

200936107A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究

(H21-難治-一般-052)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 井上 健

国立精神・神経センター 神経研究所

平成22(2010)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究

(H21-難治-一般-052)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 井 上 健

国立精神・神経センター 神経研究所

平成22(2010)年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究-----	1
井上 健	
II. 分担研究報告	
1. 先天性大脳白質形成不全症の全国実態調査 (第1報) -----	8
井上 健、小坂 仁、黒澤健司、高梨潤一、山本俊至、岩城明子	
2. 先天性大脳白質形成不全症の診断基準と治療指針の策定-----	11
井上 健、小坂 仁、黒澤健司、高梨潤一、山本俊至、岩城明子	
3. 先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究-----	13
小坂 仁	
4. Pelizaeus-Merzbacher病の遺伝カウンセリング-----	17
黒澤健司	
5. 先天性大脳白質形成不全症モデルマウスを用いた脳画像研究-----	22
高梨潤一	
6. 先天性大脳白質形成不全症における網羅的遺伝子診断と遺伝子型・症状 関連分析 -----	26
山本俊至	
7. PLP1 遺伝子の点変異と臨床病型との関係: 先天型 Pelizaeus-Merzbacher 病から家族性痙性対麻痺 2 型まで -----	30
岩城明子	
III. 資料	
平成21年度班会議資料 -----	37
全国実態調査票など -----	46
診断基準と治療指針 -----	57
遺伝カウンセリングガイドライン -----	76
公開セミナーお知らせ -----	79
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	80
V. 研究成果の刊行物・別刷 -----	85

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究

研究代表者 井上 健 国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第二部

研究要旨

先天性大脳白質形成不全症は、原因不明（しかし多くは遺伝性と考えられる）の中樞神経系髄鞘の形成不全による非常に重篤な症状を呈する稀な神経疾患の一群である。罹患している患者の多くは、重度の運動障害と知的発達遅滞をもつ重症心身障害者であり、小児期に死亡する患者も多い。これまで *PLPI* などいくつかの原因遺伝子が同定され、病態が明らかになっている一方、遺伝子検索はおろか診断未確定の患者も多い。また、本邦の患者実態の把握は、ほとんど行われてこなかった。本研究は、これまで個別にこれらの疾患の臨床や研究に関わってきた臨床医と研究者を取りまとめ、全国調査による本邦の臨床実態の把握と診断基準の作成など臨床研究を推進し、さらにその成果を直接、治療法開発へつなげるべく、生体試料の登録保存や疾患モデル動物などの基盤整備を推進するものである。本研究の特色は、「ベッドからベンチへ、ベンチからベッドへ」という臨床・基礎研究一体型の研究組織を構築し、先天性大脳白質形成不全症の診断から治療までにかかる研究を一体的に推進する点である。

研究組織

研究代表者

井上 健 国立精神・神経センター  
神経研究所 疾病研究第  
二部 室長

研究分担者

小坂 仁 神奈川県立こども医療セ  
ンター 神経内科 科長  
黒澤健司 神奈川県立こども医療セ  
ンター 遺伝科 科長  
高梨潤一 亀田メディカルセンター  
小児科（神経担当）部長  
山本俊至 東京女子医科大学 国際  
統合医科学インスティ  
テュート 特任准教授  
岩城明子 九州大学 生体防御医学  
研究所 助教

1. 研究目的

これまで我が国では、先天性大脳白質形成不全症に関する全国調査研究は行われてこなかった。しかし、個々の研究者は、新たな遺伝子異常の発見、遺伝子診断の技術開発、遺伝型と臨床型との関連、新たな病態の解明等、質の高い研究成果を上げている。さらに、遺伝子診断の臨床への適応など臨床医療での先進的な取り組みも行っている。本研究では、そういった経緯をふまえ、これらの臨床研究者を研究班としてまとめ、先天性大脳白質形成不全症の臨床研究を大きく推進させることを目的とする。

本研究が必要な医療的背景として、以下の点が上げられる。

第1に、今後の先天性大脳白質形成不全症に関する診断の標準化や厚生労働行政の基盤になる知見を得るために、



まず本邦における患者実態の把握が必要である。これまで疾患自体が稀であり、生化学的な診断指標がなく確定診断が困難だったが、近年、MRIなどの画像診断技術や疾患原因遺伝子の同定と遺伝子診断技術の進歩により、正確な診断が可能になりつつあり、全国レベルでの実態把握調査が必要である。

第2に、遺伝子診断の確定に基づく病態の解明と治療法の開発のための生体試料のシステマチックな収集・保存が非常に重要になり、そのための基盤整備が必要である。現在、この疾患には、根本的な治療法が存在しない。しかし、遺伝子・再生治療の技術進歩により、近い将来、治療法が開発される機会が訪れると期待されるが、そのためには、正確な臨床情報とリンパ芽球や皮膚線維芽細胞などの生体試料の登録保存システムの確立が重要である。

本研究の最大の特徴は、班員により高度先進医療として確立された遺伝子診断システムが、本邦で最初の遺伝子診断の保険適用疾患の一つとして認可されている点である。これはすなわち、実態の把握を遺伝子レベルで、正確かつ効率的に行えることを意味する。また、研究代表者は、疾患の分子病態の解明や診断法の開発を行い、さらに治療法開発へ向けた体制を整備していることである。また、すでに欧州や米国の研究グループとの交流もあり、国際的な共同研究も開始していることも特色の一つである。すなわち、臨床実態調査研究の枠を超え、その成果をすぐに病態解明と治療研究のため活かせる体制を整え、「ベッドからベンチへ、ベンチからベッドへ」をスムーズに行うトランスレーショナルな研究を行うことを念頭におき、実際にこの疾患の研究に携わる研究者からなる小回りのきく研究班を立ち上げた。

## 2. 研究方法

### A. 臨床の実態の把握調査と診断の推進のための研究

#### (1) 全国調査による患者数と診断・治療の実態の把握

調査の対象は、小児神経科を有する全国の大学病院および主要な病院および重症心身障害児施設の小児科・小児神経科医師に対して行う。重症心身障害児施設をつなぐ重症心身障害政策医療ネットワークSMIDなどの協力も得る。一次調査で罹患数、診断根拠、行われている治療や療育内容の把握を行う。さらに、症例を有する施設に対して二次調査を行い、詳細な臨床情報の収集と遺伝子診断の推進、生体試料の登録を進める。

#### (2) 画像解析と遺伝子診断を含めた診断基準と治療指針の確立

現状では、診断基準の未確立や遺伝学的検査の未施行により、診断が確定していない先天性大脳白質形成不全症患者も少なくない。そこで本研究課題では、最近の画像および遺伝学的解析の知見を加味した新たな先天性大脳白質形成不全症の診断基準と治療に関する指針を確立する。画像診断、臨床症状の多様性と重症度の評価、治療に関、遺伝子診断の手順と方法の各項目について、診断基準と治療の指針を作成し、公表する。調査研究からの遺伝子検索のニーズに対応できるよう本研究班が中心になり直ちにこれを稼働できるようにする。

#### (3) 遺伝子診断の整備推進と遺伝子変異と臨床表現型との関連解析

本研究課題では、現在稼働している *PLP1* 遺伝子診断システムをさらに発展させ、すべての疾患原因遺伝子 (*PLP1*, *JGC2*, *SLC16A2*, *FAM126A*, *SOX10* など) の検索を行う。また、遺

伝子変異と臨床表現型との関連を行い、疾患の自然歴あるいは予後と遺伝子変異との関連を明らかにする。国際共同研究による海外の患者情報との比較や統合によりその有意性を高める。これらの情報は、各患者における遺伝的病態や予後、治療法の選択の決定に重要な情報を供給することができ、また重症心身障害児に関する厚生労働行政の施策に関する計画のための意義ある情報となる。

## 2. 治療法開発に向けた基盤整備と基礎研究の推進

### (1) リンパ芽球および皮膚線維芽細胞など生体試料の登録・保存（バイオバンクの確立）

本研究の大きな役割の1つは治療法開発への基盤作りである。昨今のゲノムワイド解析や再生医療に関する技術革新は、様々な疾患に応用できる共通のプラットフォームを持っており、従って高品質な疾患特異的な生体試料バンクを確立することが、これらの技術を病態の解明や治療法開発のために応用するための重要なカギになる。そこで本研究課題では、ゲノムワイド解析のためのリンパ芽球バンクおよび将来のiPS技術の応用を見据えた皮膚線維芽細胞の収集・登録を国立精神・神経センターが中心となって行う。

### (2) 治療法開発へ向けた基礎研究のための基盤整備

疾患動物モデルや培養細胞を用いた病態モデルは、病態解明と治療法開発のためのツールとして、必須である。本研究課題では、既に確立されている疾患モデルマウスを入手・飼育し、治療薬投与と組織病理や電顕などの効果判定の実験系を確立する。また、疾患の治療標的となるオリゴデンドロサイトの初代培養系を確立し、試験管内での病態解明や薬物効果の分子基盤の解

明のために整備する。

### (3) 国際共同研究による海外の診療および研究実態の把握

欧米の研究者との共同研究を推進し、諸外国における診断と治療の実態を把握する。仏 INSERM の Boespflug-Tanguy 教授らは、大脳白質変性症コンソーシアムを主催し、患者登録データベースを作成しているため、彼らとの連携により、欧州における実態の情報を入手する。将来的に、このコンソーシアムへの参加を目指し、オンラインシステムの共有・英語での臨床情報の構築、そして情報や生体試料の共有化のための倫理審査など、その体制作りを行う。

## 3. 研究結果

### A. 臨床の実態の把握調査と診断の推進のための研究

#### (1) 全国調査による患者数と診断・治療の実態の把握（参考資料）

本研究課題は、国立精神・神経センター倫理委員会の承認のもと、「疫学研究に関する倫理指針」に準拠して行なわれている。

全国実態調査の実施に関する立案は、難病疫学班により作成された「難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル(第2版)」(2006年8月研究代表者 永井正規)の手法に基づき行った。調査対象の選定や調査票の内容、さらに倫理審査などの具体的な手法の決定や作業に関しては、疫学班の永井班長および疫学調査担当の中村班員と直接協議しながら、取り決めた。調査票の作成に当たっては、まず疫学調査に必要な診断基準の確立を行った。これは調査としての簡便化を図るため、後述の診断基準とは異なり、より簡素化しわかりやすいものにするこ

につとめた。一次調査票は対象患者の有無のみを記載し返信する葉書による形式を用いた。一次調査の対象施設は、疾患の特異性と希少性を考慮し、無作為抽出による方法よりも、むしろ患者が集積する特殊医療施設全体を対象とするほうが適切と判断した。そこで、小児神経学会の協力を得て、小児神経科専門医の名簿を入手し、彼らが所属する全国の医療・療育施設を抽出し、これに大学病院小児科および全国の重症心身障害児施設などを加え、合計約920施設に対して調査票をH21年11月に発送した。H22年1月時点で、約半数の回答を得た。回答が得られなかった残りの半数の施設に対しては、再度、督促の依頼を送付し、H22年2月現在で約7割と非常に高い回収率で、一次調査の回答を得ることができた。一次調査の結果、90施設余りから、先天性大脳白質形成不全症の患者を有するとの回答を得た。これらの症例の多くは、PMDであり、当初の予想通り約100例の患者を確認した。診断が未確定の症例も相当数、存在することが確認された。今後、これを二次調査の対象とする。二次調査票は、詳細な臨床情報の入手と臨床経過や治療内容に関する情報を収集するもので、調査方法および調査内容については倫理委員会の承認を得た。今後、二次調査票の発送および回収を行う。結果の集計と解析は、来年度に行う予定である。

## (2) 臨床的な診断基準と治療指針の確立 (参考資料)

先天性大脳白質形成不全症は、これまで疾患概念が比較的明確に確立されているPMD以外は、最近10年以内にその疾患概念が初めて記載されたものが多く、まだ十分な症例数の蓄積や多

数症例での臨床記載がなされていないものが多い。また、疾患自体が稀少であり、日本人での報告がないものも多い。その一方で、依然、PMD類縁疾患と臨床的に考えられながら、遺伝学的解析により、PLPIなど既知の遺伝子変異が見いだせず、確定診断に至らない症例は決して少なくない。今回の我々の疫学調査でも、一次調査の段階ではあるが、そういった症例を散見することができる。

これまで、本邦ではPMDを代表疾患とする先天性大脳白質形成不全症に関する診断基準や疾患分類の試みはされておらず、国際的にも研究者個人レベルでの疾患分類や重症度分類がされてきているが、班研究(あるいは国際研究グループ)としての診断基準などは策定されていない。

こういった状況を踏まえ、我々は現段階で原因遺伝子が同定されている、あるいは複数症例の報告によりその疾患概念がある程度確立されている先天性大脳白質形成不全症について、文献的検討をもとに診断基準の作成を行った。通常、患者数が多い疾患の診断基準や治療指針の策定については、文献のエビデンス・スケールに基づくガイドライン作成を行うが、先天性大脳白質形成不全症は疾患自体が稀少であり、エビデンス・レベル2以上の文献が存在せず、症例報告あるいは少数例の遺伝学的解析研究などの文献がほとんどである。PMD以外の疾患の多くは、新しい疾患ばかりであり、数本の論文報告があるのみである。従って、CEBE推奨のガイドライン作成手法は本研究課題における診断基準策定作業にそぐわないため、本年度は既存の文献報告をもとに、診断基準(案)を作成した。来年度以降にこの診断基準を用いて自験PMD20例の再評価を行い、この

診断基準の妥当性を検討する予定である。

### (3) 遺伝子診断の整備推進と遺伝子変異と臨床表現型との関連解析

本研究課題は、国立精神・神経センター倫理委員会、神奈川県立こども医療センター、東京女子医科大学、九州大学の各施設での倫理委員会の承認のもと、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行なっている。

遺伝子診断の整備推進では、検索対象となる各遺伝子のうち創始者効果のない5遺伝子(*PLP1*、*JGC2*、*SLC16A2*、*FAM126A*、*SOX10*)については、遺伝子診断のためのゲノムDNAを用いた各エクソン領域のPCR増幅と塩基配列決定のプロトコルを確立した。18q-症候群は一般臨床検査での染色体検査により検出可能であるので、必要に応じて詳細な分子細胞遺伝学的検討を行なうこととした。

### B. 治療法開発に向けた基盤整備と基礎研究の推進

#### (1) リンパ芽球および皮膚線維芽細胞など生体試料の登録・保存(バイオバンクの確立)

本研究課題は、国立精神・神経センターおよび神奈川県立こども医療センターでの倫理審査を行ない、承認を得て行なっている。

リンパ芽球は、遺伝子診断を目的に採取された血液検体を用いて行う。本研究開始までに約20例の収集が行われており、これをさらに継続させる。今後、全国実態調査で見いだされた症例について、遺伝子診断の推進とともに血液検体の収集を進めていく予定である。本年度は、倫理委員会での承認を得るなど、基盤整備を行なった。まだ全国実態調査が途中で、検体収集まで至っていないので、本年度は自験例

を少数のみの株化を行なった。

皮膚線維芽細胞は、iPS細胞化とこれを用いた病態解明や治療法開発のために重要な試料となる。本年は、倫理面での整備を行った後、*PLP1*重複によるペリツェウス・メルツバッハ病患者2例から皮膚検体の提供を受け、これを用いて皮膚線維芽細胞を作成した。

#### (2) 治療法開発へ向けた基礎研究のための基盤整備

薬物スクリーニング、治療効果の評価、分子薬理基盤の解明のため、オリゴデンドロサイト初代培養やPMDモデルマウスを用いた実験系を確立した。

オリゴデンドロサイト初代培養は、胎生後期あるいは出生直後のマウス脳より、混合初代培養を行ない、1週間後に神経細胞が脱落した後に、震盪分離により上清に遊離したオリゴデンドロサイトを集め、二次培養を行なう。甲状腺ホルモンを培地中に添加し、分化を促進した。この結果、成熟オリゴマーであるMBPおよび*PLP1*を発現し、樹状に突起をのびたオリゴデンドロサイトを初代培養にて確立した。

*PLP1*変異マウスMSDは、*PLP1*遺伝子に点変異を持つ自然発生型変異マウスで、点変異によるPMDのモデル動物として有用である。我々は、以前からこのマウスのコロニーを確立しているが、本研究では、行動、組織、分子レベルで、その表現型の解析を進めており、新規治療法開発に際しての評価するための実験系を確立した。行動学的評価では、主に運動機能の評価のためのロタロッド試験他、組織学的評価では、免疫組織科学および電子顕微鏡による超微形態解析、分子遺伝学的評価では、TUNEL法による細胞死の評価やウェスタンブロットやRT-PCRなどを用いた小胞体ストレス



反応関連分子の発現解析など、多面的な方法による評価が可能になっている。同様に、PLP1 遺伝子重複による PMD のモデルマウスである PLP1 トランスジェニックマウスを入手に、そのコロニーを確立した。今後、MSD マウスと同様に、その病態の解明と治療法の開発のためのツールとして、研究に用いていく。

さらに、これらのマウスを用いて、動物用高性能 MRI を用いた画像解析研究を開始している。これについては分担研究者高梨潤一が、中心となり解析を行なった。

### (3) 国際共同研究による海外の診療および研究実態の把握

仏 INSERUM の Boespflug-Tanguy 教授らと、PMD のゲノム病態解明に関する共同研究を開始した。彼女らが主催している大脳白質変性症コンソーシアムで収集された PMD 患者 DNA 検体のうち、PLP1 重複による患者 DNA の提供を受けた。我々は、これを用いてアレイ CGH によるゲノム解析を開始した。

一方、米国 PMD 患者の家族らが中心となって設立した PMD 基金の世話役でもあり、PMD 研究の第 1 人者でもある Hobson 博士と会い、本邦での家族会発足に関する情報を提供するとともに、今後家族会間の交流を持ち、様々な情報の交換ができるような体制作りについて、話し合った。これらの活動は、今後本邦の家族会の発足と活動の開始に向け、必要に応じてサポートをする中で実現化に向けた方向付けを行なう。

現段階では、患者情報ネットワークでの患者臨床情報の相互利用などに関する取り組みは始まっていないが、特に欧州のグループからは参加の呼びかけがあり、国内の体制が整えば参加

していきたいと考えている。

## 4. 結論

本研究は、先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に大きな進歩をもたらすことを目的にした。具体的には、診断あるいは疫学といった臨床の基盤的な研究から、遺伝子診断などの応用医療、そして治療法開発に向けた基礎研究まで、一稀少疾患に焦点を当て、幅広い領域についての縦断的な研究を継続的に行なっていくための基盤を作った。本研究の成果は、次に挙げるような重要な意義を持つと考える。

### A. 社会的意義

患者数や診断・治療の現状に関する疫学的な知見は、厚生労働行政の基礎資料として重要である。全国実態調査によって本邦の患者数、障害の程度や臨床経過、検査所見と診断、治療の実態を把握することができる。また、調査により確認された患者家族に対し、主治医を通して、あるいは公開セミナーに参加した患者家族に対し、遺伝子診断とカウンセリング、治療指針、家族会に関する情報を提供するなど、双方向的な情報交換により、医療サービスの向上に寄与することができる。

また、先天性大脳白質形成不全症に関する画像、臨床、遺伝子診断、遺伝カウンセリングの各専門家による診断基準と治療指針は、適切な診断・治療・カウンセリングのための情報を提供し、希少疾患の医療現場での認知の向上に寄与する。

### B. 学術的意義

先天性大脳白質形成不全症には、疾患概念や原因遺伝子が未確定の同類疾患が複数存在すると思われる。系統的な遺伝子診断システムを構築し、既知遺伝子の変異と表現型の関連を明らかにするとともに、ゲノム解析を進

めることにより、新規疾患原因遺伝子の発見が期待される。

また、現在この疾患には根本的な治療法が存在しない。リンパ芽球や皮膚線維芽細胞などの生体試料を収集し、基礎研究への供給することにより、病態に基づく治療法開発への体制を整えることができる。実際にリンパ芽球を用いた CGH アレイ解析と皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞の作成を開始した。

動物や培養細胞での疾患モデルは、病態解明と治療法開発のために必須である。PMD 疾患モデル MSD マウスと PLP1 トランスジェニックマウスを維持・解析し、これにオリゴデンドロサイト初代培養などを併用し、候補薬スクリーニング、治療効果の評価、動物用 MRI を用いた脳画像解析、分子治療法など多面的に病態解明と治療法開発に向けた基礎研究に取り組んでおり、疾患の克服に向けた意義は大きい。

### C. 国際的意義

国際的な競争力を保ちつつ、効率的に研究を行うための国際共同研究は、希少な難治性疾患の克服のために重要である。多数 DNA 検体を用いたゲノム病態解析の共同研究から、患者家族会の国際交流の橋渡しまで、長年の研究を通じて培った人的関係を利用した国際交流を進めている。代表者はこれまで米国と仏国での PMD 国際シンポジウムに招待参加するなどしており、当該疾患に関わる研究者の国際的なネットワークに精通しているため、今後これを利用して国際交流をより深める。

## 5. 健康危険情報

特記事項無し

## 6. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

先天性大脳白質形成不全症の全国実態調査（第1報）

井上 健<sup>1</sup>、有馬恵里子<sup>1</sup>、小坂 仁<sup>2</sup>、黒澤健司<sup>3</sup>、高梨潤一<sup>4</sup>、  
山本俊至<sup>5</sup>、岩城明子<sup>6</sup>

1 国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第二部、2 神奈川県立こども医療センター 神経内科、3 神奈川県立こども医療センター 遺伝科、4 亀田メディカルセンター 小児科、5 東京女子医科大学 国際統合医科学インスティテュート、6 九州大学 生体防御医学研究所

研究要旨

先天性大脳白質形成不全症の患者数と診断・治療の実態を把握することを目的として、全国実態調査を開始した。疫学班と協力し、日本小児神経学会の共同研究支援の指定を得て、専門医所属施設を中心に918施設に郵送によるアンケート調査を行った。一次調査による患者数と診断の把握では、約7割の回収率で、91施設から約150症例を確認した。二次調査では、個別症例の詳細な調査票による臨床実態情報の収集を行う。現在、計画通りの日程で二次調査表の発送を終えた。

1. 研究目的

1. 研究目的

先天性大脳白質形成不全症は、遺伝性の中枢神経系髄鞘の形成不全を本態とする重篤かつ稀な神経疾患の一群で、代表的疾患として Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) が知られている。いくつかの原因遺伝子が同定され、病態が明らかになっている一方、臨床的には遺伝子検索はおろか診断未確定の患者も多いと考えられている。しかし、現在、先天性大脳白質形成不全症の患者数や診断、治療、予後の現状など疫学的な知見が全くなく、厚生労働行政の基盤となる情報が存在しないため、疫学調査による本邦の先天性大脳白質形成不全症患者の実態の把握が必要である。

2. 研究方法

全国実態調査により、先天性大脳白

質形成不全症の疫学的知見を明らかにする。実態調査のデザインは、難治性疾患疫学班（永井班）によるプロトコール（平成19年度）に則り、調査の方法など具体的な点は、疫学班の協力を得て行った。調査の対象は、症例の受診に関する特殊性を考慮し、小児神経科専門医を有する全国の医療・療育施設を中心に、大学病院小児科および全国の重症心身障害児施設など、計918施設に対して抽出率100%でアンケートによる調査を行った。これに先立ち、研究代表者の所属施設での倫理審査を行い、承認を得た。さらに、日本小児神経学会から本研究に対する共同研究支援の指定を得ることにより、回収率と研究参加へのモチベーションの向上を目指し、より質の高い調査研究を行うことを目指した。

調査は一次調査と二次調査の二段階で行うこととした。一次調査では葉

書による簡便な調査票により行い、罹患数と診断の概要の把握を行う。二次調査では、各症例を有する施設に対して、個別に詳細な調査票を送付し、臨床実態情報の収集を行う。さらに、これらの症例に関して、希望があるものに関しては、遺伝子診断の推進、生体試料の登録を進める。本年度は、一次調査票の発送、回収、および集計と二次調査の発送、回収までを行う。

### 3. 研究結果

#### A. 倫理審査について

本調査研究は、「疫学研究に関する倫理指針(平成20年12月1日一部改正)」に準拠して実施する必要がある。そこで、研究実施に先立ち、研究代表者所属施設である国立精神・神経センターにて、倫理審査を受けた。一次調査に関しては、個人情報を含め医療機関単位での該当疾患の患者の人数のみの把握であるので、倫理審査の対象にはならない。一方、二次調査は、個々の患者の診断や病歴、検査所見などを含むため、患者の個人情報を厳重に保護する必要があり、倫理審査の対象となる。本調査研究における二次調査の研究としての分類は、「人体試料を用いない」「既存資料のみの」「観察研究」である。また対象患者の氏名やその他の個人を容易に同定できる情報が含まれないので、個人情報保護法上の個人情報には該当しない。従って、「疫学研究に関する指針」による対象者のインフォームド・コンセントを必要としない研究に分類されるため、本調査においても、二次調査対象者からのインフォームド・コンセントを得ることは計画していない。

#### B. 調査票の作成と発送

一次調査票は、基本的にこれまで難

治性疾患疫学班で用いられてきた形式を踏襲した(参考資料I)。返信用葉書に該当疾患患者の有無と人数のみを記載する形をとった。先天性大脳白質形成不全症の診断基準は、これまで定められていないので、本調査用にPMD、PMLD、それ以外と3つのカテゴリーのみに簡略化した診断基準を作成した。合わせて遺伝子診断を施行済みの症例数の記載項目をもうけた。発送した918施設の内訳は、小児神経学会認定専門医が所属する医療関連施設747箇所、これに含まれない全国の医学部大学附属病院小児科48箇所、全国の国立、公立、および私立の重症心身障害児施設124箇所であった。

一次調査の発送は、平成21年11月に行ない、同月末日までの約1ヶ月の期限で回収した。平成22年1月までに、約55%の施設から回答を得ることができた。さらに、回収率をあげるため、未回答の施設に対して、再度返信用の葉書を含めた一次調査票と督促のお願いを平成22年1月に送付したところ、同年2月1日現在で計70%の施設より、返答を得ることができた。これは、同時期に同様の調査が数多く施行されている中で、非常に高い回収率であったと考えている。

二次調査票は、一次調査の結果に基づき、患者有りと回答が得られた施設に、患者の数分の二次調査票を送付し、封筒により返却する。二次調査票では同一患者の複数施設での登録を避けるため、氏名のイニシャルと生年月、および住居の県名の記載を求める。氏名、カルテ番号などの患者個人情報は医療機関で保存する対照表に記載してもらい、これの基づく通し番号のみを調査票に記載することにより、匿名化する。二次調査票はA4両面に、前述の基礎登録情報、診断、家族歴、遺伝子解析

の有無、通院の状況、臨床症状、検査所見、臨床経過、治療内容などの記載項目がある。

二次調査票の発送は、一次調査で患者有りとの回答を得た91施設に対して160人分の調査票を平成22年2月に発送した。同月末を期限として、平成22年2月現在、回収を待っている。

#### C 一次調査結果の概要

平成22年2月1日での一次調査の結果、91施設から計160名の患者有りの回答を得た。その内訳は、PMD 97例、PMLD 17例、その他の先天性大脳白質形成不全症が46例であった。うち、遺伝子検査による診断が行なわれているものは、PMD 62例、PMLD 2例、その他の先天性大脳白質形成不全症が6例であった。

#### 4. 考察

現段階では、個々の情報がないので、まだこれらの所見から、断定的な結論を導き出す段階ではないが、いくつかの興味深い所見を得ているので、これを列挙する。

- (1) PMD の患者数は100～200人程度と予想していたが、推定患者数も大方予想通りになると思われる。
- (2) PMLDあるいはその他の先天性大脳白質形成不全症の数は、予想よりも多かった。これはPMDが疑われながら、PLP1 遺伝子変異が見つからない症例がこのカテゴリーに含まれていると思われる。
- (3) その他の先天性大脳白質症性には、クラッペ病やアレクサンダー病など、先天性大脳白質形成不全症から除外されるべき疾患が含まれてしまっている可能性も高いので、これらは二次調査票の評価に当たり、注意が必要である。

#### 5. 結論

患者数と診断・治療の実態の把握を目的として全国実態調査の途中経過を報告した。疫学班と協力し、日本小児神経学学会の共同研究支援の指定を得て、専門医所属施設を中心に918施設に郵送によるアンケート調査を行った。一次調査による患者数と診断の把握では、約7割の回収率で、91施設から約160症例を確認した。今後、二次調査で個別症例の詳細な調査票による臨床実態情報の収集を行う。現在、計画通りの日程で二次調査表の発送を終えた。

#### 6. 研究発表

##### A. 論文発表

なし

##### B. 学会発表

井上 健、小坂 仁、黒澤健司、高梨潤一、山本俊至、岩城明子 先天性大脳白質形成不全症の全国疫学調査および遺伝子解析研究の推進について 第54回日本人類遺伝学会 2009年9月24日 東京

#### 7. 知的財産権の出願・登録状況

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

先天性大脳白質形成不全症の診断基準と治療指針の策定

井上 健<sup>1</sup>、小坂 仁<sup>2</sup>、黒澤健司<sup>3</sup>、高梨潤一<sup>4</sup>、山本俊至<sup>5</sup>、岩城明子<sup>6</sup>

1 国立精神・神経センター 神経研究所疾病研究第二部、2 神奈川県立こども医療センター 神経内科、3 神奈川県立こども医療センター 遺伝科、4 亀田メディカルセンター 小児科、5 東京女子医科大学 国際統合医科学インスティテュート、6 九州大学 生体防御医学研究所

**研究要旨** 現段階で疾患概念が確立されている先天性大脳白質形成不全症 10 疾患について、文献的検討をもとに診断基準の作成を行った。診断基準には、先天性大脳白質形成不全症として定義、症状や検査所見から各疾患の診断を進めるためのフローチャート、そして各疾患に関する概念と既知の情報についてまとめた。治療指針については、現時点で先天性大脳白質形成不全症には根治療法がないため、一般的な対症療法についての指針を作成した。

## 1. 研究目的

現在、先天性大脳白質形成不全症の診断基準として、少なくとも本邦で公表されているものは存在しない。そのため、先天性大脳白質形成不全症患者の診断の確定のための情報が十分でなく、確定診断に至っていない患者も少なくないと思われる。特に近年その疾患概念が確立されてきた先天性大脳白質形成不全症も複数存在することから、これらの疾患について、その分類や鑑別についてまとめた診断基準の策定は、臨床現場に有効な情報を提供することができると考えられる。そこで本研究課題では、最近の画像および遺伝学的解析の知見を加味した新たな先天性大脳白質形成不全症の診断基準を策定し、加えて主に対症療法ではあるが治療に関するガイドラインを作成することを目的とする。

## 2. 研究方法

先天性大脳白質形成不全症のうち、疾患概念や原因遺伝子が確定している

ものは、ごく最近まで代表的疾患である Pelizaeusu-Merzbacher 病 (PMD) などほんの数疾患しかなかった。PMD 以外の先天性大脳白質形成不全症の疾患概念が確立してきたのは、最近の 5 年程度のことであり、従ってこれらに関する文献数はまだ数えるほどしか存在せず、そのほとんどが少数症例の報告であるのが現状である。従って、本研究班における診断基準の策定には、多数例の検討を行ったような文献を重視して検討する近年の EBM を重視した診断基準の策定手法を用いるのは困難と判断し、現段階で報告されている各症例に関する文献を吟味し、これらの基づく診断基準を策定した。稀少疾患における診断基準の策定には、おそらくこういった手段を用いざるを得ないと考えられるが、今後、報告症例数が増加した際には、考慮に入れた再検討が望まれる。

治療指針については、一般的に考慮されるべき症状に対する治療法のガイ

ドラインとしてまとめた。現段階では先天性大脳白質形成不全症に対する根治療法は存在せず、身体的な合併症に対する対処療法が治療とケアの中心となっている。

### 3. 研究結果

診断基準と治療指針を作成した(参考資料 II)。

### 4. 考察

今回、本邦初の先天性大脳白質形成不全症に関する診断基準と治療指針を作成した。作成に関わったメンバーは先天性大脳白質形成不全症の画像、臨床、遺伝子診断、遺伝カウンセリングに実際に関わり、これらに関する研究を行なっている各専門家であり、臨床現場での問題から分子遺伝学的解析の最前線までを包括的に考慮した上で作成されたものとなっている。今後、この診断基準と治療指針が、先天性大脳白質形成不全症の適切な診断・治療・カウンセリングのための情報を提供し、希少疾患の医療現場での認知の向上に寄与することが期待される。

### 5. 結語

先天性大脳白質形成不全症に関する診断基準と治療指針を作成した。

### 6. 研究発表

#### A. 論文発表

なし

#### B. 学会発表

1. 井上 健、小坂 仁、黒澤健司、高梨潤一、山本俊至、岩城明子 先天性大脳白質形成不全症の全国疫学調査および遺伝子解析研究の推進について 第 54 回日本人類遺伝学会 2009 年 9 月 24 日 東京

### 7. 健康危険情報

特記事項無し

### 8. 知的財産権の出願・登録状況

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  
先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究

神奈川県立こども医療センター 神経内科 小坂仁、遺伝科 黒澤健司、  
国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第二部 井上 健

**研究要旨**；先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向け下記の研究を展開した。①遺伝子診断の実施および診断基準案の作成：

下記4疾患の遺伝子レベルでの、検索を継続し先天性大脳白質形成不全症の診断基準案を作成した。

- A) Pelizaeus-Merzbacher Disease, PMD
- B) Pelizaeus-Merzbacher Like Disease, PMLD
- C) Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum, HABC
- D) Hypomyelination and congenital cataract, HCC

②診断系の確立：

PLP1 変異のうちスプライシング異常の意義を検証するための mRNA 解析系の確立は、臨床上重要である。脳での発現量を 100 とした場合、血液：皮膚繊維芽細胞：iPS での相対発現量は 0：1：10-20 であった。iPS は PLP1mRNA 解析のための、あるいはそれ以外の髄鞘化不全原因遺伝子探索のリソースとしても重要なことが示唆された。また T7 リガーゼを用いて、線形に mRNA を増幅することにより、血液からも PLP1mRNA の検出が行えることを示した。

③治療基準作成：

市民公開セミナーを開催し当日のアンケートに応える形で治療基準を作成した。

④根本治療薬の開発：

PLP 重複による PMD 患者の治療薬開発を目的として細胞スクリーニングより得られた、候補薬の中から 8 種類を選定し、正常マウスに人で安全性が確認されている最大量を体重換算し、1 週間強制投与した。その後片側大脳より mRNA を抽出し、発現量を測定した。その結果、1 種類の薬物で mRNA の有意な減少をみた。(p<0.05)

## A. 研究目的

末梢神経の遺伝性ミエリン形成不全は、シャルコーマリーツース病と呼ばれ、難病に指定され、厚労省の班研究として疫学、治療研究が進んでいる。また主として成人で発症し、その罹患臓器である末梢神経を生検で得ることが容

易であるため、今までに 20 を超える遺伝子が単離され、一部の疾患では臨床治験が開始されている。一方我々の取り組んできた中枢神経のミエリン（大脳白質）の遺伝性形成不全は、通常重度の発達遅滞と運動障害を来たし原因不明の脳性麻痺として診断未定

の患者に多く、原因遺伝子はわずかに4つしか明らかにされておらず(*PLP*, *GJC2*, *DRCTNNB1A*, *SLC6A2*)、国内での頻度も不明である。我々の施設では2004年より、高度先進医療として先天性白質形成不全症の患者に対し proteolipid protein; PLP の遺伝子診断を行ってきた。今年度は、班研究として今までの解析・診断・診療研究を推進した。

#### (1) 遺伝子診断と基準案作成

国内外を問わず、当疾患の診断基準は存在しないため、分類も混乱しているのが現状であり、15年来この疾患解析に携わってきた実績をもとに、遺伝子診断の継続と診断基準案を作成した。

#### (2) 診断系の確立

*PLP1* の変異にはスプライシング異常をきたすと思われる変異が含まれる。これらの病因としての意義を検証するための mRNA 解析系の確立は、臨床重要である。従来血液からの、*PLP*mRNA 増幅は困難であったため、病因であるか否かの判定ができなかった、また患者から得られる組織として、血液以外に皮膚、剖検組織などがあるが、それらに加え今後は iPS の利用も可能になると思われ、それらにおける *PLP1* の mRNA の発現を調べ、診断のためのソースとしての有用性を検定する。

#### (3) 治療基準作成:

市民公開セミナーを行い、患者家族の要望を集積し、それに応える形で治療基準を作成する。

#### (4) 根本治療薬の開発:

PMD 患者数として最も多い、*PLP1* 遺伝子重複の治療薬開発のため内因性の *plp* 発現を認めるラット C6 グリオーマを用いた薬物スクリーニングより、得られた薬剤を正常マウスに投与し、個体での効果が得られる薬物を抽

出した。

## B. 研究方法

### (1) 遺伝子診断と基準案作成

PubMed を用い 疾患名、もしくは原因遺伝子名を入力し、得られた論文の内診断基準作成に役立つと思われる論文を抽出、要約した。また先天性白質形成不全症患者に対し、*PLP1* および *GJC2 DRCTNNB1* の塩基配列解析を行うとともに (PCR 条件およびプライマー配列のリクエスト:

hosaka@kcmc.jp,) 原因遺伝子の不明な C) に関しては、候補遺伝子の塩基配列決定を行った。なおこれらの症例の遺伝子解析研究においては施設内倫理委員会の承認を得ている。

### (2) 診断系の確立:

末梢血液、皮膚繊維芽細胞、iPS 細胞、大脳より RT-PCR 法を用いて、mRNA を抽出し、Sense: 5'-ATCTCA TCAATGTGATCCATGCC-3, Antisense: 5'- ATCCATGGGAGAA CACCAT -3'プライマーを用い、ヒト *PLP* 発現を検出した。

### (3) 治療基準の作成

第1回市民公開セミナー(平成21年7月18日)においてアンケートを配布し、回収し患者家族の問題点を抽出する。

### (4) 根本治療薬の開発

ラット神経芽細胞株由来 C6 グリオーマを用いた細胞実験により、内因性 *PLP* が 30%以上低下した食品化合物 14 種類を候補化合物とする。これらはすべて、食品中に含まれるものであり、安全性は確認されている。マウスは日本チャールズリバーより提供された *Crlj*: CD1(ICR)を用いる。入荷後1週間以上の馴化期間の後、ラット用経口ゾンデを用い、一匹あたり 0.2ml を連日強制経口投与する。Day 8 にエーテル麻酔下で後大静脈および下行

大動脈より放血後安楽死させ、左脳と右脳に分け液体窒素に凍結処理する。左脳は、TRIZOL を用い Total RNA を抽出し、オリゴ dT を用い、逆転写反応により cDNA を合成し、SYBER GREEN を用いた PCR 法を用い、PLP の発現量を定量。内因性のコントロールとして G6PDH および HPRT を用いた。

### C. 研究結果および考察

#### (1) マウス評価系の確立

A) に関しては、今年度も保険診療の範囲内で、原因遺伝子のプロテオリド蛋白(PLP)遺伝子の解析を行い、新規遺伝子変異(ミスセンス変異)を3例において見いだした。これらの解析、診療結果は診断基準案作成に反映した。B) に関しては、遺伝子レベルでの異常が判明した本邦初症例の、細胞レベルでの解析を進め臨床経過とともに報告した。C) に関しては原因遺伝子が確定していないため、髄鞘化に関わる候補遺伝子を、昨年、までに作成した中枢神経発現ライブラリーより選び、解析を行ったが現在までのところ患者3名に於いて、遺伝子異常を見いだし得なかった。D) については国内での報告例はない。臨床歴より、この疾患が疑われる2例について原因遺伝子の塩基配列決定を行い、いずれも片側アレルのミスセンス変異を見いだしたが、もう一方のアレル異常は、見いだせなかった。またこれらの解析結果も加味して、診断基準を提示した。

#### (2) 診断系の確立

脳での発現量を 100 とした場合、血液：ファイブプロブラスト：iPS での相対発現量は 0:1:10-20 であった。iPS は PLP mRNA 解析ためのリソースとして重要であることを示した。また PLP 遺伝子以外の髄鞘化不全原因遺伝子探索のリソースとしても重要なこ

とが示唆された。また発現の認められなかった、血液からも T7 リガーゼを用いて、線形に mRNA を増幅することにより、PLP の検出が行えることが明らかになった。

#### (3) 治療基準の作成

先天性大脳白質形成不全症の克服へ向けて～症状と診断、治療をめざした研究の現状と展望～ 第1回市民公開セミナーを神奈川県立こども医療センターにて開催した。当日約30家族、70名の出席者よりアンケート調査・回収を行い、医療上の問題点等の把握を行った。その結果、精神運動発達遅滞、てんかん、筋緊張亢進、股関節の癒性脱臼、呼吸障害・摂食障害等への対応に対する治療案の提示が強く望まれており、これらにつき治療基準を作成した。またセミナーの参加者に当日のビデオを後日郵送で配布した。患者家族からは、同様の会が継続的に行われることが強く要望された。当日、今年度の責任者が選出され、メーリングリスト等を通じて、情報交換が行われることになった。

#### (4) 根本治療薬の開発

ラット C6 グリオーマを用いた薬物スクリーニングより、得られた薬剤のうち、6剤について、正常マウスに投与しコントロールと比較した。mRNA の低下は、細胞実験に比べて少ない傾向であったが、一つの薬剤に於いて優位な低下( $P < 0.05$ , two tailed p-test) を認めた。今後、PLP1 遺伝子の過剰発現を認める、トランスジェニックマウスへの投与を通じて、有用性を検討したい。

### D. 研究発表

#### 論文発表

- 1) Goto, A., Wang, Y. L., Kabuta, T., Setsuie, R., Osaka, H., Sawa, A.,



- Ishiura, S., and Wada, K. Proteomic and histochemical analysis of proteins involved in the dying-back-type of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy (gad) mouse. *Neurochem Int.* 2009; 54: 330-338
- 2) Ogiwara I, Ito K, Sawaishi Y, Osaka H, Mazaki E, Inoue I, Montal M, Hashikawa T, Shike T, Fujiwara T, Inoue Y, Kaneda M, Yamakawa K. De novo mutations of voltage-gated sodium channel alphaII gene SCN2A in intractable epilepsies. *Neurology.*
- 3) Osaka H Koizume S, Aoyama H, Iwamoto H, Kimura S, Nagai J, Kurosawa K, Yamashita S. Mild phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a PLP1-specific mutation. *Brain Dev* (2009), doi:10.1016
- 4) Tsuji M, Aida N, Obata T, Tomiyasu M, Furuya N, Kurosawa K, Errami A, Gibson M, Salomons G, Jakobs C, Osaka H . A New Case of GABA Transaminase Deficiency Detected with Proton MR Spectroscopy. *J Inherit Metab Dis,* (2010)10.1007/s10545-009-902 2-9
- Gibson, GS Salomons, C Jakobs, H Osaka. Proton MR Spectroscopy Identifies GABA Transaminase Deficiency Neuroscience meeting , Oct 17-21,2009 Chicago
- 2) Drug screening for Pelizaeus-Merzbacher Disease. Hitoshi Osaka ,Hiroko Shinbo, Shiro Koizume, Kenji Kurosawa, Sumimasa Yamashita 第 51 回日本小児神経学会、English Session 2009.5.28-30, 米子
- 3) 露崎悠、高木篤史、渡辺好宏、辻恵、鮫島希代子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、新家敏弘 小坂仁 MRS が診断に有用であった Creatine transporter deficiency の一例.第 51 回日本先天代謝異常学会総会・第 8 回アジア先天代謝異常症シンポジウム 2009.11.5-7 東京
- 4) 小坂 仁. 先天性大脳白質形成不全症はどんな病気？(教育講演) 先天性大脳白質形成不全症の克服へ向けて～症状と診断、治療をめざした研究の現状と展望～ 第 1 回市民公開セミナー主催：厚生労働科学研究補助金難治性疾患克服研究事業「先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究」班 平成 21 年 7 月 18 日, 横浜

学会発表

- 1) M Tsuji, A Noriko, T Obata, M Tomiyasu, A Takagi, K Sameshima, M Iai, S Yamashita, N Furuya, K Kurosawa, KM

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

Pelizaesus-Merzbacher の遺伝カウンセリング

分担研究者 黒澤 健司 神奈川県立こども医療センター 遺伝科

研究協力者 小坂 仁 同 神経内科  
研究協力者 永井 淳一 同 検査科  
研究協力者 西川 智子 同 認定遺伝カウンセラー

研究要旨

Pelizaesus-Merzbacher 病 (PMD) の遺伝カウンセリングの難しさは、本疾患が 1) 遺伝的異質性の高い先天性大脳白質形成不全症の一つであることのほかに、2) 児の診断が母親の保因者状態を示唆すること、3) 診断確定を目的とした検査では X 連鎖性疾患としての説明のほかに染色体異常症に由来する場合を想定し多くの説明が必要なこと、などが上げられる。現在まで当施設では 69 家系の解析を行い、PLP1 重複を 16 家系（転座 1 家系、挿入 1 家系）、遺伝子内変異を 5 家系に検出した。重複家系 11 家系で母親の保因者診断がなされていた。直接面接をして、次子の希望がある（あった）と答えた家系は、6 家系であった。保因者診断施行率および次子希望の割合は、他の遺伝性疾患と比較しても低くない。この背景に、PMD が家族に受容されていることや遺伝的問題が正確に理解されていること、などが上げられる。面接を通して明らかとなった家族の葛藤を、文献的考察を加えつつまとめた。（本症の遺伝子解析研究においては、施設内倫理委員会の承認を得ている）

A. 研究目的

遺伝カウンセリングとは、疾患の特性、遺伝様式、疾患がもつ意味を患者とその家族に伝え、理解を促し、医学的かつ個人的な決断が下せるように援助するプロセスを意味する。米国人類遺伝学会（1975）でも、遺伝カウンセリングをある家系の遺伝疾患の発症や発症のリスクに関連した人間の問題を扱うコミュニケーションの過程と定義づけ、適切な訓練を受けた 1 人以上の人間が当事者や家族に援助を行うこととしている。その援助とは、  
1) 診断、疾患のおおよその経過、実

施可能な治療法などの医学的事実を理解すること、2) その疾患に関与している遺伝様式および特定の血縁者に再発するリスクを正しく評価すること、3) 再発のリスクに対応するためのいくつかの選択肢を理解すること、4) リスクとその家族の最終目標、その家族の倫理的・宗教的価値基準などを考慮したうえで、その家族にとって適切と思われる一連の方策を選択できるようにし、その決断に従って実行できるようにすること、5) 患者またはリスクのある家族に対して、実行可能でもっともよい調整を行うこと、などを