

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

## 胎児脳発達異常の出生前診断と病理に関する研究

研究分担者

伊東 恭子

京都府立医科大学大学院医学研究科分子病態病理学

研究協力者

伏木 信次

京都府立医科大学大学院医学研究科分子病態病理学

**研究要旨** 胎児期に脳形成異常と診断され、在胎 20 週前後で病理解剖となった胎児の脳発達異常について、病理学的解析ならびに遺伝子検索を行った。症例は全 13 例で、脳分離障害、神経細胞移動異常、神経細胞増殖異常、小脳形成異常を伴う水頭症などが含まれた。そのうち代表的症例に関して詳説する。今後さらに症例を重ね、脳形成異常の出生前診断精度の向上、発生病理の研究、遺伝子検索カスタムアレイの作製、遺伝相談へのフィードバックに寄与することをめざしたい。

### A. 研究目的

本研究は難治性脳形成障害症の病態解析を行い、臨床的には胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準の作成をめざすものである。その過程において、臨床病態、画像情報、遺伝子・染色体検索から難治性脳形成障害症と診断された胎児の病理学的解析を詳細に行い、脳発達異常の本態を明らかにすることは重要である。我々は『胎児脳形成異常』と画像により出生前診断され、在胎 20 週前後で病理解剖となった胎児の脳発達異常について神経病理学的解析を行ったので報告する。

### B. 研究方法

1. 患者の臨床データは、難治性脳形成異常症臨床登録票に従って記載し、画像データとともにデータ集積サーバに、登録番号に従って整理した。サーバは独立行政法人国立病院機構大阪医療センターに設置されている。

### 2. 病理学的解析

ご遺族に病理解剖の主旨および意義を十分に説明し、病理解剖の承諾書をいただいた後、死体解剖保存法の規定に基づき病理医によって死体および死胎の病理解剖を行った。その組織は、京都府立医科大学病理学教室分子病態病理学部門において、詳細な病理組織学的検索を行った。

#### （倫理面への配慮）

インフォームド・コンセントのための手続および方法として、「研究にご協力いただける皆様への説明文書」を用いて共同研究機関の説明者が口頭で、本研究の意義・目的・方法に関する内容、試料および採取法に関する事項、予想される研究成果および危険、個人情報保護の方法、予測される不利益およびそれを防止する措置、研究成果の取り扱い、等の内容について十分説明し、研究協力の依頼を行った。本研究は、京都府立医科大学医学倫理審査委員会に

表 1

M/F	CDA (W)	Clinical Diagnosis	CK	DNA chip	PA (W)	Pathological diagnosis	
1	M	18	Hydrocephalus	46XY	ND	20	Lissencephaly type II
2	M	18	Hydrocephalus	46XY	ND	19	X-linked hydrocephalus (L1cam)
3	M	16	Hydrocephalus, vermis defect	46XY	ND	21	Porencephaly, Dandy-Walker variant
4	M	18	Hydrocephalus, vermis defect	46XY	ND	20	Agenesis of CC, Cerebellar hypoplasia
5	M	19	Holoprosencephaly	46XY	ZIC2 deletion	20	Holoprosencephaly (semilobar)
6	F	16	Hydrocephalus, cerebellar dysplasia	46XX	ND	20	Agenesis of cerebellum, aqueduct stenosis
7	F	19	Thanatophoric dysplasia	ND	ND	21	Abnormal temporal convolution, focal polymicrogyria
8	F	12	SUA, TAPVD	46XX	15q partial trisomy +11q partial monosomy	20	Normal brain, TAPVD
9	F	19	Hypoplasia of the brain	46XX	Normal	21	Multiple nodular heterotopia of the cerebrum and cerebellum
10	F	21	Cerebellar hypoplasia	ND	ND	21	LCCS type 1 with hypoplasia of the spinal cord and brainstem
11	M	17	Normal	46XY	Duplication of Xq28	17	Hypoplasia of CC
12	F	15	Hydrocephalus	46XX	Normal	20	Agenesis of CC, Hydrocephalus with aqueduct stenosis
13	M	19	Hydrocephalus, cerebellar hypoplasia	46XY	Normal	21	Agenesis of CC, Hydrocephalus with cerebellar hypoplasia

CDA: Clinically diagnosed age  
 CK: Chromosome karyotype  
 PA: Pathologically diagnosed age  
 CC: Corpus callosum  
 ND: not done

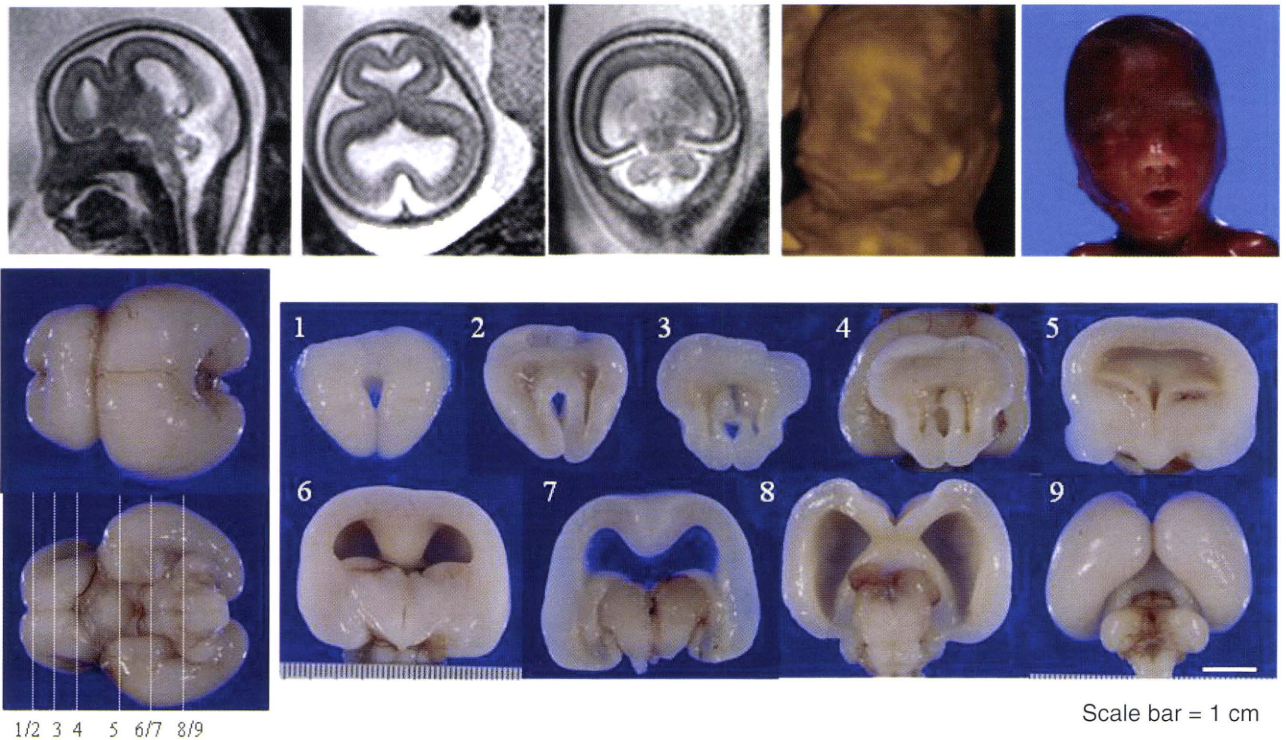


図 1 在胎 19 週の胎児 MRI で、全前脳症と診断された。顔面形成異常はみられなかった。脳は肉眼的に冠状に横断するシルビウス裂を有する semilobar 型の全前脳症であった。

において承認を受けた（番号 C-638）。

### C. 研究結果

症例のプロフィールを表1に示す。各症例の性別、臨床診断時胎齢、臨床診断（MRI, エコーによる画像診断）、染色体核型（G-band 法）、胎児 DNA chip（array CGH）、出生時胎齢、病理学的診断を簡略に示した。脳分離障害である全前脳症：1例、神経細胞移動異常：3例、L1cam 遺伝子異常に伴う水頭症：1例、神経細胞増生異常：2例、小脳形成異常を伴った水頭症：6例が含まれた。全前脳症、神経細胞移動異常、小脳形成異常を伴った水頭症の代表的症例に関して詳説する。

#### 症例番号 5：

在胎 20 週男児。在胎 18 週において、胎児エコー、MRI で、semilobar 型の全前脳症と画像診断されたが、3D エコーでは顔面形成異常はみられなかった（図 1）。病理学的には、肉眼的に前頭葉吻側から眼窩葉、側頭葉、後頭葉尾側に左右分離がみられたが、頭頂葉は不分離で、冠状に横断するシルビウス裂がみられた（図 1）。未熟な嗅球が存在し、脳梁は完全欠損するも、基底核、視床は分離し、脳幹は正常であった。組織学的

には嗅球脳室が遺残、背側海馬、扁桃体は側頭葉腹側に存在した。大脳の左右分離部と不分離部の境界領域では背側と腹側で神経細胞移動方向の差異がみられた（図 2）。DNA chip（array CGH）で、ZIC2 deletion のヘテロ接合体であることが判明した。ZIC2 deletion に起因する全前脳症の報告は少なく、特異な冠状シルビウス裂を伴った、病理学的に興味深い例と考えられた。

#### 症例番号 9：

在胎 21 週女児。在胎 19 週において、胎児エコーで大脳・小脳低形成と画像診断された。羊水検査で、染色体は 46XX 正常核型、DNA chip（array CGH）で異常は認められなかった。病理学的には、肉眼的に後頭葉から側頭葉にかけ粗大な脳回様の凹凸がみられ、剖面で脳表は不整で、脳表および脳室内に向かって突出する不規則、粗大な結節をみとめた（図 3）。組織学的に当該部位には結節性のヘテロトピアが認められ、nestin 陽性の増殖能を示す未分化な細胞と、神経・グリア細胞のマーカー、未分化細胞のマーカーいずれも示さない分類不能の細胞集団より成っていた（図 4）。脳室下層から連続して脳室内に突出する結節は、分化

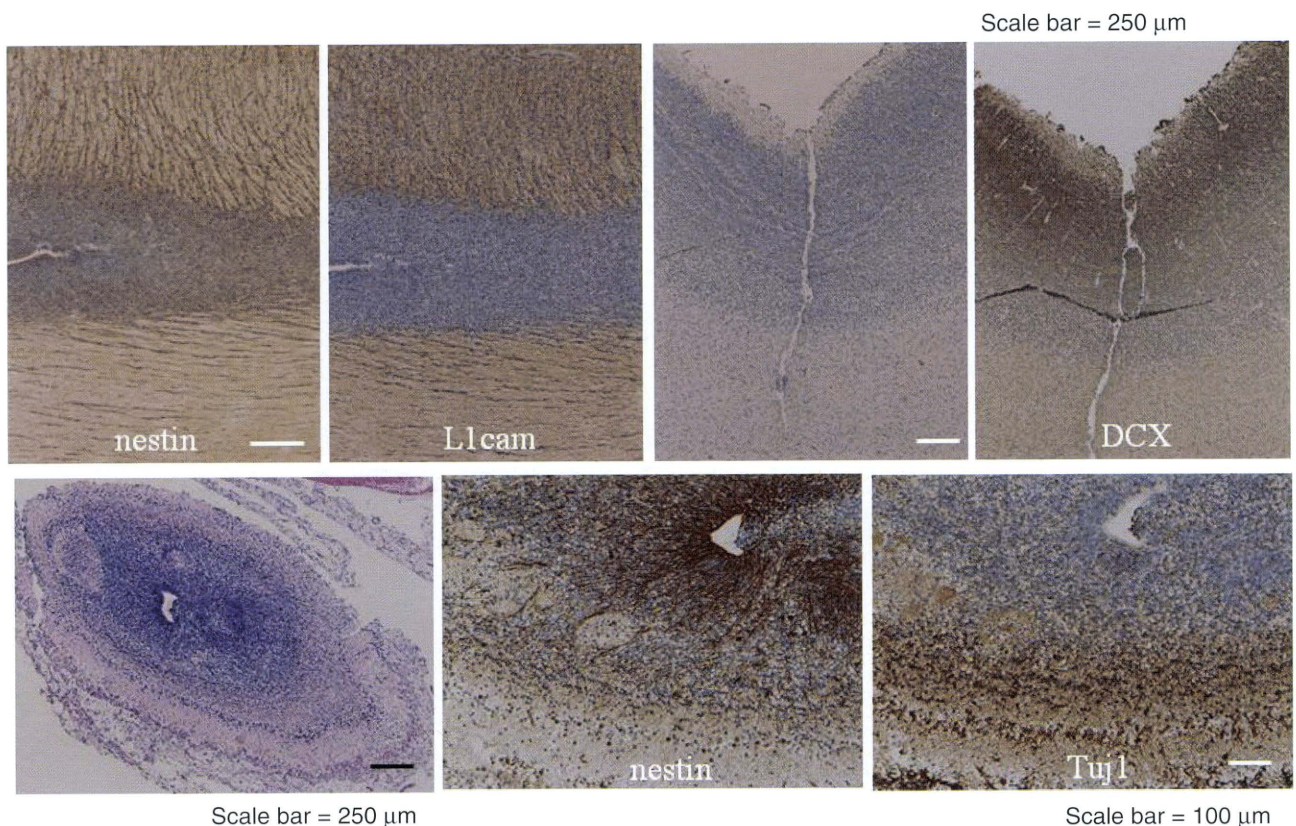


図 2 脳の背側（不分離部）と腹側（分離部）で神経細胞移動方向が異なる。脳を前後に分かつ冠状溝は脳溝構造を示した。嗅球には脳室が残存したが、層構築は保持されていた。

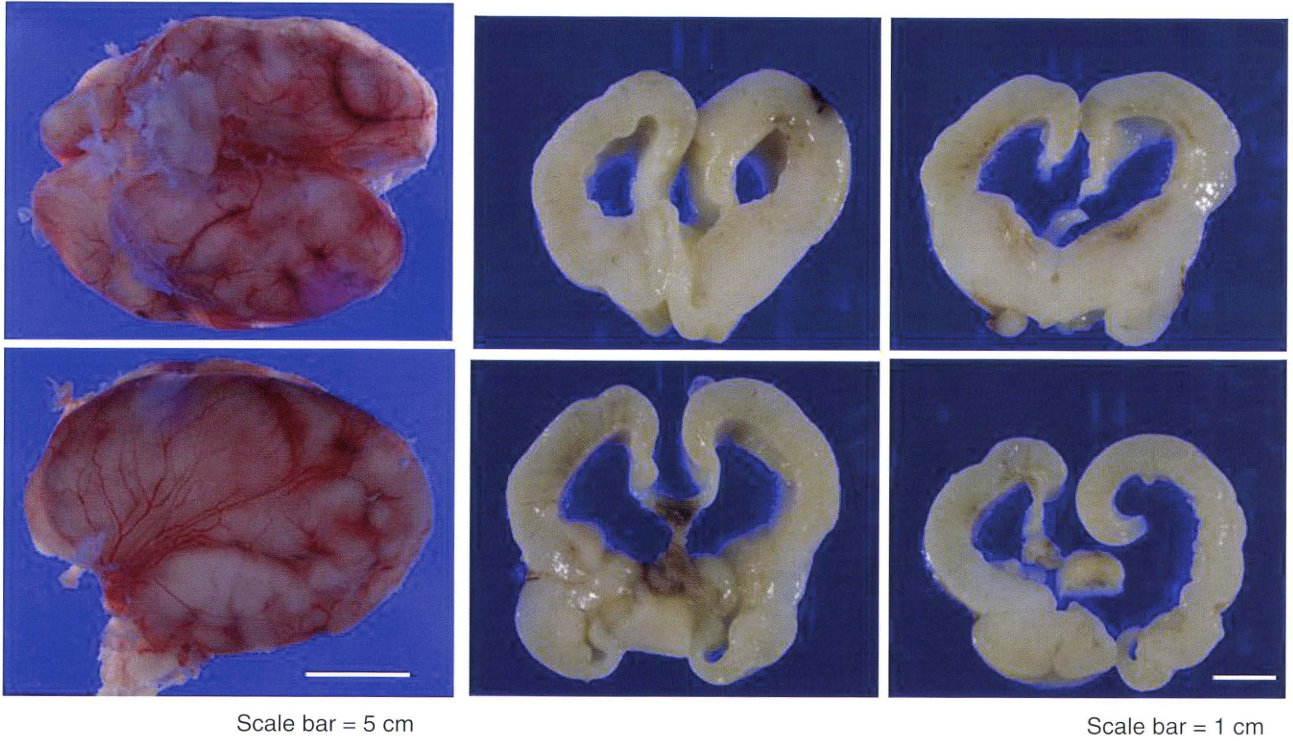


図3 後頭葉から側頭葉にかけて、不整な脳溝様構造をみる。断面では、脳表面、脳室内に突出する結節が不規則にみられる。

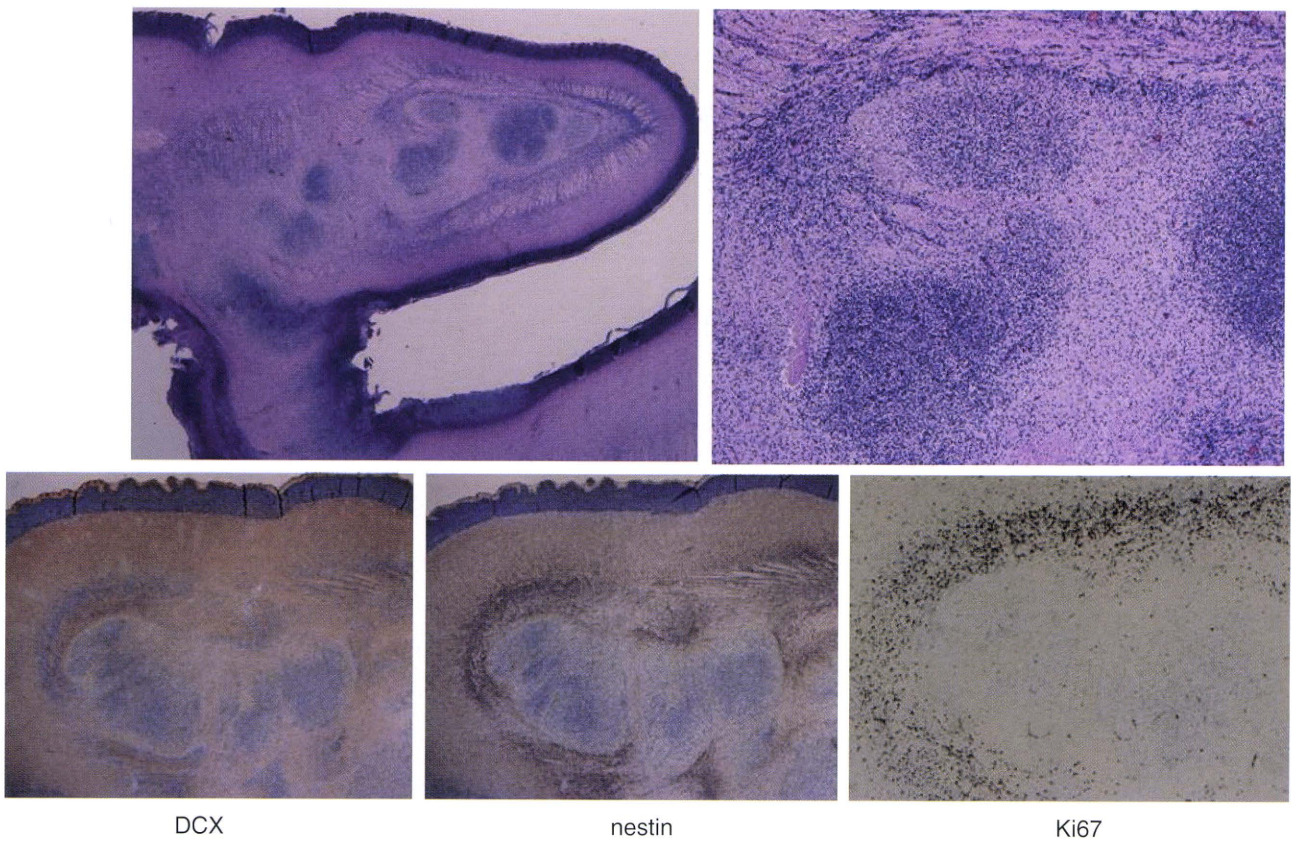


図4 結節性ヘテロトピアをみる。Nestin, Ki67 陽性の増殖能を有する神経幹細胞と分化した神経細胞のマーカーを発現しない分類不能の細胞集団からなる。

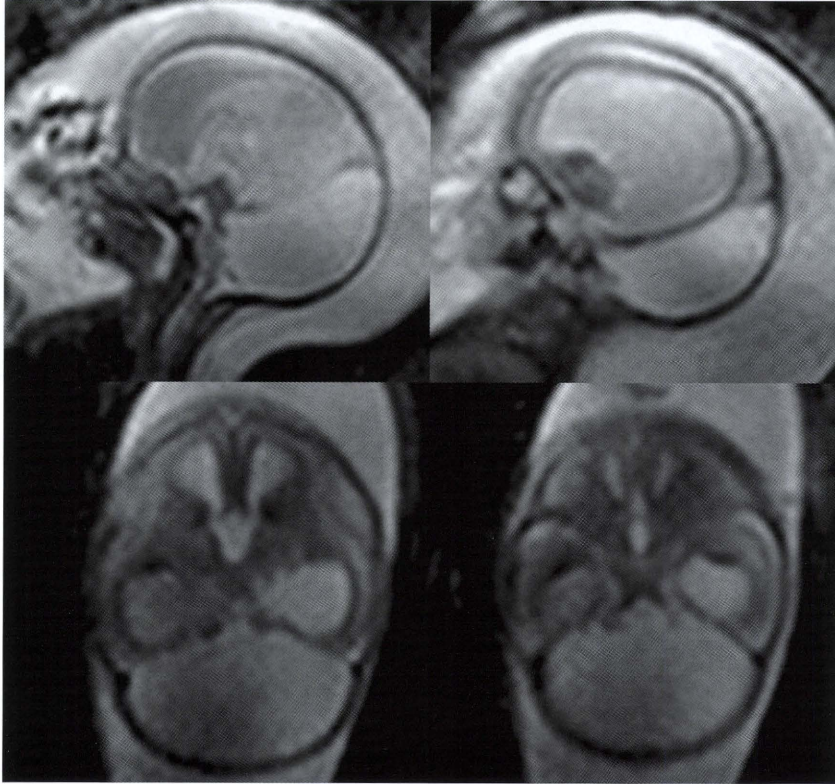


図5 小脳異形成を伴う高度の胎児水頭症

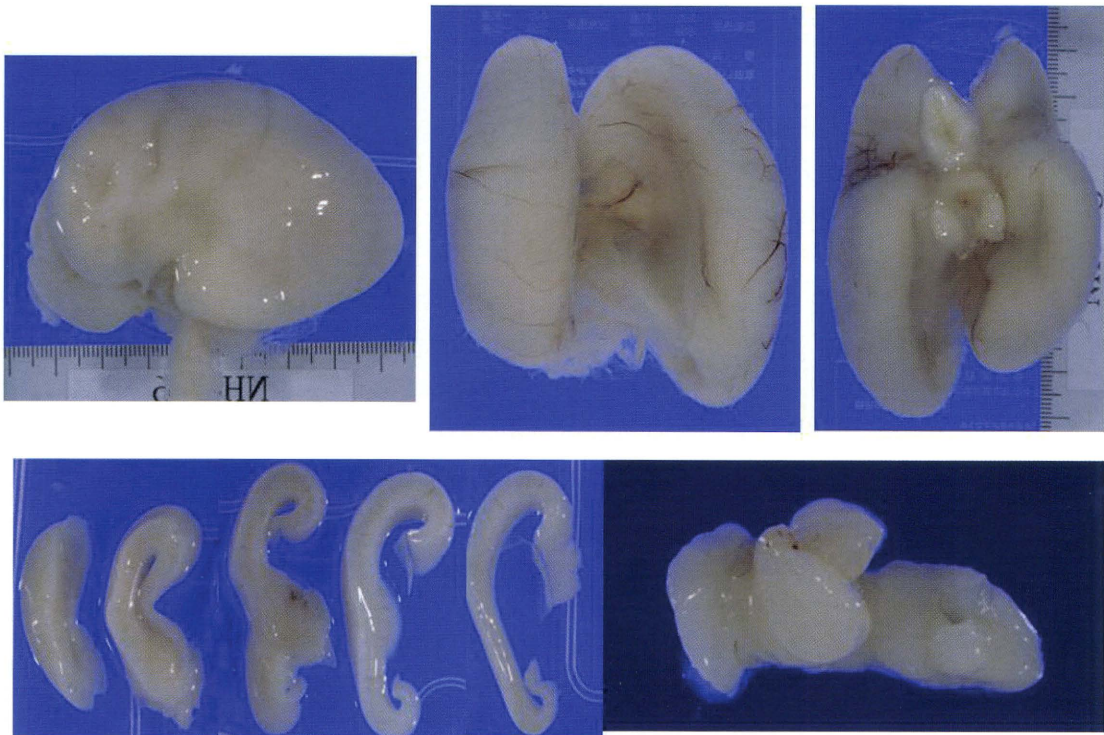
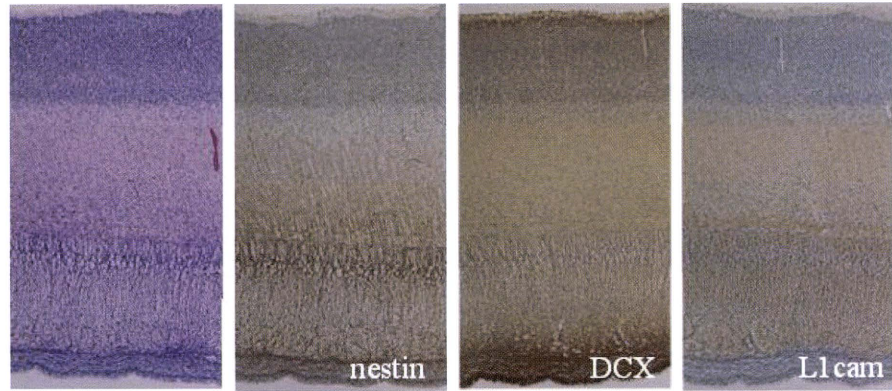
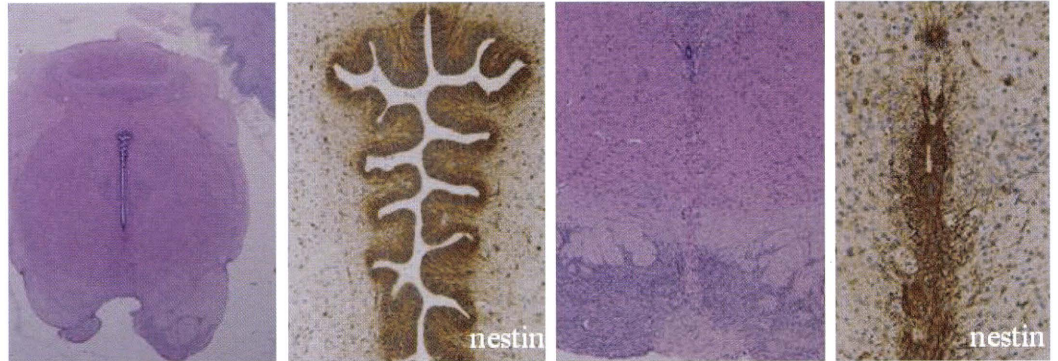


図6 脳梁欠損，小脳部分には菱脳唇様の組織をみる，第4脳室は完全に露出している。

大脳皮質は正常に形成されている



橋、中脳では中脳水道狭窄・閉塞をみる



微小な小脳組織では皮質構築異常を示す

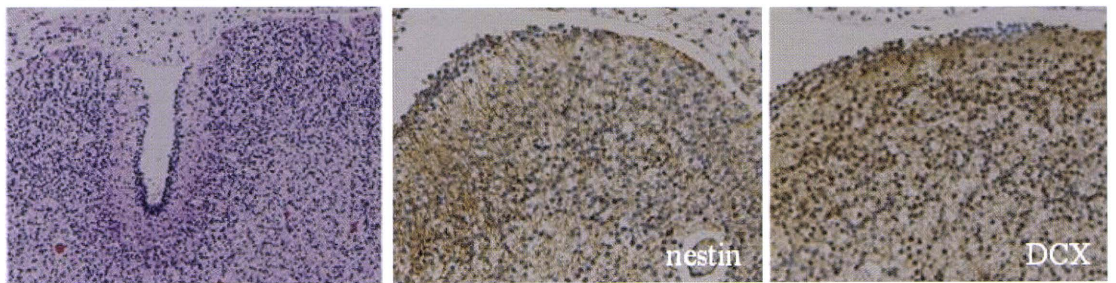


図 7

方向の明らかでない細胞集団より形成されていた。神経細胞の増生異常、分化異常、移動異常の要素が合併した一例と考えられた。遺伝子異常に関しては検索中である。

#### 症例番号 6:

在胎 20 週女児で、家族歴のない第 1 子である。在胎 16 週に、胎児エコー、MRI で、小脳異形成を伴う水頭症と診断された (図 5)。羊水検査で染色体は 46XX 正常核型であった。病理学的には、肉眼的に小脳は高度低形成で、菱脳唇と考えられる小組織が橋背側にみられたのみであり、第 4 脳室は完全に露出していた (図 6)。大脳はやや菲薄で脳梁欠損を認めたが、基底核、視床は正常に形成されていた。組織学的に、橋、中脳レベルで第 3 脳室から中脳水道がフォーク状となりほぼ閉塞しており、閉塞性水頭症と考えられた。微小な小脳皮質では、外顆粒層、分子層を欠損した部分

がみられた (図 7)。遺伝子異常に関しては検討中である。

#### D. 考 察

胎児画像診断で『胎児脳形成異常』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。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症例がある一方、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。それらの中には、従来の染色体の G-band 法、100 kb でのコピー数変動を検出できる array CGH でも異常が見出されない症例が多かった。特に、今回の胎児期脳形成異常症例の検討では、小脳形成異常を伴う水頭症の発見頻度が高かった。今後は、脳発達異常の正確な病態把握を基盤として、分子レベルでのメカニズムの解明、さらに微

細な遺伝子異常を見出すことを可能とするカスタムアレイの作製などを進める必要がある。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に努め、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『胎児脳形成異常症』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、病理組織学的基盤の上になった分子レベルでの発生メカニズムの解明、臨床と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、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] 論文発表

- 1) Itoh K, Ogi H, Yaoi T, Yoshifuji K, Pooh R, Yamasaki

M, Fushiki S. Semilobar holoprosencephaly with a unique traversed sylvian sulcus. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011 Jan 5. doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01161.x. [Epub ahead of print]

#### [2] 学会発表

- 1) 伊東恭子, 堀 映, 夫 律子, 伏木信次: 終脳を前後に分かつ冠状シルビウス溝を有する全前脳症の2胎児例. 第2回日本神経病理学会近畿地方会, 京都, 2010年6月5日
- 2) 伊東恭子, 夫 律子, 伏木信次: 小脳の形成異常を伴った胎児性水頭症3例の検討. 第2回日本神経病理学会近畿地方会, 京都, 2010年6月5日
- 3) Itoh K. A neuropathological study on developmental brain anomalies. 6th IAPM/ISFN Oct 23, 2010, Osaka, Japan
- 4) Itoh K, Yamasaki M, Pooh R, Fushiki S. Neuropathological studies on fetuses prenatally diagnosed as brain anomalies. XVIIth International Congress of Neuropathology, Sep 11-15 2010, Salzburg, Austria

### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当項目なし

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

## 難治性脳形成障害症データバンクにおける 遠隔画像診断に関する研究

研究分担者

宇都宮英綱

国際医療福祉大学大学院 放射線・情報科学分野

研究協力者

相田典子<sup>1</sup>，大場 洋<sup>2</sup>，森 壘<sup>3</sup>

<sup>1</sup>神奈川県立こども医療センター放射線科

<sup>2</sup>帝京大学医学部 放射線科学講座

<sup>3</sup>東京大学医学部附属病院 放射線科

**研究要旨** 胎児診断における難治性脳形成障害症の診断基準作成研究班のデータバンクに集積された画像データの読影を行い，遠隔画像診断の有用性と問題点について検討した。画像診断は4名の小児を専門とする神経放射線診断医の合議で行った。画像データや臨床データが不十分な症例があったが，概ね詳細読影が可能であった。各読影者間での画像検討方法の合理化を図る必要があると思われた。

### A. 研究目的

本研究班のデータバンクに集積された画像データの複数の読影者で遠隔画像診断し，診断結果を解析すると共に有用性と問題点について検討する。

### B. 研究方法

2010年1月～2011年3月までに症例検討サイト (<http://fms.fetal-brain-malformation.jp>) にデータ登録された症例のうち，神経放射線読影委員会で検討し得た43例を対象とした。読影委員は研究分担者（H.U.）1名と研究協力者（N.A, H.O, H.M）3名の計4名で構成された。データバンクに登録された画像データの中で読影に十分な情報がある症例（原則として画像データがDICOM形式でアップされているもの）を研究分担者（H.U.）が拾い上げ，報告書（レポート）を作成し，これを各読影委員にメールで送信し，読影内容につい

て検討を依頼した。読影委員からの返信を待って，意見を集約し最終報告書として症例検討サイトにアップした（図1）。

### C. 研究結果

#### (1) 画像データ

43例中，胎児MRIが施行されていたものは7例（胎児MRIのみは3例）であった。画像撮像時の正確な年齢が不明なものが18例あった。性別は男性16例，女性12例，性別が記載されておらず不明であったものが16例であった。CTのデータを読影したものは4例であり，このうち1例はMRIのT1強調画像のみが追加撮像されていた。

#### (2) 読影結果（表1）

主たる診断名として，神経細胞移動障害：9例，その内訳は古典的滑脳症：2例，丸石様皮質異形成



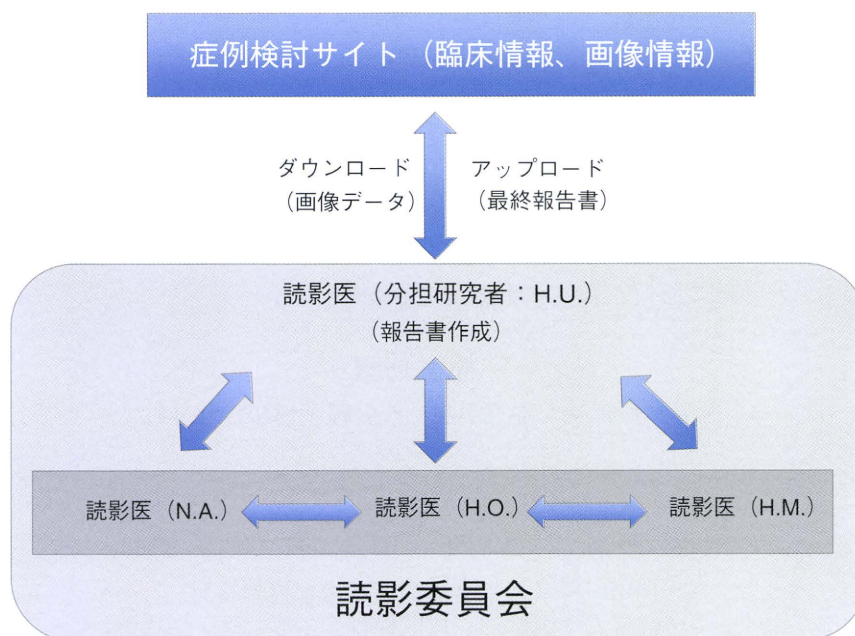


図 1

表 1

診断名(例数)	亜型(例数)	備考
■神経細胞移動障害 (9例)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•古典的滑脳症(2例)</li> <li>•丸石様皮質異形成(1例)</li> <li>•小滑脳症(1例)</li> <li>•多小脳回(5例):+異所性灰白質(1例),+脳梁低形成(1例)</li> </ul>	DCX 異常?(1例) W-W 症候群.
■単純脳回型小頭症 (3例)		
■脳梁形成不全(3例)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•完全欠損(1例)</li> <li>•部分欠損(1例):</li> <li>•低形成(1例):+橋低形成、+上衣下偽嚢胞</li> </ul>	
■全前脳胞症(3例)	Semilobar型(2例) Lobar型:syntelencephaly (1例)	
■Dandy-Walker奇形(3例)		PHACE症候群(1例)
■水頭症(4例)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•脳梁欠損+交通性半球間裂嚢胞(3例)</li> <li>•透明中隔欠損(1例)</li> </ul>	
■その他の脳奇形(5例)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•巨脳症(2例):+白質異常(1例)</li> <li>•小脳症(1例)</li> <li>•線条体形成不全(1例):+Blake嚢</li> <li>•脳破壊性孔脳症(1例)</li> </ul>	
■頭蓋骨異常(4例)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•頭蓋縫合早期癒合症(3例)</li> <li>•軟骨異形成疑い(1例):Chiari I型奇形</li> </ul>	
■脊髄小脳変性症(3例)	EAOH?(2例)	
■その他(6例)	上衣下偽嚢胞(1例)、1側側脳室拡張(1例)、診断困難(2例) 遺伝性痙性椎麻痺(2例)	診断困難:胎齢不明の胎児MRI

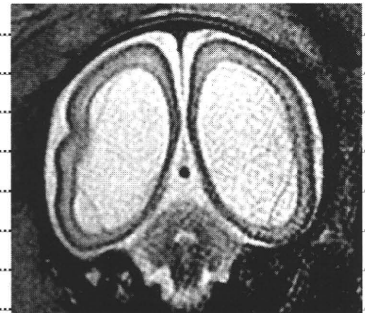
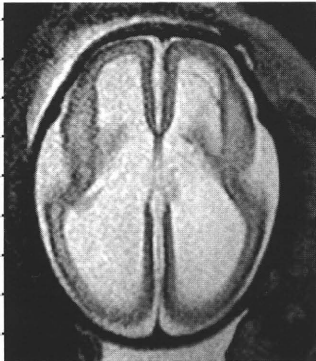
ID :I-007(F) 年齢 GA(29w) 性別 :不明 検査 : MRI 特殊検査

病歴 妊娠27週で胎児水頭症を指摘。在胎38週4日、2805g、身長49cm、頭囲35cmで出生。  
 新生児マススクリーニングでメープルシロップ尿症/有機酸・脂肪酸代謝異常症が陽性。精査  
 でビオチンダーゼ欠損症、複合カルボキシラーゼ欠損症の疑い。

## 所見

(胎児 MRI:妊娠29週)

- 1) 胎齢を考慮すると脳回・脳溝の形成が不良です。: 概ね25-26週程度の形成段階と考えます。
- 2) 大脳外套は両半球ともに菲薄化しています。: Migrating neuroblast layerは不明瞭。皮質の厚みには明らかな異常は認めません。
- 3) 基底核、視床、脳幹、小脳には明らかな形態異常は指摘できません。
- 4) 脳室系では側脳室の拡張(colpocephaly)が認められます。両側側脳室前角下部(尾状核頭)にcystic cavityを認めます。: subependymal pseudocyst?
- 5) 両側側脳室体部外側に隔壁様構造が認められます。: natureは不明です。脳室上衣が剥がれた様にも見えます。



## 診断

Accentuated lissencephalic brain(delayed gyration and sulcation)

読影医 読影委員会

読影日 2010/08/03

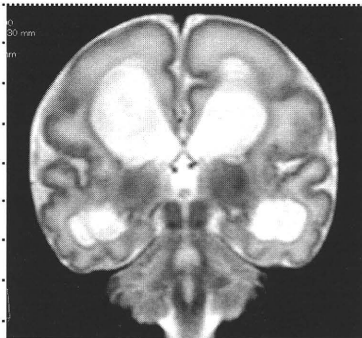
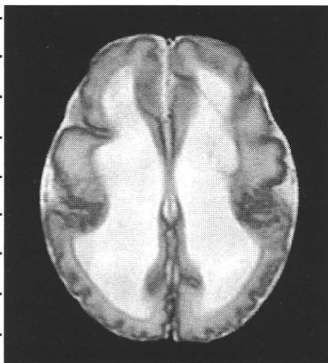
図 2A

ID :I-007 (N) 年齢 :7day 性別 :不明 検査 : MRI 特殊検査

病歴 妊娠27週で胎児水頭症を指摘。在胎38週4日、2805g、身長49cm、頭囲35cmで出生。  
 新生児マススクリーニングでメープルシロップ尿症/有機酸・脂肪酸代謝異常症が陽性。精査  
 でピオチニダーゼ欠損症、複合カルボキシラーゼ欠損症の疑い。

### 所見

- 1) 両側perisylvian regionから島皮質にかけ皮質の肥厚と皮髄境界のbumpy borderを認め、  
 polymicrogyriaが示唆されます。 : bilateral perisylvian syndrome?
- 2) 前頭葉の脳回・脳溝の形成は不良でpagygyricですが、皮質の厚さは正常範囲と思われます。 :  
 simplified gyral pattern。後頭葉の脳回は小さい印象がありますが、皮質の厚さには異常は認めませ  
 せん。
- 3) 側脳室は胎児期同様に拡張していますが、体部の外側壁の凹凸が胎児期よりは明瞭です。また、  
 脳室上衣が剥がれた様な隔壁様構造は今回も認められます。 : subependymal pseudo-cystと思われる  
 構造は不明瞭化しています。
- 4) 大脳白質の信号は、年齢を考慮しても異常で、髄鞘形成、軸索異常が示唆されます。脳梁は著明  
 な低形成を示しています。 : 交連線維の発達は明らかに異常と考えられます。
- 5) 基底核・視床に明らかな異常は認めません。 : 内包前脚構造が不明瞭です。
- 6) 頭蓋の形状に明らかな異常は認められません。
- 7) MRA上、頭蓋内動脈に明らかな異常は認めません。



### 診断

Polymicrogyria prominent in bilateral perisylvian region.  
 White matter abnormality with marked callosal hypoplasia.

読影医 宇都宮英綱

読影日 2010/08/03

(Walker-Warburg 症候群) : 1 例, 小滑脳症 : 1 例, 多小脳回 : 5 例 (1 例で上位下異所性灰白質を含む), 単純脳回型小脳症 : 3 例, 脳梁形成不全 : 3 例, 全前脳胞症 : 3 例, Dandy-Walker 奇形 : 3 例, その他の奇形 (脳幹低形成, 小脳症, 巨脳症など) が 5 例であった。水頭症 : 4 例 (3 例に脳梁欠損を伴う交通性半球間裂嚢胞を合併), 脊髄小脳変性症 : 3 例, 頭蓋骨異常 : 5 例 (頭蓋縫合早期癒合 4 例, 軟骨異形成症 : 1 例), その他, 遺伝性痙性椎麻痺 : 2 例, 上衣下偽脳胞 : 1 例, 一側の側脳室拡張 : 1 例, 診断困難例 (単純脳回?) : 2 例であった。

胎児 MRI と出生後 MRI で大きく診断が異なるものはなかったが, 出生後 MRI で多小脳回が明瞭化したものが 1 例認められた (図 2A, B)。

#### D. 考 察

読影に際して, 臨床情報の不十分なものがあり, 特に胎児 MRI 施行時の胎齢が不明なものが多かった。胎児期から新生児期にかけては脳回・脳溝の形成や髄鞘形成は精力的に行われ, それに伴って MRI 所見も大きく変化するため, 年齢は正確な診断をするために必須の情報である。また, 性別も遺伝性疾患の鑑別には極めて重要な情報である。今回のシステムでは臨床情報の取得が完全にはオンライン化されていないため, アップされたデータをチェックする方法を構築しておく必要があると思われた。また, 読影報告書の作成において, 最終報告書の作成まで 1 週間以上を要するものが数例あった。これは, メールによる議論で合意を得たためであり, 各読影者で読影時間を統一する方法やインターネットでのコミュニケーションツールなどを活用することで, より合理的な討論方法を確立していく必要があると思われた。しかし, 今回の方法

で最も重要な点は小児神経放射線を専門とする 4 名の放射線診断医が読影にあたったことにあると思われる。このような, 遠隔読影のシステムはこれまでに行われたことがなく, 極めてユニークな方法で各臨床科で独自に画像診断されていた現状から考えれば, 画期的な方法といっても過言ではないと思われる。すなわち, より客観的に評価された画像診断に基づいて臨床情報や遺伝子解析との対比がなされることで, 今後, 脳形成不全盛疾患におけるさらに正確な診断法が確立されていくことが期待される。

#### E. 結 論

他施設共同研究の一環として行われた遠隔読影システムについて紹介するとともに, その結果について報告した。この方法は, 難治性脳形成脳形成障害症の診断基準の作成に大きく寄与するものと考えられた。

#### F. 研究発表

- 1) 宇都宮英綱 : 脳神経の発生. 小児神経の画像診断—脳脊髄から頭頸部・骨軟部まで—. 大場 洋編集
- 2) 宇都宮英綱 : 先天奇形 : 1 脳梁形成不全 小児神経の画像診断—脳脊髄から頭頸部・骨軟部まで—. 大場 洋編集
- 3) 宇都宮英綱 : 先天奇形 : 2 全前脳胞症とその類縁奇形 小児神経の画像診断—脳脊髄から頭頸部・骨軟部まで—. 大場 洋編集
- 4) 宇都宮英綱 : 水頭症 小児神経の画像診断—脳脊髄から頭頸部・骨軟部まで—. 大場 洋編集
- 5) 宇都宮英綱 : 中枢神経の発生胎児期水頭症. 診断と治療ガイドライン 改訂 2 版
- 6) Utsunomiya H: Diffusion MRI abnormalities in pediatric neurological disorders. *Brain & Development* 33: 235-242, 2011.

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

## 橋小脳低形成を伴う小頭症，精神遅滞における CASK 遺伝子の変異解析

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

共同研究者

山本悠斗<sup>1</sup>，林 深<sup>2</sup>，稲澤譲治<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科

<sup>2</sup>東京医科歯科大学難治疾患研究所 分子細胞遺伝

**研究要旨** CASK はシナプスに存在し，転写因子 TBR1 と相互作用する足場蛋白であり，RELN など大脳皮質の発生に関与する遺伝子群の発現を調節する。CASK 異常マウスは脳・頭蓋形成異常と口蓋裂をきたす。Hayashi らは Xp11.4 に座位する CASK を含む X 染色体微細欠失による重度精神遅滞，小頭症，小脳低形成の女兒を報告した。Najm らは，CASK の変異が小頭症や脳幹小脳低形成の原因になることを報告した。CASK 異常症は男児では致死性的になり，主に女兒が患者として認識される X 連鎖性疾患である。男児例を含む新規例 3 例の CASK 遺伝子解析結果を報告する。

### A. 研究目的

CASK はシナプスに存在し，転写因子 TBR1 と相互作用する足場蛋白であり，RELN など大脳皮質の発生に関与する遺伝子群の発現を調節する。CASK 異常マウスは脳・頭蓋形成異常と口蓋裂をきたす。Hayashi らは Xp11.4 に座位する CASK を含む X 染色体微細欠失による重度精神遅滞，小頭症，小脳低形成の女兒を報告した<sup>1)</sup>。Najm らは，CASK の変異が小頭症や脳幹小脳低形成の原因になることを報告した<sup>2)</sup>。CASK 異常症は男児では致死性的になり，主に女兒が患者として認識される X 連鎖性疾患である。

CASK 異常症は mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH: MIM ID #300749) と称されている。

Takanashi らは，MRI 画像で大脳，脳梁，橋，中脳，

小脳虫部，小脳半球および小脳/脳梁の面積の計測を行った<sup>3)</sup>。CASK 異常症 (MICPCH) では脳梁の大きさは正常で，大脳/脳梁比の低下，大脳，橋，中脳，小脳虫部，小脳半球の面積の減少が特徴であることを報告した。

Hayashi らは MICPCH の臨床症状を呈する女兒例を 10 例について難治研・分子細胞遺伝学教室において開発した MCG X-tiling array を用いたアレイ CGH による CASK 領域のゲノムコピー数異常の検出と，CASK の全エクソン内のダイレクトシーケンスによる変異解析を行い，ナンセンス変異，スプライシング領域，CASK の一部または全部を含むヘテロ欠失，CASK の部分重複を検出した (Hayashi et al. 投稿中<sup>4)</sup>)。引き続き施行した転写産物の解析などにより，これらのゲノム異常はいずれも正常な CASK の発現を減少させ

ることを示した。ゲノム異常のパターンはさまざまであるが、結果的に *CASK* のハプロ不全の原因となっている。

最近、新たに3症例について大阪府立母子保健総合医療センターにおいて *CASK* 変異解析を行った。

## B. 研究方法

症例の診療を行っている各施設において遺伝カウンセリングを行い、インフォームド・コンセントを得て採血を行った。当センターに送付された末梢血リンパ球からDNAを抽出し、各エクソンのコーディング領域をPCR法で増幅し、回収した。PCR産物を用いてABI社のオートシーケンサーによる直接シーケンズ解析を行った。

PCRのプライマーの設計は大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科において独自に設計したものを使用した。

## C. 研究結果

最初に、3症例の臨床経過の概要を紹介する。

### 【症例1】生後8ヶ月女児

広島県立病院小児科 小野浩明先生症例

39週2800gで出生。生後4ヶ月で発達遅滞あり、精査となる。追視不良、高口蓋、筋緊張亢進あり。頭囲36.0cm。体重増加不良のため、経管栄養となる。頭部MRIで、小脳・脳幹低形成。脳梁は正常。

### 【症例2】1歳9ヶ月女児

大阪医科大学小児科 島川修一先生症例

36週1810gで出生。家族歴に特記事項なし。乳児期より発達遅滞、1歳5ヶ月で點頭てんかん発症。現在身長体重-2SD 頭囲37.5cm (-6.3SD)と高度小頭症を認める。頸定なし、寝返り不可で有意語も認めず、重度発達遅滞。

頭部MRIで小脳・脳幹低形成であるが、脳梁は発育良好。

### 【症例3】5歳男児

国立静岡てんかん・神経医療センター小児科 高橋幸利先生症例

41週2392gで出生。生後4ヶ月より點頭てんかん発症し、治療をうけた。3歳より症候性全般てんかん、

Lennox-Gastaut 症候群となる。強直発作頻発する。7歳で歩行不可、有意語なく、重度精神運動発達遅滞。頭囲は45cmと小頭症。頭部MRIで大脳萎縮、小脳下部低形成、脳幹低形成あり。脳梁の大きさ形態は正常。

次の変異はいずれも新規変異であった。

症例1 Exon21 c.1910G>A p.Gly637Asn 変異同定

両親は異常なく、突然変異と判明。

症例2 Exon4 c.316C>T p.Arg106Stop

停止コドンで病的と判断した。

症例3 Exon12 ミスセンス変異

c.1061 C>T p.Leu354Pro

両親異常なく、突然変異と判明。

## D. 考 察

*CASK* 遺伝子はXp11.4に座位し、哺乳類の神経系において強く発現するMAGUK(membrane-associated guanylate kinase) 蛋白のメンバーである *CASK* をコードしている。*CASK* は神経末端部において複合体を形成し、シナプス間の結合や神経伝達物質の輸送、Reelinの転写調節を介した神経細胞の移動と層形成への関与などといった神経系における多彩な働きが明らかにされてきた。

*CASK* はシナプスにおいて転写因子TBR1と相互作用する足場蛋白であり、RELNなど大脳皮質の発生に関与する遺伝子群の発現を調節する。*CASK* 異常マウスは脳・頭蓋形成異常と口蓋裂をきたす。HayashiらはXp11.4に座位する *CASK* を含むX染色体微細欠失による重度精神遅滞、小頭症、小脳低形成の女児を報告した<sup>1)</sup>。Najmらは、*CASK* の変異が小頭症や脳幹小脳低形成の原因になることを報告した<sup>2)</sup>。

HayashiらはさらにMICPCHとMRを呈する10例の女児の全例で、欠失・重複・変異のいずれかの *CASK* ゲノム異常を検出し、*CASK* のハプロ不全がMICPCHを伴う発達遅滞というよく類似した症状に関与することを報告した(Hayashi et al. 投稿中)。*CASK* 遺伝子は欠失または遺伝子変異がX連鎖性優性遺伝形式で女児に発症するが、欠失範囲に含まれる遺伝子の中では *CASK* のみが臨床症状に関係するため、

欠失例と点変異例とは臨床的に区別は困難である。

MICPCHは小脳下部と脳幹は低形成であるが、脳梁は發育良好であることが画像上の特徴である<sup>3)</sup>。小頭の程度は強く、丸顔で瞳が大きく目だつ特徴的な顔貌である。顔貌とMRI所見だけで多くの例で診断の推測が可能である。MICPCHを疑われて解析を行ったが変異陰性であった症例は、やはり臨床的に非典型的であった。

今回の解析対象は臨床症状や画像所見はMICPCHに合致した。3例とも点変異で男児例1例も含まれた。男児例を含む2例で両親の解析を行ったが、両親には異常なく、突然変異であることが証明された。

CASK異常症は男児では致死的になり、主に女児が

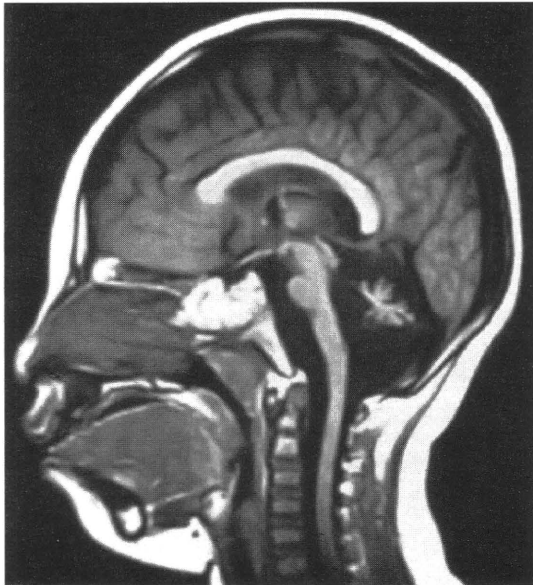


図1 CASK異常症 典型例

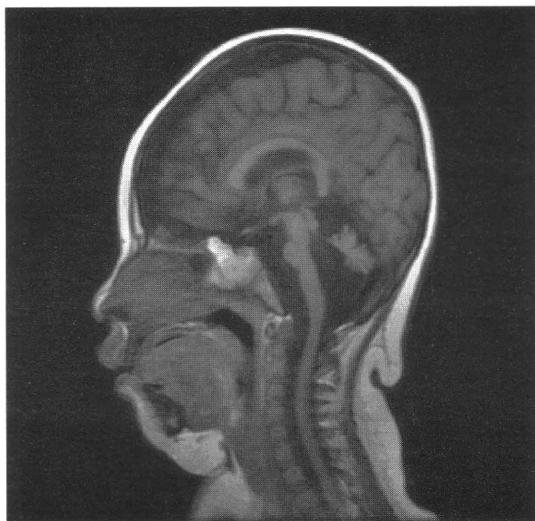


図2 MRI像 症例2

患者として認識されるX連鎖性疾患である。しかし、今回の解析ではミスセンス変異による男児例も含まれた。顔貌やMRI画像の特徴は女児例と区別がつかなかった。女児例の多くは遺伝子全体の欠失、ストップコドン、スプライス異常など、遺伝子の機能に大きく影響するケースが多いが、男児例はミスセンス変異のため、多少遺伝子機能が保持されている可能性がある。臨床像から疑いを持たば、積極的な解析が必要である。

Hackettらは、先天性眼振やX連鎖性精神遅滞の男児で意外とCASK変異を持つ例が多いことを報告した<sup>4)</sup>。CASK異常は女児のみでなく男児にもみられることは注意が必要である。

## E. 結 論

先天性小頭症、小脳低形成、重度遅滞の女児の中にCASK異常例(MICPCH)が存在する。丸顔で瞳の部分が目立つなど特徴的な顔貌で、臨床的に認識可能な症候群である。従来、橋小脳低形成症と分類された疾患の中に含まれる可能性も高い。今回、男児例も経験した。臨床像、画像所見は典型的で女児例と区別がつかなかった。男児においてもCASK異常症は小脳脳幹低形成症の鑑別で重要である。

症例をご紹介いただきました先生方に深謝いたします。

## 文献

- 1) Hayashi S, Mizuno S, Migita O, Okuyama T, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. The CASK gene harbored in a deletion detected by array-CGH as a potential candidate for a gene causative of X-linked dominant mental retardation. *Am J Med Genet A*. 2008. 146A: 2145-51.
- 2) Najm J, Horn D, Wimplinger I, Golden JA, Chizhikov VV, Sudi J, Christian SL, Ullmann R, Kuechler A, Haas CA, Flubacher A, Charnas LR, Uyanik G, Frank U, Klopocki E, Dobyns WB, Kutsche K. Mutations of CASK cause an X-linked brain malformation phenotype with microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum. *Nat Genet*. 2008 Aug 10. [Epub ahead of print]
- 3) Takanashi J, Arai H, Nabatame S, Hirai S, Hayashi S, Inazawa J, Okamoto N, Barkovich AJ. Neuroradiologic features of CASK mutations. *Am J Neuroradiol*. 2010; 31: 1619-22.
- 4) Hackett A, Tarpey PS, Licata A, Cox J, Whibley A, Boyle J, Rogers C, Grigg J, Partington M, Stevenson

RE, Tolmie J, Yates JR, Turner G, Wilson M, Futreal AP, Corbett M, Shaw M, Gecz J, Raymond FL, Stratton MR, Schwartz CE, Abidi FE. CASK mutations are frequent in males and cause X-linked nystagmus and variable XLMR phenotypes. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18: 544-52.

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表

- 1) Hosokawa S, Takahashi N, Kitajima H, Nakayama, Kosaki K, and **Okamoto N** A case of Brachmann-de Lange syndrome with congenital diaphragmatic hernia and NIPBL gene mutation *Congenit Anom (Kyoto).* 2010; 50: 129-132
- 2) Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, **Okamoto N**, Kawame H, Fujiwara I, Takada F, Ohata T, Sakazume S, Ando T, Nakagawa N, Lapunzina P, Meneses AG, Gillissen-Kaesbach G, Wiczorek D, Kurosawa K, Mizuno S, Ohashi H, David A, Philip N, Guliyeva A, Narumi Y, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Hum Mutat.* 2010; 31: 284-94.
- 3) **Okamoto N**, Akimaru N, Matsuda K, Suzuki Y, Shimojima K, Yamamoto T. Co-occurrence of Prader-Willi and Sotos syndromes. *Am J Med Genet A.* 2010; 152A: 2103-9
- 4) Komatsuzaki S, Aoki Y, Niihori T, **Okamoto N**,

Hennekam RC, Hopman S, Ohashi H, Mizuno S, Watanabe Y, Kamasaki H, Kondo I, Moriyama N, Kurosawa K, Kawame H, Okuyama R, Imaizumi M, Rikiishi T, Tsuchiya S, Kure S, Matsubara Y. Mutation analysis of the SHOC2 gene in Noonan-like syndrome and in hematologic malignancies. *J Hum Genet.* 2010 Sep 30.

- 5) Takanashi J, Arai H, Nabatame S, Hirai S, Hayashi S, Inazawa J, **Okamoto N**, Barkovich AJ. Neuroradiologic features of CASK mutations. *Am J Neuroradiol.* 2010 31: 1619-22.
- 6) Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, **Okamoto N**, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet.* 2010 Oct 28.
- 7) Filges I, Shimojima K, **Okamoto N**, Röthlisberger B, Weber P, Huber AR, Nishizawa T, Datta AN, Miny P, Yamamoto T. Reduced expression by SETBP1 haploinsufficiency causes developmental and expressive language delay indicating a phenotype distinct from Schinzel-Giedion syndrome. *J Med Genet.* 2010 Oct 30.

#### 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

山形大学医学部附属病院 小児科 講師

**研究要旨** 大脳皮質形成障害の原因遺伝子同定に対し、全ゲノムのアレイ解析法の有用性を検討するために、小頭症を主とする脳形成障害 5 例にオリゴヌクレオチドアレイ解析を行った。2 例で 15 番染色体と 1 番染色体にそれぞれ 1 Mb 未満の微細欠失を検出した。1 例の微細欠失は正常多型と考えられたが、もう 1 例の欠失領域には脳に発現する新規候補遺伝子を含んでいた。脳形成障害のようなまれな疾患の原因解明のために、アレイ解析は有力なツールとなりうる。

### A. 研究目的

近年の遺伝子解析技術の進歩はめざましい。旧来のギムザ染色法を用いた染色体分析法 (G-band 法) では、塩基対として数百万 (M) b の解析精度だったものが、全ゲノムのアレイ解析法では現在数千 (K) b まで解析精度が向上し、微細欠失や微細重複などのコピー数変化 copy number variation (CNV) の検出に威力を発揮している。また、G-band 法の判定には熟練した技能を要するが、アレイ解析の判定はコンピューターソフトウェアの補助によって G-band 法ほどの熟練は要さず、判定が比較的容易である。さらに、G-band 法では判定不可能な片親性ダイソミーもオリゴヌクレオチドアレイでは判定可能である。また、量産化による費用の低下も著しく、欧米では既に、先天異常のゲノム構造異常の判定には、診療レベルでも G-band 法よりアレイ解析法を優先して行うことが奨励されている。

脳形成障害で遺伝的要因が解明された疾患は、*LIS1* や *DCX* 遺伝子変異による古典型滑脳症や、*LI* 遺伝子変異による先天性水頭症、*SHH* 遺伝子変異による全前脳症など、単一遺伝子の遺伝子内変異が多いが、ミラー・ディーカー症候群や Dandy-Walker 症候群など微細欠失を原因とする疾患も報告されている。

本研究では、脳形成障害に対するアレイ解析法の有用性を検討するために、小頭症を主とする脳形成障害に対して、オリゴヌクレオチドアレイ解析法を行い、その利点と問題点を検討した。

### B. 研究方法

対象は、本研究班のバイオリソースから依頼された小頭症 5 例である (表 1)。

方法は以下の通りである。

1. イルミナ社の Infinium whole-genome genotyping 解析システムおよび高密度 SNP genotyping array (HumanCytoSNP-12) を使用した。検体は、付属試薬キットを用いて、200 ng のゲノム DNA を処理した。処理方法の手順は、①ゲノム DNA の精製、② PCR 非依存性の全ゲノム増幅、③ DNA の断片化、④断片

表 1

ID	併発症
2529 A-004	橋小脳低形成
2530 A-008	大田原症候群
2531 A-009	両側頭頂葉破壊性病変
2532 A-010	Opitz 症候群の疑い
2533 A-011	同上 (A-010 の妹)

化された DNA と 50mer のオリゴヌクレオチドが結合したビーズとのハイブリダイゼーション, ⑤酵素的な一塩基伸長反応による標識ヌクレオチド (A, T, C, G) の特異的 SNP 検出である. なお, HumanCytoSNP-12 は, 1 つのチップで 12 検体の同時処理が可能である.

2. 得られたデータを GenomeStudio および KaryoStudio を用いて, B アリル頻度 (アリル構成の測定) とログ R 比 (信号強度), confidence ratio (確からしさ) を基準に, 実際にプロットされた図をみて判定した. データの妥当性は, % Defects (全体に占める変異率) と LogR 偏差 (信号強度のふらつき程度) を参考に判定した.

(倫理面への配慮)

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行われた.

### C. 研究結果

2 症例において 1 Mb 未満の微細欠失領域をそれぞれ 1 か所に検出した (表 2, 図 1, 図 2). 他の 3 症例では CNV 領域および片親性ダイソミー領域は認めら

れなかった.

2529 A-004 で検出された 829 Kb の欠失領域には 4 つの遺伝子と 5 つの偽遺伝子が存在した. 2530 A-008 で検出された 220 Kb の欠失領域には遺伝子は存在しなかった.

### D. 考 察

今回 G-band 法との比較はできなかったが, 検出された微細欠失はいずれも 1 Mb 未満であり G-band 法では検出不可能と考えられ, 微細構造異常の解析精度においてアレイ解析法の優位性が確認された. 2530 A-008 で検出された 1q21.1 の欠失領域には遺伝子は存在せず, またホモの欠失であることは正常多型としての CNV を示唆し, 疾患原因の可能性は低い. 一方, 2529 A-004 で検出された欠失領域に存在する遺伝子には中枢神経系で発現しているものも含まれる. FISH 法や定量 PCR 法による欠失領域の再確認および両親の解析による新生変異の確認を行い, 小頭症の候補遺伝子として今後解析を進める予定である.

G-band 法と比較したアレイ解析法の欠点は, CNV を伴わない均衡型転座もしくは相互逆位や倍数体の検出が不可能なことである. また, FISH 法と異なり位

表 2 オリゴヌクレオチドアレイ解析結果

ID	CNV or LOH	Confidence	% Defects	LogR 偏差
2529 A-004	del(15)(q11.2) 829 Kb, hetero	752	6.58	0.28
2530 A-008	del(1)(q21.1) 220 Kb, homo	819	6.26	0.21
2531 A-009	なし		7.17	0.27
2532 A-010	なし		2.14	0.32
2533 A-011	なし		2.99	0.34

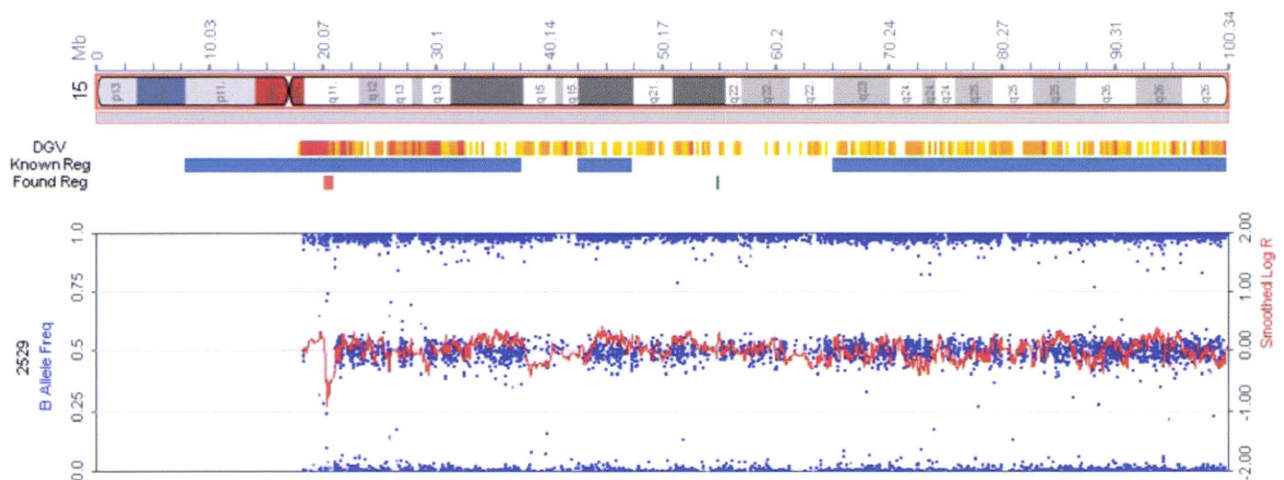


図 1 2529 A-004 15 番染色体

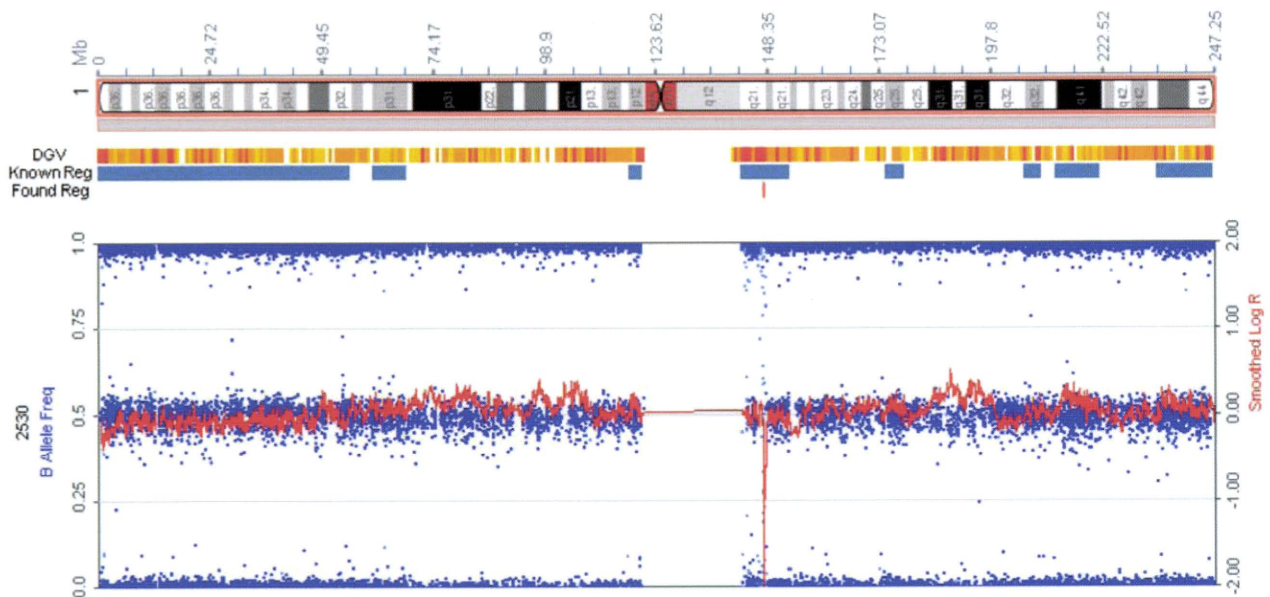


図2 2530 A-008 1番染色体

置情報はない。さらにオリゴヌクレオチドアレイは精製されたDNAの品質に解析精度が影響される。今回解析した5検体のLogR偏差をみると、CNVが検出されなかった姉妹の2検体においてLogR偏差が0.3を超えており、DNAの品質に問題があった可能性がある。

今回使用したイルミナ社のビーズチップHumanCytoSNP-12の総マーカー数は約30万(300K)で、マーカー間の平均距離は10Kbである。ゲノムカバー率は74%であるが、既知のヒト疾患に関連する約250のゲノム領域を密にカバー(平均距離6Kb)し、他の遺伝子、テロメアと動原体周辺の各領域、性染色体など約400の遺伝子領域もカバーされている。解像度は100Kb前後であり、BACアレイとほぼ同じで、遺伝子内のエクソン単位の欠失/重複の検出には不適格だが、12検体の一括処理によりコストも比較的低くおさえられることから、微細構造異常の初期スクリーニングには適している。他の脳形成障害に対してもアレイ解析を応用することで、既知の異常の他に、新たな疾患候補遺伝子の同定が期待される。

## E. 結論

小頭症を主とする大脳皮質形成障害の原因遺伝子を明らかにするためにオリゴヌクレオチドアレイ解析を行った。5症例中2症例で微細欠失を検出し、うち1症例で候補領域を絞り込むことができた。脳形成障害

のようなまれな疾患の原因説明のために、アレイ解析は有力なツールとなりうる。

アレイ解析の検体処理を行っていただきました山形大学先端分子疫学研究所・ゲノム情報解析ユニットの田宮元教授に深謝します。

## 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 51: 1679-1684, 2010](#)
- 2) [Shiihara T, Maruyama K, 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 32: 502-505, 2010](#)
- 3) [加藤光広：脳形成障害・てんかんのトピックス—年齢依存性てんかん性脳症と介在ニューロン病—。脳と発達 42: 333-338, 2010](#)
- 4) [加藤光広：大脳皮質形成異常 大場洋編 小児神経の画像診断 脳脊髄から頭頸部・骨軟部まで 学研メディカル秀潤社 232-249, 2010](#)
- 5) [加藤光広：脳形成異常の遺伝相談。杉田克生, 林雅晴編 イメージからせまる小児神経疾患 50 診断と治療社 2010, 10](#)

### 2. 学会発表

- 1) [Kato M, Honma T, Hayasaka K: Autosomal dominant form of periventricular nodular heterotopia. 11th](#)

International Child Neurology Congress Meeting,  
Grand Hyatt Hotel Cairo, Egypt, May 2-7, 2010

- 2) 加藤光広：画像でわかる脳形成障害の分類と原因。第29回日本画像医学会 教育講演：東京 2010年2月26日
- 3) 加藤光広：大脳皮質形成障害の新しい視点—ARXと介在ニューロン病。第41回慶応ニューロサイエンス研究会 招待講演：東京 2010年11月6日
- 4) 菊池貴洋, 加藤光広, 中村和幸, 早坂 清：当科における先天性多発性関節拘縮症12例の検討。第62回北日本小児科学会：札幌 2010年9月
- 5) 篠崎敏行, 中村和幸, 本間信夫, 菊池貴洋, 荻野大助, 岡田昌彦, 加藤光広, 早坂 清：母斑のない脳軟膜限局性血管腫を示すSturge-Weber症候群の1乳児例。第16回日本小児神経学会東北地方会：仙台 2010年10月
- 6) 安孫子優, 高橋辰徳, 笹 真一, 田邊さおり, 木村敏之, 加藤光広：ヒトヘルペスウイルス6型 (HHV6) 感染を契機に深部灰白質病変を呈した1例。第89回日本

小児科学会山形地方会：山形 2010年12月

- 7) 市川大輔, 田尾克生, 野口 靖, 野口博史, 杉田克生, 加藤光広：ARX 遺伝子に新規の変異を認めたX連鎖性滑脳症の一例。第40回胎児・新生児神経研究会：東京 2010年5月
- 8) 高橋辰徳, 中村和幸, 菊池貴洋, 笹 真一, 田邊さおり, 松本直通, 木村敏之, 加藤光広：両側傍 Sylvius 裂多小脳回を認めた1p36欠失症候群の1男児例。第15回山形小児神経研究会：山形 2010年9月
- 9) 須藤陽介, 加藤光広, 菊池貴洋, 中村和幸, 金井雅代, 若林 崇, 佐々木綾子, 早坂 清：筋病変を伴わずWalker-Warburg症候群類似の脳形成異常を認める1女児例。第15回山形小児神経研究会：山形 2010年9月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし