

荒木克仁	知的障害者施設入居者の婦人科受診の現状	平山義人、有馬正高編	知的障害医療の進歩：地域医療の現状と将来展望	日本知的障害者福祉連盟	東京	87-90	2003
鈴木文晴	心身障害児(者)専門医療機関における手術を要する知的障害者の手術方法の検討	平山義人、有馬正高編	知的障害医療の進歩：地域医療の現状と将来展望	日本知的障害者福祉連盟	東京	135-137	2003
曾根 翠 平山義人 中野睦子 倉石公路	婦人科外来診療	平山義人、有馬正高編	知的障害医療の進歩：地域医療の現状と将来展望	日本知的障害者福祉連盟	東京	165-168	2003
曾根 翠 平山義人 加賀君彦 菊池 茂 田山二郎	耳鼻科外来診療	平山義人、有馬正高編	知的障害医療の進歩：地域医療の現状と将来展望	日本知的障害者福祉連盟	東京	173-176	2003
中村全宏	歯科外来診療	平山義人、有馬正高編	知的障害医療の進歩：地域医療の現状と将来展望	日本知的障害者福祉連盟	東京	177-181	2003
鈴木文晴	知的障害者死亡事例の検討	平山義人、有馬正高編	知的障害医療の進歩：地域医療の現状と将来展望	日本知的障害者福祉連盟	東京	196-201	2003
西條晴美	Prader-Willi症候群-成人期の医療問題点-	平山義人、有馬正高編	知的障害医療の進歩：地域医療の現状と将来展望	日本知的障害者福祉連盟	東京	204-207	2003
荒木克仁	ダウン症候群の早期老化について	平山義人、有馬正高編	知的障害医療の進歩：地域医療の現状と将来展望	日本知的障害者福祉連盟	東京	208-211	2003

Niemann–Pick Type C Disease: Accelerated Neurofibrillary Tangle Formation and Amyloid β Deposition Associated with Apolipoprotein E $\epsilon 4$ Homozygosity

Yuko Saito, MD, PhD,^{1,2} Kinuko Suzuki, MD,²
Eiji Nanba, MD, PhD,³
Toshiyuki Yamamoto, MD, PhD,³
Kousaku Ohno, MD, PhD,⁴
and Shigeo Murayama, MD, PhD¹

Niemann–Pick type C disease is a neurovisceral storage disorder. Neurofibrillary tangles similar to those in Alzheimer's disease have been reported in most juvenile/adult patients without amyloid β protein (A β) deposits. Recently, we found deposits of A β in the form of diffuse plaques in three (31- and 32-year-old sisters and a 37-year-old man) of nine Niemann–Pick type C disease patients, who presented with most severe tauopathy and with numerous neurofibrillary tangles. A β deposits were not detected in any of the control brains of patients younger than age 42 years. These three patients with A β deposit all were homozygotes of apolipoprotein E $\epsilon 4$. Our study suggested that *NPC1* gene mutations combined with homozygosity of apolipoprotein E $\epsilon 4$ alleles could manifest neuropathology similar to that of Alzheimer's disease. Investigation of these patients may provide an important clue for understanding the pathogenesis of Alzheimer's disease.

Ann Neurol 2002;52:351–355

Niemann–Pick type C (NPC) disease is an autosomal recessive neurovisceral storage disorder characterized by

From the ¹Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo, Japan; ²Department of Pathology and Laboratory Medicine (Neuropathology), University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC; ³Gene Research Center, Tottori University; and ⁴Division of Child Neurology, Institute of Neurological Science, Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago, Japan.

Received Jan 10, 2002, and in revised form Mar 4 and Mar 26. Accepted for publication Mar 26, 2002.

Published online Jul 17, 2002, in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/ana.10266

Address correspondence to Dr Murayama, Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2, Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo, 173-0015, Japan.
E-mail: smurayam@tmig.or.jp

abnormal intracellular cholesterol trafficking.¹ Most cases are caused by a mutation in the *NPC1* gene. More recently, the *HE1* gene has been identified as the second gene² causing the disease. In addition to abnormal lysosomal storage in neurons and glial cells, neurofibrillary tangles (NFTs) were constant features detected in juvenile/adult NPC disease cases. NFTs have been detected in the brains of NPC disease patients as young as 10 years of age.^{3,4} NFTs in NPC disease were ultrastructurally composed of paired helical filaments and immunochemically indistinguishable from NFTs in Alzheimer's disease (AD).⁵ The burden of NFTs, however, did not always parallel the patients' age.³

Recently, an accumulation of amyloid β protein (A β) was detected in the endosomal fraction of cultured NPC fibroblasts after blocking cholesterol trafficking.⁶ This observation prompted us to investigate A β in an expanded series of NPC disease cases with sensitive silver staining, immunocytochemistry, and electron microscopy. We found three cases of nine presenting with anomalous deposition of A β in the brain. All were in their 30s and consisted of two sisters of one family and an unrelated man, showing most severe accumulations of τ . Sequence analysis of the *NPC1* gene detected different compound heterozygosity in these two families, one of each allele having a new mutation. Furthermore, these three cases were found to carry homozygosity of apolipoprotein E (ApoE) $\epsilon 4$ alleles, whereas other NPC disease cases were not ApoE $\epsilon 4$ alleles.

The data presented here suggest that mutation of *NPC1* genes superimposed on apoE $\epsilon 4$ homozygosity may invoke anomalous accumulation of A β as well as acceleration of tauopathy.

Materials and Methods

Tissue Source

Nine NPC brains, submitted for consultation to the Division of Neuropathology in the Department of Pathology and Laboratory Medicine at the University of North Carolina at Chapel Hill, were the basis of this work. Clinical histories and pathological details of Cases 2 and 6 to 9 have been reported previously.^{4,7} Diagnosis was based on typical clinical and pathological features combined with filipin stain and abnormal cholesterol esterification using cultured fibroblasts. Frozen tissue was available in seven cases.

Neuropathology

Formalin-fixed tissues from various areas of the central nervous system were obtained from all cases with NPC disease (Table). Large hemispheric sections were prepared in some cases for the distribution of diffuse plaques (DPs) and NFTs. Six-micrometer-thick serial sections were stained with solochrome eosin, hematoxylin and eosin, and Klüver-Barrera. The silver stains included Bodian, Bielschowsky, modified methenamine silver, and the Gallyas-Braak method. Congo red and thioflavin S stainings were used to detect amyloid.

Table. Genotypic-Phenotypic Correlations of Niemann-Pick Type C Disease

Case No.	Age (yr)	Gender	Onset (yr)	DP	NFT/NT	NPC1 Gene Mutation		ApoE
						Allele 1	Allele 2	
1	0.75	M	0	—	—	N/A	N/A	N/A
2	10	F	N/A	—	+	I1061T ²¹	N/A	ε3/ε3
3	11	F	N/A	—	+	E1189G ²²	G insert in 3134* ^b	ε3/ε3
4 ^a	31	F	N/A	+++	+++	S954L ¹²	R116X ^b	ε4/ε4
5 ^a	32	F	14	++	+++	S954L ¹²	R116X	ε4/ε4
6	32	M	16	—	++	P1007A ²¹	E1189G ²²	ε2/ε3
7	37	M	10	+	+++	P1007A ²¹	S357L ^b	ε4/ε4
8	52	F	26	—	++	G992R ²¹	4b (ACTT) insert in 3573* ^b	ε3/ε3
9	55	M	51	—	++	N/A	N/A	N/A

^aSibling.

^bNew Mutation.

*sequence position in NPC1 cDNA.

DP = diffuse plaque; NFT/NT = neurofibrillary tangles/neuropil threads; ApoE = apolipoprotein E genotype; N/A = not available;

For the immunocytochemical study, an automatic stainer (20NX; Ventata, Tucson AZ)^{8,9} was used. The anti-Aβ antibodies were used, and their epitopes were as follows: 4G8, amino acids 17-24 (Senetek, Napa, CA), 12B2, amino acids 11-28 (IBL, Maebashi, Japan), anti-Aβ 1-42 (polyclonal, IBL), and anti-Aβ 1-40 (polyclonal, IBL). The anti-τ antibodies were used, and their epitopes were AT8, phosphorylated Ser202/Thr205 (Innogenetics, Temse, Belgium), Alz50, amino acids 5-51 and 312-322 (a gift from Dr P. Davies), and paired helical filament 1, Ser396/404 (a gift from Dr P. Davies). Also used were anti-ubiquitin (Sigma, Glostrup, Denmark), anti-gliofibrillary acidic protein (GFAP; Sigma), and anti-HLADR (CD68; Sigma) antibodies.

One hundred thirty-nine control cases from various age groups were selected randomly from the archives of the Department of Pathology and Laboratory Medicine at the University of North Carolina at Chapel Hill and were stained with modified methenamine silver and Aβ 1-42 for the detection of DPs.¹⁰ They included 16, 6, 5, 13, and 12 cases each from the first to fifth decade.

For the ultrastructural study, pieces of formalin-fixed tissues from Cases 3, 5, and 7 were further fixed in half Karnovsky solution, postfixed in 1% osmium tetroxide, and embedded in epoxy resin. One-micrometer-thick semithin sections were stained with toluidine blue, and an appropriate area was trimmed for ultrastructural observation.

Molecular Pathological Study

Genomic DNA was extracted from frozen frontal lobes of the seven cases (Cases 2-8), and searched for mutations in NPC1 gene as previously reported.^{11,12} Apolipoprotein E genotyping was determined by polymerase chain reaction and digestion of a restriction enzyme,¹³ confirmed by sequence study.

Results

General Neuropathology

All cases presented with typical neuropathological features of NPC disease. Abnormal storage was observed both in neurons and in glial cells throughout the cere-

brum, cerebellum, brainstem, and spinal cord. NFTs were seen in all cases except for Case 1 (9-month-old male infant).

Specific Pathology Related to Aβ

The most abundant NFTs with numerous DPs were found in the neocortex (Fig. A) of Cases 4 and 5 (ages 31 and 32 years, respectively). The distribution was widespread, including the frontal, temporal, and parietal cortex. Case 7 (37-year-old man) also had abundant tangles but showed limited numbers of DPs, scattered in the parietal lobe and third temporal gyrus. These DPs were positive for all anti-Aβ antibodies used (see Fig. B). No neuritic components were detected by silver staining or immunocytochemistry with anti-τ antibodies. No amyloid was detected with Congo red or thioflavin S. Some DPs were associated with swollen neurons with abnormal storage (see Fig. C). No DP was detected in other NPC disease cases. Among control cases, those older than 42 years had definite DPs detected in the valley of the third temporal neocortex.

τ-Related Pathology

Case 1 (9-month-old male infant) did not show any τ-immunoreactive structure. However, in Case 2 (10-year-old girl) and Case 3 (11-year-old boy), NFTs were detected in the transentorhinal area, together with oligodendroglial coiled bodies. NFT-containing neurons or oligodendroglial coiled body-containing oligodendroglia also showed cytoplasmic storage. Neuropil threads were also abundant in these areas. An accumulation of abnormally phosphorylated τ was widespread in Cases 4, 5, and 7 (see Fig. D and E). The amount of NFT burden is not age dependent, as it was most prominent in Cases 4, 5, and 7 (all were in their 30s), followed by Cases 8 and 9 (ages 52 and 55 years). The ages of Cases 4 to 6 were similar, but Case 6 had fewer

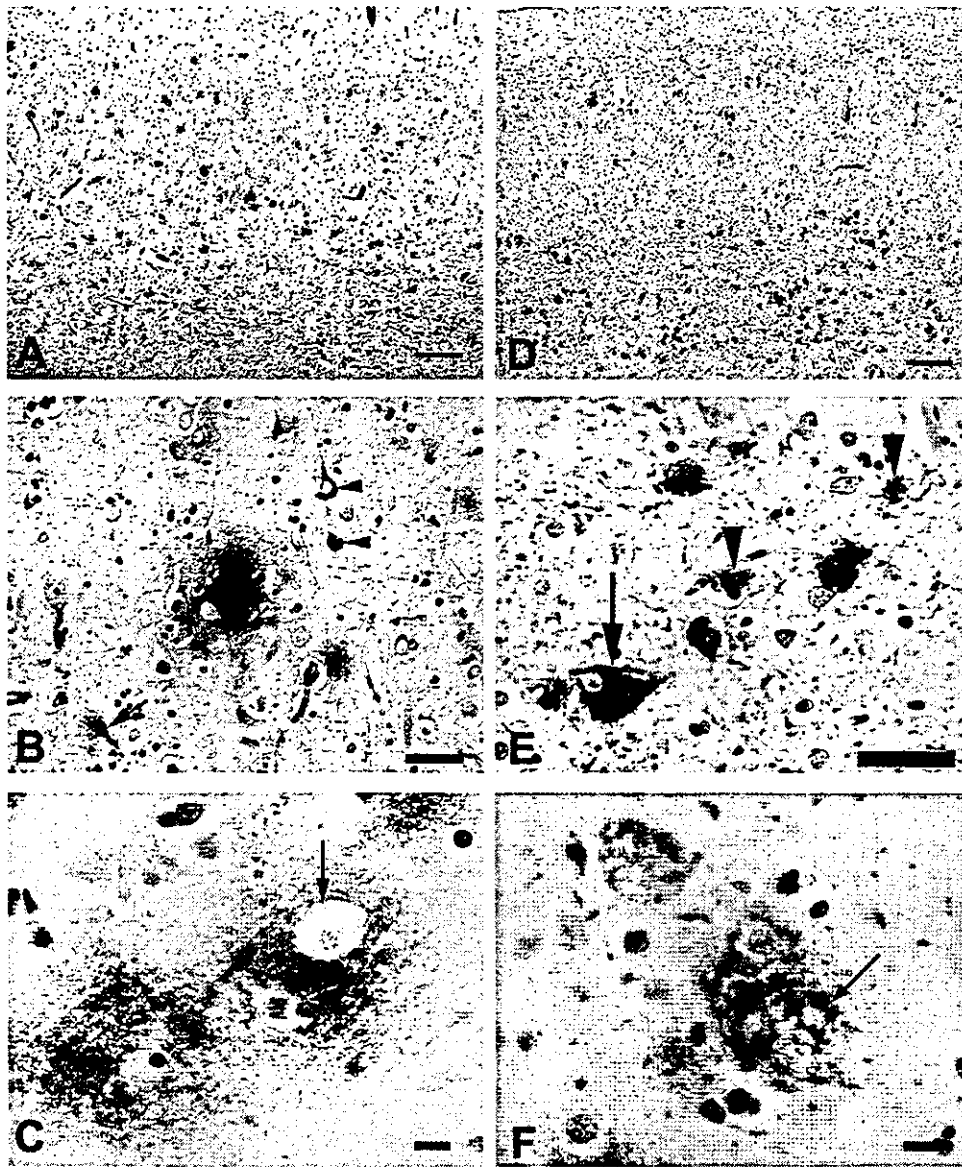


Fig. Alzheimer-type pathology in a case of Niemann-Pick type C disease with homozygotes of apolipoprotein E $\epsilon 4$ (Case 4: 31-year-old woman). (A) Diffuse plaques (DPs), frequent in the parietal cortex (modified methenamine silver stain; bar = 200 μ m). (B) DPs in the frontal cortex, accompanying neurofibrillary tangles (NFTs; arrowheads) and a neuron with abnormal storage (arrow; modified methenamine silver stain; bar = 50 μ m). (C) DPs associated with a storage neuron (arrow; immunostaining with 12B2 [anti-A β 11-28 monoclonal antibody]; bar = 10 μ m). (D) τ -Immunoreactive structures, diffusely present in the entorhinal cortex (immunostaining with AT8 [antiphosphorylated τ antibody]; bar = 200 μ m). (E) Higher magnification of D, showing AT8 immunoreactivity in both a neuron (arrow) and oligodendroglia (arrowheads; bar = 50 μ m). (F) DPs frequently associated with τ -immunoreactive storage neurons (arrow) in the insular cortex (double immunostaining with AT8 [red] and 12B2 [brown]; bar = 10 μ m).

NFTs and no DPs (see Table). In two cases, in which spinal cords were available (Cases 6 and 7), severe tauopathy involving neuronal and oligodendroglial cells, with preponderance in the posterior horn, was noted. Double immunostaining occasionally demonstrated DPs around τ -immunoreactive ballooned cells with abnormal storage (see Fig. F). Ultrastructurally,

paired helical filaments were detected in all the examined cases having NFTs (data not shown).

NPC1 Gene Mutation

The Table summarizes the results of the genotype analysis of *NPC1* gene and extent of NFTs and DPs. Cases 4 and 5 show a new mutation, R116X, and Case 7 also

shows another new mutation, S357L. A new four base (ACTT) insert in 3573 sequence position in NPC1 cDNA was found in Case 8.

ApoE Genotyping

ApoE genotyping is summarized in the Table. All the cases with A β deposition were homozygotes of $\epsilon 4$ alleles, and cases without A β deposition were $\epsilon 3/\epsilon 3$ or $\epsilon 2/\epsilon 3$ alleles.

Discussion

In this study, we have demonstrated an accumulation of A β as well as acceleration of tauopathy in three NPC disease cases carrying $\epsilon 4/\epsilon 4$ alleles.

Among our randomly selected autopsy cases of normal individuals, DPs were seen as early as 42 years of age. Although the limited tissue source of our controls hinders further study of their apoE genotype, several pathological studies examining apoE status totally agreed with our data.^{14,15} Only Down syndrome presented with early deposition of A β , followed by the appearance of paired helical filament τ . Thus, the aberrant deposition of A β in these three cases in their 30s was interpreted to be an abnormally accelerated deposition.

Until now, NPC disease has been classified as one of the diseases causing secondary tauopathy without deposition of A β .^{3,4,7,16} Our study showed that homozygosity of ApoE $\epsilon 4$ alleles leads to the deposition of A β and accelerated accumulation of abnormally phosphorylated τ in neurons. Because all three cases with A β deposition carry new mutations of the *NPC1* gene, it is still possible that these new mutations may contribute to the deposition of A β . Obviously, this possibility has to be further investigated. However, the mutation site of the *NPC1* gene was not common among them, and therefore it is more likely that apoE $\epsilon 4$ homozygosity is responsible for the deposition of A β as well as accelerated tauopathy.

ApoE plays a major role in the transport of cholesterol in the brain, and the ApoE $\epsilon 4$ allele is known to be an important risk factor for Alzheimer's disease.¹⁷ There is a recent report that ApoE $\epsilon 4$ allele accelerates deposition of A β in APPsw transgenic mouse.¹⁸ Also, there are reports that cholesterol is a risk factor for Alzheimer's disease¹⁹ and that reducing cholesterol level could lead to decreased deposition of A β .²⁰ Therefore, it is reasonable to speculate that the early appearance of DPs in some NPC disease cases is influenced by the ApoE genotype. Our study may provide new insight into the formation of NFTs and amyloid or neuritic plaques. Double transgenic mice carrying mutant *NPC1* genes and $\epsilon 4/\epsilon 4$ alleles could be an interesting model for the investigation of Alzheimer's disease,

apart from mice with mutations in APP and/or τ genes.

This study was supported by the Long Term Projects of Comprehensive Research on Senile Dementia (S.M.) of the Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology and the Ara Parseghian Medical Research Foundation (K.S.).

We thank Dr Peter Davies for the donation of antibodies, N. Aikyo, M. Maeda, M. Yamazaki, S. Sugiura, J. Saishoji, N. Naoi, and C. Langaman for technical support, and Dr Lee McIlwain for the editorial work. Frozen tissues from Cases 4 and 5 were provided by Kathleen Price Bryan Brain Bank at Duke University, Durham, NC.

This study was presented in part at the 2001 Annual Meeting of the American Association of Neuropathologists, Chicago, IL June 21–24, 2001.

References

1. Pentchev PG, Kruth HS, Comly ME, et al. Type C Niemann-Pick disease. A parallel loss of regulatory responses in both the uptake and esterification of low density lipoprotein-derived cholesterol in cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 1986;261:16775–16780.
2. Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, et al. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* 2000;290:2298–2301.
3. Vanier MT, Suzuki K. Recent advances in elucidating Niemann-Pick C disease. *Brain Pathol* 1998;8:163–174.
4. Suzuki K, Parker CC, Pentchev P. Niemann-Pick type C: neuropathology revisited. *Dev Brain Dysfunct* 1997;10:306–320.
5. Auer IA, Schmidt ML, Lee VM, et al. Paired helical filament tau (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 1995;90:547–551.
6. Yamazaki T, Chang TY, Haass C, Ihara Y. Accumulation and aggregation of amyloid β -protein in late endosomes of Niemann-Pick type C cells. *J Biol Chem* 2001;276:4454–4460.
7. Suzuki K, Parker CC, Pentchev PG, et al. Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Acta Neuropathol* 1995;89:227–238.
8. Grogan TM, Casey TT, Miller PC, et al. Automation of immunohistochemistry. *Adv Pathol Lab Med* 1993;6:253–283.
9. Grogan TM, Rangel C, Rimsza L, et al. Kinetic-mode, automated double-labeled immunohistochemistry and in situ hybridization in diagnostic pathology. *Adv Pathol Lab Med* 1995;8:79–100.
10. Murayama S, Suzuki K, Bouldin T. Diffuse type of senile plaques in non-demented population. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991;50:303.
11. Yamamoto T, Nanba E, Ninomiya H, et al. NPC1 gene mutations in Japanese patients with Niemann-Pick disease type C. *Hum Genet* 1999;105:10–16.
12. Yamamoto T, Ninomiya H, Matsumoto M, et al. Genotype-phenotype relationship of Niemann-Pick disease type C: a possible correlation between clinical onset and levels of NPC1 protein in isolated skin fibroblasts. *J Med Genet* 2000;37:707–712.
13. Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990;31:545–548.

14. Morishima-Kawashima M, Oshima N, Ogata H, et al. Effect of apolipoprotein E allele $\epsilon 4$ on the initial phase of amyloid β -protein accumulation in the human brain. *Am J Pathol* 2000;157:2093–2099.
15. Yamaguchi H, Sugihara S, Ogawa A, et al. Alzheimer β amyloid deposition enhanced by apoE $\epsilon 4$ gene precedes neurofibrillary pathology in the frontal association cortex of nondemented senior subjects. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:731–739.
16. Love S, Bridges LR, Case CP. Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Brain* 1995;118:119–129.
17. Poirier J. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2000;924:81–90.
18. Carter DB, Dunn E, McKinley DD, et al. Human apolipoprotein E4 accelerates β -amyloid deposition in APPsw transgenic mouse brain. *Ann Neurol* 2001;50:468–475.
19. Launer LJ, White LR, Petrovitch H, et al. Cholesterol and neuropathologic markers of AD: a population-based autopsy study. *Neurology* 2001;57:1447–1452.
20. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, et al. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease β -amyloid peptides A β 42 and A β 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5856–5861.
21. Millat G, Marçais C, Rafi MA, et al. Niemann-Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am J Hum Genet* 1999;65:1321–1329.
22. Sun X, Marks DL, Park WD, et al. Niemann-Pick C variant detection by altered sphingolipid trafficking and correlation with mutations within a specific domain of *NPC1*. *Am J Hum Genet* 2001;68:1361–1372.

結節性硬化症
—2つの原因遺伝子の同定とその後の展開—

鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設脳神経小児科

大野 耕 策

日本小児科学会雑誌 第106巻 第11号別刷

総説

結節性硬化症

—2つの原因遺伝子の同定とその後の展開—

鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設脳神経小児科

大野 耕 策

キーワード：結節性硬化症，てんかん，知的障害，過誤腫

1. はじめに

結節性硬化症は種々の組織や臓器の過誤腫性病変を特徴とする優性遺伝性疾患である。この疾患は少なくとも人口約1万人に1人の頻度で発生する¹⁾。脳神経細胞の部分的分化異常（結節）によって、およそ90%にてんかんと、60%に知的障害を合併し、これらの中枢神経症状がQOLを左右する最も大きな症状である。その他、新生児期の心臓横紋筋腫による不整脈や心不全、学童期以降の顔面の血管線維腫や脳腫瘍、成人期の腎血管平滑筋脂肪腫の増大や出血による急性腹症や腎機能障害、肺のリンパ血管平滑筋腫症による急性および慢性的呼吸困難など、成長とともに過誤腫性病変による多臓器の障害によってQOLが左右されることが特徴である²⁾。

この疾患は染色体16番に存在するTSC2遺伝子³⁾または染色体9番に存在するTSC1遺伝子⁴⁾の変異により発病することが明らかになっている。現在、この2つの遺伝子産物が生体でどのように機能しているか、またこの遺伝子の欠陥でどのような異常がおこるのか活発に研究が進められている。この総説では、遺伝子変異と臨床症状の関係、TSC遺伝子機能、また難治性てんかんの発症と関係する皮質結節 (cortical tu-

bers) の分子病態について概説する。

2. TSC 遺伝子とその変異

1) TSC1 遺伝子と遺伝子産物 Hamartin

染色体9q34に存在するTSC1遺伝子は23エクソンからなり、8.6kbの転写産物を作り、hamartinと命名された1164アミノ酸からなる130kDaの蛋白質をコードする⁴⁾。Hamartinはアミノ酸127～144に膜貫通領域様ドメインを持つが、一般的に親水性で、アミノ酸730から始まる266アミノ酸は、別の蛋白質と結合することが予測されるcoiled-coilドメインを持つ⁵⁾。これまで明らかにされた脊椎動物の蛋白質の中でHamartinに強い類似性を持つ蛋白質はない。

2) TSC2 遺伝子と遺伝子産物 Tuberin

染色体16p13.3に存在するTSC2遺伝子は41エクソンからなり5.5Kbの転写産物とtuberinと命名された1807アミノ酸からなる198kDaの蛋白質を産物とする³⁾。TSC2遺伝子のセントロメア側に多発性嚢胞腎の原因となるPKD1遺伝子が存在し⁶⁾、この領域の染色体欠失により、結節性硬化症と多発性嚢胞腎を合併するcontiguous gene syndromeを呈する。TSC2遺伝子はN端に疎水性アミノ酸が多い領域があるが、膜貫通はないと考えられている³⁾。エクソン34～38領域の約160アミノ酸はrap-1 GTPase活性化蛋白質(GAP)に相同性を示す。エクソン3の81～102アミノ酸はロイシンジッパーモチーフ、エクソン10の346～371アミノ酸とエクソン26と1008～1021アミノ酸

連絡先：(〒683-8504) 米子市西町 36-1

鳥取大学医学部脳幹性疾患研究施設脳神経小児科
大野 耕 策

表1 結節性硬化症の遺伝子変異の特徴¹⁰⁾

変位	TSC1	(%)	TSC2	(%)
大きい欠失 (1kb ~)	0	(0%)	54	(18%)
挿入	26	(17%)	26	(9%)
欠失	55	(36%)	67	(23%)
ナンセンス点変異	60	(38%)	55	(19%)
スプライシング点変異	11	(7%)	31	(11%)
ミスセンス点変異	2	(1%)	59	(20%)
計	154		292	

は coiled-coil ドメインを持ち、これらの領域は別の蛋白質と結合する可能性のある領域である⁹⁾。

3) 遺伝子変異

遺伝子変異の検出率：結節性硬化症患者の TSC1 および TSC2 遺伝子を、PCR-SSCP 法でエクソンを解析すると、50~60% の患者でしか変異を同定できない^{6,7)}。大きな欠失などを検出するパルスフィールドゲル、サザン解析、long-range PCR などの種々の方法を組み合わせても、変異を同定出来るのは 75%~90% と言われている^{8)~10)}。この原因として、変異を検出する方法の問題、プロモーター領域やイントロンの変異、モザイク、TSC1 と TSC2 以外の原因遺伝子の存在の可能性などが上げられる。TSC1 と TSC2 の遺伝子以外に原因遺伝子が存在する可能性は否定できないが、少なくとも結節性硬化症の大家系は TSC1 か TSC2 に連鎖することが明らかになっており、第3の原因遺伝子が存在する可能性は少ない¹⁰⁾。

TSC1, TSC2 遺伝子変異の特徴 (表1) : TSC1 も TSC2 も一塩基置換は約 50% に認め、このうち TSC1 ではナンセンス変異が 82% と頻度が高く、TSC2 ではナンセンス変異とミスセンス変異はそれぞれ 40% 前後である。TSC1 のナンセンス変異の半数以上は CG が多い CpG 領域の CGA の C が T に変異し、ストップコドンに変化する。TSC1 では、7つある CpG 領域の 6カ所が比較的変異が集積しやすいホットスポットとなっている。TSC2 でも、2カ所ある CpG 領域にミスセンス変異が多い。1kb 以上の大きな欠失は TSC2 では 18% と比較的頻度が高いが、TSC1 ではみられない。

TSC1, TSC2 遺伝子変異の頻度：両親に異常のない孤発例のおよそ 60~70% は TSC2 に変異があり、10~15% は TSC1 に変異がある¹⁰⁾。この原因の1つとして TSC1 は TSC2 よりエクソンの数が少なく (1/2)、転写領域が小さいこと (2/3) が考えられる。しかし、TSC1

遺伝子では大きな欠失がほとんど見られないことやミスセンス変異が少ないことから、遺伝子構造の違いやミスセンス変異の影響が出にくい hamartin 蛋白質の特徴なども考えられる。一方、家族例では TSC1 と TSC2 の頻度はほぼ同じと考えられてきた^{6,11)}が、家族例でも TSC2 に変異の頻度が高いと考えられるようになっている⁹⁾。

4) 遺伝子変異と臨床症状との関係

TSC1 変異は TSC2 変異と比較して、知的障害が軽い。両親に異常のない結節性硬化症患者では TSC2 遺伝子の変異の頻度が高く、また家族例では TSC1 と TSC2 遺伝子変異に差がないことから、TSC1 に変異を持つ例は症状が軽く TSC2 に変異を持つ孤発例と比較して、子孫を残す可能性が高いと推察されてきた。Jones ら⁹⁾は知的障害の頻度は有意に TSC2 に変異を持つ患者に高い (TSC2 59/88 人, TSC1 4/13 人) ことを観察した。Dabora ら⁹⁾は、TSC1 に変異を持つ孤発例 (22 人) と TSC2 に変異を持つ孤発例 (129 人)、また家族例を含めて TSC1 に変異のある 28 人、TSC2 に変異のある 158 人、TSC1 にも TSC2 にも変異の見られない 38 人の臨床症状を比較検討した。TSC1 と TSC2 の孤発例の比較では、痙攣の頻度、中等度から重度知的障害の頻度、大脳上衣下結節数や脳の全結節数は TSC2 に高いことを見いだしている (表2)。また家族例を含めた検討でも、同様で、けいれんや知的障害の頻度、結節数は TSC2 に比較して、TSC1 で低いことを報告している。日本人についても、包括的な研究ではなく症例数も少ないが、知的障害については同様の傾向である^{11,12)}。

脳以外の過誤腫の頻度も TSC1 変異で低い。Dabora ら⁹⁾は、腎血管平滑筋脂肪腫、網膜過誤腫など脳以外の過誤腫の頻度も TSC2 変異と比較して、TSC1 変異で有意に頻度が低いと報告している (表2)。腎の血管平滑筋脂肪腫の TSC1 変異での発生頻度は TSC2 変異の頻度の半分であり、腎シストの発生も TSC1 変異で低く、またその大きさや数を考慮したスコアも TSC1 ではるかに小さい。肺のリンパ血管平滑筋腫症は結節性硬化症の女性にみられ、気胸や呼吸困難の原因となる。Dobora ら⁹⁾の 224 人の結節性硬化症の 16 歳以上の女性 49 人中 5 人に、肺のリンパ血管平滑筋腫症を認め、全て TSC2 に変異を有していた。この頻度について、統計学的な有意さを認めていないが、これまでの肺のリンパ血管平滑筋腫症を合併した結節性硬化症の遺伝子解析では、3例が TSC2 に変異があり、1例は TSC1

表2 TSC1 または TSC2 遺伝子に変異を持つ孤発例の臨床症状⁹⁾

	TSC1 (n=22)	TSC2 (n=129)	P
平均年齢 (歳)	9 (2-51)	10 (1-44)	NS
けいれん	19/22 (86%)	127/128 (99%)	0.02
知的障害 (読み書き不能)	2/14 (14%)	41/90 (46%)	0.04
脳室上衣下結節	15/20 (75%)	127/136 (93%)	0.02
平均上衣下結節数	1.7	6.7	0.0002
脳の総結節数 (10 以上)	1/9 (11%)	29/42 (69%)	0.02
平均結節数	4.4	12.9	0.02
腎シスト	3/19 (16%)	30/122 (25%)	NS
大きさの平均スコア	0.16	0.52	0.03
腎血管平滑筋脂肪腫	6/19 (31%)	72/121 (60%)	0.03
大きさ数の平均スコア	0.32	0.97	0.006
皮膚白斑	20/21 (95%)	124/128 (97%)	NS
顔面血管線維腫	13/22 (59%)	95/121 (78%)	NS
爪周囲線維腫	5/20 (25%)	26/128 (20%)	NS
額の線維腫	2/20 (10%)	51/128 (40%)	0.01
網膜過誤腫	0/16	32/117 (27%)	0.01
心横紋筋腫	8/17 (47%)	58/117 (50%)	NS
肺リンパ血管平滑筋脂肪腫 (女性, 16 歳以上)	0/5	3/17 (18%)	NS

に変異が報告されている⁸⁾¹³⁾。また、肺のリンパ血管平滑筋腫症は結節性硬化症のない人にも見られることが知られているが、散発的に見られる肺のリンパ血管平滑筋腫症でも、TSC2 に変異がおこっていることが明らかになっている¹⁴⁾¹⁵⁾。従って、肺のリンパ血管平滑筋腫症も TSC1 変異に比較して TSC2 変異に多い過誤腫である可能性が高い。また、Dabora ら⁹⁾の 224 例中、網膜所見の記載のある 192 人中、網膜過誤腫は 46 人に見られ、この中に TSC1 に変異を持った例はないと言うことも注目値する。

5) モザイク

結節性硬化症のおよそ 60% は両親に結節性硬化症の症状がなく両親のどちらかの配偶子細胞に突然変異が生じたためと考えられる。しかし、Verhoef ら¹⁶⁾¹⁷⁾は結節性硬化症では体細胞レベルおよび生殖細胞レベルでモザイクを示す例が存在し、決して稀ではないことを報告した。モザイクの存在は遺伝子診断、遺伝相談上大きな問題である。Yates ら¹⁸⁾は、健康な両親から 3 人の結節性硬化症を持つ家系を分析した。3 人の子は TSC2 に同じ変異を持ち、健康な兄弟と両親にその変異はなく、この変異が母親の生殖細胞のモザイクに由来することを証明した。また、Rose ら¹⁹⁾も、結節性硬化症の症状がない両親から 2 人の結節性硬化症の子どもが生まれた 7 家系を分析し、5 家系で両親のどちらかの生殖細胞は TSC2 変異がモザイクに存在し、1 家

系で TSC1 変異がモザイクに存在していることを示した。Kwiatowska ら²⁰⁾は、患者の白血球の 30% しか TSC1 の 2 塩基欠失を示さない症例を経験し、血液細胞、尿細胞、頬粘膜、毛根で、この変異の割合が 0%~42% と異なる体細胞モザイクを同定している。体細胞および生殖細胞での TSC 遺伝子の変異モザイクがどの程度の頻度で存在するか明らかではないが、再発危険率などの遺伝相談や遺伝子検査にあたって、常にこのモザイクの存在について考えておく必要がある。

3. 過誤腫性病変形成の分子機構

結節性硬化症の病変は、皮膚白斑やシャグリーン斑の様に斑状に生じる場合、脳の上衣下結節のように結節状に生じる場合、皮質結節の様に脳室周囲から皮質に向かう線状または漏斗状に生じる場合と、過誤腫として皮膚、眼底、腎臓、心臓、腎臓に結節または腫瘍性病変を作る場合がある。患者の体細胞では、全て、片親から受け継いだ正常アリルともう 1 人の片親から受け継いだ変異アリルから出来ている。しかし、結節性硬化症の病変はある臓器または組織の全体ではなく、その一部に斑状または結節状の病変や過誤腫として見られる。この分子機構を明らかにすることが結節性硬化症の病態を理解する第一歩となる。

1) 過誤腫形成と 2 段階変異モデル

遺伝性腫瘍では、ある腫瘍抑制遺伝子の変異を片親の配偶子細胞 (germline mutation = 第1段階の変異) を介して受け継ぎ、さらに個体形成期の体細胞の分裂過程で、遺伝子の欠失または変異が生じ (somatic mutation = 第二段階の変異) によって、その腫瘍抑制遺伝子機能が消失することで、腫瘍発生がおこると考えられてきた、Knudson の two-hits theory²¹⁾。その後、多くの遺伝性腫瘍性疾患で、原因遺伝子が明らかになり、体細胞では正常アリルと変異アリルを持つ heterozygous な状態にあるのに、腫瘍では正常アリルの消失 (Loss of Heterozygosity, LOH) が生じていることが明らかになった。結節性硬化症の病変部もこのように体細胞が分裂する過程で TSC1 または TSC2 の正常アリルの欠失がおこっていることが明らかにされた²²⁾²³⁾。腎血管平滑筋脂肪腫や心臓横紋筋腫ではおよそ半数の例で LOH が認められるが、大脳の結節 14 例では LOH が認められず、脳室上衣下の巨細胞性星状細胞腫 11 例では 1 例のみ LOH が見つけられている²⁴⁾。また顔面血管線維腫でも 3 例中 2 例²⁵⁾に、肺リンパ血管平滑筋腫症では 4 例中 3 例¹⁵⁾に LOH を認めている。結節性硬化症の皮膚、腎臓、心、肺の過誤腫は正常アリルの欠失によってその遺伝子産物が消失することによっておこると考えられるようになっている。

2) なぜ脳の病変部では正常アリルの欠失 (LOH) が認められないか?

これまで脳の病変 (脳室上衣下の巨細胞性星状細胞腫や大脳皮質結節) ではほとんど LOH が検出されていない。1つの可能性として、LOH が検出される過誤腫は単一クローン由来の細胞が多く存在し、脳の病変では、正常細胞が多く混在するために LOH が検出できない可能性がある。第2には脳の病変では、大きな欠失がおこりにくいのではないかという可能性がある。この可能性を考えて、Niida ら²⁶⁾は過誤腫が単一クローン由来かどうか明らかにするとともに、LOH の検出だけでなく、正常アリルの小さい変異による不活性化を検討するための体細胞変異解析と、正常アリルの高メチル化による不活性化を検討するためのメチル化解析を組み合わせて行った。しかしながら、脳の病変部でも単一クローン性が高い場合があるにも関わらず、LOH が認められないだけでなく、正常のアリルを不活性化する遺伝子変化を認めなかった。このことから、結節性硬化症の過誤腫性病変の発生、特に脳の病変の発生には、正常アリルの不活性化をおこす第二段階の変異 (正常アリルの欠失や突然変異) 以外の機構

が働いている可能性が高くなった。

一方、遺伝子レベルではなく、脳病変での TSC1 遺伝子産物 hamartin, TSC2 遺伝子産物 tuberin の発現を免疫組織学的に検討した研究でも、腎臓や心臓の病変では hamartin も tuberin も染色性が低下している^{27)~30)}のに対し、脳室上衣下の巨細胞性星状細胞腫や大脳皮質結節では、染色性が消失している場合やいろんなレベルに発現していることが報告されている²⁹⁾³⁰⁾。特に大脳結節の巨大グリア細胞では染色性は低下していない²⁹⁾³⁰⁾。従って、病理学的にも大脳皮質結節が遺伝子産物の不活性化 (二段階の変異) によっておこっているかどうか明らかではない³⁰⁾。

4. TSC 遺伝子機能

TSC の原因遺伝子は腫瘍抑制遺伝子と言われてきた。TSC2 は GTP 結合蛋白質 rap-1 の GTPase-activating protein (GAP) と相同性のある部分を持ち³⁾、遺伝性腎癌ラットの Eker ラットの腎癌発生はこの遺伝子が原因であること³¹⁾³²⁾、さらに前に述べたように多くの過誤腫で LOH が認められることから腫瘍抑制遺伝子として働くことが示されている。また、TSC1 についても、遺伝子産物 hamartin は GTP 結合蛋白質 Rho の活性化に関与し、アクチン結合蛋白質である Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) ファミリーと結合し、細胞の接着斑の形成に重要な役割を行うこと³³⁾が明らかにされ、腫瘍抑制遺伝子として働くことが示されている。

TSC1 の欠陥でも、TSC2 の欠陥でも臨床症状に多少の重症度の違いはあっても、ほぼ区別出来ない臨床症状をおこす。この背景には、TSC1 の遺伝子産物 hamartin と TSC2 遺伝子産物 tuberin が蛋白質複合体を形成し³⁴⁾³⁵⁾、この複合体が細胞の増殖に関する特定の経路に働くためであることはまず間違いない。我々も TSC2 蛋白質の抗体を用い、免疫沈降法すると TSC1 も検出されることを確認している (図1)。従って、TSC1 と TSC2 の疾患を引きおこす変異は、tuberin と hamartin の結合出来なくする異常³⁶⁾であり、この複合体の形成異常が、結節性硬化症の病変と関係することが明らかになりつつある。また、この複合体にいくつかの蛋白質が結合し、複雑な機能を担う複合体を形成する可能性が高くなっている。

1) Tuberin または Hamartin が欠失した細胞は細胞周期に異常を来す?

結節性硬化症の皮膚病変部を培養すると大型で、あ

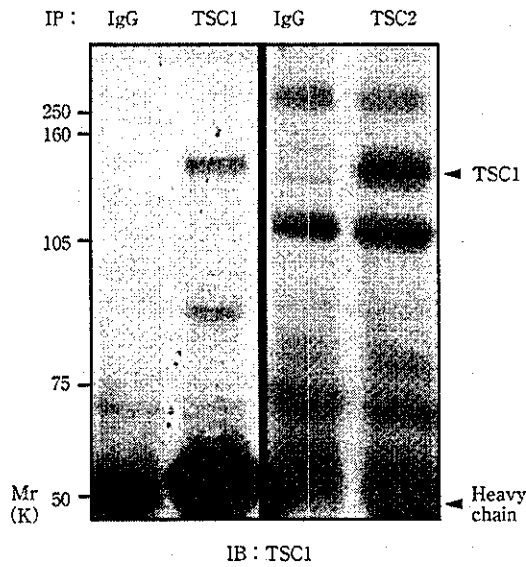


図 HEK293細胞の0.5%NP-40抽出物から、抗TSC1/抗TSC2と各々のコントロールIgGで免疫沈降(IP)を行い、沈降サンプルをSDS/PAGEで展開後、抗TSC1でウエスタンブロッック(IB)した。TSC1(130kDa)は抗TSC1で免疫沈降されるが、抗TSC2でも免疫沈降されている。

たかもニューロン様の多極性の突起を持ち、多核の細胞が出現する^{37)~40)}。ショウジョウバエのTSC2変異体では、細胞が大型化し、細胞分裂することなくDNA含量が増加し、ヒトの結節性硬化症の病変部細胞との類似性を示し⁴¹⁾、ショウジョウバエのTSC2は、DNA複製を停止させ、M期に入るのを決定している蛋白質で、ヒトのTSC2も細胞周期進行と関係のある可能性を示した⁴²⁾。さらにショウジョウバエでも、TSC1とTSC2は共同して働き、どちらの変異でも細胞が大型化し、サイクリンEとサイクリンAのレベルが増加し、このサイクリンEの増加でG1期が短縮し、サイクリンAの増加で細胞分裂が増加する可能性が示された。Tuberinの欠失するEkerラット由来の線維芽細胞は、ショウジョウバエの変異細胞同様に、細胞周期進行が早いと報告されている⁴³⁾が、hamartinの欠損するマウス由来の細胞では、細胞増殖はむしろ遅く、明らかに細胞周期の進行に異常があるとは確認されていない⁴⁴⁾。また、結節性硬化症の皮膚病変部由来の細胞は、S期が長く、アポトーシスが増加する⁴⁵⁾と報告され、細胞周期に異常を来していることが報告されているが、哺乳動物で見られる異常とショウジョウバエで

見られる細胞周期の異常は必ずしも一致していない。

2) Tuberin, hamartinは細胞のどこに局在するか?

Tuberinとhamartinの蛋白質複合体の機能が細胞周期の進行の制御そのものであれば、この蛋白質複合体は核内にあるはずである。しかしながら、細胞分画と免疫沈降法では、tuberinもhamartinも細胞質分画に存在し、特に細胞膜に接した小胞に存在していることが報告されている³⁸⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾。またtuberinもhamartinも細胞質、ミクロソーム、骨格蛋白質分画に存在し、その一部はカベオラに存在し⁴⁷⁾、イーストを用いたデータでTSC1-TSC2複合体は細胞内の蛋白質小胞輸送に関与している可能性が報告されている⁴⁸⁾。

ヒトまたはラットの組織では、tuberinとhamartinは、上皮、内分泌系、筋肉、神経系の細胞質に多く発現し²⁷⁾³⁵⁾、ラットの脳ではウエスタンレベルで成人になってもtuberinとhamartinは高いレベルで発現するが、その他の臓器では発育期の発現量が高い⁴⁹⁾。一方20週の胎児から8歳のヒトの組織では、免疫組織学的には、ほとんどの組織にhamartinとtuberinは、ほぼ同じ部位で発現し、年齢によってその発現量が変わらない⁵⁰⁾とする報告もある。また、tuberinとhamartinの局在は、全ての組織で共存せず、膵臓の島細胞、腎髄、筋繊維内では独立して存在し、TSC1蛋白質は、小脳顆粒細胞や膵臓組織では核内に存在することも示されている⁵¹⁾。

またtuberinはステロイド受容体ファミリーと結合し、tuberinのリン酸化に伴って核に移行することが報告されている⁵²⁾。Tuberinもhamartinも核移行シグナル、核輸出シグナルを持たない。従って、核に移行するとすれば、これらのシグナルを持つ蛋白質と結合して移行することが考えられる。

3) Tuberin, hamartinの消失で神経系細胞にどのような異常が生ずるか?

結節性硬化症の脳病変では、脳室上衣下の結節と大脳皮質結節が、重要である。遺伝学的にはこれらの病変部では、TSC1およびTSC2遺伝子のLOHがおこっているかどうか明らかではないが、tuberin, hamartinの量の低下または機能異常でおこることは間違いない。この結節部位の皮質は正常の大脳皮質構造が乱れ、形態的に大型な異形神経細胞やモンスター細胞と呼ばれる巨大(グリア)細胞が出現する⁵³⁾。これらの細胞はGFAP、ニューロン特異エノラーゼ、ミエリン塩基蛋白など複数の細胞マーカーを発現する異常細胞で、正し

く分化出来ていないことが示されてきた⁵⁴⁾。また、この結節の細胞には、ネスチンなど未分化な神経細胞のマーカーが出現し、大脳皮質形成に必要な神経細胞の分化に異常を来していることが示されている⁵⁵⁾。

試験管内で神経系細胞株の分化を誘導すると tuberin 蛋白質の量が増加し、tuberin のアンチセンス DNA で mRNA を抑制すると神経細胞の分化が抑制される⁵⁶⁾が、神経細胞分化と tuberin, hamartin の関係は十分明らかではない。我々は、TSC2 と結合する分子をイースト two-hybrid 法でスクリーニングし、神経細胞の分化や細胞死と関与する NADE (p75NTR associated cell death excutor) を重要参考分子として注目して解析を進めている。神経系細胞株 PC12 細胞では、p75NTR を介して、NADE-hamartin さらに tuberin が結合し、神経成長因子で刺激後、tuberin, hamartin が増加することを見だしている。tuberin-hamartin 複合体は神経細胞の分化に伴い、どのような分子とどのような形で機能的結合を行うかを明らかにしていくことが結節性硬化症の大脳皮質結節形成の分子機能を明らかにする上で、重要と考えている⁵⁷⁾。

5. 結節性硬化症のてんかんの特徴と皮質結節の機能的異常

結節性硬化症の QOL はてんかんと知的障害の重症度によって大きく左右される。結節性硬化症の 90% はてんかんと合併し、乳幼児期の難治性てんかんである点頭てんかん (infantile spasm) をおこす原因疾患として、もっとも重要な疾患の 1 つとなっている。結節性硬化症のてんかん原性焦点は、大脳皮質結節と考えられている⁵⁸⁾⁵⁹⁾。結節性硬化症のてんかんの特徴を明らかにするとともに、大脳皮質結節は、なぜてんかん原性となりやすいのかを明らかにしていくことも重要である。

1) 結節性硬化症のてんかんには Vigabatrin が有効である

Vigabatrin は比較的新しい抗てんかん剤で、抑制系トランスミッターの GABA (gamma-aminobutyric acid) に化学構造上類似し、GABA を分解する酵素 GABA アミノトランスフェラーゼを抑制し、脳内の GABA 濃度を上昇させて、てんかん性放電またはそのひろがりやを抑制すると考えられている⁶⁰⁾。

Aicardi ら⁶¹⁾は、ヨーロッパの点頭てんかんへの Vigabatrin の有効性試験で、点頭てんかん 192 例中 131

例 (68.2%) が著効を示し、このうち結節性硬化症の点頭てんかんでは 28 例中 27 例 (96%) の有効率を示し、Vigabatrin は結節性硬化症の点頭てんかんに有効であると報告した。また 1999 年 Hancock と Osborne⁶²⁾は、Vigabatrin を使用した点頭てんかんの文献をまとめ、結節性硬化症以外の原因 313 例の有効例は 169 例 (54%) であるのに対し、結節性硬化症 77 例中 73 例 (95%) が有効であると報告し、しかも、ACTH やその他の抗けいれん剤に比較し、治療への反応が 1 週間以内で見られるとしている。また、結節性硬化症の部分発作にも有効とされている⁶³⁾。

しかし、残念ながら、Vigabatrin の服用で、およそ 40%~50% の頻度で、視野狭窄がおこることが明らかになり、この視野狭窄は薬剤中止後も改善せず、進行する場合があります⁶⁴⁾。現在、日本での使用は許可されていない。

なぜ、Vigabatrin が結節性硬化症の点頭てんかんや部分てんかんに高い有効率を示すのか明らかではない。部分発作での有効性の検討で、結節性硬化症の症状のない皮質形成不全による部分発作にも有効であること⁶⁵⁾から、皮質形成不全によるてんかん原性焦点に Vigabatrin が有効である可能性がある。皮質形成不全 (cortical dysplasia) は、大脳皮質構造の異常を示し、多くの原因が関係している。これらの中で、慢性の難治性けいれんと関係する限局性皮質形成不全 (Focal cortical dysplasia, FCD) は Taylor's balloon cell type (FCDbc) と呼ばれ、MRI-Flair 画像で、皮質下白質に漏斗状の高信号を示し、病理学的に皮質層構造の乱れと結節性硬化症の巨大(グリア)細胞に類似したバルーン細胞が出現することから、結節性硬化症との類似性が指摘されている⁶⁶⁾。最近、この Taylor's balloon cell type の皮質形成不全では、TSC1 遺伝子の変異がその形成と関係していることが示された⁶⁷⁾。部分てんかんの原因となる ganglioglioma は TSC2 の変異が多いとされ、TSC1 変異が Taylor's balloon cell type の形成に特異的に関与すると言う所見は興味を持たれる。これらの知見から、Vigabatrin が有効とされる部分てんかんのてんかん原性焦点は病理学的にも同じである可能性がある。

2) 大脳皮質結節のてんかん性焦点を形成する分子病態

結節性硬化症以外の限局性皮質形成不全 (FCD) では、「興奮性シナプス活動が増強することがてんかん原性に関係する」とする仮説がある。この仮説のもとに、

興奮性アミノ酸受容体であるNMDA受容体サブユニット蛋白質発現量を調べ、結節性硬化症以外の限局性皮質形成不全の異形神経細胞で増加していることが報告されている⁶⁶⁾⁶⁷⁾。Crinoら⁶⁸⁾⁶⁹⁾は、結節性硬化症の皮質結節も同じ理由によって、興奮性の亢進とてんかん原性焦点が形成されると考え、単一細胞切り出し法(microdissection法)を用いて、1つの異形神経細胞(dysplastic neurons)や巨大(グリア)細胞(giant cells)の興奮性アミノ酸受容体および抑制性GABA受容体mRNAの発現を検討した。この結果、異形神経細胞ではグルタミン酸受容体サブユニット(GluR 3, 4, 6)とNMDA受容体サブユニット(NR2B, 2C)が、巨大細胞ではNMDA受容体サブユニット(NR2D)のmRNAが増加し、GABA受容体サブユニット(GABAAR α 1, α 2)mRNAは低下していることを見いだした。このことは、皮質結節を構成する異形神経細胞、巨大(グリア)細胞は抑制系シナプス受容体の減少と興奮性シナプス受容体の増加によって、興奮性が高まった状態にあることでてんかん原性を獲得する可能性を示している。しかも、異形神経細胞、巨大(グリア)細胞の興奮性アミノ酸受容体の発現パターンは異なり、この2種類の細胞はてんかん原性に異なった役割をしている可能性を指摘している。

6. おわりに

結節性硬化症は、比較的頻度の高い遺伝病で、小児神経科外来でも比較的多く見られる疾患である。難治性てんかんの頻度も高く、知的障害の合併も多く、特定疾患の1つに上げられている。年長児(者)では、腎臓の血管平滑筋脂肪腫や肺のリンパ血管平滑筋腫症による障害が重症な例も見いだされる。遺伝子機能の解明による過誤腫性病変の発生予防と大脳皮質結節のてんかん原性焦点形成の予防と確実なてんかん治療の開発が期待されている。

この総説に引用した我々の研究データの一部は、厚生科学研究費補助金(脳科学研究事業)神経回路網形成障害の分子機構に関する研究【H12-脳-018, H12-こころ-009】、厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)神経皮膚症候群の新しい治療法の開発と治療指針作成に関する研究(主任研究者 大塚藤男)の補助を受けた。

文 献

- 1) Ohno K, Yakura N, Zhang H, et al. Molecular epidemiology of tuberous sclerosis. In: Niimura M, Otsuka F, Hino O (Eds). *Phacomatosis in Japan—Epidemiology, Clinical Picture and Molecular Biology*. JAPAN SCIENTIFIC SOCIETIES PRESS / KARGER, Tokyo, 1999; 53—59.
- 2) Gomez MR, Samposn JR, Holets-Whittemore V. *Tuberous sclerosis complex*, 3rd edn. Oxford University Press, New York, 1999.
- 3) European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 1993; 75: 1305—1315.
- 4) Van Slechtenhorst M, deHoogt R, Herman C, et al. Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 1997; 277: 805—808.
- 5) European Polycystic Kidney Disease Consortium. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies with a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 1994; 77: 881—894.
- 6) Jones AC, Daniells CE, Snell RG, et al. Molecular genetics and phenotypic analysis reveals differences between TSC1 and TSC2 associated with familial and sporadic tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet* 1997; 12: 2155—2161.
- 7) Zhang H, Nanba E, Yamamoto T, et al. Mutational analysis of TSC1 and TSC2 genes in Japanese patients with tuberous sclerosis complex. *J Hum Genet* 1999; 45: 391—396.
- 8) Jones AC, Shyamsundar MM, Thomas MW, et al. Comprehensive mutation analysis of TSC1 and TSC2 and phenotypic correlation in 150 families with tuberous sclerosis. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1305—1315.
- 9) Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN, et al. Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicate increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 64—80.
- 10) Cheadle JP, reeve MP, Sampson JR, et al. Molecular genetic advances in tuberous sclerosis. *Hum Genet* 2000; 107: 97—114.
- 11) Van Slechtenhorst M, Verhoef S, Tempelaars A, et al. Mutationla spectrum of the TSC1 gene in a cohort of 225 tuberous sclerosis complex patients: no evidence for genotype-phenotype correlation. *J Med Genet* 1999; 36: 285—289.
- 12) Yamamoto T, Pipo JR, Feng JH, et al. Novel TSC1

- and TSC2 mutations in Japanese patients with tuberous sclerosis complex. *Brain Dev* 2002 ; 24 : 227—230.
- 13) Zhang H, Yamamoto T, Nanba E, et al. Novel TSC 2 mutation in a patient with pulmonary tuberous sclerosis : lack of loss of heterozygosity in a lung cyst. *Am J Med Genet* 1999 ; 82 : 368—370.
 - 14) Carsillo T, Astrindis A, Henske EP. Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are the cause of sporadic pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 6085—6090.
 - 15) Sato T, Seyama K, Fujii H, et al. Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in Japanese patients with pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *J Hum Genet* 2002 ; 47 : 20—28.
 - 16) Verhoef S, Vrtel R, Essen TV, et al. Somatic mosaicism and clinical variation in tuberous sclerosis complex. *Lancet* 1995 ; 345 : 202.
 - 17) Verhoef S, Bakker L, Tempelaars AMP, et al. High rate of mosaicism in tuberous sclerosis complex. *Am J Hum Genet* 1999 ; 64 : 1632—1637.
 - 18) Yates JRW, Bakel I, Sepp T, et al. Female germline mosaicism in tuberous sclerosis confirmed by molecular genetic analysis. *Hum Mol Genet* 1997 ; 6 : 2265—2269.
 - 19) Rose VM, Au KS, Pollom G, et al. Germ-line mosaicism in tuberous sclerosis : how common. *Am J Hum Genet* 1999 ; 64 : 986—992.
 - 20) Kwiatowska J, Wigowska-Sowinska J, Napierala D, et al. Mosaicism in tuberous sclerosis as a potential cause of the failure of molecular diagnosis. *New Eng J Med* 1999 ; 340 : 703—707.
 - 21) Knudson AG. Mutation and cancer : statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971 ; 68 : 820—823.
 - 22) Green AJ, Smith M, Yates JR. Loss of heterozygosity on chromosome 16p13.3 in hamartoma from tuberous sclerosis. *Nat Genet* 1994 ; 6 : 193—196.
 - 23) Carbonara C, Longa L, Grosso E, et al. 9q34 loss of heterozygosity in a tuberous sclerosis astrocytoma suggests a growth suppressor-like activity. *Hum Mol Genet* 1994 ; 3 : 1829—1832.
 - 24) Henske EP, Scheithauser BW, Short MP, et al. Allelic loss is frequent in tuberous sclerosis kidney lesions but rare brain lesions. *Am J Hum Genet* 1996 ; 59 : 400—406.
 - 25) Au KS, Hebert AA, Roach ES, Northrup H. Complete inactivation of the TSC2 gene leads to formation of hamartoma. *Am J Hum Genet* 1999 ; 35 : 1790—1795.
 - 26) Niida Y, Stemmer-Rachamimov AO, Logrip M, et al. Survey of somatic mutation in tuberous sclerosis complex (TSC) hamartomas suggests different genetic mechanism for pathogenesis of TSC lesions. *Am J Hum Genet* 2001 ; 69 : 493—503.
 - 27) Mizuguchi M, Kato M, Yamanouchi H, et al. Tuberin immunohistochemistry in brain, kidney and heart with or without tuberous sclerosis. *Acta Neuropathol* 1997 ; 94 : 525—531.
 - 28) Arai Y, Ackerley CA, Becker LE. Loss of TSC2 product tuberin in subependymal giant cell tumors. *Acta Neuropathol* 1999 ; 98 : 233—239.
 - 29) Mizuguchi M, Ikeda K, Takashima S. Simultaneous loss of tuberin and hamartin from the cerebrum, kidney and heart with tuberous sclerosis. *Acta Neuropathol* 2000 ; 99 : 503—510.
 - 30) Mizuguchi M, Takashima M. Neuropathology of tuberous sclerosis. *Brain Dev* 2001 ; 23 : 508—515.
 - 31) Kobayashi T, Hirayama Y, Kobayashi E, et al. A germline insertion in the tuberous sclerosis (TSC 2) gene give rise the Eker rat model of dominantly inherited cancer. *Nat Genet* 1995 ; 9 : 70—75.
 - 32) Kobayashi T, Mitani H, Takahashi R, et al. Transgenic rescue from embryonic lethality and renal carcinogenesis in the Eker rat model by introduction of a wild-type Tsc2 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 3990—3993.
 - 33) Lamb RF, Roy C, Diefenbach TJ, et al. The TSC1 tumor suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho. *Nat Cell Biol* 2000 ; 2 : 281—287.
 - 34) Van Slegtenhorst M, Neillist M, Nagelkeeken B, et al. Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Mol Genet* 1998 ; 7 : 1053—1057.
 - 35) Plank TJ, Yeung RS, Henske EP. Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interact with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicle. *Cancer Res* 1998 ; 58 : 4766—4770.
 - 36) Hodges AK, Li S, Maynard J, et al. Pathological mutations in TSC1 and TSC2 disrupt the interaction between hamartin and tuberin. *Hum Mol Genet* 2001 ; 10 : 2899—2905.
 - 37) Onodera K, Ishibashi Y, Sasaki M, Kimura G. Abnormal division and gene expression in cultured cells from a patient with tuberous sclerosis. *J Dermatol* 1989 ; 16 : 263—269.
 - 38) Johnson WG, Yoshidome H, Stemroos ES, et al.

- Origin of the neuron-like cells in tuberous sclerosis tissues. *Ann N.Y. Acad Sci* 1991 ; 615 : 211—219.
- 39) Wataya-Kaneda M, Hashimoto K, Yoshikawa K, et al. The loss of 40-kDa chromosomal protein in tuberous sclerosis complex. 1995 ; 217 : 559—607.
 - 40) Toyoshima M, Ohno K, Katsumoto T, et al. Cellular senescence of angiofibroma stroma cells from patients with tuberous sclerosis. *Brain Dev* 1999 ; 21 : 184—191.
 - 41) Ito N, Rubin G. *gigas*, a *Drosophila* homolog of tuberous sclerosis gene product-2, regulate the cell cycle. *Cell* 1999 ; 96 : 529—539.
 - 42) Tapon N, Ito N, Dickson BJ, et al. The *Drosophila* tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell* 2001 ; 105 : 345—355.
 - 43) Soucek T, Pusch O, Wienecke R, et al. Role of the tuberous sclerosis gene-2 product in cell cycle control. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 29031—29308.
 - 44) Kwiatkowski DJ, Zhang H, Bandura JL, et al. A mouse model of TSC1 reveals sex dependent lethality from liver hemangionas, and up-regulation of p70S6 kinase activity in Tsc1 null cell. *Hum Mol Genet* 2002 ; 11 : 525—534.
 - 45) Wataya-Kaneda, Kaneda Y, Hino O, et al. Cells derived from tuberous sclerosis show a prolonged S phase of the cell cycle and increased apoptosis. *Arch Dermatol Res* 2001 ; 293 : 460—469.
 - 46) Nellist M, Van Slegtenhorst MA, Goedbloes M, et al. Characterization of the cytosolic tuberin-hamartin complex : tuberin is a cytosolic chaperone for hamartin. 1999 ; 274 : 35647—35652.
 - 47) Yamamoto Y, Jones KA, Mak BC, et al. Multicompartment distribution of the tuberous sclerosis gene products, hamartin and tuberin. *Arch Biochem Biophys*. 2002 ; 404 : 210—217.
 - 48) Matsumoto S, Bandyopadhyay A, Kwiatkowski DJ, et al. Role of the Tsc1-Tsc2 complex in signaling and transport across the cell membrane in the fission yeast *schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 2002 ; 161 : 1053—1063.
 - 49) Murthy V, Stemmer-Rachamimov AO, Haddad LA, et al. Developmental expression of the tuberous sclerosis proteins tuberin and hamartin. *Acta Neuropathol* 2001 ; 101 : 202—210.
 - 50) Johnson MW, Kerfoot C, Bushnell T, et al. Hamartin and tuberin expression in human tissues. *Mod Pathol* 2001 ; 14 : 202—210.
 - 51) Fukuda T, Kobayashi T, Momose S, et al. Distribution of Tsc1 protein detected by immunohistochemistry in various normal rat tissues and the renal carcinomas of Eker rat : detection of limited colocalization with Tsc1 and Tsc2 gene products in vivo. *Lab Invest* 2000 ; 80 : 1347—1359.
 - 52) Lou D, Griffith N, Noonan DJ. The tuberous sclerosis 2 gene product can localize to nuclei in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol Res Commun* 2001 ; 4 : 374—380.
 - 53) Short MP, Richardson EP, Haines J, Kwiatkowski DJ. Clinical, neuropathological, and genetic aspects of the tuberous sclerosis. *Brain Pathol* 1995 ; 5 : 173—179.
 - 54) Nishimura M, Takashima S, Takeshita K, et al. Immunohistochemical study on a fetal brain of tuberous sclerosis. *Pediatr Neurol* 1985 ; 1 : 245—248.
 - 55) Crino PB, Trojanowski JQ, Dichter MA, et al. Embryonic neuronal markers in tuberous sclerosis : single cell molecular pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 14152—14157.
 - 56) Soucek T, Hodel G, Bernaschek G, Hengstschalager M. A role of the tuberous sclerosis gene-2 product during neuronal differentiation. *Oncogene* 1998 ; 16 : 2197—2204.
 - 57) 大野耕策. 結節性硬化症の原因蛋白質ハマルチンと結合する蛋白質群の同定と解析. 厚生科学研究研究費補助金・特定疾患対策研究事業「神経皮膚症候群の新しい治療法の開発と治療指針作成に関する研究報告書」2002 ; pp75—77.
 - 58) Tamaki K, Okuno T, Ito M, et al. Magnetic resonance imaging in relation to EEG foci in tuberous sclerosis. *Brain Dev* 1990 ; 12 : 316—320.
 - 59) Chungai DC, Chungai HT, Muzik O, et al. Imaging epileptogenic tubers in children with tuberous sclerosis complex using a-¹¹¹Ci methyl-L-tryptophan positron emission tomography. *Ann Neurol* 1998 ; 44 : 858—866.
 - 60) Curatolo P, Verdecchia M, Bombardieri R. Vigabatrin for tuberous sclerosis complex. *Brain Dev* 2001 ; 23 : 649—653.
 - 61) Aicardi J, Sabril IS Investigator and Peer Review Groups, et al. Vigabatrin as initial therapy for infantile spasms : a European retrospective survey. *Epilepsia* 1996 ; 37 : 638—642.
 - 62) Hanacock E, Osborne JP. Vigabatrin in the treatment of infantile spasm in tuberous sclerosis : literature review. *J Child Neurol* 1999 ; 14 : 71—74.
 - 63) Curatolo P. Vigabatrin for refractory partial seizures in children with tuberous sclerosis. *Neuropediatrics* 1994 ; 25 : 55—56.
 - 64) Urbach H, Scheffer B, Heinrichsmeier, et al. Focal

- cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type : a clinicopathological entity with characteristic neuroimaging and histopathological features and favorable surgical outcome. *Epilepsia* 2002 ; 43 : 33—40.
- 65) Becker AJ, Urbach H, Scheffler B, et al. Focal cortical dysplasia of Taylor's balloon cell type : Mutational analysis of the TSC1 gene indicates a pathogenic relationship to tuberous sclerosis. *Ann Neurol* 2002 ; 52 : 29—37.
- 66) Ying Z, Babb TL, Comair YG, et al. Increased expression of NR2 proteins and differential expression of NR1 splice variants in dysplastic neurons of human epileptic cortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998 ; 57 : 47—62.
- 67) Mikuni N, Babb TL, Ying Z, et al. NMDA-receptors 1 and 2A/B coassembly increased in human epileptic focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 1999 ; 40 : 1683—1687.
- 68) Crino BB, Henske EP. New developments in the neurobiology of tuberous sclerosiscomplex. *Neurology* 1999 ; 53 : 1384—1390.
- 69) White R, Hua Y, Scheithauser B, et al. Selective alterations in glutamate and GABA receptor subunit mRNA expression in dysplastic neurons and giant cells of cortical tubers. *Ann Neurol* 2001 ; 49 : 67—78.
-

脳と発達〔第34巻・第3号〕別刷

2002年5月1日発行

発行所 株式会社 診断と治療社

特集 第43回日本小児神経学会総会

シンポジウムⅠ: Rett症候群 臨床徴候と遺伝子異常の相関

画像, 臨床生化学からみた病態

松石豊次郎 山下裕史朗

要旨 Rett 症候群 (RTT) は現在までの臨床的研究, 電気生理, 神経生化学, 神経病理, CT, MRI や PET, SPECT などの画像研究からノルアドレナリン, セロトニン, ドーパミン系, コリン系, グルタミン酸や NMDA, GABA レセプター, 神経ペプチド, 神経栄養因子, その他多くの神経伝達物質などが病態に関与していると考えられている。

これまでに解明された MRI, PET, SPECT などを用いた神経放射線学的な研究, および脳脊髄液や剖検脳の免疫組織学的研究, 神経生化学的研究, β -エンドルフィンやサブスタンス P などの神経ペプチド, および神経修飾因子である β -フェニルエチラミンの役割を我々のデータを含め紹介した。最近開発された methyl CpG binding protein 2 遺伝子のノックアウトマウスは RTT のモデル動物で本症の解明に重要な糸口を与えると考えられる。

見出し語 Rett 症候群, 神経生化学, 神経放射線

はじめに

Rett 症候群 (RTT) は乳児期の筋緊張低下, 四つ這いの異常, 自閉傾向, 重度の精神遅滞, 特有な手の常同行動, 頭囲拡大の停滞などが年齢依存性に出現し, 過呼吸・無呼吸の特有な呼吸異常, 便秘, 冷たく小さい足などの自律神経系の異常などをともなう発達障害である¹⁾。1999年, Amirらはメチル-CpG結合蛋白2をコードする遺伝子 (MeCP2) が RTT の原因遺伝子であることを発見した²⁾。この遺伝子には, メチル結合ドメイン (MBD) および転写抑制遺伝子 (TRD) の領域があることが知られており, 胎生期から生後に働く多くの遺伝子にいつ役目を終えるかを指令する遺伝子 (silencing gene) であり, 正常に働かない MeCP2 の異常によって, 他の遺伝子が不適当な時期に発現するため正常な発達を阻害することが予想される。

年齢依存性の症状, 睡眠, 運動系の発達特にロコモーション, 神経生理, 神経病理, CT, MRI, PET, SPECT, 脳脊髄液を用いた研究からノルアドレナリン, セロトニン, ドーパミン系, アセチルコリン系, グルタミン系, NMDA や GABA レセプター, 神経ペプチド, および神経成長因子その他多くの神経伝達物質などが病態に関与していると考えられている³⁾。

我々の報告を含めて, 神経放射的, 神経生化学的な立場から RTT の病態を解説した。

I 現在までに報告された神経伝達物質, 神経修飾因子, 神経栄養因子

生体アミンではノルアドレナリン系, セロトニン系およびドーパミン系の関与, Mynert 核およびアセチルコリン系の障害⁴⁾, 神経ペプチドでは脳脊髄液 (CSF) の β -エンドルフィンの上昇⁵⁾, サブスタンス P の低下⁶⁾, 神経栄養因子では神経成長因子 (nerve growth factor) の著明な低下⁶⁾, 興奮性アミノ酸のグルタミン酸の上昇⁷⁾, グルタミン酸受容体 NMDA の増加⁸⁾ その他 CSF の乳酸の増加が報告されている (表1)。以下, 神経放射線, 神経生化学の立場より

久留米大学医学部小児科

連絡先 〒 830-0011 久留米市旭町 67

久留米大学医学部小児科 (松石豊次郎)

(受付日: 2001. 10. 9)

表1 Rett 症候群で報告された神経伝達物質, 神経修飾因子, 神経栄養因子, その他の関与

● 生体アミン……ノルアドレナリン系, ドーパミン, セロトニン
● コリン系……アセチルコリン, Mynert 核
● 神経ペプチド…β-エンドルフィン, メチオニン-エンケファリン, サブスタンス P
● 神経栄養因子…Nerve growth factor, brain derived neuronal factor など
● アミノ酸……グルタミン酸, グルタミン酸受容体, GABA
● ビルビン酸, 乳酸

表2 神経放射線からみた Rett 症候群の病態 (I)

・ CT スキャン, MRI ⁽¹⁰⁾⁽²¹⁾ 脳幹, 中脳の萎縮, 大脳皮質 (前頭葉-側頭葉) 萎縮 Rett の volumetric MRI analysis, 灰白質, 白質量減少 prefrontal, posterior-frontal, anterior temporal, 尾状核の灰白質↓
・ PET, SPECT ⁽¹¹⁾ 6人の Rett 症候群女児 (3歳~18歳) トレーサー C ¹⁴ O ₂ , ¹⁵ O ₂ 吸入 (脳血流, CMRO ₂) 前頭葉の hypofrontalization 年長児に著明

解説する。

1. 神経放射線からみた Rett 症候群

Nihei らは CT スキャンおよび MRI で脳幹, 中脳の萎縮および前頭葉-側頭葉の脳萎縮を報告し⁹⁾, Subramaniam らは MRI で脳の定量的測定を行い, 各部位の灰白質, 白質の容量の減少および prefrontal, posterior-frontal, anterior temporal および尾状核の灰白質の容量の減少を報告した¹⁰⁾。

PET を使った研究では Yoshikawa らは 3歳~18歳の 6人の典型例の女児でトレーサーとして C¹⁴O₂, ¹⁵O₂ 吸入で脳血流および CMRO₂ をチェックした。コントロールに比べ前頭葉の hypofrontalization が確認された¹¹⁾ (表2)。

また PET によるドーパミン系の研究では, 被殻のドーパミン D₁ レセプターは正常だが D₂ レセプターが減少し, 11人の RTT での ¹²⁵I-iodolisuride の検討では D₂ レセプターの binding potential の増加が見つかりドーパミン減少による upregulation が考えられている¹²⁾。

一方, Naidu らは 12人の成人 Rett 症候群 (年齢 15歳~39歳) で D₂ レセプターは正常下限, ドーパミントランスポーターも被殻, 淡蒼球で正常下限,

表3 Rett 症候群における脳脊髄液中の生体アミン代謝産物の変化⁽¹⁴⁾

6人の典型例の Rett 女児 (2歳~15歳), 脳脊髄液; GC/MS コントロール 37人 (2歳~4歳, 5歳~10歳, 11歳~16歳) ・ MHPG (3-methoxy, 4-hydroxyphenylethylene glycol) 低下 ・ HVA (homovanillic acid) 低下 ・ 5-HIAA (5-hydroxy indoleacetic acid) 有意差なし
VS ⁽¹³⁾ 5人の典型例 Rett 女児, コントロール 17人 MHPG, HVA, 5-HIAA, GABA, アミノ酸正常

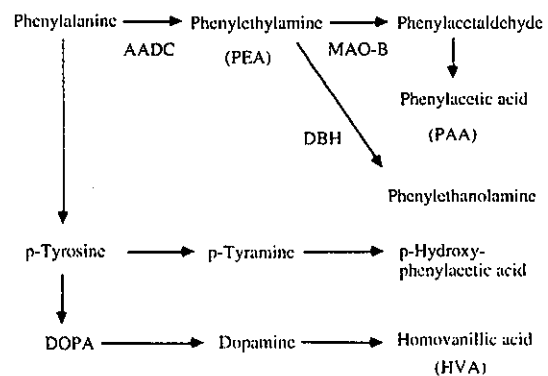


図1 Phenylethylamine の代謝経路

pre, post synaptic D₂ レセプターは減少したと報告している。彼女は, 中脳黒質のドーパミン顆粒の減少にかかわらず, 代償機構は認めないと相反する報告をしている¹³⁾。今後より多数例でレセプターのリガンドの種類などを変えて検討することが必要である。

2. 脳脊髄, 脳組織を用いた神経生化学的研究

Zoghbi らは 1985年に 6人の 2歳~15歳の典型例の RTT 女児の homovanillic acid (HVA), 5-hydroxy indoleacetic acid (5-HIAA), 3-methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol (MHPG) を測定し, 37人のコントロールと比べた。RTT の CSF で HVA と MHPG の低下が認められ, 5-HIAA は有意の低下がないことを報告した¹⁴⁾。しかし 1988年には Perry らは 5人の典型例の RTT 女児で HVA, MHPG, 5-HIAA, GABA, アミノ酸は全て正常なことを報告した¹⁵⁾。

RTT と一部似た病態を示す Parkinson 病でも黒質の変性があっても 70%以上の障害がないと CSF に反映しないことが知られており, RTT では CSF の HVA, MHPG の変化は認めないことが確認された