

脊髄小脳変性症の診断支援・未診断疾患の原因同定に関する研究

研究分担者 高嶋 博 鹿児島大学大学院 脳神経内科・老年病学講座

研究協力者 樋口雄二郎¹⁾, 橋口昭大¹⁾, 吉村明子¹⁾, 岡本裕嗣¹⁾, 松浦英治¹⁾, 上田 健博²⁾, 小出隆司³⁾, 矢口裕章⁴⁾, 中川正法⁵⁾, 石浦浩之⁶⁾, 三井 純⁶⁾, 戸田 達史²⁾⁶⁾, 辻 省次⁶⁾, 村山 圭⁷⁾, 大竹 明⁸⁾, 原 太一⁹⁾, 山口政光¹⁰⁾

1) 鹿児島大学大学院 脳神経内科・老年病学講座、2) 神戸大学大学院医学研究科 神経内科、3) 平塚市民病院神経内科、4) 市立札幌病院神経内科、5) 京都府立医科大学附属北部医療センター神経内科、6) 東京大学医学部附属病院 神経内科、7) 千葉県こども病院代謝科、8) 埼玉医科大学小児科、9) 早稲田大学人間科学学術院 健康福祉科学科 細胞制御学、10) 京都工芸繊維大学 応用生物学系・染色体工学研究室

研究要旨

大規模な数の原因未同定の遺伝性ニューロパチー患者を対象にエクソーム解析を実施し、複数の症例間で共有する新規のホモ接合性変異を抽出することで常染色体劣性遺伝性ニューロパチーの新規原因遺伝子を3つ同定した。その1つはミトコンドリア呼吸鎖複合体アセンブリに關与する遺伝子 *COA7* (Cytochrome C Oxidase Assembly Factor 7) である。*COA7* 変異症例は、脊髄小脳変性症の臨床像に加え軸索型ニューロパチーを伴うという特徴的な表現型を呈していたことから、その表現型を spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy type 3 (SCAN3) と命名し、脊髄小脳変性症の亜型として新しい疾患概念を確立した。本疾患の詳細な臨床像、画像所見、病理所見を明らかにし、さらに生化学的および細胞生物学的解析、ショウジョウバエ疾患モデルを用いた機能解析を行い、本疾患の病態を解明した。

A. 研究目的

遺伝性ニューロパチー (inherited peripheral neuropathy: IPN) や脊髄小脳変性症 (spinocerebellar degeneration: SCD) は臨床的にも遺伝的にも多様な疾患で多くの原因遺伝子が同定されているが、いまだ未知の原因遺伝子が多数存在する。また、ミトコンドリア機能に関連するさまざまな遺伝子が、ニューロパチーや小脳失調症などの遺伝性疾患の原因として多数同定され

ている。当教室では以前より原因未同定の IPN 多数例を対象にエクソーム解析を行い、新規原因遺伝子の探索を行っている。本研究では、小脳失調を伴う軸索型ニューロパチーの新規原因遺伝子として *COA7* (Cytochrome c oxidase assembly factor 7) を同定した。*COA7* 変異の病的意義を検証し、さらに生物モデルを用いて病態解明を試みた。

B. 研究方法

IPN の新規候補遺伝子を同定するため、IPN が疑われた症例 1369 例の DNA 検体を収集し、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を行った。既知遺伝子異常のない原因未同定の IPN の症例を選出し、その一部を対象に全エクソーム解析 (whole exome sequencing; WES) を行った。WES から得られる大量の変異データから効率よく原因となる遺伝子変異を同定するために、overlap-based strategy というアプローチ法を応用した ESVD システム (exome-based shared variants detection system) という解析ソフトを独自に開発した。これを用いて、WES から得られた大量の変異データの中からミスセンス変異やナンセンス変異、スプライス部位変異などの翻訳された蛋白の機能に強い影響を与えると予想される変異を選択的に抽出し、さらに複数の症例間で共有する変異を抽出することで、最終的に 4 家系に *COA7* 遺伝子の劣性変異を有していることを同定した。*COA7* 変異の病的意義を検証するため、臨床所見、電気生理学的所見、MRI 画像、末梢神経および筋組織の病理像などから臨床的特徴を明らかにし、さらに患者由来の皮膚組織から培養した線維芽細胞を用いて、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 (MRC complexes) の酵素活性を測定した。また HeLa 細胞を用いて *COA7* 変異体の細胞内での発現解析を行った。また、d*COA7* をノックダウンしたショウジョウバエの疾患モデルを作成し、運動機能解析や神経筋接合部のシナプス形態へ及ぼす影響を評価した。

(倫理面への配慮)

これらの実験に使用する DNA 検体の使用については、鹿児島大学のヒトゲノム使用研究に関する倫理委員会で承認され、使用目的 (遺伝性神経疾患の遺伝子診断検査、研究目的での原因検索の施行および厳重な保存) について患者または家族全員に十分に説明し、文書で遺伝子検査に関する

同意書を得ている。

C. 研究結果

COA7 変異を有する症例を 4 家系同定した。臨床的には、全例とも軸索型ニューロパチーに加え小脳性運動失調を認めており、発症年齢は 15 歳未満と若年発症であった。また、MRI 検査では全例で小脳萎縮を呈しており、一部の症例では大脳白質病変、脊髄萎縮を伴っていた。末梢神経病理では慢性の軸索変性所見を呈しており、筋病理では ragged red fiber や CCO 欠損線維を認め、mitochondrial myopathy に矛盾しない所見を呈していた。HeLa 細胞を用いた解析では、*COA7* 蛋白はミトコンドリア内に局在していることを明らかにした。また変異 *COA7* タンパク質の細胞内局在への明らかな影響は認められなかった。患者由来の皮膚線維芽細胞ではミトコンドリア呼吸鎖複合体である complex I もしくは complex IV の酵素活性ないし発現低下を認めた。ショウジョウバエモデルでは、複眼の形態異常や運動機能の低下、寿命の短縮、神経筋接合部のシナプス形態異常が誘導されることを明らかにした。

D. 考察

COA7 遺伝子がコードするシトクロム c オキシダーゼ・アセンブリ因子 (Cytochrome C Oxidase Assembly Factor 7) というタンパク質は、様々な組織の細胞のミトコンドリア内に豊富に発現しており、呼吸鎖複合体 (特に complex I と complex IV) のアセンブリ (集合) に重要な役割をもつ。*COA7* は神経系においては小脳や大脳皮質、基底核など中枢神経系に発現していることが分かっていたが、我々はヒト末梢神経系にも *COA7* が発現していることを明らかにした。*COA7* と相互作用するタンパク質にはどのようなものが存在するのか、またミトコンドリア内での *COA7* の局在や呼吸鎖複合体のアセンブリに関する詳細な分子動態については、未だ不明な点が多い。しかし、我々

は、SCAN3 患者から採取した末梢神経組織にて軸索障害をきたしていること、筋組織にてミトコンドリア異常をきたしていること、患者皮膚組織から培養した線維芽細胞を用いて、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の酵素活性や蛋白発現が非常に低下していることを明らかにした。さらに、*COA7* をノックダウンしたショウジョウバエの疾患モデルの樹立に成功し、運動機能の低下や寿命の短縮、神経筋接合部のシナプス形態異常が誘導されることを明らかにし、*COA7* の機能障害による神経変性のメカニズムの一部を解明した。一方、本研究において新規候補遺伝子を効率よく同定するために開発した ESVD システムは、同時に 3 つの IPN の新規原因遺伝子を同定に貢献した（国内特許取得）。このシステムは、多数例を解析して初めて行いうる手法であるが、他疾患にも応用も可能性であり、今後、IPN や SCD 以外の複数の遺伝性疾患の新規原因遺伝子の同定に用いることが可能である。

E. 結論

COA7 は軸索型ニューロパチーを伴う脊髄小脳変性症の新規原因遺伝子であり、その表現型を spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy type 3 (SCAN3) と命名し、脊髄小脳変性症の亜型として新しい疾患概念を確立した。*COA7* の同定は、遺伝性末梢神経障害や脊髄小脳変性症を含むさまざまな神経変性疾患に共通する神経変性メカニズムの解明および今後の治療開発に貢献するものと思われる。さらに本研究で樹立したショウジョウバエ疾患モデルを用いることで、今後は薬剤スクリーニング系を用いた治療法開発が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higuchi Y, Okunushi R, Hara T, Hashiguchi A, Yuan J, Yoshimura A, Murayama K, Ohtake A, Ando M, Hiramatsu Y, Ishihara S, Tanabe H, Okamoto Y, Matsuura E, Ueda T, Toda T, Yamashita S, Yamada K, Koide T, Yaguchi H, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Doi K, Morishita S, Sato K, Nakagawa M, Yamaguchi M, Tsuji S, Takashima H: Mutations in *COA7* cause spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Brain*. 2018 Jun 1;141(6):1622-1636. doi: 10.1093/brain/awy104.PMID: 29718187
- 2) Yoshimura A, Yuan JH, Hashiguchi A, Ando M, Higuchi Y, Nakamura T, Okamoto Y, Nakagawa M, Takashima H: Genetic profile and onset features of 1005 patients with Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018 Sep 26. pii: jnnp-2018-318839. doi: 10.1136. PMID: 30257968
- 3) Yoshimura M, Yuan JH, Higashi K, Yoshimura A, Arata H, Okubo R, Nakabeppu Y, Yoshiura T, Takashima H: Correlation between clinical and radiologic features of patients with Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (Pro102Leu). *J Neurol Sci*. 2018 Aug 15;391:15-21. doi: 10.1016/j.jns.2018.05.012. Epub 2018 May 17. PMID: 30103963
- 4) Miyabayashi T, Ochiai T, Suzuki N, Aoki M, Inui T, Okubo Y, Sato R, Togashi N, Takashima H, Ishiura H, Tsuji S, Koh K, Takiyama Y, Hagiyo K: A novel homozygous mutation of the *TFG* gene in a patient with early onset spastic paraplegia and lat

- er onset sensorimotor polyneuropathy. *J Hum Genet.* 2018 Nov 22. doi: 10.1038/s10038-018-0538-4. [Epub ahead of print] PMID: 30467354
- 5) Takanashi M, Funayama M, Matsuura E, Yoshino H, Li Y, Tsuyama S, Takashima H, Nishioka K, Hattori N: Isolated nigral degeneration without pathological protein aggregation in autopsied brains with LRRK2 p.R1441H homozygous and heterozygous mutations. *Acta Neuropathol Commun.* 2018 Oct 17;6(1):105. doi: 10.1186/s40478-018-0617-y. PMID: 30333048
 - 6) Nishikura N, Yamagata T, Morimune T, Matsui J, Sokoda T, Sawai C, Sakaue Y, Higuchi Y, Hashiguchi A, Takashima H, Takeuchi Y, Maruo Y: X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 5 with recurrent weakness after febrile illness. *Brain Dev.* 2018 Aug 31. pii: S0387-7604(18)30167-0. doi: 10.1016/j.braindev.2018.08.006. [Epub ahead of print] PMID: 30177296
 - 7) Sakiyama Y, Matsuura E, Maki Y, Yoshimura A, Ando M, Nomura M, Shinohara K, Saigo R, Nakamura T, Hashiguchi A, Takashima H: Peripheral neuropathy in a case with CADASIL: a case report. *BMC Neurol.* 2018 Aug 31;18(1):134. doi: 10.1186/s12883-018-1131-3. PMID: 30170552
 - 8) Yamaguchi M, Takashima H: Drosophila Charcot-Marie-Tooth Disease Models. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1076:97-117. doi: 10.1007/978-981-13-0529-0_7. Review. PMID: 29951817
 - 9) 竹丸 誠, 下江 豊, 佐藤 恒太, 橋口 昭大, 高嶋 博, 栗山 勝: 一過性の繰り返す大脳白質病変を示し, GJB1 遺伝子点変異ヘテロ接合体の X 連鎖 Charcot-Marie-Tooth 病の女性例. *臨床神経学*. 2018 May 25;58(5):302-307. doi: 10.5692/clinicalneuro.cn-001138. Epub 2018 Apr 28. Review. Japanese. PMID: 29710024
 - 10) Fujisaki N, Suwazono S, Suehara M, Nakachi R, Kido M, Fujiwara Y, Oshiro S, Tokashiki T, Takashima H, Nakagawa M: The natural history of hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement (HMSN-P) in 97 Japanese patients. *Intractable Rare Dis Res.* 2018 Feb;7(1):7-12. doi: 10.5582/irdr.2017.01084. PMID: 29552439
 - 11) Dung VM, Suong DNA, Okamoto Y, Hiramatsu Y, Thao DTP, Yoshida H, Takashima H, Yamaguchi M: Neuron-specific knockdown of Drosophila PDHB induces reduction of lifespan, deficient locomotive ability, abnormal morphology of motor neuron terminals and photoreceptor axon targeting. *Exp Cell Res.* 2018 May 15;366(2):92-102. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.02.035. Epub 2018 Mar 6. PMID: 29501567
 - 12) Tanabe H, Higuchi Y, Yuan JH, Hashiguchi A, Yoshimura A, Ishihara S, Nozuma S, Okamoto Y, Matsuura E, Ishiura H, Mitsui J, Takashima R, Kokubun N, Maeda K, Asano Y, Sunami Y, Kono Y, Ishigaki Y, Yanamoto S, Fukae J, Kida H, Morita M, Tsuji S, Takashima H: Clinical and genetic features of Charcot-Marie-Tooth disease 2F and hereditary motor neuropathy 2B in Japan. *J Peripher Nerv Syst.* 2018 Mar;23(1):40-48. doi: 10.1111/jns.12252. Epub 2018 Feb 14. PMID: 29381233
 - 13) Yuan JH, Hashiguchi A, Okamoto Y, Yoshimura A, Ando M, Shiomi K, Saito K, Takahashi M, Ichinose K, Ohmichi T, Ichikawa K, Tadashi A, Takigawa H,

- Shibayama H, Takashima H: Clinical and mutational spectrum of Japanese patients with recessive variants in SH3TC2. *J Hum Genet.* 2018 Mar;63(3):281-287. doi: 10.1038/s10038-017-0388-5. Epub 2018 Jan 10. PMID: 29321516
- 14) 浜田 恭輔, 武井 藍, 崎山 佑介, 森山 宏遠, 橋口 昭大, 高嶋 博: 広範な脳萎縮と髄液 IL-6 上昇を伴いインフリキシマブを使用した慢性進行型神経ペーチェット病の 1 例. *臨床神経学.* 2018 Jan 26;58(1):30-34. doi: 10.5692/clinicalneurolog.cn-001086. Epub 2017 Dec 22. Japanese. PMID: 29269695
- 15) Minami K, Takahashi S, Nihei Y, Oki K, Suzuki S, Ito D, Takashima H, Suzuki N: The First Report of a Japanese Case of Seipinopathy with a BSCL2 N88S Mutation. *Intern Med.* 2018 Feb 15;57(4):613-615. doi: 10.2169/internalmedicine.8765-16. Epub 2017 Dec 21. PMID: 29269637
- 16) Hikiami R, Yamashita H, Koita N, Jingami N, Sawamoto N, Furukawa K, Kawai H, Terashima T, Oka N, Hashiguchi A, Takashima H, Urushitani M, Takahashi R: Charcot-Marie-Tooth disease type 2A with an autosomal-recessive inheritance: the first report of an adult-onset disease. *J Hum Genet.* 2018 Jan;63(1):89-92. doi: 10.1038/s10038-017-0353-3. Epub 2017 Nov 13. PMID: 29215088
- 17) Yuan JH, Sakiyama Y, Hashiguchi A, Ando M, Okamoto Y, Yoshimura A, Higuchi Y, Takashima H. Genetic and phenotypic profile of 112 patients with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 1. *Eur J Neurol.* 2018 Jul 11. doi: 10.1111/ene.13750.
- 18) Shimizu C, Kasahara H, Furuta N, Shibata M, Nagashima K, Hashiguchi A, Takashima H, Ikeda Y. Charcot-Marie-Tooth disease showing transient central nervous system lesions after a large amount of alcohol intake: A case report]. *Rinsho Shinkeigaku.* 2018 Aug 31;58(8):479-484. doi: 10.5692/clinicalneurolog.cn-001130. Epub 2018 Jul 31. Japanese.

2.学会発表

樋口雄二郎¹⁾、橋口昭大¹⁾、袁軍輝¹⁾、吉村明子¹⁾、岡本裕嗣¹⁾、松浦英治¹⁾、上田健博²⁾、石浦浩之³⁾、三井純³⁾、戸田達史²⁾³⁾、辻省次²⁾、高嶋博¹⁾ *COA7*は小脳失調を伴う軸索型ニューロパチーの新規原因遺伝子である。第29回日本末梢神経学会学術集会, 2018年9月8日.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

遺伝性疾患の検出方法(特許第6378529号, 出願日: 平成26年4月28日、取得年月日: 平成30年8月3日、利権者: 高嶋博、樋口雄二郎)

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし