

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591365

研究課題名（和文） 精神神経疾患におけるミトコンドリア遺伝子異常の解析

研究課題名（英文） Identification of mitochondrial DNA mutations in patients exhibiting neuropsychiatric symptoms

研究代表者

中村 雅之（NAKAMURA MASAYUKI）

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：90332832

研究成果の概要:幻覚や妄想もしくは気分の落ち込みや興味関心の喪失などの精神症状を呈し、手足の筋力低下やまぶたが下がってくるなどの筋症状を有する患者に遭遇した。このような筋症状はミトコンドリア異常を示唆するものであり、ミトコンドリア遺伝子解析を行った。その結果、これらの患者にはミトコンドリア遺伝子の一部が欠落する変異が存在することが解り、統合失調症やうつなどの精神疾患とミトコンドリア機能異常の関連が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：精神神経医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：統合失調症、気分障害、認知症、ミトコンドリア遺伝子

1. 研究開始当初の背景

統合失調症や気分障害をはじめとする精神疾患は遺伝的要因と環境的要因が複雑に絡みあう多因子遺伝の複雑な疾患であると言われている。精神疾患の診断には生物学的分子マーカーは存在せず、その診断は問診によってなされている。現在、国際的に使用されている「ICD-10 精神と行動の障害」や「DSM-IVTR 精神疾患の分類と診断の手引き」による診断基準では症候論的段階の「障害(disorders)」の段階にあるため生物学的に異種の「疾患(diseases)」が混在すると考えられている(中村ら 精神医学 47, 348-358, 2005)(中村ら 分子細胞治療 4, 60-66,

2005)。従って精神疾患の病因を検討する際には研究対象の規定が極めて重要であると考えられる。今回我々は精神症状に加えミトコンドリア機能異常を伴うと考えられるものを研究対象とし、それを手がかりとして精神疾患の病因解析を行うこととした。最近我々は統合失調症の診断のもと治療をうけていたが、経過中、クレアチンキナーゼの上昇にともなう筋力低下をきたし、筋生検からミトコンドリア病の診断がなされた症例に遭遇した。また、うつ病の診断のもと抗うつ薬を中心とした治療の経過中に、外眼筋麻痺や運動負荷後の筋力低下を来たしミトコンドリア障害が強く疑われる症例にも遭遇

した。ミトコンドリアはエネルギー産生の主要な場であり、その障害により脳や筋肉といったエネルギー受容の高い臓器が侵されることが知られている。ミトコンドリア障害と精神神経疾患との関連は以前から指摘されてはいるものの、いまだ明らかにされていない。今回我々は、これら患者のミトコンドリア遺伝子変異検索を行うとともに、ミトコンドリア遺伝子変異関連核性遺伝子の変異解析を行った。

また、ハンチントン病やパーキンソン病などの神経変性疾患においてはその病態とミトコンドリア障害との関連があるといわれている。最近、パーキンソン病および加齢と脳組織（黒質）におけるミトコンドリア欠失変異との関連が明らかにされた。我々はヒト疾患遺伝子変異を導入した有棘赤血球舞踏病（ChAc）モデルマウスを作成し、ヒト ChAc 類似の線条体を中心とした神経変性を来すことを明らかにした（*J Neurochem.* 92, 759-766, 2005）。我々は ChAc のような遺伝性神経変性疾患においてもその変性部位においてミトコンドリア遺伝子異常が引き起こされ、その障害によって神経変性に至る可能性を考えており、今回、ChAc モデルマウス線条体におけるミトコンドリア遺伝子欠失変異の有無について検索を行うこととした。

2. 研究の目的

統合失調症、認知症およびうつ病などの精神症状を前景とし、ミトコンドリア障害を伴うと考えられる症例について筋および白血球由来のミトコンドリア遺伝子変異解析を行い、変異を明らかとする。また、多重欠失などのミトコンドリア遺伝子異常が認められた場合、*POLG* などその変異がミトコンドリア遺伝子変異を引き起こすといわれている核性遺伝子群についても遺伝子変異解析を行い、ミトコンドリア遺伝子異常の原因を明らかにする。得られた変異の中で白血球由来ミトコンドリア遺伝子変異については、各疾患における頻度をコントロールと比較し、疾患関連を解析し、精神疾患とミトコンドリア異常の関連の有無を明らかにする。

また、有棘赤血球舞踏病モデルマウスを用いて、神経変性部位とミトコンドリア欠失変異の関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 症例報告

統合失調症および認知症症状を前景とし、ミトコンドリア障害が疑われた 1 症例および、うつ症状を呈し、ミトコンドリア障害が疑われた 2 症例に遭遇し、筋および白血球由来のミトコンドリア遺伝子解析および核性遺伝子のリ・シークエンシング解析とコピー数解析の対象とした。各症例の臨床経過について

以下に示す。

① 症例 1

69 歳男性。両親がいとこ婚。生来、易疲労感を呈していた。22 歳頃から幻聴、被害妄想、粗暴行為を認め、統合失調症として精神科病院に入退院を繰り返した。65 歳時、CK 上昇を伴う筋力低下を認め、ミトコンドリア脳筋症が疑われた。69 歳時に行った Mini mental state examination において見当識障害、記憶力障害、計算障害、構成障害などを認め、MRI ではびまん性大脳皮質の萎縮と側脳室下角拡大を認めた。筋生検では、筋線維の大小不同を認め（図 1 ABC）、Gomori トリクローム変法による染色では筋組織内に Ragged red fibers (RRFs)（図 1A）を認めた。また、cytochrome c oxidase (CCO) 染色では CCO 部分欠損（図 1B）を認めた。NADH-TR 染色ではタイプ I 線維の酸化酵素活性の著明な低下を認めた（図 1C）。

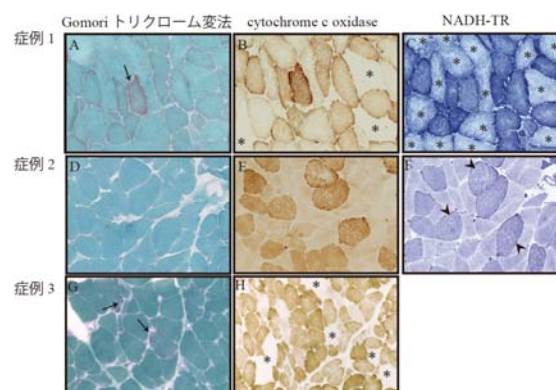
② 症例 2

76 歳男性。21 歳頃から不眠、易疲労感を認めた。74 歳時に抑うつ気分、興味関心の喪失、思考制止などのため精神科病院に入院した。うつ症状増悪時に眼瞼下垂を認め、血清乳酸値・ピルビン酸値の上昇を伴っており、ミトコンドリア脳筋症が疑われた。筋生検では RRFs は認めなかったが（図 1D）、筋線維の大小不同を認め（図 1DEF）、NADH-TR 染色では酸化酵素活性低下を示す multiple-essentric core 様の病変を認めた（図 1F）。

③ 症例 3

43 歳男性。両親がいとこ婚。16 歳から進行性の難聴を認めた。抑うつ気分、不安、心氣的訴えが強まり、血清乳酸・ピルビン酸高値となり、難聴に加え、眼瞼下垂、外眼筋麻痺、筋力低下、網膜色素変性、両側性腺萎縮などを呈した。頭部 MRI T2 強調画像では大脳深部白質にびまん性高信号領域を認めた。筋生検では筋線維の大小不同、Gomori トリクローム染色において RRFs（図 1G）、CCO 染色では CCO 部分欠損を認めた（図 1H）。

【図 1】 症例 1-3 の筋病理



(2) 遺伝子解析

遺伝子解析は、鹿児島大学医学部遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得ており、インホームドコンセントを得た上でやっている。

症例 1-3 については白血球および筋肉から遺伝子 DNA を抽出し、ミトコンドリア遺伝子全配列について直接シーケンシングを行い、点変異などの有無について解析した。また、ミトコンドリア遺伝子のほぼ全長をカバーする領域について PCR サザンプロット法を用いてミトコンドリア遺伝子上の欠失変異の有無を解析した。症例 1 については白血球由来のミトコンドリア遺伝子に変異が認められたため 86 名の統合失調症と 122 名の健常者についても同変異の検索を行った。症例 1-3 については、さらに、遺伝子変異がミトコンドリア遺伝子変異を引き起こすといわれている核性遺伝子、*POLG*、*POLG2*、*C10orf2*、*SLC25A4*、*ECGF1*、*OPAL*、*WFS1* の各遺伝子翻訳領域上流 1kb を含んだ全エクソンについてリ・シーケンシングを行い遺伝子変異を検索した。また、TaqMan Probe を用いて、各核性遺伝子についてコピー数変異解析を行った。

(3) マウス線条体由来ミトコンドリア遺伝子解析

有棘赤血球舞蹈病モデルマウスおよび野生型マウスの線条体から抽出した遺伝子 DNA を用いて、PCR サザンプロット解析を行い、同部位のミトコンドリア遺伝子欠失変異を検索した。

尚、マウスの解析に関しては鹿児島大学動物実験委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア遺伝子のシーケンシング解析結果

症例 2 と 3 には新規多型や病因と考えられる変異は認めなかった。症例 1 に関しては以下の変異を認めた (図 2)。

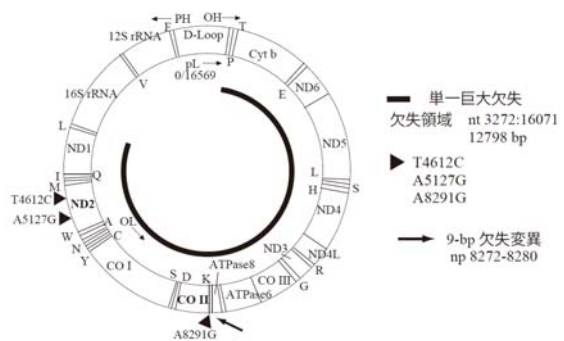
① np5127 における homoplasmic A to G 変異
症例 1 に homoplasmic A5127G 新規変異を認めた。この変異は NADH-dehydrogenase subunit 2 をコードする *ND-2* 遺伝子の翻訳領域に存在し、アスパラギンからアスパラギン酸へのアミノ酸置換を伴うものであった。しかし、この変異は 86 名の統合失調症患者には見出せず、健常者 122 名中 1 名 (0.8%) に homoplasmic に認めており、疾患特異的な変異とは言えなかった。

② np8291 における homoplasmic A to G 変異
np8272-8280 における homoplasmic 9 bp 欠失変異

Hirata らにより肢帯型筋ジストロフィーを

呈するミトコンドリア障害との関連が報告された np8272-8280 の homoplasmic 9 bp 欠失変異を伴う homoplasmic A8291G 変異を症例 1 に認めた。homoplasmic 9 bp 欠失変異を伴う homoplasmic A8291G 変異は統合失調症 86 名には認めなかったが、健常者 122 名中 1 名 (0.8%) に認めた。このことから、この変異は疾患特異的とは言えなかった。さらに Hirata らの報告にある ND-2 遺伝子上にメチオニンからトレオニンへのアミノ酸置換を伴う T4612C 変異を homoplasmic に認めたが健常者 122 名中 1 名 (0.8%) にも homoplasmic に同変異を有しており病的意義は不明である。また、以上の 3 変異を同一健常者に認めており、これら変異は稀な多型であるか、正確な診断には筋生検を要すが、この健常者が潜在的にミトコンドリア異常を伴う可能性が示唆された。尚、homoplasmic 9 bp 欠失変異は健常者 122 名中 16 名 (13.1%) に認めており、Hirata らの報告同様に、単独の homoplasmic 9 bp 欠失変異は通常多型であることが示された。

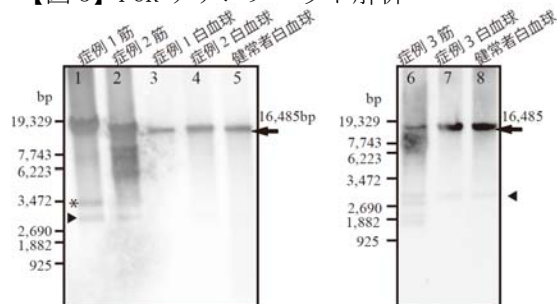
【図 2】 症例 1 のミトコンドリア遺伝子変異



(2) PCR サザンプロット解析結果

症例 1 において筋由来ミトコンドリア遺伝子に heteroplasmic 単一巨大欠失を認めた (図 2、図 3 lane 1*)。引き続き行った欠失断片に対するシーケンシング解析でこの欠失領域は np3272 から np16071 に渡る 12798 bp の欠失であることが明らかとなった。一方で白血球由来ミトコンドリア遺伝子には欠失変異は認めなかった (図 3 lane 4)。症例 2 と 3 においては、筋由来ミトコンドリア遺伝子に多重欠失を認め (それぞれ、図 3 lane 2, 6)、白血球由来ミトコンドリア遺伝子には欠失変異を認めなかった (図 3 lane 4, 7)。

【図 3】 PCR サザンプロット解析



▶、◀は非特異的バンド

(3) ミトコンドリア遺伝子異常を引き起こす核性遺伝子変異解析結果
ミトコンドリア遺伝子欠失変異を引き起こすことが知られている *POLG*, *POLG2*, *C10orf2*, *SLC25A4*, *ECGF1*, *OPAL*, *WFS1* の 7 遺伝子について症例 1 から 3 の遺伝子 DNA を用いてリ・シーケンシング解析を行ったところ、病因変異は見出せなかった。症例 3 と健常者 244 アレル中 1 アレルにおいて *SLC25A4* 上に新規多型 A587C を認めた。また、症例 1 から 3 の遺伝子 DNA を用いて CNV 解析を行ったがいずれの遺伝子にも CNV は認めなかった。

(4) 有棘赤血球舞踏病モデルマウス線条体ミトコンドリア欠失変異解析結果
有棘赤血球舞踏病モデルマウスの線条体由来のミトコンドリア遺伝子に明らかな欠失変異は認めなかった。

(5) まとめ
主症状として統合失調症や気分障害として加療されていたが、経過中に筋力低下や眼瞼下垂などミトコンドリア異常が原因と考えられる 3 症例に遭遇し、ミトコンドリア遺伝子解析を行った。その結果、これらの症例は筋由来ミトコンドリア遺伝子に heteroplasmic に単一巨大欠失変異もしくは多重欠失変異をもつことが明らかとなった。ミトコンドリア遺伝子に欠失変異を引き起こすことが報告されている核性遺伝子の変異は見出せなかったが、筋症状を伴い精神症状を呈するものの中にはミトコンドリア異常が病因となっているものが存在する可能性が示唆された。
また、有棘赤血球舞踏病モデルマウスの神経変性部位とミトコンドリア遺伝子欠失変異との関連は見出せなかった。

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 2 件)

① Kageyama, Y., Matsumoto, K., Ichikawa, K., Ueno, S., Ichiba, M., Nakamura, M., & Sano A: A new phenotype of chorea-acanthocytosis with dilated cardiomyopathy and myopathy. *Mov. Disord* (22) p1669-167, 2007, 査読有

② Ichiba, M., Nakamura, M., Kusumoto, A., Mizuno, E., Kurano, Y., Matsuda, M., Kato, M., Tomemori, Y., Muroya, S., Nakabepu, Y., Sano, A.: Clinical and molecular genetical assessment of a chorea-acanthocytosis

pedigree. *J Neurol. Sci.* **263** p124-132, 2007, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① Kato M., Nakamura M., Ichiba M., Tomiyasu A., Shimo H., Matsuda M., Sano A. Three cases of mental disorders with muscle weakness, external ophthalmoplegia and mitochondrial DNA deletions. XVIth World Congress on Psychiatric Genetics. October 13, 2008 Osaka Japan

② Matsuda M., Nakamura M., Ichiba M., Kato M., Shimo H., Tomiyasu A., Kono N., Uchinokura Y., Mori S., Ishizuka T., Hayashi T., and Sano A. Bcl-2 family proteins are involved in neuronal apoptosis in the chorea-acanthocytosis model mouse. 第51回日本神経化学学会大会 平成20年9月12日 富山

③ Sano A Molecular understanding of ChAc using ChAc mouse. 4th International Symposium on Neuroacanthocytosis July 2, 2008 London and Oxford, UK

④ Nakamura M., Sano A Chorein (VPS13A) state and Proteome analysis in chorea-acanthocytosis red blood cells. 4th International Symposium on Neuroacanthocytosis, July 2, 2008 London and Oxford, UK

⑤ 加藤真依子, 中村雅之, 市場美緒, 揚村明日美, 松田三恵子, 畑幸宏, 伊地知明, 今井莉香, 佐野 輝 うつ病を呈し慢性進行性外眼筋麻痺の筋症状や遺伝子異常を伴い、筋病理上 multiple mini-core を認めた一例
第29回日本生物学的精神医学会 2007年7月13日 札幌

⑥ 佐野 輝 ミトコンドリア病の精神症状第29回日本生物学的精神医学会 2007年7月12日 札幌

[図書] (計 3 件)

① Nakamura M., Katoh Y., Kurano Y., Ichiba M., Matsuda M., Katoh M., Ueno S., and Sano A. Springer, Berlin, Germany
Neuroacanthocytosis Syndromes II
A Mouse Model of Chorea-acanthocytosis

2008, .p153-160

②Sano A. Springer, Berlin, Germany,
Neuroacanthocytosis Syndromes II
Psychiatric Morbidity in
Neuroacanthocytosis
, 2008, p219-223

③佐野輝, 朝倉書店 chorea acanthocytosis ;
内科学 第九版, p1794-1796, 2007 3

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 雅之 (NAKAMURA MASAYUKI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号 : 90332832

(2) 研究分担者

佐野 輝 (SANO AKIRA)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号 : 30178800