

家族歴のない脊髄小脳失調症6型の遺伝学的解析

藤岡 竜太¹⁾ 三浦 史郎²⁾ 山田 浩平³⁾ 柴田 弘紀³⁾

Genetic analysis of a sporadic case of spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6)

Ryuta FUJIOKA¹⁾ Shiroh MIURA²⁾ Kohei YAMADA³⁾ Hiroki SHIBATA³⁾

【要 旨】

電位依存性カルシウムチャンネル $\alpha 1 A$ サブユニット(*CACNA1A*)遺伝子上にあるDNAの三塩基配列CAGリピートの異常伸長が脊髄小脳失調症6型(Spinocerebellar ataxia type 6: SCA6)の発症に関わることが知られている。SCA6の原因遺伝子である*CACNA1A*遺伝子上ではCAGリピート数が健常者では4から19, 罹患者では21から33となる。また、SCA6は家族歴のある常染色体優性遺伝性の罹患者が多く、日本では優性遺伝性の脊髄小脳失調症の約30%を占めている。本研究では孤発性(家族歴のない)SCA患者および両親の末梢血検体を使用し、遺伝学的解析によるCAGリピート異常から遺伝性を検証した。結果として患者はCAGリピートの異常伸長(変異アレルでリピート数23)が認められた。さらに遺伝学的解析により父親由来の正常アレルが伸長して罹患者の変異アレルになったのではないかと示唆された。これらのことから孤発性SCAの症例でも遺伝学的解析により原因の究明ができる可能性が考えられる。

【キーワード】

脊髄小脳失調症6型 常染色体優性遺伝 *CACNA1A* CAGリピート

1. はじめに

脊髄小脳失調症6型(Spinocerebellar ataxia type 6: SCA6)は主に小脳症状のみで進行が緩やかな特徴を持った常染色体優性の神経変性疾患である¹⁾⁻²⁾。電位依存性カルシウムチャンネル $\alpha 1 A$ サブユニット(*CACNA1A*)遺伝

子上に存在するDNAの三塩基(シトシン、アデニン、グアニン)のリピート配列であるCAGリピートの異常伸長がSCA6に大きく関わっていることが知られている³⁾⁻⁸⁾。具体的には、CAGリピート数が健常者の正常アレルでは4から19であるが、罹患者の変異アレルでは19より大きいリピート数となる³⁾⁻⁸⁾。*CACNA1A*遺伝子は19番染色体短腕の13.13に位置する³⁾。

¹⁾ 別府大学短期大学部食物栄養科 ²⁾ 久留米大学医学部内科学講座

³⁾ 九州大学生体防御医学研究所ゲノミクス分野

SCA 6は、優性遺伝性のSCAの約30%を占めている⁹⁾。日本ではSCA 3に次いで多いSCAである。症状としては構音障害、企図振戦、注視誘発眼振を伴う小脳失調の進行が認められる疾患である^{10) - 11)}。

2. 症例

症例は大分県出身の60歳女性。43歳頃から四肢・体幹失調が出現。53歳頃から構音障害が出

現。以後、緩徐進行し、移動は伝い歩きレベルである。画像的には皮質性小脳萎縮症であった。家族歴はなかったが遺伝子検査をした結果、SCA 6と診断した。両親は神経学的に小脳症状を全く認めず、父親は91歳で元気に歩行ができ、母親は82歳でテニスができる状態であった。

脊髄小脳失調症6型の女性および健康な両親のトリオで遺伝学的解析を行った(図1)。

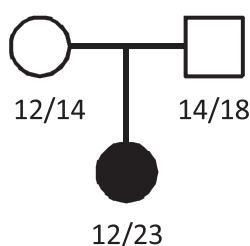


図1：SCA 6罹患者の家系図

SCA 6罹患者およびその両親のトリオで本研究を実施した。SCA 6罹患者の異常アレルのCAGリピート数は23, 正常アレルでは12であった。父親の正常アレルのCAGリピート数は14と18, 母親の正常アレルのCAGリピート数は12と14であった。

3. 試料と方法

(1) ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction: PCR) 用プライマー
増幅領域におけるDNAの3'末端側のアニーリング (相補的な配列を持った一本鎖のDNAどうしが二本鎖を形成すること) に必要なForwardプライマー (SCA 6_Forward) と5'末端側のアニーリングに必要なReverseプライマー (SCA 6_Reverse) を、以下のように設計してPCRおよびアガロースゲル電気泳動に使用した。

SCA6_Forward

5'-CCGGCCACACGTGTCCTATT-3'

SCA6_Reverse

5'-TGGGGCCTGGGTACCTCCGA-3'

(2) PCRの反応条件と試料の組成

増幅させるDNAを95℃、5分熱変性させた

後、サイクル数を35として、95℃、1分の熱変性、58℃、1分のアニーリング、72℃、30秒の伸長反応を35回繰り返し、実施した。

PCR 反応条件

95℃	5 min	} 35 cycles
95℃	1 min	
58℃	1 min	
72℃	30 sec	
72℃	7 min	
4℃	∞	

(3) PCR 試料

TaKaRa Taq Hot Start Versionのキットを使用し、(1)のPCR用プライマーと各試薬を以下の反応量に調整してPCRを実施した。

PCR mixture	(× 1)
10×PCR Buffer	1 μl
2.5 mM dNTP	1 μl
SCA6_Forward (10 pmol/μl)	0.335 μl
SCA6_Reverse (10 pmol/μl)	0.335 μl
DMSO	1 μl

Taq HS (5 units/ μ l)	0.08 μ l
dH ₂ O	5.25 μ l
mixture 9 μ l / tube	
DNA Template	1 μ l
total	10 μ l

M13_Forward(10 pmol/ μ l)	0.336 μ l or 0.168 μ l
M13_Reverse(10 pmol/ μ l)	0.168 μ l or 0.336 μ l
M13_Rox	0.168 μ l
DMSO	1 μ l
Taq HS (5 units/ μ l)	0.08 μ l
dH ₂ O	5.25 μ l
total	10 μ l

(4) アガロースゲル電気泳動

PCR後のDNA増幅試料はアガロースLE(低電気浸透)の粉末(ナカライテスク)と0.5% TBEバッファーを用いて1%のアガロースゲルを調整し135V、20分電気泳動した。

(5) GeneScan (フラグメント解析)

アガロースゲル電気泳動により増幅確認後(図2)、ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を使用してGeneScan (Applied Biosystems)によりM13のプライマーを使用したフラグメント解析を以下の反応量に試薬調整して実施した。

DNA (5 ng/ μ l)	1 μ l (\times 1)
10 \times PCR Buffer	1 μ l
2.5 mM dNTP	1 μ l

4. 結果

図2はスクリーニングとして実施した、PCR産物の電気泳動結果である。脊髄小脳失調症6型罹患者のバンドで異常伸長アレルが認められた。また臨床学的に健常であった父親と母親のバンドの結果は異常伸長がないと判断できた。これらの結果が得られたことからGeneScanによるフラグメント解析を実施し、CACNA1A遺伝子のCAGリピート異常の正確なリピート数を調べた。そのGeneScanの結果を図3に示し、結果から求めたCAGリピート数を表1にまとめた。罹患者の変異アレルではPCR産物

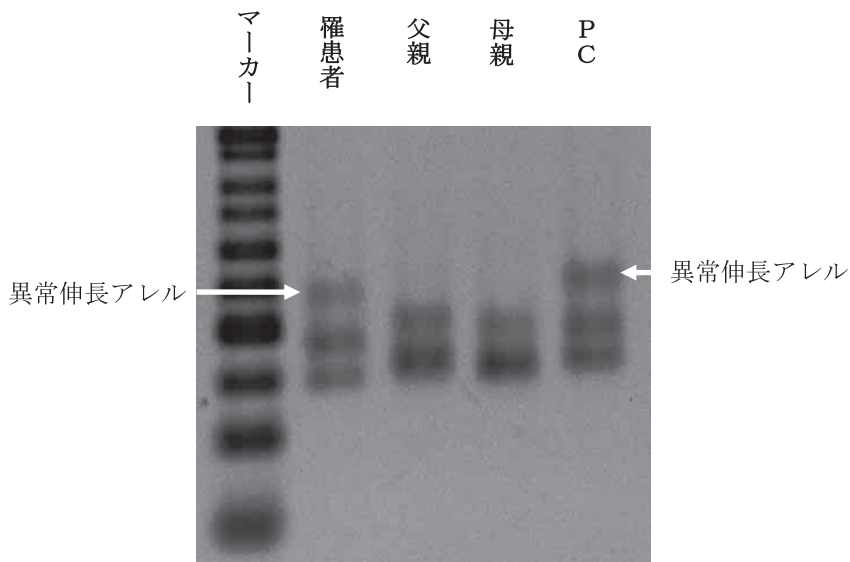


図2：PCR産物のアガロースゲル電気泳動

左から50bp マーカー、SCA6 罹患者、父親 (健常)、母親 (健常)、SCA6 のポジティブコントロール (Positive Control: PC) の順番で電気泳動を行った。健常な父親、母親と比較して、PCと同様の異常伸長のバンドが罹患者では確認できた。

サイズが199 bp 程となりこの値を使用し CAG のリピート数を求めたところ19より大きい23の異常値を示した。この結果から遺伝学的解析でも脊髄小脳失調症 6 型であることが裏付けられた。罹患者の正常アレルの CAG リピート数は 12 であった。次に、このリピート異常は両親から由来しているかを調べるために父親と母親の

CAG リピート数を調べたところ図 3 および表 1 に示した通り父親は 14 と 18 で両方正常アレル、母親も 12 と 14 で両方正常アレルだった。母親の正常アレルの 1 つが 12 だったことから、このアレルが罹患者の正常アレルとして受け継がれ、異常アレルは父親の 14 もしくは 18 から異常伸長した可能性が推測された。

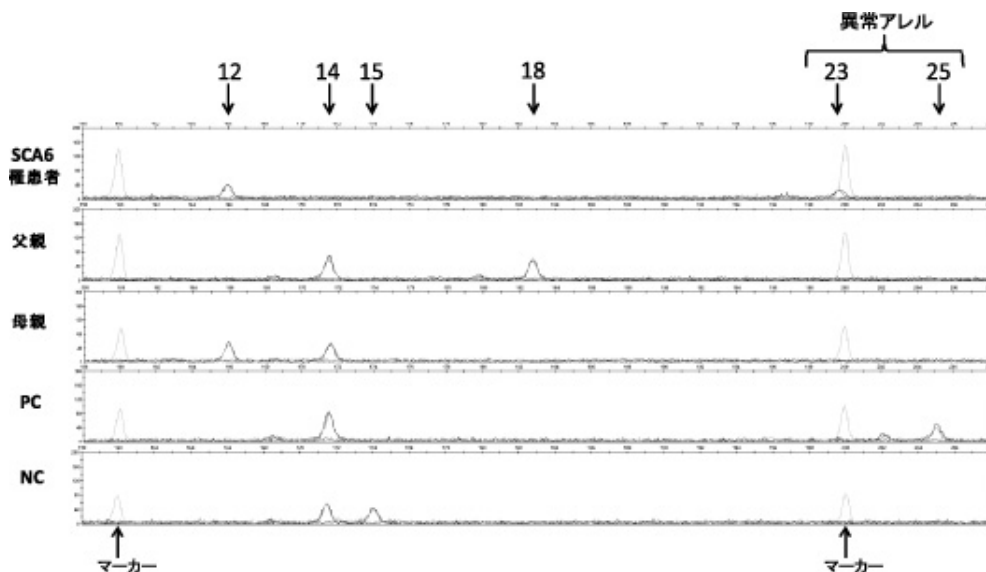


図 3 : GeneScan の波形データ

横軸は電気泳動により分離した PCR 産物のサイズ (bp)、縦軸はピークのサイズを示した。PCR 産物のサイズを元にして CAG リピート数を求め、上部に示した。SCA6罹患者およびポジティブコントロール (Positive Control:PC) では CAG リピート数が 19 より大きいため、異常アレルが確認でき、父親、母親、ネガティブコントロール (Negative Control:NC) では正常アレルが確認できた。

表 1 : フラグメント解析

フラグメント解析結果	
	CAGリピート数(回)
SCA6罹患者	12
	23
父親	14
	18
母親	12
	14
ポジティブコントロール (PC)	14
	25
ネガティブコントロール (NC)	14
	15

GeneScan によるフラグメント解析を行った結果、SCA6罹患者で CAG リピート数が 23 となり、19 より大きい異常アレルが認められた。また父親、母親は健常であることが遺伝学的解析により確かめられた。実験方法はポジティブコントロール (PC)、ネガティブコントロール (NC) の両コントロールの結果からデータの信頼性はあると考えられる。

5. 考察

本来、孤発性がどうかは家族歴の有無、さらには患者本人及びその両親の神経学的診察によって患者本人以外が罹患者でないことを確認することで証明するものであるが本研究では、父親、母親の遺伝学的解析の結果からも罹患者が脊髄小脳失調症6型(SCA6)の孤発性であることが示唆された。これまでの研究ではSCA6は常染色体優性遺伝性であり家族性であることが取り上げられている⁸⁾が孤発性のSCAでも遺伝学的解析を実施することで原因の一端を解明できる可能性があることが分かった。また、通常SCA6は表現促進現象(世代が進むことで重症化する現象)が認められていないことが知られている²⁾。本家系では、推測ではあるが、父親由来の正常アレルのリピート伸長がSCA6に深く関与している可能性が考えられた。

6. 生命倫理に対する取り組み

この研究は久留米大学「生命に関する倫理委員会」および九州大学医学研究院「ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会」において承認を得た後に実施している。

7. 参考文献

- 1) Shimazaki H, Takiyama Y, Sakoe K, Amaike M, Nagaki H, Namekawa M, Sasaki H, Nakano I, Nishizawa M. Meiotic instability of the CAG repeats in the *SCA6/CACNA1A* gene in two Japanese SCA6 families. *J Neurol Sci*. 2001; **185**: 101-107.
- 2) 武市紀人: シリーズ教育講座「めまい・平衡障害と遺伝子」5. 脊髄小脳変性症. *Equilibrium Res*. 2015; **74**(3): 159-165.
- 3) Ishikawa K, Tanaka H, Saito M, Ohkoshi N, Fujita T, Yoshizawa K, Ikeuchi T, Watanabe M, Hayashi A, Takiyama Y, Nishizawa M, Nakano I, Matsubayashi K, Miwa M, Shoji S, Kanazawa I, Tsuji S, Mizusawa H. Japanese families with autosomal dominant pure cerebellar ataxia map to chromosome 19p13.1-p13.2 and are strongly associated with mild CAG expansions in the spinocerebellar ataxia type 6 gene in chromosome 19p13.1. *Am J Hum Genet* 1997; **61**: 334-346.
- 4) Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1 A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 1997; **15**: 62-69.
- 5) Matsuyama Z, Kawakami H, Maruyama H, Izumi Y, Komure O, Udaka F, Kameyama M, Nishio T, Kuroda Y, Nishimura M, Nakamura S. Molecular features of the CAG repeats of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). *Hum Mol Genet*. 1997; **6**(8): 1283-7.
- 6) Yabe I, Sasaki H, Matsuura T, Takada A, Wakisaka A, Suzuki Y, Fukazawa T, Hamada T, Oda T, Ohnishi A, Tashiro K. SCA6 mutation analysis in a large cohort of the Japanese patients with late-onset pure cerebellar ataxia. *J Neurol Sci* 1998; **156**: 89-95.
- 7) Mariotti C, Gellera C, Grisoli M, Miner R, Castucci A, Di Donato S. Pathogenic effect of an intermediate-size SCA-6 allele (CAG) (19) in a homozygous patient. *Neurology* 2001; **57**: 1502-1504.
- 8) Lindquist SG, Nørremølle A, Hjeremind LE, Hasholt L, Nielsen JE. Meiotic CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type 6: maternally transmitted elongation in a presumed sporadic case. *J Neurol Sci* 2006; **241**(1-2): 95-8.
- 9) 渡瀬啓, 石川欽也, 水澤英洋: SCA6-原因の同定から治療法の開発に向けて-. *臨床神経* 2010; **50**: 858-860.
- 10) Rüb U, Schöls L, Paulson H, Auburger G, Kermer P, Jen JC, Seidel K, Korf HW, Deller T. Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog Neurobiol*. 2013; **104**: 38-66.
- 11) Kordasiewicz HB, Gomez CM. Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 6. *Neurotherapeutics*. 2007; **4**(2): 285-94.