

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07606

研究課題名(和文) 神経有棘赤血球症の共通分子病態の解析

研究課題名(英文) Analysis of common molecular pathogenesis in Neuroacanthocytosis

研究代表者

中村 雅之 (NAKAMURA, Masayuki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：90332832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経有棘赤血球症は、神経症候と有棘赤血球症を併せ持つ病態に対して用いられる。その中核群の代表疾患が有棘赤血球舞蹈病(ChAc)とMcLeod症候群(MLS)である。ChAcはVPS13A遺伝子の機能喪失変異が病因であり、遺伝子産物choreinが欠損する。MLSはX染色体上のXK遺伝子の機能喪失変異が病因であり、XK蛋白質が欠損する。6例のMLSの赤血球膜分画において全例choreinの発現が低下しており、培養細胞ではXK蛋白質とchoreinの相互作用が示唆され、choreinの細胞骨格系相互作用とミトコンドリアの品質保持機構の破綻が共通分子病態であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経有棘赤血球症の代表疾患である有棘赤血球舞蹈病とMcLeod症候群は臨床症状が酷似しており、両疾患ともにハンチントン病類似の精神神経症状と末梢血赤血球に有棘赤血球症を呈し、共通する分子病態の存在が示唆される。これら疾患の共通分子病態を明らかにすることによって、両疾患に共通する治療法の開発の足掛かりとなり、両疾患は高率に精神症状を来すことから、精神疾患の病態解明や治療法開発の一助にもなる。

研究成果の概要(英文)：Neuroacanthocytosis (NA) is used to describe a condition that combines neurological symptoms and acanthocytosis. The core group of NA is represented by chorea-acanthocytosis (ChAc) and McLeod syndrome (MLS). ChAc is caused by a loss-of-function mutation in the VPS13A gene, resulting in loss of the gene product chorein, and MLS is caused by a loss-of-function mutation in the XK gene on the X chromosome, resulting in loss of the XK protein. In all six MLS cases, chorein expression was decreased in the erythrocyte membrane fraction, and the interaction between XK protein and chorein was indicated in cultured cells, suggesting that disruption of the cytoskeletal interaction and the mitochondrial quality maintenance mechanism of chorein are common molecular pathogenesis of NA.

研究分野：精神神経科学

キーワード：神経有棘赤血球症 有棘赤血球舞蹈病 McLeod症候群 chorein VPS13A XK XK蛋白質

1. 研究開始当初の背景

神経有棘赤血球症 (Neuroacanthocytosis; NA) は神経症候と有棘赤血球症を併せ持つ病態に対する包括的用語である。この疾患の中核群の殆どは有棘赤血球舞蹈病 (Chorea-acanthocytosis; ChAc) と McLeod 症候群 (McLeod syndrome; MLS) で占められ、両疾患共に Huntington 病類似の精神神経症状を呈する。私たちは ChAc の原因遺伝子 *VPS13A* を同定し、遺伝子産物を chorein と命名した。MLS の原因遺伝子は *XK* であり、遺伝子産物は XK 蛋白質である。両疾患とも、末梢血に有棘赤血球症を来し、脳神経系では尾状核の萎縮を伴い、舞蹈運動などの不随意運動を呈し、てんかんや統合失調症類似の多彩な精神神経症状を呈する事が多いなどと、臨床症状は極めて類似しており、分子的診断を行わない限り鑑別は困難である。また、両疾患とも遺伝子産物の機能喪失性の変異が原因であるが、それぞれの病変遺伝子は全く異なっており、機能相関は明らかでなかった。ChAc は世界で 1000 例程と考えられており、日本からの報告が多く、比較的日本人に多い疾患と考えられている。私たちは日本人症例のみならず国際的な臨床例および剖検例の分子遺伝学的側面からの研究を加えた報告を行ってきた。私たちが行った研究で、chorein 蛋白質の機能としては、脳などの臓器に発現が豊富であること、GABA 受容体関連蛋白質との関連発現やドパミン神経分泌機構への関わること、 β -adducin と β -actin、 α -tubulin などの細胞骨格系蛋白質と相互作用し、オートファジーと関連することを解析してきた。また、chorein が欠損する ChAc モデルマウスが静精子無力症による雄性不妊を呈し、精子のミトコンドリアには超微細構造異常を認めた。MLS は世界で 100 例ほどの報告しかない非常に稀な疾患であるが、今回私たちは 6 例の MLS について分子的診断と赤血球膜における chorein と XK 蛋白質解析を行う機会を得た。

2. 研究の目的

6 例の MLS 疑い症例に対する分子的診断を行い、赤血球膜における chorein のタンパク質レベルでの発現解析を行う。また、chorein-XK の相互作用について赤血球膜、培養細胞を用いて解析する。

3. 研究の方法

研究材料

MLS の 6 例と平均年齢を合わせた健常男性 6 例、ChAc の男性患者 6 例、さらにヘテロ接合性に *VPS13A* 遺伝子変異を持つ ChAc 保因者 6 例について解析を行った。MLS 症例 1 例と健常 1 例由来のリンパ芽球様細胞株をそれぞれ作成し、ウエスタンブロット解析に使用した。K562 細胞と chorein 安定過剰発現 HEK293 細胞を、免疫沈降法による相互作用解析に用いた。

遺伝子解析

MLS の 6 例の白血球から gDNA を抽出、もしくは mRNA を抽出し cDNA を合成して、*XK* 遺伝子と *VPS13A* 遺伝子の coding 領域をサンガー法で解析した。MLS の 1 例では、*XK* 遺伝子の Gross deletion mutation が疑われ、全ゲノムシーケンスの結果をもとに、deletion 領域の long-range PCR とサンガーシーケンスを行い、breakpoint の同定を行った。

ウエスタンブロット解析

MLS 6 例、ChAc 6 例、VPS13A 遺伝子変異保因者 6 例、健常 control 6 例の赤血球膜タンパク分画を分離した。抽出した赤血球膜タンパク質を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、抗 XK 抗体、抗 chorein 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。また、MLS 症例 1 例と健常 1 例由来のリンパ芽球様細胞を作成し、その細胞から抽出したタンパク質に関して、同様にウエスタンブロット解析を行った。

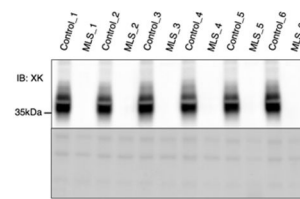
免疫沈降法

K562 細胞と chorein 安定発現 HEK293 細胞からタンパク抽出し、XK タンパクと chorein の相互作用の有無について、それぞれ免疫沈降法を用いて調べた。

4. 研究成果

MLS が疑われた 6 症例全てにおいて、赤血球膜分画のウエスタンブロット解析で XK 蛋白質の免疫反応が欠如していた(図 1)。さらに、遺伝子変異解析で MLS 6 症例の XK 遺伝子変異を同定し分子的に MLS と診断した。そのうち 2 例は新規変異であった。1 症例においては、exon 3 を含んだ gross deletion と、deletion 領域に含まれる intron 2 の 382 bp の配列が逆相補的に insertion されている変異であることが判明し、それらの breakpoint を同定した (c.509-636_c.*3667+670 delins c.509-619_-238inv)。MLS 6 症例の臨床表現型について、ChAc 症例と比較すると、平均発症年齢が約 13 年遅く、病状の進行もより緩徐であった(図 2)。

図1 赤血球膜 XKウエスタンブロット解析



Urata et al. Neurology, Genetics 2019

図2 MLS 6例の遺伝子変異と表現型

| McLeod | Case 1 | Case 2 | Case 3 | Case 4 | Case 5 | Case 6 |
|-----------------|--------------------------------------|-------------------|-----------------|----------------------|------------------|---|
| XK 遺伝子変異 | c.669_673delTGTAG insGGTCCCTTTACC | c.1013delT | c.451dupC | c.370C>T | c.397C>T | c.509-636_c.*3667+670 delins c.509-619_-238inv (Gross deletion including exon3) |
| アミノ酸置換 | p.V225Lfs*12 | p.F3385fs*70 | p.Q151Pfs*47 | p.Q124* | p.R133* | Unknown |
| 発症年齢 | 47歳 | 53歳 | 43歳 | 33歳 | 50歳 | 55歳 |
| 初発症状 | 筋力低下 | 不随意運動 歩行困難 | 筋力低下 | 「見当はずれ」 (不随意運動) | 不随意運動 眩暈 | 不随意運動 |
| 精神症状 | 不眠 | 脱服 | 被害妄想 疑心性 | 集中力低下、不安 被害妄想、抑うつ | 多弁、不眠 高次知覚障害 | ? |
| 最終診断までの年齢 | 17年 | 8年 | 26年 | 23年 | 12年 | 15年 |
| CK (IU/L) 総値 | 5465 | ? | 920 | 821 | 2422 | 1052 |
| 運動症状 | 舞踏運動、歩行障害 口唇ジスキネジア | 舞踏運動、歩行障害 立位行動 | 自覚症、歩行障害 踵下垂 | 舞踏運動 口唇ジスキネジア | チック、舞踏運動 歩行障害 | 口唇ジスキネジア、四肢chorea、 歩行障害 |
| 前駆症状 | 肩甲骨痛 大脳皮質萎縮 | 肩甲骨痛 脳萎縮 | ? | 肩甲骨痛 脳萎縮 | ? | 慢性炎症性変化 びまん性脳萎縮 |
| 検査 | Intermittent theta waveあり | ? | ? | 3-4Hz律動あり | ? | ? |

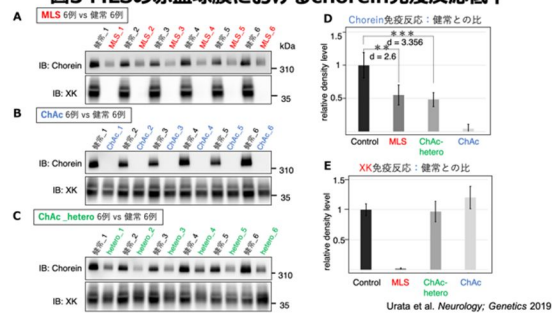
Urata et al. Neurology, Genetics 2019

MLS 6 症例において、ウエスタンブロット解析で、赤血球膜タンパクの chorein 免疫反応が健常と比較して有意に低下していることを見出した(図 3AD)。MLS 全例で VPS13A 遺伝子変異を認めないにも関わらず、MLS 症例の赤血球膜 chorein の減少は、VPS13A 遺伝子変異保因者における chorein 減少と同等であった(図 3CD)。

一方、赤血球膜タンパクの XK 免疫反応は、健常、ChAc、VPS13A 遺伝子変異保因者において差はなかった(図 3BCE)。MLS 症例 1 例と健常 1 例由来のリンパ芽球様細胞から抽出したタンパク質を用いたイムノブロット解析では、MLS 症例と健常で chorein 免疫反応に差はなく、XK タンパク質のバンドは認めなかった。

慢性骨髄性白血病細胞由来の K562 細胞から抽出したタンパク質で、抗 XK 抗体を用いて免疫沈降を行い、XK タンパクと chorein の共沈を確認した。続いて、chorein 安定発現 HEK293 細胞から抽出したタンパク質で、抗 XK 抗体と抗 chorein 抗体を用いて同様に免疫沈降を行い、それぞれ双方向に chorein と XK タンパクの相互作用を確認した。

図3 MLSの赤血球膜におけるchorein免疫反応低下



Urata et al. Neurology, Genetics 2019

MLSの赤血球膜 chorein レベルの低下は、*VPS13A* 遺伝子変異保因者における chorein レベルと同等であり、*VPS13A* 遺伝子変異保因者は、有棘赤血球症や舞踏運動、精神神経症状などを部分的に呈する場合がある。これらから chorein レベルの低下もしくは局在の変化がMLSの分子病態に深く関与している可能性が示唆された。また、培養細胞において、chorein-XK タンパク相互作用を免疫沈降法によって確認し、ChAc とMLSの共通する症候に関して、タンパク相互作用を介した共通する分子病態の関連が示唆された。さらに、chorein を強制発現させた細胞ではミトコンドリア膜電位消失刺激による細胞死が抑制され、chorein がミトコンドリアに集積することを発見しており、chorein がミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーと関与する可能性を示唆する予備的研究結果を得ており、XK 蛋白質は chorein の局在や安定性に関与しており、ChAc とMLSの共通分子病態に chorein の局在変化や発現低下による細胞骨格系との相互作用の破綻やミトコンドリア品質保持機構の破綻などが共通分子機構として関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Urata Y, Nakamura M, Sasaki N, Shiokawa N, Nishida Y, Arai K, Hiwatashi H, Izumi Yokoyama I, Narumi S, Terayama Y, Murakami T, Ugawa Y, Sakamoto H, Kaneko S, Nakazawa Y, Yamasaki R, Sadashima S, Sakai T, Arai H, Sano A | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Novel pathogenic XK mutations in McLeod syndrome and interaction between XK protein and chorein. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Neurol. Genet. | 6. 最初と最後の頁 e328 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXG.0000000000000328. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Nishida Y, Nakamura M, Urata Y, Kasamo K, Hiwatashi H, Yokoyama I, Mizobuchi M, Sakurai K, Osaki Y, Morita Y, Watanabe M, Yoshida K, Yamane K, Miyakoshi N, Ryouichi Okiyama R, Ueda T, Wakasugi N, Saitoh Y, . . . , Sano A | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Novel pathogenic VPS13A gene mutations in Japanese patients with chorea-acanthocytosis. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Neurol. Genet. | 6. 最初と最後の頁 e332 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/NXG.0000000000000332. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Suzuki F, Sato N, Ota M, Sugiyama A, Shigeyamay, Morimoto E, Kimura Y, Wakasugi N, Takahashi Y, Futamura A, Kawamura M, Ono K, Nakamura M, Sano A, Watanabe Masako, Mathuda H, Abe O | 4. 巻 408 |
| 2. 論文標題 Discriminating chorea-acanthocytosis from Huntington's disease with single-case voxel-based morphometry analysis. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J. Neurol. Sci. | 6. 最初と最後の頁 116545 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2019.116545. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Murakami T, Abe D, Matsumoto H, Tokimura R, Abe M, Tiksnadi A, Kobayashi S, Kaneko C, Urata Y, Nakamura M, Sano A, Ugawa Y | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 A patient with McLeod syndrome showing involvement of the central sensorimotor tracts for the legs. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 BMC Neurol | 6. 最初と最後の頁 301 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12883-019-1526-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Futamura A, Nakamura M, Kawamura M Sano A, Ono K | 4. 巻 68 |
| 2. 論文標題 Novel VPS13A gene mutations in a South Asian, Indian patient with chorea-acanthocytosis. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Neurol. India | 6. 最初と最後の頁 206-208 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/0028-3886.279653. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Tada Y, Hamaguchi T, Ikeda Y, Iwasa K, Nishida Y, Nakamura M, Sano A, Yamada M | 4. 巻 412 |
| 2. 論文標題 Chorea-acanthocytosis with a novel mutation in the vacuolar protein sorting 13 homolog a gene: A case report. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 J. Neurol. Sci. | 6. 最初と最後の頁 116731 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2020.116731. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---------------------------------------|---------------------|
| 1. 著者名 中村雅之 | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 神経有棘赤血球症の遺伝子変異と分子病態 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 MDSJ Letters | 6. 最初と最後の頁 57-60 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 中村雅之、佐野 輝 | 4. 巻 48 |
| 2. 論文標題 精神症状を伴う神経変性疾患 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 臨床精神医学 | 6. 最初と最後の頁 75-81 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Urata Y, Nakamura M, Hiwatashi H, Yokoyama I, Meguro K, Sano A |
| 2. 発表標題 Molecular diagnosis and symptoms of the six cases of McLeod syndrome. |
| 3. 学会等名 WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Nishida Y, Nakamura M, Sano A |
| 2. 発表標題 Novel pathogenic mutations in the VPS13A gene in Japanese patients with Chorea-acanthocytosis and clinical diversities. |
| 3. 学会等名 WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 中村雅之、佐野 輝 | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 南江堂 | 5. 総ページ数 13 |
| 3. 書名 有棘赤血球舞蹈病、神経変性疾患ハンドブッカー神経難病へのエキスパートアプローチ | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

| | |
|---|--------------------|
| 国際研究集会 10th International Meeting on Neuroacanthocytosis Syndromes | 開催年 2021年～2021年 |
|---|--------------------|

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|