

論 文 要 旨

Late-onset Charcot-Marie-Tooth disease 4F caused by periaxin gene mutation

〔 Periaxin 遺伝子変異による Charcot-Marie-Tooth 病 4F
高齡発症型の検討 〕

徳 永 章 子

【序論および目的】

Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) は、遺伝性ニューロパチーの中で最も頻度が高く、有病率は 2500 名に 1 名であり、遠位筋優位の筋力低下と筋萎縮、感覚障害を伴う。診断には、電気生理検査や病理学的検査が必要である。これまで periaxin 異常による CMT は、主として幼児期発型の CMT の原因となることが知られている。periaxin は髄鞘のループ部、軸索間のタイトジャンクションおよびコンパクトミエリンの形成において重要な働きをする。我々は、日本人 CMT 患者の包括的な遺伝子診断を行い、その検査の中で PRX 変異を持つ症例を同定し、CMT4F の臨床的な特徴をあきらかにするため、以下の研究を行った。

【材料および方法】

2006 年から 2012 年までの間、書面による同意を得た CMT または CMT 関連ニューロパチーと診断された PMP22 重複のない 427 例について、独自の設計したリシークエンシングアレイを用いて遺伝子診断を行った。リシークエンシングアレイは、Affimetrix 社製 Gene Chip[®] を使用し、一度に 28 種類の CMT 関連遺伝子配列を搭載したものを作製した。血液より抽出した DNA 検体を、28 種類*の遺伝子全てのエクソン領域をカバーするように設計された 363 のプライマーセットを、32 本のチューブに分割し、Qiagen[®] Multiplex PCR System を用いてそれぞれ増幅した。増幅された DNA 増幅産物を一つにまとめ、DNase I で断片化後、ビオチン化抗ストレプトアビジン抗体でラベル化し、アレイ上のプローブと hybridization した。プローブと結合した DNA を染色・洗浄後、専用スキャナでシグナル情報を読み、Gene Chip[®] Operating Software (GCOS) で処理後、Gene Chip[®] Sequence Analysis Software (GSEQ) で解析し配列を決定した。検出された遺伝子異常は Sanger 法シークエンス解析でも確認した。

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。

* : PMP22, EGR2, MPZ, GJB1, PRX, LITAF, NEFL, GDAPI1, MTMR2, SH3TC2, SBF2, NDRG1, MFN2, RAB7, GARS, HSPB1, HSPB8, LMNA, DNMT2, YARS, AARS, KARS, APTX, SETX, TDPI, DHH, GAN1, KCC3

【結 果】

遺伝子チップによるリシーケンス解析の結果より、2種類の *PRX* 変異を3家系3例に認めた。1例は新規のミスセンス変異 D651N のホモ接合体であり、残り2人は既報告のナンセンス変異 R1070X のホモ接合体であった。臨床的な特徴として、D651N 変異のみられた症例1は65歳女性、30歳時に両下肢の筋力低下と感覚障害を自覚し、44歳時に上肢脱力と嚁声がみられた。R1070X 変異のみられた症例2、症例3は63歳女性と47歳男性で、発症はそれぞれ50歳頃と37歳時に遠位筋の筋力低下に始まり、以後緩徐に症状は進行した。歩行状態において、1例目は短下肢装具と電動車椅子を用いて移動、2例目は装具なしで自力歩行可能、3例目は歩行器歩行レベルである。電気生理検査において3例全て38m/秒未満の脱髄型パターンを示した。腓腹神経の病理像では髄鞘の菲薄化やオニオンバルブ形成などの脱髄所見を確認した。

【結論及び考察】

我々は新規の *PRX* 変異による CMT4F 例を報告した。3人の患者に *PRX* 変異を認めた。これまで *PRX* 変異は27名において報告されており、それらは全てナンセンスまたはフレームシフト変異であった。我々は今回、D651N のホモ接合体を報告したが、ミスセンス変異例の報告はこれまでにない。Aspartate 651 について9種の生物間でその保存性を調べたところ、5種では保存され、また4種では glutamate に置換されていた。しかし、aspartate と glutamate は類似した特性のアミノ酸で、陰性荷電を持った同一のグループに属することから、aspartate 651 は各生物間で保持されていることとなる。また Aspartate 651 は repeat domain に位置するが、本部位の重要性が推測された。症例1で見られた嚁声に関しては、これまでに CMT1, CMT2C, CMT2K, X 連鎖性 CMT, Dejerine-Sottas 病でみられた報告と同様に、声帯麻痺により起こっている可能性が高い。

2症例でみられた R1070X 変異は日本人の中で最も頻度が高く、トルコ人にも R1070X 変異が報告されていることから、この変異は日本やアジアにおいて祖先のアリルである可能性がある。*PRX* 変異による CMT は通常、早期発症で CMT4F か Dejerine-Sottas 病を引き起こし、臨床表現型は重度の筋力低下と大幅な神経伝導速度の低下を示す。3例において発症年齢は27歳以降と遅く、臨床型は既報告例と比較して軽症であった。我々は CMT4F に対して、この3例によって臨床表現型のバリエーションを広げた。今後、成人例において、CMT1A 陰性の脱髄型ニューロパチーに対して、*PRX* 変異がある可能性を考える必要がある。

【結論】

我々は C 大規模な CMT の遺伝子解析により、3例の CMT4F 症例を報告し、臨床表現型の多様性を示した。

(Neurogenetics . 2012; 13(3): 189–196 DOI : 10.1007/s10048-012-0338-5)

論文審査の要旨

報 告 番 号	総 研 第 2 1 3 号		学位申請者	徳永 章子
審 査 委 員	主 査	出雲 周二	学 位	博士 (医学・歯学・学術)
	副 査	橋口 照人	副 査	熊本 一郎
	副 査	武田 泰生	副 査	久保田 龍二

Late-onset Charcot-Marie-Tooth disease 4F caused by periaxin gene mutation.
(Periaxin 遺伝子変異による Charcot-Marie-Tooth 病 4F 高齢発症型の検討)

Charcot-Marie-Tooth 病は、遺伝性の末梢神経障害では最も多く、髄鞘の障害型(脱髄型)と軸索障害型に分けられる。これまでに明らかにされた原因遺伝子は 40 以上と多く、遺伝子診断は困難であった。

今回、学位申請者は、開発した CMT 遺伝子診断システム (リシークエンス DNA アレイ法) を用い、多数例の遺伝子検査を行い、これまでに CMT427 例の遺伝子診断を行った。結果、日本でも世界でもまれな遺伝子異常である Periaxin (PRX) の変異をもつ CMT4F 型を複数例、診断し得た。通常、CMT4F の発症年齢は早いですが、本邦の症例は軽症であり、臨床的な特徴がこれまでの報告と異なっていたため、本論文では、遺伝子異常と臨床的特徴についての詳細な検討を行っている。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

- 1) *Peripheral myelin protein 22(PMP22)* 重複陰性の成人発症 CMT に関して、既知の疾患関連遺伝子の遺伝子診断陽性者の中で、PRX 遺伝子異常を 3 家系 3 例同定した。2 例はナンセンス変異のホモ接合体、1 例はミスセンス変異のホモ接合体であった。
- 2) ミスセンス変異の D651N について、タンパク質機能予測ツールのうちの SIFT、生物種別間のアミノ酸比較、家族の遺伝子解析 (Segregation study)、およびコントロールスタディを行い、ミスセンス変異 D651N の病原性を確認した。
- 3) 3 家系の臨床的解析では、四肢遠位筋優位の障害、深部腱反射消失、電気生理検査において 38m/秒未満の脱髄型パターンを示した。神経生検の病理像において髄鞘の菲薄化やオニオンバルブ形成などの脱髄所見を認めるといった既報告と同様の特徴が確認されたが、ミスセンス変異の 1 例においては PRX 変異ではまれな嗄声を認めた。補助具なしでの歩行が可能な軽症例もみられた。
- 4) 本報告は、これまでの報告の中で、最も遅発性発症の軽症例を含んでいた。

本研究により PRX 変異による CMT は、ほとんどが早期発症で重症型の遺伝性ニューロパチーを引き起こすと考えられていたが、今回の 3 例とも発症年齢は 27 歳以降と遅く、臨床症候も軽症であることが確認された。本研究により CMT4F の臨床表現型の多様性が確認され、今後の CMT の鑑別診断上重要な知見を提供している。

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 2 1 3 号		学位申請者	徳永 章子
審 査 委 員	主 査	出雲 周二	学 位	博士 (医学・歯学・学術)
	副 査	橋口 照人	副 査	熊本 一郎
	副 査	武田 泰生	副 査	久保田 龍二

主査および副査の5名は、平成24年9月25日、学位申請者 徳永 章子 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、いずれに付いても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 嚔声は病初期のいつ頃から出現するのか、進行してからか。

(回答) ある程度進行してから後期に出現する。

質問2) トルコ人と共通の病気で、CMT以外の遺伝病/神経疾患はあるのか。

(回答) 常染色体優性遺伝性パーキンソン病、ベーチェット病、球脊髄性筋萎縮症などが知られている

質問3) 抗 periaxin 抗体による神経線維の染色を行ったのか。

(回答) 病理組織は他施設で行われており、標本を入手できず、抗 periaxin 抗体による染色は行なっていない。

質問4) Cajal band は本質的にはどのようなものか。

(回答) Cajal band は、シュワン細胞の髄鞘の外周を取り囲む、縦走および横走のバンドであり、横たわった細胞膜に接着している。シュワン細胞の必要とする代謝や輸送を遂行すると考えられている。

質問5) figure 1 でのホモ接合体の方は子供がいるのか。妊娠は可能なのか。

(回答) 妊娠可能と思われるが、子供はいない。

質問6) figure 2 で R651N は間違いか。

(回答) D651N が正しい記載である。

質問7) Cajal band は、シュミットランターマン切痕のことか。細胞質が少し残っているシュミットランターマンのところに periaxin が集積していると考えてよいのか。

(回答) シュミットランターマン切痕とは、髄鞘のところどころにみられる、線維の方向にたいして斜めの方向にみられる切れ目である。Cajal band は髄鞘表面にみられるバンドで、シュミットランターマン切痕とは異なる。

質問8) 免疫染色で染色されているのは、シュミットランターマンのところではなくて細胞質だが、DRP2 と結合して発現していると考えて良いのか。

(回答) periaxin はシュワン細胞の細胞質内に存在し、髄鞘膜近くにおいて DRP2 と結合して存在し、細胞外膜との接着の役割を持つ。シュワン細胞の髄鞘に広く発現しており全体が染色されて見えている。

質問9) 本症例は高齢発症であり、今までの重症例の報告との違いは何から来るのか。

(回答) これまでの periaxin の変異は、すべてがナンセンス変異かフレームシフト変異であり、今回報告した D651N 変異はミスセンス変異であり機能変化は少ないと考えられるので、臨床病型が軽いと推定される。R1070X 変異については、periaxin の C 末の 291 アミノ酸の欠失がおこるが、約 70% の長さの蛋白発現があるため臨床像が軽症と考えられる。

質問10) 蛋白質の機能を in vitro で観察しようとしたとき、どのような実験系が考えられるか。ほかの細胞質の蛋白質で、ジストログリカン自体が接着に関わるとか、PMP22 や P0 の局在が変化するという報告はないのか。

(回答) PRX D651N 変異を持ったベクターを作成し、periaxin null マウスから作成したシュワン培養細胞に正常な

最終試験の結果の要旨

periaxin と異常 periaxin を発現させ、異常な Periaxin が PMP22 や P0 の分布に影響を与えるか確認する実験系が考えられる。また、基底膜の主要成分であるラミニン (LN) は強い細胞接着活性を持つ。インテグリンと α -ジストログリカン (α -DG) は細胞側 LN レセプターとして知られている。 α -DG は筋組織において LN-1、LN-2 と結合し、筋細胞膜の安定化に寄与する。PMP22 や P0 の局在が変化するという報告はない。

質問 11) ノックアウトマウスで他の蛋白質の動態が変わることは報告されていないのか。

(回答) 主なミエリン蛋白である myelin-associated glycoprotein や P0 蛋白、ミエリン塩基性蛋白のレベルは正常だった。

質問 12) 調べられた患者さんで、2 種類の遺伝子の変異はなかったのか。

(回答) P0 蛋白の異常はなかった。myelin-associated glycoprotein については、CMT の原因遺伝子ではないため今回は調べていない。

質問 13) マイクロアレイのコントロールにアメリカ人を入れた意味はあるのか。

(回答) 数をできるだけ増やすためである。

質問 14) DNA チップを施行した後に、サンガー法で確認する意味があるのか。

(回答) 正確性は高いが、読みにくい配列も存在するので精度を上げるために行っている。

質問 15) SIFT はどのような原理で変異の病原性をよみとるのか。

(回答) 1 塩基の変異が蛋白質にどのような影響を与え得るのか、同じ蛋白ファミリーの中での配列保存性を元に、蛋白質安定性への影響を評価している。

質問 16) 嚙声の原因は何か。過去の報告においての反回神経麻痺の病理的变化は、autopsy により得られたものか。

(回答) 声帯麻痺により嚙声が起こる。Autopsy 例はないが、ファイバースコープで左声帯の動きの制限が主に観察されていることから、反回神経に病理的变化が起きていると推定される。

質問 17) CMT3 は何か。Dejerine-Sottas 病 (DSS) は AR だが、CMT4 との違いは何か。

(回答) CMT3 は DSS を表す。一般に 2 歳以下の発症で、より重症なものが DSS であり CMT4 と区別されているが、厳密な基準が無く、CMT4 と DSS にはオーバーラップがあり得る。

質問 18) PRX 異常の表現型のほとんどは DSS なのか。

(回答) ほとんどではない。過去報告 19 例中 5 例である。

質問 19) 発症年齢で CMT3、CMT4 を区別して良いのか。

(回答) 2 歳以下の重症例が CMT3 であるが、現在はあまり用いられていない。発症年齢と重症度によって CMT3 と CMT4 は区別されるのは、DSS と同様である。

質問 20) CMT4F というのは名前の付いた順番なのか、periaxin の異常症を 4F というのか。

(回答) 遺伝子座が決定された順で決まっている。CMT4F の原因が periaxin と判明した。

質問 21) PRX はシュワン細胞だけに発現しているのか。発生時期に他の部位に発現はないのか。

(回答) 末梢神経のみに発現している。

質問 22) 3 例の病理所見で Schwann cell projection とは何か。

(回答) 古い病理レポートからの引用所見であるが、シュワン細胞の増加を示していると考えている。

質問 23) 無髄線維については異常はないのか。あるいは、臨床像で自律神経障害はあるのか。

(回答) 臨床像で自律神経障害はない。基本的には無髄線維の異常はないだろうと推測される。

質問 24) 有髄線維が減少、脱落する機序は何か。

(回答) 脱髄から輸送の障害や Na チャネルの機能の低下による機能的軸索障害がおこり、それがワーラー変性を引き起こすと考えられる。

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。