

神経有棘赤血球症の診療ガイドラインの作成に向けた分子的診断法の検討

佐野 輝

中村雅之

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 精神機能病学分野

**研究要旨**

神経有棘赤血球症（Neuroacanthocytosis）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り、舞踏運動などの movement disorder を呈する中核群の代表疾患は有棘赤血球舞踏病（ChAc）と McLeod 症候群である。今回、診断ガイドライン作成に際し、ChAc と McLeod 症候群それぞれの責任遺伝子 *VPS13A* と *XK* 遺伝子解析および、それぞれの遺伝子産物である chorein と *XK* タンパク質の検出解析を行い、有効な分子診断法の検討を行った。ChAc 患者においては変異の種類は点変異から CNV まで多岐にわたり、*VPS13A* 遺伝子に広く分布しており、*VPS13A* 遺伝子が巨大であることから、遺伝子診断には甚大な労力を要す。一方、赤血球膜分画を用いた chorein 検出解析の方がより確実で簡便、迅速に行えた。McLeod 症候群においても赤血球膜分画を用いた *XK* タンパク質の検出解析による分子診断が同様に可能であることから、両者を併行することによって神経有棘赤血球症の代表疾患の分子的鑑別診断が可能であり、今後の調査に有用であると考えられた。

**A. 研究目的**

神経有棘赤血球症（Neuroacanthocytosis）とは神経症候と有棘赤血球症を併せ持つ病態に対して包括的に使用される用語である。その中で神経症候において舞踏運動などのいわゆる movement disorder を呈する中核群は、有棘赤血球舞踏病（chorea-acanthocytosis; ChAc）と McLeod 症候群で占められる。その他、ハンチントン病類症型（Huntington disease-like2）や PKAN: Pahtothenate kinase associated neurodegeneration（Hallervorden Spatz syndrome）などもこの群に含まれるが、その頻度は極めて少ない。他方、movement disorder を呈さない群として、リポ蛋白の低下に伴う脂質の吸収不全から神経障害と有棘赤血球症を来す疾患が存在し、無リポ蛋白血症、低リポ蛋白血症が挙げられる。これらの疾患においては、脊髄後索、末梢神経、網膜の障害を生じ、失調症状は認めるがいわゆる movement disorder は生じない。中核群の代表疾患である有棘赤血球舞踏病および McLeod 症候群は、責任遺伝子が明らかにされており、それぞれ *VPS13A* 遺伝子変異、

*XK* 遺伝子変異を有する。今回我々は、有棘赤血球舞踏病および McLeod 症候群の診療ガイドライン作成に際して、両疾患の分子的診断法の検討を行った。

**B. 研究方法**

神経有棘赤血球症の臨床診断により有棘赤血球舞踏病が疑われる症例に対し、文書による同意が得た後に血液サンプルの採取を行った。末梢血白血球から gDNA と RNA を抽出し、RNA から cDNA 合成を行い、gDNA と cDNA を遺伝子解析の鋳型とした。それらを用いて直接シーケンシング法による *VPS13A* 遺伝子変異解析、同遺伝子の定量的 PCR 法による CNV 解析を行った。赤血球膜分画が入手できた検体に対してはウエスタンブロット法による *VPS13A* 遺伝子産物である chorein タンパク質の検出解析を行った。また、臨床検査において血液型物質 kelli 抗原が陰性であった症例の検体に関しては *XK* 遺伝子変異解析と *XK* タンパク質検出解析を行った。尚、本研究は鹿児島大学大学院医歯学総合研究科遺伝子研究倫理委員会および鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会の承認を得ている。

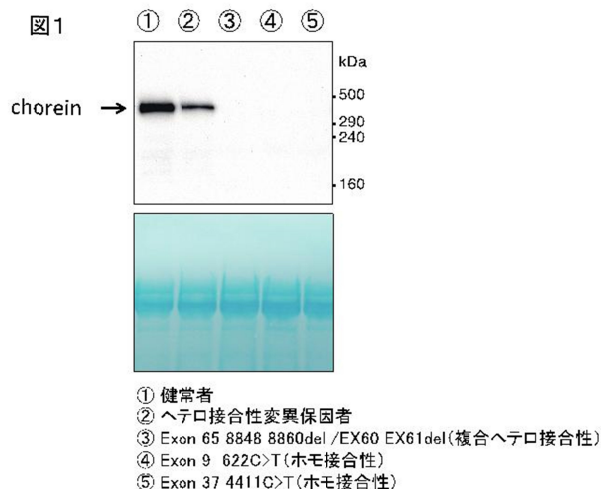
## C. 研究結果

### ChAc の分子診断

日本人 ChAc 疑い症例 20 名について *VPS13A* 変異解析を行った。13 例が変異をホモ接合性に、7 例が変異を複合ヘテロ接合性に有しており、全例遺伝子診断的に ChAc と診断できた。EXON 37 上の 4411C>T (R1471X) および Exon 60,61 欠失変異が全変異アリル中それぞれ 32.5%および 27.5%と頻度高く、そのほとんどが関東以西に分布していた。その他の変異アリルは 5~2.5%の頻度で *VPS13A* 上の exon9 から exon72 まで多岐に分布しており (表)、特に東京を除く関東以東においては多彩な変異を認め明らかな創始者効果は認めなかった。また、CNV 解析で exon24 から 45 に渡る duplication を 1 例について同定したが、これはシーケンシング法のみでは検出できない変異であった。赤血球膜分画のタンパク質抽出が可能であった検体についてウエスタンブロットを行った結果、全例分子量約 360kDa の全長 chorein は検出されなかった (図 1)。

**表 日本人 20 名の有棘赤血球舞踏病患者の *VPS13A* 遺伝子変異アリル頻度**

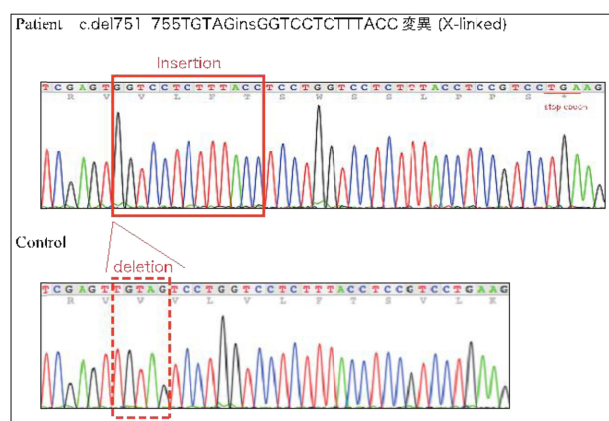
Position	DNA change	Protein change	allele frequency
Exon 37	4411C>T	R1471X	13 ( 32.5% )
Exon 60_61	EX60_EX61del	V2738AfsX5	11 ( 27.5% )
Exon 34	3889C>T	R1297X	2 ( 5.0% )
Exon 9	622C>T	R208X	2 ( 5.0% )
Exon 53	7411C>T	Q2471X	2 ( 5.0% )
Exon 12	928C>T	Q310X	1 ( 2.5% )
Exon 15	1287del	429GfsX29	1 ( 2.5% )
Exon 15	1305G>A	W435X	1 ( 2.5% )
Intron 20	2037+2T>G	– (splice site)	1 ( 2.5% )
Exon 24_45	EX24_EX45dup	– (large duplication)	1 ( 2.5% )
Exon 32	3418_3419del	I140TfsX5	1 ( 2.5% )
Exon 35	3970_3973del	I324SfsX3	1 ( 2.5% )
Exon 57	8035G>A	I2652HfsX12	1 ( 2.5% )
Exon 65	8848_8860del	2950NfsX13	1 ( 2.5% )
Exon 72	9403C>T	R3134X	1 ( 2.5% )
Total			40



**図 1** 赤血球膜分画の chorein ウエスタンブロット  
上図にウエスタンブロットの結果の例を示す。ChAc 患者 (③~⑤) では chorein バンドは認めない。下図には同メンブレンのタンパク染色を示した。

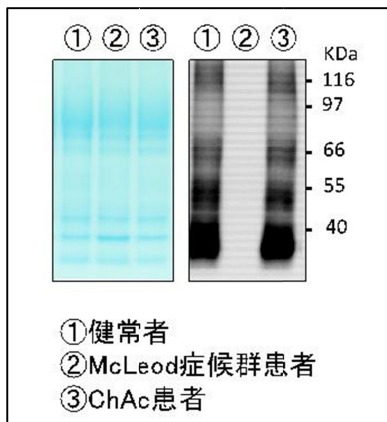
### McLeod 症候群の分子診断

血液型物質 kelli 抗原が陰性であった症例の検体に関しては *XK* 遺伝子変異解析で、新規変異 c.del751\_755TGTAGinsGGTCCTCTTTACC を同定した (図 2)。また、同患者について *XK* タンパク質ウエスタンブロットでは *XK* タンパク質のバンドは検出されなかった (図 3)。



**図 2** *XK* 遺伝子変異解析

McLeod 症候群患者 (上図) と健常者 (下図) の *XK* 遺伝子の直接シーケンシングの結果を示す。c.del751\_755TGTAGinsGGTCCTCTTTACC 変異を McLeod 症候群患者に認める。



**図3** 赤血球膜分画のXKタンパク質ウエスタンブロット

右図にXKタンパク質のウエスタンブロットの結果を示す。健常者やChAc患者に認めるXKタンパク質のバンドをMcLeod症候群患者( )には認めない。左図には同メンブレンのタンパク染色を示した。

#### D. 考察

20名の日本人ChAc疑い症例について総合的分子診断を行った。全例ホモ接合性もしくは複合ヘテロ接合性に変異を有していたが、中には直接シーケンシング法では変異が同定できないCNV変異を有するものが存在した。ChAcの遺伝子診断においては変異がVPS13A遺伝子上に広く分布しており、シーケンシング法で変異を認めない場合はCNV解析も必要である。VPS13A遺伝子はエクソン数が70を超える巨大な遺伝子であり、その解析に要する労力は甚大である。一方、赤血球膜分画を用いたウエスタンブロット法によるchorein検出解析においては、解析した全ChAc症例においてchoreinバンドは欠失しており、分子診断においては遺伝子解析よりも労少なく、確実かつ迅速に行うことが可能であった。McLeod症候群においても赤血球膜分画を用いたウエスタンブロット法によるXKタンパク質検出解析により分子診断が可能であった。これらから神経有棘赤血球症の分子診断に赤血球膜分画を用いたウエスタンブロット法によるchorein検出解析とXKタンパク質検出解析を同時に行うことにより、遺伝子診断

よりも迅速にChAcとMcLeod症候群の分子的鑑別診断が可能であると考えられる。

#### E. 結論

本邦におけるChAc患者のVPS13A遺伝子変異は点変異からCNVに至るまで多岐にわたりかつ遺伝子上に広く分布していた。VPS13A遺伝子は巨大であり、頻度高い変異を認めない場合には遺伝子解析は煩雑を極める可能性がある。このため、ChAcの分子診断においては赤血球膜分画によるchorein検出解析を用いた方がVPS13A遺伝子解析に比べより簡便かつ確実に迅速な診断が可能であると考えられる。また、McLeod症候群についても赤血球膜分画を用いたXKタンパク質検出解析によって分子診断が可能であることから、chorein検出解析と併用すれば神経有棘赤血球症におけるChAcとMcLeod症候群の分子的鑑別診断を行うことが迅速に可能となる。神経有棘赤血球症において、赤血球膜分画を用いたウエスタンブロット法による分子診断は今後の診断ガイドライン作成や疫学調査に際し活用すべき手法であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

中村雅之、佐野 輝：神経症候群（第2版）- その他の神経疾患を含めて- II章 III 変性疾患 錐体外路系疾患 不随意運動を主とする疾患 舞蹈運動症候群 「有棘赤血球舞蹈病 (Chorea-acanthocytosis)」、別冊日本臨床新領域別症候群シリーズ No.27、173-177、2014

##### 2. 学会発表

Natsuki Sasaki, Masayuki Nakamura, Nari

Shiokawa, Akiko Kodama, Akira Sano:  
Chorein interacts with  $\alpha$ -tubulin and  
HDAC6, and its overexpression preserves  
cell viability from nutrient starvation.  
第 57 回日本神経化学会 2014 (奈良)

Hitoshi Sakimoto, Omi Nagata, Masayuki  
Nakamura and Akira Sano: Modifiers for  
symptoms of chorea-acanthocytosis  
-Effect of genetic background on ChAc model  
mouse- 第 36 回生物学的精神医学会 2014  
(奈良)

#### **H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）**

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし