

博士（医学）須藤 章

学位論文題名

Leigh syndrome caused by mitochondrial DNA G13513A mutation: frequency and clinical features in Japan.

（ミトコンドリア DNA13513G→A 変異による Leigh 症候群：
日本における頻度と臨床的特徴）

学位論文内容の要旨

ミトコンドリア病は、細胞内のエネルギー産生に重要な小器官であるミトコンドリアの機能異常のために、脳や筋肉、心臓、腎臓など様々な臓器に障害をもたらす疾患である。小児においては、高乳酸血症、卒中様症状を伴うミトコンドリア病（MELAS）と、Leigh 症候群が代表的である。特に後者は、乳幼児期より精神運動発達遅延を示し、感染などを契機に発達停止、退行し、けいれんや呼吸障害等で早期に死亡する可能性のある重症な疾患であるが、その原因や治療法に関しては、未解明の点が多い。

ミトコンドリア病の原因としては、MELAS では主にミトコンドリア DNA の異常に起因することが判明しているが、Leigh 症候群では、核 DNA とミトコンドリア DNA の両方の異常が報告されているが、全容は明らかではない。ミトコンドリア DNA 13513G→A 変異は、MELAS の新しい変異として 1997 年に報告されたが、比較的頻度が高い変異であることが判明したため、Leigh 症候群についても同変異が存在するかを検索し、その変異を有する臨床的特徴を調査した。

＜対象・方法＞ 対象は、1990 年から 2000 年までの 11 年間に、Leigh 症候群を疑われ、筋肉または血液の DNA が採取された 84 例。Leigh 症候群の診断には、(1) 小児期発症で、発達遅延または退行を示す、(2) 血中または髄液中の乳酸値が 20 mg/dl をこえる、(3) 頭部 CT や MRI 検査で、基底核または脳幹に左右対称性の病変を認める、の 3 つの基準を満たしているものとした。ただし、筋生検が行われ、1% をこえる赤色ぼろ線維（RRF）や血管周囲のミトコンドリアの蓄積像（SSV）を認めたものは MELAS の可能性があるので除外した。ミトコンドリア DNA13513G→A 変異の検索には、PCR による DNA の増幅後、制限酵素断片長の違いを電気泳動で判別して行った。また、断片の濃度より変異率を計算した。

＜結果＞ Leigh 症候群と考えられた 84 例中 6 例（7%）に、ミトコンドリア DNA13513G→A 変異を認めた。いずれの患者にも、これまで Leigh 症候群で報告されている既知の変異（ミトコンドリア DNA8993,9176,8344,3243 の各変異）を認めなかった。その他の症例中 6 例に、ミトコンドリア DNA の 8993T→G または T→C 変異を、4 例に 9176T→C 変異を、2 例に 11777C→A 変異を、1 例に 8344A→G 変異を認めた。ミトコンドリア DNA13513G→A 変異を示した 6 例は、検査時 1~7 歳の小児（男 2 例、女 4 例）で、発症年齢は 9 カ月から 5 歳で、症状として、眼瞼下垂（5 例）や WPW 症候群などの心伝導障害（4

例) が多かった。検査所見として、全例で脛液乳酸値は、25~85mg/dl の高値を示し、画像上の脳幹病変も認めた。筋病理は、非特異的なミオバチー所見のみであり、チトクローム C 酸化酵素の欠損線維も認めなかった。筋肉中の変異ミトコンドリア DNA の割合は、42~70% (平均 59%) であったが、変異率と発症年齢、重症度との間に関連を認めなかった。ミトコンドリアの呼吸鎖酵素活性を 6 例中 4 例で測定したが、有意な低下を認めなかった。

＜考察＞ 過去の論文で、ミトコンドリア DNA13513G→A 変異が MELAS の病因であるとの根拠として、次の 5 点が上げられている。(1) 病変臓器で変異率が高い。(2) ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I のサブユニット蛋白である ND5 を構成する、生物進化上で高度に保存されているアミノ酸配列を変化させる。(3) 健常人に変異を認めない。(4) 単一筋線維での分析で、ミトコンドリア異常が明らかな赤色ぼろ線維のある筋線維での変異率が高い。(5) 同じアミノ酸変異をもたらす 13514A→G 変異でも、MELAS を発症する。過去のマウスの実験においても、NADH 脱炭酸酵素が ND5 遺伝子に強く依存していることが示されており、その異常を招く本変異がミトコンドリア病の原因となることは間違いないであろう。

本研究では、日本人の Leigh 症候群 86 例中 6 例 (7%) に、ミトコンドリア DNA13513G→A 変異を認めた。一方、これまで Leigh 症候群に最も多いミトコンドリア異常と考えられている 8993 変異も今回は同じ 6 例であった。それゆえ、13513 変異は Leigh 症候群においても、比較的高頻度に見られる変異であることが判明した。しかし、8993 変異は、これまでの報告では、Leigh 症候群の 15~20%を占めるという報告もあることから、現時点では 13513 変異は 2 番目の高頻度変異と考えた方が良いであろう。

13513 変異を有する患者は、乳児期前半に発症することの多い一般的な Leigh 症候群と比較すると、発症がやや遅く、症状も比較的軽い印象であった。また、眼瞼下垂や WPW などの心伝導障害を 6 例中 5 例で認めた。これらの症状は、他の変異によるミトコンドリア病ではあまり述べられていないため、この変異に出現しやすい臨床的特徴と考えられた。しかし症例数が少ないため、この変異と臨床的特徴との関連については、まだ明確なことは言えない。

これまでの報告とは異なり、今回の 6 例中 4 例の筋肉で調べた呼吸鎖酵素活性は正常であった。その理由としては、13513 変異が臓器によって変異率が異なる性質を示すため、筋肉では変異率が低く酵素活性が正常範囲となった可能性がある。過去に報告されたマウスの実験によると、ミトコンドリア DNA の変異が閾値に達するまで増加しないと、酵素活性は正常というデータがある。一方で、13513 変異では変異率が低くても Leigh 症候群を発症するという最近の報告もあり、変異率の酵素活性との関連については、今後の研究が待たれる。

13513 変異がなぜ、MELAS と Leigh 症候群の両方の疾患の原因となりうるのかは不明である。両者において変異率を検討した我々の他のデータでは、変異率に差を認めなかった。しかし、MELAS の患者には、赤色ぼろ線維などの筋病理所見を多く認めた。13513 変異は 2 つの表現系と関係している珍しい変異であるため、この変異について研究することは、一般的なミトコンドリア遺伝子変異と表現系との関係を考える上でも、重要である。

学位論文審査の要旨

主査教授 有賀 正

副査教授 佐々木 秀直

副査教授 筒井 裕之

学位論文題名

Leigh syndrome caused by mitochondrial DNA G13513A mutation: frequency and clinical features in Japan.

(ミトコンドリア DNA 13513G→A 変異による Leigh 症候群：
日本における頻度と臨床的特徴)

ミトコンドリア病は、細胞内のエネルギー産生に重要な小器官であるミトコンドリアの機能異常のために、脳や筋肉、心臓、腎臓など様々な臓器に障害をもたらす疾患である。小児においては、卒中様症状を伴う MELAS と、Leigh 症候群が代表的である。特に後者は、乳幼児期に発症し、基底核や脳幹が左右対称性に障害され特徴的な病理像を示す重症の脳変性疾患であるが、原因は未解明な点が多い。1997 年に報告された MELAS の新しい変異(ミトコンドリア DNA 13513G→A)が、これまで報告してきた tRNA 領域の点変異ではなく、呼吸鎖酵素を構成する重要な蛋白(複合体 I の ND5)のアミノ酸構造を変えることから、Leigh 症候群にも同変異を認めるかどうかを研究した。1990～2000 年に、インフォームド・コンセントのもとに筋肉または血液の DNA が採取され、国立精神神経センターに保存されている症例中で、Leigh 症候群と臨床的に診断確実な 84 例を対象とした。Leigh 症候群の診断基準としては、以下の4つ全てを満たすこととした。(1) 小児期発症であること (2) 精神運動発達遅延または退行に加えて他の神経症状を有すること (3) 血液または脛動脈の乳酸値が高値(>20mg/dl) (4) 頭部 MRI または CT 画像所見で基底核または脳幹の特徴的な病変を有すること。ただし、MELAS か Leigh 症候群か鑑別が困難なケースは、筋病理所見と主治医臨床診断を重視した。ミトコンドリア DNA の変異解析には、変異を含む領域を PCR で増幅させて制限酵素で切断し、電気泳動により判定した。プラスミドを用いて 100% 変異株と 100% 野生株を作り、変異率が 10% 每 10～90% にしたものを電気泳動することで、変異率とバンド濃度との関係をグラフ化した。このグラフをもとに、バンドの濃度から変異率を計算した。その結果、84 例中 6 例(7%) で、13513G→A 変異を認めた。同時に調べた他の変異は、8993T→G/C 変異を 6 例、9176T→C 変異を 4 例、11777C→A 変異を 2 例、8344A→G 変異を 1 例で認めた。13513G→A 変異は、ヘテロプラスミーを示し、筋肉での変異率は 42～70% であった。健康人コントロール 150 例および 3243A→G 変異を有する 120 例には同変異を認めなかった。13513G→A 変異を示した Leigh 症候群は、発症年齢が乳児期後半から幼児期であり 8993T→G 変異より遅く、全例で脳幹病変を伴い、6 例中 5

例で眼瞼下垂と WPW 症候群などの心伝導障害を認めた。筋病理では特異的な所見はなく、呼吸鎖酵素活性は調べた4例とも正常範囲であった。ただし、複合体 I 単独での酵素活性は測定しなかった。これまでの文献も合わせると、この変異がミトコンドリア病の原因となりうる根拠として、次の4点が上げられる。(1)罹患臓器で変異率が高い (2) ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の構成蛋白のうち重要な ND5 の進化上高度に保存されているアミノ酸を置換し、酵素活性を低下させて影響を与える。そのため、同じアミノ酸変異をもたらす 13513A →G 変異でも、MELAS を発症する (3) 健康人に変異を認めない (4) MELAS 症例の単一筋線維での分析で、ミトコンドリア異常が明らかな赤色ぼろ線維のある筋線維での変異率が高い。本変異の表現型が、MELAS と Leigh 症候群の両方を示す理由としては、単純な変異率だけでは説明が困難で、未解明の他の因子(核遺伝子など)の関与が推察された。今回の研究により、Leigh 症候群にも 13513G→A 変異を認め、その頻度が 8993 変異と同程度に比較的高いことが初めて示された。臨床的にも、これまで良く知られた 8993T →G 変異とは異なる特徴を有していた。また、Leigh 症候群のおよそ2割が既知のミトコンドリア DNA の変異で説明可能となり、原因の解明が進んだ。

公開発表に際し、副査の筒井裕之教授から症例の心筋収縮力、WPW 症候群をきたす機序等につき質問をされた。また、副査の佐々木秀直教授からは、髓液乳酸値が高いことの理由、ミトコンドリア病の共通概念などの質問があった。主査の有賀正教授からは、母親の表現型と変異率について 8993 変異との違い、変異率が年齢とともに増加して発症する可能性、罹患臓器とミトコンドリア DNA の変異率との関係、生化学的・遺伝学的側面から疾患分類の変更の必要性がないか等の質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は実験データや、文献をもとに、適切な回答をなし得た。質疑応答の時間は、約 15 分であった。なお、出席者はおよそ 10 名であった。

この論文は、未解明な点が多かった Leigh 症候群に新たなミトコンドリア DNA の変異が原因となり、その頻度が比較的高いことを示した点、特徴的な臨床像を示すことを明らかにした点で高く評価された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、これまでの豊富な臨床研究発表なども併せて、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。