

や、小児慢性疾患受給手続きなど、制度の狭間で医療費の負担増などの問題が生ずる。

2) 呼吸器あるいは消化器症状など本疾患とは直接関連はないが、疾患のために濃厚な医療を必要とする状況での医療費の負担について、その扱いに地域差がある。

3) 次子をもうけたいが、その子が罹患する確率は、あるいは保因者になる確率はどうなるのか。

その他にも、体温調節の問題や、股関節脱臼に対する外科的治療法などについての質問があがった。

最後に、家族のとりまとめ役の方から、家族会発足に関する提案があり、これについてのアンケート調査を行った後に、正式に発足の手筈を整える方向に入るとの話があった。合わせて、主催者側からのアンケートも行い、最後に、班長の井上が挨拶を行ない、公開セミナーは終了した。

4. 考察

第1部の講演に関しては、各講演者とも昨年度よりも平易でわかりやすい内容であったが、家族からの質問はほとんどなく、やや堅苦しい雰囲気であったのは、次回への反省点の一つである。

質問事項の中では、ケースワーキングに関する問題点が存在することが明らかになった。次回は、ケースワーカーの参加により、制度的な部分に関しての質問に、明確な回答を提供することが出来るようにしたい。

今回の最も大きな収穫は、家族会発足のための具体的な段取りが始まったことであろう。今後、さらに患者家族とのコミュニケーションをとりつつ、

患者を取巻く医療環境や相互援助など様々な事柄について、改善していくための援助をしていくことが、本研究班の使命の一つと考えている。

5. 結語

先天性大脳白質形成不全症の患者家族を対象とした市民公開セミナーを実施し、疾患に関する医療や研究の進歩についての情報を提供するとともに、患者家族同士、患者と医療・研究者との交流を深めることが出来た。

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診断と治療に向けた研究 第52回日本小児神経学会総会 2010年5月21日 博多

(2) 井上 健、岩城明子、小坂 仁、黒澤健司、高梨潤一、出口貴美子、山本俊至 先天性大脳白質形成不全症：難治性疾患克服研究事業による希少性疾患の統合的研究の推進 第55回日本人類遺伝学会総会 2010年10月30日 大宮

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

クルクミン経口投与による Pelizaeus-Merzbacher 病の治療法の開発

守村敏史、沼田有里佳、余 荔華、岩下晴美、井上 健

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第二部

研究要旨

Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) は、先天性大脳白質形成不全症で最も頻度が高い代表疾患である。PLP1 遺伝子の重複や点変異などの変異が原因であり、変異によって異なる分子病態を介して髄鞘の低形成が生ずるが、現在までに有効な治療法はない。点変異は、PLP1 タンパクの折りたたみ異常を来し、これが小胞体に異常蓄積することによって引き起こされる小胞体ストレス反応がその分子病態である。クルクミンは植物より抽出された天然食品化合物であり、PMD と同様の分子病態が関与すると考えられる嚢胞性線維症や遺伝性ニューロパチー等の治療に有効であると報告されている。そこで、我々は、点変異による PMD のモデルマウス Msd にクルクミンを投与することにより、その治療効果を検証してきた。その結果、クルクミンは Msd の寿命を延長し、またオリゴデンドロサイトの細胞死を抑制する効果が見られた。その一方で、Msd マウスの脳内で上昇している小胞体ストレス反応関連分子の発現量は、クルクミン投与によっても変化はなく、クルクミンの治療効果が小胞体ストレスに直接的に働いているのかは不明であった。そこで、クルクミンの薬理機能を明らかにするために、変異型 PLP1 タンパクを強制発現させた HeLa 細胞にクルクミンを投与し、小胞体ストレス関連分子の発現量の変化を定量的 PCR により解析した。その結果、生体での結果と同様に、小胞体ストレス関連分子はクルクミン投与によって変化しないことがわかった。これより、クルクミンの薬理作用は直接、小胞体ストレス反応を変化させることではないことが示唆された。

1. 研究目的

現在、先天性大脳白質形成不全症の代表的疾患である Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) には有効な治療法がない。そこで、PMD のモデル動物や培養細胞を用いて、PMD の治療薬候補を見いだすことが、本研究の目的である。本課題では、PMD 患者のおよそ 3 割程度に見いだされるアミノ酸置換型の変異を標的に、クルクミンの有用性を検討する。

PLP1 の点変異は、非常に臨床型のばらつきが多いことが知られている。その分子病態については、PLP1 蛋白の変異による何らかの毒性機能獲得がメカニズムとして考えられており、とくに小胞体に異常蛋白が蓄積することによるストレス応答が病態に関与すると考えられている。そこで、我々はこれまでこの小胞体ストレス反応を治療の介入点として、小胞体ストレスを病態機序とする幾つかの遺伝性疾患での

治療モデルが提唱されているクルクミンを用いて、PMD の点変異モデルマウス *myelin synthesis deficit (Msd)* に対して治療実験を行い、その治療効果と分子薬理動態を検討してきた。

Msd マウスは、A242V のアミノ酸置換型変異を持つ自然発生型マウスで、重症型 (connatal form) のモデルと考えられている。オスは、中枢神経系の髄鞘の形成不全を呈し、生後約 4 週で死亡する。このマウスに対して、クルクミンを生後 3 日目より経口的に投与したところ、生存期間が中央値 28 日から 35 日に延長するという治療効果を観察した ($p < 0.05$)。また、このマウスの脳組織を組織学的に解析したところ、髄鞘形成の改善には至らないものの、オリゴデンドロサイトのアポトーシスが抑制されていることを示唆する所見を得た。これまで PLP1 の点変異は、小胞体ストレス反応を惹起し、最終的にオリゴデンドロサイトを細胞死に至らしめると考えられており、この細胞死の抑制効果は、クルクミンが小胞体ストレス反応に対して、治療的效果をもたらしたのではないかと仮説を立てた。

そこで、クルクミンを投与した Msd マウスの脳内における小胞体ストレス関連分子 (BiP, Chop, Gadd45, Calnexin, Calreticulin) について、その発現量の変化について、RT-PCR を用いて検討したが、投与の有無によるこれらの分子の発現量に変化は認められなかった。これは、我々の仮説に反するものなんか、それとも、生体内の状況下では変化を検出しきれないためなのか、について不明であったので、この点を明らかにし、クルクミンの分子薬理機序を解明することを目的に、培養細胞を用いた実験系を確立し、小胞体ストレス反応に対するクルクミン

の効果について検証することとした。

2. 研究方法

(1) PLP1 遺伝子発現系の確立

HeLa 細胞に変異型マウス PLP1 タンパクを一過性発現させた後、培養中にクルクミンを投与し、一定時間のインキュベート後に細胞を回収し、トータル RNA を回収し、これを用いて cDNA を合成した。これを鋳型にして定量的 RT-PCR を行い、小胞体ストレス関連分子の発現を定量した。

PLP1 発現用のプラスミドは、マウス PLP1cDNA (野生型および A242V 変異型) に FLAG を tag として結合し、これを CAG プロモーター下に挿入した。

HeLa 細胞に、これらのプラスミドをトランスフェクションし、PLP1 タンパクを一過性発現させた後に、クルクミンを 5-25 μ M の濃度で培養中に投与した。2-16 時間後に細胞を回収し、定量的 PCR 用の RNA を抽出した。同様に細胞をガラスボトムシャーレで培養した後、4 %PFA で固定後、免疫染色に用いた。

(2) 定量的 RT-PCR

細胞から抽出した RNA を逆転写し cDNA を合成したのち、これを鋳型として定量的 PCR を行った。ヒト BiP, Chop, Gadd45, Calnexin, Calreticulin に対する TaqmanProbe を用いて、これらの小胞体ストレス関連分子の RNA の発現を定量的に測定した。

(3) 細胞免疫染色

ガラスボトムディッシュに固定した細胞を、抗 PLP1 抗体と抗 PDI 抗体で染色し、PLP1 タンパクの細胞内局在を観察した。

3. 研究結果

定量的RT-PCRによる小胞体ストレス関連分子の発現量は、クルクミン投与量、インキュベーションの時間により、多少の差異はあったが、総じて解析されたどの分子も、変異型 PLP1 の強制発現により上昇することがわかった。しかし、クルクミン処理によってこれら小胞体ストレス関連分子の発現量は変化しなかった。

免疫染色による PLP1 タンパクの細胞内局在の解析では、クルクミン処理なしの状態では、野生型 PLP1 は小胞体や細胞膜に広く分布しているのに対し、変異型 PLP1 は小胞体のみを集積していることが、PDI との二重染色で明らかになった。次にクルクミン処理した細胞について観察したが、野生型、変異体ともに未処理と比較して、細胞内局在に明らかな変化は見られなかった。

4. 考察

今回得られた結果より、Msd マウスで認められたクルクミンの治療効果は、当初予想されていたように、クルクミンが小胞体ストレス反応に直接的に作用することにより、変化させるためではないであろうことが明らかになった。

また、MPZ や PMP22 で認められたように、小胞体に蓄積した変異型タンパクが細胞質に移行するような細胞相局在の変化も認められず、クルクミンの薬理機序を示唆するような所見は得られなかった。

5. 結語

PMD のモデルマウス Msd に対するクルクミンの治療効果に関する薬理機序は、小胞体ストレス反応への作用ではない可能性が示唆された。今後、新たな薬理機序の解明に向けて、さらに

解析を行う必要があることが明らかになった。

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診断と治療に向けた研究 第52回日本小児神経学会総会 2010年5月21日 博多

(2) 井上 健、岩城明子、小坂 仁、黒澤健司、高梨潤一、出口貴美子、山本俊至 先天性大脳白質形成不全症：難治性疾患克服研究事業による希少性疾患の統合的研究の推進 第55回日本人類遺伝学会総会 2010年10月30日 大宮

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

オートファジーに注目した食品化合物ライブラリースクリーニング
～PLP1 重複の治療薬開発を目指した *in vitro* 解析系の確立～

沼田有里佳、守村敏史、井上 健

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第二部

研究要旨； PLP1 のゲノム重複は、最も頻度の高い Pelizaeus-Merzbacher 病の原因遺伝子変異である。正常な PLP1 タンパクの過剰発現が、中枢神経系の髄鞘の形成不全を来すと考えられているが、その細胞分子病態は不明である。近年の研究により、過剰発現された PLP1 は後期エンドソームに局在し、オートファゴゾーム内への蓄積も認めることから、PLP1 重複の病態としてオートファジーの関与が示唆された。オートファジーは、細胞内の不要タンパク分解系として機能することが知られ、近年、神経変性疾患の病態に大きく関与していることが示唆されている。我々は、このオートファジーを活性化することにより、過剰発現された PLP1 の分解を促進し、症状の緩和を来すことが出来るのではないかと考えた。そこで本研究では、培養細胞を用いてオートファジーの活性化を検出する実験系を確立し、これを用いて食品化合物ライブラリーをスクリーニングすることにより、オートファジーを活性化するような食品化合物を同定することを目的とした。本年度は、オートファジー活性化の検出系の確立を行った。まず、GFP と融合した LC3 タンパクを定常的に発現する HeLa 細胞を作成した。LC3 はオートファジーの活性化により、オートファゴゾームに集積するタンパクであり、GFP 標識することにより蛍光顕微鏡下に細胞内局在を観察することが出来る。この細胞に、オートファジーを活性化することが知られている rapamycin を投与したところ、顕微鏡下に細胞質内に蛍光顆粒の出現が観察された。また、これに対応して、ウェスタンブロットでも、オートファジーの活性化を示す断片化された LC3 のシグナルの増強が観察された。以上の結果、*in vitro* でのオートファジー検出系が確立できた。今後、この系を用いて食品化合物ライブラリーのスクリーニングを行う予定である。

1. 研究目的

Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) は、先天性大脳白質形成不全症の代表的な疾患である。中枢神経系の髄鞘膜タンパクをコードする proteolipid protein1 (PLP1) 遺伝子の変異が原因であることが知られている。PMD を引き起こす PLP1 遺伝子の変異には、いくつかの異なる種類の変異が存在す

るが、最も頻度が高いのは PLP1 ゲノム領域の重複によるものである。これは、正常の PLP1 遺伝子が 2 コピー以上存在するもので、生成される PLP1 タンパクの品質には異常はないが、発現量が増加するために、疾患を引き起こす、いわゆる gene dosage effect と言われているものである。近年の研究により、PLP1 重複が起こるゲノム

再構成の機序が明らかにされてきたが、なぜ、正常な PLP1 タンパクが増加しただけで、著明な髄鞘形成不全を引き起こすのか、その病態機序に関しては、ほとんど解明されていない。

PLP1 重複の病態解析に適した動物モデルは、トランスジェニックマウスである。この *Plp1* トランスジェニックマウスのオリゴデンドロサイトは、分化の最終段階でアポトーシスに陥り、髄鞘化が停止してしまう。この変化は、*Plp1* の発現量に比例して重症化する。これらの所見は、一見、点変異マウスと同様であるが、以下の2点で点変異とは異なる病態に基づくものであることが示唆される。第一に、過剰発現した PLP1 蛋白は、*in vitro* でも *in vivo* でも、小胞体へ異常蓄積することなく正常に細胞膜へ輸送される。第二に、点変異モデルと過剰発現モデル双方にアポトーシスが起るが、点変異モデルでのみ、小胞体ストレス反応に伴うアポトーシスに特異的な変化である活性化型 caspase12 が増加している。

近年 PLP1 は、コレステロールと結合し、髄鞘でミエリンラフトと呼ばれるガラクトシルセラミドに富む膜成分に組み込まれることがわかった。細胞内に過剰発現した PLP1 は、コレステロールと結合したまま、後期エンドソーム/リソソームに蓄積し、不溶化することがわかった。この後期エンドソーム/リソソームでの異常な蓄積が、このミエリンラフトの生成と髄鞘の形成に影響を及ぼすのではないかと考えられている。

また、最近の報告では、PLP1 トランスジェニックマウスでは、これらの PLP1 タンパクがオートファゴゾームに存在していることが示されており、PLP1 重複とオートファジーとの関連性が示唆されている。オートファジー

は、飢餓状態における自己融解による生存のための細胞内メカニズムとして知られているが、近年では様々な神経変性疾患における病態に関与していることが明らかになっている。

そこで、我々は PLP1 重複の細胞病態におけるオートファジーの関与の解明とオートファジーを標的にした治療法開発を目的に、まず、培養細胞下にオートファジーの活性化を可視的に検出できる実験系の確立を行った。

2. 研究方法

(1) LC3 定常的発現系の確立

LC3 はオートファジー関連タンパクで、LC3-I が LC3-II に切断されることにより、オートファゴゾームに集積することが知られている。そこで、LC3 の cDNA に GFP の cDNA を結合し、これを CAG プロモーター下に組み込み、両者の融合タンパクを発現させる発現させるベクターを構築した。これを HeLa 細胞に導入し、この融合タンパクを定常的に発現させる細胞株 GFPLC3-HeLa を作製した。

この細胞では、定常状態では LC3-I が細胞質にび漫性の緑色蛍光を呈し、オートファジーの活性化時には LC3-II がオートファゴゾームに集積するため顆粒状に緑色蛍光が観察されることが予想された。

(2) オートファジー活性化の可視化

次に、実際にこの細胞を用いることにより、オートファジーの活性化を顕微鏡下に可視化できるかどうかを、確認した。GFPLC3-HeLa 細胞培養中に、ラパマイシン 200nM で投与した。6 時間後に細胞を蛍光倒立顕微鏡にて観察した。

(3) ウェスタンブロットによる確認
実際にこの細胞でオートファジーが活性化されているかどうかを確認するた

めに、LC3のウェスタンブロットを行った。ラパマイシンで同様に処理した細胞をハーベストし、抗 GFP 抗体にてウェスタンブロットを行った。

3. 研究結果

GFP-LC3 融合タンパクを定常的に発現する細胞を複数確立した。このうち、LC3 の発現量が多い2つの細胞株を以下の実験系に用いることにした。

蛍光倒立顕微鏡により、この細胞を観察したところ、通常の培養条件下では、細胞質にび漫性に緑色蛍光を観察した。一部の細胞では、少量の緑色蛍光顆粒を観察し、負荷のない状況でも基礎状態のオートファジーを観察することが出来た。次にラパマイシン処理を行ったところ、著明な顆粒状蛍光の増強を核周囲に観察した。これはオートファジーの活性化により、LC3-II がオートファゴゾームに集積したためと考えられた。

ウェスタンブロットでは、ラパマイシン処理により、LC3-I が切断されて短い断片となった LC3-II のバンドが増強されることが示された。これは、上記で見られた顆粒上蛍光の増強が、オートファジーの活性化によるものであることを示唆する所見であると考えられた。

4. 考察

PLP1 重複変異は、最も頻度の高い変異であるにもかかわらず、その細胞病態が十分に明らかになっておらず、治療法開発への足がかりが見つかっていない。しかし、近年、エンドゾームでの過剰 PLP1 タンパクの蓄積が報告されたことから、オートファジーの病態への関与が示唆された。このことから、我々はオートファジーが PLP1 重複変異の治療標的の一つになるのでは

ないかと考えている。

本研究では、この仮説に基づき、PLP1 重複変異による PMD の治療法開発の一端として、培養細胞系でオートファジーの活性化を可視的に検出できる解析系を確立した。

今後、この系を用いることにより、PLP1 の過剰発現が、どのようにオートファジーの活性化に関与しているかの解析を行うことができる。また、オートファジーを活性化する、あるいは抑制するような化合物の同定のためのスクリーニングに用いることも出来る。実際に、今後、食品化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを予定しており、これによって見いだされた化合物が PMD 重複の候補薬になる可能性がある。

5. 結語

in vitro でのオートファジー活性化の可視化をスクリーニングできる実験系を確立した。これを用いて、PLP1 重複変異による PMD の病態解明と治療法開発を進める。

6. 研究発表

なし

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

平成 21・22 年度 PLP1 遺伝子解析の結果報告
～特に開始コドンの変異例解析を中心として～

小坂仁¹、新保裕子¹、永井淳一²、黒澤健司³

1 地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター神経内科、2 同 検査科、3 同 遺伝科

研究要旨

平成 21 年 4 月以降に、当院で PMD 診断を目的に PLP1 遺伝子検索を行った 22 例について、定量的 PCR、FISH、シーケンスを行った。その内、開始コドンに変異を認めた症例 1 と、エクソン 2-7 に欠失を認めた症例 2 については、さらに詳細な解析を行った。依頼総数 22 例の内、量的異常としては、重複が 3 例、3 倍が 1 例、エクソン 2-7 の欠失（症例 2）が 1 例であった。点突然変異は 8 例で認め、ATG>AGG (initiation codon) (exon1)、Phe32Val (exon2)、Ileu176Asn(exon4)、Asp203His (exon4)、Arg205Lys (exon4)、Ala214Asp (exon5) はそれぞれ 1 例に、Phe240Leu (exon6) は血縁関係のない 2 例に認めた。症例 1 では ATG>AGG (initiation codon)の変異導入により、抗 FLAG 抗体では PLP1 の検出が消失した。また FLAG による影響を回避するため、タグのないプラスミドから作成された蛋白を無細胞系で検出したが、同様の結果であり、完全欠失に相当する変異と考えられた。軽症の表現型、末梢神経伝導速度低下もそれを支持していた。また症例 2 では、イントロン 1 から始まる 34 kb の欠失を証明し、切断点を同定した。この症例もまた軽症の表現型であり、機能喪失型変異は、軽症の表現型を呈するという従来の結果を支持した。

1. 研究目的

当院では Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) の診断を保険診療として、行っている。臨床的に PMD と診断される症例のうち、約半数で Proteolipid protein 1 (PLP1) 遺伝子異常を見いだしている。臨床症状は、定額のない重症例から、臨床的に痙性対麻痺に相当する軽症例まで幅が広い。今回は、班研究開始時からの解析例を報告し、特に軽症例の分子基盤を明らかにすることを目的として、さらに詳細な解析を行ったので報告する。

2. 研究方法

【方法】対象は、平成 21 年 4 月以降に、当院で PMD 診断を目的に PLP1 遺伝子検索を行った 22 例について、定量的 PCR、FISH、シーケンスを行った。その内、開始コドンに変異を認めた症例 1 と、エクソン 2-7 に欠失を認めた症例 2 については、さらに詳細な解析を行った。症例 1 (6 歳男児、支持歩行、二語文あり。末梢神経電動速度低下あり)；正常型 PLP1 と site directed mutagenesis により得た変異型 PLP1 を、発現ベクターに組み込み、COS 細胞にリポフェクタミンにてトラ

ンスフェクトし、24 時間後回収し、抗 FLAG 抗体検出を行った。また無細胞系として、T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNAProduction System により mRNA を合成。タンパク質合成は、50 μL の反応スケールにて行った。反応系に Promega 社製 FluoroTect™ GreenLystRNA 0.5 μL を添加し、蛍光標識を行 50 μL スケールでタンパク質合成 (25°C、5 時間) を行い SDS-PAGE 後、蛍光検出した。症例 2 (26 歳男性、座位可能、言語発達遅滞あり。末梢伝導速度低下あり); *PLP1* のイントロン 1 と、下流の遺伝子配列の間で Long-PCR を行い、バンドが確認後、順次プライマー間隔を狭め、切断点を同定した。

3. 研究結果

依頼総数 22 例の内、量的異常としては、重複が 3 例、3 倍が 1 例、エクソン 2-7 の欠失 (症例 2) が 1 例であった。点突然変異は 8 例で認め、ATG > AGG (initiation codon) (exon1)、Phe32Val (exon2)、Ileu176Asn(exon4)、Asp203His (exon4)、Arg205Lys (exon4)、Ala214Asp (exon5) はそれぞれ 1 例に、Phe240Leu (exon6) は血縁関係のない 2 例に認めた。症例 1 では ATG > AGG (initiation codon) の変異導入により、抗 FLAG 抗体では PLP1 の検出が消失した。また FLAG による影響を回避するため、タグのないプラスミドから作成された蛋白を無細胞系で検出したが、同様の結果であり、完全欠失に相当する変異と考えられた。軽症の表現型、末梢神経伝導速度低下もそれを支持していた。また症例 2 では、PLP1 のイントロン 1 と、RAB9B のエクソン 1 にプライマーを設定したところ、Long-PCR が可能であった (~50kb)。

順次プライマー間隔を狭め、PCR 産物の全長がシーケンス可能となった時点で切断点を同定した。イントロン 1 から始まる 34 kb の欠失を証明し、切断点を同定した。この症例もまた軽症の表現型であり、機能喪失型変異は、軽症の表現型を呈するという従来の結果を支持した。

4. 結果および考察

症例 1 では ATG > AGG (initiation codon) の変異導入により、抗 FLAG 抗体では PLP1 の検出が消失した。また FLAG による影響を回避するため、タグのないプラスミドから作成された蛋白を無細胞系で検出したが、同様の結果であり、完全欠失に相当する変異と考えられた。軽症の表現型、末梢神経伝導速度低下もそれを支持していた。また症例 2 では、イントロン 1 から始まる 34 kb の欠失を証明し、切断点を同定した。この症例もまた軽症の表現型であった。以上の 2 例は、機能喪失型変異は、軽症の表現型を呈するという従来の結果を支持した。

5. 研究発表

A. 論文発表

1. [Osaka H](#), Koizume S, Aoyama H, Iwamoto H, Kimura S, Nagai , Kurosawa K, Yamashita S. Mild phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a PLP1-specific mutation, *Brain Dev.* 2010 32; 703-707
2. [Osaka H](#), Hamanoue H, Yamamoto R, Nezu A, Sasaki M, Saitsu H, Kurosawa K, Shimbo H, Matsumoto N, Inoue K. Disrupted SOX10 regulation of GJC2 transcription causes

- Pelizaeus- Merzbacher-Like Disease . *Ann Neurol*, 2010;250-4.
3. Saitsu H, Kato M, Okada I, Orii KE, Higuchi T, Hoshino H, Kubota M, Arai H, Tagawa T, Kimura S, Sudo A, Miyama S, Takami Y, Watanabe T, Nishimura A, Nishiyama K, Miyake N, Wada T, Osaka H, Kondo N, Hayasaka K, Matsumoto N. STXBPI mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern. *Epilepsia*. 2010 Sep 30. [Epub]
 4. 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 facilitated by proton MR spectroscopy. *J Inher Metab Dis*. 2010;33; 85-90.
 5. Tsuyusaki Y, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi M, Osaka H, Yamamoto K, Kurosawa K. 1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype. *Pediatr Int*. 2010; 52: 547-550
 6. Sato I, Onuma A, Goto N, Sakai F, Fujiwara I, Uematsu M, Osaka H, Okahashi S, Nonaka I, Tanaka S, Haginoya K. A case with central and peripheral hypomyelination with hypogonadotropic hypogonadism and hypodontia (4H syndrome) plus cataract. *J Neurol Sci*. 2010 [Epub]
 7. Tsuji M, Takagi A, Sameshima K, Iai M, Yamashita S, Shinbo H, Furuya N, Kurosawa K, Osaka H. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency with progressive polyneuropathy in an infant. *Brain Dev*. 2010 [Epub]
 8. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Arita K, Nakamura H, Ohyama M, Osaka H, Kambara T, Hirako Y, Shimizu H. Plectin deficiency leads to both muscular dystrophy and pyloric atresia in epidermolysis bullosa simplex. *Hum Mutat*. 2010:E1687-98.
 9. Muto A, Oguni H, Takahashi Y, Shirasaka Y, Sawaishi Y, Yano T, Hoshida T, Osaka H, Nakasu S, Akasaka N, Sugai K, Miyamoto A, Takahashi S, Suzuki M, Ohmori I, Nabatame S, Osawa M. Nationwide survey (incidence, clinical course, prognosis) of Rasmussen's Encephalitis. *Brain Dev*. 2010;32:445-53
 10. Saitsu H, Tohyama J, Kumada T, Egawa K, Hamada K, Okada I, Mizuguchi T, Osaka H, Miyata R, Furukawa T, Haginoya K, Hoshino H, Goto T, Hachiya Y, Yamagata T, Saitoh S, Nagai T, Nishiyama K, Nishimura A, Miyake N, Komada M, Hayashi K, Hirai S, Ogata K, Kato M, Fukuda A, Matsumoto N. Dominant-negative mutations in alpha-II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic

quadriplegia, and developmental delay. Am J Hum Genet. 2010;86:881-91.

B. 学会発表

1. 辻 恵、三谷忠宏、渡辺好宏、鮫島希代子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁、急性脳症を呈した重症乳児ミオクロニーてんかんの1例、第65回神奈川てんかん懇話会 2010.1.16 横浜
2. 大脳白質変性を伴う交通性水頭症に末梢神経障害・呼吸不全を合併した乳児例辻 恵、渡辺好宏、鮫島希代子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁、第15回蔵王セミナー2010.2.20-21 山形
3. インフルエンザ罹患に伴うせん妄の Delirium Rating Scale による検討
渡辺好宏、藤田利治、和田敬仁、小坂仁、森雅亮、横田俊平
第113回日本小児科学会総会 2010.4.24 盛岡
4. MRS が診断に有用であった Creatine transporter deficiency (CTD) の一例 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、久原とみ子、相田典子、小坂仁、第52回関東小児神経学会 22.3.20 東京
5. 抗NMDA受容体脳炎の1例、秋庭真理子、渡辺好宏、辻恵、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁、山岡正慶、的場香織、第46回神奈川小児神経学会、2010.7.10 横浜
6. 小児期発症 Charcot-Marie-Tooth 病の臨床病理学および遺伝学的検討山下純正、渡辺好、辻恵、鮫島希代子、和田敬仁、井合瑞江、小坂仁、阿部暁子、早坂清、第52回日本小児神経学会 5月20日~22日福岡
7. 精神遅滞患者に対するクレアチニン代謝異常のスクリーニング法の開発、和田敬仁、新保裕子、小坂仁、第52回日本小児神経学会 5月20日福岡
8. 大脳白質変性を伴う交通性水頭症に末梢神経障害・呼吸不全を合併した MTHFR 欠損症の一例、辻恵、渡辺好宏、鮫島希代子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁、第52回日本小児神経学会 5月20日福岡
9. 新型インフルエンザによる急性脳症の臨床的検討、渡辺好宏、安西里恵、露崎悠、辻恵、鮫島希代子、和田敬仁、井合瑞江、小坂仁、山下純正、第52回日本小児神経学会 5月20日福岡
10. サイクロフォスファミド療法が著効した抗NMDA受容体抗体脳炎の1例、三谷忠宏、大塚佳満、和田敬仁、辻恵、渡辺好宏、井合瑞江、山下純正、小坂仁、第53回関東小児神経学会 22.9.11 東京

6. 知的所有権の取得状況

特願 2010-25346 弱酸性陽イオン交換カラムを用いた生体アミンの検出。

MLPA(Multiplex ligation-dependent probe amplification)による
PLP1 遺伝子コピー数解析

黒澤健司¹、永井淳一²、小坂仁³

1 地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター遺伝科、
2 同 検査科、3 同 神経内科

研究要旨

Pelizaues-Merzbacher 病 (PMD) は、*PLP1* 遺伝子の異常により発症する X 連鎖劣性の先天性大脳白質変性症である。今回 *PLP1* 特異的 MLPA による PMD 解析についてまとめた。対象は、PMD 診断を目的に提出された患者、あるいは保因者女性で、MLPA は、MRC-Holland 社製 MLPA P022 *PLP1* を用いた。*PLP1* 重複 (duplex) 男性罹患者、*PLP1* 重複保因女性、*PLP1* 三重複 (triplex)、*PLP1* 遺伝子内部分欠失例 (exon2-6) いずれも、MLPA では正確に検出評価することが可能であった。しかし、Bacterial artificial chromosome (BAC) クローンをプローブとした間期核 FISH では、正確に triplex および遺伝子内部分欠失を検出することはできなかった。以上の結果から *PLP1* 特異的 MLPA は、臨床診断における PMD1 次スクリーニングとして極めて有用であった。FISH 解析および定量 PCR、シーケンス解析との組み合わせによる臨床診断システムの確立が重要である。

1. 研究目的

Pelizaues-Merzbacher 病 (PMD) は、乳児期早期から眼振、筋緊張低下、発達遅滞などの症状を呈し、成長とともに痙性四肢麻痺と失調が進行する代表的な中枢神経系ミエリン形成不全症である。原因遺伝子は X 染色体 q22 にマップされる *Proteolipid protein 1* (*PLP1*) 遺伝子で、X 連鎖劣性遺伝形式をとる。診断は、臨床症状およびびまん性の大脳白質変性を特徴とする頭部 MRI 画像所見、聴性脳幹反応 (ABR) など電気生理学的評価を組み

合わせて行われる。しかし、大脳白質変性疾患は遺伝的異質性が高く、確定診断は遺伝子診断による。PMD をきたす *PLP1* 遺伝子の異常は多岐に及び、臨床的に PMD と診断された患者での変異は、*PLP1* 領域の遺伝子重複が 50-60%、シーケンス解析で検出される遺伝子内変異が 15-25% とされる。しかし、実際には、まれな例として遺伝子内欠失や転座重複例、さらには 3 重複 (triplex) 例などが存在する。*PLP1* 遺伝子領域の重複は平均 500 kb とされ、fluorescence *in situ*

hybridization (FISH) での重複確認は間期核を用いる。したがって遺伝子診断システムとしてはこれらを考慮した遺伝学的解析システムを備える必要がある。こうしたゲノムの特定領域のゲノムコピー数変化の検出方法としてアレイ CGH (array-based comparative genomic hybridization) が優れるが、コストの問題が残る。近年 exon レベルでのコピー数解析として、Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法が注目されている。1本のチューブ内で各領域特異的な PCR を同時に行い定量化する方法で、キット化することにより手法の簡便化とコスト低下を達成している。今回我々は、この MLPA 解析を PMD 診断に応用し、その有用性を確認したので報告する。

2. 研究方法

対象は、PMD診断を目的に提出された患者、あるいは保因者女性で、文書による同意を得たのちに解析を進めた。染色体検査およびFISH解析は標準的方法により行われた。FISH解析では検出プローブとしてRP11-832L2

(Xq22.2) を、コントロールとして *PLP1* より約2Mbセントロメア側にマップされるBACクローン CTD-227005 (Xq22.1) を用い、Leica CW4000で観察した。ゲノムDNAはキットによる標準方法(QIAamp DNA Blood Mini kit) により抽出し、MLPA解析では抽出精製を2回繰り返した。MLPAは、MRC-Holland社製MLPA

P022 *PLP1* を用いた。定量PCRは、LightCycler480 (Roche) を用いて解析を行った。*PLP1* アレルコピー数の定量化は、 $\Delta\Delta Ct$ 法により、Reference gene はBeta-globin gene exon 3、およびKDR gene exon 30とした。

(倫理面への配慮)

研究を進めることに対して、解析施設内での倫理審査承認を得た。その内容は、PMD 遺伝子解析全般については「先天性大脳白質形成不全症の遺伝子診断」(平成21年11月19日付承認)、MLPA法の臨床応用については「MLPA法による原因不明多発奇形精神遅滞の病因解析」(平成21年11月19日付承認) によった。

3. 研究結果

最初に、正常男性、正常女性で解析を行い、*PLP1* 各 exon (正常男性では各1コピー、正常女性では各2コピー)、X染色体上対照領域 (正常男性では各1コピー、正常女性では各2コピー)、常染色体対照領域 (正常男性、女性ともに各2コピー) が正しく評価できることを確認した (結果省略)。次に定量PCRおよびFISHで重複を確認している男性患者、および女性保因者について MLPA 法による解析を行い、それぞれ矛盾ない結果が得られた。以上を参考に、定量PCRにより3コピー (triplex) を検出した男児例、および部分欠失例 (partial deletion) について検証を行った。図に示すように、7つの exon すべてについて3重複していることを検出することができた。ま

た、欠失については、exon 1 の残存と exon 2-7 の欠失を一度に検出することが可能であった。しかし、triplex 症例での間期核 FISH では、コピー数変化が推定されたが、それが triplex であるか duplex であるか判別は困難であった。また、exon2-7 欠失例でも間期核 FISH では、欠失を認めなかった（結果省略）。この欠失例では、欠失領域が用いた BAC clone RP11-832L2（約 180kb）より小さいことが予想された。つまり、欠失領域が BAC clone のマップされる領域に含まれてしまっていることが理由と推定された。

4. 考察

遺伝的異質性の高い先天性大脳白質形成不全症の診断スクリーニングにおいて、*PLP1* の MLPA 解析を導入することは、臨床診断として極めて有用である。しかし、あくまでもスクリーニングとしての解析手段であり、MLPA で検出された変異は、他の方法によって確認することが必要なことは言うまでもない。具体的には、全 exon におよぶ遺伝子重複では転座の可能性を確認するために分裂期あるいは間期核での FISH 検査が不可欠になる。また、FISH で検証できない微細な変異では、定量 PCR での確認が必要である。さらに、1 exon 程度のコピー数変化が見られた場合には、probe 設定領域の多型による可能性も十分考慮する必要がある。

MLPA の有用性を PMD 遺伝子診断

でも確認することができた。症例によっては duplex と FISH で確認してきた症例に対しても MLPA によるコピー数の再評価が必要かもしれない。MLPA は臨床診断システムとして、先天性大脳白質形成不全症の診断に導入すべきであると考えられた。

5. 結論

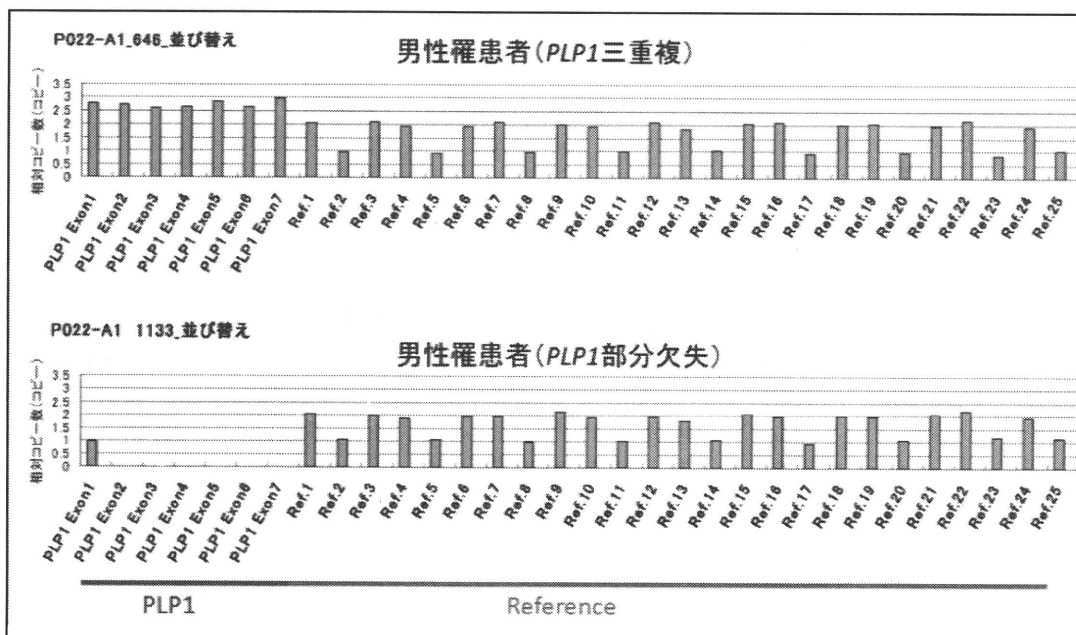
PLP1 特異的 MLPA は、臨床診断における PMD1 次スクリーニングとして極めて有用であった。FISH 解析および定量 PCR、シーケンス解析との組み合わせによる臨床診断システムの確立が重要である。

6. 研究発表

A. 論文発表

1. 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* 52;547-550, 2010.
2. Osaka H, Hamanoue H, Yamamoto R, Nezu A, Ssaki M, Saitsu H, Kurosawa K, Shimbo H, Matsumoto N, Inoue K. Disrupted SOX10 regulation of GJB2 transcription causes Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Ann Neurol* 68:250-254, 2010.
3. Saito Y, Kubota M, Kurosawa K, Ichihashi I, Kaneko Y, Hattori

- A, Komaki H, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M.
Polymicrogyria and infantile spasms in a patient with 1p36 deletion syndrome. *Brain Dev.* 2010 Aug 12. [Epub ahead of print]
4. 黒澤健司 神経線維腫症1型における分子細胞遺伝学的スクリーニング 日レ病会誌 1:35-37, 2010.
- B. 学会発表
1. 榎本啓典、石川亜貴、古谷憲孝、黒澤健司 全サブテロメア FISH による診断未定症例のスクリーニング 第113回日本小児科学会 2010.23-25. 盛岡
2. 石川亜貴、黒澤健司、山下純正 MECP2、L1CAM を含む Xq28 領域の重複を認めた重度精神遅滞の男児例 第52回日本小児神経学会 2010.5.20-22. 福岡
3. 宮武聡子、山下純正、黒澤健司、三宅紀子、松本直通 劣性遺伝性白質脳症の1家系の疾患責任遺伝子解析 第55回日本人類遺伝学会 2010.10.27-30. さいたま市
4. Kurosawa K, Enomoto K, Furuya N, Masuno M, Kuroki K. Trends of the incidence of twin births in Japan. 60th American Society of Human Genetics 2010.11.2-6. Washington DC. USA.
5. Miyatake S, Miyake N, Yamashita S, Kurosawa K, Matsumoto N. Anovel homozygous intronic DARS2mutation in a family with congenital leukoencephalopathy. 60th American Society of Human Genetics 2010.11.2-6. Washington DC. USA.
7. 知的所有権の取得状況なし。



☒ MLPA による解析例

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。

MRS では Msd マウスで wild マウスに比して tNAA (NAA+NAAG), creatine, glutamine, glutamate, taurine の高値を、Cho の低値を認めた。NAAG 単独では Msd マウスで高値であったが、十分な信頼度は得られなかった。HPLC による解析で Msd マウス脳において NAA, NAAG とともに wild マウスに比して高値であることが確認された。免疫染色では Msd マウス脳で髄鞘低形成とグリオシスが明らかであったが、Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) 数には差は認めなかった。

Msd マウスにて tNAA の増加が確認された。この増加は NAA, NAAG 両者の増加を反映していた。NAA は乏突起膠細胞において aspartoacylase (ASPA) の働きで分解される。髄鞘低形成疾患では成熟した乏突起膠細胞が存在せず、NAA が分解されずに蓄積し、二次的に NAAG が高値を呈していると推測された。未診断の白質変性症における tNAA 高値は髄鞘低形成を強く示唆する所見と考えられる。

1. 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 マウス脳代謝の非侵襲的測定を試みた。

2. 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。

両マウス脳の NAA, NAAG を HPLC 法にて定量測定した。また両マウス脳の Mbp, Gfap, Ng2 染色を施行した。

3. 研究結果

MRS では Msd マウスで wild マウスに比して tNAA (NAA+NAAG), creatine, glutamine, glutamate, taurine の高値を、Cho の低値を認めた。NAAG 単独では Msd マウスで高値であったが、十分な信頼度は得られなかった。

HPLC による解析で Msd マウス脳で NAA, NAAG とともに wild マウスに比して高値であることが確認された。免疫染色では Msd マウス脳で髄鞘低形成とグリオーシスが明らかであったが、Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) 数には差は認めなかった。

4. 考察

Msd マウスにて tNAA の増加が確認された。この増加は NAA, NAAG 両者の増加を反映していた。NAA は乏突起膠細胞において aspartoacylase (ASPA) の働きで分解される。髄鞘低形成疾患では成熟した乏突起膠細胞が存在せず、NAA が分解されずに蓄積し、二次的に NAAG が高値を呈していると推測された。未診断の白質変性症における tNAA 高値は髄鞘低形成を強く示唆する画像所見と考えられる。

5. 結論

7 T 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。

6. 研究発表

論文発表

1. Takanashi J. Moyamoya disease in children. *Brain Dev* in press.
2. Shioda M, Hayashi M, Takanashi J, Osawa M. Lesions in the central tegmental tract in autopsy cases of developmental disorders. *Brain Dev* in press.
3. Shinohara M, Saitoh M, Takanashi J, Yamanouchi H, Kubota M, Goto T, Kikuchi M, Shiihara T, Yamanaka G, Mizuguchi M. Carnitine palmitoyl transferase II polymorphism is associated with multiple syndromes of acute encephalopathy with various infectious diseases. *Brain Dev* in press.
4. Omata T, Takanashi J, Wada T, Arai H, Tanabe Y. Genetic diagnosis and acetazolamide treatment of familial hemiplegic migraine. *Brain Dev* in press.
5. Hasegawa S, Saito S, Takanashi J, Morokoshi Y, Furukawa T, Saga T, Aoki I. Evaluation of ferritin-overexpressing brain in newly developed transgenic mice. *Magn Reson Imaging* in press.
6. Takanashi J. Wide range of

- CNS manifestations of rotavirus infection. *Brain Dev* 2011; 33: 9.
7. Takanashi J, Miyamoto T, Ando N, Kubota T, Oka M, Kato Z, Hamano S, Hirabayashi S, Kikuchi M, Barkovich AJ. Clinical and radiological features of rotavirus cerebellitis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2010; 31: 1591-1595.
 8. Takanashi J, Arai H, Nabatame S, Hirai S, Hayashi S, Inazawa J, Okamoto N, Barkovich AJ. Neuroradiological features of *CASK* mutations. *AJNR Am J Neuroradiol* 2010; 31: 1619-1622.
 9. Takanashi J, Imamura A, Hayakawa F, Terada H. Differences in the time course of splenial and white matter lesions in clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS). *J Neurol Sci* 2010; 292: 24-27.
 10. Ninchoji T, Takanashi J. Pontine hypoplasia in 5p-syndrome; a key MRI finding for a diagnosis. *Brain Dev* 2010; 32: 571-573.
 11. 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* 2010; 290: 153-156.
 12. 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* 2010; 32: 435-439.
- 和文
1. 市山高志、高梨潤一. 急性脳症の診療・研究最前線 序論. 脳と発達 印刷中
 2. 高梨潤一. 急性脳症の診療・研究最前線 小児急性脳症の臨床と画像. 脳と発達 印刷中
 3. 高梨潤一. 頭部 MRI, MR spectroscopy. 小児内科 2010; 42: 1152-1160.
 4. 高梨潤一. ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) の中枢神経合併症. ヘルペス感染症フォーラム 2010; 29-31.
 5. 高梨潤一. 小児 HHV-6 の中枢神経合併症. HERPES MANAGEMENT 2010; 14: 6.
- 和文 著書
1. 高梨潤一: ¹H-MRS の臨床応用. 小児神経の画像診断—脳脊髄から頭頸部・骨軟部まで— 秀潤社 大場洋編 132-145, 2010
 2. 大場洋、高梨潤一、安達木綿子: 先天代謝・変性疾患. 小児神経の画像診断—脳脊髄から頭頸部・骨軟部まで— 秀潤社 大場洋編 370-445, 2010
 3. 高梨潤一: 脳血管障害 II. 小児神経の画像診断—脳脊髄から頭頸部・骨軟部まで— 秀潤社 大場洋編 312-315, 2010
 4. 相原正男、市山高志、伊東恭子、

大塚頴子、川井充、後藤雄一、佐々木正行、佐藤博美、塩見正司、下泉秀夫、高梨潤一、田沼直之、森本武彦、橋本俊顕：小児神経学用語集 改定第3版 診断と治療社 日本小児神経学会用語委員会編，2010

5. 高梨潤一：小児白質病変の鑑別。イメージからせまる小児神経疾患—症例から学ぶ診断・治療プロセス— 診断と治療社 日本小児神経学会編集 杉田克生、林雅晴監修 47-48, 2010

(1) 学会発表 講演

1. 高梨潤一：小児神経 MRI の ABC、小児急性脳症の臨床と画像。久留米大学小児科学教室 Grand Round 2010.1.22.
2. 高梨潤一：小児急性脳炎脳症の画像診断。第39回日本神経放射線学会 2010.2.11-13.
3. 高梨潤一：急性脳症の画像診断。第29回日本画像医学会 2010.2.26-27.
4. 高梨潤一：急性脳症の臨床と画像。第52回日本小児神経学会 2010.5.20-22.
5. 高梨潤一：急性脳症の臨床・画像 up to date。第20回青葉画像研究会 2010.5.28.
6. 高梨潤一：MRI 検査でわかること。先天性大脳白質形成不全症の克服へ向けて 第2回市民公開セミナー 2010.7.17
7. 高梨潤一：画像臨床像から新しい概念へ：可逆性の脳梁膨大部病変を有する脳炎脳症 (MERS) のあれこれ。第4回東海地区小児神経セミナー 2010.9.4
8. 高梨潤一：新生児単純ヘルペス脳炎を考える。第53回日本小児神

経学会関東地方会 2010.9.12

9. 高梨潤一：拡散強調画像から MERS を考える。第53回日本小児神経学会関東地方会 2010.9.12
10. 高梨潤一：MERS のあれこれ。第31回神経放射線カンファレンス 2010.10.18
11. 高梨潤一：小児神経における MR spectroscopy。第5回小児神経放射線研究会 2010.10.23

7. 知的財産権の出願・登録状況

無し