

**COX10 両アレル変異と PMP22 欠失を伴った Leigh 脳症の一家系：臨床病理学的特徴と分子遺伝学的解析の検討**

黒羽泰子

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 分子細胞医学専攻 分子情報医学 神経病因遺伝学

(主任教授：池内 健 教授)

Clinicopathological and molecular features of a family with Leigh encephalopathy and hereditary neuropathy with liability to pressure palsy due to biallelic *COX10* mutations and *PMP22* deletion

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

Course for Molecular and Cellular Medicine, Neuro-pathogenesis and genetic

(Molecular Genetics)

(Director: Prof. Takeshi Ikeuchi)

別刷請求先

〒951-8585 新潟県新潟市中央区旭町通1番町757番地

新潟大学脳研究所附属生命科学リソース研究センター

バイオリソース研究部門遺伝子機能解析学分野

## 要旨

Leigh 脳症は脳幹，基底核，視床，小脳，脊髄の間質組織の粗鬆化やグリオシスを伴う左右対称性の壊死性病変を認める亜急性壊死性脳脊髄症である。Leigh 脳症の原因として，核遺伝子変異によるミトコンドリア呼吸鎖複合体欠損症が報告されている。本研究では，Leigh 脳症の特徴を有する白質脳症を呈した家系において，発症者の臨床的特徴を抽出し，分子遺伝学的，組織学的解析により発症機序を明らかにすることを目的とした。発端者（54 歳女性）と弟妹 2 例（死亡時 4 歳，9 歳）の同胞 3 例が発症者である。妹は Leigh 脳症と臨床診断され，剖検により大脳白質ジストロフィと診断された。同胞 3 例とも痙性麻痺，精神発達遅滞，小脳性運動失調症，呼吸不全を発症し，熱性疾患や侵襲的検査を契機に症状が悪化した。発端者の頭部 MRI では，Leigh 脳症に合致する大脳白質病変を認めた。姉妹は顕著な末梢神経障害を認め，父も全身麻酔術後に圧迫性ニューロパチーを発症した。ミトコンドリア呼吸鎖欠損症の精査目的に，発端者の筋病理と筋，線維芽細胞における呼吸鎖複合体酵素活性の評価を行った。筋組織はタイプ 2 線維パターンを呈し，cytochrome c oxidase 染色の染色性が低下していた。筋組織では複合体 I-IV の酵素活性が低下し，線維芽細胞では複合体 IV の酵素活性が選択的に低下していた。5 名の家系員に対して遺伝子解析を行った。全エクソーム解析により，*COX10* ミスセンス変異を同定した。遺伝子コピー数解析では，*COX10* イントロン 5 から *PMP22* に及ぶ約 1.4Mb の遺伝子欠失が検出された。剖検例の凍結脳組織を用いたウエスタンブロット解析では，複合体 IV サブユニットの発現が低下していた。以上の結果から，*COX10* 変異に伴う cytochrome c oxidase 集合機能障害によるミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 欠損症と *PMP22* 欠失による遺伝性圧脆弱性ニューロパチーが併発した家系と診断した。ミトコンドリア呼吸鎖欠損症に圧脆弱性ニューロパチーを併発する例では，

*PMP22* 欠失を伴う *COX10* 変異が原因となる可能性があると考えられた.

**キーワード：**

Leigh 脳症, 大脳白質病変, ミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 欠損症, 圧脆弱性ニューロパチー, *COX10*, *PMP22*

## 序文

ミトコンドリア呼吸鎖複合体欠損症は、発症年齢や遺伝形式、主な罹患臓器や乳酸アシドーシスの有無、病理所見により、臨床・病理学的に分類されてきた。しかしながら、臨床経過、遺伝的、生化学的背景が症例により多彩であり、分類が困難なことも稀ではない<sup>1)2)3)4)5)</sup>。近年、核遺伝子の機能障害による複合体のサブユニット欠損症のほか、呼吸鎖複合体の集合にかかわるアセンブリー因子の機能異常が、Leigh 脳症類似の病態を呈することが明らかにされている<sup>1)3)</sup>。なかでも、呼吸鎖複合体 IV のアセンブリー因子欠損に伴う呼吸鎖欠損症は、cytochrome c oxidase の機能低下を引き起こし、乳幼児期に死亡する重症病型を呈することが知られている。病因遺伝子として *SURF1*, *SCO2*, *PET100*, *COX10*, *COX11*, *COX15* 変異を伴うミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 欠損症が報告されている。*SURF1* 変異以外の遺伝子変異を原因とし、複合体 IV 集合障害による呼吸鎖欠損症は報告例が少なく、臨床的特徴は明らかにされていない<sup>6)7)8)9)10)</sup>。

本研究は、大脳白質病変と脳幹、小脳病変を示すミトコンドリア呼吸鎖欠損症と末梢神経障害を合併した家系を対象に、臨床病理学および分子遺伝学的解析を行った。*COX10* は複合体 IV 形成においてヘム A の生合成に関与する遺伝子であり<sup>11)</sup>、*COX10* 変異によるミトコンドリア呼吸鎖欠損症は、これまでに 5 例の報告がある<sup>12)13)14)15)</sup>。ほとんどが新生児/乳児ミトコンドリア病に分類される重症致死型高乳酸血症を呈し、緩徐進行性の経過を示す白質脳症は報告されていない。本研究では、Leigh 脳症の特徴を有する大脳白質病変を呈した一家系における発症者の臨床・画像所見を抽出し、組織学的・分子遺伝学的解析により発症機序を明らかにすることを目的とした。

## 症例呈示

### 症例 1 (III-1 発端者), 54 歳女性 (図 1, 表 1)

出生発育歴：正常経膈分娩。出生時体重 2,900 g。定頸 3 か月，寝返り 6 か月，立位 1 歳，処女歩行 1 歳半で，言語発達は正常であった。

現病歴：4 歳時，歩行障害を発症した。10 歳までは下肢装具で歩行可能，12 歳時に杖歩行となり，15 歳から車いすを使用していたが，ADL は自立していた。26 歳から入浴に介助が必要になった。早期に閉経し，ホルモン補充療法を行った。48 歳，めまいを繰り返すようになり，眼球運動障害を指摘された。頭部 MRIT2 強調画像，FLAIR 像で大脳白質病変と大脳基底核，脳幹，小脳に対称性の T2 高信号病変を認めた。橈骨神経麻痺を発症したが，徐々に軽快した。49 歳，電動車いすの誤操作が続き，50 歳からは構音障害，下肢筋力低下が進行した。上部消化管内視鏡検査後，誤嚥性肺炎を繰り返し，51 歳時に入院した。

入院時所見 (51 歳時)：口頭命令の理解はよく，言語の表出も良好であった。動作教示に対し適切に応じた。脳神経領域では，眼球運動は衝動的で水平方向に軽度な眼球運動制限と上下転制限を認めた。上方注視時に回旋性の眼振が認められた。複視はなかった。嚥下障害が高度であり，経管栄養を開始した。緩徐な発声であり，不明瞭な言語であった。徒手筋力テストでは，上肢は左右とも 1~2 レベル，両下肢は関節運動や筋収縮は確認できなかった。深部腱反射は上肢が正常，下肢は消失しており，バビンスキー反射は陰性で両側凹足であった。指鼻試験は右側上肢で遂行できず，左上肢で測定障害と運動分解を認めた。表在覚低下は指摘できなかった。振動覚は上肢が正常，下肢は両側著明に低下していた。排尿障害は認めなかった。

検査・画像所見：血清 CK は 13IU/l と上昇はなく，血清乳酸値は 17.4mg/dl，ピルビン

酸は 1.0 mg/dl と正常であった。脳脊髄液検査では、蛋白 187.5 mg/dl, 乳酸 43.8 mg/dl, ビルビン酸 1.8 mg/dl と上昇していた。頭部 MRIT2 強調画像, FLAIR 像では、大脳白質に高信号域の広がりを認め、その内部は粗鬆症化し、その網目状の内部は脳脊髄液と等信号を示した。大脳基底核, 赤核, 下オリーブ核, 小脳歯状核, 中心被蓋路, 延髄が T2 強調画像上, 対称性に高信号化していた (図 2A-L, O, P)。神経伝導速度検査では、左側正中神経の MCV は 33.5m/s, 遠位振幅は 1.24mV と低下し、左側正中神経の SCV, 左側後脛骨神経の MCV, 左側腓腹神経の SCV は導出されなかった (表 2)。

入院後経過 : 52 歳時, 失調性多呼吸を発症, 呼吸不全が悪化し人工呼吸器を装着した。装着時, 四肢完全麻痺となったが, 麻痺は徐々に改善した。人工呼吸器装着後, 延髄背側に左右対称性の T2 高信号を呈する病変が新たに出現した (図 2Q, R)。MR スペクトロスコピーでは乳酸ピークは指摘されなかった。

### **症例 2 (III-2), 死亡時 4 歳男児**

出生発育歴 : 正常経膈分娩

現病歴 : 生下時, 異常は指摘されなかった。処女歩行は 2 歳で, 歩行は痙性歩行であった。3 歳時, 気脳写検査後に嘔吐し, 昏睡となり, 除皮質硬直状態となった。徐々に回復したが, 座位, 立位はとれないままであった。4 歳時に麻疹肺炎に罹患し, 死亡した。剖検なし。

### **症例 3 (III-3), 死亡時 9 歳女児**

既往歴 : 白内障。出生発育歴 : 正常経膈分娩。出生時体重 3,060g

現病歴 : 生後数か月から, 低身長, 低体重, 精神発達運動遅滞を指摘された。処女歩行は 1 歳 3 か月だった。3 歳時に嘔吐し, 嚥下障害, 言語障害を発症, それ以降, 歩行は

できなかつた。神経症候学的には、右上下肢に不全麻痺，四肢腱反射低下，バビンスキー反射陽性，体幹失調，凹足を指摘された。CT 上，脳室の拡大があり，気脳写を行ったところ，撮影後に嘔吐した。数か月の経過で，精神，運動機能ともに悪化し，半昏睡となった。MCV は 25.8m/s と低下していた（表 2）。除皮質硬直，皮質盲が指摘された。1 か月後には意識は回復し，座位が可能となった。血清乳酸値は 12.4mg/dl，ピルビン酸値は 0.41mg/dl と基準値範囲内であった。脳脊髄液検査では蛋白 84mg/dl と軽度上昇していた。入院 2 か月後，MCV は 18.7m/s とさらに低下し，入院 4 か月後には，MCV 14.9m/s となった。6 歳時，呼吸障害を繰り返し，気管切開術を施行した。CT では脳室が拡大し，大脳白質はびまん性に低濃度化していた。9 歳時，呼吸不全を発症し，死亡した。剖検が実施された。

#### **症例 4 (II-5)，80 歳男性。同胞例の父**

既往歴：特記事項なし。出生発育歴：生育発達歴に異常なし。

現病歴：79 歳時，健康診断で胸部異常陰影を指摘され，肺腺癌と診断された。胸腔鏡補助下右上葉切除術（左側側臥位）を施行した。術後 3 日後，左上肢尺側のしびれ感と左上肢挙上不良を訴えた。術後 13 日後，両側上肢筋力低下，手指のしびれを発症，両側腕神経叢，手根管以遠の正中神経に感覚運動麻痺を認めた。頭部，脊髓 MRI に異常所見は認めなかった。神経伝導速度検査において，遠位潜時の延長を認めた（表 2）。左側尺骨神経の腋窩と肘上部間に伝導ブロックを認めた（図 3）。多発性圧迫性ニューロパチーと診断した。数か月の経過で運動麻痺は改善したが，両手指しびれ感は残存した。

## 方法

### 組織学的解析

症例 1 (III-1) 53 歳時, 右側外側広筋から筋生検を施行した. 採取した筋組織は, 液体窒素で冷却したイソペンタンで凍結後  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し, Hematoxylin-Eosin 染色, Succinate dehydrogenase (SDH) 染色, nicotinamide-adenine dinucleotide-tetra-zolium-reductase (NADH) 染色, ATPase 染色 (pH 9.4/4.3), Oil-red-O 染色, Gomori-Trichrome 染色, cytochrome c oxidase 染色を行った.

### 酵素活性解析

呼吸鎖複合体酵素解析は, ドライアイスにより冷却したアセトンで凍結後,  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した筋組織と線維芽細胞において, 呼吸鎖複合体 I, II, II+III, IV, V および mitochondrial marker enzyme として citrate synthetase (CS) の酵素活性解析を行った.

### 剖検解析

症例 3 (III-3) は 9 歳死亡時, ご家族の同意のもと病理解剖を行った. ホルマリン固定, パラフィン包埋ブロックから  $10\mu\text{m}$  厚の連続切片を作製した. Hematoxylin-Eosin (HE) 染色, Klüber-Barrera (KB) 染色, Holzner 染色, Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 染色を用いて免疫組織学的に解析した.

### 分子遺伝学的解析

5 名の家系員からインフォームドコンセントを取得の後, ゲノム DNA を抽出した. ゲノム DNA  $1\mu\text{g}$  を用いて SureSelect v7 (Agilent 社) により全エクソン領域のキャプチャーを行い, 次世代シーケンサーを用いて全エクソン配列を取得した. FASTQ 配列を参照配列 (hg38) にマッピングし, バリエントコールにより VCF を作製した. アミノ酸非同義置換, 共同データベースによるアレル頻度, *in silico* 解析などを用いて候補

バリエーションの絞り込みを行った。サンガー法によるシーケンシングを行い、*COX10* のミスセンス変異を確認した。*COX10* のコピー数多型解析のため、TaqMan probe によるリアルタイム定量 PCR を行った。またコピー数変化が生じた領域を特定するため、DNA マイクロアレイ解析 (CytoScan, Affymetrix 社) を行った。本研究の遺伝子解析は、新潟大学遺伝子倫理審査委員会の承認を受け実施した。

### **タンパク解析**

剖検脳 (II-3) 後頭葉皮質と大脳白質からタンパクを抽出、ウエスタンブロット解析による発現解析を行った。タンパク発現の評価はミトコンドリア画分および全細胞画分に分けて評価した。ミトコンドリア画分抽出は、Mitochondria isolation kit for tissue (ThermoFisher 社) の、全細胞成分抽出は RIPA バッファーを用いた。

## 結果

### 臨床的特徴

本家系の症例 1 (III-1), 2 (III-2), 3 (III-3) は, 乳幼児期に痙性麻痺, 精神発達遅滞, 小脳性運動失調症, 呼吸不全を呈した (表 1). また, 熱性疾患, 外傷, 検査, 手術などの侵襲を契機に神経症状が一時的に増悪した. 症例 3 (III-3) は Leigh 脳症と臨床診断され, 剖検では大脳白質ジストロフィと診断された. 症例 1 (III-1) の 頭部 MRI では, T2 高信号病変がびまん性に認められ, その内部は粗造化, 空胞化していた (図 2A-L). 経過中に眼球運動障害や小脳性運動失調を呈した際は, 下オリーブ核, 小脳歯状核, 中心被蓋路の左右対称性の病変 (図 2O, P) が出現した. 失調性呼吸, CO<sub>2</sub> ナルコーシスを発症した際は延髄背側に, それぞれ左右対称性の新出病変を認めた (図 2Q, R). 症例 3 (III-3) 同様, テント下の病変は Leigh 脳症, テント上の所見は cavitating leukoencephalopathy の特徴を有し, ミトコンドリア呼吸鎖欠損症で報告されている白質脳症を伴う Leigh 脳症の所見に合致していた. 一方, 顕著な末梢神経障害を症例 1 (III-1), 3 (III-3) が呈した点が本家系の臨床的な特徴であった. 症例 4 (父, II-5) も肺癌手術時に圧迫性ニューロパチーを発症しており (表 2), 末梢神経障害を発症する遺伝的素因を家系内で共有していることが示唆された.

### 筋組織解析 (症例 1)

HE 染色では, 筋線維のびまん性小径化が認められ (図 4A), NADH, SDH, ATPase 染色では, タイプ 2 線維パターンを呈していた (図 4C, E, G). Gomori-trichrome 染色では, 赤色ぼろ線維は認められなかった (図 4B). Oil-red O 染色では, 脂肪滴は数, 大きさともに増多していた (図 4F). Cytochrome c oxidase 染色では, すべての筋線維で染色性が著しく低下していた (図 4D).

筋組織の呼吸鎖複合体酵素活性では、正常筋組織との比較では、複合体 I 6.1%、複合体 II 13.5%、複合体 II+III 1.3%、複合体 III 9.8%、複合体 IV 3.8%とすべての酵素が低値であったが（表 3）。線維芽細胞では citrate synthase ratio（CS）比で、複合体 I 68.5%、複合体 II 64.4%、複合体 II+III 52.4%、複合体 III 61.7%、複合体 IV 24.9%と複合体 IV 酵素活性の選択的低下を認めた（表 3）。ミトコンドリア呼吸鎖欠損症の診断基準では、組織を用いた場合、CS 比%で、30%以下が小基準、20%以下が大基準を満たし、培養細胞では 40%以下が小基準、30%以下が大基準を満たす。本例の所見は cytochrome c oxidase 欠損による複合体 IV 機能欠損症に合致する所見であった。

## 剖検所見

大脳白質は、線維性グリオシスが高度で、深部白質は髄鞘の淡明化を認め、皮質下白質は保たれる傾向にあった（図 5A-C）。KB 染色では、白質において髄鞘の脱落と比較し、軸索は同程度もしくはそれ以上に脱落していた（図 5H）。脳幹はびまん性にグリオシスを呈し、中小脳脚、左側内側毛帯に強い変性が認められた。グリオシスは赤核、下オリーブ核周囲においても強く認められた（図 5D, E, F, G）。延髄正中やや左よりには、GFAP 染色性が低下する部位が見られた（図 5F, G）。強拡大では、髄鞘、軸索が局所性に一部脱落し、ニューロピルの粗鬆化や血管増生、マクロファージの浸潤が認められた（図 5J）。

## 遺伝子解析

5 名の家系員のゲノム DNA を用いたエクソーム解析により、症例 1, 3 において *COX10* 変異 : p.Arg159Glu（エクソン 3）、p.Pro295Leu（エクソン 6）を認めた（図 6A）。Polyphen-2 および SIFT による *in silico* 解析では、p.Pro295Leu の病原性が示唆された。*COX10* のコピー数多型解析では、症例 1, 3, 4 において、イントロン 6 以降の

コピー数多型の減少が見られた (図 6B)。PMP22 コピー数多型解析では、症例 1, 3, 4 において PMP22 コピー数多型の減少が見られた (図 6C)。DNA マイクロアレイ解析では、症例 1 において、COX10 イントロンから PMP22 を含む約 1.4Mb の遺伝子欠失領域が特定された (図 6D)。症例 1, 3 の同胞例では、COX10 のミスセンス変異と遺伝子欠失が複合ヘテロ接合体で認められた。

### タンパク解析

症例 3 (III-3) の凍結脳組織 (大脳皮質および白質) から可溶性タンパクを抽出し、ミトコンドリア画分と全ライセイト画分に分け、ウエスタンブロット解析を行った。両分画とも MTCO1, MTCO2, COX4 の複合体 IV サブユニットの発現低下が認められた (図 7)。発現低下の程度は大脳白質由来のサンプルにおいて高度であった。一方、COX10 の発現低下は認められなかった。

## 考察

本家系の症例 1, 3 は特徴的な大脳白質病変を呈し、臨床的に Leigh 脳症と診断した。線維芽細胞を用いた酵素活性では、呼吸鎖複合体 IV の選択的低下が認められ、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV 欠損症に合致する所見であった。5 名の家系員のエクソーム解析から、*COX10* ミスセンス変異を発症者に同定した。さらに *COX10* エクソン 6 から 3' 非翻訳領域に及ぶ欠失を認め、*COX10* 複合ヘテロ接合体を原因とする Leigh 脳症と診断した。

ミトコンドリアの機能障害に伴う筋病理としては、タイプ 2 線維の割合が増加することが指摘されている<sup>16)17)</sup>。症例 1 の筋組織において、タイプ 2 線維パターンを示したことや cytochrome c oxidase 活性欠損の所見は、*COX10* と同じ複合体 IV アセンブリー因子である *SURF1* 欠損症でも報告されている。症例 1 の筋病理所見は、呼吸鎖複合体 IV アセンブリー因子欠損症の所見と考えた<sup>18) 19) 20)</sup>。症例 1 の筋組織を用いた呼吸鎖複合体の酵素活性では、複合体 I - IV すべての活性低下を認めた。一方線維芽細胞では、複合体 IV の活性が選択的に低下していた<sup>21)22)</sup>。筋組織検索では、ミトコンドリア機能異常に起因する複合体 I-IV の活性低下やタイプ 2 線維パターンが認められ、複合体 IV 欠損症が一次的な原因となっていることが示唆された。症例 1~3 の進行期にみられた運動障害や呼吸不全は、中枢神経や末梢神経病変に加え、筋病変が影響した可能性が考えられた。本家系では、ミトコンドリア呼吸鎖欠損症にもかかわらず、高乳酸血症や代謝性アシドーシスを呈さなかった点が既報と異なっている。その理由として、筋病変が緩徐進行性の経過であったことが影響した可能性があると考えられた。

呼吸鎖複合体 IV の集合にかかわるアセンブリー因子欠損では、cytochrome c oxidase の機能低下を引き起こし、乳幼児期に重度致死性乳酸アシドーシスで死亡する複合体

IV 欠損症が報告されている。その中で、*COX10* ミスセンス変異を原因とする呼吸鎖欠損症は 5 例の既報がある<sup>12) 13) 14) 15)</sup>。5 例中 4 例は重度乳酸アシドーシスを呈し、平均 10.5 か月で死亡している。2 例において頭部 MRI が撮影され、脳幹、基底核の対称性病変を認めたが、大脳白質病変は指摘されていない。*COX10* 変異以外を原因とするミトコンドリア呼吸鎖欠損症においては、約 10% の頻度で白質病変が検出されている<sup>10) 23)</sup>。症例 1 でみられた *cavitating leukoencephalopathy* と評される白質の粗鬆化、空洞化がみられる症例は 6 例報告されている<sup>10) 23) 24) 25) 26)</sup>。本家系で認められた大脳白質病変は、ミトコンドリア呼吸鎖欠損症によるものと思われた。症例 3 の剖検脳組織のタンパク解析では、*COX10* の発現低下はなく、複合体 IV の発現が低下していた。ミスセンス *COX10* 変異体の機能障害により、複合体 IV の形成障害を反映した所見と考えられた。

ミトコンドリア病においても末梢神経障害を発症する症例が知られているが、本家系内発症者の末梢神経障害はミトコンドリア病としては重症であった点が特異であった。症例 1, 3 は *COX10* p.Pro295Leu のミスセンス変異とともに、*COX10* エクソン 6 から *PMP22* に及ぶ欠失を複合ヘテロ接合体で有していた。本家系発症者の症例 1, 3 とその父 (症例 4) は、*PMP22* 欠失による遺伝性圧脆弱性ニューロパチーを発症したものと考えた。*PMP22* 欠失に *COX10* 変異を伴い、ミトコンドリア病を発症した既報はなく、本家系が初めての報告である。*COX10* は *PMP22* の近傍に位置し、*COX10* はエクソン 6 とその前後のイントロンに *PMP22* と酷似した *CMT1A-repeat* 配列を持ち、この 2 つの配列間で相同組み換えが生じる機序が推察されている<sup>27) 28)</sup>。そのため、遺伝性圧脆弱性ニューロパチーの症例では、他方のアレルにおいて *COX10* の病的変異が併存した場合、本例同様、ミトコンドリア呼吸鎖欠損症を発症する可能性があると考えた。

## 結論

大脳白質病変と脳幹小脳病変に顕著な末梢神経障害を併発し、*COX10* 変異と *PMP* 欠失を有する一家系を報告した。本家系の発症者は、高乳酸血症を欠いており、複合体 IV 欠損症としては緩徐進行性の経過であった。侵襲により神経症状が変動する症例や、頭部 MRI 所見から Leigh 脳症が疑われる症例では、ミトコンドリア呼吸鎖欠損症である可能性を考慮する必要がある。また圧脆弱性ニューロパチーに中枢病変や筋症を併発する例では、*COX10* と *PMP22* の遺伝子コピー数を含めた遺伝子解析が必要であると思われる。

## 謝辞

本家系についての貴重な資料をご提供下さり、ご指導いただきました新潟県内の神経内科の先生方、国立病院機能 西新潟中央病院 脳神経内科 小池亮子先生、松原奈絵先生、高橋哲哉先生、長谷川有香先生、分子遺伝学的解析を行って下さった新潟大学脳研究所 神経内科 石黒敬信先生、病理・病態学的解析を行って下さった新潟大学脳研究所 病理学分野 柿田明美先生、他田真理先生、千葉県こども病院 代謝科 村山圭先生、本研究をご指導下さいました新潟大学脳研究所 遺伝子機能解析学分野 池内健先生、春日健作先生に厚くお礼申し上げます。

## 参考文献

1. Saneto RP, Parikh S, Cohen BH: Mitochondrial case studies: Underlying Mechanisms and Diagnosis. 1st ed, Elsevier Inc, pp1-9, 2016.
2. Thorburn DR, Smeitink J: Diagnosis of mitochondrial disorders: clinical and biochemical approach. *J Inher Metab Dis.* 24: 312-316, 2001.
3. Rahman S, Blok RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW, Christodoulou J, Thorburn DR: Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol.* 39: 343-351, 1996.
4. Leigh D: Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 14: 216-221, 1951.
5. Dayan AD, Ockenden BG, Crome L: Necrotizing encephalomyelopathy of Leigh. Neuropathological findings in 8 cases. *Arch Dis Child.* 45: 39-48, 1970.
6. Valanne L, Ketonen L, Majander A, Suomalainen A, Pihko H: Neuroradiologic findings in children with mitochondrial disorders. *AJNR Am J Neuroradiol.* 19: 369-377, 1998.
7. Rahman S, Brown RM, Chong WK, Wilson CJ, Brown GK: A SURF1 gene mutation presenting as isolated leukodystrophy. *Ann Neurol.* 49: 797-800, 2001.
8. Timothy J, Geller T: SURF1 gene mutation associated with leukoencephalopathy in a 2-year-old. *J Child Neurol.* 24: 1296-1301, 2009.
9. Wedatilake Y, Brown RM, McFarland R, Yapliito-Lee J, Morris AA, Champion M, Jardine PE, Clarke A, Thorburn DR, Taylor RW, Land JM, Forrest K, Dobbie A, Simmons L, Aasheim ET, Ketteridge D, Hanrahan D, Chakrapani A, Brown GK, Rahman S: SURF1 deficiency: a multi-centre natural history study. *Orphanet J Rare Dis.* 8: 96, 2013.
10. Rossi A, Biancheri R, Bruno C, Di Rocco M, Calvi A, Pessagno A, Tortori-Donati P: Leigh Syndrome with COX deficiency and SURF1 gene mutations: MR imaging findings. *AJNR Am J Neuroradiol.* 24: 1188-1191, 2003.
11. Williams SL, Valnot I, Rustin P, Taanman J: Cytochrome c oxidase subassemblies in fibroblast cultures from patients carrying mutations in COX10, SCO1, or SURF1. *J Biol Chem.* 279: 7462-7469, 2004.
12. Valnot I, von Kleist-Retzow JC, Barrientos A, Gorbatyuk M, Taanman JW, Mehaye B, Rustin P, Tzagoloff A, Munnich A, Rötig A: A mutation in the human heme A: farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet.* 9: 1245-1249, 2000.
13. Coenen MJH, van den Heuvel LP, Ugalde C, Brinke MT, Nijtmans LGJ, Trijbels FJM, Beblo S, Maier EM, Muntau AC, Smeitink JAM, Pitceathly RDS: Cytochrome c oxidase biogenesis in a patient with a mutation in COX10 gene. *Ann Neurol.* 56: 560-564, 2004.
14. Antonicka H, Leary SC, Guercin GH, Agar JN, Horvath R, Kennaway NG, Harding CO, Jaksch M: Mutations in COX10 result in a defect in mitochondrial heme A biosynthesis and account for multiple, early-onset clinical phenotypes associated with isolated COX deficiency. *Hum Mol Genet.* 12: 2693-2702, 2003.
15. Pitceathly RDS, Taanman JW, Rahman S, Meunier B, Sadowski M, Cirak S, Hargreaves I, Land JM, Nanji T, Polke JM, Woodward CE, Sweeney MG, Solanki S, Foley AR, Hurles ME, Stalker J, Blake J, Holton JL, Phadke R, Muntoni F, Reilly MM, Hanna MG, UK10K Consortium: COX10 mutations resulting in complex multisystem mitochondrial disease that remains stable into adulthood. *JAMA Neurol.* 70: 1556-1561, 2013.
16. Enns GM, Hoppel CL, DeArmond SJ, Schelley S, Bass N, Weisiger K, Horoupian D, Packman

- S: Relationship of primary mitochondrial respiratory chain dysfunction to fiber type abnormalities in skeletal muscle. *Clin Genet.* 68: 337-348, 2005.
17. Gehrig SM, Mihaylova V, Frese S, Mueller SM, Ligon-Auer M, Spengler CM, Petersen JA, Lundby C, Jung HH: Altered skeletal muscle (mitochondrial) properties in patients with mitochondrial DNA single deletion myopathy. *Orphanet J Rare Dis.* 11: 105, 2016.
  18. Sarnat HB, Marín-García J: Pathology of mitochondrial encephalomyopathies. *Can J Neurol Sci.* 32: 152-166, 2005.
  19. Pronicki M, Matyja E, Piekutowska-Abramczuk D, Szymanska-Debinska T, Karkucinska-Wieckowska A, Karczmarewicz E, Grajkowska W, Kmiec T, Popowska E, Sykut-Cegielska J: Light and electron microscopy characteristics of the muscle of patients with SURF1 gene mutations associated with Leigh disease. *J Clin Pathol.* 61: 460-466, 2008.
  20. Müller-Höcker J, Droste M, Kadenbach B, Pongratz D, Hübner G: Fatal mitochondrial myopathy with cytochrome c oxidase deficiency and subunit restricted reduction of enzyme proportion two siblings. *Hum Pathol.* 20: 666-672, 1989.
  21. Kirby DM, Crawford M, Cleary MA, Dahl HH, Dennett X, Thorburn DR: Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology.* 52: 1255-1264, 1999.
  22. Murayama K, Nagasaka H, Tsuruoka T, Omata Y, Horie H, Tregoning S, Thorburn DR, Takayanagi M, Ohtake A: Intractable secretory diarrhea in a Japanese boy with mitochondrial respiratory chain complex I deficiency. *Eur J Pediatr.* 168: 297-302, 2009.
  23. de Lonlay-Debeney P, von Kleist-Retzow JC, Hertz-Pannier L, Peudenier S, Cormier-Daire V, Berquin P, Chrétien D, Rötig A, Saudubray JM, Baraton J, Brunelle F, Rustin P, Van Der Knaap M, Munnich A: Cerebral white matter disease in children may be caused by mitochondrial respiratory chain deficiency. *J Pediatr.* 136: 209-214, 2000.
  24. Moroni I, Bugiani M, Bizzi A, Castelli G, Lamantea E, Uziel G: Cerebral white matter involvement in children with mitochondrial encephalopathies. *Neuropediatrics.* 33: 79-85, 2002.
  25. Lerman-Sagie T, Leshinsky-Silver E, Waternberg N, Luckman Y, Lev D: White matter involvement in mitochondrial diseases. *Mol Genet Metab.* 84: 127-136, 2005.
  26. Zafeiriou DI, Koletzko B, Mueller-Felber W, Paetzke I, Kueffer G, Jensen M: Deficiency in complex IV (cytochrome c oxidase) of the respiratory chain, presenting as a leukodystrophy in two siblings with Leigh syndrome. *Brain Dev.* 17: 117-121, 1995.
  27. Murakami T, Reiter LT, Lupski JR: Genomic structure and expression of the human heme A: farnesyltransferase (COX10) gene. *Genomics.* 42: 161-164, 1997.
  28. Inoue K, Dewar K, Katsanis N, Reiter LT, Lander ES, Devon KL, Wyman DW, Lupski JR, Birren B: The 1.4-Mb CMT1A duplication/HNPP deletion genomic region reveals unique genome architectural features and provides insights into the recent evolution of new genes. *Genome Res.* 11: 1018-1033, 2001.

## 図の説明

### 図 1. 家系図

症例 1 (III-1) : 発端者 (54 歳女性), 症例 2 (III-2) : 弟例 死亡時 4 歳男児, 症例 3 (III-3) : 妹 剖検例 死亡時 9 歳, 症例 4 (II-5) : 父. 黒塗 : 白質脳症発症者. 半黒塗 : 圧脆弱性ニューロパチー発症者. 矢印 : 発端者, 斜線 : 死亡例, 数字 : 年齢. 括弧内数字 : 死亡時年齢. \* : ゲノム DNA 解析実施対象者

### 図 2. 頭部 MRI の経時的変化 (症例 1)

頭部 MRI (51 歳時) : T1 強調画 (軸位断), TR/TE 2000/8.4ms; matrix 288 × 224 : **A-D**, T2 強調画像 (軸位断), a spin-echo pulse sequence; TR/TE 4000/85ms; matrix 320 × 256 : **E-H**, FLAIR 像 (軸位断), TR/TE 10000/120ms; matrix 288 × 224 : **I-L**. MRI 撮影 1.5T scanner, Sigma (シーメンス社). 48 歳 めまい発症時 T2 強調画像 (軸位断) : **M, N**. 51 歳 入院時 T2 強調画像 (軸位断) : **O, P**. 53 歳, 人工呼吸器装着後 T2 強調画像 (軸位断) : **Q, R**. 入院時, T2 強調画像において T2 高信号域がびまん性に白質に広がり, その内部が粗造化, 空胞化していた (**A-L**). めまい発症時は下オリーブ核, 小脳歯状核, 中心被蓋路に左右対称性の病変が出現し (**O, P**), 人工呼吸器装着後は延髄背側に左右対称性の新出病変が出現した (**Q, R**).

### 図 3. 神経伝導速度検査 (症例 4)

左側尺骨神経の腋窩 (axilla) と肘上部 (above elbow) 間に伝導ブロックを認めた.

### 図 4. 筋病理所見 (症例 1)

**A**: HE 染色, **B**: Gomori-Trichrome 染色, **C**: NADH 染色, **D**: cytochrome c oxidase 染色, **E**: ATPase 染色 (pH 10.6), **F**: Oil red O 染色, **G**: SDH 染色. 筋線維はびまん性に小径化していた (**A**). 赤色ぼろ線維は認められなかった (**B**). すべての線維でタイプ 2 線維パ

ターンを呈していた (**C, E, G**) . 脂肪滴は数, 大きさともに増多していた (**F**) . すべて  
の筋線維で CCO 染色性の著しい低下が認められた (**D**) .

### 図 5. 剖検所見 (症例 3)

**A, D, F, H:** Klüver-Barrera 染色; KB 染色, **B:** Holzer 染色, **C, E, G:** Glial Fibrillary Acidic Protein 染色; GFAP 染色, **I, J:** Hematoxylin Eosin 染色; HE 染色. 大脳白質は, 線維性グリ  
オーシスが高度であった (**A-C, H**) . 赤核, 下オリーブ核周囲においてもグリオーシス  
が強く認められた (**D, E, G, I**) . 延髄正中やや左よりには, **KB, GFAP** 染色で抜ける  
部位が見られ (**F, G**) , 強拡大では, 髄鞘, 軸索が局所性に一部脱落し, ニューロピル  
の粗鬆化や血管増生, マクロファージの浸潤が認められた (**J**) .

### 図 6. COX10/PMP22 遺伝子解析

**A.** *COX10* のエクソン 6 に p.Pro295Leu ミスセンス変異を認めた. **B.** *COX10* のコピー数  
多型解析では, 症例 1 (III-1), 3 (III-3), 症例 4 (II-5) において, インترون 6 以降  
のコピー数多型の減少が見られた. **C.** 症例 1 (III-1), 3 (III-3), 症例 4 (II-5) におい  
て *PMP22* コピー数多型の減少が見られた. **D.** 症例 1 (III-1) のマイクロアレイ解析で  
は, *COX10* インترون 5 から *PMP22* に及ぶ約 1.4Mb の遺伝子欠失領域が特定された.

### 図 7. タンパク解析 (症例 3)

症例 3 (III-3) の脳組織 (大脳皮質および白質) から可溶性タンパクを抽出し, ミトコ  
ンドリア画分と全ライセイト画分に分け, 免疫ブロット解析を行った. *MTCO1*,  
*MTCO2*, *COX4* の複合体 IV サブユニットの発現低下を認めた. 大脳白質由来のサン  
プルは, 皮質サンプルと比較し発現低下が高度であった. *COX10* の発現低下は認めら  
れなかった.

图 1

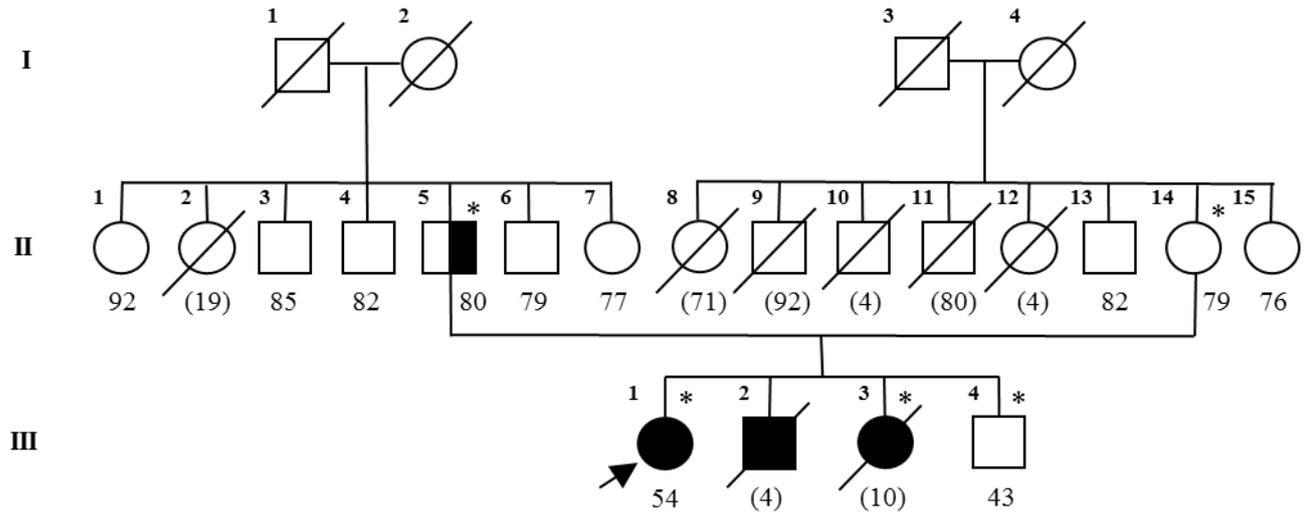
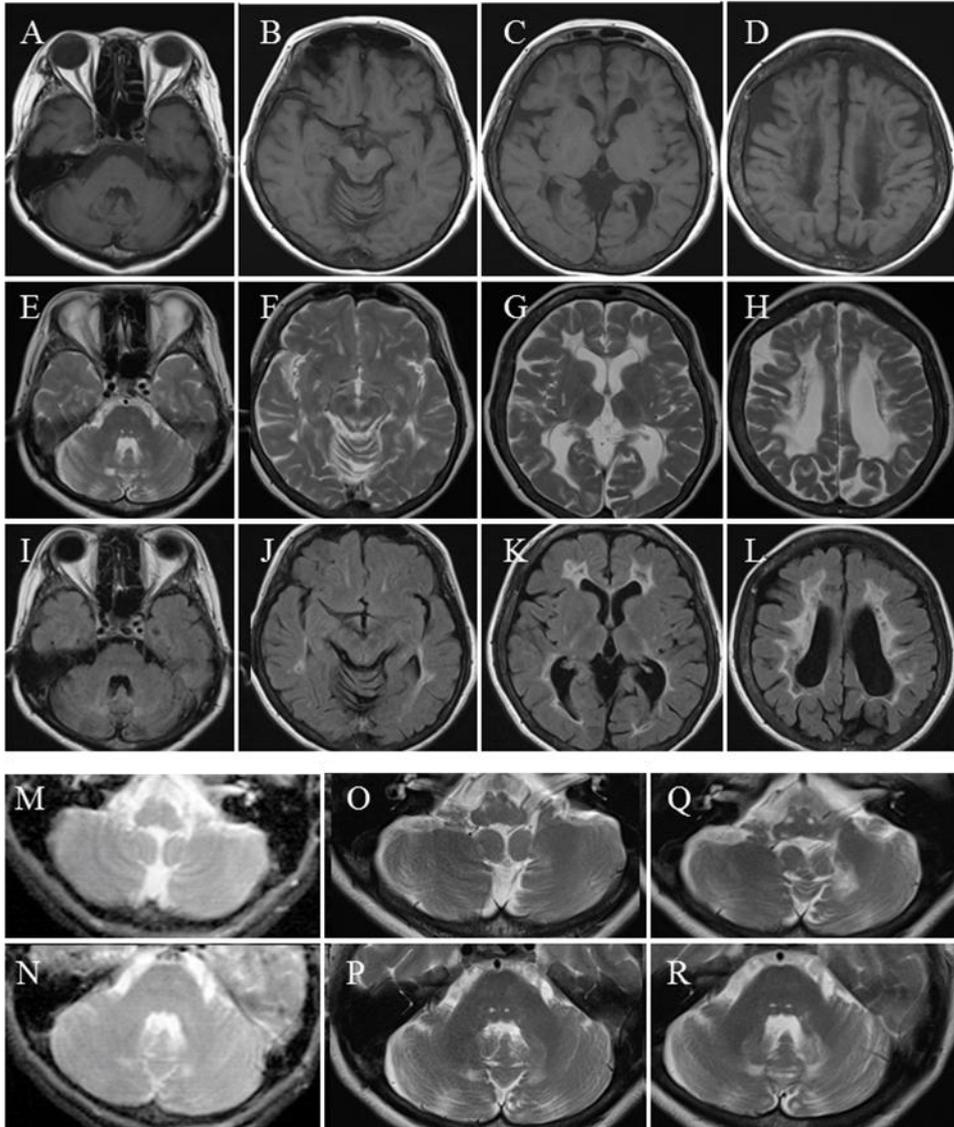


图2



☒3

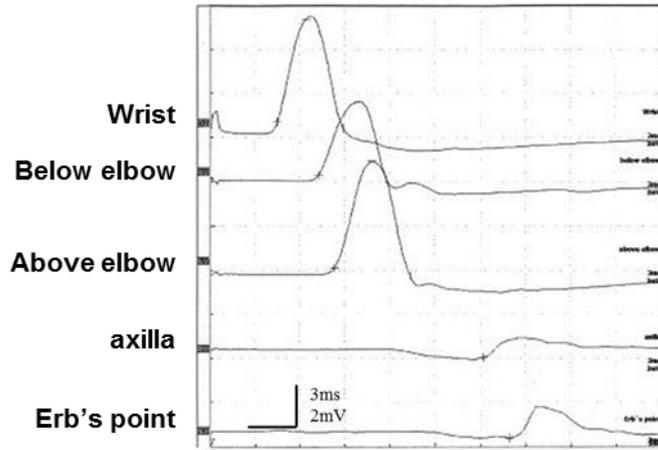


図4

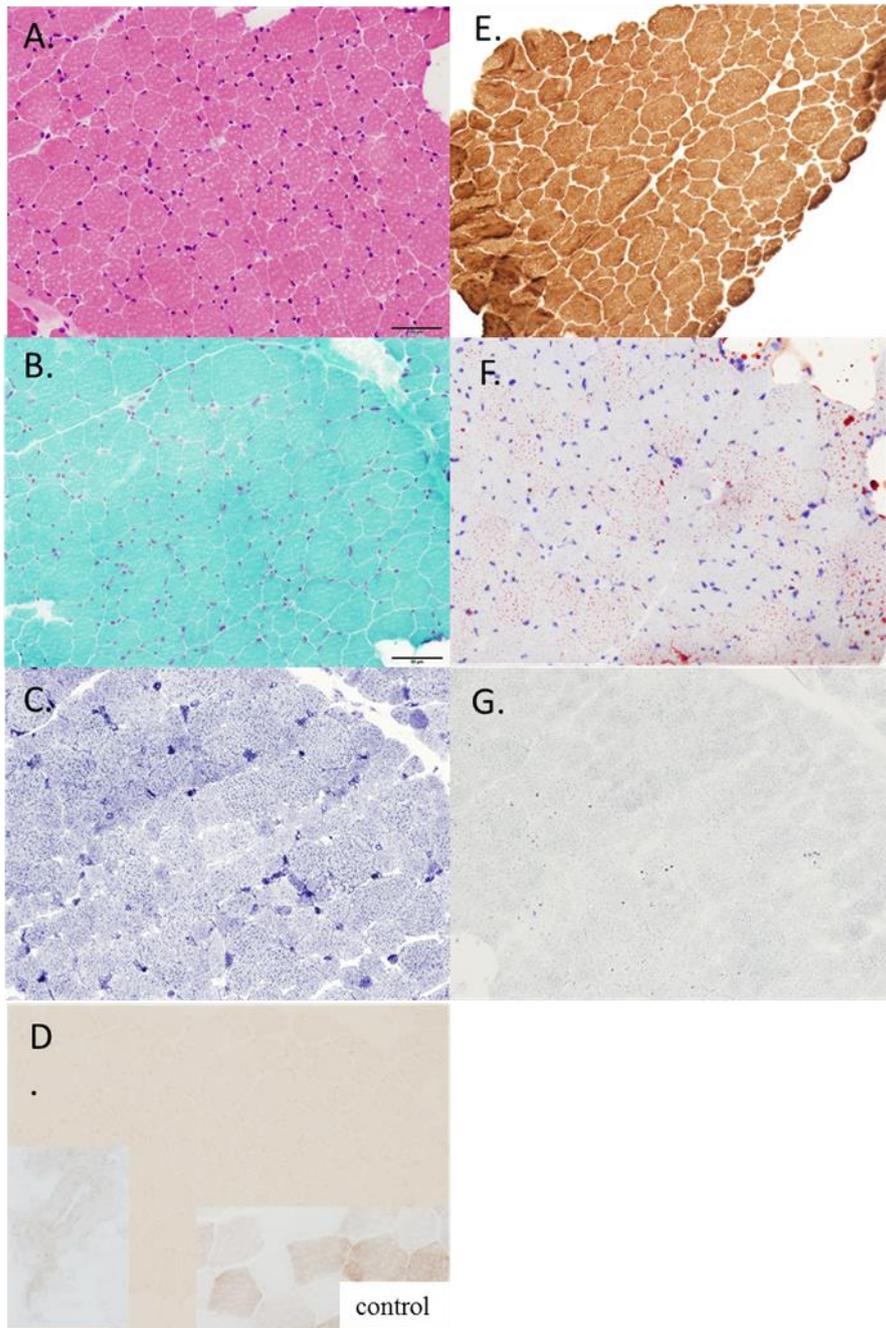
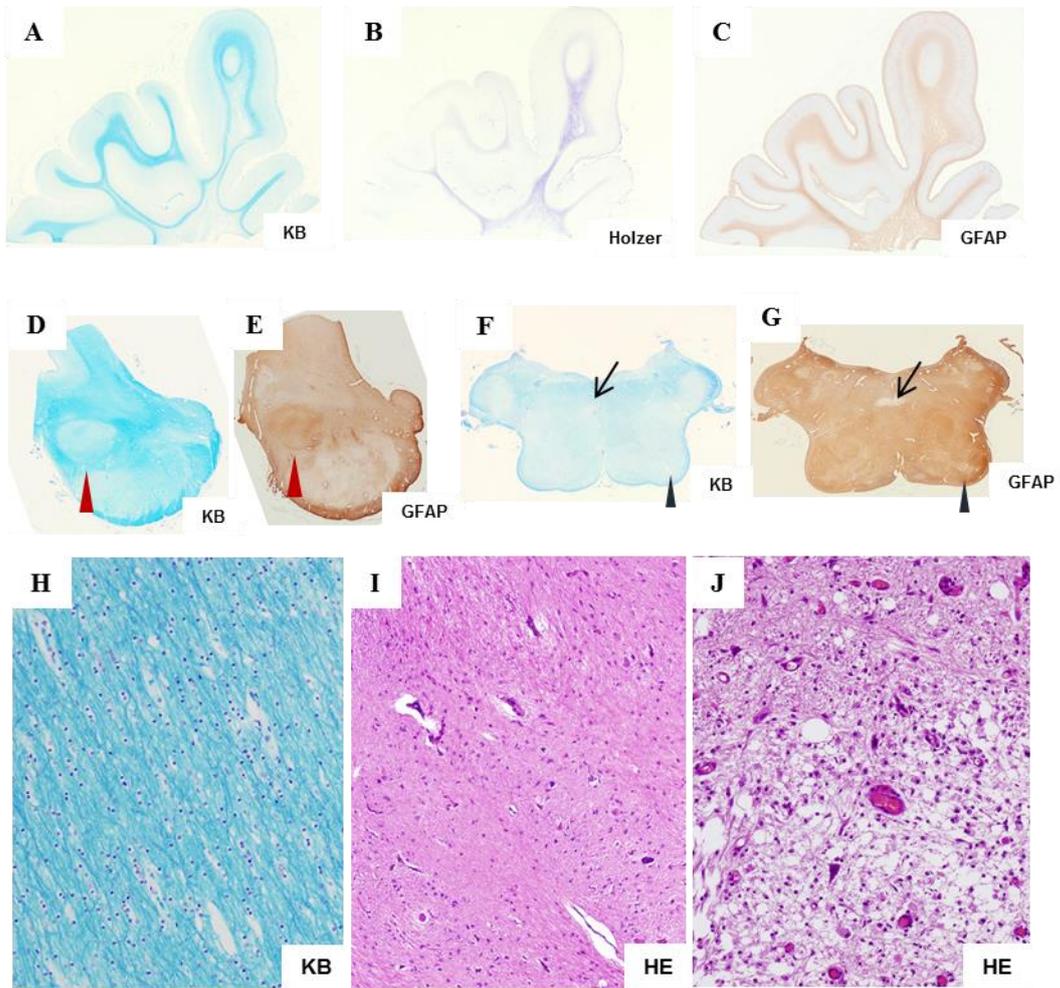


図5



# 图6

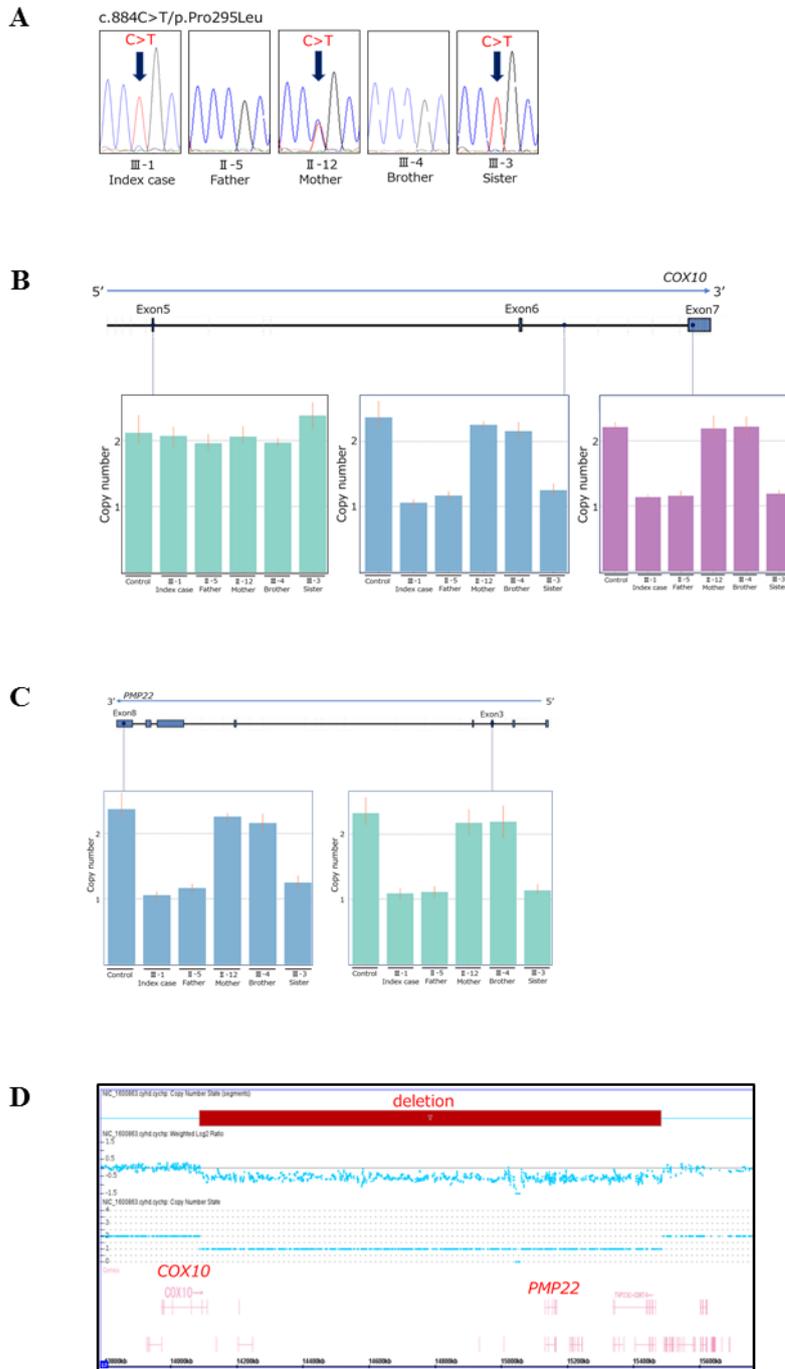


図7

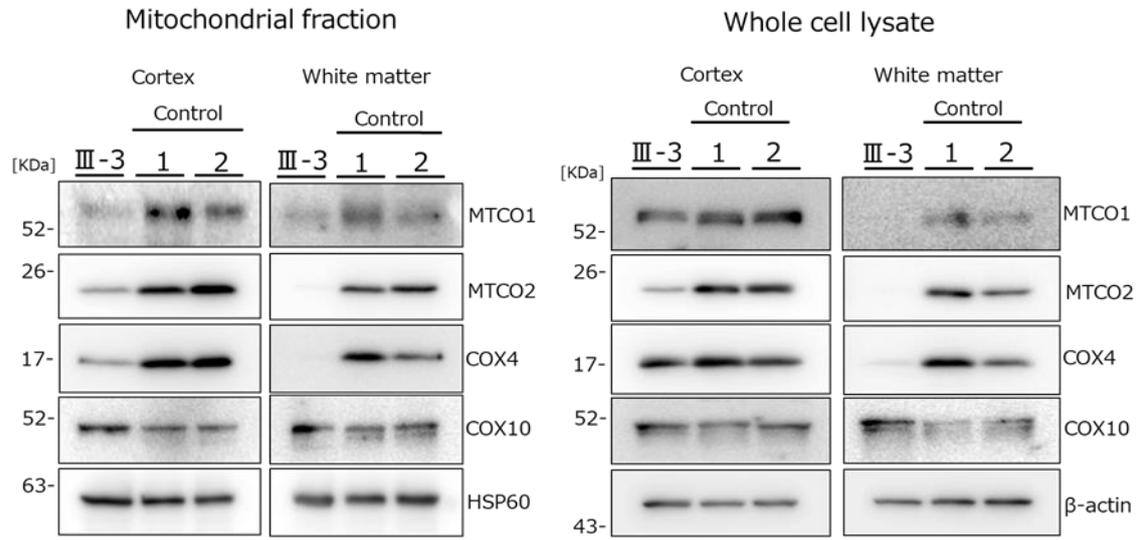


表 1. 家系内発症者の臨床・分子遺伝学的特徴

	症例 1 (III-1) proband	症例 2 (III-2) younger brother	症例 3 (III-3) younger sister	症例 4 (II-5) father
clinical diagnosis	cavitating leukoencephalopathy	cerebral palsy	Leigh encephalopathy	pressure palsy
age of onset	4 years	15 months	2 years	79 years
age (current status)	54 years (alive)	4 years (dead)	9 years (dead)	80 years (alive)
initial symptoms	gait disturbance, mental and motor retardation	gait disturbance, mental and motor retardation	gait disturbance, mental and motor retardation	numbness and weakness of upper extremities
other symptoms	spastic tetraplegia, nystagmus, vertigo, cerebellar ataxia, dysphagia, respiratory failure	N/A	spastic tetraplegia, dysphagia, respiratory failure	none
peripheral neuropathy	present	N/A	present	present
serum lactic acid (mg/dl)	normal (17.4)	N/A	normal (12.4)	N/A
CSF lactic acid (mg/dl)	elevated (43.8)	N/A	N/A	N/A
<i>COX10</i> mutation	p.P295L / deletion	N/A	p.P295L / deletion	deletion
<i>PMP22</i> mutation	deletion	N/A	deletion	deletion

表 2. 神経伝導速度検査

	症例1	症例2	症例3
<b>Left Median nerve</b>			
MCV (m/s)	<b>33.5</b>	<b>25.8</b>	63.3
Distal latency (ms)	<b>5.83</b>	-	<b>6.51</b>
CMAP (mV)	<b>1.24</b>	-	6.14
SCV (m/s)	N.E.	-	<b>48.0</b>
SNAP ( $\mu$ V)	N.E.	-	9.90
<b>Left Tibial nerve</b>			
MCV (m/s)	N.E.	-	44.9
Distal latency (ms)	N.E.	-	<b>5.60</b>
CMAP (mV)	N.E.	-	8.70
<b>Left Sural nerve</b>			
SCV (m/s)	N.E.	-	41.7
SNAP ( $\mu$ V)	N.E.	-	7.60

MCV: motor nerve conduction velocity; CMAP: compound muscle action potential; SCV: sensory nerve conduction velocity; SNAP: sensory nerve action potential; N.E.: not evoked; significant changes are shown in bold.

表 3. 筋組織および線維芽細胞における呼吸鎖複合体酵素活性解析

	Co I	Co II	CoII+III	Co III	Co IV	CS
<b>Muscle</b>						
% of normal	<b>6.1</b>	<b>13.5</b>	<b>1.3</b>	<b>9.8</b>	<b>3.8</b>	<b>14.0</b>
CS ratio (%)	44.1	98.2	<b>9.2</b>	72.3	<b>25.4</b>	
Co II ratio (%)	43.8		<b>9.1</b>	72.1	<b>24.5</b>	
<b>Fibroblast</b>						
% of normal	26.5	24.9	20.5	24.4	9.6	38.2
CS ratio (%)	68.5	64.4	52.4	61.7	<b>24.9</b>	
CoII ratio (%)	105.2		79.1	94.4	<b>37.6</b>	

Co I: complex I, Co II: complex II; Co III: complex III; Co IV: complex IV; CS: citrate synthase. Significant changes are shown in *bold*.