

## 論 文 要 旨

**Mitochondrial DNA deletion mutations in patients  
with neuropsychiatric symptoms**

精神神経徴候を有する患者における  
ミトコンドリア DNA の欠失変異

加 藤 真 依 子

**【序論および目的】**

ミトコンドリア脳筋症はミトコンドリア機能異常により引き起こされる骨格筋や中枢神経系を含む多臓器を侵す疾患である。近年パーキンソン病や統合失調症、気分障害において、剖検の脳組織にミトコンドリア DNA 異常を認めることが報告されている。これは、ミトコンドリア異常が神経精神疾患の発生と深く係っていることを推測させるものである。精神症状とミトコンドリア遺伝子の関連を評価する為に、以下の研究を行った。

**【材料および方法】**

眼瞼下垂や筋力低下を伴い精神神経症状を呈する患者群において、認知症を含む精神神経症状ならびに身体症状、血液生化学的所見、画像所見等の臨床評価を行った。また、患者群ならびに健常コントロール群に書面によるインフォームド・コンセントを得た後に白血球および骨格筋由来遺伝子 DNA (gDNA) を抽出した。次に、白血球由来の gDNA を用いて直接塩基配列決定法により mitochondria DNA (mtDNA) の全配列を同定し点変異の検索を行うとともに、骨格筋由来および白血球由来の gDNA 各々について Southern blot 法により mtDNA の巨大欠失を検出した。加えて、白血球由来の gDNA を用い直接塩基配列決定法によりミトコンドリア遺伝子変異をもたらす核性遺伝子群の点変異および microdeletions を同定し、real-time PCR 法を用いて核性遺伝子群の copy number variants (CNVs) を測定した。尚、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った。

**【結 果】**

3 症例の患者はそれぞれ、易疲労性や眼瞼下垂、また血中乳酸・ピルビン酸の高値などミトコンドリア脳筋症を示唆する臨床症状を有していた。まず、患者 1 および 3 の筋病

理所見では Gomori Trichrome 染色で ragged red fiber (RRF)を認め、cytochrome c oxidase 染色で活性のない線維を認めた。以上のことから、2 症例はミトコンドリア筋症の特徴を有していた。患者 2 では RRF は認めなかったが、筋線維の大小不同をみとめ、筋原性の変化を有していた。

次に白血球由来 gDNA を用いて、各々の mtDNA の配列を決定した結果は、全ての患者において A3243G transition に代表される既存の疾患原因となる点変異は認めなかった。しかし、統合失調症様の精神症状を有する患者 1 では A5127G transition に加え、平田 (1999) らが報告した近位筋優位な萎縮を呈する患者に認めたものと同様の T4612C transition, A8291G transition, 9-bp microdeletion を検出した。頻度を解析した結果および mtSNP database に照らし合わせた所、9-bp microdeletion (頻度 9.3%) は一般的な多型と考えられ、A5127G, T4612C, A8291G はそれぞれ 0.3~0.4% であり稀な多型と判断した。Southern blot 法で mtDNA の解析を行ったところ、健常者、患者 2 および患者 3 の白血球由来の mtDNA では欠失は認められず、患者の筋肉由来の mtDNA では、それぞれ多重欠失を認めた。また患者 1 の白血球由来の mtDNA でも多重欠失を認めた。

外眼筋麻痺を呈するミトコンドリア脳筋症は種々の核遺伝子の変異が関係しているといわれることから、その遺伝子異常が二次的な欠失 mtDNA の蓄積を引き起こすと報告のある 7 つの遺伝子 (POLG, POLG2, C10orf2, SLC25A4, ECGF1, OPA1, WFS1) について、遺伝子の開始コドンから 1kb 上流領域を含む直接塩基配列決定法および CNVs 解析を用いて変異解析を行った。患者 1 において SCL25A4 遺伝子 A587C transversion を認めた。これはコントロール群において 0.4% の頻度で見つかっており、稀な多型と考えられた。患者 2、患者 3 では既存の多型のみ検出された。

### 【結論及び考察】

我々は今回の研究において精神神経症状を有する患者 3 例において heteroplasmic な mtDNA 多重欠失を同定し、これらの患者において欠失は精神症状との関連が考えられた。mtDNA 多重欠失の引き金は今回の研究でははっきりしなかったが、これらの患者ですでに報告された核遺伝子群には異常は無く、別の機序による mtDNA の多重欠失が引き起こされていると考えられた。

(Neuroscience Research 掲載予定)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 119 号	学位申請者	加藤 真依子
審査委員	主査	高嶋 博	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

## Mitochondrial DNA deletion mutations in patients with neuropsychiatric symptoms

## (精神神経徴候を有する患者におけるミトコンドリア DNA の欠失変異)

ミトコンドリア脳筋症はミトコンドリア機能異常により引き起こされる骨格筋や中枢神経系を含む多臓器を侵す疾患である。近年、パーキンソン病、統合失調症や気分障害において、剖検の脳組織に mitochondrial DNA (mtDNA)異常が報告されており、ミトコンドリア異常と精神神経疾患の発生との関連が推測されている。今回、学位申請者は眼瞼下垂や筋力低下を伴い精神神経症状を呈する 3 症例において、詳細な臨床評価と分子遺伝学的研究を行った。その結果、以下の知見が明らかにされた。

(1) 患者 1 は統合失調症様の精神症状を呈し、頭部 MRI にて両側基底核部分を中心に脳梗塞を疑う所見を認めたため MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes)様の病型を疑った。しかし、MELAS にみられる A3243G に代表される点変異は認めず、CPEO (Chronic progressive external ophthalmoplegia)でみられることの多い骨格筋の mtDNA の多重欠失を認めた。

(2) 患者 2 と患者 3 は精神症状として抑うつ状態を呈し、身体症状として眼瞼下垂や眼球運動障害を有していたことから CPEO を疑い検索を行ったところ骨格筋の mtDNA の多重欠失を認めた。

(3) 患者 1 および患者 3 の筋病理所見は、ragged red fiber 等のミトコンドリア脳筋症の筋病理の特徴を有していた。患者 1 では骨格筋のみならず白血球由来の mtDNA にも欠失が観察され、臨床症状に組織のヘテロプラスミーが影響を与えていると予想された。

(4) 全ての症例で mtDNA の多重欠失を認めたことから、mtDNA の欠失に関連すると報告された核遺伝子群(POLG, POLG2, C10orf2, SLC25A4, ECGF1, OPA1, WFS1)の検索を行った。今回の 3 症例では、mtDNA 多重欠失に関連する既知の核遺伝子群には異常は検出されず、新たな機序による mtDNA の多重欠失が引き起こされたと考えられた。

(5) 精神疾患と診断された患者の中に mtDNA 異常を有し、ミトコンドリアの機能異常が精神症状の発症に何らかの影響を与えている一群の存在が明らかにされた。精神症状が前面となる症例においても、筋症状等を認めた場合はミトコンドリア脳筋症も疑い、診断治療に当たる必要性が考えられた。

本研究は、精神疾患を有する患者群の臨床症状を評価し、mtDNA を解析し、mtDNA の多重欠失を明らかにし、関連する各遺伝子を解析したものである。精神疾患とミトコンドリア機能異常の関連性に着目し、臨床症状と mtDNA 欠失変異の組織ヘテロプラスミーの関連についても考察し、日常の精神科診療へもフィードバックを行っており、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 119 号	学位申請者	加藤 真依子
審査委員	主査	高嶋 博	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1月21日、学位申請者 加藤 真依子君に面接し、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) 患者3の頭部MRI上の異常所見は、ミトコンドリア病に伴う頭部の異常所見と考えられるか。

(回答) 患者3には糖尿病や高脂質血症などの脳血管障害の危険因子となる他のリスクファクターはなく、頭部MRIの所見はミトコンドリア脳筋症に伴う白質の異常と判断した。

質問2) ミトコンドリアの異常がどのように働いて、統合失調症を呈すると考えられるか。仮説を述べよ。

(回答) 近年、統合失調症の患者の死後脳でNMDA受容体の低下が観察され、カルシウムイオンの制御障害と統合失調症の病因との関連性が示唆されている。mtDNA異常やミトコンドリア関連核遺伝子の変異によるミトコンドリア機能の異常によっても、同様にカルシウムイオンの制御障害が起こると考えられており、これによりシナプスの可塑性が変化し精神症状の原因となると推測される。

質問3) 向精神薬で精神症状が改善しているが、精神症状の治療によって筋症状に影響はあったか。

(回答) 患者によって異なる。患者2は精神症状と筋症状としての脱力や眼瞼下垂がリンクしていた。

質問4) それぞれ精神症状と筋症状が同じ機序で起こっているのか。

(回答) どちらもミトコンドリアの機能異常により起こると考えている。

質問5) 患者2と抗うつ薬の関係は？

(回答) 患者2の精神症状にはノルトリプチリン40mgが有効であったが、健常成人と比較して薬物の血中濃度が上昇しやすく、代謝異常が存在すると推測した。

質問6) 脳筋症患者と通常の統合失調症や躁うつ病患者とを比較して、精神症状に違いはあったか？

(回答) 患者の精神症状はそれぞれ疾患の診断基準に合致し、向精神薬を用いた治療で症状の改善を認めた。日常診療での気付きとして、患者1は、幻覚・妄想状態の再燃を繰り返したにも関わらず薬剤の反応性が良い印象を受けた。また、患者2では抑うつ状態の悪化とリンクして眼瞼下垂を認めた。

質問7) ミトコンドリア脳筋症は神経症状の変動が認められるが精神症状も変動はあるか。

(回答) 精神症状にも変動が認められる。

質問8) 筋肉mtDNAの多重欠失は正常の高齢者の筋肉でもみられるか？

(回答) 正常高齢者の筋肉にもmtDNAの多重欠失が蓄積するが、全mtDNAに大して欠失mtDNAひとつひとつの割合は大変小さく、PCR法などにより増幅して検出する必要がある。

質問9) 統合失調症患者の骨格筋にmtDNAの欠失があり、白血球にないという文献報告は他にあるか。

(回答) 精神疾患を呈したミトコンドリア脳筋症患者では、筋組織由来のmtDNAに欠失を認め、白血球由来のmtDNAに欠失を認めないとする報告は多くあるが、統合失調症を対象にした研究論文は少ない。

## 最終試験の結果の要旨

質問 10) コピー数多型の解析はどのような目的で、何をしたのか。

(回答) 核遺伝子のコピー数多型が、様々な疾患の発生に関連するという報告が相次いでいるため、mtDNA の多重欠失と関連すると報告された既知の核遺伝子について、全エクソンの配列を決定するとともに各々のエクソンのコピー数多型を解析した。

質問 11) 患者 3 の網膜色素変性症はミトコンドリア異常と関係あると考えるか。

(回答) 網膜色素変性症は、ミトコンドリア脳筋症において Keams-Sayre 症候群や慢性進行性外眼筋麻痺など mtDNA の欠失を有する病型でしばしば観察される。

質問 12) 患者 2 の抑うつ症状と生化学的所見は連動していたと考えられるか。

(回答) 患者 2 は抑うつ症状と生化学的所見の推移が連動していた。

質問 13) ミトコンドリア異常は糖尿病を発症する頻度が高いが、患者 1、患者 2、患者 3 については耐糖能異常は認めなかったか。

(回答) 3 症例とも耐糖能異常や糖尿病は観察されなかった。

質問 14) ミトコンドリア脳筋症で骨格筋に mtDNA の異常があれば、脳にも mtDNA の異常があると考えられるか。

(回答) mtDNA は組織によって割合が異なるヘテロプラスミーであり、症状を呈した組織により多くの異常 mtDNA が認められる。そのため、筋症状と中枢神経症状を有するミトコンドリア脳筋症では、筋組織に異常 mtDNA を認める場合に脳組織でも異常 mtDNA が存在することが強く示唆される。

質問 15) Long-PCR 法を用いて mtDNA を増幅し、電気泳動するとどうなる結果になるか。

(回答) Long-PCR 法でも骨格筋に mtDNA の多重欠失が観察され、白血球では認めなかった。しかし、Long-PCR 法では短い DNA 断片のほうが増幅されやすく、欠失のある mtDNA 断片が強調された泳動像が観察された。

質問 16) サザンブロット法では白血球由来の mtDNA のバンドの強度が弱い、totalDNA 量は等量流しているのか。

(回答) サザンブロットに用いた totalDNA は、すべて等量 (2  $\mu$ g) を電気泳動した。

質問 17) 平田ら (1999) が報告した A8291G を有するミトコンドリア脳筋症の家系では筋肉の異常のみで精神症状の出現はなかったが、同様の点変異を有しているからと患者 1 の精神症状とリンクさせてもいいのか。

(回答) 我々の研究では健常者に 1 名同様の多型が観察されたことから、A8291G は稀な多型もしくはこの健常者には発病を抑制する別の機序が働いたのではないかと考察した。結果、患者 1 は A8291G 点変異を有し近位筋優位の筋萎縮を呈した家系例とは異なる機序でミトコンドリア脳筋症を発症したと推測するに至った。

質問 18) VPS13A 遺伝子について調べているか。

(回答) 今回の研究では調べていない。

質問 19) mtDNA の多重欠失が脳に出現したと仮定すると、統合失調症患者の脳内ではどのような異常が起こっていると考えられるか。脳内の異常の検索方法や症状悪化と連動した検査が可能か述べよ。

(回答) 統合失調症患者の死後脳でミトコンドリアの呼吸鎖複合体の活性低下を認めることから、ミトコンドリアの機能異常による脳のエネルギー代謝異常が症状発症の原因の一つと推測されていた。近年、FDG-PET、SPECT や  $P^{31}$ -MRS など脳機能画像検査により、統合失調症患者の大脳皮質前頭部の低活性、側頭葉や視床および大脳基底核の代謝異常、前頭葉と左側頭葉での ATP 減少などが観察されるようになった。脳機能画像検査を用いると、脳の代謝機能を症状悪化と連動して観察することが可能である。

質問 20) 気分障害などの患者でもミトコンドリア脳筋症の可能性を考えて日常診療をおこなっているのか。

(回答) 当診療科では、診療に当たる医師のミトコンドリア脳筋症に対する知識を深め、研究を臨床に反映するよう努めている。脱力や易疲労性などの身体症状、神経学的所見や病歴などからミトコンドリア脳筋症が疑われる患者には、血液性化学検査、髄液検査や筋生検を行っている。

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。