

罕見疾病基金會第一屆博碩士獎助論文摘要

私立中山醫學院醫學研究所碩士論文

藥物對脊髓小腦萎縮症第三型的生化作用 「Machado-Joseph Disease 蛋白之分生研究」

李彥賢

論文摘要

Machado-Joseph Disease 簡稱 MJD，是體染色體顯性的遺傳疾病，屬於漸進性神經退化性疾病的小腦脊髓運動失調症第三型(Spinocerebellar ataxia type 3:SCA3)。MJD 主要有運動失調、漸進性眼外肌麻痺、錐體及外錐體徑路的病徵、肌張力的異常及僵硬、末梢肌萎縮、臉部及舌的顫搐。

MJD 基因的所在位置--14q32.1 是在 1994 年由 Kawaguchi 等人鑑定出，並且在 MJD 患者的基因中，發現到靠近於 3'端轉譯區(translated region)內，有一段不穩定的 CAG 核酸重複序列倍增突變，而這段 CAG 核酸重複序列會轉譯出一段含多個麩胺酸(polyglutamine)的蛋白質。於 1995 年後陸續有多篇關於 CAG repeat 與 MJD 臨床疾病的報告，例如擴張重複序列的長度會影響疾病的發病年齡(ate at onset)，其 p(CAG)n 的 n 值越大，發病年齡也就越早，但是也有 n 值小但發病年齡較預測提前。在兩代間有輕微的不穩定的 CAG repeat 遺傳，也就是說雙親傳給子代的 p(CAG)n 有的會增加，有的會減少，而且父親比母親更影響後代 p(CAG)n 的遺傳數目改變。

近年來發現至少有十一種疾病與三核酸重複序列(trinucleotides repeat)有關。不穩定的三核甘酸序列所造成的疾病可分為二類:第一類是位於轉譯區(translated region)中 CAG 三核甘酸重複序列倍增突變轉錄出一段多醯胺麩胺酸蛋白，所造成的神經退化性疾病(neurodegeneration disease)，包括亨汀頓氏舞蹈症(Huntington's Disease;HD)、小腦脊髓幹運動失調症第一型(Spinocerebellar ataxia type 1;SCA1)、小腦脊髓幹運動失調症第二型(Spinocerebellar ataxia type2;SCA2)、小腦脊髓幹運動失調症第三型(Spinocerebellar ataxia type3/Machado-Joseph Disease;MJD)、小腦脊髓幹運動失調症第六型(Spinocerebellar ataxia type6;SCA6)、小腦脊髓幹運動失調症第七型(Spinocerebellar ataxia type7;SCA7)、延髓肌萎縮症(Spinal and bulbar muscular

atrophy)、齒狀紅核蒼白球肌萎縮症(Dentatorubral-Pallidouysian atrophy; DRPLA/Haw River Syndrom; HRS)。此類疾病基因中三核甘酸重複序列倍增突變呈現中度不穩定，CAG 重複序列最多可達到 100 次以上，但其病徵會造成專一的神經退化(neurodegeneration)。第二類是位於不轉譯區(untranslated region)內，由不穩定的 CGG 或 CTG 及位於插入子(intron)中 GAA 三核甘酸重複序列倍增突變所造成的疾病，包括易脆 X 染色體症候群(Fragile X Syndrome)、肌強直萎縮症(Myotonic Dystrophy;DM 及 Friedreich's ataxia (FA)等，此類疾病基因中三核甘酸重複序列倍增突變極為不穩定，可重複上百次或上千次，基因突變並不會造成神經退化性疾病，但會引起肌肉萎縮、智障等遺傳疾病。

由先前研究報告得知，在人類腦不可偵測出 MJD 基因轉譯出來的蛋白產物 MJD/ataxia-3)，包含多醯胺麩胺酸倍增的突變型 MJD 蛋白，與正常的蛋白。而腦部正好是 MJD 病症所在，雖然對 MJD 蛋白的正常功能與致病機轉仍不清楚，但已知 MJD 基因中倍增的 CAG 重複序列會誘發細胞死亡，且經由表現 MJD 中的多醯胺麩胺酸蛋白質片段於細胞中的轉殖基因老鼠，會出現運動失調的症狀。

最近研究並且顯示 MJD/ataxia-3 蛋白累積於腦部神經細胞核內形成包含物(inclusion body)，推測可能經由包含倍增醯胺麩胺酸的 MJD 蛋白片段促使或催化(catalyzed)，而使醯胺麩胺酸倍增片段和正常蛋白造成包含物在核內聚集(neuronal intranuclear inclusions/NIIs)，而且會造成運動神經退化性症狀出現，猜測 NIIs 會影響神經退化的病程發展。而核內包含物(inclusion body)究竟是促使神經細胞走向細胞凋亡(apoptosis)亦或是保護作用並不清楚、目前在文獻上有兩極的說法、因此我們實驗室欲建立一株可長期表達 MJD 蛋白的人類神經細胞株(SK-N-SH)並以細胞免疫染色來觀察 MJD 蛋白在此株神經細胞內部所表達的位置、是否隨著細胞老化代數增加而有明顯的核內包含物產生或細胞程序性死亡(apoptosis)? 並評估此表達治病性 MJD 蛋白的細胞株可存活性。另外我們也給予這個細胞株一些外在環境因子的壓力、例如、紫外線照射和過氧化物處理以觀察細胞在老化過程中此細胞株中 MJD 蛋白位置有何變化以及是否會誘導核內包含物增加? 希望藉此釐清核內包含物和細胞程序性死亡(apoptosis)之間的研究、對於此罕見遺傳性神經退化疾病、晚發性的病理現象、有一較明確的致病機制探討。另外有關 MJD 疾病的治療至目前為止仍根據臨床徵狀來治療 Lamotrigine [3, 5-diamino-6- (2, 3 dichlorophenyl) -1, 2, 4-triazine;LTG]是一種 phenyl-triazine 化合物，是一種新的抗癲癇藥物，被廣泛用來治療單純性或複合性的癲癇。

先前實驗研究顯示 MJD 病人的淋巴母細胞株受到 LTG 藥物作用、致病的 MJD 蛋白有 30%的產量下降，然而根據臨床的觀察發現 Lamotrigine 能夠減輕 MJD 臨床的症狀、以前曾指出以 Sulphame-thoxazole 和 Trimethoprim(Bactrim)治療 MJD 疾病所造成的步態不穩和運動不協調(Sakai, et al., 1995)，但均無研

究說明藥物對疾病的治療機制。LTG 如何能使得 MJD 突變的蛋白質產量降低而減緩症狀的發生？因此，為了解藥物對 MJD 的分生機制，我們實驗室與臨床醫師共同合作、從已確定是 MJD 的病人分別抽取未服用藥物前和服用藥物後的週邊血液、運用分生實驗方法(西方轉漬法/Western blot)分析 MJD 蛋白變化來探討 lamotrigine 此藥物如何改善 MJD 的病症及一些在臨床上有效的藥物對於病人週邊血液中 MJD 蛋白的表達是否有重要的生化作用？