

学 位 論 文 題 名

ミトコンドリア脳筋症における遺伝子診断の臨床応用

学位論文内容の要旨

I は じ め に

ミトコンドリア脳筋症には、慢性進行性外眼筋麻痺（CPEO）、福原病（MERRF）、メラス（MELAS）の三大臨床病型があり、それぞれが特異的なミトコンドリア（mt）DNA 異常をもつことが明らかにされた。すなわち CPEO では大きな欠失が、MERRF と MELAS ではそれぞれリジンとロイシンの転移 RNA 内に点変異が証明された。これら mtDNA 上の遺伝子異常を検出することは、従来からおこなわれてきた診断法に新たな方法を追加することになり、さらに正確で迅速な診断が得られるものと考えられる。本研究では、この遺伝子診断の臨床応用例を検討し、その意義および問題点について考察する。

II 対 象

国立精神・神経センター神経研究所微細構造研究部に登録されているミトコンドリア脳筋症患者（CPEO：40例、MERRF：6例、MELAS：40例）を対象とした。

III 方 法

生検筋からはフェノール／クロロホルム法で、末梢血からは塩析法で全 DNA を分離した。
①サザンブロッティング(SB)法：欠失の検出には制限酵素 PvuII で、MELAS の点変異検出には ApaI で処理した後に電気泳動しプローブにはヒト正常人の胎盤から調整した mtDNA を用いた。②PCR 法：プライマーは、両方向で合計約50個(平均して約650塩基対ずつ離れている)を作成した。欠失を PCR 法で検出するには、数種類のプライマーの組み合わせを用いて、欠失部位をはさむような組み合わせを捜し出すことが必要であった。さらに欠失断点を含んだ DNA 断片を制限酵素 HinfI や HaeIII で切断し、その結果得られた digestion profile を正常で得られるものと比較することで、欠失部位をより正確に推定した(PCR-RFLP 法)。またこの方法は、MELAS の変異を検出する際（変異部位を含む DNA 断片を制限酵素 ApaI で切断）にも、

MERRF の変異を検出する際（変異部位を含む領域を、NaeI という制限酵素の切断点ができるような mismatch プライマーを用いて増幅した後、同酵素で切断）にも用いた。③PCR 法を用いた直接塩基配列決定法：最初の PCR 産物から、非対称 PCR 法で一本鎖 DNA を増幅し、サングァー法で塩基配列を決定した。この方法で、CPEO における欠失部分の正確な位置を決定し、MERRF の点変異を検出した。

IV 結 果

(1) CPEO

SB 法で生検筋に欠失が証明されたのは、40例中31例（78%）であった。そのうち、29例は単一の欠失を、2例に多種類の欠失を認めた。これらの欠失は、すべて PCR 法でもその存在が確認でき、さらに単一欠失例22例については、PCR-RFLP 法でその欠失部位を推定した。直接塩基配列決定法で正確な欠失断点を決定した例では、断点周辺に direct repeats の存在している例が多く、この repeats 欠失の起こる機序と深く関わっていることが示された。生検腎を検討した2例では、骨格筋と同じ大きさ、部位の欠失が認められた。線維芽細胞を検討した2例のうち1例は SB 法でも PCR 法でも骨格筋と同一な欠失が確認できたが、もう一例は PCR 法でも確認できなかった。欠失 mtDNA は必ず正常 mtDNA と共存しており、SB 法で欠失 mtDNA の比率を算出すると、10-90%であった。

(2) MERRF

検査した6例全例に、直接塩基配列決定法および mismatch プライマーを用いた PCR-RFLP 法で変異が確認された。ミトコンドリアミオパチー以外の患者20人には、この変異は存在しなかった。この変異も、異常と正常が共存していることが示された。

(3) MELAS

検査した40例のうち、32例（80%）に塩基番号3,243の点変異が存在した。この変異は、正常な50人には一例も存在しなかった。また、異常な mtDNA は正常 mtDNA と必ず共存していた。変異 mtDNA の正常に対する比率は、SB 法で50%から92%と推定された。血液を用いて検査した5例では、骨格筋での変異の有無と血液でのそれは必ず一致した。

V 考 察

ミトコンドリア脳筋症は、臨床病理学的に CPEO, MERRF, MELAS の三大病型に分けられており、また一方で生化学的酵素異常から電子伝達系酵素複合体 I 欠損症やIV欠損症としても分

類されていた。その理由は、臨床病型と酵素異常とが一對一に対応しないためであり、二つの分類法の併用が余儀なくされていた。しかし本研究で明らかなように、臨床病型と mtDNA 異常とがほぼ一對一に対応する事実は、臨床的分類の有用性を示すとともに、ミトコンドリア脳筋症における遺伝子診断の大きな根拠になる。

CPEO においては、約70%の症例に大きな欠失が存在した。残りの症例は SB 法や PCR 法で確認できないほどの小さな欠失か、あるいは点変異が存在しているのかもしれない。また、ミトコンドリア内のほとんどの酵素が核 DNA にコードされていることを考えると、mt DNA には変異はなく、核 DNA 異常の存在する CPEO も否定できない。欠失 mtDNA の存在に関しては組織特異性と疾患特異性について考慮する必要がある。CPEO においては骨格筋に多量の欠失 mtDNA が検出されるのに対し、血液細胞や線維芽細胞には少量しか検出されないことが多い。一方、Pearson 病では、血液細胞に多量の欠失 mtDNA が存在する。おそらく両者は同じミトコンドリア異常による疾患と考えられるが、その違いは障害を受ける臓器・組織の差によると考えられる。また最近、筋緊張性ジストロフィー症や発作性ミオグロビン尿症の骨格筋で、欠失 mtDNA が見ついている。また、特発性心筋症患者の心筋やパーキンソン病患者の脳でも、PCR 法で欠失が証明された。さらに、正常老人の心筋や脳から欠失が見つかるという報告もある。したがって、mtDNA を調べ、それを CPEO の診断に利用するには、臨床症状や筋病理所見などと合わせ、総合的な検討が不可欠と思われる。

MERRF と MELAS の mtDNA 検査において、それぞれ100%と80%の症例に共通な点変異が存在した。その際、検査材料として血液細胞を用いても、生検筋を用いた場合と変異の存在に関しては差がなく、より迅速で簡便な検査法になると考えられた。

結論として、ミトコンドリア脳筋症における mtDNA 分析は、きわめて臨床的に有用性が高いといえる。今後は、これら mtDNA 異常が引き起こす生化学的変化の基礎的研究が発展し、ミトコンドリア脳筋症の病態の全容が明らかにされることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 葛 卷 暹

副 査 教 授 近 藤 喜 代 太 郎

ミトコンドリア脳筋症には、慢性進行性外眼筋麻痺(以下 CPEO)、福原病(以下 MERRF)、メラス(以下 MELAS)の3大病型があり、それぞれがある種のミトコンドリア(mt) DNAの異常をもつことがこの研究の冒頭で報告された。今回の研究は、CPEO40例、MERRF 6例、MELAS40例を対象としてそれらの遺伝子解析を行い、臨床診断におけるその有用性を示すことを目的として行われた。方法には、患者の生検筋から、一部の例では線維芽細胞や血液細胞からDNA分離し、サザンブロッティング法とよびPCR法(ミスマッチプライマーを用いる方法、制限酵素切断を加える方法、直接塩基配列法を含む)が用いられた。その結果、①CPEO40例中、31例に欠失 mtDNA が正常 mtDNA と共存する形で存在し、そのうち29例が単一欠失、2例が多重欠失であった。欠失はCPEO以外の病型には認められず、疾患特異的な遺伝子異常と考えられた。②MERRFでは、検査した6例全例に、塩基番号8344の点変異を認め、ミトコンドリア病以外の筋疾患患者20人の生検筋には一例も存在しなかった。③MELASでは、検査した40例のうち、32例(80%)の生検筋に、塩基番号3243の点変異(申請者らが世界に先駆けて発見)が存在し、正常な50人には一例も存在しなかった。血液を用いて検査した5例では、骨格筋での変異を有無と血液でのそれは、必ず一致した。以上の結果から、ミトコンドリア脳筋症の3大病型には、それぞれ特異性の高い mtDNA 異常の存在することが明らかにになり、mtDNA 検査が臨床的に高い有用性をもつことが実証された。今後この新しい診断法が広く応用され、ミトコンドリア脳筋症の診断がより迅速に、より確実に行われることになるものと考えられ、この研究の医学的価値は極めて高いと判断された。

なお、副査の葛巻・近藤両教授から方法論上の問題点や、臨床上的分類と分子病としての再構築の間の関係につき質問がなされ、さらに柿沼、長島、宮崎3教授にも討議を頂戴したが、いずれに関しても極めて順当且つ、正確な答えがされたものと判断された。