スモン（SMON）の疾患感受性遺伝子に関する研究　令和2年度の進捗報告

大西　秀典（東海国立大学機構岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学）
久留　　聡（国立病院機構鈴鹿病院脳神経内科）
南山　　誠（国立病院機構鈴鹿病院脳神経内科）
小長谷正明（国立病院機構鈴鹿病院脳神経内科）
鷲見　幸彦（国立長寿医療研究センター神経内科）
徳田　治彦（国立長寿医療研究センターメディカルゲノムセンター）
木村　暁夫（東海国立大学機構岐阜大学大学院医学系研究科脳神経内科）
溝口　功一（国立病院機構静岡富士病院院長）
杉本精一郎（国立病院機構宮崎東病院神経内科）
小池　春樹（東海国立大学機構名古屋大学大学院医学系研究科神経内科）
松尾　秀徳（国立病院機構長崎川棚医療センター神経内科）
軸丸　美香（大分大学医学部神経内科）
三ツ井貴夫（国立病院機構徳島病院臨床研究部）
高橋　美枝（高知記念病院神経内科）
坂井　研一（国立病院機構南岡山医療センター臨床研究部）
濱田　康宏（香川大学医学部消化器・神経内科）
千田　圭二（国立病院機構岩手病院）
峠　　哲男（香川大学医学部看護学科健康科学）
大越　教夫（筑波技術大学学長）
井上　　学（大阪市立総合医療センター神経内科）
松本　英樹（東海国立大学機構岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学）

研究要旨

NQO1（NADH quinone acceptor oxidoreductase1）という多機能な抗酸化酵素の機能喪失型C609T遺伝子多型（rs1800566）について、この機能喪失多型を有する者がSMONに対する易罹患性があり、また重症化しやすかったという仮説のもとに、SMON患者の本遺伝子多型の解析を進めている。本年度も症例数を追加し解析を行ったが、優性遺伝モデル、劣性遺伝モデル、アレル頻度での解析で本多型とSMON発症との間に有意な関連性は見いだせなかった。サブグループ解析で、臨床症状、特にその重症度に注目して解析したが、本多型の有無と有意に関連する項目は認めなかった。また、今後の解析対象遺伝子の拡大のためスモンバイオバンク事業が計画されており、本年度はDNA検体の移管準備を行った。現在までに収集した126検体のうちオプトアウト症例、残検体量不足の症例を除いた計112検体を移管する予定としている。

A．研究目的

SMON（亜急性脊髄視神経障害）はキノホルムによる薬害であり、発症機序は未解明の部分が多い。日本人に好発したことから、SMON 発症と日本人特有の遺伝的背景との関連が示唆される。新規治療法の開発のため、SMON 発症と関連する遺伝子の同定が重要である。本研究では SMON 発症に関連する遺伝子を同定し、SMON 患者に対する新規治療の開発につなげることを目的とする。

SMON 発症には神経細胞における酸化ストレスが影響しているとされる。酸化ストレスと関連する NQO1 遺伝子に存在する機能喪失性多型（rs1800566）が発見され、キノホルムの毒性を用量依存性に抑制することが報告されている。NQO1 rs689455 多型は NQO1 の発現調整に関わるとされる。また、2019 年に論文報告された SMON 発症と関連性が指摘された SNP として ABCC4 遺伝子の rs3765534 多型、ABCC 11 遺伝子の rs17822931 多型が報告されており、それらについても解析を行った。

なお、SMON は今後新規発症することはないと考えられ、新規の治療法開発のために、現存する臨床情報、画像情報、DNA などの生体試料について安定的に保存するバイオバンク事業が必要と考えている。当施設が収集・管理している匿名化された DNA サンプルについても当該事業に移管する方針であり、本年度はその準備を行うこととした。

B．研究方法

日本国内で発症した SMON 患者から本研究について書面で同意を得、血液検体を全国の協力施設から収集し、白血球分画から DNA を抽出した。Sangar 法及びアレル特異的 PCR 法により NQO1、ABCC4、ABCC11 遺伝子の以下の 4 つの SNP（rs1800566、rs689455、rs3765534、rs17822931）の有無について、遺伝子解析を行った。SMON 患者群と大規模日本人遺伝子多型データベース（Human Genomic Variation database (HGVD) 及び Integrative Japanese Genome Variation Database（iJGVD）：東北メディカル・メガバンク機構の日本人遺伝子データ）上で登録されているアレル保有頻度を比較し、SMON 発症と遺伝子多型の関連性を統計学的に検討した。統計学的手法は Pearson の χ^2 検定、必要に応じて Yates の補正を用いた。p 値は 0.05 未満を有意とした。

既に SMON 患者から書面での同意書を得て抽出した DNA 検体をバイオバンク事業に移管するため、オプトアウトを実施した。検体移管を希望されなかった症例以外の検体を連結可能匿名化し、患者情報は国立病院機構鈴鹿病院で対照表を管理し、国立長寿医療研究センターに移管するため、新たに各研究協力施設の倫理委員会で審査を受けた。

（倫理面への配慮）

本研究は、岐阜大学大学院医学系研究科医学研究等倫理審査委員会の承認を得ている（承認番号 29-209、2020-132）。

C．研究結果

１）NQO1 C609T 多型（rs1800566）

合計 125 例の解析で C/C（wild-type）39 名　C/T（hetero）は 68 例、T/T（homo）は 18 例であった。日本人における本多型のアレル保有頻度は HGVD にて C/C 471 名、C/T 542 名、T/T 197 名となっており、ヘテロ接合体が SMON 患者で多い傾向がみられたが、優性遺伝モデルあるいは、それぞれ単独群とした場合のアレル保有頻度においても、現在の解析検体数では統計学的に機能喪失型 T アレルが SMON 患者に有意に高頻度であるという結果は得られなかった。また視力、運動機能の重症度とこの多型との関連性についても同様にサブグループ解析を行ったが、両者に関して有意差は認められなかった。

２）NQO1 -1221 A>C のプロモーター領域の多型（rs689455）

45 例の SMON 患者に対して解析したが、45 人ともこの多型の A/A, A/C, C/C の方は上述の C609T 多型の C/C, C/T, T/T を持っており完全に一致しており、この 2 つの多型は連鎖していると考えられ、それ以上の解析は行わなかった。iJGVD においても rs1800566 と rs689455 のアリル頻度はほぼ一致しており、連鎖していることが裏付けられている。

3）ABCC4 rs3765334（c.G2268A、p.E857K）および
ABCC11 rs17822931（c.G538A，p.G180R）

この2つの多型については、その頻度分布はSMON患者と健常日本人データベース（HGVD、iJGVD）との間で有意差を認めなかった。

4）スモンバイオバンク事業

研究協力施設それぞれにおいて倫理委員会による審査を受け、認可を得た上、本年度末までに受領した全126検体のうちオプトアウト症例、検体量不足の症例を除いた計112検体を移管する予定としている。

D．考察

キノホルムのミトコンドリア障害が、NQO1のタンパク発現量と負の相関があり、NQO1の発現が低い細胞ほど強く障害されることが細胞レベルの実験から示唆されている（Siegel D, Pharmacogenetics 1999）。このためNQO1の機能喪失型多型であるNQO1 C609T多型を有する者は、キノホルムによる細胞障害が強く生じる可能性があると考えられ、またこの多型は日本人に多いことが判明している。これが日本でSMONが多発したことと関連がある可能性を考え、SMON患者にNQO1機能喪失多型を持つものが多いという仮説のもとに現在までに通算125例の解析を行った。この解析ではキノホルムを同様に内服していたのにSMONを発症しなかった人を比較対照にすることができず、代替として日本人の健常者と考えられる1000人ゲノム等の多型頻度と比較しており、その点が有意差が検出し難い要因となっているのではないかと推測している。このため今後はさらに解析症例数を増やして解析したいと考えている。また、NQO1遺伝子の他の遺伝子の多型についても今後解析対象を広げることも検討している。

2019年にPerezらがPharmacology and Therapeuticsに投稿したキノホルムの総説でABCC4とABCC11遺伝子上の日本人に非常に頻度の高いとされる多型があたかもSMONが日本に多発した原因であるかのような記載がなされていたが、SMON患者と一般日本人におけるこれら2つの遺伝子の多型において頻度の差は認められず、SMONの発症に関与したという根拠がないことが明らかになった。この結果についてPerezらの報告に対する反論として、125例の解析結果を論文として投稿準備中である。

今回解析したSNP以外の何らかの遺伝的要因の差がSMON発症に関係した可能性も残されており、今後SNPアレイやエクソーム解析などでSMON発症に関与する遺伝的背景について範囲を拡大して調べることも検討している。スモンバイオバンク事業はこの解析範囲拡大に必要不可欠であり、各施設間で協力して事業を進めていく予定である。

E．結論

現時点ではSMON患者においてNQO1のC609T機能喪失多型が日本人における平均的頻度と比較し有意に高い頻度で同定されると言う結果は得られなかった。さらに症例数を加えて解析することが必要である。ABCC4 rs3765334（c.G2268A、E857K）およびABCC11 rs17822931（c.G538A，G180R）はSMONとの関連性は低いと考えられた。

G．研究発表

特になし

H．知的財産権の出願・登録状況

特になし

I．文献

特になし