

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461537

研究課題名(和文) Charcot-Marie-Tooth病の病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease

研究代表者

早坂 清 (HAYASAKA, Kiyoshi)

山形大学・医学部・名誉教授

研究者番号：20142961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病症例の約半数は、病因が不明である。本研究では、劣性遺伝を示す軸索型および混合型CMT病の2家系について、SNPsマイクロアレイによる連鎖解析と全ゲノムシーケンシングによりcytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1 (COX6A1) 遺伝子の変異を検出した。末梢白血球およびリンパ芽球におけるcytochrome c oxidase活性、COX6A1mRNAおよびATP含量の低下を確認した。ノックアウトマウスにおける発症も確認した。COX6A1変異は、劣性軸索型または混合型CMT病の病因である。

研究成果の概要(英文)：Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) is the most common inherited neuropathy, but causing gene mutation is not unknown in half of the patients. We studied two consanguineous families with CMT (axonal and mixed phenotypes) by SNP array and whole-genome sequencing analyses and finally detected a disease-specific 5 bp deletion (c.247-10\_247-6delCACTC) in a splicing element (pyrimidine tract) of intron 2 adjacent to the third exon of cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1 (COX6A1). Functional analysis showed that expression of COX6A1 in peripheral white blood cells from the affected individuals and COX activity in their EB-virus-transformed lymphoblastoid cell lines were significantly reduced. In addition, Cox6a1-null mice showed significantly reduced COX activity and neurogenic muscular atrophy leading to a difficulty in walking. Those data indicated that COX6A1 mutation causes the autosomal-recessive axonal or mixed CMT.

研究分野：小児科学

キーワード：遺伝性ニューロパチー Charcot-Marie-Tooth病 軸索型 混合型 チトクロームオキシダーゼ COX6A1

### 1. 研究開始当初の背景

#### 遺伝性ニューロパチーを代表する

Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病は 2500 人に 1 人と頻度が高い疾患である。多くは小児期に発症し、歩行開始の遅延、緩徐進行性の遠位筋の筋力低下や萎縮、深部腱反射の消失、手足の変形、手袋靴下型の知覚障害などの特徴的な症状を呈する。重症型では、乳幼児期に発症し、軽症型では抗ガン剤（特にビンクリスチン）の投与などにより、歩行障害、時に呼吸困難が出現し罹患に気付く患者さんも存在する。

本症は伝統的に 2 つの病型、髄鞘型および軸索型に分類されてきた。更に、最近では中間型と表現される混合型の存在も報告されている。遺伝形式は優性、劣性、X 連鎖性と様々であり、約 40 個という多数の遺伝子が明らかにされている。私達は、日本人症例約 350 名について、網羅的に病因遺伝子を解析し、日本人の症例では欧米と異なり、CMT 病 1A 型の 17p11.2 遺伝子重複が少なく、約 200 名の病因は不明であるという特徴を明らかにしてきた。

これらの既知の病因遺伝子に変異を有しない症例では、治療法の開発のためにも、新たな病因検索が求められる。

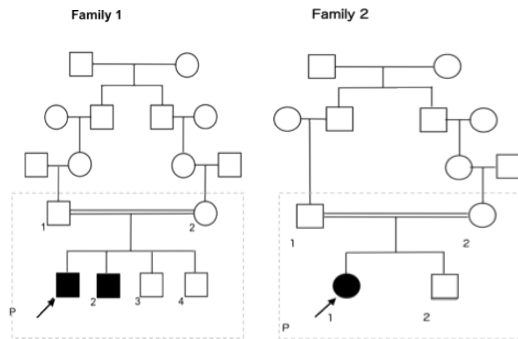
### 2. 研究の目的

CMT 病の治療法の開発や効果的な遺伝カウンセリングを行うためには、病因・病態の解明が求められる。病因が同定されない理由としては、未知の病因遺伝子の存在と既知の病因遺伝子に対する検索上の問題との 2 つの問題が考えられる。

未知の病因遺伝子については、最近、次世代シーケンサーで症例の遺伝子を解析し、病因が解明されている報告が多い。しかし、実際には多数の遺伝子変異が検出され、病因の絞り込みが困難である。現在まで、蓄積してきた多くの家系の中から、劣性遺伝を示す家系では、SNPs を用いた連鎖解析と次世代シーケンサーを組み合わせた解析に適していることから、第一解析対象とした。

### 3. 研究の方法

(1) 両親に血族婚がある 2 家系を対象とした。家系 1 には、混合型 CMT 病の罹患者が 2 名存在し、両親および同胞 2 人は健康である。小児期の電気生理学的検索では、電動速度の遅延を認めなかったが、成人となった病因確定後の検索では遅延が確認された。家系 2 では、軸索型 CMT 病の罹患者が 1 名存在し、両親および弟 1 名は健康である。両親、罹患者および健康な同胞を検索した。



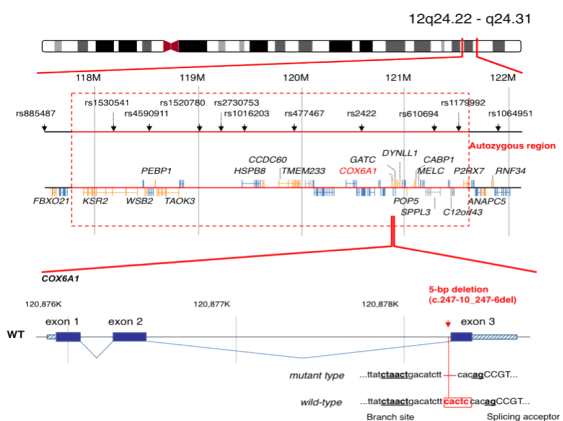
(2) 2 家系を対象とし、SNPs マイクロアレイを用いて連鎖解析を施行した。連鎖部位を特定した後、全ゲノムシーケンス解析を施行した。

(3) 末梢血白血球および EB ウイルス形質転換リンパ芽球を用いて、COX 酵素活性、*COX6A1* mRNA および ATP の含量を測定した。

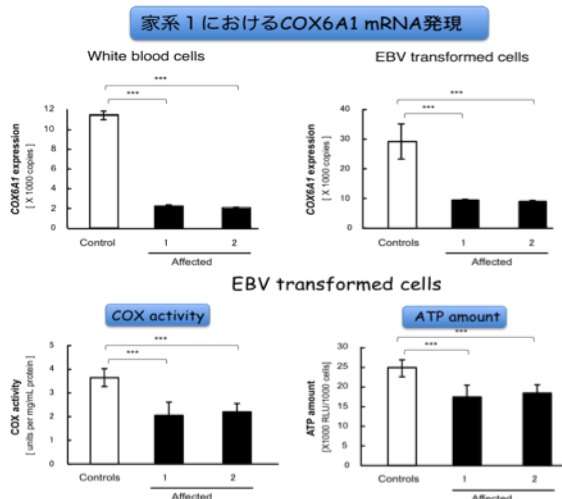
(4) *Cox6a1* knockout null mice の行動解析、組織の病理学的および生化学的解析を施行した。

### 4. 研究成果

(1) 2 家系の連鎖解析から、12q24 部位に LOD 4.23 が得られた。罹患者(家系 1 発端者)を全ゲノムシーケンス解析し、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\_247-6delICACTC)を検出した。シーケンサーを用いて、家系 1, 2 を解析し、変異と疾病の連鎖を確認した。



(2) 末梢血白血球および EB ウイルス形質転換リンパ芽球を用いて *COX6A1* の機能を解析するために、mitochondrial respiratory complex IV(cytochrome c oxidase [COX])の活性、*COX6A1* mRNA および ATP の含量を測定し、有意な低下を確認した。



(3) Cox6a1 欠損マウスでは歩行困難を呈し、病理学的に神経原性の筋の萎縮を認め、神経伝導速度の遅延を確認した。COX の活性低下と ATP 量の低下も確認された。

以上のことから、COX6A1 は、劣性遺伝を示す軸索型および混合型 CMT 病の病因であることが明らかにされた。

(4) 結果を総括すると、末梢神経は外部から中枢への情報入力、また筋肉など効果器官への中枢からの出力を担っており、特に運動・知覚神経は、激しい運動を含む環境にさらされ、変形や伸張に対応するために堅固な髄鞘に保護されている。神経細胞では、座骨神経などでは 1メートルと長く、また、髄鞘を形成するシュワン細胞では、軸索に巻き付いており細胞体は同様に長く、ミエリンを生成するという特殊な機能を有する。機能および構造上の特殊性から、多少の細胞学的な異常により機能が障害される。それ故に、CMT 病の病因遺伝子は多数存在すると考えられる。

今回、新規の病因遺伝子として COX6A1 が同定された。この遺伝子にコードされる蛋白質は、チトクロームオキシダーゼのサブユニットの一つで調節に関与していると考えられ、ubiquitous に発現しているが、特に末梢神経で重要な役割を果たしていると考えられる。他の臓器ではアイソフォームが代償している可能性が考えられる。末梢神経は複雑な形態および機能を有し効率的なエネルギー代謝を要するために、ミトコンドリアのダイナミクスや調節機能の異常により機能が障害されると考えられる。

多数の病因遺伝子が存在する CMT 病の病因解明には、次世代シーケンサーによる解析は有用な方法と考える。

<引用文献>

Abe A, Numakura C, Kijima K, Hayashi M, Hashimoto T, Hayasaka K. Molecular diagnosis and clinical onset of Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. *J Hum Genet.* 2011;56:364-368. doi: 10.1038/jhg.2011.20. Epub 2011 Feb 17.

#### 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)

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.* 2014;95:294-300. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.07.013. Epub 2014 Aug 21. 査読有

Toyota K, Ogino D, Hayashi M, Taki M, Saito K, Abe A, Hashimoto T, Umetsu K, Tsukaguchi H, Hayasaka K. INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease complicated with focal segmental glomerulosclerosis. *J Peripher Nerv Syst.* 2013;18:97-98. doi: 10.1111/jns.5.12014. 査読有

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.* 2013;58:273-278. doi: 10.1038/jhg.2013.15. Epub 2013 Mar 7. 査読有

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.* 2013;334(1-2):176-179. doi: 10.1016/j.jns.2013.08.001. Epub 2013 Aug 9. 査読有

#### [学会発表](計2件)

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 119 回日本小児科学会学術集会. 平成 28 年 5 月 13 日~15 日. ロイトン札幌(北海道札幌市)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 平成 27 年 11 月 12 日～14 日 .大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

[図書](計 1 件)

早坂清他 .シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル改訂 2 版 (CMT 診療マニュアル編集委員会編集) 金芳堂 2015 年

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

早坂 清 (HAYASAKA, Kiyoshi)  
山形大学・医学部・名誉教授  
研究者番号 : 20142961

### (2) 研究分担者

沼倉 周彦 (NUMAKURA, Chikahiko)  
山形大学・医学部・講師  
研究者番号 : 00400549

阿部 暁子 (ABE, Akiko)  
山形大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号 : 10536949

高橋 信也 (TAKAHASHI, Nobuya)  
山形大学・医学部・医員  
研究者番号 : 20536958