

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860842

研究課題名(和文)Charcot-Marie-Tooth病の病態解明：遺伝子の量的変化の関与

研究課題名(英文)Molecular diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease in Japan: quantitative alterations in the major causative genes

研究代表者

阿部 暁子 (ABE, Akiko)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10536949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Charcot-Marie-Tooth病の病態を解明するために、既知の病因遺伝子のスクリーニングを行った。さらに、病因不明の劣性軸索型CMT病の2家系を対象genome-wide SNP microarray technologyを用いた連鎖解析と次世代 sequencer を用いた遺伝子解析を行った。結果、多彩な臨床症状を呈した兄妹例でOPA1の複合ヘテロ接合変異を検出した。さらに、劣性遺伝形式をとる新規の病因遺伝子COX6A1を同定した。2家系にホモ接合変異を検出し、COX6A1変異が常染色体劣性軸索型または中間型CMT病を引き起こすことを報告した。

研究成果の概要(英文)：To determine the mechanisms of pathogenesis for Charcot-Marie-Tooth disease (CMT), we examined the genes that had already been known to be responsible for the development of CMT. In addition, we studied two families affected with autosomal-recessive (AR)-axonal CMT by a parametric linkage analysis using genome-wide SNP microarray and whole-genome analysis (WGA) using a next-generation sequencing. We detected the autosomal-dominant gene mutations as follows: 14 cases of MFN2 mutation, 1 of GARS, 5 of MPZ, 5 of GDAP1, 6 of GJB1, and 1 of PRPS1. Compound heterozygous OPA1 mutations were detected in the siblings who showed variable clinical symptoms. We also found a novel AR-causative gene, COX6A1 in two families. The homozygous COX6A1 mutation is a cause of autosomal-recessive axonal CMT or intermediate CMT. Since the causative genes have not yet been detected in most Japanese patients with CMT, WGA by using a next-generation sequencer would be useful for molecular diagnosis of CMT.

研究分野：小児科学

キーワード：Charcot-Marie-Tooth病 遺伝性ニューロパチー

1. 研究開始当初の背景

Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病は罹患者が 2500 人に 1 人と頻度が高い遺伝性ニューロパチーである。多くは学童期に発症し、緩徐進行性の遠位筋の筋力低下および筋萎縮、深部腱反射の消失、手足の変形等の症状を呈する。乳幼児期に発症する重症例や様々な合併症を有する症例、抗ガン剤投与時や糖尿病罹患時に顕在化・重症化する症例なども認められ、神経・筋疾患領域においては頻度が高く重要な疾患である。本症は、神経生理学的に髄鞘型および軸索型の 2 つに分類され、さらに最近では中間型も報告されている。

私達の教室では、国内の神経内科医、神経小児科医から依頼された多くの症例について、遺伝子診断解析を行い病因の解明を継続してきた。従来、優性遺伝を示す軸索型の CMT 病の病因と報告されていた NEFL 遺伝子の機能喪失型変異では、劣性遺伝を示す髄鞘型 CMT 病の病因となることを世界で初めて明らかにした。また、優性遺伝を示す遺伝子について、量的変化を検索する目的で、Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) 法を確立し、点変異などの検索と合わせて、2011 年に、日本人 CMT 病の網羅的解析結果をまとめて報告している。しかしながら、日本人の症例では欧米の従来の報告と異なり、約 60%の症例では病因は不明であった

2. 研究の目的

日本人 CMT 病の遺伝的背景を明らかにすること、および遺伝子型と臨床型の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 軸索型 CMT 病について

127 症例を対象として、既知の病因遺伝子: MFN2, RAB7, TRPV4, GARS, NEFL, HSP27, MPZ, GDAP1, HSP22, AARS, GJB1, PRPS1, LMNA, MED25, OPA1 について翻訳領域のエクソンおよびエクソン-イントロン移行部を PCR 法に増幅し、直接塩基配列を決定した。

Optic atrophy 1 (OPA1) 遺伝子変異を検出した家系で Real time PCR を用いて、末梢白血球での mtDNA コピー数を ND1 および ND4 領域の特異的プローブを用いて定量し、GAPDH で細胞あたりのコピー数を算出した。

(2) 髄鞘型および軸索型 CMT 病における病因不明症例について臨床型、合併症、家族歴等のデータをもとにグループ別し、遺伝子解析を行った。

病因不明の劣性軸索型 CMT 病の 2 家系を対象(図 1)とし、genome-wide SNP microarray technology (Illumina 社)を用いた連鎖解析と次世代 sequencer によるエクソーム解析をおこなった。

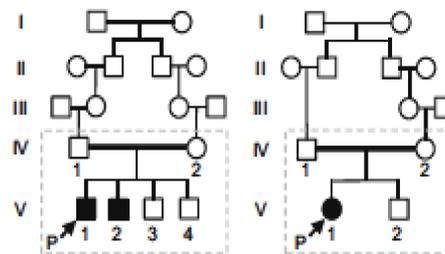


図 1. 対象の CMT 病の 2 家系

末梢白血球および EB ウイルス形質転換リンパ芽球を用いた COX6A1 の機能解析を行った。さらに Cox6a1 knockout null mice で病態を解析した。

(3) 軸索型 CMT 病の日本人における遺伝子頻度と遺伝子変異を検出した症例について、家族および健康対照を調べ、変異と罹病との関係を明らかにした。

(4) 現在までに検出した髄鞘型 CMT 病で, SBF2, SH3TC2/KIAA1985, NDRG1, FGD4, FIG4 遺伝子における新規の変異を含め、劣性遺伝形式を示す髄鞘型 CMT 病について論文発表をした。

4. 研究成果

(1) 軸索型 CMT 病について

軸索型 CMT 病の既知の病因遺伝子である MFN2 変異 14 例, GARS 変異 1 例, MPZ 変異 5 例, GDAP1 変異 5 例, GJB1 変異 6 例, PRPS1 変異 1 例, OPA1 変異 1 例に検出した。

Optic atrophy 1 (OPA1) 変異は兄妹例で検出し、c.716A>G (p.Glu239Gly) / c.908G>A (p.Ser303Asn) の複合ヘテロ接合変異であった。前者は母由来、後者は父由来であった。

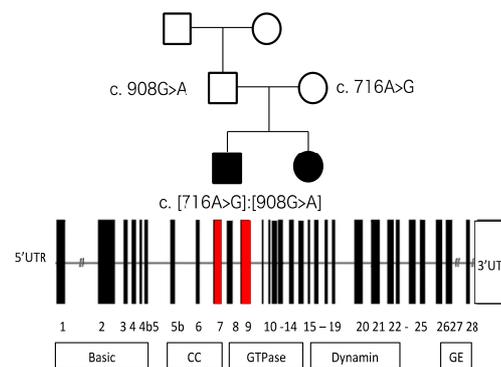


図 2. OPA1 変異症例

これらの変異は、種を超え保存されているアミノ酸残基の変異をもたらすことが予測された。また、Real time PCR を用いて、リンパ球中の MtDNA 量を核 DNA 量と比較定量したが、対照と有意差を認めなかった。(表 1)

表1. OPA1変異症例におけるmtDNAコピー数

	ND1 (mean±SD)	ND4 (mean±SD)
正常対照10例	274.4±9.3	299.7±8.0
患児 (兄)	270.9	304.6
患児 (妹)	275.0	307.1
父	267.3	307.2
母	277.1	307.4

(単位: copies/cell)

兄妹ともに、視神経萎縮症、難聴、末梢神経障害、遠位尿細管性アシドーシス、発育不良を呈し、妹には性腺機能不全を認めた。兄は6歳時の神経生検で病理学的にCMT病が考えられた。父方祖父に難聴・糖尿病、父に糖尿病を認め、自覚症状はないものの眼科的に視神経症が確認されている。

OPA1はミトコンドリア内膜の融合蛋白であり、その遺伝子変異は常染色体優性遺伝視神経萎縮症(ADOA)の原因の一つである。OPA1異常症の約20%に神経筋症状が合併すること、またsemidominantである症例の報告もある。本兄妹例では、複合ヘテロ接合変異により多臓器が大きく障害され、多彩な症状を呈しているものと考えられた。

(2) 髄鞘型および軸索型CMT病における病因不明症例の解析

cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1 遺伝子(COX6A1)のエクソン3に隣接するイントロン2のスプライシング領域において、5塩基の欠失(c.247_10_247_6delCACTC)を検出した。(図3)

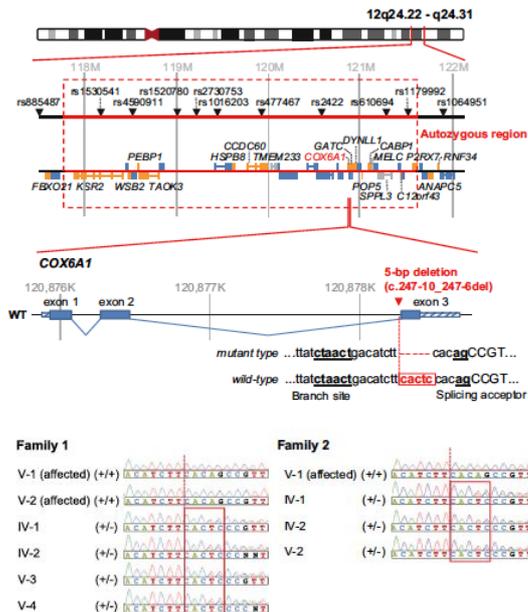


図3. 遺伝子検索結果

末梢白血球およびEBウイルス形質転換リンパ芽球を用いたCOX6A1の機能解析により、mitochondrial respiratory complex IV(cytochrome c oxidase [COX])活性が有意に低下していたさらに、Cox6a1欠損マウスではCOX活性低下により神経原性筋萎縮症を引き起こし、歩行困難につながることを示した。Cox6a1欠損マウスでのCOX活性とATP

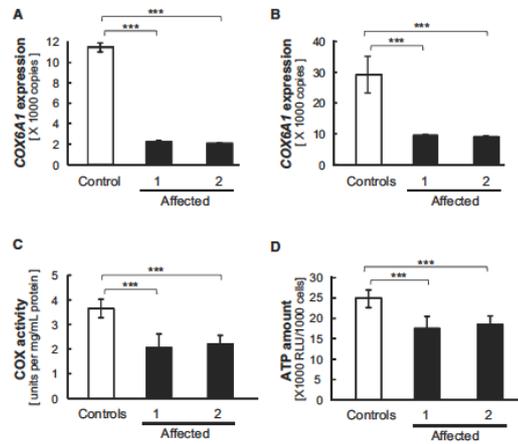


図4. COX6A1の機能解析

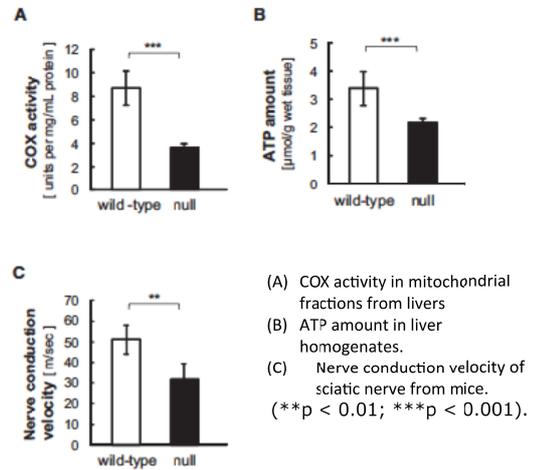


図5. Cox6a1欠損マウスにおけるCOX活性とATP量の低下、神経伝導速度

量の低下、神経伝導速度にも変化をみとめる結果がえられた。(図4, 5)

COX6A1は骨格筋以外のほとんどの臓器で発現しているにもかかわらず、遺伝子変異により末梢神経症状のみをきたすのは、COX6A1は骨格筋以外のほとんどの臓器で発現しているにもかかわらず、遺伝子変異により末梢神経症状のみをきたすのは、組織特異性のためと考えられる。COX6A1がホロ酵素の安定性のために必要小さなポリペプチドであり、機能が限局すること、また、他の臓器ではCOX6A1の基礎活性でCOX活性を維持している、もしくはCOX6A2により補償されて可能性、末梢神経のミトコンドリアにおけるCOXの安定に干渉している可能性が考えられた。

(3) 以上の検索結果より日本人における軸索型CMT病における遺伝子変異頻度を表2示す。軸索型CMT病では75.5%の症例で病因が不明である。

(4) 日本人髄鞘型CMT病頻度を表3に示す。劣性遺伝形式をとる病因遺伝子を網羅的に検索した結果、CMT4は12例(髄鞘型CMT病の5.5%)であった。

表2. 軸索型CMT病の遺伝子頻度

		Our data	%
CMT2A	MFN2	14	11.0
CMT2B	RAB7	0	0.8
CMT2C	TRPV4	0	
CMT2D	GARS	1	0.8
CMT2E	NEFL	0	
CMT2F	HSP27	0	
CMT2I	MPZ	5	3.9
CMT2K	GDAP1	1	0.8
CMT2L	HSP22	0	
CMT2N	AARS	0	
CMTX	GJB1	6	4.7
CMTX5	PRPS1	1	0.8
ARCMT2B1	LMNA	0	
ARCMT2B2	MED25	0	
	OPA1	1	0.8
CMT RID	COX6A1	2	1.5
unknown		96	75.5
total		127	

表3. 髄鞘型CMT病の遺伝子頻度

		Our data	%
CMT1	5genes ^{a)}	40	18.0
CMT1A	PMP22	53	24.1
CMTX	GJB1	19	8.6
CMT4A	GDAP1	1	0.5
CMT4B1	MTMR2	1	0.5
CMT4B2	SBF2	0	0
CMT4C	SH3TC2	2	0.9
CMT4D	NDRG1	0	0
CMT4E	EGR2	0	0
CMT4F	PRX	5	2.3
CMT4H	FGD4	3	1.4
CMT4J	FIG4	0	0
unknown		96	43.6
total		220	

a) 5 genes: PMP22, MPZ, LITAF, EGR2 and NEFL

臨床症状は早期発症，緩徐進行性であり，検出された変異は フレームシフト変異が多く，loss of functionとして作用することが示唆され，両者の関連がうかがわれた．

日本人における CMT 病では、未だ多くの症例について病因遺伝子が特定されておらず、今後スクリーニング法の改善をはかるとともに、既知および候補遺伝子検索を継続していく必要がある．

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1) Tamiya G, Makino S, Hayashi M, Abe A, Numakura C, Ueki M, Tanaka A, Ito C, Toshimori K, Ogawa N, Terashima T, Maegawa H, Yanagisawa D, Tooyama I, Tada M, Onodera O, Hayasaka K.

A mutation of COX6A1 causes a recessive

axonal or mixed form of Charcot-Marie-Tooth disease.

Am J Hum Genet. 査読有, 2014;95:294-300. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.07.013.

2) 村上龍文, 久徳弓子, 西村広健, 林真貴子, 阿部 暁子, 早坂清, 砂田芳秀: Charcot-Marie-Tooth 病 type 4B1 と myelin outfoldings . 末梢神経 . 査読有, 2014;25(1):52-58 .

3) Murakami T, Kutoku Y, Nishimura H, Hayashi M, Abe A, Hayasaka K, Sunada Y. Mild phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease type 4B1. J Neurol Sci. 査読有, 2013 Nov 15;334:176-9. doi: 10.1016/j.jns.2013.08.001.

4) Hayashi M, Abe A, Murakami T, Yamao S, Arai H, Hattori H, Iai M, Watanabe K, Oka N, Chida K, Kishikawa Y, Hayasaka K. Molecular analysis of the genes causing recessive demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. J Hum Genet. 査読有, 2013 May;58:273-8. doi: 10.1038/jhg.2013.15.

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 早坂清, 田宮元, 牧野悟士, 沼倉周彦, 林真貴子, 阿部暁子, 植木優夫, 田中敦, 他田正義, 小野寺理: 劣性軸索型および混合型 Charcot-Marie-Tooth 病における新規病因遺伝子 COX6A1 の同定. 第 57 回日本先天代謝異常学会, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)2015 年 11 月 14 日

2) 林真貴子, 阿部暁子, 早坂清: 劣性遺伝性髄鞘型 Charcot-Marie-Tooth 病(CMT4)の遺伝子型と表現型について. 第 55 回日本小児神経学会学術集会, iichiko 総合文化センター (大分県大分市) 2013 年 5 月 31 日

〔図書〕(計 1 件)

早坂清, 阿部暁子: Myelin Protein Zero (P0 タンパク) 遺伝子異常. CMT 診療マニュアル編集委員会 編, シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル 改定 2 版. 京都府; 金芳堂, 2015 年: 42-45

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 暁子 (ABE, Akiko)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 10536949