

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 黒羽 泰子  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 974 号  
学位授与の日付 令和3年3月23日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 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

論文審査委員 主査 教授 笹岡 俊邦  
副査 教授 五十嵐 博中  
副査 准教授 金澤 雅人

### 博士論文の要旨

#### 背景と目的

Leigh 脳症は、脳幹被蓋部、基底核、視床、小脳、脊髄後索や灰白質の間質組織の粗鬆化やグリオーシスを伴い、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。核遺伝子変異を伴い、常染色体劣性遺伝を呈するミトコンドリア呼吸鎖複合体欠損症が、Leigh 脳症の原因として知られている。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家系において、家系内の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。

#### 対象

本家系において発端者 54 歳女性と、幼少時に死亡した弟妹 2 例の同胞 3 例の発症者を認めた。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、歩行獲得後、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。発端者の MRI T2 強調画像では大脳白質に高信号域がびまん性に広がり、病変内部が粗造化、空胞化していた。下オリブ核、小脳歯状核、中心被蓋路、延髄背側で左右対称性の病変を認めた。また同胞 3 例では末梢神経障害が顕著であり、父も肺癌術後に多発圧迫性ニューロパチーを発症した。

#### 方法

組織学的解析：発端者に対して筋生検を行った。筋組織は Hematoxylin-Eosin 染色、Succinate dehydrogenase (SDH) 染色、nicotinamide-adenine dinucleotide-tetra-zolium-reductase (NADH) 染色、ATPase 染色 (pH 9.4 and 4.3)、Oil-red-O 染色、Gomori-Trichrome 染色、Cytochrome c oxidase 染色を用いて解析した。

酵素活性解析：筋組織および皮膚線維芽細胞を用い、呼吸鎖複合体酵素活性解析を実施した。

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 を抽出し全エクソーム解析を行った。サンガー法による COX10 のシーケンシングを行い、DNA 配列を決定した。COX10 のコピー数多型を決定するため、TaqMan probe によるリアルタイム定量 PCR 解析を行った。Affymetrix 社の CytoScan による DNA マイクロアレイ解析を行い、コピー数変化が生じているゲノム領域を決定した。

タンパク解析：剖検脳検体（後頭葉皮質と大脳白質）からタンパクを抽出し、ミトコンドリア画分と全細胞成分に分け、ウェスタンブロット解析によるタンパク発現を検討した。ミトコンドリア画分抽出は ThermoFisher 社の Mitochondria isolation kit for tissue、全細胞成分抽出は RIPA buffer を用いた。

#### 結果

筋組織では、筋線維がびまん性に小径化し、全線維でタイプ2線維パターンを呈し、Cytochrome c oxidase の染色性が全線維において低下していた。呼吸鎖酵素活性解析は、筋において呼吸鎖複合体 I -IV すべての酵素活性が低下し、線維芽細胞では複合体 IV 酵素活性の選択的低下を認めた。

5名の家系員のエクソーム解析では、COX10において p.Pro295Leu 変異を発症者に共通して認められた。Polyphen-2 および SIFT による in silico 解析により、p.Pro295Leu 変異の病原性が示唆された。同胞発症2例と圧脆弱性ニューロパチーを発症した父では、COX10 イントロン5からPMP22を含む約1.4Mbの遺伝子欠失が同定された。剖検例（妹）のタンパク解析ではCOX1、COX2、COX4のサブユニット発現の低下が認められた。

#### 考察

本家系の3名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C末に及ぶ欠失を認め、COX10 複合ヘテロ接合体を原因とする Leigh 脳症と診断した。

筋組織におけるタイプ2パターンと Cytochrome c oxidase 欠損については、COX10 と同じ複合体 IV アセンブリー因子である SURF1 変異例において報告されている。本例は、COX10 変異に起因するアセンブリー因子機能低下に伴う複合体 IV 欠損症と考えた。剖検例（妹）の脳組織のタンパク解析で COX10 の発現低下はなく、複合体 IV のサブユニット発現が低下していたことは、COX10 の機能喪失により複合体 IV の形成不全が脳内で生じたものと推察した。

本家系の特徴は、末梢神経障害を併発したことが挙げられる。同胞発症3例は COX10 のミスセンス変異と、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。本家系発症者の同胞3例と父における末梢神経障害は、PMP22 欠失による圧脆弱性ニューロパチーが本態であると考えた。PMP22 欠失に COX10 変異を伴い Leigh 脳症を発症した報告は本例が初めてである。COX10 は PMP22 のごく近傍に位置しているため、両遺伝子領域に存在する CMT1A-repeat 配列を介した相同組み換えにより欠失変異が生じた機序が推察された。

#### 結論

大脳白質脳症と末梢神経障害を併発した家系の臨床像に、COX10 変異と PMP22 欠失の2つの遺伝子変異が関与していることを明らかにした。圧脆弱性ニューロパチーに大脳白質病変や筋症状を併発する例では、PMP22 欠失を伴う COX10 変異の可能性に留意すべきと考えられた。

#### 審査結果の要旨

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、組織学的解析による発症機序の解明を目的とした。

当該家系において、発端者及び幼少期に死亡した弟妹2例の発症者を認めた。また発症者3例と発端者の父には、末梢神経障害を認めた。母、未発症の弟を含めた家系員のエクソーム解析では、COX10において p.Pro295Leu 変異を発症者に共通して認め、同変異の病原性が示唆された。剖検例（妹）の脳組織のタンパク解析では COX1、COX2、COX4 のサブユニット発現の低下が認められ、本家系は COX10 変異に起因するアセ

ンブリー因子機能低下に伴う複合体 IV 欠損症と考えられた。

また、本家系の特徴は、末梢神経障害を併発したことである。同胞発症 3 例は COX10 のミスセンス変異と、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。本家系発症者の同胞 3 例と父における末梢神経障害は、PMP22 欠失による圧脆弱性ニューロパチーが本態と考えられた。

大脳白質脳症と圧脆弱性ニューロパチーに大脳白質病変や筋症状を併発する例では、PMP22 欠失を伴う COX10 変異の可能性を考慮するべきと考えられた。

本研究は、当該疾患の発症機序解明に大きな貢献をしており、博士論文として妥当であると判断した。