

## 論 文 要 旨

### Heteroplasmic m.1624C>T mutation of the mitochondrial tRNA<sup>Val</sup> gene in a proband and his mother with repeated consciousness disturbances

〔 意識障害を繰り返す母子例におけるミトコンドリア tRNA<sup>Val</sup> 遺伝子上の heteroplasmic m.1624C>T 変異 〕

三月田 葉子

#### 【序論および目的】

ミトコンドリア病の病因となるミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) 上の点変異に関しては、数百以上の種類に及ぶ報告がある。その中でも m.1624C>T 変異の報告は一家系列の報告のみであり (Robert McFarland et al. Nat Genet. 30, 145-6, 2002)、症例は全例変異を homoplasmic に有しているが臨床表現型は多様で、母親は軽症であったがその子らの多くは胎生致死もしくは生下後数時間で死亡し、生存患児も Leigh 脳症類似の重篤な臨床症状を引き起こした。これまでに heteroplasmic に m.1624C>T 変異を持つ症例の報告はない。今回我々は成人発症で精神運動興奮を伴う一過性の意識障害を繰り返し、m.1624C>T 変異を heteroplasmic に持つ母子例を経験した。本家系列において同変異の heteroplasmy の割合の定量を行い、既報の homoplasmic にもつ家系列と臨床症状を比較検討し、相違点について考察した。

#### 【材料および方法】

発端者となった症例は、36 歳男性。25 歳時に、せん妄による精神運動興奮を伴う一過性の意識障害を呈し入院加療となった。脱抑制、知的機能低下、人格変化などの精神神経症状を認めた。脳脊髄液では乳酸、ピルビン酸の上昇を繰り返し認めた。この症例に対して、WAIS-R、WAIS-III、Trail-Making test、Modified Stroop test、Wisconsin card sorting test、Word fluency test などの神経心理学的検査を行い、7 年間の経過を追った。また、母親は 37 歳時より精神運動興奮、幻視、幻聴やてんかん発作を伴う一過性の意識障害を繰り返し、頭部 CT 上に一過性に出現する低吸収域を繰り返し認めた。

文章によるインフォームドコンセントを患者、患者母親から得た後に採血を行い、白血球、患者筋肉から常法を用いて mtDNA を抽出した。患者白血球、患者筋肉、患者母親白血球の mtDNA について直接シーケンス法で変異検索を行った。

また、ARMS (Amplification Refractory Mutation System) 法を用いた real-time PCR 法により heteroplasmic m.1624C>T の定量を行った。定量の際には、p-GEM-T vector を利用した wild-type1624C と mutation1624T の plasmid により検量線を作成した。定量の際の蛍光試薬には SYBR Green を使用した。

尚、本症例の報告に当たっては、個人が特定されないよう十分に配慮した。また、本研究は鹿児島大学医学部生命倫理・遺伝子解析研究倫理委員会、遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を

得た。

### 【結果】

患者白血球、患者筋肉、両者の白血球から抽出した mtDNA において、全 mtDNA の配列解析を行い、m.1624C>T heteroplasmy 変異を見出した。また、ARMS 法を用いた real-timePCR により得られた Ct 値から、検量線を利用して変異比率の定量を行った。m.1624C>T 変異比率は患者筋肉 88.8%(29 歳時)>患者筋肉 59.7%(36 歳時)>患者白血球 47.8% (29 歳時)>患者白血球 34.0% (36 歳)>母親白血球 17.2%>>健常者白血球 0% という結果を得た。m.1624T の変異比率は 7 年間で患者白血球、患者筋肉で共に減少していた。

### 【結論及び考察】

近年では、うつ病、双極性障害、統合失調症、知的障害、自閉症などの精神障害患者で mtDNA 変異や mtDNA と関連する核遺伝子変異を持つ症例が多数報告されている (Fattal et al., *Psychosomatics*, 2006; Kato et al., *Neurosci. Res.*, 2011; Munakata et al., *Mutat. Res.* 2007; Rollins et al., *PLoS One*, 2009; Rossignol and Frye, *Mol. Psychiatry*, 2012)。今回我々は、繰り返す意識障害を伴う精神神経症状を呈し、脳脊髄液中の乳酸、ピルビン酸の上昇を認める家系例に対して、heteroplasmic な m.1624C>T 変異を同定した。今回、患者脳 sample はなかったが、Macmillan や Shiraiwa らによると死後脳の変異率と死後筋肉検体の変異率は同等であったと報告されており (Macmillan et al., *Neurology*. 1993 ; Shiraiwa et al., *J. Neurol. Sci.*, 1993)、本患者での脳の変異率も筋と同等であり、精神症状になんらかの影響を及ぼしていると考えられる。

既報の homoplasmic 症例では、COX 欠損がみられていたが、本患者筋肉において、88.8%(29 歳)、59.7%(36 歳)といった高率の m.1624C>T 変異が見られたにもかかわらず、筋病理所見では、大小不同の筋線維以外の異常所見やミオパチーは認めなかった。M.3243A>G 変異では、COX-deficient fiber や ragged-red fiber がみられる変異率の閾値があると報告されている (Jeppesen et al., *Arch. Neurol.*, 2006)。M.1624C>T 変異に関しても同様に筋病理所見や筋症状が出現する変異率の閾値があり、本症例は閾値以下の変異率であることが示唆された。

低比率の heteroplasmy の検出には RFLP や Taqman probe による real-time PCR よりも ARMS 法を使用した real-time PCR が有用であると報告されている (Bai and Wong, *Clin. Chem.*, 2004)。直接シーケンス法では、低比率の変異は周囲のノイズと見間違える可能性がある。

胎生致死もしくは Leigh 脳症類似の重篤な臨床症状を引き起こしている homoplasmic な家系例に対して、我々の症例は発症年齢や臨床症状において、比較的軽症例と言える。Homoplasmic 家系では母親のみが片頭痛、易疲労感、筋力低下などの軽症となっており、Rorbach らは、VARs2 (valyl-tRNA synthetase 2) の発現が本変異の障害を rescue する可能性を考察していた (Rorbach et al., *Nucleic Acids Res.*, 2008)。今回の結果から既報の homoplasmic に変異をもつ家系に比較すると、heteroplasmic に変異を有する本家系例の臨床症状は軽症であり、heteroplasmy の比率が表現型決定因子の一つであると考えられた。

発端者の 7 年間の経過で白血球と筋ともに m.1624C>T の変異率が低下していた。白血球においては経時的に m.3243A>G 変異率が低下することが知られている。Olsson, t'Hart らの研究では rapid turn over によるものではないかと考察されていた (Olsson et al., *J. Hum. Genet.*, 2001; t'Hart et al., *Hum. Mutat.*, 1996)。しかし、筋細胞では turn over の説明はできず、筋細胞における heteroplasmic 変異率の経時的減少の報告はほとんどない。Zhang らは筋において経時的な m.13167A>G 変異率低下を報告しており、変異細胞の複製の遅さによるのではないかと考察していた (Zhang et al., *Hum. Mutat.*, 1998)。本例の筋においても同様の機序で m.1624C>T 変異率低下が起こっている可能性が示唆された。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 230号	学位申請者	三月田 葉子
審査委員	主査	出雲 周二	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	高嶋 博	副査 橋口 照人
	副査	久保田 龍二	副査 樋口 逸郎

### Heteroplasmic m.1624C>T mutation of the mitochondrial tRNA<sup>Val</sup> gene in a proband and his mother with repeated consciousness disturbances

(意識障害を繰り返す母子例におけるミトコンドリア tRNA<sup>Val</sup> 遺伝子上の heteroplasmic m.1624C>T 変異)

ミトコンドリア病の病因となるミトコンドリア遺伝子 (mtDNA) 上の点変異に関しては、数百種類以上に及ぶ報告がある。その中でも m.1624C>T 変異の報告は一家系列の報告のみである。その症例は同変異を全例白血球、筋肉の組織で homoplasmic に有しているが臨床表現型は多様で、母親は軽症であったがその子らの多くは胎生致死もしくは生下後数時間で死亡し、生存患児も Leigh 脳症類似の重篤な臨床症状を引き起こした。これまでに heteroplasmic に m.1624C>T 変異を持つ症例の報告はない。今回学位申請者らは成人発症で精神運動興奮を伴う一過性の意識障害を繰り返し、全 mtDNA の配列解析により m.1624C>T heteroplasmic 変異を同定した母子例を経験した。発端者は、脱抑制、知的機能低下、人格変化などの精神症状を認め、脳脊髄液では乳酸、ピルビン酸の上昇を繰り返し認めた。この症例に対して、種々の神経心理学的検査を行い、7年にわたって精神症状の経過を追った。また、母親は37歳時より精神運動興奮、幻視、幻聴やてんかん発作を伴う一過性の意識障害を繰り返し、頭部 CT 上に一過性に出現する低吸収域を繰り返し認めた。本家系における、発端者筋肉、発端者白血球、発端者母親白血球において real-time PCR を用いて同変異の heteroplasmic 定量を行い、既報の homoplasmic にもつ家系列と臨床症状を比較検討し、相違点について考察した。また、ARMS (Amplification Refractory Mutation System) 法を用いた real-time PCR 法により heteroplasmic m.1624C>T の定量を行い ARMS 法の有用性を検討した。その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) m.1624C>T 変異比率は発端者筋肉 88.8% (29歳時) > 発端者筋肉 59.7% (36歳時) > 発端者白血球 47.8% (29歳時) > 発端者白血球 34.0% (36歳) > 発端者母親白血球 17.2% で、m.1624T の変異比率は7年後に発端者白血球、発端者筋肉で共に減少していた。
- 2) 本症例では筋症状や筋病理所見が軽度で、筋症状や筋病理での異常所見が出現する m.1624C>T 変異閾値に達していない可能性が示唆された。
- 3) 今回の検討で ARMS 法を利用することで低比率の heteroplasmic 定量が可能であった。
- 4) 臨床像の比較では、胎生致死もしくは Leigh 脳症類似の重篤な臨床症状を引き起こしている homoplasmic に同変異を有する家系列に比べて、今回の heteroplasmic に変異を持つ症例は発症年齢や臨床症状において軽症例であり、heteroplasmic m.1624C>T の比率が表現型決定因子の一つであると考えられた。

本研究は、m.1624C>T 変異を heteroplasmic に持つ症例の初めての報告で、ミトコンドリア病の遺伝子変異の同定、heteroplasmic の定量、臨床症状の比較など多岐にわたる解析により、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 230 号		学位申請者	三月田 葉子
審査委員	主査	出雲 周二	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	高嶋 博	副査	橋口 照人
	副査	久保田 龍二	副査	樋口 逸郎

主査および副査の 5 名は、平成 25 年 1 月 21 日、学位申請者 三月田 葉子君に面接し、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) 筋生検の部位はどこか？

(回答) 左の上腕二頭筋である。

質問 2) 視野狭窄は半盲なのか？

(回答) 視野狭窄についての詳細は不明だが、カルテ上では半盲という記載はなかった。

質問 3) 母親では頭部 CT 上後頭葉が低吸収であるが、この所見をどの様に解釈しているか？

(回答) MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes) 様の梗塞様所見であり、血管内皮細胞の機能障害を反映していると考えている。

質問 4) 治療薬の候補はどの様に考えるか？ L-アルギニンの投与歴はあるのか？

(回答) コエンザイム Q10 の内服歴があるが、自己中断されている。L-アルギニンは投与していないが、効果を検討する価値はあると考える。

質問 5) SPECT 画像は血流量を表しているのか？小脳失調があるが、小脳の血流量は低下していないのか？

(回答) e-ZIS (eazyZ score imaging system) まで行えていないので、暖色系の色であるほど血流が豊富であるという評価になる。この画像上小脳の血流は保たれている。

質問 6) VARS2 (valyl-tRNA synthetase 2) がこの変異とどのように関わっているかと考えるのか？ VARS2 は val (valine) のミトコンドリア (mt) -tRNA の合成酵素であることから、val と mt-tRNA の結合に異常をきたし、結果としてその活性が上がっている可能性はないのか？

(回答) 先行報告における、m.1624T の変異を持つ mtDNA を挿入した cybrid cell を用いた研究によると VARS2 の発現がコントロールよりも多かった。機序は不明であるが、先行報告では、VARS2 が val と mt-tRNA との結合を補助して、homoplasmy でも臨床表現型に差異が生じている可能性が考察されていた。val と mt-tRNA が結合できず、VARS2 の活性自体が上がっているだけという見方もできる。

質問 7) SDH (Succinate dehydrogenase) 染色はしているのか？ SSV (Strongly SDH-reactive blood vessel) は認めたのか？

(回答) SDH 染色も行ったが、SSV は認めていない。

質問 8) 7 年の経過で m.1624C>T の変異率が下がっているが、m.3243A>G 変異を持つ MELAS では変異が蓄積して高齢で発症するという報告もある。この変異の場合にはどのように変異率が動いていると思うのか。

(回答) 脳生検まで行っておらず、脳と筋肉の変異率に乖離が起こっている可能性もあるが、発症年齢に達するまでは、精神症状があまり出ていない事を考えると、発症年齢まで変異が蓄積し、その後減少しているのではないかと考えられる。

## 最終試験の結果の要旨

質問 9) 変異細胞の複製の遅さにより変異率が下がる事についてもう少し詳しく説明を下さい。

(回答) Zhang らは、生後 1 時間～90 歳の患者において m.13167A>G 変異率が低下したという事実から、胎児細胞、新生児の筋肉から 90 歳の筋肉に至る間に、高齢ほど正常細胞の複製の方が変異細胞に比べて速く、結果として変異率は年齢と共に下がって行くのではないかと考察していた。本変異も同様の機序で変異率が低下したのではないかと考えた。

質問 10) 本家系では、母子二例で発症しているがその他の兄弟では臨床症状は認めていない。その理由は何が考えられるのか？

(回答) Heteroplasmy の比率が他の兄弟で低く、臨床症状として発症に至っていない可能性が考えられる。

質問 11) 新生児では変異がリセットされて homoplasmy になることがある。本症例でも細胞分裂時に heteroplasmy がリセットされて行くと考えると、白血球の方が筋肉より変異比率が低いのは白血球の早い turn over によるのではないか？

(回答) ご指摘の通り、白血球の turn over により変異比率が筋肉に比べて低いと考えている。

質問 12) 発端者の兄弟の女性は発症していないが、今後この家系での発症がなくなる可能性はあるか？

(回答) その可能性はあると考える。

質問 13) 家系内で流産はなかったのか？ ミトコンドリアの変異は胎盤機能不全とは関係しないのか？流産はミトコンドリア病で頻度は高いのか？

(回答) 本家系は流産はみられなかった。ミトコンドリア脳筋症と流産の関与は多数報告されているが、機序は明らかになっていない。

質問 14) ピルビン酸の正常範囲はどのように決めたのか？

(回答) 一般的に指定されている正常範囲を使用した。

質問 15) IQ の低下は臨床的にははっきりと判断できるものか？

(回答) 臨床的には難しいので、客観的な知能検査 Wechsler Adult Intelligence Scale (WAIS) -R、WAIS-III により評価した。

質問 16) 母親が 48 歳で脳梗塞を発症しているがその機序はどの様に考えるか？

(回答) MELAS 様の症状で、血管の平滑筋の障害により起こったのではないかと考える。

質問 17) 実験でプラスミドを使って DNA の assay calibration を行っているが wild type と mutation type はどのように構築したか？

(回答) 患者の mtDNA 上の m.1624C>T を含む前後 700bp 程に primer を設計して PCR により 1624C、1624T の配列をもつフラグメントを増幅しプラスミドに挿入してクローニングした。

質問 18) 核の tRNA 遺伝子の異常を持つ疾患は存在するのか？

(回答) 核の tRNA 遺伝子の変異をもつ疾患は非常に稀で報告も少ない。核の tRNA 合成酵素遺伝子の異常による疾患はいくつか報告があり、例えばアラニル tRNA 合成酵素の遺伝子配列異常により遺伝性運動性ニューロパチーや Charcot-Marie-Tooth 病を引き起こす報告もある。

質問 19) ミトコンドリアの val を含むタンパク合成に異常があると思うが、その点を検討した報告はあるのか？

(回答) 別の点変異において mt-tRNA<sup>val</sup> が障害され、MELAS や Leigh 脳症になった報告は多数あるが、現段階では COX 活性が低下する程度の報告しかみられていない。

質問 20) MELAS では小血管の内皮細胞の異常があるが、当該患者ではどのような異常が推測されるか？

(回答) 内皮細胞の異常の他に、前頭葉の軽度萎縮と尾状核と被殻の変化が起こっていることから神経細胞における、ミトコンドリアの異常が起こっている可能性も考えている。

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。