



Genetic Variations and Neuropathologic Features of Patients with PRKN Mutations

Seike, Naohiko

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2021-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8107号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008107>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



Genetic Variations and Neuropathologic Features of Patients with *PRKN* Mutations

PRKN 遺伝子変異患者における分子遺伝学的多様性および神経病理学的特徴

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
脳神経内科学
(指導教員：松本 理器 教授)

清家 尚彦

<序論>

常染色体劣性若年性パーキンソン病 (AR-JP) は 40 歳以下発症、下肢ジストニア、睡眠効果、レボドパ反応性が特徴の神経変性疾患で *PRKN* (*PARK2*) 遺伝子変異が最も一般的な原因である。

E3 ユビキチンリガーゼである Parkin タンパクをコードする *PRKN* 遺伝子では、全 12 エクソンで一塩基置換 (ミスセンス・ナンセンス・スプライス部変異) やエクソン再構成 (エクソン欠失・重複) が生じ得る。*PRKN* 遺伝子の既報では、両側アレル変異は片側アレル変異より早期発症である、遺伝子量変異ハプロ不全はパーキンソン病発症リスクである、正常対照 1% にエクソン 1-4 ヘテロ変異を認めるが機能部位は保たれている、など多様であり、*PRKN* 遺伝子ハプロ不全の形質発現・病態への影響は不明である。

病理学的にはレヴィ小体を伴わない黒質緻密帯 (SNPC) ドパミン作動性神経細胞脱落が知られるが、病理学的特徴と多様な *PRKN* 遺伝子変異の関連についても明らかになっていない。

我々は *PRKN* 遺伝子変異型と病理学的特徴の関連を調べるため、両アレル性 *PRKN* 遺伝子変異剖検 8 例において、DNA 解析、mRNA 解析、Parkin タンパク発現と組織学的特徴の関連を解析した。

<対象と方法>

患者：対象の両アレル性 *PRKN* 遺伝子変異剖検 8 例のうち、臨床像 3 名・遺伝情報 3 名・剖検所見 2 名は既報である。発症年齢は 10-36 歳、罹病期間は 38-63 年間で、睡眠効果・下肢ジストニア・レボドパ反応性・レボドパ誘発性ジスキネジアを認めた。3 名で 50-60 歳発症の四肢異常感覚を認め、電気生理学的に末梢・中枢性障害が確認された。2 名で認知機能障害を認めた。6 名は家族歴を認めたが、2 名は家族歴・近親婚を認めなかった。

DNA・mRNA 解析：ゲノム DNA を 7 名の新鮮凍結前頭葉皮質 (1 名は凍結脳なく罹患同胞末梢血) から抽出し、*PRKN* 遺伝子のコード領域・スプライス部変異検索のためイントロンプライマーによるサンガー法でダイレクトシーケンス解析を行った。遺伝子量解析は各エクソン特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR を施行しターゲット量を Ct 値で定量した。3'末側スプライス部から 50-55ヌクレオチド上流に変異ストップコドンがある場合にナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) による翻訳不能を想定した。*PRKN* 遺伝子エクソン再構成 7 名では、選択的転写を確認するため前頭葉皮質から全 RNA を抽出し、相補的 DNA 合成および PCR を施行しダイレクトシーケンスを行った。

免疫プロット法：凍結脳を入手できた 7 名および対照 2 名の前頭葉皮質から界面活性剤溶性タンパクを抽出し、Parkin タンパク C 末 (アミノ酸 399-465、RING2 含む)・ β アクトチンを認識するマウスモノクローナル抗体で免疫プロット法を行った。

組織病理・免疫組織染色：大脳・小脳・脳幹・脊髄・後根神経節 (DRG) を 20%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後 4 μ m 厚に薄切し各種染色を施行した。神経細胞脱

落・グリオーススを黒質傍核・中間部・外腹側部・外背側部の各 SNPC 亜領域および青斑核で、脊髄薄束髄鞘淡明化および DRG 変性も含め半定量的に解析した。抗 Parkin 抗体・マウスモノクローナル抗リン酸化 α シヌクレイン抗体を用い免疫組織染色を施行した。

<結果>

DNA・mRNA 解析：点突然変異はホモ接合 p.C431F および複合ヘテロ接合 p.C431F/エクソン 2-4 重複各 1 名であった。エクソン再構成はホモ接合がエクソン 6-7 重複・エクソン 10-11 重複各 1 名およびエクソン 4 欠失父子 2 名だった。複合ヘテロ接合はエクソン 2 重複/エクソン 2-3 欠失およびエクソン 2-4 重複/エクソン 3-4 欠失を各 1 名に認めた。mRNA 解析で重複 2 名に縦列反復配列を認めた。

免疫プロット法：対照で豊富な Parkin タンパク発現を認めた。一方、PRKN 遺伝子変異の解析 7 名では、2 例でわずかに発現を認め、他は陰性であった。

組織病理・免疫組織染色：SNPC で軽～重度の神経細胞脱落（外腹側・中間部で強く黒質傍核・外背側部は比較的軽度）を認め、メラニン含有神経細胞は少数残存のみだった。グリオーススは全体に軽く神経細胞脱落と比較し軽度だった。青斑核も同様の所見だった。Parkin は対照の大脳皮質・大脳基底核の神経細胞細胞質・アストロサイト終末で陽性だったが、SNPC・青斑核は陰性で、DRG 神経節細胞の核膜で陽性だった。PRKN 遺伝子変異症例の脳・DRG では陰性だった。レヴィ病理は 3 名で認めたが海馬・大脳皮質では陰性であり、脳幹型と辺縁型が各 1 名で残り 1 名は非特異パターン（青斑核・迷走神経背側核に軽度のみで SNPC は陰性）であった。脊髄病理は、薄束髄鞘淡明化、DRG 変性及び後根大径有髄線維減少を全例で認めた。

<考察>

我々はエクソン 10-11 新規重複を含む 7 種類の遺伝子変異を解明し、6 種類がエクソン再構成であった。エクソン再構成 6 名（エクソン 2-4 重複、エクソン 4 欠失、エクソン 6-7 重複、エクソン 2 三重複）で NMD 機構による成熟 Parkin タンパク非産生が予想され、免疫プロット法・免疫組織化学により上記を確認した（エクソン 10-11 重複例では NMD 回避ストップコドンのため C 末切断異常 Parkin タンパク産生が予想されたが凍結脳なく確認不能だった）。p.C431F 変異 Parkin タンパクは重要な触媒反応部における置換のため、Parkin タンパクの機能不全および構造変性が予想された。以上から PRKN 遺伝子変異患者の臨床・病理学的形質発現は、Parkin タンパク RING2 領域障害のためユビキチンリガーとしての酵素機能が消失することによると考察した。

今回、PRKN 遺伝子変異患者 8 名中 2 名で、遺伝子量解析では複合ヘテロ接合エクソン 2 重複/3 欠失およびヘテロ接合エクソン 2 重複であったが、mRNA 解析によりそれぞれエクソン 2 三重複/2-3 欠失及びエクソン 2-4 重複/3-4 欠失の異常転写が認められ、複合ヘテロ接合と判明した。従って両アレルでエクソン欠失および重複がある場合、mRNA 解

析による正確な評価が重要と考えた。上記既報では、遺伝子量ハプロ変異はパーキンソン病のリスク因子とあるが、実際はエクソン再構成複合ヘテロかも知れず、正しい評価には mRNA 解析が必要と考える。末梢血では、リンパ球の PRKN 遺伝子発現が乏しく、mRNA 解析が難しい場合、長鎖 DNA 解析が代替となるかも知れない。

今回、点突然変異・エクソン 10-11 新規重複変異を含むエクソン再構成の多様な PRKN 遺伝子変異にも関わらず極めて類似した組織学的特徴（SNPC・青斑核の著しい神経細胞脱落と比較的軽いグリオースス）を認め、PRKN 遺伝子変異患者・ヘテロ接合キャリアを解析した既報と一致した。孤発性パーキンソン病では過剰 α シヌクレインによるグリオースス抑制の報告があるが、PRKN 遺伝子変異患者では α シヌクレイン沈着は一般的でなく、本研究で認めた軽度グリオーススの病態ははっきりしない。また SNPC 神経細胞脱落パターンに関しても、今回も既報通り PRKN 遺伝子変異患者の特異的なパターン（外腹側・中間部で強く黒質傍核・外背側部で比較的軽い）を認め、孤発性パーキンソン病のパターン（外腹側部・黒質傍核で強く中間部で軽い）とは異なった。従って PRKN 遺伝子変異患者の SNPC 神経変性・領域特異的神経細胞脆弱性は α シヌクレインによる孤発性パーキンソン病の病態とは異なると考える。

免疫プロット法・免疫組織化学について、我々と同じ抗体を用いた既報では同様の Parkin タンパク発現パターンだった。ポリクローナル抗体を用いた既報ではドパミン作動・非作動神経細胞でより強い反応が示されたが、これは抗体の違いによると考える。

レヴィ病理については、PRKN 遺伝子変異例では通常認めないが、今回我々は 3 名で認めた。既報では複合ヘテロ接合（p.R275W/エクソン 3 欠失・エクソン 6 欠失・p.G430W、エクソン 7 欠失/1072delT）およびホモ接合（エクソン 2-4・エクソン 3 欠失）の一部でレヴィ小体の報告があるが、特定の遺伝子型と α シヌクレインとの関連は考えにくい。またレヴィ小体を認める PRKN 遺伝子変異例はより若年に発症するとの既報があるが、今回レヴィ小体を認める 3 名の平均発症は 20.7 歳、そうでない 5 名は 20.2 歳と差がなかった。3 名の中枢神経外レヴィ病理は嗅球（2 名で少数、1 名でわずか）、腹腔交感神経節（1 名で少数、1 名でわずか）、心臓交感神経（3 名で少数）のみで概ね孤発性パーキンソン病のパターンに一致しており、レヴィ病理発生率は 8 名中 3 名で 37.5%と 60 歳以上健常者の有病率（8-26%）よりわずかに高い程度に過ぎず、レヴィ病理は偶然に重なったと考える。

脊髄病理に関しては、全剖検例で DRG・薄束変性を認め、50-60 歳で発症する四肢感覚障害の原因病理を確認した。既報では、剖検例で薄束髄鞘淡明化、臨床例で軸索性ポリニューロパチー、PRKN 遺伝子変異無症状患者で腓腹神経 SNAP 有意低下、PRKN 遺伝子変異患者同胞例で末梢神経障害などがあり、近年末梢神経障害と長期レボドパ使用の関連の指摘はあるものの、DRG 障害による二次性軸索変性は PRKN 遺伝子変異患者の特徴の可能性がある。

<結語>

正確な両アレル性 *PRKN* 遺伝子変異解析にはゲノム DNA・mRNA 解析が必要である。
PRKN 遺伝子変異患者は成熟 Parkin タンパクを産生できず、遺伝型は多様だが、組織病理学的には SNPC の特徴的な神経細胞脱落と比較的軽度のグリオシスおよび DRG 障害という類似した特徴を呈した。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第3083号	氏名	清家 尚彦
論文題目 Title of Dissertation	Genetic Variations and Neuropathologic Features of Patients with <i>PRKN</i> Mutations <i>PRKN</i> 遺伝子変異患者における分子遺伝学的多様性および神経病理学的特徴		
審査委員 Examiner	主 査 横 崎 宏 Chief Examiner 副 査 福山 隆司 Vice-examiner 副 査 曾 良 一 郎 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

常染色体劣性若年性パーキンソン病 (AR-JP) は 40 歳以下発症、下肢ジストニア、睡眠効果、レボドパ反応性が特徴の神経変性疾患で *PRKN* (*PARK2*) 遺伝子変異が最も一般的な原因である。E3 ユビキチンリガーゼである Parkin タンパクをコードする *PRKN* 遺伝子では、全 12 エクソンで一塩基置換 (ミスセンス・ナンセンス・スプライス部変異) やエクソン再構成 (エクソン欠失・重複) が生じ得る。*PRKN* 遺伝子の既報では、両側アレル変異は片側アレル変異より早期発症である、遺伝子量変異ハプロ不全はパーキンソン病発症リスクである、正常対照 1% にエクソン 1-4 ヘテロ変異を認めるが機能部位は保たれている、など多様であり、*PRKN* 遺伝子ハプロ不全の形質発現・病態への影響は不明である。病理学的にはレヴィ小体を伴わない黒質緻密帯 (SNPC) ドパミン作動性神経細胞脱落が知られるが、病理学的特徴と多様な *PRKN* 遺伝子変異の関連についても明らかになっていない。本研究では *PRKN* 遺伝子変異型と病理学的特徴の関連を調べるため、両アレル性 *PRKN* 遺伝子変異剖検 8 例において、DNA 解析、mRNA 解析、Parkin タンパク発現と組織学的特徴の関連を解析した。研究対象と用いた方法は以下のごとくである。

研究対象患者は両アレル性 *PRKN* 遺伝子変異剖検 8 例である。発症年齢は 10-36 歳、罹病期間は 38-63 年間で、睡眠効果・下肢ジストニア・レボドパ反応性・レボドパ誘発性ジスキネジアを認めた。3 名で 50-60 歳発症の四肢異常感覚を認め、電気生理学的に末梢・中枢性障害が確認された。2 名で認知機能障害を認めた。6 名は家族歴を認めたが、2 名は家族歴・近親婚を認めなかった。ゲノム DNA を 7 名の新鮮凍結前頭葉皮質 (1 名は凍結脳なく罹患同胞末梢血) から抽出し、イントロンプライマーによるダイレクトシーケンス解析を行った。遺伝子量解析は各エクソン特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR を施行しターゲット量を Ct 値で定量した。3' 末側スプライス部から 50-55 ヌクレオチド上流に変異ストップコドンがある場合にナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD) による翻訳不能を想定した。*PRKN* 遺伝子エクソン再構成 7 名では、選択的転写を確認するため前頭葉皮質から全 RNA を抽出し、相補的 DNA を合成しダイレクトシーケンスを行った。凍結脳を入手できた 7 名および対照 2 名の前頭葉皮質から界面活性剤溶性タンパクを抽出し、Parkin タンパク C 末 (アミノ酸 399-465、RING2 含む)・ β アクチンを認識するマウスモノクローナル抗体で免疫プロット法を行った。大脳・小脳・脳幹・脊髄・後根神経節 (DRG) を 20% 緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後 4 μ m 厚に薄切し各種染色を施行した。神経細胞脱落・グリオーシスを黒質傍核・中間部・外腹側部・外背側部の各 SNPC 亜領域および青斑核で、脊髄薄束髄鞘淡明化および DRG 変性も含め半定量的に解析した。抗 Parkin 抗体・マウスモノクローナル抗リン酸化 α シヌクレイン抗体を用い免疫組織染色を施行した。得られた結果は以下のごとくである。

DNA・mRNA 解析では、点突然変異はホモ接合 p.C431F および複合ヘテロ接合 p.C431F/エクソン 2-4 重複各 1 名であった。エクソン再構成はホモ接合がエクソン 6-7 重複・エクソン 10-11 重複各 1 名およびエクソン 4 欠失父子 2 名であった。複合ヘテロ接合はエクソン 2 重複/エクソン 2-3 欠失およびエクソン 2-4 重複/エクソン 3-4 欠失を各 1 名に認めた。mRNA 解析で重複 2 名に縦列反復配列を認めた。免疫プロット法では対照で豊富な Parkin タンパク発現を認めたが、*PRKN* 遺伝子変異の解析 7 名では、2 例でわずかに発現を認め、他は陰性であった。次に、病理学的検索では、SNPC で軽～重度の神経細胞脱落 (外腹側・中間部で強く黒質傍核・外背側部は比較的軽度) を認め、メラニン含有神経細胞は少数残存のみであった。グリオーシスは全体に軽く神経細胞脱落と比較し軽度であり、青斑核同様の所見であった。Parkin は対照の大脳皮質・大脳基底核の神経細胞細胞質・アストロサイト終足で陽性であったが、SNPC・青斑核は陰性で、DRG 神経節細胞の核膜で陽性を示した。*PRKN* 遺伝子変異症例の脳・DRG では陰性であった。レヴィ病理は 3 名で認めたが海馬・大脳皮質では陰性であり、脳幹型と辺縁型が各 1 名で残り 1 名は非特異パターン (青斑核・迷走神経背側核に軽度のみで SNPC は陰性) であった。脊髄病理は、薄束髄鞘淡明化、DRG 変性及び後根大径有髄線維減少を全例で認めた。

今回の研究でエクソン 10-11 新規重複を含む 7 種類の遺伝子変異が解明され、6 種類がエクソン再構成であった。エクソン再構成 6 名 (エクソン 2-4 重複、エクソン 4 欠失、エクソン 6-7 重複、エクソン 2 三重複) で NMD 機構による成熟 Parkin タンパク非産生が予想され、免疫プロット法・免疫組織化学により上記を確認した (エクソン 10-11 重複例では NMD 回避ストップコドンのため C 末切断異常 Parkin タンパク産生が予想されたが凍結脳なく確認不能だった)。p.C431F 変異 Parkin タンパクは重要な触媒反応部における置換のため、Parkin タンパクの機能不全および構造変性が予想された。以上から、*PRKN* 遺伝子変異患者の臨床・病理学的形質発現は、Parkin タンパク RING2 領域障害のためユビキチンリガーゼとしての酵素機能が消失することによると考察した。

本研究は、常染色体劣性若年性パーキンソン病原因遺伝子 *PRKN* の分子レベルの変化と病理組織学的変化を同時に解析したものであるが、正確な両アレル性 *PRKN* 遺伝子変異解析にはゲノム DNA・mRNA 解析が必要であり、*PRKN* 遺伝子変異患者は成熟 Parkin タンパクを産生できず、遺伝型は多様だが、組織病理学的には SNPC の特徴的な神経細胞脱落と比較的軽度のグリオーシスおよび DRG 障害という類似した特徴を呈することを明らかにした価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。