

含む。疾患がもつ意味は、それぞれの個人にとって捉え方が異なり、また、文化や宗教の影響も受ける。わが国においては、臨床遺伝専門医および認定遺伝カウンセラーが専門職として遺伝カウンセリングに関わっている。Pelizaeus-Merzbacher 病は X 連鎖劣性遺伝形式をとる代表的な先天性大脳白質形成不全症の一つである。その診断においては遺伝カウンセリングが診療の一環として不可欠である。我々は本疾患の遺伝子診断を診療として取り入れ、現在まで 69 家系を解析し、16 家系に重複変異を、5 家系に遺伝子内変異を検出した。このうち、8 家系においては遺伝カウンセリングを通してその家系における診断の意義などを患者家族とともに考えてきた。こうした診療経験を通して、今回 Pelizaeus-Merzbacher 病の診断における遺伝カウンセリングの意義をまとめた。

## B. 研究方法

対象は、診断確定を目的として神奈川県立こども医療センターを紹介受診し、実際に PLP1 遺伝子の変異を検出した家系である。PLP1 の遺伝子診断は、平成 19 年度までは厚生労働省承認の先進医療として行われ、平成 20 年度の本疾患の保険収載以降は、保険診療として行われた。本疾患の遺伝子診断および解析研究は、神奈川県立こども医療センター倫理会議における承認のもとで行われた。解析研究における同意は、臨床遺伝専門医が説明文書を用いて十分な時間をかけて説明し、患者ないしは患者の代理人（親権者）による同意書の署名をもってなされた。遺伝カウンセリングの意義および問題点を検討するにあたっては、全ての個人情報潜在化され、同定不可能な形でまとめられた。遺伝子解析の方法は、

1 次スクリーニングとして患者末梢血液より抽出したゲノム DNA を用いて定量 PCR を行い、PLP1 重複の有無を検討した。また、PLP1 を含む BAC クローン RP11-832L2 を検出プローブとして、PAC クローン RP1-164F3 をコントロールプローブとして末梢血液リンパ球の間期核 FISH により、PLP1 重複を検討した。FISH 解析を目的とした検体処理は、通常の方法にしたがった。遺伝子診断の前後で行われる遺伝カウンセリングは、全て臨床遺伝専門医によって行われ、平成 19 年度からは認定遺伝カウンセラー（日本人類遺伝学会、日本遺伝カウンセリング学会認定）の資格を有するスタッフが協働するシステムをとっている。臨床症状の評価は、小児神経専門医によって行われ、診療体制はこれらスタッフのチーム医療として成り立っている。

## C. 研究結果

現在まで、69 家系の遺伝子解析を行い、PLP1 遺伝子重複を 16 家系に、PLP1 遺伝子内変異を 5 家系に検出した。遺伝子重複 16 家系のうち 2 家系は、6 番染色体への転座によるもの、および Xq21 領域への挿入によるものであった。遺伝子内変異では、アミノ酸置換をもたらすコード領域の変異のほかに、非コード領域のスプライス異常をもたらす変異も含まれていた。これらの変異検出家系のうち、3 家系における遺伝カウンセリングをまとめた。

いずれの家系も紹介医より Pelizaeus-Merzbacher 病の疾患概要や遺伝形式について説明は受けているものの、正確に理解している家系は少なく、遺伝子解析を前提としてあらためての説明は理解を促すために重要であった。小児神経専門医による病態説

明とは別に、遺伝に関する問題を臨床遺伝専門医から説明することにより、遺伝子診断が患者の診断確定と同時に、対象家系における変異がもたらす影響を確認することができた。さらに、担当医（臨床遺伝専門医）の説明の後に、認定遺伝カウンセラーと家族の面談の時間を別に設定することにより、家族が置かれた状況をより広く把握することが可能となった。認定遺伝カウンセラーは受診のサポート（受診手続、診療科から診療科への移動のナビゲートも含む）をしつつ、祖父母も含めた家族の疾患に対する理解を確認し、考え方の違いを把握し、さらに家族関係の調整を行い、自己決定を支援する役割を果たした。認定遺伝カウンセラーの介入によって夫婦間の遺伝子診断に関する認識のずれや、発端者の祖父母と父母の考え方の違いを整理することができた。家系によっては、遺伝学的検査の日程を先へ延ばし、さらに家族間の調整を行うこともあった。

解析結果は、2回目の面談時に両親揃った場面を設定し、開示された。保因者診断は対象患者の結果開示の後に、日を改めて、当事者（母親）の意向を確認しておこなった。重複家系11家系（他施設での遺伝カウンセリング症例も含む）で、母親の保因者診断がなされ、6家系で次子拳児希望を前提として検査に臨んだことを確認した。この比率は、他の遺伝性疾患と比較しても決して低いとは考えられず、疾患の理解と結果の受容が得られたことを示したものと推察された。

#### D. 考察

Pelizaeus-Merzbacher 病の遺伝カウンセリングにおける問題は、1) 先天性大脳白質形成不全症は遺伝的異質性が高く、臨床症状のみでは診断の確

定が不可能であること、2) 原因となる遺伝子変異の種類が染色体転座・挿入からスプライス異常まで幅広くあり、検査前のカウンセリングにおける理解が難しいこと、3) X連鎖劣性遺伝という遺伝様式から、児の診断を目的とした検査でありながら、児の主たる介護養育の当事者である母親の保因者状態を示唆することになり、医療管理上必要とされる診断の確定を希望する思いと、自分自身が保因者であることを積極的に明らかなとしたいくない思いとの間に葛藤が起こること、などが上げられる。こうした問題点を考慮し、我々の施設では小児神経専門医、臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラーからなる専門診療チーム（外来）を組み、対応することとした。実際に来院して面接を進めた家系では、遺伝子診断結果に対して前向きに受容でき、結果を踏まえての保因者診断、さらには次子拳児への意向も表出され、夫婦間の考え方の違いを面接を進めるにつれて狭めることが可能であった。このことは、こうした専門診療チームが本疾患において極めて重要であることを意味する。

Pelizaeus-Merzbacher 病の遺伝学的特長 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GeneTests>) をまとめると以下のようになる。

##### 1) 男性発端者の親

発端者の父親は発症せず、変異の保因者でもない。罹患児および1名の別の家系内罹患者を有する女性は、ヘテロ接合（保因者）である。家系解析で発端者が唯一の家系内罹患者であった場合は、その罹患男性の母親は保因者であるか、あるいは、その罹患男性は PLP1 遺伝子の新生突然変異の可能性がある。実際には、家族歴の有無にかかわらず発端者の母親は殆どの場合、PLP1 遺伝子変異の保因者である。新

生突然変異例は、主に PLP1 遺伝子の点変異例で報告されてきた[Dlouhy et al 1993, Pratt et al 1995, Hodes et al 1998]が、父方由来（母方祖父）の生殖細胞系列の変異による PLP1 重複変異では、新生突然変異の報告はない[Woodward, Kendall, Vetrie, Malcolm 1998; Mimault et al 1999]。

## 2) 男性発端者の同胞

同胞におけるリスクは、母親が保因者であるか否かにより異なる。PLP1 変異を有する女性が、児に変異を受け渡す可能性は 50% である。変異を受け継いだ男性は罹患する；変異を受け継いだ同胞女性は保因者となり、ときに軽度から中等度の症状を呈することもある。注意すべき点として、罹患男性において比較的軽症の神経学的症状をもたらす PLP1 アレルは、ヘテロ接合の女性での神経学的徴候と関連する傾向がある。また、性腺モザイクも注意する必要がある。この場合は、母親の DNA で病因となる変異が検出されなくても、発端者の同胞が病因となる変異を受け継ぐ可能性は一定の確率である[Woodward et al 2003]。罹患男性の症状が比較的軽症（複雑型、あるいは純粋な痙性対麻痺）の場合には、同胞女性では神経学的徴候がより出現しやすくなる[Hurst et al 2006]。ヘテロ接合女性が臨床的に罹患する可能性が最も高いのは、兄弟が PLP1 ナル(null) の場合で、可能性が最も低いのは兄弟が PLP1 重複の場合である。PLP1 重複のヘテロ接合女性は偏った X 染色体不活化状態を有していることが報告されている[Woodward et al 2000]。

## 3) 男性発端者の子孫

典型的な PMD 男性は子孫を残せないが、痙性対麻痺の患者では生殖能力がある。罹患男性は、その全ての娘に PLP1 変異を受け渡すことになり、息

子に受け渡すことはない。

## 4) 男性罹患者の他の家族

発端者の母方おばやその子孫は、保因者あるいは罹患者になる可能性がある（性や家系内の近さ、発端者の母親が保因者かどうかにもよる）。罹患男性がそれほど重症でない場合には、ヘテロ接合女性は神経学的徴候（大抵の場合、成人発症の痙性対麻痺）を呈することがある。

## 2. 保因者診断

ヘテロ接合女性は、一般的には神経学的に正常だが、ときに軽度から中等度の症状を呈することもある。分子遺伝学的検査で保因者診断が可能なのは、PLP1 の病因変異が罹患家族で同定されている場合か、家系内連鎖解析で明らかになっている場合である。

## 3. 遺伝カウンセリングに関連したその他の問題

### 1) 表現型の多様性

児が罹患者になる可能性があるカップルに、同じ家系内の同胞や血縁者間でもさまざまな表現型（症状）があることを認識させることは重要である。男性罹患者が軽症である家系では、次世代では重症となることもある。

### 2) Xq22 から離れた座位への挿入重複

Xq22 から離れて挿入された重複は、PLP1 関連疾患の稀な原因となることがあるが、遺伝カウンセリング上難しい問題をもたらす。理由は、遺伝様式として必ずしも X 連鎖でなくなるからである[Hodes et al 2000; Inoue, Osaka et al 2002]。

### 3) 家族計画

遺伝的リスクを決定し、保因状況を明らかにし、出生前診断の適用を相談する時期は、妊娠前が望ましい。

Pelizaesus-Merzbacher 病の医療は、上述の問題を踏まえた適切な遺伝カウ

セリングを行い、遺伝医療の大きな枠組みの中で進めるべきと考えられた。

#### E. 結論

Pelizaeus-Merzbacher 病の診断における遺伝カウンセリングの重要性・意義をまとめた。その医療には、小児神経専門医（神経内科専門医）、臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラーが不可欠で、時間をかけた診療（遺伝カウンセリング）が重要であり、疾患の理解は両親の前向きな気持ちを促し、結果として児の予後にも影響を与えることが推測された。今後、Pelizaeus-Merzbacher 病の自然歴を明らかにし、遺伝カウンセリングに応用してゆくことが課題である。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Fujita K, Aida N, Asakura Y, Kurosawa K, Niwa T, Muroya K et al. Abnormal basiocciput development in CHARGE syndrome. *Am J Neuroradiol* 2009;30: 629-34.
2. Kuniba H, Yoshiura KI, Kondoh T, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H et al. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J Hum Genet* 2009;54:304-9.
3. Yamanaka M, Ishikawa H, Saito K, Maruyama Y, Ozawa K, Shibasaki J, Nishimura G, Kurosawa K. Prenatal Findings of Paternal Uniparental Disomy 14: Report of Four Patients. *Am J Med Genet Part A* (in press)
4. Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M. et al. Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates Prader-Willi syndrome-like phenotype. *J Pediatr*. 2009 Dec;155(6): 900-903.e1. Epub 2009 Oct 1.

5. Tsuji M, Aida N, Obata T, Tomiyasu M, Furuya N, Kurosawa K, Errami A, Gibson KM, Salomons GS, Jakobs C, Osaka H. A new case of GABA transaminase deficiency detected with proton MR spectroscopy. *J Inherit Metab Dis* (in press)
6. 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* (in press)
7. Tsuyusaki Y, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi N, Osaka H, Yamamoto K, Kurosawa K. 1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype. *Pediatr Int* (in press)

##### 学会発表

1. Enomoto K, Iju K, Kurosawa K, Ohta M. A new case of Double Aneuploidy Mosaicism: 47,XX,+8 / 45,X. American Society of Human Genetics, 59<sup>th</sup> Annual Meeting, 2009. 10. 20-14, Honolulu.
2. Saitsu H, Kurosawa K, Kawara H, Eguchi M, Mizuguchi T, Harada N et al. Characterization of the complex 7q21.3 rearrangement in a patient with bilateral split-foot malformation and hearing loss. American Society of Human Genetics, 59<sup>th</sup> Annual Meeting, 2009.10.20-14, Honolulu.
3. Kurosawa K, Tanaka M, Osaka H, Ohashi H, Hamano S, Enomoto K, et al. Complex chromosomal rearrangements in a girl with Pelizaeus-Merzbacher disease. American Society of Human Genetics, 59<sup>th</sup> Annual Meeting, 2009.10.20-14, Honolulu.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

## 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

分担研究者 高梨潤一 亀田メディカルセンター小児科

### 研究要旨

先天性大脳白質形成不全症の病態解明、新たな治療法の開発に向けて脳画像研究を行った。先天性大脳白質形成不全症の代表疾患である Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) において従来行ってきた脳 MRI, MRS 研究の延長として、PMD モデルマウス (MSD マウス) を放射線医学総合研究所の 7 テスラ MR 装置を用いて撮像した。MRI として T1, T2 強調画像、線条体において proton MRS を施行した。

体重わずかに 5-20g のマウス脳の画像を明瞭に描出しえた。T2 強調画像にて MSD マウス白質は正常マウス白質に比して高信号を呈し、T2 map では T2 値の有意な延長を認めた。皮質、線条体においても T2 値の延長を認め、その程度は白質 > 線条体 > 皮質であった。白質髄鞘形成不全を反映した所見と考えられた。MRS では、2mm 立方の関心領域からスペクトル採取を施行し N-acetylaspartate の上昇と Choline (Cho) の低下を認めた。Cho は髄鞘のマーカーであり、その低形成を反映した所見と考えられた。先天性大脳白質形成不全症モデルマウスにおいて脳代謝の非侵襲的解析が可能となり、新たな治療法の有用性評価などに応用可能と思われる。

#### A. 研究目的

先天性大脳白質形成不全症は、重篤な症状を呈する中枢神経系の難病である。PLP1 などいくつかの疾患原因遺伝子が同定されているが、髄鞘形成不全における病態は十分には理解されていない。本研究の目的は脳 MRI を用いて非侵襲的に病態の解明、治療法の開発に貢献することである。

先天性大脳白質形成不全症の病態解明、新たな治療法の開発には、モデルマウスを用いた検討が欠かせない。従来、モデルマウスの評価には剖検や行動評価が用いられているが、脳内代謝

を非侵襲的に測定することは困難であった。そこで、超高磁場 MRI 装置を用い、PLP1 自然発生変異体の先天性大脳白質形成不全症モデルマウスである MSD マウス脳を非侵襲的に測定することが本年度の目的である。

#### B. 研究方法

対象は 3 週齢の正常マウス (B6C3-WT、雄) と Pelizaeus-Merzbacher 病のモデルマウス (MSD マウス、B6C3-MSD) である。放射線医学総合研究所にて動物実験研究承諾を得たのち、Bruker 社製 7 テスラ MR 装置を用いて T1, T2 強調画

像、拡散強調画像、proton MR spectroscopy (MRS, PRESS 法, TR=2500msec, TE=20msec, NEX 256, VOI=2x2x2mm or 3x3x3mm) を撮像した。MRS は LCModel を用い解析を行った。

### C. 研究結果

T1, T2 強調画像ではマウス脳の画像を明瞭に描出しえた。T2 強調画像にて MSD マウス白質は正常マウス白質に比して高信号を呈した。T2 map では白質、線条体、皮質すべてで T2 値の有意な延長を認め、その程度は白質 > 線条体 > 皮質であった。拡散強調画像は呼吸性変動のためか評価は困難であった。MRS では、LCModel を用い高感度のデータ (NAA の %SD=4-7) を撮像しえた。MSD マウスでは N-acetylaspartate (NAA)/creatine (Cr)の上昇と Choline (Cho)/Cr の低下を認めた。

### D. 考察

T2 値の延長は髄鞘低形成に伴う自由水の相対的增加を反映していると考えられる。また Cho は髄鞘のマーカーであり、髄鞘低形成を直接反映した所見と考えられた。T2 値と Cho は髄鞘低形成のマーカーとして応用可能と考えられた。NAA の高値は NAAG の上昇を反映している可能性が考えられた。今後病理との相関により、原因を解明していきたい。

### E. 結論

7T MR 装置を用いた画像解析はマウスにも十分適応可能である。モデルマウス脳代謝の非侵襲的解析が可能となり、新たな治療法の有用性評価などに応用可能と思われる。

### F. 研究発表

#### (1) 論文発表

1. Sasaki M, Takanashi J, Tada H, Sakuma H, Furushima W, Sato N. Diffuse cerebral hypomyelination with cerebellar atrophy and hypoplasia of the corpus callosum. *Brain Dev* 2009; 31: 582-587.
2. Takanashi J. Two newly proposed encephalitis/encephalopathy syndromes. *Brain Dev* 2009; 31: 521-528.
3. Takanashi J, Tada H, Kuroki H, Barkovich AJ. Delirious behavior in influenza is associated with a reversible splenial lesion. *Brain Dev* 2009; 31: 423-426.
4. Takanashi J, Tada H, Terada H, Barkovich AJ. Excitotoxicity in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. report of 3 cases. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009; 30: 132-135.
5. Takanashi J, Tada H, Ozaki H, Barkovich AJ. Malformations of cerebral cortical development in oral-facial-digital syndrome type VI. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009; 30: e22-e23.
6. Takanashi J, Tada H, Maeda M, Suzuki M, Terada H, Barkovich AJ. Encephalopathy with a reversible splenial lesion is associated with hyponatremia. *Brain Dev* 2009; 31: 217-220.
7. Hashimoto Y, Takanashi J, Kaiho K, Fujii K, Okubo T, Ota S, Kohno Y. A splenial lesion with

transiently reduced diffusion in clinically mild encephalitis is not always reversible. *Brain Dev* 2009; 31: 710-712.

8. Fujii K, Minami N, Hayashi Y, Nishino I, Nonaka I, Tanabe Y, Takanashi J, Kohno Y. Homozygous female Becker muscular dystrophy. *Am J Med Genet A* 2009; 149A: 1052-1055.
  9. Okumura A, Lee T, Shimojima K, Hisata K, Shoji H, Takanashi J, Yamamoto T, Shimizu T, Barkovich AJ. Brainstem disconnection associated with nodular heterotopia and proatlantal arteries. *Am J Med Genet A* 2009; 149A: 2479-2483.
  10. Tanuma N, Miyata R, Kumada S, Kubota M, Takanashi J, Okumura A, Hamano S, Hayashi M. The axonal marker tau protein in the cerebrospinal fluid is increased in patients with acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Brain Dev* in press.
  11. Ninchoji T, Takanashi J. Pontine hypoplasia in 5p- syndrome; a key MRI finding for a diagnosis. *Brain Dev* in press.
  12. Imamura T, Takanashi J, Yasugi J, Terada H, Nishimura A. Sisters with clinically mild encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS)-like features; familial MERS? *J Neurol Sci* in press.
1. 高梨潤一. 熱性けいれん重積、二相性脳症 (acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion [AESD]) における脳代謝、特にグルタミン酸の研究. てんかん治療研究振興財団研究年報 第 20 集 2009. 財団時報 2009; 20: 89-94.

#### 和文 著書

1. 高梨潤一: 小児神経疾患・Proton MRS の臨床有用性コンセンサスガイド 2009 年度版 日本磁気共鳴医学会 Proton MRS の臨床有用性検討会編 32-42, 2009
2. 高梨潤一: 小児脳. 磁気共鳴スペクトルの医学応用. インナービジョン社 in press.

#### (2) 学会発表 講演

1. 高梨潤一: 脳炎・脳症の画像診断. 第 68 回日本医学放射線学会総会
2. Jun-ichi Takanashi: Moyamoya disease in children. 10th Asian Oceanian Congress of Child Neurology (アジア大洋州小児神経学会)
3. 高梨潤一: 頭部 MRI からせまる先天代謝異常、神経変性疾患. 第 5 回 日本先天代謝異常学会セミナー
4. 高梨潤一: 脳梁膨大部に可逆性病変を有する脳炎・脳症. 第 14 回 日本神経感染症学会学術集会
5. 高梨潤一: 脳幹・小脳の先天奇形. 第 4 回 小児神経放射線研究会
6. 高梨潤一: 小児急性脳症の臨床と画像. 第 9 回 広島小児救急研究会
7. 高梨潤一: 小児急性脳症の臨床と画像. 第 100 回 宮城神経放射線研究会
8. 高梨潤一: 今日はどっぶり MRI:

#### 和文

T1, T2 強調画像から拡散強調、  
MRスペクトルスコピーまで。 第  
15 回 日本小児神経学会東北地方  
会

G. 知的財産権の出願・登録状況  
無し



厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業研究事業)  
分担研究報告書  
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

分担研究者 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

**研究要旨**; 臨床的に Pelizaeus-Merzbacher 病と診断される先天性大脳白質形成不全症の多くは PLP1 遺伝子の重複あるいは遺伝子変異による。しかしながら実際には分子生物学的、あるいは細胞遺伝学的検査によっても診断が得られない症例が存在する。これは遺伝的異質性が存在するためである。診断率の向上と遺伝学的異質性の原因となっている他の候補遺伝子を見出すことを目的として網羅的遺伝子診断を行い、それら遺伝子型と臨床症状の関連について検討した。PLP1 の重複を示した症例の重複サイズは PMD の臨床症状の重症度と相関しておらず、重症度を規定する要因として、重複ゲノム領域の大きさではなく、重複が起こった領域の複雑なゲノム構造異常の関わりが想定され、さらに詳細な検討が必要である。PLP1 の点変異を示す症例は全て重度であった。研究対象とした症例の半数でのみ PLP1 の変異を同定できたが、残り半数では GJC2 と SLC16A2 においても変異が認められず、これ以外にまだ明らかになっていない大脳白質形成不全を来たす遺伝子が存在していると考えられるため、さらに検討が必要である。

#### A. 研究目的

臨床的に Pelizaeus-Merzbacher 病と診断される先天性大脳白質形成不全症の多くは PLP1 遺伝子の重複あるいは遺伝子変異による。しかしながら実際には分子生物学的、あるいは細胞遺伝学的検査によっても診断が得られない症例が存在する。これは遺伝的異質性が存在するためであり、PLP1 を解析しても診断が得られない場合は PLP1 遺伝子以外の遺伝子の変異によるものであることが示唆される。その一方、PLP1 の変異には翻訳領域の点変異だけではなく、多彩な変異が存在するため、PLP1 変異の見落としの可能性もある。そこで、本研究では、診断率の向上と遺伝学的異質性の原因となっている他の候補遺伝子を見出すことを目的として網羅的遺伝子診断を行い、それら遺伝子型と臨床症状の関

連について検討した。

#### B. 研究方法

臨床的に PMD と診断された患者 27 名を対象とした。学内倫理委員会の承諾を得て作成された説明書に基づき説明し、書面によるインフォームドコンセントを得たのち、患者から末梢血液を通常どおり採取した。

全血からゲノム DNA を抽出し、PLP1 の全エクソンの塩基配列を直接塩基決定法により解析すると同時に、MLPA 法により全エクソン領域のゲノムコピー数解析を行い、点変異の有無と PLP1 の重複の有無を解析した。重複が確定できない 4 症例に関してはアレイ CGH 法でその領域範囲を解析した。PLP1 の重複が確定した患者検体については fiber-FISH 法で重複の挿入方向を確認した。

上記の検索によっても *PLP1* の変異あるいは重複が確認できなかった症例は *GJC2* と *SLC16A2* の解析を行った。

### C. 研究結果

MLPA 法により、*PLP1* の重複が疑われる所見を示した7症例についてアレイ CGH 法で重複領域を決定し、いずれも 1 Mb 以下であった。このうち1例は過去に報告のない、*PLP1* の部分重複を示した。Fiber-FISH による解析により、全例タンデム方向で挿入していることが明らかになった。点変異に関しては、6例において変異を見出し、5種類は新規変異であり、残りの1種類は既知の変異であった。変異の認められなかった14例に関しては *GJC2*、*SLC16A2* とも変異を認めなかった。

臨床症状に関しては、*PLP1* の重複を示した例のうち3例は自立歩行能力を獲得できた時期があり、比較的症状が軽かったと考えられる。3例の重複サイズは比較的が小さかったが、他の重複サイズが小さな症例でも症状が重い例があり、重複領域のサイズと症状の重症度には相関を認めなかった。その一方、*PLP1* の点変異例はいずれも予定の獲得ができておらず、*PLP1* の重複例と比べて症状が重いことが明らかになった。

### D. 結論

*PLP1* の重複のサイズは PMD の臨床症状の重症度と相関しておらず、重症度を規定する要因として、重複ゲノム領域の大きさではなく、重複が起こった領域の複雑なゲノム構造異常の関わりが想定され、さらに詳細な検討が必要である。研究対象とした症例の半数でのみ *PLP1* の変異を同定できたが、残り半数では *GJC2* と *SLC16A2*

においても変異が認められず、これ以外にまだ明らかになっていない大脳白質形成不全を来たす遺伝子が存在していると考えられるため、さらに検討が必要である。

### E. 研究発表 論文発表

- 1) Komoike Y, Shimojima K, Liang J-S, Fujii H, Maegaki Y, Osawa M, Fujii S, Higashinakagawa T, Yamamoto T : A functional analysis of GABARAP on 17p13.1 by knockdown zebrafish. *Genesis* (in press).
- 2) Komoike Y, Fujii K, Nishimura A, Hiraki Y, Hayashidani M, Shimojima K, Nishizawa T, Higashi K, Yasukawa K, Saitsu H, Miyake N, Mizuguchi T, Matsumoto N, Osawa M, Kohno Y, Higashinakagawa T, Yamamoto T : Zebrafish gene knockdowns imply roles for human YWHAG in infantile spasms and cardiomegaly. *J Hum Genet* (in press).
- 3) Shimojima K, Inoue T, Hoshino A, Kakiuchi S, Watanabe Y, Sasaki M, Nishimura A, Takeshita-Yanagisawa A, Tajima G, Ozawa H, Kubota M, Tohyama J, Sasaki M, Oka A, Saito K, Osawa M, and Yamamoto T : Comprehensive genetic analyses of *PLP1* in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease applied by array-CGH and fiber-FISH analyses identified new mutations and variable sizes of duplications. *Brain Dev* (in

- press).
- 4) Shimojima K, Inoue T, Fujii Y, Ohno K, Yamamoto T : A familial 593-kb microdeletion of 16p11.2 associated with mental retardation and hemivertebrae. *Eur J Med Genet* 52 : 433-435, 2009.
  - 5) Shimojima K, Komoike Y, Tohyama J, Takahashi S, Páez MT, Nakagawa E, Goto Y, Ohno K, Ohtsu M, Oguni H, Osawa M, Higashinakagawa T, Yamamoto T : TULIP1 (RALGAPA1) haploinsufficiency with brain development delay. *Genomics* 94 : 414-422, 2009.
  - 6) Shimojima K, Yamamoto T : ACTA2 is not a major disease-causing gene for moyamoya disease. *J Hum Genet* 54 : 687-688, 2009.
  - 7) Liang J-S, Shimojima K, Ohno K, Sugiura C, Une Y, Ohno K, Yamamoto T : A newly recognized microdeletion syndrome of 2p15-16.1 manifesting moderate developmental delay, autistic behavior, short stature, microcephaly, and dysmorphic features: a new patient with 3.2-Mb deletion. *J Med Genet* 46 : 645-647, 2009.
  - 8) Yamamoto T, Páez MT, Shimojima K : Comment on "Altered DNA copy number in patients with different seizure disorder type: By array-CGH" by Kim HS et al. *Brain & Development* 2007;29:639-643. *Brain Dev* 31 : 94, 2009.
  - 9) Shimojima K, Tanaka K, Yamamoto T : A de novo intrachromosomal tandem duplication at 22q13.1q13.31 including the Rubinstein-Taybi region but with no bipolar disorder. *Am J Med Genet* 149A(6) : 1359-63, 2009.
  - 10) Shimojima K, Yamamoto T : Investigation of the candidate region for trigonocephaly in a patient with monosomy 9p syndrome using array-CGH. *Am J Med Genet* 149A : 1076-1080, 2009.
  - 11) Shimojima K, Adachi M, Tanaka M, Tanaka Y, Kurosawa K, Yamamoto T : Clinical features of microdeletion 9q22.3 (pat). *Clin Genet* 75 : 384-393, 2009.
  - 12) Shimojima K, Páez MT, Kurosawa K, Yamamoto T : Proximal interstitial 1p36 deletion syndrome: the most proximal 3.5-Mb microdeletion identified on a dysmorphic and mentally retarded patient with inv(3)(p14.1q26.2). *Brain Dev* 31 : 629-33, 2009.

#### 学会発表

- 1) Shimojima K, Inoue T, Hoshino A, Kakiuchi S, Watanabe Y, Sasaki M, Nishimura A, Takeshita-Yanagisawa A, Tajima G, Ozawa H, Kubota M, Tohyama J, Sasaki M, Oka A, Saito K, Osawa M, and Yamamoto T. Comprehensive genetic analyses of PLP1 in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease applied by array-CGH and fiber-FISH

analyses identified new mutations and variable sizes of duplications. 59th Annual Meeting of American Society of Human genetics, Honolulu, 2009.10.21

- 2) Yamamoto T, Shimojima K, Sugiura C, Takahashi H, Kubota Y, Takahashi Y, Saito K : Microdeletion and triplication around 17p13 including PFAH1B/LIS1 in three patients with MR and epilepsy. 59th Annual Meeting of American Society of Human genetics, Honolulu, 21Oct2009.
- 3) 山本俊至, 下島圭子, 斎藤加代子 : アレイ CGH 法で明らかになった家族性ゲノムコピー数変化. 日本人類遺伝学会第 54 回大会, 東京, 2009.9.24
- 4) 山本俊至, 下島圭子, 斎藤加代子 : 高密度オリゴアレイ CGH 法による微細染色体異常診断と遺伝カウンセリング. 第 112 回日本小児科学会学術集会, 奈良, 2009.4.17-19(4/19)

PLP 1 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

分担研究者 岩城 明子 九州大学生体防御医学研究所遺伝情報実験センター

研究要旨

当施設ではこれまでに proteolipid protein 1 (PLP1) 遺伝子病の遺伝子解析に携わり、点変異 25 例、重複 26 例、欠失 1 例を同定した。PLP1 遺伝子 (*PLP1*) の点変異の位置と種類は家系ごとに異なり、重症な先天型 Pelizaeus-Merzbacher 病 (PM 病) から家族性痙性対麻痺 2 型 (SPG2) まで幅広いスペクトラムを呈する。発症年齢とその症状から先天型、古典型、痙性対麻痺に分類されることが多いが、今回最大発達到達点を指標にして点変異の臨床病型を分類し直す後方視的検討を行った。その結果、重症型 (FORM 0) はアミノ酸置換を引き起こすミスセンス変異によるものが比較的多く、エクソン 3B 内の変異やフレームシフトを引き起こす変異は軽症型 (FORM 4) が多いことが分かった。また今年度はミスセンス変異で起る軽症な古典型の男児例 (FORM 4) を報告した。

A. 研究目的

分担研究者は 1993 年に本邦初となった proteolipid protein 1 遺伝子 (*PLP1*) のミスセンス変異による先天型 Pelizaeus-Merzbacher 病 (PM 病) を報告し (Iwaki, *et al.*, *Hum Mol Genet*, 1993)、引き続きフレームシフト変異による古典型 PM 病を報告した (Kurosawa, Iwaki, *et al.*, *Hum Mol Genet*, 1993)。その後、全国の臨床医から依頼を受け PM 病が疑われた患者の遺伝子解析を行ってきた。当初は点変異のみ知られていたが、その後 *PLP1* の完全重複 (コピー数異常) や欠失でも発症すること、さらに両下肢の痙性だけが最初に出現し病気の進行に伴い他の症状も現われる家族性痙性対麻痺 2 型 (SPG2) も *PLP1* の異常で起ることが明らかとなった。本年度は当施設で同定した点変異による PM 病 (既報告 2 例、今年度報告 1 例、報告準備中 21 例) の患児の重症度を最大運動発達到達点から

捉え、遺伝子変異と臨床病型との関係を明らかにすることを目的として後方視的検討を行った。

B. 研究方法

(対象) 当施設でこれまで遺伝子解析を行い点変異が同定された男児 24 例を対象とした。

(方法) 家族歴、臨床所見 (初期の眼振、精神運動発達遅滞、痙性四肢麻痺)、ABR (中枢成分の欠如)、MRI (ミエリン形成不全) などから PM 病が疑われた患者の *PLP1* 遺伝子解析を行い、付帯した臨床情報をまとめた。検査時年齢の低かった患者についてはその後の運動発達到達点を調査した。

(遺伝子解析法) 点変異の検出方法として、ゲノム DNA から *PLP1* の各エクソンを PCR 法により増幅し、コード領域の塩基配列を決定した。重複の検出法は今回の報告に関係しないので割愛した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析は九州大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査専門委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

患者 24 名はいずれも男児であり、生直後から 1 歳半(平均 3.2 ヶ月)の間に眼振や発達の遅れで発症していた。検査時年齢は 6 ヶ月～29 歳(平均 6.5 歳)であり、発症年齢に比べて幅があった。

遺伝子解析で認められた点変異の種類と数をエクソンごとに表 1 にまとめた。

表 1. 各エクソンに見られた変異の種類と数

エクソン	2	3	3	4	5	6	7
		A	B				
ミスセンス変異	7	3	0	2	3	1	0
塩基挿入欠失	0	0	1	1	1	0	1
スプライス変異	0	0	1	0	0	0	0
ナンセンス変異	0	0	1	0	0	0	0

表 1 の変異以外にイントロン内にスプライス異常を導く変異が 2 種類認められた。点変異の種類別ではミスセンス変異が最も多く 16 例、ナンセンス変異 1 例、スプライス変異 3 例、フレームシフト変異 4 例であった。エクソン 2 にミスセンス変異が最も多く認められた。

次に Cailloux らの方法(2000)に従い、最大運動発達到達点から重症度を以下の通り 5 段階(FORM 0～4)に分類し、症例ごとに図 1 に示した。変異の詳細は伏せてある。

FORM 0: 定頸なし

FORM 1: 定頸獲得するが座位はとれない

FORM 2: 座位は獲得するが支持歩行なし

FORM 3: 支持歩行を獲得する

FORM 4: 自立歩行を獲得する

10 歳に達していない患者は傍点で示した。

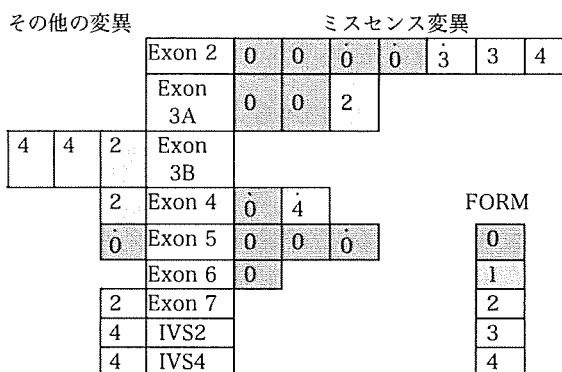


図 1. 運動発達から見た臨床病型と変異の関係

ミスセンス変異は重症型(FORM 0)となるケースが比較的多かったが、FORM 3,4 も少なからず見られた。図 1 の中でミスセンス変異以外はその他の変異としてまとめた。内訳は表 1 で示したエクソン内の塩基挿入欠失、スプライス変異、ナンセンス変異に加え、イントロン(IVS)内スプライス変異である。表 1 と図 1 からわかるように、エクソン 3B 内の変異やフレームシフトを引き起こす塩基挿入欠失やスプライス変異は軽症型となりやすいことがわかった。生下時発症の場合は一般的に重症型となりやすいが、ゆっくりと発達が進むケースもあるので長期経過観察が重要と思われた。

このうち本年度報告した 1 例は生後 3 ヶ月に眼振で発症し 1 歳 7 ヶ月で緩徐な発達の遅れと MRI によるミエリン形成の遅れが指摘されたが、その後発達が進み自立歩行を獲得した男児の症例である(FORM4)。痙性麻痺は観察されなかったので軽症な古典型とした。遺伝子解析により PLP1 の新規のミスセンス変異を同定した。少なくともこの変異では PLP1 の大きな構造変化やフォールディング異常を起こすことはないものと推測された。

### D. 考察

PLP1 蛋白質は中枢ミエリンの主要構成蛋白質(~50%)であり主にオリゴデンドロサイトで発現している。4 回膜貫通構造型の膜蛋白質でアシル化され脂溶性が極めて高く、種間で高度に保存されている。例えばヒトとマウス間でアミノ酸配列は 100% 相同であり、様々なアミノ

酸置換がその構造と機能に影響を及ぼすことが考えられる。

重症型のミスセンス変異の場合、変異 PLP1 蛋白質が小胞体に蓄積して PLP1 の産生細胞であるオリゴデンドロサイトの細胞死を引き起こすものと考えられている。実際我々が最初に経験した剖検例の脳白質には PLP1 だけでなく、オリゴデンドロサイトのマーカーとしてよく使われる塩基性ミエリン蛋白質(MBP)の mRNA も蛋白質もほとんど存在していなかったこととよく一致している。一方、今回報告した症例のような軽症型の場合の発症機構はまだ不明である。

PLP1 遺伝子は X 染色体上にあり 7 つのエクソンからなるが、エクソン 3 の alternative splicing の結果、2 つの蛋白質 (PLP1 と DM20) が生成される。エクソン 3B のコードするアミノ酸配列は PLP1 にはあるが DM20 には存在しない。したがって、エクソン 3B の変異は DM20 には影響がないので一般的に軽症であることが知られており自験例でも一致を見た。

さらに蛋白質の構造と変異の位置、アミノ酸の進化的保存度、変化したアミノ酸の性質の違いなどと病型との関係について今後検討を重ねる予定である。

*PLP1* の点変異と重複が認められなかった症例については、他の先天性白質形成不全症の候補遺伝子の解析を行っている。また、*PLP1* は遺伝子量依存的遺伝子であることからその発現量が厳密に制御されているものと思われる。そこで現在患者群の *PLP1* の発現調節領域の解析を進めている。さらにプロモーター領域をルシフェラーズ遺伝子に連結し、細胞レベルでプロモーター活性やエンハンサー活性を評価する系を立ち上げた。

## E. 結論

PM 病における PLP1 遺伝子の点変異の種類と位置は家系ごとに異なり、その臨床像は定額まで至らない FORM 0 から

自立歩行可能な FORM 4 まで運動発達面では実に多様であった。長期経過観察による最大運動発達到達度による分類は発症時期を目安とした分類に比べ情報量が多く有用であった。より詳細な臨床経過の記載がこの疾患の診断やカウンセリングの資料として重要である。

## F. 健康危機情報

特記すべきことはない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kibe T, Miyahara J, Yokochi K, Iwaki A. A novel PLP mutation in a Japanese patient with mild Pelizaeus-Merzbacher disease. *Brain Dev.* 31, 248-251, 2009.

Tateishi T, Hokonohara T, Yamasaki R, Miura S, Kikuchi H, Iwaki A, Tashiro H, Furuya H, Nagara Y, Ohyagi Y, Nukina N, Iwaki T, Fukumaki Y, Kira JI. Multiple system degeneration with basophilic inclusions in Japanese ALS patients with FUS mutation. *Acta Neuropathol.* DOI: 10.1007/s00401-009-0621-1. 2009.

### 2. 学会発表

Iwaki A, Suzuki SO, Arakawa K, Furuya H, Fujii N, Fukumaki Y, and Iwaki T. Adult-onset spastic paraplegia type 2 with a novel mutation in exon 7 of PLP1: An autopsy case. 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2009.10.21.

Nii T, Iwaki A, Sasaki T, Shibata A, Fukuyoshi Y, Sagata N, Nomura M, Fukumaki Y. Generation and analysis of schizophrenia susceptibility

candidate gene *Grm3* KO mice. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2009. 12.12.

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. 日本人類伝学会第54回大会, 2009.09.24.

鈴木 直輝, 青木 正志, 割田 仁, 加藤 昌昭, 水野 秀紀, 島倉 奈緒子, 秋山 徹也, 古谷 博和, 銚之原 敏博, 岩城 明子, 服巻 保幸, 富樫 慎二, 今野 秀彦, 糸山 泰人. 若年発症・急速進行・好塩基性封入体を特徴とし FUS/TLSに変異を持つ日本人家族性筋萎縮性側索硬化症の3家系, 日本人類伝学会第54回大会, 2009.09.24.

銚之原 敏博, 三浦 史郎, 岩城 明子, 柴田 弘紀, 古谷 博和, 吉良 潤一, 服巻 保幸. 筋萎縮性側索硬化症の日本人1家系におけるFUS遺伝子変異の同定, 日本人類伝学会第54回大会, 2009.09. 26.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



## 資料

資料 I

## 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』

平成 21 年度 第 1 回研究班会議

日時 平成 21 年 6 月 6 日 13 時～17 時 30 分

場所 国立精神・神経センター神経研究所  
疾病研究 2 部

議題：研究班の活動内容と実施に関する役割分担について

## 本研究班の目的と内容

### 1 難治性疾患に関する厚生行政に関する情報の提供と難病指定の獲得

全国実態疫学調査： 患者数、疾患分布、病状、検査所見、治療実態の把握

ガイドライン作成： 画像・遺伝子診断を含めた診断基準と治療指針の確立

患者家族との組織的連携： 家族会設置への誘導と市民公開講座の開催

### 2 先天性大脳白質形成不全症に関する臨床および基礎研究の推進

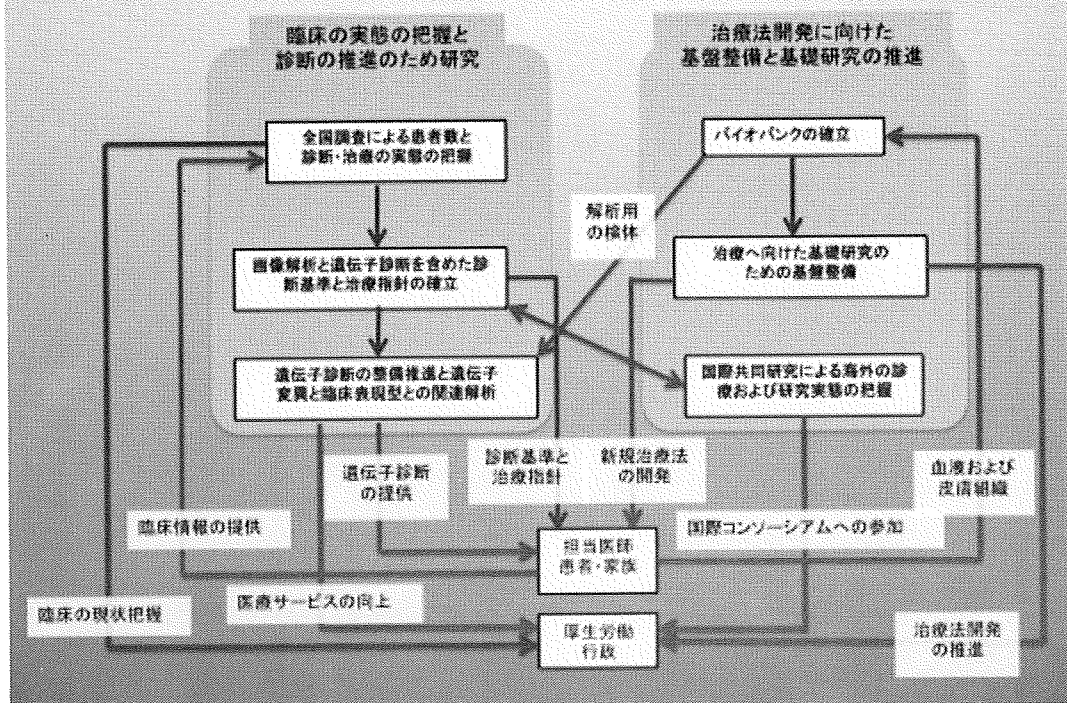
バイオリソースバンクの確立： リンパ芽球あるいは線維芽細胞の収集・登録

遺伝子診断の実施： 陽性例と陰性例

個々の班員の研究： 共同研究の推進

治療法開発を目指した基礎研究の推進： 動物モデルの維持と使用

## 先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究



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」  
平成21年度 第2回班会議

日時 平成22年1月24日 13時～17時30分

場所 東京女子医科大学

心臓血管研究所 会議室

〒162-0054

東京都新宿区河田町8-1