

学位論文題名

[¹¹C] flumazenil PET を用いた Angelman 症候群における GABA_A 受容体機能に関する研究

学位論文内容の要旨

Angelman 症候群(AS)は、重度の精神遅滞、表出言語中心の言葉の遅れ、ぎこちない動き、容易に引き起こされる笑いを主要な症状とする遺伝性疾患である。AS は、E6-AP ubiquitin-protein ligase 遺伝子(*UBE3A*)の機能的な欠損が原因である。脳内では、*UBE3A* 遺伝子は刷り込みを受けており、母由来対立遺伝子のみ発現している。しかし、*UBE3A* 遺伝子の機能と AS の病態の詳細は、未だ解明されていない。患者の 7 割は、*UBE3A* を含む母由来 15q11-q13 領域の 4Mb の欠失が原因である。15q11-q13 領域は、刷り込みを受けていない遺伝子を含み、gamma-aminobutyric acid type A (GABA_A)受容体β3、α5、およびγ3 をコードする *GABRB3*、*GABRA5*、*GABRG3* も含まれている。これらの非刷り込み遺伝子は、非欠失型 AS では正常に発現されているが、欠失型では、その発現量が低下していると考えられる。刷り込みを受けていない GABA_A 受容体サブユニット遺伝子の発現低下が、欠失型 AS 患者のより重篤な症状を引き起こしている可能性が考えられる。本研究では、AS 患者における GABA 系の機能障害を検討するため、アンタゴニストである [¹¹C] FMZ を用いて、AS 患者および正常対照に PET 検査を施行し、GABA_A 受容体の脳内分布を検討した。

対象と方法

本研究は、遺伝学的に診断された 7 名の AS 患者を対象とした。5 名(患者 1-5)は、欠失型で、2 名は男性、3 名は女性、年齢は 6-28 歳であった。患者 6 は、刷り込み変異(ID)であり、患者 7 は、エクソン 9 の一塩基(G)欠失(910delG)の *UBE3A* 変異であった。患者 6 を除いて全例でてんかんを持ち、5 例(患者 1-5)は、バルプロ酸を内服し、患者 7 はバルプロ酸およびエトサキシミドを内服していた。患者 6 は、抗けいれん剤治療は受けていなかった。4 名の対照は、健康男性成人で年齢は 22 から 29 歳だった。全員右利きで、神経精神学的異常を有する者はいなかった。脳 MRI 上、異常は認めなかった。

PET は、ECAT EXACT HR+ scanner (Asahi-Siemens, Tokyo, Japan)を用いて撮像した。患者においては、撮像はチオペンタールによる鎮静下に行った。 [¹¹C]FMZ はそれぞれの患者に 6MBq/kg 静脈内投与した。非侵襲的に結合能(binding potential: BP)を調べるために、橋を基準とした reference tissue compartment model を用いた。診断的および PET データの重ね合わせのため 1.5T, Magnetom Vision MRI system (Siemens AG, Erlangen, Germany)を用いて MRI を撮像した。PET と MRI データは、Unix-based workstation (Sun Ultra 30; Sun Microsystems)を用いて重ね合わせた。関心領域は、直径 10mm の円形で抽出した。データは平均±標準偏差で示した。FMZ 結合能(BP)は、それぞれの脳部位において、7 例の患者それぞれを対照と比較し、ANOVA(nonparametric Kruskal-Wallis test および Dunn's post test)を用いて解析した。有意差は $P<.05$ に設定した。

結果

AS 患者の $[^{11}\text{C}]$ FMZ の BP は、対照と比較して概ね上昇していた。患者 1 では、BP は前頭葉および頭頂葉($P<0.001$)と側頭葉($P<0.05$)で有意に上昇していた。患者 2 では、BP は前頭葉、頭頂葉、後頭葉($P<0.001$)で有意に上昇していた。患者 3 および 7 では、BP は前頭葉、頭頂葉、側頭葉および後頭葉($P<0.001$)と小脳半球および虫部($P<0.05$)で有意に上昇していた。患者 4 では、前頭葉および頭頂葉($P<0.05$)で有意に上昇していた。一方、患者 5 および 6 では、すべての脳部位で BP の有意な上昇は認めなかった。また、全ての患者で、対照と比較して BP が有意に低下している部位はなかった。BP の有意な上昇は、欠失型小児患者および *UBE3A* 変異患者で認め、欠失型成人患者のうち 1 名と ID 患者では、有意な上昇は認めなかった。

考察

本研究では、いずれのタイプの AS 患者においても、対照と比較して BP の有意な低下は認めなかった。欠失型の小児と成人 1 名および *UBE3A* 変異患者において、いくつかの脳部位で BP の有意な上昇を認めた。

Gabrb3 ヘテロノックアウトマウス($\beta 3^{+/-}$)では、 GABA_A 受容体の総結合能に有意な低下は見られない。しかし、培養 $\beta 3^{+/-}$ ニューロンにおいては $\beta 3$ mRNA の有意な減少があり、 GABA に対する反応性が 25%低下していたという報告がある。これらの結果は *Gabrb3* のヘテロ欠失は $\beta 3$ サブユニットの低下を引き起こすが、その他のサブユニットが代償的に増加することで、 GABA_A 受容体の総結合能は保たれること、そして、サブユニット構成が変化することにより、全体としての受容体機構が障害を受ける可能性を示している。本研究では、 $\beta 3$ サブユニットの発現は、 $\beta 3^{+/-}$ マウスと同様に低下していたとしても、結合可能な GABA_A 受容体の数は、欠失型患者で低下していないと推測した。 $\beta 3$ サブユニットの発現の低下は、マウスと同様に他のサブユニットの発現増加で代償されている可能性が考えられる。

最近の研究で、 GABA 系は、脳の発達の制御において重要な役割を持っていることが示され、特に胎生期および早期新生児期において、神経栄養因子としての働きが報告されている。発達の臨界期では、 GABA_A 受容体サブユニット遺伝子が空間的および時間的に正確に制御されることが、非常に重要であると考えられる。 GABA 系の多様性を考慮すると、欠失型 AS 患者における GABA 系の機能障害は、 GABA_A 受容体の総発現量の低下のみで単純に説明できないと考えられる。むしろ、AS 患者には発生段階に出現する GABA 機能障害が存在し、それは、 GABA_A 受容体構成の異常に起因するとの仮説を提唱したい。

UBE3A 変異患者は、15q11-q13 領域に存在する GABA_A 受容体サブユニット遺伝子に異常はなく、これらの遺伝子は、その表現型に影響していないと考えられてきた。しかし、近年 *UBE3A* は、Plic 蛋白と相互作用があることが報告された。Plic-1 は、 $\beta 3$ を含む GABA_A 受容体に選択的に結合し、細胞膜上の GABA_A 受容体数を制御していると考えられる。母性 *Ube3a* 欠失成熟マウスでは、 $\beta 3$ mRNA レベルは正常であるが、発達の異常が認められる。本研究では、*UBE3A* 変異患者において、大脳皮質および小脳で BP の有意な上昇を認め、何らかの GABA 機能障害を有することが示唆された。一方、ID 患者は、小児であるにも関わらず、BP の上昇を認めなかった。このことから、ID 患者も GABA_A 受容体発現の異常を有することを否定できず、*UBE3A* 変異や片親性ダイソミー同様、ID 患者のより大規模な研究を要すると考えられた。

本研究は、AS 患者では、結合可能な GABA_A 受容体数が増加していることを報告した。これらの結果は、従来の概念と異なるものであり、AS 患者において GABA_A 受容体サブユニットの制御異常が発生段階で起きているという新しい概念を提唱した。また、本研究によって、 GABA_A 受容体機能研究における $[^{11}\text{C}]$ FMZ PET の解釈の重要な方向付けがなされた。

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 玉 木 長 良

学 位 論 文 題 名

[¹¹C] flumazenil PET を用いた Angelman 症候群における GABA_A 受容体機能に関する研究

Angelman 症候群(AS)は、重度の精神遅滞、表出言語中心の言葉の遅れ、ぎこちない動き、てんかんなどを主要な症状とする遺伝性疾患である。AS は、E6-AP ubiquitin-protein ligase 遺伝子(*UBE3A*)の機能的な欠失が原因である。脳内では、*UBE3A* 遺伝子は刷り込みを受けており、母由来対立遺伝子のみ発現しているが、*UBE3A* 遺伝子の機能と AS の病態の詳細は、解明されていない。患者の7割は、*UBE3A* を含む母由来15q11-q13領域の欠失が原因である。15q11-q13領域は、刷り込みを受けていない遺伝子を含み、gamma-aminobutyric acid type A (GABA_A)受容体β3、α5、およびγ3をコードする *GABRB3*、*GABRA5*、*GABRG3* も含まれている。刷り込みを受けていない GABA_A 受容体サブユニット遺伝子の発現低下が、欠失型 AS 患者のより重篤な症状を引き起こしている可能性が考えられている。本研究では、AS 患者における GABA 系の機能障害を詳細に検討するため、アンタゴニストである [¹¹C] flumazenil (FMZ)を用いて、さまざまな遺伝背景の AS 患者および正常対照に PET 検査を施行し、GABA_A 受容体の脳内分布を検討した。

対象は、遺伝学的に診断された7名の AS 患者で、5名(患者1-5)は、欠失型で年齢は6-28歳であった。患者6は、刷り込み変異(ID)であり、患者7は、エクソン9の一塩基(G)欠失(910delG)の *UBE3A* 変異であった。患者6を除いて全例てんかんを持ち、5例(患者1-5)は、バルプロ酸を内服し、患者7はバルプロ酸およびエトサキシミドを内服していた。4名の対照は、健康男性成人で年齢は22-29歳だった。PET は、ECAT EXACT HR+ scanner (Asahi-Siemens, Tokyo, Japan)を用いて撮像した。患者においては、撮像はチオペンタールによる鎮静下に行った。非侵襲的に結合能(binding potential: BP)を調べるために、橋を基準とした reference tissue compartment model を用いた。診断的および PET データの重ね合わせのため 1.5T, Magnetom Vision MRI system (Siemens AG, Erlangen, Germany)を用いて MRI を撮像した。PET と MRI データは、Unix-based workstation (Sun Ultra 30; Sun Microsystems)を用いて重ね合わせた。FMZ の BP は、それぞれの脳部位において、7例の患者それぞれを対照と比較し、ANOVA(nonparametric Kruskal-Wallis test および Dunn's post test)を用いて解析した。有意差は $P<.05$ に設定した。

結果として、AS 患者の $[^{11}\text{C}]$ FMZ の BP は、対照と比較して有意に低下している部位はなく、むしろ上昇している部位を認めた。患者 1 では、BP は前頭葉および頭頂葉($P<.001$)と側頭葉($P<.05$)で有意に上昇していた。患者 2 では、BP は前頭葉、頭頂葉、後頭葉($P<.001$)で有意に上昇していた。患者 3 および 7 では、BP は前頭葉、頭頂葉、側頭葉および後頭葉($P<.001$)と小脳半球および虫部($P<.05$)で有意に上昇していた。患者 4 では、前頭葉および頭頂葉($P<.05$)で有意に上昇していた。一方、患者 5 および 6 では、すべての脳部位で BP の有意な変化は認めなかった。すなわち、欠失型患者および *UBE3A* 変異患者で BP の有意な上昇を認め、欠失型成人患者のうち 1 名と ID 患者では、有意な上昇は認めなかった。

以上の結果は、Holopainen らの先行研究と異なるものであった。一方、*Gabrb3* ヘテロノックアウトマウス($\beta 3^{+/}$)では、 $\beta 3$ サブユニットの発現低下を引き起こすが、 GABA_A 受容体の総結合能は保たれていることが示されており、我々の結果を支持するものと考えられた。最近の研究で、GABA 系は、脳の発達の制御において重要な役割を持っていることが示され、特に胎生期および早期新生児期において、神経栄養因子としての働きが報告されている。発達の臨界期では、 GABA_A 受容体サブユニット遺伝子が空間的および時間的に正確に制御されることが、非常に重要であると考えられる。GABA 系の多様性を考慮すると、AS 患者における GABA 系機能障害は、 GABA_A 受容体の総発現量の低下のみで単純に説明できるものではなく、発生段階における神経回路網形成障害に関与する可能性が考えられた。

公開発表に際し、副査の佐々木秀直教授から、AS の表現型への GABA_A 受容体の関与、PET の撮像方法、Holopainen らの先行研究と本研究との相違の原因に関する質問があった。次いで副査の玉木長良教授から AS における神経細胞の脱落の有無、てんかん焦点としての PET 所見に関連して AS のてんかんの有無による PET 所見の相違に関する質問があった。また主査の有賀正教授から、AS の GABA 機能を直接的に調べる手法の有無、対照と比較して GABA_A 受容体の分布に有意差を認めた部位の患者間での共通性に関する質問があったが、いずれの質問に対しても申請者は妥当な回答をした。

本研究は AS 患者の GABA 系機能障害は発生段階における神経回路網形成障害に関与するという新しい概念を提唱した点で高く評価され、今後さらなる症例の蓄積から AS 患者における GABA 系機能障害の詳細な知見が得られることも期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。