

図3 脳組織学的所見（症例1）. 大脳皮質には cobblestone type の細胞移動異常, 小脳には, 多数の島状細胞集塊をみる. L1cam, DCX の発現を認める.

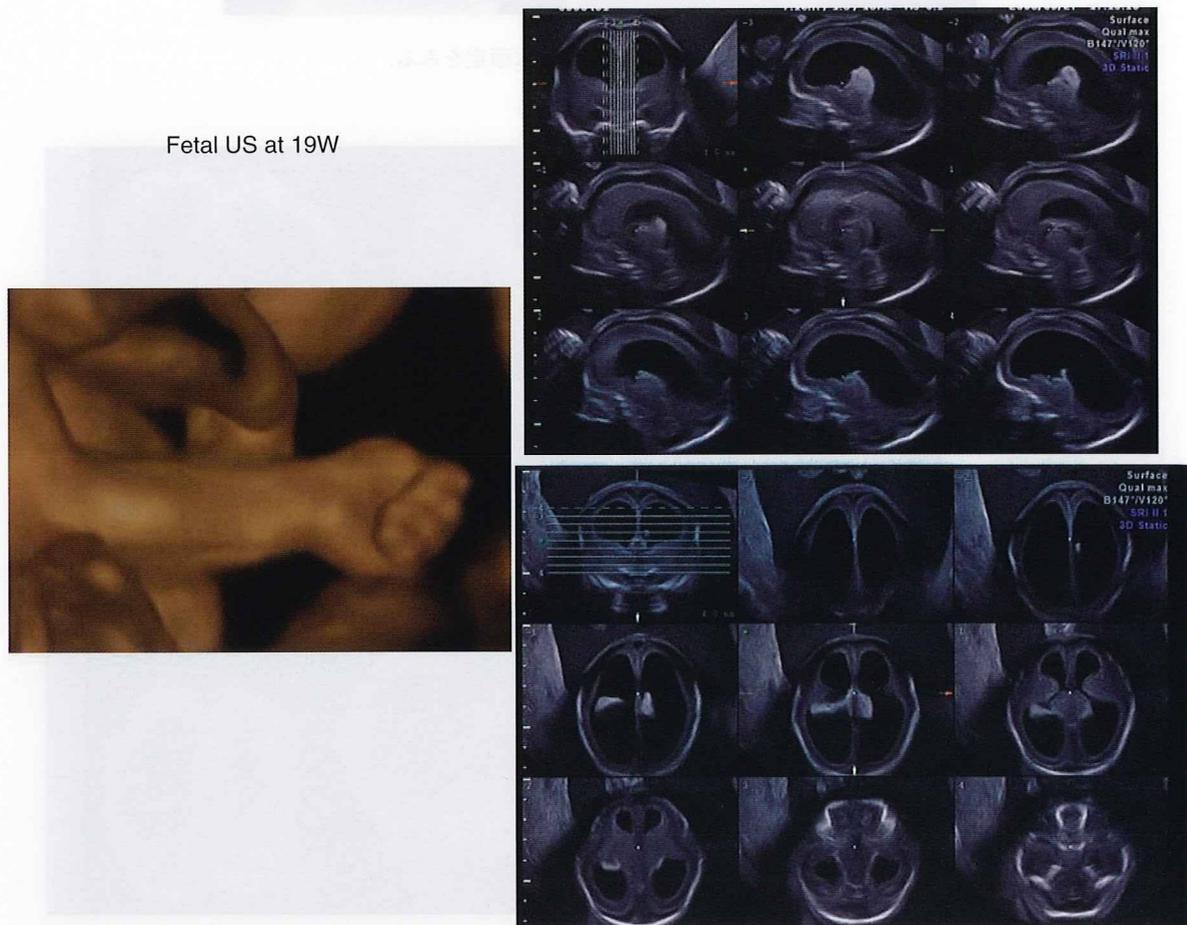


図4 胎児エコー（症例2）. 水頭症, 拇指内転をみる.

Fetal MRI at GA 19W

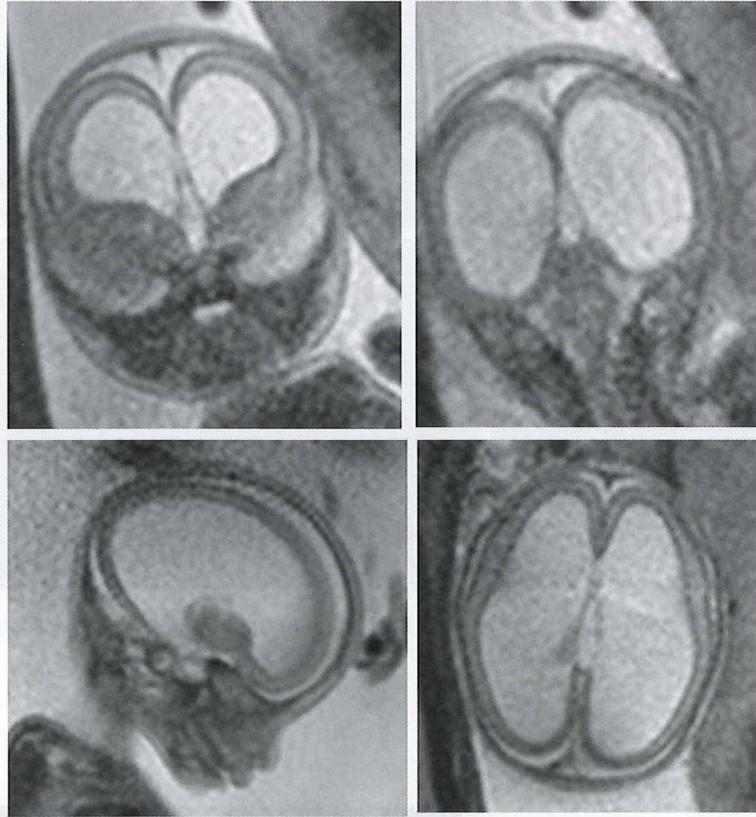


図5 胎児 MRI (症例 2). 水頭症をみる.

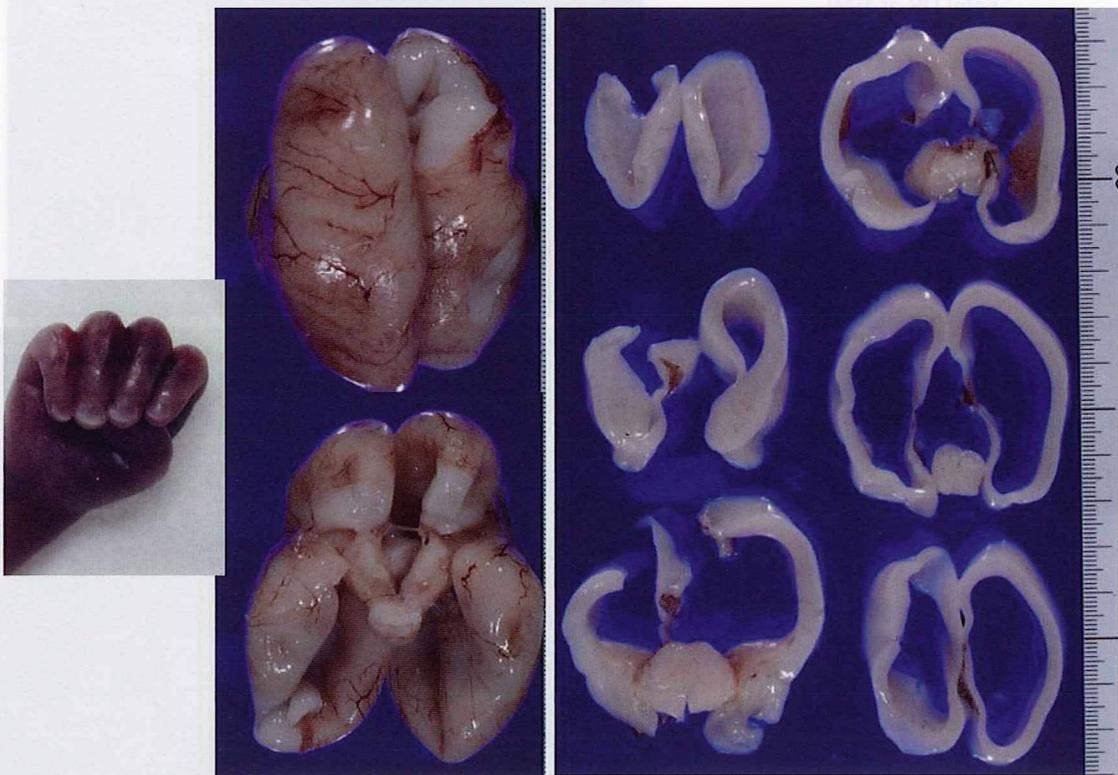


図6 脳ならびに手指の肉眼的所見 (症例 2). 大脳壁の非薄化を示す水頭症, 脳梁欠損, 視床融合, 拇指内転をみる.

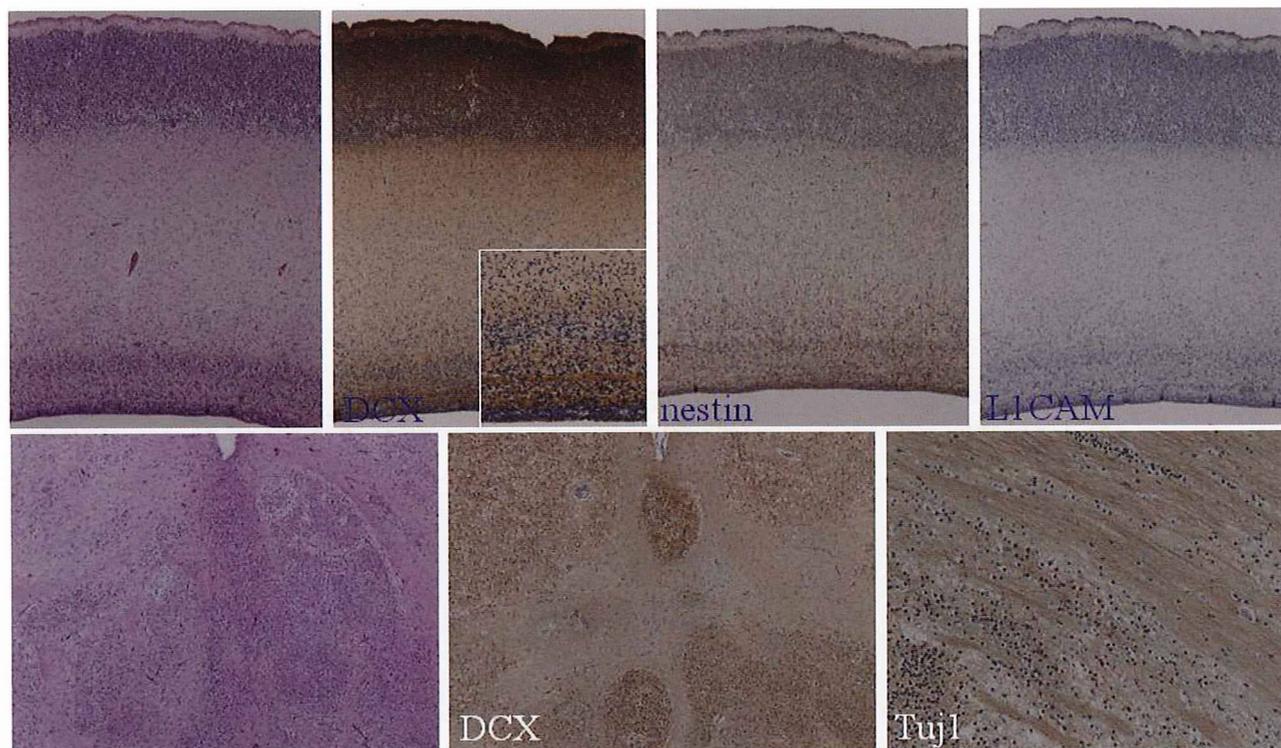


図7 脳組織学的所見（症例2）. 視床皮質路低形成，頭側視床融合，皮質板，中間層線維束，内包における L1cam 発現欠損をみる.

テロトピア，double cortex 類似の所見，小脳には，多数の島状の異常細胞集塊をみた. L1cam, DCX の発現は正常に認められた(図3). 以上より，滑脳症(type II)と診断した. 遺伝子検索では，*L1cam*, *fukutin*, *ARX*, *DCX* は正常であった.

症例2：在胎19週男児. 第1子. 胎児エコーで，水頭症，拇指内転を認め，X連鎖性水頭症が疑われた(図4, 5). 病理学的には，視床融合，脳梁欠損を伴った大脳壁の菲薄化を示す水頭症で(図6)，組織学的には視床皮質路低形成，頭側視床正中融合，皮質板，中間層線維束，内包における L1cam 発現欠損をみた(図7). 遺伝子検索では，*L1cam* に 818-820 (CCA) : threonine 欠失タイプの変異を認めた.

D. 考 察

胎児画像診断で『胎児水頭症』と診断された症例には，病理学的表現型として多様な脳発達異常が含まれていた. 一例は病理形態学的検索から既知の遺伝子異常が疑われ遺伝子診断に至った. 一方，脳形成異常の病理組織学的診断が明らかになっても，依然として病因が不明な例も残されている. 今後，臨床と病理などがタイアップし，脳発達異常の正確な病態把握，遺伝

子解析を含む脳形成異常の出生前診断精度の向上とともに発生病理の研究，遺伝相談へのフィードバックを図ることが求められる.

E. 結 論

臨床情報，画像診断で『胎児水頭症』と出生前診断された胎児の神経病理学的検索を行った. 画像診断上，類似の病態であっても，病理学的には異なった疾患であった. 今後，臨床と病理などがタイアップし遺伝子解析を含む脳形成異常の出生前診断精度の向上，発生病理の研究，遺伝相談へのフィードバックを図ることをめざしたい.

G. 研究発表

- 1) 伊東恭子，山崎麻美，夫律子，伏木信次：出生前診断された胎児脳発達異常症例の神経病理学的検討. *Neuropathology* 29: 159, 2009.
- 2) 伊東恭子，山崎麻美，夫律子，伏木信次：胎児脳発達異常の出生前診断と病理：遺伝相談へのフィードバックに向けて. *脳と発達* 41: S215, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当項目なし

難治性脳形成障害症の病態解析と治療法開発

研究分担者

宇都宮英綱

国際医療福祉大学大学院 教授

研究要旨 1.5T MRI を用いた拡散テンソル画像により、小児期脳梁および皮質脊髄路の発達について画像解剖学的な検討を行った。脳梁および皮質脊髄路の拡散異方性：FA (fractional anisotropy) 値は年齢に伴って上昇した。脳梁のFA値上昇は髄鞘形成が完了した3歳以降においても有意な上昇を認めた。また、皮質脊髄路は2歳まで有意に上昇し、3歳以降は有意な上昇が見られなかった。

FA値の上昇はシナプスの削減と同時に発達してくる神経回路網の強化に伴う軸索の構造的あるいは機能的変化が関連しているものと考えられる。したがって、小児期の皮質脊髄路は脳梁よりも神経回路網強化が早く完成するものと推察された。これらの結果は拡散テンソル画像が小児脳の神経可塑性の評価に有用であることを示すと考えられ、小児神経疾患の病態解析や機能予後評価への応用が期待される。

A. 研究目的

拡散テンソル画像を用いて小児期脳梁および皮質脊髄路の発達についてMR画像解剖学的な検討を行った。

B. 研究方法

【対象と方法】正常小児34例（1ヶ月～13歳；平均4.8歳）、女児18例、男児16例を対象とした。MRIはPhilips社製Achiva 1.5T用い、拡散テンソル収集はSingle shot EPI, 4 mm厚, FOV: 24 cm, Matrix; 128 × 128, b=700, 6軸で行った。MR tractographyの作成と画像解析は東大医学部附属病院放射線科で開発されたVolume-oneとdTV.IISRの組み合わせで行った。矢状断で脳梁全体にROIを設け脳梁の軌跡を描かせた。続いて脳梁を3等分し、それぞれの部分（①吻・膝部、②幹部、③膨大部）を目的ROIとして各々色分けした軌跡を描かせた（図1-A）。各部分軌跡の平均のFA (fractional anisotropy) 値を計測し、年齢に伴う変化を解析した。また、皮質脊髄路は内包後

脚の部位と運動野にROIを設定する2-ROI法で皮質脊髄路の軌跡を描き（図1-B）、その平均のFA値を計測し、年齢に伴う変化を解析した。

【臨床例の解析】脳梁に広範な障害を来した脳室周囲白質軟化の症例（症例1:3歳、女児）と運動野が障害された乳児皮質下出血症例（症例2:4ヶ月、男児）の症例の脳梁と皮質脊髄路のFA値をそれぞれ計測し、その臨床的意義について考察した。

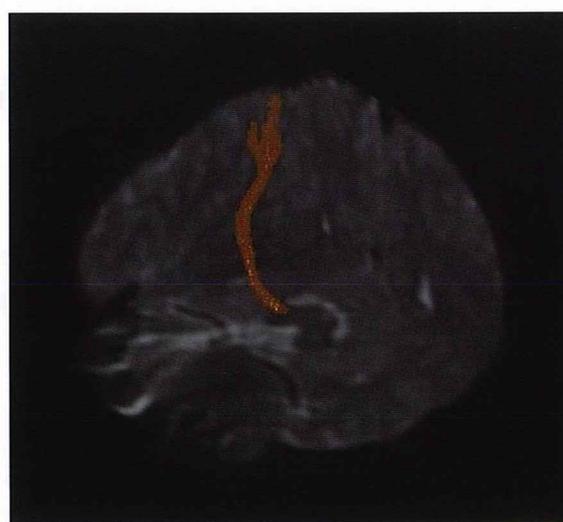
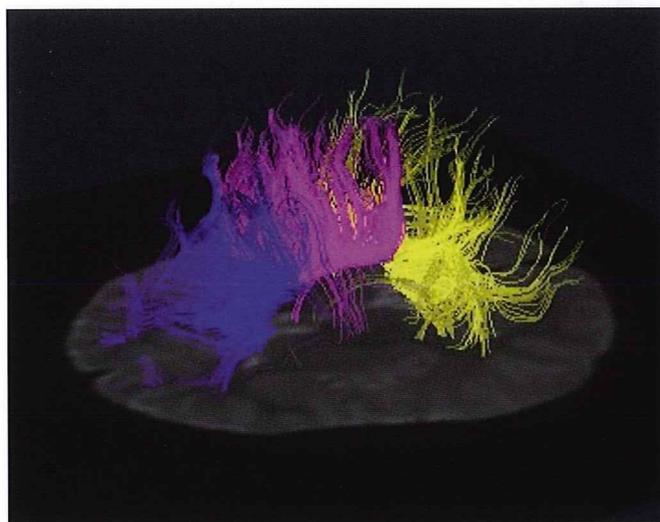
C. 研究結果

(1) 脳梁各部分のFA値は膨大部で最も高く、次に吻・膝部で高く、脳梁幹で最も低かった。また、FA値は各部分で年齢と共に上昇した。髄鞘形成の未熟な1歳未満の乳児を除いた27例でも年齢と共に上昇し、髄鞘形成がほぼ完了した3歳以降の21例においても有意な上昇が見られた（図2）（図3）。

(2) 皮質脊髄路のFA値は左右で有意差はなく、左右FAの平均値は2歳まで年齢とともに上昇したが3歳をすぎると有意な上昇は認められなかった（図4）。

(A) 脳梁, 皮質脊髓路

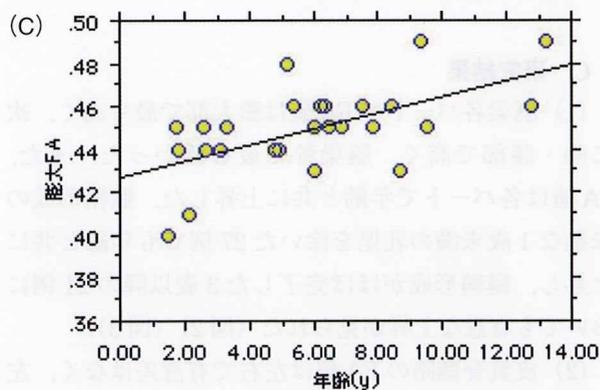
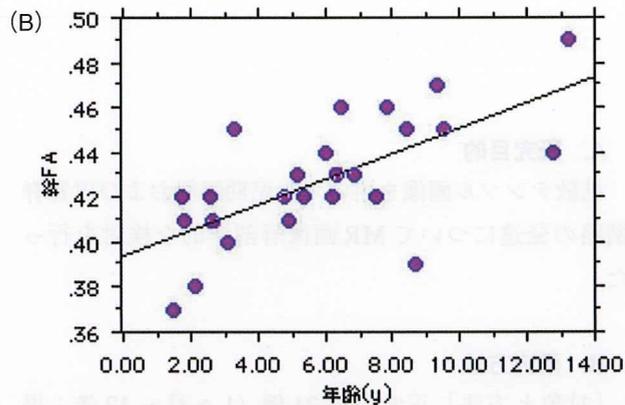
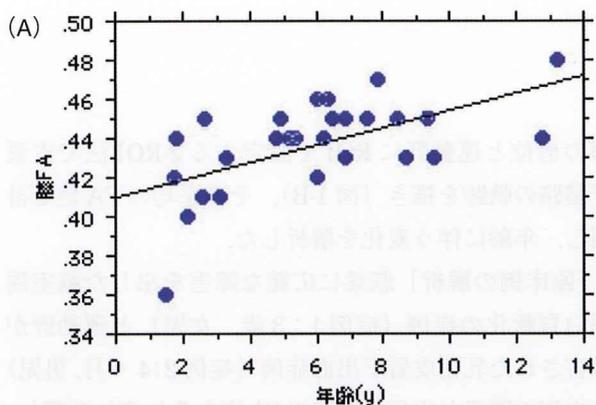
(B) 皮質脊髓路



吻・膝 (青), 幹 (桃), 膨大 (黄)

右側皮質脊髓路 (茶)

図1 脳梁, 皮質脊髓路の拡散テンソル画像: 1.5T MRI (Achiva 1.5T, Philips). 東京大学放射線医学教室で開発された, テンソル解析ソフト (dTV.IISR) と3次元画像表示ソフト (volume one) で描写した脳梁 (A) と右側皮質脊髓路 (B) の拡散テンソルトラクトグラフィー.



吻・膝 R=0.586 p=0.013	幹 R=0.667 p=0.001
膨大 R=0.595 p=0.011	N=27 Age>1y.

図2 脳梁 FA 値の年齢 (1歳以上) にともなう推移. A: 脳梁吻・膝, B: 脳梁幹, C: 脳梁膨大

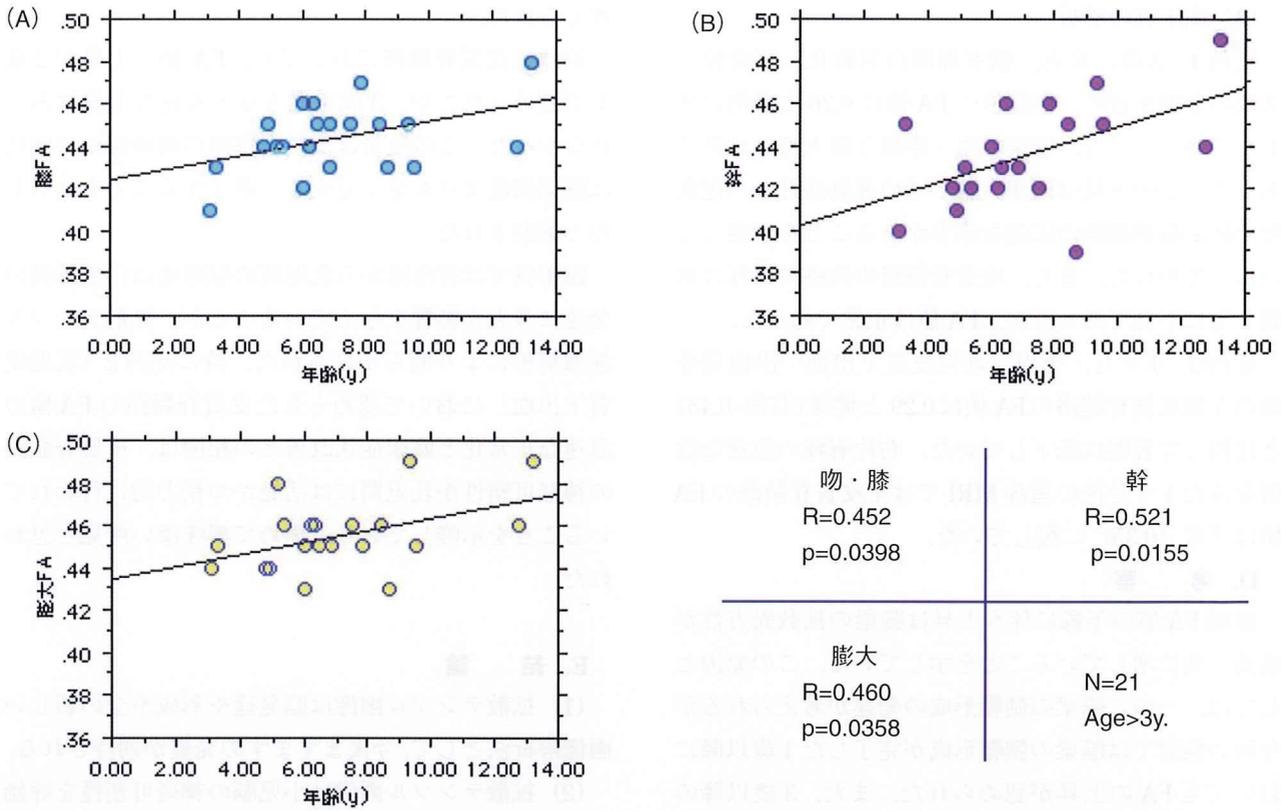


図3 脳梁 FA 値の年齢 (3 歳以上) にともなう推移. A: 脳梁吻・膝, B: 脳梁幹, C: 脳梁膨大

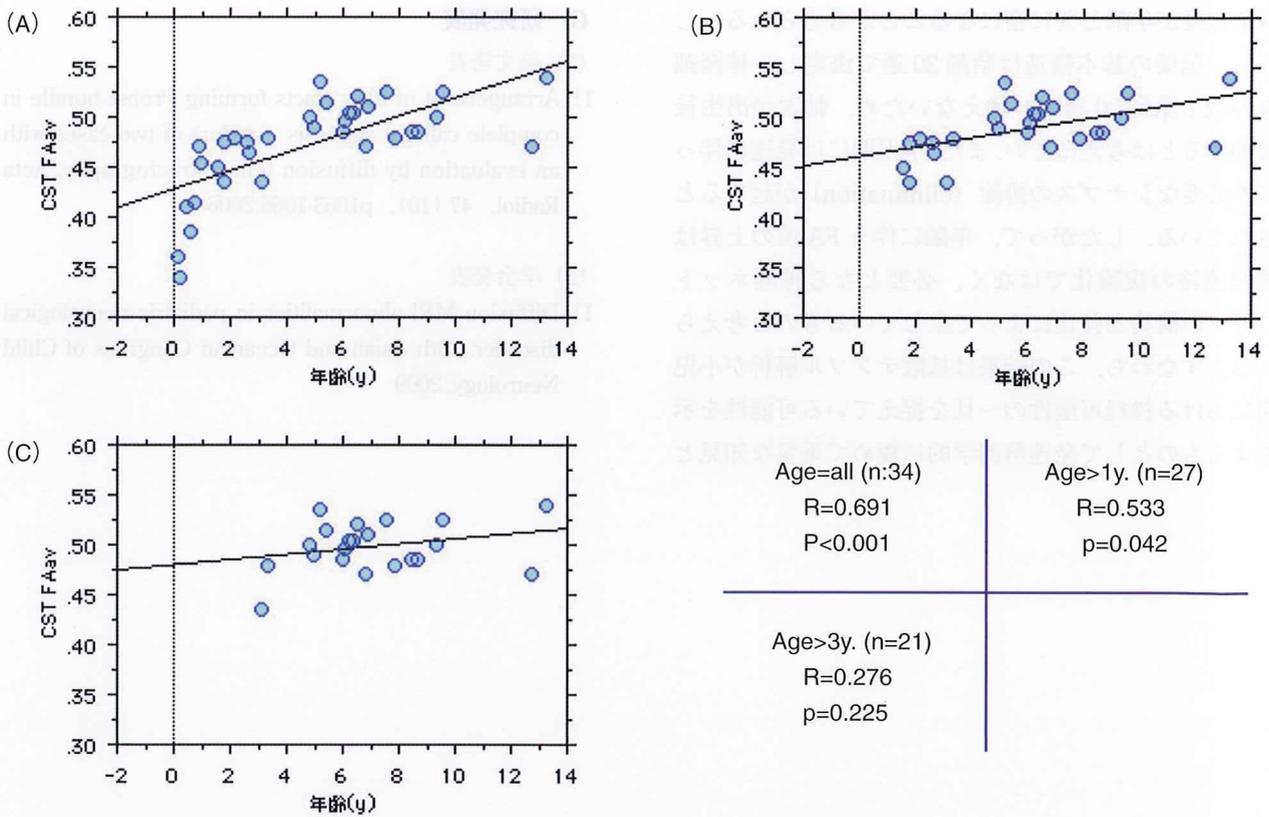


図4 皮質脊髄路 FA 値 (左右平均) の年齢にともなう推移. A: 全年齢 (34 例), B: 1 歳以上 (27 例), C: 3 歳以上 (21 例)

(3) 臨床例の解析

症例1: 3歳, 女児, 脳室周囲白質軟化: 脳梁幹の高度の萎縮を認め, 同部位のFA値は0.26と著明に低下していた. 一方, 脳梁の吻・膝部と膨大部は正常であった. この所見は両側大脳半球の運動前野から運動野を結ぶ脳梁線維の広範な障害があることを示唆していると思われた. また, 皮質脊髄路の軌跡の描写は両側ともに不良であったが, FA値は正常であった.

症例2: 4ヶ月, 男児, 乳児皮質下出血: 出血発症時の左側皮質脊髄路のFA値は0.29と健側(右側:0.43)と比較して著明に低下していた. 右片麻痺の急速な改善をみた1ヶ月後の追跡MRIでは左皮質脊髄路のFA値は正常(0.35)に復していた.

D. 考 察

脳梁FA値の年齢に伴う上昇は脳梁の拡散異方向性が成長と共に増していることを示している. この原因としては, 一つに脳梁の髄鞘形成の発達が考えられるが今回の検討では脳梁の髄鞘形成が完了した1歳以降においてもFAの上昇が認められた. また, 3歳以降の年齢でも脳梁のFA値は有意に上昇を続けた. したがって, FA値の上昇には髄鞘形成以外の因子が関連していると考えられる. この現象の一つの説明としては, 脳梁線維が年齢と共に密になることが考えられる. しかし, 脳梁の基本構造は胎齢20週で決定し, 神経細胞の数も胎齢20週より増えないため, 軸索が出生後増加するとは考えにくい. また, 小児期には発達に伴って不必要なシナプスの排除(elimination)が起こるとされている. したがって, 年齢に伴うFA値の上昇は神経連絡の複雑化ではなく, 必要となる神経ネットワークの構築と強化によって生じているものと考えられる. すなわち, この結果は拡散テンソル解析が小児期における神経可塑性の一旦を捉えている可能性を示唆するものとして発達解剖学的に極めて重要な知見と

考えられた.

同様に皮質脊髄路においても, FA値の上昇が2歳まで認められたが, 3歳を過ぎると有意な上昇はみられなかった. この結果は皮質脊髄路の神経線維の強化は脳梁線維よりも早く完成し, 終了することを示しものと推察された.

臨床例では新生児から乳児期の脳障害は白質線維の発達に多大な影響を与えていることが, 拡散テンソル画像解析により明らかにされた. 特に症例2(乳児皮質下出血)において認められた皮質脊髄路のFA値の急速な正常化と臨床症状改善との相関は, 皮質脊髄路の神経可塑性が乳児期には活発かつ精力的に行われていることを示唆しており, 極めて興味深い所見と思われた.

E. 結 論

(1) 拡散テンソル画像は脳発達や形成不全の新しい画像解析法として, 今後ますますの発展が期待される.

(2) 拡散テンソル画像は小児脳の神経可塑性を評価しうる可能性があり, 小児神経疾患の病態解析や機能予後評価への応用が期待される.

G. 研究発表

(1) 論文発表

- 1) Arrangement of fiber tracts forming Probst bundle in complete callosal agenesis: report of two cases with an evaluation by diffusion tensor tractography. *Acta Radiol.* 47 (10), p1063-1066, 2006

(2) 学会発表

- 1) Diffusion MRI abnormalities in pediatric neurological disorder. 10th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2009

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

MLPA 法などによる小脳形成異常症の解析

研究分担者

岡本伸彦

大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科科长

共同研究者

松田圭子, 秋丸憲子

大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科

研究要旨 小脳形成異常を呈するヒトの疾病には Dandy-Walker 症候群, Joubert 症候群等が知られている。Dandy-Walker 症候群では *ZIC1-ZIC4* の領域の欠失例が知られている。Dandy-Walker 症候群, Joubert 症候群など小脳構造異常を呈する先天性疾患患者において染色体の微細な欠失の有無や遺伝子解析の検討を行った。解析方法として、シーケンス解析, MLPA 法やマイクロアレイ法を用いた。今回の解析結果で *ZIC1-ZIC4* の欠失例は同定できなかったが、さらに症例を増やして実施予定である。MLPA 法は効果的な検索手段と思われる。

A. 研究目的

小脳形成異常を主要症状とするヒトの中脳神経奇形には Dandy-Walker 症候群, Joubert 症候群等が知られている。一部で病因も解明されている。本研究は、小脳形成異常を呈する先天性中脳神経奇形を持つ患者の病態解析が目的である。方法として MLPA 法やマイクロアレイによる解析を用いた。正確な診断により、病態を把握し、治療方法を検討し、予後を予測することができる。遺伝カウンセリングにも重要な情報を提供することができる。

B. 研究方法

インフォームド・コンセントを得て末梢血リンパ球から DNA を抽出し、マイクロアレイ解析, MLPA 解析, ABI 社のオートシーケンサーによるシーケンス解析を行った。一部の解析は共同研究機関などに依頼した。MLPA 法は MRC-Holland 社製造の Salsa® MLPA® kit (以下, MLPA® キット) を用いた。マイ

クロアレイ解析 (Agilent 社 44k アレイなど) は東京女子医科大学国際統合医科学で実施した。

MLPA キットは P-267 を用いた。このキットには *ZIC1-ZIC4* の領域に加えて, *VLDLR* (very low-density lipoprotein receptor) の領域も含まれる。マニュアルの記載に従って MLPA の反応を行い, ABI3100 に gene mapper を搭載して解析を行った。(倫理面への配慮) 研究内容については大阪府立母子保健総合医療センターおよび関連機関における倫理委員会において承認を受けた。遺伝子解析にあたり, 遺伝カウンセリングを行い, インフォームド・コンセントを得た。

C. 研究結果

Dandy-Walker 症候群 10 例について, MLPA 法による *ZIC1-ZIC4* および *VLDLR* の解析を行ったが, 欠失は同定されなかった。対象患者は Dandy-Walker 症候群以外に精神運動発達遅滞や他の合併奇形を持つ例も含む。一般的な染色体検査でも異常は認めていない。

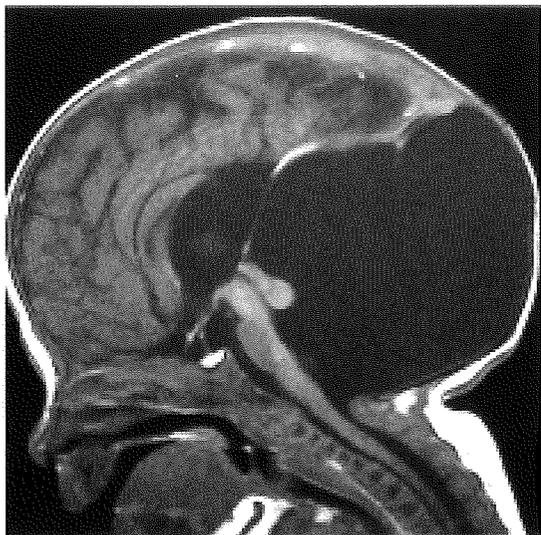


図1 Dandy-Walker 症候群の高度な後頭蓋窩脳胞

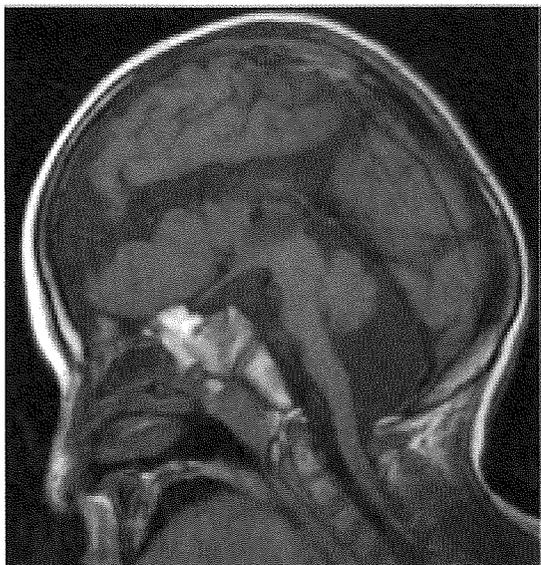


図2 MRI 像、マイクロアレイで異常なし

対象症例の1例を図1に示す。

典型的な Dandy-Walker 症候群ではないが、先天性多発性関節拘縮症、小脳回、小脳低形成、脳梁欠損、重度精神運動発達遅滞、痙性四肢麻痺の症例（図2）について、全ゲノムマイクロアレイ解析を実施した。染色体は46,XYで異常なかった。全ゲノムマイクロアレイで *ZIC1-ZIC4* 領域を含め、ゲノム上に欠失や重複はなかった。CNVは存在したが、病的なものではなかった。

多小脳回を伴う Joubert 症候群（#608629）は *AHI1* 遺伝子変異によることが報告されている。

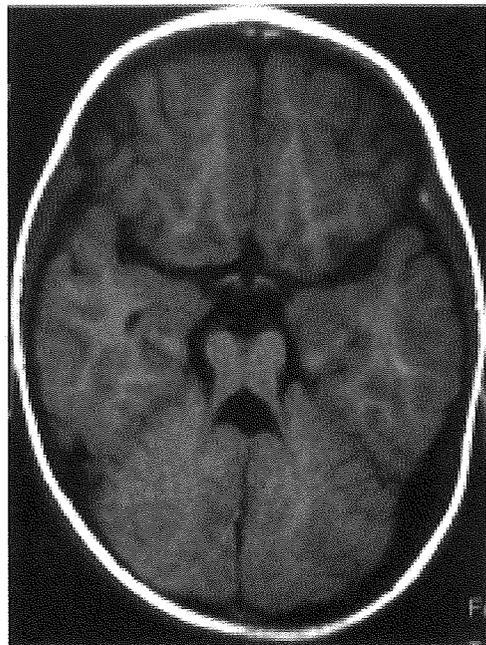


図3 Joubert 症候群における Molar tooth sign

Joubert 症候群と多小脳回を伴う例の臨床経過を述べる。症例は在胎39週AFD出生児。生後4ヶ月で頸定なく、精査となった。MRI検査を受け、多小脳回、脳室拡大、molar tooth sign（図3）を伴う小脳虫部低形成、脳幹低形成、脳梁低形成を認めた。無呼吸発作を反復した。*AHI1* 遺伝子解析とマイクロアレイ解析を行ったが変異は同定されなかった。他の Joubert 症候群の病因とされている部分でマイクロアレイ上で欠失や重複は認めなかった。

（マイクロアレイ解析を実施していただきました、東京女子医科大学国際統合医科学 山本俊至先生に感謝します）

D. 考 察

Dandy-Walker 症候群は第4脳室と交通する後頭蓋窩の嚢胞状拡大、小脳虫部低形成を特徴とするが、シャント手術が必要な水頭症を伴うことがある。臨床症状としては、小脳失調症状や精神運動発達遅滞、他の奇形を合併する例や、小脳失調がめだたず予後良好な例等、臨床的には幅広い。各種の先天性症候群に合併する例はあるが、まだ一定の遺伝子変異は報告は少ない。Grinbergらは染色体3q24に座位を持つ *ZIC1* と *ZIC4* 両遺伝子欠失と Dandy-Walker 症候群（DWM; OMIM #220200）の関連を報告した¹⁾。*ZIC1* と *ZIC4* 遺伝子は Dandy-Walker 症候群と関係することが証明された

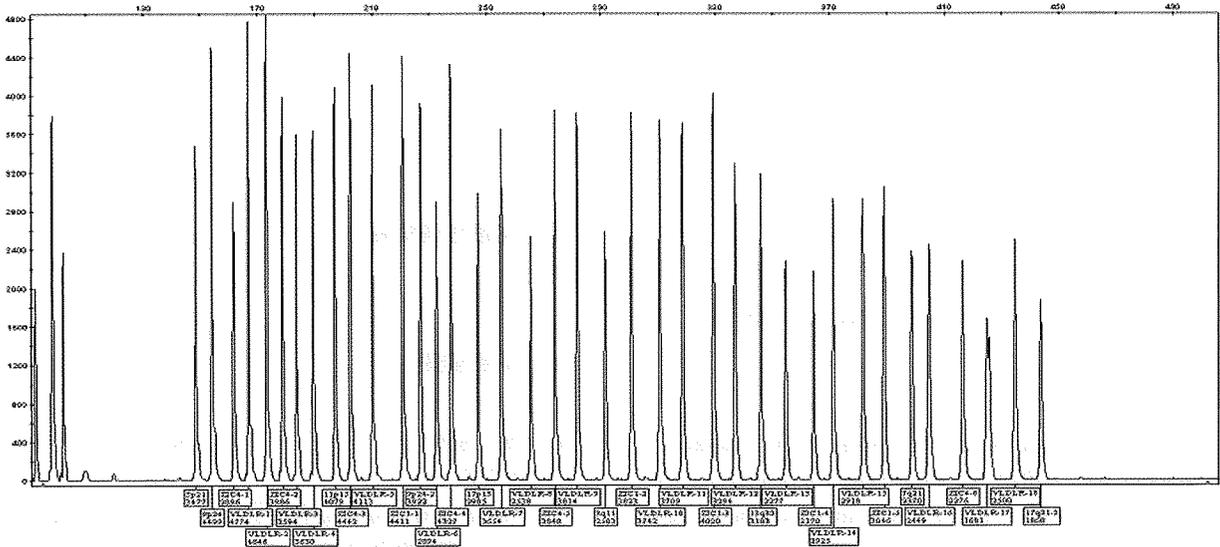


図4 図1のDandy-Walker症例のMLPA法解析生データ

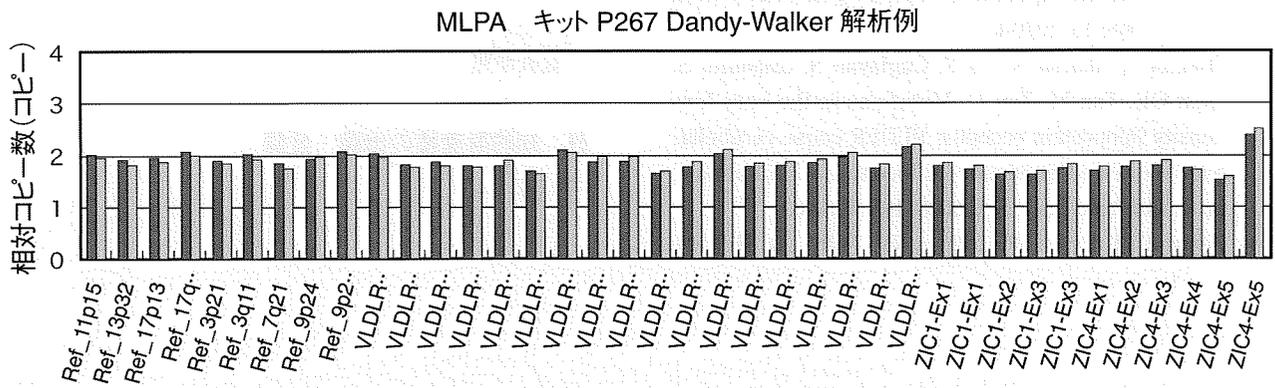


図5 図4のデータを変換. *VLDLR* 遺伝子 *ZIC1* *ZIC4* 遺伝子に欠失を認めず.

が、Dandy-Walker 症候群の中にどの程度同様な欠失例が存在するか、不明である。MLPA 法でこの領域の欠失を解析するキットが存在する。このキットでは *VLDLR* 異常症の一部も MLPA 法で同時に解析可能である。*VLDLR* 遺伝子は四つ足歩行、構音障害、精神発達遅滞、種々の程度の大脳・小脳低形成を認める。トルコで大家系が報告された^{2) 3)}。*VLDLR* 遺伝子は 大脳皮質と小脳において神経細胞の移動に関与する *reelin* シグナル伝達経路の遺伝子のひとつである。

今回の解析では 10 例全例とも *ZIC1*, *ZIC4*, *VLDLR* 各遺伝子に欠失は検出できなかった。データとしては再現性があり、Dandy-Walker 症候群では MLPA 法による *ZIC1-ZIC4* の解析は有用と考えられ

る。さらに症例数を増やして検討する予定である。

Joubert 症候群は小脳虫部低形成と脳幹の低形成を呈する。精神運動発達遅滞、小脳機能障害を認める。数個の Joubert 症候群責任遺伝子が報告されているが、*JBTS3* は染色体 6q23.2-q23.3 に座位があり、責任遺伝子は *AHI1* である。*AHI1* は脳に強く発現し、皮質脊髄路や上小脳脚の交差する軸索に最も強く発現する。*AHI1* 異常による Joubert 症候群は小脳虫部低形成に加えて、大脳の多小脳回を認めることが特徴である。臨床的にこの疾患と考えられる 1 例について責任遺伝子である *AHI1* の変異解析とマイクロアレイによる微細欠失・重複の解析を行ったが、有意な異常は同定されなかった。

E. 結 論

Dandy-Walker 症候群では ZIC1-ZIC4 の領域の欠失例が知られている。MLPA 法やマイクロアレイ法を用いて、Dandy-Walker 症候群 10 例で異常を検索したが、欠失例は同定できなかった。MLPA 法は効果的な検索手段であり、さらに症例数を増やして解析予定である。多小脳回を伴う Joubert 症候群 1 例で *AHI1* 遺伝子解析を行ったが異常なく、遺伝的異質性が示唆された。

文献

- 1) Grinberg I, Northrup H, Ardinger H, Prasad C, Dobyns WB, Millen KJ. Heterozygous deletion of the linked genes ZIC1 and ZIC4 is involved in Dandy-Walker malformation. *Nat Genet.* 2004 Oct; 36 (10) : 1053-5. Epub 2004 Aug 29.
- 2) Türkmen S, Hoffmann K, Demirhan O, Aruoba D, Humphrey N, Mundlos S. Cerebellar hypoplasia, with quadrupedal locomotion, caused by mutations in the very low-density lipoprotein receptor gene. *Eur J Hum Genet.* 2008; 16: 1070-4.
- 3) Ozcelik T, Akarsu N, Uz E, Caglayan S, Gulsuner S, Onat OE, Tan M, Tan U. Mutations in the very low-density lipoprotein receptor VLDLR cause cerebellar hypoplasia and quadrupedal locomotion in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 4232-6.
- 4) Ferland RJ, Eyaid W, Collura RV, Tully LD, Hill RS,

Al-Nouri D, Al-Rumayyan A, Topcu M, Gascon G, Bodel A, Shugart YY, Ruvolo M, Walsh CA. Abnormal cerebellar development and axonal decussation due to mutations in *AHI1* in Joubert syndrome. *Nat Genet.* 2004; 36: 1008-13.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

- 1) Char 症候群双生児例 日本小児遺伝学会 2009 年 奈良市
- 2) 小頭症・橋小脳低形成を呈する *CASK* 異常症の臨床像 日本小児神経学会 2009 年 米子市
- 3) *CADPS2* ハプロ不全と広汎性発達障害 日本人類遺伝学会 2009 年 東京都
- 4) アレイ CGH で診断された 1p34.3 微細欠失例 日本人類遺伝学会 2009 年 東京都

論文発表

一覧表参照

H. 知的財産権の出願・登録

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

大脳皮質形成障害の原因遺伝子解析に関する研究

研究分担者

加藤 光広

山形大学医学部小児科学講座

研究要旨 *DCX* 遺伝子および *ARX* 遺伝子は X 染色体に位置し、男女で表現型（脳形成障害の特徴）が異なるほか、モザイクや多面効果による表現型の差が生じる。表現型の差による両遺伝子の変異陽性率（一致率）を 38 家系の大脳皮質形成障害について調べた。*DCX* 遺伝子と *ARX* 遺伝子ともに全体の変異陽性率はそれぞれ 33%、38% と低かったが、女性の皮質下帯状異所性灰白質と男性の外性器異常を伴う X 連鎖性滑脳症では、67%、100% と高かった。遺伝子解析前に正確かつ詳細な画像診断を行い、一致率をあげるとともに、遺伝子解析の限界を事前に具体的に提示する必要がある。

A. 研究目的

脳形成障害は、発生原因により外因性と内因性に分けられ、後者は単一遺伝子の変異によって生じるものが多い。特に大脳皮質形成過程の神経細胞移動障害による滑脳症は、*LISI* や *DCX*, *ARX* などの原因遺伝子と表現型との間に相関があり、画像診断で原因遺伝子がある程度推測することが可能である。しかし、画像診断と遺伝子診断の一致率についてのデータは乏しい。両者の一致率について具体的な数値を示すことは、遺伝子解析前の診断基準作成に重要である。特に常染色体劣性疾患や X 連鎖性疾患では、遺伝相談が重要となり、画像診断や遺伝子解析の有用性のみならず、診断方法の限界を示すことも両親が冷静な判断をする上で必須と考えられる。

本研究では、遺伝子解析を行った大脳皮質形成障害について画像診断と遺伝子診断の一致率を求めるとともに、不一致の原因と、一致率を高めるために必要な課題を探る事を目的とした。

B. 研究方法

対象は、2005 年から 2009 年までの 5 年間に当講座で *DCX* 遺伝子もしくは *ARX* 遺伝子解析を行った大脳

皮質形成障害の 38 家系である。

方法は以下の通りである。

1. *DCX* 遺伝子解析：全例について蛋白翻訳領域と近傍イントロンを含む全エクソン（エクソン 2～7）を PCR 増幅後、直接塩基配列解析を行った。
2. *ARX* 遺伝子解析：画像から XLAG が疑われた症例については、蛋白翻訳領域と近傍イントロンを含む全エクソン（エクソン 1～5）を PCR 増幅後、直接塩基配列を解析した。XLAG 以外の症例については、変異好発部位であるエクソン 2 の前半のみ直接塩基配列解析を行い、他の部分は熱変性高速液体クロマトグラフィ（DHPLC）法によるスクリーニング後に、ヘテロデュプレックスを示した検体のみ直接塩基配列解析を行った。

なお遺伝子解析は山形大学医学部倫理審査委員会の承認を受け、保護者に対し文書と口頭で説明し、同意を得た後に行われた。

C. 研究結果

1. *DCX* 遺伝子解析を行った 24 家系中、変異が同定されたのは 8 家系で陽性率は 33%であった。変異陽性例の内訳は皮質下帯状異所性灰白質（SBH）が 6

例(全例女),古典型滑脳症グレード1(広汎性無脳回)と4(厚脳回のみ)が1例ずつ(両例男)であった。変異陰性例は16例でSBHが6例(女3例),滑脳症グレード3(無脳回と厚脳回の併発)が5例(男4例),グレード4が3例(男2例),水頭症(男)と皮質の肥厚を伴わない単純脳回(女)が1例ずつであった。変異陰性の滑脳症グレード3と4の8例中前頭優位は4例であった。画像診断毎の変異陽性率(一致率)はSBH 50%(女では67%),古典型滑脳症20%(男では25%)であった。

2. ARX 遺伝子解析を行った13家系中,変異が同定されたのは5家系で陽性率は38%であった。変異陽性例の内訳は5家系5例とも外性器異常を伴うX連鎖性滑脳症(XLAG,全例男)であり,変異陰性例では水頭症もしくは水無脳症が4家系(全例男),XLAG女性例が1例,その他が3例であった。画像診断毎の変異陽性率(一致率)はXLAG 83%(男では100%),その他0%であった。

D. 考 察

DCXとARXの変異陽性率は全体で約3分の1と低かったが,画像診断の違いにより変異陽性率は大きく異なった。特にSBH女性例とDCX変異,XLAG男性例とARX変異の一致率は高く,画像診断の有用性が示された。その一方,古典型滑脳症におけるDCX変異は,画像上前頭優位という特徴はあるが,一致率は低く,遺伝子診断の必要性が高い。古典型滑脳症ではDCX以外に,LISIやTUBA1Aが原因遺伝子として判明しており,遺伝的異質性が不一致の原因と考えられる。LISIとTUBA1A変異による滑脳症は常染色体優性遺伝による孤発例がほとんどで,それ自体には遺伝性の確認の意味はないが,逆に患児の遺伝子診断を確定することで,遺伝性を否定しやすくなる利点がある。古典型滑脳症においては,両者の解析を追加することにより一致率を高められると考えられる。

DCX遺伝子およびARX遺伝子はともにX連鎖性疾患であり,母が正常保因者となりうることが知られている。滑脳症など大脳皮質形成障害は胎児期には超音波検査での診断が困難であり,頭部MRIでも診断が可能になるのは脳回が形成される妊娠後期である。古典型滑脳症やSBH,XLAGでは,DCXおよびARX遺伝子解析の必要性が高く,画像診断を正確に行い,一致率を上げる必要がある。

E. 結 論

大脳皮質形成障害の原因確定には遺伝子診断を必要とする場合が多いが,患者家族の負担を減らすためには,遺伝子解析の前に,遺伝的異質性を考慮した正確な画像診断が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato M, Koyama N, Ohta M, Miura K, Hayasaka K. Frameshift mutations of the ARX gene in familial Ohtahara syndrome. *Epilepsia* in press
- 2) Shiihara T, Maruyama KI, Yamada Y, Nishimura A, Matsumoto N, Kato M, Sakazume S. A case of Baraitser-Winter syndrome with unusual brain MRI findings: Pachygyria, subcortical-band heterotopia, and periventricular heterotopia. *Brain Dev* in press
- 3) Ide S, Sasaki M, Kato M, Shiihara T, Kinoshita S, Takahashi JY, Goto YI. Abnormal glucose metabolism in aromatic l-amino acid decarboxylase deficiency. *Brain Dev* in press
- 4) Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M, Uetake K, Tohyama J, Ogata T, Saitoh S. Maternal uniparental disomy 14 spectrum is important differential diagnosis of Prader-Willi syndrome. *J Pediatr* 155: 900-903, 2009
- 5) Miyata R, Hayashi M, Miyai K, Akashi T, Kato M, Kohyama J. Analysis of the hypothalamus in a case of X-linked lissencephaly with abnormal genitalia (XLAG). *Brain Dev* 31: 456-460, 2009
- 6) 加藤光広: 神経細胞異動異常症. 脳・神経系の画像診断 特集脳・神経系の画像診断 III. 疾患各論 小児科診療 Vola.72 No.3 診断と治療社 467-472, 2009
- 7) 加藤光広: 大田原症候群. 小児疾患における臨床遺伝学の進歩 各論 I. 日本人が発見に関わった疾患遺伝子 小児科 50: 894-898, 2009
- 8) 加藤光広: 周期性四肢麻痺. 小児疾患診療のための病態生理 小児内科 41: 969-972, 2009
- 9) 中村和幸, 加藤光広: 非外傷性頭蓋内出血. 小児疾患診療のための病態生理 小児内科 41: 664-668, 2009

2. 学会発表

- 1) Kato M, Koyama N, Ohta M, Miura K, Hayasaka K: Frameshift mutations in the terminal exon of ARX cause Ohtahara syndrome. American Epilepsy Society 63rd Annual Meeting, Boston, USA, December 4-8,

- 2009
- 2) Komaki H, Hayashi Y.K., Kato M, Sakuma H, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Nonaka I, Nishino I: Inflammatory myopathy in early childhood is highly associated with LMNA-related Emery-Dreifuss muscular dystrophy. 14th International Congress of the World Muscle Society, Geneva, Switzerland ; September 9-12, 2009
 - 3) Miyake N, Kato M, Matsumoto N: Analysis of copy number changes in Aicardi syndrome. 59th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Honolulu, USA, October 20-24, 2009
 - 4) Kato M, Saitsu H, Mizuguchi T, Osaka H, Tohyama J, Uruno K, Kumada D, Hamada K, Nishimura S, Hirai S-i, Kumada T, Fukuda S, Ogata K, Hayasaka K, Matsumoto N: Clinical spectrum of Ohtahara syndrome caused by *STXBPI* mutation. The 28th International Epilepsy Congress, Budapest, Hungary ; June 28- July 2, 2009
 - 5) Au B, Kato M, Dupuis L, Mendoza-Londono R: Distinctive Clinical Phenotype in Patients with distal Trisomy 5q and distal Monosomy 13q due to Parental Balanced Translocations. American College of Medical Genetics - 16th Annual Clinical Genetics Meeting, Tampa Convention Center, Tampa, Florida, USA ; March 25 -29, 2009
 - 6) Kato M: *ARX* gene as a genetic marker for catastrophic neurological disorders and related conditions. The 10th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Dague, Korea ; June 10-13, 2009 (invited lecture for the Hot Topic Symposium)
 - 7) 中村和幸, 加藤光広, 松永明, 沼倉周彦, 古山政幸, 早坂清, 清水行敏, 秋葉香, 萩野大助, 橋本多恵子: フェノバルビタール大量療法が奏効した原因不明の脳症後部分てんかんの1例. 第112回日本小児科学会総会: 奈良 2009年4月
 - 8) 田辺さおり, 安孫子雅之, 枝松秀尚, 木村敏之, 加藤光広: パルス療法が有効であった急性出血性白質脳炎の一例. 第112回日本小児科学会総会: 奈良 2009年4月
 - 9) 加藤光広: 脳形成障害・てんかんのトピックス一年齢依存性てんかん性脳症と介在ニューロン病一. 第51回日本小児神経学会総会 教育講演: 米子 2009年5月
 - 10) 圓谷理恵, 植松 貢, 荒井那津子, 福與なおみ, 土屋 滋, 加藤光広: 特異なMRI 画像所見を呈する脳形成異常の1例. 第51回日本小児神経学会総会: 米子 2009年5月
 - 11) 廣瀬三恵子, 横山浩之, 萩野谷和裕, 圓谷理恵, 菊池敦生, 中山東城, 福與なおみ, 宗形光敏, 植松 貢, 飯沼一字, 加藤光広, 土屋 滋: Leucodysplasia, microcephaly, cerebral malformation (LMC) の姉妹例. 第51回日本小児神経学会総会: 米子 2009年5月
 - 12) 山本俊至, 下島圭子, 加藤光広, 高梨潤一, 林 隆, 前垣義弘, 菅野秀宣: モヤモヤ病の分子基盤の解明のためのゲノム連鎖解析研究. 第51回日本小児神経学会総会: 米子 2009年5月
 - 13) 中村和幸, 加藤光広, 高橋信也, 早坂 清: 拡散強調画像で一過性皮質下白質高信号を呈する急性脳症における視床病変. 第51回日本小児神経学会総会: 米子 2009年5月
 - 14) 遠山 潤, 加藤光広, 川崎砂里, 赤坂紀幸, 大橋 伯, 小林 悠, 原田直樹, 松本直通: ZIC1 と ZIC4 の欠失による Dandy-Walker 奇形の1例. 第54回日本人類遺伝学会: 東京 2009年9月
 - 15) 赤坂紀幸, 遠山 潤, 大橋 伯, 小林 悠, 加藤光広: 同一の ARX 遺伝子異常を呈した West 症候群と精神遅滞の兄弟例. 第43回日本てんかん学会総会: 弘前 2009年10月
 - 16) 日暮憲道, 浜野晋一郎, 折津友隆, 南谷幹之, 加藤光広, 廣瀬伸一: 重症皮質形成異常における乳児期の Iomazenil 高集積病変. 第43回日本てんかん学会総会: 弘前 2009年10月
 - 17) 中川栄二, 加藤光広, 黒澤健司, 難波栄二, 稲澤譲治, 後藤雄一: Genetic and clinical analysis in patients with mental retardation with epilepsy. 第43回日本てんかん学会総会: 弘前 2009年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

難治性脳形成障害症患者由来生体試料の収集とそのバンク化に関する研究

研究分担者

金村 米博

国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター 再生医療研究室 室長

研究要旨 難治性脳形成障害症の病態解明と神経機能の修復・再生法の開発を最終目標として、患者由来生体試料を収集・分離・作成し、そのバンク化を実施する。21年度は、難治性脳形成障害症患者から提供を受ける生体試料の種類とその収集方法を定め、生体試料提供マニュアルを作成した。そのマニュアルを使用し、実際に複数施設から患者由来試料の提供を受け、その収集を行うことができた。今後、この体制を本格稼働させることで、患者由来試料のバンク化を実現することが可能になると考えられる。

A. 研究目的

現在でも根治的治療法が存在しない難治性脳形成障害症の病態解明と神経機能の修復・再生法の開発を最終目標として、以下の患者由来生体試料を収集・分離・作成し、そのバンク化を実施する。

- ① 研究開発用試料：核酸（DNA および RNA）、タンパク質、組織標本
- ② 浮遊系細胞：末梢血由来単核球細胞
- ③ 接着性細胞：線維芽細胞、上皮細胞、血管内皮細胞、等
- ④ 幹細胞：神経幹細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞
- ⑤ iPS 細胞：上記②～④に遺伝子導入して作成

B. 研究方法

1. 患者由来生体試料の収集の流れ図

患者由来試料の収集は、生体試料提供マニュアル（第1版表面）（図1）に従って、A. 遺伝子診断を行うためのDNA抽出を主目的とする試料採取と、B. 細胞樹立を行うための試料採取、の2つに大別して収集する。

2. 収集する患者由来生体試料の種類とその収集方法

収集する患者由来生体試料の種類は、生体試料提供マニュアル（第1版裏面）（図2）に記載された試料を、マニュアルの方法にしたがって採取・収集する。B. 細胞樹立を行うための試料採取で収集する各試料は、事前に大阪医療センターから輸送用コンテナ（図3, A）の内部に入れて（図3, B）研究協力機関へ発送される。ヘパリン添加血液回収チューブ（図3, C1）、組織保存液が入った臍帯回収容器（図3, C2）、あるいは神経・皮膚組織回収チューブ（図3, C3）に回収し、冷蔵状態で大阪医療センターに返送する。

（倫理面への配慮）

研究計画「難治性脳形成障害症の病態解析と治療法開発」を大阪医療センター医学倫理委員会へ申請し、その承認を受けた（平成21年8月26日）。試料提供のインフォームド・コンセントは、倫理委員会承認を受けた説明文書、同意書を用いて実施された。

C. 研究成果

倫理委員会にて研究計画承認後、平成21年12月

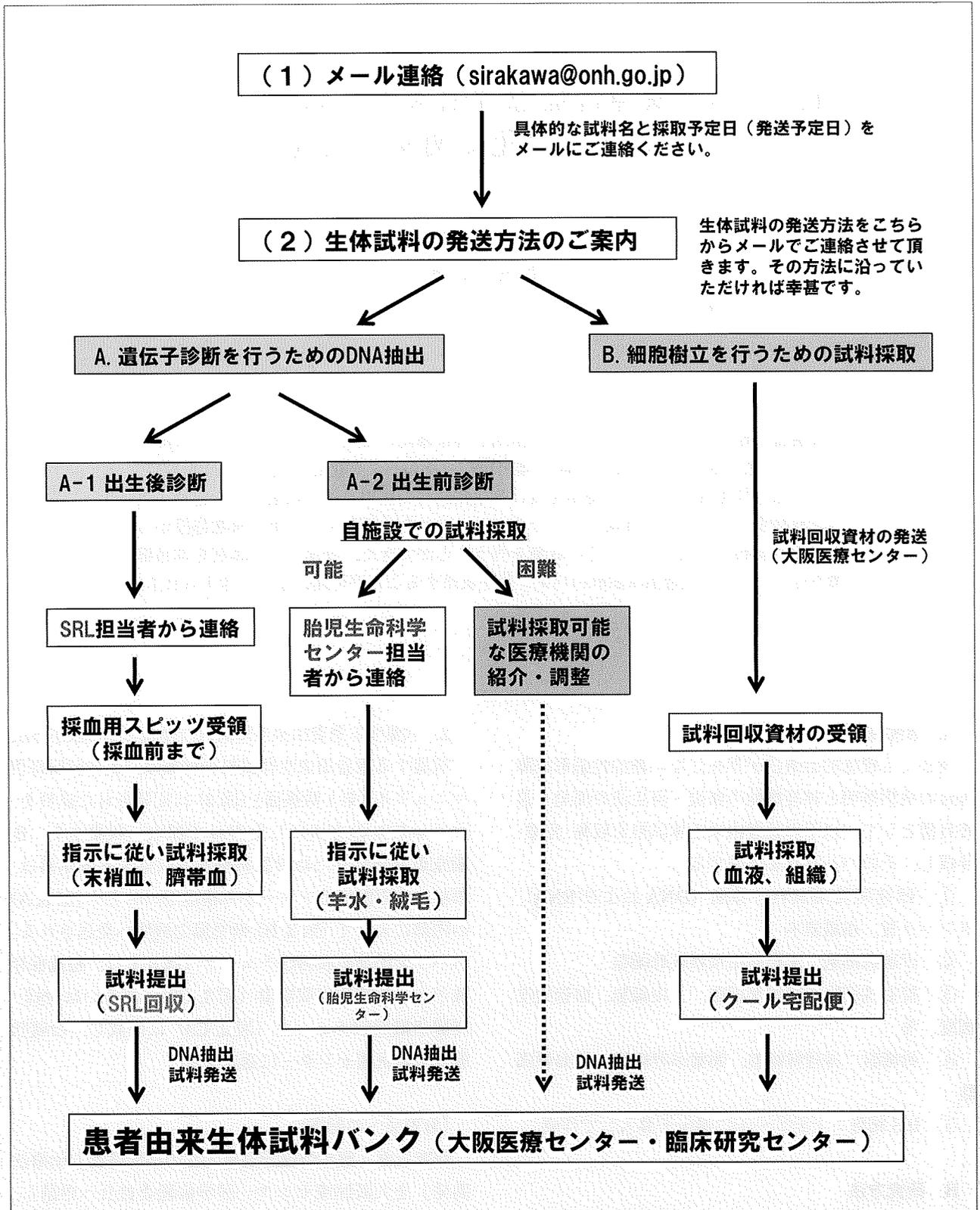


図1 生体試料提供マニュアル (第1版) 表面

ご提供を検討いただきたい試料の種類

患児の年齢	解剖・手術の有無	神経組織	胎盤組織				臍帯血	皮膚組織	末梢血細胞	口腔粘膜上皮	毛髪
			臍帯	卵膜	絨毛細胞	羊水細胞					
妊娠中、中絶実施時、流産時	病理解剖実施あり	◎	○				○	○			
	病理解剖実施なし (出生前診断)		◎	○	△	△	○				
新生児(分娩後すぐ)	手術実施あり		○				○	◎			
	手術実施なし		◎	○	△	△	○				
既に出産後、時間経過	手術実施あり	○						◎	○	●	●
	手術実施なし								○	●	●

- ◎：最優先で採取を試みてください
 ○：可能な範囲で採取を試みてください
 △：必要に応じて採取ください(主に出生前診断目的)
 ●：22年度以降、収集予定の試料

A. 遺伝子診断を行うためのDNA抽出を主目的とする試料採取

A-1 出生後診断

- ①試料採取の前に、各地域のSRL担当者からご連絡が入ると思います。ご確認ください。
- ②SRL担当者から採血用スピッツを受け取ってください。
- ③試料(末梢血あるいは臍帯血)採取後、スピッツに入れ、SRL担当者にお渡しください。
- ④DNAはSRLで抽出され、その後、大阪医療センターへ搬送されます。

A-2 出生前診断

1) 自施設で試料採取ができる場合

- ①試料採取の前に、検査会社担当者(胎児生命科学センター)からご連絡が入ると思います。ご確認ください。
- ②胎児生命科学センターの指示に従い、試料(羊水あるいは絨毛組織)を提出してください。
- ③DNAは胎児生命科学センターで抽出され、その後、大阪医療センターへ搬送されます。

2) 自施設で試料採取が困難な場合

試料採取可能な医療機関の紹介・調整をさせていただきます。

B. 細胞樹立を行うための試料採取

1) 共通事項

- ①事前に試料発送に必要な資材を担当先生宛でお送りします。その発送先と受け取り可能日時をご指定ください。
- ②各生体試料は、以下のマニュアルに従って、採取・保管してください。
- ③生体試料には原則的に個人情報記載せず、匿名化されたラベルを付けてください。
- ④お送りした容器に入れ、宅配便(着払い)で大阪医療センターへ発送してください。

2) 血液試料(末梢血・臍帯血)

- ①可及的に清潔操作を用いて、ヘパリン加専用チューブ(15ml)に1本当たり最大10mLまでの血液試料を分注してください。
- ②搬送ボックスに入れ、クール宅配便(冷蔵)で発送ください。

3) 組織試料(神経組織、皮膚組織、卵膜、臍帯)

- ①病理解剖時、手術時、分娩時に、提供試料の一部を可能な限り無菌的に採取してください。
(組織量の目安)
 神経組織：可能な範囲で最大量
 卵膜：羊膜組織を含む5センチ四方角程度
 臍帯：5センチ程度
- ②発送時までは4℃に保管し、クール宅配便(冷蔵)で発送をお願いします。

図2 生体試料提供マニュアル(第1版)裏面

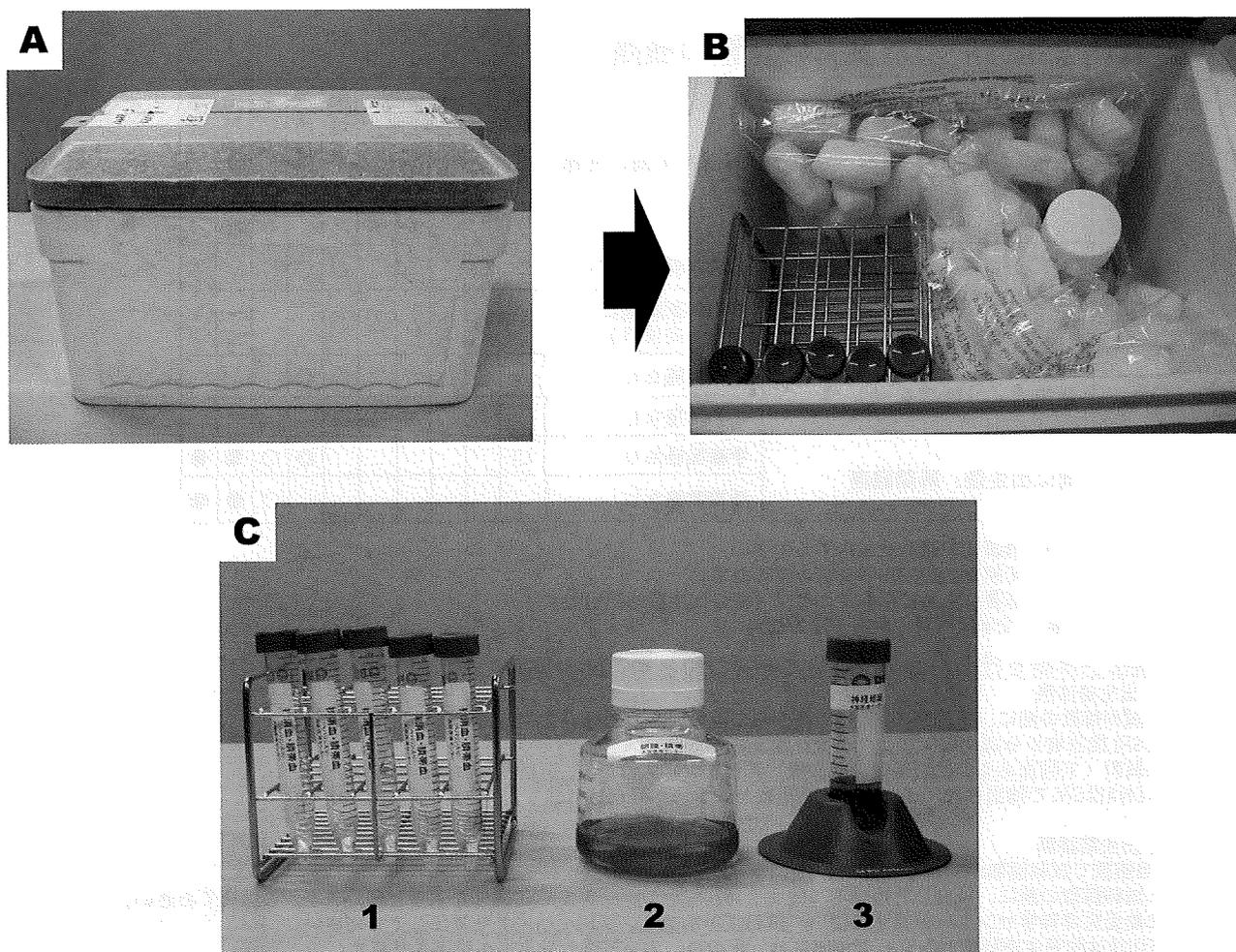


図3 患者由来生体試料の収集に使用する容器

A) 試料採取に先立ち、事前に大阪医療センターから研究協力機関へ発送される輸送用コンテナ。B) 輸送用コンテナの内部。試料回収に必要な資材が入られる。C) 各試料の回収に使用する容器。ヘパリン添加血液回収チューブ(1)、組織保存液が入った臍帯回収容器(2)、神経・皮膚組織回収チューブ(3)。

表1 21年度収集を行った患者由来生体試料

試料の収集目的	試料の種類	検体数
A. 遺伝子診断を行うためのDNA抽出	末梢血細胞由来DNA	14
B. 細胞樹立を行うための試料採取	末梢血細胞	5
	皮膚組織	1
	合計	20

13日の第2回班会議において、生体試料提供マニュアル（第1版）の運用方法を説明した。平成22年3月までの期間において、合計20検体の提供があり、それらの試料の収集を実施した（表1）。

D. 考 察

本年度の研究成果として、難治性脳形成障害症患者から提供を受ける生体試料の種類とその収集方法を定め、生体試料提供マニュアルを作成することができた。そのマニュアルを使用して、実際に複数施設から患者由来試料の提供を受け、その収集を行うことができた。今後、この体制を本格稼働させることで、本研究の目標を実現することが可能になると考えられる。

E. 結 論

難治性脳形成障害症患者に由来する生体試料を収集する体制を構築した。今後、順次試料の提供を募り、各種生体試料および細胞を収集・分離・作成し、それらのバンク化を実施していきたいと考える。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Kanemura Y, Kanematsu D, Yamamoto A, Shofuda T, Ban C, Ueda T, Yamasaki M: Decidua-derived mesenchymal cells from human term fetal membranes have higher proliferative ability but not superior to bone marrow derived- mesenchymal stem cells in multipotency. 7th ISSCR Annual Meeting, 2009.7.9 ; Barcelona, Spain
- 2) Kanemura Y: Development of Cell Processing and Banking Systems of Human Stem Cells for Regenerative Medicine. Regenerative Medicine & Stem Cell 2009, 2009.8.8; Dalian, China
- 3) 金村米博：ヒトニューロスフェアの細胞特性とその品質管理指標。第9回日本再生医療学会総会，2010.3.18；広島市
- 4) 兼松大介，吉龍澄子，山本篤世，正札智子，金村米博：ヒト真皮線維芽細胞の分化能。第9回日本再生医療学会総会，2010.3.19；広島市

H. 知的財産の出願

なし

難治性脳形成障害症の胎児診断における アレイ CGH 解析の有用性の検討

研究分担者

小崎健次郎

慶應義塾大学医学部小児科学教室

A. 研究目的

難治性脳形成障害症に含まれる一部の疾患については原因遺伝子が明らかにされており、遺伝子診断を実施する事が可能である。しかし、多くの疾患について原因遺伝子は不明であり、網羅的な解析を実施せざるを得ない。従来、ゲノム全域を含む網羅的な解析の目的には G バンド染色体検査がおこなわれているが、解像度は高くなく、相当数の疾患について「偽陰性」の症例が相当数含まれていると考えられる。

従来の染色体検査法よりも解像度が高い検査としてアレイ CGH 法検査が注目されている。ゲノム全領域に由来する数十塩基の配列をガラス板上に配置したマイクロアレイに、患者由来ゲノム DNA をハイブリダイズさせ、欠失や重複の有無を調べる技術である。

診断不明の先天異常児の生後の原因診断におけるアレイ CGH 検査の有用性については、国内外から報告されている。本研究では、アレイ CGH 法を診断不明の難治性脳形成障害症の解析に使用するとともに、胎児診断を目指す場合の基礎実験を進めた。難治性脳形成障害症の相当数が子宮内で死亡するため、検体を集める事は容易ではないことから、死亡例ないし流産例の解析を進める事が有用と思われる。流産例の DNA の入手は困難であるので、病理標本を用いた解析を進めた。

B. 研究方法

患者に由来するゲノム DNA を Cy5、正常対照者由来のゲノム DNA を Cy3 でラベル化し、アレイ上で 65℃、40 時間のハイブリダイゼーションを行い、マイクロアレイスキャナーにて、スキャンし、これを専用ソフトウェアにて数値化した後、各遺伝子のゲノム

コピー数を解析した。

ハイブリダイゼーションおよびデータの数値解析にはアジレント社のマイクロアレイシステムを利用した。以下の 2 群を対象に解析を進めた。

① 染色体検査（G バンド法）で原因診断不明である患者の一部をアレイ CGH 法でスクリーニングした。

QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN 社）を用いて血液から DNA を抽出、その後アジレント社のダイレクト法プロトコルに沿ってサンプルを調整、65℃、40 時間ハイブリダイゼーションを行い洗浄後スキャンし、これを Feature Extraction ソフトウェアにて数値化した。Agilent Genomic Workbench ソフトウェアによって解析を行った。

② 連結不能匿名化された既知染色体異常症の組織切片（パラフィン切片）をアレイ CGH 法でスクリーニングし、G バンド染色体検査と比較した。

10 年近く保存されていたヘマトキシリン・エオシン染色パラフィン切片をキシレン処理によってカバーグラスをはがし、WaxFree™ Paraffin Sample DNA Extraction Kit（TrimGen 社）を用いて DNA を抽出、カラムにより精製・EtOH 沈を行った。その後アジレント社の ULS ラベル化法プロトコルに沿ってサンプルを調整、65℃、24 時間ハイブリダイゼーションを行い洗浄後スキャンし、これを Feature Extraction ソフトウェアにて数値化した。Agilent Genomic Workbench ソフトウェアによって解析を行った。

（倫理面への配慮）

慶應大学倫理委員会の承認を得て、アレイ CGH 解析を行った。