52筋管を対象に、培養細胞ペーシングシステムを用いて持続的に筋管収縮をさせた状況で、アンチセンス核酸の取り込み効率に変化が生じるかどうかを検討する。

1-2. mdx52マウスを対象に、下肢懸垂し、片側のみの前脛骨筋をペーシングシステムにより持続的に筋収縮させた状態で、モルフォリノ核酸を経静脈全身投与し、エクソン・スキップ誘導効率を指標にPMOの取り込み効率を比較する。

1-3. H2K-mdx筋管のN-benzyl-p-toluene sulphonamide添加群と無添加群を対象に、培養細胞ペーシングシステムを用いて48時間筋管収縮をさせた後、細胞膜分画を採取し、プロテオミクス解析を実施する。

2. バイオイメージングを用いたPMOの細胞内局在の詳細な検討

2-1. C2C12あるいはH2K-mdx52筋管を対象に、蛍光標識モルフォリノ核酸の細胞質内での局在を、蛍光顕微鏡を用いて明らかにする。

2-2. C2C12あるいはH2K-mdx52筋管を対象に、蛍光標識モルフォリノ核酸の細胞質内での挙動をtime-lapse microscopyにより解析する。

2-3. モルフォリノ核酸トランスフェクション後の細胞内局在を、共焦点顕微鏡を用いて検討する。

3. H2K-mdx52筋管の自発収縮がモルフォリノ核酸の細胞内取り込みに与える影響の解析

3-1. H2K-mdx52およびH2K（野生型）筋管を対象に、培養細胞ペーシングシステムを用いて持続的に筋管収縮をさせた状況で、モルフォリノ核酸の筋管への取り込み効率に変化が生じるかどうかを検討する。

3-2. H2K-mdx52筋管を対象に、自発性筋収縮阻害剤であるN-benzyl-p-toluene sulphonamide (BTS) 添加群と無添加群を対象に、培養細胞ペーシングシステムを用いて48時間筋管収縮をさせた後、細胞膜分画を採取し、プロテオミクス解析を実施する。

結果

H2K-mdx52筋管の自発性筋収縮がモルフォリノ核酸の細胞内取り込みに及ぼす影響について、検討を行った。結果は、ミオシンIIの特異的阻害剤であるN-benzyl-p-toluene sulphonamide (BTS)を用いて筋の自発収縮を阻害すると、阻害剤を添加しなかった時と比べて、モルフォリノ核酸をトランスフェクション後のエクソン・スキップ誘導高率が有意に低下した。本結果は、筋管の収縮がモルフォリノ核酸の細胞内取り込みに関与している可能性を示唆していると考えられた。そこで、H2K-mdx52筋管を対象に、

自発性筋収縮阻害剤であるBTS添加群と無添加群を対象に、培養細胞ペーシングシステムを用いて48時間筋管収縮をさせた後、細胞膜分画を採取し、プロテオミクス解析を実施した。この結果、筋収縮と関連するモルフォリノ核酸の細胞内取り込みに、カベオラ関連タンパク質であるカベオリン3に加えて、caveolae associated protein が関与する可能性が判明した[5]。

考察

本研究によりモルフォリノ核酸が筋管および筋線維に取り込まれる機序が明らかになり、安全性が高いモルフォリノ核酸を、標的臓器である骨格筋や心筋に効果的に薬物送達できるシステムの開発につながると考えられる。これにより、DMD に対するモルフォリノ核酸を用いたエクソン 53 スキップの治療効果の向上が出来ると期待される。将来的には、DMD以外の筋ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症を含めた神経筋疾患を対象に、モルフォリノ核酸を用いた治療を広く応用できる様になる。

結論

モルフォリノ核酸が細胞内に取り込まれる分子機序の解明を基に、モルフォリノ核酸の最適な薬物送達法を開発した。さらにDMDの骨格筋および心筋障害の治療可能性を示した。

参考文献

1. Aoki Y, Yokota T, Nagata T, et al., Bodywide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. ***Proc Natl Acad Sci USA***. 2012, 109:13763-8.
2. Aoki Y, Nakamura A, Yokota T, et al., In-frame Dystrophin Following Exon 51-Skipping Improves Muscle Pathology and Function in the Exon 52-Deficient mdx Mouse. ***Mol Ther.*** 2010, 18:1995-2005.
3. Aoki Y, Nagata T, Yokota T, et al., Highly Efficient in vivo delivery of PMO into regenerating myotubes and rescue in laminin α2 chain-null congenital muscular dystrophy mice. ***Hum Mol Genet.*** 2013, 22:4914-28
4. Ezzat K, Aoki Y, Koo T, et al., Self-Assembly into Nanoparticles Is Essential for Receptor Mediated Uptake of Therapeutic Antisense Oligonucleotides. ***Nano Lett.*** 2015, 15:4364-73
5. Miyatake S, Mizobe Y, Takizawa H, et al., Exon Skipping Therapy Using Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers in the mdx52 Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. ***Methods Mol Biol.*** 2018, 1687:123-141.

ストレッチ感受性チャネルを標的とした筋変性新規治療薬の開発

岩田　裕子
国立循環器病研究センター研究所

研究協力者
松村　剛　　国立病院機構　刀根山病院
裏出　良博　東京大学アイソトープ総合センター
若林　繁夫　大阪医科大学　薬理学部
北風　政史　国立循環器病研究センター

緒 言

私達は筋ジストロフィー(筋ジス)、心筋症など筋細胞変性疾患全般に有効な治療薬の開発を目指している。そのため筋変性疾患に共通のリスクファクターを見つけることは重要な課題である。筋ジスにおける筋細胞内は恒常的に Ca^{2+}が上昇した状態にあり、その要因の１つとして TRPV2 を介する Ca^{2+}流入が重要であることをモデル動物を用いて明らかにしてきた(1-3)。チャネル機能を持たない TRPV2 の変異体を過剰発現することにより筋変性病態で観察される内在性の TRPV2 チャネルの活性化を抑制する(2)、あるいはアミノ末端ドメイン（N 末ドメイン）を過剰発現することにより内在性 TRPV2 の形質膜濃縮を抑制する(3)、それらの結果として筋ジス、心筋症が改善されることを報告してきた。しかしながら利用できる TRPV2 特異的阻害剤がないのが現状であり、ヒト筋変性疾患治療のためには TRPV2 阻害薬の開発が必須である。今回の研究では、以下のことを行った。①TRPV2 阻害剤をスクリーニングする方法を見いだし、それを用いた TRPV2 阻害化合物の同定と心筋症モデル動物に対する改善効果の検討を行った。②TRPV2 阻害作用を有する市販薬トラニラストによる筋ジストロフィー心筋障害患者 2 名を対象としたパイロット試験を実施した。③筋ジス心筋変性モデル動物の開発と TRPV2 阻害の効果の検討を行った。④新規作成した TRPV2 阻害抗体のエピトープの同定及び阻害抗体の安全性と病態治療効果の検討を行った。

方 法

阻害薬の開発

TRPV2 発現 HEK293 細胞を用いて TRPV2 アクチベーター(2-APB)刺激時の条件検討を行い阻害剤スクリーニングに適した活性化法を検討した(4)。
TRPV2 に対する阻害モノクローナル抗体は TRPV2 発現 HEK293 細胞を自己免疫疾患マウスに免疫することにより作成した。抗体のエピトープは TRPV2 の細胞外ドメインペプチドを用いたドットブロットにより同定した(5)。

動物実験関連

ジストロフィン複合体構成因子の１つ、デルタサルコグリカン欠損の心筋症ハムスター(J2N-k)とコントロールハムスター（J2N-n）、糖鎖異常の心筋症マウス(4C30)、5-6 か月齢のジストロフィン欠損マウス（*mdx*）マウスに甲状腺ホルモンの Triiodothyronin（T3）を 2 mg/kg/day 3 週間投与して作成した心筋変性マウスモデル、及びコントロールとして正常マウスを用いて TRPV2 阻害剤及び阻害抗体の安全性と病態改善効果を検討した。阻害抗体は週 1 回で腹腔内投与（0.25-2 mg/kg）し 2 週間後、安全試験では 8 週間後非投与群と比較検討した。血圧を血圧計、、心収縮能、心機能を心超音波･心電図により測定した。生化学的指標として血清 CK 活性、心不全マーカー（ANP, BNP）、心筋傷害マーカー（心筋トロポニン I（cTnI））の血清中含量を測定した。摘出心筋の形態的評価・線維化評価は切片のヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、マッソントリクローム（MT）染色像より解析した。心筋細胞の微細構造の解析は電子顕微鏡により行った。分子生物学的手法を用いて DNA アレイ及びその解析を行った。ヒト及び動物抹消血より単核球分画を調製し、単核球における TRPV2 の局在を共焦点顕微鏡により解析した。動物実験及びヒト検体を用いる実験は国立循環器病研究センターの指針に基づき規定に従い承認を受け行った。

結果

1）TRPV2 阻害剤スクリーニング法の開発と阻害剤による心筋症、重症心不全モデル動物治療

マウス TRPV2 発現細胞を用いて新規 TRPV2 活性化法を見出しそれを利用して阻害剤のスクリーニングを実施し TRPV2 阻害作用をもつものとしてトラニラスト及びトラニラストより低濃度で阻害活性を持つ阻害化合物の同定とそれらの心筋症モデル動物に対する改善効果を報告した(3, 4)。TRPV2 阻害化合物は心筋症ハムスター(J2N-k)心機能を改善した。4C30 マウスは 28 週令で約半分が拡張型心筋症、重症心不全で死に至るが、その 2 週間前にトラニラストを投与することにより、心機能の悪化の防止と延命効果が認められた。トラニラストとベータブロッカーとの併用によってさらに効果が上昇することが判明した。

2) TRPV2 阻害作用を有する市販薬トラニラストの筋ジストロフィー心筋障害患者に対する効果

上記のように心筋症動物を用いた実験より、抗アレルギー薬トラニラストが TRPV2 阻害作用を有し、心機能の改善に有効であることが認められた(3)。筋ジス併発心筋障害患者 2 例でのトラニラスト内服による 1 から 3 か月後の効果を調べるパイロット試験の結果を報告した（6）。その後、1 年以上にわたるトラニラスト服用後の結果を調べたところ、心不全マーカーである血漿中 BNP 値は低値を維持した。さらに心エコー検査による心機能の改善が 2 例とも観察された（1 例は Fractional Shortening（FS）が 4 から 9%、もう 1 例は 6 から 11%にそれぞれ上昇した）(7)。

3) T3 誘導性心筋変性マウスモデルを用いた TRPV2 阻害による心筋変性治療効果の検討

mdx に甲状腺ホルモン（T3）を 3 週間連続投与することにより、心拍数増加に伴う心筋変性が誘発され、心機能低下と著しい血漿中心筋トロポニン I（cTnI）濃度の増加が認められた。*mdx* における T3 誘導性心筋では TRPV2 の心筋細胞形質膜発現の増加が認められ、TRPV2 阻害薬投与により心筋及び単核球表面の TRPV2 発現の減少と心筋変性が抑制された。また約半分の *mdx* マウスが T3 投与 2 週後に心機能悪化により死亡したが TRPV2 阻害により死亡率が減少した。筋ジス心筋障害のよいモデルとなること、TRPV2 阻害により改善されることが明らかになった。

4) TRPV2 阻害抗体作製とエピトープ決定、心筋症・心不全に対する効果の検討

TRPV2 特異的阻害の筋変性に対する有効性を実証するため、細胞外からチャネルを阻害できるモノクローナル抗体を作成した。抗体が認識するエピトープを同定し、チャネルの結晶構造解析の結果を基にその局在を確定した(5)。エピトープは細胞外ループ 3 番目のチャネルポア付近（Large pore turret）にあり、その部位はポアの開閉に密接に関与する部位であることが判明した。また TRPV2 特異的阻害抗体は細胞形質膜 TRPV2 を内在化すること、拡張型心筋症心筋細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度異常を是正すること、4C30 マウス、J2N-k ハムスター、上記 T3 誘導性心筋変性マウスモデルの心機能低下を改善することが判明した。作製した抗体はげっ歯類 TRPV2 特異的でイヌ及びヒト TRPV2 に対する反応は認められなかった。

考察

見出した阻害剤スクリーニング法及びトラニラストをはじめとする TRPV2 阻害作用を有する既存薬の実用化、新たな TRPV2 阻害薬の開発を進めていく予定である。トラニラストの作用機序の解析及び現在実施中の先進医療 B による「筋ジストロフィー心筋障害に対する TRPV2 阻害薬の多施設共同非盲検単群試験」をさらに進めていく予定である。また T3 誘導性 *mdx* 心筋変性モデルはヒト筋ジス併発心筋障害に類似しており、TRPV2 の細胞形質膜発現が亢進していること、TRPV2 阻害により心筋変性が軽減でき延命効果があることが明らかになり、筋ジス心筋障害における TRPV2 の関与が再確認できた。今回明らかになったマウス TRPV2 に対する機能性抗体のエピトープを利用して心筋症・心不全治療を目指したヒト TRPV2 に対する機能性抗体作製に繋げていく予定である。

結論

筋ジストロフィー、心筋症・心不全の治療標的として TRPV2 は有望である。

参考文献

1) Iwata Y., Katanosaka Y., Arai Y. et al.: A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca^{2+}-permeable growth factor-regulated channel. *J Cell Biol.* 161:957-67, 2003

2) Iwata Y., Katanosaka Y., Arai Y. et al.: Dominant-negative inhibition of Ca^{2+}influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models. *Hum Mol Gen.* 18:824-34, 2009

3) Iwata Y., Ohtake H., Suzuki O. et al.: Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 99:760-8, 2013

4) Iwata Y., Katayama Y., Okuno Y. et al.: Novel inhibitor candidates of TRPV2 prevent damage of dystrophic myocytes and ameliorate against dilated cardiomyopathy in a hamster model. *Oncotarget* 9:14042-57, 2018

5) Iwata Y., Wakabayashi S., Ito S., et al.:Production of TRPV2-targeting functional antibody ameliorating dilated cardiomyopathy and muscular dystrophy in animal models. *Lab Invest* 100 324-337, 2020

6) Matsumura T., Matsui M., Iwata Y. et al.: A pilot study of tranilast for cardiomyopathy of muscular dystrophy. *Intern Med* 57:311-8, 2018

7) Iwata Y., Matsumura T.: Blockade of TRPV2 is a novel therapy for cardiomyopathy in muscular dystrophy. *Int J Mol Sci* 20:E3844, 2019

筋ジストロフィー治療のための間葉系前駆細胞制御法開発

上住聡芳
東京都健康長寿医療センター研究所

緒言

筋ジストロフィーでは、骨格筋の脂肪化・線維化が起こる。脂肪化・線維化はそれ自体が筋力・筋機能低下の要因となるだけでなく、他の治療法（細胞移植治療や遺伝子治療）の効率を低下させることにもつながり問題となる。骨格筋の脂肪化・線維化の原因は長らく不明であったが、分担研究者らは筋間質に存在し筋衛星細胞とは異なる間葉系前駆細胞の同定に成功し、この細胞が脂肪化・線維化の起源となることを世界で初めて明らかにした[1, 2]。間葉系前駆細胞は病態に寄与するだけでなく、再生過程では筋衛星細胞を支持するニッチ細胞として機能し、筋再生を促進することも明らかとなってきている[3]。このことから、脂肪化・線維化の抑制を目的とする場合、単に間葉系前駆細胞の死滅を図るだけでは、筋再生をも抑制する事態を招きかねない。よって、真に効率的な筋ジストロフィーの治療には間葉系前駆細胞の二面性を理解し、制御することが必要になる。本研究では、脂肪化・線維化の原因となる間葉系前駆細胞を制御する手法の開発に取り組む。脂肪化・線維化の責任細胞に焦点を当て、研究開発を行うことで、これまで不可能であった脂肪化・線維化を抑制する画期的治療が可能になると期待される。また、間葉系前駆細胞による筋衛星細胞支持機能を明らかにできれば、筋再生促進療法へ発展することも期待できる。さらに、原因遺伝子の発現回復を図る他の根本的治療法の治療効果を向上させることにもつながるため、本研究は筋ジストロフィー治療の実現に向け、欠くことのできない有益な成果をもたらすと考えられる。

方法

本研究では、間葉系前駆細胞を制御することで脂肪化・線維化を抑制し、筋再生を促進する筋ジストロフィーの治療法開発を目指す。間葉系前駆細胞の病態に寄与する側面と再生を促進する側面の、それぞれに特徴的に発現する遺伝子を同定する。それらの遺伝子の機能的な解析を行い、その機能に基づいた間葉系前駆細胞の制御法開発を行う。

結果

間葉系前駆細胞の再生を促進する特性に関連する遺伝子としてレチノイン酸シグナル制御因子を同定した。レチノイン酸シグナルは間葉系前駆細胞の病的表現型を抑制し、再生促進特性を付与する重要なシグナル経路であることを明らかにした。さらに、ヒト間葉系前駆細胞を用いた薬剤探索システムにより、間葉系前駆細胞に効率的に作用する作動薬を同定した。その作動薬を重篤なDMDモデルマウスであるD2-mdxに投与した結果、筋病理像が劇的に改善された。作動薬投与D2-mdxでは、異所性脂肪の形成、線維化が顕著に抑制された。また、作動薬投与により筋再生が促進される傾向にあった。作動薬の投与量を調整することで体重の低下を防ぐことはできたが、治療効果は低減した。

考察

作動薬投与により、脂肪化・線維化が抑制されるだけでなく、筋再生が促進されたことから、作動薬によるレチノイン酸シグナルの刺激は間葉系前駆細胞の二面性をコントロールすることで治療効果を発揮したと考えられる。筋再生促進効果は細胞移植治療やエクソンスキップなどの他の治療法の効率を改善させると考えられ、併用治療への応用の期待が持てる。

結論

レチノイン酸シグナルの刺激は間葉系前駆細胞の二面性制御機構に作用し、脂肪化・線維化を抑制するとともに筋再生を促進し、筋ジストロフィーの治療に有効と考えられた。

参考文献

1) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N et al., Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. Nat Cell Biol 12(2):143-52. 2010.

2) Uezumi A, Ito T, Morikawa D et al., Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. J Cell Sci 124(Pt 21):3654-64. 2011.

3) Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. Front Physiol 5: 68. 2014.

筋ジストロフィーに対するES細胞由来再生医療等製品の開発

梅澤明弘
国立研究開発法人国立成育医療研究センター

緒言

筋ジストロフィーは筋線維の変成・壊死を主病変とし、進行性の筋力低下の遺伝子性疾患であり、病因はジストロフィンの形成不全である。 Duchenne 型筋ジストロフィーの薬物療法として最近ステロイドホルモンが使用されているが、症状の進行を遅らす程度の効果しか得られず、対症療法が中心である。そこで我々は筋ジストロフィーの新たな治療法として『細胞移植』に着目しその有効性・安全性のバリデーションシステムの構築を念頭に研究を実施した。本研究では現在までの基礎研究成果をさらに応用・発展させ、筋ジストロフィーに対する ES 細胞由来再生医療等製品の開発を行った。本年度は特に、細胞加工施設において管理文書、製造手順書、記録の整備、プロセスバリデーション等のドライランを行い、ES 細胞由来再生医療等製品の製造体制の見直しを図った。

方法

1．ES 細胞由来再生医療等製品の調整を行うにあたり、個々のヒト細胞において発現している遺伝子を網羅的に解析する。ES 細胞由来再生医療等製品の分化形質発現システムを通じた情報収集を行う。また、新たな細胞リソースとして、ES 細胞由来分化細胞について、再生医療等製品としての可能性を模索していく。特に、細胞加工施設において管理文書、製造手順書、記録の整備、プロセスバリデーション等のドライランを行い、ES 細胞由来再生医療等製品の製造体制のレビュー体制を構築する。

2．ヒト ES 細胞由来再生医療等製品の分化能検定システムについては、細胞培養系での分化誘導法の決定と免疫不全動物への移植による生着、機能発揮、組織構築能に関する検討した。本年度は特に ES 細胞由来分化細胞を用いた増殖能および分化能に関する検討を行っていく。ES 細胞から分化誘導した間葉系幹細胞を用いて、筋細胞疾患への新たな治療法の検討を行った。

＜倫理面への配慮＞

1. ES 細胞に関する倫理

国立成育医療研究センターでは「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づきヒト ES 細胞に関する医学研究が適性に行われるよう、ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会が組織されている。ヒト ES 細胞研究に関する各種規程（「ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会規程」、「ヒト ES 細胞樹立に関する規程」、「ヒト ES 細胞分配に関する規程」、「ヒト ES 細胞使用に関する規程」）も整備され、機関全体として生命倫理及び医の倫理に基づき適切に行う（国立成育医療センターヒト ES 細胞研究倫理審査委員会：http://www.ncchd.go.jp/essaibou/es.htm）。

承認番号： 国立成育医療センター研究所（機関内番号 ES 倫 2）文部科学大臣確認番号:18 諸文科振第 832 号

2. iPS 細胞を含めたヒト細胞を用いることに対する倫理的配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている。

3. 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号 2003-002,2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

結果

ES 細胞から分化させた 4 ロットの細胞を準備し、各々の増殖能を解析した。細胞表面マーカーによる特性解析を行ったところ、CD90, CD105 陽性であったことから間葉系幹細胞であることが示唆された。染色体核型は、正常であった。また継代数が 1, 6, 11 の細胞を用意し Gene chip 解析を行ったところ、継代数やロットに依存せず安定した発現パターンを示した。次に骨格筋細胞への分化誘導を試みた。その結果、線維芽細胞様形態を示し、骨格筋細胞の特徴である多核体を認め、骨格筋分化能を有することが示唆された。ES 細胞が不死であることで原料を無制限に提供できることから、ES 細胞由来間葉系幹細胞が筋ジストロフィーの再生医療製剤となる可能性が考えられた。ヒト ES 細胞の取り扱いに関するバリデーションシステムを確立した。特に、高度な清浄性を維持した細胞加工施設のなかで ES 細胞から再生医療等製品を製造する際のプロセスバリデーションに注力した。細胞治療の安全性、有効性の基準の確立に向けた基盤研究を実施した。具体的には、形態観察、増殖性、奇形腫形成、in vitro での三胚葉への分化、染色体検査、RNA シークエンス、エクソーム解析およびエピゲノム解析を行い、細胞治療の原材料となる細胞の安全性にかかる特性解析項目について検討した。

考察

再生医療において使用する細胞は、移植に必要な充分な量の細胞数の獲得と細胞移植後 in vivo での生存率の低下の限界がある。そのためこれらの細胞の分化能を研究する際、必要な細胞数を得ることや、再現性の確認が重要な課題であった。近年、多能性幹細胞を用いた骨格筋の再生が注目されており、細胞源として ES 細胞、iPS 細胞などがあげられている。我が国において、再生医療に関するガイドライン、指針が相次いで成立、施行されており（再生医療等安全性確保法、再生医療推進法、医薬品医療機器等法)、当該研究の特色としては、高い安全性を有した施設でヒト細胞の分化能を有する状態を保つ培養条件、方法などを確立することにある。最適な培養条件を模索することにより、従来、困難であった安全で質の高い細胞治療に必要な細胞の確保が可能になる。

結論

本研究において、ES 細胞由来再生医療等製品を筋ジストロフィー治療に用いることに関するバリデーションシステムを確立し、細胞治療の安全性、有効性に対する前臨床研究の精度向上が期待出来る。高い安全性を有し、標準化された培養システムによって培養を行うことで、ヒト細胞を用いた細胞治療に関する倫理性および安全性の due process を提示することになる。これらのプロセスの明確化は、筋ジストロフィーの細胞治療の臨床研究を行う上で大きな礎となる。

参考文献

Sung TC, Li HF, Higuchi A, Kumar SS, Ling QD, Wu YW, Burnouf T, Nasu M, Umezawa A, Lee KF, Wang HC, Chang Y, Hsu ST. Effect of cell culture biomaterials for completely xeno-free generation of human induced pluripotent stem cells. Biomaterials. 2019 :119638.

Chen LH, Sung TC, Lee HH, Higuchi A, Su HC, Lin KJ, Huang YR, Ling QD, Kumar SS, Alarfaj AA, Munusamy MA, Nasu M, Chen DC, Hsu ST, Chang Y, Lee KF, Wang HC, Umezawa A. Xeno-free and feeder-free culture and differentiation of human embryonic stem cells on recombinant vitronectin-grafted hydrogels. Biomater Sci. 2019 ;7(10):4345-4362.

分担研究課題名

筋ジストロフィーの進行軽減療法の開発

－造血器型プロスタグランジン D 合成酵素をターゲットとした筋ジストロフィーの２次炎症軽減療法の開発－

裏出良博

東京大学アイソトープ総合センター

緒言

我々は、①現在も治療法の無い難病であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の筋変性領域に、炎症物質であるプロスタグランジン（PG）D2 の産生を行う造血器型 PGD2 合成酵素（hematopoietic PGD2 synthase、HPGDS）が発現することを見出し（１）、②DMD 患者の尿中 PGD2 代謝物を測定して、筋萎縮の進行が亢進する 4 歳から 10 歳にかけて、患者の体内での PGD2 産生が上昇することを証明し（２）、③様々な HPGDS 阻害剤（HQL79、TFC007、TAS204、TAS205）を開発して、それらを DMD モデル動物（*mdx* マウス、筋ジス犬）に投与すると、筋壊死と運動機能低下が顕著に抑制されることを証明した（３，４）。そして、④最新の HPGDS 阻害薬 TAS205 の国内の DMD 患者を対象とした第 1 相臨床安全性試験（５）と探索的第 2 相臨床試験が終了した。

DMD の急激な筋萎縮に HPGDS による PGD2 産生が関係するという我々の研究成果は、PGD2 産生の上流や下流にも筋萎縮抑制の標的が存在することを示す。そこで、①2 種類の PGD2 受容体（Gs 蛋白質共役型 DP 受容体と Gi 蛋白質共役型 CRTH2 受容体）に対する拮抗薬、及び、②PGD2 産生と連動する炎症性サイトカインの情報伝達を遮断するＩκＢキナーゼ阻害薬を、DMD モデルマウスに投与して、これらの薬剤による骨格筋の障害抑制効果を検討した。さらに、③DMD 患者の主な死因である心筋障害に対する保護作用を調べるため、高週齢 mdx マウスの甲状腺ホルモン負荷心筋障害モデルを用いて、HPGDS 阻害薬、DP 受容体拮抗薬、CRTH2 受容体拮抗薬の心筋障害保護効果を調べた。

方法

mdx マウスへの HPGDS 阻害薬、DP 受容体拮抗薬、CRTH2 受容体拮抗薬、IkB キナーゼ阻害薬投与による骨格筋障害の抑制効果の測定

雄 *mdx* マウス（C57BL/6 系統）に生後 4 週齢から 8 週齢までの 4 週間、溶媒（7%DMSO を含む生理食塩水、10 ml/kg）、HPGDS 阻害薬（TFC-007、30 mg/kg/day）、DP 受容体拮抗薬（ONO－AE6-265、1.0 mg/kg/day）、CRTH2 受容体拮抗薬（OC000459、1.0 mg/kg/day）を 1 日 1 回皮下投与し、IkB キナーゼ阻害薬 IMD2560 は 3％含有混餌の投与を行なった。

骨格筋変性の指標として、薬物投与終了時にイソフルラン麻酔下に採血した血清を用いて、骨格筋からの逸脱酵素であるクレアチン・キナーゼの酵素活性を測定した。

高週齢 *mdx* マウスの甲状腺ホルモン負荷心筋障害モデルにおける HPGDS 阻害薬、DP 受容体拮抗薬、CRTH2 受容体拮抗薬による心筋障害の抑制効果の測定

生後８ヶ月齢の雄 *mdx* マウスに、甲状腺ホルモン T3（2 mg/ml）を 1 週間飲水投与して T3 負荷心筋障害モデルを作成した。T3 投与と同時に、溶媒（7%DMSO を含む生理食塩水、10 ml/kg）、HPGDS 阻害薬 TFC007（30 mg/kg/day）、CRTH2 受容体拮抗薬 Cay10471（3.0 mg/kg/day）、あるいは、DP 受容体拮抗薬 ONO-AE6-265（1.0 mg/kg/day）を毎日 1 回、皮下投与した。

心筋変性の指標として、薬物投与終了時にイソフルラン麻酔下に採血した血清を用いて、心筋からの逸脱蛋白質である心筋トロポニン I 量を ELISA により測定した。

結果

mdx マウスの骨格筋障害に対する HPGDS 阻害薬、DP 受容体拮抗薬、CRTH2 受容体拮抗薬、IkB キナーゼ阻害薬の効果

骨格筋障害マーカーである血清クレアチニン・キナーゼ活性は、溶媒投与コントロール群（8,326±1,613

unit/l, n = 11) に比べ、HPGDS 阻害薬 TFC-007 (30 mg/kg/day) 投与群は 5,181±1,025 (n = 8) であり、統計学的に有為な低下を示さなかった (p=0.08)。DP 受容体拮抗薬 ONO-AE6-265 (1.0 mg/kg/day) 投与群は 7,277±1,325 (n = 8) であり、統計学的に有為な低下を示さなかった (p=0.21)。

一方、CRTH2 受容体拮抗薬 OC000459 (1.0 mg/kg/day) の投与群は 4,364±529 (n = 8、p=0.03)、IkB キナーゼ阻害薬 IMD2560 (3%含有混餌) の投与群は 3,259±537 (n = 7、p=0.01) であり、共に、統計学的に有為な低下を示した。

高週齢 *mdx* マウスの甲状腺ホルモン負荷心筋障害モデルにおける HPGDS 阻害薬、DP 受容体拮抗薬、CRTH2 受容体拮抗薬による心筋障害の抑制効果

心筋障害マーカーである心筋トロポニン I の血清中濃度は、溶媒投与コントロール群 (9.9±5.4, n = 8) に比べ、HPGDS 阻害薬 TFC007 (30 mg/kg/day) 投与群では 3.3±1.5 ng/ml (n = 7、p=0.008)、CRTH2 受容体拮抗薬 Cay10471 (3.0 mg/kg/day) 投与群では 2.8±3.0 (n = 7、p=0.009)、 DP 受容体拮抗薬 ONO-AE6-265 (1.0 mg/kg/day) 投与群では 2.8±2.5 (n = 7、p=0.007) であり、共に、統計学的に有為に抑制した。

結論

①CRTH2 受容体拮抗薬は HPGDS 阻害薬より低用量で DMD の骨格筋障害を抑制する。

②DP 受容体拮抗薬は DMD の骨格筋障害を抑制しない。

③IkB キナーゼ阻害薬も HPGDS 阻害薬と同等、あるいは、より低用量で DMD の骨格筋障害を抑制する。

④HPGDS 阻害薬は、T3 負荷心筋障害モデルにおいて、DMD の心筋障害を抑制する。

⑤CRTH2 受容体拮抗薬は、HPGDS 阻害薬より低用量で、DMD の T3 負荷心筋障害を抑制する。

⑥DP 受容体拮抗薬は、HPGDS 阻害薬より低用量で、DMD の T3 負荷心筋障害を抑制する。

考察

HPGDS 阻害剤と CRTH2 受容体拮抗薬、IκB キナーゼ阻害薬の併用により、DMD の筋萎縮を大幅に抑制する治療法が開発できる可能性がある。

HPGDS 阻害剤と CRTH2 受容体拮抗薬、DP 受容体拮抗薬を併用することで、DMD の心筋障害を大幅に抑制する治療法が開発できる可能性がある。

参考文献

1. Okinaga T, Mohri I, Fujimura H, Imai K, Ono J, Urade Y, Taniike M. Induction of hematopoietic prostaglandin D synthase in hyalinated necrotic muscle fibers: its implication in grouped necrosis. Acta Neuropathol, 2002, 104:377-384.

2. Nakagawa T et al. A prostaglandin D2 metabolite is elevated in the urine of Duchenne muscular dystrophy patients and increases further from 8 years old. Clin Chim Acta 2013, 23:10-14

3. Mohri I, Aritake K, Taniguchi H, Sato Y, Kamauchi S, Nagata N, Maruyama T, Taniike M, Urade Y. Inhibition of prostaglandin D synthase suppresses muscular necrosis. Am J Pathol, 2009, 174:1735-1744.

4. Urade Y. Proceedings of 67th International Astronautical Congress (IAC) 2016, IAC-16, B.3.3.6.

5. Eri Takeshita E, Hirofumi Komaki H, Yuko Shimizu-Motohashi Y, Akihiko Ishiyama A, Sasaki M, Takeda S. A phase I study of TAS-205 in patients with Duchenne muscular dystrophy. Annals of Clinical and Translational Neurology 2018; 5(11): 1338-1349.

分担研究課題名：DMD に対する遺伝子細胞治療の基盤技術開発

氏　名：岡田尚巳
所　属：東京大学医科学研究所
遺伝子・細胞治療センター
分子遺伝医学分野

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)に対する根治療法は未だ開発段階で薬物治療による対症療法が主であるが、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いた遺伝子治療の開発が期待される。本研究では、*mdx* マウスや筋ジストロフィー犬 CXMD$_J$ に対しマイクロ・ジストロフィン発現 AAV ベクター(AAV-μDys)を用いたマイクロ・ジストロフィン補充療法の開発を進めることを目的とする。AAV を用いた遺伝子治療において、transgene に対する免疫応答が問題となっている。この課題を克服するために、1) 免疫寛容誘導法の検証、2) 治療遺伝子の配列最適化、3) カニクイザルでの検討を行った。

方法

1. 間葉系幹細胞(MSCs)を AAV と併用投与することで免疫寛容誘導が可能かどうかの検討を行った。11 週齢の正常犬と同腹の CXMD$_J$ 1 頭に対し、MSCs を AAV9-Luc もしくは AAV9-μDys と共に経静脈投与した。7 日後に MSCs を再度経静脈投与し、その翌日に AAV9-Luc/AAV9-μDys を経静脈投与することで、免疫寛容を誘導した。上記のイヌについて、病態評価および剖検後サンプルについて免疫組織染色による検討を行った（論文投稿中）。
2. *mdx*/B10 に対し、情動行動解析系を構築し、新生仔に rAAV9-μDys を経静脈投与を行った。処置群について情動行動を解析した。
3. カニクイザルに対して体性幹細胞と AAV8-LacZ を併用投与して免疫寛容を誘導した個体について、筋生検・剖検を行った。
4. カニクイザル成体に DPCs と AAV8-LacZ を併用投与し免疫寛容を誘導した個体 2 頭と、コントロールとして AAV8-LacZ のみを投与した個体 2 頭について、8 週、16 週、24 週、48 週後に筋生検を行い、48 週後の時点で剖検し、主要臓器についてサンプリングを行った。また、同様にカニクイザル成体 1 頭に対し、体性幹細胞と AAV9-LacZ を併用投与し、免疫寛容を誘導した。コントロールとして AAV9-LacZ のみを投与した個体を作成し、AAV8-LacZ 投与個体と同様のタイムスケジュールで筋生検と剖検を行った。病理組織解析にて発現を確認した。

結果

1. AAV-μDys の経静脈投与を行った CXMD$_J$ 1 頭(11805MA)の剖検後の骨格筋と心筋のサンプルについて、免疫染色で確認を行った。前脛骨筋については AAV-μDys 由来のジストロフィンの発現が確認出来た（論文投稿中）。
2. *mdx*/B10 を用いて、短時間拘束後の Freezing を Smart3.0 (Panlab, Harvard Apparatus) を用いて解析し、*mdx* マウスでは既存の報告 [1),2)] と同様に野生型と有意差があることを確認した。さらに AAV-μDys 投与群で Freezing が改善することを証明した（論文投稿準備中）。
3. 臨床用ベクターの規格決定に向けた取り組みとして、これまで検討を行ってきた SPc5-12 [3)] に加え、CK7, 8, 9 プロモーター [4)] を検討した。

考察

1. 正常犬、CXMD$_J$ ともに MSC と AAV の併用投与により transgene の発現が保たれることが示唆された。CXMD$_J$ については、μDys の治療効果が観察された。
2. ヒトにおける発現を最適化した AAV-μDys を作製するための準備が整った。
3. カニクイザルにおいて DPC と AAV を併用することで免疫寛容が誘導された。

結論

CXMD$_J$ に対し MSC と AAV の併用投与により免疫寛容誘導を行った個体については治療効果が示された。また、AAV-μDys の規格について再度筋特異的プロモーターの検討を行い、構築、精製後のベクターについて *in vitro*, *in vivo* における発現を確認する。AAV8-LacZ, AAV9-LacZ 投与に際し免疫寛容を誘導したカニクイザルの剖検終了分のサンプルについて病理学的解析および発現確認などの解析を行う予定である。

参考文献

1) Sekiguchi M., Zushida K., Yoshida M., et al: A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice, *Brain*, 132:124-135, 2009
2) Yamamoto K., Yamada D., Kabuta T., et al: Reduction of abnormal behavioral response to brief restraint by information from other mice in dystrophin-deficient mdx mice, *Neuromuscular Disorders*, 20, 505-511, 2010
3) Li X., Eastman E. M., Schwartz R. J., et al: Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences, *Nature Biotech.*, 17:241-245, 1999
4) Hauser M. A., Robinson A., Hartigan-O'Connor D., et al: Analysis of Muscle Creatine Kinase Regulatory Elements in Recombinant Adenoviral Vectors, *Mol. Ther.*, 2:16-25, 2000

遺伝子医療とピアカウンセラーの役割

貝谷 久宣
一般社団法人　日本筋ジストロフィー協会

研究協力者
矢澤健司[1)]、貝谷嘉洋[1)]、井原千琴[1)]、福江裕子[1)]、松元智美[2)]、川﨑奈緒子[2)]
1) 社団法人 日本筋ジストロフィー協会
2) 医療法人和楽会 心療内科・神経科 赤坂クリニック

＜緒言＞

（社）日本筋ジストロフィー協会は、「一日も早く」をスローガンとして筋ジストロフィーの根治療法の実現を願い活動している。本研究班における我々の主な任務は、遺伝子治療をはじめとする本研究班の成果が実現するための社会的環境を作ることである。

1. 筋ジストロフィーピアカウンセラー養成講座

＜はじめに＞

重要な要素として、遺伝子医療を円滑に進めるために医療や家族計画における不安や悩みを解決する手助けとなり、情報提供や心理的サポートを行うことのできるピアカウンセラーの養成が必要であると考える。

またピアカウンセラー養成講座は、筋ジストロフィーの遺伝子医療に主体的に関わるための基盤整備として必要であると共に、同じ障害をもつ当事者や家族が交流を深める機会を得るきっかけとしても有効であると考える。実際、遺伝子医療に関する意識調査（H23 年度武田班分担研究）では遺伝に関する悩みを誰に相談するかという設問において、ピアカウンセラーという回答が複数認められた。

ピアカウンセラーの活動により、当事者や家族が遺伝子医療に対する理解を深めることが期待される。また、当事者や家族がピアカウンセリングの知識や技術を習得することにより、他の当事者や家族は、有益な情報を得られ、さらには心理的なサポートが得られることで不安感や孤独感が解消できると考えられる。加えて、ピアの精神のもとで、当事者や家族の交流が深まることで、より細やかな意識や要望の聞き取り、そして課題や解決策の具現化につなげていくことも可能となると期待される。

ピアカウンセラー養成講座は、平成 16 年度から毎年開催されている。第 5 回までの参加者数は 100 人以上、第 6 回は 19 人、第 7 回は 29 人、そして第 8 回は 24 人である。平成 24 年度は初めて 1 年間に複数回の開催をしたところ、沖縄、福島、東京の 3 か所で合計 63 人の参加があった。

本年度は 2019 年 10 月 13 日（日）に山口県で開催予定であったが、台風のため延期となった。以下は、今までに行われたピアカウンセラー養成講座の概要（一部抜粋）と、2010 年度以降に実施しているアンケート結果を示す。

＜方法＞

年	開催地	内容
2010	東京	筋ジストロフィーの子どもを持つということ DMD 筋ジストロフィーの最新治療・遺伝の基礎 カウンセリングの心得と演習
2012	沖縄・福島・東京	福祉サービスの受け方 遺伝カウンセリングの基礎 沖縄型筋萎縮症の遺伝形式と形状 福山型筋ジストロフィーの遺伝子治療 遺伝子登録の実際 カウンセリングの心得と演

		習
2014	新潟・三重	私が受けている在宅福祉 福山型医学情報登録について 筋ジストロフィーの遺伝子医学および遺伝カウンセリング カウンセリングの心得と演習
2015	熊本・岐阜	心の健康法 私が受けている在宅福祉 筋ジストロフィーの遺伝子医学および遺伝カウンセリング カウンセリングの心得と演習
2016	東京	筋ジストロフィーの医学 難病患者に対する医療法 ピアカウンセリングのための心理学 電話応対の基礎知識・ロールプレイ
2018	山口	遺伝相談 自立生活について ピアカウンセリングの基礎・ロールプレイ

【対象】

2010年以降、社団法人日本人ジストロフィー協会会員と関係者のうち、受講を希望した患者家族や患者本人合計 228 名（平均年齢 46.7 歳、男性 46%、女性 54%）。参加者のうち、患者本人の参加は全体の 28%であった。

＜結果＞

養成講座終了後に実施したアンケート(2010年以降)の結果を示す。

患者家族の方々の養成講座参加のきっかけは、「カウンセリングに興味があった」、「家族が不安定になった時に、助けになるのではないかと思った」、「同じ悩みを持つ人の支えになりたい」というものがあり、患者家族以外の関係者の中にも「話を聞くことが好きで、自分の勉強になる」、「筋ジストロフィーの児童と関わることがある」というピアカウンセリングへの動機づけの高い方が多かった。また、「以前受講してとても良かった」という意見もあり、繰り返して受講してくれる方もいることが分かった。

それぞれの講演に関しての理解度は、「とてもよく分かった」41%、「よく分かった」39%、「なんとなく分かった」15%、「よく分からなかった」3%と理解度は概ね高かったが、遺伝カウンセリングの講演では専門的な話が入っていたため、理解するのが難しく感じられた可能性があった。しかし、遺伝相談のメリット・デメリットや、近くの相談実施施設がまとめられていた点などから、今回の情報を活用できそうだと感じた方が多かった。また、自立生活についての講演では、自立生活をする上での心構えの部分や、日々受けている支援やサポート、便利なツール等、実際の経験から得られた情報が共有された。日常の細かい困りごとや工夫点等も聞けたことから、参加者には非常に好評であった。

カウンセリングの演習では、参加者がグループに分かれて順番に「話し手」、「聞き手」、「観察者」という役割を経験し、実際に話を聞く時の心構えや技術などを実践した。演習中は、話を聞くことの難しさを感じた方々も多かったようだが、今回学んだことをカウンセリング以外の日常会話の場でも活かしたいという感想を多くいただいた。

ピアカウンセラー養成講座全体の満足度としては、「とても満足」64%、「やや満足」27%、「どちらでもない」5%、「あまり満足していない」1%という結果となった。改善すべき点はまだあると感じるが、養成講座自体が、患者家族で話す機会になったということも満足度を高める要因になったと思われる。

＜考察＞

平成 16 年から開始されたピアカウンセラ

一養成講座は、2018 年で 20 回目を終了したが、参加の動機づけは非常に高く、その活用の場や相手も広く、家族以外の他者にも向けられてきた。アンケートの結果から満足度は高いことが示されたが、「自分自身の不安やストレスにどう対処したらいいかも教えて欲しかった」などの意見もあり、患者本人や家族のストレスマネジメントなどにも焦点を当てた情報提供の必要性を感じられた。また、治療や福祉的サポートについても、より情報を得たいと希望している声がみられ、全般的な情報提供・交流の場として活用していくことも考えられる。ニーズに沿った情報を提供できるよう、内容を改善しながら今後もこのような取り組みを続けていきたい。

2. 筋ジストロフィー協会講演会

＜はじめに＞

筋ジストロフィーの遺伝子治療が、特定の病型、病変において開始されはじめた。今後、様々な病型においても適用されると予想される。

その様な中、治験や遺伝子情報の提供など、治療法確立に向けて患者の協力が重要となってきた。

そこでこの度、患者家族会の一般社団法人日本筋ジストロフィー協会の東京支部の呼びかけで、「一般社団法人日本筋ジストロフィー協会講演会」と題して、筋ジストロフィーの当事者、家族を対象にして勉強会を行い、様々な病型についての正確な知識を学び、各病型の患者さんの経験や考え方について情報を共有した。

＜方法＞

【期間】

2020 年 2 月 2 日（日）東京都千代田区（JA 共済ビルカンファレンスホール）

【対象】

講演会に参加した一般社団法人日本筋ジストロフィー協会会員と家族、関係者の 22 家族計 36 名。

講演内容は、前半は「筋ジストロフィーの治験を前にして家族が知っておくべきこと（貝谷久宣）」、後半は「～家族のレジリエンス（立ち直る力）を高めるために～マインドフルネスで感情を整え、癒す（東京大学医学系研究科グローバルナーシングリサーチセンター特任助教　戸部浩美）」、さらに討論・意見交換の時間を設けた。

＜結果＞

前半の講演では筋ジストロフィーの新しい治療法や治験の説明、ウェアラブル機器を利用した臨床治験研究モデルや新薬が市販されるまでのプロセスを紹介した。治験は現在目白押しであること、筋ジストロフィー薬は承認の際に他の薬剤よりは早く審査してもらえること、治験の実施は患者団体からの要求が大切であることなどを紹介した。

後半の講演では、身近な人との関わり、そこから来る困難や強いストレスに振り回されないよう、「しなやかに生きる力＝レジリエンス」を身につけ方について説明した。また、感情マネジメント法として、怒りのコントロール方法（怒りの客観視、見方・考え方を変えるなど）、今ここを大切にする・呼吸に意識を向けるといったマインドフルネスも紹介した。参加者でペアになり、天使のささやき・悪魔のささやきの練習も実施した。「ゆっくり進んでいけばいい」「そんなに頑張らなくて大丈夫」「弱さがあるから人の痛みがわかる」などの考えを見つけ、認知の変容方法を学んでいただく機会となった。

最後に、討論・意見交換会では、参加者の方が様々な立場から体験談や意見を積極的に交換することができ、大変貴重な機会となった。

特に治療法への質問が多く、「新薬（ビルトラルセン）がいつ発売となるか」が患者や家族にとっての最大の関心事であることが分かった。他のエクソン・スキッピングについての質問も多く、新しい治療方法を期待している様子も見受けられた。

筋ジストロフィーの治験に対しては、患者の負担が少しでも軽くなるよう求める声が聞かれた。

患者家族からは、障がい者を抱える患者家族のメンタルヘルスケアが課題であるという声が多く、戸部浩美先生による家族のメンタルケアに関するお話に興味を持ち、今後の生活の参考にされた方が多いようであった。

＜考察＞

一般社団法人日本筋ジストロフィー協会の標語「1日も早く」は、早期の根本治療を目指すことを意味しているので、その東京支部においても患者当事者、家族の治療法研究に対する期待も大きく、基本的には先端の遺伝子治療には協力的である。

しかし、遺伝子治療に関する倫理観、実際の治療の際の患者の負担（痛み、ストレス、時間）、副作用の可能性についての不安は、病気の種類や病型によって不安があるだけでなく、患者の個人的な思い、年齢、立場などによっても大きなばらつきがあることは、確かのようである。また、患者とそれを取り巻く親族においても、遺伝子治療に対する捕らえ方が違うことも伺える。さらにこれらの遺伝子治療や遺伝に対する思いは、各個人において確固としたものがあるわけではなく、時の経過や立場の変遷を通じて揺れ動くものであることも、忘れてはならない。

したがって今回のように、単に専門の医師から最新の情報を得るだけではなく、よく似た病変や症状の当事者やその家族が集まり、生活の様子について情報を共有する事は、各個人が遺伝子治療に対してどのように向き合っていけばいいのか考えるきっかけとなり、また治験や遺伝子診断も含めて患者が何らかの意思決定をする際の、考慮に入れる材料になる可能性もあるので、非常に有意義であったと考える。（考察は貝谷嘉洋の記述による）。

＜結論＞

当事者、家族全体としては根本治療に期待を寄せている事は間違いなく、またその治療に最も近いのが遺伝子治療であるという認識があるのは確かであり、その分野での研究者の成果に期待は非常に強い。

今回、筋ジストロフィー治療法の開発に関連し、治験実態や必要性を患者当事者や家族に伝えたことで、今後の研究活動に結び付き、新たな成果がでることを期待したい。

＜参考文献＞

なし

iPS 細胞由来骨格筋幹細胞を用いた細胞移植治療法の開発

分担研究者　櫻井　英俊
京都大学 iPS 細胞研究所　臨床応用研究部門

【緒　言】

DMD への治療法として、エクソン・スキッピングはいくつかの製剤で治験が進行し、臨床応用が最も期待されている治療分野である。しかしながらその適応は、特定の遺伝子変異を持った DMD 患者に限られるため、変異部位に限定されない新規治療法の開発が切望されている。

骨格筋幹細胞であるサテライト細胞を用いた細胞移植治療法は、モデルマウスでは治療効果を発揮している。しかしながらヒトでは治療に十分な量のサテライト細胞を得ることは困難である。そこで iPS 細胞から骨格筋幹細胞を分化誘導し、これを移植細胞のソースとすることで、再生医療製剤の開発も可能であると期待されている。我々は再生医療用 iPS 細胞ストックから骨格筋幹細胞を分化誘導し、効率よく安全な方法で移植治療可能な培養法・移植法を確立することを目指す。

【方　法】

前年度までに我々が作製した Myf5-tdTomato ノックイン・ヒト iPS 細胞を用いて、骨格筋幹細胞を分化誘導、純化し、細胞移植時の骨格筋再生能を評価する。Myf5-tdTomato ノックイン・ヒト iPS 細胞からの Myf5 陽性細胞分化誘導、Myf5 陽性細胞の FACS による純化と、再培養実験。細胞外マトリックスや成長因子・阻害剤の添加、低酸素培養の実施によって、Myf5 陽性率の変化や Pax7・MyoD 陽性率の検証、再培養後の DMD モデルマウスへの移植を行い、有効性と安全性を検証する。

【結　果】

分化誘導法のプロトコール化を進め、iMatrix-511 と StemFit AK02N を用いたフィーダーフリー維持培養系からの分化誘導プロトコールを確立した。そこから得られた Myf5 陽性・骨格筋系譜幹細胞を分離し、約 50%がサテライト細胞マーカーである Pax7 を発現していることが明らかとなった。また大阪大学タンパク質研究所の関口教授との共同研究により、ヘパラン硫酸鎖結合型のラミニン 421E8 フラグメントの使用により、Myf5 陽性細胞の出現率を 4 倍程度上昇させることに成功した。

免疫不全 DMD モデルマウス[1]への移植実験では、移植後 12 週までのジストロフィン陽性筋線維の存在を確認し、移植後 8 週までの Pax7 陽性サテライト細胞、MyoD 陽性筋芽細胞としての筋再生への寄与を確認した。ジストロフィン陽性率は、移植後 4 週で約 4%であった。

移植後の筋収縮力の改善効果の検証では、移植後 4 週で易疲労性の改善を認め、移植後 6 週で非移植側と比較し、統計学的に有意な筋張力の改善を確認した。これは現在報告されている細胞移植治療研究の報告でも見られていないデータであり、我々の細胞移植治療法の有効性を示すものである。一方、3 例中 1 例で移植 12 週後に腫瘍の形成を認めた。腫瘍細胞の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、Oct3/4 の発現が極めて高いという事が明らかとなった。そこでレトロウイルスベクターの再活性化を疑い、PCR にてベクター由来遺伝子の発現を定量したところ、移植する前の細胞では発現していなかったのに対し、形成された腫瘍ではレトロウイルスベクター由来の Oct3/4 の発現が極めて高く上昇していることが分かった。

【考　察】

本年度は主に Myf5-tdTomato ノックイン iPS 細胞を用いた検討を行い、移植により統計学的有意に移植後の筋張力が改善することを明らか

にした。これまで組織学的にジストロフィン陽性線維の出現を持って治療効果を述べた論文がほとんどであったが、我々のデータは運動能力の改善にも寄与するという初のデータであると考える。またヘパラン硫酸鎖結合型のラミニン421E8フラグメントでの分化誘導効率上昇は、幹細胞を効率よく純化するために重要であるとともに、将来の臨床応用に向け、GMP基準で合瀬可能なマテリアルである点からも、極めて大きな成果であると考える。腫瘍化が見られた点については、現段階ではレトロウイルスベクターの再活性化によるものが考えられる。エピゾーマルベクターを用いて樹立された臨床用のiPS細胞ストックを用いての検証を進め、エピゾーマルベクターであれば腫瘍化が起きないのかどうかを早期に判定する必要がある。

【結　論】

iPS細胞由来骨格筋幹細胞を移植することで、DMDモデルマウスの骨格筋にジストロフィン陽性線維が再生され、移植後6週で筋張力が改善した。培養基材にマトリゲルに変えてヘパラン硫酸鎖結合型のラミニンE8フラグメントを用いることで、骨格筋幹細胞の分化誘導効率が4倍になった。Myf5陽性細胞移植では、移植後12週で腫瘍形成を認めてしまったが、その原因はiPS細胞樹立に用いられたレトロウイルスベクターの再活性化である可能性がある。

【考察文献】

1) Tanaka A, Woltjen K, Miyake K et al: Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Myoshi Myopathy in vitro. *PLoS One* 8(4), e61540, 2013

化学修飾人工核酸を用いる新しい筋ジストロフィー治療薬の開発

氏　名　清尾康志
所　属　東京工業大学生命理工学院

諸言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)はジストロフィン遺伝子のナンセンス変異を原因とする重篤な疾患である。DMD の治療法として、アンチセンス核酸(ASO)を用いたエキソンスキッピング法が注目されており、エキソン 51 をスキップする Eteplirsen が 2016 年に FDA に認可されている。Eteplirsen はホスホロジアミデートモルホリノオリゴヌクレオチド(PMO)骨格を有する人工核酸であり、投与量が 30 mg/kg/週と多く、その薬価も高額である。従い、より活性が高くかつ持続性の長い新たな化学修飾 ASO の開発が必要である。

そこで、新たな ASO として、2′-*O*-メチルカルバモイルエチル(MCE)核酸をはじめ、様々なカルバモイルエチル型骨格を有する人工核酸(XCE 核酸) [1-5]を開発し、in vitro および in vitro の実験系で、新規 ASO としての性質を明らかにした。

方法

新たな修飾核酸の開発に向け、様々な修飾基を有する誘導体を効率よく合成するための共通中間体として、新たな合成法を開発した。また、その中間体を用いて新たな修飾基 X を有する XCE 核酸を合成した。さらに、これら XCE 核酸と LNA、ENA など架橋型核酸を組み合わせた ASO を合成し、そのエキソンスキッピング活性を評価した。

結果

リボチミジンから合成した共通中間体2′-ベンジルオキシカルボニルエチル誘導体を用いて、種々の修飾基をもつ XCE 核酸のホスホロアミダイトを合成することに成功した。修飾基の特性としては親水性基、脂溶性基、アミノ酸など様々な物性を有するものを導入した。この手法を利用して、10 種類の XCE 核酸ユニットを合成し、修飾基 X の構造多様性の拡張に成功した。また、これら XCE 核酸と LNA または ENA を組み合わせた ASO を合成した。

活性評価

新規 XCE 核酸を含む人工核酸の標的 RNA に対する結合能を二重鎖の熱融解曲線を用いて評価し、XCE 核酸の構造に関わらず高い結合のうを示すことが分かった。また、架橋型核酸とこれら XCE 核酸を組み合わせた ASO について、exon23 のスキッピング効率を評価したところ、in vitro および mdx マウスに対する筋肉内投与いずれの評価系においてもエキソンスキッピング活性を示すことが分かった。

結論

今回の研究により様々な物理化学特性を有する XCE 核酸の合成法を開発し、それら XCE 核酸を含む ASO や XCE と標的 RNA への高い親和性を有する架橋型核酸を組み合わせた ASO の性質を明らかにすることができた。既に報告しているように XCE 核酸を含む ASO は高い ASO 活性を維持したまま、毒性低減効果などの望ましい性質を有することが期待されている。今後、様々な物性を有する XCE 核酸の開発を続けるとともに、架橋型核酸との組み合わせた効果などもより詳細に解明し、化学修飾人工核酸を用いる新しい筋ジストロフィー治療薬の開発につなげることができると期待される。

参考文献

1) Masaki Y, Yamamoto K, Yoshida K, Maruyama A, Tomori T, Iriyama Y, Nakajima H, Kanaki T, Seio K. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17, 4835-4842.
2) Masaki Y, Yamamoto K, Inde T, Yoshida K, Maruyama A, Nagata T, Tanihata J, Takeda S, Sekine M, Seio K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, 29, 160-163.
3) Masaki Y, Iriyama Y, Nakajima H, Kuroda Y, Kanaki T, Furukawa S, Sekine M, Seio K. *Nucleic Acid Ther.* **2018**, 28, 307-311.
4) Tomori T, Nagaoka K, Takeshita L, Shiozawa T, Miyatake Y, Masaki Y, Sekine M, Seio K. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 8353-8363.
5) Inde T, Masaki Y, Maruyama A, Ito Y, Makio N, Miyatake Y, Tomori T, Sekine M, Seio K. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 8371-8383.

[ここに入力]

メカノ-メタボ　カプリングに関する研究- 骨格筋量とエネルギー代謝制御の性差の解明と筋萎縮医療への応用

田中廣壽
東京大学医科学研究所附属病院
抗体・ワクチンセンター

緒言

サルコペニアに肥満が合併すること、性差が存在すること、が示唆されているが、その実態は不明であり、筋萎縮やエネルギー代謝異常疾患の臨床には反映されていない。そこで、かかる骨格筋量制御と個体レベルのエネルギー代謝における性差の分子基盤を解明することを目的とした。

方法

骨格筋量とエネルギー代謝を複雑系として捉えて数理科学的に理解することをめざし、以下の(A)-(C)の研究から、モデルマウス個体の代謝学的データを臓器・血液のマルチオミクスデータと併せて数理解析し、関連因子を絞り込む。候補因子の機能を分子生物学的に検証し、その結果を数理解析にフィードバックする。

(A) マウスのマルチオミクスデータ取得

(B) データ解析および数理モデル構築とシミュレーション

(C) 骨格筋量、脂肪量などの体組成の制御とエネルギー代謝への関連が示唆される因子について分子生物学的検証

結果

独自に作成した骨格筋特異的グルココルチコイド受容体(GR)欠失マウスにおいて、骨格筋肥大の程度に「オス＞メス」の性差を見いだした。腓腹筋トランスクリプトーム解析により、オス、メス各々に特有のGR感受性遺伝子群があり、とくにFoxo、GR標的遺伝子はメスで多く発現していた。GO解析では、オスではオートファジー、ユビキチンープロテアソーム経路、メスでは脂肪酸合成経路の遺伝子群の発現が多い傾向があった。腓腹筋と血漿のメタボローム解析では、骨格筋代謝物プロファイル、血漿脂肪酸プロファイルに顕著な性差が存在し、骨格筋GRの有無によっても変動した。

考察

現在まで骨格筋量制御に関わる遺伝子としてGRを含む47遺伝子が同定されているとともに(1)、ICU患者の骨格筋トランスクリプトーム解析でもGRが上流因子として抽出されていることからも(2)、骨格筋GRは骨格筋萎縮に対する治療法開発の標的分子として重要である。さらに、本研究から、GRの下流の遺伝子発現プロファイルには顕著な性差が存在した。メタボローム解析の結果と合わせ、性によって骨格筋GRの下流のシグナルが異なり、骨格筋のみならず全身の代謝の性差の形成に関与していることが示唆された。したがって、骨格筋GRは骨格筋—代謝連関を制御する分子としても新たな治療標的分子の候補となり得る。

結論

マウス骨格筋量・代謝と個体レベルの代謝には性差が存在し、その少なくとも一部は骨格筋GRを介した遺伝子発現調節による。

参考文献

1. Verbrugge SAJ, et al. Genes Whose Gain or Loss-Of-Function Increases Skeletal Muscle Mass in Mice: A Systematic Literature Review. Front Physiol. 2018; 9: 553
2. Llano-Diez M, et al. RNA-sequencing reveals altered skeletal muscle contraction, E3 ligases, autophagy, apoptosis, and chaperone expression in patients with critical illness myopathy. Skeletal Muscle 2019 9:9

発表論文リスト

Hirotoshi Tanaka, Noriaki Shimizu, Noritada Yoshikawa
Role of skeletal muscle glucocorticoid receptor in systemic energy homeostasis.
Exp Cell Res. 2017 Nov 1;360(1):24-26. doi:10.1016/j.yexcr.2017.03.049

Naoki Ito, Isao Kii, Noriaki Shimizu, Hirotoshi Tanaka and Shin'ichi Takeda
Direct reprogramming of fibroblasts into skeletal muscle progenitor cells by transcription factors enriched in undifferentiated subpopulation of satellite cells.
Sci Rep. 2017 Aug 14;7(1):8097. doi:10.1038/s41598-017-08232-2

Toshiki Eri, Kimito Kawahata, Takeyuki Kanzaki, Mitsuru Imamura, Kazuya Michishita, Lisa Akahira, Ei Bannai, Noritada Yoshikawa, Yasumasa Kimura, Takeshi Satoh, Satoshi Uematsu, Hirotoshi Tanaka, and Kazuhiko Yamamoto
Intestinal microbiota link lymphopenia to murine autoimmunity via PD-1+CXCR5-/dim B-helper T cell induction.
Sci Rep. 2017;7:46037.doi:10.1038/srep46037

Ono T, Kamimura N, Matsuhashi T, Nagai T, Nishiyama T, Endo J, Hishiki T, Nakanishi T, Shimizu N, Tanaka H, Ohta S, Suematsu M, Ieda M, Sano M, Fukuda K, Kaneda R.
The histone 3 lysine 9 methyltransferase inhibitor chaetocin improves prognosis in a rat model of high salt diet-induced heart failure.
Sci Rep. 2017 Jan 4;7:39752. doi:10.1038/srep39752

Erika Matsubara, Noritada Yoshikawa, Osamu Hosono, Hiroyuki Baba, Toshiki Eri, Masaaki Uehara, Aya Oda, Chieko Sekita, Atsuo Taniguchi, Hirotoshi Tanaka
A rheumatoid arthritis patient complicated with adenine phosphoribosyltransferase deficiency and unilateral renal agenesis: a first case report.
Modern Rheumatology Case Reports. 2017 Jan;1:1. 15-19. doi:10.1080/24725625.2016.1266729

Yoshikawa N, Shimizu N, Uehara M, Oda Y, Matsumiya R, Matsubara E, Kobayashi H, Hosono O, Kuribara-Souta A, Baba H, Nagamura F, Kiryu S, Tanaka H.
The effects of bolus supplementation of branched-chain amino acids on skeletal muscle mass, strength, and function in patients with rheumatic disorders during glucocorticoid treatment.
Mod Rheumatol. 2017 May;27(3):508-517. doi: 10.1080/14397595.2016.1213480

Hiroki Yamazaki, Akifumi Kushiyama, Hideyuki Sakoda, Midori Fujishiro, Takeshi Yamamotoya, Yusuke

Nakatsu, Takako Kikuchi, Sunao Kaneko, Hirotoshi Tanaka and Tomoichiro Asano
Protective effect of sex hormone-binding globulin against metabolic syndrome: in vitro evidence showing anti-inflammatory and lipolytic effects on adipocytes and macrophages.
Mediators Inflamm. 2018 Jun 25;2018:3062319. doi: 10.1155/2018/3062319

Kotaro Anan, Shinjiro Hino, Noriaki Shimizu, Akihisa Sakamoto, Katsuya Nagaoka, Ryuta Takase, Kensaku Kohrogi, Hirotaka Araki, Yuko Hino, Shingo Usuki, Shinya Oki, Hirotoshi Tanaka, Kimitoshi Nakamura, Fumio Endo, Mitsuyoshi Nakao
LSD1 mediates metabolic reprogramming by glucocorticoids during myogenic differentiation.
Nucleic Acids Res. 2018 Jun 20;46(11):5441-5454. doi:10.1093/nar/gky234

Yuki Usui Yasumasa Kimura Takeshi Satoh Naoki Takemura Yasuo Ouchi Hiroko Ohmiya Kyosuke Kobayashi Hiromi Suzuki Satomi Koyama Satoko Hagiwara Hirotoshi Tanaka Seiya Imoto Gérard Eberl Yukio Asami Kosuke Fujimoto Satoshi Uematsu
Effects of long-term intake of a yogurt fermented with Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus 2038 and Streptococcus thermophilus 1131 on mice
Int Immunol. 2018 May 15;dxy035. doi: 10.1093/intimm/dxy035

Uehara M, Yamazaki H, Yoshikawa N, Kuribara-Souta A, Tanaka H.
Correlation among body composition and metabolic regulation in a male mouse model of Cushing's syndrome.
Endocr J. 2019 Sep 7. doi: 10.1507/endocrj.EJ19-0205. [Epub ahead of print]

Yamamoto M, Takahashi H, Tanaka H.
Differences in clinical features of IgG4-related disease between elderly and younger patients.
Geriatr Gerontol Int. 2019 Jun; 19(6): 564-565. doi:10.1111/ggi.13662.

Tomohiro Matsuhashi, Jin Endo, Yoshinori Katsumata, Tsunehisa Yamamoto, Noriaki Shimizu, Noritada Yoshikawa, Masaharu Kataoka, Sarasa Isobe, Hidenori Moriyama, Shinichi Goto, Keiichi Fukuda, Hirotoshi Tanaka, Motoaki Sano

Pressure overload inhibits glucocorticoid receptor transcriptional activity in cardiomyocytes and promotes pathological cardiac hypertrophy
Journal of Molecular and Cellular Cardiology2019 May 130:122-130. doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.03.019. Epub 2019 Apr 1.

Zentaro Kiuchi, Yukino Nishibori, Satoru Kutsuna, Masashi Kotani, Ichiro Hada, Toru Kimura, Toshiyuki Fukutomi, Daisuke Fukuhara, Noriko Ito-Nitta, Akihiko Kudo, Takanobu Takata, Yasuhito Ishigaki,

Naohisa Tomosugi, Hirotoshi Tanaka, Satsuki Matsushima, Shinya Ogasawara, Yoshiaki Hirayama, Hiromu Takematsu, and Kunimasa Yan

GLCCI1 is a novel protector against glucocorticoid-induced apoptosis in T cells

FASEB J. 2019 Mar 12:fj201800344RR. doi: 10.1096/fj.201800344RR.

遺伝性筋疾患の病態解明と治療法の開発

分担研究者　野口　悟
室長、国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部
研究協力者　小川恵、外来研究補助員、国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部
西野一三、部長、国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部

緒言

VI 型コラーゲン遺伝子の変異により、関節異常を伴った遺伝性筋疾患が引き起こされる。この疾患に対する治療法は未だ確立されていない。我々は今までに、患者筋で観察されるVI型コラーゲンの分布には完全に欠損している例と筋鞘膜のみで欠損している例があることを報告してきた[1),2)]。興味深いことにVI型コラーゲン分子は筋線維で合成されるのではなく、間質に存在する間質細胞によって作られることが報告されている。患者筋での筋病理解析により、本疾患の筋病理学的特徴は筋線維大小不同と線維化および進行例での脂肪化の亢進であることを明らかにしている。2010年、上住らにより,骨格筋に存在する間質前駆細胞が、骨格筋疾患で見られる線維化と脂肪組織の起源であることが示された[3),4)]。このことから、この骨格筋に存在する間質前駆細胞が本疾患の病態に深くかかわっているのではないかと考えられた。*Col6a1*KO マウスの解析では、本疾患の病態に関わる2つの重要なイベントを見出した[5)]。骨格筋発達における筋線維数増加の不全と間質前駆細胞の増加、形態変化を伴う線維化である。本研究では、優性遺伝型 VI 型コラーゲン欠損症のモデルマウスを作製し、表現型の解析を通して、疾患病態の解明に迫るとともに、治療法作製のための基礎研究として、変異アレル選択的遺伝子サイレンシングの研究を行った。さらに、ヒト患者由来細胞での治療法評価系作製を目指し、VI 型コラーゲン関連ミオパチーの患者の遺伝子変異解析を進めた。

方法

優性型モデルマウス（*Del50*マウス）

マウス受精卵へ Zinc finger nuclease の導入により、*Col6a1* 遺伝子が部分欠失した c.809_855+3del 変異マウスを得た。モデルマウスとして、変異ヘテロ接合性マウスを用い、すべての実験を行った。

生理学的解析

ホイールケージにて一週間単独飼育により、自発運動量を測定した。また、四肢握力測定を行った。

骨格筋の *ex vivo* での筋力測定は前脛骨筋、腓腹筋を用いて、定法に基づき、トランスデューサーにて単収縮と強縮を測定した。

筋病理解析

筋病理解析には前脛骨筋を用いた。筋線維数および線維径測定では、筋線維細胞膜タンパク質 caveolin3 に対する抗体染色、基底膜ラミニンα2 に対する抗体染色を行った。また、間質細胞の染色には PDGF 受容体 α 抗体を用いた。計測には Image-J にて短径を測定した。

siRNA による遺伝子サイレンシング

既報のとおり、ルシフェラーゼアッセイによって測定した[6)]。

AAV ベクターは、定法に従って調製した。初代細胞でのノックダウン効果は、RT-PCR およびパールカンと VI 型コラーゲン染色により評価した。

シングルセル RNAseq

Del50 マウスおよび野生型マウスの後肢筋から、酵素処理により間質細胞を調製した。生細胞を得るため、プラスチックディッシュへの接着細胞を単離した。RNAseq は、10xGenomics の Chromium システムにてライブラリーを作製した。作製したライブラリーをイルミナ社 Hiseq システムを用いて、150bp ペアエンド法によりシーケンシングした。1 検体あたり 3,000 細胞程度、合計 100 ギガ塩基の配列データを取得した。解析には、10xGenomics の Cell Ranger と Loupe Cell Browser を用いた。

変異解析

遺伝子解析は、患者ゲノムを用いて、サンガー法または次世代シーケンサーにより解析した。患者検体を対象とした研究では、遺伝子解析の結果を含む情報を登録、患者検体の研究使用することについてのインフォームド・コンセントを同意書として得ることを必須とするとともに、研究対象者となる者が研究対象者となることを拒否できるよう十分に配慮した。取り扱う情報は遺伝子解析の結果を含む個人情報であり、個人情報管理については十分な配慮を行った。

結果

得られたヘテロ接合性 *Del*50 マウスは、メンデル遺伝率で算出された。発現した転写物の解析では、exon 9 が全長にわたり欠失していた。生後 3 週から生涯にわたり、野生型の 90%程度の低体重を示したが、致死個体はなく、外見上の異常は認められなかった。ヘテロ接合体マウスの筋力は、生後 3 ヶ月齢、7 ヶ月齢ともに単収縮に著明な低下が見られた。握力は 4 ヶ月齢から低値を維持していた。骨格筋の収縮力は *Col6a1*KO マウスと同様に単収縮力のみが著明に低下し、進行性ではなかった。以上の観察から、*Col6a1* 遺伝子の部分欠失遺伝子産物はドミナントネガティブの効果により、低体重・筋力低下を引き起こすことが示唆された。*Del*50 ヘテロ接合性マウスの前頸骨筋の筋病理像は、筋壊死・再生はなく、筋線維の大小不同、間質の線維化が著明であった。また、Col6a1KO マウスと同様に、骨格筋は、筋線維の平均径は野生型マウスと同様であり、筋線維の総数が約 2/3 程度に減少していた。また、線維化に伴って、間質前駆細胞の増殖と VI 型コラーゲンのデポジットの蓄積が認められた。さらに電顕観察では、野生型マウス骨格筋では間質前駆細胞周囲に VI 型コラーゲンが存在するのに対し、*Del*50 マウス骨格筋では、間質前駆細胞周囲から離れて VI 型コラーゲンが会合し、I 型コラーゲンなどのコラーゲン線維と相互作用している像が認められた。

siRNA による変異アレル特異的な遺伝子サイレンシングによる治療法の検討を行った。欠失部位の近傍に 10 種類の siRNA をデザインし、ルシフェラーゼアッセイにて遺伝子サイレンシング効果を調べた。その結果、1 種類の siRNA に、変異配列特異的な発現低下効果が認められた。さらに、同定した効果の認められる siRNA 配列に基づき、shRNA をデザインし、AAV2 ベクターにて細胞への導入を試みた。変異マウス骨格筋由来間質前駆細胞に導入したところ、変異アレル由来の RNA だけが有意に選択的発現低下が観察された。また、VI 型コラーゲンの細胞周囲への結合性とパールカンとの共局在が定量的に示された。

VI 型コラーゲン関連ミオパチー患者を 100 名以上同定した。その 9 割以上が片アレル性の変異であり、残り 1 割弱が両アレル性であった。片アレル性変異の患者骨格筋では VI 型コラーゲンの蓄積が観察された。また、異常スプライシングによる配列挿入を引き起すディープイントロン変異が 5 例認められた。このようなエクソン単位の欠失・挿入は総計 25%の患者に認められた。このうち 6 つの変異について、上述の変異アレル特異的な遺伝子サイレンシングを目指し、siRNA のデザインを行った。その結果、検討したすべての変異 mRNA 構造変化に対して、特異性を示す siRNA をデザインすることが出来た。

シングルセル解析では、約 3000 個の細胞の解析ができた。*Del*50 マウス、野生型マウスともに、7 種類、9 グループの細胞集団を同定できた。このうち野生型では、約 6 割を間質前駆細胞が占めていた。*Del*50 マウスでは、その間質前駆細胞と組織マクロファージの細胞数は、倍加していた。間質前駆細胞の遺伝子発現プロファイルでは、サイトカインの産生遺伝子の発現低下とともに、線維化に関連した細胞骨格と成長因子、サイトカイン産生、細胞外マトリックス成分遺伝子の有意な発現上昇が認められた。これらの線維化への変化は、免疫組織染色でも確認され、線維化マーカー陽性細胞は形態変化も伴っていた。さらに、10T1/2 細胞を用いて細胞モデリングを試みた。VI 型コラーゲン上で培養した細胞は、I 型コラーゲン上で培養した細胞に比べ、細胞のサイズは低下し、focal adhesion の形態も小さく、ビンキュリンの局在も低下していた。*Del*50 マウ

スやヒト VI 型コラーゲン関連ミオパチー患者の骨格筋で見られた間質前駆細胞の形態を再現したものと考えられた。

考察

*Col6a1*KO マウスと同様に、優性遺伝型モデルマウス（*Del*50）骨格筋の筋線維数は、野生型の6割程度しかなく、筋力低下、骨格筋サイズの低下は、筋線維萎縮によるものではなく、むしろ、筋線維数が少ないせいであると考えられた。また、*Del*50 マウス骨格筋は *Col6a1*KO マウスより顕著な線維化の亢進を示した。これに関連して間質前駆細胞数の増加と VI 型コラーゲンデポジットが認められた。このことから、変異をもつ VI 型コラーゲン分子がミクロフィラメントに取り込まれることで、蓄積デポジットを形成し、VI 型コラーゲン分子が間質全体から失なわれることにより、病態が引き起こされているのではないかと考えられた。上記の結果から、この *Del*50 マウスが優性変異型 VI 型コラーゲン関連ミオパチーのマウスモデルであると考えられた。

シングルセル解析により、間質細胞を中心に、7 種類 9 グループの細胞集団を特定し、それらの遺伝子発現の特徴づけを行った。疾患モデルでは間質前駆細胞の増加し、線維化マーカーの発現が亢進していた。ただし、この線維化マーカーの発現はすべての間質前駆細胞全体で一様ではなく、とても不均一であった。これと一致して、一部の細胞に線維化マーカー遺伝子産物の発現が免疫染色でも確認された。このことは、この間質前駆細胞の線維化への変化は *Col6a1* 遺伝子変異が直接規定するものではなく、進行性の二次的なものであると思われた。また、細胞実験の結果を考えあわせ、間質から VI 型コラーゲンが失われた結果、間質細胞はコラーゲン線維との相互作用により、テンションを受け、形態変化をきたすとともに、線維化遺伝子の発現が引き起こされ、線維化に陥るものと考えられた。

細胞レベルではあるが、変異アレル特異的に遺伝子発現をサイレンシングすることにより、細胞でのコラーゲン VI の発現回復が引き起こされた。このことは、変異とタンパク質の局在変化が直接関連していることを示している。siRNA の導入法を検討したが、AAV2 にて細胞に導入することで、より安定的な結果を得られることが可能になった。今後はこの方法を in vivo（マウス）で展開したいと考えている。

ヒト患者の変異解析から in vitro での細胞での試験、siRNA のデザインに関する基盤となる情報を収集することが出来た。今後は、これらの情報を活用していきたい。

結論

Col6a1 部分欠失マウスは、優性遺伝型コラーゲン VI 欠損症を十分再現しうるマウスモデルであるシングルセル解析から、分子病態を描画することが出来た。ヒト患者では、片側アレル変異がほぼ 9 割を占めし、エクソン欠失した変異mRNA については、特異的な siRNA のデザインが可能であった。

参考文献

1) Ishikawa H., Sugie K., Murayama K., et al. Ullrich disease due to deficiency of collagen VI in the sarcolemma. *Neurology,* 62, 620-3, 2004.

2) Kawahara G., Okada M., Morone N., et al. Sarcolemma specific collagen VI deficiency in UCMD is associated with diminished cell anchorage. *Neurology* 69, 1042-9, 2007

3) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, et al. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 12, 143-52, 2010.

4) Uezumi A, Ito T, Morikawa D, et al. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci.* 124, 3654-64, 2011.

5) Noguchi S, Ogawa M, Malicdan MC, et al. Muscle Weakness and Fibrosis Due to Cell Autonomous and Non-cell Autonomous Events in Collagen VI Deficient Congenital Muscular Dystrophy.

EBioMedicine. 15, 193-202, 2017.

6) Noguchi S, Ogawa M, Kawahara G, et al. Allele-specific Gene Silencing of Mutant mRNA Restores Cellular Function in Ullrich Congenital Muscular Dystrophy Fibroblasts. *Mol Ther Nucleic Acids*. 3, e171, 2014.

マウス筋肉組織におけるエキソンスキップを誘導する低分子化合物の開発研究

萩原　正敏
京都大学大学院　医学研究科

【緒言】

Duchenne型筋ジストロフィーは最も頻度の高い筋ジストロフィーで、遺伝子の変異によるタンパク質発現低下が原因であり、有効な治療法は未だ確立されていない。

Dystrophin(*DMD*)遺伝子はその遺伝子が非常に長く、タンパク質も巨大な構造タンパク質であり、省略可能なエキソンが存在する。そのことを利用し、遺伝子変異の存在するエキソンをスキップさせるエキソンスキップ誘導療法が有効である。また、その非常に長い遺伝子の転写を成立させるにあたり、特殊な制御機構の存在が示唆される。そのため、我々はエキソンスキッピングと転写伸長制御の２つの観点から *DMD* 研究を行っている。

CLK阻害剤によるエキソンスキップ誘導は現在、いくつかの特異的な患者由来の変異のみで確認されており、その臨床応用のため、CLK阻害剤の作用配列の法則性の解析による適応拡大を行いながら、より効果の高いエキソンスキップ低分子化合物の取得・より体内動態の良い化合物の取得を進めている。さらに、我々は非常に長い遺伝子である *DMD* の転写伸長の制御機構を発見したので、転写伸長という観点からの治療応用も検討している。

【方法】

TG003によりスキッピング誘導可能なエキソンの予測

筋芽細胞 C2C12 を用いて、RNA-seq 解析より CLK 阻害剤 TG003 でスキッピング誘導される内在性の遺伝子のエキソンの配列やその周囲のイントロンの配列から、TG003 によってスキッピングされる配列に共通の特徴を見つけ、スコア化を行った。そのスコアから、TG003 でスキッピング可能なエキソンにある変異をNCBIのClinVarデータベースの変異から予測し、変異エキソンが３の倍数の塩基・疾患との関連が強い変異・ナンセンスまたはフレームシフト変異などの条件でさらに絞り込みを行った。

***Sfpq* 骨格筋特異的ノックアウトマウス(KO)の作成**

Sfpq floxed マウスを用いて、*myosin light chain 1f* (*Mlc1f*) プロモーターで制御される Cre を発現するマウスと交配させ、骨格筋特異的 *Sfpq*-KO マウスを作成した。

筋芽細胞の初代培養と遺伝子発現解析

Sfpq-KO マウスとそのコントロールマウスの骨格筋から筋芽細胞の初代培養を行、分化誘導し、遺伝子発現解析を行った。

【結果】

・経口投与可能な CLK 阻害剤 TG693 を取得

TG693 のマウス経口投与 30mg/kg で、筋肉組織において TG693 を LC/MS で検出でき、1.5h に 4.5μM の頂値が得られた。マウス経口投与において頂値が見られた投与後 1.5h において筋肉組織を単離し、ウエスタンブロットにて SR 蛋白質リン酸化を検証すると SRp75 の有

意なリン酸化阻害を示した。また、この時、Clk 活性阻害によって誘導されることが知られている Clk1 成熟型スプライシング産物の増加も確認できた。[1]これらの実験から TG693 が経口投与可能なスプライシング操作 CLK 阻害剤であることが示唆された。

・CLK 阻害剤の適応拡大

低分子リン酸化酵素阻害剤によるエキソンスキップ療法による筋ジストロフィー関連疾患治療の適応拡大のため、化合物の作用点から作用配列の法則性の解析を行った。CLK 阻害剤は、SR タンパク質のリン酸化を行っている CLK のキナーゼ活性を阻害するために、SR タンパク質依存性の高いエキソンを標的として、エキソンスキッピングをさせると考えられる。このような制御標的の特徴から、どのようなエキソンならスキップ可能か、予測することが可能である。そこで、スキップ可能なエキソンの特徴を解析するために C2C12 筋芽細胞を用いて、TG003 投与下でスキッピングを生じる内在性のエキソンを RNA-seq を行うことで抽出した [2]。抽出したエキソンの配列や周囲の配列をスプライス部位の強さ、スプライスサイト付近のピリミジン塩基の含有率、スプライシング因子の結合予測などを指標として使用し、エキソンの TG003 によるスキッピングのしやすさをスコア化し、そのスコアからエキソンスキップ可能な疾患変異をスクリーニングし、*DYSF*(*Dysferlin*) IVS31DS A>G -33 変異など新たな標的が見つかった。

・より効果の高いエキソンスキップ効果を持つ化合物 CaNDY を取得

スプライシングレポーターを用いた化合物スクリーニングを行い、CaNDY というキナーゼ阻害薬を取得し、(Shibata et al,. Manuscript in preparation) *DMD* の c. 4303G>T および c.3613delG 変異においても TG003 より低濃度で、より多くエキソンをスキップさせることを発見した。

・RNA 結合タンパク質 SFPQ が *DMD* の転写伸長に必須であることを発見

RNA 結合タンパク質 SFPQ が脳において、100kbp を超える非常に長い遺伝子特異的に転写伸長を制御することを発見した。[1]骨格筋における SFPQ の機能・制御標的を解明するために *Sfpq* の骨格筋特異的欠損マウスを作成し、骨格筋や Primary myotube による大規模遺伝子発現解析を行い、SFPQ は骨格筋において *Dmd* を始めとする超長鎖遺伝子の発現を制御していることを見出した [2]。

【考察】

TG003 の作用配列の法則性の解析により作成した TG003 によるエキソンスキップのしやすさのスコア化から、新たにスキッピング効果を示した病因性の変異が見つかったことからスコアリングシステム自体はうまく機能していると考えられる。しかし、未だ患者数の少ない変異が多く、臨床応用という点では課題が残る。そこで、TG003 とは異なる kinase profile を持つ化合物や別の作用点を持つスプライシング操作化合物で、同様の予測実験を行うことで、より多くの患者の治療をできると考えられる。例えば、よりエキソンスキップ効果の高い化合物である CaNDY などを対象とした解析が進行中である。

また、*Dmd* 遺伝子の転写伸長機構については、

SFPQ の発現を人為的に増加させることで、長鎖遺伝子の発現を増やせることが解析から明らかになってきた。現在、詳細な分子機序を解析中であり、これが解けることによって、転写伸長機序に介入し、*Dmd* 発現を上昇させることが期待できる。また、転写伸長活性とスプライシングはよくカップリングしていることが知られているので、TG003 との併用療法などを検討することで、新しいジストロフィー治療を提案できると考えている。

【結論】

CLK 阻害剤の適応拡大および *Dmd* 転写伸長制御機構の解明をさらに進めていくことで、より広範囲の筋ジストロフィー患者に対し、より効果の高い治療を提供できると考えられる。

【参考文献】

1)Sakuma M,Iida K,Hagiwara M, Deciphering targeting rules of splicing modulator compounds: case of TG003. *BMC Mol. Biol.* 2015,16(1),16
2)Sako Y, Ninomiya K et al: Development of an orally available inhibitor of CLK1 for skipping a mutated dystrophin exon in Duchenne muscular dystrophy. *Scientific Reports*. 2017, 46126
3) Takeuchi A, Iida K, Tsubota T et al: Loss of *Sfpq* causes long-gene transcriptopathy in the brain. *Cell Rep.* 2018,1,23(5):1326-1341
4) Hosokawa M, Takeuchi A, Tanihata J et al: Loss of RNA-Binding Protein *Sfpq* Causes Long-Gene Transcriptopathy in Skeletal Muscle and Severe Muscle Mass Reduction with Metabolic Myopathy. *iScience.* 2019,13,229-242

血清中のエクソソームを介した骨格筋特異的microRNAによる筋再生および脳神経保護作用に着目した筋ジストロフィー新規治療法の開発

橋戸　和夫
国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　ラジオアイソトープ管理室

緒言

これまでに我々は血清中の骨格筋特異的microRNA量に着目し、筋疾患におけるバイオマーカーとしてmicroRNAの定量についての有用性について報告した（1）。さらに、エクソソーム合成経路の阻害剤であるGW4869を投与、さらにエクソソーム合成酵素遺伝子をノックアウトすることによる*mdx*マウスの病態についてすることにより血清のCKが低下し筋組織へのエバンスブルー色素の取り込みが低下することを報告した（2）。本研究において我々はエクソソーム合成酵素遺伝子をノックアウトすることによる*mdx*マウスの病態について検討するとともに、ジストロフィン欠損による中枢神経系への影響をBDNF遺伝子に着目し、DMD筋ジストロフィー患者の約30パーセントにおいて見られる精神症状（抑鬱・自閉傾向等）が筋ジストロフィー患者血清中の筋特異的microRNAが原因となっている可能性について検討した。

さらに、筋ジストロフィーの病態の特徴である骨格筋の壊死に着目し、アポトーシス・ネクロトーシスに影響を与えるTNF-αの受容体製剤であるエタネルセプトを幼弱マウスに連続投与し、血清中へのエクソソーム放出・microRNA放出に関して定量を行った。

方法

1．CRISPR/Cas9の系により、エクソソーム合成のKey enzymeであるSphingomyelin Phosphodiesterase 3遺伝子（*Smpd3*）をゲノム編集したノックアウトマウスを作出し、*mdx*マウスと交配することにより、*mdx*マウスの脳内におけるBDNF（Brain Derived Neurotorophic Factor）の発現量をウエスタンブロットによりタンパク量を定量した。

2．*Smpd3* knock outマウスと*mdx*マウスを交配したマウスについてグリップテスト・トレッドミル等の運動試験を行い、評価した。

3．エタネルセプトを2週齢mdxマウス腹腔に週3回、4週間にわたって投与し、血清中のエクソソームおよびmicroRNAに関して定量した。

結果

1．脳内のBDNFタンパク量は*mdx*マウスではおよそ1/3程度に低下していたが*Smpd3* knock out mouse(-/-)と*mdx*マウスとの交配によって得られたF1マウスにおいては、脳内におけるBDNFタンパク量はコントロールマウスと同程度に回復していた。

2．*Smpd3* knock outマウスと*mdx*マウスを交配したマウスについてグリップテスト・トレッドミル等の運動試験を行った結果、運動機能の有為な回復が見られた。

3．エタネルセプト20mg投与群において血清中のエクソソームおよび骨格筋特異的microRNA量の低下が認められ、呼吸筋機能の回復傾向が認められた。

考察

セラミド合成酵素遺伝子である Smpd3 をノックアウトすることにより生体内でのエクソソームの合成および放出を抑制した結果、*mdx*マウスにおける脳内の BDNF タンパク量の回復が見られたこと、および運動機能の回復がみられたことからエクソソームに包括された分泌型microRNAの血液中への過剰放出がDMDの中枢神経系の病態の一部である可能性を示唆している。*Smpd3* 遺伝子のノックダウンにより、エクソソーム分泌抑制を標的とする筋再生機能の改善を利用した新たな薬物治療法への応用・開発が期待される。さらに、エクソソーム分泌を抑制し、血流中の筋特異的 microRNA の循環量を減少させることにより、脳内の BDNF 発現量を回復させることによって筋ジストロフィー患者の抑鬱・自閉傾向といった精神症状が改善される可能性がある。

また、エタネルセプトの投与により、抗炎症作用のみならずエクソソームの放出抑制に起因すると考えられるＤＭＤの病態の改善が認められた。

結論

生体内において、セラミド合成酵素 *Smpd3* 遺伝子のノックダウンにより、１）*mdx*マウスの脳内における BDNF タンパク量が統計学的有為に回復し、２）運動機能の有為な回復が見られた。３）エタネルセプト投与により呼吸機能の改善が認められた。

これらの結果は、エクソソーム合成経路が DMD の筋再生および精神症状に対する新たな薬物治療の標的となりうることを示している。

参考文献

1) Matsuzaka Y, Kishi S, Aoki Y, *et al.* : Three novel serum biomarkers, miR-1, miR-133a, and miR-206 for Limb-girdle muscular dystrophy, Facioscapulohumeral muscular dystrophy, and Becker muscular dystrophy. *Environ Health Prev Med.* ; 19(6):452-8.: 2014

2) Matsuzaka Y, Tanihata J, Komaki H, *et al.*: Characterization and Functional Analysis of Extracellular Vesicles and Muscle-Abundant miRNAs (miR-1, miR-133a, and miR-206) in C2C12 Myocytes and mdx Mice. *PLoS One.* 15;11(12):e0167811. doi: 10.1371/journal.pone.0167811. eCollection 2016

3) 炎症と免疫　Vol. 26 No. 4, 2018. 「エクソソーム最前線」　神経筋疾患　筋ジストロフィーとエクソソーム

骨格筋幹細胞研究を起点とした移植細胞創成技術の開発

分担研究者： 深田宗一朗
分担研究者所属：大阪大学大学院薬学研究科
筋幹細胞創薬プロジェクト

＜緒言＞

骨格筋は優れた再生能力を保持しており、それを可能としているのが骨格筋幹細胞—筋衛星細胞—である。筋衛星細胞は通常、静止期・未分化状態で維持されており、骨格筋が傷害を受けると速やかに活性化・増殖を行い新たな筋線維を再構築する。一方で、骨格筋が肥大する際にも、筋衛星細胞は活性化・増殖し、最終的に筋線維に新しい核を供給する事で、効率的な筋肥大に貢献する。一般的に、筋肥大時の筋衛星細胞の関与も、過負荷による筋線維の損傷を修復するためと考えられている。そのため、筋肥大時の筋衛星細胞の分化機構・動態を、筋再生モデルと区別して検討を行なった報告は存在しない。我々は、Notch シグナルのエフェクター遺伝子である Hey1 と HeyL の研究を通して、Hey1 と HeyL が筋衛星細胞の維持、再生、筋肥大において特徴的な役割を担う事を明らかにした。さらに、筋衛星細胞の増殖様式が筋再生と筋肥大では異なる事を本事業で明らかにする事ができた。

＜方法＞

1． *Hey1, HeyL* 欠損マウス

Hey1 欠損、*HeyL* 欠損、*Hey1-floxed*, $Pax7^{CreERT2}$、マウスを交配する事で、筋衛星細胞特異的な欠損マウスを作成した。

2. 筋肥大モデル

マウス右後肢足首の皮膚を一部切開し同筋の共働筋である腓腹筋およびヒラメ筋の遠位腱であるアキレス腱をイソフルラン麻酔下にて約 1 ㎜切除した後に皮膚を縫合した。また、同マウス左後肢には Sham 処置として皮膚の切開および縫合のみを実施した。

3. RNA-seq

筋肥大誘導 4 日目の $Pax7^{CreERT2}$:$Rosa^{YFP}$ マウス足底筋から単離したサテライト細胞を Lysis Buffer の入ったチューブに回収し， Illumina HiSeq 1500 system を用いた解析を実施した。

4. 再生実験

マウス前脛骨筋に蛇毒カルジオトキシンを投与し、筋再生を誘導した。投与後 3、4 日目に筋肉を固定し、M-cadherin および embryonic Myosin Heavy Cahin (eMyHC) に対する抗体を用いて再性能を評価した。

＜結果＞

1. 筋衛星細胞維持における Hey1 と HeyL の役割

我々は、*Hey1* と *HeyL* の単独欠損マウスは正常である一方、二重欠損させると成体型の筋衛星細胞ができてこない事を明らかにしていた[1]。また、*HeyL* の発現は筋衛星細胞特異的であるため[2]、$Pax7^{CreERT2}$ を用いて筋衛星細胞特異的に *Hey1* を欠損させた結果、筋衛星細胞の数が激減し、その結果筋再生能力を失われた。

2. 筋肥大における *HeyL* 欠損マウスの表現系

筋肥大誘導足底筋および Sham 群から筋衛星細胞を単離し、RNA-seq 解析を行なった結果、Notch シグナルの標的遺伝子の発現が高い事が明らかとなった。その中で、*HeyL* の発現は顕著に高い発現を示した一方、*Hey1* の発現は低下していた。そこで、*Hey1* と *HeyL* 欠損マウスに筋肥大を誘導した結果、*Hey1* マウスには異常はなかったが、*HeyL* 欠損マウスでは、筋衛星細胞が分化方向に傾いており、新しい筋核数の減少・肥大効率の低下が観察された[3]。

3. 筋再生における HeyL の役割

HeyL の発現は、静止期の筋衛星細胞で検出されるが、活性化・増殖した細胞ではその発現は認められない。そこで、筋肥大で異常の観察された *HeyL* 欠損マウスの筋再生能力を詳細に検討したところ、これまでの結果同様、*HeyL* 欠損マウスの再生能力はコントロールマウスと

違いはなかった。

4　HeyL による筋分化抑制

C2C12 細胞に *HeyL* を遺伝子導入しても筋分化抑制作用は殆ど示さない。一方で、筋肥大モデルでは *HeyL* 欠損により *MyoD* の発現が増加し、さらに筋衛星細胞の静止期維持においては Hey1 と HeyL が補完的に *MyoD* の発現抑制に働いている。そこで、HeyL による筋分化抑制作用を検討した結果、HeyL は別の Notch エフェクター分子である Hes1 とヘテロダイマーを形成し機能している事が明らかとなった [4]。

＜考察＞

筋衛星細胞の未分化性維持において、Notch シグナルのエフェクターとして Hey1 と HeyL は本質的に働く分子である。また、Notch シグナルで直接誘導される Collagen V は Calcitonin Receptor (CalcR) の局所的リガンドとして働く事を国際共同研究で発表した [5]。CalcR シグナルは分化制御への寄与は殆どなく、活性化を抑制するのが主たる機能である [6, 7]。つまり、Notch-Hey1/HeyL と Notch-Collagen V-CalcR が筋衛星細胞の未分化性および静止期維持に、それぞれ主たる経路として働く事が予想される。

筋再生と筋肥大での筋衛星細胞の HeyL の要求の違いは驚くべき結果であった。緒言に記載した通り、筋再生と筋肥大時の筋衛星細胞の動態を比較した研究はこれまで存在しない。また、筋肥大の筋衛星細胞の活性化・増殖には筋損傷は必要でないことから、何が筋肥大で起きる変化（メカニカルストレスなど）を感知し、筋衛星細胞の活性化・増殖を制御しているのかは今後の大きな課題である。サルコペニアを含む筋萎縮を伴う疾患では、筋損傷は見られないため、筋損傷非依存的な筋衛星細胞活性化・増殖メカニズムの研究は、これら疾患の新規治療法開発に繋がると確信している。

＜結論＞

Hey1 と HeyL は補完的に機能する事で筋衛星細胞の維持に働き、筋損傷の場合にはそれら発現は低下するために必要でない。一方で、筋肥大時の筋衛星細胞の増殖には HeyL のみが必要である。

＜参考文献＞

1. Fukada, S. Yamaguchi, M. Kokubo, H. et al. Hesr1 and Hesr3 are essential to generate undifferentiated quiescent satellite cells and to maintain satellite cell numbers. (2011), ***Development***, 138, (21), 4609-19.
2. Fukada, S. Uezumi, A. Ikemoto, M. et al. Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. (2007), ***Stem Cells***, 25, (10), 2448-59.
3. Fukuda, S. Kaneshige, A. Kaji, T. et al. Sustained expression of HeyL is critical for the proliferation of muscle stem cells in overloaded muscle. (2019), ***Elife***, 8.
4. Noguchi, Y. T. Nakamura, M. Hino, N. et al. Cell-autonomous and redundant roles of Hey1 and HeyL in muscle stem cells: HeyL requires Hes1 to bind diverse DNA sites. (2019), ***Development***, 146, (4).
5. Baghdadi, M. B. Castel, D. Machado, L. et al. Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche. (2018), ***Nature***, 557, 714-718.
6. Yamaguchi, M. Watanabe, Y. Ohtani, T. et al. Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche. (2015), ***Cell reports***, 13, (2), 302-14.
7. Zhang, L. Noguchi, Y. T. Nakayama, H. et al. The CalcR-PKA-Yap1 Axis Is Critical for Maintaining Quiescence in Muscle Stem Cells. (2019), ***Cell reports***, 29, (8), 2154-2163 e5.

28-6 「ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発」

分担研究課題名：
「筋分化を促進させる機能性ＲＮＡの解析」
分担研究者：北條浩彦
所属:国立精神・神経医療研究センター神経研究所

諸言

筋再生は、平常時の筋肉量維持や筋損傷時の回復そして加齢に伴う筋肉量低下にも関わっている。我々は、若齢マウスと老齢マウスの血液に存在するエクソソームの解析から従来の筋肉特異的マイクロ RNA よりも筋分化・筋再生を強く誘導するマイクロ RNA (miRNA) を発見した。本研究は、このマイクロ RNA を起点に筋分化・筋再生の分子メカニズムを明らかにする。本研究から得られる成果は、機能性 RNA の観点から見た新しい筋分化・筋再生の実態を明らかにし、さらに筋疾患治療においても新しい治療戦略や治療薬候補を提供すると考える。

方法

マウス初代筋芽細胞を用いた筋分化誘導効果の検討：

マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞に加えて、マウス個体から単離した筋芽細胞を用いて当該 miRNA の筋分化誘導効果を検討した。合成した miRNA を C2C12 細胞または単離した初代筋芽細胞に導入し、筋分化マーカーである Myogenin 遺伝子やミオシン重鎖遺伝子の発現が誘導されるか調べた。

作用機序解明のための下流遺伝子ターゲットの解析：

①マイクロ RNA(miRNA)が制御する下流遺伝子を同定するため、TagetScan などの予測ターゲット遺伝子データベースを利用して筋分化に関係するターゲット遺伝子候補を抽出。②予想される miRNA の認識配列を化学合成（オリゴ DNA 合成）し、それをルシフェラーゼレポーター遺伝子の 3'UTR に挿入したレポータープラスミドを構築。③合成 miRNA と共に構築したレポータープラスミドを C2C12 細胞に導入し、翌日、レポーター遺伝子の発現を解析した。④上記に加え、合成 miRNA または阻害用アンチセンスオリゴ核酸を C2C12 細胞に導入し、内在性ターゲット遺伝子の発現変化を qRT-PCR 法やウエスタンブロット法を用いて解析した。

筋損傷モデルマウスを用いた効果の検討

8 週齢マウスの前脛骨筋に塩化バリウム溶液を投与し筋損傷を与え、その翌日に当該 miRNA を筋損傷部に投与した。miRNA 投与後 9 日目に再生した筋肉の標本を作成、免疫組織化学的染色を行い、顕微鏡観察、そして筋線維の断面積を測定した。

老齢マウスを用いた効果の検討

２年齢マウスの前脛骨筋に当該 miRNA そしてコントロールの miRNA(miCont)を直接投与し、miRNA 投与数日後の筋組織に対して上記と同じ処理を行い、顕微鏡観察、そして筋線維の断面積を測定した。

結果・考察

マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞だけでなくマウス個体から単離した筋芽細胞を用いて当該 miRNA の筋分化誘導効果を検討した。その結果、C2C12 細胞と同様に単離したマウス初代筋芽細胞でも、当該 miRNA によって筋分化マーカー遺伝子である Myogenin 遺伝子やミオシン重鎖遺伝子の発現が強く誘導されることが分かった。さらに、筋肉特異的な miRNA である miR-1 の発現も誘導されることがわかった。

当該 miRNA のターゲット遺伝子探索から、

Suz12 遺伝子と Lin28b 遺伝子がターゲット遺伝子として抽出された。Lin28b は RNA 結合タンパク質であり、miR-1 前駆体と結合して miR-1 の機能性 RNA としての成熟を抑制している。当該 miRNA によってターゲットの Lin28b が抑制されることで、miR-1 前駆体に対する成熟抑制が外れ、その結果として成熟した機能性の miR-1 が増加したと考えられる。

筋損傷モデルマウスを用いた in vivo の実験から、当該 miRNA の投与によって再生した筋線維に有意な肥大化が起こることが観察された。

さらに、老齢マウスの筋組織に当該 miRNA を直接投与した場合でも顕著な筋線維の肥大化が観察された。面白いことに、肥大化した筋線維は、再生した筋線維の特徴を有していなかった。

結論

我々が発見した miRNA は、従来の myogenic miRNAs よりも強い筋分化・筋再生能を有していた。そして、ターゲット遺伝子の一つである Lin28b の抑制を介して代表的な myogenic miRNA である miR-1 の発現をコントロールし、筋分化・筋再生に関わっていると考えられる。また、老齢マウスに当該 miRNA を投与した場合でも筋線維の肥大化が観察されたが、その老齢マウスの肥大化には上記以外のターゲット遺伝子が関わっていると予想される。

参考文献

Shima A, Matsuda R. The expression of myogenin, but not of MyoD, is temperature-sensitive in mouse skeletal muscle cells. *Zoolog Sci,* 25: 1066-1074. 2008.

Ito N, Ruegg UT, Kudo A, et al. Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrile as a key trigger of skeletal hypertrophy. *Nat Med,* 19: 101-106. 2013.

Fukuoka M., and Hohjoh H. Comprehensive measurement of gene silencing involving endogenous microRNAs in mammalian cells. In MicroRNA Protocols. *Methods Mol Biol,* 1733: 181-192. 2018.

分担研究課題名：ゲノム編集技術を用いた筋ジストロフィーの遺伝子治療法開発

分担研究者：堀田秋津　京都大学 iPS 細胞研究所

緒言

Duchenne 型筋ジストロフィーは、ジストロフィン遺伝子のアウトオブフレーム変異が原因となって引き起こされる。したがって、この原因たる遺伝子変異を修復できれば、病気の根本治療に繋がると期待される。しかしながら、ジストロフィン遺伝子は巨大であり、従来の遺伝子治療用ベクターで細胞外部より導入することは困難であった。一方、アンチセンスオリゴ核酸を利用してジストロフィン遺伝子の特定のエクソンをスキッピングさせることによりジストロフィンの蛋白質読み枠を回復できるエクソンスキッピング法が世界中で開発研究が進められている。しかしながら、アンチセンスオリゴは mRNA に作用するため、効果は一過性であり、治療効果を生涯にわたって継続させるためには、頻回繰り返し投与が必要となる。そこで我々は、新たに登場した CRISPR ゲノム編集技術に注目し、ゲノムレベルでエクソンスキッピングを誘導する事を目指している。

方法

我々は以前、DMD 患者由来 iPS 細胞において、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いることによって、ゲノムレベルでエクソンスキッピング誘導により、ジストロフィンのタンパク質発現を回復できることを報告した[1]。さらに、修復 iPS 細胞を骨格筋に分化させた後、mRNA 発現プロファイルを調べると、健常人のそれに近づいていることも確認できた[2]。

ゲノム編集によるエクソンスキッピング効率を向上させるために、ルシフェラーゼ活性を指標とするレポーター系を作製し、エクソンスキッピング効率の高い候補 gRNA を同定し特許出願を行った。

さらに、これらの gRNA と Cas9 タンパク質を骨格筋細胞や組織へと導入するために、ウイルスが細胞へと進入する機構に着目した。レンチウイルスは脂質二重膜を持ち、外皮タンパク質(VSV-G 等)を介して効率的に細胞内部へと進入する。我々はこのレンチウイルスの空粒子を利用して、内部に Cas9 タンパク質および gRNA を封入することにより、一過性に Cas9/gRNA を細胞内に効率的に導入できる VLP 送達システム NanoMEDIC を開発した。Cas9/gRNA の作用時間が一過性のため、オフターゲット切断リスクが少ないにも関わらず、遺伝子導入が困難な患者由来 iPS 細胞でも非常に高効率でゲノム編集およびエクソンスキッピングが誘導可能であることを確認した。また、前述のルシフェラーゼレッポーターをノックインしたマウス系統を樹立し、NanoMEDIC を筋注することにより生体内筋組織でもゲノム編集およびエクソンスキッピングが誘導可能であることを示すことに成功し、論文が近日出版予定である[3]。

結論

エクソンスキッピングを誘導する CRISPR-sgRNA を標的細胞や組織に送達するために、ウイルスの外皮を用いた新規送達技術を開発した。今後、更なる治療効果向上に向けた各種検討を継続していく予定である。

参考文献

1. Li, H. L. *et al.* Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports* 4, 143–154 (2015).
2. Ifuku, M.,et al., Restoration of Dystrophin Protein Expression by Exon Skipping Utilizing CRISPR-Cas9 in Myoblasts Derived from DMD Patient iPS Cells. *Methods Mol Biol* 1828, 191–217 (2018).
3. Gee P et al., Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR- Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. *Nature Communications*, in press.

ジストロフィン遺伝子産物の多様性の解明とその治療への応用

松尾　雅文
神戸学院大学　総合リハビリテーション学部

緒言

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）の責任遺伝子であるジストロフィン(*DMD*)遺伝子は、ヒト最大の遺伝子で、X 染色体に 4200kb に亘って存在している。この巨大な遺伝子は、７９ヶのエクソンから構成され、14kb の cDNA にコードしたジストロフィンを産生する。一方、この遺伝子はジストロフィンを発現するプロモーターを含めて少なくとも８種の選択的プロモーターをコードし、組織あるいは発生時期特異的なジストロフィンアイソフォームを産生する。

DMD は進行性の筋萎縮を特徴とし、筋力低下を主症状とするが、DMD は様々な筋外症状を合併し DMD 症候群ともされる。しかし、筋外症状の発症と *DMD* 遺伝子の異常との関連についての解析はその途上である。DMD の主要死因は心不全で、心筋障害の克服が DMD のケアにおいて主要課題となっている。心筋障害は骨格筋と同様にジストロフィンが欠損するために発生すると理解されている。しかし、DMD 患者の中でも心筋障害を合併する年齢は様々で、ジストロフィン欠損に加え、他の因子が関与していることが強く示唆される。

本研究では、ジストロフィン遺伝子のアイソフォームに関する様々な研究を実施した。そして、骨格筋には発現しないとされてきた、*DMD* 遺伝子の最小アイソフォームの Dp71 が、ヒト骨格筋組織で発現することを mRNA 解析とキャピラリー電気泳動によるタンパク解析により明らかに検出することに成功した(1)。

DMD 患者の中に低身長例があることから、身長とジストロフィン遺伝子の異常との関連を解析した。その結果 Dp71 を欠損する DMD は身長が低いことを明らかにした(2)。さらに、神経膠芽腫に発現する、Dp71 と Dp116 の詳細な解析を行った。Dp71 には６種のスプライシングバリアントと最小サイズの Dp40 を同定した(3)。また、Dp116 にも同様に６種のスプライシングバリアントを同定した(4)。

一方、選択的ポリアデニレーションにより産出された全く新たな Dp427 のアイソフォームを同定し、Dpm234 とした。そして、DMD の心筋障害とこのア Dpm234 との関連を解析したところ、DMD 患者の心電図の異常と Dpm234 が関係することを明らかにした（投稿準備中）。全く新しい Dpm234 をクローニングしたことは、巨大なジストロフィン遺伝子にまだ未発見のアイソフォームの存在の可能性を強く示唆した。しかし、新規の Dpm234 は iPS 由来心筋細胞で発現するがヒト心筋では発現しておらず、アイソフォームの発見には適切な組織を使用する必要があることが示唆された。

DMD 患者の心筋障害とジストロフィンアイソフォームの欠損との関係を解析したところ、DMD の心機能障害の促進因子として Dp116 が関与する結果を得た。しかし、*DMD* 遺伝子から産生されるアイソフォームの中で、Dp116 はシュワン細胞に特異的に発現すると考えられていた。そのため、この臨床データ解析結果に疑問符がつけられた。そこで、シュワン細胞特異的とされてきた Dp116 の発現を検討したところ、心筋細胞にも発現することを見い出した。本報告では,この Dp116 と心機能障害の発症との関連に関する研究(5)について記す。

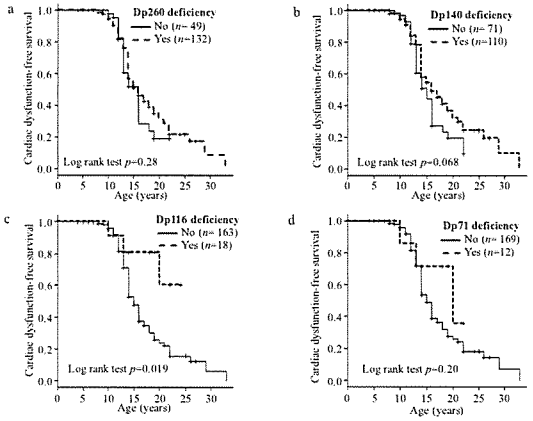
方法

神戸大学小児科を受診中の DMD 患者について、その *DMD* 遺伝子異常によるアイソフォーム欠損と心臓エコー検査所見について検討した。
また、ヒト心筋 RNA を購入し、Dp116mRNA を RT-PCR 解析した。

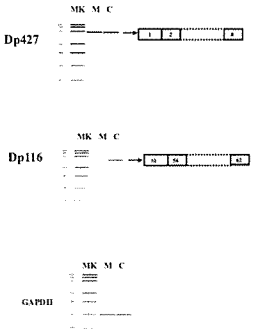
結果

２９２人の DMD 患者で、初回のエコー検査で異常がなくその後も神戸大学でフォローできた１８１人の患者を、アイソフォームの欠損状況により５つのグループに分けて検討した。患者全体でみると心エコー検査での Ejection fraction（EF）は年齢とともに低下する傾向にあった。それを年次毎に分解してみると、十代半ばに大きな低下がみられ、その後はそれ程変化しないとの結果が得られた。また、カプランマイヤー解析により、心機能障害（EF<５３％）の発生をみると、１５歳で半数が心機能不全となった。これをさらに、アイソフォームの欠損タイプでみた（図１）。Dp260、

Dp140、Dp71 では心機能障害とアイソフォームの欠損には関係がなかった。しかし、Dp116 では Dp116 (+) と (−) の２群では心機能障害に陥る割合に明らかに差があった。Dp116 (+) 群で有意に高く、しかも年齢も若いことから明らかとなった（図１）。



この結果は、シュワン細胞特異的とされた Dp116 が心臓にも発現することを強く示唆した。そこで、ヒト心筋 RNA 中に Dp116 が発現していることをエクソン S1 からエクソン 62 までを RT-PCR 増幅することにより検討した。その結果、標的サイズの PCR 増幅断片を得た（図２）。



この結果は、Dp116 が心臓に発現することを証明し臨床で得られた結果を支持した。

考察

DMD に合併する心筋障害は、*DMD* 遺伝子の異常によるジストロフィンの欠損により発生する。しかし、心筋障害はその発生時期あるいは表現において様々で、ジストロフィン欠損以外の因子の関与が強く示唆された。本研究では Dp116 の発現の有無が心筋障害の発生に関わっていること、すなわち Dp116 の発現が心筋障害を加速することを明らかにした。この結果はアイソフォームはジストロフィンの機能を補完するものであるとの概念をくつがえすものである。また、この結果はジストロフィンのアイソフォームがそれ自体で特有な機能を営んでいることを示した。心筋障害の解明には Dp116 の作用秩序の解明が必須と考えられる。一方、Dp116 の発現が心機能障害を促進する因子であるなら、Dp116 の発現を阻害することが DMD の心筋障害発生の予防法になることが示された。

参考文献

1. Kawaguchi T, and Matsuo M, et al. Detection of Dystrophin Dp71 in Human Skeletal Muscle Using an Automated Capillary Western Assay System. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6).
2. Matsumoto M, and Matsuo M, et al. Patients with Duchenne muscular dystrophy are significantly shorter than those with Becker muscular dystrophy, with the higher incidence of short stature in Dp71 mutated subgroup. *Neuromuscul Disord.* 2017;27(11):1023-8.
3. Rani AQM, and Matsuo M, et al. Identification of the shortest splice variant of Dp71, together with five known variants, in glioblastoma cells. *Biochem Biophy Res Comm.* 2019;508:640-5.
4. Rani A, and Matsuo M, et al. Schwann cell-specific Dp116 is expressed in glioblastoma cells, revealing two novel DMD gene splicing patterns. *Biochem Biophys Rep.* 2019;in press.
5. Yamamoto T, and Matsuo M, et al. Cardiac dysfunction in Duchenne muscular dystrophy is less frequent in patients with mutations in the dystrophin Dp116 coding region than in other regions. *Circ Genome Precis Med.* 2018;11(1):e001782.

筋ジストロフィー関連モデルマウスの生産・供給システムの検討

保田昌彦
公益財団法人実験動物中央研究所

緒　言

筋ジストロフィー症の要因解明や治療研究のために，我々は 50 年間継続して、筋ジストロフィー関連モデルマウスならびにそのコントロール系統マウスを微生物学的および遺伝学的統御のもとで維持し、当研究班をはじめとする多くの研究グループに供給してきた。また、筋ジストロフィー研究に適したモデルマウスの育成を目的に育種繁殖技術ならびに生殖工学技術の開発に努め、これらの技術を応用した実験動物学的改良を行うと同時に、これら筋ジストロフィーモデルマウスの背景データ解析を実施してきた。1. として、より高い精度と再現性を得られる動物実験のために維持動物の品質管理について継続的に行ってきた。2. として、筋ジストロフィーモデルマウスおよびコントロール系統を維持し、2016（平成 25）年度から 2019（令和元）年度の 4 年間にわたり、継続して各研究機関に供給を行った。3. として、新たな筋ジストロフィーモデルマウスの導入と開発を行った。4. として、筋ジストロフィーモデルマウスならびに各コントロールマウスの背景データの測定・解析を行った。

結　果

1. 維持動物の品質管理

維持動物の品質管理のため、ビニールアイソレーター（VI）装置内で管理している維持動物の定期的な微生物・遺伝モニタリング検査を定期的に実施した。微生物モニタリングは、VI あたり 1 ヶ月もしくは 3 ヶ月に 1 回の頻度で、8 週齢以上のマウス 2 匹を用い、実中研 ICLAS モニタリングセンターの全検査項目を実施してきた。結果、全項目陰性であることを確認し、免疫不全マウス相当の微生物学的品質を保証している。遺伝モニタリングは、年 1 回もしくは 2 - 3 世代に 1 回の頻度で、8 週齢以上の次世代の親 3 匹を用い、STR マーカーによる遺伝子プロファイル解析を実施し、遺伝学的品質を管理している.

2. 筋ジストロフィー関連モデルマウスおよびコントロール系統マウスの維持と供給

我々は、筋ジストロフィー関連モデルマウスの C57BL/6J-*dy*　(B6-*dy*)　、　C57BL/10ScSn-*mdx* (B10-*mdx*)、DBA/2N-*mdx* (D2-*mdx*)、重度免疫不全 NOG-*mdx* およびこれらのコントロール系統を VI 内での交配ならびに胚の凍結保存によって維持し、原則として繁殖用タネ動物を当研究班員もしくは外部研究者の要望に応じて供給した。2016 年度から 2019 年度の 4 年間における供給実績は、のべ 82 機関にのべ 190 回、総計 2,357 匹の分与・供給を実施した。供給数の系統別の内訳は、B6-*dy* が 5 匹、B10-*mdx* が 1,546 匹、ならびにコントロール系統の B10 が 340 匹、D2-*mdx* が 424 匹、NOG-*mdx* が 42 匹であった。

3. 新たな筋ジストロフィー関連モデルマウスの導入と開発

2013 年に大阪大学から導入した D2-*mdx* マウス [1] の維持生産体制ならびに頒布体制の構築、2019 年に国立精神・神経医療研究センターから導入した C57BL/6J-*mdx* (B6-*mdx*) マウスの維持生産体制の構築、そして D2-*mdx* の重度免疫不全化マウスの作製を目指した。*mdx* マウスの維持生産体制は、兄妹交配を継続実施し、各背景系統マウ

ス すなわち D2-*mdx* は DBA/2Ncrl と、B6-*mdx* は C57BL/6JJcl とのバッククロスで系統保存胚ストックを構築し、10 世代で種更新を実施してきた。その中で、D2-*mdx* は 2016 年度に確実な頒布体制の構築が完了した。B6-*mdx* は 2019 年度に凍結保存胚からの動物復元を行い、維持生産体制の構築を開始した。また、B10-*mdx* とは異なり筋力低下ならびに筋萎縮を呈する D2-*mdx* の免疫不全化は再生医療研究等にも適するモデルマウスとなり得ると考え、現在 wild-type D2 の Rag2/Il2rg double knockout マウスを作製し、D2-*mdx* との交配を開始した。

4. 筋ジストロフィーモデルマウスの背景データ解析

mdx マウスおよびコントロール系統マウスにおける背景データ解析のため、骨格筋にダイナミックな変化が認められるとされる若週齢時の体重測定、血液生化学検査ならびに筋力測定を実施した。動物は B10-*mdx* と B10 ならびに D2-*mdx* と D2 の 4 系統マウスの 3 週齢から 10 週齢を使用した。体重変動は、wild の B10 マウスと同等の変動を示す B10-*mdx* マウスとは異なり、D2-*mdx* マウスは wild の D2 マウスと比較して、3 から 10 週齢において常に低い体重値を示した。血液生化学検査の結果、B10-*mdx* ならびに D2-*mdx* マウスにおいて離乳直後の 3 週齢から骨格筋障害に反映した血漿 creatine phosphokinase (CpK) 値の異常で有意な上昇が見られ、特に 5 - 6 週齢において CpK 値の顕著な異常値 (30,000 - 40,000 IU/L) を認めた。Four limb hang test による筋力測定の結果、D2-*mdx* マウスは顕著な筋力低下を示し、且つ、6 週齢以降の筋力増加を示さなかった。

結　論

筋ジストロフィーモデルマウスの品質管理については、高い水準の微生物・遺伝モニタリング検査を定期的に実施することで、確かな品質のモデル動物を研究班の班員を含めた筋ジストロフィー研究者に継続的に供給した。その動物の供給実績は、供給機関および供給数は高い水準を維持し、2016 年度から 2019 年度の 4 年間にて 2,357 匹を分与・供給した。この 4 年間を含めた近年の特徴は供給先として、国内製薬ならびに受託試験企業の増加が挙げられる。新たな筋ジストロフィー関連モデルマウスの導入・開発については、筋力低下をみるであろう D2-*mdx* の Rag2/Il2rg double knockout マウスが再生医療等研究に重要な役割を果たしていけることを期待し、作製を急ぎたい。最後に、*mdx* マウスの背景データは、特に D2-*mdx* マウスにおいて、若週齢から血漿 CpK 値の異常高値を伴った筋力低下を示し、筋ジストロフィーモデルマウスの表現型を反映させる結果であった。

参考文献

1. Fukada S., Morikawa D., Yamamoto Y., Yoshida T., Sumie N., Yamaguchi M., Ito T., Miyagoe-Suzuki Y., Kakeda S., Tsujikawa K., Yamamoto H. 2010. Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotymes. *Am J Pathol* 176: 2414-2424.

筋ジストロフィー治療方法開発へ向けた骨格筋再生療法の開発

氏　名　湯浅　慎介
所　属　慶應義塾大学医学部循環器内科

緒言

我々は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)受容体がマウス胎仔筋芽細胞において、また成獣における再生筋芽細胞において発現しており、G-CSF は筋芽細胞の増殖を促す作用を有することを報告してきた 1, 2)。本研究は、様々な筋肉疾患の中でも特に重篤で治療方法がないデュシェンヌ型筋ジストロフィーにおいて、G-CSF を投与することにより筋肉再生を促し、筋力回復および生命予後の回復を目指した骨格筋再生療法の開発を目的としている。

方法

マウス筋ジストロフィーモデルとして mdx マウスを用いて、G-CSF の作用を検証する。mdx マウスにおいて骨格筋傷害時における筋衛星細胞の挙動を検証し、G-CSF 受容体の発現を時間空間的に明らかにする。G-CSF 受容体が発現している時期に G-CSF を投与することにより再生に対する影響を検証する。具体的には再生骨格筋の数の変化、筋肉の大きさの変化、筋力の変化を検証していく。また G-CSF 受容体欠損マウスを用いることにより、G-CSF シグナルが無い場合の骨格筋の作用を検討することが可能となる。G-CSF 受容体欠損 mdx マウスは各々のマウスを交配することにより得ることが可能であり、G-CSF シグナルが筋ジストロフィーモデルマウスにおいて必須な因子であるかどうかを検討する。さらに臨床で用いられている持続型 G-CSF に関しても、通常の G-CSF と同様に、その効果と最適な投与量・投与間隔を検討していく。

結果

我々は mdx マウスを用いて、通常の G-CSF に加えて持続型 G-CSF の検討を行った。持続型 G-CSF の投与により、再生骨格筋数が増え、骨格筋量が増していた。持続型 G-CSF を用いることで注射回数を減らしても従来の G-CSF と同様に骨格筋再生促進作用を有することを明らかにした。

考察

我々は、これまで G-CSF の骨格筋再生促進作用と、筋ジストロフィーモデルに対する有効性を示してきた。G-CSF は化学療法後の白血球低下や末梢血へ造血幹細胞動員などの目的で、臨床で広く使用されている。現在は、PEG 化製剤である持続型 G-CSF が主流となり、単回投与でも長時間作用するように加工されている。患者の立場を考えると注射の頻度が減るので利便性は高まるので、その効果を検証する意義はある。我々は、骨格筋に対する G-CSF の新たな作用を発見しているが、持続型 G-CSF が同様に骨格筋再生促進作用を有するのかを検証する必要があり、本研究により確認された。今後、G-CSF を筋ジストロフィー患者に臨床応用する際には、G-CSF を長期にわたり投与する必要があるが、その投与頻度を減らすことが可能になることが示唆された。

結論

本研究により、持続型 G-CSF を用いることにより、従来型 G-CSF にくらべて注射回数は少なくしても、筋ジストロフィーモデルマウスにおいて骨格筋再生促進作用を有することが確認された。より詳細な条件検討を行い、臨床応用を推し進めることが望まれる。

参考文献

1) Hara M, Yuasa S, Shimoji K, et al. G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. *J Exp Med.* 2011 Apr 11;208(4):715-27.
2) Hayashiji N, Yuasa S, Miyagoe-Suzuki Y, et al. G-CSF supports long-term muscle regeneration in mouse models of muscular dystrophy. *Nat. Commun.* 2015 Apr 13;6:6745.

3　年　度　班

29-1　社会機能／QOL 改善と出口戦略を見据えた睡眠障害のクリニカルパスの開発

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所　睡眠･覚醒障害研究部
栗山　健一

総括研究報告

1. 研究目的

精神疾患に随伴する不眠症、過眠症（眠気）、概日リズム睡眠-覚醒障害（夜型生活や昼夜逆転）に対する効果的な睡眠障害用クリニカルパスを作成する。クリニカルパスには患者の要望が大きいshared decision makingと出口戦略（維持療法か治療終結かの判断）の視点を取り入れる。クリニカルパスを用いた睡眠医療によって患者の日常機能の大きな阻害要因である社会機能／QOL障害の向上に資するか検証する。研究事業は以下の３ステップで行う。

【睡眠障害による社会機能／QOL障害の実態調査】 睡眠障害による社会機能／QOL障害の同定に適した臨床評価尺度を選択・作成し、睡眠障害の存在が精神疾患患者の社会機能／QOL障害に及ぼす寄与度を明らかにするための多施設共同実態調査を行う。

【睡眠障害用クリニカルパスの作成】 睡眠症状と社会機能／QOL障害のアセスメント、治療、寛解・回復基準、減薬・休薬までの流れを明示的に示す睡眠医療クリニカルパスを作成する。そのために、不眠、過眠、睡眠リズム異常に対する薬物療法をベースとして、認知行動療法（CBT-I、CBT-R）を活用することでリスクベネフィットと社会機能／QOLの向上を図る診療マニュアルを作成する。

【検証試験】 NCNP病院および共同研究機関において、睡眠障害用クリニカルパスの有効性を検証する多施設共同試験を実施する。

2. 研究組織

主任研究者

栗山健一　国立精神・神経医療研究センター　精神保健研究所　睡眠･覚醒障害研究部

分担研究者

住吉　太幹　同センター　精神保健研究所　児童・予防精神医学研究部
三島　和夫　秋田大学大学院医学系研究科精神科学講座
亀井　雄一　医療法人超年会上諏訪病院
井上　雄一　公益財団法人神経研究所・研究部
稲田　健　東京女子医科大学医学部精神医学講座
内村　直尚　久留米大学医学部神経精神医学講座
内山　真　日本大学医学部精神医学系
吉村　篤　滋賀医科大学精神医学講座
高江洲義和　杏林大学医学部精神神経科学教室

3. 研究成果

I. 睡眠障害の社会機能／QOL 評価に関わる調査（住吉）

統合失調症患者における客観的社会機能尺度として国内外で標準的に用いられている Specific Levels of Functioning Assessment Scale (SLOF)の日本語版を作成し、上記の機能的転帰の各指標を用い、発症早期の患者におけるベースライン時及び 1 年後の社会機能転帰(SLOF で測定)を、特に、神経認知機能(The Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia: BACS)、日常生活技能(UCSD Performance-based Skills Assessment-Brief: UPSA-B)の各指標が予測するか検討した。その結果、ベースラインの SLOF 得点についての修正済決定係数は 0.218 であり、独立変数の中で BACS 得点のみ 1%水準で有意であった。1 年後の SLOF 得点については、修正済決定係数は 0.280 であり、BACS、UPSA-B の各得点が 5%水準で有意な予測変数であった。これらの結果は睡眠障害により生じる社会・認知機能障害を評価する上でも有用な所見となる。

II. 精神科領域における睡眠障害のクリニカルパス・診療マニュアルの作成

① CBT-I の開発 （三島・栗山）

睡眠スケジュール法、漸進的筋弛緩法を柱にしたCBT-I の実施マニュアル、ラーニングビデオは厚生労働科学研究事業で作成済みである。栗山らは、精神科医療の現場で活用可能な実施プログラムの作成を進め、集団作業療法で実施しうるプログラムに応用し、行動療法・作業療法的特性を場面に応じて活用可能な CBT-I プログラムの有効性検証を進めている。

② CBT-R の開発 （三島）

海外で発表された、睡眠・覚醒相後退障害（Delayed sleep-Wake phase Disorder : DSWPD）に対する認知行動療法プログラムや、時間生物学的治療として有効性が示されているクロノセラピーや高照度光治療法の応用可能性を検討した。また、就床・起床時刻のスケジューリング法（１～２週間単位での無理のない前進）を定式化し、睡眠・覚醒時間帯の遵守方法、光の利用法、睡眠衛生指導、薬物療法を含めた、一般精神科医、心理職、看護師、コメディカル等でも実施できる治療者用マニュアルを作成した。三島らは、DSWPD 患者を対象に本プログラムを実施し、ユーザビリティの連続例調査を行った。数例を対象とした結果から、本プログラムを実施することにより、睡眠薬を増やすことなく改善が認められることが推測された。今後は、DSWPD 患者を対象に本プログラムを用いた介入試験を行い、プログラムの妥当性や有効性の検証を行う必要がある。

III. 原発性および二次性（精神疾患）睡眠障害患者を対象にした多施設共同調査

（栗山、三島、亀井、井上、稲田、内村、内山、吉村、高江洲）

睡眠障害が社会機能（認知機能）、QOL を低下させる実態調査のための多施設共同プロトコルを完成させた。全共同研究施設の倫理申請を済ませ、調査を実施し、227 名がエントリーする調査を終了した。国立精神・神経医療研究センター病院には 75 名、秋田大学病院には 42 名、上諏訪病院には 12 名、神経研究所には 26 名、久留米大学病院には 3 名、日本大学病院には 13 名、滋賀医科大学病院には 29 名、東京女子医科大学病院には 5 名、杏林大学病院には 11 名の被検者が参加した。そのうち、原発性不眠症が 11 例、過眠症が 27 例、概日リズム睡眠・覚醒障害が 30 例、統合失調症が 28 例、大うつ病が 34 例、双極性障害が 23 例、不安障害が 17 例、健常対照が 46 例であった。全 227 名のうち、「同意撤回」、「脱落・中止」、「質問票への回答に欠損が多い」のいずれかに該当した計 11 名を除いた 216 名を解析対象とした。社会機能評価には、客観評価指標として Specific Levels of Functioning Scale（社会機能的転帰評価尺度 ; SLOF）、主観評価指標として WHO Disability Assessment Schedule2.0（WHODAS 2.0 ; WHO 障害評価 2.0）を用いた。認知機能の評価指標として Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia （統合失調症認知機能評価尺度 ; BACS）を用いた。生活の質（Quality of Life ; QOL）評価指標として Health Related Quality of Life（健康関連 QOL ; SF-8）を用いた。調査の結果、睡眠障害は社会機能・QOL 障害に関連し、精神疾患を合併することで障害度は高度になる傾向が明らかになった。また、不眠、過眠、睡眠-覚醒リズム障害といった睡眠症状の差異により、社会機能・QOL に及ぼす影響が異なることが明らかになった。

IV.まとめ

睡眠障害を有する精神疾患患者における社会機能／QOL の評価に際しては、精神疾患に共通して感受性を有する既存の社会機能（認知機能）、QOL 評価尺度を用いて評価を行うプロトコルを作成し、多施設共同調査を行った。調査の結果、睡眠障害によりもたらされる社会機能・QOL 障害の実態が明らかとなった。

CBT-I および CBT-R の最終プロトコルに基づく実施マニュアルを組み入れた睡眠医療クリニカルパスと診療マニュアルを作成し、社会機能／QOL、

治療アドヒアランスの向上をアウトカムにした多施設共同試験を行う予定であったが、実施に至らなかった。今後は、上記到達目標を、別プロジェクトの中で達成させることを目指す。

倫理面における配慮の状況（生命倫理・安全対策等の遵守）

研究の実施に当たっては、被験者の生命、健康、プライバシー及び尊厳を守ることを最優先として、「臨床研究に関する倫理指針」、国立精神・神経医療研究センター「ヒトを対象とする医学系研究に関する業務手順書」および「人体から取得された試料及び情報等の保管に関する手順書」に従って、研究の遂行ならびに個人情報の取り扱いを行っている。

研究成果

論文　　計（５９）件　うち査読付論文（４６）件

1. Yoshiike T, Kuriyama K, Nakasato Y, Nakamura M: Mutual relationship between somatic anxiety and insomnia in maintaining residual symptoms of depression. Journal of Behavioral and Cognitive Therapy 30(2):83-93, 2020.
2. Yoshiike T, Dallaspezia S, Kuriyama K, Yamada N, Colombo C, Benedetti F: Association of circadian properties of temporal processing with rapid antidepressant response to wake and light therapy in bipolar disorder. Journal of Affective Disorders 263: 72-77, 2020.
3. 栗山健一：ストレス障害と不眠【特集ストレスと睡眠】．ねむりとマネージメント 6(2)：20-23, 2019.
4. 栗山健一：ヒトの睡眠生理と高次脳機能．睡眠医療 13(3)：315-320, 2019.
5. Takaesu Y, Utsumi T, Okajima I, Shimura A, Kotorii N, Kuriyama K, Yamashita H, Suzuki M, Watana N,Mishima K.: Psychosocial intervention for discontinuing benzodiazepine hypnotics in patients with chronic insomnia: A systematic review and meta-analysis. Sleep Med Rev 48:101-214, 2019.
6. Ayabe N, Okajima I, Nakajima S, Inoue Y, Watanabe N, Yamadera W, Uchiyama M, Tachimoti H, Kamei Y, Mishima K: Effectiveness of cognitive behavioral therapy for pharmacotherapy-resistant chronic insomnia: a multi-center randomized controlled trial in Japan. Sleep Med 50:105-112, 2018.
7. Suzuki M, Furihata R, Konno C, Kaneita Y, Ohida T, Uchiyama M: Stressful events and coping strategies associated with symptoms of depression: a Japanese general population survey. Journal of Affective Disorders 238: 482-488, 2018.
8. Benedetti F, Avery D, Bauer M, Bunney W, Caliyurt O, Camardese G, Colombo C, Dallaspezia S, Henriksen TEG, Kasper S, Kuriyama K, Lam R, Martiny K, Meesters Y, Mishima K, Schulte P, Suzuki M, Swiecicki L, Uchiyama M, Veale D, Winkler D, Wu J, Yorguner Kupeli N: Evidence for the Efficacy of Bright Light for Bipolar Depression. Am J Psychiatry 175:905-906, 2018.
9. Furihata R, Konno C, Suzuki M, Takahashi S, Kaneita Y, Ohida T, Uchiyama M: Unhealthy lifestyle factors and depressive symptoms: A Japanese general adult population survey. Journal of Affective Disorders 234:156-161, 2018.
10. Habukawa M, Uchimura N, Maeda M, Ogi K, Hiejima H, Kakuma T: Differences in rapid eye movement (REM) sleep abnormalities between posttraumatic stress disorder (PTSD) and major depressive disorder patients: REM interruption correlated with nightmare complaints in PTSD. Sleep Med. 43:34-39, 2018.
11. Takaesu Y, Inoue Y, Ono K, Murakoshi A, Futenma K, Komada Y, Inoue T: Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders Predict Shorter Time to Relapse of Mood Episodes in Euthymic Patients With Bipolar Disorder: A Prospective 48-Week Study. Journal of Clinical Psychiatry 79: 17m11565, 2018.
12. Morita Y, Sasai-Sakuma T, Inoue Y: Effects of

acute morning and evening exercise on subjective and objective sleep quality in older individuals with insomnia. Sleep Med 34:200-208, 2017.

13. Okada M, et al. Reliability and validity of a brief sleep questionnaire for children in Japan. J Physiol Anthropol, 36: 35, 2017
14. Igaki M, et al. Effects of bedtime periocular and posterior cervical cutaneous warming on sleep status in adult male subjects: A preliminary study. Sleep and Biological Rhythms. 2017(in press)
15. Sumiyoshi T, et al. Reliability and validity of the California Verbal Learning Test-II - Japanese version. Psychiatry and Clinical Neurosciences. 71: 417-8, 2017
16. Morita Y, er al. Effects of acute morning and evening exercise on subjective and objective sleep quality in older individuals with insomnia. Sleep Med. 34: 200-8, 2017
17. Furihata R, Konno C, Suzuki M, Takahashi S, Kaneita Y, Ohida T, Uchiyama M. Unhealthy lifestyle factors and depressive symptoms: A Japanese general adult population survey. J Affect Disord.234:156-161,2018.
18. Ito W, Komada Y, Okajima I, Inoue Y. Excessive daytime sleepiness in adults with possible attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a web-based cross-sectional study. Sleep Med.32:4-9,2017.
19. Nakajima S, Komada Y, Sasai-Sakuma T, Okajima I, Harada Y, Watanabe K, Inoue Y. Higher sleep reactivity and insomnia mutually aggravate depressive symptoms: a cross-sectional epidemiological study in Japan. Sleep Med. 33:130-133,2017.
20. Sumiyoshi T, Toyomaki A, Kawano N, Kitajima T, Kusumi I, Ozaki N, Iwata N, Nakagome K. Reliability and validity of the California Verbal Learning Test-II - Japanese version. Psychiatry Clin Neurosci. 71:417-418,2017.
21. Sumiyoshi T, Toyomaki A, Kawano N, Kitajima T, Kusumi I, Ozaki N, Iwata N, Sueyoshi K, Nakagome K. Verbal memory impairments in bipolar disorder: Effect of type of word learning tasks. Psychiatry Clin Neurosci. 71:570-571,2017.
22. Takahashi H, Nakahachi T, Stickley A, Ishitobi M, Kamio Y. Stability of the acoustic startle response and its modulation in children with typical development and those with autism spectrum disorders: A one-year follow-up. Autism Res. 10:673-679,2017.

分担研究課題名：睡眠障害における社会機能・認知機能評価手法の確立

分担研究者：住吉太幹[1)]
研究協力者：吉村直記[2)]、白間　綾[1)]、末吉一貴[1)]、長谷川由美[1)]
所属施設： 国立精神・神経医療研究センター
1）精神保健研究所児童・予防精神医学研究部
2）病院・第一精神診療部

緒言

情報知覚、記憶、注意/集中、課題解決などの領域からなる認知機能(cognitive function)の障害が、精神疾患において注目されている。これは、認知機能が社会機能(social function; 個人がコミュニティーや社会的関係の中で相応の役割を果たすための機能) と強く関連することによる(Keefe ら 2006; 住吉 2015, 2017; 福島ら 2017)。例えば、睡眠障害を高率にきたす統合失調症患者では健常者と比較し、認知機能が-1～-2.5SD の低下しており、社会機能や生活の質 (QOL) に影響を与える(Keefe ら 2006; 住吉 2015, 2017; 福島ら 2017)。これまで分担研究者らは、統合失調症の認知機能障害の測定法として国内外で広く用いられている統合失調症認知機能簡易評価尺度 (Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia: BACS)、日常生活技能を測定する UCSD 日常生活技能簡易評価尺度 (UCSD Performance-based Skills Assessment-Brief: UPSA-B)、および面接法を用いた客観的社会機能尺度 Specific Levels of Functioning Assessment Scale (SLOF)の日本語版を作成した。今回、当センター病院の統合失調症早期診断・治療センター (EDICS) と協働し、上記の機能的転帰の各指標を用い、発症早期の患者におけるベースライン時及び 1 年後の社会機能転帰(SLOF で測定)を、特に、神経認知機能
(BACS で測定)、日常生活技能(UPSA-B で測定)の各指標が予測するか検討した。

方法

EDICS に登録されている早期 (発症後 5 年以内) 統合失調症患者 60 名を対象とした。ベースライン (EDICS 登録時) における BACS、 心の状態推論質問紙(Social Cognition Screening Questionnaire: SCSQ) (社会認知機能)、UPSA-B の各得点を独立変数、ベースラインと 1 年後における SLOF の評価者得点を従属変数とする重回帰分析を行った。

結果

ベースラインの SLOF 得点についての修正済決定係数は 0.218 であり、独立変数の中で BACS 得点のみ 1%水準で有意であった。一方、1 年後の SLOF 得点については、修正済決定係数は 0.280 であり、BACS、UPSA-B の各得点が 5%水準で有意な予測変数であった。

考察

本研究で得られた結果より、初期統合失調症患者の 1 年後の機能的転帰は、特に神経認知機能や日常生活技能により予測されると考えられる。

結論

今後は、さらに長期間の観察から得られるデータの解析、および、種々の社会認知機能を対象とした検討などが望まれる。

参考文献

1. Keefe RS, Bilder RM, Harvey PD, et al. Baseline neurocognitive deficits in the CATIE schizophrenia trial. Neuropsychopharmacology 31 : 2033-46, 2006
2. 住吉太幹: 統合失調症の神経認知機能障害: BACS による評価を中心に. 中村　純 編、「精神疾患のバイオマーカー」、星和書店、東京、p.85-95, 2015.
3. 住吉太幹 : 認知機能の簡便な測定法－基本的事項の確認－. 精神科 31:426-429, 2017
4. 福島和郎、末吉一貴、住吉太幹 : 異なる水準の社会機能の評価方法. 精神科 31:1-5, 2017
5. Sumiyoshi T, Nishida K, Niimura H, et al. Cognitive insight and functional outcome in schizophrenia; a multi-center collaborative study with the specific level of functioning scale-Japanese version. Schizophr Res Cogn. 6:9-14, 2016
6. Nishida K, et al. Social cognition and metacognition contribute to accuracy for self-evaluation of real-world functioning in patients with schizophrenia. Schizophr Res. 2018;202:426.

分担研究課題名：概日リズム障害・覚醒障害に対する認知行動療法プログラムの開発～ユーザビリティに関する実践報告～

分担研究者：三島和夫[1、2)]
研究協力者：綾部直子[2)]
所属施設： 1）秋田大学大学院医学系研究科精神科学講座、2）国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所睡眠・覚醒障害研究部

緒言

生体内の睡眠・覚醒リズム（体内時計）と、外部の明暗サイクルとの間にずれが生じることにより社会生活に支障が生じる「概日リズム睡眠・覚醒障害（Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders：CRSWD)」がある。CRSWDは、睡眠・覚醒リズムのパターンにより数種類に分類されるが、慣習上あるいは社会的に許容される睡眠時間帯より通常２時間以上相対的に後退するものを「睡眠・覚醒相後退障害（Delayed sleep-Wake phase Disorder：DSWPD)」と定義している。DSWPDは、学校や仕事の前夜に十分な睡眠時間を取るために必要な時間帯に入眠することや、通常の登校時刻や出勤時刻に起床することに対して著しい困難をきたすだけでなく、気分の低下や抑うつなど気分障害との合併のしやすさも明らかにされている。また、DSWPDは特に思春期から若年成人に多く、その有病率は７～16％とされているが[1]、根治は難しい。

概日リズム睡眠・覚醒障害に対しては、高照度光療法等の時間生物学的治療に、認知行動的アプローチを加えた心理社会支援の有用性が提唱されている[2]。しかしながら研究数は限られており、検証が十分とは言えない。そこで、昨年度はDSWPDに対する認知行動療法プログラムを構築しマニュアルを作成した。今年度は、概日リズム睡眠・覚醒障害を有する患者を対象に本プログラムを実施し、ユーザビリティの連続例調査を行った。

方法

代表的な症例を提示する。

症例：DSWPDを抱える50代女性

主訴：他院で不眠症だと診断され、長年睡眠薬を服用しているが眠れない。子どもの頃から朝起きられず遅刻が多かった。

介入前の睡眠覚醒リズム：1時ごろ就床するが、４～５時頃まで寝つけず、起床は正午近くになる生活を送っている。ICSD-3のDSWPDに回答した。

プログラム内容：海外で発表されたDSWPDに対する認知行動療法プログラム[3]や、時間生物学的治療として有効性が示されているクロノセラピーや高照度光治療法について、睡眠医療を専門とする精神科医と、臨床心理士２名で検討を行ったものである。以下からの内容から構成される。

① 概日リズム睡眠・覚醒障害に関する知識

② 治療概要

#0）治療導入・アセスメント：治療動機、罹患歴、社会生活への支障度、不眠症状、夜型の程度、生活環境（光暴露量)、服薬の有無等の確認事項

#1）睡眠衛生指導・心理教育：睡眠の仕組み、概日リズム睡眠・覚醒障害のメカニズム、睡眠衛生指導

#2）クロノセラピー：睡眠スケジューリングの定式化

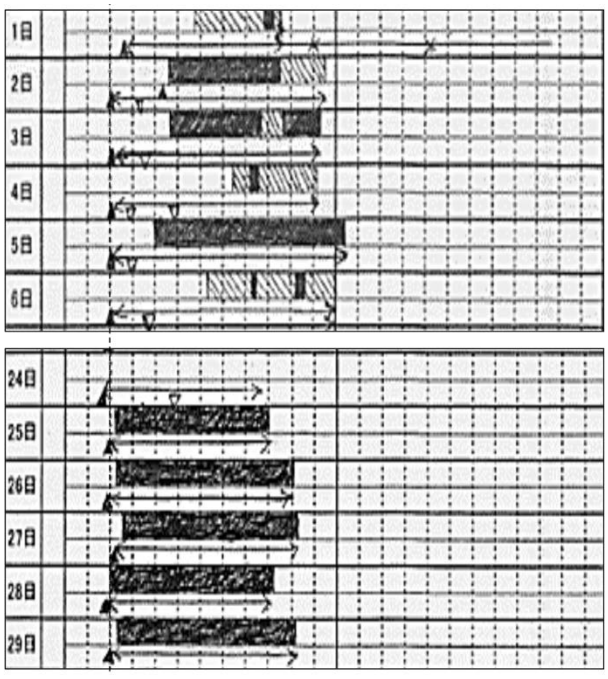
#3）リラクセーション：漸進的筋弛緩法、ストレス対処

#4）終結・再発予防：振り返り、再発リスクの検討

結果

介入前の睡眠表を見ると、睡眠薬を服用しても寝付くまでに２時間程度布団で悶々と過ごしているとのことであった。また、翌朝に用事があるときは徹夜をするためほとんど寝られない様子が伺えた。そこで、DSWPDに対する認知行動療法プログラムに則り、睡眠スケジュールとして、睡眠・覚醒リズムを毎週30分ずつ前進させていった。

その結果、治療を開始後、翌月後半には就床時刻が２時まで前進し、翌朝９時半頃に目覚まし時計で起床することができるようになった（図)。本人の報告からも、寝つきの改善と気分の安定が報告された。



考察

本症例では、長年睡眠薬を服用していたものの寝つきが改善されなかった患者に対して、DSWPDの心理教育および睡眠スケジュールのプログラムを実施することにより、睡眠薬を増やすことなく改善が認められた。

今後は、DSWPD患者を対象に本プログラムを用いた介入試験を行い、プログラムの妥当性や有効性の検証を行う必要がある。

結論

構築した概日リズム睡眠・覚醒障害に対する認知行動療法プログラムを患者に適用し改善を認めた。

参考文献

1. American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders–third edition (ICSD-3). Darien, IL: *American Academy of Sleep Medicine*; 2014.
2. Auger RR, Burgess HJ, Emens JS, Deriy LV, Thomas SM, Sharkey KM. Clinical Practice Guideline for the Treatment of Intrinsic Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders: Advanced Sleep-Wake Phase Disorder (ASWPD), Delayed Sleep-Wake Phase Disorder (DSWPD), Non-24-Hour Sleep-Wake Rhythm Disorder (N24SWD), and Irregular Sleep-Wake Rhythm Disorder (ISWRD). An Update for 2015: An American Academy of Sleep Medicine Clinical Practice Guideline. *J Clin Sleep Med*. 2015; 11(10): 1199-1236.
3. Jansson-Frojmark M, Danielsson K, Markstrom A, Broman JE. Developing a cognitive behavioral therapy manual for delayed sleep–wake phase disorder. *Cogn Behav Ther*. 2016; 45(6): 518-532.

分担研究課題名：精神神経疾患ににおける睡眠障害に伴う社会機能／QOL評価尺度の有用性の検証

分担研究者：　亀井雄一
研究協力者：　松本紀子、浜石千賀子、井上昭子
所属施設：　医療法人超年会　上諏訪病院

緒言

精神神経疾患では、不眠、過眠、睡眠-覚醒リズム障害などの睡眠障害が高率に認められる。睡眠障害の存在は原疾患の症状のみならず、社会機能/QOLも悪化させる。寛解期においても、残遺性の睡眠障害は高率に認められ、これが社会機能/QOLを低下させている可能性がある。そこで本研究では、精神神経疾患の治療ゴールである日中の社会昨日/QOLを改善させることを目標に、精神神経疾患に随伴する睡眠障害と社会機能/QOLの関連を検討する。

方法

(1) パーキンソン病 (PD) の社会機能/QOL と睡眠の関連を検討した。対象は、PD 患者 141 名 (男性 79 名、女性 62 名、平均年齢 68.7±8.7 歳) である。睡眠評価指標として、Insomnia Severity Index (ISI)、Epworth Sleepiness Scale (ESS)、Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI)、REM 睡眠行動障害の指標として RBD screening questionnaire (RBDSQ)、QOL の指標として SF-36 を、PD の重症度の指標として H-Y を用いて、QOL に及ぼす睡眠関連因子について解析した。

(2) 精神疾患の社会機能/QOL と睡眠の問題の関連について検討した。調査項目は、社会機能/QOL に関しては、Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia (BACS)、Japanese Adult Reading Test (JART)、Specific Levels of Functioning Scale (SLOF)、Sheehan Disability Scale (SDISS)、SF-8、睡眠問題に関しては、ISI、ESS、PSQI、Biological Rhythms Interview of Assessment in neuropsychiatry (BRIAN)、睡眠日誌、活動量計測定、などを実施した。

結果

(1) ISI の平均は 9.2±6.1、PSQI の平均は 6.9±3.4、SF-36 の身体的健康度 (PCS) の平均は 26.8±15.5、精神的健康度 (MCS) の平均は 46.9±10.8 であった。ISI が 8 点以上を示した人数は 81 人であり、全体の 57.4%であった。ISI が 8 点以上の不眠症 (+) 群と、8 点未満の不眠症 (-) の 2 群間で、年齢、H-Y 重症度、RBDSQ、SF-36 について比較した(対応のない t 検定)。その結果、年齢、H-Y 重症度、SF-36 PCS には変化は見られなかった。RBDSQ 得点は不眠症 (+) 群で有意に高く、SF-36 総得点、SF-36 MCS は、不眠症 (+) 群で有意に低かった。次に、SF-36 を従属変数、年齢、H-Y 重症度、RBDSQ、PSQI の下位項目得点を従属変数として重回帰分析を行った。その結果、PCS、MCS いずれの決定係数に有意差が見られた (PCS：R^2=0.21、p<0.01；MCS：R^2=0.27、p<0.01)。PCS では H-Y 重症度、MCS では H-Y 重症度、RBDSQ 得点、PSQI の下位項目のうち入眠時間、日中覚醒困難において標準偏回帰係数が有意であった (β= −0.31～0.23、p<0.01～p<0.05)。

(2) 対象患者 12 名で、双極 I 型障害 4 名 (男性 3 名 43 歳～53 歳、女性 1 名 44 歳)、統合失調症 5 名 (男性 1 名 57 歳、女性 4 名 30 歳～47 歳)、大うつ病性障害 3 名 (女性 3 名 25 歳～44 歳) である。ISI の平均は 10.3±6.1、8 点以上を示したのは 7 名 (58.3%)、15 点以上を示したのは 3 名 (25.0%) であった。ESS の平均は 7.6±4.6、11 点以上を示したのは 5 名 (441.7%) であった。PIQI の平均は、12.3±5.4、5.5 点以上を示したのは 10 名 (83.3%) であった。PSQI による、平均入眠潜時は 59.5±37.2 分、平均 1 日睡眠時間は 7.6±2.3 時間であった。健康関連 QOL の SF-8 による、身体的健康度 (PCS) の平均は 47.7±6.7、精神的健康度 (MCS) の平均は 37.0±7.1 であった。

考察

(1) PD 患者の約 57%が軽症以上の不眠症と考えられ、非常に多くの PD 患者が不眠症を並存していることが明らかになった。PD 患者における非運動症状、特に睡眠障害の並存は、QOL 障害を引き起こすことが指摘されている。本研究においても、不眠症状を並存した PD 患者では SF 36 の精神的健康度が有意に低く、不眠症は QOL 障害を引き起こしていた。PD 患者の QOL 障害に与える睡眠関連因子としては、寝つきまでの時間と日中の覚醒困難、であることが明らかになった。以上のことから、PD 患者の QOL を改善させるためには、不眠症状の中で、寝つきを良くすること、日中の覚醒度をあげること、が重要であることが分かった。この結果から、不眠症を並存する PD 患者に対する薬剤療法としては、翌日への持ち越し効果の少ない睡眠薬が重要であることになる。しかし、PD 患者の不眠症錠に対しては、夜間の転倒、幻覚、過鎮静、認知機能低下、などの副作用の点から、非薬物的治療が推奨されている。本研究の結果からは、寝つきを良くするためのリラクゼーションや就床時刻を遅くすること、日中の覚醒度を高めるための日中のエクササイズや短時間の昼寝の導入、などが効果的ではないかと考えられた。また、本格的な CBT-I なども考慮すべきではないかと考えられた。

(2) 精神疾患患者では、睡眠の問題が非常に多いことが再確認された。精神疾患患者の QOL であるので、精神的健康度のほうが身体的健康度より低いのは当然であるが、1 名で PCS が 32.5 と非常に低い値を示した患者がいた。この患者は統合失調症 (女性、30 歳) で、睡眠の問題として睡眠相後退と長時間睡眠を認めた。PSQI による平均就床時刻は 4 時、起床時刻は 19 時、平均睡眠時間は 13 時間であった。MCS、PCS ともに低く、SDISS 仕事/学業は 10 点、社会生活は 10 点、家庭内のコミュ

ニケーションや役割は7点、といずれの項目の支障度もきわめて高かった。この症例が、他の症例と大きく異なる背景として、他の精神疾患では不眠が併存しているのに対して、この症例では、概日リズム睡眠-覚醒障害と長時間睡眠を併存しているという点である。身体的 QOL の低下に概日リズム睡眠-覚醒障害と長時間睡眠のどちらが、または両方が関連しているかどうか検討すべき課題であると考えられる。

結論

精神神経疾患では、睡眠障害の併存が高く、QOL を悪化させる要因となっている。治療的介入のポイントを明確にすることが、QOL 改善につながる。

参考文献

1. Prakash KM et al : The impact of non-motor symptoms on the quality of life of Parkinson's disease patients : a longitudinal study. Eur J Neurol ;23:854-860, 2016.
2. Wulff K, et al : Sleep and circadian rhythm disruption in schizophrenia. British Journal of Psychiatry ;308-316, 2012.

分担研究課題名：睡眠障害に伴う社会機能／QOL 評価尺度の有用性の検証 CBT-I／プレゼンティーイズム
分担研究者：井上雄一
研究協力者： 岡島義、小林美奈、駒田陽子、高江洲義和（H29・30 年度)、尾棹万純（H30・R1 年度)、西澤（齋藤）若奈（H30・R1 年度)、神田優太（R1 年度)、萱場桃子（R1 年度)
所属施設： 公益財団法人神経研究所

緒言

不眠に伴う社会機能低下の評価は十分に行われておら ず、評価方法の確立が望まれる。また、機能障害が睡眠 により生じているのか睡眠以外の要因に起因しているの か十分に検討されていないことも問題点となる。勤労者 における社会機能評価の一つとして、presenteeism（出勤しているものの健康問題によって業務効率が低下してい る状態）による労働生産性の評価が行われている。先行研究では不眠と presenteeism との関連について報告されてはいるもの[1-3]、職種や交代制勤務、労働時間等の仕 事に関連した背景/要因はほとんど考慮されていない。そこで、当課題では、勤労者集団における労働生産性と関 連する職業特性・就業状況を特定し、不眠との関連につ いて検討することを目的とした。

方法

全国土木健康国民健康保険組合に加入している被保険者本人の健診時アンケート 22,903 例を分析対象とした。調査項目には、対象者の基本属性、仕事関連要因（職種、労働時間、夜勤を含む交代勤務の有無)、睡眠習慣（平日と休日の就寝時刻・起床時刻)、不眠症状の有無（不眠症状はありますか？ない / ある)、不眠症状（入眠困難、中途覚醒、早朝覚醒)、presenteeism （病気やけががない時に発揮できる仕事の出来を 100%として過去 4 週間の自身の仕事を評価してください。0%(悪い)～100%(良い)[4]を含む。

結果

１．対象者の特性と仕事関連要因

対象者の年齢は46.3±12.9 歳、男性86.4%、女性13.6%であった。69.7%の対象者が家族と同居していた。

職種は、ブルーカラー（現場勤務、現場監督）が 48%、 ホワイトカラー（設計職、営業職、事務職、管理職）が 52%であった。夜勤を含む交代勤務に従事している者は 7.0%、週の労働時間は 40 時間未満 17.2%、40-60 時間 66.5%、60-80 時間12.9%、80 時間以上2.3%であった。

２．睡眠習慣と不眠

平日の睡眠時間は 6.4±1.0 時間（平均就床時刻 23:31- 平均起床時刻5:55)、休日の睡眠時間は7.7±1.3 時間（平均就床時刻23:36-平均起床時刻7:19）であった。

不眠症状ありと回答したのは5,884 名(25.7%)であり、不眠症状の有症割合は入眠困難 8.3%、中途覚醒 15.0%、早朝覚醒11.4%であった。

３．Presenteeism との関連要因

「病気やけががない時に発揮できる仕事の出来を100% として過去 4 週間の自身の仕事を評価してください」という項目の回答「80%以上 (n=15,972)」 / 「80%未満 (n=6,155)」を説明変数としたロジスティック回帰分析を実施した結果、年齢（オッズ比, OR: 0.98, 95%信頼区間, 95%CI: 0.97-0.98)、睡眠時間 (OR: 1.03, 95%CI: 1.00-1.01)、女性 (OR: 1.1, 95%CI: 1.0-1.2)、ブルーカラー(OR: 1.4, 95%CI: 1.4-1.5)、交代勤務 (OR: 1.4, 95%CI: 1.2-1.5)、労働時間週「40-60 時間」 (OR: 0.8, 95%CI: 0.7-0.9)、労働時間「80 時間以上」 (OR: 1.4, 95%CI: 1.1-1.7)、不眠症状「入眠困難のみ」(OR: 1.7, 95%CI: 1.4-1.9)、「中途覚醒のみ」(OR: 1.8, 95%CI: 1.6-2.1)、「早朝覚醒のみ」(OR: 1.5, 95%CI: 1.3-1.7)、「入眠困難＋中途覚醒」(OR: 2.3, 95%CI: 1.8-2.8)、「入眠困難＋早朝覚醒」(OR: 1.8, 95%CI: 1.3-2.5)、「中途覚醒＋早朝覚醒」(OR: 1.9, 95%CI: 1.6-2.2)、「入眠困難＋ 中途覚醒＋早朝覚醒」(OR: 2.5, 95%CI: 2.0-3.3)において有意な関連がみとめられた。同居家族の有無では有意な関 連はみとめられなかった。

考察

不眠症状は構成症状一つ (OR: 1.5 ～1.8）でも presenteeism と関連するが、入眠困難＋中途覚醒 (OR : 2.3), 入眠困難＋中途覚醒＋早朝覚醒 (OR : 2.5)と症状の複合によりオッズ比が高くなること、すなわち不眠が重症であるほどpresenteeism が悪化することが示唆された。

結論

勤労者集団において、ブルーカラー、交代勤務、労働 時間とpresenteeism との間に関連がみとめられた。また、不眠症状と presenteesim にも関連がみられ、一般の勤労集団においても不眠症状改善の必要性が示唆された。本課題で得られた知見は、不眠に伴う社会機能の評価方法 を検討するうえでエビデンスとなり得る。これらエビデ ンスの蓄積は、新しい社会機能評価方法の確立に寄与す るものと期待できる。

参考文献

1. Espie CA, Pawlecki B, Waterfield D, et al. Insomnia symptoms and their association with workplace productivity: cross-sectional and pre-post intervention analyses from a large multinational manufacturing company. Sleep Health, 4 (3), 307-312, 2018.
2. Bolge SC, Doan JF, Kannan H, et al. Association of insomnia with quality of life, work productivity, and activity impairment. Qual Life Res, 18 (4), 415-422, 2009.
3. Kessler RC, Berglund PA, Coulouvrat C, et al. Insomnia and the performance of US workers: results from the America insomnia survey. Sleep, 34(9), 1161-1171, 2011.
4. Kessler RC, Barber C, Beck A, et al. The World Health Organization

Health and Work Performance Questionnaire (HPQ). Journal of Occupational and Environmental Medicine, 45 (2), 156-174, 2004.

分担研究課題名：睡眠障害に伴う社会機能／QOL 評価尺度の有用性の検証　依存・離脱症状
分担研究者：稲田健
所属施設：東京女子医科大学医学部精神医学講座

緒言

睡眠障害は、社会機能やQOLと大きく関係する重大な問題である。

睡眠障害の治療方法の一つである睡眠薬を用いた薬物療法では、ふらつきや転倒、認知機能障害、交通事故の増加などの問題が知られており、リスクとして長期使用が指摘されている。長期使用となる要因には、依存性や離脱症状の発現が考えられており、睡眠薬の適正使用を推進するためには、睡眠薬の減薬・離脱症状を把握し、対処することが必要である。そこで、本研究班の分担研究として、睡眠薬を適切に減薬・中止するための方法についての文献エビデンスレビューを行った。

エビデンスレビューの結果、ベンゾジアゼピン系睡眠薬については、心理社会的介入（文献1)、薬物療法的介入（文献 2）が様々な形で行われていることが明らかとなり、同時に、強いエビデンスを持った解決方法は存在せず、症例に合わせた様々な試みがなされていることがわかった。

また、文献的検討とは別に、多職種が連携してカンファレンスを開催することによって、ベンゾジアゼピン系薬の処方用量を減らし、適正試使用を推進することができることも示すことができた（文献3)。

検討を進める中で、睡眠障害の社会機能やQOLの障害は、睡眠障害そのものに起因する障害と薬物療法によって引き起こされる障害が混在している可能性が考慮された。したがって、睡眠薬による薬物療法をいつまで継続するのかという出口戦略を考える際には、睡眠障害と薬物療法による副作用の両者について考える必要がある。上記の通り、減薬を行う際の介入としては、様々なものが検討されているが、睡眠障害の社会機能評価と依存や離脱症状との関連は明らかではない。これらの実態を把握することによって、減薬の介入がより安全に行える可能性がある。

そこで、本研究において、睡眠障害の社会機能評価と依存・離脱症状評価尺度の関係を解析し、社会機能障害の実態を明らかにすることを目指した。

方法

多施設共同研究として、睡眠障害に伴う社会機能/QOL評価尺度の有用性の検討をおこなった。

対象は、東京女子医科大学病院神経精神科および他の共同研究施設に通院中の患者で不眠症、過眠症、概日リズム障害、統合失調症、大うつ病、双極性障害、不安障害と診断されたものとした。

睡眠状況は、アクチグラフによる客観的評価と自記式睡眠表による主観評価を行った。社会機能、認知機能、QOL 等については、自記式評価尺度と対面式面接による評価を行った。依存の評価尺度は Benzodiazepine dependence self-Report Questionnaire (Bendep-SRQ)、離脱症状の評価尺度は、ベンゾジアゼピン系睡眠薬離脱症状スケール（Bbenzodiazepine hypnotics withdrawal scale: BHWSS）を用いた。

結果

多施設共同研究のデータ収集を完了した。データの整理、解析は現在進行中である。

今後

多施設共同研究のデータ収集を完了した。今後、解析を行い、依存・離脱症状と社会機能関連を明らかにし、睡眠薬の減薬・中止方法についてのエビデンスレビューと併せて、妥当性のある減薬・中止方法につなげていくことが望まれる。

参考文献

1. Baandrup L, Ebdrup BH, Rasmussen JO, et al. Pharmacological interventions for benzodiazepine discontinuation in chronic benzodiazepine users. The Cochrane database of systematic reviews. 2018;3:Cd011481.
2. Darker CD, Sweeney BP, Barry JM, et al. Psychosocial interventions for benzodiazepine harmful use, abuse or dependence. The Cochrane database of systematic reviews. 2015(5):Cd009652.
3. Geka M, Inada K, Shimizu S, et al. Effectiveness of Pharmacist-convened Multidisciplinary Clinical Team Meetings in Promoting Appropriate Benzodiazepine Receptor Agonist Use. YAKUGAKU ZASSHI. 2019;139(6).

分担研究課題名：過眠症における社会機能／QOL 評価尺度の作成と検証
分担研究者：内村直尚
研究協力者： 小曽根　基裕、小鳥居望、土生川光成、比江嶋啓至、森裕之、和佐野研二郎、大島勇人、加藤隆郎、兵頭佑規、瀧井稔
所属施設： 久留米大学　神経精神医学講座

緒言

かつて、睡眠クリニックを訪れる患者の大部分は不眠症患者であったが、最近では、昼間の眠気を訴えて多くの過眠症患者が来院するようになった。眠気の要因は、ナルコレプシーや特発性過眠症といった原発性過眠症から、睡眠不足によるもの、睡眠時無呼吸症候群や Restless Legs Syndrome などの睡眠随伴疾患あるいは脳血管障害、腫瘍、頭部外傷、あるいはパーキンソン病などの変性疾患が背景にある場合など多岐に渡る。さらに気分障害を始め多くの精神疾患においても過眠を呈する患者は多く、残遺症状として多く残り、患者の社会機能と QOL を貶め、それ自体が再発のリスクファクターになりえる。これらの過眠症状の本態もやはり生活機能障害であり、臨床転帰を向上させるには日中の眠気の軽減に止まらず、社会機能と QOL の改善が必須である。よって診断と治療効果判定の際にも睡眠･覚醒症状に加えて、社会機能（認知機能）および QOL の側面からディメンジョナルな評価が求められる。しかしながら、現状の睡眠医療では、睡眠症状ベースでのカテゴリカル診断と薬物療法を中心にした初期治療（治療導入期）に基づくガイドラインしかなく、社会機能と QOL の向上を評価指標としたディメンジョナル診断の視点に欠けている。また、薬物療法の継続期間、減薬･休薬基準、日中の眠気の軽減や身体合併症の予防を目的とした睡眠衛生指導や認知行動療法の活用など、リスク管理を取り入れたクリニカルパスが存在しない。そこで、過眠症状に対して適切なタイミングで介入し、生活機能障害の軽減に導き、慢性経過を辿るのであれば安全で効率的な維持療法を提供するための実用的な治療マニュアルとして、診断治療ガイドラインとクリニカルパスの作成をすることが、当研究の目的である。

方法

下記 2 つの目標を立て、研究を行った。

①過眠症状に対して従来から実施されている診断と薬物療法の再評価を行う。他疾患担当の分担研究者と協同し、疾患横断的なアセスメント、治療ガイドラインのアップデートおよび、主要な精神機能ドメインのアセスメントツール作成を行う。

②過眠障害のクリニカルパス作成に向け、原発性過眠症及び 2 次性過眠症に共通する過眠症状の特性を考慮し、社会機能／QOL 障害の評価尺度、治療抵抗例の定義と非薬物療法による補完・併用療法（認知行動療法を含む）のマニュアルを作成し、クリニカルパスに反映する。治療抵抗性を予測する臨床尺度基準（カットオフ）の検索を並行して行う。

①、②の目標を達するために、先行文献レビューを行い、過眠性障害に共通する生活機能障害の特徴を明らかにし、他疾患担当の分担研究者と協議を行い、共通項目、特異的項目を検討した。

アセスメントの中核となる社会機能／QOL 障害の評価尺度については、1997 年以降に過眠症及び睡眠時無呼吸症候群患者の社会機能／QOL を評価した主要な論文 30 編をピックアップし、その評価方法を検討した。30 編中、2 編以上に使用された評価尺度を挙げると、約半数の 14 編では 36-Item Short Form（SF-36）[1)-14)]が、5 編に Functional Outcomes in Sleep Questionnaire (FQSQ)[14)-18)]が、4 編では SF36 の短縮版である 12-Item Short Form（SF-12）[17)19)20)21)]が、3 編に the Quebec Sleep Questionnaire (QSQ)[14)18)22)] が、2 編に The Calgary Sleep Apnea Quality of Life Index[17)25)]と a questionnaire adapted for adolescents (VSP-A)[23)24)]が使用されていた。

SF-36 で評価されたナルコレプシー患者では、全 8 領域で低下するが、中でもエネルギー/生命力と社会的機能化の領域に低下が認められた。眠気を反映する ESS スコアとは「自身の仕事予定の制御」、「症状によるパートナーとの離婚や別れ」、「症状による転職」、「他者からのサポートの認知」などの項目で関連が認められた。また気分状態も HRQoL に負の影響をもたらした。まだ SAS における HRQoL の予測因子として、うつ病スコアは SAS の重症度よりも鋭敏であった。また 3 か月の CPAP 治療は眠気とともにうつ病症状や HRQoL も改善させた。SF-36,SF-12 を使用した多くの研究では天井効果がその limitation として記載されていたが、身体的、心理的、社会的な領域に亘ってスコアリング可能であり、過眠症の他に気分障害や統合失調症、不安障害などの疾患、さらには健常対象群を対象とする本研究においては、包括的尺度であり、その信頼性と妥当性が証明されている SF-36 ないし SF-12、SF-8 が最適と判断した。また、本研究では HRQoL の他にも共通評価項目として、社会機能(SLOF、SDISS)、認知機能(BACS、JART25)、精神症状重症度評価(PHQ-9)などもあわせて評価するため、患者の負担を考慮して回答項目を絞った SF-8 を選択することとした。また、HRQoL とよく関連する「眠気」と「うつ症状」については、それぞれ疾患共通評価尺度として、ESS と PHQ-9 を評価することとした。

これらの協議の元､用いる評価尺度の共通項目を PSQI、ISI、ESS、BRIAN、PHQ-9、SLOF、SDISS、WHODAS、BACS、JART25、SF-8、HAS に決定し、診断治療ガイドラインとクリニカルパスの作成に向けて、まずは疾患横断的な社会機能／QOL 評価のアセスメントのため､症例組み入れを行った。過眠症については疾患特異的な項目は追加しなかった。尚、リクルート範囲の限界を配慮して、症例の登録においては、各研究分担施設担当の疾患

にとどまらず、全ての分担施設がすべての研究対象疾患の登録を順次行うこととした。

結果

共有された集計データ（アップロード済のものに限る）によると、BACS の結果では統合失調症でのスコア低値が明らかであり、相応の妥当性を持つデータであることが分かった。以下、解析途中の概略であるため、詳細な数値や統計学的解析は未。

過眠症のデータについて健常群と比較すると、ESS においては不眠症と並んで高値であった。BACS においては数字順列やトークン運動課題でパフォーマンス低下を認めた。社会機能評価尺度については、客観的な評価である SLOF については大差なかったが、主観的な評価である WHODAS と SDISS においては健常群より高値であった。SF8 では、他疾患群ほどではないが健常群より低値を示した。PHQ-9 と HAS においては、健常人と比較して高値であった。PSQI では、日中の覚醒障害や睡眠時間が高値の他、睡眠の質の障害も高値であった。一方、睡眠効率の障害は健常人より低値であった。ISI においては、不眠症群や概日リズム障害群程ではないが、健常群と比較すると高値であった。他、JART、BRIAN においては、健常群と明らかな差は認められなかった。

考察

BACS でのパフォーマンス低下は日中の眠気を反映したものであると考えられる。ISI が健常群より高値であったのは、睡眠パターン、日中の機能障害や QOL の項目を含むため眠気が反映された結果と考える。PSQI で睡眠効率や睡眠時間に問題がない一方で熟眠感に乏しい結果を示したことは、日中の眠気が関連していると考える。過眠症において、日中の強い眠気によって、パフォーマンスが低下し、それが社会機能低下に影響し、そのことで不適応的にうつ状態や不安症状に繋がっていく構図が示唆されたものと考える。中でも、同じ社会機能障害を示す SLOF が健常群とあまり差がない一方で、WHODS、SDISS においては健常群より高値であったことは興味深い。これには、SLOF が技能評価の側面があることや「周囲にどれだけ援助を要したか」でスコア化するのに対して、WHODS、SDISS は主観的な「困難さ」や「支障の度合い」について問うものであるためと考えられる。これには、過眠症における一般社会の疾病認知や理解が乏しく、また技能的な障害をきたしにくいため、周囲に援助を求めにくく、自身での問題解決を迫られている現状も関連していると想像する。

結論

今回の研究期間において、当初の目的であった治療ガイドラインやクリニカルパス作成の段階まで進めることは出来なかった。ただ、過眠障害における社会機能／QOL 評価尺度の検証を、SF-8 のみでなく、PHQ-9 や SLOF、SDISS などを行うことで補いつつ身体的、心理的、社会的領域に特化したより詳細にスコアリングを多角的に行うことが出来た。前述の先行研究では、過眠障害において、一次性、二次性に関わらず、身体的、心理的、社会的領域の全てにわたって機能が障害され、眠気や SAS など一次的な治療ターゲットは疾患によって違うものの、治療により最終的には「眠気」の改善を経て、うつ病症状とともに HRQoL が改善に向かう傾向が示されており、今回の研究結果を礎として、過眠症の改善による社会機能改善の評価方法を模索する段階に研究が進展することが望まれる。

参考文献

1. David A,et al.:Health-related quality of life in Portuguese patients with narcolepsy.Sleep Med,2012
2. Yang EH,et al.:Sleep apnea and quality of life.Sleep,2000
3. Daniels E,et al.:Health-related quality of life in narcolepsy.J Sleep Res,2001
4. Becker PM,et al.:Effect of modafinil on fatigue, mood, and health-related quality of life in patients with narcolepsy. Psychopharmacology(Berl),2003
5. Goncalves MA,et al.:Obstructive sleep apnea syndrome, sleepiness, and quality of life.Chest,2004
6. Ervik S,et al.:Health-related quality of life in narcolepsy.Acta Neurol Scand.2006
7. Hassan A.,et al.:Sleepiness, Quality of Life, and Sleep Maintenance in REM versus non-REM Sleep-disordered Breathing AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE,2010
8. Ozaki A,et al.:"Quality of life in patients with narcolepsy with cataplexy, narcolepsy without cataplexy, and idiopathic hypersomnia without long sleep time:comparison between patients on psychostimulants, drug-naive patients and the general Japanese population."Sleep Med,2011
9. Bilgic A,et al.:Daytime sleepiness and quality of life in peritoneal dialysis patients.Ther Apher Dial,2011
10. Campbell AJ,et al.:"Narcolepsy in New Zealand:pathway to diagnosis and effect on quality of life."N Z Med J,2011
11. Vignatelli L,et al.:A 5-year prospective cohort study on health-related quality of life in patients with narcolepsy.Sleep Med,2011
12. Wu, Rui Wang,et al.:Excessive daytime sleepiness assessed by the Epworth Sleepiness Scale and its association with health related quality of lifeBMC Public Health,2012
13. Dodel R,et al.:Health-related quality of life in patients with narcolepsy.Sleep Med.2007
14. Catalan P,et al.:Internal consistency and validity of the Spanish version of the "Quebec Sleep

Questionnaire"quality-of-life questionnaire for obstructive sleep apnea.Arch Bronconeumol.2011
15. Weaver TE,et al.:A randomized trial evaluating the effectiveness of sodium oxybate therapy on quality of life in narcolepsy.Sleep,2006
16. Barbara Riegel,et al.:"Double jeopardy:the influence of excessive daytime sleepiness and impaired cognition on health-related quality of life in adults with heart failure"European Journal of Heart Failure,2012
17. Rahavi-Ezabadi S,et al.:Translation, cultural adaptation, and validation of the Sleep Apnea Quality of Life Index (SAQLI) in Persian-speaking patients with obstructive sleep apnea.Sleep Breath,2015
18. Stucki A,et al.:Content comparison of health-related quality of life instruments for obstructive sleep apnea.Sleep Med.2007
19. Pamidi S,et al.:"Depressive symptoms and obesity as predictors of sleepiness and quality of life in patients with REM-related obstructive sleep apnea: cross-sectional analysis of a large clinical population."Sleep Med.2011
20. Amador-Licona Net al.:"Daytime sleepiness and quality of life:are they associated in obese pregnant women?"Arch Gynecol Obstet.2012
21. Jimenez KM et al.:Val158Met polymorphism in the COMT gene is associated with hypersomnia and mental health-related quality of life in a Colombian sample. Neurosci Lett.2017
22. Campos-Rodriguez F,et al.:Continuous Positive Airway Pressure Improves Quality of Life in Women with Obstructive Sleep Apnea.J Respir Crit Care Med.2016
23. Maurice M,et al.:The Link Between Excessive Quantity of Sleep and Deteriorated Quality of Wakefulness.Implications for the DSM-5 Ann Neurol,2013
24. Inocente CO,et al.: Quality of life in children with narcolepsy.Maurice,2014
25. Flemons WW,et al.:Quality of life consequences of sleep-disordered breathing.J Allergy Clin Immunol,1997

分担研究課題名：
社会機能/QOL 改善と出口戦略を見据えた気分障害に併存する睡眠障害のクリニカルパスの開発
分担研究者：内山 真
研究協力者：鈴木正泰、金子宜之、斎藤かおり
所属施設： 日本大学医学部精神医学系精神医学分野

緒言

気分障害においては、80%以上の患者で不眠を認め[1]、10~20%の患者で過眠を認める[2]。その他、概日リズム睡眠・覚醒障害[3]やレストレスレッグス症候群などの睡眠関連運動障害[4]の併存も多いことが知られている。このように気分障害では睡眠障害の併存を高率に認め、これらによって患者の社会機能（認知機能）／QOL は大きく押し下げられている可能性があるが、その実態は明らかにされていない。

睡眠障害の本態は日中の機能障害であり[5]、臨床転帰を向上させるには睡眠症状の軽減のみならず、社会機能と QOL の改善が必須である。しかしながら、現在、気分障害の併存睡眠障害に限らず、睡眠障害治療において、社会機能と QOL の向上までを視野に入れた治療戦略は取られていない。

このような背景から、本研究では、社会機能と QOL の向上を視野に入れた気分障害に併存する睡眠障害のクリニカルパス開発を最終目標とする。それにあたり、2019 年度は、気分障害における併存睡眠障害の社会機能および QOL への影響に関する実態調査を多施設共同研究として行なった。

方法

本研究事業では、個々の分担研究毎にクリニカルパス開発を担当する疾患が定められているが、限られた研究期間内に効率的にデータを収集するため、担当疾患に関わらず、全参加施設（9 施設）で以下の対象のデータ収集を行なった。実施に当たっては、事前に日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得た（RK-181113-4）。

対象

成人の原発性および二次性睡眠障害患者（不眠症、過眠症、概日リズム睡眠-覚醒障害）。二次性睡眠障害とは精神疾患（統合失調症、気分障害、不安障害）に伴う睡眠障害である。

調査内容

一般的な臨床情報（性・年齢、診断名、服薬内容など）、睡眠障害の主観的重症度（PSQI、ISI など）、睡眠障害の主観的重症度（アクチグラフを 2 週間計測）、精神疾患の重症度（疾患に応じた評価尺度を使用。気分障害では QIDS-J および PHQ-9）、社会機能（SLOF など）、認知機能（BACS）、QOL（SF-8 など）、プレゼンティーイズム（WLQ）

結果

研究期間内に全施設で 200 例超のデータを収集した。日本大学においては、精神疾患患者のデータ収集を重点的に行い、大うつ病性障害 6 名、双極性障害 3 名、統合失調症 4 名、不安障害 2 名、不眠症 1 名のデータを収集した。

考察

2016 年に改訂された日本うつ病学会治療ガイドラインに「うつ病患者の睡眠障害とその対応」が加えられた。しかし、現状では、睡眠症状ベースでのカテゴリカル診断と薬物療法を中心にした治療導入期のガイドラインしかなく、社会機能と QOL の向上を評価指標としたディメンジョナル診断の視点は欠けている。

今後、今年度に得られたデータを用いて、睡眠障害の存在が気分障害患者の社会機能（認知機能）／QOL 障害に及ぼす寄与度を明らかにする予定である。その上で、睡眠症状と社会機能／QOL 障害のアセスメント、治療、寛解・回復基準、減薬・休薬までの流れを明示的に示すクリニカルパスを作成する。

結論

社会機能と QOL の向上を視野に入れた気分障害に併存する睡眠障害のクリニカルパス開発のための基礎データの収集を行った。

参考文献

1. Sunderajan P et al：Insomnia in patients with depression: a STAR*D report. CNS Spectr 2010；15：394-404.
2. Reynolds CF, 3rd and Kupfer DJ：Sleep research in affective illness: state of the art circa 1987. Sleep 1987；10：199-215.
3. Takaesu Y et al：Circadian rhythm sleep-wake disorders as predictors for bipolar disorder in patients with remitted mood disorders. J Affect Disord 2017；220：57-61.
4. Koo BB et al：Restless Legs Syndrome and Depression: Effect Mediation by Disturbed Sleep and Periodic Limb Movements. Am J Geriatr Psychiatry 2016；24：1105-1116.
5. American Academy of Sleep Medicine, International Classification of Sleep Disorders. 3rd ed. 2014, Darien, IL: American Academy of Sleep Medicine.

分担研究課題名：睡眠障害に伴う社会機能／QOL 評価尺度の有用性の検証−不安障害に伴う睡眠障害
分担研究者：吉村 篤　（栗山 健一　2019 年 1 月交代）
研究協力者：眞田 陸、角 幸頼、藤井 彰夫、金尾 亮、上西 祐輝、松田 有史、小泉 葉月、河村 葵
所属施設：滋賀医科大学

緒言

近年、種々の精神疾患からのリカバリーにおいて、社会機能/QOL 障害に対する評価・介入が重要視されている。実臨床では精神疾患に合併する睡眠障害が社会機能/QOL 低下の主要因もしくは増悪因子として注目されているものの、睡眠障害に対する標準化された社会機能/QOL 評価尺度は未だ確立されていない。

不安障害及び外傷性ストレス障害(PTSD)をはじめとするストレス関連障害(SRD)が、睡眠障害を高率に合併することは周知の事実であり[1]、全般性不安障害、急性ストレス障害や PTSD に至っては、Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 第 5 版において、その診断基準に睡眠障害に関連する項目が含まれる。不安障害及びSRD 患者の睡眠障害に伴う社会機能/QOL 障害を正確かつ詳細に把握することは、リカバリーを念頭においた治療ターゲットを浮き彫りにする上で非常に有用である。

本研究では、不安障害及び SRD に随伴する睡眠障害における適切な介入・治療をシステマチックに模索し、治療介入戦略の開発につながるディメンジョナルな評価を開発することで、不安障害、SRD 患者の社会機能／QOL を向上させる可能性を検討することを目標においた。

方法

① 新規の評価尺度を作成するにあたり、不安障害や SRD に随伴する睡眠障害に関する既知の病態生理及びそれに基づいた治療戦略について文献検索を行った。

② 不安障害及び SRD を含む代表的な種々の精神障害・睡眠障害を対象とした社会機能／QOL 評価尺度開発にあたり作成された、共通研究計画に則り、評価尺度の標準化を目的とした多施設共同調査を施行した。社会機能／QOL 障害の客観性を担保するために、他疾患担当の分担研究者と協同して共通尺度及び共通アセスメントツールを開発し、疾患特異的な症状評価に関しても、全施設共通の症状評価尺度を用いた評価を行った。

種々の精神障害・睡眠障害患者（目標数 210 名）及び健常者（目標数 50 名）を対象とした本調査において、当施設では、精神障害・睡眠障害患者の評価を担当し、評価目標数を 30 名と設定した。

本調査は、滋賀医科大学倫理審査委員会にて審査・承認を受け、実施された。

結果

① 不安障害、SRD に合併する睡眠障害の多くは不眠症状であり、これは就寝前の不安・緊張が睡眠に影響を及ぼす結果と考えられている[1-3]。さらに、SRD に特有の睡眠症状として、悪夢が挙げられ、これは睡眠ポリグラフィーを用いた研究で見出されているレム睡眠の増加と関連し、かつ心的外傷体験の侵入性想起と関連した症状であると理解されている[4-6]。不安障害、PTSD はストレス記憶の過剰想起と消去障害を中核病理とし、ストレス記憶消去を促進し再学習を促す暴露型認知行動療法が本質的治療手法として高い治療成績を示す[7]。不安障害、PTSD に併発する睡眠障害は、PTSD の治療に伴い改善が期待できる可能性があるが[8]、一部不安症状、PTSD 症状が軽減した後も頑固に残存するケースも少なからず存在する[9]。睡眠中にストレス記憶の消去学習が促進されることが指摘されており[10-12]、遷延する不眠症状が不安障害、PTSD 慢性化の主因となることが指摘されている。さらに社会機能／QOL を低下させる一因である悪夢症状に関しては、不安障害、PTSD の中核症状の一表現型であると考えられているが、病態促進作用を有することが推測されている[13,14]。不安障害、SRD 合併不眠症状に対しては、睡眠薬や不眠を標的とした認知行動療法が、不眠の改善とともに不安・SRD 症状の軽減にも寄与するとされる報告もある[1,15]。

② 当施設で治療を受ける種々の精神障害・睡眠障害患者 30 名のデータを開発した共通尺度及び共通アセスメントツールを以て収集し、主幹施設と共有した。

考察・結論

不安障害及び SRD の疾患特異的な病態と睡眠障害をもたらす病態との病態生理的差異・関連性に関しては明確な結論が出ていない。不安障害、SRD における不眠の病態生理は、慢性(原発性)不眠と共通点が多く、ストレス因の遷延に基づく過覚醒を背景に持つと考えらえる。不安障害及び SRD に残存する不眠症状に対しては原疾患特異的な治療に加えて、慢性不眠症に準じた治療が奏功し、かつ不眠の治療が原疾患の症状を軽減し、社会機能／QOL を改善する可能性がある。

今後、他疾患担当の分担研究者と協同の下、収集したデータの解析・解釈をすすめることで、社会機能／QOL 障害の評価尺度の標準化のみならず、不安障害及び SRD に対する有用なクリニカルパス作成につながることが期待される。また、本研究成果は、不安障害及び SRD と慢性(原発性)不眠症患者をはじめとする睡眠障害の病態相互作用に関する理解を促進させうる。

参考文献

1. Michael R. Dolsen, Lauren D. Asarnow, Allison G.

Harvey: Insomnia as a Transdiagnostic Process in Psychiatric Disorder. Curr Psychiatry Rep: September 16(9): 471, 2014
2. Mochcovitch MD, da Rocha Freire RC, Garcia RF, et al: A systematic review of fMRI studies in generalized anxiety disorder: evaluating its neural and cognitive basis. J Affect Disord: 167:336-42, 2014
3. Mellman TA, Kulick-Bell R, Ashlock LE et al: Sleep events among veterans with combat-related posttraumatic stress disorder. Am J Psychiatry; 152: 110–115, 1995
4. Spielman AJ, Nunes J, Glovinsky PB: Insomnia. Neurol Clin; 14 : 513-543, 1996
5. Woodward SH, Arsenault NJ, Murray C et al: Laboratory sleep correlates of nightmare complaint in PTSD inpatients. Biol Psychiatry; 48 : 1081-1087, 2000
6. Mellman TA, Nolan B, Hebding J, et al: A polysomnographic comparison of veterans with combat-related PTSD, depressed men, and non-ill controls. Sleep: Jan;20(1):46-51, 1997
7. Schnyder,U., Ehlers,A., Elbert,T. et al.: Psychotherapies for PTSD: what do they have in common? Eur, J, Psychotraumatol.,6:28186,2015.
8. Cook JM, Harb GC, Gehrman PR, et al: Imagery rehearsal for posttraumatic nightmares: a randomized controlled trial. J Trauma Stress; 23 : 553-563, 2010
9. Zayfert C, DeViva JC: Residual insomnia following cognitive behavioral therapy for PTSD. J Trauma Stress: 17 : 69-73, 2004
10. Kuriyama,K., Honma,M., Yoshiike,T. et al.: Memory suppression trades prolonged fear and sleep-dependent fear plasticity for the avoidance of current fear. Sci, Rep.,3:2227,2013.
11. Pace-Schott,E.F., Milad,M.R., Orr,S.P. et al.: Sleep promotes generalization of extinction of conditioned fear. Sleep.,32:19-26,2009.
12. Pawlyk,A.C., Jha,S.K., Brennan,F.X. et al.: A rodent model of sleep disturbances in posttraumatic stress disorder: the role of context after fear conditioning. Biol, Psychiatry.,57:268-277,2005.
13. Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep. Nat Rev Neurosci; 11 : 114-126, 2010
14. van der Helm E, Yao J, Dutt S, et al: REM sleep depotentiates amygdala activity to previous emotional experiences. Curr Biol: 21 : 2029-2032, 2011
15. Talbot LS, Maguen S, Metzler TJ, et al: Cognitive behavioral therapy for insomnia in posttraumatic stress disorder: a randomized controlled trial. Sleep: 37 : 327-341, 2014

分担研究課題名：睡眠障害による社会機能／QOL 障害の実態調査
分担研究者：栗山健一
研究協力者：綾部直子、吉村道孝、北村真吾、吉池卓也
所属施設： 国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所睡眠・覚醒障害研究部

緒言

睡眠障害におけるもっとも重要な治療アウトカムは日中機能の障害であり、臨床転帰を向上させる上では睡眠症状の軽減よりむしろ、社会機能（認知機能）と QOL の改善が重要である。社会機能（認知機能）および QOL の評価は多くの睡眠障害の国際診断基準で共通して求められているが、標準化され臨床に広く用いられている評価尺度はない。そのため、睡眠障害の存在が患者の社会機能（認知機能）／QOL を低下させる実態が明らかになっていない。特に睡眠障害の合併率が高い精神疾患患者では、精神疾患自体により低下する上記障害との関連に注目が集まっている。

本研究では、1）原発性不眠症、過眠症、概日リズム睡眠-覚醒障害患者、2）睡眠障害を合併する精神疾患患者、3）健常対照成人を対象にした多施設共同調査により、睡眠障害により生じる社会機能（認知機能）／QOL 障害の実態を明らかにする。

方法

1）調査対象者

同意取得時において年齢が 20 歳以上 59 歳以下で次のいずれかに該当する者：a）原発性不眠症、b）過眠症、c）概日リズム睡眠-覚醒障害患者、d）大うつ病、e）統合失調症、f）双極性障害、g）不安障害、h）健常対照成人

なお、患者（a～g）については、本研究に参加する 9 施設（国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター病院、秋田大学病院、医療法人超年会上諏訪病院、公益財団法人神経研究所、久留米大学病院、日本大学病院、滋賀医科大学病院、東京女子医科大学病院、杏林大学病院）に受診した患者を対象とした。健常対照成人（h）については、The Mini-International Neuropsychiatric Interview（精神疾患簡易構造化面接法）及び、Pittsburgh Sleep Quality Index（ピッツバーグ睡眠質問票）により、睡眠障害および精神疾患の疑いが低い者とした。

2）調査材料

・人口統計学的指標：性別、年齢、診断病名、服用薬剤等
・睡眠障害の重症度（主観評価）：PSQI、Insomnia Severity Index（不眠症重症度；ISI）、Epworth Sleepiness Scale（眠気尺度；ESS）
・睡眠状態の評価（主観評価）：睡眠日誌
・社会機能（客観評価）：Specific Levels of Functioning Scale （社会機能的転帰評価尺度；SLOF）
・社会機能（主観評価）： WHO Disability Assessment Schedule2.0 （WHODAS 2.0；WHO 障害評価 2.0）
・認知機能（客観評価）：Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia（統合失調症認知機能評価尺度;BACS）
・生活の質（Quality of Life；QOL）： Health Related Quality of Life（健康関連 QOL；SF-8）

認知機能、社会機能、QOL の評価内容及び基準／解釈は次のとおりである。

検査名	評価	主観／客観	項目名	評価内容	基準／解釈
BACS	認知機能	客観（面接）	言語性記憶課題	言語性学習記憶	数値が高いと各認知機能が高い
			数字順列課題	ワーキングメモリ	
			トークン運動課題	運動機能	
			言語性流暢性課題	言語流暢性	
			符号課題	注意と処理速度	
			ロンドン塔検査	遂行機能	
			Composite Z-Score	全下位検査の標準得点の平均	健常者の平均値を0とする
SLOF	社会機能	客観（面接）	SLOF合計	①対人関係（7項目）、②活動（11項目）、③労働技能（6項目）	全項目１～5点で評価し、得点が高いと各スキルを有している（得点範囲：24～120点）
WHODAS2.0（12項目版）	社会機能	主観	WHODAS2.0	障害評価（活動制限や参加への制約）	1点（全く問題なし）～5点（全く何もできない）で評価し、得点が高いと機能が障害されている（得点範囲：12～60点）
SF8	QOL（身体）	主観	PCS	身体的サマリースコア	日本人の国民標準値を50とし、得点が低いと身体的QOLが低い
	QOL（精神）	主観	MCS	精神的サマリースコア	日本人の国民標準値を50とし、得点が低いと精神的QOLが低い

3）調査方法

各施設において、対象患者から同意取得後、主観評価に基づく各種自記式質問票による評価とあわせて、睡眠日誌および活動量計による睡眠状態を２週間評価した。睡眠評価の前後いずれかにおいて臨床心理士により客観評価に基づく SLOF、BACS および対面調査による評価が行われた。なお、本研究は、国立精神・神経医療研究センター及び各施設の倫理委員会の承認を得て実施された。

4）統計解析

主要アウトカムである社会機能（主観・客観）・認知機能、QOL について、疾患別（原発性不眠症、過眠症、概日リズム睡眠-覚醒障害患者、大うつ病、統合失調症、双極性障害、不安障害）、及び症状別（不眠症状、過眠症状、睡眠-覚醒リズム異常）に、一要因分散分析を用いた健常群との比較を行った。また、原発性睡眠障害と睡眠症状を合併する精神疾患の比較においては t 検定を用いて主要アウトカムの比較を行った。さらに、原発性疾患と睡眠症状合併の精神疾患による社会機能（認知機能）／QOL との関連について相関分析を行った。本研究においては、有意水準は $p < .05$ とした。統計解析ソフトは IBM SPSS Statistics 26 を使用した。

結果

2018 年 12 月～2020 年 2 月にエントリーした 227 名のうち、「同意撤回」、「脱落・中止」、「質問票への回答に欠損が多い」のいずれかに該当した計 11 名を除いた 216 名を解析対象とした。

1）疾患分類

睡眠障害・精神疾患分類および合併睡眠症状のクロス集計表を表 1 に示す。

表 1　疾患分類と睡眠症状

	睡眠症状				健常群	合計
	不眠症状	過眠症状	睡眠-覚醒リズム異常	不明/なし		
原発性不眠症	11	0	0	0	0	11
過眠症	0	27	0	0	0	27
概日リズム睡眠-覚醒障害	0	0	30	0	0	30
統合失調症	16	5	4	3	0	28
大うつ病	27	3	4	0	0	34
双極性障害	14	1	7	1	0	23
不安障害	16	0	1	0	0	17
健常群	0	0	0	0	46	46
合計	84	36	46	4	46	216

疾患別の年齢、性別データを表 2 に示す。大うつ病のみ性別による年齢に有意差が認められ、男性は女性に比べて約 10 歳平均年齢が高かった（t（30.03）=3.01, p <.01）。

表 2　疾患別の年齢、性別の比較

	男性			女性			全体		
	n	Mean	SD	n	Mean	SD	n	Mean	SD
原発性不眠症	6	40.0	13.6	5	41.6	13.8	11	40.7	13.0
過眠症	10	33.1	6.8	17	32.2	12.8	27	32.2	12.8
概日リズム睡眠-覚醒障害	15	32.7	7.6	15	29.5	9.8	15	31.1	8.8
統合失調症	10	41.9	10.0	18	40.6	8.5	28	41.0	8.9
大うつ病	16	48.6	7.7	18	38.7	11.4	34	43.4	10.9
双極性障害	6	44.5	13.6	17	43.9	9.9	23	44.1	10.7
不安障害	6	40.2	15.1	11	40.6	10.4	17	40.5	11.8
健常群	17	40.7	12.2	29	40.1	13.6	46	40.3	13.0

2）人口統計学的指標

夜勤の有無、シフトワークの有無、配偶者もしくはパートナーの有無、同居人数（独居の場合を 1 とする）、喫煙習慣、服薬している向精神薬のカテゴリ数（睡眠薬、過眠症治療薬、その他の向精神薬、にカテゴリ化）について表 3 に示す。

表 3 人口統計学的指標

		原発性不眠症 (n=11)	過眠症 (n=27)	概日リズム睡眠-覚醒障害 (n=30)	統合失調症 (n=28)	大うつ病 (n=34)	双極性障害 (n=23)	不安障害 (n=17)	健常群 (n=46)	合計 (n=216)
夜勤の有無	有	0	2	2	1	0	1	3	1	10
	無	11	25	28	25	34	22	13	44	202
	不明				2			1	1	4
シフトワーク	有	2	7	4	5	5	3	2	1	29
	無	9	19	26	21	29	20	14	44	182
	不明		1		2			1	1	5
配偶者/パートナー	有	1	6	9	6	17	12	7	22	80
	無	10	21	21	22	17	11	10	24	136
同居人数（独居＝1）	平均	2.2	2.4	2.8	2.8	2.8	2.2	2.9	2.7	2.6
	SD	1.1	1.3	1.6	1.3	1.3（1名不明）	1.2	1.1	1.5	1.4
教育年数	平均	15.1	14.9	14.7	13.8	14.1	14.5	13.7	14.9	14.5
	SD	1.9	2.8	3.2	1.9	2.4	1.6	2.1	1.7	2.3
喫煙習慣	有	1	3	6	7	12	10	1	1	41
	無	10	24	24	21	22	12	16	44	173
	不明				2		1		1	2
服薬ｶﾃｺﾞﾘ	服薬無	3	5	2	0	5	0	3	46	64
①睡眠薬	1種類	8	18	17	11	7	8	7	0	76
②過眠症治療薬	2種類	0	3	10	17	22	15	7	0	74
③他の向精神薬	3種類	0	1	1	0	0	0	0	0	2

3）睡眠日誌

2 週間の睡眠日誌の記録から、入床時刻、離床時刻、臥床時間、中央時刻を算出した。健常群と比較すると、概日リズム睡眠-覚醒障害患者の離床時刻（p <.01）、臥床時間（p <.01）、中央時刻（p <.05）、統合失調症の臥床時間（p <.01）において有意な差異が認められ、いずれも健常群よりも長いことが示された（表 4）

表 4　疾患別の睡眠日誌

		入床時刻		離床時刻		臥床時間		中央時刻	
	n	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
原発性不眠症	11	23:43:21	1:08:07	7:27:06	1:23:30	7:43:44	1:23:55	3:35:13	1:03:36
過眠症	27	24:20:38	0:59:55	7:37:20	1:24:32	7:15:42	1:18:51	3:59:22	1:00:11
概日リズム睡眠-覚醒障害	30	25:02:20	1:42:00	9:44:13 **	1:59:39	8:41:52 **	1:51:55	5:21:47 *	1:33:48
統合失調症	28	24:04:48	3:37:54	8:47:34	4:05:01	9:42:53 **	2:08:14	4:45:20	4:34:30
大うつ病	34	23:32:41	1:55:18	7:38:47	1:27:55	8:18:28	1:15:11	3:43:26	1:50:11
双極性障害	22	23:26:12	1:43:59	7:43:09	1:15:30	8:11:14	1:46:51	3:32:51	1:03:21
不安障害	16	24:17:28	2:20:34	8:00:26	2:01:04	8:24:50	1:37:54	3:52:53	1:26:42
健常群	41	24:03:58	1:16:57	7:23:24	1:26:33	7:18:49	0:57:15	3:44:34	1:16:39
全体	209	24:05:30	2:02:10	8:04:18	2:12:53	8:11:13	1:43:09	4:07:18	2:10:35

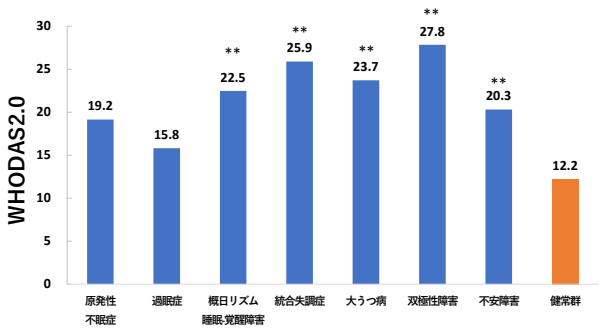
**p<.01. *p<.05（健常群との比較における有意差）

4）社会機能（認知機能）・QOL

①疾患別による社会機能（認知機能）・QOL

疾患を要因とする一要因分散分析を行い、Bonferroni による多重比較補正により健常群と比較した結果について、主要アウトカム別に示す。

WHODAS2.0：健常群と比較すると、概日リズム睡眠-覚醒障害、統合失調症、大うつ病、双極性障害、不安障害において有意に社会機能が低下していた（いずれも p<.01）（図 1）。



** p <.01

図 1　疾患別 WHODAS2.0（有意差検定の結果は健常群との比較）

BACS：本研究に参加した健常群のデータは、Kaneda, Y., et al.（2013）[1]による日本人を対象とした BACS の標準データと比較するとほぼ同等の結果であった（表 5）。

表 5　BACS の健常者データ

	本研究の健常群 (n=46)		Kaneda, Y., et al（2013） (n=292)	
	Mean	SD	Mean	SD
年齢	40.3	13.0	36.7	13.5
教育年数	14.9	1.7	14.6	2.2
BACS下位検査				
言語性記憶課題	44.2	8.1	49.2	9.9
数字順列課題	20.2	3.8	21.0	4.0
トークン運動課題	79.3	19.5	86.5	12.7
言語性流暢性課題	46.8	9.4	47.8	11.2
符号課題	68.0	11.7	67.4	12.4
ロンドン塔検査	17.6	2.7	18.1	2.3
Cmposite Z-Score	-0.4	1.3	0.0	0.6

下位検査における各構成課題成績において、疾患を要因とする一要因分散分析を実施し、Bonferroni による多重比較補正を行った。健常群と比較すると、言語性記憶課題は、過眠症、概日リズム睡眠-覚醒障害、統合失調症（all p<.01）、数字順列課題は、不安障害（p<.01）、トークン運動課題は、統合失調症、大うつ病、不安障害（all p<.01）、言語性流暢性課題は統合失調症（p<.01）、符号課題は、統合失調症と双極性障害（all p < .01）、ロンドン塔検査は、統合失調症（p < .01）において、課題成績が有意に低かった。

Composite Z-Score では、健常群に比べて統合失調症と双極性障害において有意な認知機能の低下が示された（図 2）。なお、統合失調症は双極性障害と比較しても有意に認知機能が低かった（p < .05）。

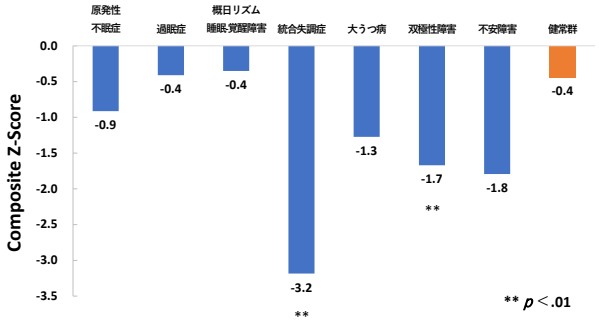


図 2　疾患別 Composite Z-Score（有意差検定の結果は健常群との比較）

SLOF：　健常群と比較すると、統合失調症、大うつ病、双極性障害、不安障害において、有意な低下が示された（図 3）。

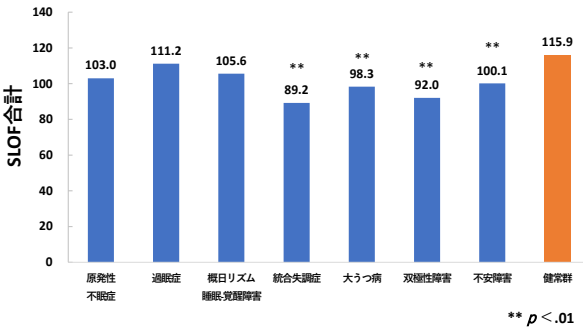


図 3　疾患別 SLOF 合計（有意差検定の結果は健常群との比較）

SF-8：　MCS（精神的健康度）は、健常群と比較すると、いずれの疾患においても有意に低いことが示された。PCS（身体的健康度）については、不眠症、統合失調症、大うつ病、双極性障害、不安障害において有意に低かった（図 4：上段 MCS、下段 PCS）

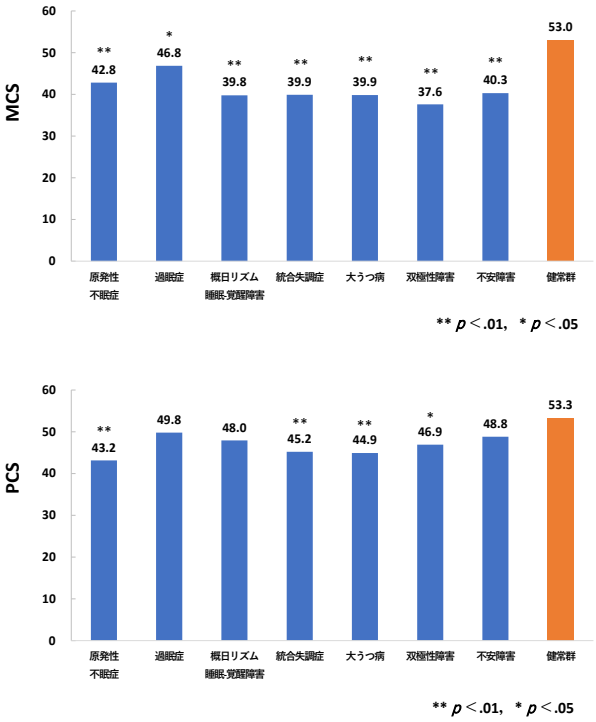


図 4　疾患別 SF-8：上段 MCS、下段 PCS
（有意差検定の結果は健常群との比較）

②睡眠症状別による社会機能（認知機能）／QOL

睡眠症状を要因とする一要因分散分析を行い、Bonferroni による多重比較補正により健常群と比較した結果について、主要アウトカム別に示す。

なお、睡眠症状（不眠症状、過眠症状、睡眠-覚醒リズム異常）のいずれにも該当しなかった「不明／なし（表 1）」の 4 名は除外し、212 名で解析を行った。

WHODAS2.0：　健常群と比較すると、不眠症状、過眠症状、睡眠-覚醒リズム異常ともに有意に社会機能が低かった（いずれも p <.01）（図 5）。

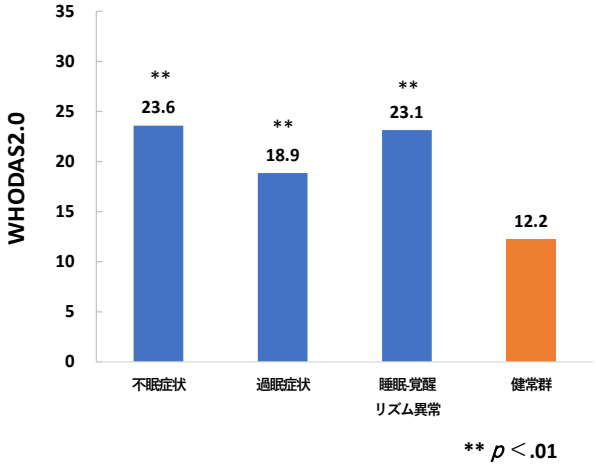


図 5　症状別 WHODAS2.0（有意差検定の結果は健常群との比較）

BACS： 数字順列課題（p<.05）、トークン運動課題（p < .01）、符号課題（p < .01）において、健常群と比較して不眠症状群で有意な認知機能低下が示された。なお、言語流暢性課題、言語性記憶課題、ロンドン塔検査においては有意な課題成績の低下は認められなかった。

Composite Z-Score では、すべての症状において有意な認知機能低下が示された（図 6）。なお、不眠症状、過眠症状、睡眠-覚醒リズム異常間には有意差は認められなかった。

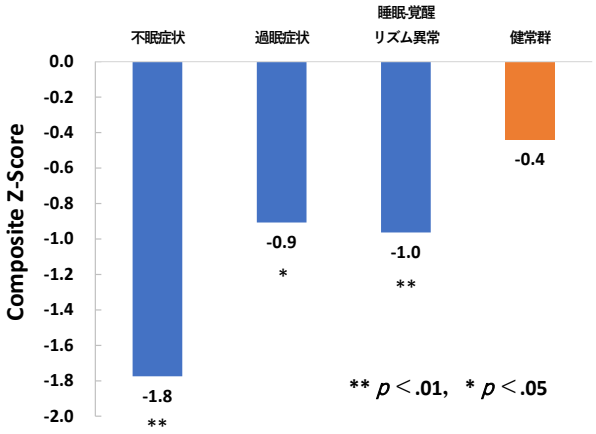


図 6　症状別 Composite Z-Score（有意差検定の結果は健常群との比較）

SLOF： 健常群と比較するといずれの症状群においても有意に成績が低かった（図 7）。

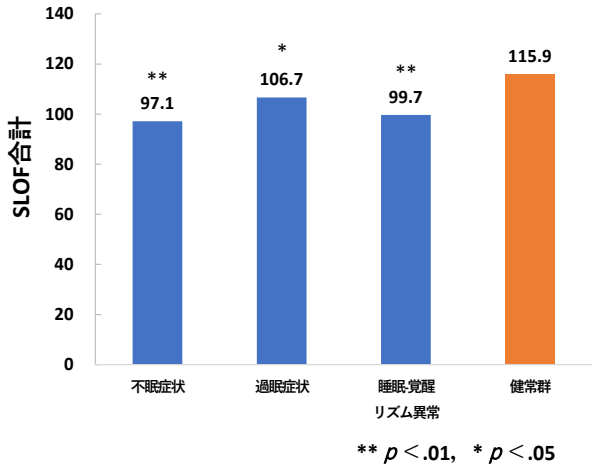


図 7　症状別 SLOF 合計（有意差検定の結果は健常群との比較）

SF-8： 不眠症状、過眠症状、睡眠-覚醒リズム異常ともに、健常群と比較し MCS、PCS 両方の評価値で低下が認められた（図 8）

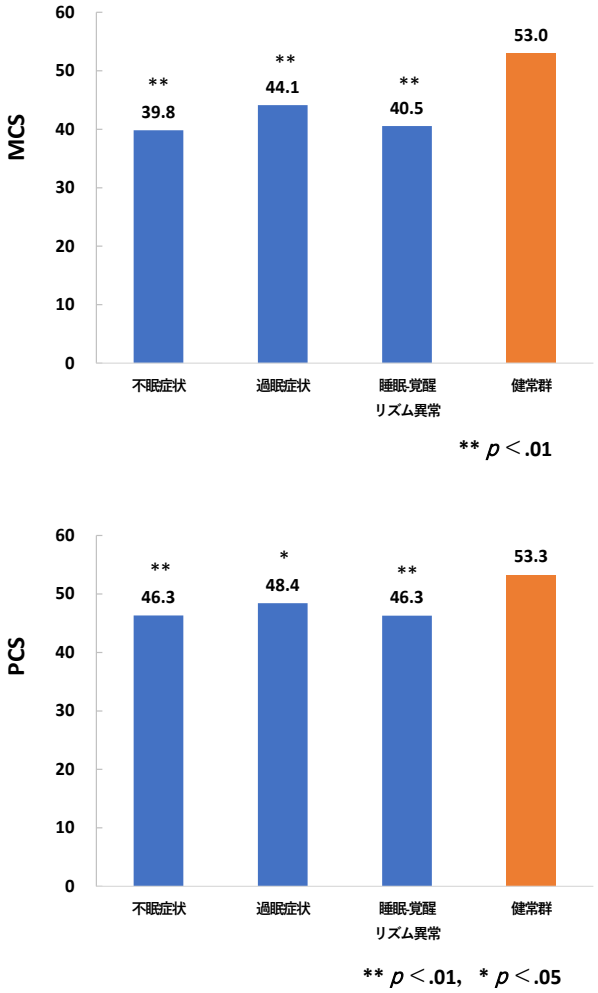


図 8　症状別 SF-8：上段 MCS、下段 PCS
（有意差検定の結果は健常群との比較）

③原発性疾患と睡眠症状合併の精神疾患による社会機能（認知機能）／QOL の差異

原発性不眠症（n =11）と不眠症状を合併する精神疾患（n =73）、過眠症（n =27）と過眠症状を合併する精神疾患（n =9）、概日リズム睡眠-覚醒障害（n =30）と睡眠-覚醒リズム異常を合併する精神疾患（n =15）のそれぞれについて社会機能（認知機能）、QOL 得点の差を t 検定した（表 6）。

BACS については、言語流暢性課題、符号課題、Composite Z-score において、すべての睡眠症状において睡眠症状合併精神疾患のほうが、課題成績が低下していた。それらに加えて、過眠症群においては言語性記憶課題、トークン運動課題、概日リズム睡眠-覚醒障害群においては言語性記憶課題、トークン運動課題、ロンドン塔課題において、睡眠症状が合併している精神疾患のほうが有意に課題成績が低下していた。すなわち、BACS の下位課題については、不眠症群＜過眠症群＜概日リズム睡眠-覚醒障害群の順で、原発性疾患に比べて合併精

神疾患のほうがより認知機能が低下していると考えられる。

また、SLOF は過眠症群、概日リズム睡眠-覚醒障害群において、WHODAS2.0 は、不眠症群、過眠症群において、合併精神疾患のほうが社会機能の低下が示された。さらに SF-8 の MCS は過眠症群においてのみ合併精神疾患のほうが有意に低かった。SF-8 の PCS については原発性疾患と合併精神疾患において有意な差異は示されなかった。

表 6　原発性疾患と睡眠症状合併精神疾患の社会機能／QOL の比較

	原発性不眠症 (n=11)		合併精神疾患（不眠症状） (n=73)			過眠症 (n=27)		合併精神疾患（過眠症状） (n=9)			概日リズム睡眠-覚醒障害 (n=30)		合併精神疾患（睡眠-覚醒リズム異常） (n=16)		
	Mean	SD	Mean	SD	p	Mean	SD	Mean	SD	p	Mean	SD	Mean	SD	p
BACS															
言語性記憶課題	10.0	6.6	11.2	7.1		51.9	7.6	37.2	14.7	<.01	52.7	9.2	39.8	10.8	<.01
数字順列反応	18.2	3.7	18.0	4.4		20.7	4.8	18.1	4.5		20.9	3.5	18.1	5.0	
トークン運動課題	66.4	19.9	55.4	25.0		72.0	16.2	50.4	33.5	<.05	73.4	14.1	61.9	16.4	<.05
言語流暢性	49.8	7.1	41.1	11.1	<.01	46.3	8.9	37.1	7.2	<.01	48.8	10.6	40.2	15.4	
符号課題	64.4	12.3	55.2	13.5	<.05	69.6	13.4	53.1	17.1	<.01	71.0	13.5	54.1	13.8	<.01
ロンドン塔検査	18.1	2.0	16.6	3.3		18.7	1.5	17.7	3.5		19.0	1.5	16.4	5.8	<.05
Composite Z-Score	-0.9	1.4	-1.9	1.9	<.05	-0.4	1.1	-2.4	2.0	<.01	-0.4	1.2	-2.1	2.2	<.01
SLOF合計	103.0	15.1	96.2	15.7		111.2	9.6	93.1	21.4	<.01	105.6	13.2	88.6	26.5	<.01
WHODAS2.0	19.2	5.7	24.2	8.4	<.05	15.8	3.4	28.0	11.0	<.01	22.5	8.4	24.4	8.2	
SF-8（PCS）	43.2	6.4	46.8	8.1		49.8	5.4	44.4	11.7		48.0	7.1	43.2	13.0	
SF-8（MCS）	42.8	7.5	39.4	9.1		46.8	6.4	36.0	11.1	<.01	39.8	8.3	42.0	11.0	

④原発性疾患と睡眠症状合併の精神疾患による社会機能（認知機能）・QOL との関連

睡眠障害の重症度と、原発性疾患と合併疾患の関係について相関分析を行った。

Composite Z-score：　不眠重症度（ISI）、過眠重症度（ESS）、睡眠-覚醒リズム位相偏移度（睡眠日誌の中央時刻）と Composite Z-score との相関分析を行ったところ、原発性睡眠障害、合併精神疾患、両群含めた全体において有意な相関関係は認められなかった。

SLOF 合計点：　不眠重症度（ISI）、過眠重症度（ESS）、睡眠-覚醒リズム位相偏移度（睡眠日誌の中央時刻）と SLOF 合計点との相関分析を行ったところ、原発性睡眠障害、合併精神疾患、および全体において有意な相関関係は認められなかった。

WHODAS2.0：　不眠重症度（ISI）と WHODAS2.0 との相関分析を行ったところ、原発性不眠症では有意な相関関係は認められず、合併精神疾患（不眠症状）において有意な相関関係が認められた（r =.51、p <.01）（図中●）。また、全体においても有意な相関関係が認められた（r =.41、p <.01）（図 9）。

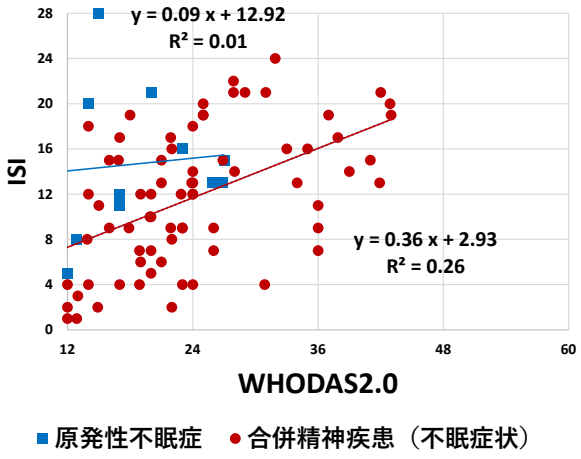


図 9　不眠症群における ISI と WHODAS2.0 の相関関係

過眠重症度（ESS）、及び睡眠-覚醒リズム位相偏移度（睡眠日誌の中央時刻）と WHODAS2.0 との相関分析を行ったところ、原発性睡眠障害、合併精神疾患、全体のいずれにおいても有意な相関関係は認められなかった。

MCS（SF-8）：　不眠重症度（ISI）と MCS との相関分析を行った。その結果、原発性不眠症においては有意な相関関係は認められなかったが、合併精神疾患（不眠症状）では有意な相関関係が認められ（r =.-52、p <.01）（図中●）、不眠症群全体においても有意な相関関係が認められた（r =.-48、p <.01）（図 10）。

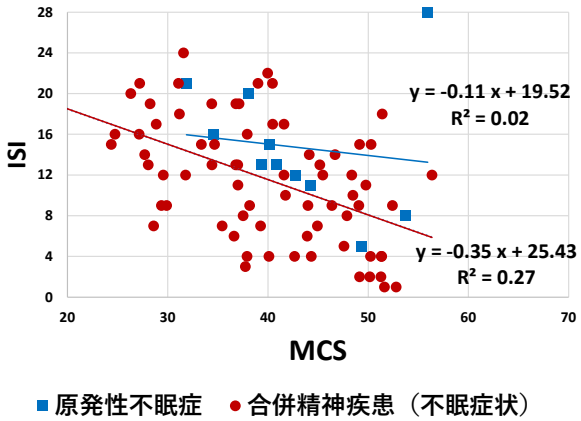


図 10　不眠症群における ISI と MCS の相関関係

過眠重症度（ESS）と MCS との相関分析を行った。その結果、原発性過眠症においては有意な相関関係が認められ（r =.-42、p <.05）（図中■）、合併精神疾患（過眠症状）でも有意な相関関係が認められた（r=.-68、p<.05）（図中●）。過眠症群全体においても有意な相関関係は認められなかった（図 11）。

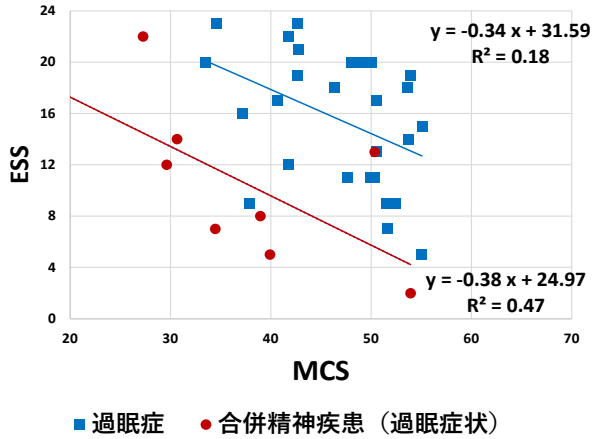


図 11　過眠症群における ESS と MCS の相関関係

概日リズム睡眠-覚醒障害（睡眠日誌の中央時刻）と MCS との相関分析を行った。その結果、概日リズム睡眠-覚醒障害、合併精神疾患（睡眠-覚醒リズム異常）、概日リズム睡眠-覚醒障害群全体において有意な相関関係は認められなかった。

PCS（SF-8）：　不眠重症度（ISI）と PCS との相関分析を行った。その結果、原発性不眠症においては有意な相関関係は認めなかった。合併精神疾患（不眠症状）では有意な相関関係が認められ（r=.-31、p<.01）（図中●）、不眠症群全体においても有意な相関関係が認められた（r =.-32、p <.01）（図 12）。

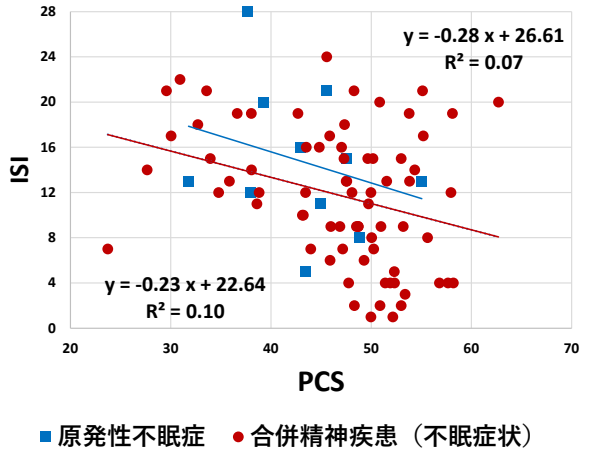


図 12　不眠症群における ISI と PCS の相関関係

過眠重症度（ESS）及び睡眠-覚醒リズム位相偏移度（睡眠日誌の中央時刻）と、PCS との相関分析を行った。その結果、原発性睡眠障害、合併精神疾患、全体において有意な相関関係は認められなかった。

考察

本研究は、睡眠障害及び睡眠症状を合併する精神疾患における社会機能（認知機能）／QOL 低下の実態を明らかにした。

先行研究において、統合失調症患者 58 名に調査した SLOF 合計得点は 90.7±15.7 点であり [2]、本研究の 89.2±22.8 点（年齢 35.9±9.6 歳）はほぼ同等の値であると考えられる。BACS の健常者データについても先行研究の標準化データとほぼ近い値であった。

疾患別の結果からは、原発性不眠症、過眠症、概日リズム睡眠-覚醒障害は、健常群に比べて主観的な社会機能及び精神的 QOL の低下が示されたが、精神疾患と比べて低下度は小さく、唯一、概日リズム睡眠-覚醒障害の主観的社会機能は精神疾患と同等の低下度を示した。。

他方で、社会機能や認知機能の低下と QOL の低下は必ずしも一致しない。たとえば、原発性不眠症患者は、客観的指標による認知機能（BACS）や社会機能（SLOF）においては、健常群と有意な差異は認められなかった一方で、主観評価である社会機能（SDISS）や QOL 評価では、健常群と比較して低い結果が示された。すなわち、原発性不眠症患者は、認知機能は低下していないにもかかわらず、自身の社会機能や QOL の低下を自覚している。

また症状別でみると、不眠症状、過眠症状は精神疾患を合併する群の方が WHODAS2.0 による社会機能が低下した一方で、概日リズム睡眠-覚醒障害においては、精神疾患の合併有無の影響は受けなかった。すなわち、不眠症状、過眠症状は精神疾患に合併するとより社会機能の低下につながるが、睡眠-覚醒リズムの異常については、精神疾患と独立して社会機能を低下させる要因となると言える。

睡眠障害重症度と社会機能（認知機能）、QOL との相関分析の結果からは、不眠症は、不眠重症度が高いほど主観的評価による社会機能および QOL の低下が示され、精神疾患合併群で有意な相関を示した。過眠症、概日リズム睡眠-覚醒障害においては、症状の重症度と主観的評価における社会機能との関連は示さなかった。しかし、過眠症状は精神疾患の合併有無にかかわらず精神的 QOL（MCS）の低下と強く相関した。

本研究より、不眠症状は主観的な社会機能、QOL の低下に関連し、精神疾患の合併によりより顕著になる傾向が示された。過眠症状は主観的な QOL を低下させ、症状の重症度と密な相関が認められるが、主観的・客観的社会機能は他の睡眠障害に比し比較的保たれる傾向があり、概日リズム睡眠・覚醒障害は症状の重症度によらず、主観的社会機能の低下と関連することが示された。

本研究の限界として、年齢の上限が 59 歳までだったため不眠症患者が少なく、原発性疾患と合併疾患の人数の偏りがあり、本研究の結果を一般化する上では上記を考慮する必要がある。

結論

睡眠障害は社会機能／QOL 低下に関連し、精神疾患を合併することで高度になる傾向が明らかになった。また、不眠、過眠、睡眠-覚醒リズム障害といった睡眠障害の表現型によって、社会機能／QOL に異なるインパクトを

与えることが初めて明らかになった。

参考文献

1. Kaneda, Y., Sumiyoshi, T., Nakagome, K., Ikezawa, S., Ohmori, T., & Noboru, Y. (2013). Evaluation of cognitive functions in a normal population in Japan using the Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia Japanese version (BACS-J). *Seishin Igaku*, *55*(2), 167-175.
2. Sumiyoshi, T., Nishida, K., Niimura, H., Toyomaki, A., Morimoto, T., Tani, M., ... & Katsuki, A. (2016). Cognitive insight and functional outcome in schizophrenia; a multi-center collaborative study with the specific level of functioning scale–Japanese version. Schizophrenia Research: Cognition, 6, 9-14.

分担研究課題名：睡眠障害に伴う社会機能／QOL 評価尺度の有用性の検証：気分障害に伴う睡眠障害
分担研究者：高江洲義和
研究協力者： 神田優太
所属施設： 杏林大学医学部精神神経科学教室

緒言

うつ病や双極性障害を含む気分障害は病相の再燃・再発を繰り返す疾患であり、認知機能や社会機能の低下をきたすことが指摘されている。これまで気分障害の長期的な認知機能の低下や社会機能の低下に対する詳細な検討や、その改善のための方策は十分な検討がなされていない。気分障害の病態に概日リズム障害が密接に関連しており、概日リズム睡眠障害の合併が、気分障害の再燃・再発の予測因子となることが示されている。近年の研究では、気分障害における概日リズム障害が認知・社会機能障害に影響を与えていることが示唆されている。しかしながら、気分障害患者の概日リズム障害と長期的な認知・社会機能障害との関連について生物学的、心理学的、社会学的側面を同時に検討した臨床研究は存在しない。そこで本研究では、うつ病と双極性障害における概日リズム障害に着目し、認知機能障害や社会機能障害に与える複合的な相互関係を検討する。

方法

杏林大学医学部付属病院並びに共同研究医療機関の外来通院中のうつ病および双極性障害の患者を対象として質問紙と面接及び概日リズム障害の生物学的指標の測定による横断調査を行った。対象者に対して以下の概日リズム障害の生物学的指標の測定、面接による気分症状の評価、認知機能障害の測定、社会機能障害の測定を実施する。概日リズム指標：４週間のアクチグラフィー連続記録および自記式睡眠表の記録を行う。気分症状：面接により MADRS および YMRS による躁・うつ症状の評価を実施する。認知機能障害：認知機能簡易評価尺度（BACS-J)。社会機能障害：WHO-DAS により社会機能障害を定量評価する。QOL:WHO-QOL により QOL を評価する。これらの指標の複合的な交互作用、媒介作用について構造方程式モデリングと階層的重回帰分析を用いて解析を実施する。その結果より気分障害における気分症状の変動、概日リズム障害、認知機能障害、社会機能障害の因果関係モデルを構築する。本横断調査により、双極性障害における認知・社会機能障害に影響を及ぼす要因の複合的な相互関係の解明を目指す。本研究は杏林大学倫理審査委員会の承認を得て実施した。

結果

現在、双極性障害 51 例、うつ病 15 例が登録しており、最終的には双極性障害 60 例、うつ病 60 例の登録を見込んでいる。現在は双極性障害群のみでの予備的な解析を行っており、気分症状と概日リズム指標、認知機能、社会機能、QOL との関連を検討している。今後は両群で十分な症例数が集まった後に、群間における概日リズム指標や認知機能、社会機能、QOL の比較を行う予定である。

結論

うつ病と双極性障害における気分症状、概日リズム、社会機能、QOL についての検討を行っている。今後はさらなる症例数の蓄積により、両群における認知機能、社会機能、QOL に影響を与える複合的な要因にを明らかにする予定である。

参考文献

1. Takaesu Y, Inoue Y, Ono K, Murakoshi A, Futenma K, Komada Y, Inoue T. (2018) Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders Predict Shorter Time to Relapse of Mood Episodes in Euthymic Patients With Bipolar Disorder: A Prospective 48-Week Study. The Journal of clinical psychiatry, 79(1).
2. Takaesu Y, Inoue Y, Ono K, Murakoshi A, Futenma K, Komada Y, Inoue T. (2017) Circadian rhythm sleep-wake disorders as predictors for bipolar disorder in patients with remitted mood disorders. Journal of affective disorders, 220: 57-61.
3. Takaesu Y, Inoue Y, Murakoshi A, Komada Y, Otsuka A, Futenma K, Inoue T. (2016) Prevalence of Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders and Associated Factors in Euthymic Patients with Bipolar Disorder. PloS one, 11: e0159578.

29-1

Development of a clinical pathway with an exit strategy for sleep disorders to improve social functioning and quality of life

Principal investigator: Kenichi Kuriyama, M.D., Ph.D.
Department of Sleep-Wake Disorders, National Institute of Mental Health,
National Center of Neurology & Psychiatry

Aim of study

This research aims to establish a safe and effective clinical pathway for sleep disorders associated with mental illness. In addition to an exit strategy, the concept of shared decision-making will be incorporated into the clinical pathway to reflect requests that have been made by many patients. We will then verify that application of the clinical pathway in sleep medicine improves impairments of social functioning and quality of life (QOL), both of which restrict patients' daily functioning. This research project will be carried out in 3 steps.

Step 1: Survey of social functioning/QOL impairments due to sleep disorder: After the selection or development of clinical assessment scales that identify social functioning/QOL impairments associated with sleep disorders, a multicenter collaborative study will be conducted to elucidate to what extent sleep disorders affect social functioning/QOL in patients with psychiatric disorders.

Step 2: Development of a clinical pathway for sleep disorders: A clinical pathway will be developed that clearly specifies the flow of sleep medicine (from assessment of sleep-related symptoms and social functioning/QOL to treatment, criteria for remission and recovery, and dose reduction and tapering). To realize this, we will develop a clinical practice manual designed to improve risk-benefit ratios and social functioning/QOL impairments by incorporating cognitive behavioral therapy for insomnia (CBT-I) and for circadian rhythm sleep-wake disorders (CBT-R) while using pharmacological therapy.

Step 3: Verification: A multicenter collaborative study will be conducted at the National Center Hospital at NCNP and collaborating research institutions to verify the effectiveness of the clinical pathway for sleep disorders.

Research outcomes

I. Feasibility assessments of the scales for social functioning/QOL associated with sleep disorders

It was investigated that whether cognitive functions (measured using the Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia: BACS) and daily living skills (measured using the UCSD Performance-based Skills Assessment-Brief: UPSA-B) are able to predict outcomes of social functioning (measured using the Specific Levels of Functioning Scale: SLOF) at a year later in schizophrenia patients. Results indicated that cognitive functions (BACS scores) can significantly predict the social functioning (SLOF scores) at both the baseline ($p < 0.01$) and a year later ($p < 0.05$). Daily living skills (UPSA-B scores) just predicted the social functioning (SLOF scores) at a year later ($p < 0.05$). These results suggest that the BACS could work a potential predictor for prospective declines in social functioning reflected in the SLOF score.

II. Developments of a clinical pathway and practice guideline for sleep disorders associated with psychiatric disorders

i) Development of CBT-I

We planned a constructive and versatile CBT-I which is highly acceptable in clinical fields of psychiatry. Group

occupational therapy is comprehensively utilized for improving the social functioning and activities of daily living of patients in clinical fields of psychiatry. We harmonized the essential CBT-I manner with the traditional group occupational therapy. Furthermore, we are developing and verifying practical effectiveness of the novel CBT-I applicable to various psychiatric disorders.

ii) Development of CBT-R

The utility of CBT-R for Delayed Sleep-Wake phase Disorder (DSWPD) developed internationally and applicability of chronotherapy and bright light therapy for sleep-wake rhythm disorders in patients with psychiatric disorders were investigated. In addition, the utility of a treatment manual for DSWPS, in which gradual sleep-wake phase advance, keeping the regular sleep-wake rhythms, bright light exposure therapy, adequate sleep habits, and medication are included, was established. Then, we tested feasibility of the manual in several DSWPD patients, and found good efficacy and tolerability of the manual for DSWPD without increasing of hypnotics.

III. A multicenter trial for evaluating decline in social functioning/QOL associated with sleep disorders comorbid with psychiatric disorders

To evaluate decline in social functioning/QOL in sleep disorders with psychiatric comorbidity, a multicenter clinical trial is designed. We carefully selected clinical questionnaires of SLOF, WHO Disability Assessment Schedule2.0 (WHODAS 2.0), BACS, Health Related Quality of Life (SF-8) for assessing social functioning/QOL with severity of sleep and psychiatric disorders for establishing the entire study protocol. We have applied the study protocol to every ethical committees of participating facilities (9 hospitals), and all committees have given approval. Total of 227 participants including 11 patients with primary insomnia, 27 patients with central hypersomnolence, 30 patients with circadian rhythm sleep-wake disorders (CRSWD), 28 patients with schizophrenia, 23 patients with bipolar disorders, 34 patients with major depressive disorders, 17 patients with anxiety disorders, and 46 healthy volunteers were participated in the study. Data of eleven participants were excluded from the analyses due to withdrawal the consent, dropout, or large amounts of missing data. Thus, data form 216 participants were analyzed. Results indicated that sleep disorders including primary insomnia, central hypersomnolence, and CRSWD significantly associate with disturbances in social functioning and QOL, and comorbid psychiatric disorders tend to accelerate disturbances in social functioning and QOL. Furthermore, it also suggested that the variation in sleep-related symptoms such as insomnia, hypersomnia, and sleep-wake phase shifts affect the disturbances in social functioning and QOL in patients with psychiatric disorders.

Summary: We have conducted a multicenter clinical trial for evaluating social functioning/QOL in patients with psychiatric disorders accompanied by sleep disorders. We revealed the figure of disturbances in social functioning/QOL caused by sleep disorders. We simultaneously developed and assessed feasibility of a practice manual and non-pharmacological treatment protocols in sleep disorders in mental healthcare settings, for final goal as establishing the clinical pathway for sleep disorders. However, we could not reach the final goal, thus we are going to plan a multicenter feasibility investigation of the clinical pathway for sleep disorders on the other research project.

29-2

心身症・摂食障害の治療プログラムと臨床マーカーの検証

［主任研究者］安藤　哲也
国立研究開発法人　国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所行動医学研究部　ストレス研究室　室長

総括研究報告

Ⅰ．研究目的

摂食障害（ED）および過敏性腸症候群（IBS）はいずれも有病率が高く、国民の負担が非常に大きい疾患である。また、診断・評価、病態解明や治療法の開発には心身医学的なアプローチが必要な疾患である。海外では、EDやIBSに対する認知行動療法（CBT）の有効性が報告されているが、わが国では研究がほとんどなく、EDやIBS治療法として普及していない。また、EDやIBSに特異的な臨床マーカーは見つかっていない。

申請者らはこれまでにEDに関して、CBT-Eの効果研究の多施設共同研究体制と指導者養成、ED情報ポータルサイト開設を行った。また、IBSの認知行動療法（CBT-IBS)のフィージビリティー研究を終了し、プロトコルの改善を行った。

1. 摂食障害（ED）の認知行動療法改良版（CBT-E）の効果を検証する、
2. 過敏性腸症候群（IBS）のビデオ教材を併用した内部感覚暴露を用いた認知行動療法（CBT-IE）の効果を検証する、
3. EDおよびIBSの臨床マーカーを検討する、

ことを目的とした。

Ⅱ．研究組織

主任研究者

安藤哲也：国立精神・神経医療研究センター（NCNP）精神保健研究所（NIMH）行動医学研究部

分担研究者

関口　敦：NCNP, NIMH 行動医学研究部
菊地裕絵：国立国際医療研究センター(NCGM)病院心療内科
福土　審：東北大学大学院医学系研究科行動医学分野・東北大学病院心療内科
須藤信行：九州大学大学院医学研究院心身医学
吉内一浩：東京大学大学院医学系研究科ストレス防御・心身医学
河合啓介 NCGM 国府台病院心療内科

研究協力者（順不同）

小原千郷、河西ひとみ、船場美佐子、菅原彩子、高村恒人：NCNP, NIMH 行動医学研究部
富田吉敏：NCNP 病院総合内科部心療内科
有賀　元：NCNP 病院総合内科部消化器内科
藤井　靖：明星大学心理学部
木村真弓、倉科志穂、北島智子：NCGM 病院心療内科
村椿智彦、相澤祐一、田中由佳里、鹿野理子：東北大学大学院医学系研究科行動医学分野
西村尭幸：東北大学病院臨床研修センター
遠藤由香、田村太作、佐藤康弘、庄司知隆、山口雄平：東北大学病院心療内科
金澤　素：東北大学大学院医学系研究科行動医学分野・東北大学病院心療内科
髙倉　修、波夛伴和：九州大学病院心療内科
吉原一文、権藤元治：九州大学大学院医学研究院心身医学
山崎允宏、宮本せら紀：東京大学大学院医学系

研究科ストレス防御・心身医学
堀江武、大谷真、松岡美樹子：東京大学医学部附属病院心療内科
田村奈穂、庄子雅康：NCGM 国府台病院心療内科

Ⅲ．研究成果

A：CBT-E の効果検証（安藤、吉内、福土、須藤、河合）

摂食障害（ED）の認知行動療法改良版（CBT-E）の効果を多施設共同無作為化比較試験（RCT）で検証するための研究体制を構築した（NCNP、東北大学、東京大学、NCGM 国府台病院、九州大学）。CBT-E 実施者の養成のため開発者のひとりイェール大学の Zafra Cooper 教授によるスーパービジョンを 17 名の治療者に実施した。ED の評価面接である Eating Disorder Examination (EDE) の日本語版を原著者の許可を得て作成し、さらに実施者養成を行った。「摂食障害に対する認知行動療法 CBT-E 簡易マニュアル」を作成し、これを用いた「神経性過食症に対する認知行動療法」が平成 30 年 4 月保険収載された。CBT-E と通常治療（TAU）の有効性を比較する研究計画「神経性過食症に対する認知行動療法の無作為比較試験」を作成した。並行、無作為化、対象は DSM-5 の神経性過食症、介入は CBT-E 20 セッション、焦点版、主要評価項目は神経性過食症の寛解である。倫理委員会の承認を受け、臨床研究登録を行った（UMIN000031625）。プロトコル論文が欧文誌に受理された。エントリーが開始された。2020 年 3 月時点で 10 例が組み入れられた。さらに本研究で養成した CBT-E 実施者が講師として「神経性過食症に対する認知行動療法(CBT-E)研修会」が計 6 回開催され、計 439 名が受講した。

以上のように、本研究により CBT-E の有効性の多施設共同 RCT による科学的検証が開始された。本研究班が作成したマニュアルに従った神経性過食症の認知行動療法が ED の治療法としては初めて保険収載された。本研究は我が国におけるエビデンスに基づく ED の治療法の普及に貢献した。

B： IBS の CBT-IE の効果検証（安藤、福土、吉内、河合、菊地）

ビデオ教材と対面セッションを併用したハイブリッド型の CBT-IE-w/vid プログラムのフィージビリティーを単群のオープン試験で検討した。IBS の重症度、腹部への不安、IBS 特異的 QOL が介入終了時に有意に改善し（P<0.01）、その効果は 6 ヶ月後まで維持された。IBS の重症度の効果量（Hedges'g）は -1.01～-1.09、脱落率は 12.5%と高い効果量と低い脱落率を示し、対面セッションのみの CBT-IE プログラムに比べ対面セッション時間は約 40%減少した。

CBT-IE-w/vid プログラムを TAU に加えた場合と TAU を比較する RCT の研究体制を構築した（NCNP、東北大学、東京大学、NCGM 国府台病院、NCGM 病院）。研究計画「過敏性腸症候群に対するビデオ教材を併用した認知行動療法プログラムのランダム化比較研究」を作成した。対象は Rome IV の IBS、主要評価項目は IBS 症状の重症度である。倫理委員会の承認を受け、UMIN に臨床研究登録した（UMIN000030620）。プロトコル論文が欧文誌に受理された。被験者のリクルート、エントリーが開始され 2020 年 3 月時点で 22 例が組み入れられた。

以上のように、本研究によりビデオ教材を併用した CBT-IE の実施可能性が示され、対面のみの CBT-IE と同程度の有効性でセッション時間を大幅に短縮できることが示された。また、我が国で初めて IBS の CBT の多施設共同 RCT による科学的な有効性の検証が開始された。

C：ED および IBS の臨床マーカーの検討 脳画像の検討（関口）

ED 患者および IBS 患者を対象とし、横断的脳画像研究では、認知的特徴や心理指標、行動指標ごとに特異的な脳内情報処理や脳神経回路ダイナミクスの異常を特定し、診断マーカーとして活用すること、CBT-E/CBT-IE 介入研究における縦断的脳画像評価では、CBT-E、CBT-IE の治療マーカー、治療反応性を予測するマーカーを特定し難治化の予測、治療適応の判定に活用することとした。共同研究機関との

協議により撮像シーケンスおよび収集する心理尺度、認知尺度を確定した。ED に関しては、本研究開発チームの枠組みを超えた国内連携体制を構築し、ED 患者 187 例、健常対象 220 例の脳 MRI 画像既存データカタログを作成した。IBS 患者に関しては、CBT-IE 前後の縦断研究を継続し、NCNP において 13 例の患者群を対象として MRI 検査を実施しており、令和元年度末までに 5 例の治療介入前の検査を実施済みである。予備的な解析において、IBS の重症度スコアと内部感覚との関連が指摘されている右前島皮質の灰白質量との正相関が認められた。本研究により ED および IBS の脳画像研究の共同研究体制が構築できた。今後、縦断データの収集により治療反応性予測を反映する脳画像バイオマーカーの特定が期待される。

ED の多面的評価法の検証（吉内）

ED を中心とした食行動異常を呈する疾患では、単なる食行動の異常だけではなく、心理社会的側面、生物学的側面など多面的な評価とそれに基づく治療法が必要である。本研究では、日常生活下における多面的な評価法である ecological momentary assessment （EMA）の手法を補完するとともに、EMA でも実施可能な Body Checking Questionnaire（BCQ）、Family Coping Questionnaire for Eating Disorders （FCQ-ED）の各日本語版を原著者の許可を得て作成し、さらに信頼性、妥当性の検討を行った。BCQ は ED 患者 100 名、健常者 155 名を対象にした確認的、探索的因子分析の結果、17 項目 3 因子（特定の体の部位、儀式的な体形確認、比較因子分析）が明らかになった。α 係数は 0.85-0.91 であり、各下位尺度とも既存の質問紙 Body Shape Questionnaire（BSQ）との有意な正の相関を示し、ED 患者では健常者より有意に高得点であった。FCQ-ED の検討は 109 名の患者の家族 150 名を対象に確認的、探索的因子分析を行い、4 因子構造（体重測定への反応、過食への反応、非排出行動への反応、排出行動への反応）がわかり、α 係数は 0.68～0.85、4 つの下位尺度は、POMS との有意な相関がみられた。BCQ、FCQ-ED は項目反応理論を用いた CAT に用いることができ、より信頼性の高い評価が可能となると考えられる。

IBS の臨床的マーカーの検証（福土）

IBS の臨床的マーカーとして、IBS 症状とともに、自律神経反応と脳波の有用性を検証した。IBS 患者 156 名ならびに健常者 31 名を対象に、バロスタットによる大腸伸展刺激負荷および食事刺激に対する心拍変動(heart rate variability: HRV)の変化分析した。また、15 名の健常者と 15 名の IBS 患者を対象に、マインドフルネス瞑想に対する脳波の変化を IBS 症状の変化とともに計測した。その結果、大腸伸展刺激および食後の観察記の HRV の low frequency component/high frequency component (LF/HF)比の反応が IBS 群と健常者では異なること、瞑想後の脳波周波数成分が IBS 群と健常群で異なることがわかった。IBS の臨床的マーカーとして HRV と脳波周波数成分の可能性が示された。

IBS の多面的評価法の検証（菊地）

IBS の評価は、患者の自己報告による評価（patient reported outcome, PRO）が中心であり、PRO に伴う recall bias を避けるために日常生活下で携帯型コンピュータを用いて記録を行う computerized EMA（cEMA）が有用である。一方、IBS は、心理社会的側面を含めた多面的な病態評価が重要である。本研究では、ストレスの客観指標の探索とコンピュータ適応型の質問票 (computerized adaptive testing, CAT）の導入を行うことを目的とした。その結果、連続的・非侵襲的に測定可能な客観的指標である身体活動度を用いてストレス因子の評価が可能となる可能性があること、また CAT を導入することで、入力負担の軽減が可能であり、また reactivity の予防にも寄与できる可能性が明らかとなった。

摂食障害と過敏性腸症候群の治療プログラムの検証と プログラム実施者養成方法の検討

［分担研究者］安藤　哲也
所属先　国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所行動医学研究部

研究要旨

摂食障害（ED）の認知行動療法改良版（CBT-E）の効果を検証するため、神経性過食症の多施設共同無作為化比較試験を計画、開始した。2020 年 3 月時点で介入開始は NCNP で 3 例、全施設で計 10 例である。また、CBT-E の実施者養成のためのスーパービジョンを 17 名に実施し 13 名がトレーニングを完遂した。「摂食障害に対する認知行動療法 CBT-E 簡易マニュアル」に従った神経性過食症の認知行動療法が保険収載され、本研究で養成した CBT-E 実施者を講師として CBT-E 研修会が 6 回開催された。

過敏性腸症候群（IBS）に対するビデオ教材を併用し内部感覚暴露を用いた認知行動療法（CBT-IE）のフィージビリティー研究において 16 例に実施、14 例で完遂、介入後 IBS の重症度、腹部への不安、IBS 特異的 QOL は有意に改善し（P<0.01）し、またビデオ教材に併用により対面面接の時間を 40%削減した。同プログラムを用いた IBS に対する.施設共同無作為化比較試験を計画、開始した。2020 年 3 月時点でエントリーは NCNP で 16 例、全施設で計 22 例である。

Ⅰ. 研究目的

摂食障害（ED）および過敏性腸症候群（IBS）はいずれも有病率が高く、国民の負担が非常に大きい疾患である。また、診断・評価、病態解明や治療法の開発には心身医学的なアプローチが必要な疾患である。申請者らはこれまでに ED に関して、CBT-E の効果研究の多施設共同研究体制と指導者養成、ED 情報ポータルサイト開設を行った。また、IBS の認知行動療法（CBT-IBS)のフィージビリティー研究を終了し、プロトコル改善した。本研究では

1. 摂食障害（ED）の認知行動療法改良版（CBT-E）の効果を検証する。
2. 過敏性腸症候群（IBS）のビデオ教材を併用した認知行動療法の効果を検証する。
3. CBT-E のわが国における研修・教育システムについて検討する。

1. CBT-E の効果検証

Ⅱ. 方法

RCT の研究体制を構築した。主幹 NCNP、介入実施機関は NCNP、東北大学、東京大学、九州大学、NCGM 国府台病院の 5 施設、統計解析、データマネジメント、モニタリングを TMC が担当とした。

介入実施者およびアウトカム評価者を養成した。CBT-E 開発者のひとり Zafra Cooper 教授によるスーパービジョン（SV）により実施者を養成し、SV 修了者がさらに CBT 実施者を養成した。ED の標準的な評価面接である Eating Disorder Examination (EDE)の日本語版を作成し、実施者を養成した。研究計画を共同研究機関と協議し作成した。介入者のために「摂食障害に対する認知行動療法 CBT-E 簡易マニュアル」を作成した。TMC の臨床支援システムによる登録、割り付け、データ授受の設定、CRF 作成を行った。中央・施設モニタリングの項目、方法を決定した

Ⅲ. 結果

17 名にケーススーパービジョンを実施し、13 名が 2 例 1 年間の条件を満たして、終了証を得た。

「摂食障害に対する認知行動療法 CBT-E 簡易マニュアル」を用いた「神経性過食症に対

する認知行動療法」が平成 30 年 4 月保険収載された。

研究計画「神経性過食症に対する認知行動療法の無作為比較試験」が NCNP および全介入実施機関の倫理委員会で承認された。対象は DSM-5 神経性過食症、対象者数 140（試験群 CBT-E 70、対照群 TAU 70、alpha=0.05, beta 0.8）とし、評価者盲検、無作為化、パラレル比較である。主要評価項目を介入修了時の寛解の有無とした。UMIN に臨床研究登録（UMIN000031625）した。

プロトコル論文「Effectiveness of enhanced cognitive behavior therapy for bulimia nervosa in Japan: a randomized controlled trial protocol」が BPSM 誌に受理された。

エントリーが開始された。年時点で NCNP 例、全体で 例で介入開始した。

Ⅳ．考察

本研究により CBT-E の有効性の多施設共同 RC による科学的検証が開始された。本研究班が作成したマニュアルもとにした「神経性過食症の認知行動療法」が ED の治療法としては初めて保険収載された。本研究は我が国における、エビデンスに基づく ED の治療法の普及に貢献した。

2. ビデオ教材を併用した CBT-IE の効果検証

Ⅱ．方法

ビデオ教材と対面セッションを併用した CBT-IE プログラム（CBT-IE-w/vid）のフィージビリティーを前後比較で検討した。RCT の研究体制を構築した。主幹機関は NCNP、介入実施機関は NCNP と東北大学、東京大学、NCGM センター病院、国府台病院の 5 施設、統計解析、データマネジメント、モニタリングを TMC が担当とした。介入実施者研修を実施し介入者を養成した。共同研究施設とのウェブ会議で協議し研究計画書を作成した。TMC の臨床支援システムによる登録、割り付け、データ授受の設定、CRF 作成を行った。中央・施設モニタリングの項目、方法を決定した

Ⅲ．結果

フィージビリティー研究で 16 例に介入し 14 例で完遂、ITT 解析で IBS の重症度、腹部への不安、IBS 特異的 QOL は介入終了時に有意に改善し（P<0.01）、その効果は 6 ヶ月後まで維持された。IBS の重症度の効果量（Hedges'g）は -1.01～ -1.09、脱落率は 12.5%と高い効果量と低い脱落率を示し、対面セッションのみの CBT-IE プログラムに比較して、対面セッション時間は約 40% 減少した。研究計画「過敏性腸症候群に対するビデオ教材を併用した認知行動療法プログラムのランダム化比較研究」を作成、対象は Rome IV の IBS 群、主要評価項目は IBS 症状の重症度、対象者数は 120（試験群 CBT-IE ＋ TAU 60、対照群 TAU 60、alpha=0.05, beta 0.8）とし、評価者盲検、無作為化、パラレル比較である。UMIN に臨床研究登録した（UMIN000031625）。研究計画が全ての介入実施機関の倫理委員会に承認された。研究計画「過敏性腸症候群に対するビデオ教材を併用した認知行動療法プログラムのランダム化比較研究」が NCNP および全介入実施機関の倫理委員会で承認された。対象は DSM-5 神経性過食症、対象者数 140（試験群 CBT-E 70、対照群 TAU 70、alpha=0.05, beta 0.8）とし、評価者盲検、無作為化、パラレル比較である。主要評価項目を介入修了時の寛解の有無とした。UMIN に臨床研究登録し（UMIN000031625）された。プロトコル論文「Cognitive behavioral therapy with interoceptive exposure and complementary video materials for irritable bowel syndrome (IBS): protocol for a multicenter randomized controlled trial in Japan」が BPSM 誌に受理された。被験者のリクルート、エントリーが開始され 2020 年 3 月時点で、組み入れは NCNP で 16 例、共同研究施設全体で計 22 例である。

Ⅳ．考察

ビデオ教材を併用した CBT-IE の効果検証の実施可能性が示され、前後比較では対面のみの CBT-IE と同程度の有効性でセッション時間を

大幅に短縮できることが示された。また、我が国で初めてのIBSのCBTの多施設共同RCTによる科学的な有効性の検証が開始された。

3. CBT-Eの研修・教育システムの検討

Ⅱ．方法

海外でのCBT-Eのワークショップ、web-based trainingについて情報収集を行い、開発者の許可を得て研修マテリアルを翻訳、作成した。

本研究で養成したCBT-E実施者が日本心身医学会、日本心療内科学会、日本摂食障害学会合同ワーキンググループメンバーおよび講師として研修およびマテリアルを開発、実施した。

Ⅲ．結果

神経性過食症に対する認知行動療法(CBT-E)研修会が計6回開催され（第1回2018年7月29日東京大学97名、第2回2018年9月23日東邦大学114名、第3回2019月2月3日九州大学51名、第4回2019年8月4日NCNP59名、第5回2019年9月29日大阪市立大学80名、第6回2020年2月23日東北大学38名）、計439名が受講した。

Ⅴ．結論

本研究により神経性過食症および過敏性腸症候群に対する多施設共同無作為化比較試験が開始された。神経性過食症の認知行動療法が保険収載され、我が国におけるエビデンスに基づく治療法の普及に貢献した。

研究協力者（分担研究者を除く）

有賀　元：NCNPセンター病院総合内科部消化器内科

富田吉敏：NCNPセンター病院総合内科心療内科部

小原千郷：NCNP精神保健研究所行動医学研究部

河西ひとみ：NCNP精神保健研究所行動医学研究部

船場美佐子：NCNP精神保健研究所行動医学研究部

菅原彩子：NCNP精神保健研究所行動医学研究部

藤井　靖：明星大学心理学部

参考文献

1）Ohara C, Sekiguchi A, Takakura S, Endo Y, Tamura N, Kikuchi H, Maruo K, Sugawara N, Hatano K, Kawanishi H, Funaba M, Sugawara A, Nohara N, Kawai K, Fukudo S, Sudo N, Cooper A, Yoshiuchi K, Ando T. Effectiveness of enhanced cognitive behavior therapy for bulimia nervosa in Japan: a randomized controlled trial protocol. BioPsychoSocial Medicine. 14: 2, 2020

2）Kawanishi H, Sekiguchi A, Funaba M, Fujii Y, Yoshiuchi K, Kikuchi H, Kawai K, Maruo K, Sugawara N, Hatano K, Shoji T, Yamazaki T, Toda K, Murakami M, Shoji M, Ohara C, Tomita Y, Fukudo S, Ando T. Cognitive behavioral therapy with interoceptive exposure and complementary video materials for irritable bowel syndrome (IBS): protocol for a multicenter randomized controlled trial in Japan. BioPsychoSocial Medicine. 2019.

3）Fairburn CG. Cognitive Behaviour Threrapy and Eating Disorders. New York: Guilford Press; 2008.

4) Craske MG, Wolitzky-Taylor KB, Labus J, et al. A cognitive-behavioral treatment for irritable bowel syndrome using interoceptive exposure to visceral sensations. Behav Res Ther. 2011;49:413–21.

5) Fairburn CG, Allen E, Bailey-Straebler S et al. Scaling up psychological treatments: a countrywide test of the online training of therapists. J Med Internet Res 2017; 19(6): e 214.

心身症・摂食障害の脳画像の検討

［分担研究者］関口　敦
国立精神・神経医療研究センター　精神保健研究所

研究要旨

摂食障害（ED）患者および過敏性腸症候群（IBS）患者を対象とし、認知的特徴や心理指標、行動指標ごとに特異的な脳内情報処理や脳神経回路ダイナミクスの異常が存在するとの仮説を立て、脳画像研究の手法を用いて検証する。

更に、主任研究者が計画している治療研究（ED に対する CBT-E、IBS に対する CBT-IE）において、治療介入前後に同様の脳画像評価を行い、異常が特定された神経回路の修復の有無を検証することで、これら神経回路の異常や変化が、治療反応性を予測するマーカーおよび治療マーカーとして活用し得るか否かを検証する。

研究期間内で収集可能な画像データのみを用いた解析で検証が難しい場合は、研究チーム内で過去に収集した既存の ED および IBS の画像データベースを活用し、横断的解析の補助データとして用いることも視野に入れ、学術的に価値のあるデータベースの構築を目指す。

I. 研究目的

摂食障害（ED）および過敏性腸症候群（IBS）の治療には、心身医学的なアプローチが有効であり、診断、評価、病態解明などに脳画像研究の手法を活用できる。脳画像を用いることで、従来疾患と異なる枠組みでの研究が容易になっており、疾患横断的に共通する神経基盤（Goodkind 2015）や、疾患のサブタイプによる特徴の抽出（Drysdale 2017）などが実証されている。また、治療反応性を予測するバイオマーカー（van Rooij 2015）として活用も試みられている。

本研究では、ED 患者および IBS 患者を対象とし、『認知的特徴や心理指標、行動指標ごとに特異的な脳内情報処理や脳神経回路ダイナミクスの異常が存在する』との仮説を立て、脳画像研究の手法を用いて検証する。

具体的には、横断的な症例-対照研究として,ED/IBS と健常対照群に対して心理･行動指標および脳画像を収集し上記仮説を検証する。更に、主任研究者が計画している治療研究（ED に対する CBT-E、IBS に対する CBT-IE）において、治療介入前後に同様の脳画像評価を行い、異常が特定された神経回路の修復の有無を検証することで、これら神経回路の異常や変化が、治療反応性を予測するマーカーおよび治療マーカーとして活用し得るか否かを検証する。

II. 方法

ED/IBS の横断的脳画像研究

ED・IBS の認知的特徴や心理指標、行動指標ごとに特異的な脳内情報処理や脳神経回路ダイナミクスの異常を特定し、診断マーカーとして活用する。

具体的には、ED/IBS に対して、多施設共同で横断的に共通プロトコールによる脳画像（T1 強調像、拡散強調像、安静時脳活動など）および認知心理機能評価を行う。ED に関しては、実施中の東北大学、九州大学との多施設共同研究のプロトコールと共通のものを用いる。認知的特徴や心理指標、行動指標ごとに特異的な脳構造・脳機能変化を重回帰分析により、診断マーカーを特定する。

CBT-E/CBT-IE 介入研究における縦断的脳画像評価

CBT-E、CBT-IE の治療マーカー、治療反応性を予測するマーカーを特定し、難治化の予測、治療適応の判定に活用する。

2 年目に治療プログラム（CBT-E/CBT-IE）が導入された際に、介入群と対照群に対して、介入前、介入終了後（3 か月）において、横断研究と同様の脳画像・認知心理機能評価を行う。上記の横断的研究で特定された診断マーカーが治療により改善するか否かを検証する。更に、治療予後を予測しうる介入前の特性を検証し、治療反応性予測のマーカーとして特定する。

倫理的配慮

本研究はヒトを対象とする医学系研究に関する倫理指針（平成 29 年改訂版）を順守し、各分担研究者・研究協力者所属施設の倫理委員会承認のもと研究を実施する。脳画像研究に関しては、NCNP、東北大、九州大の倫理審査の承認を既に受けている。

MRI 撮像には米国 FDA 基準・JIS 規格(JISZ4951)を満たしたパルスシークエンスを用い、安全性を担保する。体内金属・医療機器の危険性に関しては、事前のチェックシートで確認し、対象から除外する。実験者／被験者が不用意に検査室に持ち込む磁性体の危険性ついては、計測前の十分なチェックにより防止する。認知心理テストに関しては、汎用されている認知心理テストを採用するため、被験者は過度な負荷は少ないと考えている。

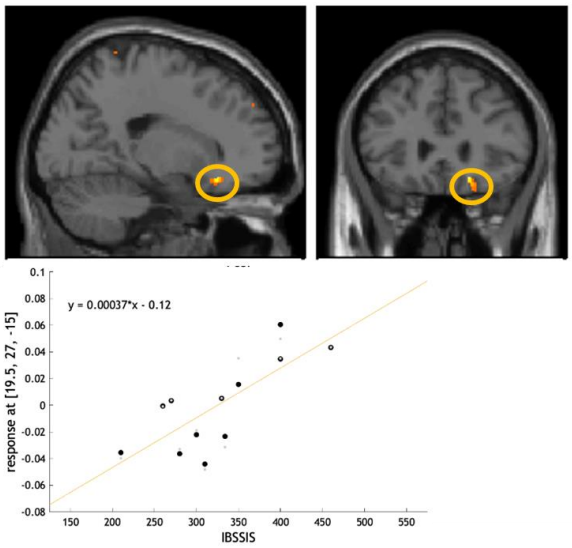
Ⅲ. 結果

各研究分担施設の担当者と定期的な打ち合わせを実施し、撮像シーケンスおよび収集する心理尺度、認知尺度について協議を重ね、収集するデータセットを確定した。

ED 患者の脳画像データに関しては、治療研究の進捗状況および共同研究期間で MRI 撮像ができる施設が限られている現状を鑑み、治療研究に参加していない ED 患者のデータの脳画像データベースの構築を優先することとした。本研究チームの枠組みを超えた国内連携体制を構築し、東北大学、千葉大学、京都大学、産業医科大学、九州大学において摂食障害の脳 MRI 画像既存データのカタログを作成し、解析研究へと移行する方針とした。2020 年 3 月時点で、共同研究者内で ED 患者 187 例、健常対象 220 例のデータカタログを作成した。

IBS 患者に関しては、従来通り治療前後の縦断研究を継続し、NCNP において 13 例の患者群を対象として MRI 検査を実施しており、令和元年度末までに 5 例の治療介入前の検査を実施済みである。予備的な解析において、IBS の重症度スコアと右前島皮質の灰白質量との正相関が認められた（図 1）。

（図 1）IBS 重症度と右前島皮質の灰白質量



Ⅳ. 考察

本分担研究の第一の成果は、本研究課題を通じて、各施設の脳画像研究者との連携を密に持つことができ、今後の ED および IBS の脳画像研究の共同研究体制が構築できたことである。

IBS 患者のデータ解析では、ベースラインデータのみであるが内部感覚との関連が指摘されている右前島皮質との正相関が認められている。今後も引き続き縦断データを収集し治療

反応性予測を反映する脳画像バイオマーカーの特定が見込まれる。

続いて、ED の脳画像研究の今後の方向性であるが、継続的なデータ収集を行いつつも、既存のデータベースを活用する方略を確立する必要がある。ED の脳画像データベースは世界的にも構築されておらず、随一の規模を誇るデータ収集ができている。今後の展開として、既存データベースで収集している認知的特徴や心理・行動指標を軸とした、治療研究と脳画像データの関連解析を検討している。具体的には、既存データベースの認知心理指標の中で、治療研究で変化が認められる指標と関連する項目を特定し、特定された認知心理指標と関連する脳構造・脳機能変化を抽出することにより、治療と関連した脳回路異常を推定できるのではないかと考えている。

V. 結語

結語として、今後の ED 及び IBS 方向性について言及する。ED 患者に関しては、データを集約し、データの QC を行い、解析研究へと展開する予定である。多施設において ED への認知行動療法前後に脳 MRI 画像を含めたバイオマーカーを収集する計画へと展開する。IBS に関しては、研究課題終了後も継続的にデータ収集を続ける必要があると考えている。NCNP での縦断研究を継続し、20 例の縦断データ収集を目指し、治療反応性予測マーカーの特定を目指していく。

研究協力者

佐藤康弘：東北大学　大学院医学系研究科
庄司知隆：東北大学　大学院医学系研究科
吉原一文：九州大学大学院医学研究院心身医学
高倉修：九州大学大学院医学研究院心身医学
権藤元治：九州大学大学院医学研究院心身医学
菅原彩子、河西ひとみ、船場美佐子、高村恒人：国立精神･神経医療研究センター　精神保健研究所

【参考文献】

1. Goodkind M, et al. Identification of a common neurobiological substrate for mental illness. JAMA psychiatry. 2015;72(4):305-15.
2. Drysdale AT, et al. Resting-state connectivity biomarkers define neurophysiological subtypes of depression. Nature medicine. 2017;23(1):28-38.
3. van Rooij SJ, et al. Predicting Treatment Outcome in PTSD: A Longitudinal Functional MRI Study on Trauma-Unrelated Emotional Processing. Neuropsychopharmacology. 2016;41(4):1156-65.

過敏性腸症候群の臨床的マーカーの検証

［分担研究者］福土　審
所属先　（東北大学大学院医学系研究科行動医学分野・東北大学病院心療内科）

研究要旨

過敏性腸症候群(irritable bowel syndrome: IBS)の臨床的マーカーを同定し、その有用性を検証することには大きな臨床的意義がある。本研究の目的は、臨床的マーカーとして、IBS 症状とともに、自律神経内分泌反応と脳波の有用性を検証することである。合わせて、認知行動療法の効果を証明するため、症例を組み入れた。方法は、IBS 患者ならびに健常者を対象に、刺激負荷あるいは治療介入時の自律神経内分泌反応と脳波を IBS 症状の変化とともに計測した。結果は、心拍変動ならびに脳波周波数成分が有意に健常者とは異なっていた。認知行動療法の臨床研究では著明改善例が見られた。IBS の臨床的マーカーとしての心拍変動ならびに脳波周波数成分は臨床的有用性が高い。認知行動療法時の臨床的マーカー変動を包含した IBS の更なる研究が今後期待される。

Ⅰ. 研究目的

過敏性腸症候群(irritable bowel syndrome; IBS)は、機能性消化管障害の概念を形成する源流になった症候群である [1]。IBS は環境からの刺激によって発症・増悪し、消化管運動異常と内臓知覚過敏で特徴づけられる脳腸相関の病態生理を有する [2]。IBS の腸内細菌には変容が見られ、変容した腸内細菌は、粘膜透過性を亢進させ、Treg、Th2、肥満細胞、好酸球などを活性化して粘膜炎症を惹起させる [3]。また、中枢での病態も明らかになりつつあり、われわれは、IBS 患者では、ストレス処理時には前頭前野の活性化が見られないことを発見した [4]。

IBS の臨床的マーカーを決定するためには、治療によって症状とともに改善する所見を同定する必要がある。IBS は難治化すると心理療法の適応となる [1]。心理療法の中でも認知行動療法 cognitive behavior therapy (CBT)は IBS に効果的であり [1]、特に内部感覚暴露 interoceptive exposure (IE)を伴わせた CBT-IE の期待が高まっている [5]。更に、マインドフルネスは、支持的治療と比較して、治療後、治療 3 か月後の IBS 重症度がより改善する [6]。われわれは、IBS 患者には、健常者と比べ、脳波 α-power 減衰と β-power 増強があることを一早く報告した [7]。corticotropin-releasing hormone 拮抗薬を投与すると、大腸運動亢進と消化器症状の発現が抑制され [8]、脳波の α-power 減衰と β-power 増強も正常化する [9]。一方、マインドフルネス瞑想が健常者において、安静時の α-power と θ-power を増強することが報告されている [10]。

本研究では、以下の仮説を検証した。研究 1. IBS 患者では健常者とは異なる自律神経内分泌反応が存在し、その変動が IBS 症状の変動と関連する。研究 2. マインドフルネス瞑想により IBS における脳波の正常化と消化器症状が改善する。合わせて、IBS に対する CBT-IE の効果を証明すべく、無作為化比較臨床試験 randomized controlled trial (RCT)の症例を組み入れた。

Ⅱ. 方法

研究 1. Rome III 基準により診断した IBS 患者 156 名(男性 25 名、女性 131 名、混合型 56 名、下痢型 55 名、便秘型 32 名、分類不能型 13 名)と年齢、性別を合致させた健常者 31 名を対照群とした。大腸内視鏡下にバロスタットバッグ付き大腸内圧カテーテルを下行結腸に挿入し、バッグ遠位 2 個と近位 2 個に装着したセンサーを用いて大腸内圧を測定記録した。内臓知

覚閾値を測定した後、バロスタットに individual operating pressure (IOP)を負荷して大腸の容量変化を測定した。安静計測の後、IOP+ 20 mmHg の大腸伸展刺激、回復、食事刺激、食後観察を実施した。同時に胸部誘導により心電図を計測し、CardioPro 2.0 (Thought Technology)によって心拍変動(heart rate variability: HRV)を分析した。IBS 症状の重症度を IBS-Severity Index (IBS-SI or IBS-Severity Scoring System: IBS-SSS)、IBS に関係する疾患特異的 QOL を IBS-quality of life (IBS-QOL)、全身症状・心理傾向を Brief Symptom Inventory (BSI)にて測定した。統計は SPSS v24.0 を用いて解析した。

研究 2. 対象は右利き男性の健常者 15 名（median [min-max]、22 [20-25]歳）と IBS 15 名（22 [20-27]歳）である。生理検査室にて順応期 10 分（安静閉眼）、瞑想期 10 分（呼吸瞑想）、回復期 10 分（安静閉眼）の脳波（Fp1/2，Fz，Cz，Pz）を測定した。脳波は周波数解析により δ，θ，α1，α2，β1，β2，γ の power%を評価した。また，各期の前後に唾液アミラーゼ、腹部症状（0：全くない～10：非常に強い）：腹部不快、腹部膨満、腹痛、便意）、気分（0：全くない～10：非常に強い）：不安、眠気、Profile of Mood States II-Brief、Toronto Mindfulness Scale を測定した。瞑想効果は、各群におけるベースラインからの各指標の変化量を一般化推定方程式（群×条件）より検討した。

RCT. 研究計画[5]にのっとり、IBS 患者 5 例を組み入れた。

Ⅲ. 結果

研究 1. 結果は、IBS 群は対照群に比較して有意に高い IBS-SI、低い IBS-QOL、高い BSI を示した。IBS 群の各時期の HRV は対照群と有意差がなかった。但し、HRV の low frequency component/high frequency component (LF/HF)比は対照群が安静期から大腸伸展刺激期と食後観察期に上昇するのに対して IBS 群では有意にその反応に乏しかった(群間 x 時期交互作用 p = 0.027)。IBS 群、対照群ともに年齢に対して HF%が有意に負の相関、LF/HF に正の相関を示した。大腸内圧から計算した大腸運動係数(motility index: MI)は、IBS 群において食後の HF%が有意な負の相関(rho = -0.231, P = 0.006)、食後の LF/HF が有意な正の相関(rho = 0.229, P = 0.006)を示したが対照群では相関しなかった[12]。

研究 2. ベースラインの腹部症状は全ての項目において IBS 群で有意に高値であり（$p < 0.05$）、唾液アミラーゼ、気分、マインドフル状態、脳波において両群に有意な差は認められなかった。脳波の α1-power 変化は Fz、Cz、Pz で有意な交互作用を認め（$p < 0.005$）、健常群において回復期の値は瞑想期に比べ有意に増加した（$p < 0.05$）。β1-power 変化は、Fp1 において有意な条件の効果を認めた（$p = 0.026$）。β2 変化は、Fp1/2、Fz、Cz、Pz において有意な条件の効果を認め（$p < 0.05$）、回復期の値は瞑想期に比べ有意に低下した（$p < 0.05$）。また Pz では有意な交互作用を認め（$p = 0.011$）、健常群でこの傾向が特に顕著であった（$p < 0.001$）。腹部不快感の変化は有意な交互作用を認め（$p = 0.007$）、IBS 群は健常群と比べ瞑想後と回復期後の得点が有意に低下した（$p < 0.05$）。便意は有意な交互作用を認め（$p = 0.003$）、IBS 群は瞑想後の得点が順応期後に比べて有意に低下した（$p = 0.016$）。マインドフル状態の変化は、体験への関心および脱中心化ともに有意な条件の効果を認め（$p < 0.001$）、瞑想後に有意に増加した（$p < 0.05$）。

RCT. CBT-IE 群 3 例、通常治療群 2 例を組み入れた。CBT-IE 群 1 例が著明改善を示した。

Ⅳ. 考察

研究 1 により、内臓知覚、大腸運動、症状の定量的尺度に加え、大腸伸展刺激時もしくは食後期における HRV で評価した自律神経応答も IBS のバイオマーカーになる可能性が示された[12]。IBS のバイオマーカーには生体での計測が必要な消化管機能、自律神経機能、脳機能の他

に粘膜透過性、血液、尿、糞便、生検組織などの検体由来の候補物質が挙げられる。この中では HRV にて評価した自律神経応答は最も計測が容易である [2]。その発展が期待され、今後の展開も有望である。研究 2 の仮説は支持され、IBS は健常者と脳波 power%の変動が健常者とは異なることが示唆された。IBS では簡易マインドフルネス瞑想により、腹部症状にも改善を認めた。今回解析した脳波は周波数解析のみであり、γ-oscillation などの細かな分析を実施していない。IBS の例数増加と脳波の詳細な分析が必要である。また、IBS の病態生理を正常化するには、単回の瞑想では効果が弱く、継続した瞑想実践が必要になることが考えられる [6]。更に IBS に対する CBT-IE の効果検証 [5] のための患者組み入れが順調に進んでいる。

IBS のバイオマーカーには生体での計測が必要な消化管機能、自律神経機能、脳機能の他に粘膜透過性、血液、尿、糞便、生検組織などの検体由来の候補物質が挙げられる [3]。脳波にて評価する中枢神経応答は計測が容易であり、どの生理的状況下で計測すれば最も健常者や他疾患との違いを描出できるか、その検証が期待され、今後の展開が有望である。

IBS の症状形成に関する消化管運動、消化管知覚過敏ならびに中枢機能については世界的に注目される成果が得られている [11-16]。また、わが国の IBS の新たな診断治療ガイドラインを日本消化器病学会から作成委員長として策定し、平成 27 年 1 月にこのガイドラインを英文で公刊したが [1]、現在これを改訂する途上にある。われわれは、Rome III 基準の日本語版大規模研究用の機能モジュールの開発には既に成功し [13]、Rome IV 基準の日本語版大規模研究用の機能モジュールにも改訂した。また、IBS とその関連疾患の治療法も格段に進歩させた [16]。これらを駆使した IBS の臨床的マーカーの同定が望まれる。

V. 結語

IBS の臨床的マーカーとしての心拍変動ならびに脳波周波数成分は臨床的有用性が高いと示唆された。

研究協力者

村椿智彦 : 東北大学大学院医学系研究科行動医学分野
西村尭幸 : 東北大学病院臨床研修センター
相澤祐一 : 東北大学大学院医学系研究科行動医学分野
田中由佳里 : 東北大学大学院医学系研究科行動医学分野
鹿野理子 : 東北大学大学院医学系研究科行動医学分野
遠藤由香 : 東北大学病院心療内科
田村太作 : 東北大学病院心療内科
佐藤康弘 : 東北大学病院心療内科
庄司知隆 : 東北大学病院心療内科
山口雄平 : 東北大学病院心療内科
金澤素 : 東北大学大学院医学系研究科行動医学分野・東北大学病院心療内科

参考文献

1) Fukudo S, Kaneko H, Akiho H, Inamori M, Endo Y, Okumura T, Kanazawa M, Kamiya T, Sato K, Chiba T, Furuta K, Yamato S, Arakawa T, Fujiyama Y, Azuma T, Fujimoto K, Mine T, Miura S, Kinoshita Y, Sugano K, Shimosegawa T. Evidence-based clinical practice guidelines for irritable bowel syndrome. **J Gastroenterol** 50: 11-30, 2015.

2) Fukudo S. IBS: Autonomic dysregulation in IBS. **Nature Reviews Gastroenterol Hepatol** 10: 569-571, 2013.

3) Enck P, Aziz Q, Barbara G, Farmer A, Fukudo S, Mayer E, Niesler B, Quigley E, Rajilic-Stojanović M, Schemann M, Schwille-Kiuntke J, Simren M, Zipfel S, Spiller R. Irritable bowel syndrome (IBS). **Nature Reviews Disease Primers** 2: 16014, 2016.

4) Aizawa E, Sato Y, Kochiyama T, Saito N,

Izumiyama M, Morishita J, Kanazawa M, Shima K, Mushiake H, Hongo M, Fukudo S. Altered cognitive function of prefrontal cortex during error feedback in patients with irritable bowel syndrome, based on fMRI and dynamic causal modeling. **Gastroenterology** 143: 1188-1198, 2012.

5) Kawanishi H, Sekiguchi A, Funaba M, Fujii Y, Yoshiuchi K, Kikuchi H, Kawai K, Maruo K, Sugawara N, Hatano K, Shoji T, Yamazaki T, Toda K, Murakami M, Shoji M, Ohara C, Tomita Y, Fukudo S, Ando T. Cognitive behavioral therapy with interoceptive exposure and complementary video materials for irritable bowel syndrome (IBS): protocol for a multicenter randomized controlled trial in Japan. **Biopsychosoc Med** 13: 14, 2019.

6) Gaylord SA, Palsson OS, Garland EL, Faurot KR, Coble RS, Mann JD, Frey W, Leniek K, Whitehead WE. Mindfulness training reduces the severity of irritable bowel syndrome in women: results of a randomized controlled trial. **Am J Gastroenterol** 106: 1678-1688, 2011.

7) Fukudo S, Nomura T, Muranaka M, Taguchi F. Brain-gut response to stress and cholinergic stimulation in irritable bowel syndrome. **J Clin Gastroenterol** 17: 133-141, 1993.

8) Sagami Y, Shimada Y, Tayama J, Nomura T, Satake M, Endo Y, Shoji T, Karahashi K, Hongo M, Fukudo S. Effect of a corticotropin releasing hormone receptor antagonist on colonic sensory and motor function in patients with irritable bowel syndrome. **Gut** 53: 958-964, 2004.

9) Tayama J, Sagami Y, Shimada Y, Hongo M, Fukudo S. Effect of alpha-helical CRH on quantitative electroencephalogram in patients with irritable bowel syndrome. **Neurogastroenterol Motil** 19: 471-483, 2007.

10) Lee DJ, Kulubya E, Goldin P, Goodarzi A, Girgis F. Review of the Neural Oscillations Underlying Meditation. **Front Neurosci** 12: 178, 2018.

11) Tanaka Y, Kanazawa M, Kano M, Morishita J, Hamaguchi T, Van Oudenhove L, Ly HG, Dupont P, Tack J, Yamaguchi T, Yanai K, Tashiro M, Fukudo S. Differential activation in amygdala and plasma noradrenaline during colorectal distention by administration of corticotropin-releasing hormone between healthy individuals and patients with irritable bowel syndrome. **PLoS One** 11: e0157347, 2016.

12) Tanaka Y, Kanazawa M, Palsson OS, Van Tilburg MA, Gangarosa LM, Fukudo S, Drossman DA, Whitehead WE. Increased postprandial colonic motility and autonomic nervous system activity in patients with irritable bowel syndrome: a prospective study. **J Neurogastroenterol Motil** 24: 1-9, 2018.

13) Kanazawa M, Nakajima S, Oshima T, Whitehead WE, Sperber AD, Palsson OS, Drossman DA, Miwa H, Fukudo S. Validity and reliability of the Japanese version of the Rome III Diagnostic Questionnaire for irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. **J Neurogastroenterol Motil** 21: 537-544, 2015.

14) Kano M, Muratsubaki T, Van Oudenhove L, Morishita J, Yoshizawa M, Kono K, Yagihashi M, Tanaka Y, Mugikura S, Dupont P, Ly HG, Takase K, Kanazawa M, Fukudo S. Altered brain and gut responses to corticotropin-releasing hormone (CRH) in patients with irritable bowel syndrome. **Scientific Report** 7: 12425, 2017.

15) Kano M, Dupont P, Aziz Q, Fukudo S. Understanding neurogastroenterology from neuroimaging perspective: A comprehensive review of functional and structural brain imaging in functional gastrointestinal disorders. **J Neurogastroenterol Motil** 24 (4): 512-527, 2018.

16) Fukudo S, Kaku K. Future possibility of mizagliflozin on functional constipation and/or irritable bowel syndrome with constipation. **Gastroenterology** 157: 898-899, 2019.

過敏性腸症候群の日常生活下での多面的評価法の検証

［分担研究者］菊地　裕絵
国立研究開発法人　国立国際医療研究センター病院　心療内科

研究要旨

過敏性腸症候群（IBS）の評価は、患者の自己報告による評価（patient reported outcome, PRO）が中心であり、PRO に伴う recall bias を避けるために日常生活下で携帯型コンピュータを用いて記録を行う computerized ecological momentary assessment （cEMA）法が有用であることが期待される。一方、IBS は、心理社会的側面を含めた多面的な病態評価が重要である。これらを可能にするために、分担研究者らはこれまでに、日常生活下での IBS の多面的評価法として EMA を中心とした測定プロトコルを開発した。しかしながら EMA については reactivity の存在、長期間実施したときの入力の負担、情報の不連続性などの懸念点も指摘されてきた。本研究では、これらの懸念点を解決するための方策としてストレスの客観指標の探索と computerized adaptive testing（CAT）の導入を行うことを目的とした。その結果、連続的・非侵襲的に測定可能な客観的指標である身体活動度を用いてストレス因子の評価が可能となる可能性があること、また CAT を導入することで、入力負担の軽減が可能であり、また reactivity の予防にも寄与できる可能性が明らかとなった。

Ⅰ. 研究目的

過敏性腸症候群（IBS）の評価は、腹痛や腹部不快感などについての患者の自己報告による評価（patient reported outcome, PRO）が中心である。PRO の評価はこれまで診察時の想起によって行うことが多く、recall bias が避けられないことが指摘されており、日常生活下で携帯型コンピュータを用いて随時記録を行うことでバイアスを避け生態学的妥当性を最大化する computerized ecological momentary assessment （cEMA）法が有用であることが期待される。また、IBS は、心身症の病態を取る（発症や経過に心理社会的因子が関連する）ことが多いことから、心理社会的側面を含めた多面的な病態評価が重要である。これらを踏まえ、分担研究者らは、日常生活下での IBS の多面的評価法として、これまでに開発した EMA 用ストレス評価尺度に IBS に関連する評価項目を合わせ、EMA を中心とした測定プロトコルを開発した。

一方、EMA は生態学的妥当性の高さがメリットではあるが、いくつかの懸念点も指摘されてきた。一つ目は reactivity の存在である。EMA では短期間に反復して評価記録（質問項目への回答）を行うため、繰り返し回答することが回答の内容に影響する可能性が否定できない。当初、疼痛に対する EMA に関しての検討では reactivity の存在を否定する報告が多かった[1)]が、疼痛以外の領域では reactivity の存在を指摘する報告[2)]も近年見られている。二つ目は、被験者の入力の負担である。研究で一般に行われるように、1 日数回の入力を 2 週間程度実施するのであれば、負担感が問題になることは少ないと考えられる。しかし、日常臨床への応用を含め長期間にわたって実施するのであれば入力の負担が問題になる可能性がある。三つ目は、EMA における記録の不連続性である。EMA では recall bias を避けるためその瞬間の状態について評価記録を行う。それにより入力時点の状態は把握することができるが、入力と入力の間の状態の推移については情報が得られないことになる。

以上の背景を踏まえ、本研究では、これらの

懸念点を解決するためにストレスの客観指標の探索とコンピュータ適合型問診（computerized adaptive testing, CAT）の導入を行うことを目的とした。

Ⅱ．方法

研究１：EMA によるストレス評価尺度と身体活動度の局所統計量の関連

20 歳以上の健常群及び心療内科患者群を対象に、1 週間スマートフォンを携帯してもらい、起床時・就寝時・アラーム時（2 日目までは約 2 時間おき、3 日目以降は約 4 時間おき）・強いストレスを自覚した時に、EMA 用ストレス評価尺度を含む複数の項目について回答を入力してもらった。また、非利き手の手首にアクチグラフを装着し、毎分の身体活動度を測定した。

先行研究[3)]にならい、EMA 記録が行われた時刻の前後 30 分間の 1 時間について平均および歪度を算出し、マルチレベル解析により、EMA 用ストレス評価尺度の各尺度（ストレッサー:心理的負担、ストレッサー:対人的ストレス、ストレス反応）との個人内関連について検討した。

研究 2:EMA によるストレス評価尺度に対する CAT 導入と CAT シミュレーション

20 歳以上の心療内科患者群および健常群を対象として、心療内科患者群は自己記入式質問紙によって、健常群はウェブ質問紙によって調査を実施した。調査項目は基本情報のほか、回答時のストレスの自覚の有無と、EMA 用質問項目であるストレス因子（4 件法）14 項目・ソーシャルサポート（2 件法）8 項目・ストレス反応（4 件法）56 項目である。項目反応理論（多母集団モデル ; ストレス因子とストレス反応は多段階反応モデル、ソーシャルサポートは 2PL モデル）を適用し、項目特性である困難度と識別力を算出し、困難度が著しく低いまたは高い項目、識別力が低い項目を除外した。さらに、困難度および識別力が患者群および健常群で有意に異なる項目も除外した。このように不適切な項目を除外し、EMA 用ストレス評価尺度を作成したが、今回の研究ではこのうちストレス反応について、不適切な項目除外後の 39 項目で解析した際の項目パラメータを利用し、最終的に尺度に採用した 21 項目を用いて、catR（R パッケージ）を用いてシミュレーションを行った。

Ⅲ．結果

研究１：EMA によるストレス評価尺度と身体活動度の局所統計量の関連

健常群 10 名（うち女性 9 名、年齢中央値 43 歳）および患者群 8 名（うち女性 7 名、年齢中央値 39 歳）で入力・記録されたデータを対象に解析を行った。EMA 記録回数を表 1 に示す。

表 1.EMA 記録回数の内訳

EMA記録回数（18名 ×7日間合計）	
−起床時	139
−就寝時	142
−アラーム時	679
−ストレス自覚時	53
合計	1013

心理的負担と身体活動度の局所平均は有意な正の関連を、また対人的ストレスと局所歪度は有意な正の関連を認めた。ストレス反応については、局所平均および局所歪度を含むモデルで、null model より当てはまりの良いものはなく、これらの局所統計量との有意な関連は認めないものと考えられた。

表 2. ストレス因子と身体活動度の局所統計量

a)

	心理的負担	
	推定値	F値およびp 値
切片	3.2 (1.8)	
局所平均の効果 （固定効果）	0.023 (0.004)	F(1,686) = 28.20 p <0.0001
局所歪度の効果 （変量効果）	0.18 (0.39)	F(1,686) = 0.21 p = 0.65

b)

	対人的ストレス	
	推定値	F値およびp 値
切片	0.80 (0.51)	
局所平均の効果 （変量効果）	0.0020 (0.0021)	F(1,685) = 0.87 p = 0.35
局所歪度の効果 （固定効果）	0.29 (0.12)	F(1,685) = 5.84 p = 0.02

推定値は標準誤差とともに示す。
それぞれ、局所平均および局所歪度の効果を固定効果もしくは変量効果とした 4 つのモデルを解析し、両者を含まない null model も含めた中から、AIC を用いてより当てはまりの良いモデルを選択した。それぞれの効果について、個人差が大きい時は変量効果モデルの方が、個人差が小さい時は固定効果モデルの方が当てはまりが良くなると考えられる。

研究 2:EMA によるストレス評価尺度に対する CAT 導入 CAT シミュレーション

まず、スマートフォン上に共同研究者が開発した CAT を実施するアプリを導入し、試行したところ、実施可能であり、全 21 問を回答することなくスコアを推定可能であった(図 1)。

図 1. スマートフォン上での CAT の実施

catR でのシミュレーションは以下の 2 条件で実施した。

＜条件 1＞項目選択は MLWI(maximum likelihood weighted information criterion)法を用いて、1 項目を選択。終了基準は、推定誤差の標準偏差 0.3 未満とする。

＜条件 2＞項目選択は MLWI(maximum likelihood weighted information criterion)法を用いて、2 項目を候補として選択したうえでいずれかをランダムに選ぶ。終了基準は、推定誤差の標準偏差0.3未満もしくは15項目実施時点とする。

表 3. CAT シミュレーション結果

	条件 1 ランダム無	条件 2 ランダム有、15 項目まで
平均テスト長 （回答項目数）	6.80	6.15
潜在特性推定値と真値の相関	0.964	0.965
RMSE	0.278	0.275
バイアス	-0.042	-0.045
最大曝露率	1	0.863
項目重複率	0.49	0.44

条件 1 でも平均テスト長は 6.8 項目と 21 項目よりも大幅に短縮可能であったが、一部の被験者において 21 項目すべてを実施しても推定誤差が基準未満とならなかった。また、1 項目目は同じ質問から始まり必ず回答することや、各質問の曝露率の分布からも、一部の項目が偏って実施される可能性が考えられた。そこで、項目選択においてランダム選択を取り入れ、また終了基準に項目数を導入した条件 2 で実施したところ、最大曝露率や項目重複率が条件 1 より改善し、また潜在特性の真値との相関など推定能を大きく損なうことなく評価が実施可能であった。

Ⅳ．考察

ストレス因子の各尺度と身体活動の局所統計量に有意な関連が認められ、ストレス因子に伴う行動パターンの変化を反映している可能性が示唆されるとともに、これらはストレス因子評価の代替指標の候補となりうると考えられた。今後入力負担の軽減・reactivity の回避および、EMA の不連続性を補う連続的な指標として用いられうることが期待される。行動パターンの変化に関する詳細な解釈を進めるとともにこれまで検討してきた心拍変動指標とあわせて、日常生活下でのストレスの客観的評価法を検討していく必要があると考えられる。

また、CAT のシミュレーションでは、通常 21 項目を実施する必要があるところ平均 6.18 項目に短縮可能であり入力負担軽減への寄与は大きいと考えられた。また、CAT を利用することにより同じ項目を繰り返し実施することも一部避けられる可能性があり、reactivity の回避にも寄与することが期待できる。今後は同一被験者が繰り返し入力を行う EMA として CAT を利用した場合のシミュレーションを行い問題点の有無を検討したうえで、実際に日常生活下調査に応用していく必要があると考えられる。

Ⅴ．結語

過敏性腸症候群の日常生活下での多面的評価法について、問題となる可能性がある reactivity や入力負担、情報の不連続性について解決法を検討した。連続的・非侵襲的に測定可能な客観的指標である身体活動度を用いてストレス因子の評価が可能となる可能性があること、また CAT を導入することで、入力負担の軽減が可能であり、また reactivity の予防にも寄与できる可能性が明らかとなった。

研究協力者

木村　真弓 : 国立研究開発法人　国立国際医療研究センター病院　心療内科

倉科　志穂 : 国立研究開発法人　国立国際医療研究センター病院　心療内科

北島　智子 : 国立研究開発法人　国立国際医療研究センター病院　心療内科

参考文献

1）Stone AA, et al. Intensive momentary reporting of pain with an electronic diary: reactivity, compliance, and patient satisfaction. Pain 104: 343–351, 2003

2）De Vuyst HJ, et al. Does repeatedly reporting positive or negative emotions in daily life have an impact on the level of emotional experiences and depressive symptoms over time? PlosOne 14: e0219121, 2019

3）Kim J, et al. Covariation of Depressive Mood and Spontaneous Physical Activity in Major Depressive Disorder: Toward Continuous Monitoring of Depressive Mood. IEEE JBHI 19:1347-1355, 2015

摂食障害の治療プログラムの開発

［分担研究者］須藤　信行
所属先　九州大学大学院医学研究院　心身医学

研究要旨

摂食障害(ED)は、先進国で増加傾向にあり、我が国も例外ではない。また、ED 患者の若年化や高齢化・遷延化が懸念されているが、治療サイドにおいても治療施設の不足や標準的治療法の未確立などの問題点を抱えている。ED は死亡率も高く、身体的・心理的に重症であることから、本邦において有効かつ簡便に使用することのできる治療法の開発が急務である。近年、ED に対する治療として強化版認知行動療法(CBT-E)の有効性を示す報告が多数なされるようになってきた。

本研究においては、日本人の ED 患者に適用可能な認知行動療法を開発することを目指す。多施設において治療を実施し、従来治療との比較を行うことで、その有効性を検証する。さらに、本治療に有効な患者群の同定も行う。

現在各施設で、神経性過食症患者に対して介入継続中である。

Ⅰ．研究目的

日本人の ED 患者に対して適用可能な認知行動療法の開発とその有効性を前向きに検証する。さらに本治療に有効な患者群を同定し、標準的治療法を確立することを目指す。

Ⅱ．方法

1. 国立精神・神経医療研究センター、東北大学、東京大学、国立国際医療研究センター、九州大学病院における他施設共同研究とする。

2. 対象者:18 歳以上で、DSM-5 の診断基準を満たす神経性過食症患者。

研究対象者数:140(試験治療群 70、対象治療群 70)

4. 試験治療群は 20 セッションの CBT-E(enhanced cognitive behavioral therapy)を施行。対象治療群は CBT-E の技法を用いない通常治療を施行。

5. 主要評価項目:

20 週における神経性過食症の緩解で、下記の 3 つの項目に同時に該当することの有無として定義される。

1. 過去 4 週間の過食エピソードおよび不適切な代償行動が平均して週 1 回未満(4 週間で 4 回未満、すなわち 3 回以下)である。

2. 自己評価が体型および体重の影響を過度に受けていない。

3. Body Mass Index(BMI)が 17.5kg/m^2 より大きい。

6. 副次評価項目

重要な副次評価項目:40 週において EDE における、過食・排出行動の頻度が過去 4 週間に平均週 1 回未満になることの達成の有無とする。

7. 評価時期

治療開始前、治療開始後 6 週、治療開始後 20 週、治療開始後 40 週、治療開始後 80 週。

8. 統計解析

Ⅲ．結果

・東北大学、国立・精神神経医療研究センター、東京大学、国立・国際医療研究センター、九州大学の全ての施設で倫理委員会の承認が得られた。

・月に 1 回各施設の代表者によるウェブ会議を行い、進捗を共有し、準備と微修正を行なった。

・平成 31 年 2 月 25 日より、研究参加者の募集を開始した。

・現在、各施設において、研究参加者に対して介入継続中およびデータ集積中である。

・治療者育成のための、開発者によるスーパービジョンも継続中である。
・プロトコール論文を作成(小原千郷ほか)、BioPsyhoSocial Medicine に掲載された。

Ⅳ．考察

申請者らは、これまで一部の AN 入院患者に対し、従来の「行動制限を用いた認知行動療法」[1]に加え、Fairburn の開発した CBT-E の技法を取り入れる試みを行っており、患者及び治療者の病態理解の深化と有効性を実感している。

研究参加者リクルートに困難があったが、摂食障害基幹センターや治療支援センターのホームページを活用するなどの工夫により、次第に参加者が集まりつつある。引き続き患者リクルートを継続し、研究参加者を増加させる必要がある。

CBT-E が有効であることは欧州各国から報告されており[2][3]、我が国での ED に対する標準的治療法を確立する上で、CBT-E が重要な規範となる可能性が考えられる。

Ⅴ．結語

ED に対する有効な治療法の開発には、本研究のさらなる継続・展開が重要である。

研究協力者

髙倉　修：九州大学病院心療内科
波夛　伴和：九州大学病院心療内科

参考文献

1) Amemiya N, Takii M, Hata T, Morita C, Takakura S, Oshikiri K, et al. The outcome of Japanese anorexia nervosa patients treated with an inpatient therapy in an internal medicine unit. Eating Weight Disord EWD. 2012;17(1):e1–e8.
2) Poulsen S, Lunn S, Daniel SI, Folke s, Mathiesen BB, Katznelson H, Fairburn CG, Arondomiszed controlled trial of psychoanalytic psychotherapy or cognitive-behavioral therapy for bulimia nervosa. Am J Psychiatry. 2014; 171:109-16
3) Dalle Grave R, Calugi S, Conti M, Doll H, Fairburn CG. Inpatient cognitive behaviour therapy for anorexia nervosa: a randomized controlled trial. Psychother Psychosom. 2013;82(6):390–8.

摂食障害の多面的評価法ならびに効果的治療法の検証

［分担研究者］吉内　一浩
所属先　東京大学大学院医学系研究科ストレス防御・心身医学

研究要旨

摂食障害を中心とした食行動異常を呈する疾患では、単なる食行動の異常だけではなく、心理社会的側面、生物学的側面など多面的な評価とそれに基づく治療法が必要であるが、国内外を問わず、これまで十分な研究が行われていない。本研究では、摂食障害を中心とした食行動異常を呈する疾患に関して、日常生活下における多面的な評価法である Ecological Momentary Assessment (EMA)の手法を補完するとともに、EMA でも実施可能な BCQ、FCQ-ED の各日本語版の開発を行った。治療法の開発に関しては、多施設共同研究の枠組みで、近年効果が報告されている CBT-E の開発者の一人によるグループスーパービジョンを施行中であり、多施設共同研究による治療介入研究の準備中である。

Ⅰ．研究目的

近年、社会的問題となっている摂食障害を中心とした食行動異常を呈する疾患に関しては、多面的な評価を行うことが重要であるが、これまで十分な研究が行われてこなかった。本研究では、日常生活下における評価法である Ecological Momentary Assessment (EMA)[1] を補完するとともに、EMA でも実施可能であり、欧米では頻用されているにも関わらず、日本語版の開発が行われていなかった Body Checking Questionnaire （ BCQ ）[2] 、 Family Coping Questionnaire for Eating Disorders（FCQ-ED）[3] の各日本語版の開発を行うことを目的とした。

また、治療に関しては、いまだ本邦においてエビデンスレベルの高い治療法が存在しないが、近年欧米で有効性が報告されている enhanced CBT（CBT-E）を用いた多施設共同研究を実施する。まずは、標準的治療回数が少ない神経過食症（BN）を対象としたランダム化比較試験を行い、CBT-E の治療効果を検証することを目的とした。

Ⅱ．方法

（1）多面的評価法の開発

これまで、分担研究者らは、病態把握のために、加速度計やスマートフォンを使用して、日常生活下における症状・身体活動度などのデータ収集を行う研究を行ってきた[1]。また、スマートフォン用の食事記録ソフトウェアを開発し、この食事記録ソフトウェアで記録・自動計算された摂取エネルギー量が正確であることも検証し、十分に正確であることが保証されている[4]。

しかし、欧米で開発された評価法である BCQ、FCQ-ED の日本語版が存在しなかったため、各日本語版の開発も行う。

・BCQ

まず、原版の著者に、日本語訳の開発の許諾を得た後、エキスパートによる順翻訳およびバイリンガルの専門家による逆翻訳を行い、日本語訳の訳を確定した。

対象は、16 歳以上の健常者および摂食障害患者であり、健常者は、インターネットの調査会社に登録している者とした。患者群は、東京大学医学部附属病院心療内科に通院中の摂食障害患者とした。

・FCQ-ED

まず、原版の著者に、日本語訳の開発の許諾を得た後、エキスパートによる順翻訳およびバイリンガルの専門家による逆翻訳を行い、日本語訳の訳を確定した。

対象は、16 歳から 65 歳の患者の 20 歳以上の家族で、過去最低 9 カ月間患者と同居しており、持続してこの 3 カ月間暮らしているものであった。

・統計解析

BCQ、FCQ-ED ともに、まず原版と同じ因子構造を持っているかを確認的因子分析を用いて検証した。その結果、因子構造の当てはまりが悪い場合には、探索的因子分析を行い、日本語版の因子構造を決定した。また、信頼性の検証は、各因子の Cronbach のα係数を算出した。妥当性の検証は、既存の質問紙（BCQ は、Body Shape Questionnaire（BSQ）と Eating Attitude Test 26（EAT-26）；FCQ-ED は POMS）との相関係数を算出して、併存的妥当性を検証した。

（2）治療法の開発

九州大学医学部心療内科、東北大学病院心療内科および主任研究者と、多施設共同研究の体制作りおよび実施に向けた話し合いを行い、多施設共同研究の枠組みによる神経性過食症を対象とした、CBT-E のランダム化比較試験を計画し、本学の倫理委員会の承認を得た。その過程で、CBT-E の開発者である Fairburn 教授との密に連絡を取り、プロトコルの作成が完了した。また、治療介入研究を行う際の治療者の教育者を育成するために Oxford 大学の Cooper 教授によるスーパービジョンを引き続き行った。

（3）倫理的配慮

いずれの研究も、当該施設における倫理委員会の承認を得たのち、被験者からも文書による説明を行なったのち、書面による同意を得た。

Ⅲ. 結果

（1）多面的評価法の開発

・BCQ

BCQ を 16 歳以上の摂食障害患者 100 名（年齢 32.9±12.5 歳）、健常者 155 名（年齢 38.9±11.8 歳）に実施した。確認的因子分析では、CFI = 0.845, RMSEA = 0.103 でありモデルの当てはまりは不十分であり、その後の探索的因子分析では、17 項目 3 つの下位尺度（特定の体の部位、儀式的な体形確認、比較）が明らかになった。3 つの下位項目の Cronbach のα係数は 0.85-0.91 と十分に高く、信頼性が示された（表 1）。また、妥当性の検討として、BSQ、EAT-26 と相関解析を行い、EAT-26、EDI-2 いずれも全ての項目で有意な正の相関が認められた(表 1)。

表 1．日本語版 BCQ の併存的妥当性

	BCQ 合計得点	特定の体の部位に関する尺度	儀式的な体形確認に関する尺度	比較に関する尺度
BSQ	0.73*	0.69*	0.52*	0.71*
EAT-26	0.45*	0.35*	0.33*	0.51*

* p<0.001

また、摂食障害患者と健常者との比較では、BCQ の合計点および比較に関して、有意に患者群で高得点が認められた。

表2. BCQ-J得点の群間比較

	健常者 (n=155)	摂食障害 (n=100)	*p*値
Total BCQ-J	35.6±12.4	39.9±16.9	0.02
特定の体の部位	13.8±5.6	14.4±7.4	0.49
儀式的な体形確認	9.9±4.2	10.6±5.3	0.26
比較	11.9±4.1	15.0±5.9	<0.001

・FCQ-ED

107 名の患者の家族 150 名が本研究に参加した（母親：91 名, 父親：34 名, 配偶者：14 名, 兄弟：7 名, その他： 4 名、平均年齢：51.1 ± 12.0）。原版の 5 つの下位尺度（強制、良好なコミュニケーション、馴れ合い、情報検索、回避）における信頼性は高いとは言えず(0.45 ≦ Cronbach のアルファ≦ 0.66) 、また確認的因子分析もモデルのあてはまりが悪かったため、日本語版 FCQ-ED 独自の因子構造を探索的因子分析を用いて検討した。その結果、4 因子構造（体重測定への反応、過食への反応、非排出行

動への反応、排出行動への反応）であることがわかり、信頼性も十分であった（0.68 ≦ Cronbach’s alphas≦ 0.85）。

また、FCQ-EDの4つの下位尺度は、家族が実施した POMS の下位尺度との有意な相関がみられた（表3）。

表3. 日本語版 FCQ-ED の併存的妥当性

	体重測定への反応	過食への反応	非排出行動への反応	排出行動への反応
POMS-TA	0.19	n.s.	0.29	n.s.
POMS-D	n.s.	0.18	0.27	0.17
POMS-AH	n.s.	0.17	0.22	0.17
POMS-V	n.s.	n.s.	n.s.	-0.22
POMS-F	n.s.	n.s.	0.31	n.s.
POMS-C	n.s.	n.s.	0.35	n.s.

数値は全て $p < 0.05$

（2）治療法の開発

九州大学医学部心療内科、東北大学病院心療内科および主任研究者と、多施設共同研究の体制作りおよび実施に向けた話し合いを行った。その過程で、まずは、治療者の育成と治療の質の担保を確保するため、CBT-E の開発者の一人である Cooper 教授による、グループスーパービジョンの実施中である。

神経性過食症を対象とした多施設共同ランダム化比較試験に関しては、分担研究者の施設では、導入済み2名、除外8名という状況であった。

Ⅳ．考察

（1）に関しては、いずれの質問票も、十分は信頼性と妥当性を持つことが検証されたと考えられる。従って、これまで欧米で使用されていた評価法の日本語版が完成したため、多面的な評価を行うことが可能になったと考えられる。また、これらは、EMA の枠組みでも使用可能であり、今後は項目反応理論を用いたコンピュータ適応型の質問票として用いることも可能となり、より信頼性の高い評価が可能となると考えられる。

（2）に関しては、信頼性の高い治療介入研究とするためには、サンプルサイズを大きくする必要があり、摂食障害患者の研究脱落率が高いことを考慮すると、多施設共同研究の枠組みで研究を進めることが重要であり、研究の枠組みを構築し[5]、進行中であるという意義は大きい。

Ⅴ．結語

摂食障害を中心とした食行動異常を呈する疾患の多面的な評価方法の開発を目的に、欧米で頻度が高く使用されているが、日本語版が存在しないものを中心に、日本語版の開発を実施した。今後は、さらに、日常生活下における評価法のブラッシュアップを行い、治療介入に役立てたい。

また、治療法の開発に関しては、多施設共同研究の枠組みで、わが国の医療制度に則した治療プログラムの開発を行いたい。

研究協力者

山崎允宏：東京大学大学院医学系研究科ストレス防御・心身医学

宮本せら紀：東京大学大学院医学系研究科ストレス防御・心身医学

堀江武：東京大学医学部附属病院心療内科

大谷真：東京大学医学部附属病院心療内科

松岡美樹子：東京大学医学部附属病院心療内科

参考文献

1) Kikuchi H, Yoshiuchi K, et al. Tension-type headache and physical activity: an actigraphic study. Cephalalgia 27:1236-1243, 2007.

2) Reas DL, et al. Development of the Body Checking Questionnaire: A self-report measure of body checking behaviors. Int J Eat Disord 31:324-333, 2002.

3) Fiorillo A, et al. Development and validation of the Family Copint Questionnaire for Eating

Disorders. Int J Eat Disord 48:298-304, 2015.
4) Fukuo W, Yoshiuchi K, et al. Development of a hand-held personal digital assistant-based food diary with food photographs for Japanese. J Am Diet Ass 109:1232-1236, 2009.
5) Ohara C, Yoshiuchi K, et al. Effectiveness of enhanced cognitive behavior therapy for bulimia nervosa in Japan: a randomized controlled trial protocol. BioPsychoSocial Medicine 14:2, 2020.

心身症・摂食障害の治療プログラムと臨床マーカーの検証

［分担研究者］河合　啓介
所属先　国立国際医療研究センター国府台病院　心療内科

研究要旨
摂食障害と過敏性腸症候群（IBS）の患者に対して、構造化された治療を多施設共同体制下で行いその有効性を検証する。神経性過食症患者（BN）では、認知行動療法改良版（CBT-E）20 セッションを行い、通常の治療（心理教育・支持的精神療法）と比較する。IBS 患者では、ビデオ教材(CBT-IE)を用いた認知行動療法による治療を行い、通常の治療（心理教育・支持的精神療法）と比較し、CBT-IE プロトコールの効果を検証する。国府台病院の副次評価項目として、気分に影響を与えると考えられているオキシトシン等を経時的に測定する。BN 群は研究期間中にエントリー数は 2 名でいずれも CBT-E 群に振り分けれられた。R2.3.31 日の段階で Stage3 であり、臨床経過は良好である。CBT-IE 群は 2 名の候補者がいたが、研究参加に至らなかった。

Ⅰ．研究目的

神経性過食症（Bulimia nervosa: BN）は難治性疾患であり、種々の治療が各施設で個別に実施されている。しかしながら、本邦ではエビデンスに基づく有効な治療法が確立されていない。過敏性腸症候群（Irritable bowel syndrome: IBS）は薬物療法が一般消化器内科で施行されているが、心理的要因の強い症例ではその効果は不十分で、簡便な心理療法の開発は必要である。BN と IBS の患者に対して、構造化された治療を多施設共同体制下で行いその有効性を検証することがこの研究の目的である。

Ⅱ．方法

BN：フェアバーン CG らによって開発された摂食障害の認知行動療法改良版（CBT-E）20 セッションを行い、通常の治療（心理教育・支持的精神療法）を対象としてランダム化比較試験（Randomized Controlled Trial：RCT）にて治療効果を検討する。

IBS：IBS を対象に RCT により、ビデオ教材を用いた IBS の認知行動療法（CBT-IE)プロトコールの効果検証を実施する。

両疾患ともにプロトコール開始前と終了後に生物学的指標を測定する。

BN と IBS の副次評価項目(国府台病院)として

1. 治療開始時、終了時にオキシトシン（尿）とコルチゾール測定（唾液） を測定する。認知行動療法が信頼を基盤とする人間相互間活動に与える影響を評価する。

Ⅲ．結果

CBT-E は研究期間中に 2 名がエントリー、両者とも CBT-E 群に振り分けれれた。現時点（R2.3 月 31 日）で Stage3 である。IBS については、2 名が研究参加を希望したが、1 名は待機期間中に症状が改善、もう1名は症状が中程度未満のためエントリーを中止した。

BN：治療プロトコールの概略

患者の条件は DSM-5 において神経性過食症と診断された 18 歳以上で、BMI 17.5 Kg/m2～40 Kg/m2 の者。介入としては試験治療（CBT-E）群と対象治療（通常治療、Treatment as usual , TAU）群に無作為割付を行う。CBT-E 群に対しては CBT-E を、TAU 群では BN になされてきた通常の治療を実施する。評価は介入開始前、介入開始 6 週間後、20 週後、40 週後、80 週後に実施する。

IBS：治療プロトコールの概略

患者の条件は RomeIV で IBS と診断された 16 歳

以上の患者。さらに今まで IBS の治療を受けたことがあり、スクリーニング時に中等症以上と診断された患者とした。治療についてはビデオ教材を用いたCBT-IEとTreatment as Usual（TAU）群に割り付けた。TAU の治療については薬物療法と生活習慣の 改善を主とし基本的には心身医学療法は実施しない。
CBT-E（No. 3044） CBT-IE（2466）に関する倫理委員会申請は承認を得ている

Ⅳ．考察

CBT-E 症例の臨床経過は、2 名とも良好である。CBT-IE は、残念ながら本期間中に症例の開始が困難であった。

Ⅴ．結語

過敏性腸症候群と神経性過食症患者に多施設共同で RCT を開始した。研究期間内に十分な症例数を確保できなかった。

研究協力者

名前：田村　奈穂　所属先　国立国際医療研究センター国府台病院　心療内科
名前：庄子　雅康　所属先　国立国際医療研究センター国府台病院　心療内科（令和元年 6 月 30 日で終了）

参考文献

1. Christopher G. Fairburn 切池信夫監訳 摂食障害の認知行動療法　医学書院 2010
2. Christopher G. Fairburn, Cognitive Behavior Therapy and Eating Disorders, Guilford Press, 2008
3. Kennedy T et al: Cognitive behaviour therapy in addition to antispasmodic treatment for irritable bowel syndrome in primary care: randomized controlled trial, BMJ, 2005
4. Craske MG et al: A cognitive-behavioral treatment for irritable bowel syndrome using interoceptive exposure to visceral sensations. Behaviour Research and Therapy. 49:413-421, 2011.

29-2

Activity Report of the National Research Group Organized by National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)

Verification of treatment programs and clinical markers for psychosomatic disorders and eating disorders.

Tetsuya Ando, M.D., Ph.D. (Principal Investigator)
National Institute of Mental Health, NCNP

Eating disorders (ED) and irritable bowel syndrome (IBS) are very common and often intractable diseases which often require evaluation and treatment from bio-psycho-social views. Effectiveness of cognitive behavioral therapies (CBT) on ED and IBS has been reported. But, there are only a few studies about CBT on ED and IBS in Japan. We aimed to 1) test efficacy of the enhanced cognitive behavior therapy (CBT-E) (Fairburn et al) on ED, 2) examine efficacy of CBT for IBS using interoceptive exposure (CBT-IE) (Craske et al) with educational video, 3) verify possible clinical markers for ED and IBS such as brain image and autonomic function, and 4) develop multidimensional assessments for ED and IBS. These studies will contribute to introduce evidence-based psychological treatments for ED and IBS patients in Japan. Finding clinical markers will facilitate understanding underlining mechanisms of ED and IBS. Multi-dimensional assessments will enable biopsychosocial evaluation ED and IBS.

Examining efficacy of CBT-E on eating disorders

(Tetsuya Ando, Kazuhiro Yoshiuchi, Shin Fukudo, Nobuyuki Sudo, Keisuke Kawai)

Eating disorders (ED) are a disease with devastating physical, psychological and social consequences; however, standardized treatment has not yet been established in Japan. The aim of the study was to test efficacy of enhanced cognitive behavior therapy (CBT-E) in patients in Japan by randomized controlled study. We established a multicenter collaborating research group consisting NCNP, University of Tokyo, Tohoku University, Kyushu University and NCGM Kohnodai Hospital. We carried out training of CBT-E therapists with the cooperation of Prof. Zafra Cooper, Yale University. We developed Japanese version of the Eating Disorder Examination interview (EDE). We made ‘Brief Manual of Enhanced Cognitive Behavioral Therapy (CBT-E)’. CBT for bulimia nervosa using this brief CBT-E manual has been covered by national health insurance since April 2018. A research protocol ‘Randomized Control Trial of Cognitive Behavior Therapy for Bulimia Nervosa’ was approved by all ethical committees concerned and registered as a clinical research (UMIN000031625). This two-arm, parallel-group multicenter RCT would compare the effects of CBT-E with those of TAU. The study subject was DSM5 bulimia nervosa, the intervention was 20 sessions of focused form CBT-E. The primary outcome is the remission of BN at the end of treatment. Recruiting subjects was

started. Ten patients had entered to this study by the end of March, 2020. On the other hand, the CBT-E workshop, in which CBT-E therapists of our research group were instructors, was held 6 times in 2 years. Total 439 participants were educated on CBT-E.

Testing efficacy of CBT-IE for IBS

(Tetsuya Ando, Shin Fukudo, Kazuhiro Yoshiuchi, Keisuke Kawai, Hiroe Kikuchi)

CBT is one of the therapeutic option for treatment-resistant IBS. However, there are few studies about the efficacy of CBT for IBS in Japan. In our previous study, we developed the Japanese version of CBT for IBS using CBT-IE and indicated feasibility and efficacy of CBT-IE. In addition, we improved the CBT-IE program with psychoeducational video materials (CBT-IE w/v) so that patients can prepare for the following face to face session. This hybrid program consisting of face to face sessions and video materials was expected to reduce the time and cost which both patients and therapists spend for the treatment. In this study, we conducted a single-arm open trial of CBT-IE w/v in Rome III IBS patients. The severity of IBS, anxiety to abdominal symptoms and IBS specific QOL significantly improved at the end of treatment, 3 month-, and 6 month-follow up comparing the base line. Time spent on a face-to-face session was reduced by 40% comparing the original program. Therefore, the hybrid CBT-IE w/v program was revealed feasible, effective and time saving. Alongside, we established a multicenter collaborating research group consisting NCNP, University of Tokyo, Tohoku University, NCGM hospital and NCGM Kohnodai Hospital. A study protocol ‘A randomized controlled trial of cognitive behavioral therapy for irritable bowel syndrome using complementary psychoeducational video’ was approved by ethical committees and registered as a clinical research (UMIN000030620). This two-arm, parallel-group multicenter RCT in Rome IV IBS patient would compare the effects of CBT-IE w/v plus TAU with those of TAU alone. Twenty two patients had entered to this study by the end of March, 2020.

Brain image as clinical marker of ED/IBS (Atsushi Sekiguchi)

The neural mechanisms specific to cognitive/psychological and behavioral features of ED and IBS, as well as predictive of the response to CBT were yet to be clarified. In the cross-sectional study of ED, we created data base of MRI images of 187 ED patients and 220 healthy controls. Concerning cross sectional study of IBS, we collected MRI images of 13 IBS patients. In a preliminary analysis, we found a positive correlation between IBS severity score and gray matter volume in right anterior insular cortex. We added base-line samples of 5 patients before CBT intervention. Through this study, a joint brain image research group for ED and IBS were established. Further collections of longitudinal samples will identify biomarker predictive of treatment responses.

Development of clinical marker for IBS (Shin Fukudo)

The usefulness of autonomic nerve response and EEG as clinical markers of IBS was verified along with IBS symptoms. We analyzed changes in heart rate variability (HRV) with respect to

colorectal extension by a barostat,.and diet load in 156 IBS patients and 31 healthy subjects. In addition, we measured the changes in the EEG for 15 normal subjects and 15 IBS patients, as well as the changes in IBS symptoms, in response to mindfulness meditation. As a result, we found the difference in the response of the low frequency component/high frequency component (LF/HF) ratio of HRV to colonic extension and postprandial between the IBS group and healthy subjects. The EEG frequency component after meditation was also different in IBS group. The possibility of HRV and EEG frequency components as clinical markers of IBS was shown.

Development of multi-dimensional evaluation by ecological momentary assessment (EMA) for ED (Kazuhiro Yoshiuchi)

ED are multi-factorial disorders influenced by both psychosocial and biological factors. The aim was to develop a new method for evaluating multiple aspects in patients with ED. We previously developed Japanese versions of four questionnaires, EDE-Q, ED-QOL, clinical impairment assessment (CIA), and fear of food measures (FOFM). In this study, we developed Japanese versions of Body Checking Questionnaire （BCQ）、Family Coping Questionnaire for Eating Disorders （FCQ-ED）. Confirmatory factor analysis followed by exploratory factor analysis in 100 ED and 155 healthy subjects yielded BSQ-J consisting of 17 items, 3 subscales. The reliability (Cronbach's alpha 0.85 – 0.91) and validity (positive correlation with BSQ and EAT-26, and higher scores in patients than in healthy subjects) of BCQ were confirmed. Confirmatory and exploratory factor analysis in 150 members of families with ED resulted in the Japanese version of FCQ-ED consisting 4 subscales. The reliability (alpha 0.68 – 0.85) and validity (positive correlation with POMS) of FCQ-ED were confirmed. Those developed questionnaires will be implemented in smart phones with EMA technique.

Development of multi-dimensional ambulatory assessment of IBS (Hiroe Kikuchi)

IBS is mainly evaluated by patient-reported outcome (PRO). To avoid recall bias associated with PRO, the computerized EMA (cEMA) will be useful. Multi-dimensional evaluation of pathological conditions is important for IBS. The investigators have developed a measurement protocol centered on EMA as a multidimensional evaluation method of IBS in daily life. However, concerns have been pointed out such as the presence of reactivity, the burden of input after long-term implementation, and discontinuity of information. The purpose of this study is to search objective indicators of stress and to introduce computerized adaptive testing (CAT). As a result, it is possible that stress factors can be evaluated using physical activity, which is an objective index that can be measured continuously and non-invasively, and the introduction of CAT reduces the input load.

国立研究開発法人

国立精神・神経医療研究センター

精神・神経疾患研究開発費

筋ジストロフィーの臨床開発促進を目指した臨床研究（29-3）

総 括 研 究 報 告 書

2017 年～2019 年度

2020 年 3 月

主任研究者　小牧　宏文

研究課題番号　29－3

研　究　課　題　名　筋ジストロフィーの臨床開発促進を目指した臨床研究

主任研究者名　国立精神・神経医療研究センター　小牧宏文

総括研究報告

1．研究目的

a) 患者レジストリーである Remudy と臨床研究ネットワークである MDCTN はこれまで別個に運営し、治験における実施可能性調査、患者リクルート、疫学研究、ネットワークにおける施設調査や多施設共同臨床研究の実施などに寄与してきた。多施設共同研究の効率的運営、製造販売後の評価への活用など変わりつつある臨床開発のニーズに応えられるように改良を加え新たな臨床研究基盤を提示する。

b) 上記のプラットフォームを用い、自然歴研究、製造販売後後調査、バイオマーカー探索など臨床開発に寄与する臨床研究を実施する。

c) 標準的診療の向上を目指したエビデンスを創出するための臨床研究を実施する。

d) 患者・家族、医療者、研究者、企業関係者に有用な情報公開のための方策を提示する。

2．研究組織

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター（NCNP）　小牧宏文

分担研究者　NCNP：小林庸子（2019 年度より水野勝広）、瀬川和彦、中村治雅、西野一三、森まどか、山本敏之、神戸大学：粟野宏之、東京女子医科大学：石垣景子、NHO 八雲病院：石川悠加、NHO 東埼玉病院：尾方克久、NHO 鈴鹿病院：久留聡、NHO あきた病院：小林道雄、NHO 西多賀病院：髙橋俊明、信州大学：中村昭則、北里大学：高相晶士、横浜労災病院：中山貴博、NHO 刀根山医療センター：松村剛、熊本大学：山下賢、大阪大学：高橋正紀、日本筋ジストロフィー協会：矢澤健司

3．研究成果

a-1)Remudy と MDCTN の統合：効率的一体的に運営するために、2017 年度より準備を開始、2018 年度に両運営委員会を統合、2019 年度より神経筋疾患先端医療推進協議会（CareCure-NMD）として活動を開始した。

a-2)各レジストリーの運営

ジストロフィン症レジストリー（NCNP 中村班員）：順調に登録数は増加しており、フィジビリティ調査、治験の被験者ルクルート実施を複数行った。現在製造販売後の有効性安全性評価に活用できるためのレジストリーの再構築を行っている。

筋強直性ジストロフィー（DM1）レジストリー（運営大阪大学）：2019 年 11 月末現在、全国から 954 例の患者登録があり世界的にも有数の規模となった。遺伝-表現型、治療、代謝、疲労などについての解析、患者ケアに関するアンケート、ガイドライン前調査を施行した。糖尿病発症患者に対する DDP4I による介入試験の患者リクルートを実施した。

眼咽頭型筋ジストロフィー（OPMD）レジストリー（熊本大学山下班員）：登録項目設定などの準備を行い、2020 年度に開始見込みとなった。

遺伝子解析部門（NCNP 西野班員）：ジストロフィン症、GNE ミオパチーの遺伝子解析を実施しており、3 年間でそれぞれ 152 例、88 例に対する解析を行った。ジストロフィン症 1497 例の変異データを解析し、ナンセンス/フレームシフト変異を有するがより軽症であるベッカー型の特徴を有する 34 例について検討を行った。ミニジーンを用いて 34 症例と同じ変異を有するコンストラクトを作成し、HeLa 細胞に導入し、スキップ効率を測定したところ 14 例でエクソンスキップが確認できた。また、スキップ効率が高い例ほど重症度が軽く、スキップ効率のカットオフを 5%とした場合に 89%の例で免疫染色の結果と臨床症状、エクソンスキップの有無が一致した。また *in silico* ソフトウェアを用いた解析により、エクソンスキップをしていた 14 例全例が、splicing enhancer が破壊されるもしくは splicing silencer が新たにつくられる変異であることがわかり、これがナンセンス/フレームシフト変異でエクソンスキップを起こすメカニズムであると考えた。

a-3)多施設共同研究の実施

MDCTN を基盤としたデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）、ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）を対象とした自然歴研究を実施している。いずれも CareCure-NMD が研究事務局としても機能しておりクオリティの確保された臨床研究を実施する基盤を整備している。

b-1）自然歴研究

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の自然歴研究（NCNP 主幹施設）：企業、規制当局などと議論を重ねたうえでプロトコール作成、倫理委員会承認、スタートアップミーティング、評価者研修会などを経て被験者組み入れを開始、28 名の組み入れを達成し研究を継続している。2019 年度予備的解析を実施したところ自然歴を反映されたデータが得られつつあることを確認した。

ベッカー型筋ジストロフィー（BMD）の自然歴研究（NHO まつもと医療センター中村班員）：MDCTN の基盤を用い AMED 研究費が採択され、AMED 研究費と連携して多施設共同後方視的研究を実施しており 240 例以上を組み入れデータ解析を行っている。また前向き自然歴研究についても準備を行っている。

福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）の呼吸機能の自然歴（東京女子医科大学石垣班員）：経皮的二酸化炭素濃度モニターによる 40 名の FCMD 患者の夜間呼吸評価を行った。呼気終末二酸化炭素濃度モニターは患者の拒否なく，2 歳から 37 歳までの症例で行うことができた。人工呼吸器装着を行っていない全例で CO2 の上昇は認められず呼吸不全の定義には相当しなかったが，幼児例と進行例とのデータについて現在詳細に評価を行い，より呼吸不全傾向を示す鋭敏なマーカーを探索している。

b-2）臨床評価、バイオマーカー研究

尿中タイチンを用いた DMD の新たな疾患バイオマーカーの確立（神戸大学栗野班員）：タイチンの分解産物を微量サンプルから鋭敏に定量できる ELISA 法の開発に成功した。DMD 患者の尿中タイチン量が健常人とは明らかに異なる非常に高値であることを見出し、筋崩壊が非常に活発であることを示すバイオマーカーであることを示した。血清 CK が基準内をとる病状の進行した DMD 患者においても、尿中タイチンは正常人より高値をしめし、尿中タイチンが血清 CK より鋭敏な筋崩壊を表すマーカーであることを示した。尿中タイチンが DMD の診断のバイオマーカーになることを明らかにした。集団検診での DMD のスクリーニングに有用なマーカーであることを示した。

FCMD の改訂版 GMFM の作成（東京女子医科大学石垣班員）：FCMD 患者における粗大運動能力尺度（gross motor function measure：GMFM）の妥当性を報告した。この結果を用いて，FCMD 患者 41 名(7 か月～24 歳 5 か月)に対し,延べ 100 回の GMFM 評価の Rasch 分析を行った。INFIT 値が 2 以上を示した 12 項目を除外し，さらに臨床的に適合性の高い評価項目として抽出し，改訂 GMFM として 68 項目を選出した。4 名の理学療法士により，改訂 GMFM による評価を行った結果，改訂版 GMFM は短時間で施行でき，元の GMFM-88 と相関良好であることを証明し，その妥当性を報告した。論文は投稿後であり，現在 revise の段階である。

FCMD 患者におけるアクチグラフを用いた活動度評価（東京女子医科大学石垣班員）：FCMD 患者 6 名に対し，フィリップス社アクティウォッチスペクトラム PRO により，入浴時を除く 48 時間，連続で活動量を測定した。活動量は，1 分間ごとにアクティビティカウント（AC）と呼ばれる単位で記録され，その平均値を算出した。さらに，測定の前後 4 か月以内に GMFM-88 による運動機能評価も行い，両者の相関性を統計学的に解析した。AC の 48 時間分平均値と GMFM-88 スコアは，r2=0.7554 であった。さらに，GMFM-88 の項目の内，上肢関連の項目のみを抜粋したスコアとの相関を検討したところ，r2=0.6001 であった。いずれも線形回帰分析により検討した。少数例での解析であるが，アクチグラフは FCMD の運動機能評価に妥当なことが示唆された。

3 軸加速度活動量計を用いた筋疾患の運動機能評価指標に関する研究（NHO まつもと医療センター中村班員）：活動量計を用いた日常活動量を連続的に測定する手法について検討した。その前段として、①2 分毎の歩数と運動量、歩行に寄らない低強度運動、中高強度の運動時間の取り出しが可能であること、②小型・安価・生活防水および装着が容易でること、③NFC を用いたデータの吸い上げ、解析からクラウド上への転送が容易であることを条件に、新規活動量計（MTN300VVH0）と解析ソフトエアー（MS Office Excel で作成）を開発した。

唾液中乳酸値（NHO まつもと医療センター中村班員）：健常成人を対象に様々条件および運動負荷における唾液中および血中乳酸値をアークレイ（株）社製のラクテートプロ 2 で測定した結果、歯磨き後で運動負荷量が多い全身運動（エルゴメータ負荷）において、両者の間に高い相関を見出した。そこで、健常成人男性 10 名を対象として、1 分 30 秒間のスクワットジャンプ運動を行って血中・唾液中乳酸値を測定した。さらに被験者全員の体組成分析の各値を元に血中乳酸ピーク値を予測する重回帰式を求めた結果、血中乳酸ピーク予測値＝14.787（定数）＋ 唾液中乳酸ピーク値×（0.840）+ 心拍数×（-0.122）＋ SMI （Skeletal Muscle Index）×1.276 となった。実測血中乳酸値と重回帰式から求めた血中乳酸値との相関係数は 0.90（$p<0.01$）であった。

DMD Functional Ability Self-Assessment Tool の日本語版作成（滋賀県立小児医療センター藤井研究協力者）：著作権保有者の承諾を得た上で日本語版を作成しバリデーションを行ったうえで完成した。

OPMD におけるミトコンドリア障害関連バイオマーカーFGF-21、GDF-15 の検討（熊本大学山下班員）：OPMD 5 例および疾患対照として孤発性封入体筋炎 6 例、ALS 5 例に対して、Quantikine ELISA キットを用いて、FGF-21、GDF-15 を測定し、OPMD 患者登録項目（CK や罹病期間、発症年齢）との関連性を評価した。OPMD の一部の症例では FGF-21 が高値を示す症例があったものの、sIBM や ALS の症例との有意差は認めず、FGF-21 および GDF-15 測定値と OPMD 患者登録項目の間で明確な関連性は見られなかった。

骨格筋量測定の自動化（横浜労災病院中山班員）：AI を用いた骨格筋量自動解析ソフトの開発を IT 企業と共同で始めた。

ｃ）エビデンスを創出するための臨床研究

オンライン画像登録システムを用いた骨格筋画像解析（NHO 鈴鹿病院久留班員）：CT および T1 強調画像でほぼ同一の筋障害度および Mercuri の障害度分類を自動計算する方法を開発し論文化した。上記の筋障害度を使用し，筋強直性ジストロフィーの全身の各筋の筋萎縮を経年的に評価し国際学会にて発表した。

DMD の気胸合併についての調査（NHO あきた病院小林班員）：DMD における気胸の発症密度は 10.6% 人年で、気胸発生者は非発生者に比べて有意に体重が低く，Cobb 角が大きいことを明らかにした。MDCTN の協力のもと他のタイプの筋ジストロフィーなども含めて神経筋疾患における気胸の合併頻度を全国的に調査した。5122 人の患者のうち、1 年間での気胸発症者は 79 人で，DMD が合併頻度が最も高く 3。6％人年，ついで先天性ミオパチーが 2.7%人年，FCMD が 2.0%人年と多かった。一方 DM1 は 0.1%人年と極めて少なかった。

DMD の心筋障害に関する予後予測（NCNP 瀬川班員）：DMD 心筋症の心不全死を予測する因子を検討し、心エコーにおける左室拡張末期径(LVDd)≧55ｍｍが生命予後不良の予測因子であることを見いだした。

筋ジストロフィー患者に合併する嚥下障害の早期発見、胃瘻造設のタイミングの検討（NCNP 山本班員）：成人筋ジストロフィー（DM1 患者 126 人、DMD 患者 44 人、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FSHD）患者 33 人）を対象に嚥下造影検査の結果を検討したところ、嚥下障害は DM1 84.9%，DMD 79.5%，FSHD 30.3%に認めた。同時に嚥下障害問診票を使い，嚥下障害の自覚を評価したところ自覚から有意に嚥下障害の合併を比較できたのは FSHD のみだった（感度 82%，特異度 82%）。DM1 患者は自覚に乏しく，DMD 患者は食形態の調整を早期に行い，嚥下障害に対処していることが明らかになった。DMD 患者 56 人の診療録調査から胃瘻造設した患者に特徴的な症状を検討した。決定木分析の結果，気管切開，固い食べ物を食べると咳き込む，もしくは固い食べ物を食べられない，が特徴であった。決定木は，有意に胃瘻造設した患者を判別した（感度 77%，特異度 95%）。

呼吸ケア（NHO 八雲病院石川班員）：国際ガイドラインに記載された DMD の NPPV や気道クリアランス（機械による咳介助 mechanically assisted coughing=MI-E）を、臨床現場に適切に取り入れ、自施設で臨床研究を行い、国内外の研究者と情報交換し、患者および関連機関のニーズに対応できる環境の整備を進めた。

側弯症に対する脊柱固定術に関する研究（北里大学高相班員）：脊柱後方矯正固定術を施行し、2 年以上経過観察が可能であった神経筋原性側弯症を対象とし、術前および術直後、最終経過観察時の座位正面、側面レントゲンを用いて Cobb 角（Cobb）、骨盤傾斜（PO）などなどのパラメーターを計測した。45 例の解析が可能であった。18 例が経過不良と分類され、2 群比較の結果 Cobb、PO、仰臥位での Cobb（SuCobb）、腰椎前弯角（SuLL）など 7 因子において有意差を認めた。これらの因子を多変量解析で検討したところ、SuCobb と SuLL が独立したリスク因子として残り、SuCobb が大きくなり、SuLL が小さくなるほど骨盤傾斜残存リスクが高いことが示された。また、回帰分析の結果から予測式を得た。Score の ROC を描いたところ、AUC は 0.930；95% CI，0.858-1.000；P<0.001 であった。感度と特異度の和が最大となる値を参考にしたカットオフ値は-0.92（感度 78%、特異度 89%）であった。骨盤傾斜残

存のリスク因子は、仰臥位における Cobb 角と腰椎前弯角であった。仰臥位にいても Cobb 角が大きく、腰椎前弯角が小さい場合は術後に骨盤傾斜が残存するリスクが高くなる可能性が示唆された。

ｄ）MDCTN のホームページは全面改定を行い、より多面的な情報が提供できるようにした。2017年10月岡山､2019年10月新潟にて100名以上の参加者のもと市民公開講座を開催した。2017年7月第4回、2018年7月第5回MDCTNワークショップを行い医師、研究者、企業関係者、規制当局間での意見交換の場を設けた。

4. 今後の研究の進め方について

レジストリーと臨床研究を CareCure-NMD として一体的に運営することで両者が有機的に連携した臨床開発、臨床研究が実施できる体制が整いつつあり、引き続き特に多施設共同研究を推進していく。レジストリーを活用し製造販売後の有効性安全性評価を収集することが求められており、Remudy についてもそれに向けた取り組みを進めていく。ウェラブル機器や画像解析といった新しいモダリティーを活用した臨床開発に資するリアルワールドデータの活用について検討を進める。筋疾患のような緩徐進行性の経過を示す疾患では適切に診断に早期に治療を開始することでより大きな薬剤の効果が期待できる可能性が高く、新生児スクリーニングを含む疾患の早期診断、早期治療体制について検討を行っていく。

5. 研究成果（原著論文、学会発表他） 主任研究者・分担研究者

【論文】　計（100）件　うち査読付論文　計（82）件　※３年間を通して１０件以内を記載

1. Komaki H, Nakamura H, et al. Systemic administration of the antisense oligonucleotide NS-065/NCNP-01 for skipping of exon 53 in patients with Duchenne muscular dystrophy. Science Translational Medicine. 2018 Apr 18;10(437). pii: eaan0713. doi: 10.1126/scitranslmed.aan0713.査読あり
2. Okubo M, Komaki H, Nakamura H, Mori-Yoshimura M, , Nishino I, et al. Comprehensive analysis for genetic diagnosis of Dystrophinopathies in Japan: Orphanet J Rare Dis. 2017; 12: 149. doi: 10.1186/s13023-017- 査読あり
3. Kuru S, Ishigaki K, Nakayama T, et al. Assessment of muscle involvement in patients with Duchenne muscular dystrophy via segmental multifrequency bioelectrical analysis. Neuromuscul Disord. 2019 Sep;29(9):671-677. doi: 10.1016/j.nmd.2019.08.006. Epub 2019 Aug 21. 査読あり
4. Awano H, et al. Diagnostic and clinical significance of the titin fragment in urine of Duchenne muscular dystrophy patients. Clin Chim Acta. 2018 Jan;476:111-116. doi: 10.1016/j.cca.2017.11.024. Epub 2017 Nov 23. 査読あり
5. Matsuo M, Awano H, et al. Receiver operating curve analyses of urinary titin of healthy 3-year-old children may be a noninvasive screening method for Duchenne muscular dystrophy. Clinica Chimica Acta. 2018 査読あり
6. Nakayama T, Kuru S, et al. Automatic calculation of Mercuri grades from CT and MR muscle images. Brain Dev. 2019 Nov;41(10):870-877. doi: 10.1016/j.braindev.2019.06.008. Epub 2019 Jul 12. 査読あり

7. Mori-Yoshimura M, Nakamura H, Komaki H, Y, Nishino I, et al. Characteristics of Japanese Patients with Becker Muscular Dystrophy and Intermediate Muscular Dystrophy in a Japanese National Registry of Muscular Dystrophy (Remudy): Heterogeneity and Clinical Variation. J Neuromuscul Dis. 2018;5(2):193-203. doi: 10.3233/JND-170225. 査読あり
8. Mori-Yoshimura M, Nishino I, et al. Social involvement issues in patients with Becker muscular dystrophy: A questionnaire survey of subjects from a patient registry.
   Brain Dev. 2018 Apr;40(4):268-277. doi: 10.1016/j.braindev.2017.11.004. Epub 2017 Nov 29. 査読あり
9. Fujii T, Takeshita E, Iwata Y, Yajima H, Nozaki F, Mori M, Kumada T. Cumulative jerk as an outcome measure in nonambulatory Duchenne muscular dystrophy. Brain Dev. 2019 Oct;41(9):796-802. doi: 10.1016/j.braindev.2019.06.002. Epub 2019 Jun 15. 査読あり
10. Shimizu-Motohashi Y, Murakami T, Kimura E, Komaki H, Watanabe N. Exon skipping for Duchenne muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis. Orphanet J Rare Dis 2018 Jun 15;13(1):93. doi: 10.1186/s13023-018-0834-2. 査読あり

【図　書】　計（　2　）件　　※３年間を通して１０件以内を記載

1. 中村昭則：1 節　筋ジストロフィーの分子治療の展望，第 7 章　遺伝性・難病・希少疾患での医療技術（核酸医薬，免疫療法，遺伝子治療，細胞医薬品）を用いた治療応用の可能性.p.395－410，技術情報協会，東京，2017
2. 中村昭則：第８節　筋ジストロフィー，第 10 章　疾病別での診断・治療の現状と求める医薬品・医療機器・再生医療像，希少疾患用医薬品の採算性ある適応拡大戦略.p.486－499，技術情報協会，東京，2018

【学会発表】　計（　102　）件　　※３年間を通して１０件以内を記載

1. Nakamura H, Takeda S. Clinical Innovation Network Status of patient registry for muscular dystrophy (Remudy), ASENT 2019 Annual Meeting, Washington D.C., 2019/3/25
2. Okubo M, Nishino I, et al.: Comprehensive analysis: Nonsense mutation induce exon skipping in Becker muscular dystrophy. 22nd WMS congress, Saint Malo, 2017/10/4
3. 佐藤孝俊、栗野宏之、石垣景子ら，福山型先天性筋ジストロフィー患者における尿中タイチンの測定，第 61 回日本小児神経学会学術集会，名古屋，2019/05/31
4. Ishigaki K, Ihara C, Mori-Yoshimura M, et al. Complications of Fukuyama congenital muscular dystrophy revealed from a nationwide registry. 24th International Annual Congress of the World Muscle Society, Copenhagen, 2019/10/1
5. Mori-Yoshimura M, Komaki H, Nishino I, et al. Psychiatric problems in patients with Becker muscular dystrophy. 第 59 回日本神経学会学術大会，札幌，2018/5/23
6. 山本敏之ら.代替栄養法を導入したデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の検討.第 60 回日本神経学会学術大会，大阪，2019/5/22

7. Kuru S, Nakayama T, et al. Quantitative assessment of muscle involvement in limb girdle muscular dystrophy 2Aand 2B. 24th International congress of the world muscle society, Copenhagen, 2019/10/1
8. Nakamura A. Natural history study of patients with Becker muscular dystrophy for establishment of preventative medicine for cardiac involvement. Cross-talk 60th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology, Osaka, 2019/5/23
9. 山下賢、中村治雅、小牧宏文ら. Remudy 登録項目案に基づいた当院眼咽頭型筋ジストロフィー症例の解析. 第 5 回日本筋学会学術集会, 東京, 2019/8/2
10. Saotome T, Kobayashi Y, Komaki H, et al. The Assessment of activity of daily living and mood in adult Japanese Patients with Duchenne Muscular Dystrophy: A Single-Site Study. 12th International Society of Physical and Rehabilitation Medicine (ISPRM) World Congress, Paris, 2018/07/08

（7）研究成果による産業財産権の出願・取得状況

【出　願】　計（　0　）件　【取　得】　計（　0　）件

Clinical study for the promotion of clinical development related to muscular dystrophy

Research summary report

1. Objective

a) Up until now, the Remudy patient registry and MDCTN clinical study network have been managed individually, contributing to the implementation of clinical trial feasibility surveys, patient recruiting, epidemiological research, institutional surveys within networks, and multi-center clinical research. In order to fulfill the changing needs of clinical development such as multi-center clinical research and practical application of evaluations after manufacturing and sales, this study presents a new and improved clinical research framework.

b) The platform above was used for clinical studies contributing to clinical development such as natural history research, surveys following manufacture and sales, and investigation of biomarkers.

c) A clinical study was conducted which creates evidence and aims to improve standardized treatment.

d) This study also presents useful methods for disclosing information to patients, their family members, medical staff, researchers, and corporate personnel.

3. Results

a-1) Fusion of Remudy and MDCTN: In order to achieve efficient and universal operations, preparations began in 2017, a joint operations committee was formed in 2018, and 2019 CareCure-NMD (a conference for the promotion of cutting-edge care for neuromuscular dystrophy patients) was launched in 2019.

a-2) Operation of various registries

Dystrophinosis registry (NCNP Nakamura): Registered members are gradually increasing, and the registry has been used multiple times for feasibility studies and clinical trial subject recruiting. The registry is currently being rebuilt so that it can be used for efficacy and safety evaluations after manufacturing and sales.

Myotonic dystrophy (DM1) registry (operated by Osaka University): As of the end of November 2019, there are 954 patients registered nationwide, making this one of the largest registries in the world. This registry has been used for analysis of factors such as genetics and phenotype, treatment, metabolism, and fatigue, as well as questionnaires related to patient care and preliminary surveys for guidelines. In addition, patient recruitment for an intervention trial of DDP4I in patients with diabetes was conducted.

oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) registry (Kumamoto University Yamashita): Preparations such as setting the data to be used for registrations have been completed, and the registered is expected to start operations in FY2020.

Genetic analysis department (NCNP Nishino group members): This registry has been used for genetic analysis of dystrophinosis and GNE myopathy, with analysis of 152 cases and 88 cases, respectively, performed over a 3-year period. Mutation data for 1,497 cases of dystrophinosis was analyzed, and the milder Becker-type characteristics of 34 cases with nonsense / frameshift mutations were considered.

Mini gene was used to create constructs with mutations identical to these 34 cases. When the constructs were introduced into HeLa cells and the skip efficiency was measured, exon skip was confirmed in 14 cases. In addition, higher skip efficiency was associated with milder symptoms, and when the skip efficiency cut-off was set to 5%, the immunostaining results were consistent with clinical symptoms and the presence or absence of exon skip in 89% of cases. When *in silico* software was used for analysis, in all 14 cases without exon skip, mutations were present which either destroyed the splicing enhancers or created new splicing silencers. As such, this was considered to the be the means by which nonsense / frameshift mutations produce exon skip.

a-3) Implementation of multi-center collaborative research

Natural history research studies on Duchenne muscular dystrophy (DMD) and Becker muscular dystrophy (BMD) with MDCTN as a foundation are currently being conducted. For both of these, CareCure-NMD also functions as a research secretariat and has established fundamentals for assuring quality in this clinical research.

b-1) Natural history research

Duchenne muscular dystrophy (DMD) natural history research study (NCNP): A protocol was created through discussions with corporations and regulatory agencies, and after approval by the ethics committee, a startup meeting, and a training session with evaluators, subject enrollment was launched. The study is ongoing, and there are currently 28 registered subjects. A preliminary analysis conducted in FY2019 confirmed that the data acquired reflects the natural history.

Becker muscular dystrophy (BMD) natural history research study (NHO Matsumoto Medical Center Nakamura): Using MDCTN as a foundation, AMED research funds were selected, and a multi-center retrospective study coordinated with AMED research funds is currently underway. Data from over 240 cases has been registered and is currently being analyzed. Preparations are also underway for a prospective natural history study.

Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD) respiratory function natural history (Tokyo Women's Medical University Ishigaki): A nighttime respiratory assessment of 40 FCMD patients was performed using a transcutaneous carbon dioxide concentration monitor. No patients refused endtidal carbon dioxide concentration monitors, and the study was conducted on subjects with ages ranging from 2 to 37. In all cases without artificial ventilators fitted, although no increase in CO2 was found and symptoms did not fit the definition for respiratory failure, detailed data from both infant cases and adult cases is currently being analyzed to search for sensitivity markers showing a tendency toward respiratory failure.

b-2) Clinical evaluation and biomarker research

Establishment of new DMD disease biomarkers using urinary titins (Kobe University Awano): Successfully developed an ELISA method that enables high-sensitivity identification of titin breakdown products from small samples. This study determined that the urinary titin levels of DMD patients are significantly elevated in comparison to healthy people, and this biomarker was shown to indicate a high level of muscle breakdown activity. Among DMD patients with progressive symptoms who have serum CK within standard levels as well, urinary titin was higher than in healthy people, indicating that urinary titin is a more accurate marker muscle breakdown than serum CK. Accordingly,

urinary titin was determined to be a biomarker for the diagnosis of DMD. In mass screenings, this biomarker was shown to be useful for detecting DMD.

Creation of revised GMFM for FCMD (Tokyo Women's Medical University Ishigaki): Reported the validity of a gross motor function (GMFM) scale for FCMD patients. These results were used for 100 rounds of Rasch analysis implemented on 41 FCMD patients (age range 7 months - 24 months 5 years). After excluding the 12 cases with INFIT values of 2 or above, GMFM was extracted as an evaluation item with high clinical applicability, 68 items were selected for a revised GMFM scale. When evaluations were conducted by 4 physiotherapists using the revised GMFM scale, the results showed that the revised GMFM could be implemented in a short time period, correlation with the original GMFM-88 was shown to be good, and the validity of the revised scale was confirmed. The paper has been submitted and is currently in the revision stage.

Activity scale evaluation for CMD patients using active life (Tokyo Women's Medical University Ishigaki): The activity of six FCMD patients was measured continuously using the Philips Actiwatch Spectrum PRO for 48 hours, with the exception of bathing time. The activity amount was recorded every minute using units called activity counts (AC), and the average values were calculated. In addition, for four months before and after this measurement period, motor function was evaluated using GMFM-88, and statistical analysis was used to determine correlation between the two. For the AC 48-hour per-minute average value and GMFM-88 scores, $r2 = 0.7554$. Furthermore, when correlation was calculated for the items within GMFM-88 concerning the upper limbs only, the value was $r2 = 0.6001$. Both were examined using linear regression analysis. This analysis of a small number of cases suggests that the use of actigraphs is an appropriate method for FCMD patient motor function evaluation.

Study on the motor function evaluation index of muscle disease using triaxial acceleration activity meters (NHO Matsumoto Medical Center Nakamura): The use of an activity meter for measuring daily activity volume was considered. As prerequisites for this process, (1) it must be possible to extract data for each two-minute period covering steps taken, exercise volume, low intensity exercise not including walking, and medium to high-intensity exercise; (2) the device must be compact, low cost, waterproof for daily wear, and easy to put on; (3) it must be easy to use NFC for data acquisition and transfer data to cloud storage after analysis. To fulfill these requirements, a new activity meter (MTN300VVHO) and analysis software (drafted in MS Office Excel) were developed.

Lactate levels in saliva (NHO Matsumoto Medical Center Nakamura): When the Arkray Lactate Pro 2 was used to measure lactate levels in the saliva and blood of healthy people in various conditions and at various exercise loads, high correlation was found in both for high-load full-body exercise after brushing teeth. 10 healthy male subjects performed jump squat exercises for 1.5 minutes, then their blood and saliva lactate levels where measured. In addition, when a multiple regression method was used to estimate peak blood lactate levels for all of the subjects based on body composition, the formula was as follows. Peak blood lactate levels ＝ 14.787 (constant) + saliva lactate peak value x (0.840) + heart rate x (-0.122) + SMI (Skeletal Muscle Index) x 1.276. The correlation coefficient between the actual measured blood lactate values and those predicted from the multiple regression equation was 0.90 ($p < 0.01$).

Creation of a Japanese-language DMD Functional Ability Self-Assessment Tool (Shiga Medical Center for Children Fujii): After obtaining the permission of the copyright holder, a Japanese-language version of this tool was created and validated.
Consideration of FGF-21 and GDF-15 biomarkers related to mitochondrial dysfunction in OPMD (Kumamoto University Yamashita): The subjects were 5 OPMD patients and a contrast group of 6 sporadic inclusion body myositis (sIBM) patients and 5 ALS patients. Using a Quantikine ELISA kit, FGF-21 and GDF-15 were measured and their correlation with OPMD patient registered data (CK, disease duration, and age of onset) was evaluated. Although a portion of OPMD cases showed high levels of FGF-21, no significant difference from the sIBM and ALS cases was identified, and no clear correlations between FGF-21 and GDF-15 measured values and OPMD patient registered data could be found.
Automation of skeletal muscle mass measurement (Yokohama Rosai Hospital Nakayama): AI-driven automated skeletal muscle mass analysis software was developed as a cooperative project with an IT company.

c) Clinical research to generate evidence
Skeletal muscle image analysis using an online image registration system (NHO Suzuka National Hospital Kuru): Developed and published a method for automatic calculation of degree of muscle damage according to Mercuri's classification that achieved results which were nearly identical to CT and T1-weighted images. Using the aforementioned degree of muscle damage, atrophy of each muscle affected myotonic dystrophy was evaluated year by year and the results were presented at an international conference.
Survey on pneumothorax complication in DMD (NHO Akita Hospital Kobayashi): The showed that incidence rate of pneumothorax in DMD was 10.6% and that pneumothorax patients had significantly lower body weight and larger Cobb angle than those without the condition. With cooperation from MDCTN, a nationwide survey on the incidence of pneumothorax complication in other types of muscular dystrophy and neuromuscular diseases. Of the 5,122 patients surveyed, there were 79 cases of pneumothorax in a one-year period, and the incidence rate per person-year was highest for DMD, at 3.6%. The next highest rates were for congenital myopathy and FCMD, which 2.7% per person-year and 2.0% per person-year, respectively. On the other hand, DM1 had an extremely low incidence rate of 0.1% per person-year.
DMD prognosis prediction for myocardial damage (NCNP Segawa): Factors predicting DMD cardiomyopathy heart failure death were considered, and the study found that echocardiography of left ventricular end diastolic diameter (LVDd) ≧55 mm on echocardiography was a predictor of poor prognosis.
Consideration of early detection of dysphagia complications and gastrostomy construction timing for muscular dystrophy patients (NCNP Yamamoto): Subjects were adult patients with muscular dystrophy（DM1 patients: 126, DMD patients: 44,　and facio-scapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) patients: 33). When swallowing contrast test results were considered, dysphagia was identified for 84.9% of DM1 patients, 79.5% of DMD patients, and 30.3% of FSHD patients. A dysphagia questionnaire was also implemented, and when patients' awareness of their dysphagia was

evaluated, statistically significant correlation between awareness and dysphagia complications was found only for FSHD (sensitivity: 82%, specificity: 82%). DM1 patients had low awareness and DMD patients were able to adjust their diet early on to cope with dysphagia. The medical records of 56 DMD patients were surveyed and characteristic symptoms of patients with gastrostomy were considered. Decision tree analysis identified three characteristic symptoms: tracheotomy, coughing when eating hard food, and inability to eat hard food. The decision tree determined patients with significant gastrostomy risk (sensitivity: 77%, specificity: 95%).

Respiratory care (NHO Yakumo Hospital): Using the international guidelines listed for DMD NPPV and airway clearance (mechanically assisted coughing = MI-E) for proper clinical applications. A clinical study was conducted at this facility, information was exchanged with other research inside and outside of Japan, and progress was made on the development of an environment to meet the needs of patients and related institutions.

Study on spinal fusion caused by scoliosis (Kitasato University): Subjects were neuromuscular scoliosis patients who underwent posterior spinal correction whose progress could be monitored for 2 years or more. Parameters such as Cobb angle (Cobb) and pelvic tilt (P0) were measured before surgery, immediately after surgery, and during the follow-up period using seated front and side X-rays. 45 cases were available for analysis. Progress was classified as poor for 18 of these cases and comparison of the two groups identified significant differences in a total of 7 different factors, including Cobb, PO, and Cobb and lumbar lordosis in a supine position (SuCobb and SuLL). When these factors were investigated using multivariate analysis, SuCobb and SuLL remained as independent risk factors, with larger SuCobb values and smaller SuLL values indicating higher residual pelvic tilt risk. In addition, the results of the regression analysis were used to obtain a prediction formula. When the ROC of the scores was calculated, AUC of 0.930 had 95% CI and the range of 0.858-1.000 had $P < 0.001$. The cutoff value based on the value which gave the maximum sum of sensitivity and specificity was -0.92 (sensitivity: 78%, specificity: 89%). Supine position Cobb and lumbar lordosis were risk factors for residual pelvic tilt. If Cobb angle remained high and lumbar lordosis was low in a supine position, this could be an indicator of high risk for residual pelvic tilt after surgery.

d) The MDCTN website was completely revised so that more multifaceted information can be provided. Public lectures with over 100 participants were held in October 2017 in Okayama and October 2019 in Niigata. At the 4th and 5th MDCTN workshops held in July 2017 and July 2018, an opinion exchange forum was established for doctors, researchers, business people, and regulatory authorities.

4. Topics for future study

Integrated operation of registries and clinical research using CareCure-NMD is establishing a system for carrying out clinical development and research which organically links parties involved with both, and multi-center research in particular should continue to be promoted. There is need for applying registries to the accumulation of effectiveness and safety evaluation after manufacturing and sales, and initiatives for this purpose should be carried out using Remudy as well. The use of real-world data which contributes to clinical development for practical application of new modalities such as wearable

devices and image analysis should also be considered. For ailments such as muscular diseases which have a slow and gentle progression, it’s highly likely that pharmaceutical treatments can be more effective when started early through proper diagnosis. For this reason, continuing investigation of early diagnosis and treatment systems for these diseases, including newborn screening, should be conducted.

Duchenne 型筋ジストロフィー患者のリハビリテーションの長期的な効果と生活の質に関する研究

国立精神・神経医療研究センター病院
身体リハビリテーション部
早乙女貴子・小林庸子・西田大輔・**水野勝広**

緒言

Duchenne型筋ジストロフィー（以下DMD）は、X染色体上のジストロフィン遺伝子の突然変異に起因する進行性の筋力低下を伴う疾患である。コルチコステロイド投与や呼吸・循環管理の進歩により、近年DMD患者の平均寿命は延長し、成人患者が増えている。患者の運動機能は5、6歳でピークに達し、経年的に日常生活活動（activities of daily living: ADL）遂行に他者の援助や介護を要するようになるため、患者と介護者における心理社会的な影響は大きい。また、長期的なリハビリテーション介入により身体機能の維持が図られているが、個別の治療介入の効果に関しては明らかでない。

本研究課題では、以下の調査研究を行った。1. 成人Duchenne型筋ジストロフィー患者家族の介護に関する調査

2. 成人Duchenne型筋ジストロフィー患者のADLと不安・抑うつに関する調査

3. Duchenne型筋ジストロフィー患者に対するリハビリテーション治療効果の検討

方法

1. 成人Duchenne型筋ジストロフィー患者家族の介護に関する調査

方法：対象は当院小児神経科または神経内科に定期的に通院または入院している20歳以上の成人DMD患者とその主介護者（親やヘルパー）及び未成年DMD患者の主介護者（親）とした。調査者が対象者に研究同意を取得し、成人患者と介護者への生活状況の聴取を行うと同時に診療録から患者情報を収集した。

患者のADL能力は調査者がFIM（Functional Independence Measure）で評価した。

成人患者と介護者双方にHADS（Hospital Anxiety and Depression Scale）と当方で作成したアンケートを、主介護者にはこれらに加えてZarit介護負担尺度（ZBI）の回答を依頼した。

2. 成人Duchenne型筋ジストロフィー患者のADLと不安・抑うつに関する調査

当院の神経内科または小児神経科に通院し、同院身体リハビリ科でリハビリを受けている20歳以上のDMD患者を対象とした。選択基準は明らかな知的障害や発達障害がなく、説明文書と調査者の研究概要の説明が理解でき、研究同意が取得できること、質問に自記または口頭で回答可能なこととした。除外基準は、患者自身の研究参加意思確認と質問紙回答が困難で、診断確定後1年未満とした。患者属性は診療録から収集し、ADL評価は機能的自立度評価表（Functional Independence Measure：FIM）を用いた。心理評価はHospital Anxiety and Depression Scale（HADS）日本語版を用いた。健康関連QOL（HRQOL）評価はSF-36v2®とWHOQOL26を用いた。FIMと他の調査項目について相関の有無を検討した。

3. Duchenne型筋ジストロフィー患者に対するリハビリテーション治療効果の検討

2008年1月から2018年8月の期間中，当院リハビリテーション科へ通院した2018年8月時15-20歳のDMD患者66名を対象とした。

対象者の立位訓練施行状況と身体機能、脊椎X線所見、呼吸機能を後方視的に調査した。歩行不能、Cobb角＞40度、%FVC＜40%をエンドポイントとしKaplan-Meyer分析により立位訓練の効果を検証した。

結果

1. 成人 Duchenne 型筋ジストロフィー患者家族の介護に関する調査

成人患者 34 名（中央値年齢 26.5 歳）の FIM 総計の中央値は 53 点（48-60)、運動項目の中央値は 18.5 点（13-25 点）であった。HADS は不安項目の中央値が 5 点（0-14)、抑うつ項目の中央値が 2 点（0-8）であった。FIM と HADS スコアの相関はなかった。

成人 DMD 患者の主介護者 17 名（男性 2 名)・中央値年齢 55 歳（患者の中央値年齢 25 歳)において、平均 ZBI 値 25.4（5-67）点、自覚的な平均介護負担割合は 77.4%/日、平均介護時間 15.6 時間/日であった。HADS の不安項目は中央値 5.5（0-19)、抑うつ項目は中央値 6（0-14）であった。ZBI と介護負担割合・不安・抑うつの得点間の相関は、それぞれ r=0.41, 0.73, 0.81 であった。

未成年 DMD 患者の保護者 34 名（全員女性)・中央値年齢 44 歳では、平均 ZBI 値 25.9（8-66）点であった。HADS の不安項目の中央値 5 点（0-13)、抑うつ項目の中央値 4 点（0-12）点であった。ZBI と抑うつの相関係数は r=0.66 で正の相関がみられた。

2. 成人Duchenne型筋ジストロフィー患者のADLと不安・抑うつに関する調査

男性 36 名（26.3±4.7 歳、20-36 歳）が対象となった。歩行能力喪失平均年齢は 10.2±1.6 歳で、全員が心筋症治療薬を内服し、ステロイド治療歴なしは 15 名（27.9±4.6 歳）であった。夜間または終日 NPPV は 32 名（88.9%）が、4 名が胃瘻を用いていた。26 名（72.2%）は屋内外で電動車いす自操可能であった。質問紙の自記回答は 16 名（44.4%）が可能であった。ヘルパー利用等で独居が 3 名（8.3%)、大卒以上が 16 名（44.4%)、14 名（38.9%）が就労中だった。ホームヘルパーは 27 名（75.0%）が利用していた。

FIM 総得点は 53.9±3.4 点で、ADL 全介助レベルであった。運動項目は 19.0±3.1 点で、食事（2.4±1.6）と整容（1.4±0.7)、排尿管理（1.9±0.4)、排便管理（1.6±0.5)、車いす操作能力（3.8±1.5）の得点に個人差があった。

HADS の平均得点は不安 4.8±2.8 点、抑うつ 2.9±2.5 点で、患者群は臨床的な意義を有する不安や抑うつを呈する状態になかった。

SF-36v2®は国民標準値に比して PF（身体機能)、RP（日常役割機能）で P<0.001、GH（全体的健康感)、SF（社会生活機能)、RE（日常役割機能）が P<0.05 と有意差を認めた。

WHOQOL26 は 20～29 歳、30～39 歳の一般人口データと比較し、有意差はなかった。

FIM と HADS、SF-36v2®、WHOQOL26、自己満足度に相関はなかった。

3. Duchenne型筋ジストロフィー患者に対するリハビリテーション治療効果の検討

Kaplan-Meyer 分析の結果、歩行可能年齢の有意な延長（HR 0.3, p<0.01)、側弯進行（HR 0.2, p<0.01）及び呼吸機能低下（HR 0.3, p<0.05）の有意な抑制を認めた。また、立位訓練を中止した理由として中学入学、体重増加による介護者の負担増などが挙げられた.

考察

介護負担感の調査では ZBI と抑うつには有意な相関が認められ、介護者側から見ると介護の負担が抑うつにつながっていることが示唆される一方で、患者本人の ADL と不安・抑

うつの調査では ADL 能力と心理面の指標には相関を認めず、患者側は介護を受けることに関して心理的負担は小さいことが示唆された。このような乖離があることから、DMD 患者のリハビリテーション治療に当たっては、患者本人の心身の状態だけでなく、介護者の負担感にも配慮する必要があると考えられた。

また、ADL と患者の心理状態とは有意な相関を認めなかった。本研究で ADL 評価として用いた FIM は基本的 ADL の自立度を評価するものであるが、成人 DMD ではこのような基本的 ADL は全介助に近い状態である場合が多く、むしろ残存機能を生かして PC 作業などを通じた社会参加のレベルが QOL や心理面に対して重要であることが考えられた。

長期的なリハビリテーション介入の効果検証として、LLB を用いた立位訓練を成長期終了まで行うことで、歩行可能期間の延長、側弯の進行抑制、呼吸機能の維持に効果があることが示唆された。しかし、就学・進学に伴うライフスタイルの変化や成長・体重増加に伴う介護負担増を理由に継続不能になる例も多く、家庭だけでなく学校での施行など介護者の負担を軽減しながら継続可能な体制の整備も必要と考えられた。

結論

DMD 患者は幼少期に発症し、徐々に症状が進行するため、早期のリハビリテーション介入が必要であり、LLB を用いた立位訓練の継続は歩行可能期間の延長、側弯の進行抑制、呼吸機能の維持に一定の効果を認めた。

成人期では身体機能は患者本人よりも介護者の負担感、抑うつに影響する一方で、患者本人の QOL 向上のためには身体機能だけでなく、社会参加の面へのアプローチが重要であることが考えられた。

参考文献

Pangalila RF, et al. Prevalence of Fatigue, Pain, and Affective Disorders in Adults With Duchenne Muscular Dystrophy and Their Associations With Quality of Life. Arch Phys Med Rehabil. 2015; 96:1242-7

Boyer F, et al. Fctors Relating To Carer Burden For Families Of Persons With Muscular Dystrophy. J Rehabil Med. 2006; 38: 309-315

Elsenbruch S, et al. Self-Reported Quality of Life and Depressive Symptoms in Children, Adolescents, and Adults with Duchenne Muscular Dystrophy: A Cross-Sectional Survey Study. Neuropediatrics. 2013; 44: 257–264.

Elsenbruch S, et al. Self-Reported Quality of Life and Depressive Symptoms in Children, Adolescents, and Adults with Duchenne Muscular Dystrophy: A Cross-Sectional Survey Study. Neuropediatrics. 44:257–264.2013

Pangalila RF, et al. Quality of life of adult men with Duchenne muscular dystrophy in the Netherlands: implications for care.J Rehabil Med. 47(2):161-6. 2015

Lue YJ, et al. Quality of life of patients with Duchenne muscular dystrophy: from adolescence to young men. Disabil Rehabil. 39(14):1408-1413. 2017

Galasko CS, et al. Lung function in Duchenne muscular dystrophy. Eur Spine J 1995;4(5):263-7.

Yamashita T, et al. Prediction of progression of spinal deformity in Duchenne muscular dystrophy: a preliminary report. Spine (Phila Pa 1976) 2001;26(11):E223-6.

デュシェンヌ型筋ジストロフィーにおける左室拡張末期径と死亡率

瀬川　和彦
国立精神・神経医療研究センター病院

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、骨格筋、心筋の変性により呼吸不全、心不全をおこす疾患である。非侵襲的人工呼吸の導入により生存期間が延長している。心機能障害についてはACE阻害薬とβ遮断薬の効果が示されているが、両薬剤で治療しても心不全による死亡がみられる。本研究では国立精神・神経医療研究センター(NCNP)で心エコー検査を行ったDMD患者の左室拡張末期径(LVDd)と心不全死の関係について後ろ向きに検討した。

方法

2011年1月～2015年12月までにNCNPで心エコー検査をおこなった10歳以上のDMD患者133例を対象とし、2018年8月までの経過を後ろ向きに検討した。

初回心エコー検査時のLVDdより、≦54ｍｍ（Group 1, n=119）と≧55ｍｍ(Group 2, n=14)の2群に分類した。Group 2において、LVDd以外の危険因子として左房拡大、中等度の僧帽弁逆流、肺高血圧を想定し、初回検査時にいずれかの所見を認めた2例を除外し、経過観察中にいずれもみられなかったGroup 2A(n=5)と1つ以上が新たに出現したGroup 2B (n=7)に分類した。

Group 1とGroup 2の全死亡、心不全死をKaplan-Meier法で解析した。死亡率の差はLog rank test及びCox比例ハザードモデルにより解析した。Group 2Aの初回検査時からの経過とGroup 2Bの左房拡大、中等度の僧帽弁逆流、肺高血圧のいずれかが最初にみられた時点からの経過をKaplan-Meier法及びLog rank testで解析した。

結果

Group 1とGroup 2の患者の年齢に有意差を認めなかった(10-39才（中央値14才）vs 11-27才（中央値18才), p=0.051)。観察期間はGroup 1が5.5±1.5年、Group 2が4.4±1.9年であった。 14例（10.5%）が観察中に死亡した(Group 1, 6/119例（5.0%), Group 2, 8/14例（57.1%))。5年生存率はGroup 1が96.3%、Group 2が47.6%であった(p<0.001)。心不全死はGroup 1の1/119例(0.8%)、Group 2の8/14例(57.1%)にみられた。5年生存率はそれぞれ99.0%、47.6%であった(p<0.001)。Cox比例ハザードモデルによる解析で、LVDdは心不全死と有意な相関を認めた(ハザード比: 1.56, 95%信頼区間: 1.20–2.03; p=0.001)。

Group 2の患者において経過観察中に新たに左房拡大、中等度の僧帽弁逆流、肺高血圧のいずれかが出現したGroup 2Bは、それらを認めないGroup 2Aと比較して短期間に心不全により死亡した(p=0.006)。

考察

先行研究では、DMD患者においてACE阻害薬とβ遮断薬が左室収縮能の指標である左室駆出率(EF)、左室内径短縮率(FS)を改善したと報告されている。DMD患者は運動機能障害のため心機能が高度に低下するまでは心不全症状を認めない。そのような無症状の左室機能低下を伴うDMD患者の

EF を改善したとしても患者の QOL は変わらない。重要なことは、症候性心不全、心不全による死亡を予測し、予防することである。本研究より左室の拡大が心不全死の予測因子であると考えられた。一方、左室拡大のない例では、左室収縮能の低下があっても生命予後は良好であった。

DMD の心機能評価法として心エコーが一般的に用いられる。心エコーにおいて良好な画像を描出するには、患者を左側臥位にする必要がある。しかし、DMD 患者は運動機能障害があり、またステロイド治療に伴う肥満のため、しばしば車椅子からベッドへの移動が困難である。そのため、車椅子坐位で検査することが少なくない。また胸郭変形や陽圧人工呼吸も心エコーの画像描出を困難にする。LVDd は、左室計測指標のなかでも比較的容易に計測ができ、再現性も高い。

DMD 心筋症の原因は心筋細胞膜のジストロフィン蛋白欠損による。しかし実臨床では DMD 心筋症の経過は一様ではなく、個人差が大きい。単純に年齢にのみ依存して進行するとは考えられず、ジストロフィン蛋白以外の修飾因子が考えられる。このことはもともと稀少疾患である DMD に対し、比較的少数の被験者間で比較試験を行う際に問題となるかもしれない。

本研究の結果から、DMD 心筋症の重症度分類を提唱する。

ステージ 0：左室内径短縮率正常
ステージ 1：左室内径短縮率低下
ステージ 2：左室拡張末期径増加
ステージ 3:左房拡大、中等度の僧帽弁逆流、肺高血圧、症候性心不全

ステージ 1 で安定している患者は心筋症があっても生命予後は良好と考えられる。一方、ステージ 2 は、心不全死のリスクが高まると考えられ、ステージ 3 は治療抵抗性で極めて予後不良である。ステージ 2 の心筋症に対して、ACE 阻害薬、β 遮断薬に追加する何らかの治療の試みが必要と考えられる。一般的な心不全ガイドラインにおいては Stage C または NYHA3 度で抗アルドステロン薬の投与を推奨している。DMD の心不全に対して抗アルドステロン薬の効果を比較試験で検証することは倫理的に認められないが、一般的な心不全にエビデンスを持つ抗アルドステロン薬を積極的に DMD 心筋症にも使うべきであると考える。

結論

左室拡張末期径増大は DMD 心筋症の心不全死の予測因子である。

左室拡大に左房拡大、中等度僧帽弁逆流、肺高血圧の 1 つ以上を伴うと、症候戦心不全となり短期間に死亡するリスクが高い。

現在推奨されている ACE 阻害薬と β 遮断薬による心筋症治療に加えて、左室拡大を防ぐための治療を模索する必要がある。

論文

Segawa K, Sugawara N, Maruo K, Kimura K, Komaki H, Takahashi Y, Sasaki M. Left ventricular end-diastolic diameter and cardiac mortality in Duchenne muscular dystrophy. *Neuropsychiatric disease and treatment.* 2020;16:171–178

希少疾患領域における臨床研究基盤モデル構築を目指した研究

中村治雅

国立精神・神経医療研究センター

緒言

希少疾患領域において、臨床開発研究基盤としての臨床研究ネットワーク、患者レジストリの有用性については疑う余地がない。さらには、これらを効率的に連携、運用することでさらなる効果が期待されるものの、未だ適切な基盤モデルは確立できていないのが現状である。

当センターにおいては、国内でも有数の神経・筋疾患者登録システム（Remudy: Registry of Muscular Dystrophy）及び筋ジストロフィー臨床試験ネットワーク（MDCTN: Muscular Dystrophy Clinical Trial Network）を有しており、これまでにも疾患登録システムにおける Trial ready cohort としての実施可能性調査、リクルート、疫学研究の実施、ネットワークにおける施設調査や多施設共同臨床研究の実施など、個別で有効に機能し、国内での臨床研究、治験、国際共同治験の希少疾患領域の一つのモデルとなってきた。しかしながら、お互いの事務局機能、運用体制は別途行われてきた。

本研究においては、これら独立運用されてきた事業の効率的運用、統合化を視野に入れた体制の提言を行い、新たな希少疾患臨床研究基盤モデルを提示する。

方法

RemudyおよびMDCTNの統合的運用に向けて、レジストリ、ネットワークの各事務局機能、運用体制の整理と規約の作成、運用に関しての検討を行う。

結果

平成 29 年度より、MDCTN および Remudy の統合に向けて、準備に向けた検討会議の開催、レジストリ事務局業務の整理、三菱綜合研究所の支援を受けて統合後の協議会規定案の策定を継続した。Remudy/MDCTN　第 1 回（平成 30 年 7 月 15 日）、第 2 回（平成 31 年 1 月 11 日）統合準備委員会が開催され、これまでの統合化に向けた基本方針の確認と承認、新たな名称である「神経筋疾患先端医療推進協議会：CareCure-NMD」の承認、そして最終的な規約が確定された。また、Remudy/MDCTN が管理する様々な施設情報、患者登録情報などの利活用のための方策についても検討し、情報開示における費用負担のあり方（製薬企業、アカデミなどの違いによる考え方）、情報提供審査委員会の委員構成及び審査の考え方についても議論された。神経筋疾患先端医療推進協議会第一回運営委員会（平成 31 年 5 月 11 日）が開催され、平成 31 年度より正式に Remudy/MDCTN　は統合され、CCNMD として運用が開始された。

考察

国内でも有数の神経・筋疾患者登録システムと臨床試験ネットワークの統合的運用について、平成 29 年度より取り組み、組織の体制整備、各種規定類等の準備を経て最終年度の平成 31 年（令和元年）からは、統合的運用を開始することができた。世界的にも、レジストリと臨床研究ネットワークを

一元的に運用している研究基盤は先駆的な活動になると考えられる。実際の運用の開始にあたって、新たに組織化された委員会の元で実務的な活動は実施された。RemudyおよびMDCTNのこれまでの事務的窓口を総務委員会のもとで一元化し効率的な運用が可能になったとともに、外部からもわかりやすい対応が可能になった。広報委員会については、今後 Remudy および MDCTN、さらには他の研究班とも連携した情報発信を進めることが必要である。RemudyおよびMDCTNそれぞれの委員会についても、今後はより協力して情報共有しつつ進めていく必要がある。

また、これらの活動が、筋疾患に限らず他の希少疾患領域においても、同様に運用できるようにするために、他の研究領域との連携も必要となると考えられる。

結論

希少疾患における研究開発促進のために、レジストリと研究ネットワークの統合的運用の準備を行い、新年度に新たな希少疾患臨床研究基盤モデルを提示した。

参考文献

1. Takeuchi F, Nakamura H, Yonemoto N, Komaki H, Rosales RL, Kornberg AJ, Bretag AH, Dejthevaporn C, Goh KJ, Jong YJ, Kim DS, Khadilkar SV, Shen D, Wong KT, Chai J, Chan SH, Khan S, Ohnmar O, Nishino I, Takeda S, Nonaka I. Clinical practice with steroid therapy for Duchenne muscular dystrophy: An expert survey in Asia and Oceania. Brain Dev. 2020 Mar;42(3):277-288. doi: 10.1016/j.braindev.2019.12.005. Epub 2020 Jan 21.
2. Okubo M, Noguchi S, Hayashi S, Nakamura H, Komaki H, Matsuo M, Nishino I. Exon skipping induced by nonsense/frameshift mutations in DMD gene results in Becker muscular dystrophy. Hum Genet. 2020 Feb;139(2):247-255. doi: 10.1007/s00439-019-02107-4. Epub 2020 Jan 9.
3. Ishigaki K, Nakamura H, et al. National registry of patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy in Japan. Neuromuscul Disord. 2018 Oct;28(10):885-893. doi: 10.1016/j.nmd.2018.08.001. Epub 2018 Aug 10.
4. Harumasa Nakamura, Shin'ichi Takeda & Masaru Iwasaki. Identification of approval conditions for orphan drugs for neurological disorders by the Japanese regulatory agency. Expert Opin Orphan Drugs.2018; 6: 441-447
5. Komaki H, Nagata T, Saito T, Masuda S, Takeshita E, Sasaki M, Tachimori H, Nakamura H, Aoki Y, Takeda S. Systemic administration of the antisense oligonucleotide NS-065/NCNP-01 for skipping of exon 53 in patients with Duchenne muscular dystrophy. Science Translational Medicine. 2018 Apr 18;10(437).
6. 中村治雅、武田伸一. クリニカル・イノベーション・ネットワーク. 整・災外 61：419−424, 2018

Remudy 対象筋疾患の遺伝学的診断サービス提供

西野一三
国立精神・神経医療研究センター

緒言

遺伝性筋疾患は、希少疾病であることと、原因となる遺伝子の数が 100 以上もあり、時には巨大な遺伝子が原因となるという特性のため、診断システムの整備は困難を極める。筋ジストロフィー等の治験・臨床研究を目的とした遺伝性神経・筋疾患の患者登録システム Remudy に登録するためには、正確な遺伝情報が不可欠である。本申請研究では、ジストロフィノパチーをはじめとする各種遺伝性筋疾患における、効率的な遺伝子診断システムの確立を目指す。

方法

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）または Becker 型筋ジストロフィー（BMD）患者で MLPA 法により変異を同定されていない一方で、筋生検で DMD/BMD との診断が確定している例を対象として、血液からゲノム DNA を抽出しジストロフィン遺伝子解析を行う。次世代シークエンサー IonPGM による解析を第一選択とし、変異が検出できなかった症例については、サンガー法による全シークエンスを施行する。また、MLPA 法で単一エクソン欠失・重複であった症例については、隣接したエクソンを含むサンガーシークエンス解析を施行する。さらに得られた遺伝子解析結果と免疫染色の結果などの Remudy 登録情報を元に、後方視的データ解析を行う。

縁取り空胞をともなう遠位型ミオパチー（GNE ミオパチー）が臨床もしくは病理学的に疑われる患者の血液からゲノム DNA を抽出し、次世代シークエンサーIonPGM による解析を行う。シークエンサーから得られたリード数の違いから、コピー数多型の解析（CNV 解析）を行う。微小変異については、ION REPORTER 解析サーバーの Variant caller を使用する。

結果

[ジストロフィノパチー遺伝子解析]

2017 年 4 月～2020 年 3 月までに 130 症例の DMD 遺伝子全シークエンスを行った。次世代シークエンサーで変異を検出できなかった症例は 15 例であり、そのうち 1 例はイントロンの変異、もう 1 例は特殊な Alu 配列の挿入であることを、全サンガーシークエンスによって確認した。それ以外の 13 例では全エクソンのサンガーシークエンスでも変異は認められなかった。単一エクソン欠失重複の確認は 28 例で行った。筋レポジトリの全検体のうち、筋病理で確実にジストロフィノパチーの診断がついているが、全エクソンシークエンスで変異が検出されていない 12 例について、現在 RNA-seq による解析を行っている。

[ジストロフィノパチー研究実績]

Remudy 登録された変異データの後方視的解析により、ナンセンス変異を有するが免疫染色にてジストロフィンの発現を認める 18 変異と、同じエクソンにおいてジストロフィンの発現を認めない 16 変異を抽出した。西田らが 2011 年に報告した H492 プラスミドを用い、34 個の変異と wild type exon 配列をそれぞれ HeLa 細胞に導入した。細胞から RNA を回収し、RT-PCR 法において、エクソンスキップの有無を解析、スキップ率を求めた。その結果、閾値を 5%としたところ、89%で免疫染色でのジストロフィンの発現の有無と H492 プラスミドを用いたエクソンスキップの結果が一致した。また、エクソンスキップを引き起こす変異は splicing enhancer を破壊することが機能予測ソフトの結果から推測された。

[GNE ミオパチー遺伝子解析]

2017 年 4 月～2020 年 3 月までに 104 症例の GNE 遺伝子解析を行った。

[GNE ミオパチー研究実績]

これまで当院で遺伝子診断した日本人GNE ミオパチー患者 325 家系 343 名を解析した。未報告の変異は 18 個あり、報告予定である。また Allele 頻度が 2 番目に高い c.620A>T (p.D207V)をホモ接合体で持つ患者は 2 名と極端に少なかった。同変異をホモ接合体で持つ健常人が 1 名見つかった。同変異はホモ接合体では発症しない可能性を疑い、上記 3 名に対し、CNV 解析、WGS、RNAseq を行ったが、明らかな異常は見つからなかった。WGS によるハプロタイプ解析では、それぞれのサンプル内において同祖なハプロタイプがホモ接合になっており、発症者 2 名の GNE 遺伝子領域を含むハプロタイプは同祖であったのに対し、非発症健康男性にハプロタイプは同祖でないと考えられた。また、新たに p.D207V ホモ接合体の患者が 1 名見つかった。発症は 60 歳であり、本変異が軽症型変異と考えられることと矛盾しなかった。

考察

[ジストロフィノパチー遺伝子解析]

DMD 遺伝子解析については、次世代シークエンサーIonPGM を用いることで、ほぼ全ての診断が可能となってきている。全サンガーシークエンスでも変異が同定できない症例については、deep intron の変異が最も考えられる。過去の報告からも全 DMD/BMD 患者の 1%程度存在すると言われており、現在の我々の解析では deep intron 変異は検出することができないが、それ以外の変異については欠失・重複を含め、理論上 98%の DMD/BMD 患者で遺伝子変異を確定することでき、保険診療で大半の患者の DMD 遺伝子変異を同定できるようになると期待される。

DMD 遺伝子変異の研究において、Remudy 登録データをもとに、ナンセンス変異を有しジストロフィン染色が陽性となる症例が、エクソンスキップを起こしていることを証明した。さらに今回の結果から、スキップ率が 5%以上の場合に、免疫染色でジストロフィンが発現していることがいえる。この結果は、エクソンスキップ治療の適応や治療効果予測などにも有用な情報である。

[GNE ミオパチー遺伝子解析]

p.D207V をホモ接合体で持つ患者 2 名と健康男性 1 名は同祖ではなく、発症者に共通し、非発症者が有さない variant が発症を規定する因子と考える。発症者の有するハプロタイプの頻度を比較するため、一般集団および p.D207V 複合ヘテロ集団のハプロタイプを比較解析中である。また、新たにみつかった p.D207V ホモ接合体患者に関しても、RNA seq および WGS で解析している。

結論

3 年間の結果から、IonPGM を用いた筋疾患患者の遺伝子解析システムは、簡便で効率的に運用可能であることが示された。今後は保険収載を目指して、企業と協力体制を結ぶことを検討している。今後、登録対象疾患の拡大や、指定難病登録システム運用のための遺伝子診断の利用などを踏まえると、次世代シークエンサーを用いることにより、効率的かつ経済的な解析方法を立ち上げることが望ましいと考えられた。

GNE ミオパチーp.D207V 変異は軽症型変異であり、ホモ接合体ではほぼ発症しないと考えられた。ホモ接合体で発症した患者 2 名は同祖であり、ホモ接合体の非発症者は同祖でなかったことより、発症者のハプロタイプのみが有するバリアントが発症を規定すると考えられた。発症を規定する因子に迫るためには、症例数を増やした解析が必要だ。

参考文献

Okubo et al.: Exon skipping induced by nonsense/frameshift mutations in DMD

gene results in Becker muscular dystrophy. Hum Genet.DOI: 10.1007/s00439-019-02107-4

Okubo M et al.: Comprehensive analysis for genetic diagnosis of Dystrophinopathies in Japan. ORJD.12;149:2017

Becker型筋ジストロフィーの病態解明のための疫学研究

国立精神・神経医療研究センター病院脳神経内科　　森まどか

A.緒言

ベッカー型筋ジストロフィー（Becker muscular dystrophy, BMD）は比較的軽症なジストロフィン異常症である。BMD は軽症であることに加え症例ごとに症状が多様であるため、疾患全体の臨床像や genotype-phenotype correlation については未解明な点が多かった。我々は①日本の BMD 患者の臨床的特徴をとらえる②BMD 患者がメンタル面の問題を抱えやすい傾向があることに注目し、解明のための調査研究を行った。

B.研究方法

①神経・筋疾患患者登録(Registry of Neuromuscular diseases, REMUDY）で収集された、遺伝子診断で確定された dystrophinopathy 患者の登録データのうち、13 歳以上 17 歳未満で歩行喪失した中間型筋ジストロフィー（IMD)、および 17 歳以上で歩行可能な BMD の情報を解析した。

②1979 年から 2017 年 8 月の間に国立精神･神経医療研究センター病院を受診し、17 歳時点で歩行可能だった男性ジストロフィン異常症患者に研究協力を依頼した。参加者に運動機能・家族歴・生育歴・治療歴・学業成績・精神疾患の有無を問診、カルテ調査を行った。希望する患者に対し WAIS-R、Japanese Adult Reading Test (JART)、精神疾患簡易構造化面接法（MINI)、うつ病簡易評価尺度（CES-D)、特性不安尺度（STAI)、Conners'Adult ADHD Rating Scales 日本語版（CAARS)、広汎性発達障害日本自閉症協会評定尺度(PARS)、自閉症スペクトラム指数（AQ）を行った。

（倫理面への配慮）患者登録システムの構築と遺伝子検査実施体制（Remudy)・および dystrophinopathy 患者登録システムについては、独立行政法人国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得ている。患者については、独立行政法人国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得ている。

取り扱う情報は、遺伝子解析の結果を含む個人情報であり、個人情報管理については十分な配慮を行った。本研究は厚生労働省・文部科学省「疫学研究に関する倫理指針」を準拠し、行政機関の保有する個人情報の保護に関する法律を遵守した。

C.研究結果

①調査参加：ジストロフィノパチー登録患者 1,298 名のうち BMD138 名、IMD54 名が該当した。収集時のデータは 34.8 ± 13.3 (median, 32 歳, 17-78 歳)であった。49.5% (n=95)は心機能正常、55.2% (n=106)は何らかの心疾患治療薬を内服していた。32 名 (16.7%) はステロイド投与を受けたことがあった。

80 名（41.7%）に家族歴があった。88 名 (45.8%)は呼吸機能正常だったが、25 名 (13.0%)は評価されていなかった。BMD のうち 35 名は呼吸機能障害があった。そのうち 18 名は歩行不能、17 名は歩行可能だった。18 名は人工呼吸器を使用しており、5 名は part-time, 13 名は終日利用していた。遺伝子診断で inframe かつ筋生検の免疫組織化学染色で faint and patchy パターンを取る典型例も含まれていた。IMD50 名のうち 44 名に呼吸機能障害を認め、33 名（17.2%)が人工呼吸器利用、13 名が持続的に利用していた。BMD, IMD のうち人工呼吸器利用者 33 名のうち 44 歳の BMD1 名のみが歩行可能だった。

137 名が欠失変異、16 名が重複、39 名が small mutations だった。ex45_ex47del 変異が最多で 26.3% (36/137), 次に ex45_ex48del 変異 12.4% (17/137), ex45_ex49del 変異 6.6% (9/137), ex3_ex7del 変異 5.1% (7/137), ex48del 変異 2.9% (4/137), ex45_ex55del 変異 2.9% (4/137)の順だった。 58 種の変異(67 名 48.9%)は 1, 2 名の患者しか登録していなかった。

頻度の高い ex45_ex47del, ex45_ex48del, ex45_ex49del, ex45_ex55del, ex48del 変異の間の表現型を比較した。ステロイド投与者は除外した。患者数は順に 36, 16, 8, 4, 4 名だった。最も頻度の高い ex45_47del に比べ

て ex45_ex55del 変異と ex48del 変異は優位に若年だった。ex45_ex55del 変異や ex48del 変異のある患者で歩行不能者はいなかった。歩行喪失年齢を残りの変異で比べた場合、ex45_ex49del 変異を持つ患者の歩行喪失年齢は 39.7 歳と ex45_ex47del (53 歳,p=0.215) ex45_ex48del (60 歳, p=0.018)より若かった。ex45_ex48 変異は最も予測歩行可能期間が長かった。心機能障害のある患者の割合は ex45_ex47del (36.1%), ex45_ex48del(60.0%), ex45_ex49del (37.5%), ex45_ex55del (25%), ex48del (0%) の順だった。呼吸不全のある患者の割合は多い順に ex45_ex47del (13.9%), ex45_ex48del (21.4%), ex45_ex49del (0%), ex45_ex55del(0%),ex48del(0%)だった。

②1. 調査参加:患者 105 名中 76 名（73%）が研究参加、23 名（22%）は参加拒否ないし接触不能、6 名が死亡していた。2 名が調査終了後に死亡した。参加者の平均年齢 37.0+/- 11.7 歳（中央値 37, 17-59 歳）、歩行可能 59 人（78%）であった。自覚・他覚症状のない未発症者が 3 名含まれた。

2. 患者背景：生育歴：学校でのいじめは 33 名（43%）が経験有りと回答し、一般人口（1.34%）より高頻度だった。就学中を除き就労経験ありは 59 名(78%)と一般男性（87.8%）より低く、19 名（25%）は身体的理由で離職していた。

3. 発達・精神面：5 例（7%）にてんかんの治療歴があった。知的障害 5 名、広汎性発達障害 1 名が含まれた。問題行動は 11 名(15%)が経験しており、不登校・ひきこもり 8 例（11%)、暴力行為 3 例（4%)、自殺企図 1 名で、不登校・暴力行為は一般人口より高頻度だった。精神疾患は 16 名（21%)、統合失調症性スペクトラム 5 名、抑うつ障害群 4 名、適応障害 3 名、転換性障害 2 名、強迫・パニック 2 名、双極性感情障害 1 名で統合失調症スペクトラムで一般人口より高頻度であった。いじめを受けた群では精神疾患を持つ割合が有意に高かった（p=0.021）精神疾患あり群に知的障害 4 名・広汎性発達障害 1 例が含まれた。

4. 心理検査結果: WAIS-R FIQ(n=33)および JART 病前 IQ(n=45)ではそれぞれ平均 94.4 +/- 18.4（50-138）および 105.1 +/- 9.9 (71.78-121.50) と低下はなかった（最重度知的障害 1 名は検査不能)。CES-D （n=40）≧16 は 32.5% と抑うつ状態の患者が多かった。STAI(n=40)では特性不安≧44 が 37.5%, 状態不安≧44 が 50%と不安状態がみられた。発達指数では PARS 幼児期得点 (n=17)9 点以上 16.7%, CAARS 自己 H (n=35) 44 点以上 17.6%、AQ (n=35) 33 点以上 11.4%であった。

D.考察

過去の報告では心筋症発症は ex45_ex48del 変異や ex45_ex49del 変異が ex45_ex47del 変異より遅い、乃至 ex45_ex47del や ex45del_
eex49del 変異の車椅子利用が ex45_ex48del 変異より早いとされる。この研究で ex45_ex47del や ex45_ex48del 変異が歩行予後が良いことを示した。

この研究では軽症 dystrophinopathy の病態を解明することを目的としたため、BMD の定義に臨床指標、すなわち歩行可能年齢を用い、genotype や病理所見を用いなかった。病理診断を受ける割合は特に欠失重複変異では少なくなっていることも背景にある。一方、ステロイド利用による歩行予後の改善は本来 DMD の表現型であった患者も含めることになるため、臨床指標単独に依存することも望ましくない可能性がある。

個別の変異ごとの表現型比較をすることが出来たのは一部の頻度の高い変異のみで、他の遺伝子型の表現型の検討は出来ない。国際登録との協調や分子機能からの予後予測など新たな方法論が必要である。BMD にもステロイドが用いられていることをはじめて明らかにしたが、効果について評価は出来ていない。前向き研究等が必要である。BMD の呼吸機能障害についてもはじめて言及した。BMD や IMD の診療には、呼吸機能評価と必要な呼吸リハビリや治療介入を行うことを再確認したい。

精神疾患と BMD の関係を明らかにし、一

般人口よりも特に統合失調症および神経症領域の罹患が多いことを明らかにした。またうつ状態および特性不安が高い傾向があり、これらは身体障害の重症度や知的障害と関連せず病気の本質的な特性であると考え、BMDは身体障害のみでなく精神面にも配慮が必要な疾患であることを認識する必要があると考えた。いじめを受けた頻度は一般人口よりも多く、これらの外的因子が特性不安と相まって精神面に幼少期から悪影響を与える可能性は否定出来ない。また発達障害に関わる因子が高いほどQOLに悪影響があった。

E.結論

国内BMD/IMDの表現型を明らかにした。BMD/IMDには呼吸障害への配慮が必要である。BMD患者では統合失調症をはじめとした精神疾患が多く不安特性が高かった。不安特性が高いことは、いじめや身体障害の影響が精神面へ強く出やすい可能性がある。BMDでは疾患の早期発見および知的・精神面での評価を促進し、医療関係者と家族・教育関係者との適切な連携を図る必要がある。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

① Mori-Yoshimura M, Mizuno Y, Yoshida S, Ishihara N, Minami N, Morimoto E, Maruo K, Nonaka I, Komaki H, Nishino I, Sekiguchi M, Sato N, Takeda S, Takahashi Y.
Psychiatric and neurodevelopmental aspects of Becker muscular dystrophy.
Neuromuscul Disord.2019 Dec 29(12) 930-939

② Pogoryelova O, Urtizberea JA, Argov Z, Nishino I, Lochműller H; ENMC workshop study group.
237th ENMC International Workshop: GNE myopathy-current and future research Hoofddorp,The Netherlands,14-16 September 2018.
Neuromuscul Disord.2019 May 29(5) 401-410

③ Mukai T, Mori-Yoshimura M, Nishikawa A, Hokkoku K, Sonoo M, Nishino I, Takahashi Y.
Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy-Related Myopathy with TMEM43 Mutations.
Muscle Nerve.2019 Feb 59(2) E5-E7

④ Mori-Yoshimura M, Mitsuhashi S, Nakamura H, Komaki H, Goto K, Yonemoto N, Takeuchi F, Hayashi YK, Murata M, Takahashi Y, Nishino I, Takeda S, Kimura E.
Characteristics of Japanese Patients with Becker Muscular Dystrophy and intermediate Muscular Dystrophy in a Japanese National Registry of Muscular Dystrophy (Remudy):Heterogeneity and Clinical Variation.
J Neuromuscul Dis. 2018 5(2) 193-203

⑤ Katsuhito Adachi, Shuji Hashiguchi, Miho Saito, Setsuko Kashiwagi, Tatsushi Miyazaki, Hisaomi Kawai , Hirotsugu Yamada, Takashi Iwase, Masashi Akaike, Shoichiro Takao, Michio Kobayashi, Masatoshi Ishizaki, Tuyoshi Matsumura, Madoka Mori-Yoshimura, En Kimura
Detection and management of cardiomyopathy in female dystrophinopathy carriers
Journal of the Neurological Sciences

2018 May 386 74-80

⑥ Uruha A, Hayashi YK, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Kanai M, Murata M, Nishino I.
A-31-Year-Old Man with Slowly Progressive Limb Muscle Weakness and Respiratory insufficiency.
Brain Pathol. 2018 Jan 28(1) 123-124

⑦ Mori-Yoshimura M, Mizuno Y, Yoshida S, et al.：Social involvement issues in patients with Becker muscular dystrophy: A questionnaire survey of subjects from a patient registry. Brain Dev. 2018;40(4):268-277

2. 学会発表

① 森まどか，大矢寧，小牧宏文，南成裕，西野一三，瀬川和彦，髙橋祐二
Respiratory dysfunction ob Becker muscular dystrophy.
第 60 回日本神経学会学術大会 2019 年 5 月 大阪

② Madoka Mori-Yoshimura, Yukiko Mizuno, Sumiko Yoshida, Naoko Ishihara, Narihiro Minami, Kazushi Maruo, Ikuya Nonaka, Hirofumi Komaki, Ichizo Nishino, Miho Murata, Shinichi Takeda, Yuji Takahashi.
Psychiatric problems in patients with Becker muscular dystrophy.
Psychiatric problems in patients with Becker muscular dystrophy.
第 59 回日本神経学会学術大会 2018 年 5 月 札幌

③ 森まどか，水野由輝郎，吉田寿美子，南成祐，西野一三，村田美穂，武田伸一，髙橋祐二，木村円
ベッカー型筋ジストロフィー患者の社会参加に関する問題
第 115 回日本内科学会総会・講演会 2018 年 4 月 京都

筋ジストロフィーの嚥下障害の評価

分担研究者　**山本敏之**

国立精神・神経医療研究センター病院 神経内科

平成 29 年度

筋ジストロフィー患者の嚥下障害の自覚に関する研究

共同研究者

鈴木俊 [1)], 永濱敏樹 [1)], 小林広拓 [1)], 笠原靖弘 [1)], 蔦谷孝夫 [1)], 髙橋祐二 [2)], 村田美穂 [2)], 小牧宏文 [3)]

1) タニタ体重科学研究所, 2) 国立精神・神経医療研究センター病院　脳神経内科, 3) 同 小児神経科

緒言　本研究は，筋ジストロフィー患者の嚥下中の生体電気インピーダンスの経時変化を非侵襲的に評価し，簡便に嚥下を判定することを目的とした.

方法　筋ジストロフィー患者 15 人(男 12 人，女 3 人，年齢中央値 34 歳．デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD) 9 人，筋強直性ジストロフィー 5 人，顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD) 1 人)と，健常者 24 人(男 15 人，女 9 人，年齢中央値 35 歳)を対象とした．除外基準は，20 歳未満の対象，本人からの同意が得られない対象とした.

筋ジストロフィー患者は非侵襲的嚥下機能評価機器を装着し，X 線透視下で液体バリウム 3ml を 3 回嚥下した．健常者は非侵襲的嚥下機能評価機器を装着し，水 3ml を 3 回嚥下した．それぞれの嚥下の動的生体電気インピーダンス値の経時変化波形を記録した．同一対象の 3 回の嚥下の経時変化波形の類似度を以下の数式で算出した.

$$S = \frac{\sum_{i=1}^{j} Fii \cdot Gii}{\sqrt{\sum_{i=1}^{j} Fii^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^{j} Gii^2}}$$

S : 類似度，I:測定データ番号，j : 最大データ番号，F:基準生体電気インピーダンス波形，G 解析対象生体電気インピーダンス波形.

筋ジストロフィー患者は嚥下造影検査(VF)の結果から，嚥下正常群と嚥下障害群に分類した．健常者はすべて嚥下正常群とした. 本研究は, 本研究は当センター倫理委員会の承認を得た(承認番号 A2014-077).

結果　健常者 24 人と VF で異常を認めなかった患者は 4 人を嚥下正常群, VF で異常を認めた筋ジストロフィー患者 11 人を嚥下障害群とした．嚥下正常群の類似度は中央値 0.99（四分位範囲　0.96～0.99)，嚥下障害群の類似度は中央値 0.79（四分位範囲 0.71～0.99）であった．2 群には有意な差を認めた（Mann-Whitney U test: $p<0.01$）.

考察　嚥下障害がない筋ジストロフィー患者は, 健常者と同様に, 嚥下を繰り返しても動的生体電気インピーダンス値の経時変化にばらつきがなく，類似度が高いことが分かった. 一方, 嚥下障害がある場合, 嚥下関連器官の協調運動にばらつきが出るため, 動的生体電気インピーダンス値が安定しないと考えた.

結論　嚥下中の生体電気インピーダンスの経時変化を非侵襲的に評価し，正常の嚥下では繰り返しの嚥下による運動のばらつきが少なく，嚥下障害では繰り返しの嚥下による運動のばらつきが大きいことを示した.

平成 30 年度

代替栄養法を導入したデュシェンヌ型筋ジストロフィー患者の検討

共同研究者

森まどか[1)]，大矢寧[1)]，小牧宏文[2)]，髙橋祐二[1)]

1）国立精神・神経医療研究センター病院脳神経内科，2）同　小児神経科

緒言　本研究は DMD 患者に特徴的な身体所見と嚥下の状態を調査し，代替栄養法の導入の決定因子を検討した.

方法　2011 年 11 月～2018 年 9 月までの間に当院に入院した DMD 患者 56 人（年齢中央値 23.5 歳）を対象とした．すべての患者に嚥下造影検査（VF）を実施し，その時点での以下の項目を評価した : 検査時の体重，検査前 1 年間の体重変化率 [（検査時の体重 - 1 年前の体重） x 100/検査時の体重]，気管切開の有無, 人工呼吸器の使用頻度（未使用，部分使用，1 日使用），VF での誤嚥と咽頭残留, 日本語版嚥下障害質問票（SDQ）(1)の回答. VF 後，半年以内に胃瘻造設，もしくは経鼻経管栄養とした患者を代替栄養群，経口摂取を継続した患者を経口摂取群とした. 2 群を Mann-Whitney の U 検定で比較した. さらに, 代替栄養群に特徴的な項目を決定木分析で判定した.

結果　代替栄養群は 56 人中 13 人（23%）で，胃瘻造設 11 人，経鼻経管栄養 2 人であった. 検査時の年齢中央値は代替栄養群 24 歳，経口摂取群 23 歳で有意差はなかった. 体重中央値は代替栄養群 33.1 kg, 経口摂取群 48.6 kgで，有意差があった（$p < 0.01$）. 検査前 1 年間の体重変化率は，代替栄養群 -8.2%，経口摂取群 0%で，有意差があった（$p = 0.03$）. すでに気管切開していた患者 5 人すべてが代替栄養を導入し，経口摂取を継続した患者に気管切開をした患者はいなかった. 人工呼吸器の使用は, 代替栄養群は未使用 0%，部分使用 31%，1 日使用 69%，経口摂取群は未使用 7%，部分使用 50%, 1 日使用 43%で頻度に有意差はなかった．VF での誤嚥は代替栄養群 2 人（15.4%），経口摂取群 1 人（2.3%），咽頭残留は代替栄養群 12 人（92.3%），経口摂取群 72.1%でいずれも有意差はなかった. SDQ では 15 問中 5 問で代替栄養群は経口摂取群より悪かった.

決定木分析では, 代替栄養群は, 気管切開があること, 固い食べ物を食べると咳き込む，もしくは固い食べ物を食べられないことが特徴であった．決定木は，感度 77%，特異度 95%で有意に代替栄養群と経口摂取群を判別した（$p < 0.01$）． また，気管切開を除いた場合，固い食べ物を食べると咳き込むこと, 検査前 1 年間の体重変化率が 7.4%以上であることが特徴であった. 決定木は，感度 63%，特異度 95%で有意に代替栄養群と経口摂取群を判別した（$p < 0.01$）.

考察　DMD 患者に気管切開下陽圧換気を導入すると, 導入前に比べて, 嚥下にかかる時間と嚥下回数が少なくなり，嚥下が改善するという報告がある(2). 本研究では気管切開を行っていた DMD 患者 5 人すべてが, 半年後には経口摂取の継続が困難になった. 本研究対象が気管切開術を行った時期は，代替栄養法の導入よりも前であり，気管切開術の嚥下に対する直接的な影響は不明である．長期の経過で，気管切開は DMD 患者の経口摂取継続に不利であることが示唆

された．固い食べ物の嚥下に異常を感じたり，固い食べ物を食べられなくなったりする DMD 患者は，代替栄養法が必要になることが多かった．

結論　代替栄養法が必要になる DMD 患者の特徴は, 気管切開していること, 固い食べ物の嚥下に異常を感じていたり，固い食べ物を食べられなくなったりすること，1 年で 7.4%以上体重が減少していることが挙げられた．

参考文献

1. Yamamoto T, Ikeda K, Usui H, et al. Validation of the Japanese translation of the Swallowing Disturbance Questionnaire in Parkinson's disease patients. Qual Life Res. 2012;21(7):1299-303.

2. Terzi N, Prigent H, Lejaille M, et al. Impact of tracheostomy on swallowing performance in Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul Disord. 2010;20(8):493-8.

令和１年度

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの嚥下機能とその自覚

共同研究者
森まどか，大矢寧，髙橋祐二
国立精神・神経医療研究セ
ンター病院　脳神経内科

緒言　FSHD 患者を対象に, SDQ の総点と VF の所見を比較した．

方法　　対象は遺伝子検査で診断した FSHD 患者 35 人(女性 22 人, 男性 13 人, 平均年齢 49.2±17.4 歳）とした．すべての対象は日常の食事を経口摂取していた．対象に SDQ を回答させ, VF を実施した．VF では液体バリウム 10ml の嚥下から，喉頭蓋谷の残留, 梨状陥凹の残留, 誤嚥のいずれかを認めた場合，「嚥下障害」と定義した．SDQ の総点と VF の結果から感度と特異度が高い点数を同定した．統計は χ 二乗検定を行い，有意水準 $p<0.05$ を有意とした．なお，すべての検査は紙面による同意を得て実施した．

結果　VF で誤嚥した患者は 2 人（5.7%）で, 喉頭蓋谷と梨状窩のいずれか, もしくは両方に残留を認めたのは 12 人（34.3%）であった．全体で 34.3%に嚥下障害を認めた．SDQ の平均総点は 8.0 であった．SDQ-J で嚥下障害を判定する点数を 8 点としたとき, 感度 0.78, 特異度 0.7，陽性的中率 0.64, 陰性的中率 0.86 であった（$p<0.01$）．

考察　本邦における疫学調査では，経口摂取可能な患者は 75.8%で，経管栄養，胃瘻栄養例が少なからずいることが報告されている．

本研究から FSHD では誤嚥の頻度は 5.7%と低いものの，34.3%に咽頭残留を認めることが明らかになった．SDQ の総点 8.0 点を基準にすると, 有意に嚥下障害を判定できることを示した．自覚しやすい症状は，口唇閉鎖や口腔から咽頭への送り込み, そして咽頭収縮の低下による異常であることが示唆された．

結論　FSHD 患者の約 1/3 に嚥下障害を合併することが示された．嚥下のスクリーニングには，自己回答式問診票による評価が有用であった．

尿中タイチンを用いた Duchenne 型筋ジストロフィーの新たな疾患バイオマーカーの確立

粟野宏之

神戸大学大学院医学研究科内科系講座
小児科学分野

緒言

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）はジストロフィン遺伝子変異によって生じる致死性の進行性の筋萎縮症である。近年、DMD に対する様々な治療法が提唱されており、その治療効果を判定できるバイオマーカーの確立が急務となっている。

タイチンはヒト最大の蛋白で、筋肉のサルコメアで分子バネの役割を果たしている。我々はタイチン分解産物が DMD 患者の尿中に排泄される(1)ことから、タイチン分解産物が DMD の新たなバイオマーカーになると考え、ELISA キットを開発した。(2) 本研究では、DMD 患者の尿中タイチン濃度を測定し、病態的意義について検討した。

方法

DMD 患者と健常人から尿を採取し、松尾雅文らが開発した ELISA キット（株式会社免疫生物研究所）で尿中タイチン値を測定した。尿クレアチニンを測定し尿中タイチン濃度は pmol/mg Cr で示した。

結果

DMD 患者（145 人）の尿中タイチン濃度の中央値は、735.5pmol/mg Cr であった。一方健常人（9 人）の尿中タイチン中央値は 1.2pmol/mg Cr であり、DMD 患者の尿中タイチン濃度は健常人に比べて極めて高値であった($p<0.0001$)。(3) この結果は DMD 患者ではタイチンの分解が非常に活発であること示すものであった。尿中タイチンは年齢とともに低下した。DMD は年齢とともに進行していくため、尿中タイチンは DMD の病勢を示していると考えられた。尿中タイチンは年齢とともに低下するが、血清 CK 値が基準内となる病状の進行した DMD 患者でも、尿中タイチンは健常人より高値を示した。このことから、尿中タイチンは、血清 CK より鋭敏なバイオマーカーであることを示した。

尿中タイチンが DMD の診断マーカーとなるかについて DMD 患者と健常人の尿中タイチン濃度を用い ROC 曲線を作成し検討した。AUC（area under curve）は 1.0 であり、尿中タイチンを用いると DMD 患者と健常人を完璧に区別できるという結果をえた。カットオフ値を 3.52pmol/mg Cr とした場合、感度 98.9%、特異度 100%であった。尿中タイチンは DMD の非常に優れた診断マーカーであることが明らかになった。

考察

DMD のジストロフィンを欠損した筋肉では筋崩壊が生じるが、筋崩壊を反映するバイオマーカーはこれまで存在しなかった。DMD の尿中には筋崩壊によって生じたタイチン分解産物の濃度が高いことから筋崩壊が活発であり、尿中タイチンは DMD の筋崩壊を反映するバイオマーカーであると考えられた。

結論

尿中タイチンは DMD における非侵襲的な新たな疾患バイオマーカーである

参考文献

1. Rouillon J, Zocevic A, Leger T, Garcia C, Camadro JM, Udd B, et al. Proteomics profiling of urine reveals specific titin fragments as biomarkers of Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul Disord. 2014;24(7):563-73.
2. Maruyama N, Asai T, Abe C, Inada A, Kawauchi T, Miyashita K, et al. Establishment of a highly sensitive sandwich ELISA for the N-terminal fragment of titin in urine. Sci Rep. 2016;6:39375.
3. Awano H, Matsumoto M, Nagai M, Shirakawa T, Maruyama N, Iijima K, et al. Diagnostic and clinical significance of the titin fragment in urine of Duchenne muscular dystrophy patients. Clin Chim Acta. 2018;476:111-6.

福山型先天性筋ジストロフィー患者における治験を前提とした適切な評価項目の構築

分担研究者：**石垣　景子**（東京女子医科大学小児科）
研究協力者：佐藤孝俊 1)，村上てるみ 1)，石黒久美子 1)，七字美延 1)，大澤真木子 1)，永田　智 1)，
安達みちる 2)，圖師将也 2)，中村花穂 2)，後藤圭介 2)，和田　太 3)，猪飼哲夫 3)，近藤和泉 4)
所属　1). 東京女子医科大学　小児科
2). 同　リハビリテーション部
3). 同　リハビリテーション科
4). 独立行政法人国立長寿医療研究センター　健康長寿支援ロボットセンター　機能回復診療部

Ⅰ．福山型先天性筋ジストロフィーに対する改訂粗大運動能力尺度の検討

【緒言】福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）では，中等度以上の精神遅滞を合併するため，客観的・定量的な運動機能評価が困難であった．これに対し，我々は，粗大運動評価尺度（Gross motor function measure：GMFM-88）が，FCMD の鋭敏かつ妥当なスケールとなり得ることを示した（Sato T et al, Neuromuscul Disord. 2017）．しかし，評価項目一つ一つの妥当性や難易度については評価されていない．近年，試験問題や心理検査等において，Rasch 分析と言われる統計学的手法が用いられているが，この手法により，個々の設問の難易度を定量化し，設問一つ一つの妥当性を評価することができる．GMFM-88 は，元来，88 項目から構成されているが，脳性麻痺への評価に関して，その後の Rasch 分析により，各項目の難易度が評価され，より適合性の高い 66 項目が抽出された経緯がある．今回，我々は，FCMD についても，Rasch 分析を用いて，より適合性の高い 68 項目を抽出し，実際の評価を行ったので，報告する【方法】FCMD 患者 41 名（7 か月～24 歳 5 か月）に対し，延べ 100 回の GMFM 評価が終了しており，その結果に対し，Rasch 分析を行った．WINSTEP を用いて分析し，項目の難易度を示す値として，尺度化スコアを使用した．項目の適合性を評価する指標として，INFIT 値を使用し，2 以上で不適合と判断した．INFIT 値が 2 以上を示した項目は，12 項目あり，これらを除外し，残りの 76 項目をより適合性の高い評価項目として，抽出し，改訂 GMFM として 68 項目を選出した．4 名の理学療法士により，FCMD 患者 8 名に対し，改訂 GMFM と GMFM-88 による評価を行った．初めに，抽出された 68 項目の評価を行い，その後，残りの 20 項目について評価した．それぞれに要した評価時間を比較し，また，両者の相関性についても検討した．この研究は東京女子医科大学倫理委員会の承認を経て行った．

【結果・考察】評価に要した時間の平均値は，改訂 GMFM で 35 分間，GMFM-88 で 46 分間と，改訂版を用いることで 11 分間，短縮できた．両者の相関性についても良好な結果を得た．

【結論】改訂 GMFM により，より短時間で，FCMD の運動機能評価を行うことがで

きた. 本評価法により, 患児・家族への負担の軽減を図れるものと考える

本論文は，2020 年 2 月 Brain and Development に受理された.

【参考文献】

(1) 近藤和泉，福田道隆監修．GMFM 粗大運動能力尺度　脳性麻痺児のための評価尺度．医学書院

(2) Sato T,Ishigaki K.The gross motor function measure is valid for Fukuyama congenital muscular dystrophy.Neuromuscul Disord. 2017 Jan;27(1):45-49

Ⅱ．FCMD におけるアクチグラフ測定

【緒言】粗大運動評価尺度（Gross motor function measure : GMFM-88）が FCMD の鋭敏かつ妥当なスケールとなり得ることを示した. しかし, 病院内という環境下における運動機能評価は，児の医療者に対する緊張や来院に要した疲労の影響により，真の運動機能を反映していない可能性が考えられる. 実際, 患者家族より, 自宅や学校では，運動機能評価時よりも活発であることを，しばしば指摘される. 近年, 院外でも，持続的かつ定量的な活動量計測が可能な腕時計型活動量計（アクチグラフ）が開発され, 様々な医療分野へ応用され, Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）では，その妥当性が示されている. 今回, 我々は, FCMD に対し，アクチグラフによる活動量測定を行い, その妥当性を検討したので報告する.

【方法】FCMD 患者 6 名に対し，フィリップス社アクティウォッチスペクトラム PRO により，入浴時を除く 48 時間，連続で活動量を測定した．対象患者の運動機能は, いずれも坐位またはいざりばいであり, 上肢は肘レベル～頭頂部まで挙上可能であった. 活動量は, 1 分間ごとにアクティビティカウント（AC）と呼ばれる単位で記録され, その平均値を算出した. さらに, 測定の前後 4 か月以内に GMFM-88 による運動機能評価も行い，両者の相関性を統計学的に解析した.

【結果】AC の 48 時間分平均値と GMFM-88 スコアは, r2=0.7554 であった. さらに, GMFM-88 の項目の内，上肢関連の項目のみを抜粋したスコアとの相関を検討したところ, r2=0.6001 であった. いずれも線形回帰分析により検討した.

【考察】少数例での解析であるが, アクチグラフは FCMD の運動機能評価に妥当なことが示唆された. 装着部位が腕であるため, 上肢機能をより反映している可能性を考えていたが，むしろ相関性は低いという結果であった. 対象患者の運動機能を考えれば, 今回，主にアクチグラフが検知していたのは, 上肢または体幹運動であり, 上半身機能を全体的に反映していると考えた. さらに, DMD での先行研究において, 下肢筋力との相関が弱かったことが報告されており，本結果と合致する可能性が示唆された．一方で，介護者による他動的な動きを検知している可能性は残り，今後の検討課題と考えた.

【結論】アクチグラフは，FCMD の運動機能評価として妥当であり，従来の来院評価のみでは不十分であった部分を補完できる可能性がある.

【参考文献】

(1) Nishizawa H et al. Usefulness of continuous actigraph monitoring in the assessment of the effect of corticosteroid treatment for Duchenne muscular dystrophy: a case report, J Phys Ther Sci. 2016 ;28(11):3249-3251.

(2) Kimura S et al. Estimation of muscle strength from actigraph data in Duchenne muscular dystrophy, Pediatr Int. 2014;56(5):748-52.

Ⅲ. FCMD 患者に対するステロイド療法の有効性

【緒言】DMD において, ステロイド療法の運動機能に対する短期的な有効性は, 高いエビデンスをもって報告されている. 一方, FCMD におけるステロイドの有効性に関しては, 数例の症例報告と, ウィルス感染後の急激な筋力低下に対する効果が報告されているが, 十分な検討はなされていない. FCMD の運動機能に対するステロイド療法の有効性について検討した.

【方法】東京女子医科大学病院通院中の遺伝学的に確定診断されている FCMD 患者のうち, 粗大運動能力尺度（GMFM）の総合点が低下し臨床的に運動機能の低下を認めた 10 歳以下の患者で, 且つステロイド療法に対する希望があり, 同意が得られた患者を対象とした. プレドニン®内服 0.5mg/kg/日隔日から開始し. 効果が不十分な場合, 1mg/kg/日隔日投与まで増量を行った. 治療開始前後において GMFM にて運動機能を評価し, GMFM 総合点をウィルコクスンの符号付順位検定（有意水準 0.05 以下）を行い検討した(東京女子医科大学倫理委員会承認番号 160104).

【結果】対象患者は 7 名で FKTN 遺伝子 3kb 挿入変異の homo 接合体を 6 名, hetero 接合体を 1 名に認めた. ステロイド療法開始年齢は 7.8±1.63 歳（5.66～10.83）だった. ステロイド療法開始前後の GMFM 総合点の差の平均は 1.34±1.19(0.1～2.6), p 値 0.018 でステロイド療法開始後の GMFM 総合点の改善を有意に認めた.

【結論】退行が始まった少数の FCMD 患者に対しステロイド療法を行った結果, GMFM 総合点は改善し. ステロイドの有効性が証明された. ステロイド療法は、FCMD の運動機能維持に有効であることが示唆された.

【参考文献】

1) Murakami T et al. Severe muscle damage following viral infection in patients with Fukuyama congenital muscular dystrophy. Brain Dev. 2012;34(4):293-7.

2) 豊野美幸ら. 歩行可能な福山型先天性筋ジストロフィーに対する経口ステロイド治療の効果. 脳と発達 2015; 47(suppl): S245-S245

デュシェンヌ型筋ジストロフィーにおける肺リクルートメント（Lung volume recruitment＝LVR）と最大強制吸気量（maximum insufflation capacity=MIC）の長期経過

独立行政法人国立病院機構八雲病院
三浦利彦　石川悠加

【緒言】

近年、肺活量が 1500ml 以下（または%VC＜50%など）に低下したデュシェンヌ型筋ジストロフィー（Duchenne muscular dystrophy=DMD）患者に対して、肺リクルートメント（Lung Volume Recruitment＝LVR）を行い、呼吸機能を維持する効果が示されている[1)-3)]。LVR は、微小無気肺を予防し肺の健常性を維持するための他動的な深吸気である。肺の健常性は、胸郭可動性と咽頭喉頭機能との総合的指標である最大強制吸気量（Maximum insufflation capacity＝MIC）により評価することができる。この MIC を維持することにより、呼吸機能としての肺活量（vital capacity=VC）や咳のピークフロー（cough peak flow=CPF）を保つことができる[1)-3)]。

【研究背景】

そのため LVR は自力の肺活量が 1500ml（欧米のガイドラインでは 2000ml）、%VC で 40%を下回った時期から、1 日数回（理想的には 3 回）行うことが推奨されています。LVR の吸気介助方法としては、先ほどの救急蘇生バッグの他に、従量式での NPPV の 1 回換気量を数回溜めるエアスタッグを行う方法や、MI-E の陽圧による深吸気、カエル呼吸とも呼ばれている舌咽呼吸（GPB）が、肺活量以上の吸気量を得る方法としてあります。

LVR による効果として期待される肺の健常性は、胸郭可動性と咽頭喉頭機能との総合的指標である最大強制吸気量（MIC）により評価することができます。

【目的】

DMD における LVR の実施状況と最大強制吸気量（Maximum insufflation capacity＝MIC）の長期経過を分析し、効果や課題を検討する。

【対象】

2001 年～2019 年に当院（入院および外来）でフォローし、一度はスパイロ以外も含めた呼吸機能評価ができた DMD 患者（ジストロフィン遺伝子異常か筋生検による筋組織のジストロフィン染色により確定診断され、臨床的に 12 歳以前に独歩不可）で、LVR を実施した症例。

除外基準は・気管切開や認知障害により継続的な LVR が困難な患者、肺活量≧1500ml で LVR の適応外と判断された患者、重症心不全や腹部膨満や呑気などにより日常的な LVR の適応が困難な患者とした。

【方法】

LVR は救急蘇生バッグとフェイスマスクまたはマウスピースを用いて他動的な吸気介助を行うか、非侵襲的陽圧換気療法（noninvasive positive pressure ventilation=NPPV）を従量式条件で行いエアスタックするか、機械による咳介助（mechanical in-exsufflation=MI-E）の吸気か、舌咽呼吸により、低下した肺活量以上の深吸気を得るように指導し、実施する

[1)-3)]。

LVR の実施状況とその手段について診療記録と患者本による聞き取り調査を行った。また、対象患者において VC、MIC、徒手介助による CPF の長期経過を調査した。

【結果】

2001 年から 2019 年の間の何らかの呼吸機能検査結果が確認できた DMD は 103 名。除外基準である気管切開患者は 3 名で、全て当院が NPPV を導入した 1991 年以前に気管切開を施行されていた患者であった。その他、認知機能障害により継続評価実施が困難だった患者が 17 名、VC1500ml 以上で LVR の適応にならなかった患者が 10 名、腹部膨満・呑気と重症心不全、気胸により日常的な LVR の実施継続が困難な患者がそれぞれ 7 名、2 名、2 名いた。在宅患者で 1 名、LVR 継続ができていなかった患者 1 名が除外された。

これにより、DMD61 名が対象となった。最終評価または死亡時の平均年齢 30.8±7.4 歳（16～50 歳）。死亡例 7 例（28 歳が 3 名。31 歳、32 歳、33 歳、36 歳が各 1 名）。経過観察期間は平均 11.1 年（最短 4～最長 18 年）。NPPV 使用状況は、終日 52 名、夜間のみ 4 名、夜間＋α が 2 名、未使用が 3 名。経過観察期間中に気管切開に移行した患者はゼロであった。栄養摂取は、経口が 59 名（96.7%）で、そのうち形態が通常 34 名、きざみ 20 名、ミキサー3 名、とろみ 1 名、経鼻胃管が 2 名であった、電動車いす乗車率は 95.1%であった。

LVR 実施に関連した明らかな合併症は認めなかった。LVR 実施時以外に気胸を 2 名に認めた。そのうち 1 名は 20 歳時に発生しており、BMI=13.47、MIC=1150ml であった。もう 1 名は、37 歳時に発生し、BMI=14.06、 MIC=2740ml であった。

MIC を得るための LVR の手段としては、4 つの吸気介助方法をそれぞれの状況において単独、もしくは組み合わせて行っていました。MI-E は 34%で、病棟や在宅において最も多い手段で、気道クリアランス目的に導入し、日常的に LVR として使用することで継続的に使用されていた。救急蘇生バッグは、他の手技が使用できない場合に、主に理学療法士によりリハ室で理学療法プログラムとして行っており、MI-E 未導入や、日常的な使用に至っていない低年齢の患者に行われていた。

VC の長期経過は、個人差はあるが明確なピーク期があり、その後は一律に低下した。

MIC の経過も、同じく個人差があるものの、明確なピーク期はなく、長期間にわたって維持さていた。ただし、LVR の開始年齢が 20 歳程度と遅い患者で、MIC が低い値で推移する傾向があった。

MIC が維持されると、加齢とともに VC との差が増大する。平均 VC のピーク年齢である 12 歳を基準に、20 歳、30 歳、40 歳時の VC、MIC それぞれの平均値を比較すると、VC ではそれぞれに有意に低下するのに対し、MIC は有意差がなく維持された。また、20 歳以降はそれぞれの年代で、VC-MIC 間に有意差を生じていた。

徒手による咳介助の CPF も MIC 同様に維持される傾向はあったが、40 歳以上の患者では、分泌物喀出に有効な CPF を得られないことが増える傾向があった。

MIC と徒手による咳介助の CPF は高い相関を認めた。相関係数は 0.65 であった。

【考察】

LVR の手段として、MI-E が最も多く使用されていた。このため、MI-E の条件設定の際に、気道クリアランスとしてだけでなく MIC に十分な吸気圧の設定が必要と考える。救急蘇生バッグは理学療法士により実施することは可能だが、病棟や在宅などでは継続が困難なことがあった。NPPV を用いる場合は、モード変更（従量式→従圧式）や機種変更（従量式でもエアスタック不可能な機種）により LVR が不可能になることがあり、定期的な確認が必要である。舌咽呼吸は習得率が低く（21%）、NPPV 使用時間の延長や加齢により、救急蘇生バッグによる MIC より少なくなる傾向があった。

VC は経年的に減少するが、それに比して MIC は不可逆的には減少せず、長期に維持している患者が多かった。これには、経口摂取率（96.7%）や電動車いす乗車率（95.1%）との関連も推測された。

MIC＜1500ml で推移する患者は、当院における最初の呼吸機能評価時にすでに MIC が著明に低下し、LVR の開始年齢が不適切に遅い（20 歳前後）傾向があった。

今回は関連を検討していないが、体重や栄養状態、嚥下機能や胸郭変形、実施環境との関連も重要と考えられた。

また、LVR は通常 1 日 2～3 回実施することが推奨されているが、1 回と 3 回での差があるのかなど明らかにはなっていないため、今後検討することが必要かもしれない。

さらに、GPB や NPPV によるエアスタッグで自主的に可能な時期もあるが、緊急時の気道クリアランス目的の他に、LVR として日常的に MI-E を導入することが LVR の継続に有益であり、肺の健常性維持に寄与すると考えられた。

【結語】

DMD 患者における LVR の実施状況と、VC、MIC の長期経過を調査した。継続的な LVR 実施には、MI-E が最も使用されていた。VC は経時的に減少するが、MIC は VC に比べて維持されている患者が多かった。重症心不全、腹部膨満や呑気により LVR が継続困難な患者も存在した。

今後も LVR の適応、方法、効果、合併症について長期に検討する必要がある。

【参考文献】

1) Katz SL, Barroaman N, Monsour A, et al. Long-Term Effects of Lung Volume Recruitment on Maximal Inspiratory Capacity and Vital Capacity in Duchenne Muscular Dystrophy. Ann Am Thorac Soc 2016;13:217-22

2) McKim DA, Katz SL, Barroaman N, et al. Lung volume recruitment slows pulmonary function decline in Duchenne muscular dystrophy. Arch Phys Med Rehabil. 2012 ;93:1117-22.

3) Chiou M, Bach JR, Jethani L, ey al. Active lung volume recruitment to preserve vital capacity in Duchenne muscular dystrophy.J Rehabil Med 2017; 49:49-53

神経・筋難病の臨床研究実施における課題と対策

尾方 克久
国立病院機構東埼玉病院

緒言

神経・筋難病，とくに筋ジストロフィーを含む神経・筋変性疾患は，その病態機序を修飾する治療の開発に至らず，また機能低下の進行を抑制する治療の有効性を検出できる評価指標の確立が困難で，希少疾病であることと相俟って，治験や臨床研究の推進が容易でない領域であった [1]。近年，疾患修飾療法の開発が進み，神経・筋難病の治験や臨床研究の推進が図られるようになった。筋ジストロフィー領域では，GCP準拠の治験や臨床研究を推進する目的で，筋ジストロフィー臨床試験ネットワーク（MDCTN）が 2012 年に設立され，活動している [2,3]。神経・筋難病の臨床研究実施における課題を，遺伝性筋疾患を題材として抽出し，その対策を試みた。

方法

① 多施設臨床研究の運営について

MDCTN 共同臨床研究課題「遅発型ポンペ病患者ハイリスクスクリーニング調査研究（PHiRS-J，UMIN 試験登録 ID：UMIN000017661）」のデータマネジメントとモニタリングの状況を分析した。

② MDCTN 施設調査

加盟施設の臨床試験実施体制整備状況を把握し，開発企業等に資するため，MDCTN では毎秋に施設調査を実施している。この回答が，実質的に唯一の加盟条件となっている。回答の内容と状況を集計した。

結果

① MDCTN 共同臨床研究のデータマネジメントとモニタリング

PhiRS-J 研究は，筋力低下ないし高クレアチンキナーゼ血症を呈し診断未確定である 1 歳以上の筋疾患患者に潜在する，遅発型ポンペ病患者の頻度を明らかにすることを目的として実施している。2015 年 6 月～2017 年 11 月に，MDCTN に加盟する 16 施設から 175 例が登録され，うち 2 例は組入脱落となり，173 例で一次検査（乾燥濾紙血による酵素活性スクリーニング）が行われた。酵素活性が低下していた 11 例で二次検査（リンパ球酵素活性測定，遺伝子解析）が行われ，「リンパ球 GAA 活性低下および 1 つの *GAA* 遺伝子ホモ接合性変異が同定」された確診群が 1 例，擬診群のうち 2 例は「リンパ球 GAA 活性低下および 2 つの *GAA* 遺伝子ヘテロ接合性変異が同定」，5 例は pseudodeficiency，3 例はリンパ球 GAA 活性正常であった。

モニタリングは，紙媒体の症例報告書を対象とする中央モニタリングとして実施し，クエリに対する修正は紙媒体に手書きで行った。原資料との照合は行わなかった。上記期間に，222 件のクエリが発生し，その内容として「記載漏れ」「誤記」「割印漏れ」「誤記修正対応不足」の順に多かった。クエリクローズまでの期間の中央値は 21.0 日（最短 1 日～最長 156 日）であった。

誤記修正にあたって，「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 ガイダンス」に基づき，修正履歴（署名，日付）と理由の記載を求めるクエリが多かったため，2015 年 11 月に誤記修正の方法について文書で

周知したところ，2015 年 8 月～2016 年 2 月の 7 か月間で 112 件あったクエリが，2016 年 3～9 月の 7 か月間で 69 件に減少し，その後 2016 年 10 月から 2018 年 5 月クエリ対応完了までの 20 か月間は 41 件とさらに減少した。

② MDCTN 施設調査

2012 年の設立以来，8 回の施設調査を行った。2016 年以降は，施設群を構成し「診療症例数調査」をとりまとめて回答する制度を導入したため，「治験・臨床研究実施体制調査」と分け 2 部構成とした。

加盟 41 施設（うち 5 施設が 1 施設群を構成，2 施設が退会）のうち，すべての調査に回答したのは 22 施設（54%）であった。

2019 年度の「治験・臨床研究実施体制調査」に回答した 29 施設のすべてで，「努力性肺活量」「経時的パルスオキシメトリ」「12 誘導心電図」「経胸壁断層心エコー」は実施可能で，機能測定として「10m 歩行／走行」「床からの起き上がり時間」は実施可能であった。倫理審査委員会は 28 施設に，治験審査委員会および利益相反審査委員会は 27 施設に設置され，15 施設が筋ジストロフィーを対象とする介入試験を経験していた。26 施設が「入院での治験実施可能」と回答し，治験実施体制の整備が進んでいた。全 29 施設が小児－成人医療の連携があると回答したが，「共同で診療する体制がある」のは 8 施設に留まり，21 施設は「医師同士で個人的に対応」していた。

2019 年度の「診療症例数調査」に回答した 26 施設と 1 施設群における症例数の単純合計は 6,868 人で，病型は多い順にデュシェンヌ型（24.4%），筋強直性ジストロフィー1 型（22.7%），ベッカー型（10.4%），顔面肩甲上腕型（8.2%），脊髄性筋萎縮症（5.6%），先天性ミオパチー（5.6%），分子診断で病型確定した肢帯型筋ジストロフィー（5.5%），病名未確定の肢帯型筋ジストロフィー（5.2%）であった。

考察

モニタリングの経過から，自主臨床研究における GCP や倫理指針に準拠したデータの質向上には，実際の共同研究実施を通じ習熟を図ることが効果的であると考えた。

MDCTN 施設調査から，加盟施設の治験・臨床研究実施体制整備が進んでいることが裏付けられた。加盟施設で普及し広く実施可能な機能測定を有効性評価指標として標準化できるような検証研究が望まれる。施設調査への回答率が著しく低い加盟施設が複数見受けられ，対応が必要である。施設調査の結果に関する広報が不足しており，今後の課題である。

診療水準向上と治療開発推進の基盤となる疫学情報である患者レジストリと，研究や試験の実施主体となる臨床試験ネットワークとが，有機的に連関することが，診療と開発の更なる発展に効果的と考える。

加盟施設で診療する筋ジストロフィー関連疾患患者の約 5%が「病型未確定の肢帯型筋ジストロフィー」とされており，この中に新たな病型や異なる疾病（先天性筋無力症候群，免疫介在性壊死性ミオパチー等）が含まれている可能性がある [4]。これらの症例の診断に関する大規模調査研究を実施する価値があると思われる。

結論

多施設共同研究における中央モニタリン

グにより，当該研究のデータの質だけでなく，参加医療機関の臨床研究の質の向上にもつながった。

MDCTN 加盟施設の治験・臨床研究実施体制は向上しており，その継続と広報が今後の課題である。

参考文献

1) 祖父江 元．神経変性疾患の病態抑止治療は可能か．内科 2007;100:1060.
2) Ogata K. Muscular Dystrophy Clinical Trial Network in Japan. *In*: Translational research in muscular dystrophy. Springer, 2016, pp.179-188.
3) Shimizu R, Ogata K, Tamaura A, et al. Clinical trial network for the promotion of clinical research for rare diseases in Japan: Muscular dystrophy clinical trial network. BMC Health Serv Res 2016;16:241.
4) 尾方 克久：肢帯型筋ジストロフィー．筋ジストロフィーの標準的医療普及のための調査研究班（編）：ジストロフィーの病型診断を進めるための手引き（肢帯型・先天性・筋強直性ジストロフィーを念頭に），2019, pp17-27

骨格筋画像定量法に関する研究

久留聡

国立病院機構鈴鹿病院脳神経内科

緒言

CT、MRI などの骨格筋画像は筋ジストロフィーの鑑別診断や経過観察において有用な検査であり臨床において広く使われてきた。近年、臨床研究や治験における治療の効果判定指標としての応用も期待されている。われわれは、骨格筋 CT を用いた骨格筋の定量法を開発したが [1)]、この方法は Duchenne 型筋ジストロフィーの治験に採用され有用性が確認されつつある [2)]。

一方､肢帯型筋ジストロフィー(LGMD)は、分子遺伝学の発展に伴い多くの病型に分類されることが判明しており、病型診断は大きな課題となりつつある。さらに、一部の病型においては治療法の開発が進んでいる。そのため、早期に正確な診断を行うこと及び詳細に経過観察を実施していくことはこれまで以上に重要であると考えられる。われわれは、LGMD の中でも頻度の高い２A、２B に着目し、骨格筋定量法を用いた骨格筋障害の検討及び両者の比較を行った。

方法

IBIC－NMD は国立精神・神経研究センターの脳病態統合イメージセンター（IBIC）によって開発されたオンラインサポートシステム IBISS 用いた骨格筋画像データベースである。本研究は IBIC－NMD に登録された LGMD2A15 例, 2 B27 例を対象とした。

1. LGMD2A は男性 8 名、女性 7 名、撮影時年齢平均 41.2±21.6 歳（12～75 歳）、発症年齢は 2～39 歳､罹病期間は 24.2±17.7 年（1～57）であり全例 *CAPN-3* 遺伝子変異確定例である。LGMD 2B は､男性 14 名、女性 13 名、撮影時年齢平均 50.5±17.4 歳（15～75 歳）、発症年齢は 15～54 歳、罹病期間は 18.5±14.3 年（3～51）であり、遺伝子変異確定例が 17 例､筋生検による診断例が 10 例である。

2. CT を用いた骨格筋定量的解析を行った。骨格筋 CT の大腿、下腿の２スライスにおいて CT 値ヒストグラムを作成し既報告通りの方法 [1)] を用いた定量的解析を行い%MVI を算出した。%MVI と運動機能障害度（Vignos）、罹病期間の関係につき検討した。また、同一症例における経年変化を見るため、4 年以上フォローされている３例（２A１例、２B２例）で解析を行った。

3. 上肢帯、上肢、体幹、腰帯、大腿、下腿各スライスにおける同定可能な筋に関して、Mercuri スケール [3)]を用いて 0～４の６段階の半定量的評価を行った。

結果

（１）%MVI による定量評価

１）%MVI と運動機能障害度（Vignos）の関係

両病型ともに大腿、下腿ともに%MVI と運動機能障害度との間に有意な負の相関がみられた。

２A：大腿 r＝－0.60, p＜0.05、
　　下腿 r＝－0.71, p＜0.01

２B：大腿 r ＝-0.72, p＜0.0001、
　　下腿 r＝－0.93, p＜0.0001

２）%MVI と罹病期間の関係

大腿、下腿ともに%MVI は指数減衰に近似して減少した。そこで、近似式から半減期 $T_{1/2}$ を計算した。大腿の $T_{1/2}$ は２A が 24.7 年で２B が 12.9 年、下腿では２A が 43.3 年、２B が 16.1 年であり明らかに２A の方が進行が緩徐であることが示された。

３）同一症例における経年変化

①２A：39 歳発症で 40～48 歳まで 9 年間の経過観察した女性例 では、大腿、下腿とも罹病期間（x）と%MVI（y）の間に優位な負の相関が見られた（大腿 r=-0.95, 下腿 =-0.99）。線形近似式は大腿で y = -0.014x + 0.73、下腿で y = -0.020x + 0.87 であり大腿では年に 1.4 ポイント、下腿では 2.0 ポイントずつ減少することが示された。

②２B：

症例１：23 歳で発症し 26 歳～34 歳まで 7 年間経過を追跡した症例では、大腿、下腿とも罹病期間（x）と%MVI（y）の間に優位な負の相関が見られた（大腿 r=-0.93, 下腿 =-0.99）。線形近似式は大腿で y = -0.0305x + 0.7446、下腿で y = -0.0323x + 0.8377 であり年に約３ポイントずつ減少することが示された。

症例２：21 歳で発症し 26 歳～30 歳まで６年間経過を追跡した症例では大腿で罹病期間（x）と%MVI（y）の間に優位な負の相関が見られた（大腿 r=-0.96）。線形近似式は大腿で y = -0.0373x + 0.9303 であり年に約 3.7 ポイントずつ減少することが示された。下腿%MVI は最初増加し、その後 27 歳以降は徐々に減少傾向となった。

４）遺伝子変異による違い

①２A：G1（*CAPN3* のどちらか一方がミスセンス変異）８例、と G２（*CAPN3* の null 変異のホモ）６例に分類した。発症年齢は G1 が 22.8±10.0 歳（10～39）、 G2 が 11.3±3.8 歳（7～15）であり G1 が高齢発症であった。%MVI の推移については両者に明らかな差は見られなかった。

②２B：G1（*Dysferlin* のどちらか一方がミスセンス変異）６例、と G２（*Dysferlin* の null 変異のホモ）13 例に分類した。発症年齢は G1 が 31.3±10.6 歳（16～50）、G2 が 25.3±7.2 歳（15～35）であり G1 が高齢発症であった。%MVI の推移については両者に明らかな差は見られなかった。

（２）Merculi スコアによる半定量評価

上肢帯：肩甲下筋が早期から障害される。進行は 2B の方が速い

上肢：両病型ともに上腕二頭筋の方が三頭筋よりも強く障害されるが、２A の方がその差が明らかである。

上部体幹：広背筋は比較的早期から障害されやすい。

下部体幹：脊柱起立筋群が早期から障害される。大腰筋は保たれやすい。

腰帯：小臀筋は全身の筋群の中でも最も早くから障害されやすい。

大腿：２A は前面筋群に比して後面筋が障害されやすい。２B も同様の傾向があるが、大腿四頭筋のうち直筋は他に比べ保たれる傾向にある。両病型ともに縫工筋、薄筋は末期まで保たれる。

下腿：両病型ともに腓腹筋内側頭がより早

期から障害され、ついでヒラメ筋障害される。後脛骨筋は２A では比較的保たれるが、２B では障害が強い。

考察

残存筋量の指標である%MVI を用いて LGMD２A、２B の定量的な評価を行った。罹病期間と%MVI との関係を見ると、指数減衰に近似して減少した。得られた近似式から半減期を計算すると大腿では２A が 24.7 年、２B が 12.9 年、下腿では２A43.3 年、２B が 16.1 年であり明らかに２A の方が進行が緩徐であること、両病型ともに大腿の方が下腿より急速に進行することが示された。これは臨床での印象と一致し、既報告[3)－5)]とも矛盾しないが、より客観的に裏付けされたことになる。症例で複数年にわたって検査がなされている症例については縦断的な検討を行い、%MVI で測られる残存筋量が緩徐に減少することが示された。微細な筋量変化は肉眼的には検出しづらいため、短期間の経過観察にも%MVI は有用であると考えられた。一例のみ下腿で一過性の増加したのち減少に転じたが、これが実際の病状を反映したものか見かけ上のものであるのかについては今後の検討が必要である。

LGMD の臨床経過には variability があり、性別や遺伝子変異タイプが重症度に関係していると報告されている。遺伝子変異型では２A、２B ともに null mutation のホモ接合の方が発症が早く、既報告と矛盾しない結果であった。その後の経過や進行の速さについて症例数が十分でなく明らかな差異を見出すことはできなかった。

国外からの筋画像研究は圧倒的に MRI が主流である。一方、本邦の研究や臨床においては CT と MRI が併用され、日常診療ではどちらかというと CT 優位である。MRI は放射線被曝がなく、様々なシークエンスで質的評価が可能な点で研究面では有利だが、CT は複数のレベルを簡易に短時間で撮影できる利点もがあり臨床で繁用されている。全身の各部位での筋障害の分布、程度、進行について詳細に検討することは鑑別診断や病状把握において重要である。今回は Merculi のスケールを CT 画像に応用して６つのレベルにおける筋障害の評価を施行し２A と２B の比較を行った。両病型ともに早期から障害されやすいのは、肩甲下筋、広背筋、腰部傍脊柱筋、臀筋、大腿屈筋群、腓腹筋内側頭である。どのレベルにおいても２B が２A より進行が速い傾向にあった。２B では大腿四頭筋のうち直筋が選択的に保たれやすいが、２A ではその選択性に乏しい。下腿では、後脛骨筋が２A では比較的保たれるが、２B では障害が強いことが示された。

結論

LGMD2A,2B 型に対して筋 CT 用いた定量的解析を実施した。２A は２B に比して疾患の進行が緩徐であることが示された。

文献

1. Kuru S, Sakai M, Tanaka N, et al. Natural course of muscular involvement assessed by a new computed tomography method in

Duchenne muscular dystrophy. Neurology and Clinical Neuroscience 2013; 1(2): p 63–68.

2. Komaki H, Maegaki Y, Matsumura T,et al..Early phase 2 trial of TAS-205 in patients with Duchenne muscular dystrophy. Ann Clin Transl Neurol. 2020 7(2):181-190.
3. Mercuri E, Bushby K, Ricci E, et al. Muscle MRI findings in patients with limb girdle muscular dystrophy with calpain 3 deficiency (LGMD2A) and early contractures. Neuromuscul Disord. 2005;15(2):164-71.
4. .Paradas C, Llauger J, Diaz-Manera J, et al. Redefining dysferlinopathy phenotypes based on clinical findings and muscle imaging studies. Neurology. 2010;75(4):316-23.
5. Takahashi T, Aoki M, Suzuki N, et al. Clinical features and a mutation with late onset of limb girdle muscular dystrophy 2B. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2011:84:433-40.

筋疾患登録システム，臨床試験ネットーワークの臨床医による活用

小林道雄
国立病院機構あきた病院

緒言

本研究班の分担研究として、Remudy、MDCTN を有効に活用して、日常臨床で遭遇する CQ を解決すべく研究をすすめることを目標とし、日頃問題を感じていた DMD 患者の気胸, DMD 患者の就労の調査を行った。また、地域の医療機関と連携した登録促進の活動や地域での調査も並行し、秋田県の筋疾患の疫学調査も行った。その結果をあわせて報告する。

方法

1. DMD 患者の気胸の調査

1) 自施設の調査 ; 国立病院機構あきた病院の過去 10 年分の DMD 患者の気胸の発症頻度やリスクファクターについて診療録を後方視的に調査した。

2)MDCTN での調査

DMD 以外のタイプの筋ジストロフィーなども含めて神経筋疾患における気胸の合併頻度を全国の MDCTN 参加施設にアンケート調査した。

2. 国立病院機構全国児童指導員協議会に加盟し筋ジストロフィー病棟を持つ 27 施設の, 療育指導室あるいは他の就労支援を担当している部署に, 過去 1 年間の就労支援の実施内容や DMD 患者の就労状況などを問うアンケート調査を行った。

3. 秋田県内の小児科, 神経内科/脳神経内科を標榜する病院, 神経内科専門医または小児神経専門医のいる診療所に郵送アンケート調査を行った。

結果

1. 1) DMD における気胸の発症密度は 10.6% 人年で、気胸発生者は非発生者に比べて有意に体重が低く, Cobb 角が大きいことを明らかにした [1)]。

1. 2) 5122 人の筋疾患患者のうち、1 年間での気胸発症者は 79 人で, DMD が合併頻度が最も高く 3.6%人年, ついで先天性ミオパチーが 2.7%人年, FCMD が 2.0%人年と多かった。一方 DM1 は 0.1%人年と極めて少なかった [2)]

2. 18%の DMD 患者が何らかの就労支援をうけ, 13%の DMD 患者が働いて収入を得ていることが明らかになった。仕事や情報が少ないこと, 福祉制度の問題, 支援するスタッフの問題, 患者さんのスキルや意欲の問題, 外部との連携の重要性などについて多くのご助言をいただいた。

3. 有病率は 10 万人あたり筋強直性が 9.7, デュシェンヌ型が 2.7 で、2008 年(筋強直性 5.8, デュシェンヌ型 2.3) と比べて、筋強直性は大きく増加しており、デュシェンヌ型でも微増であった [3)]。

考察

MDCTN を活用し, 筋疾患患者に合併する気胸の頻度を大規模に調査することができ、特に DMD において重要な問題であることを示すことができた。

就労については、今後 Remudy を使ってさらに発展させることが期待される。

本邦の疫学調査は最近少なく、今回の秋田での疫学調査の結果は Remudy などの運営の参考になると思われる。

参考文献

1) 小林道雄, 畠山知之, 小原講二ら　デュシェンヌ型筋ジストロフィーに合併する気胸～過去 10 年間の後方視的検討～
臨床神経学 2018(58). S269

2) M. Kobayashi, K. Ogata, T. Ishihara et al. Annual prevalence of pneumothorax in neuromuscular disorders: results of questionnaire survey of institutions registered in muscular dystrophy clinical trial network in Japan. Neuromuscular Disorders 2019(29), S173

3) 小林道雄, 畠山知之, 小原講二ら　秋田県における筋疾患の患者数調査～10 年前と比較して～　臨床神経学 2019(59). S363

筋ジストロフィーに伴う側弯症に対する手術療法の発展のためのエビデンス構築

分担研究者氏名：**高相晶士**

1)　3 年間の研究目標

レントゲン学的データから推定される遠位腰椎固定術の適応と限界を提唱すること。

2)　3 年間通じての最終的な研究成果

当院で後方矯正固定術を施行し、2 年以上経過観察が可能であった神経筋原性側弯症を対象とした。術前および術直後、最終経過観察時の座位正面、側面レントゲンを用いて Cobb 角（Cobb）、骨盤傾斜（PO）などなどのパラメーターを計測した。術前には臥位における正面、側面レントゲンの計測も行った。過去の骨盤固定の適応の角度を参考に、PO が最終経過観察時に 20°以上ある症例を経過不良と定義した。経過不良と定義された群との 2 群比較には t 検定、χ 二乗検定を用いた。リスク因子に検討にはロジスティック回帰分析を用いた。また ROC 曲線を求めて回帰式の妥当性を評価し、カットオフ値を算出した。

45 例の解析が可能であった。18 例が経過不良と分類され、2 群比較の結果 Cobb、PO、仰臥位での Cobb（SuCobb)、腰椎前弯角（SuLL）など 7 因子において有意差を認めた。これらの因子を多変量解析で検討したところ、SuCobb と SuLL が独立したリスク因子として残り、SuCobb が大きくなり、SuLL が小さくなるほど骨盤傾斜残存リスクが高いことが示された。また、回帰分析の結果から予測式：Score=-2.54+0.085*仰臥位 Cobb 角 +(-0.101)*仰臥位腰椎前弯角)を得た。Score の ROC を描いたところ、AUC は 0.930; 95% CI, 0.858-1.000; P<0.001 であった。感度と特異度の和が最大となる値を参考にしたカットオフ値は-0.92（感度 78%、特異度 89%）であった。

骨盤傾斜残存のリスク因子は、仰臥位における Cobb 角と腰椎前弯角であった。仰臥位にいても Cobb 角が大きく、腰椎前弯角が小さい場合は術後に骨盤傾斜が残存するリスクが高くなる可能性が示唆された。

3)　今後の研究の進め方

収集したレントゲン学的な結果と臨床データの関連の研究を進める。

また、今回得た indication criteria に基づいて固定範囲を決定し、前向きにデータを集積していく。また、患者家族立脚型アンケートの作成に取り組み、レントゲン学的評価のみならず、臨床評価を加えていく。

4)　研究成果(原著論文、学会発表、図書等)

第 28 回日本脊椎インストゥルメンテーション学会（2019 年 11 月 15 日～16 日　つくば国際会議場）にて口演発表。原著論文に関しては現在作成中である。

5)　研究成果による産業財産権の出願・取得状況

なし

ジスフェルリン異常症の臨床開発に寄与する遺伝子診断法の開発

髙橋俊明
国立病院機構仙台西多賀病院

緒言

ジスフェルリン遺伝子の変異を原因とするジスフェルリン異常症は常染色体劣性遺伝形式で三好型遠位型筋ジストロフィーおよび肢帯型筋ジストロフィー2B 型を主な表現型とする。日本人のジスフェルリン遺伝子解析を行ってきて大部分の症例で問題なく診断できるものの、一部では見出されたバリアントが本当に病的でよいものか迷うこともある。そのため今まで見出したバリアントの再検討を行った。

方法

インフォームドコンセントを得たゲノム DNA からのジスフェルリン遺伝子のエクソンを近傍のイントロンを含め PCR し、Sanger 法にて直接塩基配列決定した。339 家系で見出したバリアントの効果をコード上から予想した。ストップコドンが出現する変化は病的変異とみなす。それ以外のものは既往歴、家族歴に筋疾患がなく自覚症状のない日本人正常 100 染色体でのそれらの頻度を調べた。Kergourlay V.らの Minigene Assay によるスプライス異常の報告 [1] を参照した。TogoVar（日本人ゲノム多様性統合データベース）でもそれらの頻度を参照した。

結果

全部で 119 種類のバリアントが見出された。そのうちストップコドンやスプライス異常の出現、大きな欠失、正常では見られないミスセンスの 83 種は病的バリアントとみなしてきて 203 家系がジスフェルリン異常症と考えられる。ストップコドンが出現しないバリアントは 1 種のエクソン単位の欠失と 79 種の SNVs だった。ミスセンスの 30 種、同義置換の 8 種、エクソン近傍±3 以遠のイントロン上の 8 種が正常染色体に見られなかった。このうち同義置換の 1 種はエクソン 3'末に存在し±3 以遠の 1 種とともにスプライス異常を確認した。正常染色体に存在するものはジスフェルリン異常症でも似通った頻度に見られることが多く、実験系 [1] ではスプライス異常が報告されているものを仮に変異と考えても新たなジスフェルリン異常症患者の出現には結びつかなかった。変異とみなされないものにはジスフェルリン異常症以外の疾患に見られるものもあった。正常染色体にも見られるものはミスセンスが 4 種、同義置換は 9 種、エクソン近傍±3 以遠のイントロン上の 7 種だった。データベースではストップコドンが出現しないバリアントのうち 34 種が登録されていて c.3725G>A 以外、頻度に大きな違いはなかった。

考察

病的変異かどうかの判断に正常染色体での頻度が役立つ可能性が大きい。そのため今後データベースや mRNA の解析も加えた病原性予測ツールの活用なども必要と考えた。しかし c.3725G>A (p.R1242H) は正常染色体とデータベースで頻度が異なる可能性もあり診断に影響を与えるため今後検討が必要である。

参考文献

1) Kergourlay V, Raï G, Blandin G et al. Identification of splicing defects caused by mutations in the dysferlin gene. Hum Mutat 35: 1532-41, 2014.

Remudy 筋強直性ジストロフィー患者登録の臨床研究への活用

分担研究者　**高橋正紀** 1)

研究協力者
杉本真里佳 1)、堀江里歩 1)、山内亨祐 1)、山本理沙 1)、久保田智哉 1)、木村　隆 2)、松村　剛 3)、小林道雄 4)、高田博仁 5)、久留　聡 6)、小牧宏文 7)

1）大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学
2）国立病院機構旭川医療センター
3）国立病院機構刀根山病院
4）国立病院機構あきた病院
5）国立病院機構青森病院
6）国立病院機構鈴鹿病院
7）国立精神・神経医療研究センター

緒言

希少疾患の臨床開発を円滑に進めるためにも疫学や自然歴を明らかにすることが重要であり、ジストロフィノパチーを皮切りに神経筋疾患の患者登録が国立精神・神経医療研究センターによるRemudyとして開始された。

筋強直性ジストロフィーの患者登録についても、国立精神・神経医療研究センターと大阪大学とが共同で、2014 年 10 月 2 日より運用開始し、TREAT－NMD の国際レジストリとも協調している。2020 年 3 月末現在で、281 の医療機関、474 名の医師の協力により、984 例の患者登録があり、世界的にも有数の規模となっている 1)。

筋強直性ジストロフィーの登録は、合併症が多岐にわたることから、他疾患に比べ多くの臨床検査項目、治療状況について幅広く情報を収集しているのが特徴である。そのため登録データのみでもある程度の解析が可能であるが、目的・内容によっては追加の調査が必要となる。患者へ直接アクセスが可能であるというRemudyの特徴は、追加二次調査を容易にしている。

方法

１）患者登録データの解析

①genotype-phenotype 関連性についての検討、②耐糖能障害、脂質異常症、脂肪肝・γGTP 高値など肝機能異常の横断的解析、③患者 QOL に大きな影響を与えることが知られている 3)、疲労感に関連する因子の検討を、患者登録データを用いて検討した。CTG リピートと表現促進現象、臨床症状などについての検討をおこなった。

２）追加調査・二次調査への活用

Remudy の登録では脂質異常についての情報を収集していないことから、上の②の解析のために、二次調査を患者本人と主治医に対し郵送で行った。(AMED エビデンス創出を目指した筋強直性ジストロフィー臨床研究班と共同)

また、本症のガイドラインを日本神経学会において作成することから、ガイドライン作成のための情報収集ならびにガイドライン評価のための作成前調査として、登録患者に対しケアなどに関する多方面の調査を郵送・web 入力併用で行った 4)。また、専門医に対するアンケートもほぼ同時期に行った 5)。(厚生労働科研　筋ジストロフィ

ーの標準的治療普及のための調査研究班と共同)。

結果

①genotype-phenotype 関連性について、CTG リピート数と発症年齢の関係では、congenital DM (cDM)を除いた全症例では発症年齢とリピート数にごく弱い負の相関が認められた。さらに、小児期発症の DM を congenital（生後 1 か月まで)、infantile（1 か月～10 歳)、juvenile（11～20 歳）の 3 群に分けると、リピート数に有意な差が認められた。登録データの中で定量データである握力、QRS 幅、%FVC について CTG リピート数との相関を検討したところ、%FVC にかなり強い相関を認めた。

②患者のうち耐糖能障害は 21%、γGTP 高値は 43%、CK 高値を除いた症例での AST 高値は 43%、脂質についてもデータ提供されていた一部の症例では TG 高値は 43%、T-chol 高値は 31%、LDL-chol 高値は 29%であった。AST と ALT は中性脂肪と相関を認めた。

また二次調査の解析では、γGTP は中性脂肪、総コレステロール、LDL コレステロールとの間で有意な相関が認められた。中でも ALT と中性脂肪、γGTP と中性脂肪の相関係数が高く、肝機能と脂質代謝に関連があることが示唆された。

③本症患者の QOL に影響する症状として知られる疲労感に関する解析を探索的に行った。結果、眠気と筋強直が歩行能力にかかわらず疲労感に関連する因子として検出され、歩行可能群ではさらに、手指障害、嚥下障害、目の障害も関連していた。

２）追加調査・二次調査への活用

これらについては他の研究班のプロジェクトに協力したものであり、そちらの報告に譲る。

考察

CTG リピート数は、発症年齢や早さや重症度と相関するとされるが、今回の解析でも同様であった。ただし、各種臨床症状については、リピートの長さに、罹病期間（患者年齢）の要因が加わるため、解析にさらなる工夫が求められる。

本症では耐糖能障害が生じやすいうえに、筋力低下、嚥下障害による食事形態の制限も起こしうることから生活習慣の改善に限界がある場合がある。そのため薬物治療が重要な選択肢となるが、実際は無治療群が多かった。この背景には、スタチン系など治療薬の副作用を危惧し、無治療のまま経過観察を行っている状態が考えられる。今後本症患者の動脈硬化性疾患や脂質異常由来の肝機能障害の発症率などについて検討し、どのような患者に治療が必要か明らかにすることは重要な課題であると言える。

疲労感に関する検討では、歩行可能・不能間で差異があったことは興味深い。また、眠気との相関がともに高かったことも特筆すべきであろう。因果関係は不明ではあるものの、眠気に対する介入が患者 QOL を向上させる可能性も考えられる。患者登録での疲労感は、3 段階の評価であり、定量性の限界がある。今後二次調査や前向き研究などでの詳細な検討が望まれる。

なお、結果には記載していないが、実務面では、Remudy 筋強直性ジストロフィーレジストリーの運営効率化も進めている。Remudy が対象とするほぼすべての疾患は

国立精神・神経医療研究センターが事務局となって運営しているが、筋強直性ジストロフィーのみ事務局機能の一部を大阪大学が担っている。Remudy 通信の発送作業をはじめ、今後の Web 登録の ID 管理など、一元的に運営したほうが効率的な業務も多いことから、患者対応など疾患専門家が必要な業務を除いた事務局機能を国立精神・神経医療研究センターに 2021 年度前半に移管する予定である。

結論

筋強直性ジストロフィーの患者登録については、順調な症例蓄積が得られ、臨床病態など様々な研究に有用であることが示された。次年度には医師主導治験の患者リクルートにも活用する予定である。

参考文献

1. Wood L, Bassez G, Bleyenheuft C, et al. Eight years after an international workshop on myotonic dystrophy patient registries: case study of a global collaboration for a rare disease. Orphanet J Rare Dis. 2018 Sep 5;13(1):155.

2. van Engelen BG, Eymard B, Wilcox D. 123rd ENMC International Workshop: management and therapy in myotonic dystrophy, 6-8 February 2004, Naarden, The Netherlands. Neuromuscul Disord. 2005 15(5):389-94.

3. Fujino H, Shingaki H, Suwazono S, Ueda Y, Wada C, Nakayama T, Takahashi MP, Imura O, Matsumura T. Cognitive impairment and quality of life in patients with myotonic dystrophy type 1. Muscle Nerve. 2018 May;57(5):742-748.

4. 高橋正紀、山本理沙、久保田智哉、松浦徹、石垣景子、砂田芳秀、小牧宏文、高田博仁、久留　聡、松村　剛. 本邦における筋強直性ジストロフィーの患者実態調査－患者対象全国調査－. 臨床神経学 2020;60(2):130-136.

5. 松村　剛、高田博仁、石垣景子、小牧宏文、高橋正紀. 本邦における筋強直性ジストロフィーの診療実態調査－専門医対象全国調査－. 臨床神経学 2020;60(2):120-129.

筋ジストロフィー新規治療法の有効性・安全性評価指標の確立

分担研究者：**竹島泰弘**
兵庫医科大学小児科学

Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）に対する新規治療薬の開発が進められ、その一部はすでに保険適用となっている。これらの新規治療法は、より早期に開始することにより有効性を高め得るものと考えられる。そのため、このような治療法の開発を進め、さらに臨床に応用する上において、より早期に的確に診断することは重要である。しかし、早期診断に伴う技術的・倫理的な側面の検討が十分ではない。

本研究では、新規治療法の有効性・安全性評価指標を確立する上で課題となる、早期の的確な診断という観点から、遺伝子解析におけるピットフォール、無症候性高 CK 血症女児の解析、高 CK 血症を契機に受診した男児の解析を行った。

筋ジストロフィー遺伝子解析のピットフォール
—MLPA 法におけるレアバリアントの影響、同一アレルに複数変異が存在する可能性—

【はじめに】Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）に対し、エクソンスキッピング誘導治療や、ナンセンス変異リードスルー誘導治療などが開発され、多くの治験が開始されている。しかし、これらの治療の有効性評価法に関して、現状では十分とは言い難い。私たちは、適切な有効性評価法を見いだす戦略の一つとして、DMD の自然歴の解析を後方視的に行った[1]。また、個々の症例におけるエクソンスキッピング誘導治療に対する反応性の in vitro での解析を進めている[2]。

その一方、遺伝子変異に応じた治療法開発が進む中、これらの治療の適応を検討する上において、的確な遺伝子診断は不可欠である。遺伝子解析結果の解釈には症例ごとに詳細な検討が必要であるが、時に診断に苦慮することがある。今回、私たちは、筋ジストロフィーの遺伝子解析において診断に苦慮した症例を経験したので、ピットフォールとして報告する。

【症例】症例①：29 歳女性。DMD の家族歴なし。小児期に高 CK 血症および筋病理より DMD 保因者と診断されていた。MLPA 法にてエクソン 22 のみ増幅不良を認め、エクソン 22 のダイレクトシークエンス法では c.2842A>G(p.M948V)をヘテロ接合性に認めた。さらにイントロン 38 にスプライスサイト変異（c.5449-2A>A/C）を同定したため、スプライスサイト変異による DMD 保因者と診断し、c.2842A>G はレアバリアントと判断した。

症例②：2 歳男児。筋疾患の家族歴なし。筋力低下を認め、筋病理より Ullrich 型筋ジストロフィー(UCMD)と診断された。次世代シークエンサーによる gDNA 解析では、2 箇所のスプライスサイト変異（c.6283-1G>G/T、c.6310-2A>A/T）を認めたため、常染色体劣性遺伝性 UCMD が疑われた。両親はともに変異を認めなかった。gDNA を用いたサブクローニング解析により、同一アレルに 2 箇所の変異が存在することが判明し、新生突然変異による常染色体優性遺伝性 UCMD と診断した。

【考察・結語】症例①に見られたエクソン

22 内の一塩基置換（c.2842A>G）は、病的意義のないレアバリアントであるが、MLPA 法のプローブのハイブリダイゼーション部位に存在したためにエクソン 22 の増幅不良を生じたものと判断した。MLPA 法において、プローブのハイブリダイゼーション部位の微小変異による増幅不良が、エクソン欠失と誤って判断される可能性が、以前より指摘されている[3]。本症例では、病的意義のないレアバリアントにより増幅不良を呈し、真の病的変異を見逃すリスクがあった。

症例②では、２箇所の変異を認めたため常染色体劣性の複合ヘテロ接合変異と思われたが、実際は同一アレル上の近接した２箇所の新規変異であり、遺伝形式を誤るリスクがあった。

遺伝子変異に応じた治療法の適応を判断する上において、的確な遺伝子診断は不可欠である。判断に迷う場合、複数の方法で診断を確認することが重要である。

家族歴のない高 CK 血症女児の臨床背景の検討

【はじめに】新規治療法の検討を進める上において、個々の症例の適格な診断は不可欠である。高 CK 血症症例では、遺伝性筋疾患、炎症性筋疾患、代謝性ミオパチー、甲状腺疾患などを考慮する。遺伝性筋疾患において、男児では Duchenne/Becker 型筋ジストロフィー（DMD/BMD）の頻度が高く、そのことを念頭に置いて診断を進めることが多い。一方、女児では、DMD/BMD 保因者の可能性もあるため、診断に伴う倫理的配慮・筋生検に伴う侵襲性や技術的限界を考慮する必要がある。そのため、診断システムが確立しておらず疾患構成が明らかになっていない。今回、筋疾患の家族歴のない高 CK 血症女児について臨床背景を検討した。

【方法】2014 年 4 月から 2018 年 8 月に、持続する高 CK 血症を主訴に当科を受診した女児を対象とし、その臨床背景を検討した。代謝性ミオパチーは、α グルコシダーゼ活性測定およびアシルカルニチン分析によりスクリーニングを行なった。遺伝性筋疾患は、筋病理、遺伝子解析（次世代シークエンス法・サンガー法）、染色体分析（G-band 法・FISH 法）にて診断した。筋疾患の家族歴がある症例は除外した。

【結果】対象は 15 例、当科初診時年齢は 0～12 歳、初診時 CK 値は 740～21,944 IU/L。筋力低下・筋痛・運動発達遅滞などを認めた例（有症状群）が 8 例、筋症状を認めず機会採血により高 CK 血症を指摘された例（無症状群）が 7 例であった。有症状群の診断は、DMD/BMD 保因者（3 例）、福山型先天性筋ジストロフィー（1 例）、サルコグリカノパチー（1 例）、皮膚筋炎（1 例）、診断未確定（2 例）であった。DMD/BMD 保因者のうち、著明な高 CK 血症（13,177 IU/L）・精神運動発達遅滞を認めた 1 例では、ジストロフィン遺伝子内に切断点を有する均衡型転座および X 染色体不活化の偏りを認めた。他の 2 例はエクソン 8－9 欠失、およびエクソン 45－48 欠失であった。無症状群は、DMD/BMD 保因者（3 例）、肢帯型筋ジストロフィー2A（1 例）、診断未確定 3 例であった。DMD/BMD 保因者は、エクソン 3－44 欠失およびナンセンス変異 2 例（p.R3391X および p.Q3032X）であった。

【考察・結論】今回の検討では、DMD/BMD 保因者が最も高頻度であった。有症状・無症

状群ともに、筋疾患罹患者・DMD/BMD 保因者の両方を認め、症状の有無によらず両者の可能性を考慮すべきであることが示唆された。

筋疾患の新規治療法開発を進める上で、自然歴を解析することは重要であり、我々は DMD の自然歴に関してまとめ、報告している[1)]。また、DMD に対するエクソンスキッピング療法の in vitro での反応性を検討し、治療反応性の違いに関して報告した[2)]。

今回、個々の症例の確定診断を行うことの重要性を考え、高 CK 血症女児の検討を行った。高 CK 血症女児においては、倫理的配慮のもと必要に応じて適切に診断を行うことが重要であり、今回明らかになった臨床背景を考慮して診断システムを検討する必要があると考えられた。

高 CK 血症を契機に受診した男児例の検討

【はじめに】筋疾患に対する新規治療法の開発が進んできている現在、早期診断の重要性が指摘されている。高 CK 血症は、筋疾患を疑う契機となる重要な所見の一つである。私たちは昨年の本班会議において、高 CK 血症を呈する女児における臨床背景を検討し、デュシェンヌ型/ベッカー型筋ジストロフィー（DMD/BMD）保因者の割合が多いことを報告した。今回、高 CK 血症を契機に受診した男児例について臨床背景を検討したので報告する。

【対象と方法】2012 年 3 月から 2019 年 6 月の間に、持続する高 CK 血症を主訴に受診した男児を対象とした。すでに診断がついている症例は除外した。遺伝性筋疾患の診断は、筋病理もしくは遺伝子解析によって行った。

【結果】対象は 31 例、初めて高 CK 血症に気づかれた年齢は日齢 0～13 歳、その際の CK 値は 436～53,077 IU/L、筋疾患もしくは高 CK 血症の家族歴を有する症例は 6 例であった。筋力低下・筋痛・ガワーズ徴候などを認めた例（有症状群）が 4 例、筋症状を認めず機会採血により高 CK 血症を指摘された例（無症状群）が 27 例であった。3 例で筋生検を実施した。有症状群の診断は、DMD（2 例）、BMD（1 例）、福山型先天性筋ジストロフィー（FCMD）（1 例）であった。無症状群の診断は、DMD（7 例）、BMD（9 例）、肢帯型筋ジストロフィー（LGMD）
（Caveolinopathy1 例、sarcoglycanopathy1 例）、診断未確定（9 例）であった。DMD と診断した 9 例はすべて 4 歳未満に高 CK 血症に気づかれており、うち 7 例は筋症状を伴わない機会採血による高 CK 血症であった。また、日齢 0 に高 CK 血症に気づかれた 4 症例は、3 例が DMD、1 例が BMD であったが、生後早期の CK 値は変動が大きく、DMD 症例であっても測定のタイミングによっては 1000~2000 IU/L 台と DMD としては比較的低値を示した。

【考察と結語】

今回の検討では、男児の高 CK 血症では DMD/BMD が最も高頻度であった。FCMD を除く遺伝性筋疾患において、DMD9 例中 7 例・BMD10 例中 9 例・LGMD2 例全てでは、筋症状ではなく機会採血での高 CK 血症が診断の契機となっており、筋疾患の早期診断における高 CK 血症の診断意義を再確認した。一方、海外において CK 値に

よる新生児スクリーニングが検討されているが、偽陰性も含めその評価は確立していない。今回の検討においても生後早期の CK 値は変動が大きく、CK 値からの診断の予測は困難であった。男児の高 CK 血症に対する正確な診断のためには、さらに症例数を増やして臨床背景を明らかにする必要がある。

【参考文献】

1) Awano H, Itoh C, Takeshima Y, Lee T, Matsumoto M, Kida A, Kaise T, Suzuki T, Matsuo M. Ambulatory capacity in Japanese patients with Duchenne muscular dystrophy. Brain Dev. 2018; 40: 465-472.

2) Lee T, Awano H, Yagi M, Matsumoto M, Watanabe N, Goda R, Koizumi M, Takeshima Y, Matsuo M. 2'-O-Methyl RNA/Ethylene-Bridged Nucleic Acid Chimera Antisense Oligonucleotides to Induce Dystrophin Exon 45 Skipping. Genes (Basel). 2017, 8(2).

3) Okizuka Y, Takeshima Y, Awano H, Zhang Z, Yagi M, Matsuo M. Small mutations detected by multiplex ligation-dependent probe amplification of the dystrophin gene. Genet Test Mol Biomarkers. 2009, 13(3):427-31.

Duchenne 型筋ジストロフィーを対象とした上
限運動量に関する検討

分担研究者：
中村　昭則　信州大学医学部第三内科
国立病院機構まつもと医療センター脳神経内科・臨床研究部

共同研究者：
西澤　公美　信州大学医学部保健学科
岡野　怜己　信州大学医学部保健学科大学院

【背景と目的】

Duchenne 型筋ジストロフィー（以下、DMD）を対象とした運動機能評価に関連し、2017 年度では運動機能評価の長期継続の必要性について、また 2018 年度からは DMD 児の上限運動量に関する検討を行った。DMD における薬効の短期的な運動機能の評価には、10 m 走行時間、床からの立ち上がり時間および North Star Ambulatory Assessment (NSAA)[1]が用いられている。また、6 分間歩行テスト、Timed Up & Go Test（TUG）などのタイムドテストも、歩行可能な DMD の効果的な評価法として利用される[2]。また、ステロイド剤の投薬頻度に関する研究では、有効性の指標として、10 m 走行、4 段の階段昇降、および筋力評価がしばしば用いられていた[3]。このように、運動機能評価はステロイド剤などの薬効状況の把握に役立つとともに、副作用の点も含めて治療方針を検討する上で有用と考えられるが、数年に渡る長期間の運動機能評価を実施し検討した報告は見当たらない。

そこで、2017 年度の研究では、理学療法士による運動機能評価を定期的かつ長期的に行うことの重要性を 3 名のケースを通して検討することを目的とした。

また、2018 年度からは DMD 児の上限運動量に関する検討を行った。DMD 児が運動を行う際には、筋破壊を惹起しないよう負荷量に注意する必要がある一方[4]、DMD に対する疾患独自の運動基準は世界的にも未だ確立されていない。ゆえに患者家族や学校職員から「どのくらいまで運動して良いか」という問い合わせが頻発する状況にある。筋疲労の定量的な指標として血中乳酸値がよく使用されているものの、その測定方法は耳垂[5]や指尖[6]から血液を採取するものがほとんどであり、軽度だが侵襲を伴う。

そこで本研究では、唾液中乳酸値を用いて血中乳酸値を推定する予測式の確立を試みた。非侵襲的に採取できる唾液から血中乳酸値を予測できれば、患児が痛い思いをすることなく、運動により本来どの程度血中乳酸の蓄積が生じていたのかを把握することが可能となる。よって筋疲労度を客観的に捉えて他の運動や既存データと容易に比較できるため、適切な運動負荷量を判断するための一助となり得る。これにより DMD 児のオーバーワークを防ぎ、自宅・学校での具体的な運動活動指針の提案に寄与できると考えた。

１．運動機能の長期的評価の有用性の検討

2017 年度では、DMD に対する運動機能評価の長期継続の必要性について検討をした．対象はステロイド剤を同量同用法にて服用している歩行可能な DMD 男児 3 名とした。ステロイド剤投与前後 4~5 年の間に実施した運動機能評価結果を後方視的に検討した。指標とした評価は、10 m 走行時間、床からの立ち上がり時間、NSAA、小型活動量計（MTN220、 エステラ社製）による歩数とした。

【結果】

3 名ともステロイド剤投与及び増量の直後には、10m 走行、床からの立ち上がり、NSAA の値が改善されていた。しかし増量 1 年後には 3 名とも変化が少なくなりほぼプラトーとなった。また、ステロイド剤投与前後で歩数が計測できた症例 3 については歩数の値も投与及び増量の直後で増加が見られた。増量後 2 年以上経過している症例 1 と 2 の歩数は漸減していたが、増量後

2 年未満の 1 名については投与開始時からほとんど変化がなかった。

【考察】

3 名全員の 10m 走行、床からの立ち上がり、NSAA の値がステロイド剤投与直後に改善したことについては既報告の結果と同様であったが、ステロイド剤増量 1 年後では増量直後と同じような大きな改善は見られず、運動機能の維持期と捉えられる緩やかな傾きとなった。歩数については症例 1 と 2 では漸減する傾向が見られた。この原因としては、成長に伴いケイデンスが少なくなったこと、行動が落ち着いたことが考えられるが、運動機能評価の結果を考慮すると病気の進行も原因の 1 つと考えられた。歩数に変化がなかった症例 3 には多動が認められていた。このように長期的な運動機能評価は薬効の持続性に言及できる重要なデータと考えられた。一方、歩数に関しては定点的な理学療法評価だけではわからない症状が呈示されたことから有用な補足的指標であると思われた。今後はこれらの長期的な評価が、ステロイド剤投与中止基準の 1 つとなる可能性についても検討したい。

２．唾液中乳酸値を用いた血中乳酸値の予測式に関する検討

【方法２】

2018 年度には DMD 児の上限運動量に関する検討を行なった。運動量に関する実験を実際の DMD 患児で開始すると過負荷のリスクが考えられたため、本実験では前段階として健常成人 20 歳台の男性 10 名を対象とした。1 分 30 秒間のスクワットジャンプ運動の実施前後に、血中・唾液中乳酸値、心拍数（Polar M200、ポラール・エレクトロ・ジャパン社製）を測定した。乳酸測定には 15 秒で結果が表示され臨床応用が可能な簡易デバイス（LactatePro2、アークレイ社製）を使用した。また血中乳酸値と関連の強い生体因子を抽出するため、被験者全員の体組成分析（Inbody 430、インボディ・ジャパン）を実施した。唾液中乳酸ピーク値・唾液中乳酸がピーク値となった時点での心拍数・SMI (Skeletal Muscle mass Index)を説明変数に、血中乳酸ピーク値を目的変数とした重回帰分析（強制投入法）を行い、血中乳酸ピーク値を予測する重回帰式を求められるかについて検討した。

【結果】

得られた重回帰式は、血中乳酸ピーク予測値＝14.787（定数）＋ 唾液中乳酸ピーク値×（0.840）＋ 心拍数×（-0.122）＋ SMI×1.276 となり、自由度調整済み重相関係数の 2 乗は 0.715 であった（$p = 0.014$）。実測血中乳酸値と重回帰式から算出した予測血中乳酸値との相関係数は 0.90（$p < 0.01$）であり、両者の間に高い相関関係が認められた。

【考察】

重回帰式の自由度調整済み重相関係数の 2 乗は 0.715 であり、予測式の精度は高いと考えられた。説明変数には、唾液中乳酸ピーク値、唾液中乳酸がピーク値となった時点での心拍数、骨格筋量の指標値である SMI を採択した。得られた予測式から血中乳酸のピーク値は、唾液中乳酸のピーク値と身長あたりの骨格筋量が高いほど高値に、唾液乳酸がピークに達した時の心拍数が高いほど低値になるという関係性にあることが示された。

今後は DMD 患児への応用を見据え、学校体育を想定した運動課題に変更した場合の影響や、成人と小児の乳酸代謝の違い等更に検討を重ねて研究を発展させていきたい。

【結論】

我々は、DMD の運動機能評価について継続した研究を行ってきた。運動機能の長期継続の必要性については、3 名の DMD のデータを後方視的に検討した結果、決められた評価を数年にわたり実施することにより、ステロイド剤の効果や症状の変化を定量的に確認することができると考えている。また、DMD 児の上限運動量に関する検討では、健常成人を対象とした唾液乳酸値による血中乳酸値の予測式確立を試みた結果、心拍数や SMI などが関与した重回帰式を求める過程までを達成することができ、

血中乳酸のピーク値と唾液乳酸のピーク値を有意に関係づけることができたと考えている。今後は、これらの研究をさらに発展させ、DMD 児の運動機能に関するエビデンスを積み上げたい。

【参考文献】

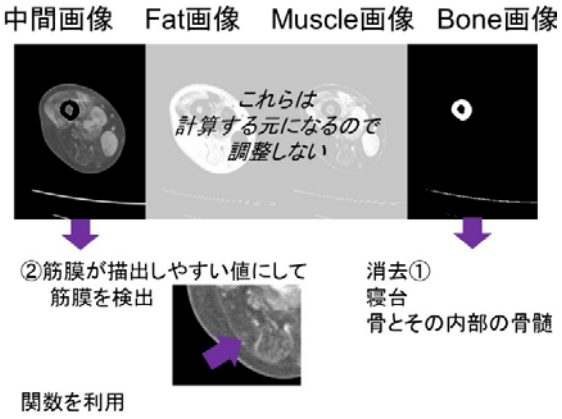
1. Mercuri E, Coratti G, Messina S, et al.: Revised North Star Ambulatory Assessment for Young Boys with Duchenne Muscular Dystrophy. PLoS One 2016; 11: e0160195.
2. Mazzone E, Martinelli D, Berardinelli A, et al.: North Star Ambulatory Assessment, 6-minute walk test and timed items in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy. Neuromuscul Disord 2010; 20: 712–716.
3. Escolar DM, Hache LP, Clemens PR, et al.: Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. Neurology 2011; 77: 444–452.
4. デュシェンヌ型筋ジストロフィー診療ガイドライン作成委員会編著.: デュシェンヌ型筋ジストロフィー診療ガイドライン. 2014; 4 章リハビリテーション: pp 46-55.
5. Forsyth JJ, Farrally MR.: A comparison of lactate concentration in plasma collected from the toe, ear, and fingertip after a simulated rowing exercise. Br J Sports Med 2000; 34: 35-38.
6. Junior ECPL, Lopes-Martins RÁB, Vanin AA, et al.: Effect of 830 nm low-level laser therapy in exercise-induced skeletal muscle fatigue in humans. Lasers Med Sci 2009; 24: 425-431.

骨格筋量測定の自動化とその課題

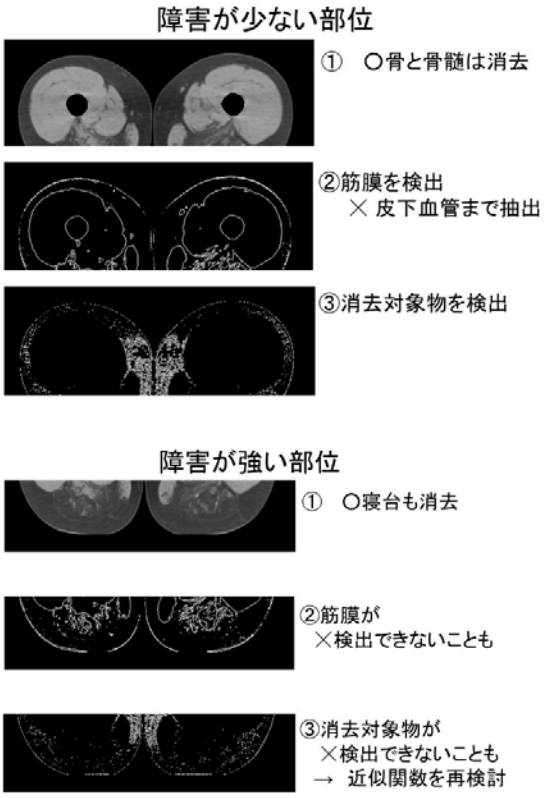
横浜労災病院　神経筋疾患部　**中山貴博**

目的：我々は筋ジストロフィー患者の骨格筋CT画像について，推定関数を用いた筋量定量方法を報告し，4年間の有意な筋量減少を示せた(BMJ　Open 2013)．その際、骨格筋外の皮膚や皮下血管を手動消去する必要があった。それらの処理を自動化するにあたる問題点，課題について述べる．

方法：骨格筋CT画像は，我々が作成した推定関数を用い，①骨・②筋・③脂肪画像を作成する．そのほかに筋膜を見やすくするために経験的に作成したCT値-241～259の画像④を作成する．A, Bの値を調整し，画像②および④を用いて，モーメント関数などから，筋膜の画像を作成した．外輪郭(皮膚)から筋膜までの領域が皮下脂肪となる．



結果：大部分の筋膜は抽出可能であったが，皮下の細静脈を誤って抽出することもあった．



課題：筋膜を連続した線として認識できない場合，筋膜の輪郭が認識できず，静脈・神経等を誤って認識してしまうことがあると考えられた．現時点で評価しているのは，顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーやポンペ病の患者にとどまり，Duchenne型筋ジストロフィーなどで脂肪置換が進行した患者については評価できていない．今まで評価してきた画像を収集し，非対象物消去ロジックの精度を評価する．その後非対象物を消去した部位の位置，形状，面積を人工知能(ＡＩ)に機械学習させ教師データを作成する．また機械学習のサンプル数が絶対的に少ない状況を考慮して手作業で消去した対象物データを集積するとともに，誤検出した組

織を非対象物の教師データとして認識させることで，ＡＩを利用した自動化ソフトを開発したい．MRI画像でも同様の処理を適応することを考えている．DIXON画像では，水画像が筋画像と考えられ，脂肪画像との割合から，水分すなわち筋の密度画像を作成する．これは，CTでの②筋画像に相当しており，同様に作成した脂肪の密度画像(③脂肪画像に相当)も作成する．元々の水画像を構造画像とし④の画像と同様とし，CTで作成したAIで処理をする．また，T1強調画像にもNakayama T. et.al., Brain Dev. 41:870-877, 2019 論文の式を用いて筋の密度画像として利用することも考えている．これらのソフトウェアはクラウド上で作業ができるようにすることを今後の目標とする．

遺伝性神経・筋疾患患者データベースの患者団体における登録促進活動および患者団体による医学情報登録の研究

分担研究報告　一般社団法人日本筋ジストロフィー協会　**矢澤健司**

1.　3 年間の研究目標

遺伝性神経・筋疾患患者データベースの患者団体における登録促進活動および患者団体による医学情報登録

2.　3 年間を通じての最終的な研究成果

1）継続的な活動：

① Remudy への登録者を対象とした、神経・筋疾患医学情報登録・管理機構（以下、機構）への登録通知（DMD/BMD）の案内。

② 機構への福山型筋ジストロフィーの医学情報登録：■登録受付（249 件 2019 年8月末）、■年1 回の定期的な更新、■大澤先生による精査とダブルチェック、■医学情報のデータ入力、■ホームページを介した登録状況の公表。

③ データ入力：将来的な治験への使用を目的とした登録データの入力（アルバイト
の学生 4 名）（2016 年 11 月～で小牧班研究費で実施。

2）3 年間の班会議での発表

(1)　2017 年度報告

・筋ジストロフィー患者が入院する療養介護病棟のＱＯＬ評価に関するアンケート調査

・在宅訪問と協会本部への質問から把握された在宅患者の現状における問題点

(2) 2018 年度報告

・次世代シークエンサーを併用したジストロフィン遺伝子の解析

・顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーのアンケート調査について

(3) 2019年度報告

・筋ジストロフィー協会の電話相談から見た患者の心と現実について

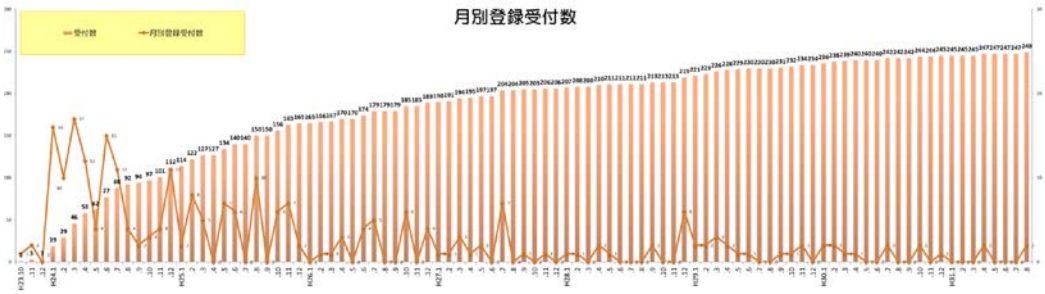
・筋ジストロフィー協会の在宅患者のアンケート調査

3.　今後の研究の進め方

(1)　筋ジストロフィー協会会員の病型を含むアンケート調査

(2)　患者に負担のない治験評価の研究

4.　研究成果の発表(原著論文、学会発表等)



眼咽頭型筋ジストロフィーの患者登録システム構築と臨床疫学情報収集に関する研究

分担研究者

山下　賢 [1)]

研究協力者

熊井良彦 [2)]、宮本卓海 [2)]、道鬼つかさ [3)]、俵望 [1)]、張霄 [1)]、張子微 [1)]、原健太朗 [1)]、安東由喜雄 [1)]

[1)] 熊本大学大学院 生命科学研究部　神経内科学

[2)] 熊本大学大学院 生命科学研究部　耳鼻咽喉科・頭頸部外科学

[3)] 荒尾市民病院　脳神経内科

【緒言】

眼咽頭型筋ジストロフィー（Oculopharyngeal muscular dystrophy: OPMD）は 40 歳代以降に発症し、進行性の嚥下障害、眼瞼下垂、四肢近位筋の筋力低下を来す常染色体優性あるいは劣性遺伝性の難治性筋疾患である。原因として *Poly (A) binding protein, nuclear 1 (PABPN1)* 遺伝子のエクソン 1 領域での GCN リピート（野生型 10 回）が 12～17 回に伸長することが報告されている。我々は本疾患の臨床的多様性に基づいて、将来的な臨床試験への展開を可能にする患者レジストリの構築を目指している。

本研究では、以前の研究班で検討した登録項目案に基づいて当施設における OPMD 症例の臨床病理学的特徴を明らかにし、予後と密接に関連する嚥下障害の特徴を解明することによって、登録項目を検証することを目的とする。さらに本疾患の病態に関する基礎研究において、伸長 PABPN1 がミトコンドリアに蓄積し機能障害をもたらす知見(1)に基づいて、本疾患におけるミトコンドリア障害関連バイオマーカーの可能性について検討する。

【方法】

(1) 患者レジストリー項目案に基づいた当科 OPMD 症例の臨床病理学的解析

2009～2017 年に当施設で新規に診断し得た OPMD6 症例（男性 3 例、女性 3 例）を対象とし、患者登録項目案に基づいて、家族歴、血族婚の有無、合併症、筋生検所見、遺伝子診断、発症年齢、初発症状、下肢筋力低下や歩行障害、車椅子使用、上肢筋力低下、上肢運動動作、眼瞼下垂、外眼筋麻痺、構音障害、嚥下障害、経管栄養使用の有無と発生年齢、呼吸機能、心機能、心臓合併症、CK 値、さらに MRI 画像所見（頭部、上下肢骨格筋）について評価を行った。

(2) 当院症例の嚥下機能評価に基づく眼咽頭型筋ジストロフィー患者レジストリー項目の検討

上記 6 症例（男性 3 例、女性 3 例）のうち、嚥下内視鏡検査（VE）および嚥下造影検査（VF）を施行したそれぞれ 4 例を対象とし、VE を施行した症例については兵藤スコア（唾液貯留、咳反射、嚥下反射惹起、咽頭クリアランス）、誤嚥量、鼻咽腔閉鎖不全、VF を施行した症例については舌運動、軟口蓋、舌根運動、咽頭収縮、舌骨運動、喉頭挙上、喉頭閉鎖、嚥下反射惹起、上部食道括約筋（UES）開大、喉頭蓋残留、梨状陥凹残

留、誤嚥量、誤嚥・侵入スコア（PAS）などの各種パラメータを評価した。また、患者登録項目案との関連性を評価した。

(3) 眼咽頭型筋ジストロフィーのミトコンドリア障害に着目したバイオマーカー探索

OPMD 5 症例（男性 3 例、女性 2 例）および疾患対照として孤発性封入体筋炎（sIBM）6 症例、筋萎縮性側索硬化症（control）5 症例に対して、Quantikine ELISA キット（USA R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA）を用いて、血清中 fibroblast growth factor 21（FGF-21）および growth differentiation factor 15（GDF-15）を測定した。また、OPMD 患者登録項目（CK や罹病期間、発症年齢）との関連性を評価した。

【結果】

(1) 患者レジストリー項目案に基づいた当科 OPMD 症例の臨床病理学的解析

6 症例中 5 例で家族歴を有し、全例において筋生検で縁取り空胞線維を伴った軽度の筋原性変化と遺伝子検査でヘテロ接合性の 13 回の GCN リピート伸長を認めた。発症年齢は 50～62 歳で、初発症状は下肢筋力低下および嚥下障害が 2 例ずつ、眼瞼下垂、外眼筋麻痺、嚥下障害が 1 例ずつであり、初発症状から他の症状への伸展は多様であった。心および呼吸機能はほぼ保たれていたが、完全右脚ブロックなどの心電図異常が半数に見られた。頭部 MRI では内側翼突筋の萎縮や舌の脂肪変性、下肢骨格筋 MRI では大臀筋や大内転筋、大腿二頭筋などに脂肪変性を伴う萎縮を高頻度に認めた。

(2) 当院症例の嚥下機能評価に基づく眼咽頭型筋ジストロフィー患者レジストリー項目の検討

VE において兵藤スコアは平均 7.75 点であり、咽頭クリアランスの不良と鼻咽腔閉鎖不全を高頻度に認めた。VF では舌骨・喉頭挙上に比して、舌根後退・咽頭収縮の高度の障害を認めた。また咽頭クリアランスは不良であり、喉頭挙上や UES 開大が保持されているにも関わらず高頻度に残留がみられた。VF で誤嚥を認めた症例（62 歳女性、PAS 6 点）は、54 歳時に嚥下障害を初発症状として発症したが、嚥下障害の罹病期間と嚥下障害の程度には明確な関連性は見られなかった。

(3) 眼咽頭型筋ジストロフィーのミトコンドリア障害に着目したバイオマーカー探索

FGF-21 は OPMD で 290.5±286.7 pg/mL、sIBM で 296.6±306.0 pg/mL、ALS で 334.0±115.7 pg/mL であり、GDF-15 は OPMD で 746.7±135.9pg/mL、sIBM で 1494.0±1052.0 pg/mL、ALS で 1060.0±261.0 pg/mL であった。FGF-21 および GDF-15 測定値と OPMD 患者登録項目（CK や罹病期間、発症年齢）の程度には明確な関連性は見られなかった。

【考察】

OPMD の三大症状は眼瞼下垂（眼瞼挙筋障害）および嚥下障害（口腔咽頭筋障害）、四肢筋力低下であるが、これらの症状の出現頻度には偏りがある。世界各国からの報告では、眼瞼下垂はほぼ 100%に共通して見られる一方、嚥下障害は 62～100%、さ

らに四肢筋力低下は 20～81%と幅がある(2)。OPMD 症例の中には、四肢筋力低下から発症する症例もあり(2)、他疾患と誤診されている可能性がある。心機能に異常は見られなかったが、呼吸機能については 1 秒量が平均 16%低下、60 歳以上の患者では 20%以上低下しているとの報告がある(3)。

OPMD における MRI 所見については、脂肪置換は大腿では内転および大腿屈筋群、下腿ではヒラメ筋・腓腹筋に顕著との報告がある(4)。また舌を含む広汎な嚥下関連筋に脂肪浸潤をきたすことも報告されている(5)。さらに骨盤筋と下肢近位筋の変化は、初期の OPMD に特徴的であり(6)、臨床スコアによる筋力と MRI の定量スコアに相関があることも明らかとなっている(4)。

OPMD における嚥下障害のメカニズムに関しては、マノメトリーによる評価において下部食道の同時収縮、弛緩不全および咽頭収縮異常を高頻度に検出するとの報告がある(7)。また VF を用いた少数例の評価では、咽頭収縮不良や舌骨運動障害、喉頭前庭の閉鎖不全等が指摘されている(8)。さらに 96%の患者で咽頭期の障害を認め、45%に食道入口部に cricopharyngeal bar、77.3%に喉頭蓋、90.1%に梨状陥凹残留が検出されると報告されている(9)。

嚥下障害に関連する治療研究として、輪状咽頭筋へのボツリヌス毒素注入により、59%の患者に症状の改善が認められたとの報告（発声障害が 24%、嚥下障害の悪化が 14%に出現）(10)や、輪状咽頭筋切断および自家筋芽細胞移植（第 I/IIa 相）が QOL の改善と嚥下機能の維持をもたらしたとの報告がある(11)。しかし OPMD の嚥下障害のメカニズムは多様であり、輪状咽頭筋に留まらない広汎な誤嚥対策が必要である。

近年ミトコンドリアミオパチーのバイオマーカーとして、Fibroblast growth factor 21 (FGF-21) と Growth differentiation factor 15 (GDF-15)が注目されている。FGF-21 はエネルギー代謝の制御因子であり、ミトコンドリアストレスにより分泌され、ミトコンドリアの生合成を促進し糖脂質代謝を正に制御すると報告されている。GDF-15 は TGFβ ファミリーメンバーであり、エネルギー恒常性を制御し、酸化的代謝や脂肪分解を促進することが明らかとなっている。この両者はミトコンドリアミオパチーのみならず、ミトコンドリア障害が病態に関与する封入体筋炎などでも上昇すると報告されている。OPMD のミトコンドリア機能障害に関連するバイオ-マーカーの可能性について、より多数例での解析が必要である。

【結論】

全症例で比較的均一な筋生検および遺伝子診断、MRI 画像所見を呈する一方で、初発症状やその後の症状の伸展パターンは様々であり、また心伝導障害や糖尿病、難聴の合併例もあり、臨床的多様性が見出された。本疾患の多彩な症状を評価しうる患者登録項目の設定がレジストリーの構築に重要と考えられる。

OPMD の嚥下障害のメカニズムとして、鼻咽腔閉鎖不全を含む咽頭収縮筋群の筋力

低下による圧形成不良が示唆された。初発症状や症状の伸展パターン、罹病期間に関わらず高頻度に嚥下障害を認めることから、定期的な VE や VF による評価は不可欠であり、患者レジストリーに包含可能な嚥下評価項目の設定が必要である。

OPMD の一部の症例では FGF-21 が高値を示す症例があったものの、sIBM や ALS の症例との有意差は認めなかった。OPMD のミトコンドリア機能障害に関連するバイオ-マーカーの可能性について、今後より多数例での解析が必要である。

【参考文献】

1. Doki T, Yamashita S, Wei FY, Hara K, Yamamoto T, Zhang Z, et al. Mitochondrial localization of PABPN1 in oculopharyngeal muscular dystrophy. Lab Invest. 2019;99(11):1728-40.
2. Van Der Sluijs BM, Hoefsloot LH, Padberg GW, Van Der Maarel SM, Van Engelen BG. Oculopharyngeal muscular dystrophy with limb girdle weakness as major complaint. J Neurol. 2003;250(11):1307-12.
3. Witting N, Mensah A, Kober L, Bundgaard H, Petri H, Duno M, et al. Ocular, bulbar, limb, and cardiopulmonary involvement in oculopharyngeal muscular dystrophy. Acta Neurol Scand. 2014;130(2):125-30.
4. Fischmann A, Gloor M, Fasler S, Haas T, Rodoni Wetzel R, Bieri O, et al. Muscular involvement assessed by MRI correlates to motor function measurement values in oculopharyngeal muscular dystrophy. J Neurol. 2011;258(7):1333-40.
5. King MK, Lee RR, Davis LE. Magnetic resonance imaging and computed tomography of skeletal muscles in oculopharyngeal muscular dystrophy. J Clin Neuromuscul Dis. 2005;6(3):103-8.
6. van der Sluijs BM, Lassche S, Knuiman GJ, Kusters B, Heerschap A, Hopman M, et al. Involvement of pelvic girdle and proximal leg muscles in early oculopharyngeal muscular dystrophy. Neuromuscul Disord. 2017.
7. Castell JA, Castell DO, Duranceau CA, Topart P. Manometric characteristics of the pharynx, upper esophageal sphincter, esophagus, and lower esophageal sphincter in patients with oculopharyngeal muscular dystrophy. Dysphagia. 1995;10(1):22-6.
8. Waito AA, Steele CM, Peladeau-Pigeon M, Genge A, Argov Z. A Preliminary Videofluoroscopic Investigation of Swallowing Physiology and Function in Individuals with Oculopharyngeal Muscular Dystrophy (OPMD). Dysphagia. 2018;33(6):789-802.
9. Tabor LC, Plowman EK, Romero-Clark

C, Youssof S. Oropharyngeal dysphagia profiles in individuals with oculopharyngeal muscular dystrophy. Neurogastroenterol Motil. 2018;30(4):e13251.

10. Youssof S, Schrader RM, Romero-Clark C, Roy G, Spafford M. Safety of botulinum toxin for dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy. Muscle Nerve. 2014;49(4):601-3.

11. Perie S, Trollet C, Mouly V, Vanneaux V, Mamchaoui K, Bouazza B, et al. Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study. Mol Ther. 2014;22(1):219-25.

「筋ジストロフィーの臨床開発促進を目指した臨床研究」班　研究者名簿

2017年～2019年度

氏　名	所属施設・職名
小牧　宏文	国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナル・メディカルセンター　センター長
(2017～2018年度) 小林　庸子	国立精神・神経医療研究センター 病院身体リハビリテーション部　医長
(2019年度) 水野　勝広	国立精神・神経医療研究センター 病院身体リハビリテーション部　部長
瀬川　和彦	国立精神・神経医療研究センター 病院総合内果内科部　部長
中村　治雅	国立精神・神経医療研究センター トランスレーショナル・メディカルセンター臨床研究支援部　部長
西野　一三	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第一部　部長
森　まどか	国立精神・神経医療研究センター 病院脳神経内科　医長
山本　敏之	国立精神・神経医療研究センター 病院脳神経内科　医長
栗野　宏之	神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学 内科系講座小児科学　准教授
石垣　景子	東京女子医科大学 小児科　准教授
石川　悠加	国立病院機構八雲病院 臨床研究部　部長
尾方　克久	国立病院機構東埼玉病院 臨床研究部　部長
久留　聡	国立病院機構鈴鹿病院 病院長
小林　道雄	国立病院機構あきた病院 脳神経内科　部長
高相　晶士	北里大学 医学部整形外科学　主任教授
髙橋　俊明	国立病院機構仙台西多賀病院 統括診療部内科系診療部　部長
髙橋　正紀	大阪大学大学院 医学系研究科保健学専攻機能診断科学　教授
竹島　泰弘	兵庫医科大学 小児科学教室　主任教授
中村　昭則	国立病院機構まつもと医療センター 臨床研究部　部長
中山　貴博	横浜労災病院 神経筋疾患部　部長
松村　剛	国立病院機構大阪刀根山医療センター 臨床研究部　部長
矢澤　健司	日本筋ジストロフィー協会 副理事長
山下　賢	熊本大学大学院 生命科学研究部神経内科学　准教授

29‐4　筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター 神経研究所

西　野　一　三

総括研究報告

1. 研究目的

本邦を代表する筋疾患研究者の力を結集し、国立精神・神経医療研究センターを中心とする筋診断ネットワークと筋レポジトリーを将来的に維持・発展させつつ、最大限活用し、医学的・科学的に重要な成果を生み出すことで、社会に貢献することを目的とする。具体的には、下記の 4 つを柱として研究を進めた。

(1) 筋疾患診断ネットワークおよび筋レポジトリーの維持と発展：　これまでに形成してきた筋病理診断を中心とする筋疾患診断ネットワークを国内のみならず、アジア諸国を中心とする海外拠点施設にも拡大して支援を行うことで、筋疾患診断体制をさらに充実させ国際的筋疾患診断拠点とする。またそのことにより、国立精神・神経医療研究センターの筋レポジトリーを更に充実させる。

(2) 病因・病態解明：　筋疾患には依然として原因不明のものが多い。本邦の基礎研究者および筋疾患研究者の力を結集して、筋炎など周辺疾患も含みつつ、筋ジストロフィー関連疾患の分子レベルの病因・病態を明らかにする。

(3) 診断法開発と活用：　病因・病態解明研究で得られた成果を活用して診断法を開発し、これまで確定診断が困難であった筋疾患の診断を可能にする。さらにその方法を活用して、国内外の臨床の現場を後方支援する。

(4) 治療法開発：　病因・病態解明研究で得られた成果を活用して、分子病態に基づく治療法開発を進める。特にこれまで研究開発費で研究が進められてきている本邦独自のリードスルー薬および筋線維肥大薬の実用化を推進する。

2. 研究組織

主任研究者

西野一三	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所　疾病研究第一部

分担研究者

大澤　裕	川崎医科大学医学部　神経内科学
青木正志	東北大学大学院医学系研究科 神経内科
戸田達史	東京大学大学院・医学系研究科 神経内科学
大野欽司	名古屋大学・大学院医学系 研究科 神経遺伝情報学分野
林由起子	東京医科大学医学部医学科 病態生理学分野
松田良一	東京理科大学理学研究科 科学教育専攻
遠藤玉夫	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター　東京都健康長寿医療センター研究所
平澤恵理	順天堂大学大学院医学研究科
土田邦博	藤田医科大学　総合医科学研究所
林　良雄	東京薬科大学薬学部薬品化学教室
杉江秀夫	常葉大学保健医療学部
遠藤　剛	千葉大学 大学院理学研究院
斉藤史明	帝京大学医学部神経内科
原　雄二	京都大学大学院工学研究科　合成・生物化学専攻生体認識化学分野
村山　尚	順天堂大学医学部
三橋弘明	東海大学工学部生命化学科
鈴木重明	慶應義塾大学医学部
中森雅之	大阪大学大学院医学系研究科
林晋一郎	国立精神・神経医療研究センター 神経研究所　疾病研究第一部
竹田哲也	岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科

3.研究成果

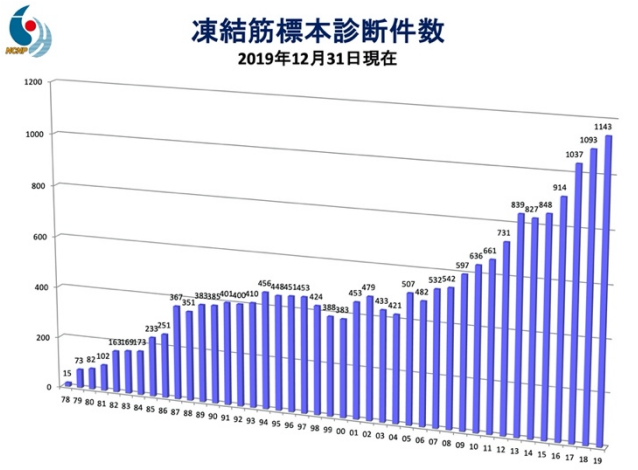
我々は、肢帯型筋ジストロフィー関連疾患の分子病態、次世代技術等を活用することにより、国立精神・神経医療研究センターを初めとする機関に蓄積された患者検体を有効活用して解明し、さらに治療法開発の基盤を形成することを目指している。具体的には、1）原因不明の各種遺伝性筋疾患の病因・病態解明研究、2）ハイスループット診断法開発研究、3）分子病

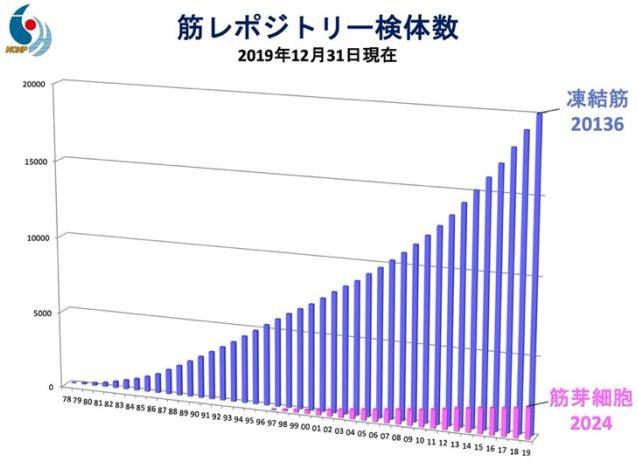
態に基づく治療法開発研究、4) 以上を可能にするための基盤的研究、の 4 つを柱として研究を進めた。

1) 筋疾患診断ネットワークおよび筋レポジトリーの維持と発展

a) 筋病理診断と検体数

2017 年～2019 年（暦年）の 3 年間、毎年、総筋病理診断件数は 1000 件を突破し更に増え続けた。その結果、2019 年の年間診断総件数は史上最高の 1143 件に達した。また、総検体数は、2 万検体を突破して 2019 年末で 20136 検体となり、名実ともに世界最大規模の筋レポジトリーとなった。培養筋も 2 千件を突破し、総検体数 2024 件となった。神経・筋疾患研究支援基盤として各種研究活用されることで、筋疾患学の発展に寄与した。





b) 国際的均てん化と筋疾患教育

タイ・マヒドン大学との共同で、第 1 回国際筋病理セミナーを 2018 年 8 月 15 日-17 日に、第 2 回を 2019 年 6 月 27 日-29 日に、何れもマヒドン大学シリラート病院（バンコク）で開催した。タイ、ミャンマー、ベトナムの基幹病院から脳神経内科医・小児科医・病理医が参加し大変好評であった。また同病院と共同で、筋生検および検体固定方法の解説ビデオ（日本語版・英語版・タイ語版の 3 バージョンがある）を作成し、2018 年 1 月より疾病研究第一部 HP 上で公開した。世界 95 カ国／地域よりアクセスがあった。World Federation of Neurology の News でも取り上げられるとともに、国内外の 8 学術団体から推薦を受けた。

2) 病因・病態解明

a) ADSSL1 ミオパチー

近年韓国から 7 家系 9 例の新たな遠位型ミオパチーとして ADSSL1 ミオパチーが報告されている。これまでに国立精神・神経医療研究センターで筋病理診断を行った例を再検討したところ、63 例（59 家系）で *ADSSL1* 遺伝子の両アレル性の変異が同定された（**Neurology**, *in press*）。何れの症例でもネマリン小体が認められ、病理学的にはネマリンミオパチーに分類されると考えられた。一方、脂肪滴を有する筋線維が少数認められるという特徴も認められた。本質的には代謝性疾患であることから、治療法開発を目指して、モデル動物作製を進めている。

b) *COX6A2* 遺伝子変異による新たなチトクローム C 酸化酵素（COX）、欠損症

COX6A2 遺伝子変異による COX 欠損症患者 2 家系 2 人を、世界で初めて見いだした（**Ann Neurol** 2019）。患者およびノックアウトマウス骨格筋では、COX の酵素活性と COX 複合体のアセンブリーが低下していた。Hela 細胞に、野生型/変異型 COX6A2 を発現させたモデルにおいては、変異型では野生型と異なる形態的特徴を認めた。これは、世界で初めての横紋筋特異的サブユニット異常による COX 欠損症である。

c) 眼咽頭遠位型ミオパチー（OPDM）の原因遺伝子同定

東京大学・石浦博士らとの共同研究で、OPDM が *LRP12* 遺伝子の CGG リピート伸長によることを明らかにした（**Nat Genet** 2019）。さらに 34 家系 36 名の日本人患者で検討したところ、男性患者が女性患者の 2 倍多いことが明らかとなった（論文投稿中）。*LRP12* 遺伝子の CGG リピート伸長の発見を契機として、北京大学との共同研究で、*GIPC* 遺伝子の CGG リピート伸長も OPDM の原因となること（**Am J Hum Genet** 2020）、さらには、神経

核内封入体病の原因である *NOTCH2NLC* 遺伝子の CGG リピート伸長によっても OPDM を来しうること（論文投稿中）を相次いで同定した。

d) 乳児重症型ミトコンドリア脳筋症の新規原因遺伝子

各種代謝性ミオパチーを対象とした原因遺伝子変異同定を試み、乳児重症型のミトコンドリア脳筋症で 3 つの新たな原因遺伝子（*IBA57*、*UNDUFAF3*、*WDR45*）を見いだした（**Neurol Genet** 2017, **Clin Genet** 2018, **Neurology** 2018）。

e) STAC3 関連ミオパチー

本邦で初めて 2 家系 3 患者において STAC3 関連ミオパチー例を見いだした。*STAC3* 変異例はこれまでミスセンス変異を有する Native American が報告されているのみである（Native American myopathy）。本邦患者では、ホモ接合性のフレームシフト変異を有し、生下時からの人工呼吸器管理、経管栄養を必要とする重症型であった。

f) Tubular aggregate myopathy の病態解明

Orai1 G100S 変異をもつノックインマウスを作製した。ヘテロ接合体マウスにおいて、前脛骨筋の筋張力低下が観察された。また、筋病理では、少数ながら、中心核線維、壊死線維が見られた。また、同マウスからの初代細胞では、カルシウム流入の亢進が観察された。store-operated calcium channel が恒常的に活性化していること、また、このカルシウム流入が骨格筋の機能低下を引き起こすことが示された。

g) GNE ミオパチー変異解析

本邦 GNE ミオパチー患者で認められる変異の中で 2 番目に多い p.D207V 変異は軽症変異であり、ホモ接合体では疾患を引き起こさない可能性が示唆された。

h) その他の新規原因遺伝子同定

次世代シークエンサーを使用するなどして、筋原線維性ミオパチー例、Marinesco-Sjogren 症候群様例で新規原因遺伝子を見いだし、培養細胞およびモデル動物作製を含む各種検証実験を実施中である。

i) その他

福山型筋ジストロフィーを初めとする各種筋ジストロフィーの病態解明研究が班員によって行われた。

3) 診断法開発と活用

a) 筋炎マーカー開発

これまでに皮膚筋炎ではミクソウイルス抵抗性タンパク質 A（MxA）が筋線維に発現していること、また MxA の発現により皮膚筋炎の診断が可能であることを報告してきた。MxA の発現を確認し、更に皮膚筋炎特異的自己抗体を確定している 182 例について調べたところ、14 例は皮膚症状を呈していなかった。このことは、これまでその存在について疑問視する声が多かった dermatomyositis sine dermatitis が確かに存在することが初めて明らかになった。またこの 14 例のうち 12 例は、抗 NXP-2 抗体陽性であり、dermatomyositis sine dermatitis が抗 NXP-2 抗体と強く関連していることが明らかとなった（**JAMA Neurol** 2020）。また、皮膚筋炎での陽性自己抗体別のサブタイプで臨床病理所見が異なるかどうかを検討したところ、抗 Mi-2 抗体陽性の皮膚筋炎では、筋線維膜上への MAC 沈着を伴う perifascicular necrosis, 筋周鞘のアルカリホスファターゼ活性、筋周鞘結合組織断片化など、抗合成酵素症候群様の筋病理所見を呈することを、初めて明らかにした（**Neurology**, in revision）。一方、抗 Jo-1 抗体など抗 ARS 抗体が陽性の抗合成酵素症候群も皮膚科およびリウマチ膠原病科では皮膚筋炎に分類される。そこで抗 ARS 抗体陽性であった 194 例について MxA の発現を調べたところ、筋線維での発現が認められたのは 3 例のみであった（**Neuropathol Appl Neurobiol** 2019）。このうち 1 例は皮膚筋炎特異的自己抗体である抗 MDA5 抗体が陽性であった。このことは、抗合成酵素症候群と皮膚筋炎は異なる疾患であることを示している。

b) 悪性高熱症素因

村山班員らは、RYR1 変異体の CICR 簡易測定系を樹立することにより、悪性高熱症素因の簡便な評価方法を確立した。

c) コア鑑別法

セントラルコアはセントラルコア病の重要な所見であり、*RYR1* の C 端領域の変異により生じる。しかし、N 端領域にある変異では、やや非典型的なコアが出現する。一方、*RYR1* 変異以外の理由でもコア病変は生じる。例えば、いわゆる target fiber や targetoid fiber と呼ばれる所見も、セントラルコアとの鑑別が難しい場合がある。そこで *RYR1* 変異によるコア病変とそれ以外の理由によるコア様病変とを鑑別するマーカーを検索したところ、*RYRI* 変異例では、RYR1 に加えて、triadin などがコア構造内で発現していた。この所見は、*RYR1* 変異によるコア病変とそれ以外の理由によるコア様病変とを鑑別するマーカーとなり得る（**J Neuropathol Exp Neurol**, in press）。

4)治療法開発

a) 筋強直性ジストロフィー

中森班員らは、CAG リピート伸長 DNA の副政治に生じるスリップ型中間構造体に特異的に結合する naphthyridine-azaquinolone が、CAG リピート伸長を有する Huntington 病（HD）マウスおよび HD 患者細胞において、ゲノム DNA 上の CAG リピート数

を減少させることを世界で初めて明らかにした（**Nat Genet** 2020）。本技術は triplet repeat 身長を原因とする筋強直性ジストロフィーにも応用可能であり、初めて根本的治療法開発可能性への展望が開けた。

b) 悪性高熱症

村山班員らは、悪性高熱症変異導入マウスにおいて、RyR1 チャネル活性を抑制するオキソリン酸誘導体に悪性高熱発症予防効果があることを明らかにした（論文投稿中）。今後 RyR1 関連筋疾患に対する効果を in vivo および in vitro 実験において詳細に検討していく。

c) その他

当班で開発されたアルベカシンによるリードスルー療法が医師主導型治験へと結びついている。その他の病態に基づく各種の治療法開発研究が班員によって行われた。

4. 研究成果刊行一覧

1. Nakamori M, Panigrahi GB, Lanni S, Gall-Duncan T, Hayakawa H, Tanaka H, Luo J, Otabe T, Li JX, Sakata A, Caron MC, Joshi N, Prasolava T, Chiang K, Masson JY, Wold MS, Wang X, Lee MYWT, Huddleston J, Munson K, Davidson S, Layeghifard M, Edward LM, Gallon R, Santibanez-Koref M, Murata A, Takahashi MP, Eichler EE, Shlien A, Nakatani K, Mochizuki H, Pearson CE: Slipped-CAG DNA binding small molecule induces trinucleotide repeat contractions in vivo. ***Nature Genetics***. 52(2): 146-159, Feb, 2020
2. Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, Suzuki Y, Qu W, Doi K, Almansour MA, Kikuchi JK, Taira M, Mitsui J, Takahashi Y, Ichikawa Y, Mano T, Iwata A, Harigaya Y, Matsukawa MK, Matsukawa T, Tanaka M, Shirota Y, Ohtomo R, Kowa H, Date H, Mitsue A, Hatsuta H, Morimoto S, Murayama S, Shiio Y, Saito Y, Mitsutake A, Kawai M, Sasaki T, Sugiyama Y, Hamada M, Ohtomo G, Terao Y, Nakazato Y, Takeda A, Sakiyama Y, Umeda-Kameyama Y, Shinmi J, Ogata K, Kohno Y, Lim SY, Tan AH, Shimizu J, Goto J, Nishino I, Toda T, Morishita S, Tsuji S: Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. ***Nat Genet.*** 51(8):1222-1232, Aug, 2019
3. Tanboon J, Nishino I: Classification of idiopathic inflammatory myopathies: pathology perspectives. ***Curr Opin Neurol.*** 32(5):704-714, Oct, 2019
4. Inoue M, Tanboon J, Okubo M, Theerawat K, Saito Y, Ogasawara M, Indrawati LA, Uruha A, Okiyama N, Fujimoto M, Suzuki S, Nishino I: Absence of sarcoplasmic myxovirus resistance protein A (MxA) expression in antisynthetase syndrome in a cohort of 194 cases. ***Neuropathol Appl Neurobiol.*** 45(5): 523-524, Aug, 2019
5. Inoue M, Uchino S, Iida A, Noguchi S, Hayashi S, Takahashi T, Fujii K, Komaki H, Takeshita E, Nonaka I, Okada Y, Yoshizawa T, Van Lommel L, Schuit F, Goto YI, Mimaki M, Nishino I: COX6A2 variants cause a muscle-specific cytochrome c oxidase deficiency. ***Ann Neurol***. 86(2): 193-202, Aug, 2019
6. Masaki T, Hara Y, Okuda M, Itoh K, Nishioka R, Shiomi A, Nagao K, Mori M, Mori Y, Ikenouchi J, Suzuki R, Tanaka M, Ohwada T, Aoki J, Kanagawa M, Toda T, Nagata Y, Matsuda R, Takayama Y, Tominaga M, Umeda M: Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation. ***Nat Commun.*** 24;9(1):2049, May, 2018
7. Hatanaka K, Ikegami K, Yoshioka Y, Nakamura K, Kosaka K, Nakatani M, Uezumi A, Ide T, Tsutsumi Y, Sugimura H,

Kinoshita M, Ochiya T, Mann M, Setou M, Tsuchida K: UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles. ***Nat Commun.*** 9(1): 3396, Sep, 2018

8. Ishiyama A, Kimura Y, Iida A, Saito Y, Miyamoto Y, Okada M, Sato N, Nishino I, Sasaki M: Transient swelling in the globus pallidus and substantia nigra in childhood suggests SENDA/ BPAN. ***Neurology.*** 90(21): 974-976, May, 2018
9. Ishiyama A, Muramatsu K, Uchino S, Sakai C, Matsushima Y, Makioka N, Ogata T, Suzuki E, Komaki H, Sasaki M, Mimaki M, Goto YI, Nishino I: NDUFAF3 Variants that Disrupt Mitochondrial Complex I Assembly may associate with Cavitating Leukoencephalopathy. ***Clin Genet***. 95(5): 1103-1106, May, 2018
10. Nakamori M, Hamanaka K, Thomas JD, Wang ET, Hayashi YK, Takahashi MP, Swanson MS, Nishino I, Mochizuki H: Aberrant Myokine Signaling in Congenital Myotonic Dystrophy. ***Cell Rep***. 21(5):1240-1252, Oct, 2017
11. Noguchi E, Uruha A, Suzuki S, Hamanaka K, Ohnuki Y, Tsugawa J, Watanabe Y, Nakahara J, Shiina T, Suzuki N, Nishino I: Skeletal Muscle Involvement in Antisynthetase Syndrome. ***JAMA Neurol***. 74(8): 992-999, Aug, 2017

筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発

分担研究者　西野一三
所属　国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　疾病研究第一部

緒言

国立精神･神経医療研究センターでは過去 40 年に亘り筋病理診断を中心とする診断サービスを全国の医療機関に向けて提供し、本邦の筋疾患医療を下支えしてきた。その結果として本邦筋生検の約 8 割が集まる、名実ともに国内のセンターとして機能するに至っている。その結果構築された筋レポジトリーは、世界最高水準の規模と品質を有するに至っている。本申請研究においては、この筋疾患診断ネットワークと筋レポジトリーを更に発展させる事を第一の目的とし、それを基盤として活用し、次世代解析技術等を活用しつつ肢帯型筋ジストロフィー関連疾患の分子病態解明とそれに基づく診断法・治療法開発を進めることを目的とする。

方法

（1）筋疾患診断ネットワークと筋レポジトリーの発展

全国の医療施設に向けて高度専門的な知識と技術を要する筋病理診断を中心とする筋疾患診断を提供する。その結果として集まる、凍結筋を中心とする検体は筋レポジトリーとして保管し、神経・筋疾患の病因・病態解明と治療法開発研究に役立てる。また国際的均てん化にも寄与すべく、筋疾患に関する教育を行う。

（2）病因・病態解明

主に AMED のプロジェクトにより行われる次世代解析等により新たに明らかとなった原因遺伝子あるいはその候補について、その病因・病態を明らかにする。具体的には、筋レポジトリーにおいて更なる同様の症例がないかを確認するとともに、臨床病理所見の詳細を明らかにする。また、培養細胞、モデル動物作製等によりその分子病態を明らかにする。

（3）診断法開発

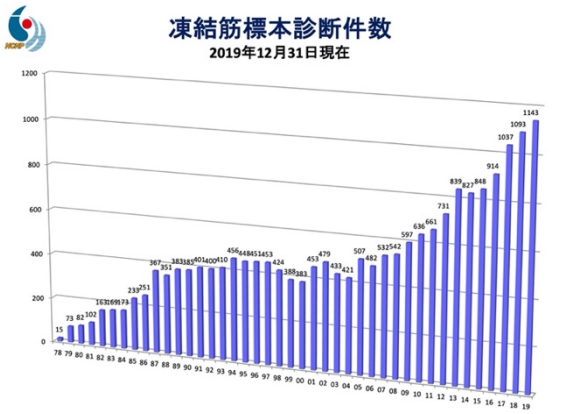
筋レポジトリー検体を有効活用し、より優れた診断マーカーを明らかにする。

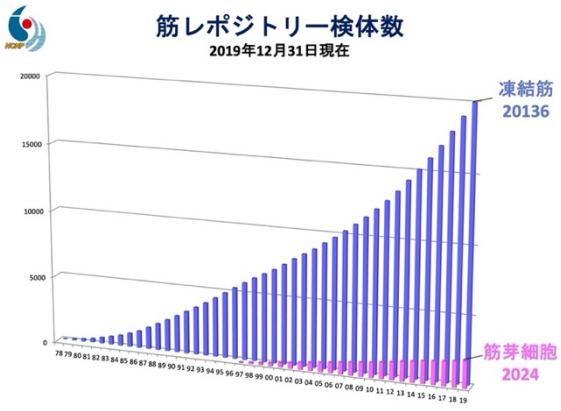
結果

（1）筋疾患診断ネットワークと筋レポジトリーの発展

a）筋病理診断と検体数

2017 年～2019 年（暦年）の 3 年間、毎年、総筋病理診断件数は 1000 件を突破し更に増え続けた。その結果、2019 年の年間診断総件数は史上最高の 1143 件に達した。





また、総検体数は、2 万検体を突破して 2019 年末で 20136 検体となり、名実ともに世界最大規

模の筋レポジトリーとなった。培養筋も 2 千件を突破し、総検体数 2024 件となった。神経・筋疾患研究支援基盤として各種研究活用されることで、筋疾患学の発展に寄与した。

b) 国際的均てん化と筋疾患教育

タイ・マヒドン大学との共同で、第 1 回国際筋病理セミナーを 2018 年 8 月 15 日-17 日に、第 2 回を 2019 年 6 月 27 日-29 日に、何れもマヒドン大学シリラート病院（バンコク）で開催した。タイ、ミャンマー、ベトナムの基幹病院から脳神経内科医・小児科医・病理医が参加し大変好評であった。また同病院と共同で、筋生検および検体固定方法の解説ビデオ（日本語版・英語版・タイ語版の 3 バージョンがある）を作成し、2018 年 1 月より疾病研究第一部 HP 上で公開した。世界 95 カ国／地域よりアクセスがあった。World Federation of Neurology の News でも取り上げられるとともに、国内外の 8 学術団体から推薦を受けた。

2) 病因・病態解明

a) ADSSL1 ミオパチー

近年韓国から 7 家系 9 例の新たな遠位型ミオパチーとして ADSSL1 ミオパチーが報告されている。これまでに国立精神・神経医療研究センターで筋病理診断を行った例を再検討したところ、63 例（59 家系）で *ADSSL1* 遺伝子の両アレル性の変異が同定された（**Neurology**, *in press*）。何れの症例でもネマリン小体が認められ、病理学的にはネマリンミオパチーに分類されると考えられた。一方、脂肪滴を有する筋線維が少数認められるという特徴も認められた。本質的には代謝性疾患であることから、治療法開発を目指して、モデル動物作製を進めている。

b) *COX6A2* 遺伝子変異による新たなチトクローム C 酸化酵素（COX）、欠損症 *COX6A2* 遺伝子変異による COX 欠損症患者 2 家系 2 人を、世界で初めて見いだした（**Ann Neurol** 2019）。患者およびノックアウトマウス骨格筋では、COX の酵素活性と COX 複合体のアセンブリーが低下していた。Hela 細胞に、野生型/変異型 COX6A2 を発現させたモデルにおいては、変異型では野生型と異なる形態的特徴を認めた。これは、世界で初めての横紋筋特異的サブユニット異常による COX 欠損症である。

c) 眼咽頭遠位型ミオパチー（OPDM）の原因遺伝子同定

東京大学・石浦博士らとの共同研究で、OPDM が *LRP12* 遺伝子の CGG リピート伸長によることを明らかにした（**Nat Genet** 2019）。さらに 34 家系 36 名の日本人患者で検討したところ、男性患者が女性患者の 2 倍多いことが明らかとなった（論文投稿中）。*LRP12* 遺伝子の CGG リピート伸長の発見を契機として、北京大学との共同研究で、*GIPC* 遺伝子の CGG リピート伸長も OPDM の原因となること（**Am J Hum Genet** 2020）、さらには、神経核内封入体病の原因である *NOTCH2NLC* 遺伝子の CGG リピート伸長によっても OPDM を来しうること（論文投稿中）を相次いで同定した。

d) 乳児重症型ミトコンドリア脳筋症の新規原因遺伝子

各種代謝性ミオパチーを対象とした原因遺伝子変異同定を試み、乳児重症型のミトコンドリア脳筋症で 3 つの新たな原因遺伝子（*IBA57*、*UNDUFAF3*、*WDR45*）を見いだした（**Neurol Genet** 2017, **Clin Genet 2018**, **Neurology 2018**）。

3) 診断法開発

a) 筋炎マーカー開発

これまでに皮膚筋炎ではミクソウイルス抵抗性タンパク質 A（MxA）が筋線維に発現してい

ること、また MxA の発現により皮膚筋炎の診断が可能であることを報告してきた。MxA の発現を確認し、更に皮膚筋炎特異的自己抗体を確定している 182 例について調べたところ、14 例は皮膚症状を呈していなかった。このことは、これまでその存在について疑問視する声が多かった dermatomyositis sine dermatitis が確かに存在することを初めて明らかにした。またこの 14 例のうち 12 例は、抗 NXP-2 抗体陽性であり、dermatomyositis sine dermatitis が抗 NXP-2 抗体と強く関連していることが明らかとなった（**JAMA Neurol** 2020）。また、陽性皮膚筋炎特異的自己抗体別のサブタイプで臨床病理所見が異なるかどうかを検討したところ、抗 Mi-2 抗体陽性の皮膚筋炎では、筋線維膜上への MAC 沈着を伴う perifascicular necrosis, 筋周鞘のアルカリホスファターゼ活性、筋周鞘結合組織断片化など、抗合成酵素症候群様の筋病理所見を呈していた（**Neurology**, in revision）。一方、抗 Jo-1 抗体など抗 ARS 抗体が陽性の抗合成酵素症候群も皮膚科およびリウマチ膠原病科では皮膚筋炎に分類される。そこで抗 ARS 抗体陽性であった 194 例について MxA の発現を調べたところ、筋線維での発現が認められたのは 3 例のみであった（**Neuropathol Appl Neurobiol** 2019）。このうち 1 例は皮膚筋炎特異的自己抗体である抗 MDA5 抗体が陽性であった。このことは、抗合成酵素症候群と皮膚筋炎は異なる疾患であることを示している。

b)コア鑑別法

セントラルコアはセントラルコア病の重要な所見であり、*RYR1* の C 端領域の変異により生じる。しかし、N 端領域にある変異では、やや非典型的なコアが出現する。一方、*RYR1* 変異以外の理由でもコア病変は生じる。例えば、いわゆる target fiber や targetoid fiber と呼ばれる所見も、セントラルコアとの鑑別が難しい場合がある。そこで RYR1 変異によるコア病変とそれ以外の理由によるコア様病変とを鑑別するマーカーを検索したところ、RYRI 変異例では、RYR1 に加えて、triadin などがコア構造内で発現していた。この所見は、RYR1 変異によるコア病変とそれ以外の理由によるコア様病変とを鑑別するマーカーとなり得る（**J Neuropathol Exp Neurol**, in press）。

考察

（1）筋疾患診断ネットワークと筋レポジトリーの発展

筋病理診断件数は順調に増加し、2017 年～2019 年（暦年）と 3 年連続で 1000 検体を越えた。総検体数はついに 2 万検体を超えた。恐らく本邦で施行されている筋生検の約 8 割の検体が国立精神・神経医療研究センターに送付されているものと推測される。送付された検体に対しては、全例に 20 種類以上の組織化学染色を施行するとともに、70%以上の例に対して筋ジストロフィー関連蛋白質および筋炎関連蛋白質を網羅する免疫染色が施行されており、名実ともに、世界最高峰の質と量を誇る筋レポジトリーと言える。

（2）病因・病態解明

ADSSL1 変異例は韓国からの先行論文とは異なり、遠位型ミオパチー例だけでなく、近位筋優位に筋障害を来す例が相当数あった。また病理学的にはタイプ 1 線維優位に加えて、全例でネマリン小体を認めたことから、病理学的にはネマリンミオパチーと分類することが可能である。ADSSL1 ミオパチーは、遺伝学的に診断された本邦例の中では、最も頻度の高いネマリンミオパチーであることが明らかとなった。OPDM は長らく原因が不明であったが、筋レポジトリー検体を用いた解析により、一気に 3 つ

の原因遺伝子が同定されるに至った。

（３）診断法開発

筋炎研究に関しては、筋線維での MxA が皮膚筋炎の診断マーカーとなることを報告して来たことを元に、これまでその存在が疑問視されていた dermatomyositis sine dermatitis が確かに存在すること、更には、dermatomyositis sine dermatitis は抗 NXP-2 抗体と強く関連していることを初めて明らかにする事ができた（JAMA Neurol 2020）。また皮膚科およびリウマチ膠原病科ではしばしば皮膚筋炎として扱われる抗合成酵素症候群が皮膚筋炎と異なる病態を有していることを明らかにした（**Neuropathol Appl Neurobiol** 2019）。また *RYR1* 変異によるコア病変とそれ以外の理由によるコア様病変とを鑑別するマーカーとして、RYR1 および triadin のコア構造内での発現が、*RYR1* 変異によるコア病変とそれ以外の理由によるコア様病変とを鑑別するマーカーとなり得る事を明らかにした（**J Neuropathol Exp Neurol**, in press）。これらは何れも筋レポジトリー検体を活用したものであり、金レポジトリーの質の高さが改めて示されたと言える。

結論

筋病理診断件数が 3 年連続で 1000 件を突破し、凍結筋層検体数は 2 万件体を突破した。名実ともに世界最高峰の質と量を誇る筋レポジトリーと言える。ADSSL1 ミオパチーは日本で最も頻度の高いネマリンミオパチーである。LRP12, GIPC1, NOTCH2NLC の非翻訳領域の CGG リピート伸長が OPDM の原因である。Dermatomyositis sine dermatitis は確かに存在し、抗 NXP-2 抗体と関連する。

参考文献

1. Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, Suzuki Y, Qu W, Doi K, Almansour MA, Kikuchi JK, Taira M, Mitsui J, Takahashi Y, Ichikawa Y, Mano T, Iwata A, Harigaya Y, Matsukawa MK, Matsukawa T, Tanaka M, Shirota Y, Ohtomo R, Kowa H, Date H, Mitsue A, Hatsuta H, Morimoto S, Murayama S, Shiio Y, Saito Y, Mitsutake A, Kawai M, Sasaki T, Sugiyama Y, Hamada M, Ohtomo G, Terao Y, Nakazato Y, Takeda A, Sakiyama Y, Umeda-Kameyama Y, Shinmi J, Ogata K, Kohno Y, Lim SY, Tan AH, Shimizu J, Goto J, Nishino I, Toda T, Morishita S, Tsuji S: Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. ***Nat Genet.*** 51(8):1222-1232, Aug, 2019
2. Tanboon J, Nishino I: Classification of idiopathic inflammatory myopathies: pathology perspectives. ***Curr Opin Neurol.*** 32(5):704-714, Oct, 2019
3. Inoue M, Tanboon J, Okubo M, Theerawat K, Saito Y, Ogasawara M, Indrawati LA, Uruha A, Okiyama N, Fujimoto M, Suzuki S, Nishino I: Absence of sarcoplasmic myxovirus resistance protein A (MxA) expression in antisynthetase syndrome in a cohort of 194 cases. ***Neuropathol Appl Neurobiol.*** 45(5): 523-524, Aug, 2019

4. Inoue M, Uchino S, Iida A, Noguchi S, Hayashi S, Takahashi T, Fujii K, Komaki H, Takeshita E, Nonaka I, Okada Y, Yoshizawa T, Van Lommel L, Schuit F, Goto YI, Mimaki M, Nishino I: COX6A2 variants cause a muscle-specific cytochrome c oxidase deficiency. ***Ann Neurol***. 86(2): 193-202, Aug, 2019
5. Ishiyama A, Kimura Y, Iida A, Saito Y, Miyamoto Y, Okada M, Sato N, Nishino I, Sasaki M: Transient swelling in the globus pallidus and substantia nigra in childhood suggests SENDA/ BPAN. ***Neurology.*** 90(21): 974-976, May, 2018
6. Ishiyama A, Muramatsu K, Uchino S, Sakai C, Matsushima Y, Makioka N, Ogata T, Suzuki E, Komaki H, Sasaki M, Mimaki M, Goto YI, Nishino I: NDUFAF3 Variants that Disrupt Mitochondrial Complex I Assembly may associate with Cavitating Leukoencephalopathy. ***Clin Genet***. 95(5): 1103-1106, May, 2018
7. Nakamori M, Hamanaka K, Thomas JD, Wang ET, Hayashi YK, Takahashi MP, Swanson MS, Nishino I, Mochizuki H: Aberrant Myokine Signaling in Congenital Myotonic Dystrophy. ***Cell Rep***. 21(5):1240-1252, Oct, 2017
8. Noguchi E, Uruha A, Suzuki S, Hamanaka K, Ohnuki Y, Tsugawa J, Watanabe Y, Nakahara J, Shiina T, Suzuki N, Nishino I: Skeletal Muscle Involvement in Antisynthetase Syndrome. ***JAMA Neurol***. 74(8): 992-999, Aug, 2017

筋ジストロフィーにおけるカベオリン-3-TGF-βシグナルの解明と分子標的医薬の開発

分担研究者　大澤　裕
所属　川崎医科大学　神経内科学

緒言

近年、筋萎縮発症の分子機構が徐々に明らかとなり、その克服を目指す治療薬の開発が盛んである。ところが、日本では筋萎縮を適応に保険適応を獲得している薬剤は皆無である。

マイオスタチンは、骨格筋量を負に制御する骨格筋特異的な TGF-β分子として同定され、その阻害は筋ジストロフィーおよび関連筋消耗性疾患の治療戦略として世界的に脚光を浴びている。米国 FDA は、2013 年からそのタイプ II 膜受容体を標的とするヒト化阻害抗体医薬を孤発性封入体筋炎に対する break-through therapy と認定して、治験が実施されている。さらにマイオスタチンリガンド阻害抗体医薬やデコイ受容体医薬のデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)を対象とした治験も進行中である。

マイオスタチン N 末端に相当するプロドメインは 239 アミノ酸残基から構成され、血中ではプロドメインが C 末端の活性をもつアクティブドメイン（リガンド）を非共有結合で包含し、その活性を抑制する不活性型複合体を形成していることが知られている。われわれは、これまでに、カベオリン-3 欠損肢帯型筋ジストロフィー（LGMD1C）モデルマウスでは、カベオリン-3 欠損により、その結合タンパク質であるマイオスタチン膜受容体キナーゼが活性化して筋萎縮が発症すること、プロドメイン高発現マウスとの交配により筋萎縮が改善することを発表した（Ohsawa, J Clin Invest 116, 2006)。さらにプロドメイン全長 239 アミノ酸残基のうち、マイオスタチン *in vitro* 転写活性を 79%阻害する 29 アミノ酸残基から構成される阻害活性中心(Inhibitory core: IC) が存在することを見出した（PCT: WO2014/119753; PLoS One 10, 2015）。

本研究は、特殊ペプチドのスクリーニング技術によって、IC ペプチドよりマイオスタチン阻害活性が高く、血中安定性も高いペプチドを同定する。LGMD1C モデルマウス、および最重症型 DMD モデルマウスに全身投与して、将来の First-in-human 治験の実施の基盤となる非臨床 POC 取得を目標とする。

方法

(i)マイオスタチンリガンドを探索プローブとして、これに結合するペプチドを、ペプチドライブラリーからスクリーニングする。(ii)得られたペプチド群について構造活性相関解析を施行して阻害活性を予測する。(iii)ペプチド群を、それぞれマイオスタチン転写活性測定系（ヒト胎児腎芽細胞 HEK293-$(CAGA)_{12}$-luc レポーター遺伝子系）に添加し、リコンビナントマイオスタチン刺激によるレポーター遺伝子発現によって *in vitro* 阻害活性を測定する。(iv)阻害活性の高いペプチド群について、野生型及び LGMD1C モデルマウスの前脛骨筋へ局所投与し、4 週後に筋量・筋力を測定して筋肥大効果を検討する。(v)筋肥大効果の高いペプチドについて、化学修飾を施す。阻害活性、ADME 試験、PK 試験により血中安定性が高率なペプチドを選択する。(vi)得られた特殊ペプチドを最重症型デュシェンヌ型筋ジストロフィー　(DMD) モデル DBA/2-*mdx* マウスに静脈投与し、筋萎縮・筋力低下・ジストロフィー変化に対しての有効性を検討する。

結果

①スクリーニングにより、マイオスタチンリガンドに結合するペプチド群を得た。②構造活性相関解析によって、マイオスタチン阻害が予測されるペプチド群を選択した。③*in vitro* マイオスタチン転写活性測定により、プロトタイプである IC ペプチドと比較して、阻害活性が 100 倍以上の阻害ペプチド群を絞り込んだ。③さら

に、阻害ペプチド群を LGMD1C モデルマウスの前脛骨筋に注射し、4 週間目に筋量・筋力が増大し、かつ、マイオスタチンの細胞内エフェクターであるリン酸化 Smad2 量が低下するペプチド群を選択した。④このペプチドを修飾した。その ADME 試験、および PK 試験により、肝マイクロゾーム安定性、血中安定性の極めて高い特殊ペプチドを同定した。⑤特殊ペプチドの最重症型 DMD モデル DBA/2-*mdx* マウスへの静脈投与の取り組みを開始した。

考察

本研究で得られたマイオスタチン阻害特殊ペプチドは、プロトタイプであるプロドメインの IC ペプチドと比較して、マイオスタチン阻害活性、および血中安定性が卓越している。ワンショット静注試験により投与法を設定、次いで、用量漸増試験により、有効域・安全域を確定する予定としている。2020 年度には、特殊ペプチドの DMD モデルマウスの筋萎縮・筋力低下・ジストロフィー変化に対する有効性と安全性を明らかとして、非臨床 POC を取得したい。

骨格筋量を負に制御、すなわち骨格筋から分泌される骨格筋サイズを決定するマイオスタチンの阻害戦略は、魅力的な筋萎縮の治療アプローチであると考えられる。現在、この分子の発見から 20 年を経て、阻害医薬の臨床応用が、現実のものとなろうとしているが、これら医薬には依然として検討事項も山積している。下肢筋のマイオスタチンを条件付きでノックアウトすると、血中のマイオスタチン濃度は半減するにも関わらず、下肢筋のみの筋肥大が達成され、一方、上肢筋には骨格筋量の変化がないという。この結果からは、マイオスタチンは autocrine の作用が主体であり、血中のマイオスタチンリガンドを阻害する戦略が有効か否かについて、さらに検討する必要がある。また骨格筋幹細胞である筋衛星細胞を欠損したマウス骨格筋でも、マイオスタチン阻害によって骨格筋量が増大することから、マイオスタチンは主に速筋線維で作用すると考えられる。この筋線維周囲ないし筋線維内部への阻害医薬の特異的デリバリー法の確立できれば、マイオスタチン阻害医薬の今後の臨床応用に向けた真の break-through となるものと予想される。

本研究が成功すれば、筋ジストロフィーだけでなく、ミオパチーなどの骨格筋消耗性疾患だけではなく、加齢性筋萎縮（サルコペニア）や廃用症候群など広範な臨床応用が期待できる。すなわち、現在の厚生労働施策の課題である希少疾患対策(Unmet Medical Needs) ばかりでなく、超高齢化社会を迎える本邦の国民的課題である介護医療費削減に発展するものと考えられる。マイオスタチン阻害特殊ペプチドによる筋消耗性疾患治療法の臨床応用に向け、ジストロフィーおよび関連筋消耗性疾患の対象患者に対する治験実施を最終目標とする。

結論

同定したマイオスタチン阻害特殊ペプチドは、プロトタイプ IC ペプチドから 100 倍以上と卓越した阻害活性を示し、局所投与によってカベオリン-3 欠損 LGMD1C モデルマウスの筋萎縮と筋力低下が改善した。現在、最重症型デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウス（DBA/2-*mdx*）全身投与の有効性を検証する研究を進めている。ペプチド医薬による筋ジストロフィーdisease modifying therapy の実現を目指す。

参考文献

1. Takayama K, Noguchi Y, Aoki S, Takayama S, Yoshida M, Asari T, Yakushiji F, Nishimatsu S, Ohsawa Y, Itoh F, Negishi Y, Sunada Y, Hayashi Y. Identification of the minimum peptide from mouse myostatin prodomain for human myostatin inhibition. J Med Chem, 58(3):1544-1549, Feb, 2015
2. Ohsawa Y, Takayama K, Nishimatsu S, Okada T, Fujino M, Fukai Y, Murakami T, Hagiwara H, Itoh F, Tsuchida K, Hayashi Y, Sunada Y. The Inhibitory Core of the Myostatin Prodomain: Its Interaction with Both Type I and II Membrane Receptors,

and Potential to Treat Muscle Atrophy. PLoS One, 10(7): e0133713, Jul, 2015
3. Fukai Y, Ohsawa Y, Ohtsubo H, Nishimatsu SI, Hagiwara H, Noda M, Sasaoka T, Murakami T, Sunada Y. Cleavage of β-dystroglycan occurs in sarcoglycan-deficient skeletal muscle without MMP-2 and MMP-9. Biochem Biophys Res Commun, 492(2):199-205, Oct, 2017

Dysferlinopathy および類似疾患の次世代シークエンサーを用いた診断および結合蛋白に注目した病態研究

分担研究者　青木正志

研究協力者

小野洋也 1)、鈴木直輝 1)、菅野新一郎 2)、井泉瑠美子 1)、髙橋俊明 3)、割田 仁 1)、加藤昌昭 1)、西山亜由美 1)、島倉奈緒子 1)、舟山 亮 4)、中山啓子 4)、新堀哲也 5)、青木洋子 5)、三宅克也 6,7)、林 由起子 8)、川原玄理 8)

所属

1 東北大学 神経内科
2 東北大学 加齢医学研究所
3 仙台西多賀病院
4 東北大学 細胞増殖制御学
5 東北大学 遺伝医療学
6 香川大学 組織細胞生物学
7 国際医療福祉大学 基礎医学研究センター
8 東京医科大学 病態生理学

緒言

Dysferlinopathy とは、筋細胞膜タンパク質 dysferlin の欠損によって引き起こされる成人発症の筋ジストロフィーの総称である。dysferlin 欠損によって筋細胞膜の修復機構が損なわれ、そのため筋細胞の変性、壊死が生じると考えられている。これまで dysferlin のほかにも筋細胞膜修復に関与する dysferlin 結合タンパク質が複数報告されているが、細胞膜修復機構の詳細はいまだ不明である。明らかになっていない鍵分子の存在が考えられる。本研究では、新規結合タンパク質を同定し、レーザー膜損傷の実験系を用いて、筋細胞膜修復機構の全容解明を目指す。そして、得られた知見をもとに治療法開発に取り組む。

方法

Dysferlin のドメイン構造に着目し、特定領域のアフィニティカラムを作成する。このカラムに細胞抽出物を反応させて相互作用するタンパク質を抽出し、SDS-PAGE により分離して、質量分析にかけることで結合タンパク質を同定する。そしてレーザー膜損傷の実験系を用いて膜修復機構への関与を評価する。さらに薬剤スクリーニングにより細胞膜修復の治療候補を探索し、動物モデルへの薬剤投与による運動機能や骨格筋構造の異常回復効果の検証を経て、治療応用につなげる。

結果

Dysferlin 特定領域のアフィニティカラムを作成し、細胞抽出物を反応させて相互作用するタンパク質を抽出し、SDS-PAGE により分離して、質量分析にかけることで、複数の dysferlin 結合タンパク質を同定した。同定した結合タンパク質の一つである AMPK 複合体に注目し、レーザー膜損傷の実験系を用いて解析を行った。マウス骨格筋において AMPK 複合体がレーザーによる膜損傷部位に集積し、また培養細胞において AMPK 遺伝子発現抑制が筋細胞膜修復機能の低下に繋がることを発見した。さらに dysferlin 欠損マウス骨格筋のレーザー膜損傷で、AMPK 複合体の損傷部位への集積が遅延することから、膜修復機構において、dysferlin が AMPK 複合体の局在を規定している（dysferlin が足場タンパク質として機能している）ことを見出した。さらに AMPK 活性化剤の投与により、*dysferlin* 変異をもつ患者培養細胞において膜修復機能が改善することを明らかにするとともに、dysferlinopathy のモデル動物（ゼブラフィッシュおよびマウス）において骨格筋の障害が改善することを確認した。

考察

AMPK 複合体について、筋細胞膜修復に関与する既報の分子との関連についても今後解析をすすめ、膜修復機構の全容解明と dysferlinopathy の病態解明につなげていく。

また、AMPK 活性化剤のモデル動物の異常回復効果の検証実験において、今回はドラッグ・リポジショニングの観点から、糖尿病治療薬であるメトホルミンの経口投与を行ったが、骨格筋の AMPK リン酸化は限定的であり、その効果は筋病理の一部改善に留まった。AMPK は全身のエネルギー代謝に関する分子である。骨格筋特異的に、より強い AMPK リン

酸化を目的として、ゲノム創薬など低分子以外の薬剤や薬物送達法に関する検討も今後行っていく。

結論

本研究で得られた AMPK 複合体が損傷を受けた筋細胞膜の修復において重要な役割を担っているという新たな知見は、根治療法がいまだない dysferlinopathy の治療法の開発に結びつく可能性がある。

本研究成果は、2020 年 2 月に米国遺伝子細胞治療学会の機関誌である「Molecular Therapy」のオンライン版に掲載された。

参考文献

Ono H, Suzuki N, Kanno SI, Kawahara G, Izumi R, Takahashi T, Kitajima Y, Osana S, Nakamura N, Akiyama T, Ikeda K, Shijo T, Mitsuzawa S, Nagatomi R, Araki N, Yasui A, Warita H, Hayashi YK, Miyake K, Aoki M. AMPK Complex Activation Promotes Sarcolemmal Repair in Dysferlinopathy. Mol Ther. 28:1133-1153, 2020

Shioya A, Takuma H, Takahashi T, Ishii A, Aoki M, Tamaoka A. Radiological Findings in Siblings With Dysferlin Mutation With Diverse Phenotype. J Neurol Sci. 409: 116579, 2020

福山型筋ジストロフィーおよび類縁疾患の分子病態および治療に関する研究

分担研究者
戸田 達史 1)

研究協力者
池田真理子 2)

所属
1) 東京大学大学院・医学系研究科・神経内科学
2) 藤田医科大学病院・臨床遺伝科

緒言

福山型筋ジストロフィー（FCMD と略）は重度の筋病変と中枢神経細胞異動をきたす難病であり治療法がない。原因遺伝子フクチンの 3’非翻訳領域に日本人に特有のレトロトランスポゾン挿入があり、その挿入変異に特異的な異常スプライシングが誘導され、αジストログリカン（αDG）の O マンノース型糖鎖修飾の欠損がみられ発症する。スプライシング異常により産生される異常フクチンは、その局在がゴルジ体から ER に変化し、機能を喪失する。われわれは、細胞・動物などのモデルを用いて、創薬開発のためのスクリーニング法を確立した。また、これまでに挿入変異とノックアウト型の複合ヘテロマウスでは、αDG の糖鎖修飾は減少するものの、筋の表現型はなく、中枢においてはそのフェノタイプを認めない。福山型筋ジストロフィーの治療法開発には中枢の病状を反映するモデル作成が必須である。

方法

我々はスプライシング異常、局在異常、αDG 糖鎖修飾異常の 3 つの方向性から、そのアッセイ系を作成し、既存のドラッグパネルを用いて薬剤スクリーニングを行った。

また FCMD 患者より iPSC を樹立し、その機能を評価した。また iPSC より無血清凝集浮遊培養法（SFEBq 法）をもちいて大脳皮質への分化誘導を行った。

結果

薬剤スクリーニングのアッセイ系では、1 スプライシング異常を改善する薬剤が 12 個同定された。その中にはすでにスプライシング調節に関与することが知られている薬剤が含まれていた（未発表）。しかし、我々の開発薬であるアンチセンス核酸の効果を超える薬剤はみつからなかった。局在異常を改善する薬剤は同定されなかった。αDG の糖鎖修飾を改善する薬剤も複数同定した。

また疾患由来 iPSC をもちいて大脳皮質オルガノイドを作成した。大脳皮質オルガノイドでは脳表のαDG の低下がみられた。

考察

局在異常については、もともと異常フクチンにおいて、フクチンの活性がないことにより、局在を変化させても機能的な回復は乏しい可能性が示唆された。スプライシング異常を是正する薬剤に関しては、もともとのスプライシング異常の特異性が高いため、アンチセンス核酸のような分子標的でないと効果が出にくい可能性があると考えられた。

結論

FCMDの病態に基づいたスクリーニング系を作成し、ドラッグスクリーニングを行った。スプライシング異常の改善・糖鎖修飾の改善をもたらすリード化合物が複数同定された（未発表・投稿準備中）。これら化合物は今後 iPSC 含めさまざまなモデルをもちいて検討を予定している。

参考文献

Ujihara Y, Kanagawa M, Mohri S, Takatsu S, Kobayashi K, Toda T, Naruse K, Katanosaka Y. Elimination of fukutin reveals cellular and molecular pathomechanisms in muscular dystrophy-associated heart failure. *Nat Commun.* 2019 Dec 17;10(1):5754.

神経筋接合部・筋の信号伝達障害の病態機構解明と治療研究

分担研究者　大野欽司 [1)]
研究協力者　Kun Huang[1)], Guiying Chen[1)], 増田章男 [1)], 木下正信 [2)], 加門正義 [3)], 荒木敏之 [3)]

[1)] 名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学
[2)] 夢眠クリニック大宮北
[3)] 国立精神･神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第 5 部

緒言

筋強直性ジストロフィー1 型(myotonic dystrophy type I, DM1)は *DMPK* 遺伝子の 3’UTR の異常延長 CUG 繰り返し配列に RNA 結合タンパク MBNL1 が異常集積し MBNL1 の機能低下が起きるとともに、別の RNA 結合タンパク CUGBP1 の活性化がおきることによりスプライシング異常を含む mRNA 代謝異常により各種病態を呈する[1,2]。DM1 に合併する糖尿病・白内障・高コレステロール血症などに対する対症療法はあるが、患者の ADL の低下に大きく寄与する筋力低下・筋委縮に対する確立した治療法はない。アンチセンスオリゴヌクレオチドにより異常延長した CUG 繰り返し配列への MBNL1 への集積を抑制する治療法が現在開発されつつある。

我々は以前に本研究班において、広く臨床応用されている既認可薬の新規薬効を同定し、特に希少疾患に対して適用するドラッグリポジショニング戦略を DM1 に対して用い、非ステロイド性抗炎症薬(nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAID) フェニルブタゾン(PBZ)が DM1 に対して有効であることを同定した[3]。PBZ は C2C12 筋芽細胞に対して濃度依存性に Mbnl1 の mRNA 発現ならびにタンパク発現を上昇させ、HSA^{LR} DM1 モデルマウスにおいて PBZ 経口投与は MBNL1 の mRNA 発現ならびにタンパク発現を上昇させた。さらに PBZ はモデルマウスの筋力低下を改善し、*Clcn1, Nfix, Rpn2* 遺伝子のスプライシングを補正した。さらに、PBZ は筋の中心核を減少させ、クロライドチャンネルの膜発現を上昇させた。PBZ は *Mbn1* の第 1 イントロンのメチレーションを減少させ、*Mbnl1* の転写を促進した。さらに、C2C12 筋管ならびに RNA EMSA にて、PBZ は CUG 繰り返し配列と MBNL1 の異常集積を抑制することを報告した。本研究では他の NSAIDs の DM1 への効果を検証することにより NSAIDs の DM1 に対する効果のメカニズムの解明を試みた。

方法

MBNL1 プロモータ領域に firefly luciferase 遺伝子をつなぎ C2C12 筋芽細胞に導入した。29 種類の既認可 NSAID 100 μM を付加し、firefly luciferase 活性を測定し NSAID のスクリーニングをおこなった。同様に、C2C12 筋芽細胞を用いて 100 μM NSAID による MBNL1 発現誘導を qRT-PCR と Western blotting により解析を行った。COX1 siRNA と COX2 siRNA の MBNL1 発現に対する影響を C2C12 筋芽細胞を用いて qRT-PCR と Western blotting により調べた。Mnbnl1 intron 1 のメチル化部位 MeR2 に対する COX1 siRNA と COX2 siRNA の効果を bifulfite sequencing により調べた。また、C2C12 筋管に対して MeR2 を CRISPR/Cas9 で欠損させることにより COX1 siRNA 効果と COX2 siRNA 効果の変化を調べた。

結果

MBNL1 プロモータ領域に firefly luciferase 遺伝子をつなぎ C2C12 筋芽細胞に導入した。29 種類の既認可 NSAID 100 μM のスクリーニングにより 13 種類の NSAIDs が MBNL1 の発現を誘導することを同定した。特に COX1 選択的 NSAIDs により効果を認めた。COX1 siRNA は mRNA レベルでもタンパクレベルでも MBNL1 の発現を誘導したが、COX2 siRNA には効果を認めなかった。同様に DM1 患者由来 iPS 細胞から誘導した筋管において COX1 siRNA のみ

MBNL1 発現誘導効果を認めた。C2C12 細胞の *Mbnl1* intron 1 のメチル化部位 MeR2 を bifulfite sequencing と MeDIP により定量をおこない、COX1 siRNA のみが MeR2 のメチル化を抑制することを明らかにした。また、C2C12 筋管に対して MeR2 を CRISPR/Cas9 で欠損させることにより COX1 siRNA による MBNL1 発現誘導効果が消失することを同定した。

考察

COX1 抑制は *Mbnl1* intron 1 MeR2 のメチル化を抑制することにより MBNL1 発現誘導を起こすことを明らかにした[4]。

結論

COX1 選択的 NSAIDs は DM1 に対する治療薬となり得ることが期待される。

参考文献

1. Batra R, Charizanis K, Manchanda M, Mohan A, Li M, Finn DJ, Goodwin M, Zhang C, Sobczak K, Thornton CA, Swanson MS. Loss of MBNL leads to disruption of developmentally regulated alternative polyadenylation in RNA-mediated disease. *Mol Cell.* 2014, 56: 311-22.
2. Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep.* 2012, 2: 209.
3. Chen G, Masuda A, Konishi H, Ohkawara B, Ito M, Kinoshita M, Kiyama H, Matsuura T, Ohno K. Phenylbutazone induces expression of MBNL1 and suppresses formation of MBNL1-CUG RNA foci in a mouse model of myotonic dystrophy. *Sci Rep.* 2016, 6: 25317.
4. Huang K, Masuda A, Chen G, Bushra S, Kamon M, Araki T, Kinoshita M, Ohkawara B, Ito M, Ohno K. Inhibition of cyclooxygenase-1 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs demethylates MeR2 enhancer and promotes Mbnl1 transcription in myogenic cells. *Sci Rep.* 2020, 10: 2558.

-

遺伝性ミオパチーの筋変性機序の解明と治療法の開発

分担研究者　林由起子

所属　東京医科大学病態生理学分野

緒言

エメリー・ドレイフス筋ジストロフィー(EDMD)のモデルマウスはこれまでにも複数作製され、解析されてきたが骨格筋に関する研究は少ない。その背景に、症状を反映する適切なモデル動物がいなかったことが挙げられる。

方法

筋ジス症状を呈さないエメリン欠損(Emd)マウスと進行性の心筋障害を起こすラミンA/C変異導入(H222P)マウスを交配させた重複変異(EH)マウスを作製し、これらの変異が骨格筋と心筋にどのような影響を与えるかを検討するとともに、病態の発症メカニズムを探索した。

結果

EHマウスはEmdマウスとH222Pマウス同様に、発生や成長障害はなくホモで系統維持が可能であった。18週頃からH222Pマウスと同様に心不全の兆候を示し体重の減少が認められた。30週齢で骨格筋と心筋を解析した結果、EHマウスの心筋障害はH222Pマウスと同程度であったが、骨格筋は明らかに症状が悪化していた。

骨格筋の病態機序を明らかにするため、心機能が正常に保たれている 12 週齢で解析を進めた。EHマウスは骨格筋の核構造異常が認められ、さらに筋線維の大小不同、再生筋線維の増加、炎症の増加などの筋ジストロフィー症状を示した。さらに運動能が有意に低下していること、運動負荷を与えると EH マウスの筋病理変化が増悪することが明らかとなった。

幹細胞の機能低下は、核膜病の病態メカニズムに関与していると考えられている。EHマウスの骨格筋幹細胞（筋衛星細胞）の機能をヘビ毒を用いた筋再生モデルで検討した結果、*Pax7* や *Myog* の遺伝子発現は遅延するものの、再生７日後の筋線維径の回復は正常対照マウスのものと比較して同程度であった。

考察

EHマウスはH222Pマウスと比較して、骨格筋病態が悪化するが、心筋機能は同程度であったことからエメリンの機能は骨格筋と心筋で異なることを示唆した。また、EHマウスの骨格筋ではメカニカルストレスに対する抵抗性の減弱が症状悪化に寄与することを示唆した。EHマウスにおいては筋衛星細胞の機能が比較的保たれており、病態への関与は少ないと示唆した。

結論

EHマウスはEDMDの筋病態メカニズムを解析するだけでなく、心筋と骨格筋におけるラミンとエメリンの関係について研究することのできる有用なモデルマウスであるといえる。

参考文献

1. Kawahara G, Nakayashiki MS, Maeda H, Kikura-Hanajiri R, Yoshida K, Hayashi YK. Antagonists for serotonin receptors ameliorate rhabdomyolysis induced by 25D-NBOMe, a psychoactive designer drug. Forensic Toxicology. 38:122-128,2020.
2. Wada E, Kato M, Yamashita K, Kokuba H, Liang W-C, Bonne G, Hayashi YK. Deficiency of emerin contributes differently to the pathogenesis of skeletal and cardiac muscle in $Lmna^{H222P/H222P}$ mutant mice. PLoS One. 14(8):e0221512,2019.
3. Wada E, Hamano T, Matsui I, Yoshida M, Hayashi YK. Matsuda R. Renal involvement in the pathogenesis of mineral and bone disorder in dystrophin-deficient mdx mouse. J Physiol Sci. 2019; 69: 661-671.

筋ジストロフィー治療のための bispecific 抗体の作製と筋変性における血液凝固の役割 －ビタミン C による低温、リンおよび TGF-β による筋細胞分化抑制の解除－

分担研究者　松田　良一
所属　東京理科大学大学院理学研究科

緒言

筋ジストロフィーは筋の変性と再生が激しく起き、やがて繊維化の増大と筋再生の阻害により、筋の進行的萎縮がおきる疾患である。その過程において、TGF-βファミリーの関与で筋再生の阻害と繊維化の亢進が示唆されている。我々は筋ジストロフィーの進行を食い止める因子が分かれば治療にも使える可能性がある。そこで、培養筋細胞の筋分化を阻害する因子として TGF-β か高濃度のリン酸を含む培養液、あるいは摂氏３０度以下の低温培養条件を標的に、これらの因子による筋分化抑制効果を解除する因子を検索した。

方法

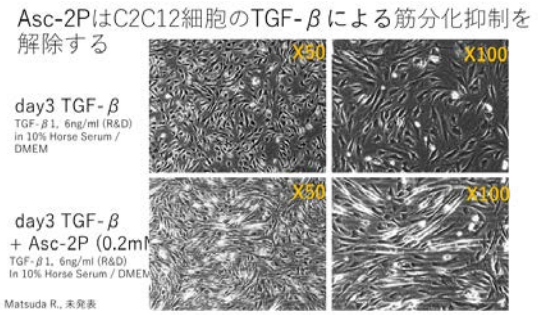
マウス衛星細胞由来筋芽細胞株 C2C12 を用い、分化誘導培養液に最終濃度①6ng/ml の TGF-β1(R&D 社製)あるいは②10mM のリン酸ナトリウム（富士フィルム和光）を添加し、5%CO2 、37℃で培養した。また、③分化誘導培養液で摂氏 28℃、5%CO2 で培養した。それぞれの培養液に分化培養液に変えた直後から 0.2mM のアスコルビン酸 2-りん酸（富士フィルム―和光）の存在下あるいは非存在下で培養した。培養 3-5 日後、あるいは 28℃の場合は 1 か月後に Fusion index を求め、で―筋細胞分化を定量化した。

結果

表1.

	A 【TGF-b】 (%)	B 【High Pi】 (%)	C 【Low temp】 (%)
Cont.	0/163(0)	0/1740(0)	0/151(0)
Exp.	25/156(16.0)	297/615(48.3)	26/160(16.3)

1） 6ng/ml の TGF-β1 は C2C12 の細胞分化を阻害したが、0.2mM のアスコルビン酸の添加により抑制効果は消失した。（表 1. A）



2）10mM のりん酸（pH.0）存在下に培養すると筋分化は抑制されたが、0.2mM のアスコルビン酸の添加により抑制効果は消失した。（表 1.B）

3）分化培地に交換後、28℃で低温培養すると C2C12 の細胞分化は抑制されたが、0.2mM のアスコルビン酸の添加により抑制効果は消失した。（表 1. C）

考察

アスコルビン酸の添加により、TGF-β、リン酸、あるいは低温培養による筋細胞分化の抑制は解除された。アスコルビン酸はプロリン水酸化酵素の活性化するので、成熟コラーゲンの生成あるいは HIF（低酸素誘導因子）の不活性化
が TGF-β 活性の解除、あるいは高濃度りん酸による筋分化抑制活性の解除、あるいは低

温による筋分化抑制の解除に関与している可能性が考えられる。

結論

これら TGF-β や高濃度りん酸、あるいは低温による筋分化抑制の解除にアスコルビン酸が有効であることを示した。筋ジストロフィーの増悪化が成熟コラーゲンの産生（線維化）あるいは HIF の不活性化により抑制されるのであれば、アスコルビン酸投与が治療的役割を持つ可能性がある。

参考文献

1.Mssague j, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard B: Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. PNAS 83(21):8206-10.1986

2.Hillege MM, Caro RAG, Offringa Cala, de Wit GJ, Jaspers RT, Hoogaars WHM:TGF-b regulates collagen typeI expression in myoblasts and myotubes via transit Ctgf and Fgf-2 expression. Sci Rep 9(2):375. Doi:10.3390/cells 9020375,2020

3.Liu D, Black BL, Derynck R: TGF-b inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. Genes Dev 15(22):2950-2966.2001.

4. Shima A, Pham J, Blanco E, Barton ER, Sweeney HL, Matsuda R: IGF-I and vitaminC promote myogenic differentiation of mouse and human skeletal muscle cells at low temperatures. Exp Cell Res 317(3):356-366.2011

5. Kikkawa N, Ohno T,Nagata Y, Shiozuka M, Kogure T, Matsuda R: Ectopic calcification is caused by elevated levels of serum inorganic phosphate in mdx mice. Cell Str. Funct 34(2):77-88.2009

α-ジストログリカノパチ―の病態解明と糖鎖による治療法の開発研究

分担研究者　遠藤玉夫

研究協力者
萬谷博, 赤阪啓子, 今江理恵子

所属　地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

緒言

α-ジストログリカノパチーは、筋形質膜タンパク質ジストログリカン(DG)の *O*-マンノース（Man）型糖鎖不全によるDGと基底膜ラミニンとの結合障害を原因とする先天性筋ジストロフィー症の一群であり、福山型およびその類縁疾患を含む。我々はこれまでに発症に関わる*O*-Man型糖鎖（コアM3糖鎖）の構造とその生合成経路を解明した[1-3]。コアM3糖鎖には2個のリビトールリン酸（RboP）が含まれ、これらのRboPは、α-ジストログリカノパチーの原因遺伝子産物であるfukutinとFKRPによって形成される[2]。RboPを含む糖鎖は哺乳類では初めての発見であり、RboP含有糖鎖の意義や合成機構を理解することは、α-ジストログリカノパチーの病態解明や治療法開発を目指す上で重要である。そこで我々は、*O*-Man型糖鎖生合成の詳細なメカニズムを理解するために関連酵素のX線結晶構造解析を進めており、これまでに、POMKとPOMGNT1の結晶構造を解明し、POMKによるコアM3三糖（GalNAc-GlcNAc-Man）のManリン酸（ManP）化とPOMGNT1-fukutin複合体による1番目のRboP転移反応を明らかにした[4,5]。今年度は、2番目のRboP転移酵素であるFKRPの結晶構造解析から、FKRPの基質認識機構と患者変異による影響について検討した[6]。

方法

N末側の細胞質領域と膜貫通領域を除去したFKRPをHEK293細胞で発現・精製し、X線結晶構造解析を行った。FKRPと基質[CDP-RboとRboP-GalNAc-GlcNAc-ManP-peptide]との共結晶化により基質認識に関わるアミノ酸を特定した。特定したアミノ酸に変異を導入した変異FKRPを作製し酵素活性を指標にして各アミノ酸の重要性を検証した。また、ゲル濾過クロマトグラフィーにより溶液中におけるFKRPの重合体形成を確認し、α-ジストログリカノパチー患者変異（Y88F,S221R,L276I）による重合体形成と酵素活性への影響を調べた。

結果

結晶構造からFKRPのゴルジ内腔側領域は、N末側から幹領域と触媒領域に分けられ、幹領域を介した四量体の形成が確認された。基質との共結晶の解析から、触媒ポケットの形成には2分子のFKRPが必要であり、一方の分子の幹領域でManPのリン酸と相互作用し、もう一方の分子の触媒領域でRboPのリン酸とCDP-Rbo、Mg^{2+}イオンと相互作用することが明らかとなった。アルカリホスファターゼによりManPのリン酸を除去した基質[RboP-GalNAc-GlcNAc-Man-peptide]にはFKRPはRboPを転移できず、FKRP基質認識にはManPが必要であることが確認された。患者変異（Y88F,S221R,L276I）を導入した疾患FKRP変異体の酵素活性は顕著に低下した。ゲル濾過クロマトグラフィーによるサイズ分画の結果、溶液中におけるFKRPの複合体形成が確認され、疾患FKRP変異体（Y88F,S221R,L276I）は低分子量画分に検出された。

考察

FKRPは四量体を形成しており、今回調べた疾

患変異（Y88F,S221R,L276I）は四量体形成を阻害することで酵素活性を減少させることが示唆された。1 つの触媒ポケットは二量体により形成され、2 分子の FKRP のそれぞれの触媒領域と幹領域を使って、基質となるコア M3 糖鎖の RboP と ManP のリン酸を捕捉することが明らかとなった。アルカリホスファターゼによる ManP のリン酸除去実験から、幹領域による ManP のリン酸との相互作用が FKRP 活性に必要であることが確認された。こうした構造生物学的な手法は各酵素の詳細な反応機構や機能解析に有用であり、α-ジストログリカノパチーの病態解明および治療法開発への貢献が期待される。

結論

FKRP は四量体を形成し、疾患変異による四量体形成障害は触媒活性低下の原因となることが示された。触媒ポケットは二量体により形成され、コア M3 糖鎖の 2 個のリン酸が FKRP の認識に必要であることが明らかとなった。

参考文献

1. Manya H, Endo T: Glycosylation with ribitol-phosphate in mammals: New insights into the O-mannosyl glycan. Biochim. Biophys. Acta, 1861(10): 2462-2472, Oct, 2017
2. Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Manya H, Kuga A, Yamaguchi Y, Akasaka-Manya K, Furukawa J, Mizuno M, Kawakami H, Shinohara Y, Wada Y, Endo T, Toda T: Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy. Cell Rep., 14(9): 2209-2223, Mar 8, 2016
3. Manya H, Yamaguchi Y, Kanagawa M, Kobayashi K, Tajiri M, Akasaka-Manya K, Kawakami H, Mizuno M, Wada Y, Toda T, Endo T: The muscular dystrophy gene TMEM5 encodes a ribitol β1-4 xylosyltransferase required for the functional glycosylation of dystroglycan. J. Biol. Chem., 291(47): 24618-24627, Nov 18, 2016
4. Nagae M, Mishra SK, Neyazaki M, Oi R, Ikeda A, Matsugaki N, Akashi S, Manya H, Mizuno M, Yagi H, Kato K, Senda T, Endo T, Nogi T, Yamaguchi Y: 3D structural analysis of protein O-mannosyl kinase, POMK, a causative gene product of dystroglycanopathy. Genes Cells, 22(4):348-359, Apr, 2017
5. Kuwabara N, Manya H, Yamada T, Tateno H, Kanagawa M, Kobayashi K, Akasaka-Manya K, Hirose Y, Mizuno M, Ikeguchi M, Toda T, Hirabayashi J, Senda T, Endo T, Kato R: Proc Natl Acad Sci U S A, 113(33):9280-5, Aug 16,2016
6. Kuwabara N, Imae R, Manya H, Tanaka T, Mizuno M, Tsumoto H, Kanagawa M, Kobayashi K, Toda T, Senda T, Endo T, Kato R: Nat Commun., 11(1):303, Jan 16, 2020

筋疾患におけるメカノトランスダクション機構の解明

分担研究者　平澤恵理１）２）

研究協力者

中田智史２），山下由莉１）

所属

１）順天堂大学大学院・医学研究科老人性疾患病態・治療研究センター/老化・疾患生体制御学

２）順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科女性スポーツ研究センター

緒言

疾患筋におけるメカニカルストレスへの脆弱性が筋ジストロフィー症などにおける筋崩壊の原因になる。一方でメカニカルストレスは、筋の維持、肥大に必須である。メカニカルストレス負荷の適正値を評価する方法は未だ確立されていない。申請者らは、筋における細胞外マトリックスバイオロジーを解明する立場から、この課題に取り組んでいる。疾患筋に特徴的なメカノカスケードを解明し、最適化することで筋ジストロフィー治療におけるリハビリテーションや筋肥大を促すトレーニングのオーダーメイド提供を視野に入れる。メカニカルストレスを定性、定量的に負荷する筋細胞システムの精度をさらに高め、形態学的、生化学的に解析を可能にする。本報告には、除神経によるメカニカルストレス免荷の系を用いて、サンプル数を追加した生化学的解析に加え、nNOSの発現と活性を形態学的に定量した結果を示す。

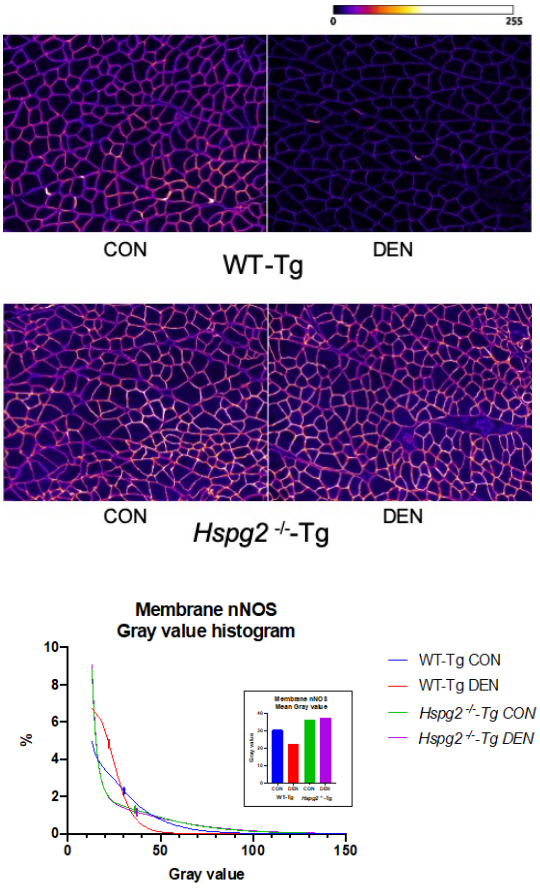
方法

本研究では、周産期致死を回避したのパールカンノックアウト（*Hspg2*$^{-/-}$-Tg）マウスとコントロール（WT-Tg）マウスを使用した。

片足を対象とした坐骨神経切除手術を行い、腓腹筋の除神経を行った（DEN）。もう一方の足は内部コントロールとして偽手術を行った（CON）。手術４日後に腓腹筋を採取し、腓腹筋は液体窒素下で冷却したイソペンタン中で凍結した。凍結サンプルは 10μm 厚で薄切し、抗 nNOS 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。加えて、NOS 活性を測定するために、Frandsen らのプロトコルに従い NADPH 染色を施行した（Frandsen et al., Biochem Biophys Res Commun. 1996）。

結果

細胞膜上の nNOS の発現シグナル強度を疑似カラーで表示した（下図）。細胞膜上の nNOS 発現のシグナル強度を解析したところ、WT-Tg では除神経に伴い、シグナル強度の低下が見られたが、*Hspg2*$^{-/-}$-Tg では除神経後もシグナル強度の低下が見られなかった。



考察

以前本研究班で報告した細胞質画分を用いたウエスタンブロッティングにより、WT-Tg マウスでは除神経後の細胞質 nNOS 量が増加したが、*Hspg2*$^{-/-}$-Tg マウスでは増加が見られなかった。さらに、タンパク分解に関連する FoxO1a、FoxO3a、Atrogin-1、および Lys48-ポリユビキチン化タンパク質の発現量は、WT-Tg マウスの除神経筋で増加が見られたが、*Hspg2*$^{-/-}$-Tg マウスでは増加が抑制されていた。*Hspg2*$^{-/-}$-Tg ではメカニカルストレスの減弱に伴う nNOS の細胞質への移行が抑制されることで、FoxO 系タンパク分解シグナルの活性化が抑制され、筋萎縮が抑制されると考察された。今回の結果は、以前報告したウエスタンブロッティングでの結果を支持するものと考えられた。

結論

筋の肥大と萎縮においてメカニカルストレスを制御する細胞外環境の重要性が示唆された。

参考文献

1 Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, Yamada Y 1999. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. Nat Genet 23:354-8

2 Arikawa-Hirasawa, E., Le, A.H., Nishino, I. et al. Structural and functional mutations of the perlecan gene cause Schwartz-Jampel syndrome, with myotonic myopathy and chondrodysplasia. *Am J Hum Genet* 70, 1368-75 (2002).

3 *Xu Z, Ichikawa N,et al.Perlecan deficiency causes muscle hypertrophy, a decrease in myostatin expression, and changes in muscle fiber composition *Matrix Biol.* 2010 Jul;29(6):461-70.

4 *Furuya N, Ikeda S, Sato S, Soma S, Ezaki J, Oliva JA Trejo, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, 7 Tanaka K, Kominami E, Hattori N and Ueno T, PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to the proteasome 2 activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy* 2014 Apr;10(4):631-41.

5 *Ning L, Xu Z, Furuya N, Nonaka R, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E. Perlecan inhibits autophagy to maintain muscle homeostasis in mouse soleus muscle. *Matrix Biol.* 2015 Aug 28.

6 Sato K, Kerever A, Kamagata K, Tsuruta K, Irie R, Tagawa K, Okazawa H, Arikawa-Hirasawa E, Nitta N, Aoki I, Aoki S. Understanding microstructure of he brain by comparison of neurite orientation dispersion and density imaging (NODDI) with transparent mouse brain *Acta Radiol Open.* 2017 Apr 17;6(4):2

7 Fujiwara N, Nakazawa-Tanaka N, Miyahara K, Arikawa-Hirasawa E, Akazawa C, Yamataka A.Altered expression of laminin alpha1 in aganglionic colon of endothelin receptor-B null mouse model of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int.* 2017 Oct 5.

8 Yamada T, Kerever A, Yoshimura Y, Suzuki Y, Nonaka R, Higashi K, Toida T, Mercier F, Arikawa-Hirasawa E Heparan sulfate alterations in extracellular matrix structures and fibroblast growth factor-2 signaling impairment in the aged

neurogenic niche. *J Neurochem*. 2017 Aug;142(4):534-544.

9 Nakazawa-Tanaka N, Fujiwara N, Miyahara K, Nakada S, Arikawa-Hirasawa E, Akazawa C, Urao M, Yamataka A.The effect of laminin-1 on enteric neural crest-derived cell migration in the Hirschsprung's disease mouse model. *Pediatr Surg Int.* 2017 Oct 10.

10 Irie R, Kamagata K, Kerever A, Ueda R, Yokosawa S, Otake Y, Ochi H, Yoshizawa H, Hayashi A, Tagawa K, Okazawa H, Takahashi K, Sato K, Hori M, Arikawa-Hirasawa E, Aoki S.The Relationship between Neurite Density Measured with Confocal Microscopy in a Cleared Mouse Brain and Metrics Obtained from Diffusion Tensor and Diffusion Kurtosis Imaging. *Magn Reson Med Sci.* 2017 Dec 7.

筋分化システム解析に基づいた難治性筋疾患の病態解明と治療法開発に関する研究

分担研究者　土田邦博

研究協力者　常陸圭介１），中谷直史１），永岡唯宏１），上田洋司１），草野大樹１,2)、大野欽司 2)

所属

１）藤田医科大学　総合医科学研究所
　　難病治療学研究部門

２）名古屋大学　大学院医学系研究科
　　神経遺伝情報学

緒言

生体最重量器官である骨格筋は、筋ジストロフィーを中心とした遺伝性難治疾患、神経原性筋萎縮、慢性炎症、がん悪液質等の病態で障害される。筋組織は、筋衛星細胞からの精密な分化システムが働くことで形成される。筋分化システムを理解し、筋病態を解明し治療法開発を多面的に推進させることは重要である。近年、200 塩基以上の長鎖非翻訳 RNA（lncRNA)の機能解析が進み、筋萎縮・筋肥大、筋分化に寄与することが解明されている。マイオジェニンのプロモーター領域由来の lncRNA (*myoparr*)の解析を進行させた。複数の筋萎縮モデルと筋肥大モデルで、筋分化やゲノムインプリンティング制御に関わる 12 種の lncRNA の発現変化を精査し、共通の分子機構を探索した。筋疾患の病態の中で、骨格筋内異所性骨化が観察されるが治療法は限定的である。骨化の起源となるヒト骨格筋由来の PDGFRα陽性間葉系前駆細胞の骨分化培養系を駆使して、骨分化抑制効果のある既存薬 320 種をスクリーニングした。最後に、エクソソーム（小型分泌型膜小胞）の解析を推進させた。ユビキチン様タンパク質（UBL3)が、ユビキチンとは異なった翻訳後修飾活性を持ち、多胞体を介してエクソソームとして特定タンパク質の細胞外への輸送に関与することを見出し解析を推進させた。

方法

マイ オジェニンは、MyoD, Myf5, MRF4 とともに筋分化に必須の HLH 型転写因子である。筋形成過程で MyoD に続いて発現が誘導され、最終分化に寄与する。除神経時に再誘導され、ユビキチン・プロテアーゼ系の活性化により筋萎縮を惹起する。マイ オジェニン遺伝子プロモーター由来のアンチセンス型の新規 lncRNA の作用を詳細に解析した。プロテオミクス解析を駆使して会合する RNA 結合タンパク質として Dead box 型 転写因子 Ddx17を同定し、マイ オジェニンの発現誘導調節機構を詳細に解析した。神経遮断による筋萎縮に対して、*myoparr*抑制核酸投与による萎縮の緩和効果を調べた。６種類の筋萎縮モデルと２種類の筋肥大モデルにおいて、１２種類の lncRNA の発現を精査した。共通に発現変動を示す分子を抽出した。

筋疾患では、筋変性と共に筋肉内脂肪変性や異所性骨化が生じる。ヒト骨格筋試料を用いて、間質に存在する間葉系幹細胞を増殖させ、アルカリフォスファターゼとアリザリンレッド染色を定量し、骨化抑制薬のスクリーニングを行い阻害薬を同定した。

結果

筋分化の主要制御転写因子の１つである マイ オジェニン遺伝子のプロモーター近傍から発現する約 1.4kb の lncRNA を同定した。マイオジェニン遺伝子発現を活性化して、筋芽細胞が運命決定されるために必須であること、活性には転写補因子の Ddx17 との会合が重要であることを示した １)。マイ オジェニン遺伝子の発現に影響以外に、筋特異的 miRNA の発現調節を介して細胞周期を制御することを見出した。*myoparr*が神経原性筋萎縮に関与しており、発現阻害により筋萎縮を緩和することを見出した１)。神経遮断、ギブス固定、尾部懸垂、デキサメタゾン投与、がん悪液質、飢餓の６種

の筋萎縮モデルおよびメカニカル負荷とミオスタチン遺伝子破壊の２種の筋肥大モデルで、筋分化関連の９種の lncRNA とゲノム刷り込みに関与する３種の lncRNA の発現変動変化をクラスター解析した。LncMyod と linc-MD1 の発現によって筋萎縮を２つのグループに分けられること、Gtl2, IG-DMR, DUM1 の変動が筋重量変化と相関することを示した２)。抗ヒスタミン薬であるデスロラタディンが、BMP シグナルを制御することで骨分化を抑制すること、アキレス腱切断により筋・腱近傍の異所性骨化を抑制することを示した３)。

考察

筋疾患の病態を考える上で、筋分化・再生能の制御の破綻、筋萎縮、筋内骨化が重要である。マイオジェニンの発現に必須の lncRNA を発見し、筋萎縮の新たな標的となることを示した。筋萎縮および筋肥大モデルで、lncRNA の発現変動を統計的に精査し、共通に変動する分子を抽出しカタログ化した。エクソソームは、miRNA やタンパク質を内包し、細胞間コミュニケーションを担う新たな機構を担う。間葉系幹細胞が分泌するエクソソームを疾患治療に応用する動きが国内外である。新たな翻訳後修飾活性を持ち、エクソソーム輸送に関与する分子の解析を進めた４)。

結論

lncRNA による筋形成および筋萎縮に関与する機構を明らかにした。筋萎縮および筋肥大モデルで発現変動する lncRNA 群を抽出した。ユビキチン化とは異なった分子機構で、エクソソームへのタンパク質の輸送に重要な役割を果たす因子を解析した。これらを統合して、筋疾患の病態への関与、治療法の開発へと進めていきたい。

参考文献

1. Hitachi K, Nakatani M, Takasaki A, Ouchi Y, Uezumi A, Ageta H, Inagaki H, Kurahashi H, Tsuchida K. Myogenin promoter-associated lncRNA Myoparr is essential for myogenic differentiation. EMBO Reports 20(3):e47468, 2019
2. Hitachi K, Nakatani M, Funasaki S, Hijikata I, Maekawa M, Honda M, Tsuchida K. Myogenin promoter-associated lncRNA Myoparr is essential for myogenic differentiation. Int J. Mol. Sci. 21:1628, 2020
3. Kusano T, Nakatani M, Ishiguro N, Ohno K, Yamamoto N, Morita M, Yamada H, Uezumi A, Tsuchida K. Desloratadine inhibits heterotopic ossification by suppression of BMP2-Smad1/5/8 signaling. J. Ortho. Res. 1-8, 2020 DOI: 10.1002/jor.24625
4. Ageta H, Tsuchida K. Post-translational modification and protein sorting to small extracellular vesicles including exosomes by ubiquitin and UBLs. Cell. Mol. Life Sci. 76:4829-4848, 2019

生体関連化合物の分子認識を基盤とする筋ジストロフィー治療薬の創製研究

分担研究者　林　良雄 1)

研究協力者

谷口敦彦 1)、髙山健太郎 1)、田口晃弘 1)、伊東史子 2)、根岸洋一 3)、池山弘晃 1)、大村紀子 1)、岡本英之 1)、小林理奈 1)、宇佐美翔哉 1)、小田切美樹 1)、嶋野慶樹 1)、向山慧 1)、大房莉奈 1)、澤田直志 1)、古屋結衣 1)、臼井健郎 4)

所属

1）東京薬科大学　薬学部　薬品化学

2）東京薬科大学　生命科学部　心血管医科学

3）東京薬科大学　薬学部　薬物送達学

4）筑波大学　生命環境系

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィン遺伝子変異による重篤な進行性筋変性疾患であり、本疾患の約 20%はナンセンス変異に起因する。我々は、ナンセンス変異読み飛ばし（リードスルー）活性を有するジペプチド型抗生物質（+）–ネガマイシン [1]（**1**）を礎としたリードスルー薬創製研究を展開してきた。これまでに天然類縁体 3-エピ-5-デオキシネガマイシンや合成誘導体 TCP-112（**2**）が良好な活性を示すことを見出した。また、これらを親化合物としたエステル型プロドラッグを複数得ることにも成功した [2-4]。更に、誘導体 **2** の 3 位アミノ基に非天然アミノ酸を導入した誘導体 TCP-1109（**3**）では、TGA 変異において **1** の約 10 倍強力なリードスルー活性を有することを見出した。本年度は、誘導体 **3** の詳細なリードスルー活性を評価するべく、濃度依存性評価および他のナンセンス変異（TAG、TAA 配列）に対する活性評価を実施した。

一方、筋ジストロフィーにおける骨格筋変性壊死に対抗する戦略の一つとして、筋量を負に制御している「マイオスタチン」の機能阻害に着目している。創薬標的としての本因子の重要性は、ヒト及び複数の動物において、当該因子の遺伝子異常に因るマイオスタチン関連筋肥大症の報告などから明らかである。従って、阻害活性および安全性、安定性の高い化合物を創製できれば、筋ジストロフィーに対する化学療法剤開発に極めて有益であると思われる。

我々は、マイオスタチン前駆体配列中の区分ペプチドによるマイオスタチン阻害ペプチドの探索研究を実施し、既にマウスマイオスタチンプロドメイン由来のマイオスタチン阻害ペプチド **4**（23 残基、IC_{50} = 3.56 μM）及びその高活性誘導体 **5**（22 残基、IC_{50} = 0.32 μM）、さらには環状化体（22 残基、IC_{50} = 0.26 μM）及び小型化誘導体（16 残基、IC_{50} = 0.13 μM）をそれぞれ報告している [6–9]。本年度は、小型化誘導体 MIPE-1686 に関して、二次構造解析と酵素溶液中での安定性試験を実施し、生体内での安定性に関する知見の獲得を目指した。また一方で、新たなマイオスタチン阻害ペプチドの創薬プラットフォームの獲得を目的に、フォリスタチンの N 末端ドメインに着目した探索研究を実施した。さらに、ペプチド **4** に光酸素化触媒を導入することで、光照射に伴って効率的にマイオスタチンを不活化させる機能化ペプチド **6** も報告した [11]。

ところで、福山型筋ジストロフィー及びその類縁疾患では、α-ジストログリカン糖鎖形成能が低下している。シチジン二リン酸リビトール（CDP-Rbo）は本糖鎖形成に必須な酵素基質となるため、CDP-Rbo を補充して糖鎖形成を回復させる療法が提案されている。しかし、本療法では CDP-Rbo の低い細胞内透過性が障壁となる。そこで、我々は CDP-Rbo に細胞膜透過性機能分子を付加した誘導体 **7** を合成した。

方法、結果、考察

1）TCP-1109（**3**）のリードスルー活性評価

まず、未熟終止コドン（PTC）として TGA を含む DMD 疾患由来配列を導入した、デュアルレポータープラスミドを COS-7 細胞に導入し、誘導体 **3** のリードスルー活性評価を行った。その結果、誘導体 **3** は濃度依存的にリードスルー活性を増強することを確認した。当該活性は、天然物において最も高活性なアミノグリコシド

G418 の活性よりも約 2 倍高値であった。また、TGA 配列以外の PTC（TAG、TAA 配列）に対する当該活性の評価も実施し、誘導体 **3** は両配列に対しても比較的高い活性（TGA : 18.3, TAG : 4.39, TAA : 2.24）を示すことが明らかとなった [5]。

２）小型マイオスタチン誘導体の二次構造／安定性解析

MIPE-1686 をはじめとする構造活性相関（SAR）研究で合成した一連の 16 残基阻害ペプチド誘導体の二次構造解析を実施した。ペプチドは、10%TFE を含むリン酸バッファーに溶解し、円二色分散計を用いて CD スペクトル解析に付した。これまでに 23 残基のペプチド **4** が、プロドメインタンパク質中と同様にαヘリックス形成能を示す一方で、高活性化誘導体 **5** がβシート形成能を示すことがわかっている [6,7]。ペプチド **4** の C 末端 16 残基フラグメントを小型化のための SAR においてリード化合物として用いたが、本ペプチド **4** はαヘリックス形成能を示した。一方で、マイオスタチン阻害活性の向上とともにβシート形成能の増大が観察された [9]。MIPE-1686 は、76%がβシート、残りの 24%がランダムコイル、という解析結果であった。即ち、ペプチドの阻害能とβシート形成能は相関している可能性が示唆された。

次に、N 末端未修飾の直鎖ペプチドである MIPE-1686 の酵素溶液中での安定性について検討した。アミノペプチダーゼ N、キモトリプシン C、トリプシン 3 の 3 種のリコンビナント蛋白質（ヒト由来）に対して、いずれも 37℃で少なくとも 4 時間半以上安定に存在できることが HPLC 解析により明らかとなった。各種 16 残基ペプチドの酵素に対する安定性を評価したところ、上述のβシート形成能との一定の相関がみられた。本結果より、MIPE-1686 は生体内で安定に存在できる可能性が示唆されたため、*in vivo* での検討を促進していきたい。

３）フォリスタチン由来マイオスタチン阻害ペプチドの獲得

フォリスタチンは生体内でアクチビンやマイオスタチンに結合して、その機能を制御するタンパク質として知られている。ペプチド **4** の獲得において、その由来の前駆体プロドメイン N 末端領域がマイオスタチンの I 型受容体結合部位に相互作用していることに着目した。即ち、当該部位に相互作用するフォリスタチンの N 末端ドメイン（ND）に由来する新規マイオスタチン阻害ペプチドが獲得できるのではないかと考えた。ND に由来する区分ペプチドを各種合成し、HEK293 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによりマイオスタチン阻害活性を評価した。その結果、14 残基からなる新規ペプチド DF-3 の獲得に成功した [10]。今後、誘導体の高活性化を試みていく。

４）光酸素化によるマイオスタチン不活化

当研究室で開発された 23 残基のマイオスタチン阻害ペプチド **4** に、光酸素化触媒を導入した機能化ペプチド **6** を合成した。ペプチド **6** は光照射によってマイオスタチンの光酸素化を起こした。酸素化されたマイオスタチンは顕著に活性を失っていた。本光酸素化によってペプチド **6** はペプチド **4** よりも低濃度で効率的にマイオスタチン活性を抑制した。

５）細胞膜透過性 CDP-Rbo 誘導体の創製

CDP-Rbo の低い細胞膜透過性を克服するための、CDP-Rbo 誘導体 **7** を合成した。

結論

リードスルー薬創製研究では、ネガマイシン誘導体 TCP-1109（**3**）が、TGA 配列において濃度依存的なリードスルー活性を示した。また、TAG および TAA 配列に対しても良好な活性を示すことがわかった。従って、本誘導体はナンセンス変異に起因する DMD 治療薬候補化合物として期待される。

マイオスタチン阻害ペプチド創製研究において、小型化ペプチド MIPE-1686 が高いβシート形成能を有していることが確認された。また N 末端未修飾の直鎖ペプチドであるにも関わらず、極めて高い酵素分解耐性を示すことが明らかとなり、今後の *in vivo* 展開の推進が期待される。また、フォリスタチンに由来する新規ペプチド DF-3 の同定に成功し、今後、新たな高活性化ペプチドの創製への弾みとなった。さらに、マイオスタチン阻害ペプチドを基盤とし、光酸素化によるマイオスタチン不活化という新しい阻害戦略を提案できた。

細胞膜透過性CDP-Rbo 誘導体**7**については、今後 *in vitro* 活性評価によって糖鎖回復効果を検討する予定である。

参考文献

(1) Arakawa M., *et al.*, J. Biochem. 134, 751-758 (2003).
(2) Taguchi A., *et al.*, ChemMedChem 9, 2233-2237 (2014).
(3) Hamada K., *et al.*, ACS Med. Chem. Lett. 6, 689-694 (2015).
(4) Taguchi A., *et al.*, ACS Med. Chem. Lett. 8, 1060-1065 (2017).
(5) Hamada K. *et al.*, ACS Med. Chem. Lett. 10, 1450-1456 (2019).
(6) Takayama K., *et al.*, J. Med. Chem. 58, 1544-1549 (2015).
(7) Takayama K., *et al*., ACS Med. Chem. Lett. 8, 751-756 (2017).
(8) Rentier C., *et al*., Bioorg. Med. Chem. 27, 1437-1443 (2019).
(9) Takayama K., *et al*., ACS Med. Chem. Lett. 10, 985-990 (2019).
(10) Saitoh M., *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 30, 126892 (2020).
(11) Okamoto H., *et al.*, Chem. Commun. 55, 9108-9111 (2019).

代謝性ミオパチーが示す病態スペクトラムの解明と病態に即した診断・治療法の開発

分担研究者　杉江　秀夫 1)
研究協力者　福田　冬季子 2)、杉江　陽子 2)、平出　拓也 2)、漆畑　伶 2)
所属
1)　常葉大学保健医療学部
2)　浜松医科大学小児科

緒言

代謝性ミオパチーの症状は exercise intolerance あるいは static/slowly progressive weakness に大別される。本症では二次的な代謝変容の賦活により、さらに広範な臓器障害や新たな代謝障害を合併することもあり、幅広い症候を示す Metabolic Myopathy Spectrum（MMS）と考えられる。今回筋型糖原病 IIIa 型（Cori 病）および V 型（以下 McArdle 病）について食事療法治療経過と基礎病態について検討した。

方法

（１）糖原病 IIIa 型：多施設において個々に倫理委員会承認を受け、「糖原病 IIIa 型および IIId 型に対する修正アトキンス食事療法の効果」の課題で UMIN 試験 ID (UMIN000023132)登録を行った。多くの症例において入院前は総カロリーの 80%以上を糖質が占めていたが、入院後糖質を徐々に漸減し、20～50g/日 (総カロリーの 10～20%)を目標に炭水化物を漸減した。心電図、心エコー、BNP などの心機能、血清 CK、肝機能などの検査を継時的に行った。観察期間は全例 6 か月以上であった。

（２）McArdle 病；Origene 社の *PYGM* cDNA を挿入した Plasmid Vector を使用し、欧米に多い p.Arg50 変異、日本人に多い p.Phe710del を挿入した cDNA を作成し、HEK293 細胞にトランスフェクト後培養液にビタミン B6 を 500μM 添加してホスホリラーゼ活性、ホスホリラーゼ蛋白を Western blot で比較した。またバルプロ酸を添加してホスホリラーゼ活性を C2C12 細胞で myoblast、myotube の stage でのホスホリラーゼ活性の変化を検討した。

結果

（１）全例で心機能・心筋障害マーカーの改善がみられるとともに、運動能力、CK の改善も併せて見られる症例もあった。食事療法を継続できなかった 4 例では心筋障害、筋障害の再悪化を見た。

（２）ホスホリラーゼ活性は p.Arg50 ではビタミン B6 添加前後では活性の増加はなく、ほぼ活性はゼロであった。一方 p.Phe710del ではビタミン B6 添加前で約 5%程度、ビタミン B6 添加後約 15%と活性の増加が認められた。バルプロ酸を C2C12 細胞に添加することで myoblast 、myotube の細胞においてホスホリラーゼの活性は増加した(有意差なし)。

考察

糖原病 IIIa 型患者への低炭水化物食による食事療法が有効であることが判明した。特に心筋障害への効果は患者の生命予後を改善する意味で重要である。

本食事療法の問題点として、①継続性、②肝機能障害の改善不良、③高脂血症の増悪などが挙げられた。今後の課題として炭水化物の制限の基準作りが必要である。McArdle 病では欧米の症例に比較すると本邦症例のではビタミン B6 の効果が良い。これは欧米の null mutation に比較して日本人の好発変異では B6-binding site が保持されていることなどが関連していると思われた。また histon deacetylase inhibitor であるバルプロ酸は脳型ホスホリラーゼの再活性化を促進する作用が期待されゼ McArdle 病の付加療法として期待される。

結論

心筋障害を合併する GSDIIIa 型では低炭水化物+高蛋白食/脂肪食が有効である。また日本人 McArdle 病では、特に好発変異（p.Phe710del）を持つ症例ではビタミン B6 投与が治療選択とすべきである。

参考文献

1. Kishnani PS, Austin SL, Arn P et al. Genet Med. 12:446-63 (2010)
2. Sentner CP, Caliskan K, Vletter WB, et al. JIMD Rep. 5:13-6 (2012)
3. Quinlivan R, Martinuzzi A, Schoser B. Cochrane Database Syst Rev. (2014) Nov12;(11)
4. Sato S, Ohi T, Nishino I, Sugie H. Muscle Nerve. 45:436-40 (2012)
5. de Luna N, Brull A, Guiu JM, et al. Dis Model Mech. 8(5):467-72 (2015)

筋原線維異常と筋変性を伴う遺伝性筋疾患の分子機構の解明

分担研究者　遠藤　剛 1)
研究協力者　高野和儀 1)，西野一三 2)

所属
1) 千葉大学大学院理学研究院 生物学研究部門
2) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第一部

緒言

本研究では，次の 3 つのことがらについて解明することを目的とする．

(1) これまでに，骨格筋筋原線維のアクチン線維形成は nebulin (Neb)–N-WASP 複合体を介してもたらされることを明らかにし，そのシグナル伝達機構と分子機構を解明してきた．*NEB* の突然変異により，筋原線維形成異常を伴うネマリンミオパチー (NM) が発症する．そこで Neb および N-WASP の遺伝子改変マウスを用いて，NM の発症と病態の分子機構を解明する．

(2) BIN1 の突然変異を介した N-WASP の局在異常により中心核ミオパチー (CNM) が発症する．そこで N-WASP の核から細胞質への移行の分子機構，ならびに骨格筋における BIN1–N-WASP による周辺核化の分子機構を解明する．これについてはこれまでに，N-WASP の核から細胞質への移行には，Fyn による N-WASP Tyr256のリン酸化が働いていることを明らかにした．

(3) 筋ジストロフィーでは筋再生における筋細胞分化の不全がみられる．また myostatin (Mstn) を介した筋萎縮が起こる．一方，サルコペニアでは GDF11 により筋萎縮が起こる．Ras–ERK 経路は骨格筋細胞分化や筋再生に対して抑制的に働く．私たちが発見した DA-Raf は，Ras に結合することにより ERK 経路の拮抗因子として機能する．そこで DA-Raf が骨格筋細胞分化誘導因子として筋再生に働くとともに，筋萎縮抑制にも働いていることを明らかにし，これらの分子機構を解明する．

今年度は特に (2) と (3) について，CNM の発症機構および骨格筋細胞分化と筋形成における PI(4,5)P_2 (PIP_2) と N-WASP の役割を解析した．さらに Mstn や GDF11 による筋細胞分化阻害を ERK 経路阻害剤や DA-Raf が解除することを明らかにした．これらの結果は，遺伝性筋疾患や加齢による筋萎縮の予防や治療の手がかりとなることが期待される．

方法

BIN1 と N-WASP の結合は，GST–N-WASP を用いた pull-down アッセイにより解析した．

マウス骨格筋 C2C12 細胞を 10% FBS を含む増殖培地から 5% 馬血清を含む分化培地に移すことにより，分化を誘導した．細胞膜 外層の PIP_2の局在をみるために，3.7% PFA, 0.1% glutaraldehyde で固定した未透過の C2C12 細胞に PIP_2 mAb KT10 を作用させ，免疫蛍光染色により PIP_2を検出した．また分化培地中に mAb KT10 をさまざまな濃度で加え，C2C12 細胞の分化を 免疫蛍光染色と イムノブロッティング (IB) により解析した．

C2C12 細胞に 500 ng/ml Mstn や GDF11 を作用させた．DA-Raf の強制発現は retrovirus の系で行った．DA-Raf, myogenin，筋特異的蛋白質の発現，および活性化 P-ERK のレベルは IB と免疫蛍光染色により解析した．

結果

(A) CNM における PIP_2と N-WASP の役割

細胞膜内層の PIP_2に結合した BIN1 は N-WASP を介してアクチン線維形成を引き起こし，中心核から周辺核への移行に働いている．そこで BIN1 と N-WASP がどのような相互作用を介して結合するかを解析した．CNM でみられる BIN1 の BAR ドメイン突然変異体 BIN1(D151N/R154Q) では，N-WASP の Pro-rich 領域との結合が弱いことが，pull-down アッセイにより示された．また CNM でみられる BIN1 の SH3 ドメイン突然変異体 BIN1(K436X) は，N-WASP の Pro-rich 領域にまったく結合しなかった．したがって CNM につながるアクチン線維形成不全は，BIN1 の SH3 ドメインと N-WASP の Pro-rich 領域との相互作用の欠如により起こると考えられる．

(B) 筋細胞分化における細胞膜外層の PIP_2の役割

細胞膜内層の PIP_2は dynamin2–Tks5–N-WASP を介してアクチン線維束形成を引き起こし，これがさらに podosome 形成を介して筋細胞融合に働いている．PIP_2は floppase により細胞膜外層にも移行する．そこで筋細胞分化における外層のPIP_2の機能を調べた．まず，固定した 未透過の C2C12 細胞に PIP_2 mAb KT10 を作用させて，外層の PIP_2の局在を調べた．外層のPIP_2は，筋細胞同士の接着面に局在していたことから，筋細胞融合を含めて筋細胞分化に働いている可能性が示唆された．次に，PIP_2の阻害抗体として働く KT10 を分化培地中に加えて培養すると，活性化 P-Akt のレベル，myogenin と筋特異的蛋白質の発現，および筋細胞融合が顕著に阻害された．

これらの結果から，外層のPIP_2は筋細胞分化において筋特異的蛋白質の発現および筋細胞融合の両者に働いていることが明らかになった．

(C) Mstn と GDF11 による骨格筋細胞分化阻害に対する DA-Raf の作用

分化培地中の C2C12 細胞に Mstn または GDF11 を作用させると，いずれの場合にも ERK 経路が活性化され，myogenin と 筋特異的蛋白質の発現および筋細胞融合が顕著に阻害された．また DA-Raf の発現も低下した．それに対し，ERK 経路阻害剤を作用させた場合には，DA-Raf の発現が誘導され，筋細胞融合が促進された．また Mstn や GDF11 と ERK 経路阻害剤を同時に作用させると，DA-Raf の発現が誘導され，Mstn や GDF11 による分化阻害が解除された．一方，C2C12 細胞に DA-Raf を強制発現させると，筋細胞分化が促進された．また DA-Raf を強制発現させた C2C12 細胞に Mstn や GDF11 を作用させた場合には，Mstn や GDF11 による分化阻害が解除され，筋特異的蛋白質の発現と筋細胞融合が誘導された．したがって DA-Raf は，Mstn や GDF11 の non-Smad シグナリングの一つである Ras–ERK 経路による骨格筋細胞分化の阻害を解除して，筋細胞分化を誘導することが明らかになった．

考察／結論

CNM には複数の型が存在するが，このうち常染色体劣性型 CNM は BIN1 の BAR ドメイン，(PIP_2に結合する) PI ドメイン，(dynamin 2 と N-WASP に結合する) SH3 ドメインの突然変異によって起こる．本研究により，CNM でみられる SH3 ドメイン突然変異体は N-WASP の Pro-rich 領域に結合できないことが示された．したがって CNM につながるアクチン線維形成不全は，BIN1 の SH3 ドメインと N-WASP の Pro-rich 領域との相互作用の欠如により起こると考えられる．

細胞膜内層の PIP_2は dynamin2–Tks5–N-WASP を介してアクチン線維束を形成し，これが podosome 形成を通して筋細胞融合に働いている．一方，本研究によりさらに，細胞膜外層の PIP_2が筋細胞分化における筋特異的蛋白質の発現および筋細胞融合の両者に働いていることが明らかになった．PIP_2の阻害抗体により 活性化 P-Akt のレベルが低下したことから，外層の PIP_2は PI3K–Akt シグナリングを活性化することにより myogenin などの筋特異的転写因子の発現を誘導して，筋細胞分化に働いている可能性が考えられる．

Mstn や GDF11 による骨格筋細胞分化阻害や筋萎縮は，おもに Smad シグナリングを介して Akt が阻害されることによると考えられている．しかし 本研究により，non-Smadシグナリングの Ras–ERK 経路も骨格筋細胞分化阻害に深くかかわっており，ERK 経路阻害剤や DA-Raf がこの阻害を解除して筋細胞分化を誘導することが明らかになった．今後は，筋ジストロフィーなどの遺伝性筋疾患や，加齢による筋再生不全や筋萎縮が，ERK 経路阻害剤や DA-Raf の発現誘導により改善されるかどうかを検討する．これにより筋再生不全や筋萎縮の予防や治療の手がかりが得られることが期待される．

参考文献

(1) Yokoyama, T., 6 authors, Endo, T.: *J. Cell Biol.* 177: 781–793 (2007).
(2) Takano, K., 7 authors, Endo, T.: *Science* 330: 1536–1540 (2010).
(3) Watanabe-Takano, H., 5 authors, Endo, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: E2291–E2300 (2014).
(4) Watanabe-Takano, H., 5 authors, Endo, T.: *PLoS One* 10: e0127888 (2015).
(5) Endo, T.: *Bone* 80: 2–13 (2015).
(6) Kanno, E., 3 authors, Endo, T.: *Exp. Cell Res.* 362: 111–120 (2018).
(7) Takahashi, K., 2 authors, Endo, T.: *Exp. Cell Res.* 376: 168–180 (2019).
(8) Endo, T.: *Exp. Cell Res.* 387: 111775 (1–12) (2020).

遺伝性筋疾患の病態解析と遺伝子／蛋白質治療に関する研究

分担研究者　斉藤史明
所属　帝京大学医学部神経内科

緒言

筋強直性ジストロフィー１型は dystrophia myotonica protein kinase (*DMPK*) 遺伝子の 3’非翻訳領域に存在する CTG リピートの異常伸長が原因である。この mRNA が核内で RNA foci と呼ばれる凝集体を形成し、そこにスプライシング調節因子 MBNL1 がトラップされる。この結果種々の遺伝子のスプライシング異常が生じることにより本症が発症する。一方 CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術が飛躍的な進歩を遂げ医療分野における応用も急速な広がりを見せている。本研究はゲノム編集による *DMPK* 遺伝子 CTG リピート配列の切断・除去、あるいは転写抑制による治療法開発へ向けての基礎的なデータを収集することを目的として行われた。さらに将来的な臨床応用へ向けて特に重要と考えられる予期せぬ遺伝子変異の発生、すなわち off-target 効果について先進的かつバイアスのかからないゲノムワイドな手法を用いて検討を行った。

方法

DMPK 遺伝子 3’非翻訳領域に存在するリピート配列の 5’側と 3’側に guide RNA を設計した。そして通常の Cas9 nuclease を用いる方法および Cas9 nickase を用いるダブルニッキング法により患者由来の線維芽細胞に対してゲノム編集を行った。リピート配列の切断・除去はサンガーシーケンスにより確認した。また *DMPK* 遺伝子の転写開始点近傍に guide RNA を設計し CRISPR interference 法 (CRISPRi) により同遺伝子の転写抑制を行った。さらに CTG 配列に対する RNA プローブを作成し RNA FISH 法により核内 RNA foci の検出・定量を行った。Off-target 効果の検出は LAM-HTGTS (Linear Amplification-mediated High-Throughput Genome-Wide Translocation Sequencing) 法 [1]を用いて行った。

結果

我々は過去２年間の本分担研究において、①通常の Cas9 nuclease を用いる方法および Cas9 nickase を用いるダブルニッキング法の両者において、*DMPK* 遺伝子の CTG リピート配列を切断・除去することが可能なこと、②このリピートの除去により核内の RNA foci 形成が高度に抑制されること、③その結果 MBNL1 の RNA foci へのトラップも解除されることを示してきた。本年度は始めに LAM-HTGTS を用いた off-target 効果の検討を行った。本法は off-target に生じた DAN の２重鎖切断が on-target の２重鎖切断と結合する事を利用して off-target 部位を検出する方法である。この結果通常の Cas9 nuclease を用いる方法では全ゲノム上に 6 カ所の off-target 部位を確認した。一方でより配列特異性が高いと考えられているダブルニッキング法では、予想に反して 24 カ所の off-target 部位が確認された。さらに驚くべき事に on-target 部位において Cas9 nuclease による切断では 20 kb、ダブルニッキング法では 60 kb に及ぶ巨大な欠失が検出された。このような予期せぬゲノム上の変異が見い出されたことから、DNA 切断を伴わなずより安全と考えられる CRISPRi を試みた。この結果定量的 RT-PCR により DMPK 遺伝子の mRNA への転写は減少し、RNA foci の形成も有意に抑制されることを明らかにした。

考察

安全性が高いと考えられていたダブルニッキング法で通常の Cas9 nuclease よりも多くの off-target 部位と、より大きな on-target 部位の欠失を検出した。この詳細なメカニズムは不明であるが、ニックが生じた状態で染色体の複製が起こるとこの部位に二重鎖切断が生じることが知られており [2]これが一因かもしれない。一方でゲノムの切断を伴わない CRISPRi によっても RNA foci の抑制効果が示されたことから、より安全な方法として今後注目すべきと考えられた。

結論

1）通常の Cas9 nuclease およびダブルニッキング法の両者で予期せぬ遺伝子変異を認め、特に後者で顕著であった。

2）ゲノム切断を伴わずより安全性の高い CRISPRi によっても RNA foci の抑制は可能であり今後注目すべき方法と考えられる。

参考文献

1) Frock RL, et al. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. Nat Biotechnol. 2015; 33: 179-186.
2) Kuzminov A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.2001; 98: 8241-8246.

骨格筋における膜リン脂質分布制御の意義解明

分担研究者　原雄二

所属　京都大学大学院工学研究科　合成・生物化学専攻

緒言

膜融合は骨格筋線維の形成や膜修復機構など、骨格筋における恒常性維持に必須な現象である。筋線維の形成過程では、筋衛星細胞から派生した筋芽細胞同士が融合し、筋管と呼ばれる長大な管状の構造体が形成される。また、絶え間ない筋収縮・弛緩により発生する筋線維膜の損傷は、小胞融合を介して修復されることが知られており、膜修復の破綻は三好型筋ジストロフィー、肢体型筋ジストロフィーの発症に至る。しかし細胞膜融合の根幹である「膜融合における膜構造・物性変化の制御機構、さらに細胞融合を経て各器官固有の形態・機能に至る分子基盤」について、未だその全容は明らかではない。我々はこれまでの結果（文献１）に基づき、本年度はリン脂質動態を感知するイオンチャネル PIEZO1 の筋再生時の機能解明を試みた。

方法

Piezo1 欠損マウス(Piezo1t$^{m1c(KOMP)Wtsi}$)を UCDavis マウスリソースセンターより入手した。本マウスの全身性欠損は胎生致死のため、筋衛星細胞特異的に Cre レコンビナーゼを発現する Pax7-Cre^{ERT2}（小野悠介先生より供与いただいた）を用いて掛け合わせを行った。マウスについては 6～12 週令を用い、Cre レコンビナーゼの誘導のためタモキシフェンを腹腔内に 5 回（1 日 1 回）注入し、さらに 5 日後にカルジオトキシンを前脛骨筋に注入することで、筋再生能を評価した。

内在性 PIEZO1 の C 末端に tdTomato タグを付加するマウスについては、野々村恵子先生より供与いただいた。

結果

これまでの申請者の研究により、PIEZO1 は筋芽細胞からの筋管形成に関わることが示された（文献１）。一方、インシリコ解析の結果、PIEZO1 は筋芽細胞だけでなく、筋衛星細胞にて高く発現することが明らかになった。タンパク質レベルでの PIEZO1 の発現を検討するため、内在性 PIEZO1 の C 末端に tdTomato が融合した形で発現する Piezo1-tdTomato マウスを用いて、PIEZO1 の骨格筋での発現を検討した。同マウスより単離した筋線維について PIEZO1 を検出したところ、筋衛星細胞にて PIEZO1 の発現が認められた。一方で、成熟筋線維では tdTomato の蛍光はほとんど検出されなかった。この現象についてウェスタンブロット解析でも同様な結果が得られたことから、PIEZO1 は未分化の筋衛星細胞に高発現することが示された。

続いて本研究では、筋衛星細胞における PIEZO1 の役割解明を目指した。*Piezo1* の全身性欠損は胎生致死を示すことから、CreERT2/loxP システムを用いてタモキシフェン誘導型の筋衛星細胞特異的 *Piezo1* 欠損マウスの作出・解析を行った。骨格筋の再生過程を観察するために、筋線維融解作用を持つヘビ毒（カルジオトキシン）を用いて筋線維壊死後の筋再生過程を検討した。カルジオトキシン適用１週間後に *Piezo1* 欠損マウスの前脛骨筋を単離し組織学的解析を行ったところ、*Piezo1* 欠損マウスでは、免疫細胞の浸潤、線維化、筋線維断面積の低下などの表現型を呈し、筋再生能が著しく低下していることを見出した。

続いて筋衛星細胞での PIEZO1 の役割解明のため、同欠損マウスより筋線維を単離後、筋線維上で筋衛星細胞を２日間培養し、筋衛星細胞の活性化時の様子を観察した。免疫染色法を用いて筋衛星細胞を抗 Pax7 抗体にて検出したところ、欠損型では筋線維１本あたりの筋衛星細胞数が減少しており、筋衛星細胞の増殖能の著しい低下が認められた。

考察

本研究を通じて、機械受容イオンチャネル PIEZO1 は筋衛星細胞にて高発現し、骨格筋の再生に重要な役割を果たすことが示唆された。インシリコ解析および PIEZO1-tdTomato マウ

スの解析により、PIEZO1 は筋衛星細胞に強く発現し、筋衛星細胞の増殖に関わること示された。我々は、先行研究により、PIEZO1 依存的なカルシウム流入は、RhoA/ROCK 経路を介したアクトミオシン形成に関わることを見出した（文献１）。筋衛星細胞にて、PIEZO1 を介した細胞骨格の再編成がどのような機能をもたらすのか、あるいは細胞骨格とは別経路の活性化に関わるのか、などを今後明らかにすることで、骨格筋再生機構の全容解明をめざしたい。

また筋衛星細胞は筋線維の再生過程に重要であるが、一方で Rhabdomyosarcoma においても筋衛星細胞と類似した経路が異常に活性化されることが報告されている。本研究で明らかにされた PIEZO1 が機械刺激を感知するメカニズムは、筋衛星細胞による筋再生能のみならず、骨格筋における多様な疾患発症においても関わる可能性が考えられる。

結論

リン脂質動態により制御される機械受容イオンチャネル PIEZO1 は、骨格筋再生能に重要な役割を果たすことが示された。また現在、他の機械受容イオンチャネルについても解析を行っており、*Piezo1* 欠損よりもさらに重篤な表現型を示すことが明らかになった。今後の研究により、機械受容イオンチャネル間での機能的なすみ分けなどを明らかにしていきたい。

参考文献

1. Tsuchiya M, Hara Y, Okuda M, Itoh K, Nishioka R, Shiomi A, Nagao K, Mori M, Mori Y, Ikenouchi J, Suzuki R, Tanaka M, Ohwada T, Aoki J, Kanagawa M, Toda T, Nagata Y, Matsuda R, Takayama Y, Tominaga M, Umeda M. Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation. Nat. Commun., 9, 2049 (2018).

リアノジン受容体関連筋疾患の病態発症機構の解明

分担研究者　村山　尚
研究協力者　呉林　なごみ
所属　順天堂大学医学部薬理学講座

緒言

1 型リアノジン受容体（RyR1）は骨格筋筋小胞体（SR）の Ca^{2+}遊離チャネルであり、遺伝子変異により悪性高熱症（MH）を引き起こす。MH では RyR1 チャネル活性が異常亢進しており、吸入麻酔薬等の刺激により筋拘縮、体温上昇といった病態を発症する。MH 治療薬としてはダントロレンが知られているが、水溶性が低く、臨床現場で使いにくいという欠点を持つ。

最近、申請者らは小胞体内 Ca^{2+}濃度測定法を利用した新規の RyR1 阻害薬スクリーニング法を開発し、RyR1 選択的阻害薬としてオキソリン酸を見出した（1）。本研究では、オキソリン酸の構造展開を行って親和性の高い誘導体を探索するとともに、オキソリン酸誘導体の MH モデル動物に対する治療効果を検討した。

方法

オキソリン酸は窒素原子へのアルキル鎖の付加、ベンゼン環への置換基の導入により種々の誘導体を合成した。誘導体の RyR1 阻害活性は小胞体内 Ca^{2+}測定および[^{3}H]リアノジン結合活性測定により評価した（1, 2）。

MH モデルマウスは MH 患者に見出された R2508C 変異をマウス RyR1 に CRISPR/Cas9 法でゲノム編集して作製した。骨格筋細胞内 Ca^{2+}動態は単離短趾屈筋を、張力測定は摘出ヒラメ筋を用いた。in vivo 実験はイソフルラン麻酔によりマウスに MH 発作を起こし、薬物の効果を評価した。

結果

オキソリン酸の窒素原子のアルキル基の炭素数を増やすと、RyR1 阻害活性が増大し C8 で最大活性を示した。ベンゼン環の 6 位への置換基の導入は阻害活性を低下させたが、7 位への導入は阻害活性を増大させた。6,7 位へのジオキソラン環の導入が最大活性を示した。最終的にオキソリン酸に比べて 70 倍以上高い親和性を有する誘導体（化合物 1）の合成に成功した（3）。いずれの誘導体もオキソリン酸と同様に RyR1 選択的な阻害作用を示した。

化合物 1 は MH モデルマウスから単離した骨格筋細胞のハロセンによる細胞内 Ca^{2+}濃度上昇を抑制し、摘出骨格筋のカフェイン拘縮を減弱させた。化合物 1 を事前に腹腔内投与するとイソフルラン麻酔による体温上昇と MH 発作を効果的に抑制した。イソフルラン麻酔で体温上昇したモデルマウスに化合物 1 を投与したところ、体温低下をもたらし、MH 発作を回避した。以上の結果から、化合物 1 は MH 治療薬として有用であることが明らかとなった。

考察

RyR1 活性は筋ジストロフィー症や種々のミオパチーでも亢進していることが示されているため、そのため、化合物 1 はこれらの筋疾患に対しても治療効果を有する可能性がある。今後、経口投与による検討を行う予定である。

結論

本研究により、ダントロレンに代わる MH 治療薬となりうる新規 RyR1 阻害薬（化合物 1）を見出した。本化合物の体内動態、副作用等を検討することにより臨床応用に向けて取り組んでいきたい。

参考文献

1. Murayama T, Kurebayashi N, Ikegami-Yuasa M, Mori S, Suzuki Y, Akima R, Ogawa H, Suzuki J, Kanemaru K, Oyamada H, Kiuchi Y, Iino M, Kagechika H, Sakurai T: Efficient high-throughput screening by ER Ca^{2+} measurement to identify inhibitors of ryanodine receptor Ca^{2+}-release channels. Mol Pharmacol, 94: 722-730, 2018.
2. Murayama T, Kurebayashi N. Assays for modulators of ryanodine receptor (RyR)/Ca^{2+} release channel activity for drug discovery for skeletal muscle and heart diseases. Curr Protoc Pharmacol, 87: e71, 2019.
3. Mori S, Iinuma H, Manaka N, Ishigami-Yuasa M, Murayama T, Nishijima Y, Sakurai A, Arai R, Kurebayashi N, Sakurai T, and Kagechika H: Structural development of a type-1 ryanodine receptor (RyR1) Ca^{2+}-release channel inhibitor guided by endoplasmic reticulum Ca^{2+} assay. Eur J Med Chem, 179: 837-848, 2019.

ゼブラフィッシュモデルを用いた筋ジストロフィー関連疾患の病態解明研究

分担研究者　三橋　弘明

研究協力者　なし

所属　東海大学工学部生命化学科

緒言

筋ジストロフィー関連疾患は希少疾病であるため原因遺伝子変異の同定が困難だという問題がある。近年、次世代シークエンサーの活用により、遺伝子解析の速度は飛躍的に向上したが、大量のゲノム配列情報の中から疾患の原因となる遺伝子変異を見出すためにはモデル生物を用いた機能解析が不可欠である。そこで、容易に遺伝子改変が可能で、組織やオルガネラを蛍光標識で可視化でき、発生速度の早いゼブラフィッシュをモデル生物として用い、筋ジストロフィー患者と相同な遺伝子変異を導入して、筋疾患モデルとして利用することを考えた。平成 30 年度までにエメリー・ドレフュス型筋ジストロフィー原因遺伝子である *LMNA* に患者型変異を持つトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。平成 31 年度はそのゼブラフィッシュの子世代、孫世代を獲得し、表現型の遺伝を確認し、詳細な病態研究を行った。

方法

昨年度、作製に成功したラミン A ロッドドメイン変異を持つトランスジェニックゼブラフィッシュを野生型と交配し、子世代(F1)を獲得した。F1 をさらに野生型と交配した F2 個体について免疫組織化学染色を行い、骨格筋変性や DNA 損傷、アポトーシスについて検討した。また、新規にゼブラフィッシュラミン A 抗体を作製した。次に、共焦点レーザー顕微鏡で核を観察し、核の形態について画像解析ソフト cellSens で定量化した。受精後 6 日目の個体については電子顕微鏡観察も行った。さらに、F2 個体から RNA を抽出し、qPCR によって各種マーカー遺伝子の発現量の変化を検討した。

結果

ロッドドメイン変異体 F0 世代で観察されたラミン A の核内凝集が F1,F2 世代でも観察され、遺伝子変異と表現型の segregation が確認された。さらに、F2 世代では核と核が細長いひも状構造でつながれた nucleoplasmic bridge 構造や、1 つの核から複数の小突起が生じる nuclear protrusion、長軸方向の核の elongation などの特徴的な核形態異常が観察された。これらの核形態異常は経過日数により異常が増加したことから進行性であることがわかった。形態異常を示す核ではヒストン H2AX 染色陽性率が高かったため、DNA 損傷が起きやすくなっていると考えられた。一方、カスパーゼ染色やファロイジンによるアクチン染色は対照と同様で際立った変化は見られなかった。電子顕微鏡観察では、核近傍にオートファゴソームが見られ、また qPCR による遺伝子発現解析では、p62 の発現量増加が見られたことから、オートファジー経路の関与が示唆された。

考察

ラミン A ロッドドメイン変異と核内凝集体の segregation が確認されたことから、この表現型とエメリー・ドレフュス型筋ジストロフィーの病態との関連が示唆された。nucleoplasmic bridge、nuclear protrusion などの核形態異常は非常に特徴的であり、*LMNA* ミオパチーの病態機序を解く鍵になるものではないかと考えられる。また、DNA 損傷やオ

ートファジーが *LMNA* ミオパチーに関与する可能性が示唆された。これらの新たな知見は *in vivo* で核を可視化できるゼブラフィッシュモデルを作製したために得られた結果と考えられた。

結論

世界で初めて *LMNA* の筋ジストロフィー変異を持つゼブラフィッシュの系統樹立に成功した。また、*LMNA* ロッドドメイン変異を持つ筋ジストロフィー動物モデルはこれまでに例がなく、新たな動物モデルを創成することができた。本ゼブラフィッシュモデルを用いることで、*LMNA* ミオパチーの病態解明、治療法開発研究の発展に寄与できるものと期待している。

参考文献

特になし

筋ジストロフィーの鑑別診断における自己抗体測定の意義

分担研究者　鈴木重明

所属
慶應義塾大学医学部神経内科

緒言
免疫チェックポイント阻害薬による筋炎の症例が散発的に報告され，その特徴的な臨床像が指摘されてきた．一般的な筋炎と異なる点としては眼瞼下垂や眼球運動障害など眼症状を呈する点である．重症筋無力症と鑑別を要する場合や両者が合併する可能性が指摘されている．

方法
2016 年 7 月から 2018 年 6 月までの 2 年間に抗 PD-1 抗体であるニボルマブあるいはペムブロリズマブの単剤投与により発症した筋炎の症例に対して慶應義塾大学に自己抗体測定依頼のあった 19 例を対象として臨床像，自己抗体，筋病理について検討した．

結果
男性 13 例，女性 6 例，平均年齢は 70 歳（25 歳-84 歳）であった．有害事象の重症度は，筋症状が軽症であり日常生活への影響が少ない grade 2 の症例が 10 例であった．一方，筋症状が中等症あるいは重症で日常生活への影響が多いあるいは生命にかかわる grade 3 あるいは grade 4 は 9 例であった．原病である悪性腫瘍は非小細胞肺がんが 10 例で最多であり，その他は悪性黒色腫が 1 例，腎細胞がんが 2 例，頭頸部がんが 1 例，ホジキンリンパ腫が 1 例，尿路上皮がんが 2 例，大腸がんが 2 例（非適応疾患）であった．抗 PD-1 抗体はニボルマブが 11 例，ペムブロリズマブが 8 例で使用され，投与回数については 1 回が 4 例，2 回が 13 例，3 回が 2 例であった．初回投与から発症までは平均 29 日（19 日-48 日）であった．

臨床像は複視と眼瞼下垂の両者を呈していたのが 12 例，眼瞼下垂だけが 3 例，複視だけが 1 例であった．19 例にうち 5 例は全経過において症状が眼筋だけに限られていた．球症状を呈して 10 例についてはすべて嚥下困難を自覚していたが，構音障害を呈していたのは 5 例であった．四肢筋力低下が 13 例に認められたのに対して，体幹筋の障害が 14 例でありより特徴的な症状であった．頚部筋力低下が目立ち，症状の重い 6 例では頚下がりを呈していた．心筋障害は 4 例で認め，うち 2 例については心筋生検で心筋炎の確定診断が得られた．呼吸筋障害は 6 例で認められた．筋痛は 16 例と多くの症例で認められ，筋力低下が出現する前に自覚している場合が多かった．特に，頚部，背部，下肢で筋痛を認めていた．

血清 CK 値は筋力低下が出現する数日前から上昇が認められる場合があった．19 症例の血清 CK 値の平均は 5,247 IU/L と著明な上昇を認めた．RNA 免疫沈降法や enzyme-linked immunoassay によって筋炎に関連した自己抗体をスクリーニングしたが，検出できなかった．抗横紋筋抗体は cytometric cell-based assay 法により測定をおこない，抗 titin 抗体は 10 例で，抗 Kv1.4 抗体は 9 例で検出され，いずれかの自己抗体が陽性であった症例は 13 例 (68%)であった．筋病理では筋線維の壊死・再生の分布が特徴な所見であり，10 個から 15 個程度の筋線維が集簇的に壊死・再生を呈していた．リンパ球浸潤は筋線維の壊死・再生周囲に集簇的に観察された．T リンパ球の表面マーカーでは CD4 と CD8+ T 細胞はほぼ同程度であった．

結論
免疫チェックポイント阻害薬により発症する筋炎は重症筋無力症の要素を含む，特有な病型と考えられる．

参考文献
Seki M, Uruha A, Ohnuki Y, et al. Inflammatory myopathy associated with PD-1 inhibitors. J Autoimmun 100: 105-113, 2019

筋強直性ジストロフィーの病態解明と治療研究

分担研究者　中森　雅之
所属　大阪大学　医学系研究科　神経内科学

緒言

筋強直性ジストロフィー（myotonic dystrophy, DM）は、CTG 繰り返し配列が異常に伸長する DM1 型（DM1）と、CCTG 繰り返し配列の異常伸長による DM2 型(DM2)からなる。DM1、DM2 ともに異常に伸長したリピートをもつ RNA が、MBNL 蛋白をはじめとする核内のスプライシング制御因子を障害する。このため DM は、さまざまな選択的スプライシング調節機構の破たんをきたすスプライシング異常症とされている。DM では多くのスプライシング異常が報告され、症状との関連が示唆されているが、ADL 阻害要因となる進行性筋萎縮や心伝導障害の原因はいまだに不明である。本研究では、こうした治療開発に不可欠な DM の病態を解明し、筋症状をターゲットとした治療法の開発を行う。また、異常 RNA の毒性を低減して、スプライシング制御障害を抑制する低分子化合物の開発も進める。

方法

DM での骨格筋障害の原因を解明するため、顕著な骨格筋症状(筋未熟性)を呈する先天性 DM1（CDM）由来骨格筋検体を用いて、次世代シークエンサーを用いた RNA-seq 解析により、CDM 骨格筋の筋未熟性と相関するスプライシング異常を探索した。DM1 心筋における刺激伝導系に関わる Ca チャネル発現についても解析した。また、DM での異常 RNA 毒性を低減する低分子化合物の効果を、DM モデル細胞、DM モデルマウス（HSA-LR）を用いて検証した。さらに、CTG リピートを短縮誘導して異常 RNA 毒性を低減する治療開発を目指し、モデル細胞での有効性も検証した。

結果

CDM 骨格筋検体を用いた RNA-seq 解析により、骨格筋症状の重症度と有意に相関する新規スプライシング異常を同定した。また、DM１心筋における Ca チャネル（CACNA2D3）発現亢進が、DM1 でみられる心伝導障害に関与することを Drosophila モデルも使用して証明した（１）。低分子化合物による異常 RNA 毒性低減効果としては、high throughput screening により痛風治療薬として使用されているコルヒチンに、異常 RNA の毒性を低減する作用があることを見出した（２）。また、すでに有効性を報告していたフラミジンとエリスロマイシンの併用療法が相乗的な効果を示すことも HSA-LR マウスで実証した（３）。さらに、CAG ミスマッチヘアピン DNA 構造に結合する低分子 NA が、DM の根源的な原因となる異常伸長 CTG/CAG リピートを短縮誘導することを細胞モデルで証明した（４）。

考察

今回同定した、骨格筋でのスプライシング異常や心筋での発現異常は、これまで長らく不明であった DM の筋病態の解明の端緒となる可能性がある。また、DM における RNA 毒性を低減する低分子化合物や、CTG リピートを短縮する核酸標的低分子に、今後の DM 治療薬としての高い potential があることが証明された。

結論

本研究により行われた、DM の病態に迫る新規スプライシングや発現異常の同定や、次世代の創薬研究を担う低分子化合物の開発により、今後の DM 病態解明および治療開発研究のさらな

る発展が期待できる。

参考文献

1. Auxerre-Plantie E, Nakamori M, Renaud Y, et al. Straightjacket/alpha2delta3 deregulation is associated with cardiac conduction defects in myotonic dystrophy type 1. Elife. 2019;8. e51114
2. Reddy K, Jenquin JR, McConnell OL, et al. A CTG repeat-selective chemical screen identifies microtubule inhibitors as selective modulators of toxic CUG RNA levels. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(42):20991-1000.
3. Jenquin JR, Yang H, Huigens RW, 3rd, Nakamori M, Berglund JA. Combination Treatment of Erythromycin and Furamidine Provides Additive and Synergistic Rescue of Mis-Splicing in Myotonic Dystrophy Type 1 Models. ACS Pharmacol Transl Sci. 2019;2(4):247-63.
4. Nakamori M, Panigrahi GB, Lanni S, et al. A slipped-CAG DNA-binding small molecule induces trinucleotide-repeat contractions in vivo. Nat Genet. 2020;52(2):146-59.

骨格筋幹細胞の分化制御機構の解明と筋疾患治療への応用

分担研究者　林 晋一郎
所属　国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　疾病研究第一部

緒言

筋ジストロフィーに対する根治療法として、以前より骨格筋幹細胞を移植療法が期待されている。しかしながら生体外で長期培養した筋幹細胞は移植後の筋線維への融合寄与率、幹細胞としての定着率も悪く、有効な治療法としては確立されていない。成体から単離直後の筋幹細胞は転写因子 Pax7 を高発現し、移植すると移植寄与率も高いことから、いかに Pax7 の発現量が高い状態の筋幹細胞を in vitro で増産しうるかが筋幹細胞移植療法の確立へのカギとなる（1)。筋幹細胞の未分化維持・分化制御機構については古くから研究されてきてはいるものの、とりわけ Pax7 の標的因子や共役因子などは不明な点も多く、成体外での筋幹細胞の未分化維持も確立されていない。そこで本研究では、骨格筋幹細胞の新たな未分化性維持・分化制御機構を、筋発生・再生モデル、in vitro 分化誘導モデルを用いて解明し、筋ジストロフィーをはじめとする難治性筋疾患の幹細胞治療法の確立に貢献することを目的とした。

方法

本分担課題では下記の 4 つの項目について研究を行った。

1)ストレスによって誘導される転写因子 Klf5 による骨格筋幹細胞の分化制御機構を筋幹細胞特異的 Klf5 欠損マウスを用いて解明する。

2) in vitro において幹細胞の未分化性を維持したまま筋細胞数を増幅する方法を確立し、そのメカニズムを解明する。

3)典型的なX連鎖性ミオチューブラーミオパチー（XLMTM）の筋病理所見を示すが、病因性の変異が同定されなかった 14 症例について RNA-seq を行い *MTM1* mRNA の構造異常を解析して新規変異を同定する。

4)Pax7 にエピトープタグを付加したノックインマウスを CRISPR-Cas9 技術により作製し、Pax7 の新規標的因子・共役因子を同定する新たなツールとして活用する。

結果

1) 筋幹細胞特異的 Klf5 欠損マウスの表現型解析および Klf5 欠損マウス由来初代筋幹細胞を用いた RNA-seq 解析により、Klf5 が細胞周期調節因子 p21 と p57 の発現を直接制御して筋細胞のアポトーシスを抑制すること、また筋再生時と同様に Myogenin の遺伝子発現を促進することによって Klf5 が胎児後期の筋発生を調節していることを明らかにした。

2) レチノイン酸によって筋幹細胞の未分化性を in vitro で保持できることを見出し、これまで困難であった筋幹細胞の長期間培養を可能にした。レチノイン酸存在下で培養したヒト筋幹細胞は免疫不全 mdx マウスへの移植率を向上させた。また、筋前駆細胞では主に RARα を介して Gpx3 などの下流遺伝子の発現を調節していることを明らかにした。さらに、レチノイン酸処理と未処理の培養筋細胞を用いて RNA-seq により比較解析を行い、筋幹細胞の未分化性を維持する新規因子の探索を行った。その結果、因子 X の発現が未分化を維持した筋幹細胞で有意に増加していることを見出した。因子 X は胸腺や脾臓などで発現し、B 細胞や T 細胞の分化を抑制することが知られているが、骨格筋における機能は全く不明であった。骨格筋において因子 X は活性化した筋幹細胞で発現し、筋

分化と共にその発現は減少した。因子 X の過剰発現細胞の解析により因子 X は筋細胞の増殖を促進し、分化を抑制する事を明らかにした。また、因子 X を阻害すると細胞増殖関連因子のカスケードが乱れ、RNA-seq による網羅的な解析によって、因子 X が細胞増殖に必須の因子であることが示された。

3) 典型的な X 連鎖性ミオチューブラーミオパチー（XLMTM）の筋病理所見を示すが、病因性の変異が同定されなかった 14 症例について RNA-seq を行い mRNA レベルでの *MTM1* の異常を解析した。その結果、4 例で *MTM1* の発現低下を認め、そのうち 2 例では Exon1 を含む領域の large deletion があることを見出した。また、1 例においてはエクソン 4 の、別の 2 例においては deep intron 領域の cryptic splice site の変異によるスプライシング異常があることを見出した。患者由来の筋細胞はこの異常スプライシングに加え、核近傍ミトコンドリアが集積するという表現型を示し、アンチセンスモルフォリノ核酸によってこれらの異常が回復することを明らかにした。

4)Pax7 の C 末端に 2 つの HA タグを付加したノックインマウス（Pax7HA-KI）を作製した。Pax7HA-KI ホモマウスの成長曲線は野生型と変わらず、Pax7 陽性の筋衛星細胞数や筋再生にも異常は見られなかった。胎齢 10.5 日の胚を用いた免疫沈降-質量分析法によって、筋発生時に Pax7 と会合すると考えられるタンパク質を 1700 種類以上同定した。野生型と比較してタグノックインマウス胚で多く検出されたタンパク質のリストを基に機能エンリッチメント解析を行った結果、細胞周期関連因子やストレス応答因子、ユビキチン関連因子などが変動していることが明らかとなった。さらに HA タグ抗体を用いた ChIP-qPCR 解析により、Pax7 のターゲットとされる Myf5 のエンハンサー領域への結合も検出できたことから、本マウスは新たな Pax7 の標的因子同定のためのツールとして非常に有効であると考えられた。

考察

本研究によってレチノイン酸による筋幹細胞未分化維持培養法が確立され、その下流因子についても明らかになりつつある。しかしながらその機序についてはいまだ不明な点が多い。今後の研究の進展と、Pax7-HA KI マウスを用いた Pax7 の標的因子・共役因子の探索とを合わせることで骨格筋幹細胞の未分化維持機構のさらなる解明が進み、未分化維持培養法が改良できると期待される。また、本研究では MTM1 の deep intron 領域の変異を起因とする MTM1 mRNA のスプライシング異常による XLMTM の発症機構が初めて解明された。しかしながら解析した 14 症例のうち、7 例については未だ原因が不明であり、さらなる原因究明が必要である。

結論

本研究によって骨格筋幹細胞の新たな分化制御機構が明らかとなった。本研究の進展に伴い、骨格筋幹細胞の増殖・分化制御、筋形成の全容が解明されるとともに、その成果が再生医療へと応用されることが強く期待される。

参考文献

1. Fu X, Xiao J, Wei Y, Li S, Liu Y, Yin J, Sun K, Sun H, Wang H, Zhang Z, Zhang BT, Sheng C, Wang H, Hu P: Combination of inflammation-related cytokines promotes long-term muscle stem cell expansion . Cell Res. Cell Res. Jun;25(6):655-73, May 2015

分担研究課題名　膜リモデリング分子に生じる先天性ミオパチー型 SNP の多階層的解析システムの構築

分担研究者　竹田哲也

所属　岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

緒言

先天性ミオパチーは、筋力や筋緊張の低下、呼吸障害などが起こる先天性の筋疾患である。先天性ミオパチーの一つである中心核ミオパチー（Centronuclear Myopathy; CNM）では、骨格筋の興奮-収縮連関に必要な細胞膜の陥入構造（T 管）の形成異常により、筋収縮が正常に起こらない。先行研究において、細胞膜の変形や切断（膜リモデリング）に関わる BAR ドメインタンパク質（BIN1）やダイナミン（DNM2）の遺伝子上の SNP（一塩基多型）が、CNM 発症に深く関与することが明らかになっている。しかし、膜リモデリングの異常により CNM が発症するメカニズムは、未だに解明されていない。本研究では、CNM 変異型の DNM2 や BIN1 の膜リモデリング機能の異常について、①*In vitro* 再構成系による分子レベルの解析、②筋芽細胞を用いた細胞レベルの解析、③CNM モデル動物を用いた個体レベルの解析を行い、CNM の発症機序をマルチスケールで解明し、診断や治療法、創薬開発に向けた学術的基盤を創生することを目指した。

方法

① *In vitro* 再構成系による分子レベルの解析

変異型の DNM2 や BIN1 の構造やダイナミクス、膜リモデリング機能の異常について、*in vitro* 再構成系を用いた電子顕微鏡および高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）解析行い、CNM 発症機序を分子レベルで解明する。

② 筋芽細胞を用いた細胞レベルの解析

マウス筋芽細胞 C2C12 を用いた T 管様構造の誘導アッセイや筋分化アッセイにおいて変異型 DNM2 や BIN1 の機能異常を解析し、CNM 発症機序を細胞レベルで解明する。

③ CNM モデル動物を用いた個体レベルの解析

線虫のダイナミン遺伝子 dyn-1 および BIN1 の相同遺伝子 amph-1 のコーディング領域を、CNM 変異型のヒト由来 DNM2 や BIN1 遺伝子で置換した CNM モデル線虫を確立し、その表現型を解析して、CNM 発症機序を個体レベルで解明する。

結果

① *In vitro* 再構成系による分子レベルの解析

変異型蛋白質の発現コンストラクトの作成を Gateway クローニング法により行った。まず、変異型 BIN1(K35N,D151N,R154Q,Q434X,K436X)、既知の変異型 DNM2(R369Q,R369W,R465W,E368K, S619L, S619W) および CNM 患者より同定された新規の変異型 DNM2(P294L,G495R,V520G,A618T, G624V, E650K, R724H) のエントリークローンライブラリーを作成した。これらのエントリークローンを用いて、大腸菌および昆虫細胞における発現コンストラクトを作成した。このうち数種の変異型 BIN1 と DNM2 について蛋白質を精製し、機能解析を行った。その結果、変異型 BIN1(Q434X, K436X) は、正常型 BIN1 とは構造的に異なる、凝集した膜チューブを形成した。一方、正常型 DNM2 は BIN1 により GTP アーゼ活性が抑制されるが、変異型 DNM2 ではその制御が起こらず、恒常的に GTP アーゼが活性化していることが明らかになった。

② 筋芽細胞を用いた細胞レベル解析：

上記①で作成した変異型の BIN1 および DNM2 のエントリークローンライブラリーを用いて、哺乳類細胞用の発現コンストラクトを作成し、C2C12 細胞における T 管様構造の誘導アッセイ

を用いて変異型蛋白質の機能異常を解析した。その結果、変異型 BIN1(Q434X, K436X) は、T 管様構造の形成能が低下していた。一方、P294L および R724H を除く変異型 DNM2 でも、T 管様構造の形成が顕著に抑制されていた。

③ CNM モデル動物を用いた個体レベル解析

CNM モデル線虫の確立に向け、正常型ヒト DNM2 による線虫ダイナミンの機能代替を解析した。その結果、線虫ダイナミン変異体が示す運動異常などの表現型が、ヒト DNM2 の発現によって機能回復することが明らかになった。そこで、変異型ヒト DNM2 を発現するトランスジェニック線虫を作成し、その表現型を解析した。その結果、変異型 DNM2 を発現するトランスジェニック線虫は、筋機能不全を示唆するような行動異常を示した。

考察

① DNM2 の CNM 型変異は、GTP アーゼの活性制御に必要な Stalk および PH ドメインに集中していた。そのため、CNM 変異に伴う立体構造変化により、GTP アーゼの恒常的な活性化(＝膜切断活性の亢進) が起こり、T 管の形成異常に起因して CNM が発症する可能性が高い。今後変異型 DNM2 の構造解析 (X 線結晶解析、クライオ電顕) や高速 AFM を用いた分子動態解析を行い、CNM 発症に繋がる DNM2 の gain-of-function 機構を解明する。

② 筋芽細胞を用いた細胞レベルの解析より、CNM 変異型 BIN1 および DNM2 は T 管様構造の形成異常を示すことが明らかになった。今後、*in vitro* 再構成系を用いてこれらの変異型 BIN1 および DNM2 の膜リモデリング機能の異常を網羅的に解析することにより、CNM 発症機序を分子レベルで解明する。

③ 正常型ヒト DNM2 は線虫ダイナミンの機能を代替した。さらに変異型ヒト DNM2 を発現する線虫は、筋機能不全を示唆するような行動異常の表現型を示した。今後、機能異常を示した線虫の筋組織構造の解析や, 疾患型変異蛋白質の細胞内局在やダイナミクスの詳細な解析を進め, 個体レベルでの CNM 発症機序を解明する。

結論

本研究により、膜リモデリング分子 BIN1 と DNM2 の機能異常を分子、細胞、個体の多階層で解析するシステムの基盤を構築した。昨今、筋疾患の治験研究では、患者の心身両面に苦痛を与える筋生検に代わる方法の開発が求められている。本研究で用いた、*in vitro*、*in cellulo*、線虫のようなモデル生物を用いた実験系は、低侵襲性かつ臨床治験の効果をより定量的に解析可能にする新たなアプローチであり、今後これらの解析を進め、CNM の発症機序の解明、さらに 診断や治療法、創薬開発に貢献したい。

参考文献

1. 竹居 孝二, 山田 浩司, **竹田 哲也**. ダイナミン複合体による新規の膜切断機構:クラスタラーゼ・モデル, **生物物理** 59(5), 2019, 001-007
2. Abe, T., La, T.M., Miyagaki, Y., Oya, E., Wei, F.Y., Sumida, K., Fujise, K., **Takeda, T.**, Tomizawa, K., Takei, K., *Yamada, H. Phosphorylation of cortactin by cyclin-dependent kinase-5 modulates actin bundling by the dynamin 1-cortactin ring-like complex and formation of filopodia and lamellipodia in NG108-15 glioma-derived cells. ***Int J Oncol.***, 2019; 54(2): 550-558.

29－4

Basic research for developing diagnostic and therapeutic methods for muscular dystrophy and its related disorders

Ichizo Nishino（Principal Investigator）

Department of Neuromuscular Research,
National Institute of Neuroscience,
National Center of Neurology and Psychiatry

Not only therapy is unavailable but even the cause is unknown for many of most muscle diseases including limb girdle muscular dystrophy. To overcome this situation, we should elucidate the mechanism and develop therapies for muscle disease by maximally utilizing our muscle repository. In this project, we aim: 1) to maintain and further improve the diagnostic network system for muscle disease and muscle repository; 2) to elucidate the cause and mechanism of muscle diseases; 3) to develop diagnostic markers; and 4) to develop therapies for muscle diseases. The number of muscle biopsy samples we receive has been steadily increasing in the last 10 years with more than 1000 samples per year in 2017-2019. As a result, the total number of frozen and cultured muscle samples has reached 20136 and 2024, respectively, by the end of 2019, which constitute the world-leading muscle repository. Using this muscle repository, we have made a number of achievements including: 1) The identification of 63 Japanese ADSSL1 myopathy patients from 59 families all of who pathologically had ADSSL1 myopathy, making ADSSL1 myopathy the most common genetically diagnosable nemaline myopathy in Japan; 2) The identification of 2 patients with COX deficiency due to COX6A2 gene mutations who showed symptoms in skeletal and cardiac muscles, which is compatible with the expression pattern of COX6A2; 3) The identification of CGG repeat expansions in LPR12, GIPC1 and as the cause for oculopharyngodistal myopathy; 4) Utility of MxA expression in distinguishing dermatomyositis (DM) and antisynthetaase syndrome; and 5) The proof of the existence of DM sine dermatitis and its association with anti-NXP-2 antibodies.

実績報告書（総括）

研究課題番号 29-5

ポリグルタミン病モデルマーモセット系統を用いた病態理解と治療法開発

主任研究者：関　和彦

（1）３年間の研究目標

NCNP では、これまでの所内共同研究によって、発症し進行形の症状を呈する世界初の病態モデルマーモセットの作出及び系統化に成功していた。本研究の目的はこのマーモセット系統の維持・発展を行うと同時に、研究所―病院連携研究によって同モデルを用いた治療法開発やバイオマーカー検索の研究基盤を確立する事であった。このマーモセット系統を作出・解析できる点で NCNP には他にはない戦略的な優位性があるが、この優位性を活かして研究成果を生むためには、基礎（研究所）と臨床（病院）の連携研究を支える研究基盤の整備が必要があった。この研究基盤を用いた継続的な研究によって、難治性疾患であるポリグルタミン病の新たな診断・治療方法が提案できる可能性があった。

（2）３年間を通じての最終的な研究成果

ポリグルタミン病モデルマーモセットの系統化（関）

本研究開発項目では、ポリグルタミン病モデルマーモセットラインを用いた運動失調症の病態解明に必要な次世代個体の作出を行った。具体的には第一世代および第二世代の産生によって、本研究に十分な質・量の動物および研究環境の整備を行った。その結果、第二世代５頭、第三世代３頭、合計８頭の次世代個体が作出された。令和 2 年 6 月の時点で、第二世代２頭、第三世代 2 頭が未発症であり、様々なバイオマーカーを用いた発症評価が進行している。

ポリグルタミン病モデルマーモセットの解析（関）

ゲノム解析の結果、第三世代の 2 頭において、それぞれ 1 コピーと 2 コピーまで純化された。今後、1 コピーまで絞られ発症すれば、発症時期・進行症状が安定したモデルマーモセットの完成となる。また、早期発症と晩期発症の個体から脳神経系各部位の導入遺伝子の発現量を比較した結果、小脳、側頭葉、線条体などで導入遺伝子発現量の相違がみられた。またポリグルタミン病モデルマーモセット系統は親子で似た発症機序を示し、発症機序の違いは導入遺伝子がゲノムのどの位置に挿入されたかに起因する可能性が高いことが分かってきた。以上の成果から発症に必要な導入遺伝子が絞られ、発症機序が均一なポリグルタミン病モデルマーモセットが完成する見通しがついた。

新規生化学バイオマーカーの開発（和田・永井）

ポリグルタミン病（PolyQ 病）に対する疾患バイオマーカーの開発を目的として実験を行った。F1 世代の PolyQ 病マーモセットおよび野生型マーモセットから経時的に検体採取（採血と血清分離）を行い、血清中の細胞外小胞エクソソームについて網羅的プロテオーム解析を行った。その結果、マーモセット血液エクソソームに含まれるタンパク質を 2000 以上同定した。野生型との比較から、PolyQ 病モデルで共通して増加または減少しているタンパク質を同定した。また、PolyQ 病モデルマーモセットの発症前後の血清エクソソームの比較から、発症時に増加するタンパク質を 5 種同定した。前者は疾患マーカーとして、後者は病態を反映して変容するサロゲートマーカー候補としての応用が期待される。また、本研究で明らかとなったマーモセットの血液中エクソソームのプロテオーム情報は、これまでに世界中で報告がなく、初めての網羅的データと

して高い科学的価値を有する。

イメージングバイオマーカーの開発（花川）

健常個体群では 8 ヶ月齢まで灰白質が増加したが，TG 個体群は発症・未発症を問わず増加率が低かった．白質は，健常個体群では 12 ヶ月齢で増加がプラトーに達するが，TG 個体群は発症・未発症問わず増加率が低かった．小脳は，健常個体では 3 から 12 ヶ月齢でやや増加し，発症 TG 個体群もやや増加傾向であった．線条体は，健常個体では増加傾向だが，TG 個体群は発症・未発症問わず増加率が低かった．MRI からは未発症 TG についても脳の潜在的な異常がある可能性が高く、発症前バイオマーカーとして MRI を用いることのできる可能性が示唆された。

マーモセット行動バイオマーカーの開発（関）

本項目では、ヒト患者を対象に行われる PolyQ 患者への行動評価を参考に、PolyQ マーモセットの発症と病態の進行を反映する行動バイオマーカーを確立することであった。その結果、運動性を反映する日内活動量、歩行機能を反映するはしご上り能力、平衡機能を反映する棒上歩行課題、また定性的指標としてはマーモセット用主観的運動失調チェックリスト（自作）が発症及び病態の進行を反映することが明らかになった。以上の結果、行動バイオマーカーと発症程度の関連性が確立され、行動バイオマーカーが確立した。

ヒト行動バイオマーカーの開発（高橋）

運動失調症の患者レジストリ J-CAT(Japan Consortium of Ataxia)を積極的に進めた。海外のコホートと比較して、発症年齢、登録時年齢、登録時 SARA 総スコアなどの代表的統計量は類似しており、J-CAT の MJD/SCA3 コホートの信頼性の高さが裏付けられた。従来の Histrical record に準拠した臨床指標としては Barthel score（BI）が使われているが、BI は天井効果のため軽症例の評価には不向きである。J-CAT 登録情報を活用して、MJD/SCA3 患者の早期例 11 例において、診察所見に立脚した臨床指標である SARA score と、Historical record に準拠した臨床指標である UMSARS score Part I との相関関係を検討した。有意差は認めなかったものの、SARA と UMSARS score Part I の相関関係を示唆する結果が得られた(r=0.31)。今後 J-CAT の症例を蓄積していくことにより Robust な相関関係が得られる可能性がある。Historical record による臨床指標はより多数の患者における評価に適しており、今後の行動バイオマーカー開発に活用できると考えられた。

ヒトーマーモセット共通生化学バイオマーカーの開発（髙橋･関）

Neurofilament Light Chain （NfL)タンパク質は神経変性のバイオマーカーとして知られており、数々のヒト神経変性疾患で患者の血液や脳脊髄液中の NfL 濃度が上昇するという報告がある。そこで、モデルマーモセット及び対照群の NfL 濃度の計測を行った。予備的解析より、病理解析により神経変性が認められた発症個体 3 個体の血液中 NfL 濃度は野生型個体に比べ有意に高い値であり、さらにヒト患者と同程度の値であった。そこで University Collage London のハンチントン病研究所との共同研究において、すべての発症個体及び対照群サンプル、及び NCNP 病院やバイオバンクで蓄積したサンプルをすべて解析している。現在、年度末に先方にサンプルを送付したが、Covid19 による UCL 閉鎖の影響を受けて、解析が停滞している。先方の解析を待って、NfL のバイオマーカーとしての適合性が評価できる。また、上記、エクソソーム解析結果からヒトーマーモセット 共通バイオマーカーの探索も継続して進めている。

ポリグルタミン病モデルマーモセットの病理解析（齊藤）

主として、第二世代個体を対象とした解析を進めた。2017 年に論文にした個体とほぼ同様の部位、すなわち、脊髄前角、脳幹運動神経核、末梢神経、筋肉の病変が強く、小脳では個体差が目立った。やはり同胞の病理は他と比して同様の病理を呈していた。封入体の超微形態は、ヒトポリグルタミン病のそれと矛盾しないものと考えられた。遺伝子発現量と病理については、封入体の量では相関は見られなかったが、microglia や astroglia の活性化などでは発現量との相関が見られた。

Tet-on システム導入マーモセットのライン化（富岡）

Tet-on システムを搭載したポリグルタミン病原因遺伝子を受精卵に導入することで、7 頭（TET1～TET7）の産仔獲得に成功した。この 7 頭のマーモセット（TET1～TET7）について爪より抽出した DNA を解析した結果、4 頭がトランスジェニック個体であった。さらに、ドキシサイクリンを投与することで遺伝子発現量が増加したことから、個体レベルで Tet-on システムが正常に機能していた。次に、最も遺伝子発現量の高かった TET3 から、自然交配により第二世代を作出した。その結果、計 6 頭の個体（TET3-1～6）の獲得に成功し、DNA 解析した結果、TET3-3 のみトランスジェニック個体であった。TET3-3 より採取した耳線維芽細胞にドキシサイクリンを添加することで遺伝子発現量が増加したことから、Tet-on システムが正常に機能していた。以上より、Tet-on システムを導入したポリグルタミン病モデルマーモセットの系統作出に成功した。

（3）今後の研究の進め方について

まず、本研究成果の論文化を行う。ヒトと同様発症後に進行性の運動失調を示し、発症時期や症状の進行を反映する複数のバイオマーカーが確立している霊長類モデル動物は世界でも稀有である。論文化の後は、積極的に世界にアピールし、当該疾患臨床前研究の有用なモデル動物として利用されることを願う。

（4）倫理面における配慮の状況（生命倫理・安全対策等の遵守）

本研究での実験動物の取扱に当たっては、厚生労働省が定める「動物実験等の実施に関する基本指針」および国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所の霊長類研究施設倫理指針を遵守し、動物が受ける苦痛を最小限に停める努力がなされた。本研究は国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所により承認された機関承認実験である。

29-5「ポリグルタミン病モデルマーモセット系統を用いた病態理解と治療法開発」
ポリグルタミン病モデルマーモセットの生化学バイオマーカー開発

和田　圭司
国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　所長
永井　義隆
大阪大学大学院医学系研究科
神経難病認知症探索治療学寄附講座　教授

【緒言】

加齢に伴って発症する神経変性疾患の克服は、高齢化が進行するわが国における重要な課題である。神経変性疾患の病態解明と治療法開発へ向け、ヒト病態をより正確に反映し、前臨床研究に適した疾患モデルを確立するために、脳の構造・機能や代謝経路がヒトに近い霊長類を用いたモデルの開発が急務である。

ポリグルタミン（polyQ）病は、原因蛋白質内のpolyQ鎖の異常伸長により発症する神経変性疾患の総称であり、異常蛋白質の構造異常と凝集を通じて、多くの神経変性疾患と共通の分子機構により発症すると考えられている。

私たちはこれまでに、ヒトpolyQ病病態を反映する世界初の遺伝子改変マーモセットを樹立した[1]。F0 世代のうち早期発症個体の画像解析では第4脳室の開大を認め、病理解析では小脳・脊髄などでの神経変性と、脳幹・脊髄などでの抗polyQ抗体陽性の封入体とミクログリアの活性化を認めた。このpolyQ病マーモセットの疾患モデルとしての妥当性を検証し、疾患バイオマーカーを開発することを目的として、以下の研究を行った。

【方法と結果】

これまでの研究から、異常蛋白質の再折りたたみを行う分子シャペロンがエクソソームと呼ばれる膜小胞によって細胞外に分泌され、polyQ病病態に関わることを明らかにしている[2]。そこでバイオマーカー候補分子としてエクソソーム内蛋白質に着目し、上記のpolyQ病モデルマーモセット（脊髄小脳失調症３型）の血液エクソソームのプロテオーム解析を行い、候補分子を網羅的に検索する。得られた候補分子については、患者検体にて検証する。

F0世代の発症個体から変異遺伝子の伝達が確認されたF1世代のpolyQ病マーモセットに対し、運動症状の発症年齢を考慮し、3ヶ月齢・5ヶ月齢・12ヶ月齢での生化学的バイオマーカー評価を行うこととした。PolyQ病モデルマーモセット５頭、ならびに対照群として野生型マーモセット４頭から血液検体を採取した。それぞれの血液検体からエクソソームを含む細胞外小胞画分を精製し、LC-MS/MS測定により画分内に存在するタンパク質を網羅的かつ定量的に解析した。その結果、いずれの検体においても2,000種を超えるタンパク質を定量的に同定することに成功した。そのうち、polyQ病マーモセット群で増加または減少するタンパク質を4種、さらに発症と相関して増加するタンパク質を4種同定した。

現在、これら計8種の変動タンパク質について、polyQ病患者においても変動が見られるかの検証を行っている。NCNPバイオバンクから提供されたpolyQ病患者血液検体21例、および対照群として非変性疾患患者検体25例について、すでにエクソソーム画分の精製が終了し、上記8種のタンパク質についてウェスタンブロットによる定量評価を行っている。今後、定量評価結果について、polyQ病型、罹病期間、polyQリピートや重症度などとの相関を解析することにより、polyQ病生化学マーカーとしての信頼性を評価するとともに、病態を反映して変容する分子の探索を進めていく。

【考察】

本年度は、polyQ病に対する疾患バイオマーカー開発に向け、polyQ病モデルマーモセット由来血液エクソソームのLC-MS/MS測定結果について、詳細なプロテオーム解析を行い、polyQ病モデルでの変容分子を8種同定した。さらにこれら8種について、患者検体を用いた検証実験を開始した。今後、患者検体における定量評価結果と臨床症状との相関解析を進めることにより、病態を反映しかつ発症前から検出可能な鋭敏な疾患バイオマーカーの開発を目指す。

【成果発表】

【学会】

1) 永井義隆. 認知症・神経変性疾患バイオマーカーとしての血液中エクソソームの可能性. 第 38 回日本認知症学会学術集会（R1.11.7-9、東京）
2) 中谷輝実、他. 国立精神・神経医療研究センターにおけるトランスジェニックマーモセット研究の現状. 第 9 回 日本マーモセット研究会（R2.2.14-15、神戸）

29-5「ポリグルタミン病モデルマーモセット系統を用いた病態理解と治療法開発」

（分担課題名）SCA3 の種間画像マーカーの開発

分担研究者　花川　隆
国立精神・神経医療研究センター 脳病態統合イメージングセンター 先進脳画像研究部

緒　言

神経変性疾患には治療法が確立されていない難病が多い．治療法の確立に寄与するモデル確立を目指して，ヒトの疾患遺伝子を導入したトランスジェニックマーモセットの開発が進められているが，種差のためにモデル動物の遺伝系・表現形だけではモデルとしての妥当性を言うことは難しいことが予想される．本研究では，磁気共鳴撮像 (MRI: Magnetic Resonance Imaging)を用いることで，トランスジェニック（TG）マーモセットの脳構造，機能異常を非侵襲的かつ縦断的に評価しつつ，ほぼ同じ方法で取得できるヒト患者での MRI 研究と組み合わせることで，TG マーモセット疾患モデルの妥当性の評価を可能にする非侵襲全脳網羅的イメージング法の基盤技術を開発することを目指した．さらに，蓄積を進めてきた健常・SCA3 モデルマーモセットの MRI データを用いて，MRI 解析技術の最適化を図り，次いでヒト患者 MRI 研究により種間の相同・特異性を同定していくことを目指した．

方法

ヒトSCD患者とマーモセットモデルの画像バイオマーカー樹立プロジェクトを並行して推進した．

マーモセットプロジェクトでは，健常，発症TG，未発症TG個体の脳体積を経時的に計測した．健常・TGマーモセットで縦断的MRI撮像を行い，正常と遺伝子異常に伴う脳構造・脳機能の継時的変化のデータポイントを増やした．マーモセット健常群から得られたMRIより当施設における年齢別マーモセット標準発達データを作成し，健常モデルと疾患モデル群間での脳灰白質容積の違い比較した．特に小脳および第四脳室付近や基底核に絞った健常群，SCA3モデル群間の脳体積の変化についても検討した．

ヒトプロジェクトでは，SCD総計31名（SCA3, SCA 6, SCA 31, CCAを含む），健常コントロール29名のデータを収集した．うちSCD総計23名，健常コントロール21名のデータについて，群間比較およびプリズム適応課題（Hashimoto et al. 2015）の成績と脳灰白質容積の相関解析を行い報告した（Bando et al. 2019）．また新しい失調症状評価法の提案を行った（Honda et al. 2020）．

結果

マーモセット研究において，健常個体群では8ヶ月齢まで灰白質が増加したが，TG個体群は発症・未発症を問わず増加率が低かった．白質は，健常個体群では12ヶ月齢で増加がプラトーに達するが，TG個体群は発症・未発症問わず増加率が低かった．小脳は，健常個体では3から12ヶ月齢でやや増加し，発症TG個体群もやや増加傾向であった．線条体は，健常個体では増加傾向だが，TG個体群は発症・未発症問わず増加率が低かった．MRIからは未発症TGについても脳の潜在的な異常がある可能性が高いと考えている．．

ヒト研究において，SCD群では，健常コントロールとの比較で，小脳を中心とした萎縮

を確認し，その一部（左下半月小葉と第VI小葉）はSCDにおけるプリズム学習の低下の程度と相関していること発見し報告した（Bando et al. 2019）．SCAのタイプ別の差については現段階では明らかでないが，引き続き症例の蓄積を進める．

考察

運動失調は小脳の機能障害のみならず，体性感覚や視覚の異常でも生じうる．今回対象としたSCA3 の TG マーモセットには，中枢神経系以外にも筋肉など末梢の異常があり，運動障害の表現系だけでは，SCA のモデルとして妥当か否かの判断は難しい．今回の一連の研究は，MRI によりモデルマーモセットとヒト症例の共通バイオマーカーを探索できる可能性を示した．一方でマーモセットを撮像した MRI 装置の限界からヒトのようなボクセルレベルでの解析は困難であった．

結論

TG マーモセットとヒト患者の両方において MRI で測定できる小脳の灰白質容積が SCA のバイオマーカーとなる可能性を示した．

参考文献

Hashimoto Y, Honda T, Matsumura K, Nakao M, Soga K, Katano K, Yokota T, Mizusawa H, Nagao S, Ishikawa K. Quantitative evaluation of human cerebellum-dependent motor learning through prism adaptation of hand-reaching movement. PLoS One. 2015 Mar 18;10(3): e0119376. doi: 10.1371/journal.pone.0119376.

Bando K, Honda T, Takahashi Y, Ishikawa K, Mizusawa H, Hanakawa T: Impaired adaptive motor learning is correlated with cerebellar gray matter atrophy in spinocerebellar ataxia patients: A voxel-based morphometry study. Front Neurol 10: 1183, 2019.11.

Honda T, Mitoma H, Yoshida H, Bando K, Terashi H, Taguchi T, Miyata Y, S, Hanakawa T, Aizawa H, Kondo T, Mizusawa H, Manto M, Kakei S: Assessment and rating of motor cerebellar ataxias with Kinect v2 depth sensor: Extending our appraisal. Front Neurol 11:179, 2020.3

研究発表

知的所有権の出願・取得状況

なし

29-5「ポリグルタミン病モデルマーモセット系統を用いた病態理解と治療法開発」
（分担課題名）ポリグルタミン病モデルマーモセットの作出と行動バイオマーカー開発

分担研究者　関　和彦
国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　モデル動物開発研究部

緒　言

当プロジェクトではこれまで、神経変性疾患であるポリグルタミン病に焦点を合わせ、遺伝子改変技術を用いたモデル霊長類の作出を進めてきた。その結果、PolyQ 遺伝子が導入された世界初のマーモセットが合計5頭誕生し、そのうち3頭で発症が認められた。さらに発症個体1頭の第二世代5頭の獲得に成功し、そのうち3頭で発症が確認され、その発症個体 1 頭から、第三世代が 3 頭獲得された。この第二第三世代を対象に行動バイオマーカー確立のための研究を行った。

方法・結果・考察

1）モデルマーモセットの系統化

本研究に十分な質・量の動物および研究環境の整備を行った。第二世代5頭、第三世代3頭、合計8頭の次世代個体が作出された。現在、第二世代2頭、第三世代3頭の発症を待っているが、早期発症型ラインであるため今年度末までに数頭、次年度中にはすべての個体に発症を見込んでいる。ゲノム解析の結果、第一世代では、ゲノムに 4 コピー以上のトランスジーンの挿入が見られたが、第三世代の 2 頭において、それぞれ 1 コピーと 2 コピーまで純化された。今後、1 コピーまで絞られ発症すれば、発症時期・進行症状が安定したモデルマーモセットの完成となる。また、第二・第三世代のポリグルタミン病モデルマーモセットについて、早期発症と晩期発症の個体から脳神経系を採取し、各部位の導入遺伝子の発現量を比較した。その結果、早期発症個体は晩期発症個体に比べ、小脳、側頭葉、線条体、胸髄、腰髄での導入遺伝子の発現が高かった。このポリグルタミン病モデルマーモセット系統は親子で似た発症機序を示し、発症機序の違いは導入遺伝子がゲノムのどの位置に挿入されたかに起因する可能性が高いことが分かってきた。すなわち、導入遺伝子のゲノムへの挿入部位の違いで脳の各部位における導入遺伝子の発現量が変化し、発症機序に違いが出てきたものと推察された。以上の成果から発症に必要な導入遺伝子が絞られたため、今後は発症機序が均一なポリグルタミン病モデルマーモセットが完成する見通しがついた。

2）　行動バイオマーカー

a.　平衡機能評価

ポリエチレン製の棒をモータで時計回り/逆周りに一定スピードで回転させ、その上を落下せずに歩行し出口に到達した段階で報酬を与える行動課題を行わせた。充分な落下防止措置を施した。PolyQ 個体では体軸方向が健常個体と優位に異なり、予測的運動機能や運動学習機能に障害がある可能性が示された。

b.　日内活動量

日内活動量のコントロール個体を対象とした標準値作成と疾患モデルとの比較：野生型(n=10)及び TG 個体(n=10)を収容しているシングルケージに 24 時間体制で活動を監視できる受動的赤外線運動検出センサーを設置した。センサーは各個体のケージ内での運動を検出し、2 秒ごとにロガーに記録し、一年を通してほぼ継続的な計測した。F1, F2 個体ともに、身体活動量は症状の進行を反映するマーカーであることが確認された。

c. **鉛直移動能力の評価：自発的はしご登り運動についての評価方法を確立した。コントロール個体と発症前、発症後の移動能力を計測し、病状進行の指標になるか確認する目的であった。セッションは、高さ 120cm の 2cm 間隔のステップを設けた梯子を使い 5 分間行い、この間正面よりビデオ撮影することによって、四肢の運動パターンを計測した。発症個体では、ホームケージ活動量で変化が始まった時期に移動速度の低下も始まり、滞在時間の解析では、それに先んじて床にとどまる割合が増加していた。樹上生活動物であるマーモセット は、本課題をあまり訓練しなくても遂行することができることがわかり、ヒト患者の歩行機能検査の代用として、ヒト−マーモセット 共通行動バイオマーカーとして用いられる可能性を示していた。**

今後の展望

未発症の個体について継続的に計測し、その後論文化を行う予定である。本方法は疾患モデルマーモセットに広く用いることが可能な行動バイオマーカーであるので、共同研究などによって積極的に活用する予定である。

成果発表

1）小杉亮人，小泉昌司，小島潮子，川野邊哲代，関和彦： 自由行動課題を用いたマーモセット下肢筋力評価， 第 9 回日本マーモセット研究会大会，2020/2/14，シーサイドホテル舞子ビラ神戸

2）中谷輝実、小杉亮人、小泉昌司、小島潮子、川野邊哲代、野上尚武、尾張健介、沼澤秀美、皆川栄子、武内敏秀、富岡郁夫、齊藤祐子、花川隆、永井義隆、和田圭司、関和彦：国立精神・神経医療研究センターにおけるトランスジェニックマーモセット研究の現状，第 9 回日本マーモセット研究会大会，2020/2/14，シーサイドホテル舞子ビラ神戸

3）小泉昌司，野上尚武，中谷輝実，川野邊哲代，佐賀洋介，関和彦 ： 長期間にわたるホームゲージでのマーモセット運動量の計測．第 41 回日本神経科学大会．神戸国際展示場，2018/7/28

4）小泉昌司、野上尚武、佐賀洋介、川野邊哲代、小島潮子、中谷輝実、尾張健介、関和彦：遺伝子改変ポリグルタミン病モデルマーモセットの疾患進行による行動変化の探索．第 8 回日本マーモセット研究会大会．日本橋ライフサイエンスハブ，2019/2/6 – 2/7

5）野上尚武、小泉昌司、佐賀洋介、小島潮子、尾張健介、中谷輝実、川野邊哲代、富岡郁夫、関和彦：ポリグルタミン病モデルマーモセットにおける簡易レーティング法の開発．第 8 回日本マーモセット研究会大会．日本橋ライフサイエンスハブ，2019/2/6 – 2/7

6）川野邊哲代、佐賀洋介、小泉昌司、野上尚武、関和彦：マーモセット運動失調モデルのバランス歩行解析．第 8 回日本マーモセット研究会大会．日本橋ライフサイエンスハブ，2019/2/6 – 2/7

7）関和彦：遺伝子改変技術を用いた精神・神経疾患モデル霊長類の作出と評価．第 58 回日本神経病理学会総会　会長シンポジウム．学術総合センター（一橋講堂）：2017/6/2

8）関和彦：霊長類モデルを用いた運動系機能評価と神経疾患研究．第 54 回薬剤学懇談会研究討論会．熱海温泉新かどや：2017/6/9

9）関和彦：遺伝子改変技術を用いた神経疾患モデルマーモセットの作出と利用．第 37 回ヒューマンサイエンス基礎研究講習会．NCNP 教育研修棟ユニバーサルホール：2017/9/12

10）野上 尚武，尾張 健介，中谷 輝美，小泉 昌司，佐賀 洋介，川野邊 哲代，永井 義隆 ，富岡 郁夫，関 和彦 ：ポリグルタミン病モデルマーモセットのライン化及び表現型解析．第 40 回日本神経科学大会．幕張メッセ：2017/7/22

11）野上 尚武，尾張 健介，中谷 輝美，小泉 昌司，佐賀 洋介，川野邊 哲代，齊藤祐子 ，富岡 郁夫，関 和彦：ポリグルタミン病モデルマーモセットの作出と病態解析．日本畜産学会第 123 回大会．信州大学農学部：2017/9/4 – 9/8

12）野上 尚武，尾張 健介，中谷 輝美，小泉 昌司，佐賀 洋介，川野邊 哲代，齊藤祐子 ，富岡 郁夫，関 和彦：ポリグルタミン病マーモセットの病態解析．第 7 回日本マーモセット研究会大会．京都大学芝蘭会館：2018/1/17

29-5 「ポリグルタミン病モデルマーモセット系統を用いた病態理解と治療法開発」（分担課題名）

分担研究者　　髙橋　祐二
（所属）国立精神･神経医療研究センター･病院・脳神経内科

緒　言

本研究の目的は、MJD/SCA3 に関して、ヒトとマーモセット両方の病態を反映する共通のバイオマーカーを確立することである。共通バイオマーカーを用いて発症早期の変化を検出することにより、早期診断が可能となり、病態抑制治療の早期導入に繋がる。マーモセットを用いた治療研究における鋭敏かつ信頼性の高いマーカーの確立は、マーカーを活用した自然歴の確立、治療効果の判定に有用であり、治験を行うための基盤が整備される。

方法

MJD/SCA3 患者における行動バイオマーカーの開発に関して、NCNP 内での研究倫理申請を行う。NCNP 受診患者において研究同意を取得する。患者リクルートには運動失調症の患者レジストリ J-CAT も活用する。行動バイオマーカーのデータを経時的に追跡する。SARA 等の臨床症状評価バッテリーを同時に取得し、データの相関を検討して妥当性を検証する。罹病期間が異なり、発症年齢、そして CAG リピート数の比較的類似した患者群において、罹病期間による行動バイオマーカーの差異を評価し、同一患者の経時的データの外挿と合わせて、臨床指標としての有用性を検証する。

結果

本年度は、センター内での MJD/SCA3 患者の血清/髄液検体の収集を推進し、血漿/血清 7 例、髄液 5 例の検体を収集した。さらに、University of College London との共同研究で Neurofilament L の測定を開始した。一方、J-CAT を用いた患者レジストリを積極的に進め、年度内に 1460 例の運動失調症患者の登録が得られ、そのうち 809 例の遺伝子検査が終了した。MJD/SCA3 と診断されたのは 74 例(10%)であった。また、J-CAT を活用して血漿を収集する体制を整備し、さらなる検体収集の体制を整えた。

考察

本研究においては MJD/SCA のバイオマーカーを探索するために血清・髄液等のリソース収集が必要である。本年度は順調に検体収集が進捗した。今後も継続的にリソースを蓄積していく。レジストリは順調に進捗し、比較的早期からの患者登録を達成している。MJD/SCA3 に関しては、米国の 138 例のコホート(1)、欧州の 139 例のコホート(2)などがあるが、それらと比肩しうるコホートが構築されつつある。また今年度よりゲノム DNA のみならず血漿の収集体制も整え、より統合的な研究体制が構築された。今後はさらに J-CAT を発展させ、MJD/SCA3 のバイオマーカー探索にも活用する。

結論

期間を通じて順調に研究は進捗した。今後は蓄積したリソースを活用してヒト・マーモセット共通のバイオマーカーの探索を行う。

参考文献

1. Ashizawa T, Figueroa KP, Perlman SL, Gomez CM, Wilmot GR, Schmahmann JD, et al. Clinical characteristics of patients with spinocerebellar ataxias 1, 2, 3 and 6 in the

US; a prospective observational study. Orphanet journal of rare diseases. 2013;8:177.
2. Diallo A, Jacobi H, Cook A, Labrum R, Durr A, Brice A, et al. Survival in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): a longitudinal cohort study. Lancet neurology. 2018;17(4):327-34.

研究発表

1. Shinji Oda, Yuji Saitoh, Yuji Takahashi, Hidehiro Mizusawa, Japan Consortium of Ataxias. Exploration of Evaluation Tool for ADL by Historical Review in Hereditary SCD Patients. 第 60 回日本神経学会学術大会　大阪（2019）

2. Yuka Hama, Hidetoshi Date, Yuji Takahashi, Hidehiro Mizusawa, and J-CAT (Japan Consortium of Ataxias). Epidemiological analysis of the hereditary spinocerebellar ataxias: J-CAT study 第 60 回日本神経学会学術大会　大阪（2019）

知的所有権の出願・取得状況

なし。

29-5「ポリグルタミン病モデルマーモセット系統を用いた病態理解と治療法開発」

（分担課題名）

ポリグルタミン病モデルマーモセットの病理解析

分担研究者　齊藤祐子

（所属）国立精神・神経医療研究センター病院　臨床検査部

緒　言

これまで、当センターで開発されたポリグルタミン病(SCA3)モデルマーモセットの病理解析に取り組んできた（参考文献１）。昨年度はMRI 画像との対比が取るための方法論の確立を行った。今年度はこれまでに病理解析した個体の病理につき、臨床像との比較、導入遺伝子発現の部位差と病理の相違の有無、ヒトSCA3 との比較をさらにすすめた。

方法

これまでに実験殺された発症個体合計6個体を主に対象とした。実験殺後、大脳・小脳・脳幹は半分に切り、半分を病理検索用に4%PFAに固定した。生化学・遺伝子解析用の反対側は必要量を採取した残りの部位を電顕観察用に4%グルタールアルデヒドにて固定した。末梢神経は半切し、GAにてそれぞれ固定した。脊髄は脊椎を含んだ形で4%PFAに固定した。筋の一部を4%PFA固定した。一般臓器はすべて4%PFA固定した。大脳・小脳・脳幹は一晩MRI撮像後、パラフィン包埋し、６ミクロン厚切片を作成した。脊髄は２日間固定後、脊髄を細切、パラファイン包埋およびGA固定後、エポン包埋した。他の4%PFA固定組織はすべてパラフィン包埋し、GA固定組織はエポン包埋を行った。パラフィン包埋切片は、通常染色と、抗ポリグルタミン、抗GFAP、抗Iba 1, 抗ubiquitein抗体等にて免疫染色を施行した。エポン包埋ブロックは、電顕観察を行った。今年度は主に光顕所見と導入遺伝子の部位差との比較を行った。

そして、次の個体の解析までにこれまでの結果の論文化を進めた。

結果

導入遺伝子の発現については、late onsetのPQD11では、脳幹。前頭葉、後頭葉において発現量が高いというデータが得られている。一方early onset のPQD 13, PQD 14では側頭葉、線条体、胸髄、腰髄の発現量が高く、小脳ではやや高く、海馬および頚髄では後者のみがやや高いという結果であった。

病理学的には、封入体の数、ミクログリアの活性化の状態、GFAPによる変性の度合い等により、部位別に評価を行ったが、半定量化による評価によっても脳幹では明らかな相関がみられた。他の部位では上記の方法では、明らかな相関を見ることは困難であった。

ヒトとの比較のために封入体の超微構造の観察を行ったところ、限界膜をもたない、ランダムな線維が密に配列している封入体を観察することに成功した。

考察

本モデルでは、脳幹の所見が特徴的で、個体差、あるいは同胞例での類似像が特徴的であった。今回導入遺伝子との相関がその部位で明らかであったことはそれを裏付ける結果であったと考える。封入体の超微形態については、ヒトの封入体で観察に成功した報告がなく、引き続き自験例で観察を試みたい。

結論

本モデルは生検可能な部位の障害が強く、治療効果を縦断的に判定できると考えた。

参考文献

Tomioka I, Ishibashi H, Minakawa EN, Motohashi HH, Takayama O, Saito Y, Popiel HA, Puentes S, Owari K, Nakatani T, Nogami N, Yamamoto K, Noguchi S, Yonekawa T, Tanaka Y, Fujita N, Suzuki H, Kikuchi H, Aizawa S, Nagano S, Yamada D, Nishino I, Ichinohe N, Wada K, Kohsaka S, Nagai Y, Seki K. Transgenic Monkey Model of the
Polyglutamine Diseases Recapitulating Progressive Neurological Symptoms. eNeuro.
2017 Mar 28;4(2).

研究発表

なし

知的所有権の出願・取得状況

なし

29-5「ポリグルタミン病モデルマーモセット系統を用いた病態理解と治療法開発」

（分担課題名）ポリグルタミン病モデルマーモセットのライン化

分担研究者　　富岡　郁夫
（所属）　　信州大学農学部

緒　言

ポリグルタミン病は、ハンチントン病や様々な脊髄小脳失調症など９疾患の総称であり、原因遺伝子内のグルタミンをコードする不安定なCAG リピート配列の異常伸長が原因である。我々はこれまでに、CMV プロモーター下でポリグルタミン病原因遺伝子が発現するポリグルタミン病モデルマーモセットの作出に成功した。このモデルは正常に発育したのち発症し、緩徐行性の症状を示した一方で、胎生期の高い流産率や若齢期の発症により系統維持が困難であった。この原因として、強力なユビキタスプロモーターであるCMV を用いたことが挙げられる。この結果を受けて、導入遺伝子の人為的発現制御を可能にするため、Tet-on システムを導入したポリグルタミン病マーモセットを作出し、産仔獲得に成功した。そこで本研究は、このポリグルタミン病モデルマーモセットを系統（ライン）化することを目的とした。

方法

凍結保存していたトランスジェニックマーモセット精子を、卵細胞質内精子注入(ICSI)法を用いて第二・第三世代を作出した。また、成熟したトランスジェニックマーモセットは自然交配させ、産子を獲得した。産子について、遺伝子解析によりトランスジーンの挿入部位を特定し、遺伝子発現量解析によりトランスジーンの発現量を定量した。

結果

CMV プロモーターで病原遺伝子が発現するポリグルタミン病モデルマーモセットを増産し、解析した。第二・第三世代のモデルマーモセットも安定して発症が認められた。ゲノム解析の結果、第一世代では、ゲノムに 4 コピー以上のトランスジーンの挿入が見られたが、第三世代の 2 頭において、それぞれ 1 コピーと 2 コピーまで純化された。今後、1 コピーまで絞られ発症すれば、発症時期・進行症状が安定したモデルマーモセットの完成となる。また、第二・第三世代のポリグルタミン病モデルマーモセットについて、早期発症と晩期発症の個体から脳神経系を採取し、各部位の導入遺伝子の発現量を比較した。その結果、早期発症個体は晩期発症個体に比べ、小脳、側頭葉, 線条体, 胸髄, 腰髄での導入遺伝子の発現が高かった。このポリグルタミン病モデルマーモセット系統は親子で似た発症機序を示し、発症機序の違いは導入遺伝子がゲノムのどの位置に挿入されたかに起因する可能性が高い。以上の成果から発症に必要な導入遺伝子が絞られたため、今後は発症機序が均一なポリグルタミン病モデルマーモセットが完成する見通しがついた。

TET システム導入ポリグルタミン病マーモセットを作出し、4 頭のトランスジェニックマーモセットの獲得に成功した。ドキシサイクリンを投与することで遺伝子発現量が増加したことから、個体レベルで Tet-on システムが正常に機能していた。次に、最も遺伝子発現量の高かった TET3 から、自然交配により第二世代を作出した。その結果、1 頭のトランスジェニック個体の獲得に成功し、Tet-on システムが正常に機能していた。以上より、Tet-on システムを導入したポリグルタミン病モデルマーモセットの系統作出に成功した。

考察

子孫にも安定して症状が受け継がれる、ポリグルタミン病モデルマーモセットのライン化に成功した。次世代以降でトランスジーンが 1 か所になることで、単一遺伝子に起因するモデル系統が完成する予定である。また、、人為的に遺伝子発現誘導可能な Tet-On システム導入ポリグルタミン病モデルマーモセットのライン化にも成功した。得られたマーモセットで発症が確認されれば、世界初の人為的に発症を制御できる疾患モデル霊長類となる。この動物は発症を任意でコントロールできことが最大の利点であり、いったん発症させた動物の遺伝子発現を抑制することで、霊長類において『神経変性の進行程度と可逆性の関係』を証明できることや、異なる成長段階で発症させることで『成長段階と症状の関係』を探索できる。また、病原遺伝子を止めた状態は治療後の回復時期の状態を模倣できるため、治療バイオマーカーの開発にも繋がる可能性を持つ。

結論

子孫にも安定して症状が受け継がれる、ポリグルタミン病モデルマーモセットのライン化に成功した。

研究発表

1. Tomioka I, Nagai Y, Seki K. Developing biomarkers for neurodegenerative diseases using genetically-modified common marmoset models. Neural Regeneration Research. 13(7): 1189-1190, 2018.

2. Tomioka I, Nogami N, Nakatani T, Owari K, Fujita N, Motohashi H, Takayama O, Takae K, Nagai Y, Seki K, Generation of transgenic marmosets using a tetracyclin-inducible transgene expression system as a neurodegenerative disease model. Biology of Reproduction, 97(5), 772-780, 2017. 5YIF＝3.445 (JCR2017), Rank 5 / 29 in Reproductive Biology.

3. Tomioka I, Ishibashi H, Minakawa EN, Motohashi H, Takayama O, Saito Y, Popiel HA, Sandra P, Owari K, Nakatani T, Nogami N, Yamamoto K, Noguchi S, Yonekawa T, Tanaka Y, Fujita N, Suzuki H, Kikuchi H, Aizawa S, Nagano S, Yamada D, Nishino I, Ichinohe N, Wada K, Kohsaka S, Nagai Y, Seki K, Transgenic monkey model of the polyglutamine diseases recapitulating progressive neurological symptoms. eNeuro, 4(2),0250-16,2017.

知的所有権の出願・取得状況

Intramural Research Grant (29-5) for
Neurological and Psychiatric Disordersof NCNP
Understanding of pathology and development of new therapy of
Polyglutamine disease using transgenic marmoset lines.
Principle investigator: Kazuhiko SEKI (NCNP)

We generated SCA3 model marmosets (n=7) and established the disease model line by generating F1 (n=5) and F2 (n=3) animals. In this three years, we performed an extensive phenotyping from different aspects, e.g. behavior measurement, biochemical analysis, non-invasive brain imaging, pathological analysis. According to these analysis, we proposed the biomarker that reflect the onset and progression of the symptom, and some of them were confirmed to be shared in human patients.

【Behavior】We routinely performed the measurement of daily activity, ladder-climbing task, and beam-walking task on both TG and control animals to detect the onset and progression of symptom. As a result, we established a reliable test battery. These test could evaluate the ability of locomotion, equilibrium, and general motor function separately. 【Brain Imaging】While the brain volumes gradually increase from 3 months to 9 months of age in the wild type, it is less dominant in the TG group. This observation suggest TG marmosets may exhibit developmental disorder of the brain structure before the onset of symptom, suggest that the MRI could be used to as a biomarker predicting the onset of symptom. 【Biochemistry】By means of exosome analysis, we found the potential biomarker that could be shared between human patient and TG marmoset. On the other hand, we found a preliminary finding indicating that the Neuro Filament Light chain (NfL) could also be functioning as the shared biomarker between human and marmoset (temporarily paused due to Covid-19 pandemic).【Pathology】In the case of littermates twins, we confirmed the tendency that pathological images are similar. These

image is comparable between F0 and F1 animals in general. However, we could not find the difference between the early and late onset line.
【Human MJD】We have established a system to conduct clinical research with ethics approval. We also confirmed 12 MJD/SCA patients and measured using test battery like SARA scores and others. We accumulated the patient registry composed by 1460 patients, and genotyping of them are in progress (finished 809/1460)【New animal model】In order to enable artificial expression control of the transgene, we have been developed and evaluatd polyglutamine disease marmosets that introduced by the Tet-on system.

29−6 発達障害の治療法の確立をめざすトランスレーショナルリサーチ

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター

一戸紀孝

総括研究報告

1. 研究目的

自閉症は近年、自閉症スペクトラム障害（ASD）と呼ばれるように、多くの原因からなる多様な疾患を含むと考えられている。また、ADHD, LD などの発達障害を併発することが知られている。当研究はヒトに近い霊長類マーモセットを用いたASDモデルによる研究と、ヒトのASDと併発する発達障害の研究を並行して行い、それぞれのメリットを活かして、ASDに関する理解を深め、病態生理、バイオマーカー、行動発達特性、診断法、治療法に迫ろうとするものである。

動物モデルグループはバルプロ酸母体投与で作成された自閉症霊長類モデルマーモセットを用い、侵襲的な実験を含むことのできるメリットを利用して、行動学的、分子生物学的、脳形態的(イメージングを含む)、電気生理学、薬理学的手法を含む集学的な方法で、総合的に検討を行い、行動、脳形態、分子生物学的なレベルで、この自閉症様モデルの統一的な理解をし、治療法の開発、バイオマーカーの発見を目指す。

発達障害臨床グループは、多様なアプローチを用いて、自閉症および併発しやすい発達障害の行動学的特徴の定量化、生理学的・遺伝子的・細菌学的バイオマーカーの検討、コホート的早期発見と予後の追跡、行動学的・薬理学的治療法の検討を行い、動物モデル班に実際のヒトASDおよび類縁疾患のフィードバックを行い、同時に、実際の自閉症を含む発達障害の臨床的診断、治療の道を追求する。その際に、動物行動グループからのデータを活かしていくことを目的とする。

2. 研究組織

主任研究者
一戸紀孝　国立精神・神経医療研究センター

分担研究者
川合伸幸　名古屋大学
郷　康広　自然科学研究機構・新分野創成センター
稲垣真澄　国立精神・神経医療研究センター
中川栄二　国立精神・神経医療研究センター
北　洋輔　国立精神・神経医療研究センター
加賀佳美　国立精神・神経医療研究センター
小枝達也　国立成育医療研究センター
山下裕史朗　久留米大学
功刀　浩　国立精神・神経医療研究センター
神尾陽子　国立精神・神経医療研究センター
高橋秀俊　高知大学
山末英典　浜松医科大学

3. 研究成果

ASD モデルマーモセットの大脳皮質の発達に沿った遺伝子異常を検討した。発達期に関しては、新生児期、ASD の診断がなされる小児期、およびそれ以降である思春期のデータの取得・解析を行った。そのデータを、米国の孤発性 ASD 遺伝子異常バンクと比較を行った。その結果、小児期と思春期の異常遺伝子とヒト孤発性 ASD の異常遺伝子はよく相関していることが見出され、モデルマーモセットが孤発性 ASD 研究のために有用な動物であると考えられた。興味深いことに、モデル動物の新生児期の発現異常遺伝子は、小児期や思春期の発現異常遺伝子とは異なった遺伝子群であり、ヒトの ASD も新生児期ではその後の遺伝子異常とは異なる遺伝子変化が起こっていることが示された。これはヒト ASD の治療法に関して、時期特異的なターゲットを考慮に入れなければならない可能性を示している。また、ラットでのバルプロ酸による ASD モデル動物の皮質発現異常遺伝子とマーモセットの発現異常遺伝子との共通性はほとんどなく、同じバルプロ酸の投与でも、ラットとマーモセットはバルプロ酸により異なる遺伝子発現変動が起こっていることが示された。また、ラットの遺伝子変動に関しては、ヒト ASD との相関は見られず、霊長類特異的な遺伝子発現変化が想定された（Watanabe ら, 投稿準備中)。

ZD3 という左右の社会脳をつなぐ交連繊維の形成に重要であると想定されていた遺伝子が新生児期で低下していることが示された。そこでこの FZD3 の機能に関して、マーモセットで DTI を用いて検討した。その結果、想定通りに交連繊維の形成異常がモデル動物で見出された。ASD で知られている左右交連繊維の障害の原因遺伝子として、FZD3 の寄与があると考えられた。これは初期の交連繊維の発達異常の治療法として、FZD3 をターゲットにした方法の有用性を示したと言える（Mimura ら、2019)。

ASD の症状にはシナプス障害があるとされている。そこで、我々は遺伝子変化と同様に、シナプス機能・構造の異常に関して、発達期に沿った解析を行った。その結果、マーモセットの思春期ではヒト孤発性ASD

と同様に興奮性シナプスが過剰に発達していることが示された。しかし、新生児期には、逆に興奮性シナプスの数が低下していた。また小児期特異的に異常発現 LTD（可塑性を示すマーカー）が観察され、興奮/抑制比の低下も見られた。これらのことは、ASD の時期特異的なシナプス異常の存在を示しており、異常遺伝子発現と並んで、時期特異的な治療法ターゲットを考える必要のあることが示された。

また遺伝子の解析では、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト関連遺伝子の異常が認められた。そこで我々は、ミクログリア関連マーカーである Iba-1 免疫組織化学をおこない、モデル動物のミクログリアが過剰活動していることを見出した。このことは、自閉症免疫仮説とあっていると考えられた (Sanagi ら、2019)。

マーモセットが、不公平忌避を示すかを実験的に検討した。その結果、公平な報酬の時はコントロール群・モデル動物群ともに 90%以上の課題遂行率を示した。それに対して、不公平な報酬の時では、コントロールマーモセットは、不公平忌避を示し、モデルマーモセットは不公平忌避を示さないことが明らかになり、胎生期バルプロ酸曝露は、個体の社会性に大きな影響を与えることがさらに示された（Yasue et al., 2018)。

臨床グループは、自閉症およびその関連発達障害に関して、多方面からの検討を行ない、これらの発達障害における病院および社会での実装的な研究を行った。多動性の客観的指標として一定時間内の身体活動を活動量計により定量的に測定した。多施設共同で研究を進め ADHD 児 84 名（男児 73, 5.0-14.9 歳), ADHD+ASD 児 59 名（男児 54, 5.0-15.3 歳）および TD 児 105 名（男児 50, 4.1-15.0 歳）の活動量（10 分間）の結果から ADHD 児のみ TD 児より活動量が高値になる傾向が示された。ADHD+ASD 群は TD 群と有意差はなかった。すなわち活動量に基づく多動性の診断メニューは ASD 併存の有無と年齢に応じて作成する必要があることが明らかになった。

脳波（ERP)、近赤外線スペクトロスコピー（NIRS）による非侵襲的脳機能指標や行動学的指標を活用し実行機能評価を行い、ASD の生理指標として「社会性課題」を作成し、定型発達児では Feedback related negativity: FRN が年齢変化する事を見出した。

また脳波ネットワーク解析では ASD のネットワークパターンが異なる可能性が示された。415 名の小学生のコホート調査を実施し、算数障害の早期発見と早期介入に必要なスクリーニング検査として新たに「数的基礎力検査」を開発し、その基準値を設定した。また、算数障害の背景にある認知特性を探り、数の大きさの表象課題（数直線課題）が鋭敏でかつ重要であることを明らかにした。

比喩皮肉文テストでは ASD とコミュニケーション障害との間に社会機能的な言語能力の差異は認められなかった。外来通院中の発達障害患者についてグアンファシン塩酸塩（GXR）が入眠時脳波や併存するてんかんや他の併存症に与える影響や効果について検討した。GXR はてんかんや脳波異常を伴う ADHD に対して治療効果を認め、朝方の日常生活機能を改善する。併存する反抗挑発症と睡眠障害に対する有効性も見出された。抑肝散が睡眠障害と QOL 改善に有効である事も見出した。

ASD 児をもつ母親が受講したプログラムから養育レジリエンスを向上させる要因を抽出した。すなわち、保護者が子どもに適切な期待をもちつつ、子どもに身につけさせることに困難を抱えている基本的生活習慣（食事、睡眠、排泄、清潔、衣服の着脱、朝もしくは夜の一連の行動、礼儀）に取り組むことで、これらについて成功体験をもつことであった。養育レジリエンス向上に特に有用な要素をコアにした ASD 児をもつ保護者のニーズに合ったスペシャルメニューを開発し得た。

オキシトシンとドーパミン神経系・セロトニン神経系の相互作用が ASD 者と TD 者で異なることを見出した。ASD 児で変動のある腸内細菌群の検索を行った。

4. 研究成果刊行一覧

1. Mimura K,途中 12 名, Ichinohe N*. Abnormal axon guidance signals and reduced interhemispheric connection via anterior commissure in neonates of marmoset ASD model. Neuroimage , 2019, 195:243-251

2. Sanagi T, 途中 4 名, Ichinohe N*. Segmented Iba1-Positive Processes of Microglia in Autism Model Marmosets. Front Cell Neurosci. 2019, 13:344-

3. Komatsu M, Kaneko T, Okano H, Ichinohe N. Chronic Implantation of Whole-cortical Electrocorticographic Array in the Common Marmoset. J Vis Exp. 2019, (144).

4. Owada K, 途中 27 名, Yamasue H*. Quantitative facial expression analysis revealed the efficacy and time-course of oxytocin in autism. Brain 2019; 142: 2127-2136.

5. Takahashi H, Nakahachi T, Stickley A, Ishitobi M, Kamio Y. Relationship between physiological and parent-observed auditory over-responsiveness in children with typical development and those with autism spectrum disorders. Autism, 22, 291-298, 2018.

マーモセット自閉症モデルに有効な薬物の開発

分担研究者　一戸　紀孝
国立精神・神経医療研究センター

緒　言

高度な社会性/コミュニケーションと知性をもつ霊長類マーモセットは、精神・神経疾患モデルとしてげっ歯類よりも質的に高い評価に耐えると考えられる。我々は昨年度までの開発費の研究として、妊娠マーモセットの妊娠中期に抗てんかん薬バルプロ酸を1週間投与した際の産出仔が自閉症様行動を取ることを示した（Yasue et al., 2015, 2018）。我々はこのようにして産出した動物を自閉症スペクトラム障害（ASD）のモデルマーモセットとしてさらなる研究を展開している。当該年度は、このASDモデルマーモセットの行動異常の脳基盤を探るために、遺伝子発現検出法、スライスパッチクランプを用いた薬理学的手法、および免疫組織化学やDTIを用いた形態学的手法を用いて、集学的な研究を行った。また、ヒトと同様なバイオマーカーを検出するための技術開発を行った。

方　法

①モデル動物の脳遺伝子発現の検討

自閉症の病態の背後には遺伝子自体の異常と、遺伝子発現の異常があると考えられている。本モデルは、遺伝子発現に影響を与える、エピジェネティックな手法で作成されている。その遺伝子発現の異常に関して調べた。解析に関しては、P0, 2M, 3M, 6M、成体（1Y6M以降）と発達に沿って、大脳皮質の6カ所から遺伝子発現解析のための検体を採取した。P0は新生児、2M, 3Mは小児期、6Mは思春期前期と考えられる。その検体からマイクロアレーを用いて、遺伝子発現のデータの取得を行なった。

a. モデル動物の遺伝子発現とヒト孤発性遺伝子発現との比較

本モデル動物の妥当性を調べるために、ヒト孤発性ASDの遺伝子発現との比較を行なった。現在、ヒト孤発性ASDに関しては、米国において大きな情報バンクがある。この情報バンクは診断が確定する小児期から成人のデータを含んでいる。このヒトの孤発性ASDの遺伝子発現異常とマーモセットモデル動物の遺伝子異常の間の相関関係を調べた。

b. 新生児期の異常発現遺伝子の機能的検討

新生児期に特に発現の異常の程度が高い遺伝子を調べ、その機能的意義に関して新生児脳の形態に関してDTIを用いて検討した。

c. 異常発現遺伝子のインフォーマティクスによる解析

異常発現遺伝子をgene ontology、pathway解析ソフトなどを用いて機能的意義づけに関して検討した。

②モデル動物のシナプス解析

ASDはシナプス病であると言われている。そこでシナプスの形態と機能に関して調べた。

a 大脳皮質細胞への興奮性入力量の解析

a-1. 解剖学的解析

皮質の錐体細胞の樹状突起棘（スパイン）は興奮性入力を受ける構造であり、その数を数えることにより、興奮性入力の数を知ることができる。神経細胞に染色物質を注入して、神経細胞全体の形態を可視化し、基底樹状突起上のスパインの密度および総数に関して検討した。この検討も発達期の時間軸にそって、多数の皮質領野に関して行なった。

a-2.電気生理学的解析

内側前頭前野の生体外スライスを作成し、電気生理学的にmEPSPを計測することにより興奮性の入力数を検討した。この際、検討した時期は新生児期（0 d）,小児期(3M), 思春期（6M）であった。以下の、シナプス関連の実験は、本実験と同じ条件で行われた。

b. 興奮性入力/抑制性入力比(E/I ratio)の検討

E/I ratioは自閉症の発症にとって重要と考えられている。このE/Î ratioを計算するためにmIPSPを記録し、mEPSP/mIPSPをE/I ratioとして計算した。

c. シナプスの可塑性の検討

シナプスの可塑性は脳回路の改変能力を検討するための重要なファクターである。これまで齧歯類ASDモデル動物において、long-term depression(LTD)に異常があるという報告がある。そこで、マーモセットモデルでも、皮質の深部の1 Hz刺激を行い、EPSPの変化を調べた。

d. モデル動物のシナプスのフェノタイプと並行して動く発現異常遺伝子の同定

前頭前野からとった皮質組織のモデル動物と正常動物の遺伝子発現解析を行い発現異常遺伝子と発達時期にそったシナプスパラメーターの異常の相関を調べた。

e. 小児期における鳴き声の発達の異常

新生児期から小児期にすでにシナプス異常があることが示されたので、ヒトのASDが診断される小児期にマーモセットのコミュニケーションの道具であるコールについて調べた。コールは防音室に隔離して5分間の録音が行われ、コールは12種類に分け、その頻度を調べた。

③ グリアの異常の検討

ジーンチップによって、グリア細胞関連遺伝子の発現異常を調べた。また、

上のグリア関連遺伝子の発現異常の結果に相当する、形態的表現形があるかに関して、iba-1免疫組織化学およびミエリンの電顕的解析によって検討した。

④脳の機能的異常のアッセイ

a. イメージングによる解析

他のマーモセットが餌をとっている映像を見せ、上側頭溝において他者認知に関わる脳活動のモデル動物に関わる異常を、内因性光イメージングにより検討した。

b. 電気生理学的検討

モデル動物の脳活動の異常を検討するためにマーモセット用のECoG法の開発を行った。

結果—考察

① モデル動物の脳遺伝子発現の検討遺伝子

a. モデル動物の遺伝子発現とヒト孤発性遺伝子発現との比較

3ヶ月以降の発現異常遺伝子は、ヒトの小児期から大人までのデータを含んだデータベースの遺伝子発現異常と強い相関が見られた。このことは、モデル動物が孤発性ASDのモデルとして遺伝子の観点から見ても、人の状況を再現しているとみることが出来、遺伝子としての治療ターゲット遺伝子の開発において有用な動物であると思われる。しかし、P0のマーモセットの異常発現遺伝子は、マーモセットの3カ月以降のパターンおよびヒトの異常発現遺伝子とP0の発現異常遺伝子との相関は見られなかった。これはこれまで、検討することの出来なかった新生児期の異常発現遺伝子群の同定が可能になったと考えられ、ヒトの自閉症を考えるにおいて、極めて重要で新しい知見だと思われる。

b. 新生児期の異常発現遺伝子の機能的検討

P0でもっとも低下している遺伝子はFZD3であった。この遺伝子は左右の皮質を結合する前交連の発達に重要だと考えられている。そこでP0のマーモセットの前交連をDTIを用いて調べたころ、やはり縮小していることが見出され、齧歯類の遺伝子機能に関する知見が、マーモセットを介して、同様な機能を持っていることを示しえたということと、ヒトで見られる交連繊維の発達異常に関わる遺伝子に関する情報を提出しえた。

c. 異常発現遺伝子のインフォーマティクスによる解析

異常発現遺伝子のpathway解析の結果、synaptogenesis関連遺伝子や臨界期関連遺伝子群に異常があると考えられた。

②モデル動物のシナプス解析

a 大脳皮質細胞への興奮性入力量の解析

a-1. 解剖学的解析

モデル動物はスパインの密度が定型発達群と比べて、新生児期には低下しており、小児期では異常がなく、思春期では増大していることがわかった。

a-2.電気生理学的解析

モデル動物は mEPSP の頻度が定型発達群と比べて、新生児期には低下しており、小児期では異常がなく、思春期では増大していることがわかった。

二つの結果は、錐体細胞への興奮性入力に異常があることが示唆された。

b. 興奮性入力/抑制性入力比(E/I ratio)の検討

E/I ratio は、新生児と思春期のモデル動物で正常であるが、小児期では低下していることが示唆された。興奮性と抑制性の入力のコントロールのホメオスタシスに障害があることが示された。

c. シナプスの可塑性の検討

モデル動物の小児期で、異常な LTD の発現が見られた。

d. モデル動物のシナプスのフェノタイプと並行して動く発現異常遺伝子の同定

遺伝子の発現の時空間パターンによって、3つのクラスターにわかれることが示された。それぞれの遺伝子の発現パターンはシナプスのフェノタイプと相関がみられた。

e. 小児期における鳴き声の発達の異常

小児期にはコールがモデル動物で単調になっていることが示された。これはモデル動物の固執性と関連していると思われた。

③ グリアの異常の検討

マーモセットの発現異常遺伝子は髄鞘形成に関わるオリゴデンドロサイトや、ミクログリアやアストロサイトの異常を示していた。モデルマーモセットの脳にはヒト ASD と同様に全グリアを巻き込んだ異常があることを示しえた。これに一致してミクログリアに過剰活動を示す形態的特徴が見られ、電顕的研究は髄鞘形成の不全を指し示していた。

④脳の機能的異常のアッセイ

a. イメージングによる解析

上側頭溝の他者の意図を反映する活動の低下が見られた。社会脳の機能の障害があることが示された。

b. 電気生理学的検討

モデル動物の脳活動の異常を検討するためにマーモセット用の ECoG 法の開発を終了し、次のタスク中の活動の記録を始めた。

結語

本研究群により、モデル動物の遺伝子発現とそれに応ずる形態的・電気生理学的研究がフェノタイプとして一致していることを示しえた。これらが実際の ASD 者の病態とどの様な関係にあるかを検討しつつ、至適な治療薬の開発への探索を開始し得ると考えている。

マーモセットの行動発達及び行動評価に関する研究

川合伸幸
名古屋大学大学院 情報学研究科

緒言

自閉症は1000人に1-2人の割合で生じる先天性の脳機能発達障害と考えられている。しかし、脳機能上の異常から行動の問題へと至る具体的なメカニズムは未だ解明されていない。これまで多くのげっ歯類モデルと候補遺伝子は提案されているが、いずれも症候群のある一面を再現・説明しようとするものであり、ヒト自閉症モデルとして確立しているとは言いがたい。そこで本研究では、高次な知能と高い社会性を有しヒトに近縁な霊長類であるマーモセットを用いて、行動評価系の確立を行い、ヒト実症例に近いモデル開発に繋がる研究を目指した。

方法

①唾液中コルチゾール値の日内変動

ヒト自閉症者では、コルチゾールの分泌に障害があることや心拍数が多いことなど、内分泌機能のリズム異常が報告され始めている。本実験では、マーモセット自閉症様モデルにおいても類似した異常が見られるかを調べるため、同一日においてバルプロ酸に暴露されなかった個体（UE 群）と胎生期にバルプロ酸に暴露された個体（VPA 群）の唾液中コルチゾール値を、飼育室の照明点灯 30 分後（午前 7 時 30 分）と消灯 30 分前（午後 6 時 30 分）の２回測定し比較した。

②小型加速度計による活動量分析

多動性や過活動性は自閉症様症状の一つである。自閉症モデルマーモセットにもヒト自閉症者と類似した活動性の異常が認められるかを調べるため、小型加速度計を個体に 3 週間装着し、装置に慣れ安定的に計測できた 1 週間分のデータを解析した。

③ストレス事象に対する応答性の検証

自閉症をはじめとする発達障害では、その障害特性がストレス脆弱性を高めていることが報告されている。そこでまずは UE 群を対象個体とし、ストレス事象となり得る物体（ヘビのゴム製玩具）を呈示して、回避行動や警戒音声が発せられるか調べた。また、急性ストレスに応答して分泌されるコルチゾール値を玩具呈示の前後 30 分で測定した。

④オキシトシン投与による行動試験評価

鼻腔からオキシトシン（脳下垂体後葉から分泌されるホルモンの一種）を投与することで、自閉症のコミュニケーション障害が改善されることが最近の研究で示唆されている。近年、マカクザルでも鼻腔にオキシトシンを投与する実験が行われている。それらの実験では他個体に対する注意が変化するなどの結果が得られている。そこで、自閉症モデルマーモセットにオキシトシンを投与することで他個体への注意が変化するかを調べた。他個体と自身の報酬の差を反映する不公平忌避課題を評価指標とした。

実験前に対象個体に対して鼻腔への溶液投与訓練を行い、投与への馴化を行った上で生理食塩水とオキシトシンを投与し不公平忌避課題を実施した。投与 30 分後に同じ報酬が得られる条件を 2 日間（ET セッション）、その後パートナーが価値の高い報酬を得る条件を 2 日間（IT セッション）実施した。その後パートナーを交代してオキシトシン投与後にさらに ET セッション、IT セッションを実施した。

⑤行動指標の関連

本研究に参加しているマーモセットは生後間もない頃から行動テストを実施されている。それらの個体の行動の変化や一貫性を縦断的に調べることが可能である。そこで、生後 15 週齢から 19 週齢までに実施した社会性テストと、成体になってからの高次社会認知実験との関連を調べた。

結果

①唾液中コルチゾール値の日内変動

点灯 30 分後の測定において、VPA 個体が UE 個体と比較して有意に高いコルチゾール値を示したが、消灯 30 分前の計測時には有意差はみられなかった。

②小型加速度計による活動量分析

UE 群 10 頭、VPA 群 10 頭、計 20 頭のホームケージでの活動量を統計的に比較した結果、UE 群に比べ

てVPA群では日中（午前7時から午後7時:飼育室内照明が点灯する12時間）の活動量が有意に高いことが認められた。

③ストレス事象に対する応答性の検証

玩具非呈示日（同じ実験環境だが玩具の呈示はしない別日）ではPheeと呼ばれるグループコンタクトコール（遠くにいる仲間に向けて発する音声）が発する音声の大部分を占めていたが、玩具呈示中にはTsik-Ekと呼ばれる警戒している際に発せられるアラームコールが頻発した。詳細な音声パターンは現在解析中である。また、玩具呈示の前後30分で測定したコルチゾール値では、玩具呈示後において上昇が認められた。

④オキシトシン投与による行動試験評価

VPA群3頭に対して行動試験評価を実施したところ、生理食塩水投与時と比較して、オキシトシン投与時にはITセッションでの不公平忌避を示す傾向が認められた。

⑤行動指標の関連

自閉症モデルマーモセットは、生後15週齢時に3チャンバーテストで評価された社会性得点と、成体になってからの不公平忌避得点およびヒト第三者の互恵／非互恵的認識得点の間にきわめて高い相関があった。これらのことは、生後15週齢の社会性得点で、2歳以降の社会行動を予測できることを示唆している。

考察

上記の結果から、VPA群ではヒト自閉症者にみられるような内分泌機能の異常や過活動性が認められることが明らかとなった。また、ヒトの臨床治験から自閉症の治療薬として効果を示すと報告されているオキシトシンが、自閉症モデルマーモセットに対しても、他個体に対する関心を高めるために有効である可能性が示唆された。

自閉症様モデルマーモセットを用いた遺伝子解析によるトランスレータブル指標の開発

郷康広

自然科学研究機構

緒言

ヒトの疾患，特に高次認知機能に関わる病態機序の解明を目的とした研究においては，ヒト脳との形態や機能分化に大きな差異があるマウス脳で得られた結果を，ヒトに外挿する方法論の限界も指摘されている．一方，ヒトにおいては、実験的な操作や侵襲的な実験が不可能なため，病態と遺伝子・分子の因果律の解明まで踏み込むことが極めて難しい現状にある．そこで本研究では，ヒトにより近縁で，高度の社会性・認知機能をもつマーモセットを対象とし，ヒト自閉症スペクトラム症の分子基盤解明およびトランスレータブル分子マーカーの開発を行うことを目的とした．国立精神・神経医療研究センター・微細構造研究部の一戸研究室においては，世界に先駆けてバルプロ酸曝露マーモセットの作出に成功しており，作出されたマーモセットは自閉症様行動を示すことが明らかになっている．また，自閉症スペクトラム症の一つの中間表現型と考えられるシナプスの刈り込み不全によるシナプス形成異常がバルプロ酸曝露マーモセットでは観察されており，マウスではこのシナプス形成異常は観察されないため，その点においても本研究で用いるマーモセットの有用性は非常に高いものと考えられる．本研究では，それらの利点を最大限に活かし，薬理学的に作出された自閉症様マーモセット脳におけるトランスクリプトーム・エピゲノムの動態変化を次世代シーケンサーを用いたオミックス解析により明らかにするとともに，ヒト自閉症スペクトラム症を含む発達障害へのトランスレータブル分子マーカーの開発を行うことを目的とした．

方法

国立精神・神経医療研究センター・微細構造研究部において薬理学的に作出された自閉症様行動を示す胎生期バルプロ酸曝露マーモセット（VPA 個体）の脳を用いた網羅的遺伝子発現解析（トランスクリプトーム解析）を行った．定型発達群（バルプロ酸非曝露マーモセット：UE 個体）との比較発現解析により，霊長類疾患モデルとしてのマーモセット脳内における遺伝子動態を明らかにし，ヒト自閉症スペクトラム症を含む発達障害の治療法の基盤となるトランスレータブル分子マーカーの開発を行った．

具体的には，妊娠 60 日齢の母体マーモセットに連続 7 日間バルプロ酸を経口投与後の出生マーモセットをバルプロ酸曝露個体（VPA 個体）とした．脳のサンプリングは新生児，2 ヶ月齢（シナプス形成期），3 ヶ月齢（シナプス数ピーク期），6 ヶ月齢（シナプス刈り込み期），および成体の各発達段階において，それぞれ area12 と area24 の脳領域を対象とした．令和元年度は，3 ヶ月齢の UE 個体と VPA 個体の area12 から調整した細胞核を用いたシングル核トランスクリプトーム解析を行った．

結果

3 ヶ月齢の UE 個体と VPA 個体の area12 を用いてシングル核トランスクリプトーム解析を行った．UE および VPA 個体それぞれ 1 個体の area12 から細胞核を調整し，DAPI 染色を行った後，DAPI 陽性細胞核をセルソーターで回収し，シングルセルライブラリ作成装置（10xGenomics 社 Chromium）を用いて，それぞれ

3561 細胞核（UE 個体），1822 細胞核（VPA 個体）のシングル核における遺伝子発現データを取得した．教師なし学習によるクラスタリングとその後の細胞種特異的分子マーカーによる細胞種の同定を行った結果，19 種類（7 種類の興奮性神経細胞，5 種類の抑制性神経細胞，アストロサイト，オリゴデンドロサイト前駆細胞，成熟オリゴデンドロサイト，ミクログリア，および 3 種類の未同定細胞）の細胞種を同定することができた．

それぞれの細胞種において，UE 個体と VPA 個体における遺伝子発現量に有意な違いが認められる遺伝子群を解析した．その結果，興奮性神経細胞では 381 遺伝子，抑制性神経細胞では 175 遺伝子，アストロサイトでは 74 遺伝子，オリゴデンドロサイト前駆細胞では 6 遺伝子，ミクログリアでは 8 遺伝子において統計的に有意な遺伝子発現量の違いを認めた．

先行研究より自閉症スペクトラム症との関連が示唆されている 215 遺伝子と比較した結果，興奮性神経細胞において 12 遺伝子（*ATP2B2, CELF4, CUX2, FOXP2, GABRB3, KCND3, MAP1A, MKX, RAPGEF4, SCN1A, SCN2A, SRSF11*），抑制性神経細胞において 6 遺伝子（*ATP2B2, KCNQ3, MAP1A, NR2F1, SLC6A1, SRSF11*），アストロサイトにおいて 2 遺伝子（*ATP1A1, NRXN1*）が自閉症スペクトラム症関連遺伝子に該当した．特にナトリウムチャネル（SCN1A, SCN2A），GABA トランスポーター（SLC6A1）シナプス接着因子（NRXN1）などシナプス機能などに関わり自閉症スペクトラム症との高い関連性があると考えられている分子をコードする遺伝子が同定された．

考察

上記のいくつかの比較トランスクリプトーム解析において定型発達群（UE 個体）とバルプロ酸暴露群（VPA 個体）において，シナプス関連遺伝子群に発現差を示す遺伝子が多く同定できた．これらの遺伝子オントロジー，生物学的パスウェイは自閉症スペクトラムを含む多くの精神疾患との関連が示されているため，今回の作出されたマーモセットモデルは，自閉症スペクトラム症のモデル動物となる可能性を示唆する．同時に，今回同定した遺伝子はトランスレータブルな分子マーカーとなり得る．

令和元年度を含めて過去 3 年間の研究開発費により行ったトランスクリプトーム解析において興味深い遺伝子候補が同定できた．シングルセルレベルでの遺伝子発現解析は，まだそれぞれ 1 個体の 1 領域の比較にとどまっているため，個体数と領域数，さらに各発達段階における比較解析をさらに進め，より精度の高いトランスレータブル分子マーカーの同定を進める．

結論

本研究では，シナプス刈り込み不全，およびヒト自閉症スペクトラム症様の行動を示すバルプロ酸暴露マーモセットの発達に応じた脳内遺伝子発現変動を明らかにし，その分子基盤とトランスレータブル指標の開発を目的とした．定型発達個体群とバルプロ酸暴露個体群との発現変動を示す遺伝子がシングルセルレベルで同定することが可能となった．その多くがシナプス機能と関連し，また自閉症スペクトラム症との関連が示唆される遺伝子であったことは特筆すべき点である．これらの研究結果から，今回作出された自閉症様マーモセット個体群は自閉スペクトラム様のモデルとなり，精度の高いトランスレータブル分子マーカーの開発につながる可能性を示すことができた．

衝動性・多動性の診断と治療メニュー作成

国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所
研究分担者：稲垣真澄

【緒言】

注意欠如多動症（Attention Deficit Hyperactivity Disorder、ADHD）は、不注意と多動性・衝動性を主症状とする神経発達症であり、有病率は、小児期から思春期の子どもで6-7%と報告されている（Fayyad et al., 2017; Thomas, Sanders, Doust, Beller, & Glasziou, 2015; Willcutt, 2012）。本研究では、ADHDの主症状のうち、齢不相応の落ち着きのなさや過剰な身体活動として観察される、多動性・衝動性に焦点を当てる。多動性・衝動性は、学校生活への適用、日常生活における安全性、他者との社会的交流などに様々な問題をもたらすことから、慎重かつ適正な評価が特に重要と考えられる。

臨床場面における多動性の評価はこれまで、診察時の行動観察や保護者等への聴取、質問紙などの主観評定が一般的であった。しかし、これらの方法に基づくADHDの診断とサブタイプ分類（不注意優性型、多動・衝動性優勢型、混合型）は、評価者や評定法、診断に用いる情報の組み合わせ方等によって結果が大きく変動し、一貫性が低いことが示されている（Kennerley et al., 2018; Rowland et al., 2008; Valo & Tannock, 2010; Vitoratou et al., 2019）。従って、ADHDの臨床診断は未だ評価者のバイアスや個々の医師の診断手法に依存する部分が大きいと言え、症状や状態が過大もしくは過小評価される可能性がある。

これに対し、多動性・主観的を客観的に評価する試みも、複数の研究で進められてきた。代表的なアプローチは、ADHDのある子どもに加速度センサーが内蔵された活動量計を装着し、身体活動量を数値化するというものである。活動量計は、子どもが動いた量や時間を記録することができ、手首、足首、腰などに着けられる小さな装置であるため、日常生活、授業中、遊び時間、睡眠中といった様々な場面で測定を実施できる。これまでの研究では、ADHDのある子どもが、同年齢の定型発達児と比較して身体活動量が増加することが概ね一貫して示されており、主観評定に代わる多動性・衝動性評価法として臨床応用が期待されている（Gawrilow, Kühnhausen, Schmid, & Stadler, 2014; Kofler, Raiker, Sarver, Wells, & Soto, 2016; Murillo, Cortese, Anderson, Di Martino, & Castellanos, 2015）。

しかし、活動量計を用いてADHD児の多動性・衝動性を検討した先行研究の多くは、計測時間が数時間から数日にも及び、また家庭や学校等で測定を行っていた（e.g., Dane, Schachar, & Tannock, 2000; Hudec et al., 2015; Kam et al., 2010; Lin, Yang, & Su, 2013; Miyahara, Healey, & Halperin, 2014; Tsujii et al., 2009; Wood, Asherson, Rijsdijk, & Kuntsi, 2009）。従って、ADHDのある子どもの身体活動量を臨床場面で求められる条件、すなわち短時間かつ統制された状況下で測定する手法は未だ開発されていない。さらに、主観評定による多動性・衝動性評価では通常、年齢を追って得点や重症度が低下するが（Biederman, Mick, & Faraone, 2000; Döpfner, Hautmann, Görtz-Dorten, Klasen, & Ravens-Sieberer, 2015; Larsson, Dilshad, Lichtenstein, & Barker, 2011; Murray et al., 2019; Pingault et al., 2015; Sasser, Kalvin, & Bierman, 2016）、活動量計を用いて測定した身体活動量について、年齢変化はこれまで検討されていな

い。多動性・衝動性において、年齢は重要な要因であることから、この点についても明らかにする必要があると考えられた。

そこで本研究では、一般的な臨床場面において短時間で実施可能な、多動性・衝動性の客観的評定法を開発することを目的とした。方法として、多施設でのADHD外来診察場面において短時間（10分間）の身体活動量計測を行い、診察場面を模した状況下で測定した定型発達児（TD児）のデータと、活動量とその年齢変化を比較した。また、主観評定との比較検証を行うため、保護者によるADHD評価スケール（DuPaul, Power, Anastopoulos, & Reid, 1998 市川・田中訳, 2008）の結果と、身体活動量の対応を検討した。さらに、ADHDのある子どもの一定数においては、自閉スペクトラム症（Autism Spectrum Disorder、ASD）の併存が認められることから（Antshel, Zhang-James, Wagner, Ledesma, & Faraone, 2016; Hansen, Oerbeck, Skirbekk, Petrovski, & Kristensen, 2018; Jensen & Steinhausen, 2015）、ADHD群を単独群（ADHD群）と併存群（ADHD+ASD群）の2群に分け、両者の相違についても探索した。

【方法】

対象児

小児神経専門医により、DSM-5（American Psychiatric Association, 2013）に基づく診断を受けたADHD児84名、ADHD+ASD児63名、およびTD児105名の計252名が研究に参加した（表1）。群間で参加者の年齢に有意差は認められなかった（$F_{2, 249} = 1.08$, $p = .34$, $\eta^2_p = .009$）。ADHD群とADHD+ASD群は、全例で知能指数または発達指数が70以上であった。ADHD症状の主観評定として、保護者による日本版ADHD評価スケール（DuPaul, Power, Anastopoulos, & Reid, 1998 市川・田中訳, 2008）の不注意得点および多動性・衝動性得点を取得し、TD群については全員の両得点が同年代の93パーセンタイル未満であることを確認した。

身体活動量の計測

身体活動量の計測は、臨床群においては外来の診察場面で主治医、保護者、および本人の3者が対面して行った。TD群については、研究者、保護者または指導者、本人が、診察場面を模した個室で測定を行った。対象児は、3軸加速度センサーが内蔵された活動量計（wGT3X-BT; Actigraph, Pensacola, Florida, USA）を、利き腕と反対の手首に装着し、イスに着席してiPodで風景写真のスライドショーを見ているよう指示された。測定時間は12分間であった。その間、主治医（研究者）は保護者（または指導者）から、対象児の普段の様子を聴取した。測定中の対象児の身体活動は、3軸（x、y、z）の加速度として記録され、サンプリング周波数は30 Hzであった。

分析方法

活動量計で記録した加速度データは、ソフトウェア（ActiLife 6, version 6.13.2, Pensacola, Florida, USA）を用いて、1秒ごとの活動量値に変換した。3軸の活動量値はベクトル値（$\sqrt{X2+Y2+Z2}$：X、Y、Zは各軸の活動量値）を算出して統合した（Martín-Martínez et al., 2012）。安定した活動量値を得るため、測定区間（12分間）の最初および最後の1分間は分析対象外とし、各対象児について10分間の活動量値を合計した総活動量を算出した。統計解析は、総活動量およびADHD評価スケールの多動性・衝動

性得点について、群（ADHD、ADHD＋ASD、TD）をカテゴリカル変数、年齢を連続変数として投入した線形重回帰分析を行い、2つの臨床群とTD群の間で総活動量の群間差、および年齢変化の差異について検討した。

【結果】

ADHD症状評定　保護者によるADHD評価スケールの評定値については、不注意得点について群の主効果が認められ（$F_{2, 249} = 133.55, p < .0001, \eta^2_p = .52$）、ADHD群、ADHD+ASD群ともにTD群より有意に高かった（both ps < .0001）。多動性・衝動性にも群の主効果が認められ（$F_{2, 249} = 96.98, p < .0001, \eta^2_p = .44$）、評定値は両臨床群がTD群よりも高く（both ps < .0001）、ADHD+ASD群がADHD群よりもさらに高値であった（$p = .0002$）。

身体活動量　図1Aは、各対象児の総活動量を、年齢を横軸にとって示したものである。線形重回帰分析の結果、群と年齢を要因としたモデルはデータと適合しており（adjusted $R^2 = .26, F_{5, 246} = 18.84, p < .0001$）、全体としてADHD群の総活動量がTD群よりも増大していたが、同様の主効果はADHD+ASD群では認められなかった（表2）。また、年齢の主効果も認められ、全体として年齢が高い児ほど総活動量が減少していた（表2）。

加えて、ADHD群については、群と年齢の交互作用が認められ、TD群と年齢変化に差異があることが示された（表2）。この結果の下位検定として、ADHD群とTD群でそれぞれ年齢を説明変数とした総活動量の単回帰分析を実施し、年齢効果の単純傾斜をt検定により比較した（Robinson, Tomek, & Schumacker, 2013）。その結果、両群で年齢を追った総活動量の減少が認められ（表2、ADHD群：adjusted $R^2 = .30, F_{1, 82} = 36.08, p < .0001$；TD群：adjusted $R^2 = .15, F_{1, 103} = 19.83, p < .0001$）、減少の傾斜はADHD群でTD群よりも急峻であることが認められた（表2、$t(187) = 4.00, p < .0001$）。一方、ADHD+ASD群については、群と年齢の交互作用が認められなかった（表2）。ADHD群との対比のため、TD群との年齢効果の比較を同様に行ったところ、ADHD+ASD群でも年齢を追った総活動量の減少は有意であったが（表2、adjusted $R^2 = .06, F_{1, 61} = 4.71, p = .03$）、TD群との間に単純傾斜の差は認められなかった（$t(166) = 0.29$ [絶対値], $p = .77$）。

多動性・衝動性得点　図1Bは、各対象児におけるADHD評価スケールの多動性・衝動性得点を、年齢を横軸にとって示したものである。線形重回帰分析の結果、群と年齢を要因としたモデルはデータと適合しており（adjusted $R^2 = .26, F_{5, 246} = 18.84, p < .0001$）、ADHD群とADHD+ASD群の両方で得点がTD群よりも増大していた（表3）。

多動性・衝動性得点については、ADHD群とADHD+ASD群で群と年齢の交互作用が認められ、両臨床群とも年齢変化にTD群との差異があることが示された（表3）。総活動量と同様に、各群で年齢を説明変数とした単回帰分析を実施したところ（Robinson, Tomek, & Schumacker, 2013）。ADHD群とADHD+ASD群では年齢を追った得点の低下が認められたが（表3、ADHD：adjusted $R^2 = .08, F_{1, 82} = 7.61, p = .007$；ADHD+ASD：adjusted $R^2 = .12, F_{1, 61} = 9.51, p = .003$）、TD群では認められなかった（adjusted $R^2 = -.006, F_{1, 103} = 0.36, p = .55$）。年齢を追った得点の低下（単純傾斜）はADHD群、ADHD+ASD群ともにTD群よりも有意に急峻であった（ADHD：$t(187) = 3.39, p = .0008$；ADHD+ASD：$(t(166) = 4.04, p < .0001)$）。

【考察】

外来診察場面、あるいはそれを模した状況下で計測した、短時間（10 分間）の身体活動量データは、ADHD 群の身体活動が全体として TD 群よりも多く、年齢を追った活動量の減少が ADHD 群でより顕著に生じることを示した。このことから、身体活動量の計測は主に、低年齢の ADHD 児（単独例）において落ち着きのなさや過剰な身体活動を把握するのに貢献すると考えられる。反対に高年齢の ADHD 児では、年齢を追った身体活動量の急峻な減少により、TD 児との差異が観察されなくなるため、多動性・衝動性の評価方法としては適さないことも示唆された。ADHD 児の身体活動量に関する先行知見の多くが、数時間から数日に及ぶ計測データに基づいていたことを踏まえると（e.g., Dane, Schachar, & Tannock, 2000; Hudec et al., 2015; Kam et al., 2010; Lin, Yang, & Su, 2013; Miyahara, Healey, & Halperin, 2014; Tsujii et al., 2009; Wood, Asherson, Rijsdijk, & Kuntsi, 2009）、本知見は活動量計を用いた多動性・衝動性の客観評定は、臨床場面により即した手法で実施可能であることを実証したと言える。加えて、活動量計測による同様の検討で、広範な年齢層における発達的変化を示したのは本研究が初めてであり、多動性・衝動性の客観評定の応用可能性が年齢に依存することを示した点にも意義がある。

さらに、身体活動量とその年齢変化に関する ADHD 群と ADHD＋ASD 群の比較では、前者にのみ TD 群との差異が示され、後者では総活動量の増大や年齢変化の違いが認められなかった。ASD の併存は、ADHD 症状の重症度や適応機能の問題を増大させることが示されているが（Ashwood et al., 2015; Green et al., 2015; S. Thomas, Sciberras, Lycett, Papadopoulos, & Rinehart, 2018; Van Der Meer et al., 2012）、本知見からは単独例と併存例が多動性・衝動性に関して、異なる臨床像および発達的変化を呈することが明らかになった。ASD 単独例や広汎性発達障害では、身体活動量が定型発達児よりも低下する時間帯や瞬間があることが示されているが（Ogino et al., 2018; Takahashi et al., 2018; Tsujii et al., 2009）、これらを踏まえると、ADHD 単独例では多動性・衝動性が恒常的に高いのに対し、ADHD+ASD 併存例ではより散発的に出現するといった性質の違いが存在する可能性がある。従って、短時間の総活動量に基づく多動性・衝動性の客観評定は、単独例には適するが併存例には適さないことが示唆され、臨床応用に際しては ASD 併存の鑑別を含めた手続きの策定が必要になると考えられる。

ADHD 群と ADHD＋ASD 群のさらなる相違は、客観指標の身体活動量と主観評定の多動性・衝動性得点の対比から示された。身体活動量において TD 群との差異が認められたのは ADHD 群のみであったが、多動性・衝動性得点は両群が TD 群よりも高値であり、年齢を追った低下もより急峻であった。さらに、平均得点の比較では ADHD＋ASD 群が ADHD 群を有意に上回っていた。これらの結果は、保護者による主観評定において ADHD+ASD 群は、ADHD 群と同等かそれ以上の多動性・衝動性があると評価されているにも関わらず、実際の身体活動量については明らかな増大や特異な発達的変化が見られなかったことを意味している。そのため、ADHD 単独例では多動性・衝動性の主観評定と客観評定、およびそれらの発達的変化が比較的一致するが、ADHD+ASD 併存例では両者の乖離が大きくなることが示唆される。ADHD における多動性・衝動性の主観評定と客観評定が必ずしも一致しないことは、先行研究でも示されてきたため（Dane et al., 2000; Du Rietz et al., 2016; Marks, Himelstein, Newcorn, & Halperin, 1999）、多動性・衝動性の適正な評価においては、手法や指標の主観性／客観性を議論するだ

けでなく、単独例と併存例にそれぞれ適した評価法を確立・選択することが重要であり、主観評定と客観評定の組み合わせをも含めた診断法を開発していく必要があると考えられる。

しかしながら、客観評定（身体活動量）と主観評定（多動性・衝動性得点）、および ADHD 群と ADHD+ASD 群のいずれについても、個人間でのデータのばらつきや群内の不均質性が大きかった。このことは、多動性・衝動性の適正な評価方法、および ADHD の確定的な診断方法を作成していく上での大きな問題と言える。今後の課題として、身体活動量については診察場面での短時間計測が可能な利点を活かしつつ、測定条件のさらなる検討を進め、落ち着きのなさや過剰な身体活動をより正確に補足できるようする必要がある。また、適用可能な年齢範囲や疾患群についても検討を進め、医師や医療機関を問わず使用できる、標準的な診断手続きを策定することも望まれる。さらに、ADHD 単独例と ADHD+ASD 併存例において、客観評定と主観評定の一致性と乖離、ならびに両者の組み合わせによる判定精度等の検討を進め、それぞれ最適な診断手続きを確立することも今後の展望として挙げられる。特に、患児が有する疾患によって多動性・衝動性の性質が異なる可能性を考慮すると、画一的な診断手法ではなく、選択可能な診断メニューを確立していくことが、臨床場面でのより実際的な応用につながるであろう。

【結論】

医療機関での発達障害児の診察場面において、活動量計を用いての短時間の身体活動量の計測は、多動性・衝動性の評価および診断に有益であることが客観的に示された。同時に、ADHD 単独例と ADHD+ASD 併存例、ならびに身体活動量と主観評定の乖離も示されたことから、画一的な手法ではなく、対象児の年齢や疾患に応じて選択可能な診断および治療メニューの策定が必要であることが明らかになった。

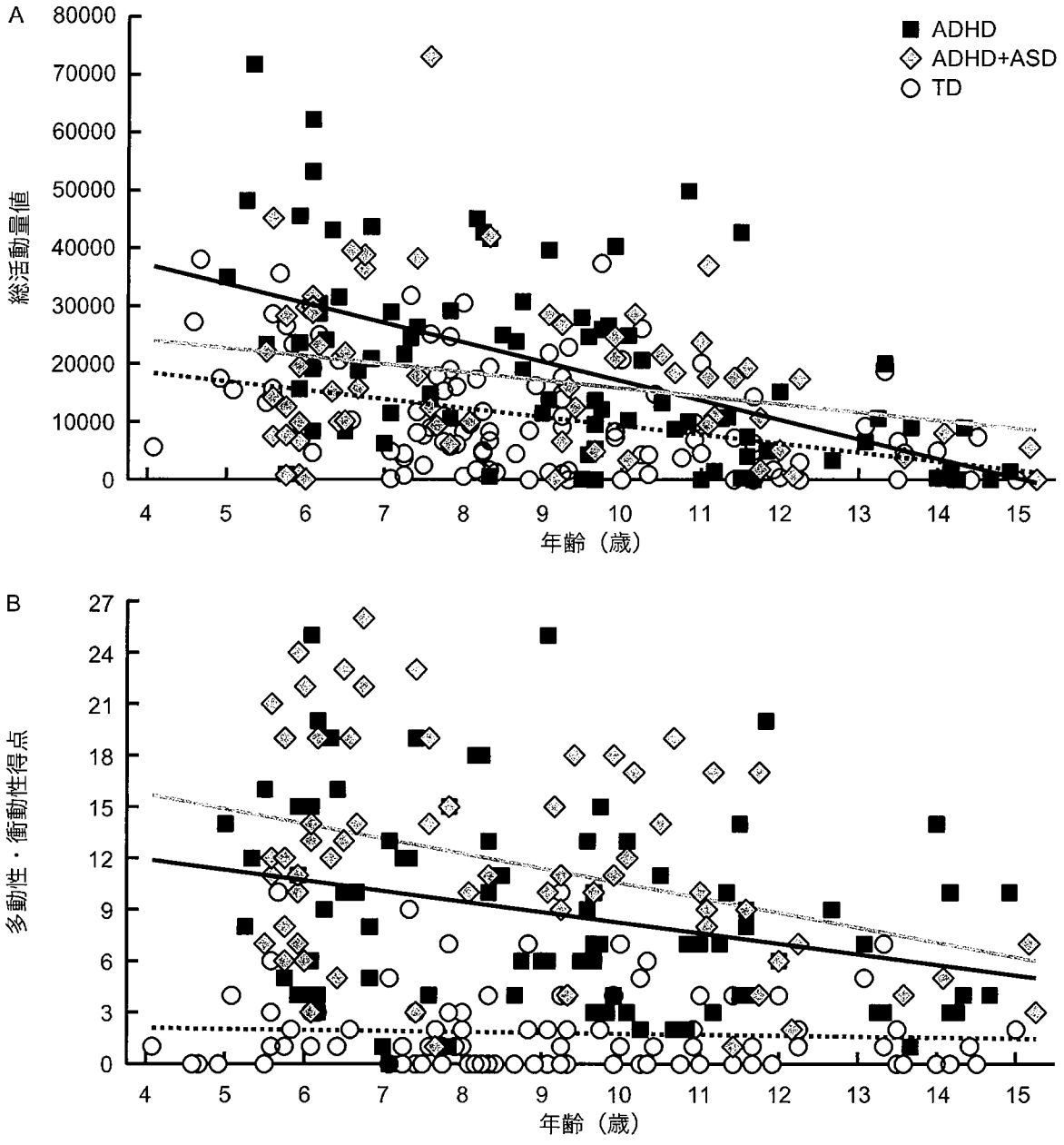


図 1. A）10 分間の総身体活動量、B）ADHD 評価スケール：多動性・衝動性得点の散布図と群ごとの回帰直線。ADHD＝単独群、ADHD+ASD＝併存群、TD＝定型発達群

表 1. 対象児の情報と ADHD 評価スケールの得点

群	ADHD	ADHD+ASD	TD	*F 検定*
N (男児/女児)	84 (73/11)	63 (58/5)	105 (50/55)	-
服薬中	29	28	-	-
年齢	9.25 ± 2.68 (5.00-14.92)	8.61 ± 2.68 (5.50-15.25)	9.02 ± 2.48 (4.08-15.00)	.3404
不注意得点	13.07 ± 5.65 (0-26)	14.63 ± 5.82 (5-27)	3.41 ± 3.70 (0-17)	< .0001
多動性・衝動性 得点	8.70 ± 5.67 (0-26)	11.75 ± 6.31 (1-26)	1.81 ± 2.35 (0-10)	< .0001

年齢、不注意得点、多動性・衝動性得点については、平均±1 標準偏差および値域（カッコ内）を示してある。*F* 検定の結果は、群の主効果の *p* 値である。

表 2. 総活動量の線形重回帰および単純傾斜分析の結果

重回帰モデル ($n = 252$)	β	SE	$/t/$	p	
切片	24626	4345	5.668	< .0001	***
群：ADHD	25894	6353	4.076	.0001	***
群：ADHD+ASD	5021	6653	0.755	.4512	
年齢	-1533	465	-3.297	.0011	**
ADHD × 年齢	-1817	669	-2.714	.0071	**
ADHD+ASD × 年齢	147	727	0.202	.8403	
群ごとの単回帰モデル	β	SE	$/t/$	p	
ADHD 群 ($n = 84$)					
切片	50520	5367	9.414	< .0001	***
年齢	-3349	558	6.017	< .0001	***
TD 群 ($n = 105$)					
切片	24625	3217	7.654	< .0001	***
年齢	-1532	344	4.453	< .0001	***
単純傾斜の差 ($df = 187$)	1817	454	4.000	< .0001	***

群（ADHD、ADHD+ASD）を含む主効果と交互作用は、TD 群を参照カテゴリーとしたときの結果である。$/t/$は、絶対値であることを示す。* < .05、** < .01、*** < .001。

表 3. 多動性・衝動性得点の線形重回帰および単純傾斜分析の結果

重回帰モデル ($n = 252$)	β	SE	$/t/$	p	
切片	2.31	1.69	1.371	.1717	
群：ADHD	12.08	2.47	4.894	< .0001	***
群：ADHD+ASD	16.88	2.59	6.529	< .0001	***
年齢	-0.06	0.18	-0.310	.7568	
ADHD × 年齢	-0.56	0.26	-2.152	.0324	*
ADHD+ASD × 年齢	-0.81	0.28	-2.862	.0046	**
群ごとの単回帰モデル	β	SE	$/t/$	p	
ADHD 群 ($n = 84$)					
切片	14.40	2.15	6.701	< .0001	***
年齢	-0.62	0.22	2.758	.0072	**
ADHD+ASD 群 ($n = 63$)					
切片	19.21	2.53	7.588	< .0001	***
年齢	-0.87	0.28	3.084	.0031	**
TD 群 ($n = 105$)					
切片	2.31	0.87	2.666	.0089	**
年齢	-0.06	0.09	0.603	.5478	
単純傾斜の差					
ADHD 群 vs. TD 群 ($df = 187$)	0.56	0.16	3.392	.0008	***
ADHD+ASD 群 vs. TD 群 ($df = 166$)	0.81	0.20	4.037	.0001	***

群（ADHD、ADHD+ASD）を含む主効果と交互作用は、TD 群を参照カテゴリーとしたときの結果である。$/t/$は、絶対値であることを示す。* < .05、** < .01、*** < .001。

神経学的評価と睡眠異常の診断と治療メニュー作成

国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科
研究分担者：中川栄二

【緒言】

(1) 発達障害においては、睡眠障害やてんかんの併存を認めることが多く、また脳波異常を認める割合はさらに高い。発達障害に対する薬物治療として、抗精神病薬のみならず、抗てんかん薬の併用が精神症状や睡眠障害に治療効果を認めることが多い。しかしながら、脳波異常を伴う発達障害に対する薬物治療の一定の見解は得られていない。発達障害における入眠時脳波異常と睡眠障害に対する薬物治療の検討を行った。また、睡眠障害を定性評価し、睡眠障害に対するバルプロ酸（VPA）の治療効果について検討した。

(2) 神経発達症ではてんかんの併存率が高く、注意欠如多動症（ADHD）では12-17%にてんかんが併存し、脳波異常の頻度は 18-69%とてんかんの合併よりも多いことが報告されている。ADHD 治療薬であるグアンファシン塩酸塩（GXR）が入眠時脳波や併存するてんかんや他の併存症に与える影響や効果についての報告は少ない。

【方法】

(1-1)　睡眠時脳波異常と睡眠障害

当院てんかん・発達障害外来通院中の自閉スペクトラム症（ASD)、注意欠如多動症（ADHD)、限局性学習症（SLD)、知的障害(ID)を含む発達障害患者 354 人を対象として、睡眠時脳波と発作波の種類、部位、抗てんかん薬や抗精神病薬の内服状況と行動障害、精神症状、睡眠障害に対する薬物治療の検討を行った。薬物効果判定は、睡眠障害や興奮性、衝動性などの行動面、生活面での改善の有無を保護者から同意を得て聴取にて行った。

(1-2) 睡眠障害とバルプロ酸(VPA)治療効果

当院てんかん・発達障害外来受診中の患児を対象にした。同意が得られた保護者に子どもの睡眠習慣質問票日本語版を用いて調査を行った。睡眠時刻遅延、入眠潜時延長、睡眠時間短縮、中途覚醒、日中の眠気に分類し、それぞれ 0-2 点の最大 10 点で数値化した睡眠障害重症度を用い評価した。発達特性は PARS、ADHD-RS 等で評価した。脳外傷や脳炎脳症既往、脳外科手術歴や基礎疾患を有する者を除外し、治療経過 3 年以内の治療前後の発達特性、睡眠障害について検討した。また治療前後で睡眠脳波検査を施行した。VPA 治療前後の睡眠障害点数差と PARS 点数差、脳波異常を Wilcoxon 順位和検定で解析した。

倫理委員会の承認を得て、同意の得られた患者の診療録を後方視的に調査した。

(2-2) GXR 治療前後における浅睡眠時脳波変化

ADHD に対して GXR の治療効果を認め、GXR 投与前後の脳波変化を比較できた 16 例（男児 14 例、女児 2 例)、年齢 8-19 歳（平均 12 歳）を対象とした。てんかん合併例は 13 例で、検討中に

抗てんかん薬の増減は行わなかった。浅睡眠時（sleep stage 1-2）の脳波において、任意の5分間を1秒単位に分け、1秒以内に1か所でも棘波、鋭波、棘徐波を認めた場合を脳波異常所見ありとし、300秒で除して百分率を求め突発指数とした。効果判定は突発指数が50%以上減少した症例を有効例、50%以上増加を認めた症例を悪化例、それ以外は変化なしとした。またてんかん患者においてはGXR投与前後でのてんかん発作頻度を検討した。

（2-2）GXRのADHDに併存する反抗挑発症と睡眠障害に対する有効性

当院通院中の、GXR内服開始後、4週間以上経過しているADHD患者21例に対し、外来受診時にアンケートを行った。アンケートは、①臨床全般改善度（CGI）、②ADHD RS　日本語版、③子どもの日常生活チェックリスト（QCD）、④反抗挑戦性評価尺度（ODBI）、⑤睡眠習慣質問票を用いて行った。

【結果】

（1-1）　睡眠時脳波異常と睡眠障害

対象とした発達障害患者354人のうち男性254人（71.8%）、女性100人（28.2%）で、平均年齢は13.9±6.6歳（2〜46歳）であった。そのうち脳波異常は293人（82.8%）に認め、男性210人（59.3%）、女性83人(23.4%)であった。脳波異常の内訳は前頭部の鋭波や徐波が180人(50.8%)、前頭部の棘波が52人（14.7%）、前頭部棘徐波が32人（9.0%）、全般性鋭波39人（11.0%）、全般性徐波32人（9.0%）、その他29人（11.4%）であった。睡眠障害は全体の47.5%に認められ、ASDでは51.3%、ADHDでは46.5%、ASDとADHD併存では58.0%で認められた。てんかんの合併は226人（63.8%）に認められた。抗てんかん薬は326人（92.1%）に使用され、CBZ、VPA、CZP、LTG、LEV、GBP、CLB、ZNS、NZP、PB、TPMが投与されていた。脳波異常がある発達障害に対する抗てんかん薬と抗精神病薬の併用により、睡眠障害や興奮性、衝動性などの行動面での改善が認められた。

（1-2）　睡眠障害とバルプロ酸(VPA)治療効果

回答が得られた121例中、基礎疾患を除外した症例は38例で、ASD 31例、ADHD 26例、ID 6例、SLD 1例(重複あり)、うち34例(男27：女7、平均年齢7.1歳)の保護者が睡眠障害を訴えた。睡眠障害点数差3点以上が、睡眠障害の訴えと臨床全般評価度と概ね一致した。VPA使用群は幼児期(3-6歳)治療開始群(男12例、平均年齢4.3歳)と、学童期(7歳以降)治療開始群(男10：女4、平均年齢8.4歳)で、VPA非使用群は(男5：女3、平均年齢8.9歳)であった。VPA幼児期開始群は他の2群と比べ有意（p=0.013-0.015）に睡眠が改善していたが、PARS点数差は有意差を認めなかった（p=0.67-0.82)。治療前に脳波検査が行えた35例中17例に不規則な高振幅鋭徐波や突発波が認められたが、治療前後での統計的有意差は認められなかった。

（2-1）GXR治療前後における浅睡眠時脳波変化

GXRの維持用量は1mg12名、2mg4名でADHDに対して治療効果を認めた。GXR投与前の

突発指数は 0.3-86%（中央値 4.3%）、投与後は 0-90%（中央値 2.4%）で治療前後による統計的有意差を認めなかった。突発指数の変化については有効例 5 例、変化なし 9 例、悪化例 2 例であった。悪化例 2 例については突発指数の変化がそれぞれ 0.7 から 1.7%、0.3 から 0.7%といずれも絶対値としてはわずかであった。てんかん発作頻度の増悪が認められた例は認めなかった。

（2-2）GXR の ADHD に併存する反抗挑発症と睡眠障害に対する有効性

年齢：中央値 13 歳（6-18 歳）、性別：男 19 例、女 2 例。GXR 開始時、メチルフェニデート（MPH）から変更 5 例、アトモキセチン塩酸塩（ATX）から変更 3 例、MPH と併用 5 例。①CGI 改善度は著明な改善 1 例、改善 9 例、やや改善 7 例、不変 4 例で 80%が改善したと感じていた。②ADHD-RS では、GXR 投与前後で不注意項目が平均 6.3 点、多動・衝動性項目が平均 5.0 点改善し、それぞれ有意差を認めた（*P=0.0004, P=0.0005*）。不注意と多動/衝動性の改善度の比較では有意差は認めなかった。③QCD は、GXR 投与前後で、総得点は平均 4.9 点上昇し有意に改善していた（*P=0.024*）が、時間帯別の下位項目毎に見ると、早朝/登校前が有意に改善しており（*P=0.019*）、学校、夕方では有意差を認めていたが（*P=0.043, P=0.049*）、放課後、夜、全体の行動では有意差は認めなかった。④反抗挑戦性障害の症状を認め、ODBI がカットオフ値である 20 点以上であったのは 15 例。GXR 開始後、その内 9 例でスコアの低下を認め、低下スコアの平均は 7.9 点であり有意差を認めた（*P=0.0078*）。また、4 例でカットオフ値以下に低下していた。⑤睡眠障害は 21 例全てに認め、GXR 開始後 13 例で改善を認め、悪化は 3 例で認めた。GXR 投与前後で平均 4.4 点改善し、有意差を認めた(*P=0.0019*)。

【考察】

（1）脳波異常は入眠時に前頭部優位に鋭波、徐波、高振幅な律動性速波が認められ、発達障害の発症には前頭葉機能との関連が示唆された。脳波異常を伴う睡眠障害は抗てんかん薬投与により改善が認められ日常生活の質の向上が認められた。本検討では発達障害患者の 82.8%に脳波異常が認められ、47.5%に睡眠障害が認められた。てんかんを合併した症例以外にも前頭部優位に脳波異常を高頻度に認めた。これらの検討からも前頭部優位の脳波異常の出現には前頭葉機能の低下や GABA 抑制系の低下が関与している可能性がある。一方で、脳波異常そのものが前頭葉機能に影響を与えている可能性もあり、脳波異常と睡眠障害を改善させることが発達障害に対する治療となり得ると考えられる。我々の検討では、抗精神病薬に抗てんかん薬を追加することにより睡眠障害などの併存症状の改善効果が認められた。このことから脳波異常を認める ADHD に対する抗てんかん薬の投与は有効であり、抗精神病薬と併用することによりさらに症状の改善を見込める可能性があると考えられる。特に、幼児期からの VPA 内服は発達障害に合併する睡眠障害を改善させる可能性があり、早期診断と適切な治療介入が必要であると考えられた。

（2）GXR 治療前後における浅睡眠時脳波変化：GXR はてんかんや脳波異常を伴う ADHD においても、脳波異常の悪化や発作頻度の増悪を認めずに ADHD に対して治療効果が期待できる。

GXR の ADHD に併存する反抗挑発症と睡眠障害に対する有効性：GXR は、不注意、多動・衝動性を同程度に改善し、特に朝の日常生活機能を改善し、，睡眠障害、反抗挑戦性症状に有効である可能性が示唆された。

【まとめ】

発達障害においては、睡眠時を含む脳波検査を可能なかぎり行い、入眠時脳波異常を伴う場合は、抗てんかん薬による薬物治療を行うことで睡眠の質の向上により昼間の精神症状や行動異常の改善が期待できる。特に、併存症状を認める場合や抗精神病薬による症状の改善を認めなかった場合には、脳波異常の有無を参考にして抗てんかん薬の追加投与を検討することで、脳波異常の改善とともに併存症状の改善を期待できる。

利益相反：利益相反に関する開示事項はない。

倫理的配慮：本研究は当センター倫理委員会承認のもとで行われた（A2017-019,2017-032,2017-060）。

実行機能・社会性機能障害の診断と治療メニュー作成: ASD 併存の特徴

国立精神・神経医療研究センター
分担研究者：加賀佳美

【緒言】

近年、発達障害の有病率は高く、問題行動を生ずる前に介入していく必要性に迫られている。しかし、従来の発達障害の診断は、Rating scale(RS)などの保護者への問診による聞き取りが中心で、主観的評価に基づいたものであり、均てん化した診断や治療が行われていないのが現状である。また発達障害の専門外来は患者があふれ、外来待機も大きな問題となっている、そこで誰でも診療しやすい指標、すなわち客観的バイオマーカーの確立は急務である。

発達障害には、注意欠如多動症（ADHD）をはじめ、自閉スペクトラム症（ASD)、限局性学習症などがある。その中で ADHD の病態生理として、実行機能障害、遅延報酬障害、時間処理障害があることが知られている[1)]。特に実行機能障害の中でも抑制機能は、ADHD 症状の中核として、脳波や事象関連電位[2)]、近赤外線スペクトロスコピー（fNIRS）[3)]、機能的 MRI（fMRI）[4)]など非侵襲的脳機能評価のための課題として用いられている。しかし、実際それぞれの検査法には利点と欠点があり、臨床現場において実際に使いやすい検査方法の確立が必要である。そこで今回は ADHD のバイオマーカーとして、行動抑制課題として知られている Go/NoGo 課題を用いて、事象関連電位 Go/NoGo 電位、fNIRS の同時記録を行い、バイオマーカーとして有用性を検討した。

ASD では、コミュニケーションや社会性の障害、こだわりなど常同行動、および想像力の欠如などが知られている。今回は社会性に目を向け、特に比喩表現や皮肉など、字義通りでない表現を理解することが難しいことから[5)]、字義通りではない表現の多い慣用句に着目し、課題を作成した。そして慣用句課題の回答時の脳内フィードバック機能について脳波を用いて検討を行い、ASD のバイオマーカーとしての有用性について検討した。

本研究では、発達障害とくに、注意欠陥多動障害（ADHD)、自閉症スペクトラム障害（ASD）の病態の中心と考えられている実行機能と社会性の神経生理学的バイオマーカーを抽出し、その診断および治療効果の指標として、客観的な評価法を確立することを目的とした。

【方法】

検討 1：実行機能評価のためのバイオマーカーの確立

行動抑制課題である Go/NoGo 課題を 2 つの客観的検査法である脳波と近赤外線スペクトロスコピー（fNIRS）を用いて検討した。対象は、8～11 歳の定型発達(TDC)群 18 例、ADHD 群 20 例。ADHD の診断は DSM-5 を用いて行い、投薬のない症例を選択した。また症状の評価については保護者評定 ADHD-RS を使用した。Go/NoGo 課題は、5 種類の色（赤、白、青、黄、緑）を提示した Continuous Performance test (CPT)であり、白の次に赤（1 セット目）または青（2 セッ

ト目）が来たときキー押し（Go 刺激）、それ以外の時はキーを押さない（NoGo 刺激）よう指示した[6]。10-20 法の Fz, Cz, Pz に電極を装着し、前頭部に眼球運動のアーチファクトの除外のため電極を設けた。得られた脳波から、Go 刺激、NoGo 刺激時の事象関連電位（ERP）Go/NoGo 電位を解析した。

脳波解析ソフト(EMSE、ミユキ技研)を用いて、NoGo および Go の加算波形をそれぞれ算出し、200ms 付近の陰性波 NoGo-N2 および、300ms 付近の陽性波 NoGo-P3/ Go-P3 を求めた。それぞれ振幅、潜時を計測し、特に NoGo-P3/Go-P3 振幅比に着目して解析した。また fNIRS は、OEG-16(スペクトラテック社)を用いて、プローブを前頭部に装着し、Go 課題を対照課題として Go/NoGo 課題施行中の酸素化ヘモグロビン(OxyHb)変化を比較検討した。なお，本研究の実施にあたり、当センター倫理委員会の承認を得た (A2017-002)。なお統計は、TDC、ADHD の 2 群間の検討には、Student t-test を行った。

検討 2：社会性の評価のためのバイオマーカーの確立

慣用句は 5～6 文字でなる体の部分を使用した慣用句を選択 120 問の正答率について定型発達児 110 名の検討を行った。次に、図 1 に示すように同課題を用いて強化学習課題を作成し、課題施行中の脳波を集積した。脳波は 10－20 法の 28 チャンネルとした。対象は、10 歳以上の TDC21 名と ASD13 名。ASD の保護者評価としては PARS を用いた。ASD の診断は DSM-5 を用いた。刺激提示には、マルチトリガーシステム(メディカルトライシステム)、脳波解析は脳波解析ソフト(EMSE、ミユキ技研)を用いて行い、フィードバック後 200msec 付近に出現する陰性波の事象関連電位である Feedback related negativity (FRN)、300msec 付近の陽性波を P300 とし、それぞれ最大振幅となる Fz および Pz の解析を行った。また FRN 振幅については誤答時で高くなるため、誤答時と正答時の振幅差を検討した。さらに TDC は発達変化を調べるため、13 歳未満群と 13 歳以上にわけて年齢変化を検討した。

FRN については、それぞれの脳部位との関連を検討するためネットワーク解析法の一つである Dynamic Causal Modeling (DCM)法を用いて検討した。FRN 出現の推定部位として、前部帯状回(dACC)、外側前頭前皮質(dlPFC)、背側中心前頭前皮質(vmPFC)がこれまでの報告から知られているため、図 2 のようなモデルを推定し、それぞれの connectivity について解析を行い、ASD と TDC について比較検討した。統計は、2 群の検討には Student t-test を用いた。

【結果】

検討 1：Go/NoGo 課題における ADHD の実行機能障害の検討

ADHD では TDC と比較してお手付きエラーADHD 3.4±4.2、TDC 1.4±1.9、見逃しエラーADHD 2.9±3.5、TDC 0.7±1.6 ($p<0.05$)と有意に見逃しエラーが高くなっていた。NoGo-P3 潜時は、ADHD 407±67msec、TDC 373±24msec ($p<0.05$)、NoGo/Go-P3 振幅比 ADHD 0.8±0.2、TDC 1.1±0.4 ($p<0.05$) と ADHD で有意に NoGo-P3 潜時が延長し、NoGo/Go-P3 振幅比が小さくなっていた。一方、fNIRS の OxyHb 変化値では、TDC で右前頭部中心に増加が認められたのに対し、ADHD は全体的に低

下しており、特に右前頭部で有意差を認めた($p<0.01$)。また、右前頭部の OxyHb と NoGo /Go-P3 振幅比は、正の相関を認めた($r=0.36$, $p=0.047$)。ADHD-RS とは明らかな相関は認められなかった。

検討 2：慣用句課題における ASD のフィードバック機能の検討

慣用句はひらがな 5～6 文字の体に関する慣用句を抽出し、本来の意味を示すイラストに対して、○か×を答える課題。9～18 歳の 110 名の正答率を調べたところ、60%以上を 8 割が示した年齢は 10 歳以上であった。特に 15 歳以上は全例 60%以上であった。そのため、脳波採取の対象群を 10 歳以上とした。

事象関連電位 FRN は、まず TDC 群を 13 歳未満と 13 歳以上の 2 群に分けて検討した。正答率は 13 歳未満 0.68±0.1、13 歳以上 0.72±0.07 と年齢とともに増加していた。FRN 潜時は 13 歳未満 282.9±27.8msec、13 歳以上 262.8±27.8msec、FRN 振幅は、13 歳未満 4.0±5.4、13 歳以上 4.7±3.5μV と年齢とともに潜時は短縮し、誤答時の FRN 振幅が増加した。

次に 13 歳以上の ASD と TDC を比較したところ、正答率は ASD 0.71±0.09、TDC 0.72±0.07 と差はなかった。FRN 潜時は、ASD 256.0±24.4msec、TDC 262.8±27.8msec 振幅は ASD 4.5±6.0μV、TDC 4.7±3.5μV で、ASD と TDC の差は認められなかった。また P300 は TDC、ASD とも誤答時に振幅は高くなるパターンを示した。

DCM によるネットワーク解析では、誤答時には、両群に差を認めなかった。正答時、ASD では、vmPFC から dACC への connectivity が弱いという結果であった（図 3)。さらに、PARS スコアとの相関を検討したところ、この connectivity と PARS スコアが負の相関を認めた（$r=-0.508$, $p=0.044$)。

【考察】

実行機能検査として、色を用いた Go/NoGo 課題は、NoGo 電位、fNIRS による右前頭部脳血流変化ともに ADHD では反応が低く、客観的評価法として有用性を認めた。また NoGo-P3/Go-P3 振幅比と右前頭部の酸素化 Hb 変化は正の相関を認め、どちらもバイオマーカーとして有用である可能性がある。NoGo 電位は古くから有用性が認められているが、報告によって結果も異なっており、また解析や測定がやや煩雑であるのが欠点である。一方 fNIRS は比較的装着が容易であるが、体動アーチファクトの影響などを受けやすく、また皮膚血流の影響なども指摘されていた。今回われわれの検討から、同時記録により、NoGo 電位と fNIRS の相関を認めたことから、ADHD のバイオマーカーとしてどちらも同様に計測できることがわかった。

今後の課題としては、実行機能には年齢変化があり、通常 10 歳以降に発達してくることがわかっている[7) 8)]。fNIRS でも年齢による変化があることが報告されており[9)]、今後この二つの課題を組み合わせることで、ADHD のバイオマーカーとして、その精度を上げることが出来る可能性がある。

慣用句を用いたフィードバック機能は、正答率や FRN の振幅や潜時に ASD と相違を認めなかった。このことはフィードバック機能としては正常に働いている事を示している。実際容易な課

題だったと事もあり、正答率も相違はなかった。これまでの報告でもASDでは振幅の低下はなかったという報告が多く、むしろ他者が課題をモニタリングしてその他者反応を記録するモニタリングFRNで差があったという報告などがある[10]。しかし、行動上は正答していても、その正当時のconnectivityのパターンが異なっており、課題は実行できても、その脳内機序が異なっている可能性は考えられる。今後connectivityスコアがバイオマーカーとして使用できる可能性もある。症例数を増やして検討していく必要がある。

【結論】

実行機能検査として、Go/NoGo課題における事象関連電位NoGo電位、および右前頭部の酸素化Hbの変化は、ADHDの客観的バイオマーカーとして診断精度を上げられる可能性がある。また社会性指標の一つとして、「慣用句」強化学習課題を用いたFRNのconnectivityがASDの客観的バイオマーカーになり得る可能性がある。

【

【図の説明】

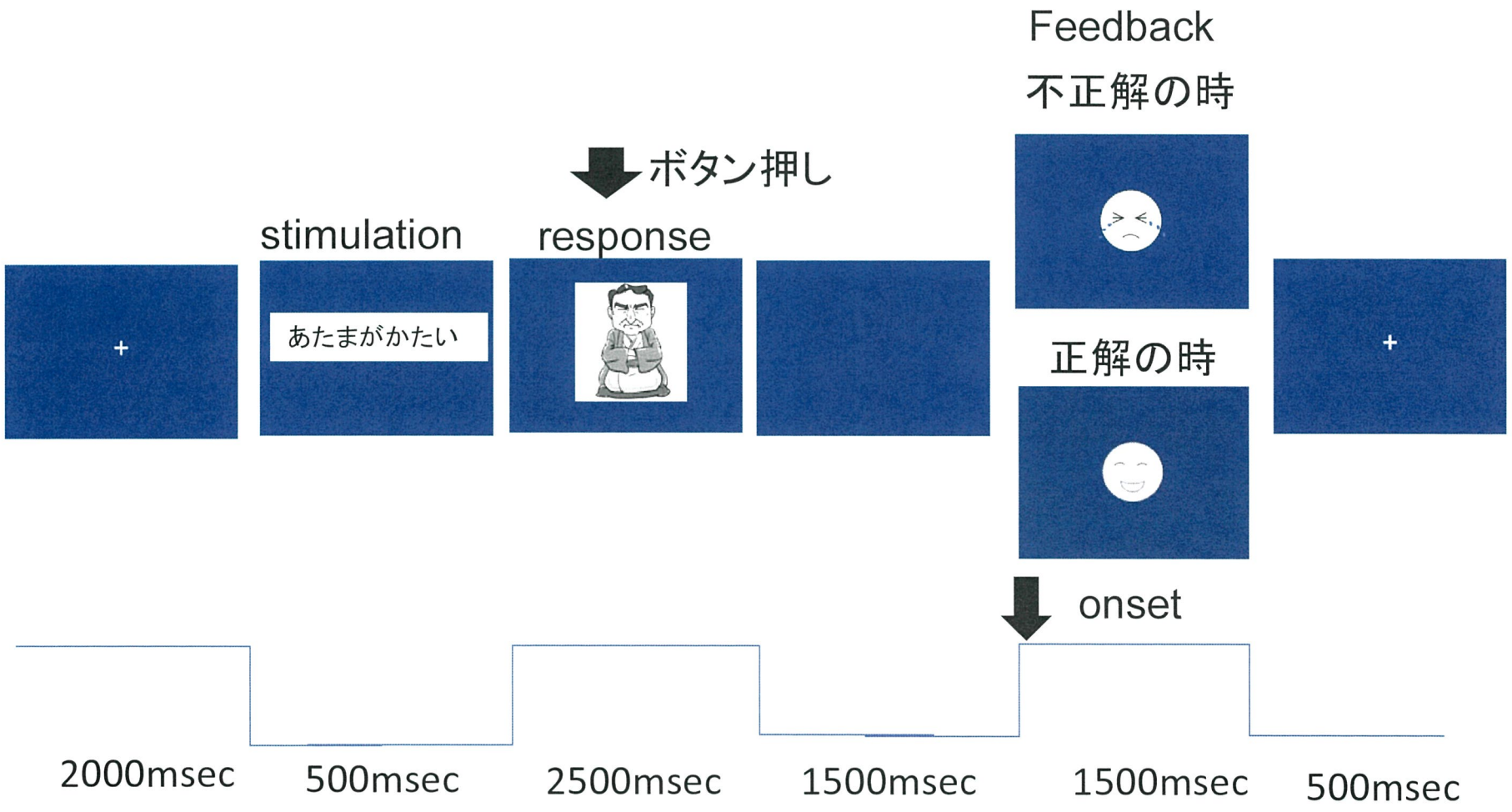
図1　慣用句を用いた強化学習課題

図2　DCM法に使用したconnectivityのモデル

図3　前部帯状回と各部位のconnectivityの比較

dlPFCL；左外側前頭前皮質、dlPFCR；右外側前頭前皮質、vmPFC；背側中心前頭前皮質、TDC；定型発達児、ASD；自閉スペクトラム症

図1



Feedbackに関連した電位
Feedback related negativity(FRN)

図2

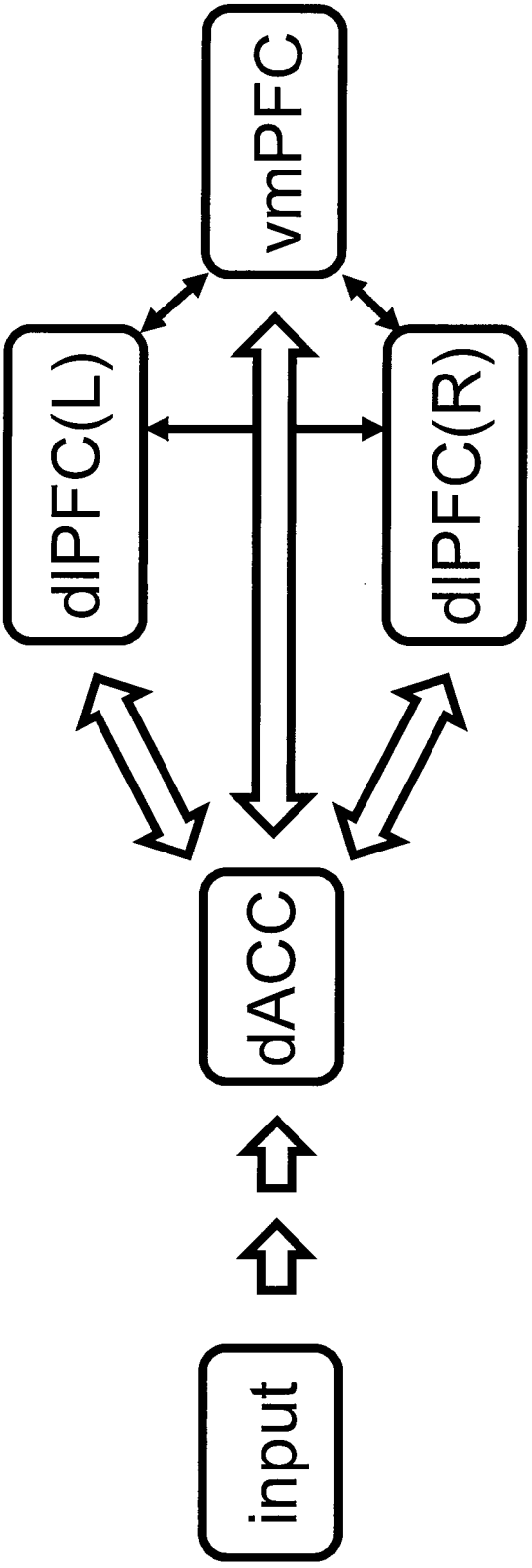
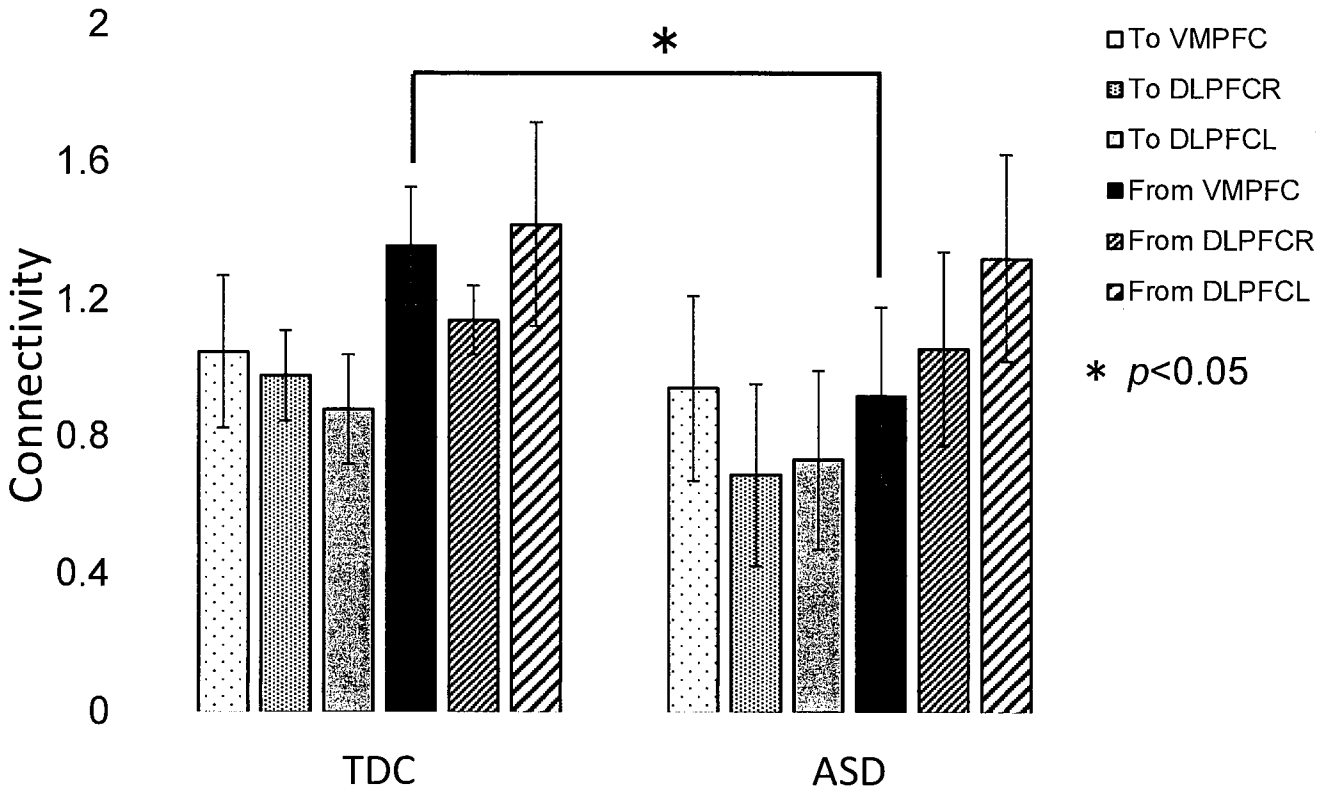


図3


2
1.6
1.2
0.8
0.4
0
Connectivity
*
TDC
ASD
To VMPFC
To DLPFCR
To DLPFCL
From VMPFC
From DLPFCR
From DLPFCL
* p<0.05

障害・コミュニケーション障害の診断メニュー作成：ASD 併存例の特徴

所属機関：国立成育医療研究センターこころの診療部
分担研究者：小枝達也

【緒言】

本邦ではまだ定まっていない算数障害及びコミュニケーション障害の診断のために必要なメニューとして、スクリーニング法の開発、新たな診断補助検査法の開発と診断のための基準設定などを目指しており、それに必要な基礎的なデータを収集し、両者の併存症例の特徴を抽出することを目的とする。そのために、Ⅰ.数的基礎力検査開発、Ⅱ.算数障害の基底病態解明、Ⅲ. 社会的コミュニケーション障害（以下、Social Communication Disorder: SCD）の特性解明の 3 つに関する研究を分担して行った。Ⅰの数的基礎力検査開発は、小枝達也、大羽沢子、前垣義弘が担当した。Ⅱの算数障害の基底病態解明は関あゆみ、後藤亜矢子が担当した。ⅢのSCDの特性の解明は 2 年度と 3 年度の 2 年間での実施となり、小枝達也、多門裕貴が担当した。

【方法】

Ⅰ. 数的基礎力検査開発

1) 初年度

先行研究で開発した数的基礎力検査（序数性・基数性・数的事実の 3 要素から構成される検査）をスクリーニング検査法として用いた。小学 1 年生 239 名（男児 125 名）を対象として、数的基礎力検査を 10 月に実施し、2 月に各学校で実施される算数学力テスト成績と照合することにより、数的基礎力検査の算数の学力に対する予測性を検討した。解析方法は、数的基礎力検査の３つの構成要素の各領域別得点および総合点を算出し、各得点が算数学力テストの成績をどの程度予測できるかについて、ROC 解析で検討した。

2) 2 年度

数的基礎力検査を用いて、2 年生での算数の学力を予測することとした。昨年度の小学 1 年生 239 名から得られた数的基礎力検査結果と 1 年生 2 月の算数学力テスト結果を元に、2 年生算数学力テスト下位 20%の小児を高精度に予測する方法を検討した。

3) 最終年度

対象となる小学 1 年生を 415 名に増やして、昨年度までに開発した算数の学力を予測する方法の精度を再度確認することとした。

Ⅱ. 算数障害の基底病態解明

1) 初年度

通常学級に在籍している算数の学習に著しい困難を訴えている小学 3 年～6 年生 16 名（男児 9 名）を対象とした。算数能力の評価は米国で用いられている評価法 Add+Vantage Math Recovery（AVMR）

を用いた。認知能力は、数の大きさの表象能力（数直線課題）、視空間ワーキングメモリ（ドット課題）、音韻ワーキングメモリ（数の順唱と逆唱）、語彙理解力（絵画語彙発達検査）の４つの認知機能検査を実施して、カテゴリー化した。

数直線課題は100までの数字を用いたときの誤差を調べる数直線誤差100課題と1000までの数を用いたときの誤差を調べる数直線誤差1000課題の２つを実施した。

ドット課題は順再生と逆再生の２種類を行った。

2) 2年度

計算に困難がない通常学級に在籍している小児78名（3～6年生）を対象に、数直線課題、視空間WM課題、数・計算課題、数唱（順唱、逆唱）等の関係性を調べた。

3) 最終年度

通常学級に在籍している計算に困難がある小学生16名（3年生から6面生）と計算に困難がない小学生80名（3年生から6年生）を対象として、数直線課題における両者の質的な差異について検討した

Ⅲ．SCDの特性解明

1) 2年度

ASD17名とSCD5名を対象にSRS2と比喩皮肉文テストを実施し、SCDの臨床的特徴を抽出した。

2) 最終年度

ASDの対象者を25名に増やして、昨年度と同様に比較検討を行った。

【結果】

Ⅰ．数的基礎力検査開発

1) 初年度

235名中231名のデータが解析できた。総得点の満点が100点になるよう重み付けをした結果、数的基礎力の総得点は正規分布に近似し、平均点は46.5点、1標準偏差は13.5となった。スクリーニング基準を－２SDとすると、総合得点は20点であり、それを下回るのは8名（3.5%）であった。スクリーニング基準を－1.5SDとすると、総合得点は26点となり、それを下回るのは21名（9.1%）であった。

算数学力テスト結果で下位10%以下の小児をターゲットとしたROC解析において、AUC(Area Under Curve)は、数的基礎力検査の各要素の得点、総合得点のうち総合得点が0.895ともっとも高く、感度は82.4、特異度は80.0であった。下位15%でも下位20%でもAUCは総合得点においてもっともよい値を示した（それぞれ0.873、0.854）。

2) 2年度

数的基礎力検査、1年と2年の算数学力テスト結果が得られたのは215名であった。215名のデータを元に2年生の算数学力テスト下位20%を精度よく予測できる数的基礎力検査と1年生の算数学力テ

ストの組み合わせを探索したところ、1年生算数学力テストで下位20%である小児（41名）で数的基礎力検査にて30点未満であると高率に2年生算数学力テストで下位20%となることが判明した（11名中10名、91%）。

一方、1年生算数学力テストで下位20%であった小児でも、数的基礎力検査で40点以上であれば、2年生算数学力テストで下位20%になるものは27%（18名中5名）と少ないことも判明した。両者間の相対危険度は3.3であった。

2) 最終年度

415名の小学1年生のうち保護者の同意が取得できた392名を対象として、数的基礎力検査、1年生と2年生の算数学力テスト結果を調査した。すべてがそろったのは365名（男児179名）であった。数的基礎力検査結果と算数学力テスト結果との間には有意な相関がみられた（1年生0.52、2年生.47、$p<0.01$）。

昨年度に検討した数的基礎力検査結果と1年生での算数学力テスト結果を組み合わせる方法を用いて、同様に高い予測性が得られるかについて検討した。

1年生の算数学力テストが下位20%78名のうち、数的基礎力検査結果が30点未満であった28名は、そのうち21名が2年生でも算数学力テスト結果が下位20%であった。一方で1年生の算数学力テストが下位20%であった78名のうち、数的基礎力検査結果が40点以上であった26名は、そのうち5名が2年生の算数学力テスト結果が下位20%であった。両者間の相対危険度は3.9であり、またオッズ比も12.9であり、昨年度と同等の結果であることが確認された（図1）。

Ⅱ．算数障害の基底病態解明

1) 初年度

数に関する基礎的能力を評価するAVMRの成績と4つの認知機能検査結果の相関を見たところ、数直線誤差100課題との相関係数は−0.815、数直線誤差1000課題では−0.817、ドット課題の逆再生とは0.712と高い相関を示した。

AVMRの成績を従属変数とした重回帰分析（ステップワイズ法）では、数直線誤差100課題が説明変数としてピックアップされ、R2は0.88であった。数直線誤差100課題と絵画語彙発達検査の修正得点の2つも説明変数としてピックアップされ、R2は0.924であった。

対象児16名を4つの認知機能検査結果でサブタイプに分けると、

(1)数直線課題の困難と視空間ワーキングメモリに困難があるタイプ10名

(2) 数直線課題と視空間ワーキングメモリの困難に加えて音韻性ワーキングメモリに困難があるタイプ2名

(3) 数直線課題と視空間ワーキングメモリの困難に加えて語彙理解力に困難があるタイプ1名

(4)いずれの認知機能検査においても困難がないタイプ3名

に分けられた。

2) 2年度

定型発達の小学生において、数直線課題では、100 課題の誤差、1000 課題の誤差について学年間で有意差はなかった。視空間 WM 課題では、学年間で差があり、高学年の成績が良好であった。これらの認知課題と数・計算課題との関連を調べた（学年の影響を制御した偏相関分析）が、有意な相関を示すものはなかった。

3) 最終年度

計算に困難のない小学生では数直線課題の 100 課題でも 1000 課題でも、ともに対数への適合率よりも線形への適合率が良好で、適合性に学年間の有意差はなかった。

計算に困難のあるとなしで比較すると、1000 課題で計算に困難がある小学生の方がない小学生に比べて、線形の適合率が有意に低く（$p<0.01$）、対数の適合率が有意に高い（$p<0.05$）という結果であった。

さらに線形と対数への適合率が 90%以上である人数を比べると、100 課題、1000 課題ともに計算に困難がある小学生の方が困難のない小学生に比べて有意に人数が少なかった（表 1 、$p<0.01$）。

Ⅲ．SCD の特性解明

2 年間の結果をまとめて記す。

SRS-2 の総合 T 得点、社会性 T 得点、興味の偏り T 得点を比較したところ、ASD 群 25 名と SCD 群 5 名の間にはすべてに有意差が認められた（ASD 群 79.3 、77.7 、80.2 ：SCD 群 60.4、60.6、55.6、それぞれ $p<0.01$, $p<0.05$, $p<0.001$、図 2)。

ASD 群ではすべての T 得点が臨床域でかつ重度であるのに対し、SCD 群では興味の偏り T 得点は臨床域に入らず、臨床域に入る総合 T 得点、社会性 T 得点でも軽度であることが示された。ROC 曲線では T 得点にて AUC0.89、感度 84%、特異度 80%であった。SCI の T 得点では AUC0.82、感度 84%、特異度 80%であった。RRB の T 得点では AUC1.0、感度 100、特異度 100 であった。

比喩皮肉文テストでは総合得点、比喩得点、皮肉得点、地雷得点（皮肉られたのに褒められたと勘違いした得点）を比較したところ、皮肉得点においてのみ有意差が認められた（ASD 群 30.6 点：SCD 群 0 点。図 3)。

【考察】

Ⅰ．数的基礎力検査開発

3 年間の研究で 1 年生の 10 月に実施した数的基礎力検査は、算数の学力が低い小学生を一定の精度で予測することが可能であることが示された。しかし、2 年生での予測性はやや低下することが判明したため、数的基礎力検査と 1 年生での算数学力テストを組み合わせることを検討し、2 年生で算数学力テストが下位 20%以下になる予測が高率に可能な方法を探索した。

その結果、1 年生の算数学力テスト結果が下位 20%未満でかつ数的基礎力検査結果が 30 点未満の場合には、数的基礎力検査結果が 40 点以上であるものよりも相対危険度が 3.3～3.9、オッズ比は 12.6 と高いことも判明した。

この方法を用いることにより、2 年生の学年末で算数の学力が低い小学生を 1 年生のうちに高率に予測することが可能であることが示された。これは何らかの介入的な指導を 1 年生の学年末から取り入れて、2 年生の終了時に改善するかどうかを検証する土台ができたことを意味する。

Ⅱ．算数障害の基底病態解明

3 年間の研究により、算数に困難がある小学生には、4 つのサブタイプがあることが示唆された。その多くに数の大きさの表象能力が関与しており、この能力が算数困難の基盤にあり、そこに視覚性や音韻性のワーキングメモリの困難が関与するタイプがあると考えられる。語彙理解力が関与するタイプは全般的な知的能力の低さが大きく影響しているのではないかと考えられる。

こうした困難の背景にある認知能力障害の一つとして数直線課題での数の見積もりをする能力の困難が想定された。一方で計算に困難がある小学生の半数では、数直線課題での線形との適合率が良好であることから、数の見積もりをする能力に問題はなく、別の背景要因もあると考えられた。

Ⅲ．SCD の特性解明

SCD 群における SRS2 の特徴は、平均点で見た場合、ASD 群に比べて軽度であること、かつ興味の偏り T 得点は臨床域に入らないことが特徴であると考えられた。また比喩皮肉文テストでは ASD よりも皮肉得点が低く、皮肉という状況の理解がより不十分であることが示された。両者の組み合わせで ASD と SCD の違いを区別できることが示唆された。

【結論】

Ⅰ．数的基礎力検査開発

算数の学力テストと数的基礎力検査を組み合わせることで、介入効果の検証の対象となる小児を特定する条件を見出すことができた。

Ⅱ．算数障害の基底病態解明

算数障害の背景にある認知特性を探り、数の大きさの表象課題（数直線課題）が鋭敏かつ重要であることを明らかにした。さらに検討した結果、数直線課題では説明しきれない背景を有する計算障害のある小児の存在が明らかとなった。

Ⅲ．SCD の特性解明

ASD の社会的なコミュニケーション障害を抽出するのに有用な比喩皮肉文テストを用いて、SCD の特徴の抽出を試みた。SRS2 と比喩皮肉文テスト両者を用いることで、SCD の特性を抽出することが可能であると考えられた。

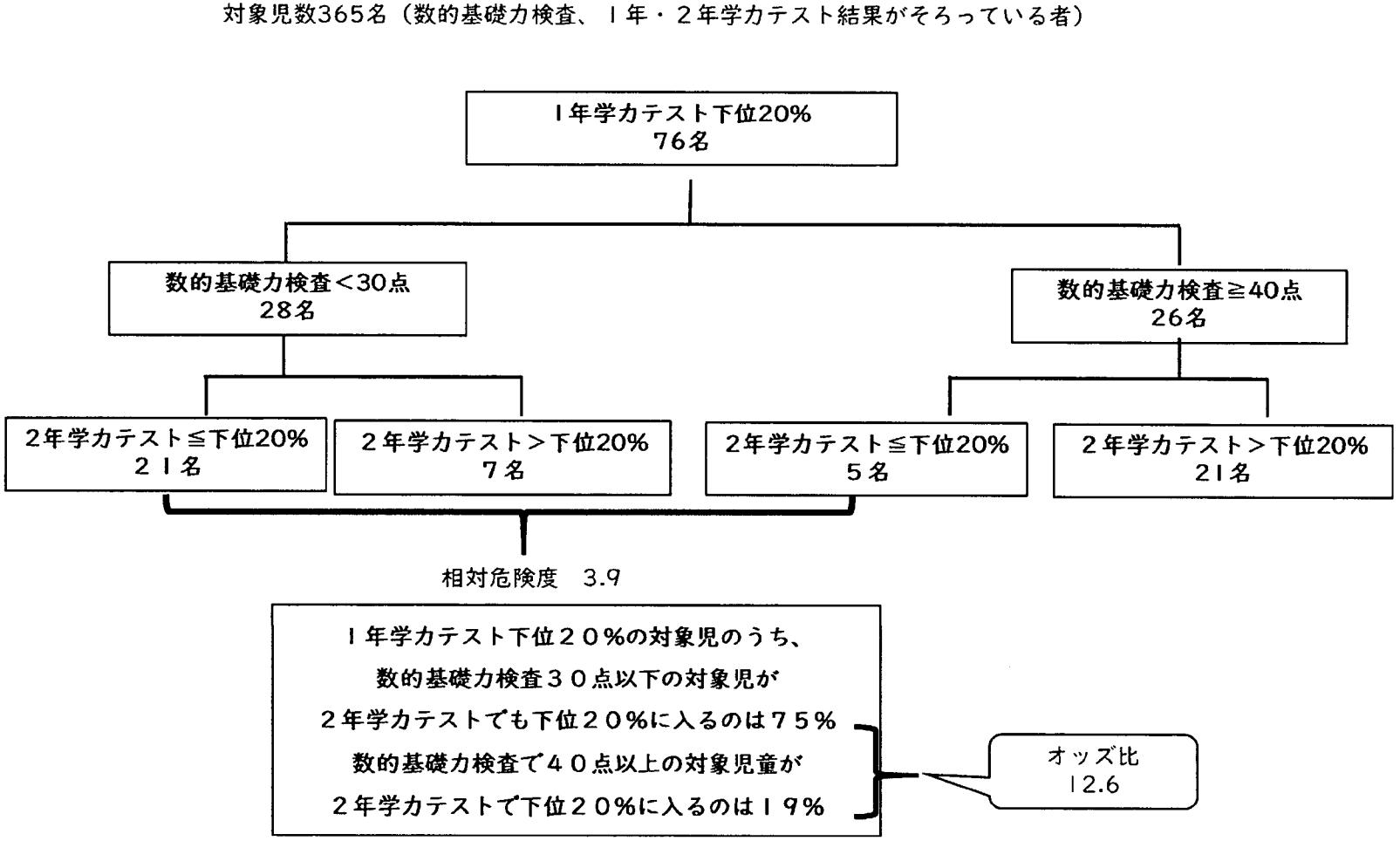


図１　数的基礎力検査結果と算数学力テスト結果の組み合わせによる予測

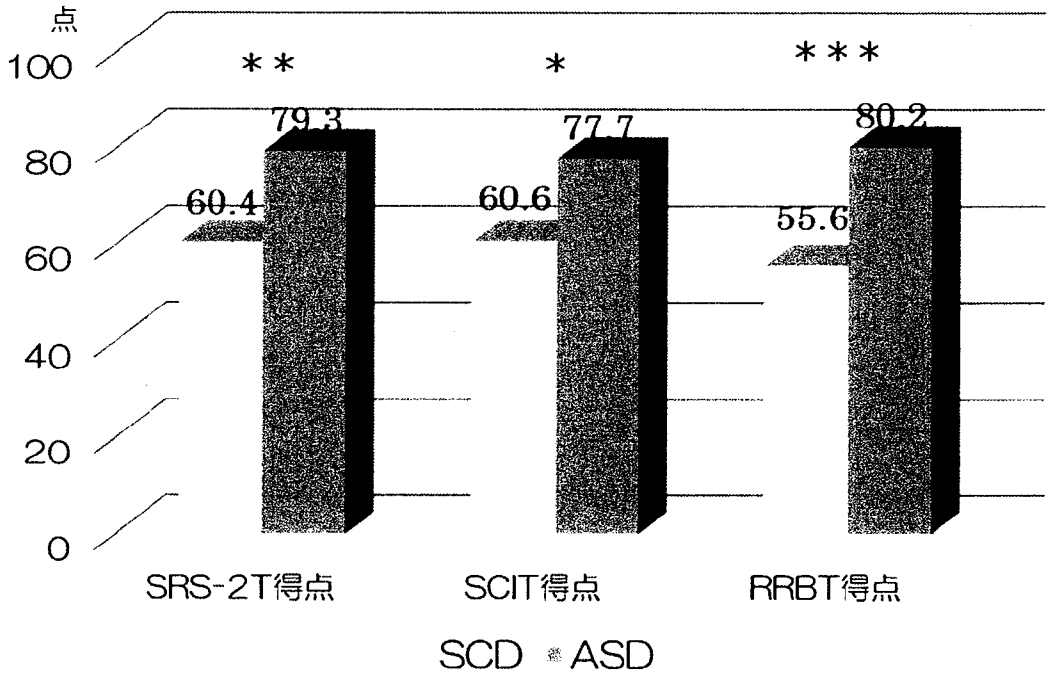


図２　ASD と SCD における SRS2 の T 得点比較

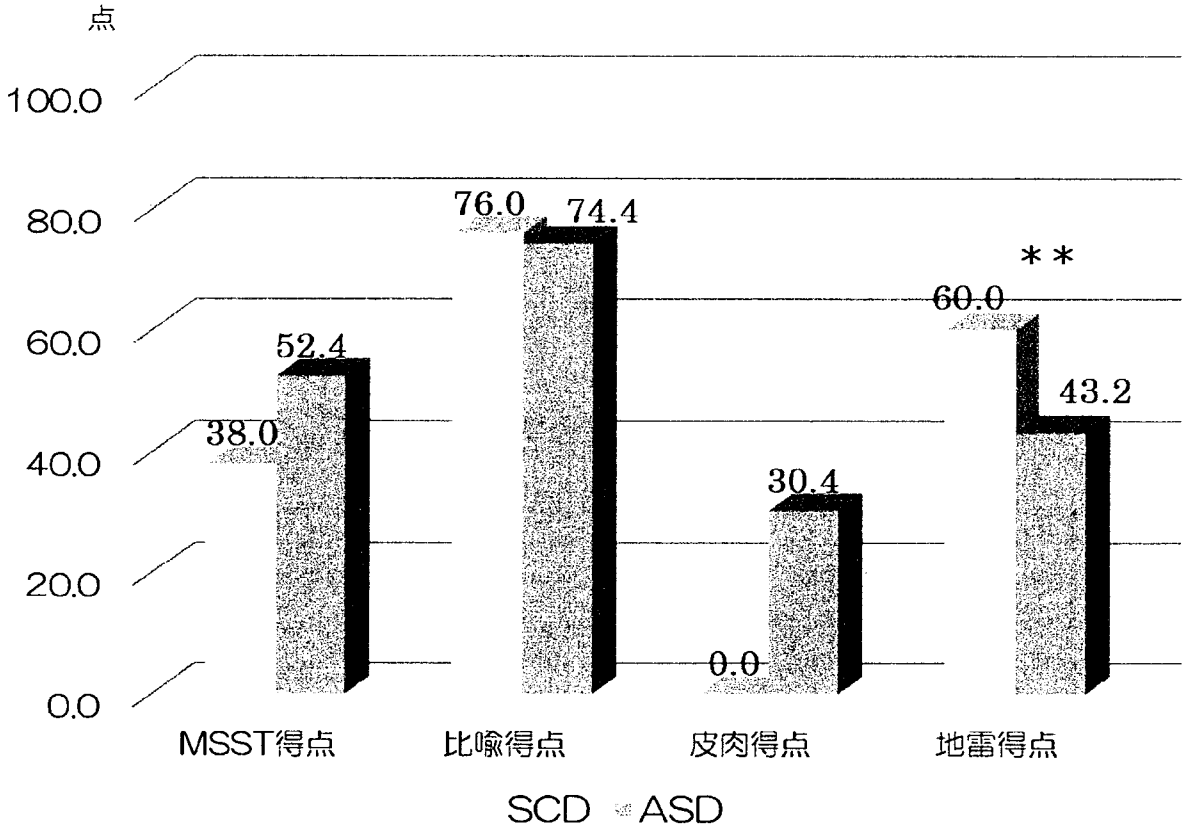


図３　ASD と SCD における比喩皮肉文テスト結果の比較

保護者支援メニューの作成：ASD の子どもをもつ保護者に特化したスペシャルメニュー

所属機関：久留米大学小児科

研究分担者：山下裕史朗

【緒言】

自閉スペクトラム症(Autism Spectrum Disorder; ASD)の子どもをもつ保護者は子育てにおいて逆境に立たされることが多い。ASD をもつ子どもの子育ては困難であり、不適切な子育てや虐待を受けるリスクが定型発達児より高いことが報告されている。我々の予備的研究では、ASD をもつ子どもの保護者は基本的生活習慣を習得させることに困難さを感じていた。そこで、我々は、ASD のある子どもの基本的生活習慣の習得と保護者の養育レジリエンスを向上することを目的としたスペシャルプログラムの作成と実践を目指した。

【方法】

1. 平成 27 年(2015)から平成 29 年(2017)までのトリプル P 受講者の養育レジリエンス変化を 78 例で追跡し、養育レジリエンス要素質問票(PRQ)サブスケールの変化を検討した。受講した ASD をもつ保護者へのアンケート調査を行い、保護者の困難に感じている項目を抽出した。
2. 2018 年に養育レジリエンス向上に特に有用な要素をコアにした ASD のある子どもの保護者のニーズに合ったスペシャルメニュー（試行版）を作成し、2019 年度に試行版をもとに、ASD のある子どもの保護者（母親）へ 8 週間のスペシャルメニューを実施した。PRQ、DASS、Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ)および基本的生活習慣習得項目を評価に用いた。実践結果をもとに、ワークブック、ファシリテーターマニュアル、DVD、スライドを作成した。

【結果】

1. トリプル P 受講者の養育レジレンス要素質問票(PRQ)サブスケール 3 項目ともに改善を認めた。受講した ASD をもつ保護者へのアンケート調査を行い、保護者は基本的生活習慣の習得に困難を最も感じていることが明らかになった。
2. スペシャルメニューの実施：小児神経科医師、言語聴覚士からの 3〜5 歳の

ASD 児紹介は 30 名、うち 2 名は参加承諾が得られず、28 名の参加希望者に無作為割り付けを行い A、B グループ 14 名ずつで開始した。A が介入群、B 群は waiting 群である。それぞれの群の男女差は、A 群（介入）14 名は男 11 名、女 3 名である。B 群(waiting)14 名は男 10 名、

女４名である。A,B 群の男女比、年齢分布において有意差はなかった。開始時の PRQ 得点は両群とも有意差なし（図１）。PRQ 得点は A 群（介入）のみ下位尺度すべてに有意な差が認められ、B 群(waiting)は改善がなかった(図２)。不安、抑 うつ、ストレを評価する DASS(Depression Anxiety Stress Scale）は、ストレスおよび抑うつのみ有意な改善が認められた。SDQ に関しては、有意に減少することはできなかったものの、向社会性に関して上昇していた。

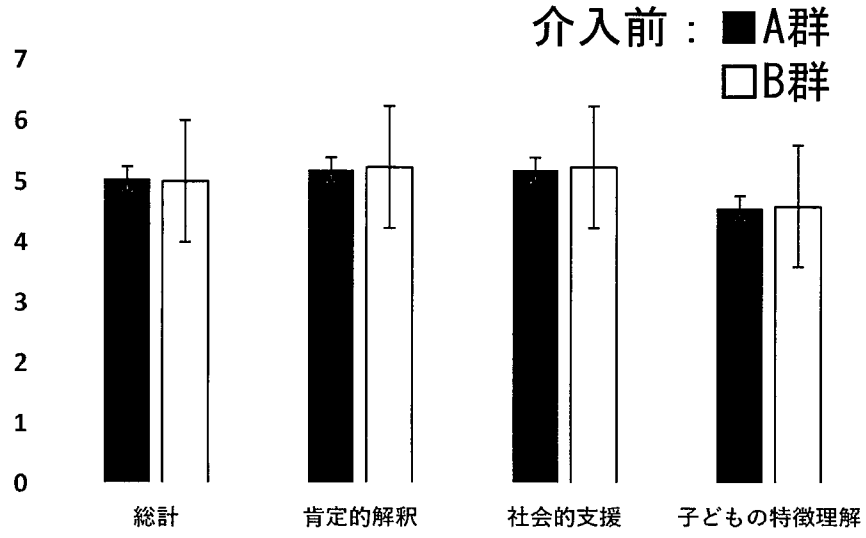
基本的生活習慣：参加した母親がプログラム中に取り組んだ基本的生活習慣の項目は、食事２名、排泄４名、衣類５名、清潔１名、礼儀２名であった。受講中、14 名中 13 名の子どもが目標を到達でき、１名が途中達成となっている。また、14 名のうち、３名は途中で初期目標が達成でき、次の目標に取りくめた。

【考察】

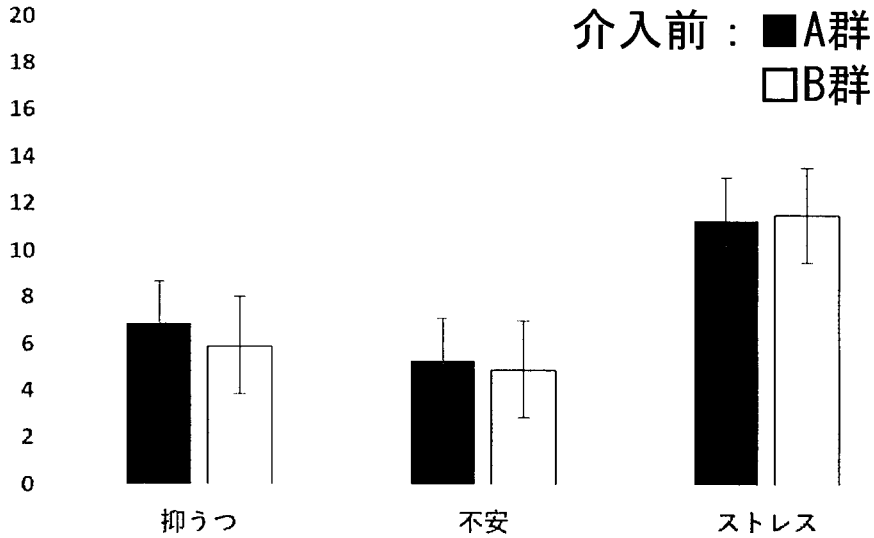
ASD スペシャルメニュー（保護者への認知行動療法）は親の養育レジリエンスを向上し、子どもに基本的生活習慣を習得することのできるプログラムである。

介入群はメンタルヘルスの向上、不適切な子育ての減少につながっており、養育レジリエンスの向上によるものと考えられる。SDQ に関しては、有意に減少することはできなかったものの、向社会性に関して上昇していた。この結果は子どもが基本的生活習慣を習得していることが反映したと考える。

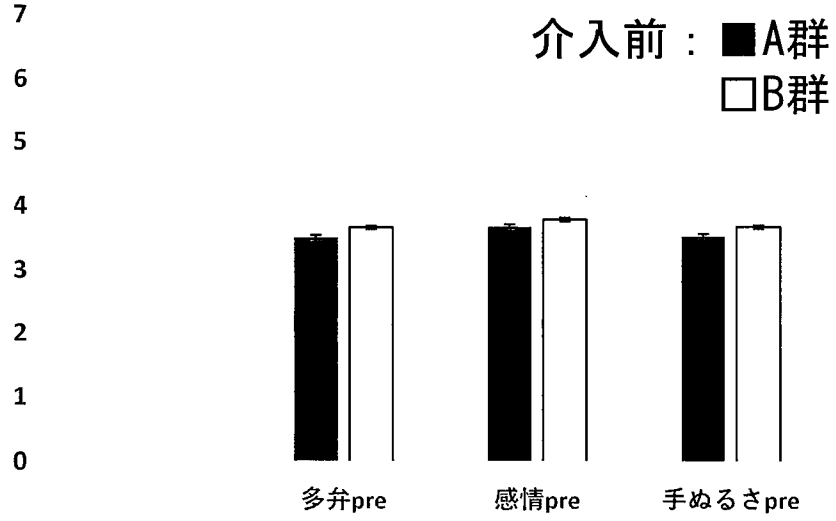
ワークブックとファシリテーターマニュアル、DVD、スライドを完成したが、今後はスペシャルメニューを活用した支援者の研修およびより多くの参加者を対象とした実践と効果検証が求められる。



養育レジリエンス：PRQ



精神的健康：DASS



子育てスタイル：PS

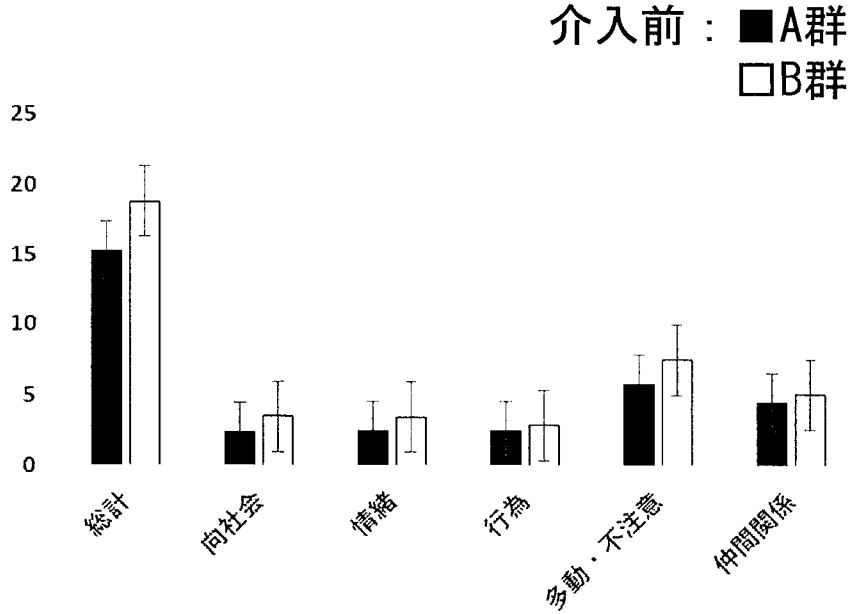
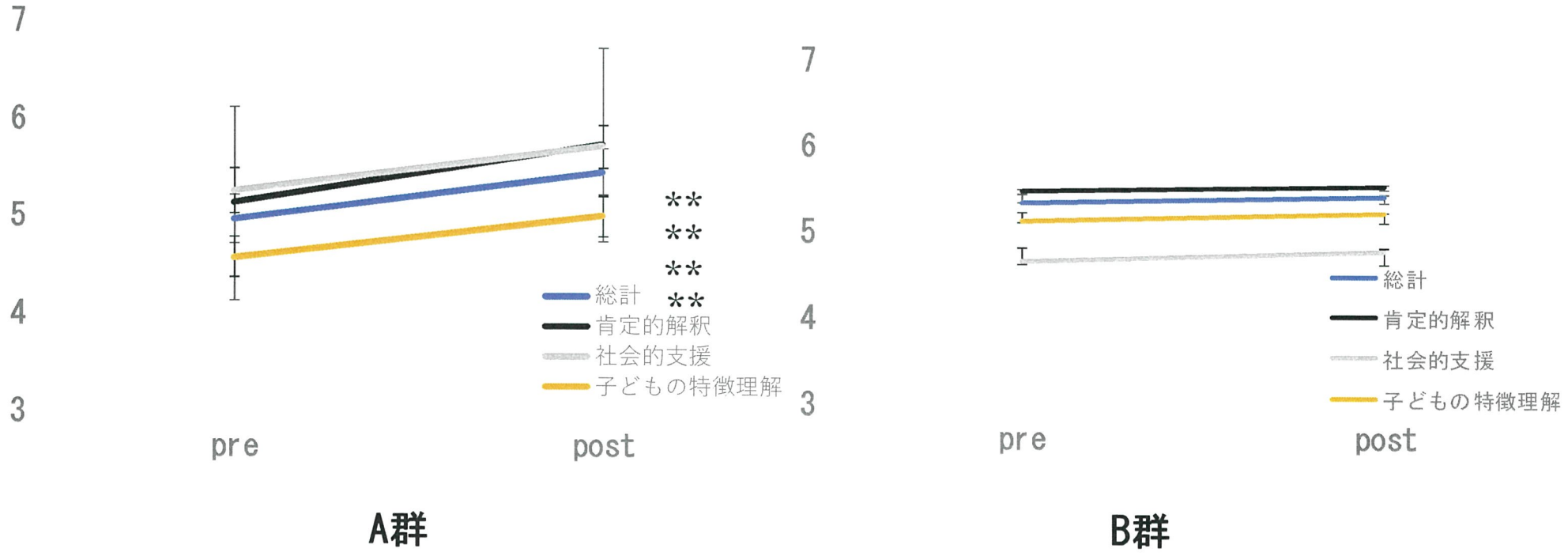


図1. 開始時の両群データ

図2. 養育レジリエンスデータ



養育レジリエンス（1-7)は点数が高いほど良いことを示す。

A群：	肯定的解釈	pre<post	(p<.001)
	社会的支援	pre<post	(p<.01)
	子どもの特理解	pre<post	(p<.01)

漢字の学習障害診断メニュー作成

東京学芸大学、現　尚絅学院大学
研究分担者：小池敏英

【緒言】

発達性読み書き障害（発達性ディスレクシア）は、全般的な知能が正常範囲にあり、視覚や聴覚などの末梢感覚器の障害がなく、学習環境や本人の意欲にも問題がないにも関わらず、「読み書き」に習得の困難を認めるものである[1)]。また、その特徴は、正確かつ／または流暢な単語認識の困難があり、綴りや文字記号の音声化が劣拙である[1)]。音韻認識の問題や呼称のスピードの異常を検査で明らかにすることが客観的な診断や病態把握につながるとされている[2) 3)]。日本語は、アルファベットと同じ表音文字のひらがな、カタカタと、表意文字である漢字の3種を使用している。発達性ディスレクシアの発生率は文字と音との対応関係により異なることが報告されており[4)] 日本語は、ひらがな、カタカナ、漢字によりその発生率が異なる。ひらがなにおける発達性ディスレクシアの発生率は1～2%であり、また、漢字はひらがなよりも多く6 ～7%と報告されている[5) 6)]。

漢字は、学年ごとに配当されており学年進行に合わせて学習がなされる。通常学級における漢字の習得状況に関する調査によると、読みと書きでその正答率が異なり読みは各学年共に90%を超えている[7)]。書きは読みと比較して正答率が徐々に下がるが約70%の正答率をしめしている[7)]。発達性ディスレクシア児のような、ひらがな文に読み困難を示す子どもの中には、漢字の読み困難を示す者がとても多いことが報告されている[8)]。また、ひらがなにおける読字障害児の大部分は漢字の読字・書字にも困難をきたすが、それ以外に漢字のみで読字・書字の困難を示す症例との指摘もある[9)]。これより、かな文字の音韻意識や、呼称スピードの問題と共に、日本語においては漢字の読みと書きの問題についても評価していくことが必要であると考えられる。

日本において漢字を含めた、発達性ディスレクシアのスクリーニング検査として、小学生の読み書きスクリーニング検査（STRAW）が報告されている[12)]。この検査では、認知発達検査と共にひらがな、カタカナに加え、漢字の音読と書取の検査が用いられ、定型発達児の基準値に比して-2SD 以下の値を明らかな異常値とする検査である。しかしながら、未だ漢字も含めた発達性ディスレクシアの診断やスクリーニングを目的とした検査は少ないことが現状であり、また、発達性ディスレクシアの診断には、標準化された検査による客観的な学習到達度の評価が不可欠である[12)]。

そこで本研究では、臨床場面で簡便に使用できる漢字の読字と書字の検査の基準値を作成することを目的とした。具体的には、はじめに、漢字単語の読字と書字の課題を小学生の定型発達児を対象として調査し、基準値を算出する。次いで、発達性読み書き障害児または、書字障害児に漢字単語の読字と書字の課題を実施し、基準値の妥当性を検討する。

【方法】

1．対象

（1）定型発達児

関東地方及び、中国地方の公立学校の通常学級に在籍する児童を対象に調査を行なった。その際、漢字の書字課題が全て無回答の者、性別に関する記述が未記入であった児童を除外し3396名（男児1745名、女児1651名）を対象に分析を行なった。各学年別の人数は、2年生758名（男児389名、女児399名）、3年生

707名（男児375名、女児332名）、4年生685名（男児350名、女児335名）、5年生614名（男児305名、女児309名）、6年生632名（男児326名、女児306名）示した。対象児については、国語の学習達成においいて遅れがないことを確認した。研究の趣旨を保護者に文章で伝え、小学校を通して研究協力と発表の同意を得た。

（2）読み書き困難児（以下LD児）

LD児114名（小学2年生20名、3年生25名、4年生26名、5年生22名、6年生21名）を対象とした。本研究においてLD児は①WISC-Ⅲないしは Ⅳにおいて FIQ（FSIQ）が70以上を示す者、②読み書き困難を主訴として医療機関を受診または相談機関に相談をしている者、③脳損傷に関する病歴が報告されていない者と操作的に定義した。漢字単語の読字テストの検討にあたっては、小児神経科医により発達性ディスレクシア（DD）または、読字障害（RD）の診断がある者、ガイドラインによる評価（稲垣ら，2010）[1]で+2SD以上の課題が2課題以上ある者のいずれかを満たす者を、読字困難群、それ以外を読字非困難群とした。読字困難群は73名、非困難群は46名であった。漢字単語の書字テストの検討にあっては、小児神経科医により発達性ディスレクシア（DD）または、書字障害（WD）の診断がある者を書字困難群、それ以外を書字困難群とした。書字困難群は56名、非困難群は50名であった。対象児とその保護者に対して、研究趣旨の説明を行い、研究協力と共に発表に対する同意を文章で得た。

2．調査課題

漢字の読字と書字の能力は、漢字単語の読字テストと漢字単語の書字テストによって検討した。課題で出題した漢字単語は、各学年の国語の教科書に掲載されている新出単語の中から、既学年の前学年までに学習した漢字単語を16単語選定し出題した。漢字単語の選定に当たっては、漢字単語の属性として、親密度、心像性が漢字単語の読字に影響を与えることが報告されているため、その報告を参考に単語の属性を調整し調査単語の選定を行った[14]。親密度、心像性の値については、NTTデータベースを用いた[15]。親密度は、各学年の教科書（東京書籍）に掲載されているすべての新出漢字単語について親密度の中央値を求め、中央値以上の単語を選択した。またその中から、Ondaら(2015)[14]の報告に掲載されている心像性の範囲に基づき、高心像単語を8単語、低心像単語を8単語選定した。2年生に関しては、漢字単語の心像性の値が高いためテストは高心像漢字のみとした。漢字単語の読字テストの親密度は、2年生6.03～6.46、3年5.81～6.56、4年5.72～6.63、5年5.62～6.34、6年5.40～6.09であった。高心像性漢字の心像性の平均(SD)は、2年生5.84（0.47）、3年生5.54（0.20）、4年生 5.92（0.35）、5年生5.48（0.37）、6年生4.41(0.23)であった。低心像漢字の心像性の平均(SD)は、3年生 4.41(0.32)、4年生 3.91（0.16）、5年生 3.83（0.16）、6年生3.73(0,19)であった。漢字単語の書字テストの親密度は、2年生 5.84～6.53、3年 5.71～6.56、4年 5.71～6.34、5年5.46～6.40、6年5.34～6.28であった。高心像性漢字の心像性の平均(SD)は、2年生5.42（0.61）、3年生5.48（0.28）、4年生 5.79（0.22）、5年生5.39（0.29）、6年生4.35(0.22)であった。低心像漢字の心像性の平均(SD)は、3年生 4.7(0.29)、4年生 3.8（0.19）、5年生 3.82（0.19）、6年生 3.83(0.11)であった。

漢字単語の読字テストはA4用紙に漢字単語が16題記載されており、問題の下にある括弧の中に漢字単語の読み仮名をひらがなで記入する課題である。漢字単語の書字テストは、A4 用紙に、回答する漢字単語の読みが含まれた短い文章が16第記載された。回答する漢字単語の読みには下線が引かれていた。各問題の

下にある四角の中に読みに対応する漢字を記入する課題である。各課題はいずれも実施時間は5分間であった。

3．手続き

定型発達児については、平成27年4月～7月に調査を実施した。調査実施に当たっては、担任教員に教示文を配布した。教示文に基づき担任教員により各クラスで一斉実施された。LD児については、平成28年4月~令和2年1月に調査を実施した。調査実施に当たっては、教示文に従い個別に実施した。

4．分析

得られたデータの統計的分析は、エクセル統計 2012（社会情報サービス，日本）及び EasyEstimation Ver.1.7.1[16]を用いた。漢字単語の読字テスト、書字課題の信頼性を検討するため、各学年で、課題項目のα係数を算出した。また、項目応答理論(IRT)を用いて、各漢字単語の難易度と弁別性を算出した。その際、各学年の漢字単語についての難易度と弁別性のパラメーターは、項目応答理論の2パラメータモデルを用いて算出した。漢字単語のテスト項目の難易度のパラメーターが一定の範囲内にある場合、テストの得点は対象児の達成の度合いを反映するとされている。難易度のパラメーターに関して、平均と標準偏差を算出し、課題項目の難易度を検討した。次に、読字困難群/読字非困難群（書字困難群/非困難群）の判定を、漢字単語の読字テスト、書字テストによってどの程度正確に識別可能であるのかを検討するために感度と特異度を算出した。

【結果】

1．定型発達児について

（1）漢字単語の読字テストと書字課題の正答率の分布と信頼性

漢字単語の読字テストの平均正答率(SD,5パーセンタイル値、10パーセンタイル値)は2年生95.5(10.4、81.2、87.5)、3年生93.8(14.5、75.0、81.2)、4年生94.6(11.0、75.0、81.2)、5年生96.1(9.5、81.2、87.5)、6年生92.7(15.6、68.8、81.2)であった。各学年の正答率の分布は図1に示した。テスト項目が調査対象者の一貫した特徴を測定できているか検討するため、漢字単語の読字テストの16問のクロンバックのα係数を算出した。その結果、2年生α=.819、3年生α=.909、4年生α=.790、5年生α=.796、6年生α=.890となり、すべての学年でα=.79以上の高い信頼性係数を示した。項目応答理論を用いて、各学年の漢字単語の読字テストの難易度を算出し、課題項目の難易度を検討した結果、難易度のばらつきは比較的小さく－1.0～－3.8の範囲であった。

漢字単語の書字テストの平均正答率(SD,5パーセンタイル値、10パーセンタイル値)は2年生92.1(12.4、68.8、81.2)、3年生87.6(17.9、50.0、70.0)、4年生82.5(20.2、36.5、53.1)、5年生78.7(19.9、37.5、47.8)、6年生80.0(20.9、34.4、50.0)であった。各学年の正答率の分布は図2に示した。テスト項目が調査対象者の一貫した特徴を測定できているか検討するため、漢字単語の書字テストの16問のクロンバックのα係数を算出した。その際、3年生以上は各課題項目が2文字熟語で構成されているため、漢字ごとに（32字）α係数を算出した。その結果、2年生α=.762、3年生α=.938、4年生α=.925、5年生α=.909、6年生α=.926を示した。項目応答理論を用いて、各学年の漢字単語の読字テストの難易度を算出し、課題項目の難易度を検討した結果、難易度のばらつきは比較的小さく－4.3～0.1の範囲であった。

2. LD 児について

漢字困難群/読字非困難群（書字困難群/非困難群）の判定を、漢字単語の読字テスト、書字テストによってどの程度正確に識別可能であるのかを検討するために感度と特異度を算出した。その際、漢字読字テスト、書字テストの 5 パーセンタイル値、10 パーセンタイル値を基準値として識別可能か検討した。

各学年の感度と特異度の値を表 1 に示す。漢字単語の読字テストについては、小学 3 年~6 年生においては、10 パーセンタイル値を基準値としたときの感度が 70%以上、特異度は 80%以上を示した。漢字書字テストについては、小学 2 年生は、10 パーセンタイル値を基準値としたときの感度が 88.9%、特異度は 87.5%を示した。小学 2 年生~6 年生においては、5 パーセンタイル値を基準値としたときの感度の範囲は 55.6～81.8%、特異度の範囲は、66.7～100%を示した。また、10 パーセンタイル値を基準値としたときの感度の範囲は 69.2～100%、特異度の範囲は 57.1～88.9%を示した。

【考察】

（1）漢字単語の読字書字テストについて

これまで、日本における発達性ディスレクシアのスクリーニングや診断においては、ひらがなの音読の正確性や流暢性を測る検査が多く用いられているが、発達性ディスレクシアの発生率は、かな文字よりも漢字の読字と書字における発生率の方が高いことが報告されている。漢字は学年進行に従い学習単語が決定されているため、当該学年にあわせた漢字単語の読字と書字の評価を行なっていくことが必要であろう。しかしながら、漢字の読字書字に問題をある児童を評価するための実用的な検査は、未だ少ない状態にある。ひらがなの音読の流暢性、正確性と共に、漢字の読字、書字について評価することで、臨床場面や診断における情報になると考えられる。そこで、本研究では、臨床場面で簡便に使用できる漢字の読字と書字の検査の基準値を作成刷ることを目的として調査を行った。

日本教育技術学会（2007）[7] は、小学 1～6 年生までの配当漢字について学年ごとに習得率の調査を行なっている。その結果、漢字の読字では全ての学年で 92%～94%の正答率を示していた。漢字の書字では、2 年生では、小学 2 年生 79%、小学 3 年生 71%、小学 4 年生～6 年生は、65%前後を示している。Onda et al（2015）の漢字単語の読字テストの正答率は 2 年生 94.6%、3 年生 93.9%、4 年生 92.2%、5 年生 95.8%、6 年生 92.4%を示していた [14]。

本研究の漢字単語の読字テストは、全ての学年で 90%以上の平均正答率を示し、日本教育技術学会（2007）[7] や Onda et al（2015）[14] の調査とほぼ同様の結果が得られた [14]。漢字単語の読みは、文部科学省の学習指導要領 [17] の中で、当該学年までに配当されている感じを読めるようにすることが指導目標とされている。通常学級における児童の多くは全ての学年で当該学年までの漢字の読みを達成していることが指摘できる。また、漢字の読みは学年が進行しても正答率に大きな変化はないという結果も先行研究と同様の知見が得られた。

漢字単語の書字テストは、日本教育技術学会（2007）による調査 [7] と比較すると正答率が高くなった。本研究では、漢字単語の親密度を統制し、単語としての親しみが低すぎるものは出題しなかった。これが、要因となり日本教育技術学会（2007）が行った調査 [7] よりも正答率が高くなったと考えられる。しかしながら、学年進行に従って正答率が下がる傾向は同様に認められた。

課題の信頼性は漢字読字、書字共におおよそ $\alpha = .80$ 以上を示した。また、項目応答理論の結果から、学年間のテストの難易度に差がないことが確認できた。これより、本研究で作成した漢字単語の読字、書字テスト

は基準値としての信頼性を指摘できる。

（2）漢字単語の読字、書字テストの感度と特異度について

漢字単語の読字テスト、書字テストの感度と特異度を検討するにあたっては、各テストの5パーセンタイル値、10パーセンタイル値の2種について、基準値の候補として検討した。その結果、漢字単語の読字テストについては、小学3年~6年生においては、10パーセンタイル値を基準値としたときの感度が70%以上、特異度は80%以上を示した。これより、漢字単語の読字テストについては、10パーセンタイル値を基準値とすることが妥当と考えられる。一方、漢字書字テストについては、小学2年生~6年生においては、5パーセンタイル値を基準値としたときの感度の範囲は55.6～81.8%、特異度の範囲は、66.7～100%を示した。また、10パーセンタイル値を基準値としたときの感度の範囲は69.2～100%、特異度の範囲は57.1～88.9%を示し、その範囲が大きかった。この点については、小学2年生~4年生においては、10パーセンタイル値を基準値とし（感度の範囲は80.0～100%、特異度の範囲は、60.0～87.5%）、5年生と6年生については、5パーセンタイル値を基準値とする（感度の範囲は69.2～81.8%、特異度の範囲は71.4～88.9%）と比較的良好な識別が可能になることを指摘できる。

【結論】

漢字単語の読字、書字テストの基準値について検討を行った。漢字読字テストについては各学年で10パーセンタイル値を基準値とすることが妥当であることが示された。また、小学2年生~4年生においては、10パーセンタイル値を基準値とし、5年生と6年生については、5パーセンタイル値を基準値とすることが妥当であることが示された。この基準値を利用することにより、ASDをはじめとする他の発達障害が併存した場合の漢字の読字・書字障害の様相の解明につながることを指摘できる。

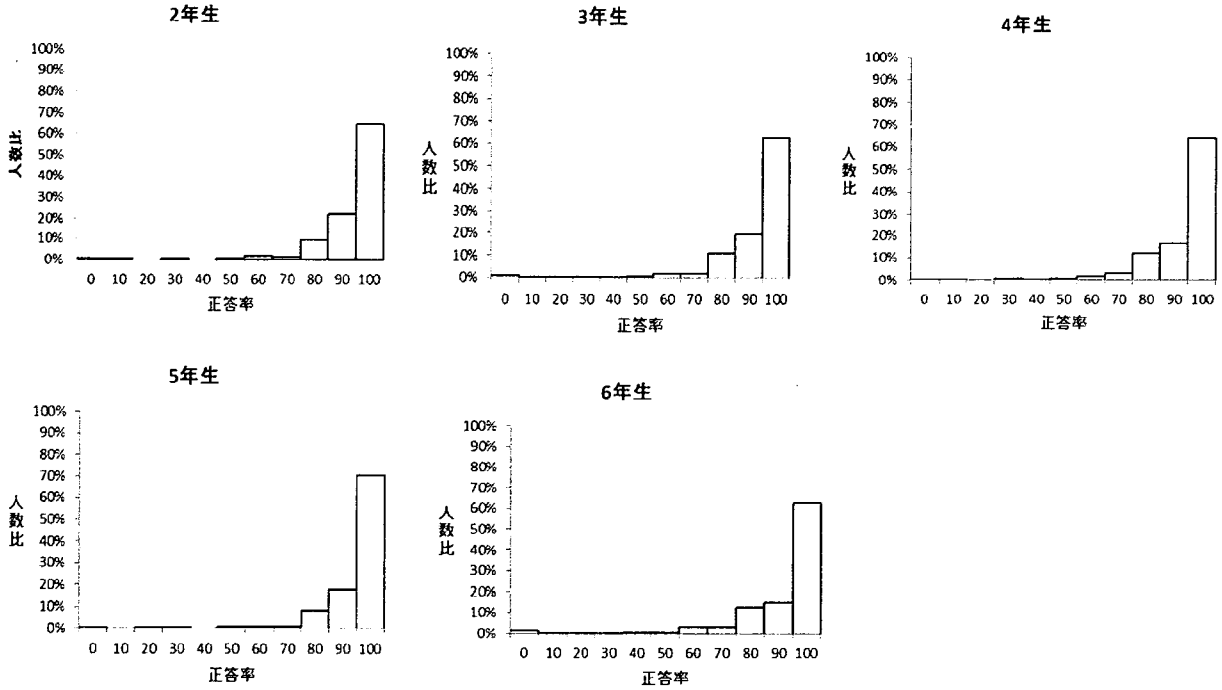


図1　漢字単語の読字テストの成績分布

漢字単語の読字テストの成績分布である。棒グラフの縦軸は人数比、横軸は漢字単語の読字テストの正答率を示している。

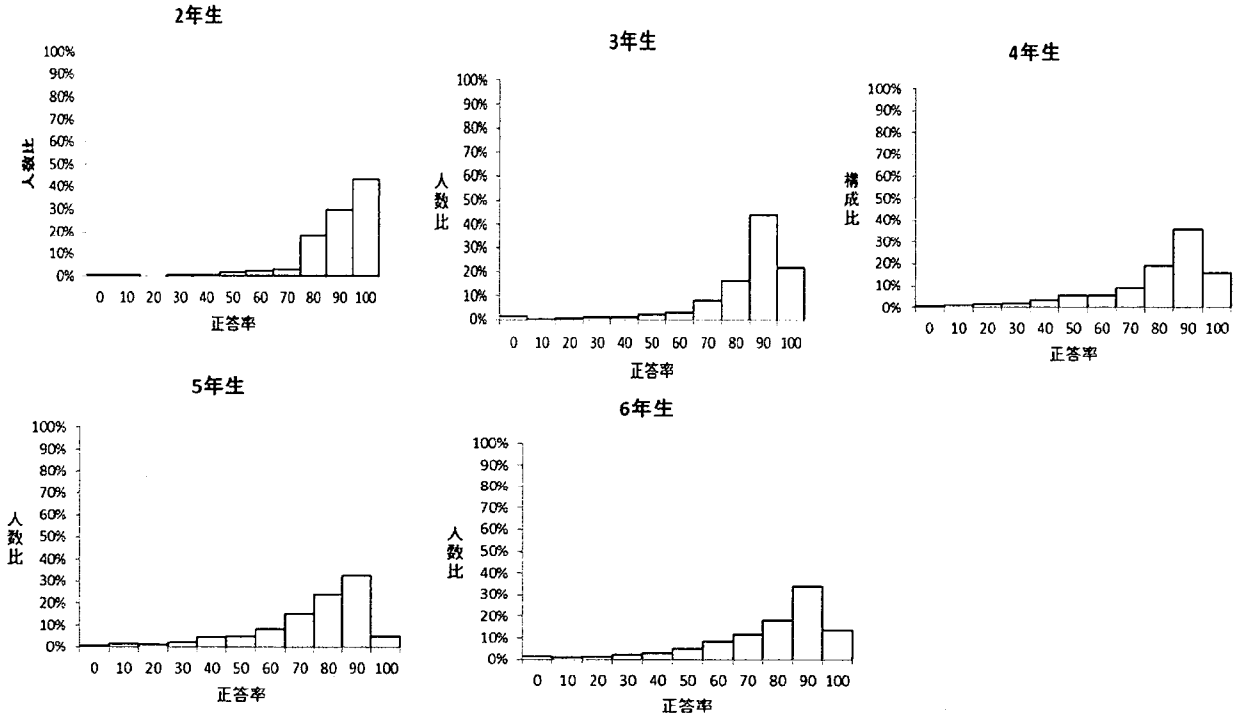


図2　漢字単語の書字テストの成績分布

漢字単語の書字テストの成績分布である。棒グラフの縦軸は人数比、横軸は漢字単語の書字テストの正答率を示している。

表 1　漢字単語の読字、書字テストの感度と特異度

		漢字単語の読字テスト		漢字単語の書字テスト	
		感度	特異度	感度	特異度
2年生	5%タイル値	42.9%	100.0%	55.6%	100.0%
	10%タイル値	64.3%	83.3%	88.9%	87.5%
3年生	5%タイル値	80.0%	93.3%	75.0%	66.7%
	10%タイル値	86.7%	93.3%	100.0%	60.0%
4年生	5%タイル値	75.0%	100.0%	60.0%	90.9%
	10%タイル値	75.0%	90.0%	80.0%	63.6%
5年生	5%タイル値	57.1%	100.0%	69.2%	88.9%
	10%タイル値	85.7%	100.0%	69.2%	88.9%
6年生	5%タイル値	57.1%	100.0%	81.8%	71.4%
	10%タイル値	71.4%	100.0%	81.8%	57.1%

発達障害バイオマーカーの開発

功刀 浩

国立精神・神経医療研究センター

緒言

発達障害と腸内細菌との関連は古くから指摘されており、トピックスの１つになっている(Hsiao et al, Cell 2013 ほか)。また、栄養学的異常との関連も多数指摘されているが、唾液の常在菌解析なども含めて日本での検討は殆どない。

そこで本研究は腸や口腔内常在菌の役割、栄養学的指標に焦点をあてた解析を行う。常在菌や食生活との関連が明らかになれば、介入法の開発に直接役立つ知見が得られることが期待される。

方法

定型発達児 28 名、自閉症スペクトラム障害（ASD）児 13 名を対象に糞便および唾液を採取し、菌叢 DNA を抽出後、16S rRNA 菌叢解析を行い、両群間で比較した（糞便採取できた ASD 児は 10 名)。

＜倫理的配慮＞ 被験者・保護者に対しては、承認されたプロトコールに従って研究について説明を行い、文書で同意を得る。具体的には、「自閉スペクトラムにおける病態生理の解明、および新規治療法・診断予防法の開発を目指した遺伝子解析・ヒト粘膜常在細菌に関する研究という課題名で既に倫理委員会での承認を得ている。データの取り扱いにあたっては、個人情報の保護に十分留意している。

結果

腸管/口腔内における α-Diversity（個人内多様性）の解析では、腸管内の菌種について ASD 群で有意に多かった。菌叢における菌種組成のバランスを表す Shanon's index も ASD 群で有意に高く、定型発達児と比べて菌組成のバランスが悪くなっている可能性が示唆された。腸内フローラの予備的解析結果によれば、2 群間で有意差がみられた菌種の多くは Firmicutes 門であり、ストレプトコッカス科(Streptococcaceae)とベイロネラ属（Veillonella)は ASD 群で平均存在比が低く、ルミノコッカス科（Ruminococcaceae)、リケネラ科（Rikenellaceae)、デスルフォビブリオ属（Desulfovibrio）では ASD 群で平均存在比が高かった。

唾液フローラにおいて、2 群間で有意差がみられた菌の多くは Firmicutes 門、Proteobacteria 門、Fusobacteria 門であった。Firmicutes 門の菌種全体で ASD 群は菌数が多く、特にラクノアナエロバクラム属（Lachnoanaerobaculum）の平均存在比が高かった。Proteobacteria 門、Fusobacteria 門の菌については ASD 群で平均存在比が低かった。Bacteroidetes 門では特定の属のみ有意差がみられ、プレボテラ属（Prevotella）は ASD 群で平均存在比が低く、パルディバクテリア属（Paludibacter）は平均存在比が高かった。

考察

ASD 児では胃腸症状との関連が指摘されている Ruminococcus torques が多いという報告（Wang et al., 2013）があり、今回の腸内フローラ解析の結果と一致した。リケネラはバクテロイデス目であり、バクテロイデスおよびパラバクテロイデスはコントロールマウスと比較して ASD モデルである BTBR マウスで有意に多いという動物実験での結果とも整合性がある（L. Coretti, et al., 2017)。また、Desulfovibrio 属の菌数は自

閉症症状と強い相関があるという報告があり（Tomova A., et al., 2015）、ASD群の特徴を表す菌である可能性が支持された。

腸内のPrevotella属の組成比がASD児で有意に低いということが示されており（DW. Kang, et al., 2013）、口腔と腸管内それぞれのPrevotella属の関連性はわからないものの、ASDの病態に何らかの関係があるかもしれない。

結論

ASD児と定型発達児との間で、腸内・口腔内フローラにおける菌組成に有意な差があることが示唆された。ASD児では腸内・口腔内ともに菌の種数が多く組成バランスが定型発達児と比べて悪かった。腸内ではFirmicutes門に属する菌でASD児と定型発達児の2群間で有意差があり、口腔内ではそれに加えてProteobacteria門、Fusobacteria門でも有意差が見られた。

所沢コホート：発達障害リスク児の幼児期からの発達軌跡の同定

分担研究者：神尾陽子
国立精神・神経医療研究センター
お茶の水女子大学 基幹研究院人間科学系 人間発達教育科学研究所

緒言

本研究は、精神保健研究所と連携協定を結んでいる所沢市が2017年に開設した児童発達支援事業所（「所沢市こども支援センター」）との密接な連携のもとで、発達支援を必要としてセンターを訪れる就学前幼児とその養育者を対象として行う縦断的な観察研究である。自閉スペクトラム症(ASD）を主とする発達障害を疑われた子どもたちは発達過程で、発達障害以外にも情緒や行動の問題を持ちやすいが、包括的な観点からの発達軌跡は明らかにされていない。また、発達障害の発症は遺伝的要因が大きいことがわかっているが、同時に育児のむずかしさからマルトリートメントのリスク要因でもある。子どもと家族への支援という観点からは、子どもの発達、情緒、そして行動に影響する遺伝的要因と養育環境要因の双方の影響について縦断的にデータ収集の仕組みが必要である。本研究では、地域の発達支援の拠点となる支援機関（所沢市こども支援センター）との連携のもとで、幼児期から子どもの発達障害特性に加えて、精神症状や一般健康問題を、環境要因として、家庭環境、親の健康や発達特性について年1回の質問紙調査に加え、必要に応じて臨床情報をあわせて包括的なデータを収集する体制を構築することを目標とする。最終的にはエビデンスにもとづく早期支援および予後予測が可能となり、個別ニーズに応じた支援サービスの提供が可能となると考える。また前向きコホートを維持することは、医療、福祉、教育との連携強化に役立ち、エビデンスにもとづく地域の発達支援のモデルとなることが期待される。

方法

対象：所沢市こども支援センター・発達支援部門の新規来所者（2歳から6歳までの未就学児でなんらかの発達的な困難を抱えている多様な発達リスク群と、同年齢、同数の同センターの育児支援部門を利用するコントロール群とその養育者。2019年度末時点で、発達リスク群32名、コントロール群4名からインフォームド・コンセントを得た。

手続き：当研究チームと、所沢市（こども未来部、こども支援センター）、そしてNCNPが連携協定を結んでいるお茶の水女子大学（人間発達教育研究所）の三者での連携会議を計15回持ち、研究者、行政、民間事業者との間で合意形成をはかりながらすすめた。具体的には1年次は、研究計画を策定し、データ収集にかかる負担を少なくするためにクラウドを介した電子アンケートの調査項目（フェイスシート項目15、子どもに関する項目150-200、親に関する項目130、子どもの年齢により多少変動あり）を確定し、調査ツール（所沢子どもの心の健康調査：Tokorozawa Survey of Children's Mental Health: TOUCH ME “タッチミー”）のシステムを開発した。1年次末から2年次にかけて13名の保護者を対象にパイロットテストを行い、その結果を踏まえた修正版システムとユーザー向け利用マニュアルを作成した。2年次10月から、研究参加募集のチラシ配布、個別に研究参加への説明を行い、その後に電子アンケートのIDを配布を経て、回答をしてもらうという手順で本調査を開始した。説明のための日程調整が難しいため、対面以外に電話での説明の選択肢も用意し、できるだけ迅速な調査開始の工夫を行った。同時に、1年次、2年次を通して、既存の臨床データの活用を見越して、こども支援センターの全職員を対象として標準化された臨床検査の実施の質の向上のために研修を実施した。3年次には、広く市民に本研究事業を知ってもらうために、子育て交流サロンを開催し(2020.1.28、於　こども支援センター)、保護者と研究者、福祉課、事業所が参加した。

本研究は国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得ており、全ての被験者およびその保護者に対して研究の目的及び内容を十分に説明して書面によるインフォームド・コンセントを得て行われた。

結果と考察

現時点でアンケートの初回回答の終了した21名の特徴は、2−4歳が大部分を占め、第1子が過半数、男女比は2.7:1と男児＞女児であった。回答者の9割は母親で、ほとんど全員が児の発達に懸念があった。家庭の経済的状況については地域を代表する分布を示していた。児の対人関係の問題は自閉症的特性の強さと強い相関を示し、ADHD特性との相関も中程度にみられた。心の健康全般の困難さは自閉症、ADHD双方の発達特性と高い相関を示した。育児ストレス（保護者自身に関するもの、子どもの特徴に関するもの）のうち後者のみ、前述の児の発達障害特性および心の健康全般の困難さと中程度の相関を示した。

結論

子どもの自閉症的特性と全般的メンタルヘルスの問題が強いほど、育児ストレスが高くなることが示され、先行研究の結果と一致した。幼児期に地域で支援サービスを受けることで、どのように変化していくかについては今後の検討課題である。

聴覚情報処理に関わる神経生理学的基盤を用いた児童期から成人期における精神医学的障害の早期発見と早期介入に関わる病態解明に関する研究

分担研究者：高橋秀俊
高知大学

緒言

本研究の目的は、発達障害の聴覚情報処理特性に応じた治療法（特に環境調整法）と併存精神障害発症や介入時期の予測法の開発である。近年、都市化の進展やインターネットの普及などにより聴覚情報処理に関する環境的負荷はますます増している。発達障害や精神障害における聴覚情報処理の脆弱性は古くから報告されているが、ともに病因の異種性が大きいこと、発達障害における思春期・成人期発症精神障害の高い併存率のため、治療には個々の特性に応じたアプローチが必要である。そのため聴覚情報処理特性の簡便な生理学的評価法と、それを基に動物実験などでの治療法ならびに精神障害発症や介入時期の予測法の開発に対する必要性は高く、このような成果は社会実装にもつなげやすいと期待できる。

方法

本分担研究課題では、これまで分担研究者らが多摩地域で行ってきたコホート研究の参加児童（自閉スペクトラム症[autism spectrum disorders: ASD]・定型発達）を主な対象とした。これらの児童では、主要な臨床指標（精神医学的診断、定量的自閉症特性、精神症状、社会機能）や生理学的指標を得る体制が整備されていた。

臨床指標としては、日本語版 Social Responsiveness Scale (SRS)用いた定量的自閉症特性、日本語版 Strengths and Difficulties Questionnaire (SDQ) を用いた児童の情緒や行動の問題、日本語版感覚プロファイルを用いて感覚刺激への反応傾向（感覚過敏・鈍麻など），日本版 Vineland-II 適応行動尺度を用いて適応行動・不適応行動などを評価した。協力の得られた児童に関しては、聴覚性驚愕反応（acoustic startle response: ASR）検査、脳波・脳磁図（安静時会閉眼、聴性定常ガンマ律動、聴覚性前注意的弁別処理）検査といった神経生理学的検査、アクチグラフを用いた身体行動動態などの表現型、さらには糞便・唾液内細菌叢も検討した。

ASR 検査では、ASR の潜時や 65dB から 105dB まで 10dB きざみで 5 段階の各音圧の白色雑音(40msec)に対する ASR の大きさ、さらに ASR の制御機構として馴化やプレパルス抑制（PPI）について評価した。脳波・脳磁図検査では、開閉眼課題や聴性定常ガンマ律動に加え、聴覚性前注意的弁別処理（ミスマッチ陰性電位[MMN: 脳波]）を評価するために、聴覚性 multi-feature oddball 課題として、標準音（70%）に対して duration・pitch・omission の 3 種類（各 10%ずつ）の偏奇音を提示し、課題実施中の脳波を 64 チャネル脳波計を用いて測定し、各偏奇音に対する加算平均誘発波形から標準音に対する加算平均誘発波形を減算した後、MMN ならびに P3a を評価し、eLORETA (exact low resolution brain electromagnetic tomography) 法を用いて電位源を推定した。糞便・唾液内細菌叢では、採取した糞便・唾液検体で 16S rRNA 配列(細菌叢)解析を行い、菌種(OTU)組成情報を得、多様性解析を行った。これらの指標において、ASD 児と定型発達児とで群間比較し、さらに生理学的指標と臨床指標との関連についても検討した。

なお、本研究課題で行った研究は全て臨床研究に関する倫理指針及びヘルシンキ宣言の指針に基づく手続きを遵守し、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得ており、平成 29 年 2 月 28 日一部改正後の「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」にも対応できている。全ての被験者およびその保護者に対して研究の目的及び内容を十分に説明し書面によるインフォームド・コンセントを得て行われた。これまで倫理的な問題は特に生じていない。

結果

小さな聴覚刺激に対する ASR の大きさなどの ASR の指標は、ASD 特性や情緒・行動上の問題に,加え、感覚の問題[1]、適応行動の低さ[2] やアクチグラフで評価した身体活動動態[3]と関連し、アクチグラフで評価した身体活動動態は ASD 特性とも関連[4]した。また、小さな聴覚刺激に対する ASR の大きさや ASR のピークの潜時は、糞便・唾液内の様々な細菌叢とも関連した。腸内・口腔内細菌に関する研究では、糞便や唾液細菌叢中の組成が、児童の自閉症特性や情緒・行動上の問題、感覚特性と関連する結果を得つつある。

開眼安静時の脳波 α 帯域の電位源は、心の理論に関与すると考えられる右縁上回を中心とする側頭頭頂接合部において、定型発達児に比べ、ASD 児で更新していた。さらに、pitch- oddball MMN の右下前頭回における電位源の大きさは、SDQ total score で評価した情緒・行動上の問題と負の相関を認めた。また時間・空間分解能に優れる脳磁計を用いて評価した聴性定常ガンマ律動の同期の側性も、SDQ total score で評価した情緒・行動上の問題と負の相関を認めた。

考察

低次知覚処理を反映するASRや開眼時脳波、聴覚性前注意的弁別処理、聴性定常ガンマ律動、アクチグラフで評価された身体活動動態および腸内・口腔内細菌叢の菌種がASDや併存する行動上の問題と関連する生物学的マーカーになる可能性が考えられた。

特にASD児に認める聴覚過敏性など低次知覚処理の非定型性を反映するASRの指標は、ASDの自閉症特性や感覚の問題、感覚の問題や行動上オ問題、適応行動など重要な臨床指標と関連するエンドフェノタイプ候補と考えられた。これらの知見、およびASRを用いたASD研究の今後の方向性に関して英文総説[5]や和文総説[6]にまとめた。聴覚過敏などの特性が強い児童では生活場面での音環境保全が重要であり、学校の教室や保育園の室内における音環境調査を建築音響工学や教育関係者等と連携し、教室内音環境調査を行い、音環境保全の重要性について国内学会や和文総説[7, 8]で報告した。これらの成果をもとに、感覚過敏に対する社会的な取組（sensory friendlyな取組）の日本での普及に関わり、川崎市において我国初のスーパーマーケットでのクワイエット・アワー、サッカー競技場でのsensory friendly roomが実施できた[9]。糞便や唾液細菌叢に関しては、今後詳細な解析を行いASDの臨床特性に影響する細菌叢を同定し、菌種の組成と食品接種状況との関連についても解析することで、ASDの臨床特性を改善する食生活や薬剤の開発につなげる可能性が考えられる。

今後は、被験者を多施設・多地域で募り、ASRを中心に脳波・脳磁図などの神経生理学的指標や被験者の腸内・口腔内細菌やアクチグラフによる身体活動動態など基礎研究に応用しやすい臨床指標の発達的変化を多次元的・総合的に評価し、マーモセットなどの動物で類似の指標を得て、発達過程におけるASDの病態メカニズムの変遷、ならびに併存精神障害の発症や介入時期の予測への応用について検討することで、ASDの聴覚特性や併存精神障害への有効な支援法の開発につながると考えらえる。

結論

ASDや併存する行動上の問題と関連する生物学的マーカーとして、低次知覚処理を反映するASRや開眼時脳波、聴覚性前注意的弁別処理、聴性定常ガンマ律動、アクチグラフで評価された身体活動動態および腸内・口腔内細菌叢の菌種のような基礎研究に応用しやすい指標をマーモセットなどの動物に応用することで、ASDの感覚特性や併存精神障害への有効な支援法の開発につながると考えらえた。

脳画像とゲノム解析の応用による社会的コミュニケーションの障害の治療薬開発

山末英典
浜松医科大学　精神医学講座

緒言　自閉スペクトラム症（ASD）は、100 人に 1 人の頻度で認められる発達障害で、社会的コミュニケーションの障害などの中核症状の治療法が未確立で、巨大な Unmet Medical Needs として、当事者や家族さらには社会全体にも大きな負担となっている。これに対して分担者は、H26-H28 年に責任研究者として、ASD に対するオキシトシン経鼻剤の世界初の多施設検証的自主臨床試験となった Japanese Oxytocin Independent Trial (JOIN-Trial)など、繰り返し自主臨床試験を行なってきた (JAMA psychiatry 2014; Mol Psychiatry 2014; 2918a, 2018b; Brain 2014; 2015; 2019 など)。一方、社会行動におけるオキシトシンとセロトニン（Nature 501:179-186,2013 など）やドパミン（Neuron 95:368-384,2017 など）の相互作用の重要性は、動物実験で繰り返し指摘されているが、ヒトでの知見は乏しい。

本研究は、オキシトシンによる ASD 中核症状改善過程における他の分子の関与を明らかにすることを研究目的とした。

方法　分担者が責任研究者として行なった、多施設無作為割付のプラセボ対照二重盲検並行群間デザインの検証的臨床試験である JOIN-Trial に参加した 106 名の成人で高機能の男性 ASD 当事者から、投薬開始直前と 6 週間の投薬期間の最終投薬から 1 時間後に収集した血漿検体について、網羅的な代謝物濃度測定を行なった(CE-TOFMS, Agilent Technologies, Santa Clara,CA, USA)。投薬内容は、オキシトシン経鼻剤 48 単位またはプラセボであった。

結果　定量に成功した 35 の代謝物について解析を行なったところ、オキシトシン投与前後では、プラセボ投与前後に比べて、N,N-dimethylglycine (DMG)濃度の有意な上昇が認められた(P_{FDR}=0.043, d=0.74, N=83)。さらに、分担者らが見出していたオキシトシン反復投与による効果減弱（Brain 2019）との関係を検討するために、オキシトシン投与を受けた参加者の中でも顕著に一旦発現した効果の減弱を示した 20 名を抽出して検討すると、やはり DMG 濃度について、プラセボ投与に比べた有意な上昇をより大きな効果量で認めた(P_{FDR} = 0.004, d=1.13, N=60)。さらに、この DMG 上昇と臨床試験におけるオキシトシン投与による臨床的改善との関係を検討すると、DMG 濃度上昇が顕著であった参加者ほど、投与開始後 2 週間での臨床的改善（対人場面での定量解析した中立表情の変動の乏しさという ASD 的表情特徴の減少）も顕著であった(P_{FDR} =0.006, r=-0.485, N=43)。一方で、DMG 濃度上昇が顕著であった参加者ほど、投与開始後 2 週から 4 週の間においては、臨床効果の減弱も顕著であるという相関を認めた(P_{FDR} =0.033, r=0.415, N=37)。しかし、DMG 濃度上昇は、6 週間の全投与期間における臨床的改善とは、いずれの指標でも相関を認めなかった(P_{FDR}>0.62)。

考察　DMG はグリシンの誘導体であり、NMDA 受容体を調整している可能性がある。DMG などの NMDA 受容性のグリシン結合部位の作動薬には、ASD も含めて様々な向精神作用が報告されている。

分担者らの先行研究（Molecular Psychiatry 2018）も含めて、オキシトシン作用と神経可塑性や NMDA 受容体の関連については報告が散見されている。

本研究結果は、ASD 当事者におけるオキシトシン反復投与による効果減弱過程に、NMDA 受容体に関連する生化学的変化が関与することを初めて示したものである。

結論　本研究結果から、DMG 濃度上昇は、オキシトシンの反復投与に伴う効果減弱過程と関連することが示された。分担者らの先行報告（Molecular Psychiatry 2018）と合わせても、オキシトシン反復投与に伴う効果減弱過程には、NMDA 受容体や神経可塑性が関与していることが支持された。本研究結果によって、オキシトシンによる臨床効果発現メカニズムの解明が促進され、より改良された最適な治療方法の開発が期待される。

29－6

Translational Research for developing of therapy of developmental disorder

Noritaka Ichinohe
National Institute of Neurological and Psychiatry

Autism spectrum disorder (ASD) is one of the most common developmental diseases and can be defined by the disorder of social communication, fixated or restricted behaviors, and high sensitivity. This project team performs translational research for ASD combining both pre-clinical marmoset-model and clinical researches. In 3 years of this project, marmoset model group has performed gene-expression analysis of brains from developing model animal. Study showed that markers for myelination and oligodendrocyte were down-regulated and markers for astrocyte and microglia were up-regulated. These results were consistent with reduction of fraction anisotropy and inclement of inflammatory-related biomarker in brains from patients with ASD. Animal model group also developed the quasi-non-invasive methods. These are comparable to non-invasive methods used for diagnosis and assay of therapeutic effects of patients with ASD. The developed methods were intrinsic optical imaging, comparable to fMRI in human, high density cortical wide ECoG, comparable to EEG and MEG in human, DTI for marmoset and human, and higher social test, comparable to human behavior score. Similar methods were used by clinical group, and this group provided data related to diagnostic efficacy of these methods for patients with ASD. Marmoset group and clinical group have proceeded with this project by collaborating with each other.

２　年　度　班

30-1　精神疾患の NVS（negative valence system）に対する治療法の開発

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター
中込和幸

総括研究報告書

1.　研究目的

米国 NIMH で進められている Research Domain Criteria（RDoC）の研究フレームをもとに、5 つの機能ドメインのうち、Negative Valence Systems（NVS：不快の感情価：恐怖、不安、喪失感など）に焦点を絞り、統合失調症、気分障害、不安障害患者を対象に臨床評価（臨床症状、動機づけ、社会機能、QOL）、脳画像（NIRS、MRI）、生体サンプル（血液、髄液）情報を採取し、NVS の臨床評価系を確立し、関連するバイオマーカーを探索する。候補バイオマーカーを抽出後、動物モデルを用いて得られた創薬候補化合物の臨床応用可能性を探索する。

2.　研究組織

主任研究者

中込和幸　国立精神・神経医療研究センター

分担研究者

功刀　浩　国立精神・神経医療研究センター

山田光彦　国立精神・神経医療研究センター

住吉太幹　国立精神・神経医療研究センター

野田隆政　国立精神・神経医療研究センター

3.　研究成果

a. 情動神経回路の中で、眼窩面前頭前皮質（OFC）から扁桃体外側基底核（BLA）に投射する神経回路に注目し、マウスのオプトジェネティクスおよびケモジェネティクスを利用した解析を進めている。ストレスによりマウスの OFC-BLA 回路においてカルシウム透過性 AMPA 型グルタミン酸受容体のポストシナプスへの動員が引き起こされ、これがストレスによる行動変化の一因となることを明らかにした。また、NVS と関連する心理的ストレスに特化した慢性社会的敗北ストレスマウスモデルを確立した。さらに、健常人や精神疾患患者の脳脊髄液や血漿を用い世界で初めてリゾフォスファチジン酸を定量し、新規バイオマーカーとしての臨床応用可能性を探索した。

b. NVS と関連する候補分子としてストレス応答で重要な役割を果たす CRH について検討したところ、慢性統合失調症患者のうち陰性症状が強い患者では CRH が低下していることを見出した。さらに、抗うつ薬を服薬しているうつ病患者において CRH は健常者よりむしろ低下しており、セロトニン代謝産物と正の相関を示した。すなわち、抗うつ薬によるセロトニンのダウンレギュレーション効果と比例して CRH が低下している可能性が考えられる。

以前に本研究班において過去の文献を精査し、CSF 中のモノアミン代謝産物に関するメタアナリシスを行い、未投薬大うつ病患者の CSF においてドパミン代謝産物である HVA の低下があることを報告したが、その後、CSF 中のモノアミン代謝産物との関連をみた結果、HVA は意欲、性機能などとの関連が強いことがわかった。

さらに、CSF 中の炎症関連分子に関する検討を行い、IFN-β が疾患横断的に高いことを見出した。

c. 経頭蓋直流刺激（tDCS）の治療法としての可能性に関する検証を目的として、統合失調症患者の認知機能改善効果を、これまで報告されてきた研究データのメタ解析に基づき検証した。その結果、ワーキングメモリーにおいて有意な効果が示され（SMD = 0.49, 95%信頼区間 = 0.16-0.83）、重大な効果の不均一性は見られなかった（$p = 0.10$, $I^2 = 39\%$）。一方、言語学習記憶、処理速度、注意と警戒、視覚学習、推論と問題解決への効果については、有意には到らなかった。

d. 髄液採取（CSF）・神経画像検査（MRI、NIRS）・臨床評価を組み合わせたサンプル数が 163 例に達した。うち、CSF が採取できた者は 96 例、MRI が 152 例、NIRS が 161 例であった。また、診断別には大うつ病性障害 69 例、双極性

障害、統合失調症がそれぞれ 33 名、その他 28 例である。NVS に関連する臨床評価を用いて因子分析を行い、3 因子が抽出された（F1：不安・抑うつ F2：衝動性、F3：内発的動機づけ)。F1、F2 は社会適応度、自閉症傾向、QOL、遂行機能、F3 は社会適応度とそれぞれ有意な相関が認められた。また、CSF 中のサイトカインとの関係については、F3 と TNF superfamily との間に有意な負の相関が認められ、内発的動機づけが慢性炎症から生じる免疫反応と関連する可能性が示唆された。さらに、NIRS データとの関連については、F1 と VLPFC の CH19 の重心値との間に有意な負の相関が認められた。すなわち、抑うつ・不安が強いほど、NIRS 反応のピークが早まるということです。

Negative Valence Systems の臨床指標と認知機能、社会機能、QOL との関連性について

国立精神・神経医療研究センター
中込　和幸

緒言

米国 NIMH で進められている NIMH Research Domain Criteria（RDoC）の研究フレームをもとに、5 つの機能ドメインのうち、Negative Valence Systems（NVS、不快の感情価：恐怖、不安、喪失感など）に焦点を絞り、統合失調症、気分障害患者を対象に臨床評価（症状、社会認知、社会機能・適応度）、脳画像（NIRS、MRI）、生体サンプル（血液、髄液）情報を採取し、機能ドメインに関連するバイオマーカーを探索し、新規治療法の開発につなげることを目的とする。

当分担研究課題では、NVS と認知機能、社会機能・適応度、QOL との関連を検証することを目的とする。NVS の評価に用いる尺度について、気分症状、不安症状、衝動性、動機づけに関して、疾患横断的に使用可能なものを選択し、神経認知、社会認知、QOL、社会機能・適応度の評価尺度、血液、髄液、脳画像等の生物学的指標と合わせて前向きにデータの採集を行った 2019 年 12 月末までに収集された 163 名のデータを用いて中間解析を行った。

方法

NVS の評価に用いた尺度は下記のとおりである。

a) 気分症状：MADRS

b) 不安症状：STAI-S、STAI-T

c) 衝動性：BIS（Barratt Impulsiveness Scale）11（運動的衝動傾向、非計画的衝動傾向）

d) 動機づけ：GCOS（自律志向性、コントロール志向性、動機づけ喪失志向性）

e) レジリエンス：RS（Resilience Scale）

その他の尺度は下記のとおりである。

f) 神経認知：BACS（Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia）、WCST（Wisconsin Card Sorting Test）、

g) 社会認知：SCSQ（Social Cognition Screening Questionnaire）、AQ（Autism Spectrum Quotient）

h) QOL：SF-12

i) 社会機能・適応度：UPSA-B（UCSD Performance-based Skills Assessment-Brief）、SASS（Social Adaptation Self-evaluation Scale）-J（自記式社会適応度評価尺度）

対象は 163 名の精神疾患患者（大うつ病 69 名、双極性障害 33 名、統合失調症 33 名、その他 28 名）が参加し、そのうち 96 名から髄液データが採取された（MRI：152 名、NIRS：161 名）。

結果

気分症状、不安症状、衝動性、動機づけ、レジリエンスに関する臨床指標を用いて主成分分析を行ったところ、3 因子（F1：不安・抑うつ； MADRS、STAI-T、RS、F2：衝動性； BIS11 運動的衝動傾向、非計画的衝動傾向、F3：内発的動機づけ； GCOS_自律志向性_）が抽出された。その他の臨床指標との関連性を検討したところ、F1 は社会適応度（SASS-J）、QOL（SF-12）、社会認知（AQ、SCSQ メタ認知）、F2 は社会適応度（SASS-J）、社会認知（AQ）、神経認知（WCST カテゴリー数）、F3 は社会適応度（SASS-J）との関連性が見出された。

髄液中のサイトカインとの関連性については、F2 は髄液中 IL-11 濃度と負の相関（R=-0.30, P=0.0065, n=79）、F3 は TNF ファミリー（TNF-R1：R=-0.40, P=0.0003, n=79; TNF-R2：R=-0.40, P=0.0003, n=79; TWEAK/TNFSF12：R=-0.33, P=0.0029, n=79; APRIL/TNFSF13：R=-0.31, P=0.0055, n=79;BAFF/TNFSF13B：R=-0.30, P=0.0084, n=79）と負の相関を示した。

考察

NVS に関連する臨床評価指標の主成分分析の結果、3 因子が抽出され、不安・抑うつ、衝動性、内発的動機づけ、を表すものと考えられた。また、不安・抑うつは情動的側面を反映し、先行研究と一致して QOL と関連が強いことが示唆された。さらに衝動性と社会認知（AQ）、遂行機能（WCST）と関連があることは ASD（Autism Spectrum Disorder）に見られる衝動性抑制の困難さ、前頭葉機能の障害による情動抑制機能の低下を反映したものと捉えられる。内発的動機づけが社会適応度

(SASS)と関連が認められたことは、内発的動機づけが社会適応のために重要な要因であることを示しており、各指標の構成概念妥当性は一定程度満たされていると思われる。
また、内発的動機づけが慢性炎症によって生じる免疫反応と関連する可能性が示唆された。今後は、これまでに得られた健常者サンプルにおいて、同サイトカイン濃度を計測し、患者群との比較を行い、動機づけの病態との関連を更に検証を進める。

結論

163 名のデータを用いて NVS に関連する臨床指標として、不安・抑うつ、衝動性、内発的動機づけの 3 要素を抽出した。それぞれ、社会機能や QOL との関連性において先行研究と矛盾しない結果が得られ、一定の妥当性を持つことが明らかにされた。内発的動機づけと免疫反応との関連が示唆された。

参考文献

1) Insel, T., Cuthbert, B., Garvey, M., et al.: Research domain criteria (RDoC): toward a new classification framework for research on mental disorders. Am J Psychiatry, 167(7); 748-751, 2010.

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経医療研究センター

氏　　名 中込　和幸

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
Validation of the MUSIC Model of Motivation Inventory for use with cognitive training for schizophrenia spectrum disorders: A multinational study.	Schizophr Res.	206	2019 Apr

Negative valence に関する脳内分子動態の解明と治療法開発

【氏　　名】功刀浩
【所属施設】国立精神・神経医療研究センター・神経研究所　疾病研究第3部

緒言

本研究は、脳の病態を反映する脳脊髄液を多数収集し、バイオマーカーを開発することを目的とする。精神疾患の脳脊髄液を多数収集した研究施設は我が国には殆どなく、世界的にみても貴重である。タンパク、代謝産物などについて最先端の手法を用いて解析し、分子動態を明らかにするとともにバイオマーカーを指標とした新たな治療法開発を行うことを最終目標とする。特に、統合失調症や気分障害における不安、抑うつなどの negative valence と関連する脳内マーカーを起点として、新しい治療法の開発を行う。これまでにうつ病の注目される分子として脳脊髄液中のフィブリノーゲンの高値やエタノールアミンの低値、Neural cell adhesion molecule (NCAM)の低値について報告し、治療薬開発のための前臨床的検討を行っている。

方法

大うつ病患者、統合失調症患者、双極性障害患者、健常者を対象に脳脊髄液、血液、生理学的指標などを実施し、バイオマーカー探索した。今年度は negative valence との関連が深い候補分子として CRH、モノアミン代謝産物、炎症性サイトカインなどに注目して検討した。モノアミン代謝産物に関する過去の文献のメタアナリシスも行った。

結果と考察

①今年度中に脳脊髄液 109 検体を収集した（統合失調症 19、大うつ病性障害 13、双極性障害 29、健常者 22、その他 26)。これは今後、精神疾患の病態解明を行う上で貴重な試料となる。

② 不安、抑うつなどの negative valence と関連する候補分子としてストレス応答で重要な役割を果たす視床下部—下垂体—副腎系の司令となる CRH について検討したところ、慢性統合失調症患者のうち陰性症状が強い患者では CRH が低下していることを見出した(Ishiwata et al, 2020)。CRH の低下は統合失調症の欠陥状態の１つの要因として働いている可能性が示唆された。さらに、抗うつ薬を服薬しているうつ病患者において CRH は健常者よりむしろ低下しており、セロトニン代謝産物と正の相関を示した。すなわち、抗うつ薬によるセロトニンのダウンレギュレーション効果と比例して CRH が低下している可能性が考えられる。

③以前に本研究班において過去の文献を精査し、CSF 中のモノアミン代謝産物に関するメタアナリシスを行い、未投薬患者の CSF においてドパミン代謝産物である HVA の低下があるが、セロトニン代謝産物 5-HIAA やノルアドレナリン代謝産物 MHPG は健常者と比較して有意差がないことを報告したが(Ogawa et al, 2018)、ほぼ同時期にデンマークの研究者によって、HVA に関するエビデンスが乏しいという結果が報告された(Pech et al, 2018)。そこで、この Pech らの方法を詳細に検討したところ、研究データの選択に偏りがあることを見出し、われわれが再解析したところ、やはり、CSF 中の HVA は大うつ病性障害の一部で低下していることは間違いないと結論された(Ogawa et al, 2019)。その後、CSF 中のモノアミン代謝産物とうつ病症状との関連をみた結果、HVA は意欲、性機能などとの関連が強いことがわかった（論文準備中)。

④CSF 中の炎症関連分子に関する検討を行い、IFN-β が疾患横断的に高いことを見出した（論文準備中)

結論

本年度もこれまでに継続して CSF 検体収集が進んだ。CSF 中の CRH が統合失調症の陰性症状や、抗うつ薬と関連することを見出した。うつ病における HVA の低下や IFN-β の上昇をさらに確認した。

参考文献

Ishiwata S et al: Lower Cerebrospinal Fluid CRH Concentration in Chronic Schizophrenia With Negative Symptoms. J Psychiatr Res 2020;127:13-19.

Ogawa S et al. Cerebrospinal fluid monoamine metabolite concentrations in depressive disorder: A meta-analysis of historic evidence. J Psychiatr Res. 2018; 105: 137-146.

Pech J et al. Poor evidence for putative abnormalities in cerebrospinal fluid neurotransmitters in patients with depression versus healthy non-psychiatric individuals: A systematic review and meta-analyses of 23 studies. J Affect Disord. 2018 Nov;240:6-16.

Ogawa S, Kunugi H. Evidence for reduced homovanillic acid (HVA) in the cerebrospinal fluid of patients with depression. J Affect Disord. 2019; 255: S0165-0327(18)33267-1.

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 NCNP 疾病三部

氏　　名 功刀　浩

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
Lower cerebrospinal fluid CRH concentration in chronic schizophrenia with negative symptoms.	J Psychiatr Res	127	2020 Aug
Possible associations between plasma fibroblast growth factor 21 levels and cognition in bipolar disorder.	Neuropsychopharmacol Rep	In press	2020 Apr.
Comparison of physiological and behavioral responses to chronic restraint stress between C57BL/6J and BALB/c mice.	BBRC	In press	2020 Feb
Altered ethanolamine plasmalogen and phosphatidylethanolamine levels in blood plasma of patients with bipolar disorder.	Psychiatry Clin Neurosci	74(3)	2020 Mar
Proinflammatory status-stratified blood transcriptome profiling of civilian women with PTSD.	Psychoneuroendocrinol	111	2020 Jan
Structural brain network correlated with the resilience to traumatic events in the healthy participants: An MRI study on healthy people in a stricken area of the Great East Japan Earthquake.	Psychol Trauma.	In press	2019 Oct
Reduced plasma orexin-A levels in patients with bipolar disorder.	Neuropsychiatr Dis Treat	15	2019 Aug
Altered polyunsaturated fatty acid levels in relation to proinflammatory cytokines, fatty acid desaturase genotype, and diet in bipolar disorder	Transl Psychiatry	9(1)	2019 Aug
Possible association between photic sneeze syndrome and migraine and psychological distress.	Neuropsychopharmacol Rep	39(3)	2019 Sep

Lysophosphatidic acid levels in cerebrospinal fluid and plasma samples in patients with major depressive disorder	Heliyon	5(5)	2019 May
Reduced Serum and Cerebrospinal Fluid Levels of Autotaxin in Major Depressive Disorder.	Int J Neuropsychopharmacol.	22(4)	2019 Apr
Evidence for reduced homovanillic acid (HVA) in the cerebrospinal fluid of patients with depression	J Affect Disord	25	2019 Aug

分担研究報告書

（課題名）Negative Valence Systems にかかる神経回路特性に基づく新規向精神薬の研究開発

（所属）国立精神･神経医療研究センター精神保健研究所精神薬理研究部

（氏名）山田光彦

緒言

疾患横断的な機能ドメインの一つとして提唱されている Negative Valence Systems（NVS）及び関連する神経回路に焦点を絞り、非臨床ステージにおける創薬研究を中心とした新規治療法の研究開発を行う分担研究課題である。

方法

１．ストレスによる OFC-BLA 回路のシナプス特性の変化についての検討

情動神経回路に注目し、マウスのオプトジェネティクスおよびケモジェネティクスを利用した解析を詳細に検討した。

２．構成概念妥当性及び治療効果の予測妥当性の十分な動物モデルの開発

心理的苦痛にのみ繰り返し曝露する社会的敗北ストレス負荷モデル改変版を確率した。さらに、NVS が関わるストレス関連精神疾患ににおいて注目されている神経免疫相関に着目し、サイトカイン、ケモカインについて探索を進めた。

３．新規バイオマーカーの探索

健常人や患者の脳脊髄液や血漿を対象に、脂質メディエーターであるリゾフォスファチジン酸を定量し、新規バイオマーカーとしての臨床応用可能性を探索した。

４．大うつ病の診断性能についてのシステマティックレビューの手法を用いた検討

DEPRESSD Collaboration（マクギル大学）に参画し Patient Health Questionnaire-9（PHQ-9）の診断性能について、IPD データを用いたシステマティックメタアナリシスの手法により検討した。

結果と考察

１．ストレスによりマウスの眼窩前頭皮質-基底外側核回路においてカルシウム透過性 AMPA 型グルタミン酸受容体のポストシナプスへの動員が引き起こされ、これがストレスによる行動変化の一因となることが明らかとなった。本成果は、ストレスと関連する様々な精神疾患の病態解明や新規治療法開発につながるものである。NCNP 病院では、AMPA 受容体リガンドを用いた PET 研究が進んでいるが、脳画像研究から得られた仮説を検証するためには、実験動物を利用したオプトジェネティクス及びケモジェネティクスによる神経回路研究が必須となる。臨床研究から得られる知見を分子レベルで支える貴重な病態研究モデルとなればと期待される。

２．他個体の社会的敗北ストレス場面の目撃を利用した新しいタイプのストレスモデルを確立し、心理的ストレスの報酬系（人間では意欲低下や喜びの喪失といった精神症状と関連が深い）への強い影響を報告した（参考文献 4)。このモデルは、ストレス負荷時に痛みや外傷等を伴わない点で構成概念妥当性に優

れた心理的ストレスモデルとなる。本研究は、第 6 回アジア神経精神薬理学会において高く評価され、中武優子研究員が Late Breaking Abstract Award を受賞した。

３．マウスを用いた先行研究で不安との関連を報告していたリゾフォスファチジン酸について、うつ病患者の脳脊髄液及び血漿中濃度を世界で初めて定量解析した（参考文献 2）。研究班では、慢性心理的ストレス動物モデルを確立し、血漿サンプルにおける炎症性バイオマーカーの変化を既に報告している。NCNP で収集された患者サンプルと共通するマーカーは中間表現形として NVS 研究に利用できる可能性が高いと考えられる。

４．適格基準を満たした 58/72 報の論文を対象に、個別データ（対象症例数：17,357、大うつ病患者：2,312）が収集された。主要解析の結果（参考文献 1）に加えて、複数の二次解析結果を公開することができた（参考文献 3, 5, 6）。研究班では、NVS を評価するための診断尺度の開発を進めており、その中核症状として NVS が重要となる大うつ病についての診断尺度の性能評価は重要な知見となる。

結論

気分障害、不安障害等の NVS が関わる精神障害は、既存の向精神薬では十分な治療効果が得られず、既存薬と異なる作用機序と優位性を備えた新規治療薬の開発が望まれている。これら候補化合物の臨床開発可能性を検討するため、さらに詳細な検討を進め、非臨床レベルでの POC/POM を確立する必要がある。

参考文献（業績）

1. Levis B, et al. Accuracy of Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) for screening to detect major depression: individual participant data meta-analysis. BMJ 365: l1476, 2019.
2. Gotoh L, et al. Lysophosphatidic acid levels in cerebrospinal fluid and plasma samples in patients with major depressive disorder. Heliyon 5 (5): e01699, 2019.
3. Wu Y, et al. Equivalency of the diagnostic accuracy of the PHQ-8 and PHQ-9: a systematic review and individual participant data meta-analysis. Psychol Med, ePub, 2019.
4. Nakatake Y et al. The effects of emotional stress are not identical to those of physical stress in mouse model of social defeat stress. Neurosci Res ePub, 2019.
5. He C, et al. The Accuracy of the Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) Algorithm for Screening to Detect Major Depression: An Individual Participant Data Meta-analysis. Psychother Psychosom 89: 25–37, 2020.
6. McGrath S, et al. Estimating the sample mean and standard deviation from commonly reported quantiles in meta-analysis. Stat Methods Med Res ePub, 2020.

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設　精神薬理研究部

氏　　名　山田　光彦

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
Probability of major depression diagnostic classification using semi-structured versus fully structured diagnostic interviews.	Br J Psychiat	212(6)	2018/6 未報告分
Accuracy of Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) for screening to detect major depression: individual participant data meta-analysis	BMJ	36	2019/4
Lysophosphatidic acid levels in cerebrospinal fluid and plasma samples in patients with major depressive disorder	Heliyon	5 (5)	2019/5
Equivalency of the diagnostic accuracy of the PHQ-8 and PHQ-9: a systematic review and individual participant data meta-analysis. Psychological Medicine	Psychol Med	ePub	2019/7
The effects of emotional stress are not identical to those of physical stress in mouse model of social defeat stress	Neurosci Res	ePub	2019/10
The Accuracy of the Patient Health Questionnaire-9 (PHQ-9) Algorithm for Screening to Detect Major Depression: An Individual Participant Data Meta-analysis	Psychother Psychosom	89 (1)	2020/1
Estimating the sample mean and standard deviation from commonly reported quantiles in meta-analysis	Stat Methods Med Res	ePub	2020/1

Negative Valence Systems を対象とした治療法創出と臨床評価法に関する研究

【氏　名】住吉　太幹
【所属施設】国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所 児童・予防精神医学研究部

緒言

統合失調症、気分障害などの疾患単位は、これまで操作的診断基準により区分され、それぞれに対応する治療法の開発が試みられてきた。一方、複数の精神疾患に共通する症状（不安、恐怖など）に同一の治療法が有効であることを示すエビデンスが多く存在する。以上より、疾患横断的な機能ドメインを標的とした治療法の開発が、患者の機能的予後改善により有効と推定され、それに資する臨床評価法の整備が必要である。米国 NIMH Research Domain Criteria (RDoC) で提唱されている Negative Valence System(NVS)（不安、喪失感など）に的を絞り、関連する精神症状および神経・社会認知機能、社会機能、QOL などの評価を統合失調症や気分障害を対象に行う。このように疾患横断的に得られた臨床症状と、他の分担研究者が施行する脳機能などの生物学的指標から得られたデータとの関連を検討する。また、ニューロモデュレーションなどを用いた介入法の効果を検討する。以上より、NVS を対象とした治療法創出と臨床評価法の確立を目指す。特に 2019 年度は、経頭蓋直流刺激（tDCS:ニューロモデュレーション）による統合失調症患者の認知機能改善効果を、これまで報告されてきた研究データのメタ解析に基づき検証した。

方法

解析の対象として、1) ランダム化比較試験、2) 統合失調症および統合失調感情障害をターゲットにしていること、3) 前頭前野への複数セッションの tDCS の効果を調べていること、4) 認知機能への効果を十分なデータで報告していること、5) 英語で執筆されている論文とした。PubMed, EMBASE, PsychINFO, Web of Science の 4 つのデータベースを調査した。効果量の評価はランダム効果モデルにおける Hedges' g を用いた。305 本の論文が条件に一致し、うち重複を省いた 195 本に対してスクリーニングを行った。これらのうち、9 本が本研究の条件に一致し、tDCS 刺激群 133 名および偽刺激群 137 名の計 270 名が組み込まれた。解析の対象となった被験者の平均年齢は 41.2 歳で、32.6%が女性だった。6 本の研究では統合失調感情障害の患者が含まれていた。tDCS のモンタージュとしては 3 パターン：(1) F3 と FP1 の間/T3 と P3 の間、(2) F3/F4、(3) F3/FP2 が用いられていた。電流の強度としては 2 mA が主に用いられており、介入時間は 20-30 分だった。

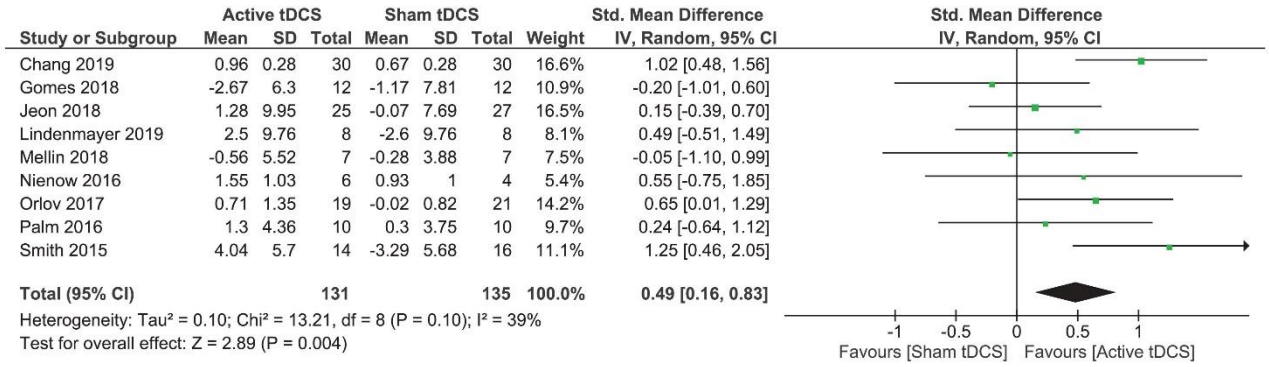
結果

メタ解析の対象となった認知機能領域のうち、ワーキングメモリーにおいて有意な効果（効果量約 0.5）が示され（SMD = 0.49, 95%信頼区間 = 0.16-0.83）、重大な効果の不均一性は見られなかった（$p = 0.10$, $I^2 = 39\%$）（図、次項）。一方、言語学習記憶、処理速度、注意と警戒、視覚学習、推論と問題解決への効果については、有意には到らなかった。一つ一つの研究を除外した感度分析では、効果は大きく変化しなかった。メタ回帰でも統合失調感情障害の診断、サンプルサイズ、年齢、モンタージュ、電流の強度、セッション数、総刺激時間によって効果量は大きく変化しなかった。また、出版バイアスは示唆されなかった。

考察

tDCS の統合失調症患者のワーキングメモリーへの中等度の改善効果は、感度分析やメタ回帰の結果からも妥当性が高いと考えられる。ワーキングメモリーの低下には前頭前野が重要な役割を果たすとされ、実際に TMS を用いた介入のメタアナリシスでも、ワーキングメモリー特異的に効果が示されている。その作用機序として、GABA 神経系およびグルタミン酸神経系のシナプス伝達の修飾などが挙げられる。また tDCS はアストロサイトの Ca^{2+}シグナルを修飾し、さらに同シグナルはワーキングメモリーに関与することも、神経生物学的な作用機序として挙げられる。今回のメタ解析で、他の認知機能領域で有意な効果を認めなかった原因として、効果の不均一性が小さいことより、用いたサンプルサイズによる検出力の不足が考えられる。

（図）統合失調症患者のワーキングメモリーへの tDCS の効果



結論

統合失調症の認知機能障害は患者の機能的転帰に重要であるにも関わらず、その治療法に関するエビデンスは限られている。ゆえに、本稿で紹介したような tDCS の効果に関する最近の知見は臨床的に意義深いと考える。さらなる臨床研究データの蓄積が期待されるとともに、tDCS の効果を予測する簡便な生体指標の探索も、今後の課題となろう。加えて、本稿で扱った神経認知機能以外の種類の認知機能も、tDCS をはじめとするニューロモデュレーションの対象となることが期待される。

参考文献

1. 住吉太幹：統合失調症における認知機能障害. 臨床精神医学 42(12)：1461-1467, 2013.

2. Yokoi Y, Narita Z, Sumiyoshi T. Transcranial Direct Current Stimulation in Depression and Psychosis: A Systematic Review. *Clin EEG Neurosci.* 2018; 49: 93-102.

3. Narita Z, Inagawa T, Sueyoshi K et al. Possible Facilitative Effects of Repeated Anodal Transcranial Direct Current Stimulation on Functional Outcome 1 Month Later in Schizophrenia: An Open Trial. *Front Psychiatry*. doi: 10.3389/fpsyt.2017.00184.

4. Narita Z, Stickley A, DeVylder J et al. Effect of multi-session prefrontal transcranial direct current stimulation on cognition in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res.* 2020; 216:367-373

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所 児童・予防精神医学研究部

氏　　名 住吉 太幹

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
Effect of multi-session prefrontal transcranial direct current stimulation on cognition in schizophrenia: A systematic review and meta-analysis.	Schizophr Res.	216:367- 373	2020;
Meta-Analysis of the Effect of Multisession Transcranial Direct Current Stimulation on Cognition in Dementia and Mild Cognitive Impairment.	Clin EEG Neurosci.	50:273-282	2019
Social Cognition Deficits as a Target of Early Intervention for Psychoses: A Systematic Review	Front Psychiatry	doi: 10.3389/fpsyt.2019.00333	2019

Negative Valence Systems の治療法開発に寄与する関連バイオマーカーの同定

野田　隆政
国立精神･神経医療研究センター病院

緒言

精神疾患の臨床診断は患者の主観的な訴えと医師の問診によりなされているのが現状である。精神疾患の診断を補助する客観的指標（バイオマーカー）は古くから探索されているが、現時点で実臨床に応用できるものはほとんど存在しない。

本研究では、米国 NIMH で進められている NIMH Research Domain Criteria（RDoC）の研究フレームをもとに、5 つの機能ドメインのうち、Negative Valence Systems（不快の感情価：恐怖、不安、喪失感など：NVS）に焦点を絞り、統合失調症、気分障害患者を対象に臨床評価（臨床症状、動機づけ、社会機能、QOL）、脳画像（NIRS、MRI、ERP）、生体サンプル（血液、髄液）情報を採取し、機能ドメインに関連するバイオマーカーの探索を行う。さらには生体資料から得られる機能ドメインバイオマーカーとの関連を調べ、大規模なデータから機械学習の手法を応用して検討する。また、電気けいれん療法(ECT)など治療介入前後においても同様の計測を行い、バイオマーカーを探索する。

方法

国立精神・神経医療研究センター病院において、統合失調症、うつ病、躁うつ病と診断され、受診もしくは入院している患者を対象に、研究趣旨を文書および口頭にて十分に説明を行い、同意を確認し、同意書に自署（未成年の場合は合わせて保護者による署名）を得る。本研究への参加に同意した対象者に対して、精神科的診察、生理検査、神経検査および各種心理検査を実施した。評価項目は以下の通りである。

・デモグラフィックデータ

性別、年齢、主診断、併存診断、罹病期間など患者情報

・検査項目

DTI、ASL、VSRAD advance などを用いた MRI 検査
近赤外線スペクトロスコピー（NIRS）による脳血流検査

* 髄液：髄液については、倫理審査承認済の「脳脊髄液を用いた統合失調症・気分障害の生物学的マーカーの開発（第二期）」研究に参加した場合のみ、そこで得られたデータを二次利用する。

* 血液：血液データについては、倫理審査承認済の「バイオバンク検体を用いた精神疾患バイオマーカーの探索」研究に参加した場合のみ、そこで得られたデータを二次利用する。

・心理検査項目：面接

1. DSM-4 Ⅰ軸障害診断構造化面接（Structured Clinical Interview for DSM-4-TR Axis Ⅰ Disorder）
2. 知的機能の簡易評価（Japanese Adult Reading Test：JART）
3. 陽性・陰性症状評価尺度（Positive and Negative Syndrome Scale：PANSS）
4. ハミルトンうつ病評価尺度（Hamilton's Rating Scale for Depression; HAM-D/HDS）
5. 日本語版モンゴメリー/アスベルグうつ病評価尺度（Montgomery- Åsberg Depression Rating Scale：MADRS）
6. 統合失調症認知機能簡易検査評価尺度日本語版（Brief Assessment of Cognition in Schizophrenia Japanese version (BACS-J)）
7. ウィスコンシンカードソーティングテスト
8. 心の状態推論質問紙（Social Cognition Screening Questionnaire：SCSQ）
9. UCSD 日常生活技能簡易評価尺度（UCSD Performance-based Skills Assessment：UPSA-B）
10. ヤング躁病評価尺度日本語版（Clinical Evaluation of Manic Disorders by Japanese version of Young Mania Rating Scale; YMRS-J）

・心理検査項目：質問紙調査

1.BPNSFS（Basic psychological need satisfaction, need frustration, and need strength）：自律性、関係性、能力の 3 領域における満足感、不満感に関する評価
2.一般的因果律志向性尺度（The General Causality Orientations Scale: GCOS）：外発的動機付け、内発的動機付け、動機付け欠如の 3 因子に関する評価
3. 自閉症スペクトラム指数（Autism-Spectrum Quotient：AQ）
4.状態・特性不安検査（State-Trait Anxiety Inventory: STAI）
5. 日本語版ベック抑うつ質問表第二版（Beck Depression Inventory: BDI-Ⅱ）
6. 日本語版自記式社会適応度評価尺度（Social

Self-Adaptation Evaluation Scale Japanese version：SASS-J）：対人関係、興味と好奇心、自己認識の 3 因子における社会的動機や行動を評価

7. 日本語版 BIS-11 （Barratt Impulsiveness Scale Japanese version：BIS-11）：衝動性の気質評価

8. レジリエンス評価尺度（Resilience Scale：RS）：ストレスや逆境への抵抗力に関する評価

9. SF12（SF-12® Health Survey）

結果

2020 年 3 月 15 日時点で、195 名の研究同意があった。NIRSおよびMRIデータは 192 名、髄液検査は 111 名の同意を得て実施した。SCID診断では、大うつ病性障害が 52.3%、統合失調症が 22.1%、双極性障害 18.5%、その他の疾患が 7.2%であった。

新たに NVS に関連する臨床指標を絞って因子を再解析し、抽出された 3 因子と光トポグラフィ検査（NIRS）との関連を検討したところ、疾患横断的に Factor1（うつ、敗北者信念）と NIRS の重心値が左右の背外側前頭前野領域で負の相関を示した（Fig.1）。さらに、QOL 指標と NIRS の積分値が右中側頭回、右背外側前頭前野、前頭極領域など広範に正の相関を示した（Fig.2）。

考察・結論

これまで、各疾患における NIRS の特徴は示されてきた（例えば、Pu，2018）先行研究の結果が、前頭極、左右背外側前頭前野といった共通の領域で疾患横断的に共通するパラメーターとなりうる可能性が示された。本研究において、NIRS が共通のパラメーター（RDoC の NVS）となる可能性が示唆された。

今後は、引き続きデータ収集を続け、NVS の各因子と髄液データ、神経画像所見との関連性を検証し、バイオマーカーが NVS のどの因子と関連するのかを明らかにすることを目指す。

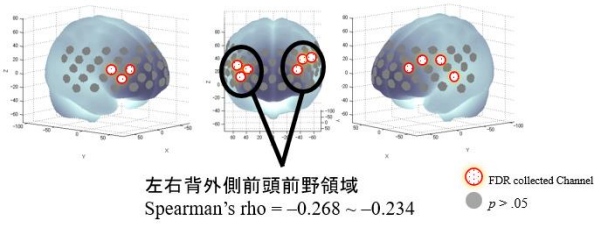


Fig.1 Factor 1（うつ、敗北者信念）と重心値 (N=153)

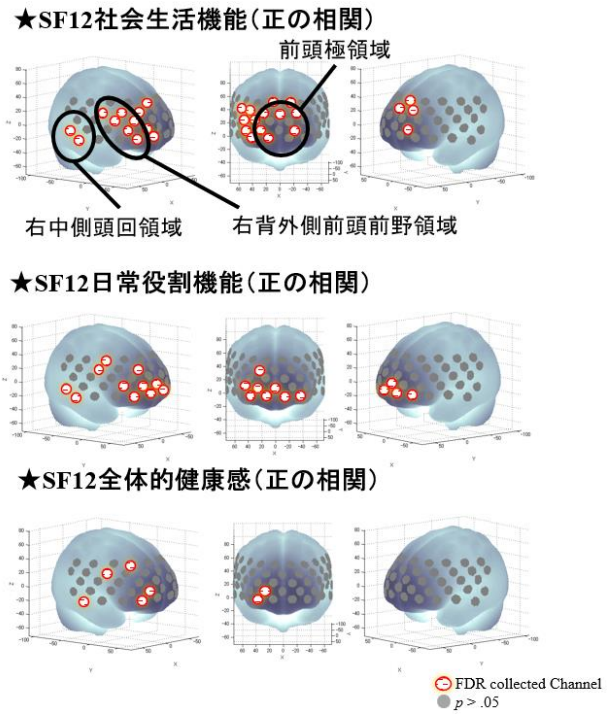


Fig.2 QOL(SF12)と積分値の関連(N=153)

参考文献

Lilienfeld, S . O.（2014） The Research Domain Criteria (RDoC): An analysis of methodological and conceptual challenges. *Behaviour Research and Therapy.* 62. 129-139

Verona E, Bresin K. (2015) Aggression proneness: Transdiagnostic processes involving negative valence and cognitive systems. *International Journal of Psychophysiology*.98：321-329

Wildes JE, Marcus MD. (2015) Application of the Research Domain Criteria (RDoC) Framework to Eating Disorders: Emerging Concepts and Research. *Current Psychiatry Report.* 17(5)

Simmons J. M., Kevin J.Q (2014) The NIMH Research Domain Criteria (RDoC) Project: implications for genetics research. *Mammalian Genome*, 25 (1-2), 23-31

Pu S, Nakagome K, Itakura M. et al. (2018) Right Frontotemporal Cortex Mediates the Relationship between Cognitive Insight and Subjective Quality of Life in Patients with Schizophrenia. *Frontiers in psychiatry*, 2;9:16

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設　病院第一精神診療部

氏　　名　野田　隆政

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
The use of diffusional kurtosis imaging and neurite orientation dispersion and density imaging of the brain in bipolar disorder.	Journal of Affective Disorders	251	2019年5月
Lysophosphatidic acid levels in cerebrospinal fluid and plasma samples in patients with major depressive disorder	Heliyon	5（5）	2019年5月
【ニューロモデレーション治療の可能性】ECTの現在地	精神科	34（6）	2019年6月
Reduced plasma orexin-A levels in patients with bipolar disorder.	Neuropsychiatric Disease and Treatment	15	2019年8月

３０－１ Development of novel treatment methods for mental illnesses based on functional domains

Kazuyuki Nakagome
National Center of Neurology and Psychiatry

- Objective

Within the 5 functional domains of the RDoC project developed by NIMH, we focused on Negative Valence Systems (NVS; fear, anxiety threat, frustrative non-reward, loss). Clinical assessment (symptoms, social cognition, social functioning), brain imaging (NIRS, fMRI) and molecules (blood, cerebrospinal fluid; CSF) were sampled in patients with schizophrenia, affective and anxiety disorders to identify biomarkers of the NVS. After extracting candidate biomarkers, we will explore the clinical applicability of drug candidate compounds obtained using animal models.

- Outcome

1) Examination using a model animal

Among the emotional neural circuits, we focused on the neural circuits that project from the orbitofrontal prefrontal cortex (OFC) to the basal lateral amygdala (BLA) and are proceeding with the analysis applying optogenetic and chemogenetic methods. We clarified that stress induces post-synaptic recruitment of calcium-permeable AMPA-type glutamate receptors in the OFC-BLA circuit in mice, which contributes to stress-induced behavioral changes. We also established a chronic social defeat stress mouse model specialized in psychological stress associated with NVS. In addition, we quantified lysophosphatidic acid for the first time in the world using cerebrospinal fluid and plasma of healthy subjects and patients with mental illness, and investigated the clinical applicability as a novel biomarker.

2) Analysis of CSF in psychiatric disorders

We found that CRH, which plays an important role in stress response as a candidate molecule associated with NVS, was decreased in patients with chronic schizophrenia featuring prominent negative symptoms. Furthermore, CRH was lower than that in healthy subjects in depressed patients taking antidepressants, which was positively correlated with the level of serotonin metabolites. It seems that CRH is decreased in proportion to the down-regulating effect of serotonin by antidepressants. Previously, we reviewed the past literature and conducted a meta-analysis on monoamine metabolites in CSF, and reported that there was a decrease in HVA in

CSF of unmedicated major depressive patients. Furthermore, we found that HVA was strongly related to motivation and sexual function. In addition, as for the inflammatory molecules in CSF we found that IFN-β was higher than that in healthy subjects in patients across diagnosis.

3) Intervention study by neuromodulation

With the aim of verifying the potential of transcranial direct current stimulation (tDCS) as a treatment method, the effect of improving cognitive function in patients with schizophrenia was investigated based on the meta-analysis of previously reported research data. The results showed a significant effect in working memory (SMD = 0.49, 95% confidence interval = 0.16-0.83) and no significant effect heterogeneity (p = 0.10, I2 = 39%). On the other hand, the effects on verbal learning, processing speed, attention and vigilance, visual learning, reasoning and problem solving, were not significant.

4) Establishment of clinical evaluation system of NVS

The total number of samples associated with clinical evaluation data, CSF collection and neuroimaging (MRI, NIRS) reached 163. Of these, 96 were able to obtain CSF, 152 in MRI, and 161 in NIRS. As for diagnosis, 69 patients with major depressive disorder, 33 patients with either bipolar disorder or schizophrenia, 28 patients with other diagnoses, respectively. Factor analysis was performed using clinical indices related to NVS, and 3 factors were extracted (F1: anxiety/depression F2: impulsivity, F3: intrinsic motivation). F1 and F2 were significantly correlated with social adaptation, autism tendency, QOL, executive functioning, and F3 with social adaptation. Regarding the relationship with cytokines in CSF, significant negative correlations were also found between F3 and TNF superfamily members, suggesting that intrinsic motivation may be associated with the immune response resulting from chronic inflammation. Furthermore, regarding the association with NIRS data, a significant negative correlation was observed between F1 and the center of gravity value in Ch 19, which is located within VLPFC. That is, the more depressed and anxious the patient is, the earlier the peak of the response of NIRS is.

３０－２　認知行動療法を国民の生活につなげる研究

認知行動療法センター 堀越勝

総括報告書

１．研究目的

本研究は、ナショナルセンターとして国民の生活全体を見据え、認知行動療法(Cognitive Behavior Therapy; CBT)に基づく治療・ケアの手法を、国民が広く活用できるための基盤を構築することを主眼とする。これらの目標の遂行のために、国民的な問題である睡眠と痛みに標的を当てた CBT の研究を行う（身体化 CBT、睡眠 CBT）。また、CBT 全体の受療可能性を高めることを目的に、インターネット支援型 CBT とビデオ会議システムの 2 つの情報通信技術を融合させたテレビ会議システムを用いたインターネット支援型 CBT に関する研究（遠隔 hybrid-CBT）、診断に限定されず国民に CBT を届ける研究（診断横断 CBT）、多職種が CBT を簡易に提供できるようにする研究（短時間 CBT）を行う。

【行動医学領域における認知行動療法の展開に関する研究（身体化 CBT）】

行動医学分野における CBT の臨床研究のモデルケースとして、特に慢性の痛みに焦点をあて、臨床研究を遂行する。その中で、他の診療科（ペインクリニック、整形外科、内科等）と協働での CBT 実施や臨床試験の遂行における連携体制を検討する。

【睡眠の問題に対する CBT（睡眠 CBT）】

わが国では 5 人に一人が睡眠の問題を抱えている。現在、欧米では不眠障害に対する治療の第一選択は不眠症に対する認知行動療法（Cognitive Behavioral Therapy for Insomnia: CBT-I）である一方、わが国ではエビデンスの不足と実施できるセラピストが不足しているという点から、第一選択となっていない。そこで本研究では、成人を対象とした CBT-I の臨床試験を遂行するための治療マニュアルの作成とセラピストのトレーニングの実施を行う。

【うつ病に対する遠隔インターネット hybrid 認知行動療法の開発とその効果に関する研究（遠隔 hybrid-CBT）】

医療資源への物理的交通アクセスが困難な場所に居住する国民への支援が不足している。これまで、NCNP における開発費により、うつ病に対するインターネット支援型 CBT（iCBT）の RCT による実績がある。本研究では、これまで展開してきたインターネット支援型 CBT を、テレビ会議システムによって提供する hybrid-CBT を開発し、その提供手法を構築する。

【診断を越えた認知行動療法の均てん化に関する研究（診断横断 CBT)】

公衆衛生領域や精神保健領域（精神科・心理臨床）でうつ・不安等の汎用性の高い CBT を診断に限定されず届けることが有効である。これまで、診断を越えた CBT である統一プロトコルのコンサルテーション体制の構築を進めるとともに、均てん化にとって重要となる治療機序の明確化を行ってきた。本研究では、これまでの均てん化の取り組みをさらに広げ、集団版の統一プロトコルや、児童青年版の統一プロトコルも含めて、診断横断的 CBT の均てん化の基盤を構築するとともに、治療機序のさらなる検討を行う。

【短時間で実施可能な簡易型認知行動療法の開発および普及に関する研究（短時間 CBT)】

わが国での CBT 普及の障壁として診療時間の制約や人材不足の問題がある。外来患者の診察時間は 10 分未満が 68.1%を占めており（厚生労働省, 2016)、医師が 1 回あたり 30–50 分、全 8–16 回もの時間を要する標準型の CBT をすべての患者に対して実施するのはきわめて困難である。また、CBT をより広く実施するためには CBT や精神療法の専門的な訓練を受けたことのない多職種（看護師、保健師、助産師等）の役割が重要である。しかしそのような多職種が利用可能なプログラムは非常に限られている。そこで、わが国の医療体制に合わせ、ごく短時間かつ様々な職種が実施可能な簡易型認知行動療法（CBT）を開発し、普及させることを本研究の目的とする。

２．研究組織

主任研究者

堀越　勝　国立精神・神経医療研究センター（NCNP）認知行動療法センター

分担研究者

中島　俊　NCNP 認知行動療法センター　認知行動療法診療部　臨床技術開発室

中川敦夫　慶應義塾大学病院　臨床研究推進センター　教育研修部門

伊藤正哉　NCNP 認知行動療法センター　研修指導部　研修普及室

蟹江絢子　NCNP 認知行動療法センター

研究協力者

行動医学領域における認知行動療法の展開に関する研究（身体化 CBT）

大江悠樹　　杏林大学／NCNP 認知行動療法センター

石井裕乃　　NCNP 認知行動療法センター

佐々木洋平　　NCNP 認知行動療法センター

宗未来　　東京歯科大学市川総合病院

伊達久　　医療法人社団開遁会仙台ペインクリニック

松原貴子　　神戸学院大学総合リハビリテーション学部

睡眠への認知行動療法の開発および普及に関する研究（睡眠 CBT）

綾部直子　　NCNP 精神保健研究所睡眠・覚醒障害研究部

山本晴美　　NCNP 認知行動療法センター

うつ病に対する遠隔インターネット hybrid 認知行動療法の開発とその効果に関する研究（遠隔 hybrid-CBT）

満田大　　慶應義塾大学医学部精神神経科学教室

中川ゆう子　　慶應義塾大学医学部精神神経科学教室

加藤典子　　慶應義塾大学医学部精神神経科学教室

武智小百合　　慶應義塾大学医学部精神神経科学教室

天野瑞紀　　慶應義塾大学医学部精神神経科学教室

馮えりか　　慶應義塾大学医学部精神神経科学教室

佐々木洋平　　慶應義塾大学医学部精神神経科学教室

梶原真智子　　慶應義塾大学医学部精神神経科学教室

診断を越えた認知行動療法の均てん化に関する研究（診断横断的 CBT）

加藤典子　　NCNP 認知行動療法センター

中島俊　　NCNP 認知行動療法センター

藤里紘子　　NCNP 認知行動療法センター

大江悠樹　　NCNP 認知行動療法センター

宮前光宏　　NCNP 認知行動療法センター

豊田彩花　　NCNP 認知行動療法センター

駒沢あさみ　　NCNP 認知行動療法センター

竹林由武　　NCNP 認知行動療法センター

山口慶子　　NCNP 認知行動療法センター

横山知加　　NCNP 認知行動療法センター

短時間で実施可能な簡易型認知行動療法の開発および普及に関する研究（短時間 CBT）

中嶋愛一郎　　NCNP 認知行動療法センター

牧野みゆき　　NCNP 認知行動療法センター

片柳章子　　NCNP 認知行動療法センター

横山知加　　NCNP 認知行動療法センター

久保田智香　　NCNP 認知行動療法センター

三田村康衣　　NCNP 認知行動療法センター

３．研究成果

1　身体化 CBT：

慢性痛に対する標準型 CBT のパイロット試験を終え、RCT を開始した。また、慢性痛に対する簡易型 CBT のパイロット試験を実施した。さらに、過敏性腸症候群に対する集団 CBT の RCT を継続した。さらに、これら CBT の実施者と指導者育成プログラムを開発した。

2　睡眠 CBT：

CBT-I の臨床試験で使用する治療マテリアルとして、新しい睡眠日誌の作成と睡眠 CBT のマニュアルの作成を行った。また、漸進的筋弛緩法の映像を作成した。現在、これらのマテリアルを使用した CBT-I の治療マニュアルを作成中である。

3　遠隔 hybrid-CBT：

うつ病患者を対象とした遠隔 hybrid-CBT の feasibility study を開始し、研究協力者 3 名を登録して、介入を実施した。また、この研究に参加した患者と CBT 担当者の双方から実施時のフィードバックを得て、遠隔 hybrid-CBT 実施上の留意点等を整理した。その結果をもとに、治療者マニュアルの一部として、遠隔での実施に慣れない治療者や患者が遠隔 hybrid-CBT を適切に行えるように導入のためガイドを作成した。加えて、昨年度に引き続き、遠隔 hybrid-CBT の実用性を検討するための研修を行った。

4　診断横断 CBT：

感情障害に対する診断を越えた治療のための統一プロトコル（Unified Protocol of the Transdiagnostic Treatment for Emotional Disorder：UP）が実施できる人材育成や均てん化のためにセラピスガイド、ワークブック、適切な実施法を疾患毎にまとめた臨床ガイドブックの整備を行うとともに、これまで実施してきた基礎研修に加えて、上級者向けの研修を実施し、効果的な均てん化に関する検討を進めた。児童青年版の診断横断ＣＢＴのセラピストガイドとワークブックを整備して出版するとともに、専門家向けの研修会を実施し、均てん化のモデルを検討した。また、既存の大規模観察研究や臨床試験のデータを用いて、診断横断的なＣＢＴの治療機序に関する論文執筆や公表を進めた。加えて、集団版や児童青年版の診断横断ＣＢＴに関する予備試験のデータをまとめ、論文執筆を進めた。

5　短時間 CBT：

短時間 CBT の提供基盤としてウェブサイトの構築を進めた。また、短時間 CBT の実践研究領域として、周産期メンタルヘルス領域と大学生への予防的介入に着目した。前者では、助産師への CBT コミュニケーション研修素材を作成し実施するとともに、日本産婦人科医会の関沢明彦医師（昭和大学）らと共に実地での提供法の協

議を進めた。後者としては、スマートフォンアプリ CBT のどの組み合わせが最も有効化を検討する多相最適化戦略試験の準備を進めた。

４．今後の研究の進め方について

身体化 CBT では、慢性痛に対する標準型 CBT-IE および過敏性腸症候群に対する集団 CBT の RCT を継続する。その他、他機関と連携し、歯科領域の慢性痛に対する CBT の開発や、過敏性腸症候群に対する簡易型 CBT の開発を進める。育成プログラムの運用は継続し、プログラム実施者および指導者、特に指導者の育成を行っていく。

睡眠 CBT では、引き続き臨床試験の実施に必要な治療マテリアルの作成を行うとともに、睡眠外来と連携し、CBT-T の臨床試験の体制を構築する。同時に、CBT-I を実施できるセラピストの養成を行う。

遠隔 hybrid-CBT では、うつ病患者を対象とした feasibility study を継続する。この feasibility study では、COVID-19 感染拡大を考慮して、これまでの２つの医療機関を結ぶ形式だけでなく、遠隔 hybrid-CBT プログラムを医療機関と患者宅を結んだ形式で実践し、その実施可能性についても検証する。あわせて、テレビ会議システムを用いた CBT セラピスト育成法を検討し、治療マニュアルを整備する。

診断横断 CBT では、最新版のセラピストガイドとワークブック、そして訓練体制の整備を進める。診断横断ＣＢＴに関するランダム化比較試験のプライマリアウトカム論文の公表を経て、そのデータを用いた二次解析により、様々な観点から、診断横断 CBT 特有の治療機序の検討を進める。他に、大規模観察研究などの既存のデータを用いて、診断横断ＣＢＴの治療機序に関する検討を行う。児童青年版の診断横断ＣＢＴに関しても、予備試験の論文執筆を進め、公表を目指す。

短時間 CBT では、提供基盤となるウェブサイトの改良と拡張を行う。周産期領域では、H30 の実施で明らかになった問題点を踏まえ、CBT コミュニケーションの研修マテリアル（研修テキストを含む）を整備する。多相最適化戦略試験については、共同研究者（京都大学　古川壽亮ら）と試験の準備を整え、開始する。

５．倫理面における配慮

全ての分担研究において、ヘルシンキ宣言ならびに「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」など該当する倫理指針に準拠し、各研究実施機関の研究倫理審査委員会で倫理審査を受け、承認を得たうえで行う。研究参加者には、研究の目的、方法、予想される利益と不利益、本研究への参加が自由意志によるものであり、本研究への参加同意後も随時撤回可能であること、不参加による不利益は生じないこと、個人のプライバシーが保護されることや、有害事象の発生時への対応等を分かりやすく説明する。また、安全性を確保するために研究班で緊密な連絡体制を図る。

行動医学領域における認知行動療法の展開に関する研究

分担研究者　堀越勝 [1)]

研究協力者　大江悠樹 [1)2)]、佐々木洋平 [1)]、高岸百合子 [1)]

所属

1) 国立精神・神経医療研究センター認知行動療法センター　2)杏林大学精神神経科学教室

諸言

行動医学領域において認知行動療法を展開していくために、まずは慢性の痛みに関する問題を中心的な対象として選んだ。慢性痛はわが国成人の約 23%が有するとされる国民的な問題である[1]。慢性痛の問題は身体的苦痛だけでなく，日常生活上の支障，うつや不安の心理的問題，健康関連 QOL の低下など多岐にわたる。慢性痛による社会的生産性の低下によって，がんの 2. 5 倍，糖尿病の 3 倍にあたる年間 5,600～6,350 億ドル（約 67 兆円）の経済コストが生じると試算され(Gaskin & Richard, 2012)、社会的にも影響の大きい疾患である。

認知行動療法は，海外の臨床試験で慢性痛に対する有効性や費用対効果の高さが示されている。本邦における慢性痛の治療ガイドラインは，こうした海外の先行研究に基づいて認知行動療法を推奨してはいる(日本整形外科学会・日本腰痛学会（監修）, 2012; 日本線維筋痛症学会（編）, 2013)。しかし，その普及率は著しく低く，日本での慢性痛治療はいまだにマッサージやブロック注射，装具療法といった比較的エビデンスが弱い治療が中心である(Nakamura, Nishiwaki, Ushida, & Toyama, 2011)。

専門的な CBT 実施者の不足に加え、実証的な知見が乏しいという点も大きな問題である。

したがって、本研究では(1)身体化領域での認知行動療法において必要とされる各種マテリアルの整備、(2) 専門的な CBT 実施者・指導者の育成体制の整備、そして（3）多施設共同を中心とした臨床試験を実施し、身体科領域における慢性痛をはじめとした各種疾患に対する CBT の有効性を検証することを目的とする

方法

1．CBT 実施者・指導者の育成体制整備

筆者らが開発し、パイロット研究を実施した慢性痛に対する通常型の CBT、および過敏性腸症候群に対する CBT をベースに、専門的な実施者育成のための体制整備を行い、運用を行った。その運用を図 2 にまとめた。ここから培ったノウハウをもとに、2019 年●月●日に当施設において「IBS に対する認知行動療法研修会」を実施し、約 40 名の対象者に対して研修を行った。

2. 慢性痛に対する認知行動療法の臨床試験

（1）慢性痛に対する通常型認知行動療法のパイロット試験

（2）慢性痛に対する通常型認知行動療法のランダム化比較試験

（3）IBS に対する集団認知行動療法のランダム化比較試験

京都大学、高槻赤十字病院と共同で IBS に対する集団認知行動療法のランダム化比較試験を実施している。本研究の対象者は(1)Rome III または IV の過敏性腸症候群の診断基準を満たし、(2)スクリーニング時の年齢が 16 歳以上 65 歳以下で、(3)消化器内科の通常治療を 3 か月以上受けても症状が変わらず、(4)過

去に IBS 特異的精神療法を受けたことのない、(5)自由意思による研究参加の同意が得られたものである。介入は全 10 回＋1 回のフォローアップセッションで構成される CBT である。主要評価項目は IBS 症状の重症度（IBSSI-J)、疾患特異的 QOL（IBS-QOL-J）とした。副次評価項目として全般的症状改善度（IBS-GIS)、QOL（EQ-5D-5L)、抑うつ（PHQ-9)、不安（GAD-7)、消化器症状（GSRS）などを設定している。

（２）IBS に対する集団形式での認知行動療法のランダム化比較試験

京都大学、高槻赤十字病院と共同で集団版 CBT-IE のランダム化比較試験（RCT）を開始した。パイロット試験と同等の基準を設定した。現在 4 クール目の患者を募集中である。

結果

1．CBT 実施者・指導者の育成体制整備

NCNP ではこれまでに 2 名が介入担当者となり、計 4 症例に対して臨床提供として CBT を実施した。スーパーバイザーは全てのセッションについて録音を聴き、スーパーバイズを行った。先任スーパーバイザーがスーパーバイズの指導を行った。堀越は先任スーパーバイザーの監督・指導を行った。介入期間を通して有害事象は発生しておらず、介入前に比して介入後は IBS 症状や QOL の改善が認められている。

これらの経験にもとづく情報は論文の形で情報発信している[4-7]。

2．IBS に対する認知行動療法の臨床試験

（1）IBS に対する集団形式での認知行動療法のパイロット試験

京都大学および高槻赤十字病院では計 2 名が治療者となり、先述したパイロット試験を実施した。12 名の患者の紹介を受けたうち、7 名が研究参加の意思を示し、その全員が介入を完遂した。なお、これらの事例についても先に述べた体制でスーパーバイズを行った。

（2）IBS に対する集団形式での認知行動療法のランダム化比較試験

パイロット試験でスーパーバイズを受けた京都大学、高槻赤十字病院の医師および心理士計 2 名が治療者となり、RCT を実施中である。。

考察

本研究の結果、今回構築した IBS に対する CBT の実施者育成体制は、臨床試験での介入を担当できる治療者の育成を可能とする、一定の有効性を持つ可能性が示された。ただし、今後は実施者の実際の能力をより客観的に評価するため、CTRS など既存の尺度を利用して査定することが必要であると考えられる。

パイロット試験では大きな有害事象の発生なく試験を終了し、その有効性についても確認することができた。

現在はパイロット試験の結果を受け、RCT を実施中である。今後は試験を完遂し、IBS に対する集団形式での認知行動療法の有効性を検証したいと考えている。

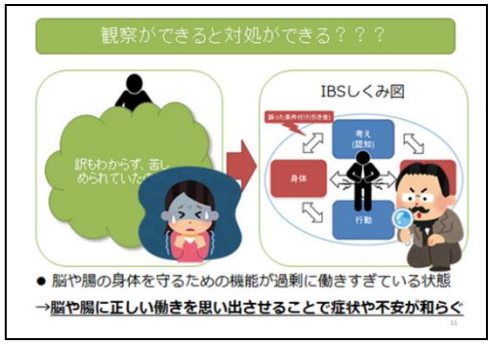


図 1　患者用資料

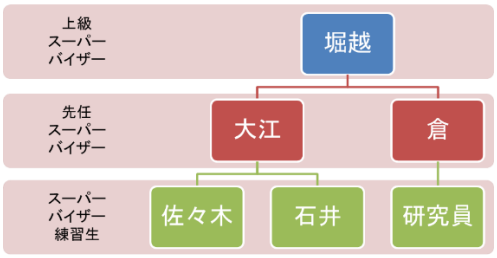


図２　実施者および指導者の育成体制

引用文献

1. Drossman DA, Hasler WL: Rome iv-functional gi disorders: Disorders of gut-brain interaction. Gastroenterology 2016;150:1257-1261.
2. Kanazawa M, Endo Y, Whitehead WE, Kano M, Hongo M, Fukudo S: Patients and nonconsulters with irritable bowel syndrome reporting a parental history of bowel problems have more impaired psychological distress. Dig Dis Sci 2004;49:1046-1053.
3. Zijdenbos IL, de Wit NJ, van der Heijden GJ, Rubin G, Quartero AO: Psychological treatments for the management of irritable bowel syndrome. Cochrane database of systematic reviews (Online) 2009:CD006442.
4. 堀越勝・大江悠樹　リエゾン場面への認知行動療法の応用－他科の患者のメンタルヘルス－　精神科治療学　2016, 31: 163-170.
5. 大江悠樹・堀越勝　過敏性腸症候群に対する認知行動療法　Pain Reserch 2017, 32:267-271.
6. 藤澤大介・堀越勝・笠原諭・岩佐和典・大江悠樹・山本和美・近藤真前　多面的アプローチで慢性痛に挑む　認知療法研究　2018, 11:156-165.

睡眠への認知行動療法の開発および普及に関する研究

分担研究者　中島俊 [1)]

研究協力者　綾部直子 [2)]、山本晴美 [1)]

所属

1) 国立精神・神経医療研究センター認知行動療法センター　2) 国立精神・神経医療研究センター　精神保健研究所睡眠・覚醒障害研究部

緒言

不眠障害は, 適切な睡眠の機会や環境が得られており, その他の睡眠障害がみられないにもかかわらず, 夜間の睡眠の問題とそれに伴う日中の機能障害によって定義される疾患である。日本では、不眠障害の治療ガイドラインの第一選択は薬物療法である。一方、欧米諸国の治療ガイドラインでは慢性不眠障害に対する認知行動療法（Cognitive Behavioral Therapy for Insomnia: CBT-I）が治療の第一選択とされている (Qaseem et al., 2016; Ree, Junge, & Cunnington, 2017; Riemann et al., 2017)。この違いは、日本では CBT-I に関するエビデンスが少ないという点だけでなく、CBT-I を実施できるセラピストが他の CBT 以上に少なく、CBT-I が有効であっても睡眠の問題を抱えた方に提供できないといった供給上の問題も大きい。

このような背景から、本研究では、成人を対象とした CBT-I の臨床試験を遂行するための治療マニュアルの作成（研究①）とセラピストのトレーニングの実施（研究②）を行う。

研究①　治療マニュアルの作成

方法

本研究では、不眠症の認知行動療法の実施に欠かせない睡眠日誌の作成及び治療構成要素の一つである漸進的筋弛緩法のデモ映像の作成を行った。

睡眠日誌の作成は、睡眠日誌の国際的なコンセンサス（Carney et al., 2012）と治療マニュアル（Harvey et al., 2018）を参考に、行動睡眠医学を専門とする複数の臨床心理士及び看護師、睡眠障害患者が議論を重ね、開発を行い、ブラッシュアップを重ねて確定版を作成した（図 1 ）。

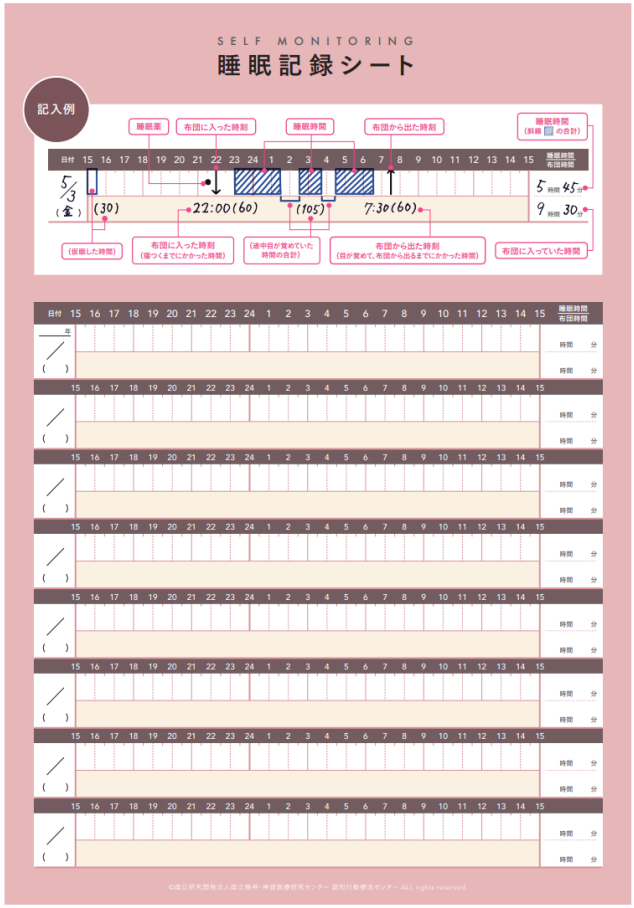


図 1　作成した睡眠日誌

漸進的筋弛緩法のデモ映像は、不眠症の認知行動療

法で一般的に用いられる介入プログラムを患者が自宅でも利用できることを目的に作成した。デモ映像は行動医学を専門とする博士号を有する臨床心理士の監修のもと、以下のものを作成した（図２）。

図２　作成した漸進的筋弛緩法のデモ映像

６．考察

睡眠の問題を抱える者は多い一方、わが国では睡眠 CBT のアクセスは限定的である。そのような背景から、本研究で作成した資材は今後睡眠 CBT の均てん化には欠かせないものと考えられる。また COVID-19 感染拡大に伴う外出自粛の生活は、世界中の人々の睡眠の問題の増加・増悪が懸念されている（Altene et al., 2020）。そのため、本研究は COVID-19 感染拡大下においても資するものと考えらえる。

７．結論

本年度を踏まえ、次年度は引きつづき治療マテリアルの作成を行うとともに、オープン試験を実施予定である。また、本年度作成した睡眠 CBT に関する資材は国民に資するものとなるよう NCNP 認知行動療法センターのホームページ等で一般公開予定である。

８．引用文献

1．Qaseem, A., Kansagara, D., Forciea, M. A., Cooke, M., Denberg, T. D., Barry, M. J., … Wilt, T. (2016). Management of chronic insomnia disorder in adults: A clinical practice guideline from the American college of physicians. *Annals of Internal Medicine*, *165*(2), 125–133.

2．Ree, M., Junge, M., & Cunnington, D. (2017). Australasian Sleep Association position statement regarding the use of psychological/behavioral treatments in the management of insomnia in adults. *Sleep Medicine*, *36*, S43–S47.

3．Riemann, D., Baglioni, C., Bassetti, C., Bjorvatn, B., Dolenc Groselj, L., Ellis, J. G., … Spiegelhalder, K. (2017). European guideline for the diagnosis and treatment of insomnia. *Journal of Sleep Research*, *26*(6), 675–700.

4．Carney, C. E., Buysse, D. J., Ancoli-Israel, S., Edinger, J. D., Krystal, A. D., Lichstein, K. L., & Morin, C. M. (2012). The consensus sleep diary: standardizing prospective sleep self-monitoring. *Sleep*, *35*(2), 287–302.

5．Harvey A., & Buysse G. (2018). Treating sleep problems: transdiagnostic approach, The Guilford press.

うつ病に対する遠隔インターネット hybrid 認知行動療法の開発とその効果に関する研究（遠隔 hybrid-CBT）

分担研究者：中川敦夫

分担報告書

緒言

本研究は、認知行動療法(Cognitive Behavior Therapy; CBT)の理解に基づく治療・ケアの手法を、国民が広く活用できるための基盤を構築することを主眼とする。本分担研究では均てん化という点に注目している。

厚生労働省認知行動療法研修事業により、日本での CBT の提供者は全国で増えては来ているもの、依然として、臨床ニーズを満たすにははるかに及ばないのが現状である。とくに、人口過疎地や地方などの医療アクセスの十分でない地域でその傾向は顕著である。こうした背景から、うつや不安といったコモンメンタルディスオーダーに対する CBT については、対面型(Nakagawa et al., 2017)やインターネット支援型（iCBT）ついて既にランダム化比較試験（RCT）を完了・遂行してきた。

iCBT では「こころのスキルアップトレーニング」（http://www.cbtjp.net/）のサイトを利用したインターネット支援型認知行動療法という独自のプログラムを開発し、その有効性を 12 週間の waiting-list control を対照とした RCT を行った(Nakao et al., 2018)。iCBT プログラムは、行動活性、認知再構成、問題解決から構成される治療プログラムである。対象は、20 歳以上 65 歳未満で DSM-IV にて診断された大うつ病性障害患者で、1 種類以上の抗うつ薬を 6 週間以上内服しても、ベースラインで GRID-HAMD が 14 点以上の中等症のうつ病患者で、計 40 例（介入群 20 例、waiting-list control 群 20 例）であった。なお、いずれの群において、投薬治療を含む通常治療が実施された。主要なアウトカムは GRID-HAMD とし、治療開始 6 週目（中間評価）、12 週目

（終了評価）、そして介入群のみ 24 週目（フォローアップ評価）に行われた。GRID-HAMD の評価は、中央評価者が盲検下で電話インタビューを施行され、高い信頼性を得られていた(ICC：0.94-0.98)。RCT の結果、有効性に関して、GRID-HAMD17 合計得点はベースラインにて iCBT 群:18.3(SD3.6), 対照群:18.5(SD 3.6)であったが、12 週時点(介入終了時点) iCBT 群:9.4(SD5.1), 対照群:15.5(SD 6.3)であった。ベースラインからの変化量の両群間での差は 5.95 (95%CI 2.37 to 9.53), p=0.02 と有意差を認めた。12 週時点の治療反応率は iCBT 群:55.0%(n=11), 対照群:20.0%(n=4)であった(RR 2.75, 95%CI 1.05 to 7.20)。また 12 週時点の寛解率は iCBT 群:30.0%(n=6), 対照群:15.0%(n=3)であった(RR 8.00 95%CI 1.10 to 58.19)。

これらの成果に基づき、本分担研究では、このインターネット支援型 CBT を改良し、テレビ会議システムによって提供する hybrid-CBT を開発し、その提供手法を構築することにした。

方法

本研究では、認知行動療法が未だ十分に普及していないわが国の臨床現場に対応すべく、インターネット CBT とビデオ会議システムの 2 つの情報通信技術を融合させた、新たなテレビ会議システムを用いたインターネット支援型認知行動療法（遠隔インターネット hybrid-CBT）のプログラム開発（治療者マニュアル・患者向けセッションノート）を行い、その開発された

プログラムのパイロット・ランを行いながら、プログラムのブラッシュを図り、確定版プログラムにてオープン試験を行う。加えて、プログラムの各セッションにおいてサテライト機関では陪席者を置き、セラピスト育成法を検討する。

結果

平成 30 年度は、遠隔 hybrid-CBT の患者向けセッションノートを作成し、遠隔 hybrid-CBT の実用性を検討するためパイロット研修(39 名)を行った。

令和元（平成 31）年度は、うつ病患者を対象とした遠隔 hybrid-CBT の feasibility study を開始し、研究協力者 3 名を登録して、介入を実施した。また、この研究に参加した患者と CBT 担当者の双方から実施時のフィードバックを得て、遠隔 hybrid-CBT 実施上の留意点等を整理した。その結果をもとに、治療者マニュアルの一部として、遠隔での実施に慣れない治療者や患者が遠隔 hybrid-CBT を適切に行えるように導入のためガイドを作成した。加えて、昨年度に引き続き、遠隔 hybrid-CBT の実用性を検討するための研修を行った。

考察

令和元年度に開始した遠隔 hybrid-CBT の feasibility study において、3 例に介入を開始して、安全に介入が実施された。しかし、COVID-19 の感染拡大に伴い、3 例目の通院継続が困難になったため、COVID-19 蔓延の際にも実施可能な体制を検討することが必要だと考えられた。

結論

令和 2 年度は、うつ病患者を対象とした feasibility study を継続する。この feasibility study では、COVID-19 の感染拡大を考慮して、これまでの 2 つの医療期間を結ぶ形式だけでなく、遠隔 hybrid-CBT プログラムを医療機関と患者宅を結んだ形式で実践し、その実施可能性についても検証する。あわせて、テレビ会議システムを用いた CBT セラピスト育成法を検討し、治療マニュアルを整備する。

参考文献

1. Nakao S, Nakagawa A, Oguchi Y, Mitsuda D, Kato N, Nakagawa Y, Tamura N, Kudo Y, Abe T, Hiyama M, Iwashita S, Ono Y, Mimura M. Web-Based Cognitive Behavioral Therapy Blended With Face-to-Face Sessions for Major Depression: Randomized Controlled Trial. J Med Internet Res. 2018;20:e10743.
2. Nakagawa A, Mitsuda D, Sado M, Abe T, Fujisawa D, Kikuchi T, Iwashita S, Mimura M, Ono Y. Effectiveness of Supplementary Cognitive-Behavioral Therapy for Pharmacotherapy-Resistant Depression: A Randomized Controlled Trial. J Clin Psychiatry. 2017

診断を越えた CBT の均てん化に関する研究

分担研究者：伊藤正哉 [1]

堀越勝 [1]、加藤典子 [2]、藤里紘子 [1,3]、山口慶子 [1]、宮前光宏 [1,4]、竹林由武 [1,5]、大江悠樹 [1,6] 、中島俊 [1]、蟹江絢子 [1]、豊田彩花 [1]、駒沢あさみ [1]

[1.] 国立精神・神経医療研究センター認知行動療法センター、[2.] 慶應大学、[3.] 国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所、[4.] 国立精神・神経医療研究センター神経保健研究所、[5.] 福島県立医科大学、[6.] 杏林大学

緒言

本研究では、感情的な困難が特徴的な幅広い疾患への適用が可能な診断横断的な認知行動療法である、感情障害の診断を越えた治療のための統一プロトコル（ Unified Protocol of Transdiagnostic Treatment for Emotional Disorders; UP）の効果に着目し、2 つの観点から検討する。第 1 に、成人に対する個人形式の UP だけでなく、児童版 UP、青年版 UP、集団形式の UP などを含めた様々な UP の均てん化を効果的に進めるために、さまざまなマテリアルを開発するとともに、それらを用いた研修を実施し、均てん化のモデルを検討する。第 2 に、UP の治療機序を明らかにする。そのために、すでに終了した予備試験、ランダム化比較試験、および大規模な観察研究のデータを用いて、治療機序や効果測定に関わるプロセス等を検討する。

方法

UP の均てん化を円滑にするために、さまざまなマテリアルの開発が求められる。そのために、最新の知見を踏まえたセラピストガイド及びワークブック（Barlow et al., 2017）、臨床応用テキスト（Barlow & Farcione, 2017）の日本版を作成することとした。また、日本の臨床現場において UP を広めていく上では、集団療法としての実施が容易になることも重要であるが、集団 UP については既存のテキストが存在しない。そこで、グループセッションを均質に進めていくための補助資料（映写スライド）を作成することとした。さらに、UP は児童版と青年版のテキストの翻訳も本邦における均てん化において重要であると考えた。

UP の治療機序の検討　様々な疾患群や健常群を有した既存の調査研究の二次解析を通して、統一プロトコルの実施に関与する変数を検証した。さらに、予備試験で実施した PTSD 事例についての詳細な検討を進めた。また、予備試験のデータを用いて、UP における中核的な治療機序である感情調整が、治療効果にどのように関わるかの検証を進めた。

結果

UP 均てん化のためのマテリアル開発　上述の UP セラピストガイド、ワークブック、臨床応用テキスト、そして児童版のセラピストガイドおよびワークブック、青年版のセラピストガイドおよびワークブックの翻訳を進めた。臨床応用テキストの監訳では、分担研究者らが 1 次監訳を行い、伊藤が 2 次監訳を進め、出版に至った。児童版のセラピストガイドおよびワークブックも監訳を終えて出版に至った。集団版 UP のスライド作成では、イラストなどのビジュアル資料を多く導入し、セッション構造を維持するよう統一的な仕様で作成した。

UP の治療機序の検討　UP の PTSD への適用事例について詳細に検討し、論文を修正した。UP の治療機序としては、うつに対する行動活性化やマイン

ドフルネスの媒介要因をモデル化して検証し、論文を公表した（Takagaki et al., 2020）。予備試験のデータを二次解析し、感情表出抑制が治療効果を調整することが示唆された（Hosogoshi et al., under review）。

考察

将来的なUPの均てん化に資するさまざまなマテリアルの開発が進められた。また、治療機序に関しては、重要な変数や尺度の検証が進み、一定の進展が得られたと考えられる。

結論

次年度には、本年度から執筆、審査を受けている他の論文を公表しつつ、マテリアル開発を進め、均てん化への促進につなげていく。

引用文献

Barlow, D. H., Farchione, T. J., Sauer-Zavala, S., Latin, H. M., Ellard, K. K., Bullis, J. R., . . . Cassiello-Robbins, C. (2017). *Unified Protocol for Transdiagnostic Treatment of Emotional Disorders: Therapist Guide*: Oxford University Press.

Barlow, D. H., & Farchione, T. J. (2017). *Applications of the Unified Protocol for Transdiagnostic Treatment of Emotional Disorders*: Oxford University Press.

バーロウ, ファーキオーニ 編; 伊藤正哉・堀越勝監訳 不安とうつの統一プロトコル　診断を越えた認知行動療法　臨床応用編、診断と治療社, 2020.4

ジル・エレンリッチ-メイ [ほか] 著 ;藤里紘子, 堀越勝監訳; 伊藤正哉, 加藤典子訳　子どものための感情探偵プログラム–つらい感情とうまくつきあう認知行動療法の統一プロトコル　セラピストガイド, 福村出版, 2020.1

ジル・エレンリッチ-メイ [ほか] 著 ;藤里紘子, 堀越勝監訳; 伊藤正哉, 加藤典子訳　子どものための感情探偵プログラム–つらい感情とうまくつきあう認知行動療法の統一プロトコル　ワークブック, 福村出版, 2020.1

Takagaki, K., Ito, M., Takebayashi, Y., Nakajima, S., & Horikoshi, M. (2020). Roles of Trait Mindfulness in Behavioral Activation Mechanism for Patients With Major Depressive Disorder. *Frontiers in psychology*, *11*, 845., https://doi.org/10.3389/fpsyg.2020.00845

短時間 CBT：短時間で実施可能な簡易型認知行動療法の開発および普及に関する研究

分担研究者　　蟹江絢子
認知行動療法センター

中嶋愛一郎[*2]・伊藤正哉・片柳章子・牧野みゆき・横山知加・久保田智香[*2]・三田村康衣[*2]

[*1] 国立精神・神経医療研究センター認知行動療法センター

[*2] 国立精神・神経医療研究センター病院

緒言

精神障害を抱えた患者の精神療法、特に認知行動療法のニーズは高く、精神科医もそれを認識している。しかし、時間的制約や認知行動療法を実施できるものが少ないために、十分に提供されているとはいえない。このような問題を解決するために、欧米では短時間のCBTが開発されている（David, 2013; Otto et al., 2011）。この短時間CBTは臨床現場で歓迎され、臨床家の間ではその有用性のコンセンサスが得られつつある。

そこで、本研究ではわが国の医療体制に合わせ、通常診療でも行えるような10分程度の短時間かつ様々な職種が実施可能な短時間認知行動療法（短時間CBT）を開発し、普及させることを目的とする。さらに、人材育成プログラムを作成し、研修を行いその効果を検証し研修をさらに改良し、必要な人材を育成していく。（研究①）

また提供基盤となるウェブサイトを構築する。（研究②）

また、どのような認知行動療法の技法がどのような順番で行われると効果が高いのか検証するため、多相最適化戦略試験については、共同研究者（京都大学　古川壽亮ら）と試験の準備を整え開始する。（研究③）

方法

【研究①】

10 分間程度の短時間かつ様々な職種が実施可能な短時間認知行動療法を認知行動療法の専門家であるものが作成する。

また、10 分間認知行動療法という著書を翻訳する。

【研究②】

認知行動療法の情報を提供するにあたって、まずは周産期領域の妊産婦そのパートナーとその援助者に向けて、情報提供するための記事とイラストを作成し、どのようなプラットフォームにするといいか検討する。

【研究③】

認知行動療法には、様々な治療要素がある。そのなかでも、代表的な治療要素はセルフモニタリング（Self-monitoring; SM）、認知再構成（Cognitive Restructuring; CR）、行動活性化（Behavioral Activation; BA）、アサーション（Assertion Training; AT）、問題解決（Problem Solving; PS）の 5 つである。どのような患者にどのような順番で行われると治療効果が高いか検討する。

結果

【研究①】

1）10 分間認知行動療法のマテリアル開発

10 分間認知行動療法で取り組む疾患を決定した。うつ病、パニック症、社交不安症、全般性不安症、強迫症、心的外傷後ストレス障害、不眠症、慢性疼痛、過敏性腸症候群、自尊心低下とした。心理の相談室に来院するものにも対応するため、その軽症例についても取り組むこととした。

10 分間認知行動療法で取り組む治療要素について

は、目標設定・行動活性化・認知再構成・問題可決法・曝露・再発予防とした。
それらについて 10 分間でおさまるようなかたちでセッションが実施できるように必要な要素を書き出した。
うつ病の認知行動療法のテキストは多いが不安症は少ないため、まずは社交不安症に関して患者用マニュアルと治療者用マニュアルにわけて作成した。

２）10 分間認知行動療法の翻訳
翻訳の分担者を決めて翻訳を行った。
出版社と話し合い、レイアウトなどに工夫を凝らした。現在第２版校正中である。

【研究②】
ウェブサイトでは、1）妊産婦や妊娠を考えている女性が周産期メンタルヘルスに関するリテラシーを高める　2）パートナーが自身のケアや妊産婦を効果的にサポートする方法を学ぶ　3）専門家が周産期メンタルヘルスに関する知識を高め、援助のスキルを学ぶといった情報が必要だと考えられたため、プレママ・ママ/パートナー/医療者・援助者というカテゴリーにわけて情報を発信する。コンテンツの内容としては、周産期のメンタルヘルス/社会や行政の動き/認知行動療法/パートナーや専門職のメンタルケア/パートナーへの対話ヒント/裏コラムとし、精神科医や心理士や看護師や助産師が執筆した。コンテンツはイラストと記事より成り立っており、見やすく分かりやすい構成であり妊産婦が気楽にみれるように工夫をした。

【研究③】
現在、京都大学でリクルートを開始した。
研修の満足度は高く、「復職判断やリワークプログラムの重要性が分かった」「全国の社労士会でも同様の研修が開催できるとよい」との声が聞かれた。

考察
研究①では、専門の医師らの確認したところ、治療者マニュアルと患者用マニュアルは別にあるといいとのことであったので、別に作成することとする。
10 分間認知行動療法の翻訳について、進めていく。
また、研究②では、ウェブサイトの記事を作成したため、プラットフォームを作成していく。
また、研究③ではリクルートをすすめていく。

結論
本研究では３つの研究を実施した。本研究の２年度は、各研究を推進すべく、計画通りに実施できた。来年度以降は、その続きを行う予定である。

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 認知行動療法センター

氏　　名 堀越　勝

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
Predicting recurrence of depression using lifelog data: An explanatory feasibility study with a panel VAR approach	BMC Psychiatry	19・1	2019

（注）１．当該研究費による研究成果の刊行のみを記載すること
２．分担研究者毎に作成すること
３．刊行なしの場合は下欄に「なし」と記入する
４．論文の写しを１部提出すること（主任研究者にて保管）

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設　認知行動療法センター

氏　　名　中島　　俊

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
不眠に対する認知行動療法マニュアル	金剛出版		2020.3

（注）１．当該研究費による研究成果の刊行のみを記載すること
２．分担研究者毎に作成すること
３．刊行なしの場合は下欄に「なし」と記入する
４．論文の写しを１部提出すること（主任研究者にて保管）

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設　慶應義塾大学

氏　　名　中川　敦夫

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
うつ病に対する遠隔認知行動療法の可能性と実践	精神科治療学	3（2）	2019.2
うつ病に対するインターネットや遠隔通信技術を用いた認知行動療法の可能性	最新精神医学	24(2)	2019.3
うつ病の認知行動療法とブレンド認知行動療法を活用した遠隔精神医療	精神療法	増刊（7）	2020.6
職域における簡易型認知行動療法の活用可能性	精神療法	増刊（７）	2020.6

（注）１．当該研究費による研究成果の刊行のみを記載すること
２．分担研究者毎に作成すること
３．刊行なしの場合は下欄に「なし」と記入する
４．論文の写しを１部提出すること（主任研究者にて保管）

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設　国立精神・神経医療研究センター

氏　　名　伊藤正哉

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
Roles of Trait Mindfulness in Behavioral Activation Mechanism for Patients With Major Depressive Disorder	*Frontiers in psychology*,	11	2020

（注）１．当該研究費による研究成果の刊行のみを記載すること
２．分担研究者毎に作成すること
３．刊行なしの場合は下欄に「なし」と記入する
４．論文の写しを１部提出すること（主任研究者にて保管）

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設　認知行動療法センター

氏　　名　蟹江絢子

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
公認心理師のための簡易型認知行動療法入門　周産期領域	精神療法	45.1.	2019.2

（注）１．当該研究費による研究成果の刊行のみを記載すること

２．分担研究者毎に作成すること

３．刊行なしの場合は下欄に「なし」と記入する

４．論文の写しを１部提出すること（主任研究者にて保管）

30-2 Dissemination studies of Cognitive Behavioral Therapy for Citizens across Japan

Masaru Horikoshi, Ph.D.
National Center for Cognitive-Behavior Therapy and Research, NCNP, Tokyo, Japan

Overall purpose of the project

The main goal of this study is to build foundations for the widespread public use of treatment and care methods of cognitive-behavioral therapy (CBT). To meet the goal, we conduct research on CBT that focusses on national issues of sleep and pain. With the aim of increasing the availability of CBT, we also work on tele-health hybrid CBT, transdiagnostic (not limited to diagnosis) CBT, and short term CVT which enable multidisciplinary teams to provide CBT in a simplified manner

Progress in this fiscal year

Our research on CBT for sleep includes the creation of treatment materials and video teaching aids, treatment manuals.

As for CBT for pain, we are conducting a multi-site randomized controlled trial of CBT for irritable bowel syndrome based on the data obtained in the pilot study.

On telehealth hybrid CBT for depressed patients, we are conducting a clinical trial based on the workbook we developed last year.

In the research on transdiagnostic CBT we tried to find out the pathogenesis of depression and anxiety, as well as to promote equalization in group formats and CBT for children.

On short-time CBT, we developed a website for providing self-help educational materials on CBT for perinatal mental health.

Future directions

We continue to conduct clinical trials and studies, and maintain and strengthen partnership with research support departments, hospitals and other institutions to drive CBT in various clinical settings. We also promote the research projects necessary to make CBT available to the public.

３０−３　認知症・神経変性疾患の病態解明と治療・介護・予防法開発

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター理事長

水澤英洋

総括研究報告

１．研究目的

病態機序解明に関する基礎研究と治療・介護・予防に関する臨床研究の協働を通して、認知症克服のための融合的研究を展開する。NCNP病院に設置された認知症センターやAMED関連事業等と連携し、研究の効率化を進め、成果の最大化をめざす。

具体的に、１）病態機序解明研究として、病因蛋白質の凝集と伝播、それらの制御機構の解明を細胞レベル、動物モデルレベルで行い、予防・治療の標的を見いだす。さらにその成果をもとに、２）精神科医と神経内科医らによるチームが、脳画像情報、脳脊髄液・血液などバイオリソースから生み出される臨床情報を活用した研究を展開し、治療・予防法の実用化に努める。３）患者およびその家族を対象とした認知行動療法などを実践し、介護モデルの構築を図る。

２．研究組織

水澤英洋　国立精神・神経医療研究センター
和田圭司　国立精神・神経医療研究センター
荒木敏之　国立精神・神経医療研究センター
関口正幸　国立精神・神経医療研究センター
長谷川成人　東京都医学総合研究所
永井義隆　大阪大学大学院医学系研究科
村田美穂　国立精神・神経医療研究センター
（〜2018.9.9）
齊藤勇二　国立精神・神経医療研究センター
（2018.9.10〜）
功刀　浩　国立精神・神経医療研究センター
松田博史　国立精神・神経医療研究センター
堀越　勝　国立精神・神経医療研究センター
塚本　忠　国立精神・神経医療研究センター
大町佳永　国立精神・神経医療研究センター

３．研究成果

１）病態解明研究において得られた成果を臨床研究に展開

神経変性疾患における睡眠の質低下の意義を解明

従来は神経変性の進行に伴い睡眠の質が低下すると考えられていたが、睡眠障害（中途覚醒）モデルマウスを作製し、中途覚醒の増加がαシヌクレイン（α-syn）の構造変化とその蓄積を誘導することを明らかにした。さらに、当該モデルマウスの髄液中エクソソーム解析を実行し、中途覚醒の増加に伴い変動する蛋白質を複数同定した。並行して、NCNP通院中のLewy小体病患者をRBD（レム睡眠行動異常症）先行群、RBD 後発群、RBD非発症群に分け患者脳脊髄液全液及びエクソソームのオミックス解析を実施した。現在、患者、モデルマウスに共通して変動する蛋白質の解析を進めている。

脳画像評価に基づくアルツハイマー病病理の解析

タウ沈着が脳の構造的連結性に与える影響を解析した。アミロイド PET 陽性の健忘型軽度認知障害/軽度アルツハイマー型認知症（AD スペクトル群）18 例、アミロイド PET 陰性で認知機能正常の高齢者(CN 群）35 例にタウ PET イメージングを行い、さらに各群で T1 強調全脳 MRI 灰白質画像を抽出した。2mm 立方のボクセルを X,Y,Z 方向に 3 ボクセルずつ重ねた 27 ボクセルからなる立方体を全脳で作製し、立方体間の灰白質分布類似性からグラフ理論に基づき、構造ネットワーク画像（媒介中心性、クラスタ係数、特徴的経路長、次数）を作成した。CN 群では、デフォルトモードネットワーク（DMN）において大脳全体のタウ沈着は軽度であるがその増加とともに構造的連結性の増加が示された。AD スペクトル群では DMN において大脳全体のタウ沈着は CN 群に比べ顕著でその増加とともに構造的連結性の低下を認めた。タウの沈着は初期の神経細胞障害または正常な老化に伴う慢性炎症に対する代償的応答を誘導するが、アミロイドの共存は構造的連結性を変えることに作用すると考えられる。

アルツハイマー病病理と睡眠の関連性を明らかにするため、ヒト型APPノックイン(*App*$^{NL-G-F}$ KI)マウスと*MAPT* KIマウスとを掛け合わせダブルノックインマウス(*App*$^{NL-G-F}$/*MAPT* dKIマウス)を作製し、そのホモ化を終えた。予備データとしてCaMKK2の発現低下がリン酸化タウを増加させること、*MAPT*KIマウスでのCaMKK2阻害剤投与や発現抑制ベクターの導入によりリン酸化タウが増加することを明らかにしている。

伝播機序の解明と末梢由来原因蛋白質が脳機能に与える影響解析

ロテノン投与により腸管アウエルバッハ（A）神経叢ならびに求心性入力部位の迷走神経背側核（DNV）

にα-synが蓄積するモデルを確立した。溶媒投与マウスが陰性であるのに対しロテノン投与マウスでは顕著な抗リン酸化α-syn抗体陽性シグナルをA神経叢で見出した。非リン酸化α-synと異なりリン酸化α-synはプレシナプスには存在しなかった。さらにDNVを解析するため外部機関と共同で延髄孤束核や迷走神経背側核のin vivo 2光子イメージング手法を世界に先駆けて開発した。頸部迷走神経の電気刺激による孤束核神経活動イメージングに成功しており、今後腹部迷走神経活性化とDNV、孤束核の神経活動変化の関連性をロテノン投与の有無で検討する。

線維化α-synを野生型マウス脳に接種しパーキンソン病やLewy小体型認知症にみられるリン酸化α-syn病変が回路を伝わって伝播するモデルが確立されている。このモデルを用いて、L-DOPAがα-syn伝播に及ぼす影響を検討した。線条体では対照同様リン酸化α-syn量の有意な低下はみられなかったが、黒質ではL-DOPA /benserazide投与群で有意な減少が観察された。接種側および対側の黒質TH陽性ニューロンを定量したところ、対照マウスでは接種側のTH陽性細胞は対側側と比較して有意に減少したが、L-DOPA/benserazide投与群ではこの減少が抑制された。L-DOPA/benserazide投与は黒質におけるα-syn凝集、マウス脳における病的α-syn伝播を抑制すると考えられる。

治療・予防薬開発研究

植物エキス由来化合物がADモデルマウスにおける記憶・学習能力低下、シナプス関連タンパク質の発現低下を抑制することを見いだし，論文として報告した。

新規核酸分解機構RNautophagyがα-syn、ハンチンチンなど神経変性関連mRNAの分解を促進することを見いだした。さらにRNautophagyの構成因子SIDT2の発現増加が異常蛋白質の凝集を軽減することを見出した。

2) 臨床における医療・介護モデルの構築

自治体との協力体制構築

小平市市役所、同医師会と協力体制を構築し、ブレインヘルスプロジェクト小平を立ち上げた。小平市高齢者支援課および地域包括支援センターと協力して認知症状を自覚し始めた人(SCD: subjective cognitive dysfunction) をターゲットとして講演会を開催し、簡単な自記式テストにより、健常者・軽度認知症を選別し、当院もの忘れ外来受診を働きかけるシステムを構築した。このノウハウをパッケージ化することで、今後北多摩北部医療圏の他市の行政・医師会・地域包括支援センター・認知症疾患医療センターへと拡大する。

また、小平市地域包括支援センター中央センター（基幹型）から依頼を受けて、小平市「認知症地域支援推進員・認知症ケア向上事業」の一環として、認知症の家族介護者を対象とした認知行動療法研修に講師を派遣した (2017年～)。2018年には、小平市高齢福祉課および包括支援センターの協力を得て、「認知症の家族介護者を対象とした集団認知行動療法」介入研究の実施が決定し、介入プログラムを作成した。2019年5月よりプログラムを試行し、2019年10月より介入研究を開始した。

家族介護者向け認知行動療法の開発と応用

都立松沢病院、訪問看護ステーションなど4カ所と協力体制を構築し、これら施設で働く訪問看護師に対して認知行動療法研修を実施した。また、広く認知症の家族介護者のストレス・ケアに役立てていけるようテキストおよびワークシートを書籍化した。また三鷹市と協力体制を構築し包括支援センターにおいて家族介護者向け集団認知行動療法研究を実施した。

WHOプログラムの日本語化と社会実装

介護者の知識や技術の向上、精神的ストレスの軽減、自己効力感やメンタルヘルスの向上を目指し、WHO が家族等の認知症介護者のための自己学習および支援プログラム iSupport を開発した。WHO と NCNP との間で iSupport の著作権に関する契約を正式に締結し、認知症分野に精通した翻訳業者、「認知症の人と家族の会」の協力のもと動画や音声を充実させた日本語版を準備した。将来の RCT に向けて、対照群に配信予定の電子書籍「Help for care partners of people with dementia」の翻訳も行っている。併せてインターネット上で使用可能な心理評価システムを開発する予定である。

4.研究成果一覧（主任研究者・分担研究者）

【論文】計(49) 件　うち査読付論文計(36) 件

代表的なもの 5 件を記載

1. Ogawa M, Maruo K, Sone D, Shimada H, Suzuki K, Watanabe H, Matsuda H, Mizusawa H.: Longitudinal analysis of risk factors for dementia based on Mild Cognitive Impairment Screen results and questionnaire responses from healthy Japanese individuals registered in an online database. Alzheimers Dement (N Y). 2019 Aug 2; 5:347-353. doi: 10.1016/j.trci.2019.06.003. eCollection 2019.
2. Taniguchi K, Yamamoto F, Arai T, Yang J, Sakai Y, Itoh M, Mamada N, Sekiguchi M, Yamada D, Saitoh A, Kametani F, Tamaoka A, Araki YM, Wada K, Mizusawa H, Araki W.: Tyrosol Reduces Amyloid-β Oligomer Neurotoxicity and

Alleviates Synaptic, Oxidative, and Cognitive Disturbances in Alzheimer's Disease Model Mice. J Alzheimers Dis. 2019 Jun 21. 2019; 70(3):937-952. doi: 10.3233/JAD-190098.

3. Minikel EV, Vallabh SM, Orseth MC, Brandel JP, Haïk S, Laplanche JL, Zerr I, Parchi P, Capellari S, Safar J, Kenny J, Fong JC, Takada LT, Ponto C, Hermann P, Knipper T, Stehmann C, Kitamoto T, Ae R, Hamaguchi T, Sanjo N, Tsukamoto T, Mizusawa H, Collins SJ, Chiesa R, Roiter I, de Pedro-Cuesta J, Calero M, Geschwind MD, Yamada M, Nakamura Y, Mead S. Age at onset in genetic prion disease and the design of preventive clinical trials. Neurology. 2019 Jul 9; 93(2): e125-e134. doi: 10.1212/WNL.0000000000007745. Epub 2019 Jun 6.
4. Hashiguchi S, Doi H, Kunii M, Nakamura Y, Shimuta M, Suzuki E, Koyano S, Okubo M, Kishida H, Shiina M, Ogata K, Hirashima F, Inoue Y, Kubota S, Hayashi N, Nakamura H, Takahashi K, Katsumoto A, Tada M, Tanaka K, Sasaoka T, Miyatake S, Miyake N, Saitsu H, Sato N, Ozaki K, Ohta K, Yokota T, Mizusawa H, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Morishita S, Tsuji S, Takeuchi H, Ishikawa K, Matsumoto N, Ishikawa T, Tanaka F. Ataxic phenotype with altered CaV3.1 channel property in a mouse model for spinocerebellar ataxia 42. Neurobiol Dis. 2019 Oct;130:104516. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104516. Epub 2019 Jun 20.
5. Minakawa E.N., Popiel H.A.(equal contribution), Tada M., Takahashi T., Yamane H., Saitoh Y., Takahashi Y., Ozawa D., Takeda A., Takeuchi T., Okamoto Y., Yamamoto K., Suzuki M., Fujita H., Ito C., Yagihara H., Saito Y., Watase K., Adachi H., Katsuno M. Mochizuki H., Shiraki K., Sobue G., Toda T., Wada K., Onodera O., *Nagai Y. Arginine is a disease modifier of polyQ disease models that stabilizes polyQ protein conformation. Brain doi: 10.1093/brain/awaa115.

【図　書】計(8)件　代表的なものを記載

1. 水澤英洋：中山書店　改定第 9 版内科学書　6 神経変性疾患 総論. Vol.6 血液･造血器疾患 神経疾患 2019.8.30: 408-423
2. 塚本忠、水澤英洋、日本医事新報社、炎症性・脱髄性疾患 プリオン病. 私の治療 2019-20 年度版、2019.7.5、584-586.
3. 水澤英洋ほか、プリオン病感染予防ガイドライン作成委員会 厚生労働省「プリオン病のサーベイランスと感染予防に関する調査研究班」 日本神経学会、プリオン病感染予防ガイドライン 2020、2020.3、全 42 頁.

【学会発表】計(63)件　代表的なものを記載

1. Hama Y, Date H, Ishiura H, Mitsui J, Yoshimura J, Doi K, Morishita S, Tsuji S, Murata M, Mizusawa H, Takahashi Y.: Molecular background of ALS based on whole exome sequencing analysis. AAN2019(American Academy of Neurology) 2019.5.5
2. Tsukamoto T, Yabu-uchi N, Uchiyama Y, Kizaki N, Nakagawa I, Mizusawa H.: Application of the cloud database in the management of prion disease surveillance questionnaire. Asian Pacific Prion Symposium. 2019.10.3
3. Hamaguchi T, Sakai K, Kobayashi, A, Kitamoto T, Ae R, Nakamura Y, Sanjo N, Arai K, Koide M, Katada F, Harada M, Murai H, Murayama S, Tsukamoto T, Mizusawa H, Yamada M. Characterization of "sporadic CJD" with history of neurosurgery to identify potentially iatrogenic cases., Asian Pacific Prion Symposium 2019, 2019.10.3-4
4. Mizusawa H, Nanbyo (Rare disease) policy in Japan, 2019 Annual Meeting of the Society for Neurological Rare Disorders-Taiwan (SNeRD-T), 2019.9.8.
5. Nagai Y. Disease-modifying therapy for the polyglutamine diseases targeting protein misfolding and aggregation. The JSPS Core-toCore Program Seminar; Towards a cure for amyloid diseases (Dec 16-19, 2019, Pavia, Italy)
6. 塚本忠、藪内奈津子、内山裕子、木﨑菜津子、中川いずみ、水澤英洋: プリオン病サーベイランス調査票のデジタル化およびクラウド化. 第 24 回日本神経感染症学会総合・学術大会 2019.10.11

記憶に関する病態生理学研究

分担研究者　和田圭司
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター
神経研究所

緒言

アルツハイマー型認知症（AD）では軽度認知障害（MCI）などより早期の段階での診断、治療介入の必要性が認識されてきている。AD 病態において、アミロイドβタンパク質（Aβ）の可溶性集合体であるAβオリゴマーが重要な発症因子と考えられている。他方、AD をはじめとする認知症の発症には、遺伝的要因に加え、ストレスや生活習慣といった環境要因が深く関わっていることが指摘されている。本研究では、蛋白質・核酸代謝のホメオスターシスに焦点を当て環境要因と遺伝要因が蛋白質・核酸代謝、凝集性の変化を通して神経細胞機能、神経回路機能にどのように影響するかを明らかにする。さらにこれまでに同定した治療薬候補物質を、動物モデル及び培養神経細胞系を用いて検証するとともに、臨床試験等に有効なバイオマーカーの開発を目指す。

方法

今年度用いた方法開花の通りである。

①治療薬候補の開発

独自に同定したAβ42 オリゴマーの神経毒性を低減する植物由来の低分子化合物の治療的有効性をモデル動物と培養神経細胞を用いて検証する。

②生活習慣と認知機能に関する研究

多価不飽和脂肪酸の摂取が脳機能に及ぼす影響をマウスで検討した。

③神経変性疾患原因遺伝子の分解機構解析

我々が独自に見出している RNautophagy/DNautophagy において神経変性疾患原因遺伝子が基質となるかどうかを検討した。別途、新たなオートファジー経路の探索を行った。

結果

① 治療薬候補の開発

研究成果を論文として報告した。

② 生活習慣と認知機能に関する研究

高ω3 餌摂取により強制水泳試験における抗うつ薬応答性行動（無動時間）は減少し、この減少には高ω3 餌摂取による腹側被蓋野－側坐核ドパミン神経系が関与することを報告してきた。本研究に使用した高ω3 餌はクリル油を添加したものであるが、ω3 としてクリル油ではなく魚油または化学合成された EPA エチルエステルを添加した餌を摂取した動物においても無動時間を調べた。魚油および EPA エチルエステルを添加した高ω3 餌でも無動時間の有意な低下が観察されたが、クリル油を添加したものほど劇的な低下ではなかった。

③ 神経変性疾患原因遺伝子の分解機構解析

CAG リピート長依存的に Htt mRNA (exon1)が SIDT2 細胞質側に結合することを見いだした。その結合には、SIDT2 の細胞質側アルギニンリッチモチーフが必要であることを発見した。

考察および結論

今年度の研究成果に対する考察は以下の通りである。

生活習慣と認知機能に関する研究

魚油に含まれるω3 脂肪酸の多くはトリグリセリドであり、一方、クリル油に含まれるω3 脂肪酸の多くはリン脂質である。トリグリセリドやエチルエステルと比較しリン脂質は生体内に取り込まれやすいということが報告されており、今回の結果はこの bioavailability の違いを反映するものであると思われた。

神経変性疾患原因遺伝子の分解機構解析

今回の結果は SIDT2 が治療薬開発の標的分子になる可能性を示している。

参考文献

Taniguchi, K, Yamamoto, F., Arai, T., Yang, J., Sakai, Y., Itoh, M., Mamada, N., Sekiguchi, M., Yamada, D., Saitoh, A., Kametani, F., Tamaoka, A., Araki, Y.M., Wada, K., Mizusawa, H., Araki, W. Tyrosol reduces amyloid-b oligomert neurotoxicity and alleviates synaptic, oxidative, and cognitive disturbances in Alzheimer's disease model mice. J. Alzheimers Dis., 70, 937-952, 2019.

Hase, K., Contu, V.R., Takahashi, M., Kabuta, C., Hakuno, F., Takahashi, S.I., Fujiwara, Y., Wada, K., Kabuta, T. Cytosolic domain of SIDT2 carries an arginine-rich motif that binds to RNA/DNA and is important for the direct transport of nucleic acids into lysosomes. Autophagy, Jan 16:1-15, 2020.

APP ノックイン、タウノックインマウスを用いた認知症発症機序に関する研究

分担研究者　荒木敏之
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　疾病研究第五部

緒言

アルツハイマー病の危険因子の一つは加齢であると考えられているが，その一方で、その分子レベルの実体は十分に解明されていない。本研究は，加齢と類似した変化を加速的に進行させることが明らかとなった「間欠的低酸素負荷 (IHT) マウスモデル」を活用し、認知症をはじめとする神経変性疾患の発症または進行に関して，加齢がどのような影響を及ぼすのかを解明することを目的とする。従来の研究ツールでは，この問題に踏み込むことは難しかったが，本研究では，よりヒトの病状を反映すると期待されるモデルとして、ヒト型のアルツハイマー病関係タンパク質を生理的レベルで発現するモデル（APP ノックインマウス、タウノックインマウス）を用い、ストレスや老化に関連した刺激の意義に関する研究を行う。

方法

本研究では IHT モデルをヒト型 APP ノックインマウスノックイン(AppNL-G-F KI)マウス、Tau ノックイン（MAPT-KI）マウスに適用することにより，APP 蓄積、タウ過剰リン酸化のメカニズムの検討を個なっている。今年度は、主として MAPT-KI マウスを用い、IHT 負荷後の細胞内シグナル変化を検討した。

結果

昨年度までに，神経活動や神経活動依存的な新規遺伝子発現が，リン酸化タウの増減に影響を与えることを明らかにした。その過程で，CaMKK2 の発現低下もしくは活性低下によって，リン酸化タウが増加することを見出した。そして，MAPT KI マウスに対する CaMKK2 の阻害剤投与や発現抑制ベクターの導入実験を行い，リン酸化タウが増加することを明らかにした。

本年度は，MAPT KI マウスに対する CaMKK2 の発現抑制ベクター導入実験を引き続き行った。リン酸化タウが増加すること，界面活性剤に不溶性のタウが増える傾向があることを見出した。また，抗タウ抗体による免疫染色を行ったところ，タウの局在に変化が起きている可能性を見出した。

次に，c-fos や Arc を指標とし，神経活動依存的な遺伝子発現の程度を評価した。CaMKK2 の発現抑制ベクターを導入したマウスでは，対照群に比べ，c-fos や Arc が増加している傾向があった。

また，上記の実験と並行し，リン酸化タウを増加させることが分かっている刺激，間欠的低酸素負荷（IHT）も，MAPT KI マウスに対して実施した。上述と同様の解析を行い，この実験系においても，c-fos や Arc が増加している傾向を認めた。

さらに，昨年度から今年度にかけて AppNL-G-F KI マウスと MAPT KI マウスとを掛け合わせダブルノックインマウス(AppNL-G-F/MAPT dKI マウス)を作製し，そのホモ化を終えた。本年度は，このマウスを用いた実験を開始した。

考察

今後まず，AppNL-G-F/MAPT dKI マウスに対して，CaMKK2 の発現抑制ベクター導入実験や IHT を行い，これまで行ってきたのと同じ解析を行う。MAPT KI マウスと比較することにより，アミロイドβタンパク質の存在がどのような影響を及ぼすのかを明らかにする。特に，MAPT KI マウスに比べて，より不溶性のタウが出現するか，局在変化が顕著になるか，などを調べる。

また，IHT によって c-fos や Arc 陽性細胞の数が増加することを見出しているが，部位に関してはまだ漠然とした部分がある。今後は，前-後，背-腹など，脳の部位の違いにも着目し，影響を受けやすい部位を明らかにする。

現時点での仮説は，神経活動の亢進がリン酸化タウを増加させ，この状態が持続することでタウが蓄積する，ということである。この仮説の真偽を検証するため，(1)何らかの方法で神経活動を抑制し，これまで見てきた現象が緩和されるかどうかを調べる，(2)CaMKK2 の発現抑制や IHT によって影響を受けるシグナル経路を見出し，そこに対する介入実験を行う，などの方法を模索する。

文献

Takahashi Y, Uchino A, Shioya A, Sano T, Matsumoto C, Numata-Uematsu Y, Nagano S, Araki T, Murata M, Murayama S, Saito Y. Altered immunoreactivity of ErbB4, a causative gene product for ALS19. Neuropathology Volume 39, Issue 4、Pages: 268-278, August, 2019.

自律神経による求心性情報と神経変性疾患

分担研究者　関口正幸
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　疾病研究第四部

緒言

パーキンソン病における Braak の病変上行仮説をモデルマウスにおいて検証することが本研究の主要な目的である。

この目的のために、ミトコンドリア電子伝達系複合体１阻害剤であるロテノンの経口投与により、腸管でα-シヌクレイン（α-syn）の発現が増加するマウスを作出した。このモデルマウスでは、病理学的に重要な S-129 リン酸化α-シヌクレイン(p-α-syn)の増加について確実なデータは示されていない。また、p-α-syn の腸管神経系内での詳細な分布についても報告がない。

そこで本研究では、ロテノン投与で腸管神経系において p-α-syn が増加するかどうか、さらには p-α-syn が分布する細胞内ドメインや細胞種について知見を得るべく免疫組織化学的検討を行った。比較のため、α-syn の分布についても同様な検討を行った。

方法

⑴α-synが腸管神経叢に蓄積するマウスの作出：昨年度の当研究班での検討に従い、7週齢雄性マウスにロテノン10mg/kgを経口投与（1回/day、5回/weekで4週間）し、当該マウスを作出した。

⑵ロテノンマウス腸管におけるp-α-synシグナル：上記で作成したマウス腸管から組織切片を作成し、一部は抗p-α-syn抗体と反応後DAB染色した。また、一部は抗p-α-syn抗体と反応後、腸管神経系神経細胞のマーカー（NOS、calbindin、calretinin）およびプレシナプスマーカー（synaptophysin）に対する抗体とも反応させ蛍光二次抗体を用いて二重染色した。

⑶ロテノンマウス腸管おけるα-syn発現：比較のため、抗α-syn抗体とNOS、calbindin、calretinin、synaptophysinに対する抗体で二重蛍光染色した。

⑷カハール介在細胞（ICC）：この細胞は近年腸管の自発的な蠕動運動の制御に重要なことが判明した間質系細胞である。ロテノン投与はICCにおいて細胞内カルシウム動態に影響を与えるという報告がある。そこで、ロテノン投与によるICC特異的抗体の染色性変化について検討した。

結果

⑴α-synが腸管神経叢に蓄積するマウスの作出：昨年の報告同様、ロテノン経口投与により結腸で顕著な抗α-syn抗体シグナル増加が観察された。

⑵ロテノンマウス結腸におけるp-α-syn蓄積：ロテノンマウス結腸において、抗p-α-syn抗体による免疫陽性シグナルはAuerbach神経叢に広範に見られた。DAB染色の結果では、ロテノン投与マウスでAuerbach神経叢（1匹のマウスから50程度観察）の44.2±9.5％（3匹からの平均値）にp-α-syn陽性シグナルが認められた。同様なシグナルは対照マウス（vehicle投与群）でも見られたが、その頻度は神経叢の15.1±4.2％(n=3)においてであり、これはロテノン投与個体に比べて有意に低い値であった（P = 0.048, Two-tailed unpaired t-test）。

蛍光染色において、ロテノン投与群ではp-α-syn陽性シグナルは抗synaptophysin抗体シグナルと全くマージしなかった。このデータは、腸管神経系におけるp-α-synのプレシナプス局在を支持しない。一方、抗α-syn抗体陽性シグナルの2-3割はsynaptophysin陽性シグナルとマージしたので、α-synそのものは神経叢のプレシナプス部位に局在する場合もあると考えられた。

⑶ロテノンマウス結腸においてp-α-synが蓄積する細胞：蛍光染色の結果、抗p-α-syn抗体陽性シグナルはcalbindin陽性細胞やcalretinin陽性細胞に観察されることが多かった。一方、同シグナルがNOS陽性細胞に観察されることは少なかった。

⑷ICC:ロテノン投与とvehicle投与でICCの染色像に見かけ上の違いは見出せなかった。

考察

ロテノン投与により腸管神経叢内部にα-syn免疫陽性シグナルが増加することは他の研究者によっても指摘されていたが、p-α-synについては確実な報告がなかった。本年度の我々の研究で得られた、ロテノン投与による抗p-α-syn抗体由来シグナル陽性Auerbach神経叢率の上昇は、ロテノン投与によるp-α-synの増加を示す可能性があるが、さらに検討が必要と思われる。

ロテノン投与マウス結腸神経叢のp-α-synが全くsynaptophysinとマージしないという結果は、HuA53T-Tgマウス脳において、p-α-synがプレシナプスには存在しないとする既報[1)]と符合する。我々の検討でα-synそのものはプレシナプスに局在している場合もあることが示されたが、ロテノン投与で生成するp-α-synは腸管神経系においてプレシナプス部位に存在しなくなる可能性が考えられた。

また、ロテノン投与マウス結腸神経叢でp-α-synが好んで蓄積する細胞としてcalbindinやcalretininなどのカルシウム結合タンパク質を発現する細胞が指摘された点は、ミトコンドリアのカル

シウム貯蔵オルガネラとしての機能と関係するのかもしれないが、その詳細は不明である。

今後、HuA53T-Tgマウス腸管での今回と同様な免疫組織化学的検討や、同マウス迷走神経背側核などでの電気生理学的検討を計画している。

参考文献 1)Acta Neuropathol,120:145-154,2010.

認知症の進行に関わる異常分子の毒性と制御

分担研究者　長谷川成人
東京都医学総合研究所

諸言

アルツハイマー病をはじめとする認知症やパーキンソン病、ALS などの神経変性疾患では、それぞれの疾患に特徴的な異常型タンパク質の蓄積病変が観察され、病変分布と症状、あるいは病変の広がりと病態進行が密接に関係していることが知られている。近年、これらの異常タンパク質病変の形成、伝播の機序として、プリオン病における異常型 PrP の形成、伝播と同じメカニズムがおこることを示す実験的証拠が蓄積し注目を集めている。本研究では様々な神経変性疾患のプリオン様伝播を再現する細胞や動物モデルを構築し、メカニズムの解明や治療方法の開発を行うための基礎となる患者剖検脳に蓄積する異常型タンパク質の解析を行うと共に、細胞、マウスモデルの構築を行う。今年度はαシヌクレイン伝播のマウスモデルを用いて、L-DOPA(レボドパ)の効果について検討した。また大脳皮質基底核変性症(CBD)患者脳に蓄積するタウの構造について英国 MRC との共同研究でクライオ電顕による解析を行った。

方法

リコンビナントマウスαシヌクレインを線維化して異常型αシヌクレインを調製した。この線維を野生型マウスの脳の線条体に接種し、その 28 日後に、マウスを 2 つのグループに分け（各 10 匹）、生理食塩水、または 200mg/kg L-DOPA（75mg/kg benserazide との合剤）を 1 日 1 回、経口投与した。その後、マウスの脳をホルマリン固定後、切片をリン酸化αシヌクレイン抗体で染色し、陽性構造を定量した。

CBD 患者脳に蓄積するタウの構造解析については、日本ブレインバンクネットに登録され、神経病理学的に確定診断がついた 3 名の CBD 患者脳からサルコシル不溶性画分を調製し、さらに洗浄などを繰り返して線維化タウを精製し、英国 MRC 分子生物学研究所においてクライオ電子顕微鏡による構造解析を行った。

結果

αシヌクレイン伝播に対する L-DOPA の効果

αシヌクレイン線維接種の 2 か月後においても線条体、黒質、扁桃体、皮質、および他のさまざまな脳領域においてリン酸化αシヌクレインの異常病理が観察された。陽性構造を定量、比較した結果、線条体では、L-DOPA/ benserazide で処置したマウスは、対照と比較してリン酸化αシヌクレインの量に有意な低下はみられなかったが、黒質では、L-DOPA /benserazide 投与群で、有意な減少が観察された（$p<0.001$）1)。扁桃体でも減少が観察されたが、統計的有意差は見出せなかった（$p<0.1$）。また、接種側および対側の黒質の TH 陽性ニューロンを定量したところ、生理食塩水を投与したマウスでは、接種側の TH 陽性細胞は対側側と比較して有意に減少したが、L-DOPA/ benserazide 投与群ではこの減少が抑制された 1)。これらの結果は、L-DOPA/ benserazide が黒質におけるαシヌクレインの凝集、マウスの脳における病的αシヌクレインの伝播を抑制することを示唆する。

CBD 患者脳のタウの構造

3 例の患者はいずれも CBD に特徴的な astrocytic plaques が認められ、多数の神経細胞、グリア細胞内病変が観察された。凍結剖検脳から不溶性画分を調製し、通常免疫電顕解析を行った結果、3 例とも、直径が約 10nm の narrow な線維と、直径約 25nm の wide な線維が観察された。Wide な線維は約 140nm 程度の周期でねじれたリボン様の構造をした微粒子として観察された。そこで narrow 線維を type I, wide 線維を type II と解析した。生化学的にはいずれも全長 4R タウバンドの蓄積に加え、CBD に特徴的な 37kD のタウ C 末端断片が検出された。CBD 患者脳から精製した異常型タウ線維をクライオ電顕によって解析した結果、世界で初めて 2.8Å~3.2Å レベルでその構造を明らかにすることに成功した。CBD タウ線維の中心構造は、タウの微小管結合領域にある繰り返し配列 1(R1)の最後の残基 K274 からはじまり、R2、R3、R4 の全体、および R4 の後の 12 個のアミノ酸にまたがる新規の 4 層構造を形成していた。また、線維の中心部分には、非タンパク質性のコファクター（おそらくポリアニオン）の存在も明らかとなった。筆者らが以前報告したトリプシン耐性の線維中心領域とほぼ合致するものであった。

結論

α シヌクレイン線維を野生型マウスの脳の線条体に接種するモデルに、接種後一ヶ月で、L-DOPA/ benserazide を一ヶ月間、経口投与すると、L-DOPA /benserazide 投与群の黒質において、αシヌクレイン病変の有意な減少が観察された（$p<0.001$）。この結果は L-DOPA がαシヌクレインの伝播を抑える効果があることを示唆する。

MRC との共同研究により、CBD 患者脳に蓄積する異常型タウ線維をクライオ電顕解析し、世界で初めて 2.8Å~3.2Å の原子レベルでその構造を明らかにした。その構造は症例間で同一であったが、アルツハイマー病、ピック病、CTE の症例とは異なる新規

の構造であった。また線維の中心タウの K274-E380 を含む新規の４層構造を形成し、その中心部分には非タンパク質性のコファクター (ポリアニオン) の存在が明らかとなった。異なるタウの構造が様々なタウオパチーの病態を決定するという考えを支持するものである。

参考文献

1. Shimozawa A, Fujita Y, Kondo H, Takimoto Y, Terada M, Sunagi M, Hisanaga SI, Hasegawa M. Effect of L-DOPA/benserazide on propagation of pathological α-synuclein. ***Front Neurosci*** 13:595. 2019. doi: 10.3389/fnins.2019.00595. 査読有
2. Zhang W, Tarutani A, Newell K, Murzin A, Matsubara T, Falcon B, Vidal R, Garringer H, Shi Y, Ikeuchi T, Murayama S, Ghetti B, Hasegawa M, Goedert M, Scheres SHW. Novel tau filament fold in corticobasal degeneration. ***Nature*** 580 (7802): 283-287, 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2043-0. 査読有

認知症・神経変性疾患におけるライフスタイル環境要因の影響とその予防法の開発

分担研究者　永井義隆
大阪大学大学院医学系研究科
神経難病認知症探索治療学寄附講座

緒言

アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病(PD)、レビー小体型認知症、前頭側頭葉型認知症（FTD）など、加齢に伴って発症する認知症や神経変性疾患の克服は、高齢化が進行するわが国における喫緊の課題である。これらの認知症や神経変性疾患においては、蛋白質あるいはRNAの凝集と蓄積が病態の中核を成すことが明らかにされてきた。

本研究の目的は、病原性蛋白質やRNAの凝集と蓄積を誘発する生体側の因子として、食事、運動、睡眠などのライフスタイル環境要因に着目し、これらの環境要因が神経変性病態に及ぼす影響を明らかにするとともに、そのメカニズムを解明することである。

本年度は、ヒトと相同性の高い睡眠－覚醒制御機構を持つモデル動物であるマウスの特性を生かして、神経変性疾患患者にしばしば合併する睡眠の異常がPDモデルマウスの脳病理に及ぼす影響を検討した。また睡眠の異常を合併したPD患者脳脊髄液（CSF）中蛋白質の網羅的解析を行った。

方法と結果

PDモデルマウスに慢性的な睡眠の異常を誘導した後に脳を採取して病理解析を行い、対照群と比較した。

また当センターのバイオバンクに登録されたPD患者CSFのうちCSF採取と終夜睡眠ポリグラフ検査（PSG）を同時期に実施された症例を対象として、公益財団法人がん研究会植田幸嗣博士との共同研究によりCSFのLC-MS/MS解析を行い、PSGにおける睡眠指標との関連解析を行った。

結果と考察

慢性的な睡眠の異常を誘導したPDモデルマウス脳ではPD病理が対照群よりも有意に悪化していた。この結果は睡眠がPD病態に寄与するライフスタイル要因の一つであることを示唆している。

われわれはこれまでに慢性的な中途覚醒の増加がADモデルマウス脳のAβ病理を悪化させることを見出しているが[1]、今回、睡眠の異常による病態進行がAD特異的な現象ではない可能性を見出した。従来、中途覚醒の増加をはじめとする神経変性患者の睡眠の異常は、神経変性病理が睡眠－覚醒や概日リズムの制御機構に波及した結果として生じるものと考えられてきたが、われわれの結果は従来の考え方とは逆に、睡眠の異常が神経変性病態を進行させることを示唆する。ADの発症や進行と睡眠の異常の関連は疫学研究においても以前から指摘されてきたが[2]、最近PDにおいても同様の報告がなされた[3]。以上より、睡眠は様々な神経変性疾患に共通して病態に寄与するライフスタイル要因である可能性があると考えられる。

一方、LC-MS/MS解析によりPD患者CSFから同定した蛋白質の中にPSGにおける睡眠指標と関連が見られる分子を複数同定した。今後これらの各分子を手がかりとして、睡眠の異常によるPD病態進行の背景にある分子機構を明らかにしていきたい。

結論

認知症や神経変性疾患特有のライフスタイル環境要因である睡眠の異常が、これらの疾患の病態を修飾する因子である可能性を明らかにした。ライフスタイル環境要因は特に孤発性神経変性認知症に対する新たな治療介入点の候補であり、今後もこれらの要因と蛋白質およびRNAの品質恒常性をはじめとする認知症や神経変性疾患の病態との関連について研究を進めていきたい。

参考文献

1） Minakawa EN, Miyazaki K, Maruo K, Yagihara H, Fujita H, Wada K, Nagai Y. Chronic sleep fragmentation exacerbates amyloid β deposition in Alzheimer’s disease model mice, ***Neurosci Lett***. 2017;653: 362-369.

2） Minakawa EN, Wada K, Nagai Y. Sleep disturbance as a potential modifiable risk factor for Alzheimer's disease. ***Int J Mol Sci*** 2019, 20(4). pii: E803.

3） Schreiner SJ, Imbach LL, Werth E, etal. Slow-wave sleep and motor progression in Parkinson disease. ***Ann Neurol*** 2019, 85(5):765-70.

Lewy 小体病における認知症発症リスクの同定に関する研究

分担研究者　齊藤勇二
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター
病院脳神経内科診療部医師

緒言

パーキンソン病（PD）などの Lewy 小体病において，認知症の合併は予後不良因子であり，PD 患者における認知症の発症リスクとしては嗅覚低下やレム睡眠行動異常症（RBD），自律神経障害などが考えられている．近年，PD 患者の運動症状発症以前からすでに睡眠障害や精神症状，自律神経障害などの非運動症状がみられ，これらが将来の PD 発症を予測するバイオマーカーとして注目されている．これらの発症予測マーカーのうち，RBD は特に有用と考えられ，パーキンソン病のみならず，他の Lewy 小体病であるレビー小体型認知症や多系統萎縮症でも高頻度にみられ，このことから RBD と認知症とのつながりが考えられる．さらに，RBD 患者では嗅覚障害や自律神経障害などの合併が多いなど，認知症の発症リスクと互いに関連していることが推察される．

本研究では Lewy 小体病患者における RBD の存在や出現様式による特徴によって分類し，認知症に関連するとされる嗅覚低下・自律神経障害がどのように認知症の発症･進展に影響するかを明らかにし，Lewy 小体病における認知症発症リスク因子を同定することを明らかにする．さらに，脳脊髄液中の蛋白質を網羅的に解析・比較し，認知症発症に関わる分子を同定してバイオマーカーとしての有用性を検討することを目的とする．

方法

本研究では Lewy 小体病患者の臨床症状のうち RBD の出現形式により細分化し，グループごとの生体試料を網羅的に解析して各群の細胞内の分子動態がどのように異なるかを解析し，Lewy 小体病の認知症病態を解明する．

1）Lewy 小体病患者の臨床症状はすでに NCNP 病院のコホート研究を利用して検討した．運動症状だけでなく，認知症に関連するとされる睡眠障害や自律神経障害，嗅覚障害といった臨床症状に加え，髄液中タウ濃度などに着目して PD 患者群の細分化を行った．

2）1）の臨床データに基づいて細分化した PD 患者の脳脊髄液を網羅的に解析したデータをもとに，有用な分子が見いだせるか統計学的に検討した．なお，脳脊髄液の網羅的解析はがん研究会植田幸嗣博士により行われた．

結果

本年度は昨年度に引き続き，パーキンソン病評価入院患者のうち，認知機能の発症リスクとされている睡眠障害（RBD）と運動症状の発症時期の違いにより患者群を分け，臨床的な認知機能の進行の経時的データを検討した．例数が少ないものの，RBD が先行した群では RBD が運動症状に遅れて出現した群および RBD が認められない群に比べて認知機能の低下が速い傾向がみられた．また，これらの群における全脳脊髄液および脳脊髄液中エクソソーム中のプロテオーム解析を継続した結果，網羅的解析で得られた蛋白質はそれぞれ 1388，1952 蛋白質にのぼり，このうち 694 蛋白質が全脳脊髄液および脳脊髄液中エクソソームの両者で検出ができた．さらに，RBD が先行した群を基準にした認知症に関連した候補蛋白質の絞り込みを行い，RBD 後発群および RBD 非発症群でそれぞれ 40，19 蛋白質を絞り込んだ．また，発現変動分子を抽出し、分子ネットワーク解析を行い，候補蛋白質についての生体内役割について特異的な発現変動がみられる分子を検索している．

考察

パーキンソン病など Lewy 小体病の運動症状発症前のマーカーとして注目されている睡眠障害である RBD の存在は認知機能低下を併発しやすいといわれているが，その発症時期により認知機能や自律神経障害（血圧調節障害）などの非運動症状に及ぼす影響が異なり，RBD の存在だけでなく，その出現様式によっても認知機能の進行度が変化することが本研究から明らかになり，RBD の責任病巣と血圧調節障害の責任病巣への広がりに関連があることが示唆された．

さらにこのような RBD に着目して分類したグループ間で脳脊髄液中の蛋白質の網羅的解析を行った結果，各群で発現量の違いがみられる蛋白質が存在することが明らかになった。この発現量の違いがどのような理由によるものかという意義づけを複数の解析方法を用いて検討する必要がある．

結論

PD など Lewy 小体病における認知症発症リスクの同定に関する臨床・分子的バイオマーカーの探索を行った．睡眠障害の有無により臨床症状の違いがみられ，その分子的基盤を明らかにすることでバイオマーカーの同定ができる可能性がある．

参考文献　なし

脳脊髄液試料を活用した認知症の分子病態と脳画像に関する研究

分担研究者　功刀浩 [1)]
服部功太郎 [1),2)]、石渡小百合 [1)]、高居久義 [3)]
1) 国立精神・神経医療研究センター　神経研究所　疾病研究第三部　2) 同・メディカル・ゲノムセンター
3) 川崎市健康安全研究所

緒言

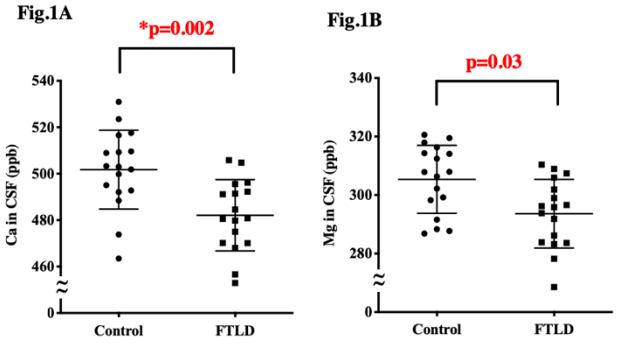
前頭側頭型痴呆(FTLD)は人格変化や行動・言語障害を特徴とする認知症で、若年性認知症の 20%を占めるがいまだに診断に有用なバイオマーカーは見いだされていない。我々は、脳脊髄液(CSF)中のオミックスを行い FTLD の脳内分子病態の解明と診断マーカーの開発を目指している。今年度は CSF 中の微量元素について網羅的な測定を行った。

方法

FTLD 群(n=17)と健康高齢者群(n=17)について誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)法により 10 種類の微量元素(ナトリウム:Na、マグネシウム:Mg、リン:P、カリウム:K、カルシウム:Ca、鉄:Fe、銅:Cu、亜鉛:Zn、ルビジウム:Rb、鉛:Pb)の同時測定を試みた。変動係数値が 10%、添加回収試験の回収率が 110%を超える値を定量下限とした。両群間の平均の差の検定を行うと共に、各種元素間の関連を調べた。

結果

対照群と比較して FTLD 群では CSF 中の Ca 量が有意に減少していた(年齢・性を統制した ANCOVA、p=0.002, Fig. 1A)。また、Mg 量も有意な減少を認めた(p=0.03, Fig. 1B)。Pb および Rb に関しては一部検体が定量下限以下であったため、今回の解析からは除外した。その他の微量元素に関しては両群間において有意差は認められなかった。



また、各種元素間の関連を検討したところ、健常者では Cu と Zn、Cu と Ca 間に有意な正の相関が認められたものの、FTLD 患者では相関が認められなかった。一方、Na と Mg では、両群において有意な正の相関が認められた(Table 1)。

Table 1

元素	Zn vs Cu	Ca vs Cu	Mg vs Na
Control	**r=0.79 p=0.0004**	**r=0.78 p=0.0006**	**r=0.80 p=0.00034**
FTLD	r=0.08 p=0.79	r=0.25 p=0.37	**r=0.81 p=0.00025**

考察

アルツハイマー型認知症患者では本研究と同様に CSF 中 Ca 濃度の減少が報告され[1)]、レビー小体型認知症患者では CSF 中 Ca や Mg の有意な増加[2)]が報告されている。血清中の Ca や Mg は糖尿病、心不全、脳卒中歴、利尿剤の使用等により影響を受けるため CSF 中 Ca や Mg 量が同様の影響を受けている可能性も考えられる。統合失調症や大うつ病患者では CSF 中微量元素の有意な変化が認められなかったため(未発表データ)、他の精神疾患との鑑別に有用な可能性がある。FTLD 群では健常群と比較して元素間の相関が崩れている組合わせが認められ、こうしたバランス異常が脳内での神経活動や機能を障害している可能性がある。

結論

FTLD 患者では CSF 中 Ca および Mg 量の有意な減少が認められた。しかしながら、本研究では検体数およびそれにともなう服薬情報や FTLD 亜型などの情報が限られていた。今後、詳細な臨床情報を含む多検体での検討が重要となる。また、同様の患者において末梢での微量元素測定も行い、両群間において末梢−中枢のバランスが崩れていないかも検討していく予定である。

参考文献

1) Subhash MN et al. Neurobiol Aging. 1991, 12:267-9.
2) Boström F et al. Neurobiol Aging. 2009, 30:1265-71.

認知症におけるPET分子イメージングに関する研究

分担研究者　松田博史
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター
脳病態統合イメージングセンター

緒言

アルツハイマー病（AD）は、細胞外アミロイド-β（Aβ）プラークと過剰リン酸化タウで構成される細胞内神経原線維変化の存在によって特徴付けられる。これらのタンパク質は局所シナプス破壊に関連しているため、ADは局所シナプス機能不全を伴う切断症候群とみなすことができる。機能的磁気共鳴画像法（fMRI）、脳波記録、脳磁図などのいくつかの神経画像診断法を使用して、ADの脳ネットワークを研究する多くの研究によってグラフ理論解析が行われている。最近では、拡散テンソルイメージング(DTI)またはT1強調イメージングを使用した構造ネットワーク解析が注目されている。T1強調画像を使用した構造ネットワークに関するこれまでの研究は、個人全体の皮質の厚さまたは体積に基づいており、グループレベルの分析に限定されていた。しかし、最近提案された方法により、皮質の類似性に基づいた個人レベルの分析が可能になった。本研究の目的は、健常高齢者とアルツハイマー病患者との間の灰白質類似性に基づいた構造ネットワーク分析を使用して、われわれがすでに報告した自動拡散コネクトメトリー分析で見られるものと同様の18F-THK5351保持関連ネットワークの変化が得られるかどうかを検証することである。

方法

患者群および対照群

健忘性の軽度認知障害5人と早期AD患者13人の計18人をADスペクトル患者群として募集した。これらの患者は11C-PIB PET画像の視覚的評価によって陽性であった。患者群は69.5±8.7歳（平均±標準偏差）であり、MMSEスコアは22.1±4.7（平均±SD）であり、Clinical Dementia Rating（CDR）は0.5および1.0である。対照として、正常な認知機能を有する30人の健康な日本人（Cognitively Normal; CN群）を募集した。これらの対照群は視覚的に正常な11C-PIBおよび18F-THK5351 PET結果を示した。年齢は68.1±6.5歳であり、平均MMSEスコアは29.1±1.1、CDRは0であった。国立精神・神経医療研究センターの倫理審査委員会の承認を得て、すべての被験者から、この試験に参加するという書面による同意を得た。

画像取得

すべての参加者は、32チャンネルヘッドコイルを使用して3-T MRIシステム(Verio、Siemens、Erlangen、ドイツ）でMRIスキャンを受けた。高空間分解能、３次元サジタルT1強調MPRAGE画像を取得した。

個人レベルの構造ネットワーク

ボクセルサイズを標準化し、次元を減らすために、すべてのネイティブセグメント化された灰白質画像を2 mm×2 mm×2 mmの等ボクセルに再スライスした。単一被験者GMネットワークは、完全に自動化された方法

（https://github.com/bettytijms/Single_Subject_Grey_Matter_Networks;バージョン20150902）を使用して、ネイティブスペースの灰白質セグメンテーションから皮質内の類似性に基づいて抽出された。ノードは、脳内の小さな関心領域として定義された（3×3×3ボクセルキューブ、6 mm×6 mm×6 mmに対応）。接続性は、任意の2つのノード間の対応するボクセルの灰白質密度値にわたるピアソンの相関で定量化された高い統計的類似性によって定義された。次に、各ノードを45度の倍数でθ角度だけ回転し、すべての軸で反射して、ターゲットノードとの最大類似値を特定した。 灰白質類似性マトリックスは、相関値の有意性が被験者固有の閾値p <.05を超えたときに脳領域を接続することにより構築され、ランダム置換法に基づく複数のテスト用に修正された。得られたネットワークを二値化し、次の4つのローカルネットワーク測定値を計算した。媒介中心性（ノードを通る最短経路の割合）、クラスタリング係数（近隣ノードの相互接続性のレベル）、特徴的な経路長（2つのノード間の最短距離）、および次数（ノードあたりのエッジの数）。

結果

18F-THK5351保持に関連してローカルネットワーク測定値は、CN群で有意な正の相関を示した。一方、ローカルネットワーク測定値の大部分（クラスタリング係数、特徴的な経路の長さ、次数）は、AD患者で有意な負の相関を示した。

討論

個人脳のT1強調画像を用いた構造ネットワーク解析は、大脳全体においてタウ沈着の増加を伴うアミロイド陰性CN群において有意に増加した結合性を検出したが、アミロイド陽性ADスペクトル群においては減少した結合性として検出された。低タウ沈着は、早期のニューロン損傷または正常な加齢に伴う慢性炎症に対する代償性反応を誘導するように思われるが、アミロイドおよび高タウの共存は、減少した結合性をもたらす代償的効果を上回ると思われる。 さらに、われわれの結果は、アミロイドの共存がタウ沈着に関連する構造的結合性を変化させるこ

とに重要な役割を果たすことを示唆している。

結論

タウ沈着とアミロイド沈着との共存が構造的結合性に悪影響を及ぼすことが自動拡散コネクトメトリーと同様に個人脳の T1 強調画像を用いた構造ネットワーク解析でも示された。

参考文献

[1] Sepulcre J, Sabuncu MR, Li Q, et al. Tau and amyloid β proteins distinctively associate to functional network changes in the aging brain. Alzheimers Dement. 2017;13(11):1261-1269. doi:10.1016/j.jalz.2017.02.011.
[2] Tijms BM, Seriès P, Willshaw DJ, et al. Similarity-based extraction of individual networks from gray matter MRI scans. Cereb Cortex. 2012;22(7):1530-1541. doi:10.1093/cercor/bhr221.
[3] Shigemoto Y, Sone D, Maikusa N, et al. Association of deposition of tau and amyloid-β proteins with structural connectivity changes in cognitively normal older adults and Alzheimer's disease spectrum patients. Brain Behav. 2018;8(12):e01145. doi:10.1002/brb3.1145.

認知症の家族介護者に対する認知行動療法の開発および有効性の検討

分担研究者　堀越勝
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター
認知行動療法センター

緒言

日本では日常生活自立度Ⅱ以上の認知症患者のうち、半数が居宅にて介護が行われている。認知症の家族介護者に対する精神的なケアの向上が喫緊の課題であるが、その手法は十分に検証されていない。そこで本研究では、家族介護者向けの認知行動療法プログラムを作成し、有効性を検討することにした。

目的

本研究では、認知症家族介護者を対象とした２つのCBTプログラム（個人・集団）を開発し、実施可能性や有効性の検討を行う。

方法

【研究①】訪問看護師が訪問時に実施する認知症の家族介護者を対象としたCBTプログラム

研究デザイン：対照群を設けない単群の前後比較試験

セッティング：都立松沢病院物忘れ外来および世田谷区内の訪問看護ステーション（4施設）を利用する認知症患者の家族介護者

研究対象者：20歳以上80歳未満で、認知症の親族と週10時間以上生活を共にする者。目標症例数は20名。MMSE23点以下の者（60歳以上）、身体疾患等で余命1年以内と申告されている者等は除外。

研究アウトライン:① 協力施設を利用する認知症患者の家族介護者に研究チラシを配布する。② 研究コーディネーターが対象者の選定基準の確認を行い、説明同意と事前評価を行う。③ 評価は介入前、中間時点、介入後、介入終了3ヶ月後に行う。④ 介入実施者（訪問看護師）が、家族介護者にプログラム（30分×11回）を実施する。

評価方法：主要評価項目は、Zarit介護負担尺度日本語版（J-ZBI）で測定する介護負担感とする。副次的評価項目は、家族介護者の精神症状（抑うつ・不安；HADS、健康関連QOL；SF8、コーピングスタイル；BriefCOPE等）、および、認知症患者の周辺症状(NPI-Q)等とする。実施可能性として、ドロップアウト率、参加率、プログラム完遂率、有害事象発生率、プログラムの満足度をまとめる。

【研究②】認知症の家族介護者を対象とした集団CBTプログラム

研究デザイン：対照群を設けない単群の前後比較試験

セッティング：小平市包括支援センター中央センター

研究対象者:20歳以上の認知症の家族介護者

研究アウトライン：①小平市市報およびチラシにて研究参加希望者を募集する。②第1回開始前に研究説明同意を実施する。③評価は介入前、介入後、介入終了１ヶ月後に行う。④介入を実施する（2時間×5回の集団プログラム）

評価方法：主要評価項目は、HADSで測定する抑うつ不安症状とする。副次的評価項目は、介護負担感（J-ZBI)、認知症患者の周辺症状(NPI-Q)等とする。

結果

研究①では、英国のCoping strategy program（START）[1] のテキスト・マニュアルの翻訳作業を行い介入に用いるテキストを作成した。テキストとワークシートは、認知症の介護者向けのワークブックとして出版した。研究倫理承認後（A2017-049)、2019年3月時点で、3名の登録を完了した。また、上記3例のプログラムを実施者（訪問看護師）に対して、認知行動療法の専門家が録音に基づいたスーパービジョンを行った。その他、プログラムの普及啓発を図ることを目的に、認知症患者や認知症家族介護者のケアに携わる地域包括支援センター、認知症疾患医療センター等の医療福祉職の職員を対象に集団研修を実施した。

研究②では、地域包括支援センター、社会福祉協議会等の地域包括ケアを担う施設において、認知症の家族介護者に対して広くプログラムを提供することを目的に、2時間×5回の集団プログラムを作成した。2019年5月からプログラムを1クール試行し、研究倫理承認後（A2019-107）に、介入研究を開始した。2019年3月末時点で、13名の登録を完了した。

考察

認知症の家族介護者は、支援を必要としながらも、自らの支援にアクセスしにくい一群であるといえる。その問題を克服するために、研究①では認知症患者や介護者の日常生活を包括的視点からケアする訪問看護師を実施主催者に据えたプログラムを作成し、研究②では、地域包括ケアを提供する施設で提供できるプログラムを作成した。研究①では、東京都内の訪問看護ステーション約570施設に対してチラシを郵送し、研究協力施設を増やして研究を継続することを予定している。また、研究②では、東京都三鷹市社会福祉協議会の研究協力を得たため、2020年度は対象施設を増やして研究を継続する予定である。

結論

本研究では、認知症家族介護者を対象とした２つのCBTプログラム（個人・集団）を開発し、実施可能性や有効性の検討を行った。

引用文献

１）Livingston G.et.al: Clinical effectiveness of a manual based coping strategy programme (START, STrAtegies for RelaTives) in promoting the mental health of carers of family members with dementia: pragmatic randomised controlled trial. BMJ. 347. f6276. 2013.

中枢神経変性疾患の臨床データベースを用いて病態解明につなげる研究

分担研究者　塚本忠
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター病院　医療連携福祉相談室　医長

諸言

認知症のあるひとの高齢者に占める割合および実数の増加はわが国の医学・公衆衛生における喫緊の課題である。認知症を伴う神経変性疾患のうち、大多数を占めるアルツハイマー病の原因物質であるアミロイドβの凝集蛋白を標的にした治験はで効果をあげているものもわずかである。これは、治験薬投与がすでに進行した症例に行われたからであるという説明がされており、効果が得られたとされる治験もなるべく早期の認知症をターゲットにしている。過去の認知症研究の結果から、認知症の前段階である軽度認知障碍(MCI)への介入のみならず、その前の段階である前臨床期(preclinical stage)の段階での介入に認知症の予防効果・進行抑制効果があるらしいことがわかってきた。しかしながら、前臨床期から認知症への転換に関する研究はまだ少ない。
前駆臨床期のコホートを構築し、経時的に心理学的検査・画像検査・採血などを行い追跡することが望まれるが、一般市民の中でも自覚的に自分はもの忘れがあるのではないかと心配しつつ生活に支障が出ていない段階である自覚的認知機能障害(SCI)から認知症への転換が、自覚がない集団より認知症になる率が高いという報告もあり、SCI のコホート構築は有意義であると考えられる。SCI のコホート構築のモデルケースとして、NCNP 認知症センター・認知症疾患医療センターの構成医師・臨床心理士・認知症相談員看護師により、2018 年度から、小平市の認知症が気になる高齢市民を対象として「もの忘れチェック会」を小平市および地域包括支援センターと共催している。

目的

小平市における自らの認知症を気にしているが生活に支障がない高齢者を対象に自記式記憶力検査を行う会を複数回開催し、認知症の自覚はあるが検査では認知症段階ではない前臨床期の自覚的認知機能障害のあるひとのコホート構築に役立てる。

また、これらの方法をマニュアル化し、毎月のチェック会の開催、参加者規模の増大により研究登録者の規模を増やし、データベースを作成する。得られたデータの統計解析により認知症前臨床期の病態に関する新知見を見出す。

方法

小平市役所、小平市の地域包括支援センター、小平市医師会などと連携を取りながら小平市在住の高齢者で、自ら高次機能障害（認知機能障害）があると自覚しながらも日常生活を支障なく過ごしている人々に、地域包括視線センターで定期的に開催されている「もの忘れチェック会」への参加を小平市市報などで呼びかけた。「もの忘れチェック会」は隔月の開催とし、1 回の参加人数は 15 人～20 人とした。10 分間で自記式認知症判定テスト(TestYourMemory-J: TYM-J)(1,2)を一斉に行い、30 分間の認知症予防の講演をしている間にテストを採点し、参加者に結果を渡した。TYM-J の論文に従って、点数によって参加者を健常者（この場合は認知症を自覚しているので SCI のひと）、MCI のひと、認知症のひとに分け、認知症の（うたがいのある）ひとには小平市のもの忘れ相談医やかかりつけ医の受診を勧めた。MCI のひとには当院もの忘れ外来受診をして Orange MCI 研究への参加を勧め、健常者（SCI のひと）にももの忘れ外来受診をし、当院での認知症前臨床期研究への参加登録を勧めた。

結果

2018 年 9 月に第 1 回「もの忘れチェック会」開催、2019 年 3 月までにさらに 2 回開催し、2019 年度は 6 回行った。(東久留米市でさらに 1 回行った) 2018 年度の参加者 43 人、2019 年参加者（小平市）76 人、東久留米市 14 人であった。

第 1 回から第 7 回までの参加者の内訳は、総数 100 人、男性 19 人(19%), 女性 81 人(81%)であり、TYM-J により認知症が疑われた人は 25 人(25%)、MCI が疑われた人は 33 人(33%)、SCI が疑われた人は 42 人（42%）であった。この SCI のうち約 4 人が認知症線臨床期研究へ参加登録した。

考察

認知症を自覚している高齢者が参加した「もの忘れチェック会」の 42%は、認知症を自覚しているにも関わらず MCI や認知症の範疇にないことが分かった。SCI の中でも、医療機関にかかる SCI のコホートでは認知症への転換率が高いという報告もあり、今後はいかにして、SCI を疑われた人から、研究への参加登録を促すかが問題となる。

また、MCI や認知症がうたがわれると診断した人を地域包括視線センターが追跡したところ、かかりつけ医が認知症を否定したり、精査を行わないケースも見られ、さらには未受診のケースもあった。今後は市や地域包括視線センターと連携して、認知症や MCI を疑った症例のケアも必要になると考えられる。

また、日常生活から認知症への進行を抑制するような介入を行う研究を開始する必要もあると考えるものである(3)。
なお、認知症前臨床期コホート研究では参加登録したひとのデータを同意の上で入力しデータベースを拡大している所である。

倫理委員会における承認結果等倫理面への配慮

前臨床期の認知症に関する研究については、すでに倫理委員会で承認を得ている。

文献

1) Brown J et al. BMJ, 2009;338:b2030
2) Hanyu H et al. Psychiatry Res. 2911;190:145-148
3) Ngandu T et.al. Lancet. 2015 Jun 6;385(9984):2255-63.doi: 10.1016/S0140-6736(15)60461-5. Epub 2015 Mar 12.

認知症介護者のためのインターネットを用いた心理評価・自己学習ツールの開発

分担研究者　大町佳永
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター病院

緒言

我が国の認知症の人は、2025 年には 65 歳以上高齢者の約 20%（約 700 万人）程度まで増加すると推計される。介護の負担による介護者のうつ、ストレス、社会的孤立、睡眠障害等も増加し、認知症介護者の身体的精神的不調及び介護のため勤務軽減並びに離職等による世界中の経済的損失は、2010 年の時点で 2,520 億ドルと推計される。

認知行動療法等の心理社会的介入が介護者の精神的苦痛を軽減し、健康状態を改善することが報告されているが、介護者は介護による時間的・体力的制約が大きいため、場所や時間の制限の少ないインターネットを用いる介入の有用性が、そのコストの低さと共に期待されている。The World Health Organization（WHO）により、介護者の知識や技術の向上、精神的ストレスの軽減、自己効力感やメンタルヘルスの向上を目指し、認知症介護者のためのインターネットを用いた自己学習支援プログラム iSupport が開発された。

本研究においては、認知症介護者の介護負担や不安、うつなどをインターネット上で自己評価するシステムを開発する。介護者が自身の介護負担感や精神状態をセルフモニタリングできるようになることで、介護うつの早期発見、医療や社会資源へのアクセスが促進され、認知症介護者のメンタルヘルスの向上が期待される。

方法

我々は日本の文化や介護環境、制度等に合わせた iSupport 日本版の開発を行っている。この iSupport 日本版の有用性を評価するため、インターネット上で利用可能な心理評価システムも併せて開発している。本研究では、認知症介護者の介護負担感や精神状態をセルフモニタリングするツールとして、この心理評価システムの有用性を検討する。

今年度は心理評価尺度を選定する。次年度は、認知症の人を介護している家族と医療・介護の専門家等で構成される２つのフォーカスグループにおいて、iSupport 日本版のパイロット版と共に心理評価システムを試用・評価する。

結果

海外での先行研究[1-3]を参考にして、認知症専門医である精神科医師、心理療法士等で検討を行い、下記の心理評価尺度を用いることを決定した。

- 介護負担度：Zarit 介護負担尺度日本語版（身体的･心理的負担や経済的困難を介護負担として測定する尺度）
- 介護肯定感：認知症介護肯定感尺度 21 項目版（認知症の人の介護を通して良かったと思う状況､場面､内容など肯定的側面を明らかにするための尺度）
- 不安：GDA-7 日本語版（不安を測定する尺度）
- うつ：CES-D scale（抑うつ症状の重症度を測定する尺度）
- 全般性 QOL：日本版 EuroQol 5-Dimension
- パーソン・センタード・ケアの意識：日本語版 ADQ（認知症介護においてどの程度パーソン・センタード･ケアを行えているかを評価するための尺度）
- アプリケーションの満足度：CSQ-8J（アプリケーションの満足度を評価するための調査票）

社会資源の利用の変化等は、アンケート調査を同時に実施し聴取することとした。

考察

心理評価を行うにあたり、介護の負担感や不安、うつ等のネガティブな感情を評価するばかりでは、被験者に介護の辛い部分のみに目を向けさせてしまう恐れがある。そこで、介護をすることによって得られる良い面にも焦点を当てられるよう、認知症介護肯定感尺度を取り入れることとした。

インターネットを用いた web アプリケーションを用いるため、被験者のプライバシーへの配慮だけでなく、データの安全管理に努め、漏洩対策を行う必要がある。そのため、システムの開発と保守管理は、各種臨床研究支援と IT システム導入支援の実績がある企業に委託する必要があると判断し、株式会社アクセライト社に委託した。

結論

認知症介護者の介護負担感や肯定感、不安、うつなどをインターネット上でセルフモニタリングするためのシステムを開発している。今後は、心理評価システムを試用し、有用性を検証する予定である。

参考文献

1. Mehta KM, Gallagher-Thompson D, Varghese M, Loganathan S, Baruah U, Seeher K, et al. iSupport, an online training and support program for caregivers of people with dementia: study protocol for a randomized controlled trial in India. Trials. 2018;19(1):1‑10.

2. Teles S, Ferreira A, Seeher K, Freel S, Paul C. Online training and support program (iSupport) for informal dementia caregivers: protocol for an intervention study in Portugal. BMC Geriatrics. 2020.20(1),10.
3. Pinto-Bruno AC, Pot AM, Kleiboer A, Droes RM, van Straten A. An Online Minimally Guided Intervention to Support Family and Other Unpaid Carers of People With Dementia: Protocol for a Randomized Controlled Trial. JMIR Research Protocols. 2019.8(10),e14106.

30-3

Studies on Neurocognitive Disorders: Pathophysiology, Prevention, Therapy and Care

Hidehiro Mizusawa, M.D., Ph.D.
Principal Investigator of the Research Group
National Center of Neurology and Psychiatry

(1) Purpose of the study group

The mission of the study group is to elucidate the pathogenesis/pathophysiology of neurocognitive disorders, and to develop methods for their prevention, therapy and care. To achieve the goal, the group conducts following three projects; 1) basic research, 2) clinical investigation, and 3) development of new treatment and care of neurocognitive disorders.

(2) Members of the research group:

Hidehiro Mizusawa, Keiji Wada, Toshiyuki Araki, Masayuki Sekiguchi, Masato Hasegawa, Yoshitaka Nagai, Miho Murata (~Sep.9, 2108), Yuji Saitoh (Sep. 10, 2018~), Hiroshi Kunugi, Hiroshi Matsuda, Masaru Horikoshi, Tadashi Tsukamoto, Yoshie Ohmachi

(3) Results and Discussion

1) Translational studies of neurocognitive disorders

We found that sleep disturbance is a possible modifiable risk factor in Alzheimer's disease model mice as well as Parkinson' disease model mice.

To apply some results of basic research to clinical investigation, we have done proteome analyses of cerebrospinal fluids from patients with and without preceding presence of sleep disturbance in neurocognitive disorders.

We found that L-DOPA treatment reduced pathological changes in model mice of Parkinson's disease. We also found that SIDT2, a component of RNautophagy, palys some role in the degradation of neurodegeneration-related mRNAs.

2) Clinical investigation of neurocognitive disorders

In grey matter network, we found that tau accumulation increased brain connectivity in normal controls without amyloid beta deposits, while it decreased structural connection of brain in patients with Alzheimer's disease spectrum.

3) Study on new treatment and care of the disorders.

We examined the utility of CBT program among family members who care patients with neurocognitive disorders. For persons who care patients with these disorders, we have started the preparation of Japanese version of iSupport, which was developed based on WHO's Mental Health Gap Action Program.

We have started Brain Health Project Kodaira under the collaboration with Kodaira city as well as Kodaira Medical Association.

30－4 運動障害疾患における疾患進展予測に基づく先制的包括医療モデル構築

主任研究者 国立精神・神経医療研究センター病院
坂本 崇

総括研究報告

1. 研究目的

パーキンソン病，局所性ジストニア，脊髄小脳変性症という代表的な運動障害疾患を対象に，病態を明らかにし，疾患進展予測に基づく先制的包括医療モデルを構築する．

1）パーキンソン病（PD）の進展様式は脳幹からと嗅球からの2経路が想定されているが，これに伴う臨床症状やその進行様式の差異については明らかになっていない．長い経過で，運動症状のみならず様々な非運動症状を呈する多彩な PD では，どのような患者群にいつ頃どのような非運動症状が出現し，どのような経過で進行していくのかが予測が可能となると，適切な時期に症状伸展を予測した治療が可能となり，患者や家族の QOL も，医療経済上も有用性が極めて高い．本研究では，PD で頻度が高くかつ機能的また QOL 上も大きな問題である，自律神経障害，姿勢異常，睡眠障害，精神症状，嚥下障害について当院の 1000 人の PD 患者データから，その実態と症状の出現，進展様式を明らかにし，そのリスク因子を明らかにし，これをもとに，疾患伸展予測に基づく先制的包括医療モデルを構築することを目的とする．

2）特発性ジストニアはいまだ病態も治療法も十分確立されていない．我々はこれまで病態解析を進め，重症度と相関する画像バイオマーカーを見出しつつあることからこれを確立する．さらに我々が開発したジストニアに対する認知行動療法(CBT)や薬物治療の評価における有用性を従来の運動指標，心理指標のみならず我々が開発する画像マーカーを用いて評価し，このマーカーをジストニアの客観的評価指標として確立することを目的とする．また，ナショナルセンターの責務としての疫学研究という観点からも実態調査を行う．

3）脊髄小脳失調症(SCD)については運動機能に応じたリハビリテーション法を確立する．SCD では決定的な治療法は確立しておらず，経過や病型に合わせたリハビリテーション法の確立は必須であり，この成果は小脳失調症の患者全員にとって福音となる．

2. 研究組織

＜主任研究者＞

坂本 崇：国立精神・神経医療研究センター 脳神経内科診療部

＜分担研究者＞

西川 典子：国立精神・神経医療研究センター 脳神経内科診療部

向井 洋平：国立精神・神経医療研究センター 脳神経内科診療部

山本 敏之：国立精神・神経医療研究センター 脳神経内科診療部

野田 隆政：国立精神・神経医療研究センター 第一精神診療部

髙橋 祐二：国立精神・神経医療研究センター 脳神経内科診療部

花川 隆：国立精神・神経医療研究センター 脳病態統合イメージングセンター

＜研究協力者＞

新明 一星：国立精神・神経医療研究センター

脳神経内科診療部

3. 研究成果

1)PD:パーキンソン病(PD),パーキンソン症候群(PS)の患者レジストリの基盤構築のため,当院通院中の該当疾患患者を抽出し,全員の診断,発症年齢を医師が確認し,ADL 調査を開始した.また,RBDコホート研究(J-PPMI)で実施している症状評価項目と合致した評価を日常臨床で簡便に行い,レジストリのデータとして収集するために自記式の質問集を作成し,PD,PS 患者に実施した.当院ブラッシュアップデータベースについては,L-dopa 薬物動態試験のデータを中心に,検査時年齢,診断,発症年齢,服薬状況,MDS-UPDRS などの症状評価をまとめた.NCNP・脳と心の総合ケア病棟において,不安を呈したPDの入院患者(Generalized Anxiety Disorder-7: GAD-7 が 5 点以上)を対象とした認知行動療法のパイロット研究を行った.これまでに 17 症例を集積し,8 セッションの認知行動療法実施した後に,不安(Hamilton Rating Scale for Anxiety: HAM-A)において有意な改善を確認した.PD・PS に伴う姿勢異常に対し,我々はこれまでに姿勢異常の分類と原因筋の同定,統一化したリハビリテーションと原因筋に対するリドカイン注射を中核とした治療法の開発を行ってきた.我々の開発した姿勢異常治療プログラムを Multidisciplinary Approach for Posture and Gait Disorders; MADI と名付けた.PD/レビー小体型認知症(DLB)における嚥下障害発症のリスク因子の検討において,PD 群 193 人,DLB+パーキンソン病認知症(PDD)群 77 名を対象とし嚥下造影検査の所見を比較した.性別等の傾向スコアからマッチングさせた66ペアについて,口腔から咽頭への送り込み時間,舌と咽頭壁の接触,誤嚥の有無,誤嚥の頻度について背景因子を調整し調べた.DLB+PDD 群で口腔送り込み期の異常が有意に多く,認知機能の低下,あるいは覚醒レベルの低下が影響した可能性があった.誤嚥の頻度は変わらなかった.PD 患者の嚥下障害に対する自覚と胃瘻造設の検討において,PD 患者 143 人を対象とした.日本語版嚥下障害質問票の結果,嚥下造影検査の結果,その後 1 年以内の代替栄養法の有無について調査し,代替栄養法導入の決定因子を検討した.決定木分析により,自覚から代替栄養法の適応を判定するアルゴリズムを作成した.この決定木によって有意に胃瘻造設のリスクを判定できた.2017 年 4 月 1 日より1年間当院脳神経内科を受診したPD,PS 患者 1,418 名を調査した.精神病症状(幻視等)は 27.7%にみられ,その半分に抗精神病薬が処方されていた(オッズ比 16.4).精神病症状に抗精神病薬の処方がない患者も 50%おり,良性の幻覚,病識・病感がありコントロール良好なことが主な理由と考えられた.

2)ジストニア:特にボツリヌス治療や外科治療の適応ではない軽症例を中心に,その分析と治療を行った.治療については前班で試みた CBT を踏襲し,特に音楽家のジストニアで良好な結果を得た.別途 PD の患者データベースに準じてジストニアのデータベース作成に着手した.また通常の治療に抵抗性の難治性ジストニアの治療についても検討した.吹奏楽器奏者に発症するアンブシュアジストニアの口あるいは手運動中の脳活動,身体部位局在を調べ,一次体性感覚野に異常があることを見出し報告した(Uehara et al. 2019).そこで,さらに足,手や口の局所性ジストニア患者および健常者が様々な身体部位を随意的に動かしている間の脳活動を調査し,身体部位に依存した局在性ジストニアの脳状態の異常と身体部位に依存しない異常を切り分けることを試みている.

3)小脳失調:脊髄小脳変性症のリハビリテーションの効果を実証して論文報告した.全国均霑化に向けた統一メニューを作成し,障害の程度に合わせて,上肢・下肢・体幹の各部位における適切なメニューを選択できるようにした.厚生労働省難治性疾患等政策研究事業「運動失調症の医療基盤に関する調査研究」班における分科会において統一メニューの策定を進めた.一方,脊

髄小脳変性症の歩行リズム障害の簡便な測定系を考案し，歩行リズム障害の特性を分析した．

まとめ

神経変性疾患の疾病進展予測とその対応という観点から，特に患者数も多い PD・ジストニア・SCD について，当院のデータベースを活用し検討を進めた．

PD においては自律神経症状，姿勢異常，嚥下障害，うつ・不安，睡眠障害などの非運動症状への評価治療法の開発を中心に，さらにはデータベースのブラッシュアップも念頭に検討を進めていく．

ジストニアの画像研究を通じて診断マーカーを探索する試みは継続していく。これは病態解明に迫りうる可能性を有するものと考える。治療の点からは特に軽症例での認知行動療法の有効性を示した。

SCD のリハビリテーションプログラムの有効性を確認し，短期集中リハビリを進めると主に個別化のシステムを確立した．これを当院から発信すべくさらなる検討を重ねていく．

パーキンソン病の不安を対象とした認知行動療法

分担研究者：西川典子
国立精神・神経医療研究センター病院
脳神経内科診療部

緒言

パーキンソン病（PD）は，ドパミン神経細胞の変性脱落による運動症状だけではなく，非運動症状と呼ばれる自律神経障害，睡眠障害，感覚障害，精神障害，認知機能障害，疲労，体重減少など全身性に様々 な症状が出現する[1)]．

PD の精神症状で高頻度に出現するのがうつや不安である．PD における不安症の有病率は31％[2)]で，過度に症状の変動に捉われたり，疾患の受容の困難であったりする．精神科領域では，不安症の治療として，認知行動療法（cognitive behavioral therapy: CBT）が認知されている．我々は，PD のうつに対しての CBT の効果検証[3)]を行なってきた．PD のうつの主体は不安であり，不安に特化した CBT の必要性を感じてきた．特に，感情や心的な事象の把握が困難となるアレキシサイミア[4)]を合併しやすく，PD の特性に配慮した心理療法が必要である．そこで，我々は，不安を呈した PD 入院患者を対象に，不安削減を目指した CBT の有効性について探索的な研究を実施した．

方法

不安を呈した（GAD-7=5 点以上）PD の入院患者を対象に，1回 60 分の CBT を8回実施した．PD に併存するアレキシサイミアを考慮して，患者の人生全体におけるポジティブな経験，困難を乗り越えた経験を振り返り，その際に経験した感情を振り返るセッションを 2-3 回実施した．その上で，その感情体験やポジティブな体験を，現在の不安削減に応用するという文脈で CBT を実施した．主要評価項目は不安（Hamilton Rating Scale for Anxiety: HAM-A），副次評価項目を不安（Generalized Anxiety Disroder-7: GAD-7），うつ（Hamilton Rating Scale for depression: HAM-D, Patient Health Questionaire-9: PHQ-9）とした．CBT は，臨床経験 10 年（13 症例），2 年（4 症例）の臨床心理士 2 名が担当した．

結果

平成30年10月から令和元年12月までに，17症例に対してCBTを実施した．19症例（男性9名，女性10名）の被験者は，年齢＝72.3 (SD＝8.8)，罹病期間＝6.5年（SD＝5.6），Hoehn-Yahr＝2.6 (SD＝0.6) であった．CBT実施前後において，HAM-A：18.1→11.2（$p<0.0001$），HAM-D：13.4→8.9（$p<0.0001$）に有意な症状改善を確認した．GAD-7，PHQ-9においては，有意差はなかった．脱落者は皆無であった．また有害事象はみられなかった．

考察

本研究では PD の不安に対して入院環境下で 8 セッションの CBT を実施し，HAM-A，HAM-D の有意な改善を認め，CBT が PD の不安の治療として有用である可能性が示された．一方で自記式の評価スケールである GAD-7，PHQ-9 では有効性を示せなかった．これは面接による他記式か自記式の評価かによる違いを反映したものと思われた．また，不安とうつのスケールはともに改善しており，不安とうつを分離して検討することは困難であった．

入院環境下で CBT を実施したことは，低脱落率の達成とともにも不安軽減に寄与した．

また，PD 患者の不安の背景には，内面の言語化が困難であるアレキシサイミアの合併もあることから，一律に実施される構造化 CBT の実施は PD 患者にとっては比較的難易度が高く，CBT を完遂できない人が多かった．そのためこの研究では，従来の構造化 CBT ではなく，実施者がそれぞれの PD 患者に柔軟に対応したテーラーメード CBT を実施し，これが PD の不安削減に有用であった．

今後は，このテーラーメード CBT の有効性を盲検無作為化試験により検証する予定である．

結論

PD の特性であるアレキシサイミアに着目したテーラーメード CBT は PD の不安軽減に寄与した．

参考文献

1) Pont-Sunyer C, Hotter A, Gaig C, et al. The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study). Mov Disord. 2015 ;30:229-37.
2) Broen MP, Narayen NE, Kuijf ML, et al. Prevalence of anxiety in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. Mov Disord. 2016 ;31:1125-33.
3) .Shinmei I, Kobayashi K, Oe Y, et al. Cognitive behavioral therapy for depression in Japanese Parkinson's disease patients: a pilot study. Neuropsychiatr Dis Treat. 2016;12:1319-31.
4) Assogna F, Palmer K, Pontieri FE, et al. Alexithymia is a non-motor symptom of Parkinson disease. Am J Geriatr Psychiatry 2012; 20: 133-141.

パーキンソン病の姿勢異常に関する研究

分担研究者:向井　洋平
国立精神・神経医療研究センター病院
脳神経内科診療部

緒言

パーキンソン病(PD)や関連疾患(PDRD)に伴う姿勢異常は薬物効果に乏しく，進行期の治療に難渋する運動症状と言える．我々はこれまでに①姿勢異常の分類と原因筋の同定，②統一化したリハビリテーションによる治療，③原因筋に対するリドカイン注射による治療，を中核とした治療法の開発を行ってきた．本治療法を Multidisciplinary Approach for Posture and Gait Disorders; MADI と命名しロゴを作成した．
2019 年度は以下の㋐㋑の研究を行った．
㋐斜角筋へのリドカイン注射と頸部コルセット着用による首下がり治療の有用性について検証し，報告した(参考文献 1)．
㋑2018 年にキール大学 Prof. Guenther Deuschl らと連携し，腰曲がりの角度評価方法について世界統一評価法を作成した(参考文献 2)．一方，首下がりの統一された評価法は存在しないことから首下がりの評価法について検討した．

方法

㋐首下がり治療を受けた PD/PDRD 患者を対象とした．
被検者は座位で頸部筋群の針筋電図評価を受けた．首下がりの姿勢から検者が他動的に被検者の頭部を持ち上げ正しい姿勢に修正し，針筋電図の波形変化を記録した．
片側あたり 2.5-5 ml の 1%リドカインを両側斜角筋に注入した(1 日の総投与量，5-10 ml)．リドカインの総投与量は，各個人の体格に基づいて調整した．注射は 1 日 1 回，連続 4-5 日間実施した．患者は各注射後すぐに頸部コルセットを着用し，可能な限り着用を続けた．
首の屈曲角度は，水平線と外耳道を通る線との間の角度と外眼角(O-E 線)と定義した．水平線から下向きの角度が+，上向きの角度が-で表記した．注射前(ベースライン)，8 日目，90 日目の首の屈曲角度を測定した．統計解析はウィルコクソンの符号順位検定を用いた．
㋑全身側面写真で，第 5 腰椎棘突起(L5)と第 7 頸椎棘突起(C7)を通る直線(L5-C7 線)と，C7 と外耳孔を通る直線(C7-E 線)のなす角を首下がり角とした．L5-C7 線に平行な背部輪郭の接線の接点を T とし，T と C7 を通る直線(T-C7 線)と，C7-E 線のなす角を首曲がり角，L5 と T を通る直線と T-C7 線のなす角を胸曲がり角，C7-E 線と OE 線のなす角を Sniff 角とした．姿勢異常のない PD30 例(正常群)と，首下がりを伴う PD15 例(首下がり群)で上記 4 種の角度を測定し，首下がり群の結果を正常群から算出した基準値と比較した．全身写真の外観から首下がり群を，首曲がり，胸曲がり，Sniffing 姿勢の有無で分類し，各角度が分類に寄与するかを検証した．

結果

㋐被験者は男性 7 名と女性 8 名(平均年齢 68.9 歳)で，PD 患者 13 名，多系統萎縮症患者 1 名，進行性核上性麻痺患者 1 名が含まれていた．
13 名に実施した針筋電図では，首下がり時には斜角筋と SCM 筋に放電は見られなかった．他動的に首の位置を補正すると，斜角筋では 13 名全てで，SCM では 9 名で異常放電が出現した．
ベースライン，8 日目，90 日目の平均首屈曲角度は，それぞれ 27.7° ±13.9°，

11.7° ±14.6° (p = 0.0012), 15.3° ±17.2° (p = 0.0214)であり, 首下がりの治療効果を確認した.

㋑正常群の平均値±SD は首下がり角 32.0±8.1 度, 首曲がり角 13.3±8.5 度, 胸曲がり角 28.1±5.1 度, Sniff 角 35.3±9.2 度であった. 首下がり群 15 例を全身写真の外見で分類すると, 首曲がりは 9 例, 胸曲がりは 11 例, Sniffing 姿勢は 4 例で見られた. 正常群の平均値±1.5SD の値から, 陽性の基準値を首下がり角≧45 度, 首曲がり角≧25 度, 胸曲がり角≧35 度, Sniff 角≦20 度とした. 首下がり群では全例で首下がり角と首曲がり角の基準値を超えた. 胸曲がり, Sniffing 姿勢の有無に対して, 上記基準値はそれぞれ感度 91%, 75%, 特異度 100%, 91%であった. 一方, 各角度を測定するには複数の補助線をひく必要があり簡便性の面では従来法(参考文献 1)に劣っていた.

考察

㋐NCNP で開発したリドカイン注射による腰曲がり治療法(参考文献 3-5)を応用し, 首下がり治療を行った.

既報告では首下がりは胸鎖乳突筋の過剰収縮が原因とするものが多い中, 本研究により初めて斜角筋が胸鎖乳突筋よりも首下がりに大きく影響していることを示した.

㋑首下がり角を, 体幹の軸(LC 線)と頸部の軸(CE 線)のなす角度としたことで, 体幹の後屈や Sniffing 姿勢による過小評価および腰曲がりによる過大評価が起こりにくくなり, 首下がり患者を検出しやすくなった.

首曲がり角と胸曲がり角の測定により, 屈曲の高位(頸椎と胸椎どちらがメインか)の評価が可能になった.

個々の患者の首下がりの特徴や重症度をより正確に表現でき, 治療前後でどの角度がどの程度改善したかを詳細に分析できるため, 治療戦略を考えるうえで有益な可能性がある.

一方, 従来の方法に比べ, 測定に手間がかかる, 患者の視線の方向をイメージしにくい, 背部の輪郭が丸まっていない患者では T 点が定めにくい, 胸曲がり型の首下がりと上腹部型の腰曲がりを分離しにくいといった欠点がある.

結論

㋐PD/PDRD の首下がりに対し, 斜角筋へのリドカイン注射と頸部コルセット着用を組み合わせた治療法は有効であると示された.

㋑本法により首曲がりを詳細に分類・評価できる可能性がある.

参考文献

1) Yohei Mukai, Yoshihiko Furusawa, Yuko Morimoto, et al. Lidocaine injections and neck corset wearing improve dropped head syndrome in Parkinson's disease and related disorders. Clinical Parkinsonism Relat Disord. 2019; 1; 82-85.
2) Margraf NG, Wolke R, Granert O, et al. Consensus for the measurement of the camptocormia angle in the standing patient. Parkinsonism Relat Disord. 2018; 52:1-5.
3) Y. Furusawa, T. Hanakawa, Y. Mukai, et al. Mechanism of camptocormia in Parkinson's disease analyzed by tilt table-EMG recording, Parkinsonism. Relat. Disord. 2015; 21; 765-770.
4) Y. Furusawa, Y. Mukai, Y. Kobayashi, et al. Role of the external oblique muscle in upper camptocormia for patients with Parkinson's disease, Mov. Disord. 2012; 27 ; 802-803.
5) Y. Furusawa, Y. Mukai, T. Kawazoe, et al. Long-term effect of repeated lidocaine injections into the external oblique for upper camptocormia in Parkinson's disease, Parkinsonism. Relat. Disord. 2013; 19; 350-354.

パーキンソン病/レビー小体型認知症における嚥下障害発症のリスク因子に関する研究

分担研究者：山本敏之
国立精神・神経医療研究センター病院
脳神経内科診療部

緒言

嚥下造影検査で誤嚥を認めたパーキンソン病患者は，その後の 2 年間の肺炎発症のリスクが高い(1). しかしながら，嚥下造影検査で誤嚥した患者が経口摂取を継続できなくなるわけではない. 代替栄養法を導入する際の臨床的な指標は不明である.

本研究では，パーキンソン病患者に代替栄養法を導入する場合に，その臨床判断に寄与する所見を検討した.

方法

対象は 2016 年 1 月 1 日から 2018 年 12 月 31 日までに当院で嚥下造影検査を実施したパーキンソン病患者 173 人（男 100 人，女 73 人，平均年齢 68.9±6.7 歳，Hoehn & Yahr（H&Y）分類中央値 3 度）とした. すべての患者は DaT SPECT，および MIBG 心交感神経シンチで異常を認めた. Mini-mental state examination で 21 点以下の患者，80 歳以上の患者，50 歳未満の患者，レビー小体型認知症が疑われた患者，経口摂取していない患者は除外した. 嚥下造影検査では液体の嚥下から，誤嚥，喉頭蓋谷の残留，梨状陥凹の残留を評価した. また，検査時の体格指数（BMI）と嚥下障害問診票（SDQ）による嚥下障害の自覚を評価した. 検査から 1 年以内に，胃瘻造設，もしくは経鼻経管栄養を導入した患者を代替栄養法導入群，経口摂取を継続した患者を経口摂取群とし，2 群を比較した（Mann-Whitney U 検定）. また，代替栄養法の導入に寄与する所見を検定した（ロジスティク回帰分析）.

結果

代替栄養法導入群は 9 人（男 7 人，女 2 人，平均年齢 72.7 ± 4.8 歳）で，H&Y 分類中央値 4，平均 BMI 15.3，SDQ 総点中央値 12.5 であった. 経口摂取群は 164 人（男 93 人，女 71 人，平均年齢 68.7 ± 6.7 歳）で，H&Y 分類中央値 3，平均 BMI 21.6，SDQ 総点中央値 5.5 であった. 2 群の比較では，H&Y 分類，BMI，そして，嚥下造影検査での誤嚥と梨状陥凹の残留，SDQ 総点が有意に代替栄養法導入群で悪かった（いずれも $p < 0.01$）. ロジスティック回帰分析では BMI のみが代替栄養法導入に寄与する評価項目であった（$p < 0.01$，95%信頼区画 0.10-0.71）.

考察

これまでの我々の研究で，パーキンソン病では，H&Y 分類が重症で，かつ嚥下造影検査で誤嚥を認める場合に肺炎を発症するリスクが高いが，嚥下造影検査での誤嚥は，胃瘻造設の決定に寄与しなかった(1). 本研究からパーキンソン病患者に代替栄養法を導入する決定因子として，BMI の低下が重要であり，嚥下障害の自覚や嚥下造影検査の所見は必ずしも代替栄養法導入の決定に寄与しないことが示唆された. しかしながら，本研究は単一機関から対象を選んだため，対象への介入（代替栄養の導入）の決定に偏りがあった可能性があった.

結論

パーキンソン病患者に代替栄養法を導入する決定因子として，BMI の低下が重要である.

参考文献

1) Yamamoto T, Kobayashi Y, Murata M. Risk of pneumonia onset and discontinuation of oral intake following videofluorography in patients with Lewy body disease. Parkinsonism Relat Disord. 2010;16(8):503-6.

パーキンソン病における精神症状の評価，予測を基にした治療指針の策定に関する研究

分担研究者：野田　隆政
国立精神・神経医療研究センター病院
第一精神診療部

緒言

パーキンソン病（Parkinson disease:以下 PD）において，患者の 30～40%に精神病症状（幻覚は 20%，妄想は 5%）が発生するとされており（Friedman et al., 2013），精神病症状を合併した PD 患者の治療に関しては，クエチアピンやクロザピンといった薬剤の有効性がメタ解析で示されている（Frieling et al., 2007）．現在，PD 患者の精神病症状に対する治療ステップは提示されているが（Shotbolt et al.,2006），実臨床場面における薬剤選択や用量設定に関しては明確な推奨は示されていない．

以上を踏まえ，本分担研究においては，当院における PD 患者を対象としたカルテ調査から，精神病症状の頻度や性質，抗精神病薬の処方率，処方内容などの傾向を明らかにする．それにより，実際の治療場面において利用可能となる治療推奨事項を作成することを目指す．

方法

調査対象期間（2017 年 4 月 1 日から 2018 年 3 月 31 日）に国立精神・神経医療研究センター病院脳神経内科を受診した患者のうち，レセプト上の病名として「パーキンソン病」「パーキンソン症候群」と登録されている患者 1,407 名を調査対象者とした．

対象者のカルテから患者背景情報（性別，年齢，重症度（Yahr），精神病症状の有無（幻覚・妄想等），抗精神病薬の処方内容（薬剤，用量）の情報を収集し解析を行った．

結果

解析対象者の平均年齢は 72±10 歳，女性が 56%であった．重症度に関して 1,030 名に Yahr が記載されており，平均は 3.0±1.1 であった．Yahr 重症度は高齢ほど悪化する傾向があり，精神病症状は高齢者ほど有意に出現していた（p = 0.00）．調査有効症例 1,227 名中，精神病症状（幻視等）は 27.7%にみられ，その半分に抗精神病薬が処方されていた（p = 0.00, *odds ratio* = 16.4）．処方の 84%はクエチアピン，平均用量は 60.7±63.9mg であり，最も多い処方量は 25mg であった．

考察

PD 患者のうち，精神病症状の見られる患者の割合は先行研究と矛盾しないものであった（Friedman et al., 2013 ; Sawada et al., 2013）．一方，精神病症状に抗精神病薬の処方がない患者は 50%おり，良性の幻覚，病識・病感がありコントロール良好なことが主な理由と考えられた．実臨床においては精神病症状の質を評価し，薬物療法の必要性について慎重に検討していくことが推奨される．

結論

今回の調査では，PD 患者の治療実態の概要を明らかにすることができた．来年度以降は，治療推奨事項に関するレビューと合わせ，抗パーキンソン薬と精神病症状との関連について検討していく．

参考文献

1)HelgeFrielinga,ThomasHillemachera,MarcZiegenbeinb,BernhardNeundörferc,StefanBleich(2007). Treating dopamimetic psychosis in Parkinson's disease : Structuredreviewandmeta-analysis. *EuropeanNeuropsychopharmacology*.17,165-171

ジストニアの認知行動療法有効性の検討

分担研究者：坂本　崇
国立精神・神経医療研究センター病院
脳神経内科診療部

緒言

ジストニアの治療としてはボツリヌス治療や外科治療があるが，軽微な症状の場合は副作用が効果を上回ることも多く，治療に難渋する．また，不安・ストレスによって症状の完全消失を求める患者も少なくないが，その要望に完全に応じることは難しいし，何よりも医療経済的にも現実的ではない．今回，そうした心理的な因子への介入という意味から認知行動療法（CBT）に着目し，ジストニアへの導入による有効性を検討する．

方法

当院で治療を開始したジストニア患者の性情を後方視的に分析し，軽症例の経過を検討する．また，すでに作成されたジストニア患者へのCBTプログラムを用いてCBTを行う．30分8回を1クールとして施行，前後で不安・うつスケールの評価とともにジストニアの症状についても評価を行った．

結果

1年間のジストニア新患144名のうち，ボツリヌス治療・外科治療の適応とならない軽症例は17名であった．症状が軽微なためにいわゆるtherapeutic windowが狭いことがその原因の一つであった．また，一般的な分析において，治療経過での改善に関して医師・患者間の認識の差が強く認められた．患者は治療への理想が大きく，結果，改善の実態に満足せずにむしろそれをストレスととらえてしまう傾向がある．この点に対して心理療法を介在させることは有効であると考えられた．

CBTでは全例で不安うつのスケールが改善するとともに，ジストニアの症状改善を認めた．もともと軽微な症状であるために，数字上の改善があまり目立たない例も散見されたが，自覚的には満足とども高く，長く演奏活動から遠ざかっていたアンブシュアジストニア罹患者が復職するなど，具体的な成功が明確に認められた．

考察

認知度が高まるについて軽症例のジストニアが増加している．これは早期発見・早期治療という観点では有益であるが，一定の割合で治療を求める患者に対しての手立てを検討する必要があった．その手法として心理療法的なアプローチとしてCBTの有効性が確認された．今後は全国的なレジストリーの確立によって，こうしたプロフィールの分析と対応をより深く検討していきたい．

結論

新たなアプローチではあるが有用な結果を生み出したことは患者の間にも福音として広まっており，その可能性を広げるとともにプログラムの改良や適応患者の拡大を目指して検討を進める．こうした研究はCBTセンターの併存する当センターならではの利点を最大限生かしたものであり，本開発費の成果としても世間にアピールし得るものと考える．

参考文献

1)Kobayashi K., Sakamoto T. et al.; A Pilot Study on Efficacy and Tolerability of Cognitive Behavioral Therapy (CBT-FD) for Japanese Patients with Focal Dystonia. Neurology and Clinical Neuroscience 2020;8:16-27

多モーダルイメージングによる局所性ジストニアの症状予測

分担研究者：花川　隆
国立精神・神経医療研究センター
脳病態統合イメージングセンター先進脳画像研究部

緒言

本研究の目的は，多モダリティイメージング計測情報を多次元的に組み合わせた特徴量を，機械学習（AI）を活用した予測モデルに学習させることで，局所ジストニア症状や重症度を予測するシステムの開発を行うことである．この研究は，局所性ジストニアのバイオマーカーの探索的発見にも結びつき，客観的診断法や症状評価法の開発に結びつく可能性がある．また，局所性ジストニアの治療法として，薬剤治療やボツリヌス毒素の投与が行われてきたが，決定的なものはない．バイオマーカーが確立すれば，最近精神神経疾患の治療として注目を集めているニューロフィードバックに基づくリハビリテーションのような新しい治療法の開発に結びつく可能性がある．

方法

機能的脳活動（fMRI）や，安静時機能的連結（rsfcMRI），脳構造神経線維連結（DTI），脳構造（VBM）を計測した．ピアニストのタッピング運動，アンブシュアの口唇運動など特異的な課題と身体部位のローカライザー課題を用いた fMRI 実験を継続している．並行して，脳卒中や水頭症などで開発してきた rsfcMRI データの機械学習（AI）判別を活用した重症度・症状回復予測技術をジストニアの症状予測に応用する技術開発を行っている．最終年度には，蓄積したデータを用いて，重症度・症状回復予測モデルが，汎化性能を持つシステムであるかを検証していく．

結果

基礎研究として前歯と臼歯の咬合課題による脳活動の差を検討し，運動野に表象の差を認めた．咬筋の筋電図との相関が運動関連領域に加え基底核にも認められた．（Yoshizawa et al. 2019 Sci Rep）．さらにアンブシュアジストニアにおいて，身体部位のローカライザー課題，ならびにアンブシュア課題・ストロー課題を課した fMRI 実験を行なった．運動時の運動ネットワーク活動と重症度の相関を見出した．さらに一次体性感覚野では，手と口の運動表象の異常を認めたが，その程度は重症度とは相関していなかった（Uehara et al. 2019 Hum Bran Mapp）．身体部位のローカライザー課題を組み合わせた fMRI 実験は，アンブシュアジストニア以外の局所性ジストニアに拡張している．また，指タッピング fMRI 中の運動野・体性感覚野活動は健常ピアニストとジストニアピアニストの間で差がなかったが，ジストニア出現中の小脳活動が過剰であることを見出した．さらに，ジストニア患者において，小脳と運動野・体性感覚野の機能結合指標に異常を認め，この指標を用いてジストニアピアニストと健常ピアニストを機械学習（AI）判別することができた．一方，運動野・体性感覚野や小脳活動からは判別できなかったを（Kita et al. submitted）．

考察

一連の研究は小脳を含む運動関連領野ネットワークの状態にジストニア病態を反映するキーがあることを示す．特に，小脳と運動野単独ではいずれもジストニアを十分説明できないが，小脳と運動野活動を組み合わせたモデル（Uehara et al. 2019）がジストニアの症状を説明できたこととか，小脳と運動野の機能結合によるジストニアの機械学習（AI）判別の成功は，小脳を含む運動関連領野ネットワークの状態を反映する特徴量が

ジストニアの病態を最も鋭敏に反映する可能性を示す.

結論

脳活動を用いてジストニアの鑑別や重症度スコアを予測する技術の開発に向かって着実に前進している.

参考文献

1) Yoshizawa H, Miyamoto JJ, Hanakawa T, Shitara H, Honda M, Moriyama K: Differential patterns in cortical activation during incisal and molar biting at several bite force levels: an fMRI study. Sci Rep 9(1):8419, 2019.06
2) Kita K, S Furuya, Osu R, Sakamoto T, Hanakawa T: Aberrant cerebello-cortical connectivity in pianists with focal task-specific dystonia. (submitted)
3) Uehara K, Furuya S, Kita K, Numazawa H, Sakamoto T, Hanakawa T: Distinct roles of brain activity and somatotopic representation in pathophysiology of focal dystonia. Hum Brain Mapp 40(6):1738-1749, 2019.04

脊髄小脳変性症のリハビリテーションに関する研究

分担研究者：高橋　祐二
国立精神・神経医療研究センター病院
脳神経内科診療部

緒言

脊髄小脳変性症(以下 SCD)のリハビリテーションの有効性は検証されているが，統一されたメニューは提唱されていない．SCD のリハビリテーションを全国的に普及させるためには，具体的なメソッドの指針を作成することが必要である．これまで実施してきた SCD の集中リハビリテーションの手法の見直しを行い，より短期間でより集中して効果を上げられるメソッド開発を目指す．最終的には，厚生労働省「運動失調症の医療基盤に関する調査研究」班（研究代表者　水澤英洋）と共同で，SCD・MSA 診療ガイドラインの改訂に資するリハビリテーションメソッドの開発を目指す．

一方，SCD においてはリズム障害が主症状の一つを占める．これまでのリハビリテーションでは，バランスや歩行訓練が主であり，リズム障害に本格的に取り組んだメソッドは少ない．本研究では，SCD の歩行リズムに特に注目し，測定系を確立して SCD の歩行リズムの特性を分析し，疾患のバイオマーカーの候補となるパラメーターを抽出する．音楽療法を活用したリズム訓練を取り入れ，SCD の運動機能に与える効果を検証する．特に，個々の患者の嗜好に合わせた音楽を選択し，歩行動作を規定する内的リズムにアジャストしたリズム設定を行うことで，個々の患者の特性に最適化した個別化音楽療法を行う．個別化音楽療法により，リハビリテーションに対するモティベーションを最大化することを目指す．

方法

①SCD に最適なリハビリメソッドの開発 (a)歩行可能な SCD におけるバランス評価指標 BESTest の Minimal Detectable Change (MDC) を算出し，2週間・4週間プログラムにおいて MDC を超える BESTest の変化があるかどうか，すなわち測定誤差以上の変化が得られたかどうかを検証した．

(b)厚生労働省「運動失調症の医療基盤に関する調査研究」班（研究代表者　水澤英洋）のリハビリ分科会において宮井一郎班員（森之宮病院）と共同で患者重症度に合わせた具体的なリハビリメニューの策定を行った．

②SCD の個別化音楽療法

SCD の歩行リズム分析と個別化音楽療法の開発：自然歩行リズムを長時間取得可能な安価なシステムを開発した．SCD　9 名(SCA31：4 名，SCA6：2　名，診断未確定：3　名)においてにおいて実際に歩行リズムのデータを取得し，分析を試みた．

結果

①　(a)歩行可能な SCD における BESTest の MDC は 8.7 点であった．4週間リハプログラムでは MDC を超える変化が得られ，介入効果を確認できたが，2週間では MDC 以上の変化が得られず，測定誤差も内包していると考えられた

(b)患者重症度を自立歩行レベルから歩行不能レベルまで 6 段階に分類し，それぞれに対して基礎練習 3 項目，動作練習 11 項目の具体的なメニューを確定した．確定したメニューを運動失調班の HP に掲載し周知した．同時に，わかりやすい動画の作成を開始した．

②SCD の個別化音楽療法

SCD 患者において歩行リズムの変動の分布はべき乗分布と対数正規分布の線形結合で表現できることを見出した．べき乗分布と対数正

規分布の相対的寄与度は SARA の歩行/姿勢スコア(Score 1-3)と四肢動作スコア(Score 5-8)の比率と相関していた．べき乗指数で正常と患者との間に有意差を見いだした ($p=1.71X10^{-4}$).

考察

BESTest の MDC の算出は，リハビリテーションプログラムの効果判定に有用である．SCD 歩行リズム変動にべき乗分布が関連することは，リズム変動の分布がスケールフリーであることを意味し，正規分布を仮定した平均・分散などのパラメーターが適用できないことを示している．以上，①SCD に最適なリハビリメソッドの開発　②SCD の歩行リズム分析と個別化音楽療法の開発　に向けて重要な進捗が得られた．

結論

SCD のリハビリテーションメソッドの開発に向けて順調に研究は進捗した．今後はリハビリテーションメソッドの周知・普及を図るとともに，リズム障害の数理的特性についてデータを集積し論文化を目指す．

参考文献

1)近藤夕騎，板東杏太，有明陽佑，勝田若奈，小林庸子，早乙女貴子，髙橋祐二．歩行可能な脊髄小脳変性症患者に対する短期集中バランストレーニングが身体機能に及ぼす効果 - Balance Evaluation System Test (BESTest) を用いて - ．神経治療　35:628-632, 2018

30-4

Preemptive comprehensive medical care model construction based on disease progress prediction in movement disorder

National Center Hospital, National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)

Takashi Sakamoto ,

N Nishikawa[1)] , Y Mukai[1)], T Yamamoto[1)] , T Noda[2)],Y Takahashi[1)] , T Hanakawa[5)]

Department of Neurology1), Psychiatry2), National Center Hospital, NCNP

IBIC3), NCNP

The aim of this study group is to investigate the factors of the disease process and develop the comprehensive therapy to Parkinson's disease (PD) and other neurodegenerative disorders as dystonia or Spinocerebellar Degeneration (SCD), following the previous study 27-4.

1)PD

Subject:Cognitive Behavior Therapy for Depression and Anxiety in Japanese Parkinson's Disease Patients.

Name of researcher: Noriko Nishikawa, Shinmei Issei, Yuki Hirose

Summary: We conducted the Cognitive behavioral therapy (CBT) studies for depression and anxiety in Parkinson's Disease (PD). The scores in anxiety (Hamilton Rating Scale for anxiety: HAM-A) and depression (Hamilton Rating Scale for depression: HAM-D) significantly improved between the baseline and post assessment after 8 sessions. CBT is useful approach. CBT should be revised based on characteristics of anxiety in PD, including personality traits, alexithymia, and cultural aspects of Japanese PD patients.

Subject:Research on postural abnormalities in patients with Parkinson's disease

Name of researcher: Yohei Mukai

Summary:1. We reported lidocaine injections and neck corset wearing improve dropped head syndrome in Parkinson's disease and related disorders.

2. As an angle measurement method for assessing dropped head syndrome, four types of angles were devised, and the reference value and usefulness were verified.

Subject:Factors of introducing tubal feeding in patients with Parkinson's disease or Dementia with Lewy bodies

Name of researcher: Toshiyuki Yamamoto

Summary: In this retrospective study of 173 patients with Parkinson's disease or Dementia with Lewy bodies, we aimed to assess factors of introducing tubal feeding by

gastrostomy or a nasogastric tube. We examined 9 patients starting to have the tubal feeding within a year after videofluoroscopic examination of swallowing in comparison with remaining 164 patients having oral intake. Of demographic data including age, sex, Hoehn & Yahr stage, body mass index (BMI), the awareness of dysphagia and videofluoroscopic findings, we showed that decreased BMI was an important factor for the introduction of tubal feeding.

Manegement of psychotic symptoms in Parkinson's disease

Name of researcher : Takamasa Noda

Summary: The aim of this study, we clarify the outline of the treatment situation of PD patients."Parkinson's disease" "Parkinson's syndrome" as the name of the disease among the 1,227 patients who were able to carry out the medical record survey, psychotic symptoms were found in 27.7%. About half of them were prescribed antipsychotics (p = 0.00, *odds ratio* = 16.4), most of which were quetiapine (mean dosage = 60.7±63.9mg). The recommendations on treatment of psychosis with PD were assessment the psychotic symptoms and the need for antipsychotics.

2)dystonia

Subject: Cognitive Behavior Therapy (CBT) for dystonia

Name of researcher: Takashi Sakamoto

Summary: In order to treat such dystonia symptoms as rather too slight or too mild to adopt Botulinum therapy or surgical procedure, we developed the Dystonia CBT program; it was successful to improve the dystonia features by reducing the anxiety or mental stress.

Subject: Prediction of dystonic symptoms based on multimodal neuroimaging

Name of researcher: Takashi Hanakawa

Summary: Using multimodal neuroimaging, the team will explore imaging biomarkers reflecting symptoms in patients with focal dystonia. If we can identify such biomarkers, we will use machine-learning methods to construct a model to predict dystonic symptoms.

3)SCD

Subject:Research on the rehabilitation methods for spinocerebellar degeneration

Name of researcher:Yuji Takahashi

Summary: This study aims to develop intensive rehabilitation methods for spinocerebellar degeneration (SCD) and contrive personalized music therapy incorporating rhythm training methods. This study elucidated a scale-free property in the gait rhythms in SCD patients.

30-5　神経変性の病態解明に基づく神経保護的疾患治療法開発研究

荒木　敏之
国立研究開発法人　国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　疾病研究第五部

研究目的

多くの神経変性疾患においては、シナプス～軸索の変性が細胞体の死に先んじて見られ、軸索変性は神経細胞全体に及ぶ変性の初期変化であるとも考えられる。本研究課題は、神経保護的疾患治療の実現を目指し、研究代表者らが研究対象としてきたシナプス～軸索の変性をはじめとする神経疾患の初期過程における最適な治療標的の同定と治療モデル作出を目的とする。

研究代表者グループは、軸索構造の安定性維持・軸索変性の進行を司る細胞内反応機序に関して研究を進め、①NAD 代謝に着目した強力な神経保護法の開発、②神経変性の最初期反応の同定、③神経突起形態制御メカニズムの神経発達障害・神経変性疾患における意義に関する検討を行う。センター内参加者は、膜透過型オートファジー依存的核酸・蛋白分解系の関与（株田）、Eomes 陽性ヘルパーT 細胞（Eomes+Th 細胞）の病態への寄与（大木）デュシェンヌ型筋ジストロフィー原因分子であるジストロフィンの中枢神経系における機能(青木)などそれぞれの側面から神経変性疾患の病態メカニズムの解明に基づく変性抑制による治療法開発を目指す。外部研究機関研究者（大野）は3D 超微細構造観察に高い技術を有しており、共同研究・技術支援による研究開発の加速を図る。

研究組織

主任研究者

荒木　敏之　（国研）国立精神・神経医療研究センター　神経研究所　疾病研究第五部　部長

分担研究者

青木　吉嗣　国研）国立精神・神経医療研究センター　神経研究所　遺伝子疾患治療研究部　部長

大木　伸司　（国研）国立精神・神経医療研究センター　神経研究所　疾病研究第六部(免疫研究部)　室長

株田　智弘　（国研）国立精神・神経医療研究センター　神経研究所　疾病研究第四部　室長

大野　伸彦　自治医科大学医学部解剖学講座　教授

研究成果

研究代表者グループは、NAD 代謝に着目した強力な神経保護法の開発課題については今年度からAMED 橋渡し研究(シーズA)にも採択され、ベンチャー企業・東京薬科大共同研究者とも協力し130 以上の候補化合物の合成・神経保護活性測定を行うことにより、毒性が低く十分な有効性を示す化合物を同定した。

また、研究代表者グループは、Na+/H+交換体であるNHE5 の欠損マウスがASD 様社会性行動異常を示し、細胞レベルでも他の ASD モデルやヒト ASD 患者で観察される未熟な樹状突起形態を認めることを示した。さらに、妊娠マウスでのアンギオテンシン高値が、胎仔での

NHE5 の分解による活性低下を誘発し ASD 様フェノタイプに繋がることを示した。

大木らは多発性硬化症（MS）臨床サンプルを用いた解析から、二次進行型 MS 患者の末梢血における Eomes+Th 細胞の頻度が病態の進行度を反映するバイオマーカーとなることを示した。臨床サンプルを用いた解析から、SPMS 患者の末梢血における Eomes 陽性 Th 細胞の頻度（Eomes 頻度）には多様性があり、Eomes 高頻度群と低頻度群に分類できる。Eomes 高頻度群では病態の進行が認められ、一方、低頻度群の病態は安定していたことから、末梢血中の Eomes 頻度が、SPMS 病態の進行度を反映するバイオマーカーとなることが示された。Eomes 陽性 Th 細胞の生成機序の解明を目的として、T 細胞と相互作用する機能的パートナーである抗原提示細胞に着目し、慢性炎症環境下における挙動の解析を進めた。その結果、持続する慢性炎症環境下に置かれた抗原提示細胞が、異所性にプロラクチンを産生することを見出した。抗原提示細胞由来のプロラクチンは、T 細胞の Eomes 遺伝子発現を誘導することが明らかとなり、Eomes 陽性 Th 細胞を介した神経細胞障害機序の上流に、抗原提示細胞由来の異所性プロラクチン産生が重要な役割を果たすことがわかった。細胞障害性因子である Granzyme B の放出に必要な Eomes 陽性 Th 細胞の活性化に、ミクログリアによる未知抗原の提示が重要である可能性が示された。株田らは、リソソーム膜タンパク質を介した膜透過型オートファジーによるα-synuclein など神経変性疾患関連蛋白の分解メカニズム、当該蛋白の欠損モデルマウスのフェノタイプに関する検討を行った。

青木は今年度から本課題に加入し、筋ジストロフィーモデルマウス(mdx)が示す基底外側扁桃体錐体細胞ポストシナプスの興奮/抑制バランス異常による自閉症様恐怖応答・社会行動異常を見出した。

オートファジーのうち、RNautophagy は株田らが新たに見出した膜透過型オートファジー経路であり、RNA が直接的にリソソームに取り込まれ分解される。SIDT2 はリソソーム膜タンパク質であり、RNautophagy において RNA 輸送体として機能する。株田らは、本研究において RNautophagy と神経変性疾患の分子メカニズムや病態との関連性を明らかにすることを目標としている。また、タンパク質が直接的にリソソームに取り込まれ分解されるという膜透過型オートファジー経路も見出しており、この経路に重要なリソソーム膜タンパク質 CMAT を同定した。また、α-synuclein タンパク質はこの経路の基質となることを見いだした。マウス個体レベルにおいて、CMAT の過剰発現により脳内α-synuclein タンパク質の量を低減させることに成功した（特許出願準備中）。CMAT KO マウスの脳内ではα-synuclein タンパク質量の上昇が観察された。以上の結果から、RNautophagy や新規タンパク質分解経路の活性化は、新たな神経変性疾患の治療法となる可能性がある。

大野らはミトコンドリアと小胞体の接触部（MAM）の形成維持における MITOL（E3 リガーゼ）の役割を示し、更にミトコンドリア分裂融合が細胞内 Ca 濃度制御を介して神経突起の安定性を制御する機序を観察した。本年度は Mfn2 のオリゴマー化を介して、MAM の維持に関与する MITOL の神経細胞および軸索における役割についての検討を共同研究の中で行った。MITOL は Mfn2 をユビキチン化することで、そのオリゴマー化を促進することが知られており、過去の検討から胎児線維芽細胞において、MITOL の欠損が MAM の減少につながることが報告されていた。そこで神経特異的 MITOL 欠損マウスにおいて、MAM の変化を検討した。その結果、神経特異的 MITOL 欠損マウスでは、神経細胞体および軸索における MAM が顕著に減少することが示された。また、ミトコンドリアの形態異常と酸化ストレスのマーカーである蛋白のカルボニル化が観察された。これらの結果は、MITOL を介する MAM の維持はミトコンドリア機能の維持や酸化ストレスの防止に関与することを示唆していると考えられた。これらの結果の一部を原著論文として発表し

た[Nagashima et al. Life Sci Alliance 2019]。

昨年度から本年度にかけ、培養脊髄神経節細胞を用いて、光遺伝学の応用による軸索変性の惹起に関する検討を行った。チャネルロドプシンの一種である oChIEF [Lin et al. Biophys J. 2009]をレンチウイルスベクターを用いて発現させ、その後に光刺激を行うことにより、oChIEF 発現軸索の光刺激領域に特異的に軸索変性を惹起できることが分かった。Ca2+指示蛍光蛋白である GCaMP3 の共発現を行って観察すると、細胞質 Ca2+濃度の上昇がこの軸索変性に先行すると考えられたことから、Ca2+依存性の軸索変性を惹起している可能性が示唆された。実際、電位依存性 Ca2+チャネルの阻害薬である Cd2+処理により、軸索変性が抑制された。また、光刺激に伴って、ミトコンドリアの断片化と輸送の停止が認められた。このミトコンドリアの断片化には、ミトコンドリア分裂蛋白である Drp1 の活性化が伴っていると考えられた。実際、Drp1 のドミナントネガティブ変異蛋白である Drp1K38A を発現させると、ミトコンドリアの有意な伸長と同時に、光刺激時の断片化の抑制が観察された。さらに、この Drp1K38A の発現によって、軸索変性の抑制が観察されたことから、ミトコンドリアの分裂は、Ca2+の軸索内への流入と軸索変性の惹起に関わることが示され、本モデルの In vivo への適応について、今後検討を進める足掛かりを築くことができた。

上記の結果からミトコンドリア分裂の抑制と融合が小胞体との相互作用の修飾にも影響を及ぼすと考えられる。この可能性を in vivo で検討するため、KENGE-Tet システムを応用し[Aida et al. 2015 Genome Biol]、生体内においてミトコンドリアの分裂を細胞特異的かつ可逆的に抑制することが可能なマウスの開発を行った。これは Cre と tTA を発現する細胞特異的に、Dox 投与中断によって Drp1K38A を一過性に発現することのできるマウスである。このマウスを大脳皮質および海馬の興奮性神経細胞に特異的に tTA を発現する系統(CaMKII-tTA)と交配させた。得られたマウスでは、神経細胞において、通常餌投与下で、顕著な Drp1K38A の発現と、ミトコンドリアの分裂抑制による巨大ミトコンドリアの出現が見られることが確認された。また DOX 投与の開始による Drp1K38A の発現低下とミトコンドリアの小型化、あるいは DOX 投与の中断による Drp1K38A の発現開始とミトコンドリアの巨大化が、2~3 週間の間に引き起こされることも確認できたことから、来年度に向けて、疾患モデルに応用する基盤を形成することができた。また、オルガネラの変化を電子顕微鏡画像から高い効率で検出するための深層学習を用いた自動抽出法の開発も進めており、既に核などの大きな構造では良好な予備データが得られつつあることから、こうした新技術の応用によるデータ解析の高速化の実現も目指す。

分担研究報告書

（課題名）神経変性の病態解明に基づく神経保護的疾患治療法開発研究
（所属）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第五部
（氏名）荒木　敏之

緒言

筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患においては、シナプス～軸索の変性が細胞体の死に先んじて見られ、軸索変性は神経変性の初期変化であるとも考えられる。我々はこれまでに軸索構造の安定性を維持する細胞内機構と、軸索変性を進行させる細胞内反応機序に関して研究を行ってきた。また一方で、NAD 代謝に着目し、製薬化学者との共同で Nicotinamide 類縁化合物を用いた強力な神経保護法の開発を進めている。本研究では、神経保護的疾患治療のための最適な治療標的の明確化を目的として、これまでに行ってきた、軸索構造の安定性維持・軸索変性の進行を司る細胞内反応機序に関して研究を進め、①NAD(nicotinamide adenine dinucleotide)代謝に着目した強力な神経保護法の開発、②神経変性の最初期反応の同定、③神経突起形態制御メカニズムの神経発達障害・神経変性疾患における意義に関する検討を行う。またこれまでに見出してきた神経保護化合物の最適化を進め、神経変性疾患のマウスモデルなど動物モデルにおける検証を行うことを目的とする。

方法

① Nicotinamide 類縁化合物による神経保護を目指した研究においては、東京薬科大学の共同研究者が合成した化合物の神経保護効果と NAD 分解酵素に対する阻害効果の検討をおこなった・

② Na-H 交換体蛋白ファミリーの一員である NHE5 の欠損モデルを用いて神経細胞内オートファジー制御を介した自閉症類縁疾患発症における意義を検討した。

結果

① これまで取り組んできた「神経保護活性を有するニコチンアミド類縁化合物」の最適化を進めた。培養下のマウス後根神経節神経細胞を用いた神経損傷モデルにおける神経保護活性と、損傷しない培養神経細胞に対する毒性の評価を行い、高い保護活性・低い毒性を示す化合物を目指すことによりスクリーニングを行った結果、130 以上の候補化合物の中から、十分な保護活性を示す化合物を同定した。

神経保護メカニズムとして、ニコチンアミド類縁化合物が細胞内で代謝されて生成する化合物が、SARM1（軸索変性開始に伴って NAD を分解する）と結合し、元のニコチンアミド類縁化合物よりも高効率に SARM1 の NAD 分解活性を阻害することを示した。

② NHE5 は主として神経細胞の細胞内小胞の膜上に発現する Na-H 交換体の一つであり、NHE5 ノックアウトマウスは自閉症様フェノタイプの一つであるとされる社会行動異常を示した。細胞レベルでは、NHE5 ノックアウトや機能抑制により、樹状突起スパインの未熟化が観察された。さらに、妊娠マウスでのアンギオテンシン高値が、胎仔での NHE5 の分解による活性低下を誘発し ASD 様フェノタイプに繋がる可能性を示した。

考察

① 上述のように、神経保護活性を持つ化合物が、神経細胞内で代謝を受けた結果生じる化合物が、SARM1 に結合して NAD 分解を阻害する、というのが、神経保護化合物の作用メカニズムである可能性が高くなった。神経保護化合物は、細胞内で多段階の代謝を受ける可能性があるため、どの段階の代謝物が最も高い SARM1 阻害活性を持つのかを、今後さらに検討し明らかにする。

② 自閉症類縁疾患のリスク因子として、妊娠高血圧があることが報告されているが、妊娠高血圧と自閉症類縁疾患発症とをつなぐメカニズムはこれまで明らかにはなっていない。我々の同定した、アンギオテンシンレベルの変化が誘導するNHE5発現変化は、妊娠高血圧と自閉症類縁疾患発症とをつなぐメカニズムとなる可能性があり、今後さらにヒト由来検体を用いた解析を行う。また、NHE5変異はこれまでのところ自閉症類縁疾患患者においては報告が無いため、NCNPバイオバンク検体を用いた検討を行う予定である。

参考文献（業績）

Bertoldo MJ, Listijono DR, Ho WJ, Riepsamen AH, Goss DM, Richani D, Jin XL, Mahbub S, Campbell JM, Habibalahi A, Loh WN, Youngson NA, Maniam J, Wong ASA, Selesniemi K, Bustamante S, Li C, Zhao Y, Marinova MB, Kim LJ, Lau L, Wu RM, Mikolaizak AS, Araki T, Le Couteur DG, Turner N, Morris MJ, Walters KA, Goldys E, O'Neill C, Gilchrist RB, Sinclair DA, Homer HA, Wu LE.
NAD+ Repletion Rescues Female Fertility during Reproductive Aging.
Cell Reports 30(6) 1670 - 1681, 2020.

Nagashima S, Takeda K, Shiiba I, Higashi M, Fukuda T, Tokuyama T, Matsushima N, Nagano S, Araki T, Kaneko M, Shioi G, Inatome R, Yanagi S
Critical role of CRAG, a splicing variant of centaurin-γ3, in ELK1-mediated SRF activation during neuronal development.
Scientific Reports 9: 20107, 2019.

Kondo S, Takahashi K, Kinoshita Y, Nagai J, Wakatsuki S, Araki T, Goshima Y, Ohshima T
Genetic inhibition of CRMP2 phosphorylation delays Wallerian degeneration after optic nerve injury.
Biochemical and Biophysical Research Communications 514(4) 1037 - 1039, 2019.

Tsubota M, Fukuda R, Hayashi Y, Miyazaki T, Ueda S, Yamashita R, Koike N, Sekiguchi F, Wake H, Wakatsuki S, Ujiie Y, Araki T, Nishibori M, Kawabata A
Role of non-macrophage cell-derived HMGB1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and its prevention by the thrombin/thrombomodulin system in rodents: negative impact of anticoagulants.
Journal of Neuroinflammation 16: 199, 2019.

Kondo S, Takahashi K, Kinoshita Y, Nagai J, Wakatsuki S, Araki T, Goshima Y, Ohshima T
Genetic inhibition of CRMP2 phosphorylation at serine 522 promotes axonal regeneration after optic nerve injury.
Scientific Reports 9: 7188, 2019.

神経変性病態の形成過程における免疫細胞の動態研究

国立精神・神経医療研究センター神経研究所
免疫研究部
大木 伸司

緒言

神経変性疾患の病態機序の不明な点が多く、様々な疾患に生じる神経変性病態の異同すら明らかではない。私たちは、神経変性を伴う二次進行型多発性硬化症（SPMS）の病態形成過程に関わる神経細胞障害性の Eomes 陽性ヘルパーT 細胞（Eomes+Th 細胞）を同定した。Eomes+Th 細胞の生成には、持続する中枢神経系（CNS）の慢性炎症が重要であることから、本研究では Eomes+Th 細胞の体内動態と、炎症に伴って浸潤した抗原提示細胞およびミクログリアとの三者の相互作用に着目し、慢性炎症環境下における Eomes+Th 細胞の生成機序の解明を行う。並行して種々の神経変性疾患とその動物モデルにおける Eomes+Th 細胞の動態解析を進め、普遍的な免疫依存性の神経変性機序の解明と、画期的な治療法につながる成果の取得を目指す。

方法

SPMS モデルマウスと神経変性モデルマウスの病態形成に伴う Eomes+Th 細胞の体内動態を解析し、病態との関わりを検証する。慢性炎症下の抗原提示細胞とミクログリアの遺伝子発現解析を行い、Eomes+Th 細胞の生成に関わる分子群を同定する。ヒト神経変性疾患における Eomes+Th 細胞の動態解析を行い、動物モデルのデータと比較解析した。

結果

慢性炎症環境下の抗原提示細胞が産生する異所性のプロラクチンが、Th 細胞の Eomes 発現を誘導することを明らかにした（文献）。抗原提示細胞のプロラクチン産生には、自身が産生する炎症性サイトカイン（IL-1、IL-6、IL-12）の他、ミクログリア由来の Type I IFN が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

考察

慢性炎症を伴う神経変性病態における免疫応答の関与が示された。免疫細胞、グリア細胞（と恐らく神経細胞）の複雑な相互作用が重要な病態制御因子と考えられ、神経・免疫両側面からの横断的なアプローチが、いまだ有効な治療法が確立してない神経変性疾患の未知の病態機序解明に有効であると考えられた。

結論

Th 細胞、抗原提示細胞とミクログリアの機能的相互作用が、神経変性病態の形成過程に重要な役割を果たすことが示された。プロラクチンが、種々の神経変性病態の新しい治療標的候補分子となることが明らかとなった。

参考文献

1. Chenyang Zhang, Ben J. E. Raveney, Hirohiko Hohjoh, Chiharu Tomi, Shinji Oki, Takashi Yamamura. Extrapituitary prolactin promotes generation of Eomes-positive helper T cells mediating neuroinflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 116 (42) 21131–21139 (2019)

分担研究報告書

（課題名）膜透過型オートファジー機構に基づく神経変性疾患の病態解明

（所属）国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第四部

（氏名）株田　智弘

緒言

多くの神経変性疾患においては、タンパク質や RNA の細胞内への蓄積が神経変性を引き起こすことから、病態解明や治療法開発のために細胞内分解の理解は極めて重要である。リソソームによる細胞内分解機構であるオートファジーのうち、RNautophagy は我々が以前新たに見出した膜透過型オートファジー経路であり、RNA が直接的にリソソームに取り込まれ分解される。SIDT2 はリソソーム膜タンパク質であり、RNA のリソソーム内への輸送において重要な分子である。SIDT2 は、RNA transporter として知られる線虫 SID-1 の脊椎動物オルソログであることから、RNautophagy において RNA transporter として機能すると考えられる。本研究では RNautophagy と神経変性疾患の分子メカニズムや病態との関連性を明らかにすることを目的とする。さらに、タンパク質が直接的にリソソームに取り込まれ分解されるという新規のオートファジー経路も見出しつつあり、これについても同様に解析を進める。

方法

培養細胞としては、Mouse embryonic fibroblast および Neuro2a 細胞を用いた。リソソーム膜に存在するタンパク質トランスポーター候補分子（ここでは CMAT と呼ぶ）について、過剰発現および siRNA によるノックダウンを行なった。それぞれの細胞について、パルス・チェイス・アッセイや Tet-off システムを用いて単位時間におけるタンパク質の分解を追跡した。リソソームへのタンパク質の直接取り込みに関しては、上記細胞から調製した単離リソソームを用いて実験を行なった。動物個体レベルの解析では、CMAT KO マウスおよび CMAT を過剰発現する Tg マウスを用いた。

結果

単離リソソームを用いた実験の結果、タンパク質が直接的にリソソームに取り込まれ分解され、新規のオートファジー経路を発見した。CMAT の過剰発現およびノックダウンにより、細胞内におけるタンパク質分解や単離リソソームにおけるタンパク質分解が、それぞれ増加、減少した。また、CAMT を介した分解は、マクロオートファジーやシャペロン介在性オートファジーなど、既知の分解経路とは異なることを確認した。これらの結果から、CMAT が新規経路に重要であることが判明した。また、パーキンソン病などの原因として知られる α-synuclein タンパク質は新規経路の基質となることを見いだした。マウス個体レベルにおける解析では、CMAT の過剰発現 (Tg)により脳内 α-synuclein タンパク質の量を低減させることに成功した。また、CMAT KO マウスの脳内では α-synuclein タンパク質量の上昇が観察された。

考察・結論

タンパク質が直接的にリソソームに取り込まれ分解されるという新規のオートファジー経路を発見した。この経路に重要なリソソーム膜タンパク質 CMAT を同定した。

新規タンパク質分解経路の活性化は、新たな神経変性疾患の治療法となる可能性がある。

参考文献（業績）

Hirayama K, Fujiwara Y, Terada T, Shimizu K, Wada K, *Kabuta T. Virtual screening identification of novel chemical inhibitors for aberrant interactions between pathogenic mutant SOD1 and tubulin. Neurochem Int. 2019;126:19-26.

神経・筋疾患の中枢神経障害に対する遺伝子治療法開発

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 遺伝子疾患治療研究部
青木　吉嗣

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は，DMD 遺伝子の変異により筋細胞膜から完全長ジストロフィンの Dp427 が欠損し､進行性の筋萎縮・筋力低下をきたす X 連鎖性の希少難病である． DMD 遺伝子からは、完全長の Dp427 に加えて、短い Dp140 アイソフォームが翻訳され, 両者はいずれも脳に発現する. ゲノムワイド関連解析から、DMD 遺伝子は恐怖応答遺伝子としても知られる。特に Dp140 が欠損した DMD 患者は自閉症を有意に伴い[1]，Dp140 は胎児・幼少期に発現が高く，神経発達障害の遺伝子と関わる[2]ことから，DMD 遺伝子は自閉スペクトラム症の原因遺伝子候補と考えられる. これまで, DMD モデルマウスの行動や生理学実験では，Dp427 欠損の mdx23 マウスが主に解析されてきた. mdx23 マウスで認める恐怖・不安反応の増強や社会性行動異常は、扁桃体における錐体神経細胞の Dp427 欠損が原因と考えられている[3, 4]. しかし、Dp140 の欠損により、認知・情動機能の異常が生じる神経生理基盤や分子病態の詳細は未だ明らかではない.

本研究では、DMD モデルの mdx および mdx52 マウスを用いる（両者とも Dp427 を欠損)。mdx マウス脳では Dp140 が発現し、mdx52 マウス脳では Dp140 が発現しないことから，両者を比較する事で、Dp140 の分子機能が明らかになると期待される。

方法

1. DMD モデルの mdx および mdx52 マウス、野生型 C57BL/6J マウスを用いる。
2. 前述のマウスを対象に、恐怖・不安や社会性を対象とした行動解析を実施する。
3. 前述マウスの扁桃体を対象に、Dp140 の発現解析を実施する。
4. 前述マウスを対象に、社会性に重要な神経核である扁桃体・基底外側核における錐体神経細胞での電気生理学的解析および分子生物学的解析を実施する。

結果

1. 恐怖・不安反応の試験では，mdx および mdx52 マウスでは野生型と比べて恐怖・不安反応の増強を示す有意な差があったが，mdx および mdx52 マウス間では差はなかった.
2. 社会性行動試験では、mdx52 マウスは，初めて出会うマウスに迫り寄る時間が mdx と比べて有意に増加し, 社会的コミュニケーション障害が示唆された。
3. Dp140 は、野生型と mdx23 マウスの扁桃体では発現し, mdx52 マウスの扁桃体では発現しないことを確認した.
4. 扁桃体・基底外側核における錐体神経細胞を対象に、whole-cell パッチクランプを実施したところ、mdx52 マウスでは，mdx マウスあるいは野生型と比べて、錐体神経細胞における神経活動の興奮性・抑制性シナプス後電流の振幅の比（E/I バランス）が有意に低下し、mEPSC の頻度異常を認めた。
5. mdx52 マウス扁桃体では、シナプス前終末に局在する小胞型グルタミン酸トランスポーター発現レベルが有意に低下していた.
6. mdx52 マウスでは，mdx マウスあるいは野生型と比べて、扁桃体・基底外側核における paired-pulse ratio と微小興奮性シナプス電流の発火頻度が有意に低下していた.

考察

Dp140 を欠損する mdx52 マウスでは、自閉症様の社会的コミュニケーション障害を認め、扁桃体・基底外側核では、自閉症モデルマウスと同様に E/I バランス異常を認めることを見出した。

今後は、マウス扁桃体・基底外側核の錐体神経細胞を対象に、Golgi 染色により spine 密度の評るおよび電子顕微鏡によるシナプス構造評価（シナプス小胞数や大きさ、間隙の距離）を実施する。さらに、Dp140 がシナプス前終末からのグルタミン酸放出を制御する分子機構を明らかにするため，錐体神経細胞を標的にしたオプトジェネティクスを行う．最後に、次世代スプライス・スイッチ核酸を、mdx52 マウスの脳室内あるいは髄腔内に投与する事により、Dp140 の発現を回復させ、Dp140 欠損に伴う社会性行動異常や電気生理異常が回復するかを確認する。併せて、成果の論文化準備を進める。

結論

Dp140 は、マウス扁桃体・基底外側核の錐体神経細胞シナプス前終末におけるグルタミン酸放出を制御することで，シナプスの興奮性バランスを保ち，社会的コミュニケーション能力の保持に関与する可能性が示唆された．

参考文献

1. Felisari G et al, Neurology. 2000
2. Doorenweerd et al, Sci Rep. 2017
3. Sekiguchi M et al, Brain. 2009
4. Ralph Adolphs, Nature Reviews Neuroscience. 2003

軸索変性に伴うオルガネラ相互作用の変化とその制御機構の解明

自治医科大学医学部
解剖学講座組織学部門
大野　伸彦

緒言

軸索変性にミトコンドリアをはじめとするオルガネラの動態と機能が重要な役割を果たしている。しかしその動態の制御メカニズムや、機能維持を担うオルガネラ間の相互作用の軸索における生理的な分布と構造的な特性、そして軸索変性を伴う病態下における変化は、不明な点が多く残されている。本研究では、特にミトコンドリアと小胞体、そしてそれらの間の相互作用(Mitochondria associated membranes, MAM)に焦点を絞り、ミクロトーム組み込み式走査型電子顕微鏡(SBF-SEM)による 3 次元超微形態解析技術や分子標識、光遺伝学などを組み合わせ、脱髄を含む髄鞘疾患を中心として、病態における個々のオルガネラと相互作用の超微細構造変化とそれらの関連分子による制御機構を明らかにする。

方法

本年度は昨年度までの結果をふまえ、Mfn2 のオリゴマー化を介して、MAM の維持に関与する MITOL の神経細胞および軸索における役割についての検討を共同研究の中で行った。MITOL は Mfn2 をユビキチン化することで、そのオリゴマー化を促進することが知られており、過去の検討から胎児線維芽細胞において、MITOL の欠損が MAM の減少につながることが報告されていた。そこで神経特異的 MITOL 欠損マウスにおいて、MAM の変化を検討した。

また、昨年度の予備検討から引き続いて、ラット胎児より調整した培養脊髄神経節細胞にチャネルロドプシンを発現させ、光刺激に伴う軸索変性の惹起に関する検討を行った。さらに、観察されたミトコンドリアの断片化にミトコンドリア分裂蛋白である Drp1 の活性化が伴っていると考えられたため、Drp1 のドミナントネガティブ変異蛋白である Drp1K38A を発現させ、ミトコンドリアおよび軸索変性への影響を観察した。

これまでの研究結果から、ミトコンドリア分裂の抑制と融合が小胞体との相互作用の修飾にも影響を及ぼすと考えられる。この可能性を in vivo で検討するため、KENGE-Tet システムを応用し[Aida et al. 2015 Genome Biol]、Cre と tTA を発現する細胞特異的に、Dox 投与中断によって Drp1K38A を一過性に発現することによって、生体内においてミトコンドリアの分裂を細胞特異的かつ可逆的に抑制することが可能なマウスモデル(KENGE-Tet-Drp1K38A)の開発を行った。

結果

神経特異的 MITOL 欠損マウスでは、神経細胞体および軸索における MAM が顕著に減少することが示された。また、ミトコンドリアの形態異常と酸化ストレスのマーカーである蛋白のカルボニル化が観察された。これらの結果の一部を原著論文として発表した[Nagashima et al. Life Sci Alliance 2019]。

チャネルロドプシンの一種である oChIEF [Lin et al. Biophys　J. 2009]をレンチウイルスベクターを用いて培養脊髄神経節細胞発現させ、その後に光刺激を行うことにより、oChIEF 発現軸索の光刺激領域に特異的に軸索変性を惹起できることが分かった。Ca^{2+}指示蛍光蛋白である GCaMP3 の共発現を行って観察すると、細胞質 Ca^{2+}濃度の上昇がこの軸索変性に先行すると考えられたことから、Ca^{2+}依存性の軸索変性を惹起している可能性が示唆された。実際、電位依存性 Ca^{2+}チャネルの阻害薬である Cd^{2+}処理により、軸索変性が抑制された。また、光刺激に伴って、ミトコンドリアの断片化と輸送の停止が認められた。Drp1 のドミナントネガティブ変異蛋白である Drp1K38A を発現させると、ミトコンドリアの有意な伸長と同時に、光刺激時のミトコンドリアの断片化の抑制が観察された。さらに、この Drp1K38A の発現によって、軸索変性の抑制が観察された。

本年度は KENGE-Tet-Drp1K38A マウスを作出し、大脳皮質および海馬の興奮性神経細胞に tTA を発現する系統(CaMKII-tTA)と交配させた。得られたマウスでは、通常餌投与下(DOX 非投与下)で、大脳皮質と海馬の神経細胞で顕著な Drp1K38A の発現と、ミトコンドリアの分裂抑制による巨大ミトコンドリアの出現が見られることが確認された。また DOX 投与の開始による Drp1K38A の発現低下とミトコンドリアの小型化、あるいは DOX 投与の中断による Drp1K38A の発現開始とミトコンドリアの巨大化が、2~3 週間の間に引き起こされることも確認できた。

考察

MITOL 欠損マウスの解析によって得られた結果は、MITOL を介する MAM の維持はミトコンドリア機能の維持や酸化ストレスの防止に関与することを示唆していると考えられ、また、初年度の結果から軸索における Mfn2 の作用の増強が、脱髄に伴う軸索の MAM の増加に関与する可能性が示唆されていたが、MITOL の欠損による Mfn2 の活性の減弱が MAM の減少につながることは、この Mfn2 を介した軸索の MAM の制御機構を支持する所見と考えられる。

脊髄神経節細胞培養における oChIEF 光刺激に伴う軸索変性の実験から、電位依存性 Ca^{2+}チャネルを介した Ca^{2+}濃度上昇と軸索変性には、ミトコンドリアの分裂が関与する可能性が示唆された。電位依存性 Ca^{2+}チャネルは物理的ダメージなどの際の軸索障害にも関わる。したがって、髄鞘疾患や他疾患における神経・軸索変性とミトコンドリア分裂の相関性について、新たに作製したマウスモデルによる In vivo での検討を行う足掛かりを築くことができた。

本年度の研究で得られた生体内での細胞特異的ミトコンドリア融合の可逆的制御系は、MAM の形成・調節機構にミトコンドリアの分裂が一次的な刺激として関与するのかどうかについて、In vivo での検証を可能にすると期待される。また、実際に生体内において脱髄などによる神経軸索変性にミトコンドリア分裂が関わる可能性について、より詳細な検討を進める土台となることが期待される。

来年度はミトコンドリア分裂を抑制する薬剤に臓器保護作用の報告がみられることをふまえ[Nishimura et al. Sci Signal 2018]、神経組織におけるミトコンドリア分裂の抑制と神経軸索保護作用の有無について、Cuprizone 投与やリゾレシチンによる脱髄-再髄鞘化モデルなどを中心に、班内の他の軸索変性モデルも対象としながら、共同研究を進めたいと考える。また、今年度は神経発生期の神経細胞や腎臓の足細胞など、多様な細胞におけるオルガネラの変化を電子顕微鏡画像から高い効率で検出するための技術について検討を進め、深層学習を用いた自動抽出法の応用が視野に入りつつある。既に核などの大きな構造では良好な予備データが得られつつあることから、こうした新技術の応用によるデータ解析の高速化の実現も目指す。

結論

今年度は MAM の維持がミトコンドリア機能の維持や酸化ストレスの防止に関与すること、ミトコンドリアの分裂が Ca^{2+}の軸索内への流入による軸索変性の惹起に関わることを示し、生体内でのミトコンドリア分裂抑制マウスモデルの開発および電子顕微鏡画像からの構造抽出法の開発を行った。これらの知見および技術は、来年度のミトコンドリア動態と MAM 制御および神経軸索保護の関係性の検証における重要な基盤となると期待される。

参考文献

1. Matsumoto M, Sawada M, García-González D, Herranz-Pérez V, Ogino T, Bang Nguyen H, Quynh Thai T, Narita K, Kumamoto N, Ugawa S, Saito Y, Takeda S, Kaneko N, Khodosevich K, Monyer H, García-Verdugo JM, Ohno N, Sawamoto K. Dynamic Changes in Ultrastructure of the Primary Cilium in Migrating Neuroblasts in the Postnatal Brain. J Neurosci. 2019;39(50):9967-9988.

2. Nagashima S, Takeda K, Ohno N, Ishido S, Aoki M, Saitoh Y, Takada T, Tokuyama T, Sugiura A, Fukuda T, Matsushita N, Inatome R, Yanagi S. MITOL deletion in the brain impairs mitochondrial structure and ER tethering leading to oxidative stress. Life Sci Alliance. 2019;2(4). pii: e201900308.

3. Takaki T, Ohno N, Saitoh S, Nagai M, Joh K. Podocyte penetration of the glomerular basement membrane to contact on the mesangial cell at the lesion of mesangial interposition in lupus nephritis: a three-dimensional analysis by serial block-face scanning electron microscopy. Clin Exp Nephrol. 2019;23(6):773-781.

4. Thai TQ, Nguyen HB, Sui Y, Ikenaka K, Oda T, *Ohno N. Interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum in demyelinated axons. Med Mol Morphol. 2019;52(3):135-146.

5. Sui Y, Nguyen HB, Thai TQ, Ikenaka K, Ohno N. Mitochondrial Dynamics in Physiology and Pathology of Myelinated Axons. Adv Exp Med Biol. 2019;1190:145-163.

30-5

Research for developing neuroprotective therapy against neurodegenerative diseases via elucidation of pathogenetic mechanism.

Toshiyuki Araki

Department of Peripheral Nervous System Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

Aims

In many neurodegenerative diseases, synaptic and axonal degenerations are observed prior to the death of the cell bodies, and therefore axonal degeneration is considered as an early phenomenon in the entire mechanism of neuronal degeneration. This study aims to identify the optimal therapeutic target in the initial process of neurodegeneration including degeneration of synapses and axons, and to create a therapeutic model using model animals to combat against neurodegenerative disorders. The research leader's group has been conducting research on the subcellular signaling mechanism that governs the maintenance of axonal structural integrity and progression of axonal degeneration. They aim to 1) develop a neuroprotective method focusing on NAD metabolism, 2) to identify initial neuronal changes in the pathogenesis of neurodegeneration, and 3) to examine the role of neurite morphogenesis / fate determination mechanism in neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. Participants from NCNP aim to develop therapy against neurodegeneration by analysis of a novel type of autophagy to degrade nucleic acid (Kabuta) ,by analyzing contribution of Eomes-positive helper T cells (Eomes + Th cells) to the pathogenesis (Oki), and by analyzing the roles of dystrophin in the central nervous system neurons via phenotype analysis of mdx mice. A researcher from outside research institutes has high technology in 3D ultrastructural observation (Ohno), and aims to accelerate research and development through joint research and technical support.

Research Team

-Leader

Toshiyuki Araki: Director, Department of Peripheral Nervous System Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry (leader of this team)

-Participants

Yoshitsugu Aoki: Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience,

National Center of Neurology and Psychiatry

Shinji Oki: Section chief, Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

Tomohiro Kabuta: Section Chief, Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

Nobuhiko Ohno: Professor, Department of Anatomy, Jichi Medical University

30－6　運動症状を主症状とする小児期発症稀少難治性神経疾患研究

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター
佐々木征行

総括研究報告

１．研究目的

小児の①Movement disorders（ジストニアなどの不随意運動症），②小脳性運動失調症、③痙性対麻痺、そして④発達性てんかん性脳症（DEE: Developmental and epileptic encephalopathy. 大田原症候群；EIEE、West 症候群など）を主な対象とする。いずれも発症頻度が低く通常検査で原因確定困難である。近年これらの疾患では、原因遺伝子が確定され分子レベルで病態が解明されつつある。本研究班では以下の研究を行う。

１）患者疫学調査。上記該当患者を登録して臨床像（神経学的所見、頭部画像所見等）を記録。

２）患者参加型の登録レジストリの確立。

３）次世代シークエンサーによる遺伝子解析で原因遺伝子探索を行う。ターゲットスクリーニングや必要に応じて全エクソーム解析を実施。

４）遺伝子診断などで確定した疾患について、その臨床像から診断ガイドライン（診断マニュアル）を作成。遺伝子情報から分子生物学的病態について検討し、治療研究を目指す。

２．研究組織

主任研究者：佐々木征行　国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科

分担研究者：

加藤光広　昭和大学医学部小児科

遠山　潤　国立病院機構西新潟中央病院神経小児科

松本直通　横浜市立大学医学研究科遺伝学

井上　健　国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究２部

佐藤典子　国立精神・神経医療研究センター病院放射線診療部

齋藤貴志　国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科

石山昭彦　同上

竹下絵里　同上

本橋裕子　同上

３．研究成果

１）小児の小脳性運動失調症の全国調査をまとめ論文発表した[1)]。続いて小児のジストニアの疫学調査を実施準備している.

２）発達性てんかん性脳症（DEE）において、新規原因遺伝子を複数（*PRUNE1, SMC1A*[2)] など）見出した。DEE の原因遺伝子探索のため全エクソーム解析を実施し、新たな異常を見出しつつある[3)]。全エクソーム解析（WES）は短鎖シーケンスを用いることが一般的であるが、この方法では診断できず、長鎖シーケンスを用いて初めて異常を見出した進行性ミオクローヌスてんかん家系を経験し、長鎖シーケンスを用いた WES の有用性を示した[4)]。

３）Pelizaeus-Merzbacher 病で PLP 蛋白の産生や組み立てに影響を与えるクルクミン治療を試みた。1 年間の治験を 9 例で行い結果を集計中である。

４）*CACNA1A* 異常を呈す発作性失調症 2 型患者に単線維針筋電図で jitter を見出し[5)]、電気生理学的検査で本遺伝子異常を疑えることを示した。

４．研究成果刊行一覧

1. Ono H, Shimizu-Motohashi Y, Maruo K, Takeshita E, Ishiyama A, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sasaki M: Childhood-onset cerebellar ataxia in Japan: A questionnaire-based survey. Brain Behav. 2019, Oct;9(10):e01392. doi: 10.1002/brb3.1392.
2. Oguni H, Nishikawa A, Sato Y, Otani Y, Ito S, Nagata S, Kato M, Hamanaka K, Miyatake S, Matsumoto N. A missense variant of *SMC1A* causes periodic pharmaco-resistant cluster seizures similar to *PCDH19*-related epilepsy. Epilepsy Res. 2019 Sep;155:106149. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2019.06.001.
3. Takata A, Tohyama J, Sasaki M, Kato M, Matsumoto N, et al. Comprehensive analysis of coding variants highlights genetic complexity in

developmental and epileptic encephalopathy. Nat Commun. 2019 Jun 7;10(1):2506. doi: 10.1038/s41467-019-10482-9.

4. Mizuguchi T, Suzuki T, Abe C, Umemura A, Tokunaga K, Kawai Y, Nakamura M, Nagasaki M, Kinoshita K, Okamura Y, Miyatake S, Miyake N, Matsumoto N. A 12-kb structural variation in progressive myoclonic epilepsy was newly identified by long-read whole-genome sequencing. J Hum Genet. 2019 May;64(5):359-368. doi: 10.1038/s10038-019-0569-5.
5. Hirasawa-Inoue A, Ishiyama A, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Yuasa S, Saitsu H, Hamanaka K, Miyatake S, Matsumoto N, Sasaki M. Single-fiber electromyography-based diagnosis of *CACNA1A* mutation in children: A potential role of the electrodiagnosis in the era of whole exome sequencing. Brain Dev. 2019 Nov; 41(10): 905-909. doi: 10.1016/j.braindev.

ATP1A3 関連神経疾患で認める小脳萎縮

分担研究者：国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科　佐々木征行
研究協力者：同上　石山昭彦、本橋裕子、
竹下絵里、齋藤貴志、住友典子
同放射線診療部　佐藤典子
福岡大学医学部小児科　石井敦士、廣瀬伸一
横浜市大遺伝学　松本直通

【はじめに】*ATP1A3* 関連神経疾患には、①小児交互性片麻痺[1] (AHC : Alternating hemiplegia of childhood) 、② RDP[2] (Rapid-onset dystonia-Parkinsonism : DYT12)、③CAPOS[3] (Cerebellar ataxia with pes cavus, optic atrophy, and sensory neural hearing loss)、④熱誘発性発作性脱力・脳症[4] (FIPWE : Fever-induced paroxysmal weakness and encephalopathy)／小脳失調を伴う再発性脳炎[5] (RECA : Relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia)、⑤新生児期発症重度てんかん性脳症[6]などの病型が報告されている。

我々は、一昨年度はこれらの診断基準を整理した[7]。昨年度は *ATP1A3* 遺伝子変異を「反復する麻痺発作を伴わず緩徐進行性小脳失調症を主症状とした２小児例」に見出し、これまでに報告のない「緩徐進行性小脳失調型 *ATP1A3* 変異：Slowly progressive cerebellar ataxia：SPCA 型」と呼ぶことを提案した[8]。

ATP1A3 関連神経疾患においては、頭部画像学的検討では脳形態に異常を来さないということがこれまで大きな特徴とされてきた。しかし、昨年我々が報告した SPCA 型の 2 症例においては、すでに小児期より小脳萎縮を認めていた。

今年度は、*ATP1A3* 関連神経疾患での小脳萎縮の有無と、小脳萎縮を認める際の小脳形態の特徴について検討した。

【対象と方法】当小児神経科を受診し、遺伝子検査で *ATP1A3* 異常を認めた 20 例を対象とした。年齢は 2 歳から 50 歳にわたっていた。臨床診断は、AHC 15 例、RECA 1 例、SPCA 2 例である。それぞれの患者で頭部 MRI を施行し、小脳萎縮の有無を検討した。

【結果】AHC においては 9 例で小脳萎縮を認めた。RECA 例には小脳萎縮を認めず、SPCA の 2 例はいずれも軽度の小脳皮質萎縮を認めた。

小脳萎縮を認めた 11 例では全般的な小脳皮質萎縮が共通した所見であった。この中で純粋な小脳萎縮だけを認めた例が 4 例、小脳萎縮に加えて前頭葉および海馬萎縮を伴った例が 7 例あった。後者の 7 例はいずれもけいれん重積を繰り返し、知的退行および運動退行が著しくいずれも常時臥床の状態であった。

一方小脳萎縮だけを認めた 4 例では、いずれも緩徐進行性の小脳性運動失調を認めた。

【考察】*ATP1A3* がコードする Na^+/K^+-ATPase α3 サブユニットは大脳皮質・基底核および小脳皮質に多く発現していることが知られている[9]。そのため *ATP1A3* の変異により Na^+/K^+-ATPase α3 サブユニットの発現量や機能に異常を来し、*ATP1A3* 関連神経疾患では大脳皮質、基底核あるいは小脳の異常に由来する症状を呈すると考えられる。本症においては、てんかん・知的障害・不随意運動症・小脳失調などを組み合わせた様々な症状が起き得ることは、この遺伝子産物の発現部位と大いに関連があるといっていいだろう。

ATP1A3 関連神経疾患では発症当初は頭部 MRI で脳形態異常がないことがほとんどであるが、その進行過程でとくに小脳性運動失調症を来す例では緩徐進行性小脳皮質萎縮を来す症例が半数近くある[10]ことから、小脳皮質萎縮は本症では比較的ありふれた画像所見である可能性が想定される。

ATP1A3 関連神経疾患では、突発性あるいは反

復性の臨床症状が疾患の大きな特徴と考えられていた。しかし我々の報告した SPCA 型が存在することから考えて、必ずしも突発性あるいは反復性が *ATP1A3* 関連神経疾患で絶対必要な条件とは限らないことが分かった。つい最近は小児の統合失調症 [11]や自閉スペクトラム症 [12]の患者からも *ATP1A3* 異常が見出され、疾患概念が広がりつつある。

SPCA 型 *ATP1A3* 関連神経疾患は臨床的には孤発性小脳性運動失調症であった。おそらく、原因不明で家族歴のない小脳性運動失調症の中に本遺伝子異常を持つ症例も含まれている可能性がある。

【参考文献】

1. Sasaki M, Ishii A, Saito Y, et al. Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood. *Neurology.* 2014; 82: 482-490.
2. Brashear A, Dobyns WB, de Carvalho Aguiar P, et al. The phenotypic spectrum of rapid-onset dystonia-parkinsonism (RDP) and mutations in the ATP1A3 gene. *Brain.* 2007;130:828-835.
3. Demos MK, van Karnebeek CD, Ross CJ, et al. A novel recurrent mutation in *ATP1A3* causes CAPOS syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:15.
4. Yano ST, Silver K, Young R, et al. Fever-Induced paroxysmal weakness and encephalopathy, a new phenotype of *ATP1A3* mutation. *Pediatr Neurol.* 2017;73:101-105.
5. Dard R, Mignot C, Durr A, Lesca G, Sanlaville D, Roze E, Mochel F. Relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia related to an *ATP1A3* mutation. *Dev Med Child Neurol.* 2015 Dec;57(12):1183-1186.
6. Paciorkowski AR, McDaniel SS, Jansen LA, et al. Novel mutations in *ATP1A3* associated with catastrophic early life epilepsy, episodic prolonged apnea, and postnatal microcephaly. *Epilepsia.* 2015;56:422-430.
7. 佐々木征行. 小児期に発症する小脳失調症を来す疾患に関する研究. 精神・神経疾患研究開発費 27-5 「運動症状を主症状とする先天性発達期脳障害に関する研究」総括研究報告書. 62-69, 2018, 3 月.
8. 佐々木征行. 緩徐進行性小脳失調を主症状とする、これまでに報告のない *ATP1A3* 関連神経疾患. 精神・神経疾患研究開発費 30-6 「運動症状を主症状とする小児期発症希少難治性神経疾患研究」平成 30 年度報告会抄録集. 6-7, 2018, 12 月
9. McGrail KM, Phillips JM, Sweadner KJ. Immunofluorescent localization of three Na, K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na K-ATPase. *J Neurosc* 1991;11:381–391.
10. Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Hirose S. Progressive brain atrophy in alternating hemiplegia of childhood. *Mov Disord Clin Prac* 2017;4:406-411.
11. Smedemark-Margulies N, Brownstein CA, Vargas S, et al. A novel de novo mutation in *ATP1A3* and childhood-onset schizophrenia. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2016 Sep;2(5):a001008.
12. Torres A, Brownstein CA, Tembulkar SK, et al. *De novo ATP1A3* and compound heterozygous *NLRP3* mutations in a child with autism spectrum disorder, episodic fatigue and somnolence, and muckle-wells syndrome. *Mol Genet Metab Rep.* 2018 Jun 15;16:23-29.

精神・神経研究開発費 30-6

演題名：福山型先天性筋ジストロフィー患者における新しいMR知見

氏名　佐藤典子、井上綾香、重本蓉子、木村有喜男、石山明彦、竹下絵里、森まどか、大矢寧、高橋祐二、小牧宏文、佐々木正行

所属　国立精神・神経医療研究センター病院
放射線診療部、小児神経科、神経内科

諸言

福山型筋ジストロフィーは *Fukutin* 遺伝子変異を来す先天性筋ジストロフィーで、症状は筋緊張低下や発達障害を主とし、また特徴的な MR 所見を示す。1990 年代に相田等は、大脳や小脳の皮質形成異常、小脳の嚢胞、白質の異常信号などの MR 所見について詳細に検討・報告しているが、それ以降まとまった報告はない。最近我々は T2,FLAIR,DIR(double inversion recovery)にて脳幹の異常信号や、SWI(susceptibility-weighted image)にて大脳の静脈の異常や出血などの、今まで報告されていない MR 所見に気づいた。今回我々は過去の MR 画像を、上記所見を含め後方視的に検討した。

対象と方法

NCNP に 2006 年から 2018 年の間に受信した患者の内、臨床的・遺伝子学的に福山型筋ジストロフィーと診断された症例は 54 例であった。脳幹評価のために axial T2WI と FLAIR を必須と定義し、それ等のシークエンスがない 27 例を除外し、最終的には 27 例を評価の対象とした。27 例全例に 3D あるいは２D T1WI と、axial T2WI と FLAIR が撮像されている。またその内 6 例の患者にて DIR が、5 例にて SWI が撮像されていた。評価項目と評価にて使用したシークエンスは以下である。脳幹の表面のけば立った構造（T2WI）、脳幹表面の異常高信号（T2WI,FLAIR,DIR）、皮質表面直下を走行する異常血管（T2WI）、表在と深部静脈の異常（SWI）、実質内の出血（T2WI, SWI）。その他脳幹の低形成や大脳の皮質形成異常、小脳の嚢胞、白質の異常信号等も評価した。

結果

脳幹は 27 例全例低形成で、脳幹表面の毛羽立ちは 26/27 例（96%）に認めた。脳幹表面の異常高信号は T2WI,FLAIR,DIR で、それぞれ 26/27 例（96%）、23/27 例(85%)、6/6 例(100%)認めた。皮質表面直下を走行する異常血管は 3/27 例（11%）に、SWI にて前頭部の表在静脈の低形成は 5/5 例(100%)に、深部静脈の拡張を 2/5(40%)に認めた。脳内出血は T2WI で 3/27（11%）に、SWI では 2/5(40%)に認めた。小脳の嚢胞は 27 例全例に、大脳の多少脳回様の異常皮質も 27 例全例に、肥厚脳回は 4/27 例(15%)に、大脳白質の異常信号は全例に認めた。

考察

福山型筋ジストロフィーは muscle-eye-brain disease, Walker-Warburg disease などと共に、α-dystroglycan(DG)を伴う先天性筋ジストロフィーの疾患群に含まれる。この疾患群はα- DG の糖鎖修飾の異常のために、基底膜への laminin の assembly がうまくおこなわれず，グリア境界膜―基底膜複合体の破綻が生じて、神経細胞のクモ膜下腔への過遊走，大脳の層構造の乱れ，さらには脳回形成の異常などが生じる疾患群である。この現象は大脳だけでなく、脳幹にも認められ、今回指摘

した脳幹表面の構造や信号異状はその病理を反映したものである。また出血も高い頻度で認めた。その理由は、静脈の還流異常あるいは血管壁そのものの異常が考えられる。

結論

脳幹表面の異常構造や信号、大脳の静脈システムの異常は福山型筋ジストロフィーの特徴的なMR所見で、画像診断において有用である。またこの疾患は高率に脳内出血も合併することにも留意すべきである。

参考文献

1. Aida N, et al. Brain MR in Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy *AJNR Am J Neuroradiol* 17:605-613,1996
2. Aida N, et al. Cerebellar MR in Fukuyama congenital muscular dystrophy: polymicrogyria with cystic lesions *AJNR Am J Neuroradiol* 15(9):1755-9,1994
3. Saito Y, et al. Aberrant Neuronal Migration in the Brainstem of Fukuyama-Type Congenital Muscular Dystrophy. J of Neuropathology and Experimental Neurology 62(5):497-508,2003

Pelizaeus-Merzbcher 病に対するクルクミンによる新規治療法開発に関する研究

分担研究者：
国立精神・神経医療研究センター　神経研究所　疾病研究第二部　井上　健
研究協力者：
国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科　山本晃代、本橋裕子、石山昭彦、佐々木征行

【緒言】

PMD は、重度の運動発達遅滞を伴う遺伝性小児神経疾患である。これまでに症状を緩和する対症療法以外に、疾患の原因を標的とした根治療法は見出されていない。原因遺伝子は CNS 特異的な髄鞘膜蛋白質をコードする PLP1 で、最も頻度が高いゲノム重複変異や主にアミノ酸置換を伴う点変異が知られている。これまでにモデル動物を用いた解析により、重複及び点変異の両方にウコンに含まれる活性ポリフェノール成分であるクルクミンの有効性が示唆されている（1,2)。クルクミンは、食品として広く市販され、小児においても安全性の高いものである。本研究でその有効性が確立されれば、極めて安全性が高く、かつコストも安価であり、すぐに実用化することが可能であることから、臨床的な有用性が極めて高い。そこで本研究では、ヒト PMD 患者に対するクルクミンの有効性を検証するために、オープンラベル臨床試験を実施し、臨床評価尺度、MRI 画像による髄鞘化評価、電気生理学的検査により治療効果の検証を行う。

【方法】

本研究は自己対照症例オープン試験で、同一患者群の介入前後比較によるコホート研究となる。クルクミンの有効性ならびに安全性の確認をエンドポイントとする。未治療時を対照とし、用量漸増を実施する。対象者は、点変異および重複変異のいずれかの PLP1 遺伝子変異を有する PMD 患者 10 名である。年齢は５歳以上 20 歳未満とする。患者のリクルートは患者親の会を通じて行なう。臨床情報は、所定の臨床情報提供書を用いて収集し、臨床症状の変化については臨床評価尺度（運動機能の評価尺度：粗大運動能力尺度 Gross Motor Function Measure: GMFM、日常生活動作を含む臨床症状の評価尺度：PMD 機能障害スコア　PMD Functional Disability Score:PMD-FDS）を用いて経時的に評価する。髄鞘化の評価は頭部 MRI 画像から得られる髄鞘化尺度により評価する。電気生理学的検査は聴覚脳幹反応を用いる。ともに投与開始前と後で評価し、投与前からの変化量を統計学的に検定する。試験期間は 12 ヶ月で、低用量投与（2 ヶ月、1mg/kg/day、１日１回経口投与）、高用量投与（10 ヶ月、4mg/kg/day、１日１回経口投与）とする。

【結果】

昨年までに本センター倫理委員会にて承認を得た。本年度は、新臨床研究法に準拠し、特定臨床研究として申請と承認を得た。9 名の患者をリクルートし、臨床試験を開始した。変異の内訳は、点変異 3 名（うち 1 名は null 変異による軽症型）、重複 5 名、三重複 1 名である。全ての症例において、有害事象なく、服用を完遂し、評価を終了した。

【結論】

本年度は、9 名の研究参加者について、オープンラベル試験による臨床研究を終了した。有害事象は見られず、途中脱落もなかった。現在、治療効果についての詳細な評価を行なっているところである。

【考察】

クルクミンを用いた PMD に対する治療研究を 9 名の参加者について、実施し、中途での脱落なく終了した。有害事象は見られなかった。本研究の実施により有効性が確認された場合には、本邦発世界初の PMD 治療薬としての実用化が期待される。

【参考文献】

1. Yu L-H, Morimura T, Numata Y, Yamamoto R, Inoue N, Antalfy B, Goto Y, Deguchi K, Osaka H, Inoue K. Effect of curcumin in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. Mol Genet Metab 2012;106:108-114.
2. Epplen, D.B., Prukop, T., Nientiedt, T., Albrecht, P., Arlt, F.A., Stassart, R.M., et al. (2015). Curcumin therapy in a Plp1 transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. Ann Clin Transl Neurol 2(8), 787-796.

運動症状を主症状とする小児期治性神経疾患の病理組織学的検討

分担研究者
国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科
齋藤　貴志

【目的】結節性硬化症および、片側巨脳症、限局性皮質異形成では、PI3K-AKT-mTOR系の異常が発症に関与し、てんかん発作をはじめとする運動症状、知的障害、発達障害などの原因となることが明らかになってきている。しかし、PI3K-AKT-mTOR系の異常がてんかんの発症、また、結節性硬化症ではそれに加え行動異常をはじめとする症状をきたす病態は、不明な部分が多く残されている。このため、難治てんかんの治療として行われたてんかん外科手術として得られた試料を用いて、PI3K-AKT-mTOR系異常の代表的疾患である結節性硬化症の病態を探索することを計画した。

PI3K-AKT-mTOR 系異常による代表的な中枢神経疾患である結節性硬化症および限局性皮質異形成 2b 型では、dysmorphic neuron、balloon cell と呼ばれる特異な形状を持つ細胞の出現が特徴的であり、これらの細胞は、mTOR系の活性を強く示す。中でも balloon cell は、神経細胞あるいはアストロサイトとも分類さず、vimentin、PAX6、SOX2 などの radial glia の性質を示す蛋白を発現している、という特徴が見られる。特に、PI3K-AKT-mTOR の活性亢進によって出現する異常細胞である Balloon cell は、中枢神経の発生期における PI3K-AKT-mTOR の細胞への影響を考察する上で重要であり、特性について明らかにすることを考えた。

なお、本研究は倫理委員会（A2019-004）およびバイオバンク利活用委員会(NCNPBB-0072)の承認を受けた。

【方法】(1)てんかん外科手術症例をバイオバンクに登録する。2017 年 11 月以降の手術例は登録されているが、それ以前に治療された例は登録されていない。このため、同時期以前の症例のバイオバンクへの登録を行った。(2)バイオバンクに登録した症例の組織学的検討を行う。

【結果】(1)2019 年 11 月までに、新たに 44 例の登録を行った。(2)バイオバンクに登録した症例の試料を用いて現在、結節性硬化症（8 例）、限局性皮質異形成 2a（5 例）および 2b 型（8 例）の症例の免疫組織化学的検討を行っている。

【その他】

SPAST は、spastic paraplegia 4 型(SPG4)の原因遺伝子として知られる。本遺伝子の p.Arg499His 変異により、14 か月時に下肢の痙性が出現、3 歳時には二語文以上の発語が可能であったが、徐々に症状が下肢から上行性に進行し、9 歳時に上肢の麻痺、および構音障害が出現し、12 歳で失構音が出現した。頭部 MRI の T2 強調像では、加齢と共に内包後脚の高信号が認められた。臨床的に、infantile onset ascending hereditary spastic paralysis (IAHSP)と診断した。全エキソーム遺伝子解析では *SPAST* に p.Arg499His の変異が明らかとなった。こ

の変異は、過去にもIAHSP1例、および早期発症の形成追麻痺の原因として報告されている。本症例もこれらの報告に一部共通する特徴を持っており、*SPAST* のp.Arg499His変異は、SPG4とは異なる臨床型と関連していると考えられた[1)]。

文献

1) Ogasawara, M., Saito, T., Koshimizu, E., Akasaka, N., & Sasaki, M. A p.Arg499His Mutation in SPAST Is Associated with Infantile Onset Ascending Spastic Paralysis Complicated with Dysarthria and Anarthria. Neuropediatrics 2019; 50(06): 391-394.

運動症状を主症状とする小児期発症稀少難治性神経疾患の診断マニュアル作成
-CACNA1A 変異による表現型の評価における単一筋線維筋電図の有用性についての検討-

分担研究者　石山昭彦
所属機関名　国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科

【緒言】小児期発症の稀少難治性神経疾患領域では、近年の遺伝子解析技術の進歩により新しい原因遺伝子が同定され、分子生物学レベルでの新しい病態が明らかになってきている。一方で臨床的な側面では、病態解析に遅れをとっていると言わざるを得ないのが現状であり、臨床的な視点に立っての表現型の分類や検査所見との関連、分子生物学的な病態と身体所見との関連についての見直しの必要性に迫られている。このように稀少疾患で知り得た新しい知見を実臨床の場で役立つ形にするためには、新しい知見により知り得た病態に基づき、臨床的特徴、病型を再考し、ガイドライン（診断マニュアル）等の作成が求められる。今回は、その１つとして、*CACNA1A* における臨床病型評価について検討を行った。*CACNA1A* はシナプス前終末におけるP/Q 型カルシウムチャネルをコードし、反復発作性運動失調症 2 型（EA2)、脊髄小脳失調症 6 型（SCA6)、てんかん性脳症、家族性片頭痛といった神経疾患に関与することが知られている。単一筋線維筋電図は神経筋接合部機能を評価する手法であるが、P/Q 型カルシウムチャネルの評価にも用いられる。

【方法】当院において、*CACNA1A* 変異が同定された 3 例（2-7 歳、男児 1 名、女児 2 名）を後方視的に見直し、遺伝子変異の確定に至るまでの診断背景、臨床像の特徴について検討を行った。臨床像の評価にあたり、客観的な根拠となりうる電気生理学的評価としての単一筋線維筋電図（single fiber electromyography; SFEMG）では、筋内軸索を電気刺激し得られた single fiber potential を計測する stimulated SFEMG にて行った。

【結果】*CACNA1A* 変異が同定された 3 例の遺伝子確定前の臨床診断は、反復発作性運動失調症 2 型、てんかん性脳症、小児交互性片麻痺であった。SFEMG の jitter の評価項目である mean consecutive difference (MCD) 値はいずれの症例も 41.6-68.7us (range 14.5-169.8us)であり、>25us と異常所見を呈しており、*CANNA1A* 変異が有意であることを示す客観的根拠となりえた。

反復発作性運動失調症 2 型と診断していた 1 例は SFEMG 後に遺伝子変異が確定しているが、他の 2 例では *CACNA1A* 変異同定後に表現型として矛盾ないかの評価を改めて行う目的で SFEMG を実施していた。遺伝子診断確定前に小児交互性片麻痺と診断していた 1 例では、*CACNA1A* 変異確定後、診断再考のために SFEMG を実施し、反復発作性運動失調症 2 型の診断に至っていた。遺伝子変異同定前に反復発作性運動失調症と診断していた例では、両親の遺伝子解析のための検体採取が困難であった例で segregation study を実施することが出来

なかった症例であり、客観的評価としてのSFEMGが有用であった。

【考察】次世代シークエンスによる解析で遺伝子変異の解析が可能となった昨今において、遺伝子が大きく新規変異の場合、時に臨床評価の再考も大切であるが、その再評価に際して単一筋線維筋電図の有用性も再認識された。また、*ATP1A3*変異による運動症状を主症状とするような小児交互性片麻痺のような疾患においては、反復発作性運動失調症も鑑別として挙げる必要があり、通常の診断評価としても見直されるべき検査法ではないかと考えられた。

種々の遺伝子変異と臨床的評価法の検討を行いつつ、引き続き、有用性のある診断マニュアル作成を継続していく。

【参考文献】

1. Hirasawa-Inoue A, Ishiyama A, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Yuasa S, Saitsu H, Hamanaka K, Miyatake S, Matsumoto N, Sasaki M. Single-fiber electromyography-based diagnosis of *CACNA1A* mutation in children: A potential role of the electrodiagnosis in the era of whole exome sequencing. Brain Dev. 2019; 41(10): 905-909.

知的障害や不随意運動を合併する小児期発症の小脳性運動失調症患者に対する SARA と ICARS の有用性に関する研究

分担研究者：国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科　本橋裕子
共同研究者：同上　住友典子、石山昭彦、竹下絵里、齋藤貴志、佐々木征行

【はじめに】小児期発症の小脳性運動失調症は多様な原因疾患を含む病態であり、原因疾患として脊髄小脳変性症、先天性の脳形成障害、代謝性疾患、腫瘍、感染などが挙げられる。運動失調の客観的重症度評価系として International Cooperative Ataxia Rating scale (ICARS)や Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA)などがある。これらの評価系には、患者の年齢、筋力の程度、他の不随意運動の存在が得点に影響を与えることが報告されている [1-3]。特に、幼少児では得点が高く出る傾向があり（得点が高い＝運動失調が重症)、更に値の変動も大きいとされている [1]。
我々はこれまでに「小児期発症の小脳性運動失調症患者に関する質問票調査」(精神・神経疾患研究開発費、課題番号 27-5「運動症状を主症状とする先天性発達期脳障害に関する研究」) を実施しており、日本小児神経学会が認定する小児神経専門医への質問票調査を行うことで小児期発症の小脳性運動失調症患者の診療実態を調査した。その結果、小児期発症の小脳性運動失調症の原因として本邦で最も多いのは DRPLA、ataxia telangiectasia、Joubert syndrome and related disorders であることが明らかとなった[4]。これらの患者には、知的障害や不随意運動を合併することが多い。そのため、本邦で見られる小児期発症の小脳性運動失調症患者に対して SARA や ICARS を使用する際には、年齢だけでなく不随意運動や知的障害の影響を加味した評価が必要であることが多い、ということになる。
【目的】知的障害や不随意運動が SARA や ICARS へどのような影響を与え得るかを検討する。
【方法】対象患者は知的障害のみを有する患者、不随意運動のみを有する患者、小脳性運動失調症を有する患者（知的障害・不随意運動の有無は問わない）に対して、2 名以上の医師によって SARA と ICARS 評価を実施する。知的障害・不随意運動群においては、得られた得点と、IQ や不随意運動の種類との相関を解析する（本来であれば知的障害・不随意運動群では失調がないので得点はゼロとなるはず)。また、全ての患者群において得られた評価者２名による得点の、inter-rater reliability を解析する。
【結果】2019 年度までに、5 名の小児患者(6-14 歳；DQ/IQ20-65）で SARA と ICARS を実施した。3 名は未診断で、1 名は Glut 1 deficiency、1 名は SCA29 であった。全例、臨床的に失調症状を認めていた。各患者において SARA と ICARS の値に大きな乖離はなかった。
【考察】小児で、何らかの発達の課題を有する患者でも、SARA と ICARS は実施することができた。また、別々の検査である SARA と ICARS の数値に大きな乖離はなく、小児の発達課題を有する場合でも、これらは小脳失調の定量評価指標として有用である可能性が示唆された。今後、評価する数を増やしていく予定である。の不随意運動を有する患者においては未評価であり、今後実施をしていきたい。
【結論】SARA と ICARS は小児の発達課題を有する患者においても、有用であることが示唆された。

【参考文献】

1. Lawerman TF, Brandsma R, van Geffen JT, Lunsing RJ, Burger H, Tijssen MA, de Vries JJ, de Koning TJ, Sival DA: **Reliability of phenotypic early-onset**

ataxia assessment: a pilot study. *Developmental medicine and child neurology* 2016, **58**(1):70-76.

2. Sival DA, Pouwels ME, Van Brederode A, Maurits NM, Verschuuren-Bemelmans CC, Brunt ER, Du Marchie Sarvaas GJ, Verbeek RJ, Brouwer OF, Van Der Hoeven JH: **In children with Friedreich ataxia, muscle and ataxia parameters are associated**. *Developmental medicine and child neurology* 2011, **53**(6):529-534.
3. Brandsma R, Spits AH, Kuiper MJ, Lunsing RJ, Burger H, Kremer HP, Sival DA: **Ataxia rating scales are age-dependent in healthy children**. *Developmental medicine and child neurology* 2014, **56**(6):556-563.
4. Ono H, Shimizu-Motohashi Y, Maruo K, Takeshita E, Ishiyama A, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sasaki M: **Childhood-onset cerebellar ataxia in Japan: A questionnaire-based survey**. *Brain and behavior* 2019, **9**(10):e01392.

小児期発症のジストニアに関する診療録調査

分担研究者：国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科　竹下絵里
共同研究者：同上　土岐平、本橋裕子、齋藤貴志、石山昭彦、佐々木征行

【はじめに】小児期にジストニアを発症する疾患は多岐に渡る。日本では 2018 年にジストニア診療ガイドラインが発刊され、臨床特徴と病因から病型分類を行うことが提唱されている。病因ごとには、遺伝性（DYT シリーズ、NBIA シリーズ、そのほかの遺伝性疾患）、後天性（周産期脳障害、感染症、薬剤性など）、特発性（原因不明）に分類されている。近年、次世代シークエンサーを用いた網羅的遺伝子解析技術の進歩により、原因不明とされていた疾患の責任遺伝子が次々に明らかになっており、特発性とされていたジストニアの病因が判明する場合もある。過去に日本で小児期発症のジストニアの臨床像を多数調査した研究は限られ、2008 年、2009 年に舟塚らが小児神経専門医を対象とした質問票調査の結果を学会発表しているのみで、近年報告はない。

【目的】日本で小児期発症のジストニアに関する疫学調査を行う。今年度はまず当科での小児期発症のジストニアの診療実態を明らかにする。

【対象・方法】2014 年 1 月～2019 年 10 月に当科に受診歴のある患者のうち、20 歳以下でジストニアを発症した症例を対象に、診療録を後方視的に調査し、症例数、性別、調査時年齢、発症年齢、病因、病状の経過、頭部画像所見、治療について検討した。なお、本研究は国立精神・神経医療研究センター倫理委員会にて承認（A2019-117）を得た上で実施した。

【結果】当科の小児期発症のジストニア患者は 152 例（男 85 例、女 67 例）で、調査時年齢 1 歳 6 か月～54 歳 2 か月（中央値 15 歳 0 か月）、発症年齢 0 歳 1 か月～14 歳 6 か月（中央値 2 歳 0 か月）だった。病因は、遺伝性 104 例（DYT シリーズ 45 例（DYT5 が 8 例、DYT10 が 19 例、DYT12 が 17 例）、NBIA シリーズ 6 例、その他の遺伝性疾患 53 例（ミトコンドリア病 6 例、両側線条体壊死 5 例、染色体異常 4 例））、後天性 47 例（周産期脳障害 25 例、急性脳症後遺症 7 例、血管性 5 例）、特発性 1 例だった。病状の経過は、停止性 88 例、進行性 64 例だった。頭部画像では、異常所見なし 49 例、皮質・白質・基底核病変あり 49 例、基底核病変あり 24 例、白質病変あり 25 例、皮質病変あり 5 例だった。ジストニア治療は、内服 1 剤が 51 例、2 剤が 23 例、3 剤以上が 78 例、うち 42 例が抗コリン薬を使用し、ほかに 8 例がボツリヌス療法、2 例がバクロフェン持続髄腔内投与療法、3 例が脳深部刺激療法、1 例が視床凝固術を行っていた。

【考察】当科の小児期発症ジストニア患者では、遺伝性が約 7 割で、特に DYT10 と DYT12 が多かった。その他の遺伝性疾患や後天性では基底核病変をきたす疾患が多く、頭部画像異常例では約半数は基底核病変を伴っていた。内科的治療は抗コリン薬の使用頻度が多く、少数例には特殊治療が実施されていた。日本での過去の疫学調査（2008 年、舟塚ら）では、小児期発症ジストニア患者は 579 例であり、病型は一次性 146 例（25%）、二次性 433 例（75%）であった。一次性は遺伝性 103 例（DYT1 が 12 例）、二次性は脳性麻痺 196 例、神経変性疾患 153 例、代謝性疾患 23 例であった。このうち、163 例の患者の臨床像についてさらに検討しており、性別は男性 85 例（52%）、女性 76 例（47%）、不明 2 例、発症年齢は平均 4 歳 4 か月 ±4 歳 1 か月、治療はジアゼパム 59 例（35 例有効）、ドパミン刺激薬 52 例中（28 例有効）、筋弛

緩薬（有効性少ない）、ボツリヌス療法 4 例、外科的治療 8 例中（5 例有効）であった。また、心因性との誤診歴が 19 例いたと報告している。本研究で遺伝性ジストニアの占める割合が多かった一因として、舟塚らの調査から約 10 年が経過しており、当時は原因不明だったジストニアの責任遺伝子が同定されている症例が増えている点や、当時はジストニアを一次性、二次性に分類していたが、現在は病因ごとに分類する方法が一般的であることも影響している可能性があった。治療法は舟塚らの調査でも本研究でも内服薬が多いという点は共通しており、特殊治療は一般的ではなかった。本研究は当センターの診療録調査であるという単施設の調査であるという限界があり、今後日本全体の診療録調査を実施し、より詳細に現状の小児期発症のジストニア診療実態について検討する必要がある。

【今後の予定】小児神経専門医を対象に、小児期発症のジストニアに関する質問票調査を実施し、日本での診療実態を明らかにする。調査は一次調査で病因に基づく患者頻度、二次調査で小児期発症ジストニア患者の病因、性別、現在の年齢、ジストニア発症時の年齢、家族歴、ジストニアの部位、経過、変動性、ジストニア以外の運動徴候、ジストニア以外の症状、検査所見（血液検査、尿検査、髄液検査）、頭部画像所見（CT、MRI、その他の画像）、治療と効果について詳細に情報収集する。現在、約 1200 名の専門医に郵送の準備中である。当科の診療録調査および小児神経専門医を対象とした質問票調査の結果を踏まえて、小児期発症のジストニアに関する診療の手引きを提案する。

【参考文献】

1. 日本神経学会監修, 「ジストニア診療ガイドライン」作成委員会編集, ジストニア診療ガイドライン 2018. 南江堂.
2. 遺伝性ジストニア（指定難病 120）難病情報センター http://www.nanbyou.or.jp/entry/4898
2. 舟塚真, 加藤郁子, 大澤真木子. 小児神経科専門医に対する小児期発症ジストニアの疫学調査. 脳と発達. 2008;40(Suppl.):S269.
3. 舟塚真, 加藤郁子, 大澤真木子. 小児期発症ジストニアの疫学調査　各ジストニア病型に対する薬物療法の有効性に関して. 脳と発達. 2009;41(Suppl.):S395.

進行性ミオクローヌスてんかんの原因となる 12-kb 欠失:長鎖シーケンスの活用法

分担研究者：横浜市立大学医学研究科遺伝学　松本直通

協力研究者：水口剛[1]、鈴木健史[2]、阿部ちひろ[2]、梅村紋子[2]、徳永勝士[3]、河合洋介[3]、中村稔[4]、長﨑正朗[5]、木下賢吾[6,7,8]、岡村容伸[7,8]、宮武聡子[1,9]、三宅紀子[1]

[1]横浜市立大学大学院医学研究科　遺伝学
[2]愛知県心身障害者コロニー中央病院　小児神経科
[3]東京大学大学院　医学系研究科人類遺伝学分野
[4]長崎医療センター　臨床研究センター
[5]京都大学　バイオメディカル情報解析分野
[6]東北大学　情報科学研究科
[7]東北メディカル・メガバンク機構
[8]東北大学　未来型医療創成センター
[9]横浜市立大学附属病院 遺伝子診療科

【はじめに】

短鎖シーケンスを用いた whole exome sequencing (WES)を用いて様々な遺伝性疾患の解明が進んでいる。WES での遺伝性疾患の解明率はおおよそ 3 割程度で、逆に 7 割は未解明となる。この未解明の症例に対してどのようなアプローチで原因を特定していくのかは様々な議論がある。我々は WES で変異未同定の進行性ミオクローヌスてんかん (progressive myoclonus epilepsy, PME) の兄妹発症例をロングリードシーケンスを用いて解析し、原因特定に到った。

【方法】

対象は兄妹罹患例で、ともに 4 歳頃より運動失調、ミオクローヌス、全般てんかん発作を発症し、神経学的退行により寝たきりであった。遺伝子変異スクリーニング、酵素診断、皮膚生検を用いた電子顕微鏡所見で異常を認めず、WES を実施したが原因の同定は出来なかった。しかし同様の臨床経過をたどる難治、進行性の PME 兄妹例であり遺伝要因が強く示唆された。WES でカバーされない領域 （イントロンや遺伝子間領域）やゲノム難読領域に病的変化がある可能性が想定された。

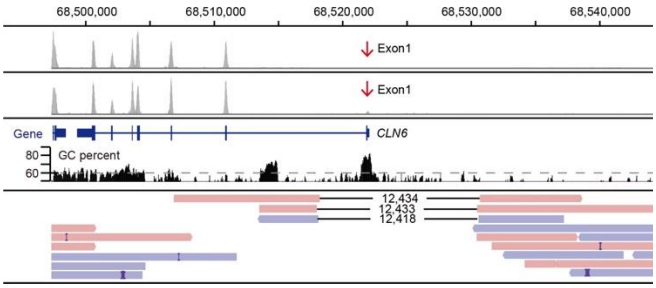
本家系の罹患者に対し PacBio 社の Sequel を用いてロングリード whole genome sequencing (WGS)を施行した。全ゲノムに対しておよそ 6x 程度（20.9 Gb）のデータを産出し、SMRT-link に付属する PBSV を用いて参照ゲノム配列にアラインし 50 bp 以上の CNV を抽出した。正常対照の 3 例を用いて”正常な”CNV を除外し、異常な CNV を絞り込んだ。

【結果】

症例に認めた CNV のうち、正常対照 3 例に認めた CNV と重複する CNV は全て多型と

して除外した。17,165 個の構造変化がコールされ(9,949 個の挿入、7,216 個の欠失)、Refseq 遺伝子、exon、タンパク質コード領域のみ、常染色体劣性遺伝性疾患遺伝子に焦点を当て異常 CNV 候補を絞りこみ、原因と考えられる病的欠失を同定に到った。この欠失は、既知の神経変性性疾患セロイドリポフスチン症の原因遺伝子 CLN6 の exon 1 を含んだ 12-kb の欠失で、ホモ接合性欠失であった。両親及び罹患同胞にも同じ欠失が、それぞれヘテロ接合性、ホモ接合性に認められ、本家系に発症した進行性ミオクローヌスてんかんの原因として妥当であると結論づけた。

全エクソーム解析でなぜ検出できなかったかについてゲノム配列の特徴を検討したところ該当領域は高 GC 含量、多数のリピートエレメントに特徴づけられるゲノム領域でショートリードシーケンスで解読困難な領域であることが明らかとなった。（下図）



【考察と結論】

WES で原因解明ができなかった進行性ミオクローヌスてんかん家系の原因をロングリード WGS を用いて明らかにした。本研究は、ショートリード WES の限界を明確に示し、かつ長鎖シーケンス等を用いた WGS の有用性を明らかにした。

【参考文献】

1. Mizuguchi T, Suzuki T, Abe C, Umemura A, Tokunaga K, Kawai Y, Nakamura M, Nagasaki M, Kinoshita K, Okamura Y, Miyatake S, Miyake N, Matsumoto N*. A 12-kb structural variation in progressive myoclonic epilepsy was newly identified by long-read whole-genome sequencing. J Hum Genet. 2019 May;64(5):359-368. doi: 10.1038/s10038-019-0569-5.

ミオクローヌスを呈する発達性てんかん性脳症に対する治療法の検討

分担研究者：国立病院機構西新潟中央病院　神経小児科　遠山　潤
研究協力者：同上　小林　悠，大野　武，放上萌美，平岩明子，岡崎健一
横浜市立大学遺伝学　松本直通
昭和大学小児科　加藤光広

【はじめに】小児発達期に不随意運動や失調症状を伴うてんかん性脳症症例には様々な遺伝性疾患が含まれ，多種類にわたり，かつ頻度は非常に稀であると思われる．原因不明症例の臨床症状を詳細に検討することから，症状–原因の関係を確立することが適確な診断と治療のために必要である．私共はこれまでの研究で，不随意運動をともなうてんかん性脳症の臨床症状および遺伝的要因を検討し，症状と原因遺伝子の関係および，特異的治療について検討してきた．疾患特異的な治療を開発することにより罹患者によりよい QOL がもたらされると思われる．

最近，進行性ミオクローヌスてんかん症例に非競合 α-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体拮抗剤 perampanel (PER)の有効性が報告されている．これまで，Lafora 病，Unverricht-Lundborg 病，歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)などに有効であるという報告がある．今回の研究では，ミオクローヌスを呈する Angelman 症候群（AS）とミオクローヌスを示す発達性てんかん性脳症症例に対して PER の有効性を検討した．

【対象と方法】対象は当院で加療中の AS5 例（男 1 例、女 4 例．15q11-13 欠失型 4 例，メチル化異常 1 例），DRPLA 2 例，*DHDDS* 変異を持つ発達性てんかん性脳症 1 例，*SEMA6B* 変異による進行性ミオクローヌスてんかん 1 例である．PER0.5～2mg で投与を開始し，てんかん発作，不随意運動，副作用などの症状に応じて増量した．AS 例の 1 例は 8 歳であり，保護者に治療について説明し同意を得た後に 0.5mg/日で投与開始した．それぞれの症例について，てんかん発作及びミオクローヌスの状態，その他の症状，副作用について後方視的に検討した．

【結果】AS 例については全例でてんかん発作は PER 投与前よりほぼコントロールされているが，頻発あるいは持続するミオクローヌスを認めていた．5 例中 4 例でミオクローヌスの改善を認め，維持量は 1～4mg（1mg 1 例，2mg 2 例，4mg 1 例）であった．うち 1 例は併用抗てんかん薬の減量が可能であった．その他の 1 例では PER 開始後問題行動が出現し，増量によりミオクローヌス重積が悪化したため投与を中止した．2 例で睡眠リズムの改善が得られ，1 例で食欲増進，体重増加を認めた．てんかん発作の悪化はみられなかった．DRPLA 症例 2 例では，ミオクローヌスがほぼ消失し強直間代発作も減少した．*DHDDS* 変異を持つ発達性てんかん性脳症例では，投与前はほぼ連日強直間代発作がみられたが，投与後では体調不良時などにみられる程度でほぼ消失した．眼瞼ミオクローヌスも持続的にみられたが治療により著明に減少した．ただし増量により不機嫌，癇癪が悪化し減量により改善した．*SEMA6B* 変異による進行性ミオクローヌスてんかん症例でも強直間代発作とミオクローヌスは 50%以上減少した．

【考察】今回の検討では，AS のミオクローヌスに対しては 5 例中 4 例に PER が有効であった．1 例では悪化を認めその理由は不明であるが注意が必要である．AS に対する睡眠リズムの改善にも有効であった．また，DRPLA やその他の遺伝子異常によるミオクローヌスをともなうてんかん性脳症例でも強直間代発作やミオクローヌスに対して有効であり，特に *DHDDS* 変異症例では難治発作がほぼ消失するなど著効した．AMPA 受容体は，主に興奮性神経に存在する受容体であ

り，興奮性神経伝達物質であるグルタミンによりシグナルを脳内に伝達し作用すると考えられている．進行性ミオクローヌスてんかんでは主にこの受容体を介して主な症状が出現していると推定されるため拮抗薬である PER が有効であると考えられる．今回の検討からは AS のミオクローヌスもこの受容体が関与していることが推定された．今回の検討例では，投与により問題行動や不機嫌，癇癪などがみられる例もあり，これが疾患特異的な症状かどうかは今後の検討課題である．今後，さらなる多症例や他疾患での検討，長期経過観察，副作用のコントロールなどが必要となると思われた．

【参考文献】

1. Kobayashi Y, Tohyama J, Kato M, Akasaka N, Magara S, Kawashima H, Ohashi T, Shiraishi H, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N. High prevalence of genetic alterations in early-onset epileptic encephalopathies associated with infantile movement disorders. Brain Dev 2016; 38: 285-292.
2. 遠山 潤，小林 悠，眞柄慎一，小松原孝夫，放上萌美, 才津浩智, 加藤光広, 松本直通. *GRIN1* 変異による発達性てんかん性脳症への個別治療．てんかん研究 2018; 36: 455.
3. Goldsmith D, Minassian BA. Efficacy and tolerability of perampanel in ten patients with Lafora disease. Epilepsy Behav 2016 ;62:132-135.
4. Crespel A, Gelisse P, Tang NP, Genton P. Perampanel in 12 patients with Unverricht-Lundborg disease. Epilepsia 2017; 58:543-547.
5. Shiraishi H, Egawa K, Ito T, Kawano O, Asahina N, Kohsaka S. Efficacy of perampanel for controlling seizures and improving neurological dysfunction in a patient with dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). Epilepsy Behav Case Rep 2017; 26:44-46.
6. 遠山　潤．国際抗てんかん連盟，NICE ガイドラインに基づく新規抗てんかん薬の使い方．脳と発達　2019; 51: 97-100.
7. Kawano O, Egawa K, Shiraishi H. Perampanel for nonepileptic myoclonus in Angelman syndrome. Brain Dev 2020; 42: 389-392.
8. Hamanaka K, Imagawa E, Koshimizu E, Miyatake S, Tohyama J, Yamagata T, Miyauchi A, Ekhilevitch N, Nakamura F, Kawashima T, Goshima Y, Mohamed AR, Ch'ng GS, Fujita A, Azuma Y, Yasuda K, Imamura S, Nakashima M, Saitsu H, Mitsuhashi S, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Matsumoto N. *De novo* truncating variants in the last exon of *SEMA6B* cause progressive myoclonic epilepsy. Am J Hum Genet 2020; 106: 549-558.

運動障害を伴う脳発達障害の臨床像と病態解明

分担研究者：昭和大学医学部小児科学講座
加藤光広
研究協力者：同上　小林梢、北條彰
国立病院機構熊本再春荘病院小児科
現）熊本託麻台リハビリテーション病院
上野弘恵
東京女子医科大学小児科　小国弘量
横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学
宮武聡子、高田篤、松本直通
浜松医科大学医学部医化学講座
中島光子、才津浩智

緒言

運動障害を伴う脳発達障害の原因はさまざまであり、原因によって脳の構造異常を示す場合（形態異常）と示さない場合（機能異常）がある。分担研究者はこれまで、形態異常をきたす脳形成異常と機能異常が中心のてんかん性脳症について、画像を含む臨床像の解析と遺伝学的原因の同定による分子病態の解明を行ない、両者に関する多数の原因遺伝子を明らかにしてきた。介在ニューロンの発生に深く関わる *ARX* 遺伝子の機能喪失変異は滑脳症などの形態異常をきたす一方、機能獲得変異はジストニアを伴う知的障害や発達性てんかん性脳症（大田原症候群、West 症候群）など脳構造異常を示さずに機能異常をきたす。近年、脳形成異常と発達性てんかん性脳症の原因遺伝子と遺伝的多面性が明らかになるにつれ、再び形態異常と機能異常との関連性が注目されている。本研究では、これまでに集積した脳形成異常約 1200 例(DNA 収集 871 例)とてんかん症候群（その多くは発達性てんかん性脳症）約 1000 例(全例 DNA 収集)の症例と新規追加症例についての臨床情報をもとに、運動障害を伴う脳発達障害の臨床像と病態解明を行う。3 年間の計画として、初年度にデータベース整理を行い、二年度は既知遺伝子の臨床像を明らかにし、三年度は全エクソーム解析を行い原因遺伝子を同定する。初年度の昨年度はてんかん症候群を中心にデータベースを見直し、757 家系について病歴と発作型、脳波所見に基づき臨床診断を整理し[1]、*SCN3A* の特異的変異(p.I875T)による多小脳回例を報告した[2]。最終的には運動障害を伴う脳発達障害、特に脳形成異常とてんかん性脳症に対して，画像・遺伝子・てんかん・リハビリ・全身管理を含む診断・治療・病態に関する包括的な情報提供システムを構築する。

方法

患児もしくは保護者から同意を得て血液（一部唾液）と臨床情報（病歴および脳形成異常では頭部 MRI）を収集した。臨床情報は脳形成異常とてんかん症候群のそれぞれの症例登録データベースに入力した。DNA を抽出後、臨床情報によって *ARX, LIS1, DCX, TUBA1A* については Sanger 法で直接塩基配列解析を行った。それ以外は、てんかん症候群についてはカスタムターゲットキャプチャー法もしくはエクソーム解析を行った。エクソーム解析は横浜市立大学院医学研究科遺伝学講座もしくは浜松医科大学医化学講座で行われた。

結果

2019 年は 11 月 16 日時点で、脳形成異常

84 例、てんかん症候群 103 例を追加収集した。分類不能な発達性てんかん性脳症の 2 家系 3 例で *SMC1A* 変異を同定した[3,4]。2 家系の臨床像は次の通りである。**症例 1** (c.2683C > G:pArg895Gly)：８歳女児。母（症例 2）がてんかんと知的障害。周産期異常なし。生後 9 か月から発達遅滞を認め、独歩は 1 歳 9 か月で、歩行は失調性で、未発語。鼻根部平坦、単頸、軽度太い眉を認める他に、多毛や裂手など de Lange 症候群を示唆する所見はなかった。2 歳 1 か月から焦点性運動発作を発症した。発作は左もしくは右腕から始まり全般化し、2-4 週間毎に一日に数回から 10 回の群発が 2-3 日間続いた。抗てんかん薬を多剤投与したが難治で、6 歳まで 24 回の入院を要した。熱感受性等の誘因はなかった。脳波では覚醒時に律動性に乏しい広汎性徐波(4-5Hz)を認める他、発作間欠期には異常がなかった。8 歳時の発作時脳波では、睡眠中突然覚醒し呼吸困難と自動症を示す自律神経発作に一致し、両側前頭に限局する速波と、覚醒中突然倒れる脱力発作に一致し、右優位の広汎性速波を認めた。頭部 MRI は脳梁の軽度菲薄化の他は異常なかった。**症例 2** (c.2683C > G:pArg895Gly):45 歳女性（症例 1 の母）。12 歳まで発達は正常で、その後 1 か月おきに月経に一致し、凝視から始まる過運動発作を群発した。発作は難治で、20 歳過ぎには頭部 MRI で小脳萎縮を認めたが、失調はなかった。20 代後半から凝視もしくは運動停止発作となり、月～年単位に減少した。28 歳時の脳波は広汎性高振幅棘徐波を示した。de Lange 症候群を示す所見はなかった。**症例 3** (c.2647delG:p.Glu883Lysfs*2):5 歳女児。両親と兄は健康。周産期異常なし。独歩は 1 歳 8 か月で、2 歳を過ぎても有意語がなかった。3 歳での新版 K 式発達検査の全領域の発達指数は 64 で、知的障害、自閉スペクトラム症と診断された。太い眉と多毛以外、顔貌異常や外表奇形はなかった。2 歳 3 か月てんかん発作を初発。3 歳 3 か月から 1-2 日間に数回から十数回群発する焦点発作および二次性全般化発作を月数回、レベチラセタム開始後は月 1 回群発した。ラモトリギン追加後、2 か月に 1 回の群発に減少した。脳波では、3 歳時に右前頭～中心部優位の 3.5Hz の δ 波、5 歳時に 4-5Hz の θ 波を背景活動異常として認める以外は、発作間欠期の異常はなかった。頭部 MRI は正常。5 歳児の田中 Binet 式知能検査では IQ 69 であった。

考察

本研究における *SMC1A* 変異は、ミスセンス変異が 1 家系 2 例、フレームシフトによるナル変異が 1 例に認められ、いずれも女性であった。*SMC1A* (Structural maintenance of chromosomes 1A)は、コヒーシン複合体を構成し、体細胞分裂の過程で DNA 複製後の姉妹染色分体の接着・分割・分離と、DNA 修復に関与する。*SMC1A* などコヒーシン複合体のサブユニットをコードする *NIPBL, SMC3, RAD21* およびコヒーシンの制御因子である *HDAC8* の変異は Cornelia de Lange 症候群(CdLS)をきたす。*SMC1A* 変異は CdLS の約 5%で認められ、*NIPBL* 変異(80%)に次いで多い。CdLS をきたす *SMC1A* 変異はミスセンスまたはインフレームの欠失が多く，女性は男性より軽い症状を示す。その一方、*SMC1A* のナル変異として、2015 年以降スプライス異常

やフレームシフト変異の報告がこれまで15例報告され、すべて女児であり、男児は胎生致死と考えられている。興味深いことに、*SMC1A*のナル変異では典型的なCdLS徴候を認めず、てんかん発作と知的障害が主症状であり、症例3の所見に合致する。*SMC1A*のナル変異16例の臨床症状をまとめると、てんかん発作の発症時期は生後 1か月以内から28か月（平均8か月）で、12例(75%)に発作の群発を認める。発作が消失したのは4例のみであり、多くは難治性であった。全例に知的障害を認め、軽度は1例のみで15例が中等度から重度であった。ミスセンス変異の症例1と2の母娘例も、ナル変異の症例と同様にてんかん発作の群発傾向を認め、*PCDH19*変異による臨床像に類似していた。

結論

*SMC1A*はCdLSに加え、発達性てんかん性脳症の原因遺伝子でもあり、発作の群発が特徴である。

参考文献

1. Takata A, Nakashima M, Saitsu H, et al. Comprehensive analysis of coding variants highlights genetic complexity in developmental and epileptic encephalopathy. *Nat Commun* 2019;10:2506.
2. Miyatake S, Kato M, Sawaishi Y, et al. Recurrent *SCN3A* p.Ile875Thr variant in patients with polymicrogyria. *Ann Neurol* 2018;84:159-161.
3. Oguni H, Nishikawa A, Sato Y, et al. A missense variant of *SMC1A* causes periodic pharmaco-resistant cluster seizures similar to *PCDH19*-related epilepsy. *Epilepsy Res* 2019;155:106149.
4. 上野弘恵, 岡田拓巳, 藏田洋文, et al. てんかん発作群発と軽度知的障害を呈し、新規*SMC1A*遺伝子変異を認めた女児例. *脳と発達* 2019;51:309-313.

30-6

The Studies on Congenital Developmental Brain Dysfunction presenting mainly Motor Symptoms

Masayuki Sasaki, M.D.,
Department of Child Neurology,
National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)

(1) The main purpose of the studies

The main purposes of the studies are to clarify the pathogenesis of the congenital developmental brain dysfunction presenting mainly motor symptoms such as involuntary movements (dystonia, myoclonus, etc), cerebellar ataxia, spastic paraplegia, or paroxysmal symptoms (spasms, tonic seizures, atonic seizures, transient hemiplegia, etc) including developmental and epileptic encephalopathy (DEE). There are so many disorders which display these motor symptoms. Among those disorders, there are not a few patients who have not yet been diagnosed correctly. It is sometimes difficult to diagnose those patients with congenital developmental brain dysfunction presenting motor symptoms precisely only by both neuroradiological and biochemical studies. Using developed gene analysis methods including Next Generation Sequencing (NGS), we will try to elucidate pathogenesis of undiagnosed rare disorders in children with motor symptoms.

(2) The study group

The members are as follows, Masayuki Sasaki, Takashi Saitoh, Akihiko Ishiyama, Yuko Motohashi, Eri Takeshita (Department of Child Neurology, NCNP), Noriko Sato (Department of Radiology, NCNP), Ken Inoue (Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, NCNP), Naomichi Matsumoto (Yokohama City University), Mitsuhiro Kato (Showa University), and Jun Tohyama (NHO Nishi-Niigata Central Hospital)

(3) Results

1) Childhood patients who present cerebellar ataxia were surveyed from all over Japan. This survey disclosed that dentatorubral pallidoluysian atrophy (DRPLA), Mitochondrial disorders, Joubert syndrome, and Ataxia-telangiectasia are major cerebellar ataxia in children in Japan.

2) The studies using NGS have found several new pathological gene abnormalities presenting developmental and epileptic encephalopathies (DEE).

3) New clinical trial has been started: Curcumin for patients with Pelizaeus-Merzbacher disease.

30－７　精神・神経医療研究センターにおけるバイオバンクの統合的管理と利活用拡大のための基盤研究

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター
メディカル・ゲノムセンター／神経研究所
後　藤　雄　一

総括研究報告

1. 研究目的

国立精神・神経医療研究センター（NCNP）が関与している、精神疾患患者を主に対象とした包括的前向き試料収集（NCNP バイオバンク）、骨格筋レポジトリー等を、試料と情報を管理する人的・物理的・組織的システムを総合的にさらに改良し、それらバンクの利活用を格段に推進させる方策を企画、実施することを目的とする。

NCNP でしか収集できない研究資源（筋、髄液等）を取り扱うシステムを構築・運用する、もしくは、日本全体をカバーするシステム（知的障害、脳バンク等）の中核となり、新たな診断バイオマーカー、治療法を開発する研究開発事業への試料提供を拡充させる。知的障害、認知症などの患者数が多い疾患、神経・筋疾患などの希少疾患の両方に対応し、ナショナルセンターとして当該疾患の病因・病態解明や新規治療法開発に資するバイオリソースを大学・企業の研究者に供給し、疾患研究を一層推進する。

2. 研究組織

主任研究者

後藤　雄一　国立精神･神経医療研究センター

分担研究者

服部功太郎　国立精神･神経医療研究センター
竹下　絵理　　国立精神･神経医療研究センター
波多野賢二　国立精神･神経医療研究センター
井上　健　　国立精神･神経医療研究センター
吉田寿美子　国立精神･神経医療研究センター
功刀　浩　　国立精神･神経医療研究センター
松本　直通　　横浜市立大学
井上　悠輔　東京大学

研究協力者

阿部ちひろ　　国立精神･神経医療研究センター
坂井　千香　　国立精神･神経医療研究センター
松島　雄一　　国立精神･神経医療研究センター

3. 研究成果

1）NCNP バイオバンクの拡充と広報

臨床情報の収集とデータベース構築については、NCNP バイオバンクとして、国立精神・精神医療研究センター病院での精神疾患患者の血液や髄液の収集・登録を継続しており、また電子カルテとの連携では、従来の病名情報に加え、処方・注射・患者プロファイル（アレルギー）・検体検査情報をオンデマンドで連携するシステムを開発した。

また、当センターでは、これまでの歴史的経緯から、幾つかのバイオバンク関連データベースが平行して動いており、NCNP バイオバンクに、知的障害症例の DNA やリンパ芽球、てんかん手術脳など試料の組み入れ作業を継続した。NCNP バイオバンクの活動の理解が進み、パーキンソン病、他の神経疾患などの研究事業におけるバンク関連部分の役割分担の依頼が増加している。

2）骨格筋レポジトリーへの継続的支援

骨格筋レジストリーの研究利用の実績を踏まえ、ゲノム診断拠点形成事業、ゲノム医療実現化プロジェクト等と連携し、活動の拡充、共同研究利用を推進させた。

3) 他のセンター内バンク事業、疾患レジストリー事業との連携

NCNP が中核となり日本ブレインバンクネット（Japan brain bank net; JBBN）事業が進められており、その活動に協力した。

また、バンク事業の連携は、ナショナルセンター間、さらに他のメガバンクなどを含むオールジャパン体制へと拡大しており、NCNP バイオバンクはそれらの活動の主導的立場で活動を行った。

4) バイオリソースの利活用の拡大

利活用推進委員会を介したバイオリソース利活用実績（共同研究、分譲）は順調であり、髄液を中心に H30 年 4 月以降の提供数は、NCNP 内 10 件、NCNP 外部 24 件であり、そのうち、分譲による提供は 8 件であった。手続き中・契約待ち・協議中の案件は 10 数件に上る。

5) 上記活動を行うための倫理的問題等への対処

利活用推進委員会を倫理委員会、受託共同研究審査委員会と連携して手順の簡素化、提供までの時間の迅速化を目指す活動を継続させている。一方で、商業利用に関する試料の利活用のあり方、特に付随する情報の利活用の側面からの手続き規制と、機関をまたぐ活動に関する倫理審査のあり方について検討し、この議論はナショナルセンター間でも行っている。

4. 今後の方向性

① 情報：センター内のバイオリソース統合化とともに、ナショナルセンター・バイオバンク事業（NCBN）、他のメガバンク事業との連携が重要な課題である。さらに、難病レジストリーやゲノム情報共有などは国際連携を視野に入れた柔軟な対応を図る必要がある。

② 脳バンク：日本バイオバンクネットワークを構築する AMED 研究費での活動を補足しながら、当センターが担う中央事務局機能を充実させる。

③ 生体試料の科学性：組織、細胞、DNA や RNA、タンパク質等の採取保存法の SOP を策定し標準化を図る。特に、ISO などの国際標準化の動きに対応して進める事が肝要と考える。

④ 利用促進：広報活動の強化と利活用推進委員会の規程確定と倫理委員会等との機能分担を明確にする。また、NCBN を含めた、オールジャパン体制への主導的な活動を今後も行ってゆく。国の研究倫理指針の統合化を見据えて、バイオバンク関連研究の倫理についても情勢が変わりつつある。それに対応する準備を進めている。

５．研究発表

（学会発表）

1) Ogishima S, Murakami Y, Goto Y, Hirata M, Imoto S, Matsuda K, Miyamoto Y, Morisaki T, Morita M, Nagami F, Nakae H, Nishihara H, Suzuki K, Yokota H, Takagi T. Research and development of biobank network and operational support for promotion of utilization of biobank toward realization of genomic medicine. The Annual Meeting of International Society for Biological and Environmental Repositories, Shanghai, China, 5.7, 2019

2) 松村亮、波多野賢二、服部功太郎、宮下由紀子、横田悠季、吉田寿美子、永井秀明、後藤雄一. バイオバンク付随情報の精度向上を目指した病院情報システムとのオンデマンド連携. 第 39 回日本医療情報学会学術大会 2019 年 11 月 21 日～24 日　千葉市

3) 後藤雄一. ナショナルセンター・バイオバンクネットワーク. AMED ワークショップ「ゲノム医療研究におけるデータシェアリング」, 東京, 2019 年 12 月 13 日

（論文発表）

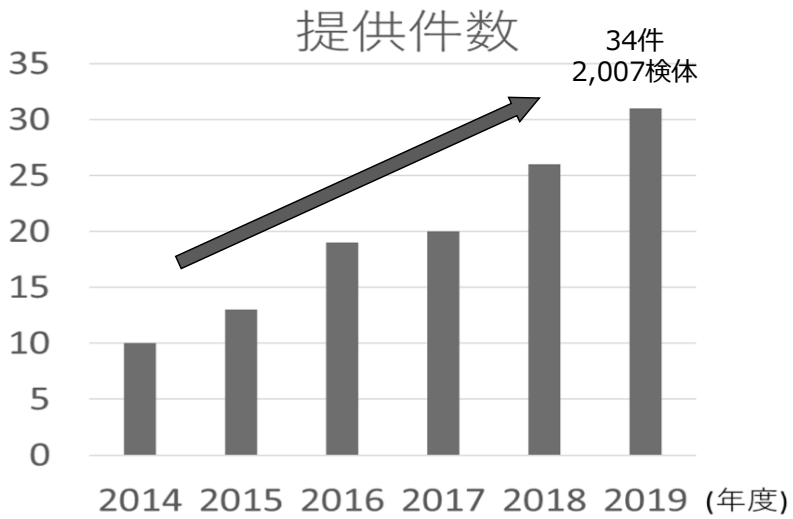
1) Takeshita E, Iida A, Abe-Hatano C, Nakagawa E, Sasaki M, Inoue K, Goto Y. Ten novel insertion/deletion variants in MECP2 identified in Japanese patients with Rett syndrome. Hum Genome Var. 18;6:48, Oct, 2019
2) Iida A, Takano K, Takeshita E, Abe-Hatano C, Hirabayashi S, Inaba Y, Kosugi S, Kamatani Y, Momozawa Y, Kubo M, Nakagawa E, Inoue K, Goto Y. A novel *PAK3* pathogenic variant identified in two siblings from a Japanese family with X-linked intellectual disability: case report and review of the literature. Cold Spring Harb Mol Case Study 13;5(6):a003988, Dec, 2019
3) Hidese S, Hattori K, Sasayama D, Tsumagari T, Miyakawa T, Matsumura R, Yokota Y, Ishida I, Matsuo J, Yoshida S, Ota M, and Kunugi H. Cerebrospinal fluid neuroplasticity-associated protein levels in patients with psychiatric disorders: A multiplex immunoassay study Translational Psychiatry, (2020) 10, 161 doi: 10.1038/s41398-020-0843-5
4) Iwama K, Mizuguchi T, Takeshita E, Nakagawa E, Okazaki T, Nomura Y, Iijima Y, Kajiura I, Sugai K, Saito T, Sasaki M, Yuge K, Saikusa T, Okamoto N, Takahashi S, Amamoto M, Tomita I, Kumada S, Anzai Y, Hoshino K, Fattal-Valevski A, Shiroma N, Ohfu M, Moroto M, Tanda K, Nakagawa T, Sakakibara T, Nabatame S, Matsuo M, Yamamoto A, Yukishita S, Inoue K, Waga C, Nakamura Y, Watanabe S, Ohba C, Sengoku T, Fujita A, Mitsuhashi S, Miyatake S, Takata A, Miyake N, Ogata K, Ito S, Saitsu H, Matsuishi T, Goto Y, Matsumoto N. Genetic landscape of Rett syndrome-like phenotypes revealed by whole exome sequencing. J Med Genet. 2019 Jun;56(6):396-407. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105775. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30842224 (Cover page of June Issue)
5) 井上 悠輔. 人試料を用いる科学研究　バイオバンクと「約束」のあり方, 科学技術社会論研究(17) 156-163 2019年4月.

6. 知的所有権の出願・登録状況

なし

NCNPバイオバンク提供実績

(2014年4月～2020年3月)

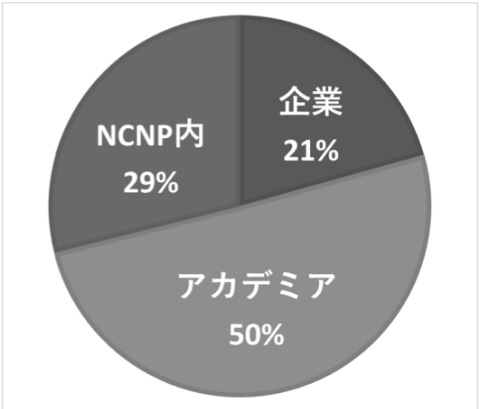


延べ122件

NCNPバイオバンク提供実績

(2014年4月～2020年3月)

外部提供先:	88 件	(72%)
大学	35 件	
公的研究機関	28 件	
企業	25 件	



精神・神経疾患バイオリソース・レポジトリーの統合化と効率的運用の研究

分担研究者
所属　国立精神・神経医療研究センター
メディカル・ゲノムセンター／神経研究所　疾病研究第二部
職名　センター長／部長
氏名　後藤雄一
E-mail: goto@ncnp.go.jp

【要旨】
NCNP バイオバンクを中核に、NCNP で行われている各種バンク関連事業の統合化をめざす活動を行った。システムの機械的な統合よりは、その設立の経緯や運営資金等の違いを踏まえ、NCNP バイオバンクのシステムの利用や共有化を行う方式で連携を図った。この連携作業は、NCNP 内に止まらず、ナショナルセンター間、他のメガバンクとの連携を含むオールジャパン体制へと発展しており、それらの活動において NCNP バイオバンクは主導的な立場で活動を行っている。

【背景と目的】
2011 年から 6 つのナショナルセンターがネットワーク・連邦型のナショナルセンター・バイオバンクネットワーク（NCBN）を組織して、国立精神・神経医療研究センター内には NCNP バイオバンクシステムがローカルバンクの一つとして前向きの研究資料の収集と提供を担ってきた。さらに当センターには様々なバイオリソースが研究プロジェクト毎に収集されており、本研究ではそれらを一括管理して有効利用することで、臨床にも研究にも有用性のより高いバイオリソース・レポジトリーを構築することを目指している。平成 27 年度に開始した発達障害バイオバンクを NCNP バイオバンクシステムへの組み入れを行い、独自の歴史をもち NCNP のモニュメント的な骨格筋レポジトリーの活用に資する支援を行う。特に、倫理指針や知的財産等の社会的手続きの変化に対応するために同じバンク事業として支援する。
さらに、昨今はゲノム医学、ゲノム医療の観点からバイオバンク事業の重要性が世界的に認識され、一大ムーブメントとなっている。我が国でも乱立気味のバイオバンクの連携を図る必要に迫られており、その動きの中核となって NCNP が動くことが要請されている。

【方法】
１）NCNP バイオバンクの拡充と広報
利用の推進を図るために、提供における迅速化と共同研究もしくは分譲のシステム化を確実に進める。NCNP バイオバンクシステムを利用した研究資源の収集を他の疾患、他の試料形態へ広げ、NCNP 及び NCNP 外の研究者に対して研究活用の機会を増やすように広報する。
２）骨格筋レポジトリー事業への継続的支援
骨格筋レポジトリーの研究利活用について継続して支援する。
３）他のセンター内バンク事業、疾患レジストリー事業との連携
知的障害バイオリソース収集システムを　知的障害バイオリソース収集システムを診断サービスとの連動を残して一元化したため、さらにシステムの改良を行う。脳バンクなどの他のセンター内バンク事業や Remudy などの疾患レジストリ事業との連携を図り、できるだけ共通のプラットフォームの利用を進める。さらにナショナルセンター間、他のメガバンクの動きとも連動して活動する。

【結果】
1)登録した試料をセンター内外の研究者や製薬企業等に提供するための「バイオバンク利活用推進委員会」が順調に活動した。特に、NCNP 内及び外部利用者に対する便宜をはかり、共同研究での提供に加え

分譲での提供(全提供数34件のうち8件)が増えた。
２)骨格筋レポジトリーは年間1000を超える症例数の登録が継続され、患者診断及び研究利用に大きく貢献した。
３）他の研究事業で行われていたパーキンソン病患者試料の収集、てんかん外科患者の試料収集、など、NCNP バイオバンクシステムへの組み入れが実現した。また、ナショナルセンターバイオバンクネットワーク（NCBN）の活動と連動してバイオバンクの国際標準化について重点的に動いた。

さらに、AMED研究費によるオールジャパンの横断検索システム構築と運用に関するプロジェクトに参加し、バイオバンクジャパン、東北メディカル・メガバンクなどのメガバイオバンクとの連携活動事業が本格的に始まり、これら我が国のバイオバンクの中核として活動した。

【結論】

国立精神・神経医療研究センターにある種々のバイオリソースを統合する試みは着実に進んでいる。また、利活用の推進とともに、それらのシステムは、ナショナルセンターのミッションと合致するオールジャパン体制へと発展してきている。

ゲノム医療に関連する研究活動の基盤として、NCNPにおけるバイオリソース収集と利用は重要な役割を果たしており、今後さらに質、量ともに高めてゆく必要がある。

【考察】

国立精神・神経医療研究センターには、複数のバイオリソース活動が存在し、試料と情報の収集法の相違、準拠している倫理ガイドラインの相違（ICの内容の違いに反映)、保管・管理法の相違、運営資金の違いなどがある。したがって、これらを大きな枠組みとして一括統合を行うことは一筋縄ではいかない。しかし、NCNPバイオバンクシステムの確立を通して、その有用性、利便性、科学性、倫理性が評価され、NCNP内研究者の活用意欲が高まることが統合化の原動力となると確信している。

また、当センターのバイオバンクシステムは、ナショナルセンター間、及び、オールジャパンでの連携体制においても中核となる活動を展開している。

【発表文献】

なし

【学会報告】

1. Ogishima S, Murakami Y, Goto Y, Hirata M, Imoto S, Matsuda K, Miyamoto Y, Morisaki T, Morita M, Nagami F, Nakae H, Nishihara H, Suzuki K, Yokota H, Takagi T. Research and development of biobank network and operational support for promotion of utilization of biobank toward realization of genomic medicine. The Annual Meeting of International Society for Biological and Environmental Repositories, Shanghai, China, 5.7, 2019
2. 松村亮、波多野賢二、服部功太郎、宮下由紀子、横田悠季、吉田寿美子、永井秀明、後藤雄一. バイオバンク付随情報の精度向上を目指した病院情報システムとのオンデマンド連携. 第39回日本医療情報学会学術大会 2019年11月21日～24日 千葉市
3. 後藤雄一. ナショナルセンター・バイオバンクネットワーク. AMEDワークショップ「ゲノム医療研究におけるデータシェアリング」, 東京, 2019年12月13日

【知的所有権の出願・登録状況】

なし

精神・神経疾患バイオバンクにおける標準化に関する研究

分担研究者
所属　国立精神・神経医療研究センター　メディカル・ゲノムセンター
職名　部長
氏名　服部功太郎

【要旨】
国際標準化機構(ISO)のバイオバンクについての専門委員会(TC276/WG2)の委員として国内や国外の委員と協調しつつ規格文書作成に参画した。バイオバンク国際標準の基本文書となる ISO 20387「バイオバンキングの一般要求事項」は 2018 年 8 月に制定され、日本語訳作成のとりまとめを行った。また上記 ISO 20387 の実装ガイド文書である ISO 22758 および、バイオバンクの処理のバリデーションに関わる文書 ISO 21899 の作成をすすめ、前年度集約した NCBN の意見を可能な限り反映させることを目指した。その結果、科学的に必要かつ NCBN では概ね対応可能な文書となりつつある。出版までその努力を続けたい。また、今年度より NCNP における認定準備も開始した。

【背景と目的】
ヒト試料を用いた研究においては、再現性向上が課題となっている。再現性不良の原因の 46-68%は分析前条件によるものと推定されており(Kaushik, 2014)、研究ごとの採取・処理条件の違いや低品質な試料が研究成果の再現を阻んでいると考えられる。この解決には試料収集の標準化が必要である。更に、近年オミックス解析をはじめとする分析技術の進歩により、より高い品質の試料も求められている。本研究では、科学的な要請と国内外の現状から、どのような標準であるべきかを検討し、国際標準の作成に貢献し、NCBN と NCNP の標準化を推進することを目的である。期待される成果としては、日本の意見が反映された国際標準ができ、NCNP と NCBN のバイオバンクの国際標準への対応が可能となり、長期的には研究の再現性、トレーサビリティの向上等により、医学研究に貢献することが見込まれる。

【方法】
１）国際規格の作成参加
国際標準化機構(ISO)の技術専門委員会(TC276)におけるバイオバンクをテーマとしたワーキンググループ(WG2)の国内委員会(月 1-2 回)、国際委員会（年２回）へ参加し、文書作成に貢献した。2020 年 3 月からは WG2 主査として、国内意見のとりまとめを担当している。
具体的には国内委員会において日本側の意見を集約し、文書へのコメントの提出、国際会議での意見表明や、各国コメントへの対応などを通じて日本側の意見を反映させることを目指した。

２）NCNP における実装
コンサルタントを選定し、必要な資源（要員、設備）を検討した。体制を明確にし、手順書作成の担当者を選定した。具体的内容は結果・考察で記述する。

【結果・考察】
１）国際規格の作成参加
① ISO 20387
基本文書である ISO 20387「バイオバンキングの一般要求事項」については 2018 年 8 月に制定され、我々が中心となって日本語訳を作成し 2019 年 4 月に日本規格協会より出版された。
② ISO TR 22758「ISO 20387 の実装化のためのガイダンス文書」
本文書に対する日本の基本方針としては「バンクが実装できるようにすること、審査機関が

審査できるようにすることを目指しつつ、コスト・実現可能性を考慮して審査が厳しすぎないようにすることを目指した。

具体的には前年度に実施したNCBNアンケート調査等にもとづいてつくられた日本の方針（下表）を反映できるように試みた。日本の意見は概ね認められた（下表「対応」の✔）。

対応	項目			コメント
✔	公平性		4.2	どのように担保するのか説明必要
△	機密性		4.3	どのように担保うするのか説明必要
✔	責任		5.1	記録の例示必要
△	ガバナンス		5.3	例示が必要。最小限にしたい。
✔	資源		6.1	「施設によって必要な要素は異なる」との制限欲しい
✔	財政的実現性		6.1.2	例示が必要。
✔	訓練		6.2.3.1	「客観的証拠によって教育を受けたことを実証できれば良い」等を追加したい。
✔	訓練		6.2.3.2	「施設によって判断基準は異なる」との制限欲しい
✔	外部プロセス		6.4.1	どのように審査するか。委託先も 20387 認定か要検討。
△	外部製品		6.4.1.5	バンクがロットごとに評価必要か証明書あればよいか。

③ ISO 21899「バイオバンクの生物材料のプロセシングのバリデーションとベリフィケーションに関する一般要求事項」

本規格案はバイオバンクの試料処理の方法についてのバリデーションとベリフィケーションに関する文書であり、かなり厳しい内容であるものの、日本の基本方針としては「ISO 20387 を骨抜きにしないため本文書は必要であるものの、可能な限り過度な要求事項は除き、適切なものとする」である。最終的に日本の意見が全て反映されたというわけにはならなかったものの、下記の点では成果をあげられた。

(A) オミックス等を含む将来あるいは全ての用途についてバリデーションを求めないことを確認した（そのように解釈できる表現となったうえ、プロジェクトリーダーから言質を得た)。

(B) 外部精度管理を必須ではなくした。(将来的には有用であるものの、日本で全ての用途に対する精度管理体制をつくるのは不可能であり、必要でもないため)

(C) 「継続的バリデーション」という、大きな負担が継続的に発生するリスクのある表現をなくした。

２）NCNP における 20387 認定取得準備

2019 年 11 月より NCNP バイオバンクの ISO 20387 認定取得の準備を開始した。過去には当センター臨床検査部の ISO 15189 認定のコンサルタントでもあり、国内委員でもある北川隆氏にコンサルティングを依頼した。今年度は、まず、認定取得に必要かつ重要な資源(足りない設備や要員)を調査した。その結果、専用のフリーザー室、隔離された DNA 処理室が必要であることが判明した。また、要員として複数の職員の常勤化が必要であると考えられた。スタッフの教育も必須であり、全員で要求事項の読み合わせを行うとともに、マ

ネジメントシステムの心臓部といえるISO 9001について、横田悠季が中心になって分かり易い資料を作成し講義のシリーズを開始した。

【結論】

国際規格ISO 20387について日本語訳や、実装ガイド文書22758の作成を委員の一人として行った。今後、国内における審査体制の構築にも貢献していく予定である。同規格の要求水準は高いものの、NCNPを含むNCBNは対応できる可能性が高い。NCNPにおける認定取得の準備を進めつつ、他のNCにも情報共有を行い、バイオバンクの標準化に主導的な役割を果たしていきたい。

【発表文献】

1. ISO 20387 バイオバンキングの一般要求事項、日本規格協会、2019.4
2. ISO/DIS 21899 General requirements for the validation and verification of processing methods for biological material in biobanks, ISO, 2019.6

【学会報告】

ISO 20387「バイオバンクの一般要求事項」の紹介，口頭、服部功太郎、第８回バイオバンク連絡会、2019/10/25，国内.

【知的所有権の出願・登録状況】

該当なし

精神・神経疾患バイオバンクの構築と病態解明

分担研究者
所属　国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科
職名　医員
氏名　竹下絵里
Email　erit@ncnp.go.jp

研究協力者
中川栄二（国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科）
後藤雄一（国立精神・神経医療研究センターMGC）

【要旨】
本研究では、精神・神経疾患を有する家系に対して系統的に遺伝学的解析を行うために、国立精神・神経医療研究センター内に患者臨床情報と試料を登録・保存するシステムを確立する。特に、知的障害、てんかん、発達障害に関する臨床情報データベースを構築することにより、精神・神経疾患の病態解明、診断と治療方法の開発を行う。知的障害、てんかん、発達障害の遺伝学的解析については、病院の臨床ゲノム外来を通じて臨床情報と併せて必要な試料をバイオバンクに登録し、当センターMGC でリサーチ・レポジトリーとして確立された臨床情報データベース構築に活用し、疾患の病態解明を行う。得られた解析結果は、臨床情報と併せて検討し、精神・神経疾患を有する家系の遺伝カウンセリングを実施し、診療にフィードバックすることで、基礎研究と臨床の連携をはかる。

【背景と目的】
精神・神経疾患の中でも、知的障害、てんかん、発達障害は、さまざまな遺伝性疾患で認める症状であり、その原因は多彩である。近年、網羅的遺伝学的解析技術の進歩により、今まで原因不明とされてきた知的障害、てんかん、発達障害の責任遺伝子が明らかになってきているが、同定された遺伝子変異が真の病因であるかを判定する上では、臨床情報との比較・検討が重要である。本研究では、知的障害、てんかん、発達障害に関する臨床情報データベースを構築することにより、精神・神経疾患の病態解明、診断と治療方法の開発を行うことを目的とする。

【方法】
知的障害、てんかん、発達障害の遺伝学的解析については、病院の臨床ゲノム外来を通じて臨床情報と併せて必要な試料をバイオバンクに登録し、当センターMGC でリサーチ・レポジトリーとして確立された臨床情報データベース構築に活用し、疾患の病態解明を行う。得られた解析結果は、臨床情報と併せて検討し、精神・神経疾患を有する家系の遺伝カウンセリングを実施し、診療にフィードバックすることで、基礎研究と臨床の連携をはかる。

【結果】
１）知的障害を主とする精神・神経疾患の遺伝学的解析データベースについて、2020 年 1 月末までに 656 家系の登録を行った。
２）臨床情報データベース構築、対象の主治医への結果報告、遺伝カウンセリングを行った。1～328 家系については、男児を中心に非症候性 X 連鎖性知的障害の原因 19 遺伝子（*FMR1&2, IL1RAPL1, TM4SF2, FTSJ1, FACL4, DLG3, ZNF41, PQBP1, PAK3, AGTR2, ARHGEF6, GDI1, OPHN1, RPS6KA3, SLC6A8, ARX, MECP2, ATR-X*）を解析し、329～650 家系については *FMR1* 解析（鳥取大学難波先生，足立先生）、*MECP2* 解析（当センター）、アレイ CGH（当センター）を行った。このうち、*MECP2* 解析については、全例に直接シークエンス法で微小変異の有無を解析し、さらに表現型から Rett 症候群が

疑わしい家系には MLPA 法でエクソンレベルの欠失・重複を確認した。*MECP2* 解析は 650 家系まで終了し、このうち MECP2 変異陽性例は 51 例、直接シークエンス法で判明した微小変異が 44 家系、MLPA 法で判明したエクソン欠失が 7 家系であった。

３）登録された 656 家系のうち、解析を行った 649 家系までの遺伝学的解析結果を主治医に報告し、必要な追加検体・臨床情報収集を行った。遺伝カウンセリングを希望した家族に対しては遺伝カウンセリングを行った。臨床情報（知的障害、発達障害、てんかん）と遺伝学的解析結果をデータベースに順次記載・更新した。

【結論】

知的障害、発達障害、てんかんを主とする精神・神経疾患の遺伝学的解析データベースを構築し、情報の更新および結果のフィードバックを行った。

【考察】

知的障害、発達障害、てんかんを主とする精神・神経疾患の遺伝学的解析データベースは登録数が 656 家系に及んでおり、日本でも有数のバイオバンクとなっている。また、当センター内で研究所と病院が連携することで、遺伝学的解析結果と臨床情報を併せて検討し、基礎研究と臨床の連携をはかることが可能となっている。今後も症例数を増やし、網羅的遺伝学的解析と組み合わせることで新たな疾患の病態解明、診断と治療方法の開発に発展させることを目指していく。

【発表文献】

1. Takeshita E, Iida A, Abe-Hatano C, Nakagawa E, Sasaki M, Inoue K, Goto Y. Ten novel insertion/deletion variants in MECP2 identified in Japanese patients with Rett syndrome. Hum Genome Var. 18;6:48, Oct, 2019

2. Iida A, Takano K, Takeshita E, Abe-Hatano C, Hirabayashi S, Inaba Y, Kosugi S, Kamatani Y, Momozawa Y, Kubo M, Nakagawa E, Inoue K, Goto Y. A novel *PAK3* pathogenic variant identified in two siblings from a Japanese family with X-linked intellectual disability: case report and review of the literature. Cold Spring Harb Mol Case Study 13;5(6):a003988, Dec, 2019

【学会報告】

なし

【知的所有権の出願・登録状況】

なし

精神・神経疾患バイオバンクにおける臨床情報登録システムの研究

分担研究者
所属　国立精神・神経医療研究センター　TMC 情報管理・解析部・病院 医療情報室
職名　室長
氏名　波多野賢二
E-mail　khatano@ncnp.go.jp

【要旨】
バイオリソースデータベースの臨床情報の充実を目的に、電子カルテシステムと連携し、電子カルテシステムの臨床情報をバイオリソースデータベースにオンラインで送信するシステムを構築した。さらに電子カルテシステムとセンター外部の症例レジストリ・データベースとの情報連携のための環境整備・システム構築を行った。

【背景と目的】
バイオリソースが臨床研究に有効に活用されるためには、患者由来の検体が適切に管理されていることに加え、検体に付随する臨床情報が適切に収集され、研究に活用しやすい形で蓄積・管理されていることが重要である。近年、医療機関では電子カルテ等の情報システムが普及し、電子化された臨床情報がデータベースに保存されるようになり、臨床情報の二次活用の環境が整いつつある。本研究では、センター病院の電子カルテデータと連携したバイオリソースデータベースを構築および、センター内外の症例レジストリ・データベースとの情報連携のための環境整備を目的とする。

【方法】
1）病院電子カルテシステムと NCNP バイオバンクの情報連携のさらなる拡充のため、オーダリング情報の種別追加および、カルテ記録やレポートなどから、臨床研究に有用な情報を抽出するシステムの開発を行う。
2)全国規模の症例データベースの標準形式である SS-MIX2(厚生労働省電子的診療情報交換推進事業)ストレージを活用し、病院の診療情報システムの臨床情報とセンター内外データベースとの情報連携のシステムを構築する。

【結果】
1）病院情報システムと NCNP バイオバンクの連携情報（処方・注射・検体検査・患者プロファイル・病名情報）について、出力する情報の最適化を行い、効率的な連携が可能になった。カルテ記録やテンプレートなどからの情報抽出に関しては、テスト環境を作成し、予備的な検証を行った。
2）2019 年度に、6NC 横断研究事業として各 NC の電子カルテ情報の統合ストレージが計画され、それに向けて SS-MIX2 ストレージを活用した診療データのオンライン送信の環境構築を行った。MCDRS と呼ばれる SS-MIX2 ゲートウエイ経由で、暗号化された診療情報を国際医療研究センターに設置されたセンターサーバーへ送信する試験を実施した。国際医療研究センターとの通信はインターネット VPN（仮想プライベートネットワーク）の拠点間通信で行い、必要なセキュリティを確保した。

【考察】
病院情報システムと NCNP バイオバンクの連携に関しては、2013 年から徐々に連携の環境整備、連携情報の拡充、自動化・省力化などに取り組んできた。今後は、カルテ記載・テンプレートなどの診療情報の連携について対応を進める必要があると考えている。
6NC 横断研究事業の電子カルテ情報の統合ストレージでは、SS-MIX2 標準ストレージのオーダリング情報（病名・処方・検査・アレルギー

等）に加え、各施設の電子カルテシステムのテンプレート情報を XML 形式で拡張ストレージに格納し連携を行う計画である。このシステムをセンター内の情報連携にも適用することにより、バイオリソースデータベースへのカルテ記載情報の送信について進展が期待できると思われる。

診療情報の外部連携については、患者情報保護のため、セキュリティについては細心の配慮が求められる。今回構築してシステムでは、外部との通信に VPN を用い、情報の漏洩や書き換えを抑止して安全な通信を行える環境を構築した。

【結論】

センター病院の電子カルテデータと連携したバイオリソースデータベースを構築および、電子カルテシステムとセンター外部の症例レジストリ・データベースとの情報連携のための環境整備・システム構築に取り組んだ。

【学会報告】

１．松村亮、波多野賢二、服部功太郎、宮下由紀子、横田悠季、吉田寿美子、永井秀明、後藤雄一. バイオバンク付随情報の精度向上を目指した病院情報システムとのオンデマンド連携. 第 39 回日本医療情報学会学術大会 2019 年 11 月 21 日～24 日 千葉市

【知的所有権の出願・登録状況】

なし

知的障害バイオバンクの試料を用いたアレイCGHによる網羅的ゲノム構造解析

分担研究者
所属　国立精神・神経医療研究センター　神経研究所　疾病研究第二部
職名　室長
氏名　井上　健
E-mail　kinoue@ncnp.go.jp

【要旨】
平成15年度より国立精神・神経医療研究センター内に、知的障害患者の血液から採取したゲノムDNAおよびこれから樹立したリンパ芽球を登録し、これを用いたゲノム解析研究を実施してきた。これらの患者検体は、診断を目的とした知的障害関連遺伝子の解析を実施し、その結果を主治医にフィードバックすることによって、これらの患者の臨床診断に寄与するとともに、科学的有用性の高いバイオリソースの構築に大きく寄与して来た。本研究では、継続して知的障害の患者の網羅的ゲノム解析としてアレイCGH解析を実施し、得られたゲノム情報と主治医から得られた臨床情報との統合を行い、知的障害のバイオリソースの有用性をさらに高めていく。

【背景と目的】
精神神経疾患の臨床研究を推進させるためには臨床情報と試料をリサーチ・リソースとして保存・管理し、また研究者が利用しやすいように提供するシステムが不可欠である。本邦においてこういった精神神経疾患に関するバイオリソース整備が遅れており、早急な整備が望まれている。バイオリソースの価値は、質の高い臨床情報や遺伝学的情報が付帯することによって高くなる。本研究では、これまでの実績を活かし、さらに知的障害の血液 DNA 及びリンパ芽球の収集と臨床情報の収集を継続し、これらにアレイCGH解析を用いた網羅的ゲノム解析によるゲノム情報を付帯させた科学的有用性の高いバイオリソースを構築することを目的とする。

【方法】
知的障害を呈する患者試料の収集は、従来通りの方法で継続する。患者DNAを用いてアレイCGHを用いた網羅的ゲノム研究を実施し、疾患原因あるいは脆弱性に関連したゲノム構造変異や多型を検出する。アレイ CGH 解析は、Agilent 社の Sureprint G3 Human CGH マイクロアレイ 8x60K を使用した。平均プローブ間隔は33.3kbである。ドライ解析にはAgillent社が提供するソフトウェアGenomic Workbenchを用いた。正常および疾患データベースとの照合により、abnormal, possibly abnormal, unclear, normalの4段階に分類した。これらのゲノム情報を臨床情報とともに患者試料に統合したデータベースを作成し、本邦において他に類を見ない質の高いバイオリソースを構築する。

【結果】
これまで継続的に解析されて来た網羅的アレイCGHの解析対象家系は、平成30年11月末までにNCNPで収集した知的障害は650家系であり、平成22年4月以降に到着した300家系である。平成31年度は、20家系の解析の登録・解析を実施し、３家系で病因と思われるCNVを同定した。1例で47,XYY の染色体異常を確認し、これは同時に行われたG-bandでも確認された。臨床的には運動発達の遅れとこだわりなどASD傾向を呈するが、知的には正常範囲の男児であった。 1例ではchr14q12-q21.1の10.8Mbの欠失を同定した。この症例は、失調歩行、精神運動発達遅滞、小頭・短頭、低身長、特異的顔貌（歯間開大、高口蓋、下顎突出、大きな耳介）、脳梁形成不全、脳室拡大、

両側頭頂葉白質の異常信号、右斜視、側彎、鼠径ヘルニア、両足関節底屈制限、右外反踵骨などを呈し、G-band でも検出可能な大きなゲノム領域の欠失に見合う多彩は臨床症状が確認された。もう１家系では、chr2p14 に 129Kb の欠失を同定した。同 CNV は母親でも同定されたが、母方家系内に知的障害を有する家族が複数存在するとのことから、家系解析を実施することとなった。本欠失により *ACTR2* と RAB1A の２つの遺伝子が破壊されるが、本疾患の責任遺伝子としては、*ACTR2* である可能性が高いと考えている。

【結論】

本年度は、解析検体数は８家計にとどまったが、非常に興味深い chr2q11.2 微細欠失症例を見いだすことができた。

【考察】

知的障害を呈する患者のバイオリソースの収集をさらに進めた。平成 31 年度は新たに 20 家系のアレイ CGH 解析を実施し、その結果をこれまでの実績に統合した。これらの網羅的ゲノム解析データが付帯したバイオリソースは、全エクソーム解析や全ゲノム解析などのリソースとして、高い科学的有用性を持つものと考えられる。

【発表文献】

1. Hirasawa-Inoue A, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Ishiyama A, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sugai K, Inoue K, Goto YI, Sasaki M. Static Leukoencephalopathy Associated with 17p13.3 Microdeletion Syndrome: A Case Report. Neuropediatrics. 2019 Dec;50(6):387-390. doi: 10.1055/s-0039-1693972.
2. Takeshita E, Iida A, Abe-Hatano C, Nakagawa E, Sasaki M, Inoue K, Goto YI. Ten novel insertion/deletion variants in MECP2 identified in Japanese patients with Rett syndrome. Hum Genome Var. 2019 Oct 18;6:48. doi: 10.1038/s41439-019-0078-2.
3. Iida A, Takano K, Takeshita E, et al. A novel *PAK3* pathogenic variant identified in two siblings from a Japanese family with X-linked intellectual disability: case report and review of the literature. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2019;5(6):a003988. 2019 Dec 13. doi:10.1101/mcs.a003988

【学会報告】

なし

【知的所有権の出願・登録状況】

なし

精神・神経疾患バイオリソース・レポジトリーの統合化と効率的運用の研究

分担研究者
所属　国立精神・神経医療研究センター　病院臨床検査部
職名　部長
氏名　吉田　寿美子
E-mail　syoshida@ncnp.go.jp

【要旨】
精神・神経疾患の新しい診断・治療法の開発研究に資するために、バイオバンクは質の高い試料・情報を収集するだけではなく、利用を活性化する必要がある。今年は認知症学会など３件の出展・発表を行い周知した。その結果 2019 年度末の時点で 34 件の提供を行い、累計 122 件となった。外部施設が 88 件うち 25 件が企業提供であった。バンクを基盤に、うつ病や認知症、パーキンソン病、てんかん等多くの共同研究も開始された。活性化に伴い手続きや作業の負担も増加しているため、簡易化・パッケージ化・自動化などをすすめていきたい。

【背景と目的】
国立精神・神経医療研究センター(NCNP)バイオバンク内には貴重な試料・情報が蓄積されてきており、更なる利活用の活性化が必要である。NCNP では様々な研究活動が行われているが、検体の処理方法や精神疾患の症状評価などが標準化されておらず、
研究横断的なアプローチが困難である。

【方法】
１）学会等での広報活動。
２）専門疾病センターや臨床研究との連携
バイオバンクを基盤として、専門疾病センターや臨床研究との連携を提案する。

【結果】
１）認知症学会など３件の出展・発表を行い周知した。その結果 2019 年度 34 件の提供を行い、累計 122 件となった。外部施設が 88 件うち 25 件が企業提供であった。
２）専門疾病センターとしては、うつ病センター、気分障害センター、認知症センターと連携、研究プロジェクトとしては CFS 研究、PET 研究、光トポ研究と連携し、各研究推進を下支えすると共にレポジトリーやコホートを共同で構築している。これら専門疾病センターや NCNP 内研究プロジェクトには共同研究として試料・情報の提供を行っているので、利活用促進にも貢献している。

【結論】
学会での広報は利活用の促進となった。一方で、NCNP 内の専門疾病センターや他の研究プロジェクトと連携する事は、研究そのものの活性化のみならず、利活用の活性化にも貢献している。

【考察】
バイオバンクは研究基盤整備事業だが、NCNP 内部の研究プロジェクトのみならず、他のアカデミアや企業など、広く研究プロジェクトと連携する事で研究と利活用の両者の活性化を促す事が出来るので、今後も積極的に連携していきたい。

【発表文献】
1. Gotoh L, Yamada M, Hattori K, Sasayama D, Noda T, Yoshida S, Kunugi H, Yamada M. Lysophosphatidic acid levels in cerebrospinal fluid and plasma samples in patients with major depressive disorder. Heliyon 5: e01699, 2019

2. Mori-Yoshimura M, Mizuno Y, Yoshida S,

Ishihara N, Minami N, Morimoto E, Maruo K, Nonaka I, Komaki H, Nishino I, Sekiguchi M, Sato N, Takeda S, Takahashi Y. Psychiatric and neurodevelopmental spects of Becker muscular dystrophy. Neuromusc Disord 29: 930-939, 2019

【学会報告】

なし

【知的所有権の出願・登録状況】

なし

精神・神経疾患バイオリソース・レポジトリーの統合化と効率的運用の研究

分担研究者
所属　国立精神・神経医療研究センター　神経研究所　疾病研究第三部
職名　部長
氏名　功刀 浩
E-mail hkunugi@ncnp.go.jp

研究協力者：秀瀬真輔、服部功太郎
（国立精神・神経医療研究センター　神経研究所　疾病研究第三部）

【要旨】

本研究では、当施設のバイオリソースを用いて精神疾患の病態解明研究を行っている。今年度はMAGPIX®システムと精神科患者及び健常対照者の大規模脳脊髄液(CSF)検体を用いて、CSF中の炎症系および神経可塑性関連タンパク質の多分子同時測定を行った。その結果、APP(アミロイド前駆体蛋白質)、soluble CD(可溶性分化抗原群)30、GDNF(グリア細胞由来神経栄養因子)、IFN(インターフェロン)-β、及び NCAM-1(神経細胞接着分子-1)が特性マーカーとして、HGF(肝細胞増殖因子)、IL(インターロイキン)-11、IL-29、S100B (S100タンパク質 B)、TSLP(胸腺間質性リンパ球新生因子)、及び VEGF (血管内皮増殖因子)受容体 2 が状態マーカーとして精神疾患の病態に関与することが示唆された。

【背景と目的】

神経炎症や神経可塑性障害は、精神疾患の病態と関与することが示唆されている。マルチプレックスイムノアッセイは、複数のタンパク質を同時測定する方法として近年になり用いられている。一方、従来のCSFを用いたマルチプレックスイムノアッセイでは、測定された炎症系タンパク質の種類やサンプル数が限られていた。また、CSF 中の神経可塑性関連タンパクについては、その測定にマルチプレックスイムノアッセイが用いられたことはなかった。本研究は、比較的多数の精神疾患患者と健常者のCSF検体で、炎症系および神経可塑性関連分子を測定し疾患や臨床情報との関連を調べることで、精神疾患の炎症及び神経可塑性障害仮説について検証した。

【方法】

低容量サンプルから多数分子同時測定を行うことができるMAGPIX CCD imaging systemを用いてCSF384検体(統合失調症94名、双極性障害64名、大うつ病性障害104名、健常者118名)で測定を行った。マルチプレックスイムノアッセイキットとしてHuman Inflammation Panel 1 37-Plex (Bio-Rad)及びMagnetic Luminex Assay, 22-plex (R&D)を用いた。その結果、それぞれ37分子中19分子（炎症性サイトカイン）及び22分子中11分子(神経可塑性関連タンパク質)について、assay working range 内の信頼性のある測定を行うことができた。

【結論】

炎症性サイトカインでは、健常対照者と比べてsoluble CD30が統合失調症で、IFN-βが統合失調症・双極性障害・大うつ病性障害でこの順番で有意に上昇しており、IL-11、IL-29、およびTSLPが統合失調症の症状と有意に負に相関していた。神経可塑性関連タンパクでは、APPおよびGDNFが統合失調症で、APPおよびNCAM-1が双極性障害で有意に減少しており、HGFおよびS100βが症状では統合失調症、S100βが双極性障害、HGFが大うつ病性障害の症状と有意に正に相関していた。

【考察】

本研究によって、炎症系サイトカインおよび

神経可塑性関連タンパク質を精神疾患のバイオマーカー分子群を示唆することができた。これらの所見は、精神疾患の炎症及び神経可塑性障害仮説を支持するものと考えられる。今回見出された炎症性サイトカインや神経可塑性タンパク質は、精神疾患の病態解明や治療法に貢献できる可能性がある。今後も、動物実験やさらに大規模な臨床研究によって有望なバイオマーカー分子に関する詳細な検討が行われることが期待される。

【発表文献】

1．Hidese S, Hattori K, Sasayama D, Tsumagari T, Miyakawa T, Matsumura R, Yokota Y, Ishida I, Matsuo J, Yoshida S, Ota M, and Kunugi H. Cerebrospinal fluid neuroplasticity-associated protein levels in patients with psychiatric disorders: A multiplex immunoassay study Translational Psychiatry, (2020) 10, 161 doi: 10.1038/s41398-020-0843-5

【学会報告】

なし

【知的所有権の出願・登録状況】

なし

Rett 症候群様表現型における全エクソーム解析を用いた遺伝学的解析

分担研究者
所属　横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学
職名　教授
氏名　松本 直通
e-mail　naomat@yokohama-cu.ac.jp

【要旨】
Rett 症候群（RTT）は神経発達のマイルストンが退行する特徴的な神経疾患である。RTT 典型例は通常 MECP2 変異で惹起する。我々は、MECP２陰性の RTT 典型例･非典型例に対して全エクソーム解析（WES）を行いその遺伝的背景を明らかにすることを目的として解析を進めた。RTT クライテリアにもとづき typical RTT 11 例、atypical RTT 22 例、RTT-like phenotypes 44 例の計 77 例に対して WES を施行した。既知遺伝子 28 種の pathogenic あるいは likely pathogenic SNV を 39 例に同定した（N=39/77, 50.6%）。WES-based CNV 解析で 8 例に病的 CNV を認め（N=8/77, 10.4%）、MECP2 を含む 6 遺伝子を巻き込んでいた。さらに次の 4 つの新規遺伝子を同定した：ATP6V0A1, USP8, MAST3, NCOR2. 本研究で MECP2 陰性の RTT-phenotypes の新たな遺伝的背景が明らかになったとともに、網羅的解析が重要であることが示された。

【背景と目的】
レット症候群は，約 10000 出生に 1 人の頻度で発症する神経発達疾患である。生後 6-18 か月で発達が止まり, すでに習得した運動／言語機能の退行, 自閉症症状，(主に手の)常同運動を示す。責任遺伝子は *MECP2* (Xq28)であり，典型例では 90%以上の症例で変異が同定される．非典型型のレット症候群で，*CDKL5* (Xp22.13), *FOXG1* (14q13)の変異によるものも報告されている. さらに HGMD には，62 個の遺伝子が報告されている (ver2018.2)。

【方法】
１）対象症例
典型 RTT 35 例、非典型 RTT 29 例、RTT 様 51 例の計 115 例を対象とした。
２）*MECP2* 解析
全例にサンガー法で *MECP2* 解析を、19 例に *MECP2* の MLPA 解析を施行した。
３）WES 解析
MECP2 陰性の典型 RTT 11 例､非典型 RTT 22 例、RTT 様 44 例の計 77 例に対して WES を施行した。

【結果】
MECP2 変異を 38 例に同定し診断が確定した。*MECP2* 陰性 77 例の WES 解析で 39 例に病的 SNV を同定した（50.6%）。WES データを用いた CNV 解析で 8 例に病的 CNV を同定､最終的に 47 例（典型 RTT 6 例、非典型 RTT 15 例、RTT 様 26 例）で遺伝学的に原因が解明した（61.0%）。未解決群（典型 RTT 5 例、非典型 RTT 7 例、RTT 様 18 例）の中で 5 例で 4 遺伝子（*ATP6V0A1, USP8, MAST3, NCOR2*）の病的バリアントが疑われ RTT 及び関連疾患の責任遺伝子の可能性が疑われた。以下の表に同定した確定バリアントの一覧を列挙する。

Gene	Reported phenotypes	Number of cases
WDR45	BPAN	5
STXBP1	EE	5
SHANK3	Phelan-Mcdermid syndrome, ASD	4
UBE3A	Angelman syndrome	3
FOXG1	Atypical RTT, congenital variant	2
CDKL5	EE, atypical RTT	1
GABRA1	EE	1
SCN2A	EE	1
SCN8A	EE	1
GRIN2B	DD with/without Seizures, EE	1
IQSEC2	Severe ID, microcephaly	1
CAMK2B	DD, ID	1
CUX2	ID, ASD	1
CACNA1D	Seizures	1
CACNA1G	Spinocerebellar ataxia	1
ITPR1	Spinocerebellar ataxia	1
KIF1A	Spinocerebellar ataxia	1
SYNGAP1	ID with epilepsy	1
NALCN	limb/face anomaly and DD	1
NR2F1	ID with/without optic atrophy	1
IRF2BPL	DD with seizures	1
MAST1	Autism and microcephaly	1
COL4A1	Schizencephaly**	1
HDAC8	Cornelia de Lange syndrome	1
TCF4	Pitt-Hopkins Syndrome	1
PDHA1	Pyruvate dehydrogenase deficiency	1
PPT1	Neuronal Ceroid Lipofuscinosis	1
DNMT3A	Tatton-Brown-Rahman syndrome	1
MEF2C	DD	1
MECP2	RTT	4

【結論】

典型 RTT 35 例、非典型 RTT 29 例、RTT 様 51 例の計 115 例を対象にシステマティックな遺伝学的解析を施行、47 例（61%）で遺伝学的原因が解明した。更に新規責任遺伝子候補 4 つが浮上し、本研究により RTT 及び関連疾患の遺伝学的背景が明らかになった。

【考察】

本邦における最大規模の RTT 及び関連疾患の遺伝学的研究によりその複雑な遺伝学的背景が明らかになった。従来想定されていた *MECP2*、*CDKL5*、 *FOXG1* 以外に多岐にわたる遺伝子異常が関連しており網羅的な遺伝学的解析を進めることが原因特定に到る効果的アプローチであると考える。

【発表文献】

1．Iwama K, Mizuguchi T, Takeshita E, Nakagawa E, Okazaki T, Nomura Y, Iijima Y, Kajiura I, Sugai K, Saito T, Sasaki M, Yuge K, Saikusa T, Okamoto N, Takahashi S, Amamoto M, Tomita I, Kumada S, Anzai Y, Hoshino K, Fattal-Valevski A, Shiroma N, Ohfu M, Moroto M, Tanda K, Nakagawa T, Sakakibara T, Nabatame S, Matsuo M, Yamamoto A, Yukishita S, Inoue K, Waga C, Nakamura Y, Watanabe S, Ohba C, Sengoku T, Fujita A, Mitsuhashi S, Miyatake S, Takata A, Miyake N, Ogata K, Ito S, Saitsu H, Matsuishi T, Goto Y, Matsumoto N*. Genetic landscape of Rett syndrome-like phenotypes revealed by whole exome sequencing. J Med Genet. 2019 Jun;56(6):396-407. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105775. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30842224 (Cover page of June Issue)

【学会報告】

1． Forum of Neuroscience 2019, Plenary talk, Naomichi Matsumoto, “RNA sequencing solved the most common but unrecognized pathogenic variant in Japanese nemalin myopathy”, Bedford Hotel and Congress Center, Brussels, Belgium, June 10, 2019

2． ESHG 2019, Naomichi Matsumoto, Kohei Hamanaka and Satoko Miyatake. “RNA sequencing solved the most common but unrecognized pathogenic variant in Japanese nemalin myopathy”(Poster) June 15-17, 2019, Gothenburg, Sweden

3. 2019 年 8 月 2 日，日本筋学会第 5 回学術集会、松本直通（シンポジスト）「Whole exome sequencing で解決できない症例へのアプローチ」@東京大学伊藤国際学術研究センター

4． CNV research meeting, Naomichi Matsumoto (Invited speaker), “Long read sequencing for “difficult” regions”,AMED, Tokyo, Oct 8, 2019

5． PacBio ASHG 2019 Workshop, Naomichi Matsumoto (Invited lecturer), “Long read sequencing for disease-genome analysis: our experiences”, Hilton-Americas Houston, Houston, Oct 16, 2019

6. 2019 年 11 月 1 日，第 53 回日本てんかん学会

学術集会・松本直通（シンポジスト）「EE/DEE 関連遺伝子研究の進歩」@神戸国際会議場・神戸
7. 2019 年 11 月 8 日, 第 64 回日本人類遺伝学会学術集会・松本直通（シンポジスト）「ロングリードシーケンスによる疾患ゲノム解析」@長崎ブリックホール・長崎
8. 2019 年 12 月 12 日, 第 61 回 164 委員会・松本直通「Long read sequencing による疾患ゲノム解析」@東京大学駒場 II キャンパス・先端科学技術研究センターENEOS ホール
9. 2020 年 2 月 7, 2019 年度合同成果報告会難治性疾患実用化研究事業, 松本直通「希少難病の高精度診断と病態解明のためのオミックス拠点の構築」@大手町プレイスカンファレンスセンター
10. 2020 年 2 月 29 日, 第 15 回広島臨床遺伝セミナー, 松本直通「オミックス・IRUD 解析拠点における希少疾患のゲノム解析」Web カンファレンス

【知的所有権の出願・登録状況】
なし

精神・神経疾患バイオバンクの倫理に関する研究

分担研究者
所属　東京大学医科学研究所　公共政策研究分野
職名　准教授
氏名　井上悠輔
E-mail　yinoue-kyt@umin.ac.jp

【要旨】
2017 年および次年度（2020 年度）に予定される個人情報保護法改正および同じく次年度に予定される研究倫理指針改正を踏まえつつ、我が国におけるバイオリソース・レポジトリーに関する規制枠組み、およびＮＣＮＰにおける問題点を検討した。　特に今年度は 9 月に「医学研究等に係る倫理指針の見直しに関する合同会議タスク・フォース」により示された「医学系研究等に係る倫理指針の見直しに関する主な検討事項及び今後の見直しの方向性について（案)」を指針改正の方向性に関する主資料として中心的に検討した。

【背景と目的】
本研究は、精神・神経疾患バイオバンクにおける試料と情報の統合的管理と利活用推進を行う観点から、法・倫理の側面について検討を行うものである。バンクが多様な研究活動の基盤として科学的妥当性をもって機能するためには、関連する医療機関との連携が果たされ、試料本体の他、情報が適切に供給される仕組みが確保されること、そしてそれらが適正に管理され、ユーザーに供給される仕組みが整備されていることが不可欠である。こうした一連の流れが、また個々の疾患群や健常者などの対象について、社会・倫理的に妥当で安定した活動の展開のために、法・倫理的な論点を特定・抽出し、対応策を研究者および関係者との協議のもとに検討する。この計画方針を引き続き今年度も維持した。

【方法】
本研究は、主に文献調査、海外の制度の動向調査、有識者・実務者へのヒアリングを専らの手法としている。

【結果】
今回の指針改正に注目される点として、主に次のものを指摘できる。まず、第一に、指針間の齟齬の解消をめざした、指針の統合である。従来の「ゲノム指針」(「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指 針」)、「医学系指針」(「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」）とを統合することで、指針をめぐるダブルトラックが生じている現状を解消することが期待される。
第二に、研究計画の審査に関する「一括審査」を原則として励行するというものである。その他、電磁的手段（オンラインも含め）による同意取得の導入といった、新しい概念もある。
第三に、研究目的と診断・治療目的の線引きの再編である。特にゲノム指針では、「新しい」というだけで治療・診断目的の検査も対象としてきた（診療・治療について研究の倫理審査をするのは無理がある)。
第四に、「遺伝子」「ゲノム」に特有の規定の見直しである。ゲノム指針は、倫理氏指針の中では最も前の時代の文章を多く残しており、当時の時代背景を繁栄して遺伝情報に関する過剰ともいえる例外主義・特別視にもとづく気体を多く残している。一方、ゲノム指針は、研究による参加者・市民・社会に及ぼす影響に最も過敏に対応してきた指針であるともいえ、逆にこの点が他の医学系研究においても参考になる場合がある。

【結論】
概して、バイオバンクへの影響は、先述の一括

審査への対応、電磁的手段に依る同意取得の解禁（遠隔地の医療機関・研究対象のリクルートに効果的か）などのほか、研究機関の定義の再編（取得機関の位置づけの変更）などが影響すると思われる。

【考察】

先の四つの点を、バイオバンクとの関係から課題と共に検討すると、以下のとおりである。第一の点は、特に従たる立場でバイオバンク・レジストリ構築にかかわる「取得機関」の課題が大きい。医学系指針では研究機関の外におかれているが、ゲノム指針では「研究機関」として位置づけられている。

第二の点は「原則、一研究一審査とし、研究責任者から付議する手続とする。」（前述の「今後の見直しの方向性」案）とした点である。「原則」がどの程度の要件なのか、またこれがどの研究についても満遍なく求められるかどうか、注目される。

第三の点は、最も注目される点である。ただ、この報告を執筆する時点で省みる限り、この点はほとんど前進できなかった点が悔やまれる。「知識」を得ることを主目的とする活動が「研究」に該当するという基準をどう考えるべきだろうか。

第四の点は、研究進行中の被験者・研究参加者からの相談への対応、研究に伴う副次的所見への対応、地域集団を対象とする研究における説明のあり方など、むしろゲノム指針に発して他の医学研究にも採用されることになる点が挙げられている。一方、実地調査や個人情報管理者などの規定は、医学系指針との統合によって薄められる予定となっている。

なお、この文書（「今後の見直しの方向性」案）には、「バイオバンクの運営円滑化に資する対応」に関する記載があるが、この点の更なる検討が注目される（ただ、本報告書執筆時点において明らかになったパブリックコメントによれば、指針本体には該当する箇所が登場しない。ガイダンスにしっかり明記されるよう、パブリックコメントを通じて問題提起する必要がある）。

【発表文献】

１．井上 悠輔. 人試料を用いる科学研究　バイオバンクと「約束」のあり方，科学技術社会論研究(17) 156-163 2019 年 4 月.

【学会報告】

なし

【知的所有権の出願・登録状況】

なし

30-7

Integrated Management in Biobanks in NCNP and Promoting Utilization

Yu-ichi Goto
Medical Genome Center/ National Institute of Neuroscience,
National Center of Neurology and Psychiatry,
Tokyo

1. Aim of the study

We have established the bioresearch repository for genetic diseases with intellectual disabilities in NCNP since 2003. Moreover, we have maintained several repositories such as frozen and myoblast samples of neuromuscular disease, cerebrospinal fluid samples for mental and neurological disease, and so on. Now we attempt to integrate these NCNP repositories for clinical and research use. We have also been engaged in nation-wide biobank network to promote basic and clinical studies.

2. Members of the research group

Principal Investigator:

Yu-ichi Goto	National Institute of Neuroscience & Medical Genome Center, National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)

Members:

Kotaro Hattori	Medical Genome Center, NCNP
Eri Takeshita	NCNP Hospital
Kenji Hatano	NCNP Hospital
Ken Inoue	National Institute of Neuroscience, NCNP
Sumiko Yoshida	NCNP Hospital
Hiroshi Kunugi	National Institute of Neuroscience, NCNP
Naomichi Matsumoto	Yokohama City University
Yusuke Inoue	Tokyo University School of Medicine

3. Results of this study

(1) Expanding and propaganda of NCNP Biobank

We have continued the DNA and cerebrospinal fluid (CSF) of patients with mental and neurological disorders. Use of CSF by researchers in academia and pharmaceutical companies is well expanding. Other specimens of other diseases such as epilepsy or Parkinson disease are also newly included in NCNP biobank systems.

(2) Supportive activity for Muscle Repository, Brain Bank and Intellectual Disability Bank in

NCNP

We supported the preexisted biobank systems in NCNP to promote utilization of the samples for research by means of recently established procedures of NCNP Biobank System. Samples in these biobanks have been utilized in genome analysis projects and basic biological studies (see Refs).

(3) Cooperation of NCNP biobank with national-center and nation-wide biobank network

NCNP biobank play a leading role on cooperation of national center biobank network (NCBN) and on activity of collaboration with Tohoku Medical Megabank, Biobank Japan and several academia-based biobanks.

4. Future Plan

We continue to refine the integrated management system for biobanks in NCNP. It is important to prepare the materials and the attached information for scientific research, especially genome research on mental, neurological and muscular diseases. And we prepare to introduce ISO approval for high quality procedures for biobanking in near future.

5. References

1) Takeshita E, Iida A, Abe-Hatano C, Nakagawa E, Sasaki M, Inoue K, Goto Y. Ten novel insertion/deletion variants in MECP2 identified in Japanese patients with Rett syndrome. Hum Genome Var. 18;6:48, Oct, 2019

2) Iida A, Takano K, Takeshita E, Abe-Hatano C, Hirabayashi S, Inaba Y, Kosugi S, Kamatani Y, Momozawa Y, Kubo M, Nakagawa E, Inoue K, Goto Y. A novel *PAK3* pathogenic variant identified in two siblings from a Japanese family with X-linked intellectual disability: case report and review of the literature. Cold Spring Harb Mol Case Study 13;5(6): a003988, Dec, 2019

３０—８NCNP ブレインバンクの運営および生前登録システムの推進

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター
齊　藤　祐　子

総括研究報告

1. 研究目的

精神、神経、筋、小児神経を専門とするナショナルセンターにおいて、その臨床や神経科学を発展させるためのインフラであるブレインバンクの構築はミッションのひとつと考えられる。質，量ともに内容が充実した精神疾患・神経疾患死後脳リソースを蓄積し、臨床への還元、研究および教育のために活用することで、日本の医療の発展に貢献することを目指す。生前登録制度を可能な限り取り入れることにより、ブレインバンク活動に理解のある方々の篤志を活かし、同時に、リソースの数と質の向上を図る。

2. 研究組織

主任研究者
齊藤　祐子　国立精神・神経医療研究センター

分担研究者
村山　繁雄　東京都健康長寿医療センター
柿田　明美　新潟大学
吉田　眞理　愛知医科大学
横田　修　岡山大学
谷池　雅子　大阪大学
井上　悠輔　東京大学
住吉　太幹　国立精神・神経医療研究センター

研究協力者
武田　篤　国立病院機構仙台西多賀病院
谷口　さやか　国立病院機構仙台西多賀病院
饗場　郁子　国立病院機構東名古屋病院
尾方　克久　国立病院機構東埼玉病院
藤村　晴俊　国立病院機構刀根山病院
小宮　正　国立病院機構東京病院
小西　吉裕　国立病院機構鳥取医療センター
二村　直伸　兵庫中央病院
鈴木　博義　仙台医療センター
高梨　雅史　順天堂大学医学部付属越谷病院
塩谷　彩子　筑波大学
田中　洋子　国立精神・神経医療研究センター
坂本　充弘　国立精神・神経医療研究センター
梅戸　克之　国立精神・神経医療研究センター
渡辺　千種　国立病院機構広島西医療センター
原口　俊　国立病院機構岡山医療センター
石津　秀樹　慈圭病院
佐藤　綾子　国立精神・神経医療研究センター
佐野　輝典　国立精神・神経医療研究センター
小松　奏子　国立精神・神経医療研究センター
森島　真帆　国立精神・神経医療研究センター
坂田　増弘　国立精神・神経医療研究センター
中込　和幸　国立精神・神経医療研究センター
宮崎　将行　国立精神・神経医療研究センター
小濱　史美　国立精神・神経医療研究センター
水谷　真志　国立精神・神経医療研究センター
瀬戸　瑛子　東京大学医学部附属病院
仙石　錬平　東京都健康長寿医療センター
山﨑　幹大　東京都健康長寿医療センター
松原　知康　東京都健康長寿医療センター
種井　善一　東京都健康長寿医療センター
元田　敦子　東京都健康長寿医療センター

河上 緒　東京都健康長寿医療センター
浜松 晶彦　東京都監察医務院
本吉 慶史　国立病院機構下志津病院
齊藤 理恵　新潟大学・脳研究所
田中 英智　新潟大学・脳研究所
齊ノ内 信　新潟大学・脳研究所
岩崎 靖　愛知医科大学・加齢医科学研究所
三室 マヤ　愛知医科大学・加齢医科学研究所
安藤 孝志　愛知医科大学・加齢医科学研究所
池田 知雅　愛知医科大学・加齢医科学研究所
宮原 弘明　愛知医科大学・加齢医科学研究所
赤木 明生　愛知医科大学・加齢医科学研究所
陸 雄一　愛知医科大学・加齢医科学研究所
平野 光彬　愛知医科大学・加齢医科学研究所
石津 秀樹　慈圭病院
三木 知子　岡山大学大学院精神神経病態学
池田智香子　慈圭病院
黒田 重利　慈圭病院
竹内 真　大阪府立母子保健総合医療センター
松岡 圭子　大阪府立母子保健総合医療センター
中西真理子　大阪大学大学院
市川 千宙　大阪府立母子保健総合医療センター
丸尾 和司　国立精神・神経医療研究センター
稲川 拓磨　国立精神・神経医療研究センター
末吉 一貴　国立精神・神経医療研究センター
長谷川由美　国立精神・神経医療研究センター
大町 佳永　国立精神・神経医療研究センター
山田 悠至　国立精神・神経医療研究センター
松元まどか　国立精神・神経医療研究センター
熊崎 博一　国立精神・神経医療研究センター
藤里 紘子　国立精神・神経医療研究センター
白間 綾　国立精神・神経医療研究センター
飯島 和樹　電気通信大学
立森 久照　国立精神・神経医療研究センター
和田 歩　帝京大学大学院

3. 研究成果

【NCNP ブレインバンク（齊藤・住吉】ブレインバンク本登録（病理解剖の際に研究同意を頂いた例）は14 例であった。希少疾患が多いことに加え、統合失調症の受託剖検もあり、受託や生前同意登録が増えているのが特徴である。病院の性質上、研究者からの提供依頼の多い精神疾患を増加する必要がある。本年度は事務局員の増員が可能となり、問い合わせに対応する時間がとれ、他のブレインバンクへの紹介も可能となった。問い合わせは過半数が HP から、４分の１は病院の掲示を見ての電話が多い、双方の充実を引き続き図る予定である。精神疾患の方の組み入れについては福島医科大学に相談しながら、また精神科医の住吉分担研究員の面談により慎重に行っている。むしろ自殺の抑止力になることが目標である。ブレインバンクの登録者の剖検は受託もあわせると 67 例行われており、剖検率は 85%を超えている。また NCNP 以外で生前登録者の剖検を依頼出来た例は 12 例あり、班員である都健康長寿医療センターや愛知医科大学のみならず、大阪大学や、仙台市立病院など、新規の施設も出てきた。学会等での広報活動の影響も大きいと考えられる。また他施設でお紺われた剖検例の凍結脳の保存を NCNP で行うことの倫理委員会承認もなされ、今後も登録者の居住地により近い施設での剖検が可能となることが見込まれる。

また生前登録者の NCNP バイオバンク研究参加希望例、バイオバンク登録者の剖検も増えてきており、NCNP バイオバンク事業との連携も機能し、成果が出て来つつある。研究者への試料提供は新規で 5 課題あり、企業への提供も行った。今後は企業とどのように連携してゆくのかを班員間である程度情報交換を行ってゆきたい。

以下に分担施設の本年度の成果を記す。

【新潟拠点（柿田）】昨年度に引き続き、ドナー登録者が亡くなられた場合の手順書に基づき、ブレイン

バンク本登録を行う準備は出来ているが、新潟地区は生前登録者があまり多くない。問い合わせも少ない地域である。しかし、特に精神科医師向けの広報活動には成功しており、そのノウハウについては、班員間で共有したい。

研究者からの試料提供依頼の情報も班員に提供し、班員のブレインバンクの有効活用に役立っている。

また企業との共同研究の経験が豊富であり、その経験についても可能な範囲で情報共有を行い、日本のブレインバンクの標準化を図りたい。

【高齢者ブレインバンク拠点（村山）】

ブレインバンクは、患者・医師・研究者の、疾患克服のための市民運動であり、献脳生前同意事前登録促進は精神・倫理面でのコアを形成する。高齢者ブレインバンクは、NCNP ブレインバンク生前同意登録の受け皿を全国に構築すべく、神経病理学会ブレインバンク委員会と協力し、徳島、広島、沖縄に続き、大阪に拠点構築を行った

神経病理学会が支えるかたちで、生前同意登録を通じ、稀少疾患の全国レベルでの集積、剖検困難地区への対応、生前を含む実証研究が可能となった。今後、大阪拠点構築に加え、九州、北海道地区拠点の構築が次の課題である。

国際的にはオランダブレインバンク責任者 Heitinga 博士と情報共有し 1、アジアオセアニア神経病理学会でブレインバンクセッションを設け、国際展開を推進する予定である。

生前同意事前登録制は、ブレインバンク活動の根幹をなす事業である。当施設は NCNP の理念に合致するためさらなる貢献が期待される。

【精神疾患拠点（横田）】

精神疾患拠点である同施設においては、今年度は、精神・神経疾患の治療法開発には病理学的，生化学的に高品質の試料と倫理面の裏付けが必要である．このため，本邦で精神疾患について高品質な病理研究試料を提供できるブレインバンクに必要な知見を得る事を目的として以下の検討を行った．

神経病理学的評価を行って試料蓄積を行う大学精神科や精神科病院は現在国内海外を問わず稀である．本研究開発の実施により，精神科施設で試料蓄積を行う際に必要となる病理学的評価，生化学的高品質化の方法，倫理整備に関する知見を蓄積できる．これは本邦における精神・神経研究の水準を向上させるのに必須の知見と考えられる．

よって精神医学・神経科学領域の高品質リソース基盤構築の在り方に関する知見の蓄積を継続することは，将来の本邦における研究水準の向上に寄与すると考えられた．

【神経疾患・認知症を主に、中部地方の生前登録者の剖検担当】（吉田）

神経・精神疾患の分子細胞生物学レベルの病態解明および治療法開発研究に疾患脳を広く活用できるようにすることを目的とし、名古屋地区において生前に献脳の意思を表明し登録していただいた神経疾患の剖検を行い、病理診断を行うとともに新鮮凍結脳を愛知医科大学加齢医科学研究所に蓄積することを 3 年間の研究目標としている。同施設では生前同意登録システムが構築された愛知医科大および名古屋大学神経内科と連携し生前登録（ドナー登録）を推進し、関連病院においても生前同意登録システムを広く啓発して推進を図っている。

関連病院からの登録例では臨床経過、画像所見などの情報が豊富にあるため、病理所見と対比する上で大変有用であるとし、　　生前同意登録ブレインバンクのシステムの維持には、人員の確保、搬送費用の補填、超低温槽の補充、正確な病理診断のための消耗品の財源の補助が不可欠であるとの班員共通の認識を持っている。

【小児精神・神経疾患の研究資源蓄積・活用のた

めのブレインバンクネットワーク構築に関する研究】（谷池）

神経・精神疾患の研究資源としてブレインバンクは現在成人のみを対象としているため、ブレインバンク登録の小児への拡大が望まれている。これを実現するシステム構築のモデルとなる役割を担っている。

そのため研究機関で保存されている小児脳標本を現行のブレインバンク・データベースに組み込むこと、また新たに取得した脳標本のバンク登録システムを整えることで、小児死後脳の研究リソースを確立させるねらいである。

引き続き標本の確認作業を進めながら順次新病理検体データベースへの登録情報更新を実施するが凍結標本はわずかしかなく、リソースの乏しさを再認識した。新たな検体のブレインバンク登録に関する倫理申請も施設内での手続きが進まず、困難がはばかっている。

それでも大阪府立母子総合医療センターとの連携により、既存検体の小児のブレインバンク登録の準備が整ってきたが、症例に偏りがあり、研究利用可能な検体はわずかである。今後新たに開頭も含めた病理解剖の同意が得られた場合には、脳標本のブレインバンク登録への同意も併せて取得できるよう、倫理審査申請を勧めていかねばならない。のちには、その他の小児医療・研究機関とも連携を進め、小児死後脳の研究リソースを拡大していく方針である。将来的には小児神経疾患の患者と保護者のコミュニティーに対し制度の周知を図り、米国Autism Brain Netのように、生前同意に枠を広げたいとしている。

【倫理担当（井上）】

NCNPのブレインバンクにおける試料（主に剖検試料）と情報の統合的管理と利活用推進を行う観点から、法・倫理の側面について検討を行うものである。バンクが多様な研究活動の基盤として科学的妥当性をもって機能するためには、関連する医療機関との連携が果たされ、試料本体の他、情報が適切に供給される仕組みが確保されること、そしてそれらが適正に管理され、ユーザーに供給される仕組みが整備されていることが不可欠である。一方、これらの前提となる事前の承諾のあり方も重要である。社会・倫理的に妥当で安定した活動の展開のために、法・倫理的な論点を特定・抽出し、対応策を研究者および関係者との協議のもとに検討した。

指針の要件がめまぐるしく変わるが、ブレインバンクはそれ自体がこれらの議論の中で主論点となってきたとはいえない。こうした動きに学会指針も対応していく必要がある一方、ブレインバンクにおける死者資料をめぐる指針での位置づけが明確でない点はもどかしい。学会指針自体の実効性と共に、遺体研究自体の議論としての認知度向上も重要であるとしている。

そして2020年度はゲノム指針の全部改正が実施される年である。とりわけ一括審査をバンクに関連するどの箇所に採用するか、またはしないのか、個別に検討する作業が発生する。死体解剖保存法の規定を考慮すれば、共同研究の枠組みを安易に外すことは難しいと思われるが、審査プロセスの効率化・簡略化はバンク機能の運営上、一層重要な課題であるとしている。

（まとめ）

分担施設、協力研究施設との連携により、生前同意システムに基づくブレインバンクが発展してきている。本邦でもブレインバンク登録に関心を持つ市民は多く、さらに広報活動を進める。剖検施設が無く登録希望者が多い北海道、四国、九州地方については今後の課題である。

今年度も生前登録希望者は研究に参加する希望を受けて、バイオバンクとの連携をさらに進めて行き、双方のリソースの質を高めて行きたい。

精神疾患の生前登録については、慎重さが肝要である

が、自殺の抑止力としての役割を果たせたらさらに良い事業となり得ると思われる。

今年度は、営利企業との共同研究が進んだが、行っていく中で問題点の発見もある。今後も慎重に倫理面での確認を行いながら事業の発展を行う。

本事業は、登録者や、ブレインバンクに本登録して下さったかたの篤志を裏切らないために、永続性が肝要であり、資金と後継者の育成が肝要である。

研究成果刊行一覧

1. Miyazaki M, Mori-Yoshimura M, Yamamoto T, Oya Y, Saito Y, Nishino I, Takahashi Y. Chronic sarcoid myopathy mimicking sporadic inclusion body myositis. Clin Neurol Neurosurg. 2019 Jul;182:84-86. doi: 10.1016/j.clineuro.2019.05.001. Epub 2019 May 6. PMID: 31102909.

2 Satoh JI, Kino Y, Yanaizu M, Ishida T, Saito Y. Microglia express TMEM119 in the brains of Nasu-Hakola disease. Intractable Rare Dis Res. 2019 Nov;8(4):260-265. doi: 10.5582/irdr.2019.01123. PMID: 31890453; PMCID: PMC6929589.

3 Takahashi Y, Uchino A, Shioya A, Sano T, Matsumoto C, Numata-Uematsu Y, Nagano S, Araki T, Murayama S, Saito Y. Altered immunoreactivity of ErbB4, a causative gene product for ALS19, in the spinal cord of patients with sporadic ALS. Neuropathology. 2019 Aug;39(4):268-278. doi: 10.1111/neup.12558. Epub 2019 May 24. PMID: 31124187; PMCID: PMC6852233.

4 Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, Suzuki Y, Qu W, Doi K, Almansour MA, Kikuchi JK, Taira M, Mitsui J, Takahashi Y, Ichikawa Y, Mano T, Iwata A, Harigaya Y, Matsukawa MK, Matsukawa T, Tanaka M, Shirota Y, Ohtomo R, Kowa H, Date H, Mitsue A, Hatsuta H, Morimoto S, Murayama S, Shiio Y, Saito Y, Mitsutake A, Kawai M, Sasaki T, Sugiyama Y, Hamada M, Ohtomo G, Terao Y, Nakazato Y, Takeda A, Sakiyama Y, Umeda-Kameyama Y, Shinmi J, Ogata K, Kohno Y, Lim SY, Tan AH, Shimizu J, Goto J, Nishino I, Toda T, Morishita S, Tsuji S. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. Nat Genet. 2019 51(8):1222-32

5 Ono CT, Yu Z, Kikuchi Y, Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Nagaoka A, Ito J, Iwasaki Y, Hagihara H, Miyakawa T, Yoshida M, Saito Y, Niwa SI, Yabe H, Kakita A, Tomita H. Minimal amount of tissue-based pH measurement to improve quality control in neuropsychiatric post-mortem brain studies. Psychiatry Clin Neurosci. 2019;73(9):566-573. doi:10.1111/pcn.12863

6 Josephs KA, Mackenzie I, Frosch MP, et al. LATE to the PART-y [published correction appears in Brain. 2019 Dec 1;142(12):e73]. Brain. 2019;142(9):e47. doi:10.1093/brain/awz224

7 Arakawa A, Saito Y, Seki T, et al. Corticobasal degeneration with deep white matter lesion diagnosed by brain biopsy [published online ahead of print, 2020 Jan 10]. Neuropathology. 2020;10.1111/neup.12638. doi:10.1111/neup.12638

8 Kurihara M, Mano T, Saito Y, Murayama S, Toda T, Iwata A. Colocalization of BRCA1 with Tau Aggregates in Human Tauopathies. Brain Sci. 2019;10(1):7. Published 2019 Dec

20. doi:10.3390/brainsci10010007

30-8「NCNP ブレインバンクの運営および生前登録システムの推進」

（分担課題名）NCNP 主導の精神・神経疾患ブレインバンクの運営の継続

分担研究者
所属　国立精神神経医療研究センター
職名　医長　　氏名　齊藤祐子

【緒言】

本研究においてNCNPの行うロードマップとしては①これまでに蓄積されてきたリソースの管理・運用、②方法論の標準化、③生前同意登録の推進と剖検（本登録）増加、④広報活動、⑤企業との連携である。これは研究の性質上、常にその質を落とさず続けて行かなければならない。

【方法】①リソースは、全例同様の方法論によって構築し、診断の精度管理、凍結検体についてはフリーザー室の完備を行う。今年度は警報アラームの二重管理システムの充実を図った。運用については、共同研究ベースの資料提供をなるべく積極的に受けるべく、研究者へのアウトリーチ活動を推進する。②方法論の標準化については個々の施設による事情があるので難しいが、固定時間や診断の標準化などは積極的に標準化を心掛け、ネットカンファを使った診断精度管理を行う。③生前同意登録者を増やす努力とともに、在宅医向けのCPCや勉強会の機会をなるべく利用する。研究者へのアウトリーチ活動は学会をとおして、シンポジウムを組むなどを行う。④広報活動は、HPhttps://www.brain-bank.org/の充実を図り、問い合わせについては、誠実に対応し、医師からの問い合わせにも積極的に応じる。⑤企業との提携は、企業サイドに需要があることが明らかとなったので、コンソーシアムを組むことを試みたが、コンスタントに使用するわけではないなど、難点が明らかになってきたので、他の方法を模索した。

【結果】

① 今年度の新たなリソースの蓄積は14例であった。半脳凍結は160例あまりとなった。運用については、共同研究が継続を含めて21件あり、そのうち企業への提供も行うことが出来ている。業績として研究を完成させるために定期的な進捗の問い合わせも始めた。②方法論については、ほぼ標準化されているが、希少疾患については、まだ模索・検討する余地もあり、ブレインバンクの分担研究者との交流を図り、統一を目指した。③生前同意登録者は順調に増加し、合計329例となり、今年度は18名の新規例があった。パーキンソン病が多いが、コントロールとなるような例が多数を占めることは大変貴重である。また精神疾患については自殺予防の観点から組み入れに慎重になっているが、それでも34例と増えている。④広報活動は年に2回行っている定期市民公開講座に加えて、患者会主催の勉強会や在宅医を対象としたCPCや勉強会を開催することで、登録者の増加やブレインバンクの認知が広くなされるようになった。④企業との提携については、1ブレインバンク対1企業でまずは行うこととなり、開始したが、共同研究にする意味や知財の件など契約を結ぶまでにこれまでのアカデミア対象とはことなった問題点が種々出てきた。今後コンソーシアム構築に向けてひとつひとつ問題をクリアしてゆくことが肝要である。

【考察・結論】

ブレインバンク活動には労力と資金と永続性が必要である。神経病理の講座や部門の減少に本邦では歯止めがかからないが、これは本邦の神経科学の発展にとってマイナスとなる。逆にブレインバンクは、神経病理の生き残りの道としても重要である。

【参考文献】Michael J. et al. “Brain Banking” Handbook of Clinical Neurology. Vol. 150

30-8「NCNP ブレインバンクの運営および生前登録システムの推進」

（分担課題名）生前同意を支える日本ブレインバンクネットワークの構築

分担研究者

所属　東京都健康長寿医療センター神経内科・バイオリソースセンター、高齢者ブレインバンク、研究所神経病理

職名：部長・研究部長　氏名：村山　繁雄

【緒言】

ブレインバンクは、患者・医師・研究者の、疾患克服のための市民運動であり、献脳生前同意事前登録促進は精神・倫理面でのコアを形成する。高齢者ブレインバンクは、NCNP ブレインバンク生前同意登録の受け皿を全国に構築すべく、神経病理学会ブレインバンク委員会と協力し、徳島、広島、沖縄に続き、大阪に拠点構築を行ったので報告する。

【方法】

NCNP ブレインバンクの、神経難病生前同意登録を、全国レベルで支えるべく、拠点構築を推進した。また高齢者ブレインバンクにおいては、老化・認知症コホートへの生前同意登録を、常勤神経心理士コーディネーターを窓口に推進した。疾患の発症から最後までを患者に寄り添い、介護者を含めた生活の質の向上の努力を行い、患者死亡時剖検による確定診断を与えることで最後の貢献をし、経時的バイオリソース蓄積、ゲノム、剖検で得られた死後脳を含む凍結組織検体を用い、根治療法の開発を目指すフレームが、高齢者ブレインバンクプロジェクトの理念である。

分担研究者は、神経病理学会理事長・ブレインバンク委員長、病理学会学術評議員の立場を生かし、神経病理学会員のサポートを得る努力をオールジャパンで推進した。また神経学会理事に選出されたことを生かし、脳神経内科教授に神経病理学会代議員になっていただき、創設した神経病理学会認定医コースによりブレインバンクを担う次世代神経病理医の育成を進めるとともに、全国拠点構築を推進した。

【結果】

徳島大学、広島大学、国立病院機構広島西医療センター、沖縄病院における生前同意剖検システム構築に続き、大阪大学において、神経内科・脳卒中科望月教授、国立刀根山医療センター藤村副院長の協力を得、森井阪大病理教授の支援、池田学精神科教授の協力の元、大阪での生前同意拠点の構築・推進を行った。神経病理学会教育指導医 3 名（藤村・井上・山寺）、認定申請志望 4 名（別宮、森、山下、米延）、望月理事の体制下、生前同意搬送剖検 2 件を阪大で得ることが出来た。次年度に向け、谷池班員の後を継ぎ、大阪ブレインバンクネットワーク拠点構築をさらに推進する。

【考察】

神経病理学会が支えるかたちで、生前同意登録を通じ、稀少疾患の全国レベルでの集積、剖検困難地区への対応、生前を含む実証研究が可能となった。今後、大阪拠点構築に加え、九州、北海道地区拠点の構築が次の課題である。

国際的にはオランダブレインバンク責任者 Heitinga 博士と情報共有し 1、アジアオセアニア神経病理学会でブレインバンクセッションを設け、国際展開を推進する予定である。

【結論】

生前同意事前登録制は、ブレインバンク活動の根幹をなす事業である。本斑は NCNP の理念に合致し、さらなる貢献を期待する。

【参考文献】

1. Brain banking. Edited by Ingeborg Huitinga, Maree J. Webster, Handbook of Clinical Neurology, Volume 150, Pages 2-430 (2018)

30-8「NCNP ブレインバンクの運営および生前登録システムの推進」

（分担課題名）
新潟地域における生前同意ブレインバンクの推進

分担研究者
所属　新潟大学 脳研究所
職名　教授　　氏名　柿田明美

【緒言】
生前同意登録（ドナー登録）制に基づくナショナル・ブレインバンク・ネットワーク構築を目的とした本研究開発費事業「NCNP ブレインバンク」の新潟地域拠点として、事業の実現に向けた諸問題を解決し、体制整備を図ることを目的に、分担研究を行なった。

【方法】
(1)患者団体と連携し、患者会等で本事業の説明を行い、生前同意登録（ドナー登録）を募り、(2)ドナー死亡時にはすみやかに病理解剖を行い、(3)新鮮凍結脳組織を保存し、(4)検体情報を NCNP のデータベースに登録し、(5)研究資源を多施設共同研究に運用するための基盤整備を図ること、を計画した。

【結果】
(1) 生前登録啓発活動：新潟大学脳研究所神経内科のご協力を頂き、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症などの患者会で、本事業の趣旨を説明し啓発活動を進めることとした。新潟県内神経内科外来に啓発活動用ポスターを掲示し、また説明文書や同意書を配置した。これまでの登録者数は12名。本年度は新規登録者はおられなかった。
(2) 本年度はドナー登録者の死亡例はなかった。
(3) 事業推進体制の整備を行った。すなわち、①遺体搬送費と剖検費は本分担研究費で充当する。②遺体搬送に関する葬儀社との連携：解剖室設備のない病院や施設あるいは自宅で亡くなられた場合、ご遺体を新潟大学病院にお運びし解剖を行う体制を確認した。③臨床立会医に謝金が出せるようにした。④死亡された際の状況によっては、死体検案書が必要であることを確認した。

【考察】
(1) 連絡体制の整備：ドナー登録者のご意志をいつでも確実に実行に移す連絡体制の整備は、特に重要な課題である。本研究開発費事業主体：NCNP の事務局が対応に当たることは有効な体制である。
(2) 情報提供体制の整備：ドナー登録者に対する継続的な情報提供、剖検実施遺族に対する報告や継続的な情報提供を行う必要がある。患者団体等での啓蒙活動は、デリケートな面があり、容易ではない。状況が許す様であればこうした活動を継続し、新潟地域でも登録者を増やす様に努めたい。
(3) 患者会での講演や啓発活動は、実際には難しい。神経難病患者の治療を行なっている基幹病院の責任者、県難病対策課とも協議し、当該患者さんやご家族様に本事業の趣旨を無理なく知って頂くにはどうしたら良いか、本研究班全体で更に協議を進める必要がある。

【結論】
生前同意登録（ドナー登録）制に基づくナショナル・ブレインバンク・ネットワーク構築を目的とした本研究開発費事業（NCNP ブレインバンク）の新潟地域拠点として、事業を推進した。

30-8「NCNP ブレインバンクの運営および生前登録システムの推進」

（分担課題名）名古屋地区における神経・精神疾患の研究資源蓄積のためのブレインバンク ネットワーク構築に関する研究

分担研究者
所属　愛知医科大学加齢医科学研究所
職名　教授　　氏名　吉田眞理

【緒言】

神経・精神疾患の分子細胞生物学レベルの病態解明および治療法開発研究に疾患脳を広く活用できるようにすることを目的とし、名古屋地区において生前に献脳の意思を表明し登録していただいた神経疾患の剖検を行い、病理診断を行うとともに新鮮凍結脳を愛知医科大学加齢医科学研究所に蓄積することを3年間の研究目標とする。

本研究では以下の活動を行う。

1) 生前同意登録システムが構築された愛知医科大および名古屋大学神経内科と連携し生前登録（ドナー登録）を推進する.

2) 関連病院においても生前同意登録システムを広く啓発して推進を図る。

3) 剖検体制の整備をはかる。

【方法】

生前登録は、2017 年に「神経疾患における剖検の生前同意登録システム（神経疾患ブレインバンク)」として愛知医科大学医学部倫理委員会の承認をえた。

生前登録の患者さんの死亡時に連絡をいただき、愛知医科大学に搬送して病理解剖を行い、半脳を凍結保存し病理診断を行う。搬送費用は本研究班の費用から拠出され、親族の負担はない。病理診断は臨床主治医を通じて家族に説明される。

【結果】

1) 2019 年度生前登録数と剖検実施

2019 年度の生前同意登録者は 8 例、内訳は、臨床診断プリオン病が 2 例、脳血管障害が 1 例、進行性核上性麻痺が 2 例、大脳皮質基底核変性症候群 1 例、前頭側頭型認知症 1 例、遺伝性脊髄小脳変性症 1 例であった。病理解剖例は、2019 年度は 4 例で、プリオン病、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症候群、前頭側頭型認知症各 1 例であった。いずれの症例も愛知県下に在住で、死亡の連絡、剖検の承諾、移送は円滑に行われた。

2) 啓発活動

関連病院から介護施設への退院時に生前登録が行われ、その後病理解剖になる例が 2 例あった。関連病院での生前登録が有効に活用されていることから、今後も関連病院での啓発を推進する。

3) 剖検体制の整備

剖検体制は令和元年度はスタッフ 6 名、大学院生 4 名と人員増員により充実した体制となった。NCNP の財源支援により超低温槽が補充された。

4) 病理解剖の報告

病理診断は主治医に報告するが、介護施設の嘱託医は神経疾患の非専門家が多く、親族の希望で病理担当医が説明する場合がある。

【考察】

関連病院からの登録例では臨床経過、画像所見などの情報が豊富にあるため、病理所見と対比する上で大変有用である。

生前同意登録ブレインバンクのシステムの維持には、人員の確保、搬送費用の補填、超低温槽の補充、正確な病理診断のための消耗品の財源の補助が不可欠である。

【結論】

生前登録システムは関連病院を通じて徐々に登録症例の増加、剖検の増加に繋がっている。今後、さらに関連病院での啓発をすすめ本制度の有効活用を図りたい。

【参考文献】

30-8「NCNPブレインバンクの運営および生前登録システムの推進」

（分担課題名）精神疾患・認知症疾患・神経疾患の剖検脳組織蓄積と臨床病理学的研究および精神疾患の死後脳リソース増加に向けた検討

分担研究者
所属　公益財団法人慈圭会慈圭病院・慈圭会精神医学研究所
職名　客員研究員　氏名　横田　修

【緒言】

精神・神経疾患の治療法開発には病理学的，生化学的に高品質の試料と倫理面の裏付けが必要である．このため，本邦で精神疾患について高品質な病理研究試料を提供できるブレインバンクに必要な知見を得る事を目的として以下の検討を行った．

【方法】

行った取り組みと検討は以下の通りである．(1)剖検の実施，(2)試料管理の高品質化と診断の標準化の取り組み，(3)試料提供の実施，(4)中四国地方の生前同意登録患者や剖検希望症例の搬送剖検の実践的検討，(5)主に中四国地方における精神科医，コメディカル，一般市民への生前同意登録や実務の広報活動を行う事，(6)NCNPブレインバンクの維持のために次世代の医師と技師の育成を行う事，(7)研究の遂行に必要な倫理面の整備を継続する．

【結果】

(1)剖検：10例の病理解剖を行った．臨床診断は前頭側頭葉変性症(FTLD)，レビー小体型認知症，筋萎縮性側索硬化症(ALS)，統合失調症，分類不能の認知症，パーキンソン病(PD)，頭部外傷後遺症などであった．(2)試料管理の高品質化と診断の標準化：タウ，TDP43の生化学的特性の確認を東京都医学総合研究所長谷川成人先生に依頼して適宜行っている．凍結試料の切り出しには研究費で購入した安全キャビネットを使用している．神経病理学会，認知症学会，老年精神医学会への症例呈示を活用して専門家と診断に関する意見交換を行っている．病理学的中央診断を行うため皮質基底核変性症(CBD)について倫理承認を得た．(3)試料提供：現在8件の研究に対して試料提供を行っている．対象疾患はCBD，FUS陽性封入体を有するFTLD(好塩基性封入体病)，FUS遺伝子変異を有するALS，SOD1遺伝子変異を有するALS，PS-1変異とcotton wool plaqueを有するアルツハイマー病(AD)，多系統萎縮症，孤発性ADである．(4)中四国地方の生前同意登録患者や剖検希望症例の搬送剖検：今年度は搬送剖検が3例あった．診断はALS，統合失調症，PDであった．(5)ブレインバンクや生前同意登録に関する啓発活動：一般市民向け講演を5回，医師向けを6回行った．(6)次世代の医師と技師育成：大学院生1名と技師1名を教育中である．(7)倫理面整備：中央診断目的での試料の移動について倫理審査を申請し承認を得た．

【考察】

神経病理学的評価を行って試料蓄積を行う大学精神科や精神科病院は現在国内海外を問わず稀である．本研究開発の実施により，精神科施設で試料蓄積を行う際に必要となる病理学的評価，生化学的高品質化の方法，倫理整備に関する知見を蓄積できる．これは本邦における精神・神経研究の水準を向上させるのに必須の知見と考えられる．

【結論】

精神医学・神経科学領域の高品質リソース基盤構築の在り方に関する知見の蓄積を継続することは，将来の本邦における研究水準の向上に寄与すると考えられた．

【参考文献】

なし．

30-8「NCNP ブレインバンクの運営および生前登録システムの推進」

（分担課題名）小児精神・神経疾患の研究資源蓄積・活用のためのブレインバンクネットワーク構築に関する研究

分担研究者：
所属　大阪大学大学院　連合小児発達学研究科
職名　教授
氏名　谷池雅子

【緒言】

神経・精神疾患の研究資源としてブレインバンクは現在成人のみを対象としているため、ブレインバンク登録の小児への拡大が望まれている。これを実現するシステムを構築するのが当研究の目標である。

そのため研究機関で保存されている小児脳標本を現行のブレインバンク・データベースに組み込むこと、また新たに取得した脳標本のバンク登録システムを整えることで、小児死後脳の研究リソースを確立させるねらいである。

【方法】

小児脳標本を多数有している大阪府立母子保健総合医療センター病理部の研究協力を得て、母子センターの病理検体登録システムをブレインバンクとリンク可能なデータベースに更新した。また保管されている脳標本の状態を確認して整理し、順次新しい病理検体データベースに情報を更新している。また新たに取得した脳標本の追加登録も行った。

今後新たに病理解剖を行う場合には、検体取得の段階から遺族の同意を得てブレインバンク登録を行うことを可能にするためには、施設の倫理委員会の承認を得る必要がある。

【結果】

1998 年から 2017 年に脳解剖を実施したうち、パラフィンブロック標本が残っている症例を 331 例確認した。内訳は胎児症例 215 例、新生児 66 例、乳児 21 例、10 歳未満 21 例、10 才以上 8 例で、胎児症例では脳奇形・水頭症・染色体異常・無脳症など、生後では脳出血・脳症・SIDS・脳感染症などが主たる病名であった。凍結標本がある症例は 13 例のみであった。

2018 年から 2019 年には新たに 8 例の開頭症例が追加された。内訳は胎児症例 7 例、新生児 1 例で、胎児症例は染色体異常・奇形症候群・子宮内感染症で後者 2 例の凍結標本を取得している。新生児は心奇形による肺高血圧症であった。

新たに取得する脳検体のブレインバンク登録についての倫理申請作業は滞っている。

【考察】

引き続き標本の確認作業を進めながら順次新病理検体データベースへの登録情報更新を実施する。凍結標本はわずかしかなく、リソースの乏しさを再認識した。新たな検体のブレインバンク登録に関する倫理申請も施設内での手続きが進まず、難しさを感じる。

【結論】

大阪府立母子総合医療センターとの連携により、既存検体の小児のブレインバンク登録の準備が整ってきたが、症例に偏りがあり、研究利用可能な検体はわずかである。今後新たに開頭も含めた病理解剖の同意が得られた場合には、脳標本のブレインバンク登録への同意も併せて取得できるよう、倫理審査申請を勧めていかねばならない。のちには、その他の小児医療・研究機関とも連携を進め、小児死後脳の研究リソースを拡大していく方針である。将来的には小児神経疾患の患者と保護者のコミュニティーに対し制度の周知を図り、米国 Autism Brain Net のように、生前同意に枠を広げたい。

【参考文献】

Autism Brain Net Home Page
https://www.sfari.org/resource/autism-brainnet/
（2020 年 6 月 12 日閲覧）

30-8「NCNP ブレインバンクの運営および生前登録システムの推進」

（分担課題名）精神・神経疾患バイオバンクの倫理に関する研究

分担研究者
所属　東京大学医科学研究所
職名　准教授　　氏名　井上悠輔

【緒言】

本研究は、NCNP のブレインバンクにおける試料（主に剖検試料）と情報の統合的管理と利活用推進を行う観点から、法・倫理の側面について検討を行うものである。バンクが多様な研究活動の基盤として科学的妥当性をもって機能するためには、関連する医療機関との連携が果たされ、試料本体の他、情報が適切に供給される仕組みが確保されること、そしてそれらが適正に管理され、ユーザーに供給される仕組みが整備されていることが不可欠である。一方、これらの前提となる事前の承諾のあり方も重要である。社会・倫理的に妥当で安定した活動の展開のために、法・倫理的な論点を特定・抽出し、対応策を研究者および関係者との協議のもとに検討する。

【方法】

試料・情報のバンクの構築から管理、運営に至る一連の流れ、そしてこれらに関する患者・当事者との関係性の構築に関する諸活動が、社会・倫理的に妥当で安定した活動の展開のために、論点を特定・抽出し、対応策を研究者および関係者との協議において検討することが本研究の目的である。これらは当該事業が研究基盤として安定的に機能するうえで不可欠な作業である。このうち本研究では、剖検試料の研究転用を中心とし、諸学会の方針と行政倫理指針の対応について検討する。とりわけ、2019 年度は国の倫理指針改正をめぐる議論があったため、こうした議論と学会指針との関係について検討した。

【結果】

大きく 2 点指摘されうる。まず、今回の指針改正について、全体として主原則の変更はない見込みである。もう一点は、とはいえ、新たに盛り込まれた「一括審査の原則化」は注目に値する。多施設共同研究時の審査形態の変化を考慮して、現状の神経病理学会・生物学的精神医学会「ブレインバンク倫理指針」の機関審査原則（各機関で審査をすることが基本となっている）を変更するべきかどうか、検討が求められるだろう。

【考察】

指針の要件がめまぐるしく変わるが、ブレインバンクはそれ自体がこれらの議論の中で主論点となってきたとはいえない。こうした動きに学会指針も対応していく必要がある一方、ブレインバンクにおける死者資料をめぐる指針での位置づけが明確でない点はもどかしい。学会指針自体の実効性と共に、遺体研究自体の議論としての認知度向上も重要である。

【結論】

2020 年度はゲノム指針の全部改正が実施される年である。とりわけ一括審査をバンクに関連するどの箇所に採用するか、またはしないのか、個別に検討する作業が発生する。死体解剖保存法の規定を考慮すれば、共同研究の枠組みを安易に外すことは難しいと思われるが、審査プロセスの効率化・簡略化はバンク機能の運営上、一層重要な課題である。

【参考文献】

井上 悠輔、患者情報の利活用と同意の限界 「オプトアウト」をどう考えるか、病院 78(11) 831 - 836 2019 年 11 月

30-8「NCNPブレインバンクの運営および生前登録システムの推進」

（分担課題名）精神疾患ブレインバンクの推進

分担研究者
所属　国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所 児童・予防精神医学研究部
職名 部長　氏名　住吉 太幹
所属　国立精神・神経医療研究センター病院
第二精神診療部
職名 レジデント　氏名　山田 悠至

【緒言】

精神疾患の病態解明や根治的治療法の開発には、ヒト脳を用いた研究が重要である。特に、患者死後脳のリソース構築により、これまで生前に間接的な手法により推定されてきた脳内の生物学的変化を、直接測定できるシステムの基盤を作ることができる。精神疾患を対象としたブレインバンクの数は本邦では少ないため、死後脳研究は欧米のブレインバンクに依存する場合が多い。このような現状の打開には、人種差の影響を受けない日本人の死後脳リソースの構築が急務である。

以上の背景から、本研究はNCNPブレインバンクへの精神疾患患者死後脳リソースの蓄積を促進することを目的とする。

【方法】

「幅広い疾患の質の高い剖検脳リソースの構築を本邦で行う」ことを目的とした、NCNPブレインバンク事業の一環として、精神疾患患者からの検体収集を促進する活動を実施した。具体的には、すでに構築されている神経疾患ブレインバンクを参考に、生前同意登録を開始した。本年度は特に、統合失調症および双極性障害の死後脳における蛋白質の発現異常に関する報告（【参考文献】参照）のレビューを行った。

【結果】

両疾患に共通する所見として、1) 海馬における reelin, BDNF, complexin 1,2, parvalbumin, glucocorticoid receptor, serotonin2A receptor の発現低下、2) 前頭前皮質における reelin, Hormer1, APP の発現低下、3) 前部帯状回における calbindin, CREB の発現低下が報告されていた（【参考文献】参照）。

【考察】

以上の所見は、統合失調症圏および気分障害圏疾患の病因の少なくとも一部における、共通する神経生物学的なメカニズムの存在を示唆する(Yamada et al. *Curr Pharm Des*. 2020)。

【結論】

患者死後脳リソースを収集するシステムの構築の重要性の啓発に関する報告を、国際誌に発信した。以上のような活動は、精神疾患の根治的治療法の開発を促進すると考えられる。

【参考文献】

1. Goldsmith DR, et al. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Mol Psychiatry.* 2016; 21(12):1696-1709.
2. Misiak B, et al. Cytokines and C-reactive protein alterations with respect to cognitive impairment in schizophrenia and bipolar disorder: A systematic review. *Schizophr Res.* 2018; 192:16-29.
3. Gray LJ , et al. Region and diagnosis-specific changes in synaptic proteins in schizophrenia and bipolar I disorder. *Psychiatry Res*. 2010; 178(2):374-80.
4. Ren X, et al. Alteration of cyclic-AMP response element binding protein in the postmortem brain of subjects with bipolar disorder and schizophrenia. *J Affect Disord*. 2014; 152-154:326-33.
5. Folsom TD, et al. Protein expression of targets of the FMRP regulon is altered in brains of subjects with schizophrenia and mood disorders. *Schizophr Res*. 2015; 165(2-3):201-11.
6. Leber SL, et al. Homer1a protein expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. *J Neural Transm*. 2017; 124(10):1261-1273.
7. Torrey EF, et al.Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. *Biol Psychiatry*. 2005; 57(3):252-60.
8. Novikova SI, et al. Identification of protein biomarkers for schizophrenia and bipolar disorder in the postmortem prefrontal cortex using SELDI-TOF-MS ProteinChip profiling combined with MALDI-TOF-PSD-MS analysis. *Neurobiol Dis*. 2006; 23(1):61-76.

様式 24-2

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設　国立精神神経医療研究センター

氏　名　齊藤祐子

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
Chronic sarcoid myopathy mimicking sporadic inclusion body myositis.	Clin Neurol Neurosurg	182	2019.05
Microglia express TMEM119 in the brains of Nasu-Hakola disease.	Intractable Rare Dis Res	8(4)	2019.11
Altered immunoreactivity of ErbB4, a causative gene product for ALS19, in the spinal cord of patients with sporadic ALS.	Neuropathology	39(4)	2019.08
Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease.	Nat Genet	51(8)	2019
Minimal amount of tissue-based	Psychiatry Clin	73(9)	2019.09

pH measurement to improve quality control in neuropsychiatric post-mortem brain	Neurosci.		
LATE to the PART-y	Brain	142(9)	2019.09
Corticobasal degeneration with deep white matter lesion diagnosed by brain biopsy	Neuropathology	40(3)	2020.01
Colocalization of BRCA1 with Tau Aggregates in Human Tauopathies.	Brain Sci.	10(1)	2019.12

（注）１．当該研究費による研究成果の刊行のみを記載すること

２．分担研究者毎に作成すること

３．刊行なしの場合は下欄に「なし」と記入する

４．論文の写しを１部提出すること（主任研究者にて保管）

様式 24-2

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設　東京都健康長寿医療センター

氏　　名　村山　繁雄

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
Tau and TDP-43 accumulation of the basal nucleus of Meynert in individuals with cerebral lobar infarcts or hemorrhage.	Acta Neuropathologica Communications.	7	2019
Rapidly progressive miliary brain metastasis of lung cancer after EGFR tyrosine kinase inhibitor discontinuation: An autopsy report.	Neuropathology.	39	2019
Amyotrophic lateral sclerosis of long clinical course clinically presenting with progressive muscular atrophy.	Neuropathology.	39	2019
Limbic-predominant Age-related TDP-43 Encephalopathy (LATE):	Brain.	142	2019

Consensus Working Group Report.			

（注）１．当該研究費による研究成果の刊行のみを記載すること

２．分担研究者毎に作成すること

３．刊行なしの場合は下欄に「なし」と記入する

４．論文の写しを１部提出すること（主任研究者にて保管）

様式 24-2

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 新潟大学 脳研究所

氏　　名 柿田 明美

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
Identification of VGF nerve growth factor inducible-producing cells in human spinal cords and expression change in patients with amyotrophic lateral sclerosis.	Int J Med Sci	17・4	2020/2
Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal TREM2-dependent and -independent cellular responses in Alzheimer's disease.	Nat Med	26・1	2020/1
Epigenome-wide association study of narcolepsy-affected lateral hypothalamic brain and overlapping DNA methylation profiles between narcolepsy and multiple sclerosis.	Sleep	43・1	2020/1
Excess hydrogen sulfide and polysulfides production underlies a schizophrenia pathophysiology.	EMBO Mol Med	11・12	2019/12
Phosphorylated NUB1 distinguishes α-synuclein in Lewy bodies from that in glial cytoplasmic inclusions of multiple system atrophy.	Brain Pathology	29・6	2019/11
Phosphorylated TDP-43 aggregates in skeletal and cardiac muscles are not a marker of myogenic degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and various conditions.	Acta Neuropathol Commun	7・1	2019/10
Differential protein expression of DARPP-32 versus Calcineurin in the prefrontal cortex and nucleus accumbens in schizophrenia and bipolar disorder.	Sci Rep	9・1	2019/10
G3BP1 inhibits ubiquitinated protein aggregations by interacting with p62 and USP10.	Sci Rep	9・1	2019/9

A minimal amount of tissue-based pH measurement to improve quality control in neuropsychiatryic postmortem brain studies.	Psychiatry Clin Neurosci	73・9	2019/9
Immunoreactivity of myelin-associated oligodendrocytic basic protein in Lewy bodies.	Neuropathology	39・4	2019/8
USP10 is a critical factor for tau-positive stress granule formation in neuronal cells.	Sci Rep	9・1	2019/7
Investigation of betaine as a novel psychotherapyeutic for schizophrenia.	EBioMedicine	45	2019/7

（注）１．当該研究費による研究成果の刊行のみを記載すること

２．分担研究者毎に作成すること

３．刊行なしの場合は下欄に「なし」と記入する

４．論文の写しを１部提出すること（主任研究者にて保管）

様式 24-2

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 愛知医科大学加齢医科学研究所

氏　　名 吉田眞理

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
1. Autopsy case of MV2K-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with spongiform changes of the cerebral cortex.	Neuropathology	Epub ahead of print	2019 Sep
2. Chameleons and mimics: Progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration.	Neuropathology	Epub ahead of print	2019 Sep
3. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease.	Nat Genet	51(8):1215-1221	2019 Aug
4. Clinicopathological differences between the motor onset and psychiatric onset of Huntington's disease, focusing on the nucleus accumbens.	Neuropathology	39(5):331-341	2019 Oct
5. Autopsied case with MERRF/MELAS overlap syndrome accompanied by	Neuropathology	39(3):212-217	2019 Jun

	stroke-like episodes localized to the precentral gyrus.			
6.	Degenerative inferior olivary nucleus and medullary tegmentum produced the characteristic magnetic resonance imaging signs in Alexander disease: A case report.	J Neurol Sci	403:159-161	2019 Aug
7.	Intracranial vascular calcification with extensive white matter changes in an autopsy case of pseudopseudohypoparathyroidism.	Neuropathology.	39(1):39-46	2019 Feb

（注）１．当該研究費による研究成果の刊行のみを記載すること

２．分担研究者毎に作成すること

３．刊行なしの場合は下欄に「なし」と記入する

４．論文の写しを１部提出すること（主任研究者にて保管）

様式 24-2

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設　慈圭病院(客員研究員)

氏　　名　横田　修

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
Miki T, Yokota O, Haraguchi T, Ikeuchi T, Zhu B, Takenoshita S, Terada S, Yamada N. Young adult-onset, very slowly progressive cognitive decline with spastic paraparesis in Alzheimer's disease with cotton wool plaques due to a novel presenilin1 G417S mutation.	Acta Neuropathologica Communications	7(1): 19 (doi: 10.1186/s40478-019-0672-z)	2019 年 1 月

(注) 1. 当該研究費による研究成果の刊行のみを記載すること

2. 分担研究者毎に作成すること

3. 刊行なしの場合は下欄に「なし」と記入する

4. 論文の写しを１部提出すること（主任研究者にて保管）

様式 24-2

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 大阪大学連合小児発達学研究科

氏　　名 谷池　雅子

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
なし			

（注）１．当該研究費による研究成果の刊行のみを記載すること

２．分担研究者毎に作成すること

３．刊行なしの場合は下欄に「なし」と記入する

４．論文の写しを１部提出すること（主任研究者にて保管）

様式 24-2

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設　東京大学医科学研究所

氏　　名　井上　悠輔

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
患者情報の利活用と同意の限界　「オプトアウト」をどう考えるか	病院	78 巻 11 号	2019 年 11 月
人試料を用いる科学研究バイオバンクと「約束」のあり方	科学技術社会論研究	17 号	2019 年 4 月

（注）１．当該研究費による研究成果の刊行のみを記載すること

２．分担研究者毎に作成すること

３．刊行なしの場合は下欄に「なし」と記入する

４．論文の写しを１部提出すること（主任研究者にて保管）

様式 24-2

研究成果の刊行に関する一覧表

所属施設 国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所 児童・予防精神医学研究部

氏　　名 住吉 太幹

論　文　題　名	雑誌名・書　名	巻・号	年　月
Specificity and continuity of schizophrenia and bipolar disorder: Relation to biomarkers.	*Curr Pharm Des.*	26(2)	2020. 2
Cognitive enhancement in schizophrenia by buspirone: Role of serotonin(1A) receptor agonism	*Schizophr Res*	215	2020.1

（注）１．当該研究費による研究成果の刊行のみを記載すること

２．分担研究者毎に作成すること

３．刊行なしの場合は下欄に「なし」と記入する

４．論文の写しを１部提出すること（主任研究者にて保管）

30-8

Management of NCNP Brain Bank and Promotion of Pre-Own Registration System

Yuko Saito

National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo

1. Aim of this study

To develop a neurologic brain bank and construct the National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP) Brain Bank, a mental and neurological brain bank at the NCNP, a national medical center. We aim to contribute to the development of Japanese medical care by accumulating quantities of high-quality postmortem brain resources in psychiatric and neurological diseases, and using them for clinical reduction, research, and education. By incorporating a pre-registration system where possible, we will improve both the quantity and quality of resources, supporting the aspirations of those who utilize the Brain Bank.

2. Members of the research group

Principal Investigator:

Yuko Saito	National Center Hosp. for Neurology and Psychiatry (NCNP), Dept. of Pathology and Lab. Med.

Members:

Akiyoshi Kakita	Brain Research Institute-Niigata Univ., Dept. of Pathology
Mari Yoshida	Institute for Medical Science of Aging-Aichi Medical Univ., Dept. of Neuropathology
Shigeo. Murayama	Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institution of Gerontology, Dept. of Neuropathology
Osamu Yokota	Okayama Univ. Graduate School of Medicine-Dentistry and Pharmaceutical Sciences
Masako Taniike	Osaka Univ. Department of Pediatric Neurology
Tomiki Sumiyoshi	NIMH, NCNP, Dept. of Preventive and Intervention for Psychiatric Disorders

Yusuke Inoue Institute of Medical Science-The Univ. of the Tokyo, Dept. of Public Policy

3. Result of study and future plan

Collaboration with shared facilities and collaborative research facilities has led to the development of Brain Banks, based on a life consent system. This year, there were 24 new registrations, for a total of 338 cases. It has been increasing steadily since September 2007. There are 67 autopsies, and the autopsy rate is about 85%. It has become clear that a large number of citizens are interested in Brain Bank registration in Japan as well. However, while this system promotes research studies, it does not provide autopsy facilities and does not support future research ambitions in Hokkaido, Shikoku, and Kyushu areas. In addition, the applicants for life registration have a strong desire to participate in the research through activities, and to further promote the collaboration with Biobank to improve the quality of both resources. There are 11 autopsy cases registered in the biobank, and this number is increasing.

We have just begun a registry for mental illness, and there are many registration applicants who read HP or NCNP's in-hospital postings and have inquired about the registry, but we would like to proceed with registration carefully. This fiscal year, we will develop the ethical aspects of joint research with for-profit companies, and will continue to develop our business while ensuring that ethical aspects are maintained.

The number of registrants has increased, and association with biobanks has been completed. Achievements are also starting to appear.s Financing of funds and human resources is the most important issue.

30-9 ゲノム編集技術を用いたモデル動物作出による精神神経筋疾患の病態解明

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター
星野　幹雄

総括研究報告

1.研究目的

CRISPR/Cas9 システムに代表される簡便なゲノム編集技術の登場で、動物個体への遺伝子欠損・変異導入が従来よりも遥かに迅速・安価・高効率で実現可能となり、疾患動物モデル作出に対するハードルは低下した。本研究課題では NCNP 内で独自に導入・醸成されたこれら有用技術とバイオリソース・バンク、マウス行動解析ツールなどを各研究部で共有するプラットホームを立ち上げ、数多くの疾患モデルを体系的に作出・解析する事から各種精神神経筋疾患の統合的な病態解明をめざし、それら診断、治療法の開発につなげることを目的とする。具体的には、まずバイオリソースから見出した疾患型の遺伝子欠損・変異・重複などを各種動物ゲノムに導入し、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、てんかん、Rett 症候群などの各種精神疾患、ALS、パーキンソン病等の各種神経変性疾患、遺伝性筋疾患などの各種神経筋疾患の動物モデルを作出する。次に、得られたモデルを *in vitro*, *in vivo* で解析すると共に実際の疾患症例と照応することによって、各種疾患の病態を理解し、新規診断法の開発に努める。さらにこれら疾患モデルの症状改善に有効な薬剤の探索などを通して、新たな治療法の開発につなげる。

2.研究組織

主任研究者

星野　幹雄（国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・病態生化学研究部）

分担研究者

井上　高良（国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第六部）
野口　悟　（国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第一部）
山田 光彦　（国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所・精神薬理研究部）
株田　智弘（国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第四部）
若月　修二（国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第五部）
鈴木　友子（国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部）
青木　吉嗣（国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究）
大木 伸司（国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・免疫研究部）
飯田 有俊（国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・MGC 臨床ゲノム解析部）
村松里衣子（国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・神経薬理研究部）
永井　義隆（大阪大学大学院医学系研究科 神経難病認知症探索治療学寄附講座）
中島　欽一（九州大学大学院医学研究院　応用幹細胞医科学部門）
内匠　透　　（神戸大学大学院医学研究科）
山田　真弓　（京都大学大学院生命科学研究科）
大川　恭行　（九州大学 生体防御医学研究所）

研究協力者

国立精神・神経医療研究センター・神経研究所

（病態生化学研究部）

田谷　真一郎・ 堀　啓・大輪　智雄・有村　奈利子・ 江草　早紀・ 嶋岡　可純・宮下　聡・橋詰　晃一・山下　真梨子・足立　透真・白石　椋

（疾病研究第一部）

大久保　真理子・林　晋一郎・井上　道雄・斎藤良彦

（疾病研究第四部）

株田　千華・藤原　悠紀

（疾病研究第五部）

荒木　敏之・大野　萌馨

（疾病研究第六部）

井上　由紀子・平賀　孔

（免疫研究部）
Ben Raveney・張　晨阳・Yosif El-darawish・佐藤和貴郎・蓑手　美彩子
（遺伝子疾患治療研究部）
野上　健一郎・原　裕子
（MGC）
後藤　雄一・小笠原　真志
国立精神神経医療研究センター・精神保健研究所
（精神薬理研究部）
三輪　秀樹・古家　宏樹・國石　洋・小林　桃子
大阪大学大学院医学系研究員
武内　敏秀・上山　盛夫・Lo Piccolo,Luca・田港朝也
東京都医学総合研究所
鈴木　マリ
九州大学大学院医学研究院
中嶋　秀行
京都大学大学院生命科学研究科
今吉　格

３.研究成果

1.バイオリソース・技術開発研究

(1)公共データベースより RNAseq 等のビッグデータを集積し、新たな研究標的を見出すことを可能とする解析プラットフォームの構築を行った（星野）。(2)CRISPR/Cas9 に基づくゲノム編集技術や細菌人工染色体（BAC）改変・修飾技術を用いた疾患モデル動物の作出（令和元年度は 37 系統の樹立を完遂）や解析基盤（動物棟改修に伴うマウス行動解析区画の整備も含む）のアップデートを推進した（井上高）。(3)NCNP の各種バイオリソースを利活用し精神・神経筋疾患の新規原因遺伝子単離とそれら病態カスケードの解明を目指した網羅的解析を進め、新規病因性バリアントを見出した（飯田）。(4)ごく少数の細胞集団からエピゲノムプロファイルングを行う画期的手法を開発し、骨格筋幹細胞や神経系の機能獲得に関わるクロマチン構造動態の体系的解明を行った（大川）。

2. 精神疾患研究

(5) 精神疾患関連遺伝子 AUTS2 およびイハラてんかんラットの原因遺伝子 DSCAML1 の各種疾患型変異導入マウスを用いた解析（星野）、(6) 統合失調症の GABA 仮説に基づく各種モデルマウス作出を新規医薬品・医療機器開発のための非臨床試験につなげる研究と NCNP 動物棟内のマウス行動解析バッテリーの再整備に向けた検討（山田光）、(7) オートファジーによる RNA/DNA 分解系関連遺伝子を破壊したマウス個体の病理解明（株田）、(8)MeCP2 の標的 miRNA 発現を操作したマウスの解析に基づく Rett 症候群病理の解明（中島）、(9) ヒトゲノム解析から得られた新規自閉症関連遺伝子変異をマウスに導入して病態を解析する研究（内匠）、をそれぞれ推進し、有益な結果が蓄積されつつある。

3. 神経疾患研究

(10)リボヌクレオ蛋白複合体 Vault の神経細胞における機能解析などを通して神経回路の形成と維持、変容の分子基盤に迫る基礎研究（若月）、(11) 免疫応答異常で引き起こされる中枢神経系の難治性疾患のうち自己反応性 T 細胞が関わる病態マウスモデルの作出とその診断・治療法の開発（大木）、(12)神経回路を修復するメカニズムの探索から神経変性疾患の新規治療薬剤開発を行う研究（村松）、(13) ショウジョウバエにおけるゲノム編集技術の開発と、それを用いたポリグルタミン病発症の病理解明を目指す研究（永井）、(14)マウス成体脳における神経細胞新生を支える分子カスケードの解明から新生過程を外因性に制御可能なシステムの開発をめざす研究（山田真）、をそれぞれ行い、病態の解明につながるモデル動物も数多く得られた。

4. 筋疾患研究

(15)ゲノム編集技術により患者変異を再現したマウスを体系的に作出し、多様な遺伝性筋疾患の分子病態解明をめざすのと同時にそれらモデルを用いて新規治療法開発につなげる研究（野口）、(16) 生体内でジストロフィン遺伝子のエキソンスキッピングを可視化する遺伝子操作マウスを作出し、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）に対する核酸医薬の網羅的スクリーニングに応用する研究（青木）、(17)DMD 患者由来の iPS 細胞から分化させた筋肉の Ca^{2+}ハンドリング特性を明らかにし、細胞内 Ca^{2+}濃度を正常化して筋変性を抑える薬剤の探索を行う研究（鈴木）、を進めており、有用なモデル動物の作出を完遂した上で、臨床応用に向けた重要シーズが得られつつある。

令和元年 10 月 30 日　AP 東京八重洲通にて班会議開催

分担研究報告

（課題名）ゲノム編集による精神疾患動物モデルの作出とその解析
（所　属）国立精神・神経医療研究センター神経研究所　病態生化学研究部
（氏　名）星野　幹雄

緒言

*AUTS2*遺伝子および*DSCAML1*遺伝子（イハラてんかんラットの原因遺伝子）はさまざまな精神疾患に関与する可能性が示唆されている。本研究では、ゲノム編集技術を用いてげっ歯類モデルを作成し、これらの遺伝子・蛋白質の果たす役割とその破綻による疾患病理の解明に努める。

方法

(i)患者データベースから*DSCAML1*遺伝子の変異をスクリーニングし、同定された遺伝子変異(A2105T 変異D*scaml1*)と相同な変異を持つノックインマウスを作成、解析する。
(ii) *Auts2*の終脳・小脳特異的cKOマウスの表現型を解析する。特にシナプス形成について解析する。

結果と考察

(i) ゲノムシークエンスによりNCNPの発達障害を伴うてんかんデポジットリーから、DSCAML1遺伝子のSNPを30種類以上同定した。それぞれの細胞内局在、細胞接着能、神経突起伸長促進作用、等について調べた。先行して解析したのが、C末端側のアラニンがスレオニンへ置換されたA2105T型変異である。in vitro解析から、この変異がDSCAML1のコンフォーメーション異常を引き起こし、結果として細胞膜へ局在できなくなり、機能を失うことを明らかにした。また相同変異を持つノックインマウスを作成し解析したところ、イハラてんかんラットと同様な表現型を示すことがわかったので、この変異がヒトてんかん症例の原因となっていることが確定した。
(ii)Auts2遺伝子のノックアウトマウスでは、シナプスの数も入力も共に興奮性>抑制性となること、その結果として脳の興奮性が上昇する(cFos陽性細胞の増加)ことが観察された。このことから、AUTS2遺伝子に異常をきたした精神疾患患者では、E/Iバランスが崩れて各種症状をが引き起こされている可能性が示唆された（Hori et al, ***iScience*, 2020)。**

小脳特異的cKOマウスの解析から、AUTS2が小脳プルキンエ細胞の成熟と、登上繊維シナプス、平行線維シナプスの発生に関与することを見出した（Yamashiro et al,リバイズ実験中）

結論

DSCAML1遺伝子の異常によって引き起こされるヒトてんかんを初めて同定した。AUTS2による興奮性シナプスの数の制御機構と、その破綻によるシナプス病態・精神疾患病理を明らかにした。

参考文献（業績）

1. Hori K et al, AUTS2 regulation of synapses for proper synaptic inputs and social communication. *iScience*, 2020;23:101183.
2. Arimura N et al, DSCAM regulates delamination of neurons in the developing midbrain. ***Science Advances***, in press

分担研究報告

（課題名）CRISPR/Cas9 および BAC システムを用いた病態モデルマウスの作出
（所　属）国立精神・神経医療研究センター神経研究所　疾病研究第六部
（氏　名）井上　高良

緒言

精神・神経疾患に関わる網羅的ゲノム・エピゲノム情報の蓄積は近年飛躍的に進んだ一方、ゲノムの 9 割以上を占める遺伝子非コード領域の機能理解については解析技術基盤が未熟なため大きく立ち後れている。本研究では遺伝子非コード領域に多数存在するゲノム欠失変異や SNP の機能的意義を、独自に醸成した細菌人工染色体（BAC）システムや CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術によって体系的に究明することを目的とする。

方法

シナプス接着分子クラシックカドヘリン（Cdh）をはじめとした自閉症スペクトラム障害(ASD)関連遺伝子に着目し、それら遺伝子群そのものの機能やそれら遺伝子非コード領域に多数存在する ASD 関連 common variant 群の意義について、申請者固有の BAC を解析単位とした手法や CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて多因子性に操作し、ASD の実状に即した病態モデリングを試みる。

結果

Cdh4/6/8/11 遺伝子を様々な組み合わせでノックアウトした個体を CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて作出することに成功し、初期脳・神経系構築過程に表現型を見出した（論文投稿中）。また CRISPR/Cas9 法によるノックインマウス作製技術に関する総説を執筆する（井上（上野）ら, 2019）とともに、同法を用いて Cdh その他の遺伝子発現を正確に可視化するエピトープタグノックインマウスを多数作出した（学会発表）。さらに BAC システムを利用して巨大遺伝子 *Cdh6/8* や *Autism susceptibility candidate gene 2* の非コード領域における転写制御機序を解析した。

考察

ASD に関連する分子群を同時に複数ノックアウトしたり、様々なタグノックインによってそれら発現動態を可視化したり、それら遺伝子発現制御ダイナミクスを体系的にスクリーニングしたりする技術が確立したことによって、これまで以上に非コード領域の機能理解が深まることが期待されるのに加え、複雑な ASD 病態を初めてモデリング可能とする解析基盤が整ったといえる。

結論

本研究によって得られた成果と申請者独自技術や新規開発手法を効率的に組み合わせることにより、多因子性 ASD の実態を反映した病態モデリングが今後著しく進展することが見込まれる。

参考文献（業績）

1.井上（上野）由紀子, 森本由起, 井上高良: クローニングフリーCRISPR/Cas9 法によるノックインマウス作製術. 生体の科学（医学書院）, Vol.70 No.4 pp 350-356, 2019 年 8 月 https://doi.org/10.11477/mf.2425201012

分担研究報告

（課題名）ゲノム編集技術を応用した遺伝性筋疾患の診断、病態解析、治療法開発
（所　属）国立精神・神経医療研究センター神経研究所　疾病研究第一部
（氏　名）野口　悟

緒言

これまで、劣性遺伝型脊髄小脳萎縮症の原因遺伝子として 24 遺伝子が単離され、それぞれの病態の特徴が解析され、発症に至るメカニズムの解明と治療法の開発が進められてきた。我々は、小脳萎縮、運動失調を呈する 2 家系 3 患者（劣性遺伝家系）の全エクソーム解析を行い、新規遺伝子 X に両アレル性の複合ヘテロ接合変異を同定した。この遺伝子は、これまでいかなる疾患への関連も報告されていないものであった。本研究の目的は、我々が見出した遺伝子変異が、脊髄小脳萎縮症の新規原因遺伝子となりうるのかを証明するとともに、遺伝子産物の機能異常からもたらされる病態メカニズムを明らかにすることである。この研究により、脊髄小脳萎縮症の新たな原因、発症メカニズムと治療標的が明らかとなることが期待される。

方法

マウス

前年度に作製した遺伝子 X 両アレル性変異複合ヘテロ接合性マウスを用いた。

Single cell RNA-seq (scRNA-seq)

6 日齢の遺伝子改変マウス、コントロールマウスの全小脳から単離した細胞群(ともに 3 個体由来)の scRNA-seq を行った。

RNA-seq

6 日齢の遺伝子改変マウス、コントロールマウス(ともに N=3)の全小脳を用い RNA-seq を行った。

6 日齢の遺伝子改変マウス、コントロールマウス(ともに N=1)の小脳切片から、組織ピッキング装置を用いてプルキニエ細胞を単離し、RNA-seq を行った。

scRNA-seq の解析は Cell ranger を、スプライシングの解析には MISO を用いた。

結果

scRNA-seq にて各細胞において発現変化（$|\log_2 FC| \geq 1$ ）があった遺伝子(Down DEGs, Up DEGs）を抽出した。その結果、プルキニエ細胞群で、最も多くの遺伝子の発現変化が認められた。パスウェイ解析の結果、細胞間シナプス伝達や細胞形態形成に関与する遺伝子が多く見出された。

単離プルキニエ細胞での RNA-seq にて異常スプライシングの検出を試みたが、十分なリードを得ることができなかった。

一方、全小脳の RNA-seq で、Down DEGs: 622 遺伝子、Up DEGs: 509 遺伝子が検出された。その中には小脳形成に重要な *Fgf8, Fgf2* 遺伝子なども含まれており、パスウェイ解析では胚発生や細胞移動に関与する遺伝子が多く含まれるという特徴が示された。

さらに、スプライシングの解析では 136 遺伝子で異常スプライシングが見出された。これらの遺伝子は細胞骨格、細胞周期、RNA メチル化など広範囲に影響を及ぼすものが含まれていた。

考察

遺伝子改変マウスの小脳では、多数の遺伝子のスプライシング変化とともに、小脳発生に重要な遺伝子の発現量の変化を認めた。scRNA-seq では、特にプルキンエ細胞群で、発現変化を示した遺伝子を多数認め、この変化がこのマウスの表現型と関係していることが推測される。

遺伝子 X 産物はスプライシング因子を核内に運ぶ輸送体であり、遺伝子 X の異常が広範なスプライシング異常を引き起こすことが推測されていたが、今回の結果はその仮説を裏付けるものであり、脊髄小脳萎縮症の病態メカニズムの中心的な役割を示すものと考えている。

結論

遺伝子 X の変異は小脳細胞の広範なスプライシング変化を引き起こし、脊髄小脳萎縮に至る。

参考文献

Okubo M, et al.: Exon skipping induced by nonsense/frameshift mutations in DMD gene results in Becker muscular dystrophy. Human Genetics. 139: 247-255, 2020.

分担研究報告

（課題名）ゲノム編集技術を用いたモデル動物の新規医薬品・医療機器開発のための非臨床試験への応用可能性の検討

（所　属）国立精神･神経医療研究センター精神保健研究所　精神薬理研究部

（氏　名）山田　光彦

緒言

本分担研究では、精神薬理研究部の三輪秀樹室長を中心に、ゲノム編集技術を用いたモデル動物の新規医薬品・医療機器開発のための非臨床試験への応用可能性について、統合失調症の GABA 仮説に基づく新規病態モデルマウスをツールとして検討している。

方法

統合失調症の GABA 仮説に基づく病態モデルについて、①表面妥当性、②構成概念妥当性、③治療的操作の予測妥当性の各妥当性について検討する。平成 31 年度は、視床網様核における GABA 伝達異常のノンレム睡眠スピンドル波発生への影響について検討を進めた。さらに、slow wave の特性解析を行った。

遺伝子組換え実験はおよび動物実験は国立精神・神経医療研究センター神経研究所組み換え DNA 実験安全倫理委員会、動物実験倫理委員会の承認を得て行っている。

結果

統合失調症の GABA 仮説に基づく新規病態モデルマウスの解析に向け、実験室及びテストバッテリー用行動実験室の準備を進めた。パルブアルブミン（PV）陽性特異的 GAD67（GABA 合成酵素の１つ）ノックアウトマウスはロタロッドによる運動学習障害を呈するが、このミュータントマウスの解剖・免疫組織化学的解析では、小脳の細胞層構造に目立った異常は認められておらず、バスケット細胞の軸索走行等の形成異常が関連していることを明らかにしている。さらに、海馬歯状回顆粒細胞が未成熟状態（成熟顆粒細胞マーカー であるカルビンディン陽性シグナルが減弱）であり、新生顆粒細胞の移動位置にも異常を観察している。また、GAD67 flox マウスの視床網様核に AAV-Cre をインジェクションすることによって作製される視床網様核特異的 GAD67 欠損マウスにおいて、スピンドル波発生密度の減少および持続時間の減少を観察している。slow wave の特性に関しては対照群と有意な差は観察されなかった。このような視床網様核の遺伝子操作をするに際して、現在はウィルスベクター を視床網様核にインジェクションしているが、実験の効率性・再現のばらつきなどを改善するため、本研究班員（疾病研究第 6 部井上高良室長ら）との共同研究により視床網様核特異的 Cre マウスの作製を進めている。

統合失調症の環境要因として、「ショ糖含有食の過剰摂取」が疫学的調査から明らかにされている。しかしながら、統合失調症の症状との関連性や統合失調症患者がコーピングとしてショ糖含有食を好んで摂取するのか、ショ糖含有食を好んで摂取することがトリガーとなり発症するのかは不明な点が多い。そこで、統合失調症関連遺伝子 glyoxalase1 ヘテロ欠損マウスを対象として、ショ糖食を摂取させたときに統合失調症様表現型を生じるかを解析した。その結果、パルブアルブミン陽性細胞の減少、オープンフィールド試験での過活動および新規物体認識時のガンマオシレーションパワーの異常など統合失調症様表現型を観察することができ、ショ糖含有食の過剰摂取は統合失調症発症の環境要因としてのリスクファクターである可能性を示唆することができた（Hirai S, Miwa H et al. bioRxiv, 2020）。

考察

これまで、精神疾患の病態を明らかにするためには、動物モデルが多大な貢献をしてきた。統合失調症死後脳解析から GABA 関連分子の異常が観察され、その中でもパルブアルブ

ミン陽性細胞において GABA 合成酵素である GAD67 の発現低下が報告されている。本研究では、既報(Fujiwara K, Miwa H, et al. Neuro-psychopharmacology, 2015) のさらなる詳細な解析を行っており、統合失調症との関連性を明らかにしようとするものである。統合失調症および双極性障害の患者脳において、海馬歯状回顆粒細胞の未成熟化が観察されており、本研究で解析した PV-GAD67 ノックアウトマウスにおいて、同様に海馬歯状回顆粒細胞の未成熟化が観察できたことから、統合失調症において「GABA 関連分子・シグナル」を標的とした臨床試験への応用研究が進展できる可能性がある複数の研究成果を得ることができたと考えている。

統合失調症陽性症状の「幻覚・幻聴」を評価できるモデル行動システムは確立されていない。また認知機能障害に関しても、その機能障害を寛解させる治療薬が開発途上にあることから、それを評価できる行動実験の確立も急務となっている。そのため、NCNP に既に備わっている各種の行動実験システムの効率化に加え、脳波や脳内電極を用いた電気生理学実験、機能イメージング実験等も同時に実施できる解析システムを確立する必要がある。そこで、行動下の細胞活動を計測するため、米国・MIT の Michael Halassa 博士との共同研究を開始し、in vivo 多点電極記録のシステムを導入し始めている。この計測システムを用いることで、より多くの情報を含む客観的な病態モデル解析が可能となるものと期待される。

結論

研究班のさらなる連携により、ゲノム編集技術を用いたモデル動物の新規医薬品・医療機器開発のための非臨床試験への応用研究の進展が強く期待される。

参考文献（業績）

Fujiwara K, Miwa H, et al. Glutamate Decarboxy- lase 67 Deficiency in a Subset of GABAergic Neurons Induces Schizophrenia-Related Pheno- types. *Neuropsychopharmacol* 40: 2475- 2486, 2015

Hirai S, Miwa H, et al. Brain Angiopathy and Impaired Glucose Metabolism in Model Mice with Psychiatric-Related Phenotypes. *bioRxiv*. https://doi.org/10.1101/2020.02.14.939546

分担研究報告

（課題名）リソソーム分解系の分子構造と疾患との関連
（所　属）国立精神・神経医療研究センター神経研究所　疾病研究第四部
（氏　名）株田　智弘

緒言

細胞内成分の適切な分解は神経細胞を含む多くの細胞・組織の恒常性維持に必須のプロセスである。神経細胞内のタンパク質や RNA の蓄積は神経変性疾患の原因となると考えられている。細胞内異常 RNA やタンパク質の分解促進をできれば、有効な治療法となり得ると期待されている。そのためには細胞内分解システムの理解が必要であるが、RNA 分解機構をはじめ細胞内分解機構に関しては未だ不明な点が多く残されている。我々は近年、新たな細胞内核酸分解システム RNautophagy/DNautophagy (RDA)を見いだした。また、リソソーム膜タンパク質 SIDT2 が、核酸のリソソーム内への輸送において重要な分子であることを見いだした。SIDT2 は、RNA transporter として知られる線虫 SID-1 の脊椎動物オルソログであることから、RDA において transporter として機能すると考えられる。本研究では、RDA のメカニズム解析を行うとともに、ゲノム編集技術などを用いて RDA の機能減弱動物や機能活性化動物を作製・解析する。以上により脳神経系における RDA の生理的役割を明らかにする。さらに、現在タンパク質を分解する新規経路も発見しており、この経路のメカニズムと生理的意義についても解明を目指す。

方法

昨年度までに、SIDT2 の細胞質側配列に直接核酸が結合し、SIDT2 と核酸の結合には選択性が存在することを見いだした。今回、SIDT2 と疾患原因 mRNA との核酸結合性及びその影響について解析した。疾患原因 mRNA としてはハンチントン病の原因である *HTT* mRNA を用いた。SIDT2 の細胞質側配列に GST を付加したタンパク質を精製し、変異型及び野生型 *HTT* mRNA は in vitro transcription により作製し、結合についてプルダウンアッセイにより解析した。さらに、SIDT2 の核酸結合モチーフ変異体についても同様にタンパク質精製を行い、核酸結合について解析を行った。また、SIDT2 及び変異型 HTT を培養細胞に発現させ、*HTT* mRNA の分解、HTT タンパク質の量や凝集への影響を、Tet-off システムによるチェイスアッセイや、フィルタートラップアッセイなどを用いて解析した。

結果

SIDT2 の細胞質側配列に直接 *HTT* mRNA が結合することを見いだした。また、この結合量は野生型 *HTT* より変異型で高く、CAG リピート依存的であることが示された。また、細胞レベルの実験では、*HTT* mRNA の分解が SIDT2 過剰発現で促進され、*HTT* mRNA は RNautophagy の基質となって分解された。さらに、SIDT2 の過剰発現により細胞内の変異型 HTT タンパク質の量を低減できることを明らかにし、その低減効果には SIDT2 と *HTT* mRNA の結合が重要であることを示した。

考察・結論

SIDT2 CD はハンチントン病原因遺伝子の *HTT* mRNA に、CAG リピート依存的に結合すること、*HTT* mRNA は RNautophagy の基質となること、SIDT2 の過剰発現により細胞内の変異型 HTT タンパク質の量を低減できることを明らかにした。RNautophagy は新たな治療法開発に利用できる可能性がある。

分担研究報告

（課題名）イオン恒常姓の破綻による精神・神経疾患発病機構の解明

（所　属）国立精神・神経医療研究センター神経研究所　疾病研究第五部

（氏　名）若月　修二

緒言

アルツハイマー病などの神経変性疾患、自閉症などの精神疾患患者の脳では、神経ネットワークの破綻が発病の主因である可能性が指摘されており、神経ネットワークの形成と維持、変容の分子基盤の整備は、疾患発病の分子機構を理解し、予防や治療の手がかりを得る上でも極めて重要である。本研究では、神経突起の変容機構に着目し、神経ネットワークの形成と維持、破綻におけるさまざまな細胞内反応の寄与を総合的に評価することで、精神・神経疾患発病の新しい分子基盤を解明することを目的とする。

方法と結果

本年度に引き続き、リボヌクレオ蛋白複合体 Vault の神経細胞における機能解析を、主に初代培養細胞を用いたシナプス形成の培養モデルにより実施した。

昨年度までに、蛋白質リン酸化酵素 Aurora A と結合する分子として、Vault 複合体の主要構成蛋白である MVP を見出した。Vault 複合体は蛋白質と RNA からなるリボヌクレオ蛋白複合体で、Vault に含まれる RNA は vault RNA（vtRNA）と呼ばれる。vtRNA が神経細胞のどのような細胞内反応の制御に関わるのかを探るため、培養神経細胞に vtRNA を過剰発現させて、各種細胞内反応の活性化状態を調べたところ、ERK シグナルが活性化され、かつシナプス形成が促進されることがわかった。vtRNA による ERK シグナルの活性調節を *in vitro* リン酸化アッセイにより検討したところ、ERK の制御酵素である MEK1 に vtRNA が直接結合して活性化することで、ERK が活性化されることがわかった。これらの結果は、vtRNA による ERK シグナル制御機構の存在を示唆するとともに、シナプス形成の新しい制御機構を提示した。

結論と考察

vtRNA は蛋白質に翻訳されないノンコーディング RNA（ncRNA）の一種である。ncRNA の役割は蛋白質合成におけるトランスファー RNA が象徴的であるが、蛋白質の安定化や局在化など、蛋白質分子のさまざまな機能調節にも関与することが、近年明らかにされている。vtRNA はほぼすべての真核生物にあるが、その生理機能はほとんど明らかになっていない。今回の結果は、神経細胞の細胞内シグナル調節因子としての vtRNA の機能の一端を明らかにしたと考えている。一方、vtRNA がどのようにして Vault 複合体からリリースされるのかを明らかにすることは究極の課題である。これまでの結果から、Aurora A による MVP のリン酸化がその引き金と想像されるが、その成否を今後の研究で明らかにする計画である。

参考文献（業績）

1. Tsubota M., Fukuda R., Hayashi Y., Miyazaki T., Ueda S., Yamashita R., Koike N., Sekiguchi F., Wake H., Wakatsuki S., Ujiie Y., Araki T., Nishibori M., Kawabata A.
Role of non-macrophage cell-derived HMGB1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and its prevention by the thrombin/thrombomodulin system in rodents: negative impact of anticoagulants.
J Neuroinflamm. (2019) 16: 199.

2. Kondo S., Takahashi K., Kinoshita Y., Nagai J., Wakatsuki S., Araki T., Goshima Y., Ohshima T. Genetic inhibition of CRMP2 phosphorylation delays Wallerian degeneration after optic nerve injury.
Biochem Biophys Res Commun. (2019) 514: 1037-1039.

3. Kondo S., Takahashi K., Kinoshita Y., Nagai J., Wakatsuki S., Araki T., Goshima Y., and Ohshima T. Genetic inhibition of CRMP2 phosphorylation at serine 522 promotes axonal regeneration after optic nerve injury.
Sci Rep. (2019) 9: 7188.

分担研究報告

（課題名）ゲノム編集技術を用いた骨格筋のCa2+ホメオスタシス制御因子の解明
（所　属）国立精神・神経医療研究センター神経研究所　遺伝子疾患治療研究部
（氏　名）鈴木　友子

緒言

骨格筋線維の形質膜直下にジストロフィンが欠損するDuchenne muscular dystrophy (DMD)では、筋形質膜が脆弱になり、筋収縮により膜が破綻し、細胞外からカルシウム（Ca^{2+}）が細胞内に流入する。更に筋小胞体(SR)のリアノジンレセプター（RyR1）やsarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase（SERCA）の活性低下により、筋線維の細胞質内Ca^{2+}濃度が恒常的に上昇し、Ca^{2+}依存性のプロテアーゼの活性化、ミトコンドリア機能低下、酸化ストレス等が引き起こされ、筋線維が変性・壊死する。本年度はこのSERCAを活性化することで、筋変性を抑えることが可能か検証した。

方法

・DMD患者由来iPS細胞から新規EZ- sphere法(Sakai-Takemura et al.,2018)を用いて骨格筋細胞を誘導した。
・筋小胞体特異的なCa^{2+}インジケータータンパク質であるrCEPIA1er（赤色蛍光）を発現するレンチウイルスベクターを構築し、ヒトiPS細胞に導入した。
・既知のSERCA活性化剤をDMDのモデル動物であるmdxマウスの腹腔内へ連続投与し、病態が改善するか検討した(血清CK値、Gripテスト，treadmill テスト，エバンスブルー色素（EBD）の筋線維内への取り込み，ex vivo筋収縮力測定、HE染色、中心核線維の計測、シリウスレッド染色等)。
・SERCA活性化剤投与後、骨格筋からミトコンドリアを単離し、Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer を用いて酸素消費量を測定した。
・SERCA活性化剤投与群と非投与群、野生型マウス（C56/BL6）の前脛骨筋での遺伝子発現をRNA-seqで解析した。

結果

・rCEPIA1er を安定発現するヒト iPS 細胞株を得た。筋分化誘導することで筋管の SR 内のCa^{2+}の濃度のモニタリングが可能になった。
・SERCA 活性化剤を mdx マウスへ連続投与したところ、骨格筋の SERCA 活性が 50%程度上昇していた。
・SERCA 活性化剤投与により、血清 CK 値が低下し、in vivo の筋力(grip テスト)、運動能力（treadmill テスト）が向上し、単離筋の twitch force, tetanic force ともに回復が見られた。
・SERCA 活性化剤投与により、ミトコンドリア機能に改善がみられた。
・通常、treadmill での走行後の mdx 筋では、筋形質膜の傷害を反映して、EBD の筋線維内への取り込みの上昇が認められる。SERCA 活性化剤によりこの EBD の取り込みが有意に抑えられた。

考察

SERCA活性化剤はmdxマウスの筋変性を抑制したが、ミトコンドリアの機能回復が主な要因と考えられた。

結論

・SERCA 活性剤は mdx マウスの病態を改善した。薬剤による SERCA の活性化が DMD の治療法として有効である可能性が示された。今後は rCEPIA1er を発現するヒト iPS 細胞を用いて（1）低用量で筋変死を抑制し、(2) 副作用が少なく長期に投与できる新規 SERCA 活性化剤の開発を行う。

参考文献

Sakai-Takemura F, et al. (2020) Prostaglandin EP2 receptor downstream of NOTCH signaling inhibits differentiation of human skeletal muscle progenitors in differentiation conditions. *Commun Biol,* 3(1):182.

分担研究報告

（課題名）ゲノム編集技術を用いたモデル動物作出による精神神経筋疾患の病態解明
（所　属）国立精神・神経医療研究センター神経研究所　遺伝子疾患治療研究部
（氏　名）青木　吉嗣

緒言

筋ジストロフィーを対象に蓄積された核酸医薬開発基盤を他の難治性神経・筋疾患に応用するには、効率的かつ簡便な核酸配列のスクリーニングおよび薬物動態の評価が必要である。本研究の目的は、EGFP 蛍光により非侵襲的にエクソン・スキップの誘導効果を評価可能な新規トランスジェニック(Tg)マウスを対象に、リアルタイム in vivo イメージングシステムを用いて、アンチセンス核酸医薬の薬効・薬理を詳細に検討することである
EGFP-Tg マウスの作出は、井上高良先生と共同で実施する。

方法

EGFP コード領域を、ジストロフィンエクソン／イントロンゲノム配列で分断し、モルフォリノ化合物を添加してエクソン・スキップが起こった時のみ EGFP 蛍光が表出されるような新規ベクターを設計および構築する。EGFP レポーターを筋細胞に導入し、エクソン・スキップの誘導効果をプレートリーダーで評価するアッセイ系を確立する。更に、EGFP レポーターを用いた Tg マウスを新規作出し、in vivo イメージングシステムの使用により、エクソン・スキップの薬効・薬理を簡便に評価可能なアッセイ系を確立する。

結果

筋ジストロフィーマウス由来初代筋芽細胞を対象に、エクソン 23 スキップの誘導により高レベルの EGFP 発現誘導が可能な
pCAGGS-EGFP の作出に成功し、プレートリーダーによる EGFP 蛍光の定量測定に成功した。EGFP 蛍光が従来の PCR によるエクソン・スキップ誘導効果と相関する事を確認できた。次に、EGFP レポーターTg マウスを 4 系統作出し、qPCR によりトランスジーンのコピー数評価を行った。さらに、当該 Tg マウスを対象にアンチセンス・モルフォリノ核酸を前脛骨筋に筋注あるいは経静脈注射し、in vivo イメージングシステムにより、エクソン・スキップの薬効・薬理評価に最適な系統を選別できた。

考察

EGFP は蛍光波長が短く in vivo イメージングの際に生体バックグラウンドがアーチファクトになり得ることから、ホタルルシフェラーゼを使ったレポーターTg マウスの作出を検討する。

結論

pCAGGS-EGFP レポーターを使った新規 Tg マウスを 4 系統作出し、in vivo イメージングに最適な系統の選別を行った。

参考文献

【欧文原著】
Hara Y, et al. Novel EGFP reporter cell and mouse models for sensitive imaging and quantification of exon skipping. Scientific reports, accepted.

分担研究報告

（課題名）動物モデルを用いた自己免疫性中枢神経疾患の研究

（所　属）国立精神・神経医療研究センター神経研究所　免疫研究部

（氏　名）大木　伸司

緒言

中枢神経系の難治性疾患には、免疫異常に起因する一群の自己免疫疾患が存在する。T細胞主体の多発性硬化症などでは治療薬の開発が進んでいる一方で、多様な症状を呈する自己免疫性脳炎など自己抗体依存性の稀少疾患は症例数が少ない。膠原病などと同様に根本的な治療法はなく、ステロイド治療などが中心となっている。本研究では、自己免疫疾患のプロトタイプとして膠原病自然発症マウスを用い、自己反応性T細胞による病態機序の解明と治療法開発を目指す。同マウス血清中に存在し、中枢神経組織、とくにシナプスに反応性を示す自己抗体を網羅的に検索し、その病原性を解析するとともに、自己抗体依存性の中枢神経病態と自己反応性T細胞の関係を明らかにする。

方法

膠原病様病態を自然発症する BXSB-Yaa 背景の NR4A2cKO マウスを作製し、自己反応性T細胞の性状解析とのサロゲートマーカーの探索を行う。同定したサロゲートマーカーを手掛かりに、自己反応性T細胞を標的とした新規治療法開発の可能性を探る。並行して、自己免疫疾患患者由来の自己反応性T細胞の挙動を解析し、NR4A2 との関係を調べる。

結果

膠原病様病態を自然発症する BXSB-Yaa 背景の NR4A2cKO マウスでは、発症に伴う脾臓やリンパ節の腫大、血清中の IgG 抗体価と抗核抗体価が有意に低下した一方で、外来高原に対する液性免疫は維持されていた。同マウスの自己反応性T細胞の性状解析から、新規のサロゲートマーカーA および B を同定し、発症に伴う自己反応性T細胞の著しい増加を確認した。この自己反応性T細胞を標的とした予防的、あるいは治療的介入により、脾臓とリンパ節の腫大、血清中の IgG 抗体価と抗核抗体価が有意に低下した。自己反応性T細胞を標的とした自己抗体依存性疾患の全く新しい病態制御機構の一端が明らかとなった。

考察

膠原病を中心とした自己抗体依存性疾患では、いまだにステロイド治療が主流であり、多くの患者は多様な副作用に苦しんでいる。今回の結果から、自己反応性T細胞を標的とした自己抗体依存性疾患の選択的な病態制御機構の可能性が開かれ、B 細胞標的治療法との併用などにより、疾患特異性がはるかに高い治療が実現できる可能性が示された。

結論

自己反応性T細胞の新規サロゲートマーカーを同定し、同細胞を標的とした治療法により、自己抗体依存性疾患の病態改善効果を得た。

参考文献

1.　なし

分担研究報告

（課題名）精神・神経筋疾患バイオリソースと臨床ゲノム情報解析による新規原因遺伝子の探索

（所　属）メディカル･ゲノムセンター 臨床ゲノム解析部

（氏　名）飯田　有俊

緒言

本研究のミッションは、（1）新しい遺伝子診断法の開発や画期的治療薬の創出などの臨床応用を目指して、精神・神経筋疾患の原因遺伝子を単離すること、（2）精神・神経筋疾患の病態カスケードの解明を目指して、バリアント情報の支援を行うことである。

方法

我々は、既に exome sequencing や染色体構造異常検出用の解析パイプラインを構築している。本研究では、さらなる exome sequencing 並びに 2,000 例の疾患ゲノムデータを用いたインフォマティクス解析を行い、候補遺伝子（変異）を発見した。具体的には、一連のゲノム情報解析を駆使し、バリアントのアノテーションとキュレーションを行った。新規（候補）遺伝子が発見された場合には、機能解析、モデル動物作製のために当研究班内で変異情報を共有し、生物学的、医学的見地から解析を支援した。

結果

（1）北京大学の研究者らとの国際共同研究により、眼咽頭遠位型ミオパチーの新規原因遺伝子 *GIPC1* を発見した。（2）横紋筋特異的チトクローム C 酸化酵素欠損症の新規遺伝子 *COX6A2* を発見した。（3）*ADSSL1* が、日本人のネマリンミオパチーで最も変異頻度の高い遺伝子であることを発見した。（4）知的障害研究において 4 遺伝子を解析し、新規病因性バリアントを発見した。（5）MGC 内のオリジナル *in house* ゲノム解析パイプラインを拡張した。なお、上記の研究は、神経研究所、NCNP 病院、他施設との共同研究による成果である。

考察

病因性バリアント情報を当研究班、研究所、病院の医師らと共有することによって研究が効率的に進み、共同研究の有用性が実証された。

結論

MGC で管理する精神・神経筋疾患の生体試料を用いて、新規原因遺伝子の探索や新規病因性バリアントと臨床像の相関研究等を行い、新しい疾患概念を確立した。

参考文献（2019 年度代表論文）

(1) Deng J, Yu J, Li P, et al. Expansion of GGC repeat in *GIPC1* is associated with oculopharyngodistal myopathy. ***American Journal of Human Genetics***, 106:793-804.

(2) Iida A, Takano K, Takeshita E, et al. A novel PAK3 pathogenic variant identified in two siblings from a Japanese family with X-linked intellectual disability: case report and review of the literature. ***Cold Spring Harbor Molecular Case Studies***, 5. pii: a003988

(3) Inoue M*, Uchino S*, Iida A*, (*: Contributed equally to this work) *COX6A2* variants cause a muscle-specific cytochrome c oxidase deficiency. A***nnals of Neurology***, 86: 193-202 (2019)

その他、上記以外に 4 報の英文原著論文が国際専門誌に掲載中。加えて、3 報が、現在印刷中。

分担研究報告

（課題名）神経回路の修復に関わる分子機構の解明
（所　属）国立精神・神経医療研究センター神経研究所　神経薬理研究部
（氏　名）村松　里衣子

緒言

中枢神経系の疾患に罹漢すると、様々な症状があらわれる。症状は、十分とはいえないがしばしば自然回復する。回復のメカニズムの一つに、傷害を受けた神経回路が自発的に修復することが指摘されている。神経回路が自然に修復するメカニズムには不明な点が多いが、修復を促進するメカニズムを解明し、その作用を増強することで、種々の神経疾患の後遺症を和らげることができると期待されている。本研究では、前年度に構築した in vitro のスクリーニング実験系を用い、神経突起の伸長効果を制御する機能を新規に見出した分子について、神経突起の伸長以外への作用の検討および候補分子の in vivo での発現様式を検討した。また、次年度に実施する in vivo の解析のためのツール作成を行った。

方法

神経突起の伸長の評価は、大脳皮質神経細胞の初代培養系に対して候補分子の siRNA を導入し、培養後に神経細胞を抗 Tuj1 抗体を用いて染色し、神経突起長を計測することで、各 siRNA 導入細胞における神経突起伸長への作用を評価した。また、同細胞を核染色し、培養後の細胞数を計測することで、導入した siRNA が細胞生存に寄与するかも検討した。

候補分子の全身での発現様式を評価するため、全身の各臓器から RNA を採取し、real time PCR 法を用いて各臓器での候補分子の mRNA 量を相対的に比較した。さらに、観察の範囲内で顕著に神経突起の伸長を制御する作用があった分子に関して、その発現を抑制させるための shRNA および GFP を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを作成した。

結果

神経症状と関連ある遺伝子群をデータベースより抽出し、脳での発現が検出される遺伝子計 40 種類に対して siRNA ライブラリーを作成し、各 siRNA を導入した神経細胞での神経突起長を計測したところ、神経突起長を有意に抑制させる siRNA を２種類見出した。なお、各 siRNA を導入した神経細胞数に差は認められなかったことから、神経細胞の生存維持には影響しないことが示唆された。特に顕著な突起伸長抑制効果があった siRNA の標的となる遺伝子として Syt4 があり、その全身の臓器で検討したところ、脳での mRNA の発現量が他臓器と比較して有意に高かった。今後、Syt4 遺伝子の発現を大脳皮質で特異的に抑制し、また抑制した神経細胞での神経回路の走行を可視化して観察するために、GFP と Syt4 shRNA を組み込んだアデノウイルスを作成し、ウイルスをマウス脳実質に注入した。14 日後に注入部位の組織において、Syt4 の発現抑制効果を mRNA レベルおよびタンパク質レベルで確認した。さらに、同ウイルスに組み込んだ GFP による軸索の可視化を、同じマウスの脊髄切片内で確認した。

考察

Syt4 遺伝子が、新規の軸索伸長阻害効果分子であることが in vitro の実験から示唆された。また同分子は脳に高発現する分子であり、ウイルスベクターを用いた in vivo 実験がマウスで可能と示唆された。

結論

今後 Syt4 遺伝子の発現を抑制することで in vivo での神経再生および機能回復への効果を検討することで、同分子の病態生理学な意義を解析していきたい。

分担研究報告

（課題名）ハイスループット *in vivo* 病態解析・創薬に向けた神経疾患モデルショウジョウバエバンクの構築

（所　属）大阪大学大学院医学系研究科
神経難病認知症探索治療学寄附講座
（氏　名）永井　義隆

緒言

アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ポリグルタミン病など多くの難治性神経疾患において遺伝子レベルの異常が明らかになり、病態解明・治療法開発を目指した研究が進んでいる。しかし、マウスなどの哺乳類モデルを用いた解析には膨大な労力・時間・経費を要することから、より迅速で簡便に解析が可能な動物モデルが必要とされている。そこで、本研究ではハイスループット解析に適するショウジョウバエに着目して、1) 様々な神経疾患モデルショウジョウバエのバンクを構築し、広く一般ユーザーへ公開して全国的な共同研究を展開する。また、2) 疾患モデルショウジョウバエを用いて、神経疾患病態解析および治療研究を推進する。

今年度は、家族性パーキンソン病（PD）の原因となる α シヌクレイン（αSyn）遺伝子変異による神経変性メカニズムを解明することを目的として、ショウジョウバエモデルを用いた *in vivo* 解析を行った。

方法・結果・考察

αSyn 遺伝子の変異による影響を正確に評価するために、ゲノム挿入部位特定な遺伝子導入法を用いて、野生型 αSyn もしくは変異型 αSyn (A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T)を発現するトランスジェニックショウジョウバエを作成した。まず、定量的 RT-PCR 法にて導入遺伝子の発現量を比較したところ、実際に野生型・変異型αSyn mRNA の発現量はほぼ同じレベルであった。次に複眼に αSyn を発現させたところ、個眼の不正・融合、剛毛の脱落など軽度の複眼変性を認めたが、野生型・変異型 αSyn 間では明らかな差は認めなかった。続いて神経系に αSyn を発現させたところ、変異型 αSynE46K、H50Q、G51D、A53T の発現では野生型に比べ、より早期の 3 週齢から有意な運動障害を認めた。ウェスタンブロットの結果、変異型αSynE46K タンパク質は野生型や他の変異型に比べて発現量が有意に高いことが明らかになり、薬剤誘導性 GeneSwitch システムを用いて遺伝子発現遮断後のαSyn タンパク質の分解を検討したところ、変異型αSynE46K では野生型に比べて分解速度が有意に遅延していた。

結論

以上の結果から、変異型αSynE46K は分解抵抗性を獲得して、神経変性発症に寄与している可能性が考えられた。また、本研究で樹立した新規のαSyn 発現パーキンソン病モデルショウジョウバエは、αSyn 遺伝子変異のメカニズム解明に有用な動物モデルであると考えられる。

業績発表

Sakai R., et al. ***PLoS One*** 14(6): e0218261 (2019)

分担研究報告

（課題名）レット症候群関連 miRNA モデルマウスの分子病態解明
（所　属）九州大学大学院医学研究院　応用幹細胞医科学部門
（氏名）中島　欽一

緒言

X 染色体上の MeCP2 遺伝子変異は、Rett 症候群（RTT）をはじめ、自閉症、双極性障害などを含めた種々の発達障害・精神疾患への関与が示唆されているものの、発症機序の詳細は不明である。これまで、神経細胞における MeCP2 の機能異常が RTT 発症の原因と考えられてきたが、最近、非神経細胞（グリア細胞）の機能異常が RTT 病態発症の一因である可能性が示唆され始めている。我々は、MeCP2 が microRNA(miRNA)マイクロプロセッサーである Drosha 複合体と結合し、miR-199a のプロセッシングを促進することを同定した。そこで本研究では、MeCP2 及び miR-199a 欠損グリア細胞の機能解析を行うことで、精神・神経疾患に対する新規分子基盤の提示を目指す。

方法

我々はこれまで野生型、MeCP2 欠損及び miR-199a 欠損アストロサイト培養上清（ACM）ではタウリンが減少していることを見出した。そこで、タウリンを MeCP2 欠損マウスに投与することで、MeCP2 欠損マウスでみられる表現型が改善するかどうかについて解析を行った。

結果

MeCP2 欠損マウスにタウリンを 100 mg/kg/day の濃度で投与し、MeCP2 欠損マウスにみられる RTT 様の表現型が回復するかどうかを解析した。その結果、MeCP2 欠損マウスは成長遅滞を示すことが知られているが、タウリンを投与することで、MeCP2 欠損マウスの体重が増加することが明らかとなった。また、RTT 様症状スコアリングを測定した結果、タウリン投与により、RTT 様症状スコアリングが減少する、つまり RTT 様の症状が改善することがわかった。さらに、タウリンを投与することで MeCP2 欠損マウスの寿命が増加することが明らかとなった。

考察

本研究により、MeCP2 欠損マウスにタウリンを投与することで RTT 様の表現型が改善することが明らかとなった。今後は、タウリン投与が MeCP2 欠損脳にどのような影響を与えるかについて、免疫染色を行いニューロンやミクログリアの形態変化について解析を行う予定である。

結論

これまで RTT について様々な研究がなされてきたが、未だに有効な治療法は存在しない。今後はタウリンの投与がどのようなメカニズムにより MeCP2 欠損マウスの表現型を改善しているかについて解析することで、新しい治療法の開発への展開が期待される。

分担研究報告書

（課題名）ゲノム編集技術を用いた自閉症モデル研究

（所　属）神戸大学大学院医学研究科
（氏　名）内匠　透

緒言

我々は自閉症スペクトラム症（Autism Spectrum Disorder, ASD）のモデル動物作製及びその解析による病態解明を目指す。具体的には、ヒト遺伝学的解析で発見した遺伝子変異を有するヒト変異体導入マウスを CRISPR/Cas9 法を用いて構築し、in vitro, in vivo で解析する。また、CRISPR/Cas9 法を用いて、染色体上の長い領域の欠失、重複等を可能にする「次世代」染色体工学を確立した。本次世代染色体工学を利用して、自閉症のコピー数多型（copy number variation, CNV）の細胞モデルを構築する。

方法

無麻酔覚醒下マウスを用いて、機能的核磁気共鳴画像法（fMRI, functional magnetic resonance imaging）を行った。機能的タスクとしては、社会性匂いによる嗅覚刺激を使用した。また、固定したマウス脳組織を用いて、拡散テンソル画像法（DTI, diffusion tensor imaging）を行った。薬物投与としては、DCS (D-cyclcoserine)の急性投与を行った。

結果

安静時 fMRI を用いて、脳領域の機能的結合を調べたところ、自閉症（15q dup）モデルマウスでは広範囲に渡り機能的結合の低下が認められた。これらの機能異常が神経構造の異常によるものかを調べるために DTI を用いて解剖学的結合を調べた。１５q dup マウスでは解剖学的結合も広範囲で低下しており、機能的結合と相関がみられた。１５q dup マウスへの DCS 投与により、社会的相互作用の異常が軽減され、脳機能異常も前頭野を中心として改善した。

CNV の網羅的細胞モデルに関しては、神経細胞に分化後、形態的、機能的、そしてシングルセル RNA-seq 法を用いたオミクス解析を行い、現在論文準備中である。

考察

MRI の利点は、マウスからヒトまで同じ撮影法で非侵襲的に計測が可能なことである。無麻酔 fMRI を用いることで、疾患モデルマウスでの認知機能に関する領域の機能異常を計測することが可能になり、ヒト臨床 MRI データと直接的に比較することが可能になる。

結論

覚醒下マウスの fMRI 解析が、自閉症モデルマウスのような精神疾患モデルマウスの評価に有効であることを示した。

参考文献

1. Furumai R et al, Hum Mol Genet 28, 1947-1958, 2019.
2. Takumi T et al, Neurosci Biobehav Rev, 110, 60-76, 2020.
3. Tsurugizawa T et al, Sci Adv, 6, eaav4520, 2020.

分担研究報告書

（課題名）ゲノム編集技術を用いた、生後脳や成体脳における新生ニューロンの生理的意義の解析

（所　属）京都大学大学院生命科学研究科
（氏　名）山田　真弓

緒言

中枢神経系において、大部分の神経細胞は胎生期あるいは出生後しばらくの時期にのみ、神経幹細胞から生み出されると考えられてきた。しかし、近年の研究によって、哺乳類の成体脳においても、神経幹細胞が存在し、側脳室周囲の脳室下帯や海馬の歯状回といった特定の領域では、ニューロン新生が継続していることが分かってきた。成体脳のニューロン新生は、記憶・学習などの高次脳機能に関与することが明らかになってきている。本研究では、ゲノム編集技術を用いて遺伝子改変マウスを作製し、新生ニューロンが神経回路や高次脳機能に与える影響を解析する。

方法

これまで、成体脳の新生ニューロンを特異的に遺伝子操作できる遺伝子改変マウスは国内外において少なく、新生ニューロンの生理的意義を解析することは困難であった。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて、DCX や Tubb3 などの幼若ニューロンに特異的に発現する遺伝子の遺伝子座に、Cre や FLP などの組み換え酵素をノックインした遺伝子改変マウスを作製する。作製した遺伝子改変マウスに対して、組換え酵素依存的に機能性分子を発現誘導できるようなアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターやレンチウイルスベクターを感染させて、生後脳や成体脳の新生ニューロンにおいて、選択的に遺伝子操作を行う。新生ニューロンにおいて、光や薬剤感受性の機能性分子を発現させ、新生ニューロンが神経回路や高次脳機能に与える影響について解析を行う。これまでに確立してきた光遺伝学ツールとも組み合わせて、解析する予定である。さらに、CRISPR/Cas9 および BAC トランスジェニックなどのゲノム編集技術を用いて、特定のニューロン集団において蛍光タンパク質 Venus をノックインした遺伝子改変マウスの作製を行う（NeuN-VenusNLS, VGAT-VenusNLS, Prox1-VenusNLS など）。ニューロン新生を阻害／活性化した際に、神経回路の構造に与える影響を解析する。

結果

CRISPR/Cas9 システムを用いて、DCX や Tubb3 陽性の幼若ニューロンに特異的に Cre や FLP の組み換え酵素をそれぞれノックインした遺伝子改変マウスを作製した（DCX-iCre, DCX-FLPo, Tubb3-iCre, Tubb3-FLPo マウスの 4 種類）。それぞれ複数ラインが得られたため、蛍光タンパク質を発現するレポーターマウスと掛け合わせて、内在性の DCX や Tubb3 の発現パターンを最も再現しているラインを選択した（*Yamada et al., 投稿準備中*）。今後は、光や薬剤感受性の機能性分子を搭載したウイルスベクターをこれらのマウスの海馬歯状回に感染させ、生後脳や成体脳における新生ニューロンの機能解析を行う予定である。

また、並行して光作動性転写因子の開発を行った。これまでに、植物由来の Cry2-CIB1 システムを利用して、光作動性 Tet システムの開発に成功している（*Yamada et al., 2018, 2020*）。さらに、マウス脳において、より効率良く機能する改良版を開発中である。培養細胞レベルでは、従来のものよりも発現誘導が高いものを作製することができた。さらに、これらの系を搭載したウイルスベクターの構築も開始している。また、生後脳や成体脳の神経幹細胞を用いて、RNA シークエンス解析を行い、ニューロン新生に関与する新規の機能性分子の探索を実施した。

考察

新規に作製した遺伝子改変マウスは、特に胎児脳において、内在性の DCX や Tubb3 の発現を再現できていた。光操作技術と組み合わせることによって、生後脳・成体脳だけではなく、胎児脳における神経発生研究にも役立つことが期待される。

結論

CRISPR/Cas9 システムにより、非常に短期間で、目的の遺伝子改変マウスを作製することができた。さらに、光作動性転写因子の改良を進展させることができた。今後はこれらのノックインマウスに、光作動性転写因子を搭載したウイルスベクターを導入して、生後脳や成体脳における新生ニューロンの機能解析を行う予定である。

参考文献

Yamada et al., Cell reports, 2018
Yamada et al., Neuroscience Research, 2020

分担研究報告

（課題名）ゲノムワイドな遺伝子発現制御機構を基盤とした神経組織特異的クロマチン構造の解明

（所　属）九州大学生体防御医学研究所
（氏　名）大川　恭行

緒言

細胞が特定の機能を有するためには、遺伝子が適切に選択され発現する機序が必要である。この基盤となっているのがDNAとヒストンで構成されるクロマチン構造である。一方で、組織には特異的クロマチン構造が存在し、細胞特異的な機能獲得を制御していると考えられてきたがその多くは不明なままである。これまでに、申請者は、骨格筋細胞分化において、骨格筋特異的遺伝子が染色体上で特定のヒストンバリアントにより、未分化段階で予め“マーキング”されることが、分化時の遺伝子発現誘導に必要であることを明らかにしてきた(Harada et al, EMBO J, 2012; Harada et al, NAR, 2015)。そこで本研究では、神経組織に高発現する機能未知のヒストン遺伝子の機能解析を行い、神経系における機能獲得を司るクロマチン構造基盤の解明を目指す。

方法

次世代シークエンサーを用いたトランスクリプトーム解析、エピゲノム解析ならびに生化学的な手法でゲノム上の神経特異的ヒストンの取り込み領域を同定し、ヒストンバリアントにより構築されるクロマチン構造を明らかにした上うえで構造形成メカニズムの解明を行う。また、生理的な機能解析のためノックアウトマウスの作成を行う。

結果

神経特異的なヒストンのノックアウトマウスの作成、樹立に成功した。現在、各種おミクス解析を中心とした機能解析を行い、神経系機能の解明を進めている。また、これら極少数の成体幹細胞のエピゲノムプロファイリングを行うための新解析技術を開発した(Nat Protocols. n press)。

考察

これら研究及び開発により、神経細胞特異的なヒストンバリアントを同定している。従来、知られていない多くのヒストンが組織特異的な機能を有している可能性があり生理的機能の解明が急務であろう。また、開発した技術は、マルチオミクス技術への基盤技術として活用できることから今後も開発を継続していく。

結論

現在も他のヒストンバリアントの解析を進めており、引き続き必要な技術を適時開発しつつ研究を進める。

参考文献（業績）

1. Chromatin integration labeling for mapping DNA binding proteins and modifications with low input. Handa T, ..., *Ohkawa Y, *Kimura H. *Nat Protocols.* in press

30-9
Systematic studies and modeling of neuropsychiatric and muscular diseases based on genome editing technology

Mikio Hoshino, M.D. Ph.D.

Department of Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)

[Purpose of the study]

The recent progress in genome editing technology allows us to rapidly and systematically generate animal models for diseases. Now that many of causative genetic elements for various muscular, neurological and psychiatric diseases have been identified in genome-wide association studies, it is highly expected that those elements, if evaluated in animal models, could stand as immediate targets for diagnosis and therapy. However, studies and modeling of neuropsychiatric and muscular diseases are still in an immature state and little is established to treat those diseases by regenerative means of medicine.

Based on useful information accumulated in the bioresource bank of NCNP, a novel platform for big data analyses, and our advanced protocols for genome editing, our group aims at development of various useful animal models for neuropsychiatric and muscular diseases to better understand the intricate pathology.

[Members]

Chief scientist: Mikio Hoshino (NCNP)

Shared scientists: Takayoshi Inoue (NCNP), Satoru Noguchi (NCNP), Mitsuhiko Yamada (NCNP), Tomohiro Kabuta (NCNP), Shuji Wakatsuki (NCNP), Yuko Suzuki (NCNP), Yoshitsugu Aoki (NCNP), Shinji Oki (NCNP), Aritoshi Iida (NCNP), Rieko Muramatsu (NCNP), Yoshitaka Nagai (Osaka University), Kinichi Nakashima (Kyushu University), Toru Takumi (Kobe University), Mayumi Yamada (Kyoto University), Yasuyuki Ohkawa (Kyushu University)

[Results]

Regarding research for technology and bioresource development, Dr. Hoshino's group established a novel platform for big data analyses in the lab and Dr. Inoue's group drastically improved CRSIPR/Cas9 based genome editing methods as well as bacterial artificial chromosome mediated functional genome mapping strategies to generate plenty of disease model mouse lines. Dr. Iida's group found out novel pathological variants based on useful information accumulated in the bioresource bank of NCNP. Dr. Ohkawa's group

developed powerful epigenomic profiling technology from small population of cells and revealed chromatin dynamics in skeletal muscle stem cells and developing neural cells.

As for studies and modeling of psychiatric diseases, Dr. Hoshino's group revealed complex gene regulatory features for the autism spectrum disorder (ASD), schizophrenia, attention deficit hyperactivity disorder, substance dependence and mental retardation related gene locus, Auts2. They also found out novel three types of human disease associated missense mutations in DSCAML1, the causative gene for epilepsy and modeled the mutations by knock-in mice. Dr. Mi Yamada's group tried to generate various schizophrenic model mice based on the GABA hypotheses for effective drug screenings. Dr. Kabuta's group investigated the RN/DNautophagy system to find out the essential function of DNA/RNA transporters in lysosomes. Dr. Nakashima's group showed ideal ways in investigating complex mechanisms of neuropsychiatric diseases such as ASD, Rett syndrome, bipolar disorders and mental retardation. Dr. Takumi's group shared the useful information in editing huge genomic territory to recapitulate intricate ASD pathology with us.

Regarding studies and modeling of neurological diseases, Dr. Wakatsuki's group revealed possible roles of the ribonucleoprotein complex, Vault in neural circuit formation, maintenance and modification. Dr. Oki's group tried to model the complex neuro-immunological diseases caused by self-reactive T cells in mice. Dr. Muramatsu's group screened molecules involved in neural circuit repair processes to identify several candidates. Dr. Nagai's group established the useful fruit fly bank for the modeling of various neurodegenerative diseases and clarified the correlation between GGGGCC repeat elongation and amyotrophic lateral sclerosis pathology in the fly model. Dr. Ma Yamada's group focused on the molecular cascade for mouse adult neurogenesis and visualized the process *in vivo* by means of CRSIPR/Cas9 based genome editing methods.

For muscular diseases, Dr. Noguchi's group comprehensively modeled mutations identified from various familial muscular diseases by using the CRSIPR/Cas9 system. Dr. Aoki's group successfully generated transgenic mouse lines to reliably monitor exon-skipping efficiency of Dystrophin gene *in vivo* and established the screening platform for nucleic acid medicine to treat Duchenne muscular dystrophy. Dr. Suzuki's group aimed to model muscular diseases by editing the human iPS cell genome and adjusted the protocol for muscle differentiation and drug screening.

We held the annual meeting where the results of our research were reported on Oct.30, 2019. We realized that the genome editing technology indeed accelerates animal modeling of diseases. Our findings also suggested considerable cross-talks among causative genes for different neuropsychiatric diseases, such as ASD, Rett syndrome, bipolar disorders, schizophrenia and so on.

30-10　精神・神経疾患での脳画像撮像および解析手法の標準化に関する研究

主任研究者
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター
脳病態統合イメージングセンター・センター長　松田　博史

総括研究報告

1、研究目的

精神･神経疾患に対する客観的な診断手法として画像診断が注目されるようになり、画像解析分野が重要視されている。ただし、得られる画像およびその解析法には施設間および画像診断装置間でのばらつきが大きく、多施設での評価には撮像技術および画像解析手法の標準化が必要である。本研究では、異なる装置から得られる画像データの差を極力少なくする補正法および解析法を開発することにより多施設共同画像研究の標準化を行う。構造 MRI に関しては対象疾患を、気分障害および小児を含めたてんかんとし、体積測定の標的部位を同定する。安静時 fMRI 関しては、ネットワーク解析法を確立し再現性を検討したうえで、対象疾患をパーキンソン病およびアルツハイマー病とする。ASL に関しては、脳の各領域での到達時間を補正した脳血流画像の開発をめざす。さらに CT を用いた PET および SPECT の定量性向上手法の開発を進める。さらに多モダリティから得られた情報を統合することによって、疾患の正診率を向上させる判別方法を提唱する。

2、研究組織

主任研究者
松田　博史　国立精神・神経医療研究センター
分担研究者
佐藤　典子　国立精神・神経医療研究センター
花川　隆　　国立精神・神経医療研究センター
湯浅　哲也　山形大学大学院理工学研究科
川口　淳　　佐賀大学医学部
原田　雅史　徳島大学病院放射線診療科
高野　晴成　国立精神・神経医療研究センター
研究協力者
沖田　恭治　国立精神・神経医療研究センター
小川　雅代　国立精神・神経医療研究センター
重本　蓉子　国立精神・神経医療研究センター
曾根　大地　国立精神・神経医療研究センター
高村　恒人　国立精神・神経医療研究センター
加藤　孝一　国立精神・神経医療研究センター
東口　大樹　国立精神・神経医療研究センター
坂東　杏太　国立精神・神経医療研究センター
木村有喜男　国立精神・神経医療研究センター
吉田　寿子　佐賀大学医学部臨床研究センター
鮎川　裕香　山形大学大学院理工学研究科
荒木　啓史　山形大学大学院理工学研究科
佐藤　学　　山形大学大学院理工学研究科
新垣　竜一　山形大学大学院理工学研究科
岩渕　玲　　山形大学大学院理工学研究科
加藤　晃輝　山形大学大学院理工学研究科

3、研究成果

本年度の成果は以下のごとくである。

3次元T1強調画像から灰白質を抽出し、グラフ理論に基づいて、媒介中心性、クラスタ性、次数中心性、経路長を表す画像を個々の症例で作成することに昨年度、成功した。本年度は認知機能が正常な男女それぞれ160名を対象とし、これらのネットワーク画像に加齢および性が及ぼす影響を検討した。女性61.9±13.4歳（平均±標準偏差）、男性61.5±13.5歳（平均±標準偏差）であり、MMSEスコアは女性28.9±1.6（平均±SD）、男性29.2±1.4（平均±SD）である。加齢に伴い、媒介中心性やクラスタリング係数、次数は視床、尾状核および前帯状皮質で有意に低下

していた。経路長も同様に視床、および尾状核で低下していた。スモールワールド性も加齢に伴い低下したが、特にγ（リアルネットワークとランダムネットワークのクラスタリング係数の比）とスモールワールド性は女性の方がより急峻に低下していた。４つのネットワーク指標の男女比較では、女性のクラスタリング係数が左海馬、および左海馬傍回において男性よりも高い値を示した。次数は視床、前帯状皮質を含む広範囲において男性がより高い値を示した。特定経路長は視床、尾状核、および前帯状皮質において女性がより高い値を示した。媒介中心性は前帯状皮質、海馬を含む広範囲において、男性がより高い値を示した。

脳卒中の亜急性期rsfMRIを用いた運動障害程度の予測(AAL/Freesurfer関心領域間の機能結合の計算に基づく)では、独立成分分析（ICA）に基づくdual regression法で分離したネットワークからrsfcMRI時系列情報を抽出し、機械学習により疾患群と健常群の判別に寄与する時間変動パターンの特性を抽出し、判別の性能を向上が向上するかを検討した。ただし、現在までの検討では、 AAL/Freesurferの関心領域を用いる方法と比較して、改善は認められていない。BOLD rsfcMRIによるParkinson病のすくみ足の予測を行った。ICAに基づくdual regression法で分離した基底核、小脳ネットワークの結合性とすくみ足指標が相関した。さらに関心領域（Freesurfer）から抽出したFCのLASSO解析によりすくみ足スコアの分散の6割程度を説明可能であった。健常被験者40名から脳波と課題および安静時fMRIの同時計測を行い、BOLD信号の動的変動と脳波の各周波数帯域のパワーの時間変動との相関解析を行なった。後頭部α波の時間変動と異なる相関を示す二種類の視覚関連ネットワークを同定した。

ASLに関しては、小児の発達障害における異常検出能について検討を行った。対象は自閉症と診断された33症例(平均7.3歳、2〜14歳)と正常コントロール(平均8.6歳、3-15歳)である。自閉症症例では左島回、左上頭頂小葉、上側頭回と下前頭回でコントロールに比べて低値を認めた。これらは、ミラーニューロンと関連する部位であり、自閉症におけるミラーニューロンシステムの機能低下を示唆する結果と考えられた。

ドーパミントランスポータ SPECT において線条体の特異的結合比を算出する目的に畳み込みニューラルネットワークを用いたところ、関心領域を設定することなく、自動算出が可能となった。

位相差強調画像PADREは、最近臨床用MRIで使用されるようになった撮像方であるが、位相差を強調して脳内の組織コントラストを強調する新しい手法である。大脳の一次運動野の神経細胞が変性する筋萎縮性側索硬化症（ALS）は進行性運動障害をきたす変性疾患であるが、ALS患者では中心前回の皮質内にPADREで低信号を認め、三層ないし４層構造として認められることからZebra signと命名された。おそらく皮質内の変性した部位に鉄沈着が低信号を示し、鉄沈着を免れた皮質、皮質下白質のミエリンの減少が高信号を呈すると考えられている。多系統萎縮症（MSA）においても錐体路症状を来す患者が多いことから、両疾患群におけるこのZebra signと臨床症状との関連を比較した。対象はASL,MSA,コントロールそれぞれ26例で、患者においては上位ニューロン障害を含めた神経所見を評価した。また疾患、コントロール群においてMRでZebra signを評価した。結果はASLでは50%にZebra signを認め、Zebra sign 陽性群は陰性群と比較してupper motor neuron burden scoreが優位に高かった。MSAにては23%でZebra sign 陽性であった。Zebra signはMSAでも認められる所見であり、錐体路症状との関連が示唆された。

これまでに，合成基底関数法と教師付学習法による新しい解析方法 Multiblock Sparse Multivariable Analysis法を開発した。一人あたり複数の脳画像データがあるように拡張する．これまで個々に解析されていた複数のデータセットを統合的に解析することによって，疾患の特徴づけなどを多様な角度から同時に行っている。脳画像解析ではマルチモダルとして，脳の形態と機能などの側面からの脳病態が評価される。US-ADNIの実データにおいて，MRIとSNP，継時測定委MRIといった多種の組み合わせデータに提案方法を適用し，その実行可能性と合理的な結果を示し，さらには教師付学習法の性質を詳細に調べチューニングパラメータ設定について実用上重要な知見を得た。本方法は主成分分析に画像内と画像間の2つの重みを考え、発展させたものであり、結果の解釈が比較的容易である。

研究課題番号:30-10
構造 MRI 解析の臨床応用に関する研究
分担研究者所属：国立精神・神経医療研究センター脳病態統合イメージングセンター
分担研究者氏名：　松田　博史

緒言：脳は複雑なネットワークを有しており、加齢や様々な疾患の発症・進行に伴い構造的・機能的に変化することが知られている。グラフ理論に基づくネットワーク解析により、脳内のネットワークの全体および局所評価が可能となり、MRI による拡散テンソル画像法、脳波記録法、および脳磁図記録法などを用いた研究が報告されてきた。より最近では、T1 強調画像を用いた構造 MRI のネットワーク分析が注目を集めている。構造ネットワークの以前の研究は、個体間の皮質の厚さまたは体積に基づいており、グループレベルの分析に限定されていた。一方、Tijms らは、単一の被験者内の灰白質（GM）形態における皮質類似性に基づく新しい方法を開発することにより個人間レベルでの分析を可能にしとし、GM ネットワーク異常が認知機能と関連することや、アルツハイマー病（AD）の早期指標であるアミロイドβ沈着に伴う GM ネットワーク異常の関連について報告されてきた。しかし正常な加齢に伴うネットワークの変化については完全に理解されているわけではない。また、一般的に女性は言語・記憶能力において男性より優れており、男性は女性よりも空間認知能力が高いと言われているが、ネットワーク解析において男女差はほとんど報告されていない。本研究は認知機能が正常な日本人を対象とし、個人ネットワークと加齢、および性別との関連を調べることを目的とした。

方法：対象
認知機能が正常な男女それぞれ 160 名を対象とし、女性 61.9±13.4 歳（平均±標準偏差）、男性 61.5±13.5 歳（平均±標準偏差）であり、MMSE スコアは女性 28.9±1.6（平均±SD）、男性 29.2±1.4（平均±SD）である。国立精神・神経医療研究センターの倫理審査委員会の承認を得て、すべての被験者から、この試験に参加するという書面による同意を得た。
画像取得
すべての参加者は、32 チャンネルヘッドコイルを使用して 3-T MRI システム（Achieva、Philips、Best、オランダ）で MRI スキャンを受けた。高空間分解能 3 次元 sagittal T1 強調 MPRAGE 画像を取得した。
個人レベルでのネットワーク解析
単一対象の GM ネットワークは、以前に記載されている完全に自動化された方法（https://github.com/bettytijms / Single_Subject_Grey_Matter_Networks; Tijms et al,2012;バージョン 20150902）を使用して、ネイティブスペース GM セグメンテーションから皮質内類似性に基づいて抽出された。節点は脳領域の小さな関心領域（3×3×3 ボクセル立方体として定義される）を表し、連結性はピアソンの相関で定量化された GM 密度値の類似性に基づく。次に、各ノードを 45° の倍数でθ角度だけ回転させ、すべての軸にわたって反射させて、ターゲットノードとの最大類似度を特定した。それらの相関値の有意性が無作為置換法に基づく多重検定のために補正された $p < 0.05$ の被験者特異的閾値を超えたときに脳領域を接続することによって GM 類似性マトリックスを構築した。得られたネットワークを 2 値化

し、次の４つのローカルネットワーク指数を計算した：次数（ノードのエッジ数）、クラスタリング係数（隣接ノードの相互接続性のレベル）、特定経路長（2 つのノード間の最短距離）、および媒介中心性（ノードを通る最短パスの割合）。ボクセルレベルで各被験者のローカルネットワーク測定値を比較するために、標準 MNI 空間のスライスされた GM に重ね合わせて対応する画像を作成した。さらにランダムネットワークよりも効率的なネットワーク、すなわちスモールワールド性を測るため次の３つの指標を算出した：γ（リアルネットワークとランダムネットワークのクラスタリング係数の比）、λ（リアルネットワークとランダムネットワークの特定経路長の比）、σ（γをλで割ったもの）。

結果：加齢に伴い、媒介中心性やクラスタリング係数、次数は視床、尾状核および前帯状皮質で有意に低下していた。経路長も同様に視床、および尾状核で低下していた。スモールワールド性も加齢に伴い低下したが、特にγとσは女性の方がより急峻に低下していた。４つのネットワーク指標の男女比較では、女性のクラスタリング係数が左海馬、および左海馬傍回において男性よりも高い値を示した。次数は視床、前帯状皮質を含む広範囲において男性がより高い値を示した。特定経路長は視床、尾状核、および前帯状皮質において女性がより高い値を示した。媒介中心性は前帯状皮質、海馬を含む広範囲において、男性がより高い値を示した。

討論：構造ネットワークと加齢の関連をみると、視床、尾状核、および前帯状皮質において有意な相関があることが分かった。視床は機能的に重要なハブであることが報告されており、加齢に伴う尾状核、視床から前帯状皮質における構造的ネットワークの変化は、加齢に伴う機能変化を反映している可能性がある。

左の海馬はより言語的な記憶に関わり、海馬の活動は、女性は左側が有意であるという報告がある。本研究で次数・媒介中心性は広範囲において男性が高い値を示したにも関わらず、左海馬におけるクラスタリング係数が女性でより高かったことは、これに当てはまると考えられる。

先行研究において Tijms らは AD の GM ネットワークはよりランダム化され、スモールワールド性指標も低下すると報告している。これらの指標が、加齢に伴い、女性でより急峻に低下していたことは、女性の AD 発症率が高いことと関連があるのかもしれない。

結論：T1 強調画像による個人脳における構造ネットワーク解析で、視床、尾状核および前帯状皮質における加齢変化を認めた。女性の方が男性よりも優れたスモールワールド性を持つが、加齢による影響をより受けやすい可能性がある。

参考文献：

[1] Tijms, B.M., Series, P., Willshaw, D.J., Lawrie, S.M., 2012. Similarity-based extraction of individual networks from gray matter MRI scans. Cereb. Cortex 22,1530-1541.
[2]Tijms, B.M., Möller, C., Vrenken, H., Wink, A.M., de Haan, W., van der Flier, W.M.,Stam, C.J., Scheltens, P., Barkhof, F., 2013a. Single-subject grey matter graphs in Alzheimer's disease. PLoS One 8, e58921.
[3] Tijms, B.M., Yeung, H.M., Sikkes, S.A., Möller, C., Smits, L.L., Stam, C.J., Scheltens, P., van der Flier, W.M., Barkhof, F., 2014. Single-subject gray matter graph properties and their relationship with cognitive

impairment in early- and late-onset Alzheimer's disease. Brain Connect. 4, 337-346.
[4] Tijms, B.M., Kate, M.T., Wink. A.M., Visser, P.J., Ecay, M., Clerigue, M., Estanga, A., Garcia-Sebastian, M., Izagirre, A., Villanua, J., Martinez-Lage, P., van der Flier, W.M., Scheltens, P., Sanz-Arigita, E., Barkhof, F., 2016. Gray matter network disruptions and amyloid beta in cognitively normal adults. Neurobiol. Aging 37, 154-160.
[5]Frings L, Wagner K, Unterrainer J, Spreer J, Halsband U, Schulze-Bonhage A, 2006. Gender-related differences in lateralization of hippocampal activation and cognitive strategy. NeuroReport 17(4), 417-421

精神・神経疾患での脳画像撮像および解析手法の標準化に関する研究

分担研究者
佐藤典子 1)

研究協力者
鈴木文夫 1）木村有喜男 1）重本容子 1）松田博史 2)

所属
1）NCNP　放射線診療部
2）NCNP　IBIC

諸言
位相差強調画像 PADRE は、最近臨床用 MRI で使用されるようになった撮像方であるが、位相差を強調して脳内の組織コントラストを強調する新しい手法である。大脳の一次運動野の神経細胞が変性する筋萎縮性側索硬化症（ASL）は進行性運動障害をきたす変性疾患であるが、ALS 患者では中心前回の皮質内に phase difference enhanced (PADRE) で低信号を認め、三層ないし４層構造として認められることから Zebra sign と命名された。おそらく皮質内の変性した部位に鉄沈着が低信号を示し、鉄沈着を免れた皮質、皮質下白質のミエリンの減少が高信号を呈すると考えられている。この所見は ASL において報告されたのみで、他の疾患では評価した報告はない。我々は多系統萎縮症（MSA）においても錐体路症状を来す患者が多いことから、両疾患群におけるこの Zebra sign と臨床症状との関連を比較した。

方法
対象は ASL 患者,MSA 患者,コントロールそれぞれ 26 例で、患者においては上位ニューロン障害を含めた神経所見を評価した。いずれの患者も発症 2 年以内である。MR は３T の Philips 社製で、疾患、コントロール群で PADRE を撮像し、Zebra sign を評価した。評価者は 2 例の神経放射線専門医で行い、中心前回に全く低信号を認めない Grade0、点状の低信号を認める Grade1、低信号の線状影を１ないし 2 スライスで認めるものを Grade2、低信号の線状影を 3 スライス以上で認めるものを Grade3 と定義し、Grade0､1 を陰性、2,3 を陽性とした。

結果
Zebra sign 陽性は 26 例の ASL 患者中 50%の 13 例（両側 8 例、片側 5 例）に、MSA では 23%の 6 人（両側 1 例、片側 5 例)、正常では 0 人であった。ASL 患者で Zebra sign 陽性の群は陰性群と比較して upper motor neuron burden score が優位に高かった(P=.015)。MSA 患者においては､Zebra サインありなしで明らかな統計的優位差は認めなかったが､MSA-P やバビンスキー陽性患者に､Zebra サイン陽性の患者が多い傾向にあった。

考察
我々の研究では、発症 2 年以内の ASL 患者の半数と MSA 患者の約/4 に Zebra サイン陽性を認めた。以前 Zebra サインは ASL に特有な所見として提示されていたが、そうではなく、MSA などの錐体路症状をきたし、上位運動ニューロン障害を示唆する指標となることを強調したい。
PADRE における Zebra サインは、鉄の沈着によるものとも、上位運動ニューロン変性に伴

う髄鞘の密度減少によるものとも推測されている。正常例においてはこのサインを認めることがなく、上位運動ニューロン変性の良い指標となりうる。

結論

Zebra sign は ASL のみでなく MSA でも認められる所見であり、錐体路症状との関連が強く示唆された。

参考文献

1. S. Kakeda, T. Yoneda, S. Ide, et al., Zebra sign of precentral gyri in amyotrophic lateral sclerosis: a novel finding using phase difference enhanced (PADRE) imaginginitial results, Eur. Radiol. 26 (2016) 4173-4183.
2. A.J. da Rocha, A.C. Maia Jr., C.J. da Silva, et al., Pyramidal tract degeneration in multiple system atrophy: the relevance of magnetization transfer imaging, Mov. Disord. 22 (2007) 238-244.
3. A. Sugiyama, N. Sato, Y. Kimura, et al., MR findings in the substantia nigra on phase difference enhanced imaging in neurodegenerative parkinsonism, Parkinsonism Relat. Disord. 48 (2018) 10-16.
4. S. Gilman, G.K. Wennin, P.A. Low, et al., Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy, Neurology 71 (2008) 670-676.
5. S. Kakeda, Y. Korogi, T. Yoneda, et al., Pakinson's disease: diagnostic potential of high-resolution phase difference enhanced MR imaging at 3 T, Eur. Radiol. 23 (2013) 1102-1111.
6. J.Y. Kwan, S.Y. Jeong, P.V. Gelderen, et al., Iron accumulation in deep cortical layers accounts for MRI signal abnormalities in ALS: correlating 7 tesla MRI and pathology, PLoS ONE 7 (2012) e35241.
7. Y. Adachi, N. Sato, Y. Saito, et al., Usefulness of SWI for the detection of iron in the motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis, J. Neuroimaging 25 (2015) 443-451.

A4、2 段組、MS 明朝体
10 ポイント。
2200 文字くらい。
文献の出典は文末に一括記載のこと。

多施設安静時機能 MRI に基づく疾患判別・症状評価法の開発に関する研究

分担研究者
花川　隆 1）

研究協力者
若杉憲孝 1）

所属
1）国立精神・神経医療研究センター 脳病態統合イメージングセンター（IBIC） 先進脳画像研究部

諸言

課題を必要としない resting-state functional connectivity MRI（rsfcMRI）による脳機能結合（FC）の解析は, 認知症をはじめとする精神・神経疾患の病態解明や診断ツールとして期待されている [1]．われわれは，rsfcMRI の撮像・解析手法を改善し，単施設にデータにおける疾患の判別法に基づき、多施設データへ汎化させることを目的として研究を行ってきた．今回, polysomnography（PSG）で確定診断のついた rapid eye movement (REM) Sleep Behavioral disorder（RBD）を対象としたコホート研究である The Japan Parkinson's Disease Progressive Marker Initiative（J-PPMI）の rsfcMRI データのうち，まず最も症例数の多い NCNP における組み入れ時のデータを用いて，健常高齢者の rsfcMRI データと比較し, さらに機械学習を用いた判別を試みたので報告する．

方法

RBD 患者 55 名（平均年齢 69.6 歳）と健康な高齢者（HC）70 名（平均年齢 68.7 歳）の rsfcMRI データを対象とした．両群とも IBIC の 3-T MRI（Siemens Verio Dot）と 32 チャンネル受信コイルを用いて，TR=25000 ms, TE = 30 ms, flip angle = 80°, voxel size = 3.3 × 3.3 × 3.2 (with a 0.8-mm gap) mm^3, 40 スライスの gradient-echo echo planar image（GE-EPI）を，開眼個視条件で 10 分間撮像した．解析としてまず group independent component analysis（gICA）を用いて安静時機能結合ネットワーク（RSN）を抽出した．RSN のうち大脳基底核（BG）RSN，運動体性感覚（SM）RSN，実行認知機能（EC）RSN に仮説を置き, dual regression 解析で RBD と HC の群間比較を行った．また，全脳に置いた関心領域から総当たりで FC を抽出し，support vector machine（SVM）による機械学習判別を行った．

結果

Dual regression 解析による FC の群間比較では, BG, SM, EC のいずれの RSN においても RBD 患者群で FC が有意に低下していた．また SVM では 70%程度の判別率が得られた．

考察

RBD は Parkinson's disease（PD）やレビー小体型認知症（LBD）の前段階として近年注目されている．実際，RBD の rsfcMRI 研究では，PD の異常 [2] と似た大脳基底核―運動野ネットワークや運動野ネットワークの異常が示されている [3,4]. 本研究は RBD における前頭前野ネットワーク機能結合の異常を初めて見出した．RBD が併存する PD は認知障害が強く，詳細は省くが RBD 症例の多くが Montreal Cognitive Assessment-Japan（MoCA-J）で mild cognitive impairment と判定される 26 点以下出あった．今後のフォローアップで認知障害が

どのように進行するか，それに伴い FC がどのように変化するかは興味深い．また，今後 J-PPMI の他の施設のデータを合わせて解析していく予定であり，それと合わせて機械学習判別法の開発も本格化させる．

結論

rsfcMRI により RBD の段階でも運動・認知ネットワークの異常を検出できる．

参考文献

1. 花川 隆：イメージングバイオマーカーとしての脳機能結合．脳神経内科 92(2): 206-210, 2020.
2. Hanakawa T, Goldfine AM, Hallett M. A Common Function of Basal Ganglia-Cortical Circuits Subserving Speed in Both Motor and Cognitive Domains. eNeuro 2017;4
3. Rolinski M, Griffanti L, Piccini P, et al. Basal ganglia dysfunction in idiopathic REM sleep behaviour disorder parallels that in early Parkinson's disease. Brain 2016;139:2224-2234.
4. Yamada G, Ueki Y, Oishi N, et al. Nigrostriatal Dopaminergic Dysfunction and Altered Functional Connectivity in REM Sleep Behavior Disorder With Mild Motor Impairment. Front Neurol 2019;10:802.

^{123}I-FP-CIT SPECT からの特異的結合比算出の自動化 : アルゴリズム高精度化に関する研究

分担研究者
湯浅哲也 1）
研究協力者
岩渕玲 1)，久根崎遥加 1)，荒木啓史 1）
所属
1）山形大学大学院理工学研究科

諸言

123I-FP-CIT (イオフルパン) は，SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) で画像化すれば，その分布からドーパミン神経の変性や脱落を評価できる．イオフルパン SPECT 画像から算出される特異的結合比 (SBR: Specific Binding Ratio) は, パーキンソン病 (PD) の診断に有効な定量的指標であるが, SBR算出には，線条体を含むVOI (Volume Of Interest) を設定する必要がある[1]. しかし, 集積が少ない場合，線条体の位置は必ずしも明瞭に抽出されない. そのため, VOI設定は解析者の主観に委ねられ，SBR値の客観性が大きく損なわれる. この困難を回避するためには, SPECT画像より客観的にSBRを算出するアルゴリズムを開発する必要がある.

SPECT画像において，線条体の位置情報を画像処理により正確に特定することは, SPECT画像の低い解像度では困難である. そこで，深層学習によりイオフルパン SPECT画像から直接的にSBRが算出できれば, ロバストな処理を実現できる. 本研究では，畳み込みニューラルネットワーク (CNN: Convolutional Neural Network) による回帰を用いたSBR値の自動算出を検討した.

方法

使用したデータは，先行研究でのアルゴリズムで抽出された VOI が線条体領域を含むと非医療従事者が判断した, PPMI の 1531 症例 (Control: 213 症例，PD: 1318 症例) とした. これらの症例に対して, Tossici-Bolt 法により算出された SBR 値を回帰の教師データとした[1]. 訓練データとして, Control: 192 症例，PD: 1186 症例を用いた．それぞれに対して, ±3 画素の範囲でランダムに平行移動させ訓練データを水増しし，最終的に訓練データ数は，Control: 384 症例，PD: 2372 症例とした. テストデータは, 訓練に用いなかった 157 症例 (Control: 21 症例，PD: 136 症例) とした．CNN は 7 層として，ハイパーパラメーターは以下のように定めた：Convolution Filter Size: 3×3×3，MaxPooling: 2×2×2，Batch Size: 5，Epoch 数: 5．また，損失関数は Mean Squared Error，最適化には RMSprop を用いた.

Fig. 1

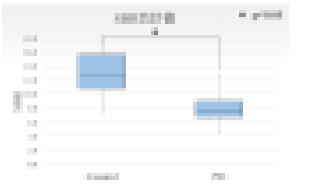


Fig. 2

結果

テストデータを CNN へ入力し予測された SBR 値と，Tossici-Bolt 法により算出された SBR 値を Observed-Predicted Plot により比較検討した．両者には高い相関があることが確認された(Fig. 1)．Fig. 1 の横軸は Tossici-Bolt 法により算出された SBR 値，縦軸は CNN 回帰によって得られた SBR 値である.

考察

CNN 回帰によって得られた SBR 値に基づいて，PD および CL（Control）の分類実験を行った（Fig. 2）．図のように両者には有意な差があった. また，このデータにより ROC 解析を試みたところ AUC（Area Under Curve）は 0.946 という高い値を示した．これらの事実により，CNN 回帰により，VOI を設定することなしに SBR 値を算出できることが実証された.

結論

SPECT と同時に撮像された MRI から線条体の位置を特定し，SBR 値算出のための VOI 設定をすることが試みられているが，検査効率や被験者の負担を考えると SPECT 一回の検査で診断を下せることが望ましい. 本提案手法によれば，VOI を設定する必要がないため，MRI を同時撮像する必要がない.

参考文献

[1] Livia Tossici-Bolt, ”Quantification of [^{123}I] FP-CIT SPECT brain images:an accurate technique for measurement of the specific binding ratio,” European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, vol. 33, no. 12, pp. 1492-1499 (2006)

多重モダリティ脳画像の統計学的解析に関する研究

分担研究者
川口　淳 1）

研究協力者
田尻　涼 1）

所属
1）佐賀大学医学部

諸言
近年、数種の脳画像を統合解析するマルチモダル解析が脳疾患研究に多く応用されている．この方法の 1 つにマルチブロックスパース成分法(Kawaguchi 2019)がある．本方法は主成分分析に画像内と画像間の 2 つの重みを考え、発展させたものであり、結果の解釈が比較的容易である．また画像内重みは主成分分析と同様に、第 1 成分より順に複数成分を算出できる．しかし画像間重みは複数成分を考慮していないため、限定的な関係しか見出せない．本研究では、両重みの複数成分を考えたスパースネスト成分法を提案し、アルツハイマー病の実データに適用し、性能の評価を行う．

方法
1 個人あたり複数の脳画像データからスパースネスト成分法により被験者毎にスコアを算出し，診断確率をロジスティック回帰モデルで推定する方法を提案した．開発した方法の実行可能性を実データに適用して行い，精度についても検討を行った. US-ADNI データのベースラインにおいて sMRI と DTI の両方が測定された 42 名を用いた. 汎化性を評価するためにデータを二分した．モデル構築用として正常 14 名と AD (Alzheimer’s Disease)14 名であり，,Validation 用として，正常 7 名と AD7 名である．

結果
提案法のアルゴリズムを構築しプログラムコードを作成に成功した．ネスト成分で新たに有意に疾患予測に寄与する成分の抽出ができた．判別に重要な部位として海馬付近が示されるという合理的な結果を得て，疾患予測に関する AUC は 0.98 となり, 既存法の 0.86 を上回り, 提案方法の良さを示すことができた．

考察
適用データ数が少ないかもしれない（28 例+14 例）．これは多種の画像全て測定された患者データは少ない（3000 人規模の ADNI でも 2 桁程度）であったので，画像の欠測を補完する方法の開発が必要かもしれない．

結論
実データによる実行可能性を示し、ネスト成分に疾患を説明する有用な情報の存在を示唆した．これにより、多種の画像への応用が期待される

参考文献
Kawaguchi A (2019). Supervised Sparse Components Analysis with Application to Brain Imaging Data, Neuroimaging - Structure, Function and Mind, Sanja Josef Golubic, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.80531.

Arterial Spin Labeling および MR spectroscopy の撮像・解析の標準化に関する研究

分担研究者
原田雅史 1)
研究協力者
大友真姫 1) 松元友暉 1)

所属
1)徳島大学病院放射線科

諸言

Arterial spin labeling(ASL)法は、ラジオ波のラベリング時間やラベル後から信号取得までの時間(PLD時間)に影響をうけ、血流速や流路長の違いによって定量値が変化する。今回、より高精度かつ高分解能で血流遅延の影響を補正するために、信号取得タイミングの工夫を行い、１度の撮像で血流遅延マップと遅延補正脳血流量及び非補正脳血流量マップを算出できるMulti-delay ASL法を作成した。これにより4分前後で高分解能な定量マップの作成が可能である。本研究ではASL法の至適パラメーターの決定と再現性や精度の評価を行った上で、各年齢群ごとの正常者データベースを作成し、認知症や自閉性障害等の脳機能疾患について検討を行う。昨年までの成人の検討に加えて本年度では、小児の発達障害におけるASL法による異常検出能について検討を行った。

MR spectroscopy(MRS)については、大分子(MM)の影響を除外するためにMM信号を編集して差分することで精度を向上する新たな信号編集シークエンスを作成した。今年度国際磁気共鳴医学会のMRS Study Groupから3T以上のproton MRSの測定においては、従来のPRESS法よりもLaser法またはSemi-Laser(SLaser)法を用いることが望ましいとするコメントが発表された1)。今回我々は、SLaser法及びSTEAM法とPRESS法を用いてMRSファントムを測定し、その再現性と代謝物定量値のばらつき及び各代謝物定量値の相違について検討を行った。

方法

1)Multi-delay ASL法による自閉症の検討

対象は自閉症と診断された 33 症例(平均 7.3 歳、2～14 歳)と正常コントロール(平均 8.6 歳、3-15 歳)である。MRI は Discovery 750(3T, GEHC 社)を用いて、撮像シークエンスは、全頭部を対象に 3DT1 強調像として 3DSPGR 法を施行し、次に 3 種類の post labeling 時間による multi-delay 3D ASL 法を撮像した。撮像条件は下記の通りである。

3DSPGR:TR=8.6 ms, TE=3.5ms, flip angle=15°, field of view=22cm, voxel size=1.6×1.6×1.6 mm3, スライス枚数=176 枚

Multi-delay 3D ASL: Spiral scan SE 法 ault),スライス厚= 4 mm, location per slab=36, points=512 arms, arms=6, echo train=40, PDL times: 1st 1.00, 2nd 1.57, 3rd 2.46 s, effective labeling times: 0.57, 0.89, 2.04 s, chemical saturation=Fat, vessel suppression off, 撮像時間=3:40。脳血流定量画像は、NEUROSTAT にて標準化を行い、NEURO FLEXER にて自動関心領域を設定して、定量値を求めた。

2)高磁場 3TMRI における SLaser 法の優位性の検討

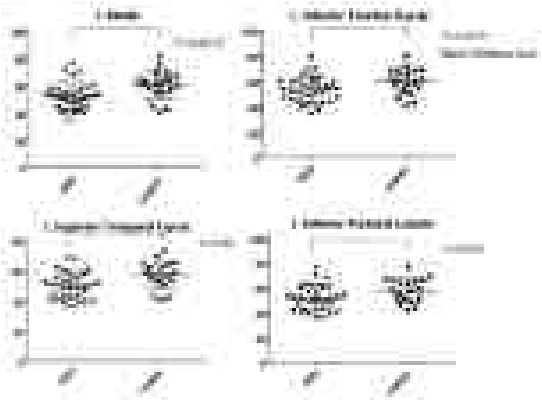
対象は、NAA(12.5mM), Cr(10.0mM), Cho(3.0mM),mIns(7,5mM),Glu(12.5mM),

Lactae(5mM)を含むMRS用のファントムを作成して用いた。装置はDiscovery 750(3T, GE-HC社)で、頭部用8Ch標準コイルを用いた。撮像シークエンスとパラメーターは以下の通りである。PRESS法(TR=4000ms, TE=29, 35, 135ms), STEAM法(TR=4000ms, TE=29ms), SLaser法(TR=4000ms, TE=29ms)で、ROIは40×40×40mm^{3}で積算は48回である。後処理はLCmodelを用いて、抑制しない水信号による較正した定量値とCrとの信号強度比を算出した。

結果

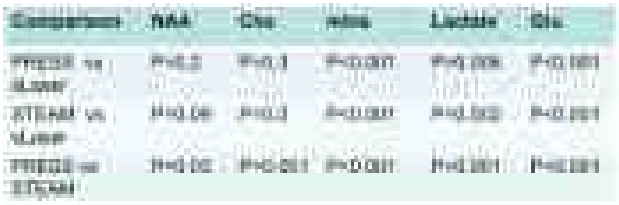
1) Multi-delay ASL 法による自閉症の検討

自閉症症例では左島回、左上頭頂小葉、上側頭回と下前頭回でコントロールにくらべて低値を認めた。これらは、ミラーニューロンと関連する部位であり、自閉症におけるミラーニューロンシステムの機能低下を示唆する結果と考えられた。



2)高磁場 3TMRI における SLaser 法の優位性の検討

得られた結果は、級内相関による再現性は、STEAM法が0.994と最も低く、PRESS法とSLaser法が0.999と高かったが、変動係数ではSLaser法が0,54と最も低く、PRESS法が2.01、STEAM法が3.17であった。さらに各代謝物の定量値との比較では、STEAM法とSLaser法では、NAA, Cr, Choとの有意差は認めないが、mIns, Lactate, Gluとは有意差が認められ、定量値が異なることが示唆された。



考察

1) Multi-delay ASL 法による自閉症の検討

小児における脳血流は、成人とくらべて血流速が速いことが知られており、脳血流の到達時間に影響を受けるASL法では、流速による変化を補正することが必要と考えられ、multi-delay ASL法の有用性が期待されるため、自閉症を対象に同法による血流評価を施行した。また、自分の動きと他者の動きの両方に関係する脳部位があることが知られるようになり、ミラーニューロンと呼ばれ、下前頭回や下頭頂小葉が代表的な部位である。今回のmulti-delay ASL法による血流評価で、ASD患児において低下が認められ、ミラーニューロンの障害との関連が示唆された。自閉症におけるミラーニューロンの障害を反映する結果と考えられ、同法の有用性が示された。

2)高磁場 3TMRI における SLaser 法の優位性の検討

高磁場における MRS の測定では、化学シフトにともなう信号の位置ずれが問題となっており、adiabatic pulse を用いた SLaser 法

の有用性が報告されている。このシークエンスでは RF パルスの均一性が向上することから測定時の再現性や精度も向上する可能性がある。今回のファントムによる検討では、SLaser 法での変動係数や級内相関係数が最も良好であった。さらに興味深い点は、NAA,Cr,Cho といった主要 3 代謝物では 3 シークエンスにおける定量値に有意差は認めなかったが、mIns, Glu 及び Lactate で有意差が認められた点から、代謝物の周波数の違いや J カップリングの影響が推察された。これらの結果から、3TMRI においても SLaser 法の使用が推奨されるが、他のシークエンスの測定値との比較には注意を要すると考えられた。

結論

Multi-delay ASL 法では、小児の脳血流評価にも応用可能で、自閉症における脳局所の血流低下が評価でき、今回の結果からはミラーニューロンの障害との関連が推察された。

3T MRI においても SLaser 法における測定値の精度と再現性が高いが、測定値については、代謝物によってシークエンスの違いによって異なる可能性が示唆され、特に J カップリングの影響をうける代謝物では比較が困難と考えられた。

参考文献

1. Martin Wilson et al. Methodological consensus on clinical proton MRS of the brain: Review and recommendations. Magn Reson Med. DOI: 10.1002/mrm.27742 On line Publication 2019 Apr

アミロイド PET およびドーパミントランスポータ PET/SPECT の標準化に関する研究

分担研究者：高野晴成
所属：(研) 国立精神・神経医療研究センター・脳病態統合イメージングセンター・臨床脳画像研究部

諸言

2004年の[11C]PiBの報告に始まるアミロイドPETイメージングは、アルツハイマー型認知症 (AD) の診断に極めて有用であり、近年のADの診断基準にはバイオマーカーの一つとして組み入れられている。半減期の長い18F製剤である [18F]flutemetamol （ [18F]FMM ），[18F]florbetapirなどは製薬企業が配送により提供できることから、広く治験や臨床研究に使われるようになった。市販されている18F製剤のアミロイドPETは、個々の症例に対し製薬企業の規定する読影ガイドラインに従った視察での陽性、陰性の判定と剖検脳でのアミロイド蓄積量と相関のエビデンスはあるが、今のところ定量データについての一貫したエビデンスはない。臨床症状との関連のみならず、視察では判断に迷う例の参考のためや、経時的変化を捉えるためにもアミロイド蓄積量の定量化およびその標準化が望まれる。

近年、アミロイドPETの定量化・標準化の試みのひとつとして、個人の脳内アミロイドの蓄積の度合いを若年健常者の平均を0、確実なADの平均を100として0-100で表現するCentiloid scale (CL値) が提唱されている[1]。これはさらに他のアミロイドPET薬剤の集積を[11C]PiBに換算し、標準化することも行われている。

本研究では2つのアミロイドPETトレーサーについて、公開されているデータと自施設の既存のデータを用い、市販のPMOD （PMOD Technologies LLC）のpipelineを使用して解析を行った。

対象と方法

(1) [18F]FMM

The Global Alzheimer's Association Interactive Network(GAAIN)の公開データの[18F]FMMのセット（静注後90-110分の撮像）である若年健常者24名（YHV)、アルツハイマー型認知症（AD）19名、健忘型軽度認知障害（aMCI）20名、健常高齢者9名（OHC）のデータ（Others）を使用した。解剖学的参照としてMRI 3D-T1強調画像を利用した。

PMODのPNEURO moduleを用い、内包されているCL atlas関心領域（CTX; cortical target regionとWC; whole cerebellum）で集積を定量化し、CTX/WC比（standardized uptake value ratio; SUVR）を算出した。この手法では一連のpipelineとしてCL値を比較的簡単に求められる。統計解析にはSPSS ver.25を用いた。

(2) [11C]PiB

[11C]PiBに関しては、昨年度の報告の対象者から抽出して解析を行った。即ち、当院に通院中の50歳以上のNIA-AAのProbable AD dementiaおよびMCI due to ADを満たす患者と公募に応募した50歳以上の健常志願者を対象とした。当院のPET-CT装置(Biograph 16 TruePoint, Siemens）を用い、[11C] PiBを静脈注射50分後から20分間3Dモードで撮像した。全ての被験者は3Tの3D-T1 MRIの撮像も行った。臨床評価としてclinical dementia rating （CDR）、mini-mental state examination (MMSE) を行った。

その中で本研究では、AD (16名) およびMCI due to AD（4名）患者群でかつ視察によりア

ミロイド陽性と判定された 20 名を対象とした（平均年齢 71.7±標準偏差 8.6 歳、男性 13 名女性 7 名、平均 MMSE 21.3±3.5、平均 Global CDR（gCDR） 0.95±0.32)。さらに、健常対照群の中でアミロイド陰性と判定された 20 名（平均年齢 65.0±9.7 歳、男性 6 名女性 14 名、平均 MMSE 29.0±1.4)、健常志願者でアミロイド陽性と判定された 7 名（Preclinical AD: 平均年齢 73.7±8.5 歳、男性 4 名女性 3 名、平均 MMSE 27.9±2.0、平均 gCDR 0.29±0.27）を対象とした。

結果

(1) [^{18}F]FMM

YHV の SUVR は平均 1.14±0.08 であった。Others 群（AD + aMCI + OHC）は平均 1.66±0.48 であった。公開されている原法による SUVR 値と今回の SUVR 値の間の Pearson の相関係数 R は 0.981、p=0.000 と高い相関を示した。今回の YHV の平均 SUVR1.14 を 0, AD 群(n=18)の平均 SUVR2.02 を 100 とすると、CL 値 = 100×(個人 SUVR - 1.14)/(2.02 - 1.14) が[^{18}F]FMM の算出式となった（正式な CL 値にはさらに[^{11}C]PiB に換算する処理が必要)。

(2) [^{11}C]PiB

健常対照者(50 歳以上)の SUVR は平均 1.11±0.13 であった。AD/MCI 群は平均 2.24±0.57 であった。Preclinical AD 群は平均 1.63±0.50 であった。今回の平均 SUVR1.11 を 0, AD 群(n=16、gCDR1 以上)の平均 SUVR2.24 を 100 として、CL 値= 100×(個人 SUVR - 1.11)/ (2.24 - 1.11) により[^{11}C]PiB の CL 値を算出した。その結果、CL 値は健常群平均 0.4±11.8（最大 35.0, 最小-8.7)、AD+MCI 群 92.5 ± 50.2 （最大 171.0, 最小 5.3）、Preclinical 群は 45.7±44.0（最大 96.0, 最小-1.3）であった。CL 値と gCDR, MMSE との関連に関しては、AD+MCI 群 20 例では有意な相関(p<0.05)はなく、preclinical を含めた 27 例だと CL 値と gCDR との相関は R=0.50 (p=0.007)であった。CL 値と MMSE との有意な相関はみられなかった。

考察

[^{18}F]FMM に関して、Battle ら[2]は GAAIN の[^{18}F]FMM の同データを用いて、今回と同様の PMOD の pipeline や FreeSurfer を用いて解析した結果と、CL Project の原法である SPM8 を用いた解析の結果と比較して、殆ど違いがなかったことを報告している。今回の SUVR の結果も原法の値と高い相関を示した。[^{11}C]PiB に関しては、昨年度も重複するデータを解析したが、SPM12 を用いて部分容積補正や DARTEL による解剖学的標準化を行った上で PMOD の CL の関心領域を使用したため、AD で SUVR 値が高かった（平均 3.5)。CL 値を求めるならば、原法に近い処理の PMOD の pipeline で一貫するべきと思われた。また、CL 値としてはアミロイド陽性とした preclinical 群, 患者群ともばらつきが大きかったが、一部の CL 値が低いものは原画像を確認すると視察上 equivocal な症例ではあった。

CL 値と重症度との関連について、AD/MCI 群の中では相関はみられなかったが、preclinical を含めると、有意な相関が見られた。アミロイドの蓄積は発症前に始まり、発症時にはプラトーに達し、その後は変化に乏しいとされていることと合致する。なお、ごく最近、CL 値と髄液マーカー[3]や死後脳でのアミロイド病理[4]との関連についても報告

されつつあり、発症に至る過程の変化を含め今後のデータの蓄積が期待される。

結論

Centiloid値はアミロイドPETの簡便な定量指標として近年報告が増えている。本研究は本年度で終了するが、今回の手法を今後の複数のアミロイドPETのデータに適用し、視察読影および臨床症状との関連や経時的変化の検討を行っていきたい。

参考文献

1 Klunk, W. E. *et al. Alzheimers Dement* **11**, 1-15.e11-14, (2015).

2 Battle, M. R. *et al. EJNMMI Res* **8**, 107, (2018).

3 Salvado, G. *et al. Alzheimers Res Ther* **11**, 27, (2019).

4 La Joie, R. *et al. Alzheimers Dement* **15**, 205-216, (2019).

30-10 A study on standardization of acquisition and analysis of neuroimaging data in neuropsychiatric diseases

Hiroshi Matsuda

Integrative Brain Imaging Center, National Center of Neurology and Psychiatry

Clinical symptoms, measured by such as neuropsychological tests, have variation according to the condition of the subject being tested at that time, or a tester's capability. Neuroimaging comes to attract attention as an objective diagnosis method in recent years, and importance is attached to the field of image analysis. However, the image quality and its analytic method vary from institution to institution and from imaging equipment to imaging equipment. Therefore image acquisition technology and the image-analysis technique need to be standardized for a multi-center study. This study aims at performing this standardization in MRI and PET. If the objective findings resulting from the standardized image-analysis method are incorporated in the diagnostic criteria of neuropsychiatric diseases, it is expected that the evaluation of drug effects will become possible in a short period and with a small number of subjects.

We examined the effects of aging and gender on these network images of 160 men and 160 women with normal cognitive function. With age, betweenness centrality, clustering coefficient, and degree centrality decreased significantly in the thalamus, caudate nucleus, and anterior cingulate cortex. Path length was similarly reduced in the thalamus and caudate nucleus. The small-world characteristics also decreased with aging, but especially γ (the ratio of the clustering coefficients of the real network and the random network) and the small-world characteristics decreased more steeply in women. In a gender comparison of the four network indices, the clustering coefficient for women was higher in the left hippocampus and in the left parahippocampus than in men. Males showed higher degree values in a wide range including the thalamus and anterior cingulate cortex. The characteristic path length was higher in women in the thalamus, caudate nucleus, and anterior cingulate cortex. The betweenness centrality was higher in men over a wide area, including the anterior cingulate cortex and the hippocampus.

In the prediction of the degree of motor impairment using rsfMRI in the subacute phase of stroke (based on the calculation of functional connections between AAL / Freesurfer regions of interest), rsfcMRI time series from networks separated by dual regression based on independent component analysis (ICA) Information was extracted, and the characteristics of the time-varying patterns contributing to the discrimination between the disease group and the healthy group were extracted by machine learning, and it was examined whether the performance of discrimination could be improved. However, in the studies to date, no improvement has been observed compared to the method using the region of interest of AAL / Freesurfer. BOLD rsfcMRI was used to predict freezing feet in Parkinson's disease. Freezing index was correlated with the connectivity of basal ganglia and cerebellar networks

separated by ICA-based dual regression method.

Regarding ASL, the ability to detect abnormalities in children with developmental disorders was examined. The subjects were 33 cases diagnosed with autism (average 7.3 years, 2-14 years) and normal controls (average 8.6 years, 3-15 years). In autism cases, lower values were observed in the left islet gyrus, left upper parietal lobe, superior temporal gyrus and inferior frontal gyrus compared to controls. These are sites associated with mirror neurons, and were considered to be a result suggesting a decline in the function of the mirror neuron system in autism. Using a convolutional neural network to calculate the specific binding ratio of the striatum in the dopamine transporter SPECT, automatic calculation was possible without setting a region of interest.

The phase difference enhanced image PADRE is an imaging method that has recently been used in clinical MRI, but is a new technique for enhancing the tissue contrast in the brain by enhancing the phase difference. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), in which neurons in the primary motor cortex degenerate, is a degenerative disease that causes progressive motor dysfunction. It was named Zebra sign because it was recognized as having three or four layers. Since many patients with multiple system atrophy (MSA) also have pyramidal tract symptoms, we compared the relationship between this Zebra sign and clinical symptoms in both disease groups. The subjects were ALS, MSA and 26 controls, respectively. The Zebra sign was evaluated by MR in the disease and control groups. The results showed that 50% of the ASLs had a Zebra sign, and the Zebra sign positive group had a significantly higher upper motor neuron burden score than the negative group. In MSA, Zebra sign was positive in 23%.

To date, we have developed a new analysis method, Multiblock Sparse Multivariable Analysis, using the composite basis function method and the supervised learning method. Expand to have multiple brain image data per person. By integrating multiple data sets that had been analyzed individually until now, disease characterization and the like are performed simultaneously from various angles. Brain image analysis evaluates brain pathology from the aspects of brain morphology and function as a multimodal. In the actual US-ADNI data, the proposed method was applied to various combinations of data, such as MRI, SNP, and successive measurement MRI, and showed the feasibility and reasonable results. A detailed study revealed that the setting of tuning parameters was important for practical use. This method is developed by considering two weights in the image and between the images in the principal component analysis, and the interpretation of the result is relatively easy.

初　年　度　班

１－１　危険ドラッグによる有害作用の新規評価法開発に関する研究

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所・薬物依存研究部

舩田正彦

総括研究報告

1.　研究目的

本研究は、危険ドラッグの有害作用予測に関する効率的な評価技術の開発を目的としている。行動薬理学、電気生理および分子生物学的手法を駆使し、危険ドラッグによる生理機能変化および精神依存形成に関する発現メカニズムを検討し、有害作用評価に利用可能なシグナルを同定する。現在までに流通が確認されている合成カンナビノイド、オピオイド系化合物およびカチノン系化合物にターゲットを絞って研究を進める。

合成カンナビノイド：合成カンナビノイドについては、慢性使用による薬物依存形成、細胞毒性、情動に対する影響を検討する。合成カンナビノイド処置により薬物依存、行動異常、条件性恐怖記憶について各種実験動物モデルを作製し、脳内神経回路、機能タンパク質、神経伝達物質の変化を解析する。

オピオイド系化合物：オピオイド系化合物については、精神依存形成における機能タンパク質の変動を検討する。その変化に基づいて、精神依存を抑制する薬物の検索を実施し、新たな治療法を開発する。

評価技術：危険ドラッグの作用発現に関与する薬物受容体や機能タンパク質を同定し、行動変化や生体シグナル変化との関連を解析し、危険ドラッグの有害作用予測のための生体マーカー検索を実施する。薬物受容体発現細胞を利用した有害作用の検出手法、薬物受容体の結晶構造を利用したコンピュータシミュレーションによる解析について検討する。また、幻覚作用については、行動解析と脳内神経機能変化を含めた総合的な評価方法の開発を試みる。

本研究を通じて、危険ドラッグとして流通している合成カンナビノイドやオピオイド系化合物などの中枢神経作用発現の分子基盤に基づいた乱用危険性等の有害作用を評価する総合システムの確立を目指す。

2.　研究組織

主任研究者：
舩田正彦　　国立精神・神経医療研究センター

分担研究者：
栗原正明　　国際医療福祉大学・薬学部
橋本謙二　　千葉大学社会精神保健教育研究センター
三島健一　　福岡大学・薬学部・生体機能制御学教室
三輪秀樹　　国立精神・神経医療研究センター
関口正幸　　国立精神・神経医療研究センター

研究協力者
阿久根陽子、富山健一
　　国立精神・神経医療研究センター
湯山円晴　　国際医療福祉大学・薬学部
藤田有子　　千葉大学社会精神保健教育研究センター
入江圭一、佐野和憲、山下郁太
　　福岡大学・薬学部・生体機能制御学教室
國石　洋、竹内絵理
　　国立精神・神経医療研究センター

3.　研究成果

有害作用発現機序に関する研究

オピオイド系化合物：橋本らは、マウスにおけるモルヒネ精神依存に対する新規抗うつ薬R-ケタミンの効果を調べた。場所嗜好性試験を用いて、モルヒネの報酬効果に対するR-ケタミンの効果を調べた結果、R-ケタミンはモルヒネの報酬効果の形成を抑制することが判った。一方、R-ケタミン自体は、場所嗜好性試験において、報酬効果を示さなかった。本結果より、R-ケタミンはモルヒネ等のオピオイド系薬物の依存の治療薬として有効であることが示唆された。

合成カンナビノイド：関口らは、恐怖神経回

路に対する合成カンナビノイドの作用検討を実現するための光遺伝学的手法の開発を行なった。マウス大脳皮質聴覚野ニューロンに光で活性化する陽イオンチャネルであるチャネルロドプシン２（ChR2）を発現させ、この動物の扁桃体外側核錐体ニューロンから膜電流を記録しながら、波長 465nm の青色光を照射することにより、大脳皮質聴覚野から当該ニューロンへのシナプス伝達を誘発した。このシナプス伝達のうちグルタミン酸作動性シナプスの活動によるシナプス電流に対するカンナビノイド CB1 受容体アゴニストである合成カンナビノイド WIN55,212-2（WIN）の作用を検討した。聴覚野から扁桃体外側核錐体ニューロンへのグルタミン酸作動性シナプス電流は WIN により弱く抑制された。この抑制効果は用量依存的であった。このシナプス応答は合成カンナビノイドの恐怖神経回路に対する作用を検討する指標となることが期待される。

大麻成分：三島らは、大麻主要成分 Δ^9-テトラヒドロカンナビノール(THC)の連続投与が CB 受容体を介した薬理作用に与える影響を検討した。マウスに THC を 7 日間(1 日 1 回)腹腔内投与し、直腸温度を測定した。THC の単回投与は、THC 投与 1 時間後のマウスの直腸温度を有意に降下させ、用量依存的であった。次に、THC 連続投与の影響を検討した結果、3 日目において、THC による投与 1 時間後の直腸温度降下作用は減弱していた。さらに、7 日目まで THC を連続投与し続けた結果、THC による直腸温度降下作用は減弱したままであった。これらの結果より、THC の連続投与によって、THC による体温降下作用に耐性が形成されることを明らかにした。

評価技術に関する研究

栗原らは、カンナビノイド CB1 受容体のＸ線構造（5U09, 5TGZ, 5XRA）を用いて、合成カンナビノイドと CB1 受容体モデルとのドッキングスタディを行い、その評価関数(S)と実際の生物活性の相関を調べた。ドッキングスタディは統合計算化学システム MOE を用いて行った。合成カンナビノイド 37 種を用いてドッキングスタディを行い、評価関数(S)を求めた。解析の結果、合成カンナビノイドの活性予測の検討を行う際には 5XRA が適していることが分かった。

舩田らは、カンナビノイド CB1 および CB2 受容体発現細胞を作成し、54 種類の合成カンナビノイド benzoylindole 類の CB1 および CB2 受容体作用強度を解析した。その結果、benzoylindole 類は CB1 受容体を介して、有害作用を示す可能性が示唆された。予備検討として、CB1 受容体解析データに基づいて QSAR 解析による活性予測を行なったところ、CB1 受容体作用強度において相関性の高い計算式を得ることができた。CB1 受容体発現細胞による解析データを利用することで、合成カンナビノイドの化学構造に基づいた有害性の予測が可能であると考えられる。

三輪は、ドパミン作動性ニューロンの異常に着目した幻覚作用に関連する神経回路の解析を目指し、dopamine transporter (DAT)-Cre マウス(DAT 陽性細胞に組換え酵素 Cre が発現)と Rosa26-tdTomato レポーターマウスを交配させ、DAT 陽性細胞（基本的にはドパミン陽性細胞）を蛍光タンパク質 tdTomato で可視化し、脳内でのドパミン細胞の局在およびその神経終末の可視化を試みた。その結果、これまでの組織学的知見と一致し、腹側被蓋野 VTA や黒質において、tdTomato 陽性細胞の細胞体が確認でき、さらに線条体、視床背内側核 MD、前頭前野、島皮質において tdTomato 陽性の神経終末様構造が確認できた。本モデル動物は、ドパミン作動性ニューロンの異常の基づく幻覚作用発現機序の解明に有用であると考えられる。

4. 今後の研究の進め方について

有害作用発現機序：オピオイド系化合物の依存形成と多価不飽和脂肪酸の代謝過程に存在する可溶性エポキシド加水分解酵素の関連性を解析し、治療薬としての可能性を調べる。大麻成分および合成カンナビノイドについては、慢性投与による生理機能や恐怖神経回路への影響について、行動解析並びに電気生理学的手法による解析を進め、CB 受容体を起点とした細胞内情報伝達系の役割について検討していく予定である。

評価技術：カンナビノイド受容体のＸ線構造を用いて、薬物の結合様式の解析、ドッキングモデルの構築を行う。コンピュータシミュレーションと、CB1 および CB2 受容体発現細胞による解析データを蓄積し、合成カンナビノイドの化学構造に基づいた有害作用の予測精度を高める。また、「幻覚」の神経基盤の候補として、ドパミン作動性神経ニューロンに着目し、これらの神経回路を光遺伝学や化学遺伝学により活性あるいは抑制することで、異常行動の発現について検討する。さらに、マウスなどの齧歯類における「幻覚」作用を評価する行動測定系として、「ラバーテイル試験」の確立および改良を進める予定である。細胞による有害作用の評価

に加え、動物の生体シグナル(行動変化や電気生理学的神経活動変化)を利用した危険ドラッグによる情動変化などの中枢神経作用の行動薬理学的な評価システムを構築する予定である。

5. 倫理面における配慮の状況（生命倫理・安全対策等の遵守）

各研究テーマについては、「実験動物等の実施に関する基本指針」、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」および所属施設の小型動物実験倫理指針、組み換え DNA 実験内部規則等に準拠し、各施設の倫理委員会等の承認に基づいて実施されている。

合成カンナビノイドの有害作用および有用性評価

分担研究者　○舩田正彦 1),
研究協力者　　阿久根陽子 1)，富山健一 1)
　　高橋秀依 2)
1）国立精神・神経医療研究センター
　精神保健研究所　薬物依存研究部
2）東京理科大学　薬学部

【はじめに】

危険ドラッグの乱用が蔓延し、大きな社会問題となっている。最も多くの流通が確認されている危険ドラッグは、大麻の精神活性物質である Δ9-tetrahydrocannabinol (THC)と類似の作用を示す合成カンナビノイドである。合成カンナビノイドについては、JWH-018 をはじめとする naphthoylindole 類が多く検出されため、3-(1-naphthoyl)indole 構造に着目した包括指定が導入され、850 種類を超える化合物が規制に至った。一方、naphthoylindole 類以外では、RCS-4 をはじめとする benzoylindole 類が流通しており、各国でその規制が進んでいる。実際、RCS-4 については、2010 年以降、欧米で流通が確認され、わが国でも流通が拡大したため、2011 年（平成 23 年 9 月）より指定薬物として規制に至った。薬物の合成過程を考えた場合、benzoylindole 類については、容易にシリーズ合成が可能であるため、今後類縁化合物の登場が懸念される。

本研究では、合成カンナビノイドの作用評価及び薬物検出を目的とするカンナビノイド受容体強制発現細胞の樹立を試みた。本細胞を利用して、合成カンナビノイドの benzoylindole 類について、カンナビノイド受容体への作用強度、細胞毒性強度を解析し、有害作用の予測システムの構築を試みた。

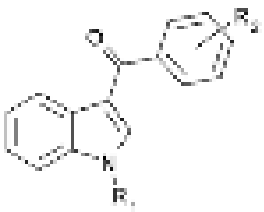


図 1　Benzoylindoles 構造式

【方　法】

カンナビノイドCB受容体作用の解析

CHO 細胞にヒト CB1 受容体もしくヒト CB2 受容体をトランスフェクションし、受容体発現安定細胞株として CHO-CB1 細胞および CHO-CB2 細胞を樹立した。この細胞を使用して、細胞内カルシウム濃度を測定した。96 穴ブラックプレート(BD Falcon)に 2.5×10^4cells/well となるように播種し、37℃・5.0%CO_2 条件下で培養した。24 時間後、Fluo-4 を 1 時間取り込ませ、合成カンナビノイド添加による蛍光強度の変化を、Flexstation II により測定した。合成カンナビノイドの AB-CHMINACA、JWH-018 および JWH-133 を標準薬として、54 種類の benzoylindole 類（R_1および R_2 置換体シリーズ）について解析を実施した。それぞれの薬物(30μM) 添加による蛍光強度(RFU)を検討した。

合成カンナビノイドの細胞毒性

薬物添加後の死細胞由来プロテアーゼ遊離を細胞毒性のマーカーとして解析した。細胞毒性の評価は CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay kit (Promega)を使用した。

【結　果】

CHO-CB1 細胞を利用して、CB1 受容体に対する作用を検討した。R_1 にアルキル鎖を有する構造において、炭素鎖の長さに依存して、CB1 受容体作用強度並びに細胞毒性作用が増加した。さらに、アルキル基の末端に F 置換を導入するとその強度はさらに増強された。一方、R_2 のハロゲン置換（I, Br, Cl）では影響がほとんど認められないものの、-OCH_3 基（特にメタ位かパラ位）の導入により、作用強度は増加した。また、CHO-CB2 細胞を利用して、CB2 受容体に対する作用を検討した結果、benzoylindole 類については、CB2 受容体への選択性が高い JWH-133 より強力な作用を有する化合物は存在しなかった。

【考　察】

本研究では、CB1 および CB2 受容体発現細胞を作成し、54 種類の合成カンナビノイド benzoylindole 類の CB1 および CB2 受容体作用強度を解析した。その結果、benzoylindole 類は、CB1 受容体を介して、有害作用を示す可能性が示唆された。予備検討として、CB1 受容体解析データに基づいて QSAR 解析による活性予測を行なったところ、CB1 受容体作用強度において相関性の高い計算式を得ることができた。CB1 受容体発現細胞による解析データを利用することで、合成カンナビノイドの化学構造に基づいた有害性の予測が可能であると考えられる。

受容体とのドッキングスタディによる危険ドラッグのインシリコ活性予測

分担研究者　○栗原正明
研究協力者　　湯山円晴
　　国際医療福祉大学　薬学部

【はじめに】

これまで危険ドラッグのインシリコ活性予測には定量的構造活性相関（QSAR）が使われてきた。我々もQSAR法により危険ドラッグの包括規制を行ってきた。

本研究では、カンナビノイド受容体を初めとする危険ドラッグのターゲット受容体とリガンドのドッキングスタディにより危険ドラッグ等の違法薬物のインシリコ活性予測法の開発を行う。

近年、カンナビノイド受容体（ＣＢ１）のＸ線構造解析が行われた。これを用いて、合成カンナビノイドとＣＢ１とのドッキングスタディを行い、その評価関数と実際の生物活性の相関を調べる。また、フェンタニル類縁体とオピオイドμ受容体のドッキングスタディによる活性予測を行う。さらにQSARによる活性予測との比較を行うことも考えている。

【方　法】

カンナビノイド受容体の構造

CB1受容体は結晶構造が解析されている5U09[1)], 5TGZ[2)], 5XRA[3)]のタンパク質構造をプロテインデータバンク(以下：PDB)からダウンロードし使用した。

リガンドの選択

使用する合成カンナビノイドのデータは構造に類似性があるJ. W. Huffman教授のチームが合成したJWHから始まる合成カンナビノイド154種[4)]を候補とし、154種のうち、Ki値が＞10000nMとなっている正確な値が不明なものを除いた。また、より顕著な傾向を調べるため、Δ9-THCを比較対象とし各受容体へのKi値がΔ9-THCのKi値の10倍超または1/10未満のものを取り上げた。その結果CB1受容体では37種、CB2受容体では41種がドッキングの対象となった。（Δ9-THC　CB1：Ki＝42ｎM　CB2：Ki＝36ｎM）

ドッキングスタディ

ドッキングスタディは統合計算化学システムMOEを用いて行った。立体構造データの前処理としてStructure Preparationで構造安定化、Energy Minimizationで水素エネルギー最小化を行った。Site finderで構造からリガンドが結合しうる場所を、Dummy-siteとして登録した。

【結　果】

5TGZを用いた場合、S値（横軸）と予測Ki値（縦軸）との間に相関性は見られなかった。5XRA、5U09ではΔ9-THCを中心にグラフを4分割した時、右上部と左下部に分かれる傾向があった。（図１）

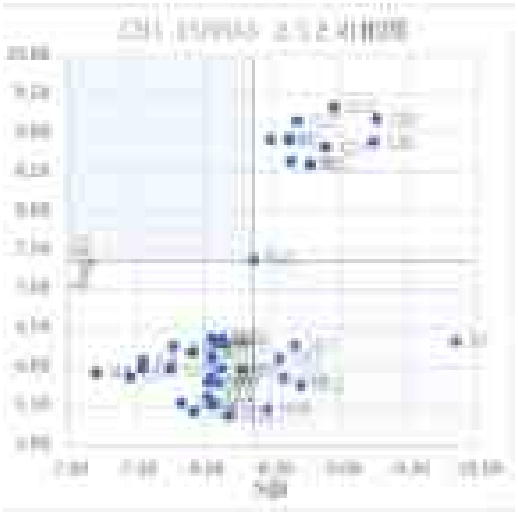


図１

【考　察】

今回使用した設定ではドッキングを用いてMOEのS値からKi値の定量的な予測を行うことは難しいことが分かった。今後、設定等を検討していくことが必要である。しかし今後ドッキングを用いて活性予測の検討を行う際には5XRAが適していることが分かった。

1. *Nature*, 2016, 540, 602-606.
2. *Cell*, 2016, 167, 750-762.
3. *Nature*, 2017, 547, 468-471
4. *Bioorganic & Medical Chemistry* ,2012, 20, 2067-2081

オピオイド系薬物による精神障害の治療法の開発

分担研究者　○橋本謙二
研究協力者　　藤田有子

国立大学法人　千葉大学
社会精神保健教育研究センター

【はじめに】
米国では鎮痛薬で使用されているオピオイド系薬剤の大量服薬で多くの方が死亡しており、大きな社会問題になっている（1,2)。しかしながら、オピオイド系薬剤の依存に対する有効な治療薬は現在のところ無い。
最近我々は、麻酔薬ケタミンの光学異性体であるR-ケタミンが、新規抗うつ薬になる事を報告した（3,4)。本研究は、オピオイド系薬剤の依存などの有害作用に対する治療法を開発することを目的で、モルヒネの報酬効果に対するR-ケタミンの効果を検討した。

【方　法】
実験には 9～12 週齢の ddY 雄性マウス（日本エスエルシー株式会社）を使用した。場所嗜好性試験（CPP）の測定は、Suzuki らの方法（5）に準じて行った。生理食塩水（10 ml/kg)あるいは R-ケタミン(10 and 20 mg/kg)を投与し 30 分後にモルヒネ塩酸塩(5 mg/kg)あるいは生理食塩水（10 ml/kg)を投与し、その後白または黒のボックスに 60 分間閉じ込め、条件付けを行った。薬物処置側ボックスの滞在時間から溶媒処置側ボックスの滞在時間を差し引いた値を CPP スコアとした。

【結　果】
場所嗜好性試験（CPP）より、モルヒネ 投与による場所嗜好性の増加が観察され、R-ケタミンの前投与は、モルヒネ投与による場所嗜好性の増加を有意に抑制した。一方、R-ケタミン単独投与は、生理食塩水投与群と同等で場所嗜好性を増加しなかった。

【考　察】
本研究において、R-ケタミンは、モルヒネの報酬効果を予防することが判り、オピオイド系の薬物依存症の治療薬として可能性がある。また既報（6,7）と同様、R-ケタミンは、報酬効果を示さないことから、R-ケタミンの薬物依存の可能性は低いと考えられる。

文献

1. Volkow ND, Collins FS. The role of science in the opioid crisis. N. Eng. J. Med. 2017; 377(18): 1798.
2. Volkow ND, Blanco C. The changing opioid crisis: development, challenges and opportunities. *Nol. Psychiatry*2020. Feb. 4. doi: 10.1038/s41380-020-0661-4.
3. Hashimoto K. Rapid-acting antidepressant ketamine, its metabolites and other candidates: A historical overview and future perspective. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2019; 73(10): 613-627.
4. Hashimoto K. Molecular mechanisms of the rapid-acting and long-lasting antidepressant actions of (R)-ketamine. *Biochem. Pharmacol.* 2020; 177: 113935.
5. Suzuki T, et al. Effects of the non-competitive NMDA receptor antagonist ketamine on morphine-induced place preference in mice. *Life Sci.* 2000;67(4): 383-389.
6. Yang C, et al. R-ketamine: a rapid-onset and sustained antidepressant without psychotomimetic side effects. *Transl. Psychiatry* 2015;5:e632.
7. Chang L, et al. Comparison of antidepressant and side effects in mice after intranasal administration of (R,S)-ketamine, (R)-ketamine, and (S)-ketamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2019;181:53-59.

大麻受容体を介した薬理作用の解析

分担研究者　○三島健一
研究協力者　　入江圭一、佐野和憲、
　　山下郁太
　福岡大学　薬学部
　生体機能制御学教室

【はじめに】

大麻主要成分（Δ^9-tetrahydrocannabinol, THC）は、生体内の大麻受容体（カンナビノイド受容体、CB 受容体）を介し、様々な薬理作用を示す。また、CB 受容体には生体内リガンドが存在しており、1992 年に Devane らによりブタの脳から N-Arachidonoylethanolamide（Anandamide, AEA）が同定され（Devane et al., Science 258:1946-1949, 1992）、1995 年に Sugiura らによりラットの脳、Mechoulum らによりイヌの小腸から 2-Arachidonoylglycerol（2-AG）が同定された（Sugiura et al., Biochem Biophys Res Commun 215:89-97, 1995）。分担研究者らは大麻関連化合物が示す薬理作用に焦点をあてて研究してきた。ラットやマウスの CB 受容体を刺激することで、摂食亢進、直腸温度低下、不安（高架式十字迷路）、抑うつ状態（強制水泳）、被刺激性（驚愕反応）、感覚運動情報制御機構などを観察してきた。また、CB 受容体の内因性リガンドの 1 つである 2-AG に着目し、マウスが脂質を多く含む食（高脂肪食）を摂食し続けた時に、脳内の 2-AG が増加することを明らかにした。加えて、個別に飼育（単独隔離飼育）した後、THC を投与すると単独隔離飼育した動物について、THC は CB 受容体を介した攻撃行動を誘発した。そのため、CB 受容体を介して発現する薬理作用は、生体がおかれた状況によって影響を受けやすいことが予想された。

大麻は、同一人が同一量を服用しても作用が大きく異なることが知られている。その作用が一定でない原因は、服用者の期待感、性格、生活歴、摂取時の環境や気分、用量、代謝酵素の量などが関与していると考えられているが、科学的根拠は少ない。本課題は、分担研究者らが現在まで CB 受容体と生体内リガンドについて明らかにしている知見に基づき、摂食や飼育環境の変化、THC の連続投与が大麻関連化合物の薬理作用に与える影響を検証した後、その制御機構を明らかにする予定である。本年度はマウスを用いて、THC の連続投与が CB 受容体を介した薬理作用に与える影響を検討した。

【方　法】

実験動物

実験動物には 30～45 g の ICR 系雄性マウス（九動; 佐賀）を用いた。マウスは、プラスチックケージの中に、室温 23±2 ℃、湿度 60±2 %, および 12 時間の明暗サイクル（7:00AM 点灯）の動物室で飼育した。なお、餌には、CE-2（日本クレア 株式会社 東京）を用い、水と共に自由に摂取させた。実験動物の取り扱いについては、福岡大学動物実験委員会（Experimental animal care and use committee）に準じた。

マウスの体温の測定

マウスの体温は、動物体温記録計（マウス用体温記録計 : KN-91-AD1687-M、マウス用プローブ : AX-KO4746-100、A&D, Inc.）を用いて測定した。室温条件下で、マウス専用のプローブを肛門から約 1 cm 挿入し、直腸温度を 30 秒間記録した。また、マウスにプローブを挿入する際、潤滑油としてグリセリンを用いた。THC は、マウスに 7 日間毎日、腹腔内投与した。THC を投与してから 2 時間目まで、マウスの直腸温度を経時的に測定し、7 日目まで実施した。

【結　果】

THC の単回投与は、投与 1 時間後をピークにマウスの直腸温度を約 2℃ほど有意に低下させ、2 時間後には正常体温にまで回復した。その THC による直腸温度降下作用は、用量依存的にあった。一方、THC の連続投与は、THC 投与 3 日目において、直腸温度降下作用を減弱させた。その後、7 日目まで THC を連続投与した結果、直腸温度降下作用は減弱したままであった。

【考　察】

本課題により、THC を連続投与することで、THC 投与開始 3 日目以降、体温降下作用に耐性が形成されることを明らかにした。今後、薬理学的、分子生物学的手法を用いて、THC の体温効果作用が減弱する機構を明らかにする予定である。本課題の成果によって、大麻を使用した経験、摂食、環境によって CB 受容体を介した薬理作用が変化する事実は、大麻が示す作用の不安定さを表すエビデンスとなりうるため、有害作用の評価基準の策定に向けて有用な情報であると考えられる。

合成カンナビノイドの有害作用および有用性評価

分担研究者　○三輪秀樹
国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所　精神薬理研究部

【はじめに】中枢神経系において、合成カナビノイドの作用点は主に CB1 受容体を介して行われ、その薬物作用として、幻覚などが生じていると考えられている。しかしながら、「幻覚」の神経基盤は明らかにされていない。視床は感覚ゲーティング機能を担っており、幻覚・妄想などの陽性症状を主訴とする統合失調症患者において、視床の機能異常が報告されている（Koshiyama, Sci Rep, 2018）。したがって、合成カナビノイドによる幻覚作用も視床神経回路を介して生じている可能性がある。さらに、アンフェタミンなどの中枢神経系興奮薬の作用機序として、ドパミン神経系が知られている。ドパミン作動性神経系は広範囲投射系として、視床や大脳皮質など広範囲の脳部位に投射し、神経機能を修飾していると考えられている。以上を背景とし、視床-皮質神経回路に着目しながら、「幻覚」の神経基盤を目指すことが本研究の目標である。具体的には、脳波よる周波数解析（特に統合失調症でも着目されているデルタ波とスピンドル波）や多点電極を用いた個々の神経活動動態の解析およびマウスなどの実験動物を用いた「幻覚」を評価する行動測定系の確立を目指し、合成カナビノイドの危険性の評価に資する研究を行う。

【方　法】(1)「幻覚」作用の神経基盤を明らかにするために、その候補としてドパミン作動神経系に着目した。古くから免疫組織学的にドパミン神経回路を明らかにされてはいるが、その神経終末を網羅的かつ正確に解析するのは困難であった。そこで、米国 Jackson laboratory 社から DAT-IRES-Cre(DAT; dopamine transporter ; DAT 陽性細胞に組換え酵素 Cre が発現）マウスおよび Ai9 マウス（Rosa-CAG-LSL-tdTomato マウス）を購入・交配し、DAT 陽性細胞（基本的にはドパミン陽性細胞）を蛍光タンパク質 tdTomato で可視化し、脳内でのドパミン細胞の局在およびその神経終末の可視化を試みた。その結果、これまでの組織学的知見と一致し、腹側被蓋野 VTA や黒質において、tdTomato 陽性細胞の細胞体が確認でき、さらに線条体、視床背内側核 MD、前頭前野、島皮質において tdTomato 陽性の神経終末様構造が確認できた（当初の計画では、視床網様核も tdTomato 陽性神経終末が観察されることを期待していたが、残念ながら明確なシグナルは検出できなかった)。ドパミン作動性ニューロンの異常は統合失調症に関連することが古くから指摘され、幻覚作用を持つアンフェタミンなどはドパミンの放出および再取り込み機構に作用すると考えられているため、これらを元に幻覚作用に関連すると考えられる神経回路の候補として、今後の解析対象と考えている。(2)「幻覚」作用をマウスなどの実験動物で評価する新たな行動測定系として、「ラバーテイル試験」（Wada et al., 2016）の確立・改良を試みた。(3)「幻覚」作用の神経基盤の実体を将来的に明らかにすることを目標としており、そのためには、in vivo において個々の神経活動を記録・解析することが必要であると考えており、その測定系の習得に取り組んだ。

【結　果】(1)tdTomato 陽性シグナルが観察される細胞体が主に観察されたのは、側坐核や腹側被蓋核であり、今までのドパミン神経細胞の局在と一致しており、この評価システムが機能していることが示唆された。さらに、tdTomato 陽性シグナルが観察された神経終末は前頭前野や視床の一部や島皮質であった。分担研究者の予想に反して、視床網様核（感覚運動ゲーティングに関与すると考えられている）には tdTomato 陽性シグナルがあまり観察されなかった。(2)ラバーテイル幻覚試験に関する既報（Wada et. al., 2016）を参考に装置を作成した。この先行研究の行動実験装置には改善余地が多く見受けられ、その点に関して、マイクロコンピューターArduino を用いて、自動化によるタスク制御を試み、良好な結果を得ている。(3)多点電極記録に関して、米国 MIT の Michael Halassa 博士との共同研究により、解析方法の導入を行った。

【考　察】本研究は、実験動物を用いた新規危険ドラッグの「幻覚」作用評価系を確立することを目指した研究計画である。研究計画初年度として、次年度以降の研究の土台となる研究ツールを確立でき、順調に研究が遂行できていると考えている。「幻覚」作用に関するマウスなどの実験動物を用いた評価系の確立は、「幻覚」は統合失調症などを含む複数の精神疾患・神経疾患で見られる症状であり、この症状を寛解・治療する治療薬は開発されていないため、本研究成果は、薬物依存症の治療薬だけでなく、統合失調症などの治療薬の開発にも貢献できることが期待できる。

合成カンナビノイドのシナプス伝達と行動に対する作用

分担研究者　○関口正幸
研究協力者　　國石　洋、竹内絵理
国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　疾病研究第 4 部

【はじめに】

危険ドラッグの主要成分として合成カンナビノイドが同定されている。一方、内因性カンナビノイドは人にも存在し、脳内では神経終末からの神経伝達物質放出を制御する生理的役割を担っていることが知られている。合成カンナビノイドは本来内因性カンナビノイドが用いている受容体やキャリアなどを利用してその生物活性を発揮している可能性がある。

本研究ではまず、合成カンナビノイドが脳における主要な興奮性シナプスであるグルタミン酸作動性シナプス伝達に作用するか否かを電気生理学的に明らかにすることを目的とする。

この目的のために情動中枢扁桃体の錐体ニューロンにおいてグルタミン酸作動性シナプス伝達を記録し、このシナプス伝達に対するカンナビノイド CB1 受容体のアゴニストである合成カンナビノイド（研究用試薬）の作用を検討する。

一方、行動の変化はその行動に重要な神経回路内のシナプス伝達の変容を伴う場合があることが知られている。上述の扁桃体シナプスの場合、恐怖条件付け行動パラダイムにより形成される「恐怖記憶」への関与が示唆されていることを考慮し、合成カンナビノイドの恐怖記憶に関する作用を検討する。

【方　法】

恐怖条件付け行動試験の脳内神経回路はここ半世紀ほどの研究によりほぼ明らかになりつつある。そこで、シナプス伝達に対する合成カンナビノイドの作用を検討する場合、恐怖記憶と関係のあるシナプスを選択的に調べることにより行動との相関をより考えやすくなる。このためには入力（プレ）—出力（ポスト）関係が明白なシナプス伝達を単離して記録する必要があり、このためには最近開発され頻用されている「光遺伝学」の使用が有効である。

我々は、音依存性恐怖記憶の条件刺激を仲介するシナプスの一つと考えられている大脳皮質聴覚野から扁桃体外側核へのグルタミン酸作動性シナプス伝達を光遺伝学的に抽出し、このシナプス伝達に対する合成カンナビノイドの作用を検討した。

具体的には、マウス大脳皮質聴覚野ニューロンに光により活性化する陽イオンチャネルであるチャネルロドプシン２（ChR2）を発現させ（AAV ベクターの脳局所注入法）、このマウスの扁桃体外側核錐体ニューロンから膜電流を記録しながら、波長 465nm の青色光を照射することにより、大脳皮質聴覚野から当該ニューロンへのシナプス伝達を誘発した。このシナプス伝達のうちグルタミン酸作動性シナプスの活動によるシナプス電流に対するカンナビノイド CB1 受容体アゴニストである合成カンナビノイド WIN55,212-2（以下 WIN）の作用を検討した。

【結　果】

光遺伝学的に単離された聴覚野から扁桃体外側核錐体ニューロンへのグルタミン酸作動性シナプス電流は、テトロドトキシンにより完全に抑制され、この抑制中に 4-アミノピリジンを投与することにより回復するというこれまでに他のシナプスで報告されている投射部位でのプレシナプス ChR2 活性化によるシナプス伝達の性質を有していた。

このシナプス伝達は WIN により弱くではあるが抑制され、この抑制効果は容量依存的であった（0.3 μM で平均約 2%の抑制、3 μM で約 10%の抑制、10μM で約 15%の抑制）。

音依存性恐怖条件付け行動試験における WIN の作用は現在検討中である。

【考　察】

CB1 受容体はグルタミン酸シナプスのプレ側に存在し、伝達物質グルタミン酸の放出をマイナスに制御することが知られている。扁桃体にも CB1 受容体は高発現しており、WIN は CB１受容体のアゴニストであるので、今回得られた WIN によるグルタミン酸作動性シナプス電流の抑制はこのマイナス制御を反映していると思われた。

ただし、WIN は合成カンナビノイドではあるものの研究用試薬であり、これまでこれを主成分とする危険ドラッグは見出されていないと思われる。したがって、今後は既に危険ドラッグの成分であることが同定されている合成カンナビノイドを用いて同様の電気生理学的、行動学的検討を行うことが必要と思われる。

1-1

Title: Study on development of a new method for detecting adverse reactions to new psychoactive substances

Masahiko Funada, Ph.D.

Department of Drug Dependence Research, National Institute of Mental Health
National Center of Neurology and Psychiatry

Opioids: Hashimoto et al. reported that pretreatment with the antidepressant ketamine abolished morphine-induced rewarding effects in mice, suggesting that ketamine may be effective as a therapeutic agent for morphine dependence.

Synthetic cannabinoids: Sekiguchi et al. labeled one of the inputs that transfers the "condition stimulation" of condition-related fear memory by locally administering an adeno-associated virus vector incorporating Channelrhodopsin-2 to the auditory region of the mouse. Next, they isolated the synapse reply from the auditory region to the lateral amygdaloid nucleus by preparing brain slices including the amygdaloid body and irradiating 465-nm light onto them during patch-clamp recording from neurons in the lateral amygdaloid nucleus. They found that this synapse reply could be used as an index for examining the action of synthetic cannabinoids on the neural fear circuit.

Δ^9-tetrahydrocannabinol (THC): Mishima et al. investigated the effect of continuous administration of a major component of cannabis THC on cannabinoid (CB) receptor-mediated pharmacological action. They found that the hypothermic effect of THC was attenuated by chronic THC administration. From these results, it was clarified that the continuous administration of THC leads to the development of tolerance to the hypothermic effect of THC.

Evaluation techniques: Kurihara et al. conducted a docking study of synthetic cannabinoids using the X-ray structure (5U09, 5TGZ, 5XRA) of cannabinoid receptor type 1 (CB_1), and examined the correlation of the evaluation function with the actual biological activity. The docking study, which used 37 kinds of synthetic cannabinoids, obtained the evaluation function, and reported that 5XRA was suitable for the study of activity prediction. Funada et al. prepared cells expressing CB_1 and CB_2 and analyzed their potency for 54 synthetic cannabinoid benzoylindoles by quantitative structure–activity relationship analysis. They found that benzoylindoles may exert an adverse effect via CB_1. It is considered possible to predict toxicity based on the chemical structure of synthetic cannabinoids by using the analysis data obtained from cells expressing CB_1. Miwa created an animal model for analyzing neural circuits related to hallucination with a focus on the abnormality of dopaminergic neurons. In the animal model, dopamine transporter-positive cells were visualized using the fluorescent protein tdTomato, which enabled localization of dopamine cells in the brain and visualization of their nerve endings. This animal model is considered to be useful for elucidating the mechanism of hallucinogenic action based on the abnormality of dopaminergic neurons.

How to proceed with our study in the future

Mechanism of adverse effects: We plan to investigate the relationship between the formation of opioid dependence and the presence of soluble epoxide hydrolase in the metabolic processes of polyunsaturated fatty acids, as well as its possibility as a therapeutic drug. Furthermore, the effects of chronic administration of synthetic cannabinoids or THC on physiological functions and neural fear circuits, and the role of the intracellular signal transduction system originating from CB receptors will be analyzed using behavioral and electrophysiological methods.

Evaluation techniques and technology: Using the X-ray structure of CB_1, we will analyze the binding mode of drugs and construct a docking model. We also aim to predict adverse effects based on the chemical structure of synthetic cannabinoids by accumulating computer simulations and data from cells expressing CB_1 and CB_2. In addition, we plan to construct a system that uses biological signals (behavioral and electrophysiological nerve activity changes) for evaluating emotional changes caused by new psychoactive substances.

課題番号: 1-2

研究課題名: 薬物使用障害に対する多様な治療法の開発

主任研究者: 松本俊彦（NCNP 精神保健研究所薬物依存研究部部長）
分担研究者: 嶋根卓也, 近藤あゆみ, 船田大輔, 村上真紀, 宇佐美貴士, 今村扶美, 森田三佳子

1. 研究目的

本研究班の目的は、すでに我々が開発した薬物依存症集団療法（SMARPP）ではカバーできない様々な問題――すなわち、併存精神障害や感染症、性差などの個別的要因、および、治療セッティングを含めた多様なニーズ――を抱える薬物使用障害患者に対する治療法を開発することである。

2. 研究方法

本研究班では、以下の 7 つの分担研究開発課題を設定し、個別的配慮を要する集団の臨床的特徴と治療上の配慮点を明らかにするとともに、SMARPP の代替となる治療プログラムの開発を進めている。

- 「HIV 感染症を伴う薬物使用障害の臨床的特徴と治療・回復支援に関する研究」（分担: 嶋根卓也, 精神保健研究所薬物依存研究部）
- 「薬物使用障害の治療転帰に関する個別的要因の影響に関する研究」（分担: 近藤あゆみ 精神保健研究所薬物依存研究部）
- 「薬物使用障害に対する精神科救急病棟での短期治療プログラムの開発に関する研究」（分担: 船田大輔, 病院第 2 精神診療部）
- 「発達障害を伴う薬物使用障害の臨床的特徴と治療法に関する研究」（分担: 村上真紀, 病院第 1 精神診療部）
- 「ベンゾジアゼピン受容体作動薬使用障害の臨床的特徴と治療法に関する研究」（分担: 宇佐見貴士, 病院第 1 精神診療部）
- 「薬物使用障害に対する個人心理療法の開発とその効果に関する研究」（分担: 今村扶美, 病院臨床心理部）
- 薬物使用障害に対する作業療法プログラムの開発と効果に関する研究」（分担: 森田三佳子, 病院精神リハビリテーション部）

3. 研究結果と考察

今年度の本研究では、当院薬物依存症専門外来における治療関係を 1 年間継続する者の多くで薬物使用障害の重症度が改善することが示された一方で、従来の治療法では十分な効果が得られず、個別性への配慮を要する集団が同定された。その 1 つが、精神障害併存症例である。本研究班では、統合失調症スペクトラム障害および他の精神病性障害群、双極性障害および関連障害群、解離症群／解離性障害群を併存する者では、既存の治療法では十分な治療効果が得られない可能性が示唆された（近藤分担班）。また、薬物使用障害患者のなかには、3〜4 割程度、発達障害の併存が疑われる者もおり、やはり個別性への配慮を要する集団と考えられた（村上分担班）。そしてもう 1 つの集団が、性・ジェンダーへの配慮を要する集団である。覚せい剤使用はしばしばHIV感染リスクを伴う危険な性的活動と関連するが、その関連の詳細には性差があり、治療に際しては配慮を要する可能性が示唆された（嶋根分担班）。

一方、本研究班では、既存の薬物依存症集団療法に代わる治療法として、精神科急性期病棟における短期入院治療プログラム（FARPP）（船田分担班）、集団作業療法プログラム（リアル生活プログラム）の開発も行い、前二者についてはすでに効

果検証を実施中である。個人心理療法プログラムについては、院内の多部署・多職種が協働して評価・参加登録をするシステムを整備するとともに、既存の集団プログラムを援用するかたちで少数例を試行する段階にとどまった。

4. 結論

本研究班では、既存の集団療法では十分にカバーではない集団を同定し、その臨床的特徴を明らかにしつつある。また、これに併行して、既存治療の代替オプションとなりうる、いくつかの新しい治療法の開発・効果検証、あるいは実施体制の整備を進めている。

5. 研究発表

1. Daisuke Funada, Toshihiko Matsumoto, Yuko Tanibuchi, Yasunari Kawasoe, Satoru Sakakibara, Nobuya Naruse, Shunichiro Ikeda, Takashi Sunami, Takeo Muto, Tetsuji Cho：Changes of clinical symptoms in patients with new psychoactive substance (NPS)-related disorders from fiscal year 2012 to 2014: A study in hospitals specializing in the treatment of addiction. Neuropsychopharmacology Reports. 2019; 1–11.doi: 10.1002/npr2.12053.
2. Ayumi Takano, Sachiko Ono, Hayato Yamana, Hiroki Matsui, Toshihiko Matsumoto, Hideo Yasunaga, Norito Kawakami: Factors associated with long-term prescription of benzodiazepine: a retrospective cohort study using a health insurance database in Japan. BMJ Open 2019; 9:e029641. doi:10.1136/bmjopen-2019-029641
3. Ayumi Takano, Yuki Miyamoto, Tomohiro Shinozaki, Toshihiko Matsumoto, Norito Kawakami: Effect of a web-based relapse prevention program on abstinence among Japanese drug users: A pilot randomized controlled trial. Journal of Substance Abuse Treatment. 111: 37-46, 2019.
4. 松本俊彦, 高野歩, 熊倉陽介, 宇佐美貴士, 伴恵理子, 窪田和巳: 保護観察の対象となった薬物依存症者のコホート調査システムの開発：「Voice Bridges Project」. 更生保護学研究 2019; 14: 3-18.
5. 大宮宗一郎, 谷渕由布子, 石田惠美, 柳友里, 山口拓洋, 藤井実, 吉永宏太朗, 林偉明, 関谷希望, 田畑聡, 白川雄一郎, 堀口忠利, 森田展彰, 斎藤環, 奥村太一, 近藤あゆみ, 松本俊彦：精神保健福祉センターにおいて薬物再乱用防止プログラムを提供することの意義―プログラム参加時点の参加者の特徴を踏まえた考察－. 日本アルコール・薬物医学会雑誌 54(3) ：120-135, 2019.
6. 高木のり子, 太田晴久, 池田明広, 高塩理, 松本俊彦：多職種チームによる個別介入とワークブックを用いた認知行動療法をワンパッケージ化したプログラムの実践―うつ病とアルコール問題を併せ持つ者への介入法の検討から―. 精神科治療学 34(11): 1323-1330, 2019.
7. 嶋根卓也, 高橋哲, 竹下賀子, 小林美智子, 高岸百合子, 大宮宗一郎, 近藤あゆみ, 高野洋一, 山本麻由子, 松本俊彦: 覚せい剤事犯者における薬物依存の重症度と再犯との関連性：刑事施設への入所回数からみた再犯. 日本アルコール・薬物医学会雑誌 54(5): 211-221, 2019.

6. 知的所有権の取得状況

なし

7. 自己評価

本研究班は、病院多職種も含めた「All NCNP」の分担構成とした分、研究に不慣れた者もおり、当初の計画よりはおお研究活動の進捗は遅れている。次年度は作業ペースを上げていきたい。

HIV 感染症を伴う薬物使用障害の臨床的特徴と治療・回復支援に関する研究

嶋根卓也(国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所薬物依存研究部)

1. 研究目的

薬物依存臨床ではHIV感染症を伴う薬物使用障害患者が散見されるが、HIV 感染およびHIV感染の背後にある危険な性行動と薬物使用障害との関連についての知見は、国内では非常に限られている。今年度は、HIV 感染の背後にある危険な性行動に着目し、薬物依存との関係を検討した。

2. 研究方法

法務省法務総合研究所との共同研究により、覚せい剤取締法違反による新規受刑者のデータベースを得た。調査期間は 2017 年 7 月 11 月であり、全国 78 施設の刑務所（医療刑務所を除く）に新たに入所した計 699 名の受刑者（男性 462 名、女性 237 名）が対象であった。次の 4 つの指標を用いて危険な性行動を評価した。

1. Inconsistent condom use（生涯）
2. Multiple sexual partners（1 年以内）
3. STD infection history（生涯）
4. Trading sex for drugs（1 年以内）

これらの指標は互いに相関し、かつ等価であるという仮定をおき、一般化推定方程式（the generalized estimating equation , GEE)によるロジスティクス回帰分析を行い、覚せい剤使用との関係を調べた。

研究実施にあたっては、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得た(A2017-107)。

3. 研究結果

危険な性行動の経験率は、Inconsistent condom use（男性 78.4%、女性 81.7%)、Multiple sexual partners（男性 61.3%、女性 41.3%)、STD infection history(男性 14.1%、女性 23.6%)、Trading sex for drugs（男性 15.6%、女性 17.7%）であった。GEE ロジスティクス回帰分析の結果、性交時の覚せい剤使用は、男性受刑者(AOR= 5.86; 95%CI= 3.41-10.07)、女性受刑者(AOR= 2.58; 95%CI= 1.33-5.00)の両方において、危険な性行動のリスクを有意に上昇させていた。また、女性受刑者においては、注射器の共有経験(AOR=1.60; 95%CI= 1.06-2.42)も危険な性行動のリスクを有意に上昇させていた。

4. 考察

性交時の覚せい剤使用は、脳内のドーパミンレベルを相乗的に上昇させ、危険な性行動につながっている可能性がある。一方、女性受刑者は男性配偶者・恋人・性的パートナーからの誘いにより覚せい剤使用を開始・継続することや、日本国内では欧米諸国のようにハームリダクションに基づく注射器交換プログラムが存在しないことを踏まえると、女性受刑者は特定の性的パートナーと薬物および注射器の両方を共有している可能性が示唆された。

本研究の知見は、刑事施設内において薬物依存治療プログラムを提供する際には、HIV 感染につながる危険な性行動と薬物使用との関係についても情報提供することの必要性を示している。

薬物使用障害の治療転帰に関する個別的要因の影響に関する研究

近藤あゆみ（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所薬物依存研究部）

1. 研究目的

集団認知行動療法 SMARPP の普及に伴い、精神科病院における薬物依存症治療の幅は広がったが、今後は、SMARPP 以外の付加的な治療を必要とする患者に提供する治療や支援の方法も確立していく必要がある。そこで、薬物依存症専門外来を受診した薬物使用障害患者の治療転帰に影響を与える要因を明らかにし、将来的には治療反応性別の臨床類型とその対応ガイドラインの開発を目的とする研究を実施した。

2. 研究方法

2017 年 1 月から 2018 年 12 月までの 24 ヶ月間に国立精神・神経医療研究センター薬物依存症外来（以下、NCNP 薬物依存症外来）を受診した新規患者 226 名のうち、NCNP 薬物依存症外来における治療の継続と研究参加に対して自発的に同意した者は 121 名であった。そのうち、治療開始から 1 年後に治療を継続しており、かつ、登録時と 1 年後の 2 時点における情報が得られた 31 名を分析対象とした。2 時点における薬物依存重症度は Addiction Severity Index コンポジットスコア（ASICS）により評価した。

3. 研究結果

対象者における治療開始時および 1 年後の ASICS 平均値はそれぞれ 0.29（SD=0.18）、0.16（SD=0.13）であり、治療開始から 1 年後の薬物依存重症度には有意な改善が認められた（t=3.332，p=0.002）。次に、ASICS の 2 時点における変化の程度によって対象者を群分けしたところ、以下の 3 群に分類された。1 群目は、治療開始時に重症度が低く 1 年後もそれを維持していた「良好維持群（6 名）」、2 群目は、1 年後の ASICS が治療開始時と比較して減少した「改善群（20 名）」、3 群目は、1 年後の ASICS が治療開始時と比較して増加した「増悪群（5 名）」である。治療開始時に得られた情報について「改善群（20 名）」と「増悪群（5 名）」を比較した結果、後者の教育歴が短い傾向にあることを除いて差は認められなかった。DSM-5 による重複障害の有無についても差がなかったが、重複する障害名（複数回答可）や各群における割合もあわせてみると、「改善群（20 名）」については「重複障害なし」（35.0%）や「抑うつ障害」（35.0%）の割合が高いのに対し、「増悪群（5 名）」では、「統合失調症スペクトラム障害および他の精神病性障害群」（40.0%）、「双極性障害および関連障害群」（40.0%）、「解離症群／解離性障害群」（40.0%）、「神経発達症群／神経発達障害群」（20.0%）、「重複障害なし」（20.0%）の割合が高かった。

4. 考察

薬物依存症専門外来において 1 年間治療を継続している者の多くは薬物依存重症度が改善することが示された。また、治療効果があがりにくい要因のひとつとして、「統合失調症スペクトラム障害および他の精神病性障害群」、「双極性障害および関連障害群」、「解離症群／解離性障害群」等の重複障害があることの可能性が示唆された。

薬物使用障害に対する精神科救急病棟での短期治療プログラムの開発に関する研究

船田大輔（国立精神・神経医療研究センター病院 第2精神診療部精神科医）

1. 研究目的

依存症の臨床は減少の一途をたどり、アルコールを始めとする依存症診療は長期の入院を前提とし、近年の入院期間の短縮が求められる入院治療に現実が全くそぐわない。本分担研究は精神科救急病棟における物質使用障害患者に対し、FARPPを提供し、介入の効果を検証することを目的とした。FARPP は全 4 回から構成されるプログラムで、テキストを媒介として物質使用障害の問題について考えられるよう作成されたプログラムである。

2. 研究方法

2017年10月から2019年9月までの間に国立精神・神経医療研究センターの精神科救急病棟に入院した精神疾患の患者（20歳以上、認知機能が、入院理由が精神の疾患）のうち、薬物やアルコールの使用が入院と関係していたと医師が判断した患者を対象に、入院期間中にFARPPへの参加を求め、同意した者を対象とした。

対象に対して、プログラム開始前（エントリー時)、入院中プログラム終了後もしくは退院前、退院後3か月、及び退院後6ヶ月後、12ヵ月後の5つの時点で評価を行った。評価項目は、診療時に実施した問診票の評価尺度得点、ならびに診療録に記載された治療継続状況に関する情報である。

そのうえで得られたデータを、FARPP参加群、FARPP非参加群、精神疾患群（薬物使用のない精神疾患患者）からなる3群に関して様々な比較・検討を行った。

3. 研究結果

現時点までに、FARPP 参加群 21 名、FARPP非参加群8名、精神疾患群77名の患者のデータを収集できている。

今年度は、FARPP参加群と非参加群との2群間比較を行った。その結果、FARPP参加群は、FARPP非参加群に比べ、薬物やアルコールについて悩んでいる者の割合が多い（P=0.010)、精神科の治療年数が短い（9.01 vs 18.75, P=0.018)、薬物・アルコールの使用年数が短い（8．88 vs 21.00, P=0.005)、病識に乏しい（SOCRATES 得点：27.81 vs 31．25, P=0.042)、入院期間が長い（43.62days vs 23．87days, P=0.032）などの特徴が認められた。

4. 考察

精神科急性期病棟で FARPP に参加した人は参加しない人と比べて、薬物やアルコール使用期間が短いにもかかわらず悩んでいる傾向が高く、急性期病棟での依存症治療のニーズを示している可能性がある。FARPP が救急病棟での依存症治療のきっかけになる可能性を示した。

以上の知見は、精神科急性期病棟での依存症治療における端緒となるという点で、FARPP の有用性を支持するものと考えられた。今後は、さらに対象数を増やすとともに、退院後の予後や治療継続状況への影響についても検討していく予定である。

発達障害を伴う薬物使用障害の臨床的特徴と治療法に関する研究

村上真紀（国立精神・神経医療研究センター病院 精神科）

1. 研究目的

薬物依存症治療として認知行動療法による覚せい剤依存症治療プログラム（SMARPP）の普及均てん化が図られているが、患者の個別的要因を考慮した治療や支援の追加が必要である事が多く、発達障害傾向の有無は重要な要因と考えられる。

そこで、本研究では、発達障害併存薬物使用障害患者の対応ガイドラインの開発を寄与する最終的な目的とし、その準備段階として、まずは、薬物使用障害患者における発達障害傾向併存率と臨床的特徴、および併存症例の治療転帰を明らかにすることを目的としている。

2. 研究方法

本研究の対象は、2020 年 4 月から 2022 年 3 月までの間に当院薬物依存症センターを初診し薬物使用障害と診断された患者のうち、同意を得られた者である。

まず対象全例に対して、初診時点で自記式質問紙である「AQ 日本語版　自閉症スペクトラム指数　成人用 10 項目版（AQ-J-10)」、および「成人期の ADHD 自己記入式症状チェックリスト（ASRS-v1.1)」を実施し、この２つのいずれかのカットオフ値を超えた者に対して、児童精神科である分担研究者が面接を行い、発達障害の臨床診断に関する評価を行うとともに、初診 6 か月後の時点における臨床情報の収集を行う計画である。その際、収集される情報としては、「薬物使用頻度」、「被虐待経験の有無」「薬物初使用や事例化するまでの経過」「治療継続性」「薬物療法の内容」などである。

初年度である 2019 年度は、研究計画の立案と倫理委員会申請を行うとともに、予備的に、2020 年 1 月から 3 月の間に薬物依存症センターを初診した患者を対象に、予備調査として初診時問診票における AQ-J-10 及び ASRS-v1.1 においてカットオフ値を超える者の頻度を調査した。

3. 研究結果

2020 年 1 月から同年 3 月までの間の初診患者は 58 名で、このうち 45 人（77.6%）において AQ-J-10 及び ASRS-v1.1 のデータ収集が可能であった。AQ-J-10 のカットオフ値（7 点）以上であったものは 8 人（12.3%)、ASRS-v1.1 のカットオフ値（A パート 4 個以上) 以上であったものは 21 人（32.3%) であり、発達障害傾向の併存の有無を確認のための面談を要するものは 24 人（36.9%）であった。

4. 考察

研究対象期間である 2020 年 4 月からの研究実施に際し、スクリーニングを行うのに十分なデータ収集が可能であると考えられた。また、一定数の発達障害傾向を併存する患者の存在が示唆された。

今年度のおける予備的調査から、薬物依存症外来患者に一定数の発達障害傾向を有する患者が存在することが明らかにされた。今後は、児童精神科医による臨床診断による正確な評価、ならびに発達障害併存症例の臨床的特徴を検討する予定である。

ベンゾジアゼピン受容体作動薬使用障害の臨床的特徴と治療法に関する研究

宇佐美 貴士（国立精神・神経医療研究センター病院 第1精神診療部精神科医師）

1. 研究目的

薬物使用障害の中でもベンゾジアゼピン受容体作動薬使用障害患者は近年増加傾向にある。ベンゾジアゼピン受容体作動薬使用障害患者の臨床的特徴について検討した研究は少ない。他の使用障害とは異なりベンゾジアゼピン受容体作動薬使用障害の治療目的は必ずしも断薬ではなく、病状によっては少量のベンゾジアゼピン受容体作動薬を継続しなくてはならない。ベンゾジアゼピン受容体作動薬使用障害における減薬の際は離脱症状の出現に注意しながら慎重に行うが、減薬法については確立されていない。国外ではベンゾジアゼピン受容体作動薬の減薬法としてアシュトンマニュアルが作成され、国内においても利用されているが有用性の確認はされていない。

以上の状況を踏まえ、本研究では、これまでに当院薬物依存症専門外来へ受診した患者の臨床的特徴を明らかにするとともに、ベンゾジアゼピンの減薬方法を含めた適切な治療法を検討することを目的とした。

2, 研究方法

本研究の対象は、2015年4月から2019年12月までの間に、当院薬物依存症専門外来に初診、ベンゾジアゼピン受容体作動薬使用障害と診断された全患者である。

具体的な研究方法としては、診療録に記載された臨床情報にもとづいて、年代や性別、さらには併存精神障害の内容、治療経過といった観点から類型化を行うとともに、各臨床類型における減薬を含めた治療上の配慮点を検討する、という方法を採用した。

なお、研究実施にあたっては、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会の承認を得た（2020年1月31日；承認番号A2019-095）。

3. 研究結果

研究期間中に薬物依存症専門外来を受診した患者は563名であり、このうちベンゾジアゼピン受容体作動薬使用障害と診断された者は81名であった。この対象81名の属性としては、男性41名、女性40名であり、初診時年齢は19歳から84歳のあいだに分布し、その平均年齢は41.5歳（標準偏差14.25）であった。

4. 考察

現在、対象の診療情報の転記作業を進めているところであり、したがって、今年度の成果として報告できる情報はないが、今後、収集した情報にもとづいて対象の類型化を行い、類型ごとの治療上の配慮点について検討していく予定である。

参考文献

全国の精神科医療施設における薬物関連精神疾患の実態調査　平成30年度厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業：H29-医薬-一般-001）分担研究報告書　研究分担者 松本俊彦

薬物使用障害に対する個人心理療法の開発とその効果に関する研究

今村扶美（国立精神・神経医療研究センター病院臨床心理部）

1. 研究目的

国立精神・神経医療研究センター（NCNP病院）薬物依存症センターでは、薬物依存症に対する構造化された依存症集団療法（SMARPP）の開発・運営を行っている。この治療プログラムは、集団療法という性質上、患者間の健康的なつながりと集団力動が治療的に作用する特徴があるが、その反面で、対人緊張や精神症状などにより集団場面への適応が困難にとっては、治療からの離脱を招きやすい面もある。

そこで、本研究では、従来の集団プログラムである SMARPP の適用が困難な物質使用障害患者に対し、個別的な心理療法を開発・実施することを目的とした。

2. 研究方法

対象は、国立精神・神経医療研究センター病院薬物依存症センターの医師により、個人心理療法の実施が適当と判断された患者である。個人心理療法の回数は NCNP で行われている標準的な個人認知行動療法の運用に合わせ、概ね 16 回を 1 クールとする。また、個人心理療法の実施前後で質問紙による評価を実施する。

2019 年度は、国立精神・神経医療研究センター病院（以下、NCNP 病院）において、物質使用障害患者に対する個人心理療法を実施するシステムの構築を行い、試行的な実施をした。また、個人心理療法の評価に用いる尺度の選定を行った。

3. 研究結果

NCNP 病院内での物質使用障害患者に対する個人心理療法の実施システムを下記の通り整備した。まず、薬物依存症センターの主治医により紹介された患者に関して、CBT カンファレンスでの検討を経て、個人心理療法へと導入される。なお、CBT カンファレンスとは、臨床心理室および CBT にかかわる多職種により、ケースの共有・検討を行うとともに、治療方針の検討を行う場である。

2019 年度は、5 名の紹介があり、最終的に個人心理療法の試行につながったのは 2 名であった。

個人心理療法の実施前後に実施する尺度としては、DAST-20（The Drug Abuse Screening Test）、AUDIT（The Alcohol Use Disorders Identification Test）、SRRS（Stimulant Relapse Risk Scale）ARRS（Alcohol Relapse Risk Scale）、POMS2（Profile of Mood States 2nd Edition）短縮版を選定した。

4. 考察

従来の治療は集団療法を前提としており、個別性に配慮した心理療法の提供が困難であったため、院内の多部署・多職種が協同するシステムを整備した意義は大きい。しかしその一方で、本研究の対象はニーズや症状が多様であり、個人心理療法の実施にあたっては、治療の構造や目標設定に関する柔軟性が求められるという印象を受けた。次年度は、今年度開発したシステムに従い、本格的実施の予定である。

薬物使用障害に対する作業療法プログラムの開発と効果に関する研究

森田三佳子（国立精神・神経医療研究センター病院精神リハビリテーション部）

1. 研究目的

薬物使用障害患者への治療法は、様々な視点で開発されつつあるが、対人緊張や言語理解の制限等で集団への適応が難しい患者等へのプログラム開発が望まれている。そうしたなかで、作業療法には、相互の役割を明確にし、行動を具現化するため、言語を主媒介とする集団より相互の心理的距離が維持しやすい、という特性がある。身近な作業活動（身体的活動、余暇活動、調理等の生活活動）を取り入れ、体験・相互交流を用いた作業療法プログラムは、薬物依存症の治療の選択肢の一つになり得ると考えられる。

そこで本研究では、薬物使用障害患者を対象にした作業療法プログラムを開発し、その効果を検証することを目的とした。

2. 方法

初年度は、地域で暮らす薬物使用障害患者への作業療法プログラムについて情報収集をした。そのうえで、薬物依存症者の健康的な生活やリカバリーを促進することに焦点を当てたプログラムを作成・実施した。その際には、参加者の反応をみながら適切と思われるプログラム内容を推察し、実施・検討を繰り返した。

3. 研究結果

国内の依存症領域における作業療法実践の多くはアルコール依存症が中心であり、地域で暮らす薬物使用障害患者に焦点を当てた専門的な作業療法プログラムについての報告は限定的であった。海外の文献においては，仕事，余暇，社会参加の分野での作業に基づく介入が依存症の治療に用いられており，それらを個人の生活に組み込むことにより薬物依存症からの回復に役立つ可能性が示唆されていた[2].

プログラムは、1 クール 12 セッションを通年で実施した。2019 年 5 月から 2020 年 1 月の期間（3 クール分）の延べ参加者数は 44 名で、複数クール参加者を除くと 25 名が参加した。その中で 1 クールでも参加率が 50%以上であった者は 14 名であった。コアメンバーの中には、食事のレパートリーが増えるなどの生活スキルに変化がみられた者や依存症集団療法（SMARPP）や就労といった新たな治療や生活の場につながった者がいた。

4. 考察

プログラムの実施を繰り返す中で、プログラムで取り扱う内容については「食生活」「欲求への対処」「生活の満足度を高めることにつながる過ごし方」を軸に、当事者的視点を取り入れ、実際に体験することを通じて相互交流を図る形で固まりつつある。しかし、プログラムを確定することや効果に関する有効な量的データをそろえることは困難であった。幅広い層の複数の参加者のニーズに応えうる、かつ難易度を考慮した適切な作業活動を提供することは我々の課題である。今後は、これまでの参加者の属性や特徴、生活における困難さやニーズを分析し、参個別性に配慮したプログラムと発展させていく予定である。

1-2

A study on development of tailor-made treatment programs for drug use disorder

Principle researcher: Toshihiko Matsumoto, M.D., Ph.D.
Department of Drug Dependence Research, National Institute of Mental Health,
Nation Center of Neurology and Psychiatry

Many of the patients with drug use disorder have various psychosocial, medical, psychiatric, and gender problems other than drug-related disorders Therefore, the “tailor-made” treatment programs for them considering individuality and caseness of each patient are required. However, such treatment programs have never existed in Japan, while the structured group therapy program, the “SMARPP” (Serigaya Methamphetamine Relapse Prevention Program), which we had developed and spread nationwide for treating the patients with drug use disorder, have exited as only one authorized and formulated program in Japan.

The purpose of our study is the following three points; first, to identify the clinical subgroups who need to be not intervened and treated in a group but individually, second, to examine clinical feature of such subgroups, and lastly, to develop the alternative, tailor-made treatment program. In order to achieve the first and second purposes, we set four studies on the clinical courses and treatment prognosis of patient with drug use disorder (divisional researcher, Kondo A),the relationships of drug abuse with risky sexual behaviors, and HIV infection (divisional researcher, Shimane T), the relationships with developmental disorder including autistic spectrum disorder and attention-deficit / hyperactive disorder (divisional researcher, Murakami M), clinical features of patients with abusing prescribed and OTC drugs (divisional researcher, Usami T). Further, in order to achieve the third purpose, we set three studies; the studies on development of alternative treatment programs for drug use disorder, such as an individual psychotherapy (divisional researcher, Imamura F), a brief intervention program for inpatients (divisional researcher, Funada D), and an occupational group therapy (divisional researcher, Morita M).

In the first annual year of our projects, we have obtained several findings on associations of clinical courses and drug-using pattern with psychiatric comorbidities and gender differences. We have also started to evaluate efficacies of the brief inpatient-program and occupational group therapy.

The next annual year of our project, we planned to develop the “tailor-made” individual psychotherapy, and to examine the relationships with developmental disorder, and clinical features of patients with abusing prescribed and OTC drugs.

1-3　重症精神障害者とその家族の効果的な地域生活支援体制に関する基盤的研究

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター
藤井 千代

１．研究目的

本研究の目的は、精神障害者とその家族を地域で支えるための効果的な制度構築のため、evidence-based practice および evidence-based policy making において考慮すべきアウトカムを見出すこと、および従来の研究で取り組まれにくい領域（家族支援や触法精神障害者のアセスメントなど）のエビデンスを発展させることである。

現在、国際的に、当事者や一般市民と一緒にアウトカムなどを模索することが推奨され始め、2018 年には Nature や BMJ でも取り上げられている。関係者から一定の合意を得て提案されるアウトカムについては、今後の研究やプラットフォームで活かされると推測される。家族支援については、これまで治療や支援の実現可能性が低いことや効果が不明瞭であったことから、先進的な実践の実装に貢献できていなかったが、本研究は既存の訪問看護の枠組みを活用した個別家族支援の効果を検証するものであり、実装可能な治療・支援の形を示せる可能性がある。また､医療観察法通院処遇者の実態把握の方法、特にリスクアセスメントのあり方については、これまで有効な方法が示せていなかった。制度開始当初より厚生労働科学研究等において医療観察法通院処遇者のモニタリングが行われているものの、調査に関する医療機関の負担感が大きく、臨床現場への結果のフィードバックのあり方についての検討も不十分であった。本研究の実施により、適切な通院処遇者のモニタリングやリスクアセスメントのあり方を提示し、医療観察法医療の向上が期待される。

２．研究組織

主任研究者：藤井 千代（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所）

分担研究者：
藤井 千代（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所）
山口 創生（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所）
菊池 安希子（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所）
平林 直次（国立精神・神経医療研究センター病院）

研究協力者：
佐藤さやか[1)]、松長麻美[1)]、塩澤拓亮[1)]、安間尚徳[1)]、中西三春[4)]、小川 亮[1)]、阿部真貴子[1)]、河野稔明[1)]、大隅尚広[1)]、小池純子[1)]、小塩靖崇[1)]、深澤舞子[5)]、岡野茉莉子[1)]、相田早織[1)]、大迫充江[6)]、今村扶美[2)]、大森まゆ[2)]、柏木宏子[2)]、和田舞美[2)]、堀越 勝[3)]、伊藤正哉[3)]、蟹江絢子[3)]、鈴木敬生[2)]、山田美紗子[2)]、梅垣弥生[2)]、竹林由武[7)]、永田貴子[2)]

１）国立精神・神経医療研究センター　精神保健研究所
２）国立精神・神経医療研究センター病院
３）国立精神・神経医療研究センター・認知行動療法センター
４）東京都医学総合研究所精神行動医学研究分野
５）東京大学大学院
６）肥前精神医療センター
７）福島県立医科大学

３．研究成果

以下の分担班により研究を実施した。

A:アウトリーチによる家族支援の効果に関する研究

B:地域精神科医療・精神保健福祉実践におけるアウトカムについてのコンセンサスの模索

C:医療観察法通院処遇者における暴力および自傷・自殺の予測因子に関する研究

D:医療観察法通院処遇者のモニタリングシステムの開発

A 班では、Co-production, Patient & Public Involvement の概念に基づいて、家族心理教育に用いるツール（訪問支援で使える統合失調症情報提供ガイド:家族心理教育編)を作成した。家族心理教育は以下の 4 回から構成される。①統合失調症に関する一般的知識（定義、原因、疫学、症状、治療、予後)、②多くの家族が出会う困りごとへの対処方法、問題解決技法、③コミュニケーションスキル訓練、④家族のリカバリーについて考え、セルフケア、社会資源の利用方法に関して学ぶ。各回でワークがあり、双方向性の家族心理教育が展開される。本ツールを用いた介入の効果につき、36 か所の訪問看護ステーションの協力を得て、クラスターランダム化比較対象試験を開始した。訪問看護ステーションを介入群と対照群に無作為に割り付け、介入群は、精神科訪問看護師が簡易的な家族心理教育ツールを用いて、1 回 60 分の家族心理教育を、週に 1 回、計 4 回施行した。主要アウトカムは主介護者の介護負担感とし、Zarit Burden Interview により測定する。現在、当事者 100 名、家族 100 名の協力を得て、介入実施中である。

B 班では、研究者が当事者や家族、その他の関係者と一緒に研究を実施する Patient & Public Involvement の方法を模索している。今年度は、Talking about Outcomes and Gathering Essential THEmes in mental health Research (TOGETHER)というプロジェクトチームを立ち上げ、①「研究で扱っているアウトカム（支援目標・ゴール）について」と、②「当事者・家族と研究者が一緒に研究するには？」という 2 つのテーマについて当事者、家族、精神保健領域の専門家（支援者)、行政職員、研究者を対象とするグループインタビューを実施した。グループインタビューは 9 月および 2 月に実施され、現在質的検討を実施中である。検討結果は、来年度以降に実施するウェブ調査に反映させる予定である。

C 班では、医療観察法通院処遇者の地域生活中の暴力や自傷・自殺の予測因子および防止要因を量的検討によって明らかにすることを研究の目的としている。医療観察法通院処遇者を直接通院者も含めて 6 ヶ月間追跡し、地域生活中の対象者の動的要因を用いて予測因子および自殺や暴力のリスクに対する保護要因を検討する。今年度は、HCR-20V3 日本版が、通院中の医療観察法患者の「他者への暴力」および「自分への暴力（自傷)」に対する予測妥当性を持つかどうかを検討した。その結果、HCR-20v3 日本版は、通院中の医療観察法患者の身体的暴力への予測妥当性があることが示されたが、自傷についての予測妥当性は認められなかった。来年度以降、社会復帰促進アセスメントのデータを用いて自傷の有無別にプロフィールを解析し、有効な予防策について検討する。

D 班では、通院処遇データベース構築の具体的・現実的方法を探るため、①入院処遇データベースに倣った電子通院処遇データベースの開発、②処遇終了届出制度の創設、③研究ベースによる通院処遇者の予後調査の実施の 3 案について協議したが、いずれも通院処遇の実態を把握するには不十分であり、さらに関係者と協議する必要がある。医療観察法地域連絡会議に参加している都内 7 箇所の指定通院医療機関における対象者の転帰に関する調査からは、医療観察法医療終了者は他の患者と比較してより手厚いケアが必要である可能性が示唆された。

今年度、いずれの分担班もほぼ予定通りに進捗している。

分担研究課題名：**アウトリーチによる家族支援の効果に関する研究**

氏名：藤井 千代
所属施設：国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所

研究協力者
佐藤さやか[1)]、松長麻美[1)]、塩澤拓亮[1)]、安間尚徳[1)]、中西三春[2)]
１）国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所
２）公益財団法人東京都医学総合研究所精神行動医学研究分野

【諸言】

家族心理教育（FPE）とは、家族の気持ちに配慮しながら、精神疾患の正確な知識、患者への対応方法を教え、また必要な社会資源を導入することで家族のエンパワメントを高める科学的根拠に基づいた医療のうちの一つとして知られている。国内外の研究において、FPE は患者の再発率、入院率を低下させるだけでなく、家族の介護負担感を軽減させる作用がある。しかし、FPE は実装性に問題があり、エビデンスは十分にあるものの、普及率が低いことが課題である。

本研究では、精神科訪問看護師が統合失調症患者をケアする家族に対して簡易的な家族心理教育を行うことによる、家族の介護負担感の軽減について、クラスターランダム化比較対照試験により明らかにすることを目的としている。本研究は既存の訪問看護の枠組みを活用した個別家族支援の効果を検証するものであり、実装可能な治療・支援の形を示せる可能性がある。これにより、精神障害者とその家族のより良い地域生活、さらには我が国の地域精神保健の向上に寄与するものと期待される。

【方法】

本年度は、まず研究で用いるツール（訪問支援で使える統合失調症情報提供ガイド：家族心理教育編）を作成した。家族心理教育は以下の 4 回からなる。1 回目：統合失調症に関する一般的知識（定義、原因、疫学、症状、治療、予後）。2 回目：多くの家族が出会う困りごとへの対処方法、問題解決技法。3 回目：コミュニケーションスキル訓練。4 回目：家族のリカバリーについて考え、セルフケア、社会資源の利用方法に関して学ぶ。各回でワークがあり、双方向性の家族心理教育が展開される。本ツールは Co-production, Patient & Public Involvement の概念に基づき、当事者をケアするご家族、精神科訪問看護師、家族心理教育の専門家と十分に話し合い作成した。

東京都、埼玉県、千葉県、神奈川県にある精神科を専門とする訪問看護ステーションに研究協力を依頼した。1 施設あたり 5 人の主介護者をランダムテーブルにより無作為にリクルートした。研究参加者の選択基準は、①統合失調症をもつ当事者をケアする主介護者、②主介護者は年齢が 20 歳以上の者、③主介護者は当事者と家族関係にある者（両親、兄弟、姉妹、配偶者、子）、④主介護者は利用者と同居していること、⑤当事者が精神科訪問看護サービスを利用している　である。訪問看護ステーションを介入群と対照群に無作為に割り付け、介入群は、精神科訪問看護師が簡易的な家族心理教育ツールを用いて、１回 60 分の家族心理教育を、週に 1 回、計 4 回施行した。主要アウトカムは主介護者の介護負担感とし、Zarit Burden Interview により測定する。研究は、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得て実施した。

【結果】

36 か所の訪問看護ステーション、当事者とその家族各 100 人の当事者の研究協力を得た。現在介入実施中である。

【結論】

Co-production, Patient & Public Involvement の概念に基づいて作成した FPE ツールを用いた介入の効果につき、36 か所の訪問看護ステーションの協力を得て、クラスターランダム化比較対象試験を開始した。現在介入実施中であり、研究は予定通り進捗している。

分担研究課題名：**地域精神科医療・精神保健福祉実践におけるアウトカムについてのコンセンサスの模索**

氏名：山口 創生
所属施設：国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所

研究協力者
小川 亮[1)]、阿部真貴子[1)]、河野稔明[1)]、大隅尚広[1)]、小池純子[1)]、小塩靖崇[1)]、深澤舞子[2)]
１）国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所
２）東京大学大学院

【諸言】

過去20年間、日本の心理社会的実践に関連する研究が、当事者・家族、支援者や行政職員にとって、真に意味のあるアウトカムを検証してきたかはわかっていない。近年では、より効果的に研究成果を利用するために、当事者や家族、支援者、行政職員、研究者などが議論することが求められている。そこで、本研究は、関係者と一緒に研究で取り入れるべきアウトカムについて議論し、一定のコンセンサスを得ること、そして当事者と一緒に研究を実施する方法について模索することを目的とする。本研究の知見は、第1に将来の研究がアウトカムを選定する際に、当事者や家族、支援者がより関心を持ちやすいものとしてヒントと根拠を与える。加えて、行政職員など政策立案に関わる者が考慮すべきアウトカムを提案可能となり、当事者や家族が望む政策に向けて好ましい影響を与えることができる。第2に、研究者と当事者・家族が一緒に研究に取り組むスタイルは国際標準になりつつあるが、本研究は日本での先駆け的な研究である。よって、本研究の知見は精神医学あるいは地域精神保健の研究における当事者との共同研究の推進の礎となるデータを提供可能である。

【方法】

本年度は、Talking about Outcomes and Gathering Essential THEmes in mental health Research（TOGETHER）というプロジェクトチームを立ち上げた。2019年9月29日と2020年2月9日に実施し、①「研究で扱っているアウトカム（支援目標・ゴール）について」と、②「当事者・家族と研究者が一緒に研究するには？」という2つのテーマについて議論した。インタビューは、当事者、家族、精神保健領域の専門家（支援者）、行政職員、研究者を対象として行った。各属性の参加者は、一つの団体からのみの参加など偏ったサンプルとなることを防止するために、複数の当事者団体・家族団体、専門職団体、行政団体、学術的団体からの推薦によって参加者を決めた。また、研究者については、学術団体からの推薦のほかに、地域精神科医療および地域精神保健サービスに関する論文の原著者から無作為抽出によって選出された研究者も参加した。研究は、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得て実施した。

【結果】

グループインタビューの結果は、録音データを逐語録化し、質的分析を実施中である。研究で測るべきアウトカムとして、専門家（支援者）や行政職員、研究者は、臨床的な評価から主観的な評価まで幅広く言及していた。また、当事者は「精神保健福祉サービスとの距離」というアウトカムを発案するなど、独自の視点と表現を用いて研究で測るべきアウトカムを言語化していた。また、家族については、日本の支援制度の中で公的なサービスがないことから、アウトカムなどの問題よりも、「専門家に自分たちの話が聞いてほしい」という支援プロセスに対する言及が目立った。

【結論】

本研究は、地域精神科医療および地域精神保健サービスをテーマとして、当事者と共同する研究のあり方を模索することを目的とした探索的かつ萌芽的な研究である。今年度は予定されていたグループインタビューを実施し、来年度以降のウェブ調査に活かされる予定である。

分担研究課題名：**医療観察法通院処遇者における暴力および自傷・自殺の予測因子に関する研究**

氏名：菊池 安希子
所属施設：国立精神・神経医療研究センター

研究協力者
岡野茉莉子[1)]、相田早織[1)]
１）国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所

【諸言】

精神障がい者のリカバリーを妨げる「心配な転帰」には様々なものがあり、その予測因子は重複することが知られている。「心配な転帰」の中でも影響力が大きいのが、他者に対する身体的暴力や自傷・自殺行動である。暴力や自傷・自殺を予防するためにも、予測因子を明らかにし、かつ防止要因も明らかにすることが求められている。医療観察法通院処遇者の自傷、自殺はベースレートとして、一般精神科患者と比べて必ずしも高水準にはないことが先行研究から示唆されているが、これは移行通院者の結果であり、直接通院者について同様の量的検討はされていない。また、自殺や他害行為の予測因子については、人口統計学的指標や、入院中の因子による検討しかされていない。

本研究の目的は、医療観察法通院処遇者の地域生活中の暴力や自傷・自殺の予測因子および防止要因を量的検討によって明らかにすることである。本研究では、医療観察法通院処遇者を直接通院者も含めて６ヶ月間追跡し、地域生活中の対象者の動的要因を用いて予測因子および自殺や暴力のリスクに対する保護要因を検討する。

【方法】

医療観察法対象者の精神保健観察を担う社会復帰調整官に研究協力を依頼し、文書による同意を得られた者より､以下のデータを収集した:
１）研究協力に同意の得られた社会復帰調整官が担当する医療観察法通院処遇者についてのHCR20V3 評価および社会復帰促進アセスメント、対象者の性別、年齢、対象行為、通院処遇の種類（直接通院、移行通院）などの基本属性（既存資料）
２）6 か月後の HCR20V3 評価、社会復帰促進アセスメント、
３）6 ヶ月間の対象者の暴力および自傷・自殺の記録(精神保健観察業務中で記録されている既存資料)
研究は、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得て実施した。

【結果】

今年度は、HCR-20V3 日本版が、通院中の医療観察法患者の「他者への暴力」および「自分への暴力（自傷)」に対する予測妥当性を持つかどうかを検討した。

全国より 245 名分のデータが収集され、有効回答は 231 名分であった。性別は男性 170、女性 61、平均年齢 46.7 歳（SD=11.9)、主診断（ICD-10)は F2:182(78.8%)、F3:27(11.7%)、F1：12（5.2%)、その他：10（4.3%）であった。

6 ヶ月間の身体的暴力は８人、自傷が 6 人に観察された。ROC 分析の結果、身体的暴力については HCR-20v3 の総得点は AUC ＝ 0.75（95%CI：.547-.947）であった。H,C,R 得点では、C 得点と R 得点が AUC>.70 であった。自傷については、AUC=.668（95%CI：.321-1.00）であり、予測妥当性は示されなかった。

個別項目で自傷と有意に関連していたのは、「精神病性症状の症状（C3)」のみであった。

【結論】

HCR-20v3 日本版は、通院中の医療観察法患者の身体的暴力への予測妥当性があることが示された。しかしながら、自傷についての予測妥当性は認められなかった。来年度以降、さらに通院中の医療観察法患者の暴力と自傷・自殺についての予測妥当性が先行研究で示されている社会復帰促進アセスメントのデータを用いて自傷の有無別にプロフィールを解析し、有効な予防策について検討する。

分担研究課題名：**医療観察法通院処遇者のモニタリング制度の開発**

氏名：平林 直次
所属施設：国立精神・神経医療研究センター病院

研究協力者
今村扶美[1)]、大迫充江[3)]、大森まゆ[1)]、柏木宏子[1)]、和田舞美[1)]、堀越 勝[2)]、伊藤正哉[2)]、蟹江絢子[2)]、鈴木敬生[1)]、山田美紗子[1)]、梅垣弥生[1)]、竹林由武[4)]、永田貴子[2)]
１） 国立精神・神経医療研究センター病院
２） 国立精神・神経医療研究センター・認知行動療法センター
３） 肥前精神医療センター
４） 福島県立医科大学

【諸言】

本研究では、医療観察法通院処遇者の地域生活中の暴力や自傷・自殺の予測因子および防止要因を量的検討によって明らかにする。

【方法】

通院処遇データベース構築の具体的・現実的方法を探るため、下記の 3 案について厚生労働省医療観察法医療体制整備推進室と協議した。

① 入院処遇データベースに倣った電子通院処遇データベースの開発
② 処遇終了届出制度の創設
③ 研究ベースによる通院処遇者の予後調査の実施

また、医療観察法地域連絡会議に参加している都内 12 箇所の指定通院医療機関に対し対象者の転帰に関する調査の実施を依頼した。個別票の対象は、当院の医療観察法病棟を退院した対象者で通院処遇終了後３か月目までの経過がわかる者とした。指定通院医療機関７か所から処遇終了者計 30 人分について回答を得た。研究は、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得て実施した。

【結果】

通院処遇データベース構築方法について、①～③各案の現実可能性について協議した結果、①、②については、予算と個人情報保護の点で懸念が示されたが、③については、調査の実行可能性は高いものの回答率と対象者の選択バイアスの点で課題が残っており、いずれの方法も、医療観察法対象者の全体像を正確に把握するのに十分とは言い難いと考えられた。

都内の指定通院医療機関に対する調査の結果、大多数の対象者は、処遇期間が進むにつれ通院や訪問看護の訪問の頻度を徐々に延ばし、グループホームの入所者は単身生活に移行しながら概ね安定して社会復帰を進めていたことが明らかになった。一方で、一部ながら通院処遇中に通院の不遵守、金銭浪費、暴力行為などの問題行動が認められ、再他害行為や医療と生活の再構築のため再入院が必要となった対象者も３例いた。また、グループホーム退所後に自殺に至った例や、もともと飲酒に課題のあった対象者で処遇終了数か月に病死した例もあった。今回、アンケートに回答した７つの指定通院医療機関はすべて、「医療観察法医療終了者は他の患者に対し平均してより手厚いケアが必要である」と回答し、６施設では既に手厚いケアを行っていると答えた。修了者 30 例中 20 例において、社会復帰調整官が行っていた関係機関との調整等の役割が処遇終了後にいずれかの機関に引き継がれており、その機関の内訳は、指定通院医療機関 10 例、行政担当者 2 例、相談支援事業所 2 例等であった。

【結論】

現時点で把握されていない通院処遇の実態を把握するうえで、通院データベースの構築は不可欠である。今回検討した３案はいずれも実態把握をするうえで不十分であることが判明した。今後は厚労科研の研究班とも連携しながら関係者と検討を重ねる予定である。処遇修了者の転帰に関する調査からは、処遇修了者は他の患者と比較し、平均してより手厚いケアが必要となる傾向が示唆された。

1-3

A fundamental study on effective community life support systems for persons with severe mental illness and their families

Chiyo Fujii

Department of Community Mental Health and Law,
National Institute of Mental Health,
National Center of Neurology and Psychiatry

The purpose of this study was to determine the outcomes that should be considered when practicing evidence-based research in order to build an effective institutional structure to support people with mental disorders and their families in the community. It also aimed to develop evidence in areas that have not been fully addressed in conventional research, such as family support and assessment of persons with tactile and mental disorders.

The study was carried out on the following shared groups:

A: A study on the effect of family support by outreach

B: Seeking consensus on outcomes in community psychiatry and mental health welfare practice

C: A study on predictors of violence, self-harm, and suicide in medical treatment outpatients

D: Development of a monitoring system for outpatient medical treatment

In Group A, based on the concept of co-production and patient and public involvement, we created a tool for family psychology. With regard to the effect of intervention using this tool, a cluster randomized controlled trial was started with the cooperation of 36 visiting nursing stations. The visiting nursing station was randomly assigned to the intervention group and the control group. The primary outcome was the caregiver burden of the primary caregiver, measured by the Zarit Burden Interview. The intervention is currently underway, with the cooperation of 100 parties and 100 families.

In Group B, researchers are looking for a method of patient and public involvement in which researchers conduct research with parties, families, and other related parties. This year, there are two themes: (1) “Outcomes (support goals/goals) handled in research” and (2) “How can a researcher work together with a party/family?” Group interviews were conducted with people with mental disorders, their families, mental health professionals, administrative staff, and researchers. The study results will be reflected in the web surveys

conducted in the following year.

In group C, outpatients under the Medical Treatment and Supervision Act (MTSA) were followed for 6 months, and both predictive and protective factors for risk of suicide and violence were examined using the dynamic factors of the subjects living in the community. The Japanese version of HCR-20v3 was shown to have predictive validity for physical violence in a medical observation of patients during hospital visits, but not for self-injury. From the next fiscal year, we will analyze the profile based on the presence or absence of self-harm using the data from the Social Rehabilitation Assessment and examine the effective preventive measures.

In group D, in order to find a concrete and realistic method of constructing an outpatient section under the MTSA database, we initiated the following: (1) development of an electronic database following the inpatient database, (2) establishment of a treatment completion notification system, and (3) establishment of a research-based database system. We discussed three plans for conducting the survey, but none were sufficient to grasp the actual situation of outpatients under MTSA. From the survey on the outcomes of the subjects at seven designated outpatient medical institutions in Tokyo, it is suggested that outpatients under MTSA require more intensive care than other outpatients.

１-4　てんかんの病態解明と併存症を含めた先駆的・包括的診断と治療方法の開発

国立研究開発法人　国立精神・神経医療研究センター病院　てんかんセンター
主任研究者名：中川栄二

総括報告書

１．研究目的

てんかん診療全国拠点機関として、当センターでのてんかんに関するリソース・レポジトリーシステムを構築することにより、てんかん発症の病態解明、診断と治療方法の開発・提言を行うことが本研究班の目的である。てんかんの診断、治療に関しては、てんかんセンターを核として精神科、神経内科、小児神経、脳神経外科、放射線科のてんかん医療体制を活かして、特に発達障害および精神症状を併存するてんかん患者に関するソフト、ハードの両面から望ましい診療体制を提言し、てんかん治療のモデル医療の実現に向けた研究を行う。

てんかん患者臨床データベースの質の高い集積を継続して行うことに加え、脳波データベースを新たに構築し脳波から診断、治療ができるシステムを提言し、全国規模での脳波診療ネットワークを構築する。

てんかんを様々な脳形態・機能画像解析や神経生理学的解析を用いて可能な限り早期に適切な評価と診断を行い、効果的な内科的、外科的治療方法導入の確立を目指す。てんかん全国拠点施設として、難治性てんかんに対する三次医療機関として小児から成人・高齢者にいたるまでの望ましい診療体制を提言し、てんかん患者のモデル医療の実現に向けた質の高い情報発信を行う。研究成果をもとにしてNCNPてんかん市民公開講座や全国の医師やメヂカルスタッフ、患者向けの研修会、講演会で積極的に発信して啓発活動を行う。

てんかんの基礎研究に関しては、すでに当センターTMCでリサーチ・レポジトリーとして確立された利用可能な試料・情報を利用することにより、てんかんの分子病理学的研究、神経生理学的研究、遺伝学的基礎研究によるてんかんの病態解明等の基礎研究を行う。

２．研究組織

主任研究者

国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科　中川栄二

分担研究者

Ⅰ．てんかん臨床情報データベース（DB）化と臨床治験地域ネットワークの構築

① 脳神経外科てんかん臨床情報のDB化と臨床治験ネットワーク構築
　国立精神・神経医療研究センター病院脳神経外科　岩崎真樹

② てんかん臨床情報DBの整備
　国立精神・神経医療研究センター病院医療情報室　波多野賢二

③ レセプトデータを使用したてんかん疫学調査の可能性についての検討

国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科　齋藤貴志

④ てんかん患者における脳波記録のデータベース化に向けた基盤構築 - 環状 20 番染色体症候群の脳波解析 -

国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科　石山昭彦

Ⅱ. 精神症状、発達症状を併存するてんかんの診断と治療戦略

⑤ てんかんと発達障害併存の検討

国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科　中川栄二

⑥ 成人・高齢者てんかんの臨床病態と治療の解析

国立精神・神経医療研究センター病院神経内科　金澤恭子

⑦ MR 画像を用いたてんかんの診断と病態解明：皮質形成異常における Transmantle sign の放射線学的および病理学的特徴

国立精神・神経医療研究センター病院放射線科　佐藤典子

Ⅲ　てんかん基礎研究

⑧ 難治性てんかんの分子病理学的病態解明

国立精神・神経医療研究センター神経研究所　疾病研究第二部　伊藤雅之

⑨ てんかんモデル動物を用いた病態解明

国立精神・神経医療研究センター神経研究所　病態生化学研究部　星野幹雄

⑩ てんかんの神経生理学的マーカーの開発と病態解明

国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所知的・発達障害研究部　加賀佳美

⑪ てんかん原性型グリア細胞の視点によるてんかん分子病態研究

山梨大学大学院総合研究部医学域　薬理学講座　小泉修一

３．研究成果

Ⅰ．てんかん臨床情報データベースの構築

医療情報室とバイオリソース部の研究補助員の協力体制を築き、2017 年の新しいてんかん国際分類に準拠したデータベースへの登録体制を 2017 年 6 月から開始した。2019 年 10 月までに外来延べ患者数 3105 名（実人数 2290 名）、入院延べ患者数 3045 名（実人数 1354 名）のデータベースとなっている。エクセルベースで管理していた従来のデータベースをデータベース・ソフトウェア（マイクロソフトアクセス）に移行し、検索や集計作業を容易にした。診断情報の入力は、専用テンプレートを診療情報システムに作成し、主に脳神経外科入院症例を対象に運用している。また、ナショナルセンターバイオバンクへてんかん患者を登録する体制を築いた。外科治療を受ける難治てんかん患者を対象に、2017 年 6 月から登録を開始した。2019 年 10 月時点で 343 名から同意を取得し、脳検体 202 件、血漿 223 件、血清 118 件が登録されている。同バイオバンクを利活用する形で、てんかん原性腫瘍の遺伝子解析を行う研究が実施されている。引き続きてんかん

臨床情報データベースの構築を継続する予定である。

Ⅱ．てんかん患者における脳波記録のデータベース化に向けた基盤構築

てんかん診療において脳波は中核的な役割を果たす重要な検査である。しかし判読には熟練を要し、かつ軽微な異常所見は見落とされる可能性も高い。てんかん医療水準の均てん化には、そのような問題を解決すべく自動解析などの補助的な判読ツール作成が求められる。本研究では脳波判読ツール作成を目指し、基礎データとなるべく脳波記録をデータベース化するための基盤構築を行うことを目的としている。本研究では、まず当センター内の脳波記録のデータベース化を行うが、将来的には全国の多施設からのデータベース化を視野に入れ、データベース構築が可能なシステム作りを行うことを目指す。脳波データ登録の形式を検討し、脳波記録に付する臨床情報を選定し、臨床情報シートを作成する。脳波記録の登録のためのサーバなどの構築を行い、登録可能な体制が整い次第、登録を行っていく。 てんかん、睡眠、プリオン病の各研究グループ内で脳波記録のデータベース化を目指す各研究グループと共同し、脳波データ登録の形式や必要な臨床情報シートの内容について検討、選定を行っているところである。

Ⅲ．てんかんの適切な診断と治療戦略の研究

（１） てんかんの画像診断

限局性皮質異形成（FCD）の MRI 所見として知られる Transmantle sign（TMS）は、FCD type IIb でよく認められる特徴的な所見である。TMSは通常、T2WI および FLAIR で高信号、T1WIで低信号を示すが、まれに、T1WIで高信号を示す症例も経験される。画像所見と病理学的所見を後方視的に評価して、TMS における T1WI 高信号の原因を検討した。病理学的に FCD と診断された141 人の連続症例の術前画像データを後方視的に評価した。141 人の FCD 患者のうち 9 人（約 6%）にT1WI高信号 TMSを認め、すべてが type IIbであった。信号はBalloon cellの密度を反映している可能性があり、この所見は FCD typeIIb の鑑別に有用であることが明らかになった。小児の難治性てんかんに対する脳梁離断術後の画像解析を行い、①病的な脳ネットワーク経路が減少し正常な脳経路が回復していること、②脳梁の病的なてんかん伝播経路が切断されること、など術後の脳構造ネットワークについての新しい知見を明らかにした。

（２） てんかんと発達障害

小児てんかん例の神経生理学的、心理学的検討を行い、40%に発達障害の併存があり、併存群は非併存に比べて①適応行動が低下すること、②不適応行動（外在化・内在化）が多いことが分かった。そして③注意欠如多動症（ADHD）併存では不注意例が多く、実行機 能障害や前頭葉機能に異常を示す群が多いことを見出した。また、④小児てんかん手術施行例では認知機能の術後変化がみられ、発作の改善に伴って前頭葉機能が軽快することが示唆された。その後、術前後の検討例が蓄積され、改めて検討を行った。また前頭葉てんかんについて、機能ネットワーク解析を行

い、前頭葉てんかんの実行機能障害には前頭部や半球間の 連結の乏しさが関与している可能性が示された。

成人・高齢者てんかんの臨床病態と治療の解析として、てんかんと自己免疫性機序の解明のため、複数の自己抗体を一度に検索できる手法の開発検討を行い診断と治療に有効活用することができた。また、広域の周波数帯域の脳波 wide-band EEG では 200 Hz 以上の高周波数帯域の活動、1 Hz 以下の低周波数帯域の活動の記録が可能となり、高周波数律動(HFOs)、直流(DC)電位と呼ばれる脳波活動が新たな情報として得られるようになり、両指標がてんかん原性領域の同定に役立つことが明らかになった。

Ⅳ. てんかん基礎研究

小児難治性てんかんの片側巨脳症の患者の治療的外科切除脳病巣に *MTOR* 遺伝子の体細胞変異を見出した。この遺伝子変異の病因性を胎仔脳で発現させることにより、神経細胞の遊走障害と神経細胞の形態異常を起こすことを明らかにした。今後、*MTOR* 遺伝子異常の発現量調節マウスを作成し、胎生期からの病巣形成過程を明らかにし、治療介入の時期や治療法の開発を行う。また、特異な画像を呈する新生児難治性てんかんの臨床像と病理、遺伝子異常を明らかにした。今後、NCNP にある生物試料レポジトリーを利用したオミックス解析を行なったデータより、難治性てんかんの病態に関連する分子を同定し、新規治療法開発の基盤を作りたい。

てんかんモデル動物を用いた病態解明では、自然発症ラット変異体であるイハラてんかんラット(IER)で、扁桃体・海馬・大脳皮質のニューロサーキットに異常が生じていることを見出した。IER の原因遺伝子として *DSCAML1* を同定し、細胞接着蛋白質 DSCAML1 が扁桃体や海馬のニューロサーキットの形成に関与することを明らかにした。当センターのてんかん患者での *DSCAML1* 発現量を調べたところ、有意に *DSCAML1* の発現低下が認められ、$DSCAML1^{A2105T}$ 変異体は、細胞膜に局在できず細胞質に蓄積していた。新規治療法の開発としてケミカル シャペロンである SAHA と 4PBA 処理をしたところ、細胞膜に局在する $DSCAML1^{A2105T}$ が上昇することを見出し新規抗てんかん薬としての可能性が示唆された。DSCAML1 と mTOR シグナルの関係を調べたところ IER では mTOR シグナルが活性化していることを見出した。また、細胞レベルでは DSCAML1 が mTOR 自体の活性には影響を与えず、下流の mTORC1 を抑制することを見出し、ヒトの疾患でも DSCAML1 の発現量低下や機能異常が mTOR シグ ナルを活性化させているのではないかと考えられた。引き続き、所属機関のバイオリソ ースを活用し、DSCAML1 の発現量と mTOR シグナル活性の相関関係を解析する予 定である。

てんかん原性獲得におけるグリア細胞機能変調との因果関係の研究では、ピロカルピンけいれん重積（SE）モデルマウスを用いた検討により、てんかん原性獲得にはアストロサイトの機能変調が必要であることを示し、これを「てんかん原性型アストロサイト」とした。てんかん原性型アストロサイトの表現型として「Ca2+興奮性の亢進」を見いだした。てんかん原性型アストロサイトの Ca2+を抑制すると、てんかん原性は誘導できなかった。てんかん原性型アストロサイトの誘導には、先行して活性化するミクログリアの活動及びそのグリア伝達物質 ATP が必須であることを示した。今後は、てんかん原性アストロサイト誘導の分子メカニズムを明らかにする。てん

かん原性アストロサイトの Ca2+興奮性からてんかんに至る分子メカニズムを明らかにする。

Ⅴ．　社会的貢献

日本てんかん協会本部並びにてんかん協会東京支部と協賛して、全国てんかん講座、てんかん基礎講座の共同開催、またNCNPセンター公開講座として、てんかんに関する市民講座を行い、てんかんに関する普及啓発活動を多数行った。（各年間50回以上てんかんに関する講演を担当）

Ⅵ．倫理面における配慮の状況（生命倫理・安全対策等の遵守）

個人情報保護法、生命倫理・安全対策に関するガイドライン等に準拠し、倫理基準を遵守して研究を行った。

Ⅶ．2018 年度より当てんかんセンターは、厚労省から「てんかん診療全国拠点機関」として指定された。全国のてんかん診療機関をリードできる臨床的・基礎的研究を推進し、成果を全国に展開し、わが国のてんかん診療の向上をはかりたい。各専門疾病センターとも連携し、各科共通の臨床データベースの構築に向けて、てんかんの疾病統計分析や臨床研究、臨床治験がスムーズに施行できるシステムの構築を目指す。てんかんを様々な脳形態・機能画像解析や神経生理学的解析を用いて可能な限り早期に適切な評価と診断を行い、効果的な内科的、外科的治療方法導入の確立を目指したい。てんかん病態解明のための基礎研究では、引き続き遺伝学的病態解明とモデル動物の開発を行い、てんかんの発症病態解明と治療方法の開発を進めていきたい。

2020 年度には、当センターが全国てんかんセンター協議会を開催し、また 2023 年度には、日本てんかん学会学術集会を開催することになった。より一層の研究のレベルアップを図りたい。

Ⅷ．研究成果（原著論文、学会発表他）

【論文】英文　34 編、和文 6 編、総説 13 編、計 53 編、うち査読付論文計 40 編
【書籍】英文　1 編、和文 15 編　計 16 編
【学会発表】国際学会 17 回、国内 80 回、計 93 回
【シンポジウム】国際 2 回、国内 26 回、計 28 回
【講演】国際 2 回、国内 53 回、計 55 回

Ⅸ．研究成果による産業財産権の出願・取得状況

次世代バルプロ酸ナトリウムの開発と自閉症の易興奮性に対する薬剤適応について検討中

【精神・神経疾患研究開発費】1-4
「てんかんの病態解明と併存症を含めた先駆的・包括的診断と治療方法の開発」
分担研究：てんかんと発達障害併存の検討
分担研究者:国立精神・神経医療研究センター病院　小児神経科　中川栄二

【はじめに】
発達障害ではてんかんの併存率が高く、自閉スペクトラム症（ASD）では5-38%にてんかんが併存し、注意欠如多動症（ADHD）では12-17%にてんかんの併存が報告されている。発達障害とてんかんの併存について検討した。
【対象と方法】
当院てんかん・発達障害通院患者を対象にてんかん発症時期、治療効果（発作50%以上改善)、投与薬剤、治療期間、脳波について検討した。当施設倫理委員会の承認を得た。
【結果】
（1）対象者588人、てんかんと発達障害併存例は275人（46.8%)、ASD併存例71人（12.1%)、ADHD併存例44人（7.5%)、ASDとADHD併存例29人（5.0%)、知的障害併存例131人（22.3%）であった。性別は男177：女98。てんかん発症年齢初発は3.7歳（0-21歳）、平均年齢17.3歳（2-48歳)。てんかん罹病期間平均は13.4年(0-48年)で、発作コントロール年齢は10.9歳（0-47歳）。治療効果は有効213人、難治62人、内服薬数平均3.6剤（0-10剤）であった。脳波異常は224人で認め、脳波異常部位は、前頭部174人、全般性47人。
（2）てんかんとASD併存例71人、性別は男60：女11。発症年齢初発は6.0歳（0-21歳)、平均年齢18.3歳（5-35歳）、てんかん罹病期間平均は11.8年（0-32年）、発作コントロール年齢は12.3歳（0-29歳）、治療効果は有効62人、難治9人、内服薬数は平均3.4剤（1-9剤）。脳波異常は55人で認め、脳波異常部位は前頭部46人、全般性7人　（重複あり)。
（3）てんかんとADHD併存例44人、性別は男30：女14。てんかん発症年齢初発は3.9歳(0-17歳)、平均年齢14.1歳(7-23歳)、てんかん罹病期間平均9.8年（0-20年）、発作コントロール年齢は7.7歳(2-18歳)、治療効果有効42人、難治2人、内服薬数は平均2.7剤(0-8剤)。脳波異常は42人で、脳波異常部位は前頭部34人、全般性6人（重複あり）であった。
（4）てんかんとASD、ADHD併存例29人（5.0%)、性別は男17：女12。発症年齢初発3.7歳（0-14歳)、平均年齢14.5歳(7-22歳)、てんかん罹病期間平均10.6年（1-21年)、てんかん発作コントロール年齢9.4歳（1-19歳)、治療効果有効24人、難治5人、内服薬数平均　4.2剤（1-10剤）、脳波異常は25人で脳波異常部位は前頭部22人、全般性5人（重複あり）であった。
(5)てんかんとID併存例131人(22.3%)、性別は男70：女61。発症年齢初発2.3歳（0-16歳)、平均年齢18.5歳（2-48歳)、罹病期間平均15.9年（2-48年)、発作コントロール年齢12.0歳（0-47歳)、治療効果有効85人、難治は46人、内服薬数平均3.9剤(0-9剤)脳波異常ありは102人で脳波異常部位前頭部72人、全般性29人（重複あり）であった。
【考察】
発達障害にてんかんの併存例は275人（46.8%）と高頻度に認められた。ASDでのてんかん発作の発症時期は、1-5歳の幼児期と11-18歳の思春期に二峰性に認められた。発達障害では、てんかんの併存にも留意しながら包括的な対応が必要である。

てんかん臨床情報データベースおよび脳神経外科データベースの構築

病院脳神経外科
岩崎真樹

はじめに

臨床研究、共同研究および治験を促進するためには、その基盤となるデータベース構築が重要である。外科治療の対象となる難治てんかんは術前精査による豊富な臨床情報を有しているとともに、外科的に切除された脳検体は研究用試料として非常に貴重である。脳神経外科データベースには、これらを有効に利活用する仕組みが求められる。また、てんかんセンターとしては、一定の質を担保しつつ悉皆性のある情報を継続的に蓄積する必要があり、医師の負担なく診断情報を取得することが課題である。

方法

1. 脳神経外科データベース

エクセルフォーマットの手術データベースとして管理し、術前カンファランスのデータをもとに、患者基本情報、術前診断の各項目（MRI、脳波など）、術後の発作転帰、病理所見、手術分類を入力した。2017 年 4 月以降は、国際抗てんかん連盟（ILAE）の 2017 年新てんかん分類に基づいた診断項目が加わっている。術前カンファランスシートと手術記録へのハイパーリンクを設け、詳細情報へのアクセスを容易にした。

手術検体の利活用を促進するために、NCNP バイオバンクと連携し（2017 年 6 月～）、同意取得できた外科治療患者を全例バイオバンクに登録した。標本は、ホルマリン固定と凍結保存が解剖学的に対応するように切り出され、将来的に病理学的所見と分子遺伝学的所見が対応するようにした。

2. バイオリソース部の支援を得て、診療支援システムから外来新患と入院新患の基本情報をデータベース化するワークフローを構築した。これまでエクセル上に構築されていたデータベースを、データベースソフト（Microsoft Access®）に移行した。クエリによって ICD10 に基づく病名コードを取得し、患者抽出に応用した。2017 年新てんかん分類に基づく診断情報は診療支援システム上のテンプレートで入力できるようにし、入院患者を対象に診断情報を得た。

結果

1. 脳神経外科データベースは、1999 年以降 2019 年 11 月までで臨床診断と術式を含む 1956 件のデータベースとなっている。2017 年 4 月以降は新てんかん分類に基づいた診断項目が追加された。手術分類に基づく集計機能を追加し、学会などへの実績報告が容易になった。また、当センター内の共同研究者に情報提供することで、外科症例を対象にした臨床研究の発案・遂行に役立てた。

てんかん外科の診断内訳は Focal epilepsy が 68%、Generalized epilepsy が 25% 、Combined generalized and focal epilepsy が 7%であった。症候群分類としては、皮質形成障害が 37.4%、原因不明 15.4%、海馬硬化症を伴う内側側頭葉てんかん 12.2%の順に多かった。

NCNP バイオバンクへの登録件数は、2019 年 10 月 31 日現在で脳試料として 202 検体、血漿として 223 検体、血清として 118 検体だった。脳試料検体は、てんかん原性脳腫瘍と皮質形成異常の遺伝子解析に利活用された（課題名：分子遺伝学的・病理学的・画像的解析による低悪性度てんかん原性腫傷および関連する皮質形成障害の診断に関する研究[A2018-050]）。

2. 医療情報室およびバイオリソース部研究補助員との協力体制によるデータベース登録体制に移行した 2017 年 6 月から 2019 年 10 月までに、外来台帳として 3105 件、入院台帳として 3045 件を登録した。

てんかんセンターにおける患者年齢は 20 歳以下にピークがあり、外来初診件数の 70.7%、入院件数の 84.1%が小児神経科であった。外来病名は、てんかんが 48.8%、てんかん疑いが 15.4%を占めた。

テンプレート入力による診断情報から、てんかん分類

は Focal epilepsy が 59.9%、Generalized epilepsy が 20.4%、非てんかんが 9.2%を占めた。てんかんの病因は、構造的原因が 61.1%、原因不明が 25.6%を占めた。

考察

てんかん外科の対象は原則として焦点てんかん（Focal epilepsy）であるが、当センターでは全般性の要素を持つてんかんも約 30%を占め、緩和的外科治療（脳梁離断術や迷走神経刺激療法）の対象者や治療が困難な難治てんかん（difficult-to-treat epilepsy）が多い実態が背景にあると考えられる。外科治療の対象となる病因としては皮質形成障害が圧倒的に多く、小児神経科が主力となっている当センターの特徴を反映している。てんかんセンター台帳からお、小児神経科が診療ボリュームの大半を占める当センターの特徴が明らかになった。

バイオバンクとの連携により、外科検体を用いた研究の発展が期待される。バイオバンクを利活用することにより、倫理審査に向けた研究計画の準備が効率化すると考えられた。過去の検体についてもバイオバンクへの同意取得と登録を進めることにより、研究に対する利用価値が更に高まると思われる。

バイオリソース部の支援による新しいワークフローを構築したが、診断係る質の高い情報をどのように取得するかが、依然として課題である。てんかんに関連する保険病名は実臨床にそぐわない面が多く、改定作業が望まれる。診療支援システム上の診断テンプレートを用いた入力作業によって、より質の高い診断情報が得られる可能性が示唆された。

結論

バイオバンク・バイオリソース部との連携により、研究試料の二次利用を容易にした。医師の負担を最小限に抑えたデータベース構築については、更に方法を検討する必要がある。また、データベースの二次利用を容易にする体制の構築も求められている。

参考文献

1. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al: ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. Epilepsia 58:512–521, 2017

レセプトデータを使用したてんかん疫学調査の可能性についての検討

研究分担者：齋藤貴志[1]
国立精神・神経医療研究センター病院小児神経診療部

目的：
てんかんは、最も患者数の多い神経疾患の一つである。諸外国でのデータをもとに、日本でも全年齢層の有病率は少なくとも 0.5～0.8%程度、60 万～100 万人ほどと推測される(1)(2)が、大規模な疫学調査はこれまでに行われていない。小児を対象とした有病率の調査は 1999 年に岡山県で行われた 13 歳未満を対象とした調査がある。その結果では、単発または発熱時の発作を除くと 5.3/1000 となる(3)。日本全国を対象とした、あるいは成人を含む全年齢層を対象とした本格的な疫学調査は未だ行われていない。患者数とその医療需要を明らかにすることは、てんかんに対する対策を行なっていくためにも重要である。
近年、様々な疾患の疫学的調査にレセプトデータが使用されることが増えてきており、神経疾患でも応用されているが(4)(5)、てんかんに関しての奔放での調査はない。本研究では、てんかんの疫学的調査の手段として、保険診療にて作成されるレセプトデータを使用することが可能かどうか検討することを目的とする。
方法：レセプトデータは、診療行為に対する保険請求のためのデータであり、研究目的のデータではない。このため、単純に「てんかん」に関連する傷病名を使用した患者をカウントすると、保険請求のために付与された「保険傷病名」の患者もカウントされるため、過大に計算される。てんかん患者数の集計にできるだけ保険傷病名の患者が含まれることを可能な範囲で減らす必要がある。このため、診療行為、処方された薬剤などを組み合わせることで真のてんかん患者に近づけることが必要である。てんかん診療に関わる精神科医、脳神経外科医、脳神経内科医、小児神経科医により検討を行った。
結果：てんかん（ICD10 コード G40*）を含む傷病名を付与された患者の、病名、診療行為、処方から以下のような手続きを行い、てんかん患者数を集計することが可能であると考えられた。
診療行為：「てんかん指導料」と「在宅迷走神経電気刺激治療指導管理料」はてんかん患者以外では請求ことはないと考えられ、どちらかが請求されていれば、てんかんと考えられる。成人で精神科で診療されている場合は、通院精神療法を請求されている可能性が高いため、他の手法が必要である。
処方：一時的な抗てんかん薬の処方は、てんかんではない可能性が高く、4 週間未満の抗てんかん薬処方はてんかん患者の集計から除外した。抗てんかん薬の中には、てんかん以外の疾患に使用されるため、保険適応外使用される機会の多い薬剤と、使用がてんかんに限られる薬品がある。スチリペントール、ルフィナミド、ペランパネルなど険適応外使用されること可能性がわずかである薬剤は、てんかん患者に対する処方であると考えられる。このため、これらの薬剤の処方がある場合にはてんかん患者として集計した。また、炭酸リチウム、マプロチリン塩酸塩、ペモリンはてんかんの患者に対して使用禁忌となっており、処方されている場合、てんかん患者の集計から除外した。てんかんガイドラインで精神症状のリスクが高いため、精神疾患患者には使用を避けるべき薬剤とされるゾニサミド、トピラマート、レベチラセタム、フェニトイン、プリミドンは、精神科領域で保険外適応使用がされにくいと考えられ、これらの処方がある場合にはてんかん患者として集計した。抗てんかん薬を適応外使用する場合の保険傷病名は「てんかん」とつけられることがほとんどであると推測され、てんかんに関する傷病名（G40*）のうち、

特定のてんかん症候群や症状をつけられている場合、てんかんである可能性が高いと考え、てんかんとして集計した。てんかんの合併頻度が低いが、抗てんかん薬の保険適応外使用が多い疾患に関しては、てんかん患者数の集計から除外する。抗てんかん薬が保険適応外使用される疾患は、ガイドラインやそれに準じるものを参照して以下のものを選択した：神経痛および顔面痙攣、神経障害性疼痛、三叉神経痛、慢性疼痛、線維筋痛症、ジストニア、舞踏病、下肢静止不能症候群、パーキンソン病、振戦、多発性硬化症、頭痛。神経発達症や精神疾患は、精神症状に対して抗てんかん薬が保険外適応使用される機会が多い一方、てんかんが合併しうる。傷病名や診療行為、薬品のみではてんかんの合併があるかどうか、区別がつきにくい。このため、これらの疾患が病名にある場合には、実際に集計してから対応を検討することが必要である。また、成人と異なり、てんかん患者がほぼ小児科で診療されていると考えられ、小児期の患者での検討はより単純で明快な手法で真のてんかん患者数に近い患者数を得られるものと考えられる。

今後の予定：次年度以降に実際に民間レセプトデータを使用した研究を行う。

1. Bell GS, Neligan A, Sander JW. An unknown quantity-The worldwide prevalence of epilepsy. Epilepsia. 2014 Jul;55(7):958–62.
2. Fiest KM, Sauro KM, Wiebe S, Patten SB, Kwon C-S, Dykeman J, et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. Neurology. 2017 Jan;88(3):296–303.
3. Oka E, Ohtsuka Y, Yoshinaga H, Murakami N, Kobayashi K, Ogino T. Prevalence of Childhood Epilepsy and Distribution of Epileptic Syndromes: A Population-based Survey in Okayama, Japan. Epilepsia. 2006 Mar;47(3):626–30.
4. Toyokawa S, Maeda E, Kobayashi Y. Estimation of the number of children with cerebral palsy using nationwide health insurance claims data in Japan. Developmental Medicine & Child Neurology. 2017 Mar;59(3):317–21.
5. Ogino M, Okamoto S, Ohta H, Sakamoto M, Nakamura Y, Iwasaki K, et al. Prevalence, treatments and medical cost of multiple sclerosis in Japan based on analysis of a health insurance claims database. Clin Exp Neuroimmunol. 2017 Nov;8(4):318–26.

てんかん患者における脳波記録のデータベース化に向けた基盤構築
- 環状 20 番染色体症候群の脳波解析 -

分担研究者　石山昭彦
所属機関名　国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科

【緒言】てんかん診療において、脳波は中核的な役割を果たす重要な検査である。現在、我々は、てんかん、睡眠、プリオン病の各研究グループと共同で脳波記録のデータベース化を目指し、準備、体制構築を行っている。脳波データの登録にあたっては、各グループで共通した脳波データの登録形式、脳波記録に随伴する臨床情報の選定を行い、登録の体制を整える必要があり、ワーキンググループにて検討を行っているところである。そのうえで脳波記録の登録のためのサーバ構築を行い、登録可能な体制が整い次第、登録を行っていく。その先駆け的な検討として、今回、環状 20 番染色体症候群の脳波について発作時の脳波所見の特徴についての検討を行った。

【方法】環状 20 番染色体症候群の発作では non-convulsive status (NCS) を認める。当院小児神経科の難治てんかん例で、NCSE を示し、環状 20 番染色体症候群を疑った 10 例を対象として (うち 5 例が環状 20 番染色体症候群と確定診断)、発作時脳波の、①徐波成分の周波数変化、②棘波、徐波の振幅高についての比較検討を行った。

【結果】環状 20 番染色体症候群 5 例のうち周波数変動は全例で認め、その変動幅は 2.5 ～7 Hz の δ～θ 帯域であった。徐波成分の振幅高が棘波成分と比して高い徐波振幅成分優位型は 5 例中の 4 例であった。一方、非環状 20 番染色体症候群群の 5 例のうち周波数変動を認めたのは 2 例であり、徐波振幅成分優位型の例は認めなかった。

【考察】周波数変動を示し、振幅高の比較で棘波よりも徐波の振幅が高振幅を示す脳波所見を示すことが、環状 20 番染色体症候群を疑う際、有用な所見であると考えられた。PET,SPECT 等の各種機能画像の検査においては、環状 20 番染色体症候群例で視床や基底核の異常所見が示され、視床皮質ネットワークの視床フィードバックの障害が徐波の周波数変動に関与している可能性も示唆された。今後、脳波登録のデータベース化をすすめつつ、種々のてんかん症候群の疾患において脳波所見の解析、検討を継続していきたい。

精神・神経研究開発費 1-4
「てんかんの成立機序の解明と診断・治療法開発のための基礎・臨床の融合的研究」
演題名：MR画像を用いたてんかんの診断と病態解明：皮質形成異常における Transmantle signの放射線学的および病理学的特徴

所属　国立精神・神経医療研究センター病院
　　放射線診療部
氏名　佐藤典子

諸言

限局性皮質異形成（Focal cortical dysplasia: FCD）の MRI 所見として知られる **transmantle sign (TMS)**は、皮質から脳室に向かう帯状の異常信号で、FCD type IIb でよく認められ、特徴的な所見とされている。TMS は通常、T2WI および FLAIR で高信号、T1WI で低信号を示すが、まれに、T1WI で高信号を示す症例がある。今回の研究は画像所見と病理学的所見を後方視的に評価して、TMS における T1WI 高信号の原因を検討した。

方法

過去に NCNP にて手術を行い FCD と病理診断され、かつ術前に MRI 検査を行っている 141 症例の症例から、さらに MRI にて TMS を伴う FCD 患者を検索したところ、**25** 人の手術例を認めた。この 25 人を後方視的に、臨床、TMS の画像と病理を評価した。FCD type 分類と TMS の T1WI の信号によりグループ分けをした。画像評価は 2 名の神経放射線科による視覚評価である。臨床評価としては、発症年齢と術後発作予後について、グループ間で比較した。発作予後の評価は観察期間を 12 か月以上とし、ILAE outcome score: 1,2 を good、3～6 を poor とした。また 2 名の神経病理医により、TMS 部の病理学的評価を行った。TMS 部位の顕微鏡観察 200 倍視野で評価した。評価項目は balloon cell の数、dysmorphic neuron の数、gliosis の程度、石灰化の程度で、それをグループ間で比較した。

結果

TMS を有する 25 人の FCD の内、typeⅡa は 3 人で、いずれも T1 で TMS の高信号は示さなかった。残りの 22 人は全て typeⅡb であった。さらにその 22 人のうちで TMC が T1 での高信号を示した typeⅡb の症例は 9 人でであった。高信号を示さなかった typeⅡb は 13 人であった。T1 高信号で typeⅡb を A 群、T1 非高信号で typeⅡb を B 群、T1 非高信号で typeⅡa を C 群とした。年齢はそれぞれ 6.6±5.9 歳、21.7±14.1 歳、13.3±8.6 歳と A 群で低く、B 群で高かった。病理では A 群は B 群に比べて、優位に Balloon cell が多かった(p=0.007)。しかし dysmorphic neuron の数、gliosis の程度、石灰化の程度は３群では優位な差は認めなかった。発症年齢、術後発作予後に有意差はなかった。

考察

141 人の FCD 患者のうち 9 人（約 6%）に T1WI 高信号を示す TMS を認め、そのすべてが typeⅡb であった。病理との比較により信号は Balloon cell の密度を反映している可能性があり、この所見は FCD typeⅡb の鑑別に有用であると思われる。厳密には Balloon cell のどの成分が T1 高信号の原因となるかは明らかではなく、今後の研究課題である。

結論

FCD にて TMS が MR で T1WI で高信号を示す症例は type Ⅱb であり、おそらく Balloon cell がその要因と考えられる。この所見は FCD のサブタイプ鑑別に有用である。

参考文献

1. Colombo N, Tassi L, Deleo F, et al. Focal cortical dysplasia type IIa and IIb: MRI aspects in 118 cases proven by histopathology. Neuroradiology. 2012;54:1065-77
2. Lerner JT, Salamon N, Hauptman JS, et al. Assessment and surgical outcomes for mild type I and severe type II cortical dysplasia: A critical review and the UCLA experience. Epilepsia. 2009;50:1310-35.
3. Urbach H, Scheffler B, Heinrichsmeier T, et al. Focal cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type: A clinicopathological entity with characteristic neuroimaging and histopathological features, and favorable postsurgical outcome. Epilepsia. 2002;43:33-40.
4. Marusic P, Najm IM, Ying Z, et al. Focal cortical dysplasias in eloquent cortex: Functional characteristics and correlation with MRI and histopathologic changes. Epilepsia 2002;43:27-32.
5. Wang DD, Deans AE, Barkovich AJ, et al. Transmantle sign in focal cortical dysplasia: A unique radiological entity with excellent prognosis for seizure control. J Neurosurg. 2013;118:337-44.

成人・高齢者てんかんの臨床病態と治療の解析

金澤　恭子[1]、山田　知香[2]、藤井　裕之[3]
森本　笑子[4]、木村　有喜男[3]、池谷　直樹[5]
西川　典子[6]、塚本　忠[1]、斎藤　貴志[7]
佐藤　典子[3]、岩崎　真樹[8]、高橋　祐二[1]
中川　栄二[7]

国立精神・神経医療研究センター病院
脳神経内科[1]、放射線科[3]
脳神経外科[8]、小児神経科[7]
東京女子医科大学東医療センター
脳神経外科[2]
大阪市立大学大学院 医学研究科
放射線診断学・IVR 学[4]
横浜市立大学附属病院　脳神経外科[5]
順天堂大学医学部附属順天堂医院
脳神経内科[6]

諸言

扁桃体腫大(AE: amygdalar enlargement)が側頭葉てんかん(TLE: temporal lobe epilepsy)の新たなサブタイプとして注目されている。AE を伴う TLE は薬剤抵抗性に経過することもある。(1)。

方法

2017 年 12 月～2018 年 11 月の診療記録を確認し、magnetic resonance imaging (MRI)で内側側頭葉の腫大を認める患者を対象とした。臨床症状、検査結果、治療反応性について後方視的に検討した。

結果

対象は 27 症例[男性：18 症例、入院時年齢（中央値）：52.9(20-81)歳、罹病期間（中央値）：73.8(0-540)ヵ月]であった。24 症例(88.9%)にてんかん発作を、14 症例(51.9%)に記銘力低下を認めた。

^{18}F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography(FDG-PET)は 15 症例で施行され、糖代謝の亢進を 2 症例(13.3%)、低下を 9 症例(60.0%)で認めた。^{99m}Tc-ethyl cysteinate dimer- single-photon emission computed tomography(ECD-SPECT)は 8 症例で施行され、血流の増加を 4 症例(50.0%)で、低下を 1 症例(12.5%)で認めた。

一般髄液検査は 22 症例で施行され、細胞数上昇を 4 症例(18.2%)、蛋白上昇を 7 症例(31.8%)、IgG index 高値を 1 症例(4.8%)、オリゴクローナルバンド(OCB)陽性を 4 症例(19.0%)で認めた。

自己抗体検査は 14 症例で施行され、5 症例(35.7%)で陽性だった(GABAb: 2, GAD65: 1, Casper2: 1, LGI1: 1)。

進行性の記銘力低下やコントロール不良なてんかん発作を認めた 12 症例で抗てんかん薬以外の治療介入がなされた[免疫療法：11 症例、外科治療：1 症例]。

免疫治療としては、ステロイドパルス療法(IVMP: intravenous methyl prednisolone)が 9 症例、IVMP+免疫グロブリン大量療法+血漿交換が 2 症例で施行された。経口ステロイドや免疫抑制剤による後療法が行われたのは 3 症例だった。

フォローアップ期間（中央値）は 9(0-20.5)ヵ月であった。治療効果を認めたのは 9 症例(75%)であった(TR: treatment-responsive)。TR 群では全例でてんかん発作の頻度が減少し、てんかん発作が消失したのは 7 症例(58.3%)であった。治療前後の MMSE が比較できた 9 症例のうち、スコアが改善したのは 5 症例(55.6%)、低下したのは 2 症例(22.2%)であった。

TR 群と non-TR 群との比較では、入院時の年齢（中央値）は TR 群 47.6(20-81)歳、non-TR 群 55.7(48-71)歳であった。治療介入までの期間は TR 群 46.8(1-240)ヵ月、non-TR 群 68.3(15-144)ヵ月であった。

TR 群では髄液検査で細胞数上昇を 3 症例(33%)、蛋白上昇を 4 症例(44.4%)、IgG index 高値を 1 症例(12.5%)で認めた。自己抗体は 5 症例(55.6%)で陽性だった。Non-TR 群の症例ではこれらの検査は基準範囲内であった。

考察

MRI で内側側頭葉の腫大を認める患者では FDG-PET で糖代謝の低下、ECD-SPECT で血流の増加を示す症例が多かった。一般髄液検査、IgG index、OCB の陽性所見を示す症例も少なかった。

non-TR 群に比し、TR 群は比較的若年で治療介入までの期間が短い傾向があった。また、髄液検査や自己抗体検査で異常のある症例で治療効果を認めやすい傾向があった。

結論

MRI で内側側頭葉の腫大を認める患者は進行性の記銘力低下、コントロール不良なてんかんを呈しうる。自己免疫機序による可能性について検討が必要である。特に髄液検査で異常を呈する場合や自己抗体が陽性の場合に免疫療法の効果が得やすい可能性がある。罹病期間が短いほど効果の高い傾向があり、早期の治療介入が望まれる。

参考文献

1. Reyes A, Thesen T, Kuzniecky R, Devinsky O, McDonald CR, Jackson GD, et al. Amygdala enlargement: Temporal lobe epilepsy subtype or nonspecific finding? Epilepsy Res. 2017;132:34-40.

てんかん臨床情報データベースの整備

波多野賢二
TMC 情報管理・解析部・病院医療情報室

緒言

センター病院に電子カルテが導入され約10年が経過し、蓄積される診療情報の量的・質的な価値は日々大きなものになっている。近年進歩がめざましい AI の診療への活用の試みも多く行われるようになり、診療情報の活用のニーズが益々大きくなっている。当センターのてんかん診療グループでは、診療科横断的な患者台帳の整備が進んでおり、電子カルテの診療情報を活用した効率的な疾患データ収集が望まれている。

本分担研究では、当センターにおいて、てんかん診療・研究に従事する診療科医師・研究者が症例の情報を共有し、診療・研究に有効に活用しうる、てんかん臨床情報データベースの整備を目的とする。さらに、診療データをセンター内外で構築されている疾患レジストリ・症例データベースと連携させる環境整備・システム開発を行う。

方法

てんかん患者データベースの充実・運用環境の整備および、電子カルテ臨床情報との連携強化を図るため、以下の 3 点の研究開発を行った。①てんかん患者台帳の基礎データとして提供している患者データ抽出の自動化と、抽出精度向上のための条件検討。②2017 年版てんかん国際分類に対応したデータベース構築に関する検討。③多施設の症例データベースとの連携のための環境構築。

結果

1. てんかん患者データ抽出の自動化と精度向上

月次で実施しているてんかんの外来・入院患者のデータ抽出について、病院情報システムの DWH からの自動出力プログラムを開発し、テスト運用を開始した。データの提供方法が現状ではファイルの手渡しによるため、自動出力の実稼働には至っていないが、環境を整備出来次第運用に供する予定である。抽出する患者データは、外来・入院患者の基本情報と病名のみであったが、病名のコード・属性情報を追加し、データベース登録患者の選択作業の際にその情報を活用する環境を整備した。

2. 2017 年版てんかん国際分類に対応したデータベース構築の検討

2017 年 ILAE てんかん国際分類では「発作型」「てんかん病型」「てんかん症候群」の診断軸の分類と用語が改訂され、データベースの対応が必要である。予備的な検討として、標準的な疾患分類の ICD10・ICD11 と国際分類の比較を行い、今後の対応方針の検討を行った。ICD10 では国際分類との齟齬が大きかったが、ICD11 では国際分類と一定の整合が取られていることを確認した。

3. 多施設の症例データベースのためのネットワーク環境構築

診療情報の標準規格である SS-MIX2 ストレージの臨床情報を外部連携するためのシステムを病院内に導入し、標準・拡張ストレージからのデータエクスポートの検証を実施した。さらに、6NC 横断的研究事業でデータセンターが設置される国立国際医療研究センターと VPN（仮想プライベートネットワーク）による通信回線を整備し、外部データ連携の環境を一通り構築した。

考察

症例データベースは、疾患固有の臨床情報を正確かつ広範に保持することが求めら

れる。日々蓄積される電子カルテの診療情報から精度の高い疾患情報を取得し、症例データベースに反映する仕組みが必要である。長期にわたるデータベースの維持のためには、可能な限り人手による作業を減らし、自動的な処理により省力化した上で安定した精度のデータを取得することが望ましいと考える。

てんかんは疾患概念が複雑多岐にわたる。従来複数の分類が併存する状況があったが、新国際分類で分類・語彙が統一された。今後のてんかんの診療・研究が新国際分類に基づいて行われるようになるため、それに準拠したデータベースの構築を進める必要があると考える。今回は診療現場で病名分類として汎用されるICD分類と新国際分類の対比を行った。ICD10では対応は不十分であったが、ICD11では一定の対応が取られていた。ICD11は今後数年以内に本邦の疾病分類としてICD10に代わり採用される見込みであり[1)]、その際は臨床病名とてんかん分類の対応付けが容易になることが期待される。

多施設の疾患データベース・レジストリにおいて、医療機関の臨床情報をダイレクトに収集するシステムが徐々に広まっている。今回6NC横断研究事業の電子カルテデータの統合ストレージ研究として、電子カルテのデータをSS-MIX2ストレージを介して国立国際医療研究センターに送信するシステムを構築した。2010年に当センター病院に電子カルテが導入されて以来、初めて外部とオンラインで診療情報を連携するシステムとなる。診療データの利活用の推進にあたって、大いに意義があるものと考えている。

結論

てんかん診療・研究に資するてんかん臨床情報データベースの整備および、診療情報の外部連携のための環境整備・システム開発を行った。

参考文献

1) 国際疾病分類の第11回改訂版(ICD-11)公表アナウンス（厚生労働省）
https://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000211217.html

難治性てんかんの分子病理学的病態解明

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所疾病研究第二部
伊藤雅之

【緒言】

難治性てんかんは多剤併用によってもてんかん発作のコントロールが困難な疾患であり、その原因には様々な基礎疾患がある。乳幼児の難治性てんかんの多くは発生異常に起因する。近年の遺伝子解析技術の進展により、多くの疾患の原因遺伝子が解明されている。本研究では、新生児期より難治性てんかん、難聴、重度発達遅滞で発症し、石灰化を伴う大脳白質変性症の原因遺伝子を明らかにし、その発症病態を解明する。

【方法】

難治性てんかんを伴う特異な大脳白質変性症の原因遺伝子と病態解明：症状の類似性が高い7例の患者DNAを用いて、HiSeq2000によるエキソームシークエンス解析を行った。異常遺伝子の共通性から原因遺伝子を推定し、LysRSをコードする*KARS*遺伝子を同定した。さらに、患者にみられた変異*KARS*遺伝子を発現ベクターに組み込み異常タンパクを合成し、ATP消費測定による活性測定を行なった。さらに、Xenopus卵細胞を用いて、morpholino knockdownおよび発現ベクターによる病因性の検証を行った。

（倫理面の配慮）生体試料を用いた遺伝子解析は、当センターの倫理問題検討委員会の承認を得ている。また、遺伝子解析にあたって患者あるいは代諾者への説明と同意のもとに行った。本研究の生物学的研究は当該施設に設置されている組換えDNA実験安全委員会の承認のもとで行なった。

【結果】

全例で*KARS*遺伝子異常をホモ接合体あるいは複合ヘテロ接合体で見つかった。いずれもSIFTやMutationTesterなどのin silico studyで高い病因性予測を示していた。また、変異*KARS*遺伝子産物は、対照群に比して有意に活性低下があった。Xenopus卵細胞の解析結果から臨床表現型を再現することができた。さらに、臨床および特徴的な画像の類似性から新規疾患と考えられた。

【考察】

新しく小児期に発症する難治性てんかん疾患の臨床像と病因遺伝子異常を明らかにした[2]。aminoacyl tRNA合成酵素の遺伝子異常は、広く神経系疾患で報告されているが、今回見つかった表現型はこれまでにない。*KARS*遺伝子異常の報告は1例報告が多く、そのスペクトラムが広いことから疾患概念が確立できなかったが、今回の研究からLysRS活性の残存が表現型に影響を及ぼしている可能性が示唆され、新しい疾患概念を提唱することができた。

【結論】

特異な画像を呈する新生児難治性てんかんの臨床像と病理、遺伝子異常を明らかにしたことより、新しい疾患概念を提唱し、未診断症例の診断への一助となることが期待される。

今後、本疾患のモデル動物を作成し、その発症病態の解明と新規治療法開発を行う。

【参考文献】

1. Itoh M, Dai H, Horike S, Ganzalez J, Kitami Y, Meguro-Horike M, Kuki I, Shimakawa S, Yoshinaga H, Ota Y, Okazaki T, Maegaki Y, Nabatame S, Okazaki S, Kawawaki H, Ueno N, Goto Y, Kato Y. Biallelic *KARS* pathogenic variants cause an early-onset progressive leukodystrophy. *Brain* 2019:142;560-573. doi.org10.1093/brain/awz001

分担研究報告書

（課題名）てんかんモデル動物を用いた病態解明と治療法の開発

（所属）国立精神・神経医療研究センター病態生化学研究部

（氏名）星野　幹雄

緒言

我が国にも多数のてんかん患者がいるが、その中には、未だに病態がわかっておらず、それ故に診断法、治療法が確立されていないてんかんも少なく無い。しかし、もしもそのようなてんかんの良いモデル動物を開発することができれば、病態の理解や診断法・治療法を検討することができる。我々はこれまでに、イハラてんかんラット(IER), Auts2 KO (Auts2-KO)マウス、などの複数種類のてんかん動物モデルを作製し、その解析などを行ってきている。本研究では、これらの動物モデルをさらに解析・利用することにより、ヒトてんかんの発症・病態進展機構を理解し、さらに診断法・治療法の開発に道を拓くことを目的とする。ヒトてんかんリサーチリソースからのヒト相同疾患を同定する。これまでに研究で、我々は薬理学的シャペロンやベタインなどの薬剤がてんかん治療に使える可能性を見出してきたので、これらの薬剤の生理作用や治療効果についても調べる。

方法

複数種類のてんかんモデル動物を作製・解析し、同じ原因で惹起されるヒトてんかんの病理を理解し、さらに診断法の開発につなげる。また、「てんかん症例リサーチリソース」から、モデル動物に相同なヒトてんかんを探し出すことも研究目的とする。我々は、前年度までの研究で薬理学的シャペロンがある種のてんかん動物モデルに効果があることを見出してきたが、さらに様々な薬理作用があるベタインについても効果がある可能性を見出している。そこで、本研究では薬理学的シャペロンの他に、ベタインについても、その抗てんかん作用について科学的に解析する。

結果

(1) Auts2 遺伝子について。

脳内の神経細胞は、神経活動を促す「興奮性シナプス」と、逆にそれを抑え込む「抑制性シナプス」で繋がっており、これらの数がバランスよく保たれることで、健やかな精神活動が営まれる。我々は、AUTS2 が興奮性シナプスの新規形成を抑え、刈り込みを促進することで、結果的に興奮性シナプスの数が増えすぎないように調整していることを見出した。一方で、抑制性シナプスに対してはこのような働きが認められなかった。AUTS2 の機能が失われると、興奮性シナプスの数は増えるが抑制性シナプスは変わらないため、興奮性／抑制性のバランスが破綻してしまい、脳が常に興奮した状態になることがわかった。

(2) IER について。

我々は、IER の原因遺伝子として Dscaml1 を同定し、また「てんかん症例リサーチリソース」から、いくつかのゲノム変異を同定した。C 末端側のアラニンがスレオニンに変異した症例では、その変異 DSCAML1 蛋白質のフォールディング異常により細胞表面に出ることができず、DSCAML1 蛋白質が機能しない。相同なゲノム変異を持つノックインマウスを作成したところ、IER と同様な表現型が見られたので、ヒトのこのアミノ酸変異が疾患の原因となっている可能性が示唆された。また、4PBA のような分子シャペロンをマウスに投与したところ、DSCAML1 の細胞内局在や神経細胞配置、異常脳波などがレスキューされた。

考察

以上から、AUTS2 遺伝子の変異を持つ患者では、脳内の興奮性/抑制性シナプスバランスが破綻した結果、てんかんやあるいは各種精神症状が引き起こされる可能性が示唆された。

また、今回 DSCAML1 に同定したような蛋白質のコンフォーメーション異常によるてんかんの場合には、4PBA のような分子シャペロンが治療薬として使えるかもしれないことがわかった。

結論

AUTS2, DSCAML1 という二つの遺伝子に絞ってんかん発症の原理の一端に迫ることができた。また、シャペロンが新たなてんかん治療薬として使える可能性にも迫ることができた。今後は他の原因遺伝子についても調べ、より一般的なてんかんの発症機構に迫る必要がある。

参考文献

AUTS2 regulation of synapses for proper synaptic inputs and social communication.:

Kei Hori, Kunihiko Yamashiro, Taku Nagai, Wei Shan, Saki F. Egusa, Kazumi Shimaoka, Hiroshi Kuniishi, Masayuki Sekiguchi, Yasuhiro Go, Shoji Tatsumoto, Mitsuyo Yamada, Reika Shiraishi, Kouta Kanno, Satoshi Miyashita, Asami Sakamoto, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Masaki Sone, Kazuhiro Sohya, Hiroshi Kunugi, Keiji Wada, Mitsuhiko Yamada, Kiyofumi Yamada and Mikio Hoshino.

iScience, in press.

てんかんの神経生理学的マーカーの開発と病態解明

国立精神・神経医療研究センター
精神保健研究所
知的障害研究部
加賀佳美

緒言

これまでに小児てんかん例の神経生理学的、心理学的検討を行い、40%に発達障害の併存があり、併存群は非併存に比べて①適応行動が低下すること、②不適応行動（外在化・内在化）が多いことが分かった。そして③注意欠如多動症（ADHD）併存では不注意例が多く、実行機能障害や前頭葉機能に異常を示す群が多いことを見出した。また、④小児てんかん手術施行例では認知機能の術後変化がみられ、発作の改善に伴って前頭葉機能が軽快することが示唆された。本年度は、術前後の検討例が蓄積されたため、改めて検討を行った。また前頭葉てんかんについて、機能ネットワーク解析を行い、実行機能との関連について検討した.

方法

【検討 1】小児てんかん症例における術前後の適応行動、認知機能の変化：

対象は当センター脳神経外科でてんかん手術を行った 21 例。内訳は、前頭葉てんかん（FLE）7 例、頭頂葉てんかん 2 例、側頭葉てんかん(TLE)6 例、CSWS 2 例、Lennox-Gastaut 症候群 1 例、病型不明てんかん 3 例である。術式は、焦点切除術 14 例、後方離断 1 例、脳梁離断 6 例。WISC-IV による全 IQ は平均 72.2（31～135）、術後発作は消失／減少例が 18／3 であった。術前と術後 4～6 ヵ月時に①質問紙（PARS, ASSQ, SNAP-IV, CBCL） ②適応行動（Vineland-Ⅱ）、③実行機能は持続注意テスト（CPT; もぐらーず）施行し、比較検討した。

【検討 2】前頭葉てんかん患者の浅睡眠時機能ネットワークと臨床症状との関連

対象は FLE21 例と定型発達児（TDC）17 例。10/20 法の 19Ch 脳波から、入眠期 non-REM stage I を視察同定し、アーチファクトやてんかん性突発波のない 5 秒×6 epoch を抽出した。δ～γの 5 周波数帯域について 19×19 の Phase lag index(PLI) を算出した。さらに PLI を edge、19 電極部位を node として GRENTA にてグラフ理論値を解析した。得られた結果について、前述の実行機能課題と比較検討を行った。

なお，本研究の実施にあたり、当センター倫理委員会の承認を得て行っている(A2017－019)。

結果

【検討 1】

①自閉スペクトラム症（ASD）の指標である ASSQ (mean±SD, 術前 12.7±11.4, 術後 9.1±8.3, p=0.026)、不適応行動の指標である CBCL の内向尺度（術前 57.3±8.5, 術後 54.5±8.6, p=0.018)で有意に改善を認めた。②適応行動は日常生活スキルが改善していた(術前 61.7±23.3, 術後 64.4±24.1, p=0.033)。また、下位項目では受容言語（術前 11.4±3.4, 術後 13.0±2.3, p=0.0076)、コーピングスキル(術前 11.4±3.4, 術後 13.1±4.8, p=0.045) の有意な改善を認め

た。③実行機能の改善傾向はあるものの有意差はなかったが、お手つきエラー、反応時間のばらつきで改善傾向を認めた。適応行動との関連では、反応時間のばらつきの改善率が高いほど家事（適応行動）の項目で術後の評価点が高くなっていた（ステップワイズ法　$p=0.0034$, $R^2=0.3716$）。

表１　術前後の持続注意テストの変化

	術前	術後	p 値
お手つき	5	3.8	0.069
見逃し	1.3	0.8	0.118
反応時間 (RT) msec	519	493	0.962
RT のばらつき msec	111.8	105.2	0.096

【検討 2】

FLE と TDC 群間の PLI は、γ 帯域の全ての ROI で有意差を認めた。特に FLE 群では、Fp1-Fp2、F3-F4、C3-C4、P3-P4、O1-O2 で有意に低下していた。すなわち大脳半球間の連結性が FLE 群で低くなっていた。また前頭部の Betweenness Centrality（BC)は、FLE 群で有意に低下しており、前頭葉の連結性も FLE 群の方が低いことがわかった。PLI は特に CPT のお手つきエラーと関連を認め、実行機能に関連している可能性が示唆された。

考察

【検討 1】小児の手術により、自閉傾向の改善を認め不適応行動が改善した。また日常生活スキルが上昇し適応行動も改善していた。実行機能についても改善傾向を認めており、実行機能の改善によって、特に日常生活スキルの中でも家事（お手伝い）が出来るようになることがわかった。

【検討 2】

FLE 患者では浅睡眠期の左右大脳半球の同期性が低いことがわかった[1)]。これまでの報告でも[2)]、TLE の患者に対する安静時機能的 MRI の研究では半球内、半球間の脳連結性低下が知られている。また、γ 帯域の半球間結合の低下は、CPT のお手付きエラーの増加と関連していた。このことは、実行機能の中でも選択的注意機能に関わる可能性がある[3)]. 以上より、FLE の実行機能障害には前頭部や半球間の連結の乏しさが関与している可能性が示された。

研究協力者

上田理誉、稲垣真澄（国立精神・神経医療研究センター　精神保健研究所　知的・発達障害研究部）

齋藤貴志、中川栄二、須貝研司、佐々木征行（国立精神・神経医療研究センター病院　小児神経科）

岩﨑真樹（国立精神・神経医療研究センター病院　脳神経外科）

竹市博臣（理化学研究所）

参考文献

1) Ueda R, Kaga Y, Takeichi H, et al, Brain Dev, 2020
2) Diessen et al, Neuroimage, 2013
3) Berry RJ et al, 2012

グリア細胞の視点によるてんかん分子病態の解明

小泉修一[1]、佐野史和[2]
山梨大　院　医　薬理[1]，小児科[2]

【緒言】

てんかんモデル動物及びてんかん患者脳のてんかん焦点において、活性化したグリア細胞の所見が認められる。我々は、ピロカルピンけいれん重積（SE）によるてんかん原性モデルを用い、この活性化したグリア細胞「アストロサイト」がてんかん原性の原因であることを見いだし、これを「てんかん原性型アストロサイト」と命名した。てんかん原性型アストロサイトの表現型は、IP3 受容体タイプ 2（IP3R2）を介した Ca^{2+}興奮性の亢進であった。しかし、この Ca^{2+}の異常興奮から、てんかん原性に至る分子メカニズムは不明のままである。今回、てんかん原性型アストロサイトが、てんかん原性を誘導するメカニズム解明を目指し、RNA-seq によりてんかん原性型アストロサイトの分子生物学的な性質の解明を行った。

【方法】

ピロカルピン SE によりてんかん原性を獲得したマウス海馬を取り出し、磁気分離法によりアストロサイトを分離した。これまでの研究で、IP3R2-KO マウスは、てんかん原性を認めないことから、同様にピロカルピン SE 後の IP3R2-KO マウスのアストロサイトも分離した。(1)生理食塩水/野生型（WT）、(2)ピロカルピン SE/WT、(3)生理食塩水/IP3R2-KO 及び(4)ピロカルピン SE/IP3R2-KO それぞれ 4 群のアストロサイトの RNA-seq 解析を行った。

【結果】

SE により、WT では 438 遺伝子発現が up、150 が down した。しかし、IP3R2KO では 105 が up、324 が down であった。WT で変化した分子は、感染や免疫系に関する分子が多かった。SE により WT では変化するが IP3R2KO では変化しない分子、つまりてんかん原性型アストロサイトの実行分子候補として、50（up）及び 109（down）分子を抽出した。その中に、*Grm5*(代謝型グルタミン酸受容体 mGluR5)を見いだした。mGluR5 は Gq 共役型のグルタミン酸受容体であり、正常なアダルトアストロサイトには発現していない。しかし、慢性疼痛やてんかんなどの病態時にアストロサイト特異的に発現してくる受容体である[1)]。mGluR5 は、ピロカルピン SE 後、7，14 日以降にアストロサイト特異的に発現亢進した。

【考察】

mGluR5 は Ca^{2+}依存的に、thrombospondin 等のシナプス新生因子を放出することが知られている。アストロサイト mGluR5 が、ピロカルピン SE による海馬のシナプス再編、ネットワーク再編等を引き起こし、てんかんネットワーク形成に関与している可能性が示唆された。

【結論】

アストロサイト mGluR5 とてんかん原性獲得との相関関係が明らかとなった。

【参考文献】

1)Kim et al, J Clin Invest, 126, 1983-1997 (2017)

1-4. Integrative research on pathomechanism, diagnostic methodology and therapeutics for epilepsy

Eiji Nakagawa, MD, PhD
Epilepsy Center, National Center Hospital, NCNP,
Tokyo, Japan

Background: Rapid advances in molecular genetics, neuroimagings and neurophysiology over the last 10 to 20 years have been a catalyst for epilepsy research in neurobiology, developmental psychopathology, and translational neuroscience. Whereas integrative study on pathomechanism, diagnostic methodology and therapeutics for epilepsy relevant to congenital factors do not have well established.

Purpose: The purpose of our research group is to clarify the pathomechanism, diagnostic methodology and therapeutics for epilepsy and to establish a reliable diagnostic methodology and therapeutics for epilepsy. Our final goal is to build up resource repository system for epilepsy research in NCNP. This should include various clinical disciplines as well as basic neurosciences.

Members of the research group

Principal Investigator: Eiji Nakagawa (NCNP)
Co-Investigator: Masaki Iwasaki (NCNP), Kenji Hatano (NCNP), Takashi Saito (NCNP), Akihiko Ishiyama (NCNP), Noriko Sato (NCNP), Kyoko Kanazawa (NCNP), Yoshimi Kagai (NCNP), Masayuki Itoh (NCNP), Mikio Hoshino (NCNP) and Schuichi Koizumi (University of Yamanashi).

Methods and Results

Iwsaki et al. were undertaken to establish the database compilation of neurosurgical epilepsy clinical information and construction of the clinical trial network. The development of patient database is essential to promoting joint researches and clinical trials. Here we report progress in developing 1. Neurosurgical database and 2. Epilepsy patient database of the NCNP Epilepsy Center. Excel-based NCNP Neurosurgical database was developed. Clinical information including patient basic profiles, diagnostic findings, seizure outcome, pathological diagnosis, and classification of surgical

procedures was collected. The epilepsy classification was adapted to the new 2017 international classification system of epilepsy and seizures (1). As of November 2019, a toal of 1956 surgeries were listed. The database was utilized for case reports and clinical studies. Registration of epilepsy patients to the NCNP Biobank was started in June 2017. Blood samples and surgical specimens, if available, in all surgical cases of epilepsy are prospectively stored for utilization in future researches. As of October 2019, a total of 202 brain tissue samples have been registered to the Epilepsy Biobank. The tissue samples are currently utilized for a study on genetic analysis of epileptogenic tumors and malformation of cortical development. A new workflow was established to generate epilepsy clinic inpatient and outpatient database from electric medical records. Epilepsy classification was adapted to the new 2017 classification system. Total 3105 and 3045 cases have been entered into outpatient and inpatient databases, respectively since June 2017. Analysis of the database elucidated patient characteristics in the NCNP epilepsy center. Efficient data entry of diagnostic information continues to be a priority issue for building high-quality data

Hatano was undertaken to construct clinical information database of epilepsy patients using the common identity management system (Super ID Registration Management System) in NCNP. Since the introduction of electronic medical records to the center hospital about ten years ago, the quantitative and qualitative value of the medical information accumulated is increasing day by day. In recent years, there have been many attempts to utilize AI for medical care, and the need for the use of medical information is increasing. In the epilepsy medical group of this center, the improvement of the patient ledger across the medical department is progressing, and efficient disease data collection using the medical information of the electronic medical record is strongly expected. In this research we develop a database of epilepsy clinical information that medical physicians and researchers engaged in epilepsy care and research can share information on cases and use them effectively in medical care and research. In addition, we will develop an environment and system that coordinates medical data with disease registries and case databases running inside and outside NCNP.

Saito et al. was undertaken to establish the reliminary study on feasibility of epidemiologic epilepsy of survey using health claim data. Epilepsy is one of the most prevalent neurological disorders. Based on data from other countries, the prevalence of all age groups in Japan is estimated to be at least 0.5-0.8%, and total number of patients is estimated to be 600,000 to 1 million. There is a survey on the prevalence rate for children under 1999 in Okayama prefecture in 1999. The result is 5.3 / 1000, excluding seizures during single or fever. No epidemiological survey including all age groups has been conducted in Japan. Clarifying the number of patients and their health needs is also important for taking measures against epilepsy. In recent years, health claim data have been increasingly used for epidemiological investigations of various diseases and are being applied to neurological diseases as well, however, there is no study on epidemiology of epilepsy in Japan. The purpose of this study is to examine whether it is possible to use the health claim data as a means of epidemiological investigation of epilepsy.

Method: Because the health claim data is made for health claims and administration, not for research purposes, we have to aware that there are many pitfalls when we use health claim data for research. The most important thing is over- or underestimation of number of patients. Physicians may give patients the diagnosis, so called “insurance diagnosis”, they did not actually have, according to health services they provided. If we simply count all patients who was given the diagnosis of “epilepsy”, the number of patients would be overestimated because the number of patients who have the “insurance disease name” granted for the insurance claim is also counted. It is necessary to reduce the number of patients with “insurance diagnosis” from the total number of patients with the diagnosis of “epilepsy” as much as possible. Therefore, it is necessary to approach a true epileptic patient by combining medical treatment and prescribed drugs. The study was conducted in cooperation with psychiatrists, neurosurgeons, neurologists, and pediatric neurologists.

Results: It was considered possible to estimate the number of epilepsy patients using health claim data by combination of the diagnosis, medical procedure, and prescription.

Conclusion: We are considering applying this method to a real health claim data.

Ishiyama et al, were undertaken to construct the major seizure type of Ring chromosome 20 syndrome is non-convulsive seizures. Among the 10 patients with refractory epilepsy and NCS, which were under the care of the Department of Child Neurology, NCNP and suspected of Ring chromosome 20 syndrome, the ictal EEG with spike and slow wave complex were analyzed for the frequency variation of slow-wave and the amplitude of spike-wave compared with slow-wave. All 5 cases with Ring chromosome 20 syndrome had frequency variation and 4 cases with Ring chromosome 20 syndrome had the slow-wave dominant type of ictal EEG compared with 2 cases and 0 cases of 5 non- Ring chromosome 20 syndrome cases, respectively. We concluded that these two specific factors are important for diagnosis of Ring chromosome 20 syndrome. We also speculated that the dysfunction of thalamus and basal ganglia might be responsible for the mechanism of refractory epilepsy with Ring chromosome 20 syndrome.

Nakagawa et al. proposed that in cases of drug resistant of absence epilepsy, we should take the possibility of frontal lobe absence epilepsy into consideration, and recommend the combination of VPA and LTG drug treatment. A comorbid rate of epilepsy is high for the neurodevelopmental disorders. There are some papers reported an epilepsy comorbid for the ASD in 5-38% and reported to 12-17% in ADHD. This research aimed to estimate of the comorbid to neurodevelopmental disorders and epilepsy. This study showed the comorbid rate of epilepsy was 46.8% patients in the neurodevelopmental disorders. The onset time of the epilepsy observed in ASD was found in the 1-5-year-old infancy and 11-18-year-old puberty by bimodality. Comprehensive correspondence is necessary for the neurodevelopmental disorders while noting comorbid of epilepsy.

Sato et al. examined the volume of FLAIR high signal area around the postoperative margin in MRI to observe its time-course change in non-neoplastic epileptogenic patients. If in patients who received resection of neoplasm without disappearance of epileptic seizure, the increased abnormal MR signals around the postoperative margin would not necessarily mean tumor recurrence. We evaluated the time course of postoperative FLAIR-high-signal lesions at the surgical margin in non-neoplastic patients. Interestingly, few cases showed an increased high signal during follow-up,

and significant associations between the enlargement of FLAIR-high-signal lesions and the presence of postoperative seizures/EEG spikes were detected. Therefore, our results suggested that the enlargement of FLAIR-high-signal lesions at the surgical margin does not always indicate tumor recurrence. Lissencephaly spectrum includes three types, agyria/patchygiria, bandheterotopia, and mixed type. They are diagnosed by MRI. We evaluated Lissencephaly spectrum by 2D routine MR images and also by 3D-T1 and 3D-DIR images and compared the detectability visually and quantitatively in 20 Lissencephaly spectrum patients. In 15 out of 20, subcortical faint increased intensity areas were detected which were not compatible with agyria/patchygiria nor bandheterotopia. DIR is useful for diagnosis of lissencephaly spectrum and its new criteria.

Kanazawa et al. were undertaken to establish the analysis of clinical pathophysiology of epilepsy in the adult and elderly using search for several autoantibodies and the method of wide-band electroencephalography.
[Purpose] Amygdalar enlargement (AE) has recently attracted attention as a novel subtype of temporal lobe epilepsy. In the present study, clinical course of the patients with the increased volume of the mesial temporal lobes were retrospectively analyzed regarding their treatment. Temporal lobe epilepsy with AE may be resistant to anti-epileptic drugs (AEDs) .
[Method] Patients with the increased volume of the mesial temporal lobes on magnetic resonance imaging (MRI) were identified by reviewing the medical record from December 2017 to November 2018 at the Department of Neurology at National Center of Neurology and Psychiatry. Clinical symptoms, laboratory data, and responsiveness to treatment were retrospectively analyzed. Comparison between patients responsive to treatment other than AEDs (TR) and those not responsive (non-TR) was also performed.
[Results] Twenty-seven patients [18 males, median age at admission: 52.9 (20-81) years, median disease duration: 73.8 (0-540) months] were included in the study. Twenty-four patients had epilepsy, and 14 patients had memory impairment. Autoantibody test, performed in 14 patients, was positive in five patients (35.7%). Treatment other than AEDs, performed in 12 patients (immunotherapy: 11 patients, surgery: 1 patient), was effective in nine patients (75.0%). Interval between disease onset and treatment was shorter

(median 46.8 vs. 68.3 months) in TR group. Cerebrospinal fluid (CSF) analysis showed cell elevation in 33.3%, protein elevation in 44.4%, and IgG index elevation in 12.5% of the patients in TR group. Autoantibody was positive in 55.6% of the patients in the group. Patients in Non-TR group did not show these abnormalities. [Conclusion] Patients with the increased volume of the mesial temporal lobes on MRI may show progressive memory impairment and/or poorly controlled epilepsy. Autoimmunity should be considered as a possible etiology. Immunotherapy could be effective, especially in patients with abnormal CSF examination and/or positive autoantibody. Early intervention is needed as it may be more effective.

Kaga et al. were undertaken to evaluate the effects of subsequent trials in the continuous performance test in children with ADHD associated with epilepsy and concluded that children with ADHD have a trouble in response switching when an inhibitory process is involved. The clarification of pathophysiological findings and exploration study of neurophysiological biomarker for epileptic children with ADHD.

[Introduction] Alteration of cognitive function after surgery varies from case to case according to the patients' background characteristics, such as etiology, focus, and seizure duration. It is difficult to correctly predict and assess the postoperative cognitive function in each case. Adaptive behavior could describe the typical performance of daily activities and represents the ability to translate cognitive potential into real-world skills. We examined the relationship between alterations of executive function (EF) and adaptive behavior was examined in school-age children undergoing surgery for intractable epilepsy. In addition, we investigated the relationship between electroencephalographic (EEG) functional connectivity and executive function in children with frontal lobe epilepsy (FLE).

[Examination 1] We enrolled 21 children who had focal resection or corpus callosotomy for intractable epilepsy (FLE;7, Temporal lobe epilepsy;6, Parietal lobe epilepsy;2, CSWS;2, Lennox-Gastaut syndrome; 1, unknown epilepsy; 3). Mean full-IQ (WISC-IV) was 72.2 (range 31 to 135). Seizures after operation was disappeared (18 cases) and diminished (3 cases). We obtained answered questionnaires on attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and autism spectrum disorder (ASD), and adaptive behavior using the Vineland Adaptive Behavior Scale, 2nd edition (VABS-II) and performed

continuous performance tests (CPTs) on the children presurgery and postsurgery. ASD symptoms improved after surgery. Improved ASD symptoms resulted in an increase in the score on the coping skills subdomain. Daily living skills was improved after surgery. The commission error (CE) in the CPT and variability of reaction time tend to improve. The lower CE observed after surgery also resulted in an increase in the score on the domestic chores subdomain.
[Examination 2] We enrolled 24 children with FLE (mean age, 11.0 years; 13 boys) and 22 sex-, age-, and intelligence-matched typically developing children (TDC) to undergo 19-channel EEG during light sleep. We estimated functional connectivity by using the phase lag index (PLI) that captures the synchronization of EEG. The average gamma PLI was lower in the FLE group than in the TDC group, especially between long-distance fronto–parietal pairs, interhemispheric frontal pairs, and interhemispheric parieto–temporal pairs. Lower gamma PLIs during light sleep predicted higher commission errors in the CPT.
[Conclusion] (1) Improvement of EF and ASD symptoms resulted in better adaptive behavior after surgery. That was significant information for identifying, pre- and post-operative evaluation and re-evaluation of children with epilepsy that require special education and related services. (2) A lack of functional connectivity between fronto–parietal pairs in children with FLE predicted poor response inhibition.

Ito et al. discovered a novel epileptic syndrome with *KARS* gene (encoding LysRS) mutations. The clinical features were characteristically intractable epilepsy after birth, severe developmental delay, congenital deafness and progressive leukodystrophy with intracranial calcification. The abnormal LysRSs functions due to the genetic variants were confirmed. We made some various patients' based-mutation expression vectors. Then, we measured mutated LysRS activities and transfected them into Xenopus oocytes to reproduce the phenotypes of patients. As results, we revealed significant decreasing LysRS activities and pathological reproduction.Here, we can propose a novel severe progressive leukodystrophy caused by *KARS* gene mutation.

Hoshino et al. were undertaken to determine that a cause gene of Ihara

epilepsy rat was *Dscaml1* and clarified the role that gene product DSCAML1 protein served as for the neural network formation.

Impairments in synapse development are thought to cause numerous psychiatric disorders. *Autism susceptibility candidate 2* (*AUTS2*) gene has been associated with various psychiatric disorders, such as autism and intellectual disabilities. Although roles for AUTS2 in neuronal migration and neuritogenesis have been reported, its involvement in synapse regulation remains unclear. In this study, we found that excitatory synapses were specifically increased in the *Auts2*-deficient primary cultured neurons as well as *Auts2* mutant forebrains. Electrophysiological recordings and immunostaining showed increases in excitatory synaptic inputs as well as c-fos expression in *Auts2* mutant brains, suggesting that an altered balance of excitatory and inhibitory inputs enhances brain excitability. *Auts2* mutant mice exhibited autistic-like behaviors including impairments in social interaction and altered vocal communication. Together, these findings suggest that AUTS2 regulates excitatory synapse number to coordinate E/I balance in the brain, whose impairment may underlie the pathology of psychiatric disorders in individuals with *AUTS2* mutations.

Koizumi et al. analyzed the role of glial cells, especially astrocytes, in induction of epileptogenesis. Findings of activated glial cells in the epileptic focus of epileptic animal models and epileptic epileptic patients. Using an epileptogenic model of pilocarpine convulsive accumulation (SE), we found that this activated glial cell "astrocyte" is the cause of epileptogenicity and named it "epileptogenic astrocyte". The phenotype of epileptogenic astrocytes was enhanced Ca2+ excitability via IP3 receptor type 2 (IP3R2). However, the molecular mechanism by which this abnormal Ca2+ excitation leads to epileptogenicity remains unclear. To elucidate the mechanism by which epileptogenic astrocytes induce epileptogenicity, we used RNA-seq to elucidate the molecular biology of epileptogenic astrocytes and found that the gene of metabolic glutamate receptor mGluR5, *Grm5*, is up-regulated. There was a close correlation between the amount of *Grm5* and epileptogenicity. mGluR5 is almost absent in the adult astrocytes, but upon SE induction, it was selectively upregulated in the hippocampal astrocytes. Thus, it is suggested that upregulation of mGluR5 in astrocytes should somehow change synaptic transmission or synaptic connection seen in neuropathic pain model

mice (Kim et al, J Clin Invest 2016), however, we must await additional experiments to clarify causal relationship between them.

Conclusion

These comprehensive and interdisciplinary research of epilepsy will continue next second year. Each research will bring further evidences to establish a reliable diagnostic methodology and therapeutics for epilepsy.

１－５　難治性神経疾患における免疫病態の解明と診断・治療法開発

主任研究者 国立精神・神経医療研究センター神経研究所

山村 隆

総括研究報告

１．研究目的

本研究班は、NCNPの研究組織を活用して、脳神経内科学、免疫学、放射線医学、病理学、分子生物学などの専門家が連携し、痛みや疲労症状などを主徴とする難治性疾患、原因不明の脳炎・脳症（橋本脳症、NINJAなど）、自己免疫性てんかん、難治性免疫性ニューロパチー（CIDP）などの難病において画期的な診断・治療法の開発につながる知見を得ることを目的とする。具体的には、患者血液や髄液および、剖検例の中枢神経組織を材料としたリンパ球解析を実施するとともにMRI拡散テンソル画像解析など通常のMRIで検出できない中枢神経病巣との対応関係について検討し、上記難治性神経疾患の病態解明研究を進める。なおNCNPだけで対応できない研究開発について、外部機関の協力を得て研究を推進する。

２．研究組織

主任研究者
山村 隆　国立精神・神経医療研究センター
分担研究者
北條浩彦　国立精神・神経医療研究センター
荒木敏之　国立精神・神経医療研究センター
大木伸司　国立精神・神経医療研究センター
佐藤和貴郎　国立精神・神経医療研究センター
岡本智子　国立精神・神経医療研究センター病院
林　幼偉　国立精神・神経医療研究センター病院
佐藤典子　国立精神・神経医療研究センター病院
齊藤祐子　国立精神・神経医療研究センター病院
漆谷　真　滋賀医科大学
髙嶋　博　鹿児島大学大学院
近藤誉之　関西医科大学医学部
三宅幸子　順天堂大学医学部
千原典夫　神戸大学医学部

３．研究成果

病態未解明の自己免疫性神経疾患に対する学際的アプローチとして、基礎研究、病理組織を活用した研究、リンパ球解析研究、画像研究等を研究班横断的に進めている。今年度は初年度であり、体制構築を進めたことに加え、いくつか興味深い知見が得られており、以下に紹介する。

1）基礎研究から出発した代表的な研究が、神経系の慢性炎症形成の分子機序解明（NCNP 免疫研究部　大木）である。この研究は、MS 患者末梢血の病原性リンパ球として NR4A2 陽性ヘルパーT 細胞を同定したことから始まり、その後、進行型 MS の促進に関連する病原性リンパ球として Eomes 陽性 T 細胞を同定（B. Raveney et al. Nat Comm. 2015）、さらにその発生に関する検討を動物モデルを用いて進めた結果、ミクログリア活性化に引き続いて産生される type I インターフェロンが抗原提示細胞の Prolactin 産生を促し、Prolactin を介して Eomes 陽性 T 細胞が誘導される機序を明らかにした（C. Zhang et al. PNAS, 2019）。横への展開として、MS および視神経脊髄炎の剖検脳脊髄病理組織における同細胞の同定（B. Raveney, 山村ら）および、末梢神経の自己免疫疾患である慢性炎症性脱髄性脊髄神経根炎（CIDP）患者末梢血における NR4A2 陽

性細胞/Eomes 陽性細胞の関与についての検討（NCNP 免疫研究部　佐藤和）を進めている。

2）自己免疫性脳炎・脳症は、原因不明の子宮頸がんワクチン接種後脳症や筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群（ME/CFS）さらに NINJA とも臨床的・免疫学的に共通点が多いと考えられる。なお NINJA は NCNP が同定した MRI 画像正常であるが MS の臨床診断基準を満たす疾患群である（Takewaki et al. Neurology NN, 2018）。鹿児島大の高島らは、多数の症例について、自己抗体測定・リンパ球解析と治療経過・予後についてまとめた。順天堂大の三宅らは自己免疫疾患マウスモデルで症状と関連する自然免疫系の変化を明らかにした。NCNP の荒木は基礎的手法を用いた抗原同定法の検討に着手した。NCNP 放射線科の佐藤らは、新たな MRI 画像解析である構造ネットワーク解析の手法を用い、ME/CFS の特定の部位の異常と血清中の抗自律神経受容体抗体との有意な相関を明らかにした。NINJA は血液浄化療法の有効例が多いが、NCNP 病院脳神経内科の林はその治療成績と関連する免疫学的異常について知見を得ている。

その他、リンパ球解析に基づいた自己免疫性てんかんの免疫病態解析（神戸大　千原）や抗体療法と細胞移植療法を組み合わせた ALS の新規治療開発（滋賀医大　漆谷）など独自性の高い研究が順調に進められている。

4．研究成果刊行一覧

1. Chenyang Zhang, Ben J.E.RAveney, Hirohiko Hohjoh, Chiharu Tomi, Shinji Oki, Takashi Yamamura: Extrapituitary prolactin promotes generation of Eomes-positive helper T cells mediating neuroinflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Oct.2019, 21131-21139,
2. Chihara N, Matsumoto R, Yamamura T. Plasmablasts and neuroimmunological disorders. Immunol Med., 42(3): 103-107, 2019
3. Tsubota M, Fukuda R, Hayashi Y, Miyazaki T, Ueda S, Yamashita R, Koike N, Sekiguchi F, Wake H, Wakatsuki S, Ujiie Y, Araki T, Nishibori M, Kawabata A. Role of non-macrophage cell-derived HMGB1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and its prevention by the thrombin/thrombomodulin system in rodents: negative impact of anticoagulants. Journal of Neuroinflammation 16: 199 2019 10.1186/s12974-019-1581-6
4. Kimura Y, Sato N, Ota M, Shigemoto Y, Morimoto E, Enokizono M, Matsuda H, Shin I, Amano K, Ono H, Sato W, Yamamura T. Brain abnormalities in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: Evaluation by diffusional kurtosis imaging and neurite orientation dispersion and density imaging. J Magn Reson Imaging. 2019 Mar;49(3):818-824.
5. Chen T, Noto D, Hoshino Y, Mizuno M, Miyake S. Butyrate suppresses demyelination and enhances remyelination. J Neuroinflammation. 2019 Aug 9;16(1):165.
6. Miyake S, Yamamura T. Gut environmental factors and multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2019 Apr 15;329: 20-23.
7. Ben JE Raveney, Wakiro Sato, Daiki Takewaki, Chenyang Zhang, Tomomi Kanazawa, Youwei Lin, Tomoko Okamoto, Manabu Araki, Yukio Kimura, Noriko Sato, Terunori Sano, Yuko Saito, Shinji Oki, and Takashi Yamamura: Eomes expression defines a pathogenic CD4+ T cell population associated with secondary progressive multiple sclerosis. BRAIN (submitted)
8. Suzuki, F., Sato, N., Ota, M., Sugiyama, A., Shigemoto, Y., Morimoto, E., ... & Kawamura, M. (2020). Discriminating chorea-acanthocytosis from Huntington's disease with single-case voxel-based morphometry analysis. Journal of the Neurological Sciences, 408, 116545.
9. Ueda, R., Matsuda, H., Sato, N., Iwasaki, M., Sone, D., Takeshita, E., ... & Nakagawa, E. (2019). Alteration of the anatomical covariance network after corpus callosotomy in pediatric intractable epilepsy. PloS one, 14(12).
10. Minamiyama S, Ueda S, Nakashima R, Yamakado H, Sakato Y, Yamashita H, Sawamoto N, Fujimoto Ry, Nishino I,

Urushitani M, Mimori T, Takahashi R. Thigh muscle MRI findings in myopathy associated with anti-mitochondrial antibody. Muscle Nerve 2020, 61:81-87
11. Kobashi S, Terashima T, Katagi M, Nakae Y, Okano J, Suzuki Y, Urushitani M, Kojima H. Transplantation of M2-deviated microglia promotes recovery of motor function after spinal cord injury in mice. Mol Ther 2020, 28:254-265
12. Zong C, Hasegawa R, Urushitani M, Zhang L, Nagashima D, Sakurai T, Ichihara S, Ohsako S, Ichihara G. Role of microglial activation and neuroinflammation in neurotoxicity of acrylamide in vivo and in vitro. Arch Toxicol. 2019, 93(7):2007-2019.
13. Yamaguchi Y, Li F, Tsujimura A, Kamada M, Ito H, Maki T, Sawamoto N, Urushitani M, Takahashi R. Phosphorylated NF-kB subunit p65 aggregates in granulovacuolar degeneration and neurites in neurodegenerative diseases with tauopathy. Neurosci Lett 2019, 704: 229-235.
14. Hishizawa M, Yamashita H, Akizuki M, Urushitani M, Takahashi R. TDP-43 levels are higher in platelets from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis than in healthy controls. Neurochem Int. 2019, 124, 41-45.
15. Ayaki, T., Murata, K., Kanazawa, N., ...M. Urushitani, F. Furukawa H. Ito, R. Takahashi Myositis with sarcoplasmic inclusions in Nakajo–Nishimura syndrome: a genetic inflammatory myopathy. Neuropathology and Applied Neurobiology. 2020 DOI: 10.1111/nan.12614
16. 髙嶋　博　自己免疫性脳症の臨床症候—ヒステリーとの鑑別　神経治療　３６：341-344
17. 竹脇大貴，山村　隆：神経変性疾患と腸内細菌．特集．腸内細菌が関与する諸疾患．Current Therapy 37:58-63, 2019
18. 山村　隆，木村公俊：多発性硬化症と制御性T細胞．特集　制御性T細胞-研究の現在．医学のあゆみ 268: 1229-1233, 2019
19. 山村　隆:総論．免疫性神経疾患の治療学．(特集編輯 山村　隆) BIO Clinica 460: 4-5, 2019
20. 佐藤和貴郎　特集「免疫性神経疾患の治療学」「新規治療薬の開発」 BIO Clinica 34巻5号 Page470-474 (2019.05)
21. 千原典夫，松本理器，山村　隆：Plasmablastsと免疫性神経疾患．Clin Neurosci 37: 744-746, 2019

ヒト中枢神経病理組織のフローサイトメーターを用いた免疫細胞の検討

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　　山村　隆

緒言

多くの神経疾患は中枢神経組織への炎症性の機序の関与があり、免疫細胞、中でもT細胞とB細胞は中枢神経組織へ浸潤し、炎症や脱髄や軸索障害に寄与していることが知られている。局所での免疫細胞同士の相互作用やミクログリア・アストロサイトとの関係により、免疫反応が形作られている。代表的な自己免疫性の炎症性脱髄疾患である多発性硬化症は、獲得免疫系が主な役割を果たす再発寛解型の他に、徐々に悪化する神経障害と脳脊髄の萎縮—神経細胞死の進行—を特徴とする二次進行型(SPMS)があり、難治性である。SPMSにおいて、我々のグループは転写因子 Eomes 発現を特徴とするヘルパーT細胞がMSの動物モデルの進行性病態を形成し、かつSPMS患者の末梢血中で増加していること、さらに同細胞がGranzymeBという細胞障害性因子を発現していることを見出した(Raveneyら 2015 Nat. Comm, Brain submitting)。本研究では、剖検組織を用いた組織浸潤免疫細胞解析による同細胞の同定や機能解析を進める。

方法

NCNP 病院にて剖検が実施された3症例について、フローサイトメーター解析を行い、中枢神経組織における浸潤細胞の評価を行った。　経過 20 年の急性呼吸不全で死亡したSPMSの51歳女性、急性呼吸不全で死亡した抗AQP4抗体陽性視神経脊髄炎(NMOSD)の54歳女性、敗血症で死亡した経過18年の臨床診断PDD、88歳男性の3例である。

結果

SPMSおよびNMOSDにおいては、脳脊髄組織での広範なリンパ球浸潤を認め、病変部位のみならず Normal appearing white matter (NAWM)において Eomes 陽性 Th 細胞が広範に浸潤していた。またNMOSDの視神経病巣にはCD4+T細胞とB細胞の両者の浸潤が認められた。一方、パーキンソン病剖検脳では、このような広範なリンパ球浸潤は乏しいものの、大脳白質へのB細胞の浸潤が確認された。

考察

MS や NMOSD 両者において、Eomes 陽性 Th 細胞が中枢神経組織に広範に浸潤していることは、少なくとも慢性経過の症例において、同細胞が両疾患の病態形成に寄与していることが示唆される。遺伝子発現解析など詳細な解析を行うことにより、同細胞の細胞障害性などの機能が明確になることが期待される。

結論

ヒト剖検例でのフローサイトメーター解析

による病原性リンパ球の同定と解析は病態解明に有用と考えられる。

参考文献

1. Raveney, J.E.B., S. Oki, H. Hohjoh, M. Nakamura, Sato W, M. Murata, and T. Yamamura: Eomesodermin-expressing T-helper cells are essential for chronic neuroinflammation. Nature Comm 6:8437, 2015
2. Raveney J.E.B., W Sato, D Takewaki, C Zhang, T Kanazawa, Y Lin, T Okamoto, M Araki, Y Kimura, N Sato, T Sano, Y Saito, S Oki, and T Yamamura: Eomes expression defines a pathogenic CD4+ T cell population associated with secondary progressive multiple sclerosis. BRAIN (under review)

難治性神経疾患における免疫関連バイオマーカーの探索

分担研究者：北條浩彦
所属：国立精神・神経医療研究センター
神経研究所

研究協力者：Mallahalli Manu
所属：国立精神・神経医療研究センター
神経研究所

緒言

神経疾患と関連してその症状を反映する生体内分子は、疾患の早期診断・治療・治療予後の経過観察において、疾患の状態を客観的に捉える有用な指標、すなわちバイオマーカーに成りえる。本研究は、その様な有用な生体内分子を見つけ出すために、近年研究が進んでいるセルフリー核酸に着目し、免疫炎症を伴う神経変性のバイオマーカー候補として血液中のセルフリー核酸を解析する。本年度は、多発性硬化症モデルを用いた疾患関連セルフリー核酸の探索を行った。

Biomolecules that are associated with neurological diseases may become useful biomarkers for early diagnosis, early medical treatment and catamnestic observation of the diseases. To find such biomarkers, cell-free nucleic acids are considered as promising candidates. Cell-free nucleic acids are extracellular and may play an important role in cell-to-cell communication[1]. In our research, we search for cell-free nucleic acids related to neurological diseases with immune inflammation as candidate biomarkers[2]; and this year, we examined Multiple sclerosis (MS) models as follows:

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS), and many factors are involved in lesion formation. Recent studies suggest that gut microbiota affects the pathogenesis of MS[3]. On the other hand, circulating exosomal miRNAs in the blood are also involved in MS. However, it is not yet fully understood how the microbiota is related to the immune responses and also if there is any association between microbiota and circulating miRNAs in MS.

方法 (Methods)

Here we hypothesized that gut microbiota might control the host immune system through blood-circulating miRNAs. Based on the hypothesis, we generated gut microbiome dysbiosis model mice by oral administration of 200μL of non-absorbing antibiotics cocktail (ABX) containing kanamycin (1mg/ml), vancomycin (0.1mg/ml) and colistin (2000U/ml). The model mice were subjected to treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by a conventional method[3]. Lymphocytes were collected from the CNS, spleen and blood to see the percentage of T cells. For cell-free miRNA analysis, total RNA was isolated from the plasma by a Plasma/Serum circulating and exosomal RNA Purification kit, and miRNA expression profiles were examined by a DNA chip of mouse miRNAs (3D-gene chip; TORAY INDUSTRIES, INC)[2].

結果と考察 (Results & Discussion)

Results indicated that: i) ABX treatment altered gut microbiome, ii) the frequency of total T cells in the CNS was reduced in EAE mice treated with ABX compared to untreated EAE mice, and iii) ABX treatment ameliorated the EAE clinical score. Expression profile analysis of circulating cell-free miRNAs in the blood showed a marked difference in the expression of miR-21a-5p, miR-122-5p and miR-223-3p among normal, EAE and ABX treated EAE mice. The results suggest the possibility that cell-free miRNAs might be implicated in the association between gut microbiome and auto immune response in EAE mice.

結論 (Conclusion & future plans)

The study we did here contains preliminary

experiments, but the data suggest an intriguing association between gut microbiome and immune response in EAE and also possible association between blood-circulating cell-free miRNAs and microbiota. To further clear the associations, more extensive studies need to be carried out in the future.

参考文献 (References)

1. Zhang J, et al., Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. Genomics Proteomics Bioinformatics. 13: 17-24, 2015.
2. Kimura K, et al., Circulating exosomes suppress the induction of regulatory T cells via let-7i in multiple sclerosis. Nat Commun. 9: 17, 2018.
3. Yokote H, et al., NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. Am J Pathol. 173: 1714-1723, 2008.

自己免疫性脳炎・神経炎における抗原同定による発症機序の解析

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　疾病研究第五部
荒木　敏之

緒言

近年、国内外でいくつかの抗原同定報告例があるが、その一方で、自己免疫性脳炎が強く疑われる脳炎・脳症のなかで、CLIPPERS（Chronic lymphocytic inflammation with pontine perivascular enhancement responsive to steroids）症候群として区分される疾患群が存在することが報告されているなど新たな疾患群の存在も明らかになっているが、抗原となっている分子の同定を含め、その病態メカニズムはほとんど明らかとなっていない。本研究では、1）臨床的に自己免疫機序が疑われる脳症・神経炎患者の血清と臨床情報を収集し、2）自己抗体の標的抗原を同定することによる病因・病態の解明と、疾患マーカーとしての自己抗体の意義の検討を実施することにより、自己免疫性脳症・脳炎の疾患概念と診断法の確立に貢献することを目指す。

末梢神経疾患評価手法の一つとして、ヒト細胞のみを用いた末梢神経培養系を作出することは、ヒト疾患の評価および創薬開発には不可欠であると考えられる。これまで、ヒトES細胞もしくはiPS細胞から末梢神経細胞を誘導した報告や、そのようにして得られたヒト神経細胞とラットSchwann細胞の共培養による培養下での髄鞘化観察の報告はなされているが、ヒト神経細胞とヒトSchwann細胞による髄鞘化モデル作出に関する論文報告はこれまでになされていない。本研究ではヒトiPS細胞から神経系細胞を分化させることにより、ヒト細胞による神経系細胞培養モデルを作出し、モデルとしての妥当性の評価に繋げたいと考えている。

方法

1）自己免疫性機序が疑われる脳炎患者、および、CIDP患者からそれぞれ血清検体を取得する。患者血清中に存在すると考えられる、自己抗体に対する抗原の同定を行う。同定法としてはラットもしくはマウスの脳・神経組織あるいは市販のヒト脳組織抽出蛋白を用いて、SDSPAGE-Immunoblot法、もしくは、患者血清を用いた免疫沈降法により検出した蛋白を、質量分析法により同定することを計画した。

2）培養下での末梢神経髄鞘化モデルは、これまでラットでのみ実施されてきた。これは、Schwann細胞の純化がラット以外では困難であるためである。我々は、これまでに後根神経節（DRG）のExplant培養を行うことにより、Schwann細胞の純化プロセスなしに髄鞘化を観察できる実験法を開発し、この方法によりマウス細胞でも高効率な末梢神経髄鞘化を観察できることを示した。

本研究では、このExplant培養と類似した方法により、神経細胞・Schwann細胞をそれぞれ純化することなく末梢神経髄鞘化を観察することを目指す。

ヒト細胞を用いた末梢神経系培養モデル作出は、標準iPS細胞から分化させた神経堤細胞を、細胞塊として培養し、末梢神経細胞の培養条件で維持したうえで、髄鞘化を誘導した。

結果

1）これまでに脳炎患者血清5検体、CIDP患者血清4検体を入手した。

自己抗体と反応する蛋白の同定に関しては、まず、上記のように一般的な生化学的手法を試みたが、齧歯類の脳蛋白Lysateを用いた場合、ヒト脳組織抽出蛋白を用いた

場合のいずれの場合も、患者血清検体中の抗体に特異的に結合していると考えられる蛋白を同定することができなかった。(ヒト血清中の抗体と反応していると考えられる蛋白は存在したが、患者血清中の抗体に特異的に反応しているとは言えなかった。)

2) ヒト末梢神経系培養モデルでは、今年度実施した範囲では、末梢神経様に分化した細胞が長く突起を伸ばし、突起の周囲にSchwann細胞マーカーを発現する細胞の集積がみられる、という段階に到達した。

考察

自己抗体に結合する蛋白を脳組織中から同定する実験に関しては、論文として成功例に関する報告も見られるが、血清中の抗体価が蛋白同定に使用できるほど高い例は少ないものと考えられた。今後、タンパクアレイを用いたスクリーニングを実施することにより抗原候補を得る。

ヒト細胞による末梢神経髄鞘化モデルは、引き続き実験手技の最適化を進める。

参考文献

Saitoh F, Hagiwara H, Wakatsuki S, Araki T Carboxymethylation of CRMP2 is associated with decreased Schwann cell myelination efficiency. Neurosci Res 139(2) 58 – 62、 2019.

神経疾患の病態形成に関わる慢性炎症の分子機序の解明

国立精神・神経医療研究センター神経研究所
疾病研究第六部
大木 伸司

緒言

中枢神経疾患における慢性炎症の分子機序は極めて複雑であり、その全容は未解明である。I 型インターフェロン(IFN-I)は、感染非依存性の sterile inflammation や慢性疲労などに伴う慢性炎症に関わる一方で、IFN-βは多発性硬化症の治療薬でもあることから、その作用は context-dependent と考えられる。本研究では、中枢神経系の IFN-I 産生細胞としての microglia の機能に着目し、IFN-I シグナルに関与する様々な遺伝子の改変マウスを用いて、中枢神経系の慢性炎症に対する IFN-I の作用を網羅的に解析する。様々な神経難病の病態形成過程における IFN-I の機能の解明が進むことにより、複数の疾患に渡る慢性炎症の分子機序の理解が進み、病態解明と治療薬開発をつなぐ画期的な成果が期待できる。

方法

IFN-α/β受容体欠損(IFN-α/βRKO)マウスに EAE を誘導し、中枢神経系に浸潤した Th 細胞の Eomes 発現と microglia の IFN signature の相関を調べる。・TREX1 欠損(Trex1 KO)マウスを用いて、上記と同様の解析を進める。microglia 特異的 USP18 欠損マウスを用いて、microglia 由来の IFN-I の機能を解析する。

結果

IFN-I は抗原提示細胞のプロラクチン産生と Eomes 陽性 Th 細胞の生成を誘導し、後期 EAE 病態に関わる。EAE マウスの microglia では IFN signature は有意に亢進していた。近年、microglia の機能的 heterogeneity が注目されており、EAE 誘導マウスの microglia を用いて single cell 解析でも、IFN signature の有無を指標として、microglia の機能的 heterogeneity が確認できた。

考察

Microglia 由来の IFN-I は、後期 EAE 病態に伴う慢性炎症の形成に深く関わることが示され、その分子機序の一端が明らかとなった。当初の計画通り、引き続き研究を進めていく。

結論

EAE の病態形成過程における microglia 由来の IFN-I の機能が示された。microglia の機能的 heterogeneity も示されたことから、今後他の遺伝子欠損マウスの解析と、組織透明化技術を用いた脳組織解析による microglia の spacio-temporal な挙動の解明を目指す。

参考文献

1. Chenyang Zhang, Ben J. E. Raveney, Hirohiko Hohjoh, Chiharu Tomi, Shinji Oki, Takashi Yamamura. Extrapituitary prolactin promotes generation of Eomes-positive helper T cells mediating neuroinflammation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 116 (42) 21131–21139 (2019)

慢性炎症性脱髄性多発神経根ニューロパチー（CIDP）における病原性リンパ球の検討

国立精神・神経医療研究センター
神経研究所　免疫研究部
佐藤和貴郎

緒言

慢性炎症性脱髄性多発神経根炎（chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy : CIDP）は、末梢神経を標的とする炎症性脱髄疾患であり、自己免疫学的機序の関与が考えられている。CIDPにおける標的抗原は同定されていないが、液性免疫と細胞性免疫の両者の関与が示唆されている。我々は、多発性硬化症とそのモデル動物である実験的自己免疫性脳脊髄炎（Experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE）の解析から、病原性CD4陽性T細胞に関連する分子としてEomesおよびNR4A2を同定した（(PNAS 2008、PLoS One 2013, Nat Commun 2015)。前者は進行型MSとの関連が、後者はMSの再発との関連を示唆する結果が得られている。今回、血液浄化療法や定期的IVIG療法などの免疫治療を必要としている難治性のCIDP患者を対象に、末梢血memory CD4+T細胞におけるEomesおよびNR4A2の発現を定量し、病態との関連について検討した。

方法

対象は、当院通院中のFENS/PNS診断基準を満たすCIDP患者10名（平均年齢±SD＝52±17.9歳、男/女＝3/7）と、健常者12名（平均年齢±SD＝40±7.3歳、男/女＝5/7）である。1）対象の末梢血から末梢血単核球細胞を分離し、フローサイトメーターを用いて、CD4陽性T細胞中のEomes陽性細胞の頻度およびmemory CD4陽性T細胞（CD3+CD4+CD45RA-）におけるNR4A2陽性細胞の頻度を測定した。2）EomesやNR4A2の頻度が異常高値の症例の臨床的特徴を検討した。

結果

健常者と比較しNR4A2陽性memory CD4+T細胞高値の患者は10例中6例、Eomes陽性Th細胞高値例は2例、両者とも高値例は1例であった。両者とも正常であった3例は、IVIG治療直後の2例とPSL10 mg/日で寛解維持している症例であった。

考察と結論

血液浄化療法や定期的IVIGを必要とする難治性CIDP患者において、末梢血中のNR4A2陽性細胞やEomes陽性細胞の頻度の高い症例は決してまれではない。両細胞は、多発性硬化症においてのみならず、CIDPにおいても病態形成に関連していると考えられ、また病態マーカーとして有用な可能性がある。

参考文献

1. Raveney, J.E.B., S. Oki, H. Hohjoh, M. Nakamura, Sato W, M. Murata, and T. Yamamura: Eomesodermin-expressing T-

helper cells are essential for chronic neuroinflammation. Nature Comm 6:8437, 2015

2. Doi, Y., Oki, S., Ozawa, T., Hohjoh, H., Miyake, S., & Yamamura, T. (2008). Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 105*(24), 8381-8386.

神経核内封入体病の臨床的多様性

分担研究者:岡本 智子[1)]
研究協力者:石原 資[1)], 齊藤 祐子[2)], 佐藤 典子[3)], 佐藤 和貴郎[4)], 山村 隆[4)], 髙橋 祐二[1)]
[1)] 国立精神・神経医療研究センター病院 脳神経内科, [2)] 同 臨床検査部, [3)] 同 放射線診療部, [4)]国立精神・神経医療研究センター神経研究所 免疫研究部

緒言

神経核内封入体病(neuronal intranuclear inclusion disease; NIID)は，認知機能障害を呈し，特異な脳 MRI 所見から NIID が疑われ，皮膚生検で診断が確定される症例が多い．しかし，NIID の中には，慢性に経過する筋力低下や感覚障害を有し，末梢神経障害が前景にたつ症例や，急性神経症状を呈する症例が存在し，NIID の臨床像を検討することは重要である．本研究では，NIID 患者の臨床的特徴を検討することを目的とする．

方法

当院で NIID と診断された 12 例について臨床経過，電気生理学的所見，脳 MRI 所見の特徴を後方視的に検討した．

結果および考察

NIID 12 例(男 5 例，女 7 例)，発症年齢は 31～68 歳，発症から診断確定までは 1～17 年，家族歴は 2 例に認めた．初期症状は認知機能低下，振戦，四肢筋力低下，排尿障害などであった．10 例は脳 MRI で特徴的な病変を認めたことから NIID が疑われ，皮膚生検で診断が確定された．頭部 MRI 所見は，全例に大脳萎縮，小脳萎縮を認め，DWI 皮髄境界高信号 10 例，FLAIR 画像で広範な白質高信号 9 例，小脳虫部高信号 8 例，小脳脚高信号 7 例に認められた．2 例は認知機能低下なく，上記 NIID に特徴的な MRI 画像所見[1)] を認めず，末梢神経障害が前景にたち，初期に慢性炎症性脱髄性ニューロパチーと診断されていた．うち 1 例は経過中急激な頭痛，めまい，視野異常が出現，頭部 MRI で広範な病変を認めた．急性期画像所見は Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes (MELAS) に類似していたが，ミトコンドリア全周シークエンスで変異を認めなかった．末梢神経障害，脳卒中様エピソード，縮瞳を認めたことから NIID を疑い，皮膚・神経生検を施行し診断が確定した．近年，NIID の原因遺伝子として *NOTCH2NLC* の GGC expansion が同定され[2)]，本例においても同様の遺伝子異常を認めている．

結論

NIID の中には DWI における皮髄境界高信号などの特徴的な頭部 MRI 所見を呈しない症例が存在し，末梢神経障害，急性発症の中枢神経症状を呈する症例の鑑別診断として NIID を考慮することは重要である．近年の遺伝子異常の同定は，今後臨床的多様性を示す NIID の診断に重要な役割を果たすと考える．

参考文献

1) Sugiyama A.et al. AJNR Am J Neuroradiol. 2017;38(11):2100-2104.
2) Sone J.et al. Nat Genet. 2019 ;51(8):1215-1221.

ステロイドパルス療法で寛解不充分な MS・NMO における血液浄化療法の有効性とその免疫学的な予測指標に関する研究

国立精神・神経医療研究センター
1)病院　脳神経内科診療部、
2)神経研究所　免疫研究部、
林 幼偉

緒言

疾患修飾薬の普及や免疫抑制剤の調整により多くの MSやNMOで疾患活動性の制御が可能になった。しかし再発・増悪症状に対してはほとんどの施設でステロイドパルスの施行にとどまり、複数クール施行しても充分に寛解しない症例も少なくない。ステロイドパルス後も症状が残存する症例に対する血液浄化療法の有効性と免疫学的指標を解析する。

方法

当院では 2005 年から血液浄化療法を導入しており、今回 2005 年度から 2011 年度の初期 5 年間に行った MS 77 人(再発型(=RRMS) 45 人; 進行型(=SPMS) 32 人) ; NMO 20 人と 2016 年度から 2017 年度の後期 2 年間に行った MS 73 人(RRMS 41 人; SPMS 32 人) ; NMO 44 人を解析した。原則血漿免疫吸着療法(IAPP)から開始し、反応次第で二重濾過型血漿交換療法(DFPP)や単純血漿交換療法(PE)に変更した。

EDSS が軽減した症例を改善群、FS のみが軽減した症例を軽快群、自覚的症状のみが軽減した症例を有効群、それ以外を不変・悪化群と判定し、複数回の施行で判定が異なる場合は別症例とした。

免疫学的指標として施行前の末梢血 B 細胞中の plasmablast と $IFN\gamma^{+}$Th1 細胞あるいは $IL\text{-}17^{+}$Th17 細胞の割合を測定した。

結果

前期では IAPP を施行した場合は RRMS 37.0% ; SPMS 27.3% ; NMO 47.8%の症例で、DFPP や PE を施行した場合は RRMS 25.0% ; SPMS 35.3% ; NMO 45.5%の症例で改善・軽快した。後期では IAPP を施行した場合は RRMS 65.9% ; SPMS 39.4% ; NMO 26.3%の症例で、DFPP や PE を施行した場合は RRMS 50.0% ; SPMS 50.0% ; NMO 57.7%の症例で改善・軽快した。

改善・軽快群では IAPP を施行した場合 plasmablast が低く、Th1 が高く、DFPP/PE を施行した場合 plasmablast が高かった。

考察

IAPP は IgG1, IgG3 サブクラスを選択的に除去することから、plasmablast の活性化レベルにより自己抗体の IgG サブクラスの発現に選択性の違いが生じる可能性がある。Th1 細胞をメインとする病態には IgG1 や IgG3 型の自己抗体が関与していることを示唆する。前期と後期の反応性の違いとしては MS では過去の施行において効果を示している患者が多く含まれていたが NMO では新規の患者が多かったこと、MS では疾患修飾薬の選択肢が増えたことが理由として考えられる。

結論

ステロイドパルス治療抵抗性のMS・NMOにおいて血液浄化療法が効果的な症例が存在する。RRMSではIAPPで軽快する症例が多いが、SPMSやNMOではDFPP・PEで効果が期待できる。IAPPとDFPP・PEの有効性はplasmablastの多寡で異なり、特にIAPPではTh1の割合で予測が可能である。

参考文献

1. Weiner HL, Dau PC, Khatri BO, et al. Double-blind study of true vs. sham plasma exchange in patients treated with immunosuppression for acute attacks of multiple sclerosis. Neurology 1989; 39: 1143-1149.
2. Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, et al. A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. Ann Neurol 1999; 46: 878-886.
3. Keegan M, Pineda AA, McClelland RL, et al. Plasma exchange for severe attacks of CNS demyelination: predictors of response. Neurology 2002; 58: 143-146.
4. Watanabe S, Nakashima I, Misu T, et al. Therapeutic efficacy of plasma exchange in NMO-IgG-positive patients with neuromyelitis optica. Mult Scler 2007; 13:128-132.
5. Khatri BO, McQuillen MP, Hoffmann RG, et al. Plasma exchange in chronic progressive multiple sclerosis: a long-term study. Neurology 1991; 41: 409-414.
6. Hauser SL, Dawson DM, Lehrich JR, et al. Immunosuppression and plasmapheresis in chronic progressive multiple sclerosis. Design of a clinical trial. Arch Neurol 1983; 40: 687-690.
7. Canadian Cooperative MS Study Group. The Canadian cooperative trial of cyclophosphamide and plasma exchange in progressive multiple sclerosis. Lancet 1991; 337: 441-446.
8. Schmitt E, von Appen K, Behm E et al. Immunoadsorption with phenylalanine-immobilized polyvinyl alcohol versus plasma exchange - A controlled pilot study in multiple sclerosis. Ther Plasmapheresis 1993; 12: 239–242.
9. Schimrigk S, Faiss J, Köhler W, et al. Escalation therapy of steroid refractory multiple sclerosis relapse with tryptophan immunoadsorption - Observational multicenter study with 147 patients. Eur Neurol. 2016; 75: 300-306.
10. Chihara N, Aranami T, Oki S, et al. Plasmablasts as migratory IgG-producing cells in the pathogenesis of neuromyelitis optica. PLoS One. 2013; 8(12): e83036.

慢性疲労症候群における脳内構造ネットワーク異常と抗自律神経受容抗体価との相関解析

分担研究者 NCNP 病院放射線診療部
佐藤典子
研究協力者 NCNP 病院　放射線診療部
藤井裕之、木村有喜男
NCNP 神経研究所免疫研究部
佐藤和貴郎、山村隆
NCNP 病態統合イメージングセンター
松田博史

緒言

脳内ネットワーク解析は脳の構造的・機能的結合状態を評価し、通常の MRI 画像では異常が指摘できない脳内ネットワークの異常を評価することが可能である。筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群（ME/CFS）患者における脳内ネットワーク異常と抗自律神経受容体抗体価の相関解析を行った。

方法

ME/CFS 患者において、頭部 MRI 検査と血中の抗自律神経受容体抗体価の測定が 30 日以内に施行されている 89 例(男性 13 名、女性 76 例、; 平均年齢 37.3±12.7 歳、右利き手)を対象とした。撮像は全例 Philips 社製 3 テスラ Achieva で行った。SPM 12 を用いて 3D-T1 強調画像から灰白質画像を抽出し、2×2×2mm 大の等大ボクセル化したのちに、灰白質の類似性を用いた個人構造ネットワーク解析 (https://github.com/bettytijms/Single_Subject_Grey_Matter_Networks; Tijms et al., 2012; version 20150902)を用いて、局所のネットワーク指標である Degree、Clustering coefficient 、 Shortest path length 、 Betweenness centrality、全体脳のネットワーク指標である small-world network δ を算出した。これらの指標と抗自律神経抗体(抗β1 アドレナリン受容体抗体(β1-adr-R-Ab)、抗β2 アドレナリン受容体抗体(β2-adr-R-Ab)、抗ムスカリン 3 型アセチルコリン受容体抗体(M3R-Ab)、抗ムスカリン 4 型アセチルコリン受容体抗体(M4R-Ab))の抗体価との相関を解析した。

結果

全体脳のネットワーク指標の δ はいずれの抗体価とも有意な相関は認めなかった。局所ネットワーク指標では、β1-adr-R-Ab と右背外側前頭前野白質(BA9)の Betweenness centrality に正の相関、β2-adr-R-Ab と右一次運動野皮質(BA4)の Shortest path length に負の相関を認めた。M3R、M4R と局所ネットワーク指標に有意な相関は認められなかった。BA9 の白質は右上縦束の一部であり、我々が以前拡散イメージングを用いて右上縦束の異常を報告したが(Kimura et al. JMRI. 2019)、同部位にネットワーク異常が再現されたと言える。BA9 は意思決定やワーキングメモリーなどの認知機能、痛みの制御に関連している。Betweenness centrality の増加の原因として、同部の白質線維の障害/減少により、残存した白質線維を介したネットワークが発達していることが考えられる。BA4 は一次運動野であるが、慢性痛の患者では一次運動野の活性化

や、補足運動野との結合増強を認めることが知られている。一次運動野が活性するのは、これが痛みのネットワークに抑制的に働くためと考えられている。Shortest path length との負の相関は、痛みに対する一次運動野の活性化によって局所ネットワークが効率化したこと、補足運動野とのランダムネットワークの増加したことが要因として考えられる。

考察

我々は以前 ME/CFS にて、MR 拡散先鋭度画像による解析を行い、患者群にて両側頭頂葉、右上縦束に有意な低下を認めた。また血中の Plasmablast/B 細胞、B 細胞/リンパ球、Treg/CD4+T 細胞の比をもって、異常高値群と正常低値群に分けて比較したところ、Treg/CD4+T 細胞では右上縦束に低下域を認めた。今回の自律神経受容体においても脳内ネットワーク解析で異常を示し、やはり ME/CFS の一部の患者は自己免疫性疾患患者が含まれるとの我々の予想は妥当性があるものと強く思われる。

結論

MRI の灰白質画像を用いた構造ネットワーク解析は拡散イメージング同様に、ME/CFS の病態解明に有用と考えられる。抗自律神経受容体抗体である β1-adr-R-Ab、β2-adr-R-Ab は ME/CFS の診断マーカーとなる可能性がある。

参考文献

1. Fukuda K, Straus SE, Hickie I, Sharpe MC, Dobbins JG, Komaroff A. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study. International Chronic Fatigue Syndrome Study Group. Annals of internal medicine. 1994;121(12):953-9.
2. Klimas NG, Salvato FR, Morgan R, Fletcher MA. Immunologic abnormalities in chronic fatigue syndrome. Journal of clinical microbiology. 1990;28(6):1403-10.
3. Sone D, Sato N, Ota M, Kimura Y, Matsuda H. Widely Impaired White Matter Integrity and Altered Structural Brain Networks in Psychogenic Non-Epileptic Seizures. Neuropsychiatric disease and treatment. 2019;15:3549-55.

NMO 剖検例の病理解析

研究分担者
国立精神・神経医療研究センター
病院臨床検査部病理部門
齊藤祐子
研究協力者
1 国立精神・神経医療研究センター
病院　臨床検査部病理部門、
2 同　脳神経内科
水谷真志[1]、佐野輝典[1]、髙橋祐二[2]

緒言

NMO は本邦に多い疾患であるが、剖検例は非常に稀である。今年度は、NMO の症例がブレインバンクに登録された。ブレインバンクプロトコールに則り、視神経を含む半脳をホルマリン固定、半脳を凍結、(脊髄も一部を凍結) した。さらに凍結前にリンパ球の解析を行うためのサンプリングを行うことが出来たので、これまでに判明している病理解析の結果を報告する。

方法

対象は 54 歳女性。45 歳時、右優位の視神経炎、第一頚髄から第六頚髄までの上部頚髄炎にて A 病院にて加療。抗 AQP 抗体陽性であり NMO と診断された。一時人工呼吸器管理となったが、離脱し、翌年から当院外来フォローとなった。ADL は車いす移動、上肢は肩までの挙上可能レベルで会話も可能であった。その後ステロイド+免疫抑制剤内服にて NMO の再発は無く、経過良好。54 歳、右慢性心不全、肺うっ血により死亡。御遺族の承諾を得て、死後 23 時間 40 分後に病理解剖を施行。

結果および考察

神経病理学的 : 脳重は 1377g と減少は認めないが、前頭葉皮質に軽度萎縮あり。視神経は右優位に高度の萎縮を認めた。頚髄では第 1 ～第 4 頚髄が高度に萎縮し、褐色調を呈していた。光顕では、視神経に強い脱髄を認め、AQP4 抗体陰性。血管周囲に T 細胞の cuffing を認めた。頚髄では脊髄前成中裂に強い脱髄を認めたが、T 細胞の cuffing は全般的に認められた。大脳では、明らかな脱髄は認められないものの、前頭葉優位に T cell の cuffing を軽度認めたが、他の皮質では明らかではなかった。

結論

光顕については解析途中であるが、臨床症状に合致して、視神経と脊髄の脱髄の時相はほぼ同時期と考えられる陳旧性の病変のみであった。

なお、大脳の前頭葉優位に脱髄所見は明らかではないもののリンパ球の cuffing を認めた点は興味深い。

今後、フローサイトメトリーとの結果とも照らし合わせ、リンパ球の染め分け、剖検時に採取したリンパ節の解析も進めてゆく予定である。

また昨年度に経験した SPMS や、疾患コントロール、健常コントロールとの比較も行う予定である。

一本鎖抗体を用いた神経変性疾患の治療法開発研究

滋賀医科大学脳神経内科
漆谷　真

緒言

パーキンソン病、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症(ALS)を始め多くの神経変性疾患は生理機能を有する蛋白質が構造学的な毒性転化を来して生じる「蛋白質ミスフォールディング病」であり、これに端を発した多彩なパスウェイを介しているが、個別のパスウェイ介入を目指した治療戦略は残念ながら大きな成果を生んでいない。我々は、これまでALSの原因蛋白質であるミスフォールドTDP-43と変異型SOD1を認識するモノクローナル抗体の産生に成功した。本研究はこうしたミスフォールド構造特異認識抗体由来の一本鎖抗体を用いた分子標的治療の開発を目指す。特に細胞自律性と非細胞自律性に着目し、作用点の近いに応じた改変抗体を作製し、培養細胞、子宮内電気穿孔法、モデルマウスなど様々な評価系を用いて、新たな遺伝子治療法の開発を進める。

方法

#1 ミスフォールド型 TDP-43 に対する細胞内 scFv 治療法の開発

ミスフォールドTDP-43を認識する3B12Aモノクローナル抗体由来の scFv にオートファジー分解シグナル CMA を付加した自己分解型一本鎖抗体をすでに構築した。これを発現するウイルスベクター(AAV, BDV)に組み込み、神経特異的にTDP-43凝集体を形成する独自の遺伝子改変マウスの静脈内投与により効果を検討する。さらにCMA シグナル以外の分解シグナルの効率も検討し、より治療効果の高い細胞内抗体の開発を目指す。

#2 変異SOD1を有する家族性ALSに対するscFv分泌OPCの移植研究

我々はすでにオリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC)の変異 SOD1 ラットへの髄腔内移植が生存期間の延長に有効であるデータを得ている。変異SOD1を特異的に認識するモノクローナル抗体 D3-1 より分泌型 scFV を構築しボルナウイルスベクターに組み込み、OPC に感染させ、変異SOD1ラットの髄腔内に投与し有効性を検討する。

結果と考察

我々はこれまでに変異SOD1蛋白質のみと結合し、天然構造のSOD1を認識しないマウスモノクロナール抗体(antibody X)の作製に成功している。その antibody X の変異SOD1蛋白質に対する特異性をSOD1変異を持つ ALS 患者の脊髄組織を用いて確認している。また浸透圧ポンプを用いて髄腔内に antibody X を 4 週間連続投与することによりSOD1H46RTgラットの生存期間の延長、運動機能の改善を確認している。しかし変異蛋白質は細胞内に豊富に存在しており、全長抗体の治療限界の障壁となっている。そこで、我々はantibody Xを用いて抗原と結合する可変領域(Fv) 配列をク

ローニングし、低分子の一本鎖抗体（single chain of Fv ; scFv）の作製に成功した。さらに scFv に分泌シグナルを付加させた細胞外分泌抗体(scFv-X と命名)を作製し培養細胞において変異SOD1に特異的に結合することを確認している。scFv-X を発現する非増殖型ボルナウイルス病ウイルスベクター(BDV)を作成し、ラットの初代培養により作成した OPC に感染させ、抗体の発現、分泌を確認している。EGFP を発現しているTgラットの初代培養によりEGFP-OPC を作成し、SOD1H46RTgラットの髄腔内に投与し、移植された EGFP-OPC が脊髄内に生着していることを確認した。まだ少数ではあるが scFv-X を発現する BoDV に感染した OPC を投与する群が scFv-X を発現しない BoDV に感染した OPC を投与する群と何も投与しない群に比べSOD1H46RTgラットの生存期間、体重変化、運動機能が有意に改善することを確認している。また生存期間の延長が平均で抗体のみでは2週間であったが細胞移植と組み合わせた方法では4週間の延長を認めた。また病理学的にも神経細胞の脱落、反応性アストロサイト、ミクログリアの増殖が減っていることを確認している。

結論

抗体治療と細胞移植治療を組み合わせた新たな治療法は ALS に対して有望な治療法である可能性があり、今後その治療機序の解明に関してさらなる研究が必要である

参考文献

1. Ayaki T, Murata K, Kanazawa N, Uruha A, Ohmura K, Sugie K, Kasagi S, Li F, Megumi Mori M, Nakajima R, Sasai T, Nishino I, Ueno S, Urushitani M, Furukawa F, Ito H, Takahashi R. Myositis with sarcoplasmic inclusions in Nakajo-Nishimura syndrome: a genetic inflammatory myopathy. Neuropathol Appl Neurobiol. 2020, in press
2. Shimizu J, Tabata T, Tsujita Y, Yamane T, Yamamoto Y, Tsukamoto T, Ogawa N, Kim H, Urushitani M, Eguchi Y. Propofol infusion syndrome complicated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a case report. Acute Med Surg. 2020;7:e473
3. Minamiyama S, Ueda S, Nakashima R, Yamakado H, Sakato Y, Yamashita H, Sawamoto N, Fujimoto Ry, Nishino I, Urushitani M, Mimori T, Takahashi R. Thigh muscle MRI findings in myopathy associated with anti-mitochondrial antibody. Muscle Nerve 2020,61:81-87
4. Kobashi S, Terashima T, Katagi M, Nakae Y, Okano J, Suzuki Y, Urushitani M, Kojima H. Transplantation of M2-deviated microglia promotes recovery of motor function after spinal cord injury in mice. Mol Ther 2020, 28:254-265
5. Zong C, Hasegawa R, Urushitani M, Zhang L, Nagashima D, Sakurai T, Ichihara S, Ohsako S, Ichihara G. Role of microglial activation and neuroinflammation in neurotoxicity of acrylamide in vivo and in vitro. Arch Toxicol. 2019, 93(7):2007-2019.
6. Yamaguchi Y, Li F, Tsujimura A, Kamada M, Ito H, Maki T, Sawamoto N, Urushitani M, Takahashi R. Phosphorylated NF-kB subunit p65 aggregates in granulovacuolar degeneration and neurites in neurodegenerative diseases with tauopathy. Neurosci Lett 2019, 704: 229-235.
7. Hishizawa M, Yamashita H, Akizuki M, Urushitani M, Takahashi R. TDP-43 levels are higher in platelets from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis than in healthy controls. Neurochem Int. 2019, 124, 41-45.
8. 漆谷　真. 筋萎縮性側索硬化症に対する創薬開発の現状と展望「神経難病をクスリで治す」BRAIN and NERVE.　71 (1) 13-23, 2019
9. 漆谷 真, 玉木 良高, 引網 亮太, 南山 素三雄. ALSにおける免疫療法開発の現状と展望. 特集「ALS2019」BRAIN and NERVE. 71 (11): 1289-1301, 2019.
10. 玉木良高、漆谷　真. 運動ニューロン疾患の抗体を用いた治療開発の展望. 神経内科, 2019, 90, 146.

HPV ワクチン後自己免疫脳症の病態、疫学、リンパ球動態等についての検討

鹿児島大学大学院脳神経内科
髙嶋 博

緒言

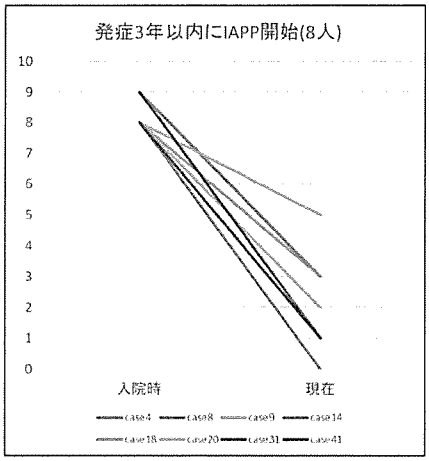
免疫学的発症機序に関する理解が十分でない自己免疫性脳炎脳症を対象とし、その臨床症状や病態や治療反応性を解析し、それに基づいた新規治療法の実現に向けた研究を実施する。対象疾患としては子宮頸癌ワクチン(HPV ワクチン)関連自己免疫脳症、橋本脳症、抗ガングリオニック ACh-R 抗体(抗 gACh-R 抗体)関連脳症について検討する。初年度研究として HPV ワクチン関連自己免疫脳症について患者の臨床像と機能画像検査、自律神経機能検査、各種抗体の検出、皮内神経線維密度、疫学について検討し、その臨床情報には一定の傾向がみられ免疫学的機序の関与が強く疑われることを証明していく。

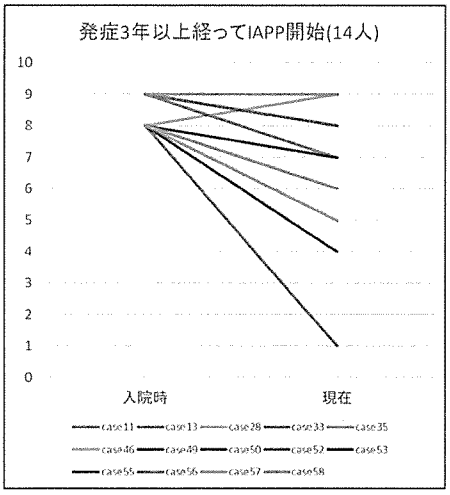
方法

我々の施設では HPV ワクチン後に神経症状を発症した患者を受け入れて、現在のところ約 58 名の患者を 6 年以上に渡って実際に入院させ診療し、脳内炎症疾患として免疫吸着療法(IAPP)を中心とする治療を行ってきた。ほとんどの患者が発症から 5〜8 年経過したため、治療効果、長期的な予後、予後を左右する因子について検討する。

結果

HPV ワクチン関連脳症について十分な臨床情報が得られた 58 名の患者の臨床情報を解析した。県内在住が 24 人で、県外からの患者が 34 名であった。発症年齢は 12 歳から 19 歳であり、ワクチンの種類はサーバリックスが 48 人、ガーダシルが 10 人であった。その臨床像は、53 人に頭痛や四肢疼痛などの痛み症状が認められ、48 例に慢性的な倦怠感を認め、46 人が日常生活に影響を与える運動障害を発症していた。た。43 人に睡眠障害、39 人に自律神経症状と思われる症状が見られた。その他、37 例に学習障害・記憶障害が認められた。血液検査では、37 症例中 10 症例の血液中に抗 gAchR 抗体が検出された。23 人中 18 人に髄液中の抗 GluR 抗体が検出された。2016 年の慢性疲労症候群患者の日常生活困難度調査事業実施報告書による各種症状出現率と比較すると症候的には類似点が多いと考えられた。治療介入の効果について検討したところ、HPV ワクチン接種後神経障害では、重症例は発症 3 年以内に IAPP を導入した例は performance status の改善が強く認められたのに対して、3 年以内に IAPP を導入しなかった例は PS の改善割合が小さかった。





血液中の抗体が検出されることから免疫学的反応が起こっていると想定し、細胞性免疫因子、液性免疫因子について検討した。その結果、年齢およびワクチン接種のある対象群を置いていないものの、血液中のIL-2やIL-4、IL-6、IL-12、IL-13、MIP-1β、TNF-αなどの上昇が認められた。一方、CD3陽性CD4陽性Fox-p3陽性細胞の割合は健常者と比べてかわりなく、CD19+CD27+CD180-CD38high の分画にも差が認められなかった。

考察

本疾患の患者の多くに血液中サイトカインの上昇を確認した一方、Plasmablast や制御性T細胞の頻度に健常者と差は認められなかった。過去の報告では多くが血液学的異常がないとされてきたが、今回の検討により患者の生体内で起こっている特異な免疫学的な反応が他覚的に確認された可能性がある。これは慢性化していない患者に免疫治療が奏功する機序を説明している可能性がある。次年度研究では、サンプル数を増やすとともに、適切なコントロールサンプルの検討により、症状特異的な免疫反応であるか検討する予定である。

参考文献

1. Ikeda SI, Hineno A, Ozawa K, Kinoshita T. Suspected adverse effects after human papillomavirus vaccination: a temporal relationship. Immunol Res. 2018 Dec;66(6):723-725. doi: 10.1007/s12026-018-9063-y. Review.
2. Hirai T, Kuroiwa Y, Hayashi T, Uchiyama M, Nakamura I, Yokota S, et al. Adverse effects of human papillomavirus virus vaccination on central nervous system: neuro-endocrinological disorders of hypothalamo-pituitary axis. Auton Nerv Syst. 2016;53:49–64.
3. Kuroiwa Y, Yokota S, Nakamura I, Nakajima T, Nishioka K. Human papilloma virus vaccination (HPVV)-associated neuro-immunopathic syndrome (HANS): a comparative study of the symptomatic complex occurring in Japanese and Danish young females after HPVV. Auton Nerv Syst. 2018;55:21–30.
4. Carnovale C, Damavandi PT, Gentili M, Pozzi M, Antoniazzi S, Radice S, et al. On the association between human papillomavirus vaccine and sleep disorder: evaluation based on vaccine adverse reporting systems. J Neurol Sci. 2017;373:179–81.
5. Kinoshita T, Abe R, Hineno A, Tsunekawa K, Nakane S, Ikeda S. Peripheral sympathetic nerve dysfunction in adolescent Japanese girls following immunization with the human papillomavirus vaccine. Intern Med. 2014;53:2185–200.
6. Palmieri B, Poddighe D, Vadalà M, Laurino C, Carnovale C, Clementi E. Severe somatoform and dysautonomic syndromes after HPV vaccination: case series and review of literature. Immunol Res. 2017;65:106–16.

重症筋無力症における濾胞性T細胞とIL-21産生の解析

分担研究者　関西医科大学大学総合医療センター神経内科　近藤　誉之

研究協力者　京都府立医科大学大学院神経内科学　芦田　真士

緒言

我々は，抗アセチルコリン受容体抗体陽性の重症筋無力症（myasthenia gravis: MG）患者において末梢血中濾胞T細胞（circulating follicular helper T cells : cTfh）の頻度，中でもinducible T cell costimulator (ICOS)を高発現した $ICOS^{high}$cTfh の頻度が上昇しており，重症度と相関することを報告した．C-X-Chemokine Receptor 5 (CXCR5)はTfhとB細胞上に発現し，2次リンパ組織への移動を促進する．Tfhの ICOS とB細胞上の ICOS ligand（ICOSL）の相互作用はB細胞の分化に重要である．また、Tfhは Interleukin (IL)-21を産生し、IL-21はB細胞の抗体産生を促進する．MG患者における ICOS の発現と IL-21 産生能と両者の関係，IL-21 の表面分子を中心としたB細胞への影響について解析した。

方法

MG患者末梢血から cTfh を分離，*in vitro* で48時間刺激し、上清中の IL-21 を定量、健常群と比較した．同様に $ICOS^{high}$cTfh と $ICOS^{low}$cTfh において，IL-21産生を比較した．またB細胞を分離培養し，IL-21 を培地に添加して，IgG産生とB細胞の表面マーカーへの影響を検討した．また IL-21 のB細胞表面分子への影響と STAT3 のリン酸化の関係についても検討した．IL-21，IgG の定量，B細胞表面マーカー，STAT3 リン酸化の解析にはフローサイトメトリーを用いた．

結果および考察

MG患者において、健常群と比較して cTfh による IL-21 の産生は亢進していた．また、MG患者の $ICOS^{high}$cTfh において IL-21 の産生亢進は顕著であったが，健常人ではこの現象を認めなかった．また既報告にあるように，*in vitro* の培養で IL-21 によってB細胞による IgG 産生は促進された．新しい知見として，IL-21 により，B細胞上の CXCR5 と ICOSL 発現は亢進した．IL-21 存在下で，B 細胞の STAT3 はリン酸化され，STAT3 リン酸化の阻害により，IL-21 の CXCR 5、ICOSL 発現促進は阻害された．IL-21 の B 細胞表面分子発現への影響は STAT3 リン酸化を介していることが推察された．

結論

MG患者では，Tfh が ICOS を高発現し，IL-21 を産生することによって B 細胞上の CXCR5 発現維持と ICOSL 発現を亢進する．結果として，2次リンパ節における T- B 細胞間作用を促進する可能性がある．

参考文献

特になし

疲労や疼痛を主徴とする炎症性中枢神経疾患の病態研究

順天堂大学　免疫学講座
三宅　幸子

緒言

筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群（ME/CFS）における主要な症状は疲労や疼痛であるが、同様の症状は自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)にもみられる。これらの症状は中枢神経における炎症性の病態と関連すると考えられるものの、一般的には臨床的な炎症マーカーではとらえることができない。精神疾患や神経変性疾患も臨床的には明らかな炎症のとらえられない病態であるが、近年ミクログリアなどの自然免疫系を中心とした神経炎症がこれらの病態へ関与していることが注目されている。ME/CFS や SLE においてもこのような神経炎症が病態に関与している可能性が考えられるため、今回我々はSLEマウスモデルを用いて中枢神経における自然免疫系を中心とした慢性炎症の病態を解析し、ME/CFS 病態の解明へとつなげることを目指した。

方法

SLEモデルであるFcγRIIB$^{-/-}$ *Yaa* マウスについては強制水泳試験、tail-flick 試験により精神神経症状の評価を行い、脳における免疫細胞のフローサイトメトリー解析、免疫組織染色、RNA-seq によるミクログリアの網羅的遺伝子発現解析によって、精神神経症状と中枢神経炎症病態との関連について検討した。また、古典的な SLE モデルである NZB×NZW F1(NZB/NZW)、MRL/Fas^{lpr} (MRL/*lpr*)についても免疫細胞の構成変化や活性化についてフローサイトメトリーと免疫組織染色を用いて解析し、FcγRIIB$^{-/-}$ *Yaa* マウスのミクログリアで発現上昇がみられた特徴的な遺伝子については定量的 PCR により NZB/NZW での発現を確認した。

結果

FcγRIIB$^{-/-}$ *Yaa* マウスの行動解析では、強制水泳試験における不動時間の亢進と、tail-flick 試験による温痛覚過敏がみられた。FcγRIIB$^{-/-}$ *Yaa* マウスにおけるミクログリアの RNA-seq 解析ではインターフェロン誘導遺伝子の発現上昇と、*Axl*、*Clec7a*、*Itgax* などの神経変性病態での上昇が報告されている炎症に関連する遺伝子群の発現上昇がみられ、これは NZB/NZW マウスにも共通していた。SLE モデルマウスの脳ではミクログリアや Ly6C^{lo} 単球などのミエロイド系細胞の増加がみられ、これらの細胞ではⅠ型インターフェロンへの反応を示唆する MHC クラスⅠや PDCA1 の発現上昇が共通してみられた。免疫組織染色では、ミクログリアの増加に加えて突起の肥大と延長、細胞体の増大がみられたことに加え、アストロサイトや血管内皮細胞の反応もみられた。また FcγRIIB$^{-/-}$Yaa マウスと NZB/NZW マウスのミクログリアでは *Ccl5* や *Cxcl10* の発現が上昇し、脳の T 細胞の増加や Ly6C^{lo} 単球の増加と合致する所見であった。

考察

FcγRIIB$^{-/-}$ *Yaa* マウスではうつ様症状や温痛覚過敏がみられ NPSLE や ME/CFS に通じる症状であった。SLE モデルマウスの中枢神経ではいずれも、ミクログリアやミエロイド系の細胞に変化がみられ、FcγRIIB$^{-/-}$ *Yaa* マウスのミクログリアの形態変化や遺伝子発現の状態は、急性炎症とは異なる自然免疫系の慢性炎症病態を示唆するものであった。FcγRIIB$^{-/-}$ *Yaa* マウスと NZB/NZW マウスには共通したミクログリアの遺伝子変化がみられ、自然免疫系の慢性炎症病態は SLE 病態全般にみられるものであり、精神神経症状にもつながるものと考えられた(1)。ME/CFS では一般的な臨床検査では炎症病態がとらえられないが、PET 検査において脳のミクログリアの活性化が示されている(2)。このように SLE の中枢神経病態と ME/CFS には共通する病態があることが示唆された。

結論

SLE モデルマウスの中枢神経には自然免疫系の関与した慢性炎症病態があり、このメカニズムの解明により ME/CFS 病態の理解へつながると考えられた。

参考文献

1. Arthritis Res Ther. 2019;21(1):303.
2. J Nucl Med. 2014;55(6):945.

自己免疫性てんかんの免疫動態の探索

神戸大学医学部附属病院　脳神経内科
千原　典夫

緒言

自己免疫性てんかんは自己免疫性脳炎の症候群の一つで、早期の診断・治療介入が必要であるが、診断の根拠となる抗神経抗体の測定が本邦では時間がかかること、また抗体陰性症例では診断に至らないことなどが問題で、不十分な治療による難治性てんかんの原因となっている現状がある。炎症を示唆する髄液所見が特徴の一つであることから、本研究では末梢血及び髄液のリンパ球フェノタイプやその機能解析を行うことで、抗神経抗体陽性症例の免疫動態の特徴を解明する。

方法

本研究では次のように自己免疫性てんかんの免疫動態の探索を行う。1) けいれんが持続しその背景に免疫性神経疾患が疑われる患者から検査のために得られた末梢血及び髄液検体を用いてそのリンパ球のフェノタイプ解析を行う。解析にはBD社のFACS AriaⅢないしFortessa及びVerseを用いる。2) フェノタイプ解析結果から統計学的な手法を用いて病態に特徴的な細胞亜分画を抽出し、その機能解析としてセルソーティングを行い細胞を分離後、免疫制御機能に関する遺伝子発現を定量的RT-PCR等を用いて解析する。3) 経過中に抗神経抗体陽性が判明した群と陰性であった群でリンパ球のフェノタイプが類似している群の臨床的特徴の相違について解析する。

結果と考察

本疾患は希少疾患であるため、本年度は神戸大学と京都大学で連携した共同研究を行うための倫理委員会承認を得た。またFACS染色のパネルについて主にヘルパーT細胞に注目したもの、さらにT細胞上の共抑制性受容体ないしB細胞亜分画に注目した合計3種類の染色パネルを作成した。

けいれんが持続し、抗神経抗体陽性症例(NMDA, LGI1, GAD)や扁桃体腫大などの画像上の異常所見が認められる症例についてT細胞およびB細胞の末梢血および髄液におけるフェノタイプ解析を開始した。一部の症例で自己抗体産生細胞であるPlasmablastsが増加している例があり、さらに症例の蓄積を行なってゆく。

結論

自己免疫性てんかんについて、臨床経過、生理検査および画像検査所見、抗神経抗体、リンパ球フェノタイプを組み合わせた新たな診断基準作成を目指した解析を開始した。次年度以降症例数を増やし検討を追加する。

参考文献

1. Chihara N, Matsumoto R, Yamamura T. Plasmablasts and neuroimmunological disorders. Immunol Med., 42(3): 103-107, 2019

1-5 Development of novel therapy and diagnostics through understanding of the intractable neurological diseases

Principal Investigator:

National Institute of Neuroscience, NCNP

Takashi Yamamura

The purpose of this study is to elucidate the mechanisms of presumably inflammation-mediated intractable neurological diseases and to develop novel diagnostic methods and therapeutic strategies in order to improve the prognosis of the patients. The subjects of this research group include autoimmune encephalomyelitis, NINJA (normal brain neuroimaging accompanies neuroimmunologically justified autoimmune encephalomyelitis) and autoimmune encephalopathy/encephalitis and ME/CFS (myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome) among others. For this purpose, we take a strategy to combine basic and clinical researches, and our team includes neurologists, radiologists, pathologists to promote inter-institutional collaborations.

In the previous year, we have succeeded in detecting cytotoxic lymphocytes in normal appearing autopsy samples from various intractable neurological disease patients. Of note, we have applied state-of-the-art methodology including searching anti-neuronal autoantibodies, brain MRI analyses and B cell repertoire analyses by next-generation sequencing.

研究課題名：精神医療政策への萌芽的取組と行政効果検証に関する研究
国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター精神・神経疾患研究開発費（1—6）
主任研究者：山之内芳雄
所属施設：国立精神・神経医療研究センター

総括研究報告

1.　研究目的

精神医療政策研究部では、政策モニタの基盤をなす精神医療データの集計・分析を行い、公的なものとして公表する立場である。公的であるゆえに、より実態を反映する新しい視点を取り込むことには慎重であるべきであり、新たな視点や技術に関して、実用可能性を検証する必要がある。また、過年の厚生労働科学研究で得られた知見について、中期的に行政効果を得ているかを 5 年間にわたり報告するよう求められており、客観的な立場から検証する必要がある。

本課題においては、行政研究の入口として、課題 1 はレセプト病名と治療内容記録から、実際の主病名を推測する技術の開発、課題 2 は電子カルテ記録から精神疾患重症度や DPC 適応可能な医療項目を推測する技術の開発を行い実効性・妥当性のあるものかどうかを検証する。これらが実効性・妥当性ある者と検証されれば、公的なデータ公開において活用することが可能になる。出口として、課題 3 は平成 30 年度まで行われた厚生労働科学研究において開発した精神保健指定医の新しい研修の仕組みの実効性を検証し、新たな研修による精神保健指定医の意識等の変化や、精神医療における変化を検証する。

2.　研究組織

主任研究者

山之内芳雄　国立精神・神経医療研究センター　精神医療政策研究部　部長

分担研究者

臼杵理人　国立精神・神経医療研究センター　精神医療政策研究部　室長

羽澄 恵　国立精神・神経医療研究センター　精神医療政策研究部　研究員

研究協力者

本屋敷美奈
国立精神・神経医療研究センター　科研費研究員

赤羽華珠　国立精神・神経医療研究センター　科研費研究員

大久保 亮　国立精神・神経医療研究センター　流動研究員

3.　研究成果

初年度の研究成果として、課題 1 は、入院中のレセプト病名の推移と、診断に寄与するとして検索の候補に挙げている医療情報（修正電気痙攣療法、持続性注射剤等）の有無を電子カルテから抽出する作業を国立精神・神経医療研究センター病院で実施して、作業に要する人的資源（workforce）や課題の洗い出しを行う実証可能性研究（フィージビリティ）を計画して、疫学の専門家として東京都医学総合研究所奥村泰之研究員の協力を得てバリデーション研究の国際標準 STARD 2015 に即して研究手順をまとめたコンセプトペーパーを作成した。課題 2 は特定の医療機関における電子カルテ上のデータを匿名加工した上で、電子カルテ記事の閲覧回数、記事数などのデータと、医療従事者の重症度評価との関連等について分析を行うことで、重症度と関連する電子カルテデータの要素について検討した。また、電子カルテ上のデータにおいて、どの要因が医療資源の必要度と関連するかについての分析計画を立案した。課題 3 は精神保健指定医研修について実行性の評価に関しては、各研修を観察したところ研修内容のうち 70%以上の遵守率が示された。また、受講者対象アンケート調査では全ての科目で「参考になった」割合が約 70～90%程度が示された。

4.　研究成果刊行一覧

山之内芳雄：電子カルテへの AI の活用．精神科, 35(1)：105-108, 2019.7
山之内芳雄：地域定着のために必要な医療福祉との連携．第 8 回日本精神科医学会学術大会,札幌, 2019.7.4

レセプト病名等情報から臨床診断を推定するロジックの開発に関する研究

分担研究者：臼杵理人（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所精神医療政策研究部）
研究協力者：堀口寿広（国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所精神医療政策研究部），
奥村泰之（東京都医学総合研究所）

要旨医療情報を用いた研究の精度を高める目的で、統合失調症について診断のバリデーション研究を実施することを計画し、対象病院の診療録を用いて退院時のレセプト病名と主治医による臨床診断との照合を行うこととし、バリデーション研究の国際標準 STARD 2015 に即して研究手順をまとめたコンセプトペーパーを作成した。

A.研究の背景と目的

レセプト病名は、主治医の判断により処方する薬剤や必要な診療行為に応じて付与されることがあり、病態を的確に把握したり疾病の発生状況を推計したりすることが容易ではない。医療情報としてデータベースから得られる診断の正確さを検証するバリデーション研究が国際的に進められているが、精神疾患については未だ実施されていない。

本研究では統合失調症について診断のバリデーション研究を実施する目的で、実証可能性研究（フィージビリティスタディ）を計画した。

B.方法

バリデーション研究の国際標準 STARD 2015[1]に即して、研究手順をコンセプトペーパーにまとめた。

大規模データベースへ適用することを想定して、対象施設の電子カルテから診断に寄与する医療情報を抽出する方法を選択した。統合失調症の診断については、退院時のレセプト病名と主治医の臨床診断を照合することとした。研究計画の第 1 段階として国立精神・神経医療研究センター病院にて実証可能性研究を行い作業に要する人的資源や課題の洗い出しを行うこととした。

倫理的配慮について、今年度は実証可能性研究を計画した段階であり対象者の個人情報などは扱っていない。研究の実施にあたっては倫理審査を受けることとする。

C.結果

国立精神・神経医療研究センター病院を対象施設に想定した実証可能性研究を計画して、疫学の専門家の協力を得てコンセプトペーパーを作成した。

D.考察

コンセプトペーパーを作成することにより、研究対象者に含める範囲の設定について検討が必要であることが明確となった。計画に即した実証可能性研究の実施につなげたい。

E.研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

文献

1) Cohen JF, Korevaar DA, Altman DG et al., STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. BMJ Open 2016;6:e012799. doi:10.1136/bmjopen-2016-01279

精神保健指定医の研修実施に関する政策評価

分担研究者：羽澄　恵
研究協力者：本屋敷美奈（精神医療政策研究部）、赤羽華珠（精神医療政策研究部）、森隆夫（あいせい紀年病院）、野木渡（浜寺病院）、長尾眞理子（埼玉県立精神医療センター）、岩田和彦（大阪府精神医療センター）、加藤温（国立国際医療研究センター）、桂川修一（東邦大学附属メンタルヘルスクリニック）、辻本哲史（滋賀県立精神保健福祉センター）、二宮貴至（浜松市精神保健福祉センター）、野口正行（岡山県精神保健福祉センター）、山本輝之（成城大学法学部）、柑本美和（東海大学法律学科）、五明沙也香（獨協医科大学埼玉医療センター）、福生泰久（神奈川県立精神科医療センター）

A. 研究の背景と目的

精神保健指定医(以下、指定医)は、精神保健福祉法第 18 条に定められ、精神科医療において患者の意志に基づかない医療の実施が許可されている。患者の人権に関与する特殊性と重責性から、有資格者の質の担保のため、新規資格取得前(以下、新規研修)および取得後 5 年ごと(以下、更新研修)に研修を受講するよう法に定められている。研修のさらなる質の向上と均てん化をめざして研修の内容と実施方法の標準化がなされ、2019 年度より運用が開始された。しかし、実際のところ、新たな研修が指定医の質の維持・向上に寄与しているか、主催団体に関わらず研修内容は均質か、裏付けはない。そこで、本研究では、あらたな指定医研修の均質性および実効性について評価することとした。

B. 方法

2019 年度に開催された全研修(新規研修 3 回、更新研修 10 回)における受講者と講師対象の横断調査および標準化された研修内容等の遵守状況の観察が行われた。あ

研修内容の遵守状況の観察については、予め定められている研修で言及すべき各項目についての言及の有無を観察し、全項目のうち言及されていた項目の比率を算出し、遵守率とした。

講師には、研修終了翌日以降に、標準化された研修内容や実施のしやすさ等について「参考にした/使いやすかった」～「参考にしなかった/使いにくかった」の 5 件法による評価を求めた。

受講者には、研修終了時に、研修科目ごとに「参考にならない・どちらともいえない・参考にならない」の 3 件法による評価とともに、研修受講前後での自覚的変化について自由記述回答を求めた。

分析にあたっては、量的データは主に記述的統計分析を、質的データはカテゴリー分析を、それぞれ行った。

本研究は、所属機関の倫理審査委員会を経て実施された(A2019-013)。

C. 結果

言及すべき事項の順守状況の観察

研修における各項目の順守率に関し、新規研修では「指定医の職務」に関する科目では平均 73.3%、「人権と法」に関する科目では平均 94.0%、「児童思春期」に関する科目では平均 91.7%、「物質使用障害」に関する科目では平均 87.5%、「社会復帰」に関する科目では平均 88.3%、「事例研究」では平均 90.5%だった。

更新研修では「指定医の職務」に関する科目では平均 70.6%、「人権と法」に関する科目では平均 82.3%、「社会復帰」に関

する科目では平均 95.0%、「事例研究」では平均 91.4%だった。

言及すべき事項への講師の評価

42 人の講師から回答を得た。研修で言及すべき事項の各項目について「参考にした/使いやすかった」と評価した者は、「研修テーマの目的」では 76.2%、「研修の到達目標」では 71.4%、「本研修で言及すべき話題」では 71.1%、「当該資料の全体的な印象」では 48.8%だった。

研修内容に対する受講者評価

新規研修では、437 人からの回答が得られた。「参考になる」と回答した者は、「指定医の職務」に関する科目では 86.5%、「人権と法」に関する科目では 87.0%、「児童思春期」では 92.7%、「物質使用障害」95.2%、「社会復帰」では 78.3%、「事例研究」では 90.8%だった。受講前後の自覚的変化に関する自由記述では 129 名の回答が得られ、「指定医としての自覚(41 人)」「多様な視点の獲得(16 人)」「指定医の役割や位置づけの理解(16 人)」「指定医に関する知識理解(17 人)」、「法に関する知識理解(5 人)」、などが挙がった。

更新研修では、1681 人からの回答が得られた。「指定医の職務」に関する科目では 83.8%、「人権と法」に関する科目では 84.2%、「社会復帰」に関する科目では 74.8%、「事例研究」では 86.2%だった。受講前後の自覚的変化に関する自由記述では 775 名の回答が得られ、「患者の人権に対する理解(31 人)」「指定医としての責任感(46 人)」「指定医の業務に関する知識理解(40 人)」「指導医としての知識理解等(35 人)」「法に関する知識理解(50 人)」「5 年間での制度等の変更点(36 人)」などが挙がった。

D. 考察

指定医に対する新たな研修は、各科目ともに、言及すべき事項に対する順守率、受講者が参考になったと感じる割合、ともに 70%を超えていたことから、十分な均一性と有意義な研修として機能していると推察される。

さらに、自由記述の結果からは一定数の受講者において患者の人権や指定医の職責や役割に対する理解、法に対する理解が促進されたことが推察される。当該資格の趣旨を考慮すると、精神保健法にて当該研修に期待される機能が果たされている可能性が考えられる。今後は、探索的手続きによって行われた本研究の成果に基づき、その効果の程度について検証していく必要がある。

E. 研究発表

1.論文発表

特になし

2.学会発表

特になし

Studies validating new approaches for evidence-based mental health policies.
Intramural Research Grant（1—6）for Neurological and Psychiatric Disorders of NCNP
Principal Investigator：Yoshio Yamanouchi
Department of Mental Health Policy , National Institute of Mental Health,
National Center of Neurology and Psychiatry

We conducted the following three research studies to validate new proposed approaches in evidence-based mental health policies.

1) A validation study on the diagnosis of schizophrenia
New epidemiological studies require a large cohort of participants with definitive diagnoses to ensure a true-positive ratio. A database review of the medical literature shows validation studies published on the diagnoses of various nonpsychiatric illnesses. In Japan, currently, the national insurance system accepts diagnoses solely to prescribe specific medications. Our validation study aimed to compare the registered diagnosis with the clinical diagnosis of schizophrenia. For feasibility study, we designed the research protocol for our hospital according to the STARD 2015 guidelines. Our research explored specific interventions and/or factors contributing to the accurate diagnosis of schizophrenia. Our outcomes documented within the database will benefit future research studies.

2) An estimation of severity of symptoms in psychiatric disorders using electronic health records data
In medical care for patients with physical disorders, there are some objective indicators to evaluate illness severity, such as presence or absence of complication or nursing care intensity. However, since there are few objective indexes in psychiatric care, evaluations of severity in psychiatry tend to be arbitrary. Therefore, we examined whether electronic health records data contain objective information which relate to the severity of psychiatric disorders. In addition, we drafted some statistical analysis plan to investigate factors in electronic health records data to predict patients who require considerable healthcare resources.

3) An assessment of certified psychiatrists' attitudes on decision making in involuntary admission
In Japan, the Mental Health and Welfare Act strictly regulates involuntary treatment prescribed by designated psychiatrists. In December 2018, the Ministry of Health,

Labour and Welfare revised the certification system, including the training programme. Approximately 70%–90% of participants were satisfied with the contents of the new programme. However, an assessment of its effectiveness has not yet been performed. Our questionnaire revealed the participants' psychological changes in the area of advocacy. Accordingly, we hypothesised that the psychiatrists' attitudes on advocacy will be a valid factor in measuring the effectiveness of the programme. To control the quality of the programme, we initiated the construction of the assessment scale.

2019(平成31-令和1)年度

精神・神経疾患研究開発費による研究報告集

令和2年9月発行

発行者　国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター

編集者　国立精神・神経医療センター企画医療研究課研究係

〒187-8551　東京都小平市小川東町4－1－1

(TEL) ０４２－３４６－１８７８

(FAX) ０４２－３４６－１７７８