

主論文の要旨

**Impaired muscle uptake of creatine
in spinal and bulbar muscular atrophy**

〔 球脊髄性筋萎縮症における骨格筋クレアチン取り込み異常 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
脳神経病態制御学講座 神経内科学分野

(指導：勝野 雅央 教授)

土方 靖浩

【緒言】

球脊髄性筋萎縮症 (spinal and bulbar muscular atrophy, SBMA) は、球麻痺および四肢筋力低下を主症状とする、成人発症の緩徐進行性神経変性疾患である。X 染色体上に存在するアンドロゲン受容体 (androgen receptor, AR) 遺伝子における CAG 繰り返し塩基配列の異常伸長を病因とし、神経細胞核内で変異 AR 蛋白質が凝集し、さまざまな遺伝子の転写障害を惹起することが本疾患の分子病態の根幹である。

これまでに我々の研究グループは、SBMA 患者の血清クレアチニン (creatinine, Cr) 値が低値であり、且つ運動機能障害を反映する良好なバイオマーカーであることを報告した。Cr の前駆体であるクレアチンは、そのほとんどがエネルギー貯蔵物質として骨格筋内に存在し、非酵素的反応によって Cr へと変換された後に濃度勾配に従って血中へと移行する。このため、一般的に血清 Cr 値は骨格筋量におおよそ比例すると考えられているが、SBMA における血清 Cr 値の低下が神経変性に伴った筋萎縮のみに由来するかどうかについては結論を得ていない。

【対象及び方法】

SBMA 患者における血清 Cr 値低値の機序を解明することを目的として、まず血清 Cr 値と骨格筋量との関係を他疾患と比較するための臨床研究を行い、次いで血清 Cr 値低下に関する分子病態を解明するための基礎研究を行った。臨床研究では、文書による同意を取得した上で、遺伝子診断によって確定した SBMA 患者 65 例、El Escorial 基準における probable 以上と臨床診断された筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 患者 27 例、および健常人 25 例を解析対象とした。評価項目は、血清 Cr、クレアチンを含む血液生化学検査、ALSFRS-R 等の各種運動機能評価項目、全身の骨格筋量とした。全身の骨格筋量は、二重エネルギー X 線吸収測定法 (dual-energy X-ray absorptiometry) によって測定した四肢除脂肪軟部組織量 (appendicular lean soft tissue mass, ALST mass) を採用した。

基礎研究では、まず SBMA 患者における骨格筋内クレアチン濃度を他疾患患者と比較することを目的として、SBMA 患者、ALS 患者、及び他疾患患者各 5 例を対象に、剖検筋検体のホモジネートを作成した後、酵素法を用いて測定した。同様の手法を用いて、野生型マウスおよび SBMA モデルマウスの骨格筋内クレアチン濃度を測定した。次に、SBMA 患者における骨格筋でのクレアチン取り込みを評価することを目的として、クレアチントランスポーター蛋白質 (SLC6A8) 発現を SBMA 患者 3 例、ALS 患者 3 例、非神経筋疾患患者 3 例の腸腰筋剖検検体を用いて、ウェスタンブロッティング法および免疫組織化学的検査によって分析した。さらに、SLC6A8 の遺伝子発現について、上記と同様の剖検筋検体を用いて、RT-PCR 法によって分析した。最後に、SLC6A8 遺伝子の転写への変異 AR の影響を評価することを目的として、ヒト AR (AR-24Q、AR-97Q) を発現させた C2C12 細胞 (マウス筋芽細胞) について、これまで述べた同様の方法で、SLC6A8 蛋白質および遺伝子発現を分析した。

【結果】

SBMA 患者群、ALS 患者群、健常人群の臨床指標及び血液生化学検査結果を Table 1、2 に示す。SBMA 患者群に比して、ALS 患者群では評価時年齢は高く罹病期間は短い傾向があったが、両群での運動機能は同程度であった。血清 Cr 値と ALST mass には、いずれの群においても強い相関関係をみとめたが、SBMA 群では、ALS 群と比較して、全身筋量の減少のみでは説明がつかない程度の著明な血清 Cr 値の低下が明らかとなった (Fig. 1)。このことから、SBMA における血清 Cr 値の低下は、全身筋量の減少以外の病態を背景にもつ可能性が示唆された。次に、各群における ALST mass、血清 Cr 値、血清クレアチン値を比較した。SBMA 患者群は ALS 患者群と同程度の骨格筋量であるにも関わらず、血清 Cr 値は有意に低値であり、Cr の前駆物質であるクレアチンの血清濃度は Cr とは対照的に SBMA 群で有意に高値であった (Fig. 2A-C)。さらに、剖検筋検体の骨格筋内クレアチン濃度についても SBMA 患者では有意に低値であり、SBMA モデルマウス (AR-97Q) でも同様の傾向をみとめた (Fig. 2D-E)。SBMA では、血清クレアチン値が高値であるにも関わらず、骨格筋内クレアチン濃度が低値となる病態を解明するために、血中に存在するクレアチンを骨格筋内に能動的に取り込む役割をもつ骨格筋クレアチントランスポーター SLC6A8 蛋白質および遺伝子レベルについて解析した。その結果、SBMA 患者では SLC6A8 蛋白質発現が有意に抑制されており、mRNA レベルについても著明に低値であることが示された (Fig. 3A-E)。変異 AR の毒性と SLC6A8 遺伝子の転写レベル低下との関係性を評価するために、ヒト AR (AR-24Q、AR-97Q) を発現させた C2C12 細胞について SLC6A8 の蛋白質および mRNA 発現レベルについて調べたところ、SBMA のモデル筋細胞である AR-97Q を発現させた C2C12 細胞では、蛋白質、mRNA レベル共に有意に低下していることが明らかとなり、変異 AR が骨格筋において SLC6A8 の発現を抑制することが示唆された (Fig. 3F-H)。

【考察】

我々は、SBMA 患者の血清 Cr 値低下の原因となる病態に、骨格筋クレアチントランスポーターである SLC6A8 蛋白質の発現が抑制されることによる、骨格筋のクレアチン取り込み障害が関与していることを同定した。

今回の研究結果から、SBMA 患者においても、ALS 患者及び健常人と同様に、血清 Cr 値は骨格筋量とよく相関することが示された。さらに、SBMA 患者における血清 Cr 値の減少は、神経原性筋萎縮による全身筋量低下に加えて、SLC6A8 遺伝子発現低下に由来する骨格筋のクレアチン取り込み障害が関与することを発見した。さらに、ポリグルタミン鎖を異常伸長させたヒト AR を発現させた C2C12 細胞では SLC6A8 の蛋白質・mRNA がともに有意に低値であったことから、変異 AR の毒性が SLC6A8 遺伝子発現低下の直接的な原因であり、骨格筋クレアチン低値、血清 Cr 低値の基礎となる病態であることが明らかになった。異常伸長したグルタミン鎖を持つタンパクが細胞核内で、蛋白質間相互作用によって転写因子の機能障害を誘発するとの報告が

あり、SBMA の骨格筋細胞においても核内において変異 AR が転写障害を引き起こし、SLC6A8 蛋白質発現低下をきたしたものと考えられる。

骨格筋内のクレアチンは、ATP 産生に関わるエネルギー貯蔵物質であり、興奮—収縮連関に重要なカルシウムホメオスタシスに働く他、ミトコンドリア呼吸と連動することによっても骨格筋内の ATP レベルの維持に働くことが知られている。SBMA 患者における骨格筋内クレアチン濃度低下の修復は、運動機能回復に寄与する可能性があり、本疾患の新たな治療ターゲットになりうると考えられる。

【結論】

本研究から、SBMA 患者では変異 AR 蛋白質による SLC6A8 遺伝子の転写障害が骨格筋クレアチン取り込み障害の病態に寄与していることが明らかとなった。骨格筋クレアチン濃度減少が SBMA における運動機能障害の病態基盤であることが考えられ、本疾患の新たな治療ターゲットとなる可能性がある。