

論文の内容の要旨

The Study on Pathogenesis and Pathophysiology of Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (LINCL)

幼児型神経セロイドリポフスチン症の 病因及び病態に関する研究

指導教官 五十嵐 隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

倉地 由季子

【背景】精神運動発達遅延、退行、視力低下を認め、セロイド/リポフスチンの顆粒の神経細胞内への蓄積を認める疾患を、1969年 Zeman と Dyken は神経セロイドリポフスチン症 (neuronal ceroid lipofuscinosis: NCL) と名付けた。Santavuori や Haltia らが乳児型を報告し、基本的な病型 (乳児型、幼児型、若年型、成人型) を提唱した。遺伝形式は常染色体劣性で、電顕所見は型により特徴がある (乳児型: granular osmiophilic deposits: GRODs、幼児型: curvilinear bodies、若年型: fingerprint profiles: FPP、成人型: FPP+GRODs)。近年分子遺伝学の発展に伴い、遺伝子座位の同定、責任遺伝子による病型分類が提唱されている。

今回、NCL の幼児型 (late infantile NCL: LINCL) に関し研究した。患者は2-4歳に痙攣発作で発症し、精神運動発達遅延、視力障害、ミオクローヌスを呈することを臨床的特徴とする。蓄積物質のリポフスチン顆粒の85%は疎水的なプロテオリピド蛋白質の一つであるミトコンドリア ATP 合成酵素のサブユニットcである。この疾患の原因遺伝子は1.7 kb のコード領域を有する *CLN2* (ceroid lipofuscinosis, neuronal 2) で、遺伝子産物 (46~49 kDa の lysosome 蛋白) の構造から pepstatin-insensitive protease (pepinase) の機能を有することが想定

されている。そこで、実験 1：CLN2 蛋白に対する抗体を作製し、その蛋白のヒトの脳、内臓臓器における分布を患児を含め明らかにし、発現の発達の検討も行った。実験 2：作製した抗体を用いた診断法を研究した。この間に、責任遺伝子の変異の報告がされはじめ、遺伝子型と表現型との関連を知るうえで、実験 3：遺伝子解析を行った。

【実験 1】 CLN2 蛋白発現の分布と発達

【対象と方法】 コントロール：<Immunoblotting (IB)>11 歳の脳（大脳皮質）及び内臓臓器と、在胎 21, 30, 39 週, 生後 5 ヶ月, 11, 58 歳の大脳皮質の凍結標本を用いた。

<Immunohistochemistry (IHC)>3 例の脳（大脳皮質、基底核、脳幹、小脳と脊髄）及び内臓臓器、在胎 14 週～60 歳の脳を使用。患者：日本人の NCL4 例（臨床所見から患者 1～3 は LINCL、患者 4 は若年型）。<IB>患者 2 の脳及び内臓臓器の凍結標本を用いた。<IHC>脳（大脳皮質、基底核、脳幹、小脳と脊髄）4 例及び内臓臓器 1 例を用いた。IHC はホルマリン固定、パラフィン切片を用い、アビジンビオチン (ABC) 法で検索した。いずれの検体も研究使用の同意を得た。抗体は CLN2 蛋白の N-末端と C-末端の構造から特異性の高い 14 及び 15 アミノ酸残基を選択し、これを抗原としウサギ抗血清を作製した (anti-CLN2-N と anti-CLN2-C)。ヒト脳の IB では、吸着試験後の血清では認められなかった CLN2 蛋白に相当する約 49 kDa の band が両抗体共に認められ、特異性が確認された。

【結果】 発現分布：<IB>CLN2 蛋白はコントロールの脳と内臓臓器ともに発現が広範に認められたが、LINCL では発現は認められなかった。<IHC>コントロールの脳全体の神経細胞、グリア、ペリサイト、肝細胞、腎尿細管上皮細胞、ランゲルハンス島細胞、副腎皮質細胞、小腸神経節細胞、特に Kupffer 細胞、ペリサイトに強く発現した。LINCL (患者 1,2) では、調べた全ての細胞で発現はなかったが、患者 3,4 では発現が認められた。発現時期：<IB>CLN2 蛋白は在胎 39 週から発現し、生後 5 ヶ月から 11 歳では明らかに増加していた。<IHC>脳幹では 2 歳以後に強陽性となり、大脳皮質では遅れて発現は増強していた。

【考察】 CLN2 蛋白は脳、各内臓臓器に広範に認められ、なかでも、食食機能を有する細胞に強く発現し、lysosome 内での protease としての機能に合致すると考えられた。その分布は、サブユニット c と同様であった。発現時期は幼児期に増強し発症年齢に関連すると考えられた。患者 1,2 の LINCL では発現の欠如を認め、患者 4 の若年型と差があり、この特異的抗体による蛋白レベルでの診断の可能性が考えられた。患者 3 に関しては、臨床症状は LINCL と同じであったが、LINCL の亜型の可能性が示唆された。

【実験2】 CLN2 蛋白による LINCL の診断法

[対象と方法] コントロール：正常 11 例（造血関連臓器、リンパ芽球、線維芽細胞、末梢血リンパ球）、他のリソソーム病患者 3 例（Tay-Sachs 病、GM1gangliosidosis、Gaucher 病;脾臓、リンパ芽球）。NCL 患者：LINCL5 例（患者 1,5~8;コントロールと同部位）と Variant type of LINCL2 例（線維芽細胞）。いずれの検体も研究使用の同意を得た。抗体：anti-CLN2-N と anti-CLN2-C を使用。<IHC>末梢血リンパ球、リンパ芽球は塗沫標本、造血系臓器はホルマリン固定後パラフィン包埋した切片を作製し、線維芽細胞は 4%PFA 固定をし、ABC 法で行った。<IB>末梢血リンパ球・リンパ芽球・線維芽細胞を用いた。

[結果] <IHC>CLN2 蛋白は両抗体ともコントロールと LINCL 以外の症例の造血関連臓器、末梢血リンパ球、リンパ芽球、線維芽細胞で認められた。骨髄ではとくに顆粒球、単球、マクロファージ系幹細胞の細胞質での発現が強く、リンパ節、胸腺、脾臓に発現が認められた。LINCL では、いずれの臓器、末梢血、細胞においても発現はなかった。<IB>CLN2 蛋白の発現はコントロールと LINCL 以外の症例では両抗体で認められ、LINCL では両抗体ともに欠損あるいは著明に減弱をしていた。

[考察] LINCL の診断は、細胞質内の異常な蓄積物質の電顕所見により行われている。最近、CLN2 蛋白は tripeptidyl-peptidase I (TPP I) の機能も有すると判明し、リンパ球や線維芽細胞の pepinase や TPP I の酵素活性測定の結果もある。今回の結果から、この特異的な抗体を用いて、IHC や IB で LINCL の診断が可能と推定される。本診断法の利点は、蛋白の発現の有無を直接確認できることである。ただし、若干の発現が認められる際はミスセンス変異や splice junction 変異の可能性もあり、酵素活性測定との併用を考慮する必要がある。第2により侵襲の少ない末梢血で行え、酵素診断の際の厳格な条件 (pH や温度) もなく結果が安定している。第3に費用も時間も少なく診断が可能である。

【実験3】 CLN2 の遺伝子解析

[対象と方法] LINCL4 例（患者 5~8）と患者 5,6 の両親、50 人の正常コントロールを対象に CLN2 の遺伝子解析を行った。いずれの症例も、遺伝子解析に関し同意を得た。患者 7 はロシア人、他は皆日本人である。DNA 抽出：末梢血（患者 5,6）300 μ l、細胞（患者 7,8）から抽出した。DNA 解析：3 組のプライマーセット（産物 2837, 1423, 1925bp）、LA Taq を用い、PCR を行った。産物をカラム精製し、29 個のシークエンスプライマーを用いて ABI 377 でシークエンスを行い、ホモロジー検索をした。RNA 抽出と cDNA 合成：患者 5,6 と各々の

両親の末梢血から total RNA を抽出し、First-strand cDNA synthesis kit を用いて cDNA 合成を行い、DNA 解析と同様にホモロジー検索まで行った。

【結果】 <DNA 解析> LINCL のゲノム解析で検出した変異は 43 個で 3 個 (C3670T(エクソン 6):コーカサス人の LINCL の common な変異, a3436t(イントロン 5) と A5837T(エクソン 12):多型) は既に報告されていた。エクソン上の変異 5 個のうち、C3383T (Q161X)、A4020G (N286S)、G4357C (K346N) は新たな変異であった。これらの変異は 50 例のコントロールでは認められなかった。患者 5 で A4020G、患者 6 で G4357C をヘテロで、患者 7 で C3670T をホモで、患者 8 で C3670T と C3383T を各々ヘテロで認めた。<mRNA 解析>患者 5, 6 の変異部のピーク (871, 1052) はそれぞれ変異型 (G,C) のみであったが、患者 5 の母は A871G、患者 6 の父は G1052C を mRNA 解析でもゲノム DNA と同様に正常と変異型のヘテロで発現を認めた。

【考察】 LINCL 4 例のゲノム DNA 上に 4 個の変異を認め、そのうち日本人 3 例での 3 個は新規であった。中国人からも C3670T 以外の部位の変異の報告があり、common な変異が人種により異なる可能性が示唆される。患者 5,6 の片アレルの変異は不明であった。プロモーター及びエンハンサー領域の異常、1つのアレル上に遺伝子全体を含む大きな欠失、エピジェネティック (プロモーター領域の DNA メチル化など) な発現の負の制御などの原因が存在している可能性が考えられる。

【まとめ】今回、LINCL の病因と病態に関する研究を行った。CLN2 蛋白は全身臓器に広範に分布し、脳での発現は幼児期に増強することを明らかにした。また、患者における発現の欠如を証明し、LINCL の新たな簡易診断法を開発した。さらに、CLN2 遺伝子の日本人における新たな変異を明らかにした。LINCL を早期診断し、乳幼児期の CLN2 蛋白の発現機序の分子遺伝学的解明が進められれば、発症予防や治療へと発展させることができると考えられる。