

論 文 要 旨

A new phenotype of mitochondrial disease characterized by familial late-onset predominant axial myopathy and encephalopathy

〔 高齢発症の家族性傍脊柱筋萎縮症ならびに脳症を
特徴とする新規ミトコンドリア病 〕

崎 山 佑 介

【序論および目的】

傍脊柱筋萎縮症 (axial myopathy) は、傍脊柱筋に限局した筋萎縮と姿勢異常を特徴とする原因不明の筋疾患である。家族性の報告もあり、遺伝的な原因が考慮されている。今回、高齢発症の家族性傍脊柱筋萎縮症 1 家系について、その原因を同定するために、以下の研究を行った。

【材料および方法】

対象は、傍脊柱筋萎縮を認める 1 家系 4 症例。2 症例 (発端者, 長姉) については、臨床像、血液生化学検査、画像検査などの臨床的解析を行った。うち 1 症例 (発端者) は、上腕二頭筋の病理検査を行った。臨床的特徴や筋病理所見からミトコンドリア機能異常が推測されたため、呼吸酸素複合体活性を測定した。また、遺伝的原因を同定するため、書面による同意を得た上で白血球および骨格筋から DNA を抽出し、ミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) 用マイクロアレイ (Mitochip[®] v2.0) を用いて、mtDNA の全塩基配列 (16,568 bases) を決定した。さらに、サンガー法を用いて、病的変異が疑われる部位の塩基配列を再確認した。

一般的に、ミトコンドリア病患者には、変異 mtDNA と正常 mtDNA が共存している状態 (ヘテロプラスミー) が観察される。この変異 mtDNA の割合が高くなると細胞機能が障害されることが知られている。本研究では、同定された変異 mtDNA の割合を定量するため、amplification refractory mutation system を用いた real-time quantitative PCR (ARMS-qPCR) を実施した。

本研究は、鹿児島大学医学部遺伝子研究倫理委員会の承認を得て行われた。

【結 果】

臨床像の特徴は、60 歳以降に出現する姿勢異常 (腰を前方に突き出す姿勢や、腰を屈曲した姿勢)、CT 画像で認められる傍脊柱筋の著しい萎縮、軽度の CK 上昇、脳症 (発端

者：認知障害・小脳性失調、長姉：急性脳症・症候性てんかん)、ならびに一般的にミトコンドリア病で認める所見(発端者：高音域感音性難聴・不整脈・白内障、長姉：乳酸アシドーシス)であった。頭部MRI画像(FLAIR像)では、発端者に大脳皮質と小脳の萎縮、長姉に大脳深部白質高信号を認めた。

発端者の上腕二頭筋病理検査は、筋線維の大小不同を示し、筋原性変化であった。

Gomori Trichrome 染色では多数の ragged-red fiber (RRF) を、また cytochrome *c* oxidase (COX) 染色では活性が欠損した線維をそれぞれに認めた。電子顕微鏡検査では、ミトコンドリア異常による paracrystalline inclusion を確認した。健常者10名と比較したミトコンドリア呼吸酸素複合体活性比率は、複合体 I:43.4%、複合体 II:73.4%、複合体 III:70.5%、複合体 IV:54.7%であり、複合体 I ならびに IV で低下傾向を示した。

次に、ミトコンドリア異常の原因遺伝子を検索するため、白血球ならびに骨格筋から抽出した mtDNA の全塩基配列を決定した。その結果、骨格筋から抽出した mtDNA のみ、新規の mitochondrial (m.) tRNA^{phe} 遺伝子変異 (m.602C>T、ヘテロプラスミー) を確認した。本遺伝子変異の割合は 64.7±1.2% (mean±SD) と高率であった。一方、白血球から抽出した mtDNA における同変異の割合は、検出感度以下であった。

【考察】

本例の臨床像、筋病理検査、生化学検査から、ミトコンドリア機能異常を見いだした。変異が同定された m.tRNA^{phe} 遺伝子は、各種生物間で保持されている重要な遺伝子である。一般的に、m.tRNA 遺伝子変異の大多数は、m.tRNA 遺伝子2次構造上のアームに存在する。アームを構成する塩基結合(A-T または C-G)の破綻による m.tRNA 機能不全から、ミトコンドリア呼吸欠損に至る。本例の m.602C>T も、m.tRNA^{phe} 遺伝子のアームに位置しており、本変異がミトコンドリア機能異常を来していると考えられた。

一般的に、m.tRNA 遺伝子変異によるミトコンドリア病では、機能障害が目立つ臓器ほど高い比率で遺伝子変異を認める。本例においても、障害が目立つ骨格筋では高い遺伝子変異比率を認めたが、障害が目立たない白血球では変異を認めなかった。

ミトコンドリア機能異常を伴う傍脊柱筋萎縮症はこれまでに5例報告されているが、実際にミトコンドリア遺伝子異常を同定したのは本報告が初めてである。一方、m.tRNA^{phe} 遺伝子変異によるミトコンドリア機能異常が傍脊柱筋萎縮や脳症を引き起こす病態機序はいまだ不明である。過去に9つの m.tRNA^{phe} 遺伝子変異が報告されているが、いずれも傍脊柱筋萎縮は認めず、臨床像は様々であった。さらに同じ genotype でも phenotype が異なることもあり、mtDNA の genotype による phenotype の多様性については更なる検討が必要である。

【結論】

我々は今回の研究において、高齢発症の傍脊柱筋萎縮と脳症を特徴とする疾患群の一原因として、新規ミトコンドリア tRNA 遺伝子変異を同定した。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 130 号		学位申請者	崎山 佑介
審査委員	主査	佐野 輝	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	出雲 周二	副査	熊本 一朗
	副査	久保田 龍二	副査	橋口 照人

A new phenotype of mitochondrial disease characterized by familial late-onset predominant axial myopathy and encephalopathy

(高齢発症の家族性傍脊柱筋萎縮症ならびに脳症を特徴とする新規ミトコンドリア病)

傍脊柱筋萎縮症 (axial myopathy) は、傍脊柱筋に限局した筋萎縮と姿勢異常を特徴とする原因不明の筋疾患である。家族性の報告もあり、遺伝的な原因が考慮されている。今回、学位申請者は家族性傍脊柱筋萎縮症 1 家系について、その原因を同定する研究を行った。2 症例 (発端者, 長姉) については詳細な臨床的検討を行い、うち 1 症例 (発端者) については、筋病理検査、生化学検査、分子遺伝学的研究を行った。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

- 1) 臨床像の特徴は、高齢で発症する姿勢異常、CT 画像で認められる傍脊柱筋の著しい萎縮、軽度の CK 上昇、脳症(発端者: 認知障害・小脳性失調、長姉: 急性脳症・症候性てんかん)であった。頭部 MRI 画像 (FLAIR 像) では、発端者に大脳皮質と小脳の萎縮、長姉に大脳深部白質の高信号を認めた。
- 2) 筋病理検査では、ragged-red fiber、COX 活性欠損線維等のミトコンドリア異常による筋原性変化を確認した。電子顕微鏡検査では、ミトコンドリア異常症に特徴的な paracrystalline inclusion を確認した。また、ミトコンドリア呼吸鎖複合体酵素活性値は、複合体 I ならびに IV で低下傾向を示した。
- 3) 骨格筋から抽出したミトコンドリア DNA(mtDNA)にのみ、新規のミトコンドリア遺伝子変異 (m. tRNA^{Phe} 602C>T、ヘテロプラスミー) を確認した。本遺伝子変異の割合は 64.7±1.2% (mean±SD) と高率であった。一方、白血球から抽出した mtDNA における同変異の割合は、検出感度以下であった。
- 4) 病原性ミトコンドリア tRNA 遺伝子変異によるミトコンドリア病では、機能障害が目立つ臓器ほど高い比率で遺伝子変異を認めることが知られており、本研究においても障害が目立つ骨格筋では高い遺伝子変異比率を認め、障害が目立たない白血球では変異を認めなかった。また、病原性遺伝子変異の多くは m. tRNA 遺伝子 2 次構造上のアームに存在するが、本研究で同定した遺伝子変異も m. tRNA^{Phe} 遺伝子のアームに位置しており、病原性変異の可能性が高い。これらの知見により本症のミトコンドリア異常は m. tRNA^{Phe} の変異が原因であることが示唆された。
- 5) 今回の検討で高齢発症の家族性傍脊柱筋萎縮と脳症を特徴とする疾患群のひとつの原因として、m. tRNA^{Phe} 遺伝子変異を同定した。本疾患は、ミトコンドリア病の新しい臨床病型と考えられた。

本研究は、傍脊柱筋萎縮と脳症を特徴とする姉妹例の臨床的検討と、うち 1 例 (妹) の病理検査、生化学検査、mtDNA の解析によって、新しいミトコンドリア病の疾患概念を打ち出した、有意義な研究内容である。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 130 号	学位申請者	崎山 佑介
審査委員	主査	佐野 輝	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	出雲 周二	副査 熊本 一朗
	副査	久保田 龍二	副査 橋口 照人

主査および副査の5名は、平成23年5月31日、学位申請者 崎山 佑介 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 高齢者ではない axial myopathy において、ミトコンドリア異常を確認された症例はあるか？

(回答) 報告はない。若年発症 axial myopathy の自験例でも、ミトコンドリア異常はみられなかった。

質問2) なぜ傍脊柱筋が著しく障害されているのか？たとえば、筋肉の種類の違いで mtDNA の変異率に差があるのか？

(回答) 傍脊柱筋が障害されている理由は明らかにされていない。しかし、MELAS では、血管平滑筋の mtDNA 変異率が高いことが報告されており、筋の種類によって変異率が異なる可能性はある。

質問3) 姉妹で、脳 MRI 異常所見が異なっているのはなぜか？

(回答) ミトコンドリア異常症は、同じ遺伝子異常でも臨床像が異なることがある。その理由のひとつとして、変異型 mtDNA の割合の差が考えられている。

質問4) 姉の子供に高 CK 血症を認めているが、遺伝子検査で axial myopathy 発症を推測できるのか？

(回答) 発端者と同遺伝子変異があれば、発症する可能性がある。

質問5) 電子顕微鏡でみられる類格子状封入体は、ミトコンドリア異常症の形態的な証であるのか？

(回答) 類格子状封入体は、クリステ構造が均一化されたもので、ミトコンドリア異常症の証といえる。

質問6) ミトコンドリア tRNA(m.tRNA)と核 tRNA の働きは根本的に異なるのか？

(回答) m.tRNA は、ミトコンドリア内のタンパク合成にのみ関与している。

質問7) ミトコンドリア内部にリボソームは存在するのか？ミトコンドリア内のタンパクは、ミトコンドリアの中で作られているのか？

(回答) ミトコンドリアにはリボソームが存在する。しかし、ミトコンドリア内のタンパクが、どのようにして作られているのか、その詳細は明らかにされていない。

質問8) 姉妹の脳病変は根本的に異なっているが、脳内のどの細胞が障害されるのか？

(回答) 姉 (白質脳症) は、オリゴデンドログリアにおける変異型 mtDNA の割合が高く、妹 (脳萎縮) は、ニューロンにおける変異型 mtDNA の割合が高いことが推測される。

質問9) 家系内において、発症者の最終的な死因は何か？

(回答) 家系内の母親、叔母、長姉の死因は把握できていない。

質問10) 変異型 m.tRNA 遺伝子が蓄積して細胞死に陥ると記載されていたが、どのタイプの細胞死か？

Programmed necrosis の可能性はどうか？

(回答) mtDNA 異常によってミトコンドリア機能を失った細胞の細胞死のプロセスについて、その詳細な機序は明らかにされていない。

最終試験の結果の要旨

質問 11) 橋本病とミトコンドリア異常とは、理論的にどのような繋がりがああるのか？

(回答) 両者の関連性は報告されているが、その詳細な機序は明らかにされていない。

質問 12) 傍脊柱筋の脂肪変性とは、筋細胞から脂肪細胞への変換と考えて良いのか？

(回答) 筋萎縮で生じたフリースペースが脂肪に置き換わったものと推定されるが、詳細は明らかにされていない。

質問 13) お腹をつきだしている姿勢も含めて、Bent spine と表現するのか？

(回答) Axial myopathy の姿勢異常には、腰曲がり姿勢と、のけ反ってお腹をつきだす姿勢がある。前者の姿勢を Bent spine と表現し、後者の姿勢は Bent spine とは表現しない。

質問 14) 症例に側彎はあったか？

(回答) 軽度の側彎があった。

質問 15) NADH デヒドロゲナーゼ活性 (複合体 I) の筋病理はどうであったか？

(回答) NADH デヒドロゲナーゼ染色に明らかな活性低下はみられなかった。

質問 16) 「複合体酵素活性 I と IV の低下は COX 活性低下によるものではないか」と論文に記載されているが、COX 活性低下が複合体 I の酵素活性を低下させるのか。

(回答) COX 活性は、複合体 I の酵素活性に直接影響しない。複合体酵素活性 I と IV の低下は、m.tRNA 異常によるものとする。

質問 17) 同じ筋肉のなかでも、筋線維ごとに変異型 mtDNA の割合は異なるのか？

(回答) COX 活性が低下している筋線維は変異型 mtDNA の割合が高く、COX 活性が保たれている筋線維では変異型 mtDNA の割合は低い。これを証明する実験が、single muscle fiber analysis である。

質問 18) 1つの細胞内に変異型 mtDNA が蓄積していくのは、変異型 mtDNA の増殖率が高いためか？

(回答) mtDNA の多重欠失や大欠失の場合は、全体のゲノムサイズが小さくなるため、その複製速度が正常型 mtDNA よりも速くなり蓄積していく。mtDNA 点変異の場合は、蓄積する機序はわからない。

質問 19) 脳の白質に障害が目立つ場合に、その領域には変異型 mtDNA を多く含むオリゴデンドログリアが存在しているのか？オリゴデンドログリアは分裂能が少ない細胞なのか？

(回答) オリゴデンドログリアのミトコンドリア異常や分裂能について、その詳細はわからない。

質問 20) MRS は検討されているか？ MRS の ROI (関心領域)はどこに設定したか？

(回答) 妹のみ検討し、乳酸のピークは認めなかった。ROI は側脳室周囲白質に設定した。

質問 21) Long-PCR では、deletion などのサイズ異常はなかったか？筋肉の mtDNA ではどうだったか？

(回答) 筋肉を含めて、mtDNA サイズに異常はなかった。

質問 22) 上腕二頭筋の変異型 mtDNA の割合が高いということは、さまざまな筋肉にも変異型 mtDNA が蓄積していると予想されるが、CK 値はどの程度上昇していたか？

(回答) CK 値は 200-300 にとどまっていた。

質問 23) 上腕二頭筋は、変異型 mtDNA の割合が高く、さらにミトコンドリア異常があるにもかかわらず、筋障害に乏しいのはなぜか？

(回答) 筋障害の程度と変異型 mtDNA の割合に解離がある理由について、その詳細は不明である。

質問 24) 筋病理では、再生線維が存在していたか？

(回答) 再生線維は認めなかった。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。