

4) 若年性 Sandhoff 病の分子遺伝学的解析

新潟大学脳研究所神経内科 (主任: 宮武 正教授)

若松 延昭

Molecular Genetic Analysis of Juvenile Sandhoff Disease

Nobuaki WAKAMATSU

Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University

(Director: Prof. Tadashi MIYATAKE)

A case of juvenile type Sandhoff disease presenting with mental retardation and local panatrophy was reported. In the patient, total hexosaminidase (Hex) activity of leukocytes was decreased to 17% of control, and Hex B activity was barely detectable. On Cellogel electrophoresis, majority of the residual Hex activity in the patient's leukocyte was Hex S (α, α), and Hex A (α, β) was present in a minor form. On Southern blot hybridization analysis using Hex β subunit cDNA as a probe, the patient's DNA showed identical pattern to those of normal controls. On Northern blot hybridization analysis, the amount of Hex β mRNA was markedly reduced, although the size was identical to that of control. These results suggest that the new phenotype of Sandhoff disease is caused by a small mutation in the Hex β chain gene, which leads to decreased amount of Hex β mRNA.

Key words: Juvenile Sandhoff disease, N-acetyl- β -hexosaminidase, local panatrophy, reduced mRNA.

(若年性サンドホフ病, ヘキササミニダーゼ)

はじめに

細胞内 lysosome に GM₂ が蓄積する, GM₂ gangliosidosis はリソソームの水解酵素, β -hexosaminidase (EC 3.2.1.30) の欠損により生じ, α 鎖の欠損症である Tay-Sachs 病と β 鎖の欠損である Sandhoff 病が知られている. β 鎖は chromosome 5 番に code され, 欠損により, β -hexosaminidase (Hex) A ($\alpha \beta a \beta b$), Hex B ($\beta a \beta b$)₂ 両者の活性低下が起こる. 乳児型では, 生直後より著明な発育障害, けいれん等がみられ, 予後不良な疾患である. しかし, 近年, より軽症の若年

型もしくは成人型の Sandhoff 病の存在が報告されている. 本稿では若年型および成人型 Sandhoff 病について初めにその多様な臨床像を概説し, 次に当科で経験した若年型 Sandhoff 病の臨床像と分子遺伝学的解析を述べる.

1. 若年型及び成人型 Sandhoff 病の臨床像

1976年 Wood ら¹⁾は, 5歳時発症し, 緩徐進行性の小脳性失調, 精神発達遅延を示した10歳の男児例を報告した. この患者は血清, 白血球, 皮膚線維芽細胞の全 Hex 活性 (Hex A, B) がそれぞれ5%, 15%, 4%に低下しており, Hex B 活性は認められなかった. ま

Reprint requests to: Nobuaki WAKAMATSU, Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University 1 Asahimachi, Niigata 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町 757
新潟大学脳研究所神経内科

若松 延昭

た、皮膚生検にて神経の軸索内にオスミン酸親性の沈着物を認め、若年型 Sandhoff 病として報告した。また、Oonk ら²⁾は脊髄小脳変性症を示す18歳および20歳発症の姉妹例で、凹足、小脳性失調、深部感覚障害、四肢筋力低下、痙性の臨床症状を示し、白血病の著明な Hex A, B 活性の低下、皮膚生検にて神経軸索内に封入体を認めた症例を成人型 Sandhoff 病として初めて報告した。今日まで若年型および成人型 Sandhoff 病の報告は10例みられるが、主な臨床像は生後2歳以降に発症する精神発達遅延、小脳性失調・振戦の脊髄小脳変性症様症状、構語障害・痙性・筋萎縮の運動ニューロン疾患様症状、ジストニア等と多彩であるが、乳児型にみられる cherry-red spots は1例しか認められず、症状は比較的良好である。また酵素学的には、いずれの症例も5~10%の残存 Hex 活性が認められている。

2. 当科の症例³⁾

患者：39歳 男性 会社員

家族歴：父に精神発達遅延を認める。両親はいとこ結婚である。

現病歴：在胎中は異常なし。生後の発育は予定7カ月、処女歩行18カ月と遅かった。7歳時、右大腿前面の皮膚が薄く黒ずんでいる事に母親が気付いた。小学校時代の成績は極めて不良であった。38歳時、腰部の皮膚が黒く萎縮していることに母親が気付く、某院神経内科を受診した。精神発達遅延、右後頸部・腰部の皮膚萎縮、右下肢全体の萎縮を指摘され、精査目的で昭和62年9月16日当科に入院した。

入院時現症：身長149cm、体重43kg、舌小帯はやや短縮し、側彎症がみられた。右後頸部・腰部、右大腿前面に皮膚の陥凹を認めた。同部は褐色の色素沈着を伴っていた。右下肢は全体が小さく、周囲長、足底長、下肢長すべてが、左下肢より短かった。他の一般理学的所見には異常を認めなかった。

神経学的には精神遅滞があり精神年齢は鈴木・ビネー法で7歳、IQ44であった。脳神経系では、両側に軽度の感音性難聴を認める以外、異常を認めなかった。他の神経学的所見には異常を認めなかった。

皮膚(右大腿前面)生検：顕微鏡では、真皮は著明に萎縮し、皮下脂肪層はほとんど消失していた。同部の神経は蛇行し、電顕では軸索内にオスミニウム親性の沈着物と膜様構造物を認めた。

以上の皮膚生検所見より患者の皮膚は local panatrophy と診断された。また、電顕所見よりスフィンゴリピドーシス等の蓄積症が疑われ、白血球リソソーム酵素の活性

Leukocyte Hex activities

(n mol/hr/mg protein)

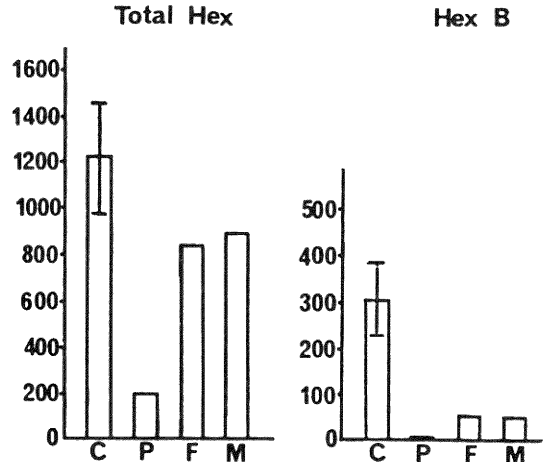


図1 白血球 Hex 活性

正常人(C)、患者(P)、父親(F)、母親(M)の白血球 Hex 活性を 4MU-N-acetyl-β-glucosaminide を基質として測定した。Hex B 活性は熱安定性を利用して、50°C、3時間の熱処理後の残存活性とした。

を測定した。4MU-N-acetyl-β-glucosaminide を基質として測定した患者白血球の全 Hex 活性は control の17%と低下していた。50°C、3時間の熱処理で安定な Hex B 活性は全く検出されなかった。父母は全 Hex 活性、Hex B 活性が各々(70, 75)%, (19, 21)%と低下していた(図1)。以上は熱安定性を用いて Hex B 活性を測定しているので、残存 Hex 活性を見る目的で白血球抽出液を用いて Cellogel による活性染色を行った。Hex はその電気的性質に基づき、電気泳動により Hex S, A, B の順に泳動される。患者では、残存活性は大部分が Hex S (α鎖の二量体) 活性で占められ、わずかな Hex A 活性を認めたが Hex B 活性は認めなかった。しかし、Hex A (αβaβb) 活性が存在することより Hex β鎖が産生されていることを示した。又、患者と正常人を等量まで行った電気泳動では両者の中間の活性パターンを示し患者白血球中には Hex の阻害物質は存在しなかった。両親は正常人と同じ Hex 活性パターンを示したが Hex B 活性の低下を認めた(図2)。以上より患者は Sandhoff 病が疑われたが、生体内での代謝異常の有無を知る目的で直腸粘膜生検、尿中の中性オリゴ糖の解析を行った。

直腸粘膜生検：Meissner の粘膜下神経叢中の神経細

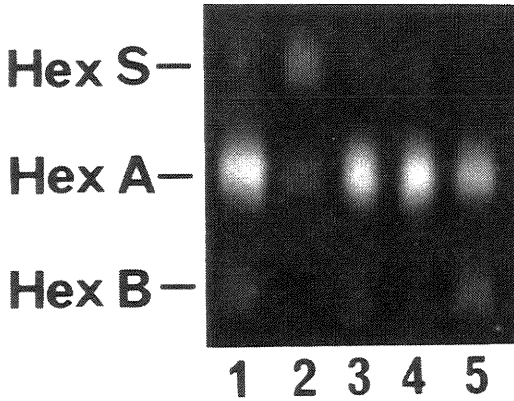


図2 Cellogel 電気泳動

正常人, 患者, 父親, 母親の白血球抽出液を Cellogel にのせ, pH 7.2, 4°C にて電気泳動を行った. 泳動後, 4 MU-N-acetyl- β -glucosaminide を含むろ紙で 37°C, 30分反応後, 遊離した 4 MU を撮影した.

1. 正常人+患者
2. 患者
3. 父親
4. 母親
5. 正常人

胞に membranous cytoplasmic bodies (MCB) を認めた. さらに患者の尿より中性オリゴ糖が検出され体内の代謝異常が証明され, 患者は若年性 Sandhoff 病と診断され, 両親はヘテロ接合体と考えられた.

3. 分子遺伝学的解析

我々は本患者の異常 Hex β 鎖の解析にあたり, まず Southern blot 解析を行い患者 Hex β 鎖遺伝子のゲノム DNA レベルでの異常の有無を調べ, 次に Northern blot 解析により mRNA レベルの解析を行った.

1) 患者及び正常人の白血球より genomic DNA を抽出し, EcoR I, Hind III で切断した後に, ATCC より入手した完全長の Hex β 鎖 cDNA を用いて Southern blot 解析を行った. 患者は正常人と同じパターンを示した (図 3).

2) 患者及び正常人の皮膚線維芽細胞を培養し同細胞より poly A (+) RNA を抽出し Northern blot 解析を行った. プローブに Hex β cDNA を用いた Northern blot 解析では, 患者の mRNA は正常人と同じ大きさを示したが, 量は数%以下に著明に減少していた. プローブに Hex α cDNA, β actin を用いた対照実験では患者, 正常人両者に差を認めなかった (図 4).

以上, 本患者では Hex β genome DNA に大きな遺伝子の欠失, rearrangement はなく point mutation 等の small mutation により Hex β mRNA が異常に減少し Hex β 活性低下が起こったと考えられた.

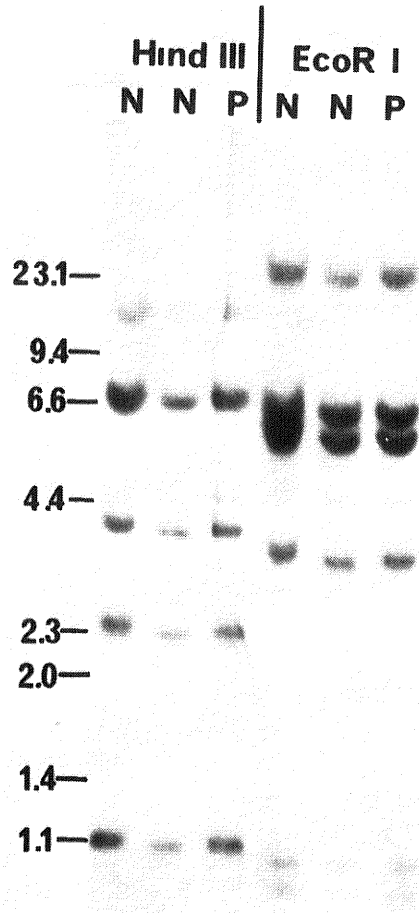


図3 Southern blot 解析

正常人 (N), 患者 (P) 白血球の genomic DNA を Hind III, EcoR I にて切断後, ATCC より入手した完全長の Hex β 鎖 cDNA をプローブとして Southern blot 解析を行った.

Sandhoff 病について現在までに明らかにされている遺伝子変異は, 乳児型では Bikker ら⁴⁾ が, genomic DNA の 50kb の欠失を認めている. 一方, 若年型・成人型では Rubin ら⁵⁾ は運動ニューロン疾患を示した姉妹例の成人型 Sandhoff 病の Northern blot 解析をおこなっているが正常人と差を認めなかった. 1989年, Nakano ら⁶⁾ は上記 Wood らの若年型 Sandhoff 病の分子遺伝学的解析を行い, 第12 intron に起こった point mutation (CG \rightarrow AG) により新たな 3' splicing site が生じ, 第12と第13 exon の間に24 nucleotides が挿入され分子量の大きい異常な Hex β 鎖が産生されることを示した. 我々の患者で認められた mRNA の著名な減少は他の

Northern blot analysis of fibroblast poly(A)⁺RNA

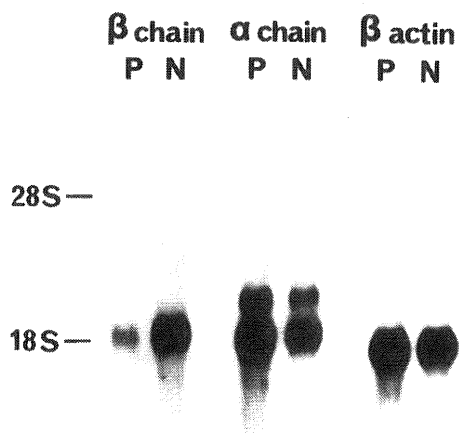


図 4 Northern blot 解析

正常人(N), 患者(P)の皮膚線維芽細胞より poly A(+) RNA を抽出し Hex α 鎖 cDNA, β 鎖 cDNA, β actin をプローブとして Northern blot 解析を行った。

若年型・成人型 Sandhoff 病の解析と明らかに異なっており、本疾患における遺伝子上の変位が多様で有ることが考えられる。

4. 今後の解析

mRNA の減少を起こす原因として

- 1) transcription での異常
- 2) 不安定 mRNA の産生 が知られている。

1) に関しては、サラセミアの研究で promotor 領域の TATA box⁷⁾, distal element の mutation⁸⁾ により正常の10~30%の mRNA の減少を認めているが、本症ほど減少した報告はない。一方, nonsense mutation, missense mutation, splicing error を起こす point mutation⁹⁾ では著明に減少した mRNA の報告があり色々な mutation により不安定 mRNA が産生される事が知られている。今後、本症でも種々の制限酵素を用いての Southern blot 解析やゲノム DNA あるいは cDNA の塩基配列の解析, さらには蛋白レベルでの変異酵素の発現を行い遺伝子レベルでの病因解明に努めることが必要である。

おわりに

生まれながらの精神発達遅延があり、右後頭部、腰部、右大腿前面に色素沈着を伴う皮膚の萎縮があり、さらに右下肢全体の萎縮も認めた local panatropy を伴った若年型 Sandhoff 病の一例を呈示し、その患者の分子遺伝学的解析を行った。又、現時点での他の Sandhoff 病の分子遺伝学的解析結果もあわせて報告した。今後、本疾患の遺伝子解析が進み病態が解明されると期待される。

ご指導いただいた脳研・神経内科 宮武 正教授、同神経内科 辻 省次先生に感謝致します。

参考文献

- 1) Wood, S. and MacDoougall, B.: Juvenile Sandhoff disease: Some properties of the residual hexosaminidase in cultured fibroblasts, *Am. J. Genet.*, **28**: 489~495, 1976.
- 2) Oonk, J.G.W., vander Helm, H.J. and Martin, J.J.: Spinocerebellar degeneration: hexosaminidase A and B deficiency in two adult sisters, *Neurology (NY)*, **29**: 380~384, 1979.
- 3) Wakamatsu, N., Tsuji, S., Nakano, R., Yamauchi, T., Harayama, H., Matsumura, G., Ito, M. and Miyatake, T.: Juvenile Sandhoff disease with local panatropy and mental retardation: biochemical and molecular genetic analysis. American Society of Human Genetics. 39 Annual Meeting. New Orleans, Louisiana. Program and Abstracts, pA74, 1988.
- 4) Bikker, H., van den Berg, F.M., Wolterman, R.A., de Vijlder, J.J.M. and Bolhuis, P.A.: Demonstration of a Sandhoff disease-associated autosomal 50-Kb deletion by field inversion gel electrophoresis, *Hum. Genet.*, **81**: 287~288, 1989.
- 5) Rubin, M., Karpati, G., Wolfe, L.S., Carpenter, S., Klavins, M.H. and Mahuran, D.J.: Adult onset motor neuronopathy in the juvenile type of hexosaminidase A and B deficiency, *J. Neurol. Sci.*, **87**: 103~119, 1988.
- 6) Nakano, T. and Suzuki, K.: Genetic cause of a Juvenile form of Sandhoff disease. Abnormal splicing of β -hexosaminidase β chain gene transcript due to a point mutation within intron

- 12, *J. Biol. Chem.*, **264**: 5155~5158, 1989.
- 7) **Antonarakis, S.E., Irkin, S.H., Cheng, T., Scott, A.F., Sexton, J.P., Trusko, S.P., Charache, S. and Kazazian, H.H.:** β -Thalassemia in American blacks: Novel mutations in the "TATA" box and an acceptor splice site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**: 1154~1158, 1984.
- 8) **Orkin, S.H., Antonarakis, S.E. and Kazazian, H.H.:** Base substitution at position -88 in a β -thalassemic globin gene, *J. Biol. Chem.*, **259**: 8679~8681, 1984.
- 9) **Maquat, L.E., Kinniburgh, A.J., Rachmilewitz, E.A. and Ross, J.:** Unstable β -globin mRNA in mRNA-deficient β^0 thalassemia, *Cell.*, **27**: 543~553, 1981.

司会 有難うございました。予定した時間が丁度10分程ございますので、ディスカッションをお願いしたいと思います。

浅見 小野先生にお伺いいたします。私もよく解らないのですが、アポB 100の binding site が先天性ではなくて secondary に変化して来るような biochemical な機序はあるのでしょうか。

小野 結局、ああいう binding で考えている事というのは、basic アミノ酸と、acidic アミノ酸の相互作用を基本として考えている訳で、例えば mature な蛋白で起こる deamination とか、そういう事はあまり起こっていないので、やはり結合の異常は genetic な部分が大いのではないかと、secondary なものというのは、ちょっとぼくは解りません。

司会 有難うございました。ほかに。

小野 最近 acetyl LDL の receptor が牛などから精製されていて、いずれ今までの LDL receptor との違いみたいなものははっきり解ってくると思います。マクロファージはこの acetyl LDL レセプターを持っており、酸化された LDL がマクロファージに receptor を介して取り込まれている。そういった機構が、血液の脂質のレベルをコントロールする上で、どの位寄与しているのか、ちょっと良く解らないのですが、例えばグルタチオンをやって、1つの還元剤の消長を見ているというのは、マクロファージの脂質代謝に対する機能を評価しようとする1つの試みなのかどうか伺いたい。また最近、いわゆるそのプロスタグランジンとかあるいは飽和

脂肪酸から出来てくる malondialdehyde をアポ蛋白につけて、そしてそれに対する抗体を作って実際 in vivo で血清の中に malondialdehyde をつけたアポ蛋白を検出している人もいるのですが、実際 in vivo にかかなりな確率でそういう実態があるのだという報告もある様なので、そういうグルタチオンの挙動を考えるポイントがどこにあるのか教えて頂ければ有難いと思います。

浅見 かなり難しい質問で、あまりお答え出来ないかもしれませんが、グルタチオンは最近の文献では、かなり色々な機能を持っております。例えば生体に対しても、その欠乏がリンパ球芽球化反応低下を起こすとか、あるいは free radical のスクベンジャーであるという様な事が色々言われています。それから、ラットなどで LDL を介して、コレステロールの低下作用があるという様な文献を少し見かけたものですから、今回のような検討をしてみました。目標と言いますか、検討したい点は、free radical も勿論ありますし、それから細胞内反応という事もありますし、かなり多岐に渡った目標や仮定を持っております。実際に今回行った事は、マクロファージだけに限定はしておりません。それから後者の答に関しては、私はまだあまり知識が無いのでお答え出来ないと思います。

小野 先ほど二内の方もそれに関して質問されてたと思うのですが、いわゆる過酸化脂質と言うのが、血液のリポ蛋白が担っている lipid の不飽和という様な所で、本当に具体的にかかなりの量で起こっているのかどうか疑問に思っており、恐らくいわゆるオータコイドの様な、プロスタグランジンやその代謝物が血液の中で代謝され、色々なプロセスで蛋白を修飾する総体を過酸化脂質として測っている可能性が高いのではないかと思う。例えば本当にリポ蛋白を HDL とか色々に分けて行って、その中で過酸化脂質が本当にあるという実態がどの位つかまえているか不明です。抗酸化剤は今後色々な意味で注目されるのかもしれないという感じはしますけど、あるいは勿論両方起こっているのかもしれないですけど、いわゆる local hormone だけだと、もう体全体としてはかなりのプロスタグランジンの量が実際はあるのではないかと、それによる catabolite みたいなものがリポ蛋白の oxidation を起こしている可能性が非常に高いのではないかという気がするのですが。

司会 三井田先生どうぞ。

三井田 今のお話は、さっき挙げた変性 LDL のところに相当するのだと思うのですが、最初の acetyl LDL とか malondialdehyde で修飾された LDL と化学修飾

LDL が最初に言われていて、それが正常の LDL receptor ではないスキベンジャー pass way で代謝されるのは解っている訳ですね。その他に色々な変性 LDL が今まで知られていまして、今出た oxidized LDL とか、あと糖尿病の人に出てくる様な glycosidated LDL とか、あとタバコの煙で修飾された様な、タバコの煙での変性を受けた様な LDL など、色々なものが言われている訳です。それでよくもはっきり解らないのですが、濃度的に言うと実験的に証明される様な濃度は、どうもあまり無い様なのですが、そういうのに対する抗体なんかを用いてやると局所では出来ているのではないかという事を言っている人がいる様です。malondialdehyde なんかですと血小板から放出されるので、局所では濃度が高くなっているかもしれないという様な事も言われてまして、まだよく解りませんが、可能性としてはあるのだと思います。あと抗酸化剤については、臨床的に高コレステロール血症の人に使っているプロブコールが、もともと抗酸化剤として開発されてまして、実験的にも変性 LDL なんか使った実験で、銅とかそういうイオンで酸化するのだと思いますが、一緒に使うことによってその変性を防いで、実際にマクロファージの取り込みを抑えるという事は言われていると思います。ただ濃度的に言うと、血中で存在するよりも非常に高濃度の銅イオンなんかで変性させているので、本当にそれが働いているかどうか解らないのですが、局所的にはそういう可能性はあるのではないかと、プロブコールが実際にコレステロール下げる以上に、腱の黄色腫なんかの退縮が非常に強いとかいうのは、ひょっとすると抗酸化作用がかなり働いているのではないかということも言われています。

司会 今回の事に関連しているかもしれませんが、先程三井田先生が HDL 分画の中で、アポ蛋白を測定して、非常に濃度が薄いために判定し難いということをおっしゃったのですが、method の面で感度を上げて、ひっかけるという方法を考えておられますか。

三井田 一応今回やったのは、免疫比濁法で測定しているんで、ちょっと前まではディスクの方法で、免疫拡散法でやりましたので、ある程度濃度が無ければ測れなかったのですが、免疫比濁法で相当低濃度まで測れるのですが、それで定量しても HDL 中のアポEは殆ど検出されないか、あってもごくわずかなので、通常の方法だとちょっとやはり難しいと思います。

司会 そうですか、それは測定法として限界に来ているという事ですか。

三井田 今回の測定法で解る程、アポE rich HDL が増えているという事は無い様な感じですが。

司会 小野先生、このことでコメントございましょうか、有難うございました。他に何かございますか。フロアの先生方からでも結構ですが。

佐藤 小野先生に1つお聞きしたいのですが、LDL の receptor は肝細胞に多いかと思うのですが、組織学的に見てどの細胞でも発現し得るのでしょうか。例えば神経を損傷した場合に、repair の時に LDL receptor が発現してくるといふ報告がありますが、そういうある特定の条件下では LDL receptor というのは発現し得るのでしょうか。

小野 一般的には fibroblast をはじめ、リンパ球でもマクロファージ以外の細胞でも発現されているのではないかと思います。昔は肝細胞以外が持っていると考えていました。と言うのは、肝を除去した時でも結構小さな細胞に LDL が取り込まれるという事で、肝細胞の receptor として、LDL receptor を同定するのにちょっと時間がかかったのです。神経細胞での検証というのは良く解りませんが、まあ fibroblast 系の細胞なら持っているのではないかと思います。細胞にとってコレステロールは一番外側の細胞膜に free のコレステロールが絶対に必要で、無ければ、例えば赤血球なら溶血を起こすという様に、膜としての機能がなくなるので、哺乳類の細胞ではコレステロールは必須なものです。それを賄うのに、1つは receptor、もう1つは生合成で賄っている訳で、必ずしも熱心に生合成している訳ではないが LDL から来なくなれば、絶対細胞は死なない様に対応するため生合成の機能で、それを補っているわけです。

司会 若松先生の発表でも遺伝の問題がありましたが、三井田先生の発表を聞いて虚血性心疾患、あるいは肝疾患で遺伝的、家族的素因があるのではないかとの印象を持ったのですが、三井田先生、如何ですか。

三井田 うちの科で、心臓カテーテルをやる患者さんですと、平均でだいたい56、57才位の人ですけれども、その患者さんの中で言いますと、だいたい7%か8%位はさっき出ましたけど、家族性の高コレステロール血症の患者さんがいます。年齢が高齢になりますと普通の虚血性心疾患だと年齢と共に増えますので、高齢、70とか80才になると確率はうんと減ると思いますが、カテをする様な対象群では7、8%は実際にいると思います。100人以上検討しまして、その他に3型の高脂血症、非常にわずかで1%位だと思いますし、複合型高脂血症、さっき出ましたけど、診断の決め手が無いので家族調査しか

ないのですけど、さっきの患者さんの中では、まず確実だろうと思われるのが1家系ありまして、色々疑わしい人も入れると10%から20%位はいると思います。実際に食事等で色々治療しても反応が悪くて、兄弟とかで同様に高いと、食事あまり関係なさそうだという人もその位はいるようです。

司会 有難うございました。小児科では冠動脈疾患と言いますと、川崎病があります。治療の上手、下手、あるいは早期治療という事も、1つの factor になっているかもしれないけど、そうでない面でも冠動脈疾患を来し易い factor、家系というものがある様に思うのです。ただこの面の研究を、私共まだ怠っておりますので何とも言えませんが、その様な意味もあって、今、三井田先生にお伺いした訳です。他に何かございますか。

フロアの先生方がいかがですか。はい小野先生どうぞ。

小野 浅見先生のいわれる後天的なものの可能性ですが、アポBの異常を報告した人達のディスカッションには、蛋白側での genomic な defect は無くても、アポ蛋白とか脂質なんかの composition 異常, assembly が変わっている様な時にも、何らかの影響がある可能性もあるという事を、書いてはいるんですね。ただ実際どれがそれなのか、という事が良く解りません。後天的なものの中には、そういう可能性は無い訳ではないのだろう、という様な気はしますが。

司会 時間もそろそろ迫った様です。今日の「各科領域における脂質代謝異常」のシンポジウムを以上で閉じさせていただきます。