

氏名	土屋 舞
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工農博4甲 第52号
学位授与年月日	令和4年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	医学専攻
学位論文題名	RFC1 repeat expansion in Japanese patients with late-onset cerebellar ataxia (日本人の遅発性小脳失調症患者における RFC1 リピート延長について)
論文審査委員	委員長 教授 木内 博之 委員 講師 上村 拓治 委員 講師 荻原 雅和

学位論文内容の要旨

研究の目的: 近年,複製因子 C サブユニット 1 (*RFCl*) 遺伝子のイントロンの AAGGG リピートのホモ接合性の異常伸長が cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome (CANVAS) の病因であり, 遅発性小脳失調症の頻度の高い原因となることが報告された. CANVAS は小脳失調, 感覚性ニューロパチーなどを特徴とする常染色体劣性遺伝性神経変性疾患である. CANVAS はこれまでほとんどがヨーロッパからの報告であり, 本邦ではコホートの報告がなかったため, 日本人の遅発性小脳失調患者における CANVAS の頻度・臨床像と遺伝的特徴を明らかにすることを目的とした.

方法: 遅発性小脳失調症の患者 37 名 (常染色体劣性遺伝または遺伝形式不明の 23 家系 25 名と, 孤発性 12 名) を対象とした. DNA は標準的な方法で末梢血の白血球から分離した. すべての患者は遺伝子検査にて SCA1, SCA2, MJD, SCA6, SCA31 のいずれも陰性であることを確認した. 標準的な PCR, long-range PCR, Repeat primed PCR (RP-PCR), サザンブロッティングによる解析を既報告に従い実施した.

結果: 37 名中 4 名で *RFCl* の異常伸長を確認した. これら 4 名は臨床的に CANVAS の診断を受けており, 遺伝性が 3 名, 孤発性が 1 名だった. その他の患者は, 小脳失調を除き CANVAS に特徴的な所見は認めなかった. Long-range PCR での結果を Sanger 法で確認すると, 3 名の遺伝性発患者では両アレルで AAGGG リピートが伸長していることを見出した. 興味深いことに, 1 名の孤発性患者では ACAGG リピート伸長が認められた. 次に, AAGGG ペンタヌクレオチドを標的とするプライマーと, 孤発性患者に対して ACAGG の 5 塩基を標的としたプライマーを用いて RP-PCR を行った結果, 家族性, 孤発性それぞれで異常リピート伸長が存在することを再確認した. 最後に, サザンロットによるハイブリダイゼーションを行い, リピート伸長の長さを確認した. 異なるサイズの異常伸長を持つ個体では 2 つの異なるバンドとして, また対立遺伝子が同程度のサイズであれば 1 つの太いバンドとして可視化されるが, Sanger 法で AAGGG リピートまたは ACAGG リピートの異常延長を示した 4 名の患者は, バンドの異常伸長が確認された.

考察：ヨーロッパ人では、孤発性遅発性小脳失調症における *RFC1* イントロンのペンタヌクレオチドリピートの異常伸長頻度は 22% である。一方、本研究では、遺伝性患者 3 名と孤発性患者 1 名にリピートの異常伸長が認められ、その頻度は遺伝性患者で 12%、孤発性患者で 8.5% であることを明らかにした。このことから、日本人の CANVAS 患者の疾患頻度はヨーロッパ人よりも低い可能性がある。中国人の孤発性遅発性小脳失調症患者 91 人では、*RFC1* 両アレルでの AAGGG リピートの異常伸長は認められなかったと報告されており、フリードライヒ失調症における GAA リピートの異常伸長の特異的な民族分布と同様であると考えられた。

今回の研究ではサンプル数が限られていたが、本邦の CANVAS の有病率を明らかにすることができた。また、臨床的に CANVAS が考えられた孤発性 1 名の患者において、両アレルの ACAGG リピート伸長が認められ、これが病因である可能性を見出した。この新規リピート配列は、従来から病因として知られている AAGGG リピート配列と同じ C/G 含量を持ち、サザンブロットでも同じサイズの配列を示した。*RFC1* の第 2 イントロンに存在する CANVAS に関連する短いタンデムリピートは、多くの遺伝的不均一性を示している。これまでに AAAAG, AAAGG, AAGAG, AGAGG の伸長が報告されているが、いずれも非病原性とされていた。さらなる CANVAS 症例の蓄積により、ACAGG リピートの異常伸長が CANVAS の原因となる分子メカニズムを解明する必要がある。さらに本研究では、これまで CANVAS では報告されていなかった睡眠時無呼吸症候群 (SAS) の男性患者を見出した。この患者は閉塞性、中枢性、および混合性の SAS を示したが、CANVAS 患者の脳幹における微妙な微細構造の変化を明らかにするためには、さらなる神経病理学的研究が必要であり、治療可能な症状を見落とさないために CANVAS における睡眠障害の認識についても検討する必要がある。また、遺伝性の 1 名にこれまで CANVAS では報告されていなかった両側性の Babinski 徴候を認めており、CANVAS の病態には錐体路障害の関与も推測され、今後、多数例での検討が必要と考えられた。

結論：日本人の遅発性運動失調症患者における CANVAS の頻度は比較的低いこと、病因に ACAGG リピートが関与している可能性があること、新たな症状として SAS、腱反射亢進が考えられることを明らかにした。本研究の結果は、CANVAS の臨床的および遺伝的スペクトルを拡大する可能性があると考えられた。

論文審査結果の要旨

審査対象論文：土屋 舞 *RFC1* repeat expansion in Japanese patients with late-onset cerebellar ataxia (日本人の遅発性小脳失調症患者における *RFC1* リピート延長について)

本論文は、日本人の遅発性小脳失調患者 37 名における cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome (CANVAS) の頻度・臨床像と遺伝的特徴を検討したものである。そのうち 4 名で *RFC1* の異常伸長を認め、臨床的に CANVAS の特徴を有する 3 名の遺伝性ならびに 1 例の孤発性例であり、前者では両アレルで AAGGG リピートが、後者では ACAGG リピートが伸長していることが明らかとなった。以上より、日本人の遅発性運動失調症患者における CANVAS の頻度は比較的低いこと、病因に ACAGG リピートが関与している可能性があること、また、新たな症状として睡眠時無呼吸症候群と 腱反射亢進を呈する可能性があることを明らかにした。本研究の結果は、CANVAS の臨床的および遺伝的スペクトルのより正確な診断につながり、遅発性小脳失調の病態解明と治療の開発への貢献するものと考えられた。

2022 年 1 月 25 日の発表会において、本学位論文について審査が行われた。主な質問と回答は以下の通りである。

Q1：Short-range PCR に関して、negative control がないが、repeat が多いと PCR 産物が増えないことを考慮しているか？また、100bp 以下のバンドは何を意味しているか？

A1：既知の報告を参照して、repeatが多いとPCR反応が起こらないように、PCR条件を設定しているためである。100bp以下のバンドは、プライマーダイマーなどの非特異的反応と考えている。

Q2：ペンタヌクレオチドのrepeat数は、症状や発症までの期間と関係性はあるか？

A2：repeat数と症状の関係性は無いと言われている。また、症状発現までの期間との関係もないと考えている。

Q3：サザンブロッティングの2つのコントロールで、バンドが一つのもの二つのものがあるが、その意味は？

A3：コントロールでも、repeat数の違いがあるので、バンドが一つになる症例とそうではない症例があると考えている。

Q4：repeatが多く、DNA Sequencingの解析が大変だったと思うが、どのくらいの長さのPCR産物をどのように解析したのか？

A4：repeatが多く解析が難しかった。Sequencing primerは、PCR primerよりも内側に作成し、Sequencingを行った。Sanger法では、Repeatが多く、約380bp位しか解析することができなかったが、特徴的なrepeatは確認できた。

Q5：本研究ではヨーロッパの報告と比べて、発症頻度が低かったが、その理由は？AAGGGのリピートが関連するのか？

A5：本疾患が2万5千年前のヨーロッパが起源と言われており、移民等で広がっていると考えられ、アジアなどでは頻度が低いと思われる。AAGGGのリピートが発症頻度に関連するかは不明である。

本研究者は、このように指摘された点、全てについて適切な回答、考察を行ったので、審査委員全員が一致して、今後の研究の展望も含め、本研究が博士論文の資格を十分に有するものであると判定した。