

# 研究成果報告書

事業名（補助金名） : 基盤的研究開発育成事業（若手研究補助金）

研究開発テーマ名 : 脊髄小脳変性症の発症における情報伝達系の関与  
-イノシトールリン脂質を介する情報伝達系を構成する PRKOG 遺伝子変異により発症する  
SCA14 の分子遺伝学、病態機序

研究代表者名 : 矢部一郎【北海道大学大学院医学研究科脳科学専攻神経病態学講座神経内科学／講師】

## はじめに

遺伝性脊髄小脳変性症 (hereditary spinocerebellar degeneration; hSCD) は、小脳性または脊髄性の運動失調症を主症候とし、小脳や脊髄の神経核や伝導路に病変の主座をもつ遺伝性神経変性疾患の総称である。hSCD は原因の異なる多様な疾患を含んでいる。現在までに、遺伝子座もしくは当該遺伝子の起因変異が同定された疾患は優性遺伝性のものだけで 30 近くにのぼる。優性遺伝性 hSCD において原因が特定されている疾患の大部分は遺伝子内翻訳領域あるいは非翻訳領域のリピート配列の異常伸長に起因することが知られているが、残りの約 25~30%については原因が判明していない。その中で、近年相次いでリピート病とは異なる原因遺伝子の点変異に起因する優性遺伝性脊髄小脳変性症が報告されている。最初に報告されたのは、13 番染色体長腕 13q34 に位置する fibroblast growth factor 14 (*FGF14*) の一塩基置換による発症する SCA27 である<sup>20)</sup>。オランダの 3 世代にわたる優性遺伝性の発症を認める家系で、*FGF14* の Exon4 に位置する 434 番目の塩基 T が C に一塩基置換し 145 番目のアミノ酸フェニルアラニンがセリンに変化するミスセンス変異を有していた。この家系の臨床像は緩慢進行性の小脳性運動失調が主体であるが、小脳性運動失調を呈する前に振戦や dyskinesia で発症するという特徴がある。最近では、本邦に高頻度であると報告されている 16q22.1-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (ADCA) が、新規に同定された遺伝子 *puratorphin-1* 開始コドンの 16 塩基上流に位置する非翻訳領域の点変異により発症する可能性が報告されている<sup>9)</sup>。脊髄小脳変性症 14 型 (Spinocerebellar atxia type 14; SCA14) もリピート病とは異なる疾患である。我々は 2000 年に 19q13.4-qter に連鎖する本邦の優性遺伝性小脳皮質萎縮症 1 家系を HUGO に脊髄小脳変性症 14 型 (Spinocerebellar atxia type 14; SCA14; OMIM #605361) として登録し、報告した<sup>24)</sup>。次いで SCA14 候補領域に連鎖するオランダからの移民に由来する北米在住の別の優性遺伝性小脳皮質萎縮症 1 家系が報告された<sup>4)</sup>。そして、その家系を含む優性遺伝性小脳皮質萎縮症 2 家系と孤発例 1 例において protein kinase C gamma (*PRKOG*) の一塩基置換が原因遺伝子変異であることが報告された<sup>6)</sup>。我々の家系についても分析を行ったところ、同様に *PRKOG* の遺伝子変異が原因であることが明らかになった<sup>23)</sup>。本報告書ではこの SCA14 の臨床像、および分子遺伝学的特徴および想定されている病態機序につきまず述べ、今後の研究展望につき記載する。

## SCA14 の臨床像

SCA14 の発見以来、世界中から 19 家系が報告されている（表 1）<sup>1), 7), 8), 10), 11), 18), 19), 21), 22), 23)</sup>。正確な頻度は不明であるが、本邦で報告されているのは 2 家系のみであり<sup>10), 23)</sup>、またフランスでは優性遺伝性脊髄小脳変性症の 1.5% 程度、ドイツでは 0% と報告されている<sup>11)</sup>。米国では 310 名の脊髄小脳変性症患者（遺伝性脊髄小脳変性症患者 189 名、孤発性脊髄小脳変性症 106 名、家族歴情報不明 15 名）を検査したところ、4 名のみが SCA14 であった<sup>7)</sup>。これらのことから、SCA14 は稀少疾患であろうと推定される。SCA14 の臨床像は、今までの報告例を総合すると、その主症状は緩慢進行性の小脳性運動失調であることは共通している（表 1）。我々の報告した家系の臨床像のまとめを表 2 に示す。我々の家系においては、歩行障害などの小脳性運動失調に起因する症状の他に、体幹を中心とした発作性不随意運動を認める（図 1）。この発作性不随意運動は、早い筋収縮運動を伴いミオクローヌス様に見える。このような発作性不随意運動は 2~7 歳以下の若年発症者にのみ認められ、かつた初発症状であった。発作頻度は月 1~2 度のこともあるれば、毎日起こる時もあり、一人の患者においても変動が大きく、一定しない。発作持続時間も数分から数時間と多様である。このような不随意運動は欧米の家系でも少数ながら散見されている。他に報告されている不随意運動としては、姿勢時振戦、rippling 現象などが報告されている。別の本邦家系においては、難治性てんかんと歩行障害を主症状とした若年発症例があるものの、残りの 4 例は高齢発症で軽度の小脳性運動失調のみであったと報告されている<sup>10)</sup>。この家系内で認められるように、てんかんを伴う症例が存在する家系も散見されている。神経学的所見としては四肢体幹の小脳性運動失調、構音障害、眼振などが高頻度に認められるが、その他に垂直性眼球運動障害、腱反射異常、足底反射陽性、振動覚障害、認知障害、うつ症状、パーキンソニズムやジストニアなどの錐体外路症状を伴う症例も報告されている。不随意運動を含めた小脳性運動失調以外の臨床症状について

は症例数がまだ少なく、SCA14との関連はまだ明確にされておらず、今後の症例蓄積に加え、神経病理学的研究や更なる分子遺伝学的研究が必要であろう。神経放射線学的検討では、脳MRIでは小脳萎縮のみを認め、脳幹は保たれているという共通した特徴がある(図2)。我々の家系においては、脳血流SPECTでは小脳のみの血流低下を認めていた(図3)。また、脳波や体性感覚誘発電位にはあきらかな異常を認めなかつたことを報告している。

### 神経病理学的所見

北米のSCA14 1例について神経病理学的に検討されている<sup>6)</sup>。ほぼ選択的なプルキンエ細胞の脱落のみが認められ、その他には異常所見は乏しい。免疫組織学的検討では *PRKCG* の染色性だけではなく、ataxin-1 の染色性も低下しており、このことは SCA14においては、ポリグルタミン病と何らかの共通の発症機序を有していることを示しているのかかもしれないとの報告者は考察している。

### 分子遺伝学的特徴

*PRKCG*遺伝子の模式図を示す(図4)。*PRKCG*は種を越えて、高度に保存された酵素蛋白である<sup>3)</sup>。調節領域(regulatory domain)と触媒領域(catalytic domain)から構成され、触媒領域の点変異で浸透率の低い家族性網膜色素変性症を発症することが既に知られていた。また触媒領域の別の点変異を保持するラットでは歩容異常を呈することが知られていた。このPRKCGを含むprotein kinase C (PKC)はイノシトールリン脂質を介するシグナル伝達系において重要な役割を担っているが、その情報伝達系においてPKCのすぐ上流にphospholipase C-β (PLCB)が位置している。PLCBアイソザイムの中で、小脳に発現しているPLCB4のノックアウトマウスにおいても小脳失調を呈することが知られている<sup>13)</sup>。*PRKCG*ノックアウトマウスを用いた研究では、*PRKCG*がプルキンエ細胞の樹状突起の発育制御に関与することや、神経軸索における微小管の制御にも関与していることが報告されている<sup>15), 16)</sup>。このように、PKCやこのシグナル伝達系は小脳機能維持において、重要な役割を担っていることが推定されているが、SCAの発症病態におけるこれらの関わり自体は未解明である。また*PRKCG*は小脳系のみならず中枢神経系に広く発現している。*PRKCG*ノックアウトマウスによる虚血モデルにおいて、脳梗塞病巣が拡大することが報告されていることより、*PRKCG*は脳虚血に対する重要な防御因子である可能性も示唆されている<sup>2), 3)</sup>。加えてこのノックアウトマウスでは、疼痛閾値の低下や不安行動の減弱化などの指摘もされており、感覚系機能や情動機能にも強く関与している可能性が指摘されている<sup>5), 12)</sup>。

我々のSCA14家系における*PRKCG*遺伝子解析では、*PRKCG*遺伝子380番目のアデニンがグアニンに置換する一塩基置換を認め、これは127番目のアミノ酸をグルタミンからアルギニンに置換するミスセンス変異であった<sup>23)</sup>。今までのところ我々の家系も含めて表1や図4に示すような*PRKCG*遺伝子変異が報告されている。これらの中には高齢の保因者が存在することや、孤発例の存在も確認されていることから浸透率は100%ではないと考えられている<sup>7), 23)</sup>。また、今まで報告されたSCA14遺伝子変異は調節領域のC1 domainを翻訳するエクソン4にその遺伝子変異は集中している。この領域はCa<sup>2+</sup>やdiacylglycerolが結合する部位であり、これらとの結合により*PRKCG*酵素活性が高まり、細胞内情報伝達が機能することが知られている<sup>21)</sup>。このことは、この領域の遺伝子変異によってCa<sup>2+</sup>やdiacylglycerolと*PRKCG*結合能の変化が酵素活性に影響を与えることにより、未知の機序を介して小脳機能に影響を与え、疾患発症に導く可能性を推定させる。最近の報告では、COS7細胞に変異*PRKCG*導入を行うと、細胞膜が脆弱になること(membrane ruffles)や酵素活性(kinase activity)が上昇することが報告されている<sup>17), 21)</sup>。また、CHO細胞への変異*PRKCG*導入研究では、導入した変異によって程度の異なる細胞質内凝集を認めている。細胞質に凝集体を認める変異*PRKCG*では酵素活性を有さず、凝集体を認めない変異*PRKCG*では酵素活性を有することも示されている<sup>10), 17)</sup>。また変異蛋白を過剰発現させると、細胞毒性の増大により細胞死が誘導される可能性も示されている<sup>17)</sup>。また、変異*PRKCG*の受容体刺激によるトランスロケーションでは細胞質から細胞膜にトランスロケーションした後に高率に細胞質内で凝集体を形成する傾向が強いことが示された<sup>10), 17)</sup>。このような結果はSCA14においてもポリグルタミン病の発症機序と共に機序の存在を推定させるが、現時点でSCA14の原因とされる遺伝子変異の全てで同じ現象が起こることは確認されておらず、また大量発現実験であるため生理的機能との解離があることが予想される。また、剖検脳でも凝集体の存在などは今のところ報告されていない。今後の更なる検討が必要であろう。

### 今後の展望

我々は、上記の分子遺伝学的特徴について更なる解明を目指し、現在SCA14ノックインマウスを作製中である。現在キメラマウスからF1マウス作製に向かう途上である。モデル動物完成後には神経病理学的解析、および神経症候学的解析を行う。特に我々が見つけた遺伝子変異を伴うSCA14は小脳性運動失調に加え、発作性の不随意運動という特異的な症状があり、マウスにおいても小脳性運動失調と不随意運動の両面を念頭に検討する予定である。また、*PRKCG*は過去の研究で、情動運動や、虚血耐性因子、疼痛制御にも関連していると考えられている。不安行動の解析や、脳虚血、疼痛負荷を行い、それぞれの状況下においても、行動解析、病理学的解析、遺伝子発現解析、この系の酵素蛋白の活性測定解析を行うことにより、小脳以外の中脳神経系におけるこの情報伝達系機能の関与を明らかにしたいとも考えている。また、このモデルマウスは治療法の開発に利用したいと考えている。それについては、遺伝子発現解析や病理学的解析を踏まえ、まずは、RNAiを用いた治療の可能性を検討する予定である。

### おわりに

SCA14 の概略と今後の我々の研究の展望につき述べた。SCA14 は稀少疾患ではあるが、その原因遺伝子である *PRKCG* は小脳のみならず中枢神経に広汎に発現している。SCA14 の発症機序はまだ未解明であるが、本症の病態機序を解明することにより中枢神経機能自体への *PRKCG* の関与も明らかになる可能性がある。また、症候学的にも、間歇的症状を含め小脳症状以外の症状を呈する患者と小脳症状のみの患者が多いことなど、興味深い点が多い。それ故、今後、様々な手法を用いてこれらの発症機序及び病態を明らかにすることは、今後の重要な課題である。新しい展望が開けるよう努力したい。

## 参考文献

1. Alonso I, Costa C, Gomes A, Ferro A, Seixas AI, Silva S, Cruz VT, Coutinho P, Sequeiros J, Silveira I. A novel H101Q mutation causes PKC gamma loss in spinocerebellar ataxia type 14. *J Hum Genet* 50: 523–529, 2005
2. Aronowski J, Grotta JC, Strong R, Waxham MN. Interplay between the gamma isoform of PKC and calcineurin in regulation of vulnerability to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 343–349, 2000
3. Aronowski J, Labiche LA. Perspectives on reperfusion-induced damage in rodent models of experimental focal ischemia and role of gamma-protein kinase C. *ILAR J* 44: 105–109, 2003
4. Brkanac Z, Bylenok L, Fernandez M, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Nochlin D, Raskind WH, Bird TD. A new dominant spinocerebellar ataxia linked to chromosome 19q13.4–qter. *Arch Neurol* 59:1291–1295, 2002
5. Celerier E, Simonnet G, Maldonado R. Prevention of fentanyl-induced delayed pronociceptive effects in mice lacking the protein kinase C $\gamma$  gene. *Neuropharmacology*. 46: 264–272, 2004
6. Chen DH, Brkanac Z, Verlinde CL, Tan XJ, Bylenok L, Nochlin D, Matsushita M, Lipe H, Wolff J, Fernandez M, Cimino PJ, Bird TD, Raskind WH. Missense mutations in the regulatory domain of PKC $\gamma$ : a new mechanism for dominant nonepisodic cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 72: 839–849, 2003
7. Chen DH, Cimino PJ, Ranum LP, Zoghbi HY, Yabe I, Schut L, Margolis RL, Lipe HP, Feleke A, Matsushita M, Wolff J, Morgan C, Lau D, Fernandez M, Sasaki H, Raskind WH, Bird TD. The clinical and genetic spectrum of spinocerebellar ataxia 14. *Neurology* 64: 1258–1260, 2005
8. Fahey MC, Knight MA, Shaw JH, Gardner RJ, du Sart D, Lockhart PJ, Delatycki MB, Gates PC, Storey E. Spinocerebellar ataxia type 14: study of a family with an exon 5 mutation in the PRKCG gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:1720–1722, 2005
9. Ishikawa K, Toru S, Tsunemi T, Li M, Kobayashi K, Yokota T, Amino T, Owada K, Fujigasaki H, Sakamoto M, Tomimitsu H, Takashima M, Kumagai J, Noguchi Y, Kawashima Y, Ohkoshi N, Ishida G, Gomyoda M, Yoshida M, Hashizume Y, Saito Y, Murayama S, Yamanouchi H, Mizutani T, Kondo I, Toda T, Mizusawa H. An autosomal dominant cerebellar ataxia linked to chromosome 16q22.1 is associated with a single-nucleotide substitution in the 5' untranslated region of the gene encoding a protein with spectrin repeat and Rho guanine-nucleotide exchange-factor domains. *Am J Hum Genet* 77: 280–296, 2005
10. 川上 秀史、酒井 規雄、平本 恵子、森野 豊之、丸山 博文、井上貴美子、関 貴弘、足立 直子、斎藤 尚亮、松本 昌泰. 遺伝性脊髄小脳変性症14型(SCA14)の新規家系の同定と変異 $\gamma$ PKCの機能解析. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 運動失調に関する調査及び病態機序に関する研究班 平成16年度 研究報告書. 平成17年3月; 48–49.
11. Klebe S, Durr A, Rentschler A, Hahn-Barma V, Abele M, Bouslam N, Schols L, Jedynak P, Forlani S, Denis E, Dussert C, Agid Y, Bauer P, Globas C, Wullner U, Brice A, Riess O, Stevanin G. New mutations in protein kinase C $\gamma$  associated with spinocerebellar ataxia type 14. *Ann Neurol* 58: 720–729, 2005
12. McNamara RK, Lenox RH. Acute restraint stress reduces protein kinase C $\gamma$  in the hippocampus of C57BL/6 but not DBA/2 mice. *Neurosci Lett* 368: 293–296, 2004
13. Miyata M, Kim HT, Hashimoto K, Lee TK, Cho SY, Jiang H, Wu Y, Jun K, Wu D, Kano M, Shin HS. Deficient long-term synaptic depression in the rostral cerebellum correlated with impaired motor learning in phospholipase C beta4 mutant mice. *Eur J Neurosci*. 13: 1945–1954, 2001
14. Narita M, Suzuki M, Narita M, Yajima Y, Suzuki R, Shioda S, Suzuki T. Neuronal protein kinase C $\gamma$ -dependent proliferation and hypertrophy of spinal cord astrocytes following repeated in vivo administration of morphine. *Eur J Neurosci*. 19: 479–484, 2004
15. Sakai N, Tsubokawa H, Matsuzaki M, Kajimoto T, Takahashi E, Ren Y, Ohmori S, Shirai Y, Matsubayashi H, Chen J, Duman RS, Kasai H, Saito N. Propagation of gammaPKC translocation along the dendrites of Purkinje cell in gammaPKC-GFP transgenic mice. *Genes Cells* 9:945–57, 2004
16. Schrenk K, Kapfhammer JP, Metzger F. Altered dendritic development of cerebellar Purkinje cells in slice cultures from protein kinase C $\gamma$ -deficient mice. *Neuroscience* 110: 675–689, 2002

17. Seki T, Adachi N, Ono Y, Mochizuki H, Hiramoto K, Amano T, Matsubayashi H, Matsumoto M, Kawakami H, Saito N, Sakai N. Mutant protein kinase C $\gamma$  found in spinocerebellar ataxia type 14 is susceptible to aggregation and causes cell death. *J Biol Chem* 280; 29096–29106, 2005
18. Stevanin G, Hahn V, Lohmann E, Bouslam N, Gouttard M, Soumphonphakdy C, Welter ML, Ollagnon-Roman E, Lemainque A, Ruberg M, Brice A, Durr A. Mutation in the catalytic domain of protein kinase C $\gamma$  and extension of the phenotype associated with spinocerebellar ataxia type 14. *Arch Neurol* 61; 1242–1248, 2004
19. van de Warrenburg BP, Verbeek DS, Piersma SJ, Hennekam FA, Pearson PL, Knoers NV, Kremer HP, Sinke RJ. Identification of a novel SCA14 mutation in a Dutch autosomal dominant cerebellar ataxia family. *Neurology* 61: 1760–5, 2003
20. van Swieten JC, Brusse E, de Graaf BM, Krieger E, van de Graaf R, de Koning I, Maat-Kievit A, Leegwater P, Dooijes D, Oostra BA, Heutink P. A mutation in the fibroblast growth factor 14 gene is associated with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 72:191–199, 2003
21. Verbeek DS, Knight MA, Harrison GG, Fischbeck KH, Howell BW. Protein kinase C $\gamma$  mutations in spinocerebellar ataxia 14 increase kinase activity and alter membrane targeting. *Brain* 128; 436–442, 2004
22. Verbeek DS, Warrenburg BP, Hennekam FA, Dooijes D, Ippel PF, Verschuur-Bemelmans CC, Kremer HP, Sinke RJ. Gly118Asp is a SCA14 founder mutation in the Dutch ataxia population. *Hum Genet* 117; 88–91, 2005
23. Yabe I, Sasaki H, Chen DH, Raskind WH, Bird TD, Yamashita I, Tsuji S, Kikuchi S, Tashiro K. Spinocerebellar ataxia type 14 caused by a mutation in protein kinase C $\gamma$ . *Arch Neurol* 60: 1749–1751, 2003
24. Yamashita I, Sasaki H, Yabe I, Fukazawa T, Nogoshi S, Komeichi K, Takada A, Shiraiishi K, Takiyama Y, Nishizawa M, Kaneko J, Tanaka H, Tsuji S, Tashiro K. A novel locus for dominant cerebellar ataxia (SCA14) maps to a 10.2-cM interval flanked by D19S206 and D19S605 on chromosome 19q13.4-qter. *Ann Neurol* 48: 156–163, 2000

表 1 SCA14 の遺伝子変異と臨床像のまとめ

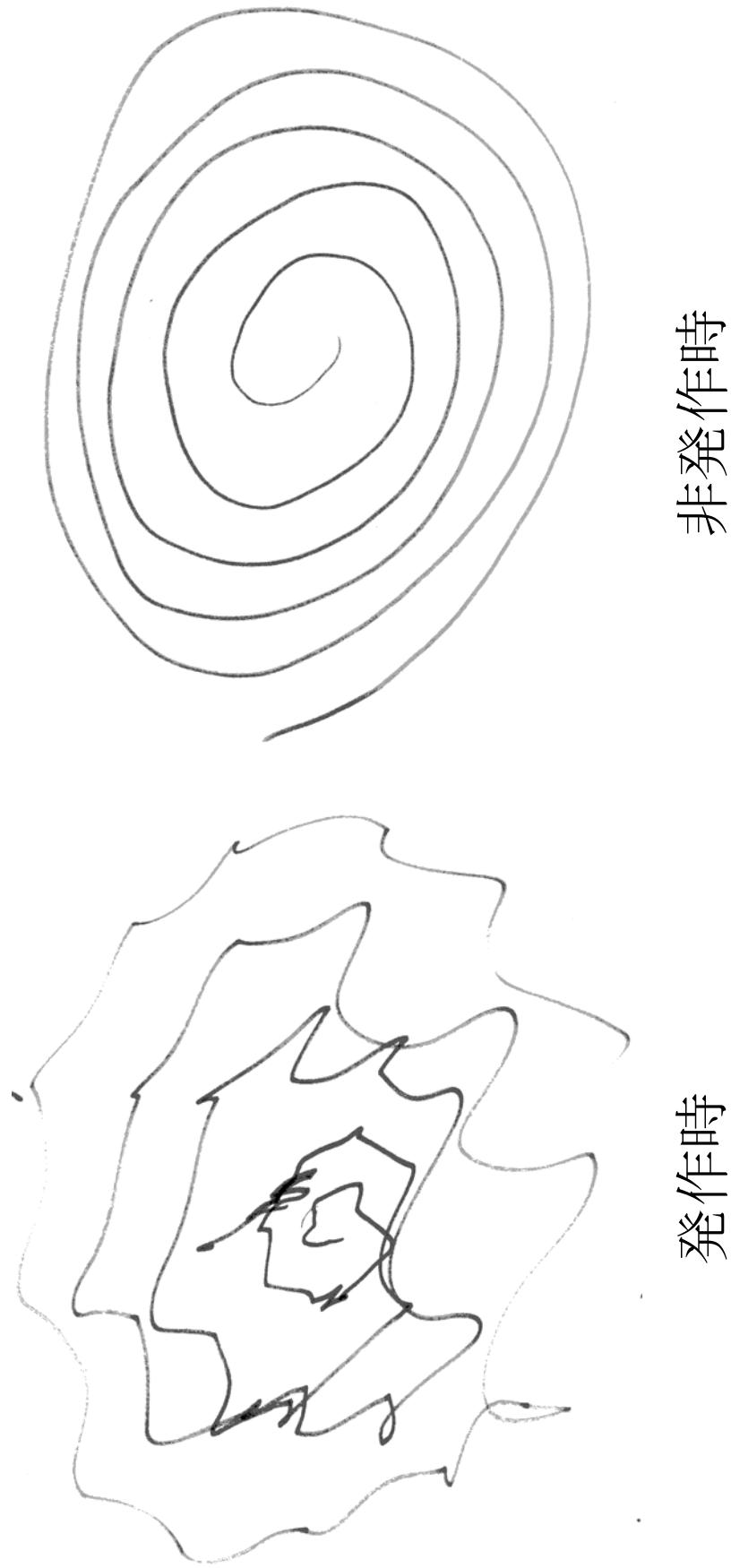
Family	Exon	Predicted Amino Acid Change	Number Affected	Mean Age of Onset (Years)	Gait Ataxia		Dysarthria	Abnormal Eye Movement	Tendon Reflexes	Axial Myoclonus	Depression	MRI Cerebellar Atrophy
					Sensory Loss	Axial Loss						
1	4	H101Y	14	31 (10-50)	+	+	↑ / ↓	-	-	-	-	+
2	4	S119P	6	42 (35-51)	+	-	↑	-	-	-	+	+
3	4	Q127R	12	28 (12-42)	+	+	↓	-	+	+	-	+
4	1	R41P	7	46 (29-58)	+	-	nl	-	-	-	-	+
5	10	S361G	5	28 (5-60)	+	-	nl	-	-	-	+	+
6	3	D95D	3	50's-60's	+	+	↓	-	-	-	-	+
7	4	del100K-101H	1	38	+	+	↑	-	-	-	+	+
8	4	G128D	1	22	+	+	nl	-	-	-	-	+
9	3	D95D	1	35	+	+	↑	-	-	-	-	+
10	4	H101Q	5	28 (26-30)	+	+	-	-	-	-	-	+
11	4	G118D	19	38 (21-59)	+	+	↑ / ↓	nl	+ (1 case)	-	-	+
12	5	C150F	6	31 (19-44)	+	+	↑	+	-	nl	+	+
13	4	C114Y	5	28 (17-37)	+	+	nl	-	+ (1 case)	nl	+	+
14	4	G123R	3	41 (20-60)	+	+	nl	+	-	nl	+	+
15	4	G123E	2	36 (24, 48)	+	+	nl	+	+ (1 case)	nl	+	+
16	10	G360S	2	37 (20, 53)	+	-	nl	-	Rippling (2 cases)	nl	+	+
17	18	F643L	18	(child-60)	+	+	↑ / ↓	+	+ (3 cases)	nl	+	+
18	18	V692G	2	nl	+	-	nl	-	+	nl	+	+
19	4	S119F	5	nl	+	nl	nl	nl	nl	nl	nl	nl

表2 SCA14 original家系の臨床所見

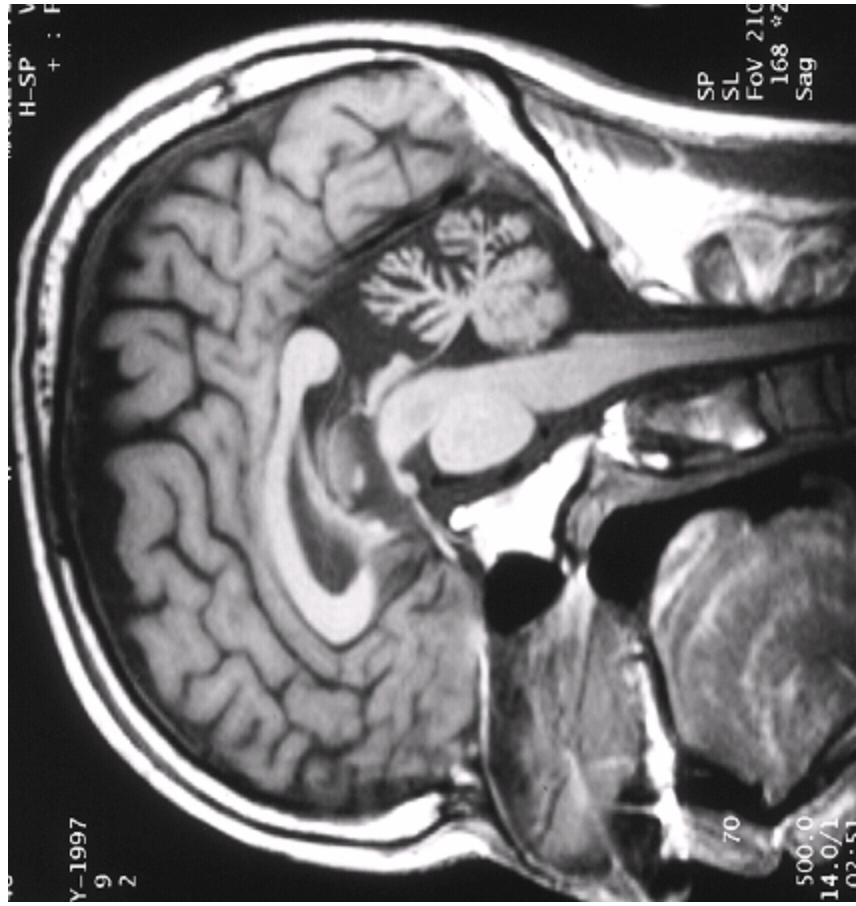
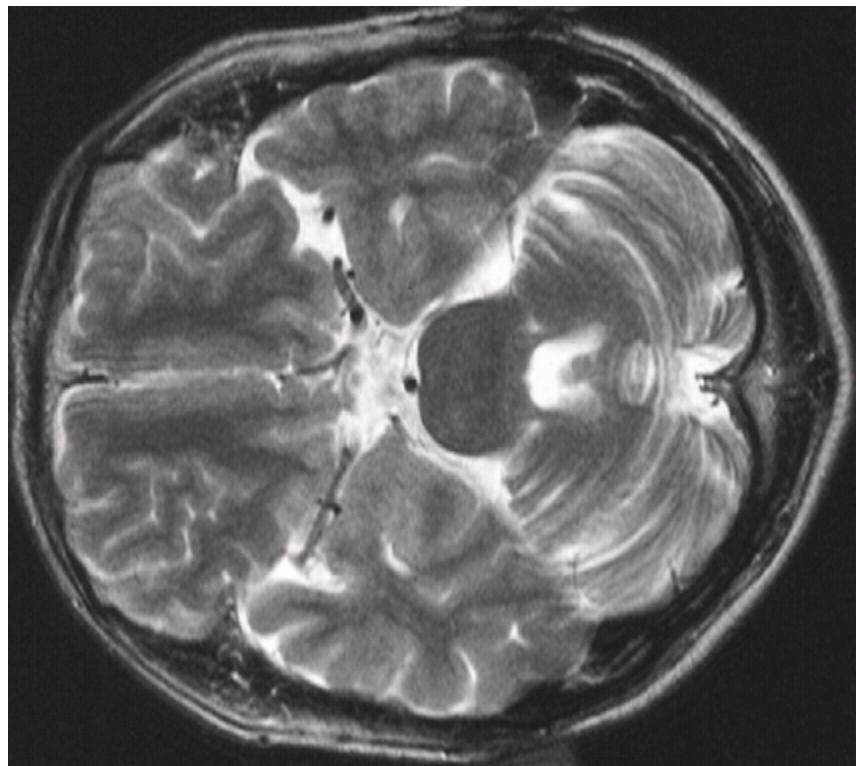
発症年令	39-42歳 (n = 4)	18-27歳 (n = 5)
初発症状	不安定歩行 構音障害	発作性不随意運動 5*
眼振		0
小脳性運動失調		4
脳幹振戦	0	5
深部腱反射減弱		2
ATRのみ減弱		1
全般性減弱	0	1

(\*1例は、発作性不随意運動で発症して小脳性運動失調は軽微)

図1 SCA14における発作性不随意運動



## 図2 SCA14 の脳MRI

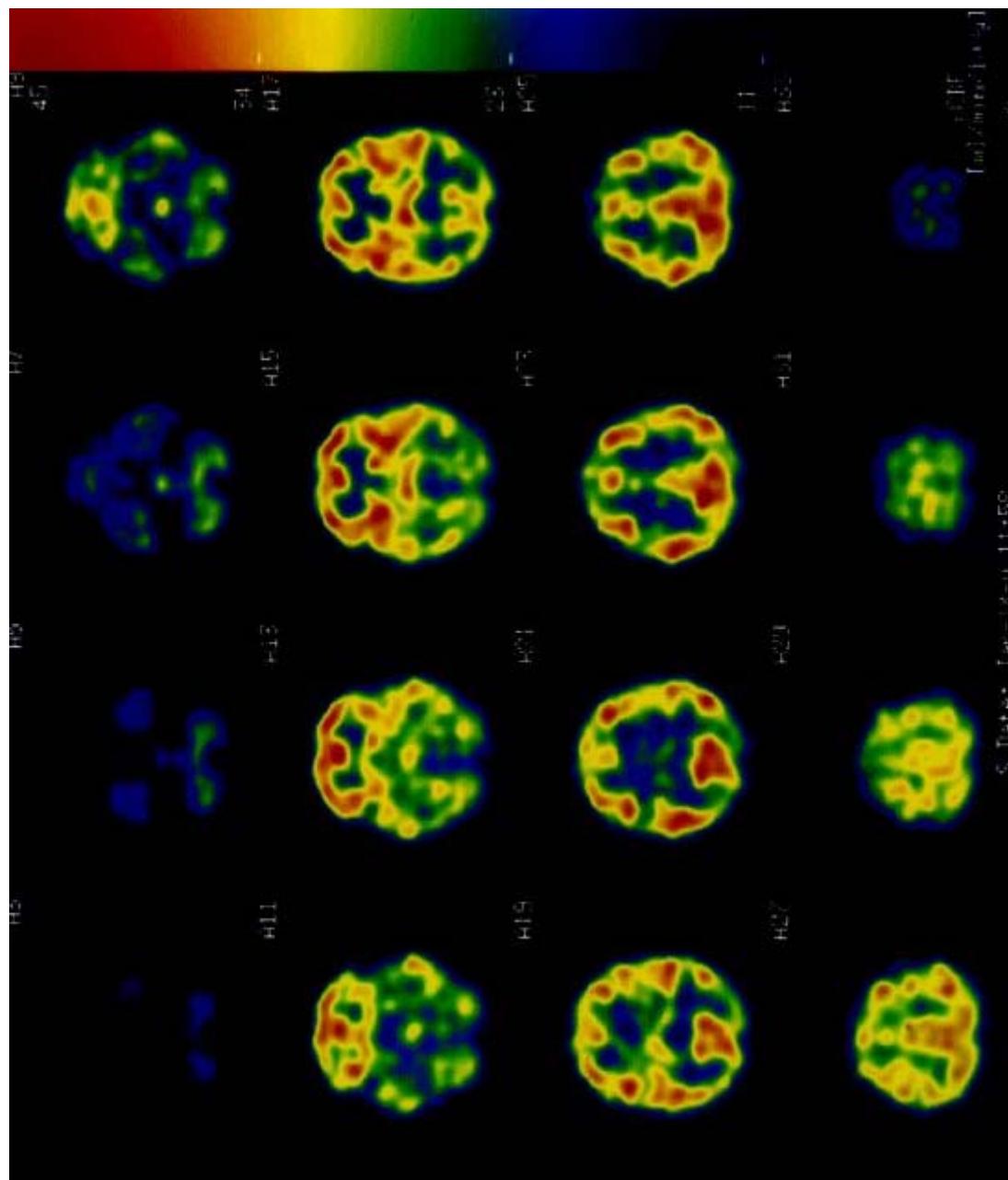


35歳 男性、罹病期間16年

図3

# SCA14 $\text{O}^{123}\text{T}-\text{IMP}$ SPECT

19歳、男性 罷病期間4年

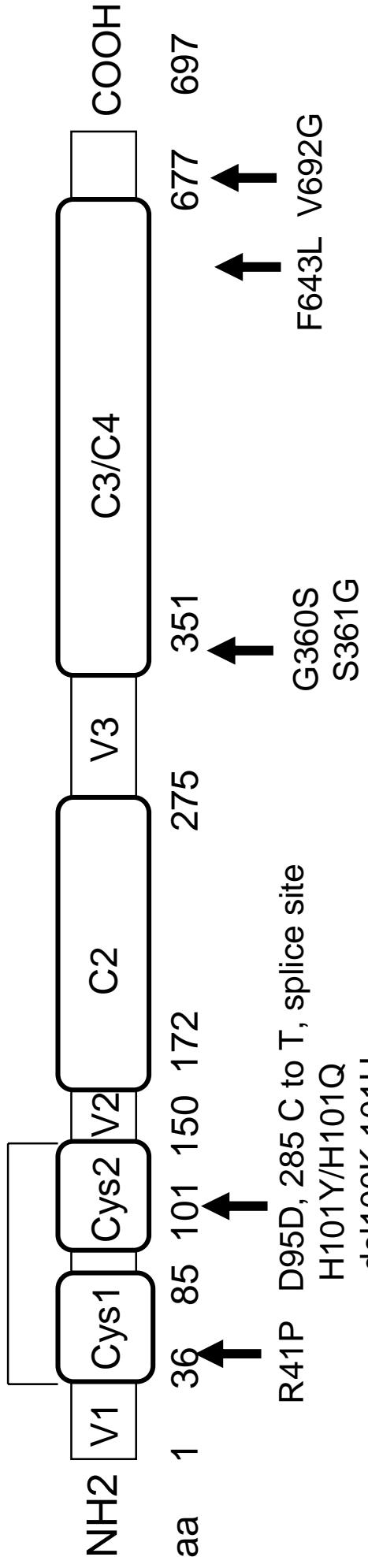


## 図 4 PRKCG の構造図

Functional domains

Regulatory domain

Catalytic domain



Exonic organization

5'UTR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	3'UTR
-------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-------

( Chen DH, et al. Am J Hum Genet 72:839, 2003一部改変6 )