
原 著

紀伊半島及びその周辺地域における
筋萎縮性側索硬化症患者の Cu/Zn SOD
遺伝子異常に関する研究

新潟大学脳研究所神経内科学教室（主任：辻 省次教授）

菊 川 公 紀

A Missense Mutation in the Cu/Zn SOD Gene in Patients with
Amyotrophic Lateral Sclerosis from the Kii Peninsula
and its Vicinity, Japan.

Koki KIKUGAWA

*Department of Neurology, Brain Research Institute,
Niigata University, Niigata
(Director: Prof. Shoji Tsuji)*

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disorder that involves upper and lower motor neurons. The high prevalence of ALS in the natives of the Kii Peninsula of Japan as well as in the indigenous Chamorro people of Guam have been attracting intensive attention as to the pathogenesis of ALS. Since the relatively high incidence of familial onset of the disease in the Kii Peninsula and Guam was reported, a specific genetic background seems to be associated with the development of ALS.

Recently, mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) gene (SOD1) on human chromosome 21q22.1 have been identified in ~20% of cases of familial ALS, most commonly inherited as an autosomal dominant trait. With this background, I investigated mutational analyses of the SOD1 of 23 patients (3 familial cases and 20 sporadic cases) with ALS from the Kii Peninsula and its vicinity.

In two of the 23 patients, an identical missense mutation (substitution of Thr for

Reprint requests to: Koki KIKUGAWA,
Department of Neurology, Brain Research
Institute, Niigata University
Asahimachi-dori 1, Niigata
951-8585, JAPAN

別刷請求先：〒951-8585 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所神経内科 菊川公紀

Ile 113) in exon 4 was detected as a heterozygous state. Neuropathological examination of one of the two cases with this mutation revealed that a lot of conglomerate inclusions, which suggests accumulation of a large amount of neurofilaments, in the remaining neurons in anterior horn of the spinal cord.

The Ile 113 Thr mutation in SOD1 has been identified in some familial as well as sporadic cases with ALS, as a mutation with a low penetrance. This mutation has been reported to be associated with formation of neurofibrillary tangles in a English family, which is a characteristic feature of ALS in the Kii Peninsula and Guam. These results suggest that the Ile 113 Thr mutation is relatively prevalent mutation in this area, and potentially results in accumulation of neurofilament. Since the penetrance associated with this mutation is low, we should thoroughly investigate this mutation in this area including those with apparently sporadic ALS. Furthermore, the mechanism of accumulation of neurofilaments in motor neurons caused by Ile 113 Thr mutation may give a clue that contributes to the elucidation of the mechanism of neurodegeneration in ALS.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis, high incidence area, Cu/Zn superoxide dismutase, missense mutation, low penetrance, neurofilament
筋萎縮性側索硬化症, 多発地帯, スーパーオキシドジスムターゼ, ミスセンス変異, 低浸透率, ニューロフィラメント

1. はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は, 上位運動ニューロン及び下位運動ニューロンに選択的かつ系統的な変性を生じ, 約3~5年の経過で呼吸不全をきたす致死的な神経変性疾患であるが, 未だにその病因は不明である. ALS の有病率は10万人に4~6人と世界各地ではほぼ一定しているが, Guam 島, 紀伊半島, ニューギニアなどは本症の多発地帯として有名である¹⁾²⁾. 紀伊半島は半島全体でも ALS の有病率が数倍高いといわれているが, 中でも古座川地区, 穂原地区で特に有病率が高く, 古くから「足萎え病」として知られていた. 穂原地区では遺伝形式ははっきりしないものの家族内発症も高率と言われ, また同一家系内に ALS の他に Parkinsonism-dementia complex を認める家系が混在している. Guam 島の Chamorro 族でも同様に ALS と Parkinsonism-dementia complex の患者が同一家系内に認められることから紀伊半島と Guam 島の ALS の類似性が指摘されてきた. さらに病理学的にも紀伊半島及び Guam 島の ALS は一般的な ALS には認められない neurofibrillary

tangle や錐体外路系の変性を認めるなどの共通した特徴がある³⁾.

これらの地域の ALS の成因については, 多発地帯ということで, 環境要因の調査が行われ, 土壌, 飲水中の低 Ca, 低 Mg, 高 Al, 高 Mn など金属イオン含有量の異常などが指摘されているが未だ不明であると言わざるを得ない¹⁾. 一方, 両多発地域とも遺伝形式ははっきりしないが, 家系内発症が認められていることから何らかの遺伝負荷があることも考えられる.

近年, 分子遺伝学的な研究により, 常染色体優性遺伝性家族性 ALS の15~20%は, 21番染色体長腕に連鎖し, ここに存在する Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) 遺伝子 (SOD1) が原因遺伝子であることが発見された. 現在までに約60種類の変異が同定され, そのほとんどは一塩基置換のミスセンス変異である⁴⁾⁵⁾. 本研究では, 以上のことを背景にして紀伊半島及びその周辺地域における ALS 患者について SOD1 変異の有無を検討した.

2. 対 象

紀伊半島及びその周辺地域出身の ALS 患者23例に



図1 ALS患者の出身地

ついて SOD1 変異の検索を行った。23例の内訳は互いに関連のない家族性 ALS 患者3家系3例、孤発例20例である。ALS 患者の出身地を図1に示す。

3. 方 法

SOD1の点変異の有無を検索するために、まず5つの全エクソンを各々の splice junction を含むように polymerase chain reaction (PCR) で増幅し、single strand conformational polymorphism (SSCP) 法⁶⁾で解析を行い、さらに移動度に異常が認められた PCR 産物についてはサイクルシーケンス法で直接シーケンスを行い、全塩基配列を決定した。

1) SSCP 法

患者白血球または凍結組織よりゲノム DNA を常法に従い単離した後、Figlewicz らの方法に準じて SOD

1の splice junction を含む5つのエクソン部分についてゲノム DNA 500ng をテンプレートして、PCRにより増幅した。この際 [α -³²P] dCTP を用い、Internal label 法で PCR 産物をラベリングした⁷⁾。PCR に用いたオリゴヌクレオチドプライマーはすでに報告されているヒト SOD1 の塩基配列をもとに合成した (Exon: sense 5'-GAGACGGGGTGCTGGTTT GC-3', antisense 5'-GCCCTTGCCTTCTGCTCGA A-3', Exon 2: sense 5'-CAGCTGTTTTCTTTGT TCAG-3', antisense 5'-CACCTGCTGTATTATC TCCAA-3', Exon 3: sense 5'-TATAAATAGGCTG TACCAGTGC-3', antisense 5'-TGGGAGCAGGG TTTACATGAG-3', Exon 4: sense 5'-GGCATG TTGGAGACTTGGGCA-3', antisense 5'-TGGAT CTTAGAATTCGCGAC-3', Exon 5: sense 5'-GT

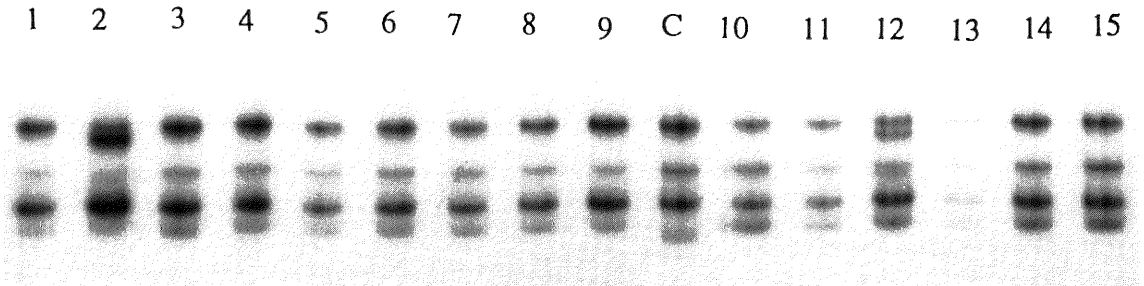


図2 SOD1 exon 4における SSCP の結果
2番, 12番に移動度の変化を認める。
C は positive control

AGTGATTACTTGACAGCCCA-3', antisense 5'-AACAGATGAGTTAAGGGGCCT-3'⁸⁾。

また, PCR 装置は TaKaRa PCR Thermal Cycler MP を, DNA ポリメラーゼは TaKaRa TaqTM を用いた。PCR の条件は最初に変性94℃ 2分を行った後, 変性94℃ 1分, アニール58℃ 1分, 反応72℃ 1分を32サイクル行い, 最後に反応72℃ 6分を行った。

[α -³²P] dCTP でラベリングされた PCR 産物は ATTO ジェノケンサーを用いて, 5%ポリアクリルアミドゲル (10%グリセオール含) に4℃条件下で, 10W, 14時間電気泳動し, コダック社 Bio Max を用いてオートラジオグラフィーを行った。

2) 塩基配列解析

SSCP 法により移動度に異常が認められた DNA 断片は, Nakano らの方法⁹⁾ に準じて, サイクルシーケンス法による直接塩基配列決定法で全塩基配列を決定し, 変異を同定した。サイクルシーケンスには精製した PCR 産物をテンプレートして蛍光 (FITC) ラベルしたオリゴヌクレオチドプライマー (Exon 1: 5'-TTGCGTCGTAGTCTCCTGCAG-3', Exon 2: 5'-TTC CACTCCCAAGTCTGGCTG-3', Exon 3: 5'-TGA ACTCCAGAAAGCTATCG-3', Exon 4: 5'-CGC GACTAACAAATCAAAGTGAAG-3', Exon 5: 5'-TTGGGTATTGTTGGGAGGAGG-3') を用い, DNA ポリメラーゼには Thermo Seaquenase (アマシャム-ファルマシア社) を使用した。塩基配列の解析に, 自動 DNA シークエンス解析機 (日立 SQ 3000) を用いた。

4. 結 果

1) SOD1 変異

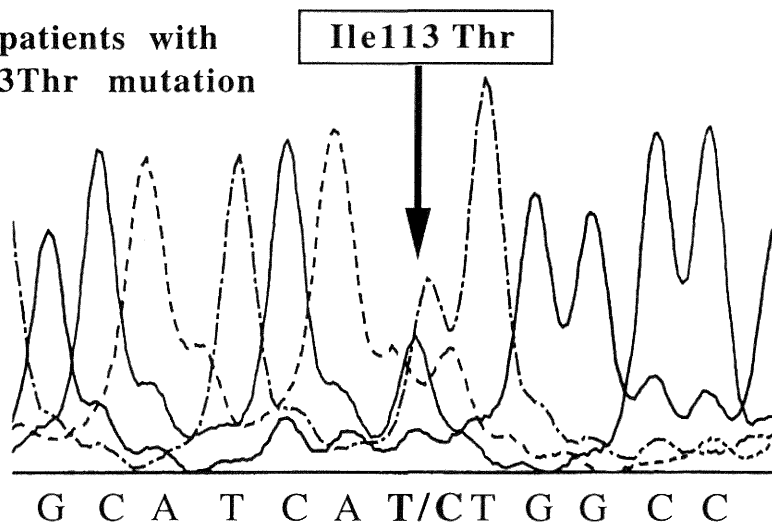
23例の ALS 患者のうち, SSCP 法により2例でエクソン4の移動度の異常が認められ (図2), 直接塩基配列決定法の結果, 113番イソロイシンがスレオニンに置換 (Ile 113 Thr) するヘテロ接合体のミスセンス点変異を同定した (図3)。この変異は, 他の地域の家族性及び孤発性 ALS 患者32例や正常対象30例については認めなかった。

2) Ile 113 Thr 症例の臨床所見

症例1 (図4-a) は69歳男性。紀伊半島北部の三重県名張市出身。幼少期に紀伊半島東部の津市に転居した。24歳時母方のいとこと結婚し, その妻は48歳で ALS を発症。56歳時, 呼吸不全で死亡している。家系内には母方の祖母が痴呆となり, 94歳で死亡した他は神経筋疾患の患者はいない。彼らの子供は41歳と35歳だが, 現在神経及び筋に異常はなく, SOD1 変異の有無については解析を行っていない。患者は68歳時に右上肢の筋萎縮及び筋力低下で発症し, 針筋電図で四肢及び舌に神経原性変化を認めた。その後症状は急速に進行し, 四肢に筋萎縮及び筋力低下を生じて発症1年後に呼吸不全で死亡した。

病理学的検索では脊髓前角の萎縮と高度の運動ニューロンの脱落を認めた。また, 後索の変性が軽度存在した。さらに脊髓前角の残存運動ニューロンには, いわゆる conglomerate inclusion を多数認め, spheroid も多数認めるなど, 著明な neurofilament の蓄積を示唆する所見を認めた (図5)。しかし, neurofibrillary tangle はなく, Bunina 小体も認めなかった。

a) The patients with
Ile113Thr mutation



b) Normal control

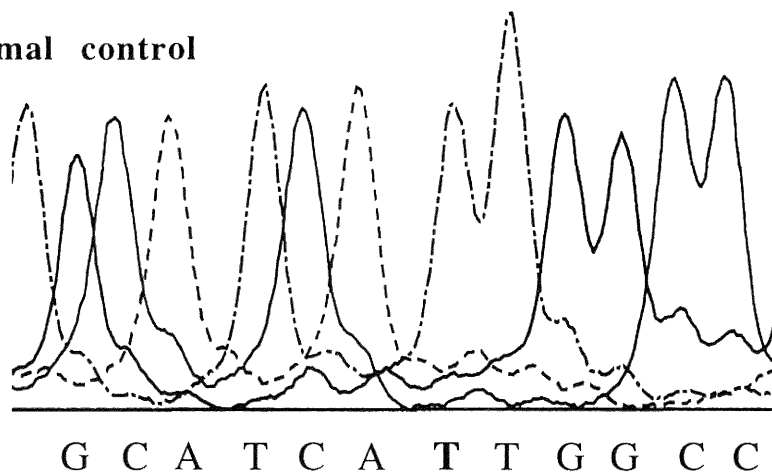


図3 直接塩基配列決定法で認めた SOD 1 exon 4 の Ile 113 Thr 変異

a) Ile¹¹³ (ATT) → Thr (ACT) 変異.

野生型アリルの 'Thymine' とともに変異アリル 'Cytosine' のピークを認める.

b) normal control

症例2 (図4-b) は60歳男性. 紀伊半島周辺の寝屋川市で生まれた. 詳細な家系調査を行ったが, 同一家系内に ALS 患者はおらず, 孤発例と考えられた. 患者は左下肢の筋萎縮と筋力低下にて発症し, 徐々に四肢に拡大, 発症2年後には四肢の筋力低下のため歩行不能となった. 四肢筋力低下がさらに進行し, 67歳時, 肺炎のため死亡した. 全経過7年であった. 剖検は行われなかった.

5. 考 察

今回互いに関連のない2家系2症例(1症例は孤発例)で発見した Ile 113 Thr 変異は, 本邦では初めての報告であるが, 外国では過去に報告例があり¹⁾¹⁰⁾⁻¹³⁾, 最近, 北米カナダ, スコットランド, バングラデシュなど様々な人種のいくつかの家系と孤発例でも認められている (T. Siddique, personal communication). Suthers

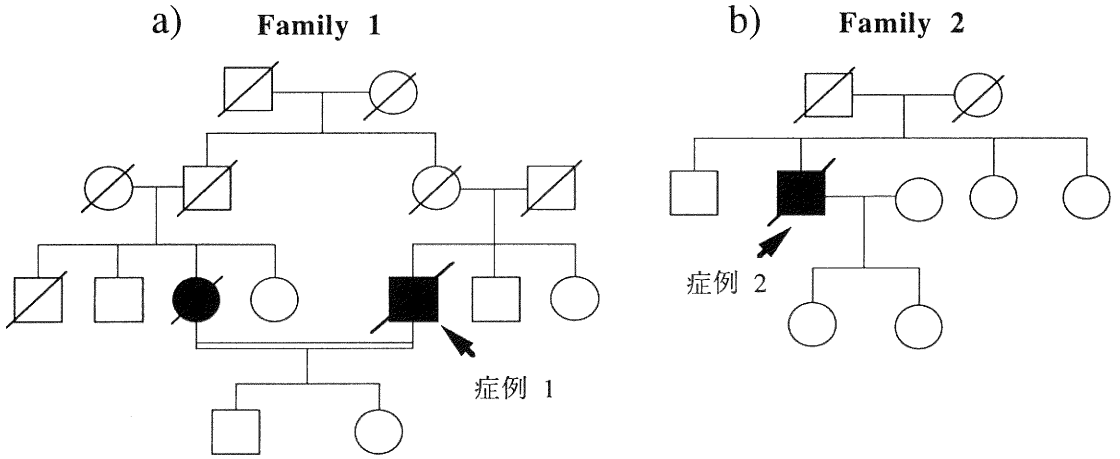


図4 Ile 113 Thr 変異を有する 2 症例の家系図. 黒塗は発症者
a) 症例 1 の家系図, b) 症例 2 の家系図

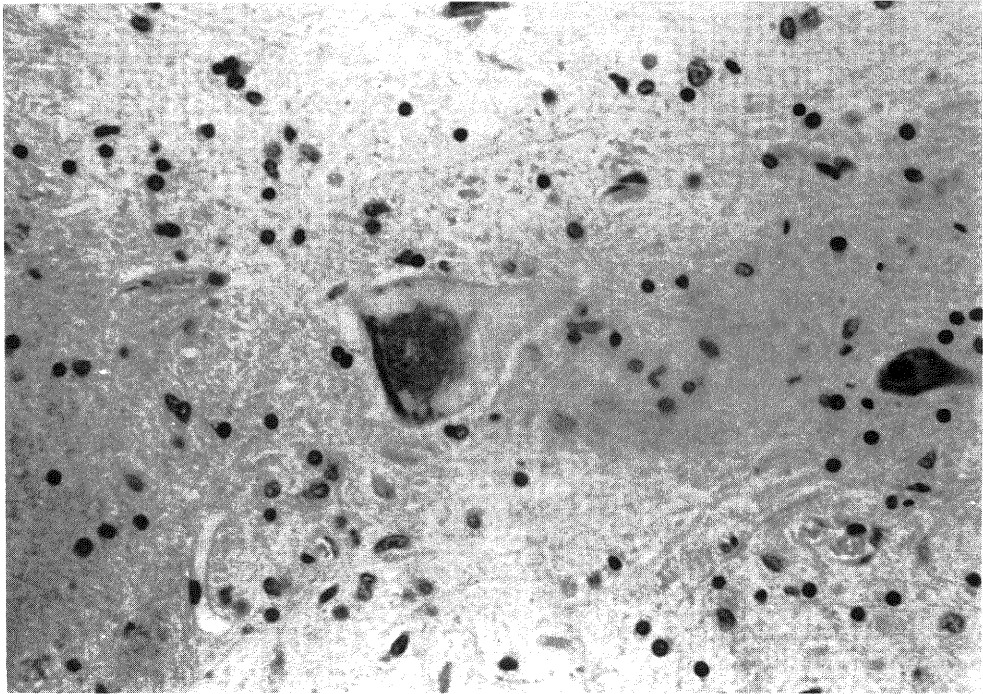


図5 腰髄前角. 著明な神経細胞の脱落と conglomerate inclusion を認める.
(Hematoxylin-eosin 染色×160)

らは、Ile 113 Thr 変異が低浸透率を示すことを報告しており¹⁰⁾、一方、Jones らはスコットランドの孤発性 ALS 症例56例中3例にこの変異を認めたことを報告している¹¹⁾。これらの事実は、Ile 113 Thr 変異は、浸透率の極めて低い変異であることを示している。症例1のいところで ALS を発症した妻は、SOD1 解析を行っていないものの、おそらく症例1と同じ変異が存在していたと考えられる。しかし、症例1、2双方の家系はそれ以外に ALS 患者はおらず、日本人においても Ile 113 Thr 変異は同様に浸透率が低い変異であると考えられる。

症例1において残存した脊髄前角細胞にニューロフィラメントの大量の蓄積を示唆する多数の conglomerate inclusion を認めたが、興味深いことに、Rouleau らも Ile 113 Thr 変異を有する家族性 ALS の症例で同様にニューロフィラメントの著しい蓄積を認めたことを報告している¹²⁾。また、Orrell らは、Ile 113 Thr 変異を有する家族性 ALS の女性患者において淡蒼球、黒質、オリブ下核のニューロンに neurofibrillary tangle 様の所見を認めている¹³⁾。これらの tangle は Alzheimer 病や紀伊半島 ALS 患者で観察される特徴的な tangle とは少し異なり、直鎖状の構造をとり、ユビキチン反応性の封入体を認めた。これらの報告は、今回発見した Ile 113 Thr 変異がニューロフィラメントの蓄積に関与しうる、特徴ある変異である可能性を示唆している。また、Ile 113 Thr 変異が低浸透率であること、すなわち低頻度で家系内発症を認め、病理学的に neurofibrillary tangle を認めうることは、紀伊半島や Gaum 島の ALS と合致する所見であり興味深い。

さらに、紀伊半島及びその周辺地域において、全く関連のない家系の ALS 患者が Ile 113 Thr 変異を有し、この地域の多くの ALS 患者を解析しても他の変異は認めなかったという結果から、この Ile 113 Thr 変異は、日本の他の地域に比してこの地域では比較的高頻度の変異である可能性を示唆している。

以上のことから、Ile 113 Thr 変異は、孤発性の ALS 患者であっても、出身地がこの地域に含まれる症例では特に注意して検索すべき変異であると思われる。また、通常の孤発性 ALS では運動ニューロンの変性初期像として、軸索近位部に spheroid と呼ばれる構造物が出現するとされるが、その本態はリン酸化ニューロフィラメントの蓄積であり、Ile 113Thr 変異によるニューロフィラメントの蓄積のメカニズムが解明されれば孤発性 ALS の運動ニューロンの変性メカニズムの解明に

も寄与する可能性がある。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました辻 省次教授に心から感謝申し上げます。また、終始御指導いただきました犬塚 貴講師、中野亮一助手、三重大学神経内科 葛原茂樹教授、和歌山県立医大神経病研究部 吉田宗平講師、新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野 崎村建司教授に深く御礼申し上げます。また、検体の収集にご協力頂きました三重大学神経内科 成田有吾講師、小久保康昌先生、佐々木良元先生、伊藤伸朗先生、真鈴川聡先生、国保ささみ病院 柳川卓弥先生、越道脳神経外科 越道進悟先生、新宮市立病院 古田一朗先生、住友病院神経内科 宇高不可思先生、井上治久先生の各先生方に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Shiraki, H. and Yase, Y.: Amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 22. Amsterdam: Elsevier Science, pp.353~419, 1975.
- 2) Hirano, A., Malamud, N. and Kurland, L.T.: Parkinson-dementia complex, an endemic disease on the island of Guam. *Neurology*, 84: 662~679, 1961.
- 3) Yase, Y.: The pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 2: 292~296, 1972.
- 4) Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.-X., Rahani, Z., Krizus, A., McKenna-Yasek, D., Cayabyab, A., Gaston, S.M., Berger, R., Tnznzi, R.E., Halperin, W.-Y., Bird, T., Deng, G., Mulder, D.W., Smyth, C., Laing, N.G., Soriano, E., Pericak-Vance, M.A., Haines, J., Rouleau, G.A., Gusella, J.S., Horvitz, H.R. and Brown Jr, R.H.: Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362: 59~62, 1993.
- 5) Deng, H.-X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W.-Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R.P., Warner, C., Deng, G., Soriano, E., Smyth, C., Parge, H.E., Ahmed.

- A., **Roses, A.D., Hallewell, R.A., Pericak-Vance, M.A. and Siddique, T.:** Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase. *Science*, **261**: 1047~1051, 1993.
- 6) **Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T.:** Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. USA*, **86**: 2766~2770, 1989.
- 7) **Figlewicz, D.A., Garruto, R.M., Krizus, A., Yanagihara, R. and Rouleau, G.A.:** The Cu/Zn superoxide dismutase gene in ALS and parkinsonism-dementia of Guam. *NeuroReport*, **5**: 557~560, 1994.
- 8) **Levanon, D., Lieman-Hurwitz, J., Dafni, N., Wigderson, M., Sherman, L., Bernstein, Y., Laver-Rudich, Z., Danciger, E., Stein, O. and Groner, Y.:** Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. *EMBO J*, **4**: 77~84, 1985.
- 9) **Nakano, R., Sato, S., Inuzuka, T., Sakimura, K., Mishina, M., Takahashi, H., Ikuta, F., Honma, Y., Fujii, J., Taniguchi, N. and Tsuji, S.:** A novel mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**: 695~703, 1994.
- 10) **Suthers, G., Laing, N., Wilton, S., Dorosz, S. and Waddy, H.:** "Sporadic" motoneuron disease due to familial SOD 1 mutation with low penetrance. *Lancet*, **344**: 1773, 1994.
- 11) **Jones, C.T., Swingler, R.J. and Brock, D.J.H.:** Identification of a novel SOD 1 mutation in an apparently sporadic amyotrophic lateral sclerosis patient and detection of Ile 113 Thr in three others. *Hum. Mol. Genet.*, **3**: 649~650, 1994.
- 12) **Rouleau G.A., Clark, A.W., Rooke, K., Pramatarova, A., Krizus, A., Suchowersky, O., Julien, J.-P. and Figlewicz, D.:** SOD 1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, **39**: 128~131, 1996.
- 13) **Orrell, R.W., King, A.W., Hilton, D.A., Campbell, M.J., Lane, R.M. and Bellerocche, J.S.:** Familial amyotrophic lateral sclerosis with a point mutation of SOD 1: intrafamilial heterogeneity of disease duration associated with neurofibrillary tangles. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **59**: 266~270, 1995.

(平成11年 2 月 9 日 受付)