

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

ターゲティング・リシーケンスによる先天性大脳白質形成不全症の  
網羅的遺伝子解析

研究分担者 山本 俊至 東京女子医科大学統合医科学研究所・准教授

研究要旨

**研究目的：**先天性大脳白質形成不全症においては、主な責任遺伝子である *PLP1* の変異が認められない症例が少なからず存在する。現在わかっているその他の責任遺伝子 *GJC2* や *SLC16A2* にも変異の認められない症例があり、それ以外にも関連遺伝子があると考えられる。そこで、本研究では新規関連遺伝子の同定を目的とした網羅的ゲノム解析を行った。

**研究方法：**既知の遺伝子を含め、機能から先天性大脳白質形成不全症に関連すると予測される計 17 の候補遺伝子 (*PLP1*, *GJC2*, *MBP*, *SLC16A2*, *HSPD1*, *FAM126A*, *SOX10*, *QKI*, *OLIG1*, *OLIG2*, *LMNB1*, *PAX6*, *MOBP*, *MYT1*, *CNP*, *MAG*, *MOG*) を選定してベイトを作成し、これまでの候補遺伝子解析でまったく異常が認められていない先天性大脳白質形成不全症症例 5 例について、次世代シーケンサーを用いたターゲティング・リシーケンスによる網羅的な解析を行った。

**研究結果：**1 例において *MAG* のミスセンス変異と一部エクソンのヘテロ接合喪失領域を認めた。両親のサンプルと合わせたトリオ解析を行ったところ、ミスセンス変異は父親と共通であった。ヘテロ接合喪失領域は部分欠失と考えられたので、カスタムアレイによる CGH 解析を行ったが、欠失ではなかった。従って、認められたミスセンス変異が病的変異とは断定できなかった。

**結論：**今回候補とした 17 の遺伝子には病的変異が認められなかったため、新たな責任遺伝子とは言えないという結論となった。今後は、全エクソンを対象としたエクソーム解析を行うべきと考える。

## 1. 研究目的

先天性大脳白質形成不全症、特に Pelizaeus-Merzbacher 病(PMD)においては、主な責任遺伝子である *PLP1* の変異が認められない症例が少なからず存在する。現在わかっているその他の責任遺伝子 *GJC2* や *SLC16A2* にも変異の認められない症例があり、それ以外にも関連遺伝子があると考えられる。そこで、本研究では新規関連遺伝

子の同定を目的とした網羅的ゲノム解析を行った。

## 2. 研究方法

### (1) 実施計画と経過

これまでに臨床症状から PMD が疑われ、遺伝子解析を実施した 35 例の患者のうち、責任遺伝子として知られている *PLP1*, *GJC2*, そして *SLC16A2* に異常が認められなかった患者のうち、

臨床症状を精査して、PMD として矛盾のない5例(男/女=3/2)について責任遺伝子変異を明らかにするため、次世代シーケンサーである Life Technoloies社 SOLiD4を用いたターゲット・リシーケンスによる網羅的な解析を計画した。

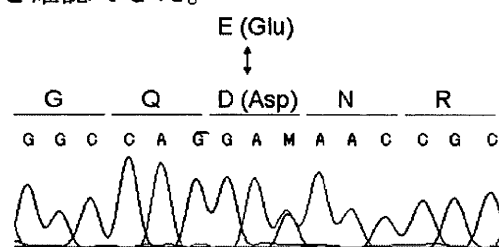
ターゲットには Agilent SureSelect Target Enrichment システムを利用した。in silico library、あるいは過去の論文などから遺伝子の機能として先天性大脳白質形成不全症に関連すると予測される候補遺伝子を挙げ、既知の遺伝子も含め計17の遺伝子(*PLP1*, *GJC2*, *MBP*, *SLC16A2*, *HSPD1*, *FAM126A*, *SOX10*, *QKI*, *OLIG1*, *OLIG2*, *LMNB1*, *PAX6*, *MOBP*, *MYT1*, *CNP*, *MAG*, *MOG*)を選定して Agilent 社 e-array システムを利用してベイトとなるオリゴを作成し、候補遺伝子領域のゲノム DNA をターゲットとして Enrichment し解析した。

## (2) 倫理面への配慮

本研究においては患者情報に基づく遺伝子解析を行うことから、個人情報に配慮する必要があるため、東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得て、書面に基づく説明と書面によるインフォームド・コンセントを得て実施した。収集される検体には、二重連結可能匿名化番号を付与し、匿名化番号、同意書のコピー1部、および患者情報票のコピー1部について個人情報管理者が管理した。個人情報と匿名化後のIDを連結する対応表はコンピューターの外部記憶装置に保存し、鍵のかかるキャビネット内で個人情報管理者が保管した。試料等に関するデータベースをコンピューターを用いて取り扱う場合は、インターネットや他のコンピューターから切り離した状態で取り扱った。

## 3. 研究結果

シーケンス結果から、新規の病的変異を示すものを選別したところ、5例中1例においてMAGのミスセンス変異 c.942C>A (p.314D>E)と一部エクソンのヘテロ接合喪失領域を示唆する所見を認めた。他の4例には明らかに病的と考えられる所見はなかった。この変異が確実であるかどうかの検証のため、サンガー法によるシーケンス反応で確認したところ、確かに変異を確認できた。



c.942C>A (p.314D>E)はデータベースには既知のSNPとして登録されていなかったもので、健康な日本人100人について多型頻度を解析したが、100人中1人も保因者が存在しなかった。

MAGのミスセンス変異を示した症例の両親のサンプルと合わせたトリオ解析を行ったところ、ミスセンス変異は父親と共通であった。ヘテロ接合喪失領域は部分欠失と考えられたので、MAG領域にターゲットしたカスタムアレイによるCGH解析を行ったが、欠失を認める所見はなかった。従って、認められたミスセンス変異が病的変異とは断定できなかった。

## 4. 考察

今回解析した5例の対象患者は、臨床症状からは *PLP1* の変異による PMD とは区別できず、*PLP1* と機能が似通った何らかの遺伝的変異を持つ

ものと考えられた。今回認められた *MAG* の新規変異は父親と共通ながら常染色体劣性遺伝形式による場合は父親が保因者である可能性もあり、また、SOLiD の SNP 情報からは *MAG* の 3'側でヘテロ性が不自然に失われていたことから、複合ヘテロ接合を考えてカスタムアレイによる解析も行ったが、欠失を証明することができなかった。以上より、*MAG* が PMD の原因であるとは言えない。

今回使用したターゲットング・エンリッチメント方式では 3-Mb の領域だけがエンリッチメントできるという制約があり、候補遺伝子 17 個だけに focus を当てて今回スクリーニングしたが、今後は全エクソン領域をシーケンスできるエクソーム解析を行うべきと考える。

## 5. 結論

今回候補とした 17 の遺伝子には病的変異が認められなかったもので、新たな責任遺伝子とは言えないという結論となった。今後は、全エクソンを対象としたエクソーム解析を行うべきと考える。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamamoto T, Shimojima K, Nishizawa T, Matsuo M, Ito M, Imai K. Clinical manifestations of the deletion of Down syndrome critical region including *DYRK1A* and *KCNJ6*. *Am J Med Genet* (in press).
- 2) Tanaka T, Motoi N, Tsuchihashi Y, Tazawa R, Kaneko C, Nei T, Yamamoto T, Hayashi T, Tagawa T, Nagayasu T, Kuribayashi F, Ariyoshi K, Nakata K, Morimoto

K. Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in *CSF2RB*. *J Med Genet* (in press).

- 3) 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* (in press).
- 4) Kibe T, Mori Y, Okanishi T, Shimojima K, Yokochi K, Yamamoto T. Two concurrent chromosomal aberrations involving interstitial deletion in 1q24.2q25.2 and inverted duplication and deletion in 10q26 in a patient with stroke associated with antithrombin deficiency and a patent foramen ovale. *Am J Med Genet* (in press).
- 5) Otsuka M, Oguni H, Liang J-S, Ikeda H, Imai K, Hirasawa K, Imai K, Tachikawa E, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. *STXBPI* mutations cause not only Ohtahara syndrome but also West syndrome—Result of Japanese cohort study. *Epilepsia* 51: 2449–2452, 2010.
- 6) Okamoto N, Akimaru N, Matsuda K, Suzuki Y, Shimojima K, Yamamoto T. Co-occurrence of Prader-Willi and Sotos syndromes. *Am J Med Genet*

- 152A: 2103-2109, 2010.
- 7) Okumura A, Yamamoto T, Kidokoro H, Kato T, Kubota T, Shoji H, Sato H, Shimojima K, Shimizu T. Altered gene expression in umbilical cord mononuclear cells in preterm infants with periventricular leukomalacia. *Early Hum Dev* 86: 665-7, 2010.
  - 8) Shimojima K, Imai K, Yamamoto T. A de novo 22q11.22q11.23 interchromosomal tandem duplication in a boy with developmental delay, hyperactivity, and epilepsy. *Am J Med Genet* 152A: 2820-6, 2010.
  - 9) Shimojima K, Sugiura C, Takahashi H, Ikegami M, Takahashi Y, Ohno K, Matsuo M, Saito K, Yamamoto T. Genomic copy number variations at 17p13.3 and epileptogenesis. *Epilepsy Res* 89: 303 — 309, 2010.
  - 10) Inage E, Suzuki M, Minowa K, Akimoto N, Hisata K, Shoji H, Okumura A, Shimojima K, Shimizu T, Yamamoto T. Phenotypic overlapping of trisomy 12p and Pallister-Killian syndrome. *Eur J Med Genet* 53: 159-161, 2010.
  - 11) 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, Yamamoto T. Comprehensive genetic analyses of PLPI in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease applied by array-CGH and fiber-FISH analyses identified new mutations and variable sizes of duplications. *Brain Dev* 32: 171-179, 2010.
  - 12) 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. *Genesis* 48: 233-243, 2010.
  - 13) 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. *J Hum Genet* 55: 155-162, 2010.
  - 14) Shimojima K, Sugiura C, Takahashi H, Ikegami M, Takahashi Y, Ohno K, Matsuo M, Saito K, Yamamoto T. Genomic copy number variations at 17p13.3 and epileptogenesis. *Epilepsy Res* 89: 303-309, 2010.
  - 15) Izumi K, Okuno H, Maeyama K, Sato S, Yamamoto T, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K. Interstitial microdeletion of 4p16.3: Contribution of WHSC1 haploinsufficiency to the pathogenesis of developmental delay in Wolf-Hirschhorn

- syndrome. *Am J Med Genet* 152A: 1028-1032, 2010.
- 16) Takatsuki S, Nakamura R, Haga Y, Mitsui K, Hashimoto T, Shimojima K, Saji T, Yamamoto T. Severe pulmonary emphysema in a girl with interstitial deletion of 2q24.2q24.3 including ITGB6. *Am J Med Genet* 152A: 1020-1025, 2010.
2. 学会発表
- 1) Yamamoto T, Komoike Y, Shimojima K, Liang J-S, Fujii Y, Maegaki Y, Osawa M, Fujii S, and Higashinakagawa T. A functional analysis of GABARAP on 17p13.1 by knockdown zebrafish. The 60<sup>th</sup> Annual Meeting for American Society of Human Genetics, Washington DC, USA, Nov 2-6, 2010.
- 2) Shimojima K, Komoike Y, Tohyama J, Takahashi S, Páez M-T, Nakagawa E, Goto Y, Ohno K, Ohtsu M, Oguni H, Osawa M, Higashinakagawa T, Yamamoto T. TULIP1 haploinsufficiency with brain development delay. The 60<sup>th</sup> Annual Meeting for American Society of Human Genetics, Washington DC, USA, Nov 2-6, 2010.
- 3) 山本俊至, 下島圭子, 伊藤昌弘, 今井克美. ダウン症候群責任領域のハプロ不全による臨床症状. 第52回日本小児神経学会大会、福岡 2010. 5.20~22.
- 4) 下島圭子, 遠山潤, 中川栄二, 後藤雄一, 大野耕策, 大津マユ, 小国弘量, 大澤眞木子, 山本俊至. TULIP1 のハプロ不全は、発達遅滞と難治性てんかんの原因となる. 第52回日本小児神経学会大会、福岡 2010. 5.20~22.
- 5) 中山東城, 青天目信, 中川栄二, 斎藤義朗, 下島圭子, 山本俊至, 奥村恵子, 藤江弘美, 植松 貢, 金子 裕, 小牧宏文, 須貝研司, 佐々木征行. Atypical benign partial epilepsy 様のでんかんを呈した8p欠失/9p重複の2例: てんかん責任領域の検討. 第52回日本小児神経学会大会、福岡 2010. 5.20~22.
- 岡本伸彦, 山本俊至, 下島圭子. 9q34欠失症候群5例の臨床研究. 第52回日本小児神経学会大会、福岡 2010. 5.20~22.
- 向田壮一, 今井克美, 下島圭子, 山本俊至, 池上真理子, 池田浩子, 高山留美子, 最上友紀子, 高橋幸利. 點頭てんかんを発症したWilliams症候群の2症例. 第52回日本小児神経学会大会、福岡 2010. 5.20~22.
- 山本俊至. アレイ CGH によるデジタル染色体解析における遺伝カウンセリングの重要性. 第34回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 東京, 2010.5.28.
- 下島圭子, 山本俊至, 浦野真理, 斎藤加代子. 染色体検査における事前説明の重要性に関する考察: 娘の染色体検査結果の受容が困難であった母親の事例より. 第34回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 東京, 2010.5.28.
- 山本俊至. ランチョン;アレイ CGH 法が臨床遺伝にもたらしたもの. 日本人類遺伝学会第55回大会, 大宮, 山本俊至. シンポジウム. Cytogenetic Array- 国内の取り組み -.

Cytogenetic Array-結果解釈の重要性. 日本人類遺伝学会第55回大会, 大宮, 2010.11.25-27.

岡本伸彦, 秋丸憲子, 松田圭子, 下島圭子, 山本俊至. Prader-Willi 症候群とソトス症候群の合併例. 日本人類遺伝学会第55回大会, 大宮, 2010.11.25-27.

山本俊至, 下島圭子, 木部哲也, 横地健治. 複数の de novo ゲノムコピー数異常が同時に生じることは稀ではない? 日本人類遺伝学会第55回大会, 大宮, 2010.11.25-27.

下島圭子, 蔣池勇太, 遠山潤, Paez M-T, 中川栄二, 後藤雄一, 大野耕策, 高橋苑子, 大津真優, 小国弘量, 大澤眞木子, 東中川徹, 山本俊至. TULIP1 のハプロ不全は、発達遅滞と難治性てんかんの原因となる. 日本人類遺伝学会第55回大会, 大宮, 2010.11.25-27.

蔣池勇太, 下島圭子, 梁昭鉉, 藤井裕士, 前垣義弘, 大澤眞木子, 藤井早紀子, 東中川徹, 山本俊至. 17番染色体 p13.1 領域の微細欠失とゼブラフィッシュによる GABARAP 機能解析. 日本人類遺伝学会第55回大会, 大宮, 2010.11.25-27.

蔣池勇太, 下島圭子, 藤井克則, 東浩二, 安川久美, 河野陽一, 大澤眞木子, 藤井早紀子, 東中川徹, 山本俊至. Williams 症候群責任領域近傍の YWHAG は點頭てんかんと心肥大の原因となり得る. 日本人類遺伝学会第55回大会, 大宮, 2010.11.25-27.

山本俊至, 下島圭子, 平澤恭子, 前垣義弘. 1p36 欠失症候群の本邦における実態と欠失範囲の同定. 第53回日本小児神経学会総会 (予定)

山本俊至. 学会共同研究支援報告

(仮). 第53回日本小児神経学会総会 (予定)

## 7. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

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

PLP1 遺伝子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

分担研究者はこれまで多くの *PLP1* 遺伝子(*PLP1*)変異を同定してきた。*PLP1* の完全重複では古典型が多いが、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(PMD)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。今年度も引き続き *PLP1* 変異と病態の解析を進め、さらに点変異による古典型 PMD の長期経過と摂食嚥下機能評価を報告した。また、PMD が疑われた患者のうち通常の解析で *PLP1* の重複や点変異が認められなかった 20 症例について PMLD1 の原因遺伝子 (*GJC2*) を解析したところ、ミスセンス変異のヘテロ接合体が 1 例認められただけであった。PMLD1 は日本人でも稀と考えられた。さらに 1 例については *PLP1* のイントロンを含む全領域のリシークエンシングを施行したがプライス異常を引き起こす変異は認められなかった。さらなる病因の検討が必要である。

1. 研究目的

分担研究者はこれまで PMD が疑われた患者の *PLP1* 解析を研究の一環として行い、点変異 25 例、重複 26 例、欠失 1 例などを同定している。*PLP1* の完全重複では古典型が多いが、*PLP1* の点変異ではその位置と種類が家系ごとに異なり、重症な先天型 Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) から成人発症家族性痙性対麻痺 2 型 (SPG2) まで幅広いスペクトラムを呈する。個々の変異と病態の関係を明らかにすることは治療法の開発やその適応を考える上で極めて重要である。また、PMD が疑われた患者の中には通常の検査で変異が検出できない症例もある。これが *PLP1* の別の異常で起

きるのか、その他の大脳白質形成不全症の候補遺伝子の異常に因るのか、新たな病因遺伝子が存在するののかについて多面的に研究を進めているのでその経過を報告する。

2. 研究方法

(1) *PLP1* 遺伝子変異と病態の関係  
当施設でこれまで遺伝子解析を行いミスセンス変異が同定された男児 15 例を対象とした。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、さらに PolyPhen によりアミノ酸置換の影響を調べた。

(2) *GJC2* 遺伝子解析  
通常の解析で *PLP1* 変異が認められな

かった 20 症例を対象とした。*GJC2* のコード領域を含む 1.7 kb を 3 つに分けて PCR で増幅しダイレクトシーケンシングを行った。

### (3) *PLP1* 全配列解析

さらに 1 症例につき *PLP1* (全長 15,770 bp) のリシーケンシングを行った。

#### (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。

## 3. 研究結果および考察

### (1) *PLP1* 遺伝子変異と病態の関係

ミスセンス変異は重症型(FORM 0)となるケースが比較的多い中、FORM 3,4 も少なからず見られた。PolyPhen によりアミノ酸置換の機能評価を行ったところ 1 変異を除きすべて高いスコアを示した。重症度との細かな相関については立体構造を含めた多方面からの検討が必要と考えられた。

一方、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プライス変異は一般に軽症型(FORM 2~4)となりやすいことがわかった。しかし、フレームシフト変異で NMD による mRNA の不安定化が予測されるケースでも古典型を呈した 1 例があった。

また今年度は点変異による古典型の男性症例の長期経過を報告した。発達退行が現れる本症では患者の予後を左右する摂食嚥下障害に対するきめ細やかな対応が必要であり、嚥下造影検査を含めた経時的な摂食嚥下機能評価が有用と考えられた。

### (2) *GJC2* 遺伝子解析

通常の解析で *PLP1* 遺伝子の重複や点変異が認められなかった 20 症例について PMLD1 の原因遺伝子 (*GJC2*)

を解析したところ、ミスセンス変異のヘテロ接合体が 1 例認められた。プロモータ領域の解析が残されているものの、*GJC2* のコード領域の変異による白質形成不全症は日本人でも稀と思われる。

### (3) *PLP1* 全配列解析

*GJC2* が除外された上記症例のうち 1 例につき *PLP1* のイントロンを含む全領域のリシーケンシングを試みた。イントロン部分に 6 カ所の indel が認められただけでプライス異常などを引き起こす変異はなかった。*PLP1* を完全に除外するのは容易ではない。エピジェネティックな要因を含めたさらなる検討が必要である。

## 4. 結論

PMD における *PLP1* 変異の種類は多様で表現型や重症度が異なり、さらなる病態解析と長期経過観察が重要と考えられた。PMD が疑われるも *PLP1* 異常が認められなかった白質形成不全症患者の中で *GJC2* が原因のものは今のところ見つからず、新たな病因の同定が必要である。

## 5. 健康危機情報

特記すべきことはない。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

Sagata, N., Iwaki, A., Aramaki, T., Takao, K., Kura, S., Tsuzuki, T., Kawakami, R., Ito, I., Kitamura, T., Sugiyama, H., Miyakawa, T. and Fukumaki Y. Comprehensive behavioral study of GluR4 knockout mice, implication in cognitive function. *Genes Brain Behav.* 9: 899-909, 2010.



Matsuoka, T., Fujii, N., Kondo, A., Iwaki, A., Hokonohara, T., Honda, H., Sasaki, K., Suzuki, S.O., Iwaki, T. An autopsied case of sporadic adult-onset amyotrophic lateral sclerosis with FUS-positive basophilic inclusions. *Neuropathology*. In press.

Suzuki, N., Aoki, M., Warita, H., Kato, M., Mizuno, H., Shimakura, N., Akiyama, T., Furuya, H., Hokonohara, T., Iwaki, A., Togashi, S., Konno, H. and Itoyama, Y. FALS with *FUS* mutation in Japan, with early onset, rapid progress and basophilic inclusion. *J Hum Genet*. 55: 252-254, 2010.

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*. 119: 355-364, 2010.

## 2. 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, 2010.05.20.

藤山 りか, 佐野 のぞみ, 渡邊 健二, 神田 ゆう子, 吉留 幸一, 岩城 明子. Pelizaeus-Merzbacher 病患者での嚙

下機能評価の経験, 第36回日本重症心身障害学会学術集会, 2010.09.24.

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. 日本人類伝学会第55回大会, 2010.10.30.

Miura S, Shibata H, Kida H, Noda K, Iwaki A, Ayabe M, Aizawa H, Taniwaki T, Fukumaki Y. Partial *SPAST* and *DPY30* deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. The 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2010.11.05.

Nii T, Fujioka R, Iwaki A, Hattori S, Takao K, Shibata A, Nomura M, Miyakawa T, Fukumaki Y. Comprehensive behavioral analysis of mGluR3 knockout mice. The 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2010.12.08.

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剖検病理脳検体の収集と解析

出口貴美子、伊藤雅之、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

先天性大脳白質形成不全症は非常に稀な疾患であるため、剖検標本の数は極めて少なく、まとまった数の解析対象を短期間に確保することは非常に困難である。そこで、本年度からの新たな取り組みとして、過去に剖検された先天性大脳白質形成不全症の病理標本の収集を開始した。本年度は、まず倫理審査において承認を得た後、3例の検体を収集した。今後、症例数の増やしていくことにより、動物実験で得られた新たな知見について、ヒトでの所見を検討するなどの有効な活用が期待される。

1. 研究目的

近年のマウスをはじめとする動物モデルを用いた解析により、Pelizaeus-Merzbacher病（PMD）の分子病態が明らかになりつつある。今後動物モデルを用いた治療法の開発が進んだ場合に、これがヒトにも同様に適応できるのかを判断するためには、これら動物で確認された病理学的所見を患者の脳検体で検討することが非常に重要である。しかし、PMDをはじめとする先天性大脳白質形成不全症は非常に稀な疾患であるため、剖検標本の数は極めて少ない。従って、複数の標本を比較検討することは、現在非常に困難である。そこで、我々は、本邦における先天性大脳白質形成不全症の剖検脳病理標本を収集し、ある程度多数例での解析を可能にできる体制を作ることを目的とする。

2. 研究方法

小児神経疾患の病理解剖を実施している施設に個別に剖検標本の有無と本研究への標本提供の可否を個別に問い合わせ、パラフィンブロックあるいは未染標本を収集する。

3. 研究結果

本年度は、まず倫理審査の申請を国立精神・神経医療研究センター倫理委員会にて行い、審査を経て承認を得た。その後、これまでに先天性大脳白質形成不全症の患者剖検脳存在を確認している公立昭和病院と都立神経研究所に協力を要請した。双方より協力を得ることができ（公立昭和病院は改めて施設内での倫理審査を経た上で）、計3例のパラフィンブロックの貸与を受けることが出来た。これらの標本から、複数の未染スライドを作成した。今後、免疫染色を中心とした解析を行っていく予定である。

#### 4. 考察

今後、さらに標本数を増やすべく、全国の施設に問い合わせを行っていく。また、同時に病理学的解析を行っていく予定である。具体的には、一般的な髄鞘染色などに加え、薬物治療あるいは遺伝子治療の標的となるオリゴデンドロサイト前駆細胞が残存しているのか、その評価を行っていきたいと考えている。

#### 5. 結語

先天性大脳白質形成不全症の剖検脳標本の収集を開始した。

#### 6. 研究発表

##### A. 論文発表

なし

##### B. 学会発表

(1) 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

## 資 料

資料 I  
平成 22 年度  
厚生労働科研費補助金（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」

第 1 回班会議

平成 22 年 5 月 22 日（土）

13-17 時

福岡国際会議場 1F  
（福岡市博多区石城町 2-1）

研究代表者： 井上 健

研究分担者： 小坂 仁（代理 渡辺先生）

岩城明子

黒澤健司

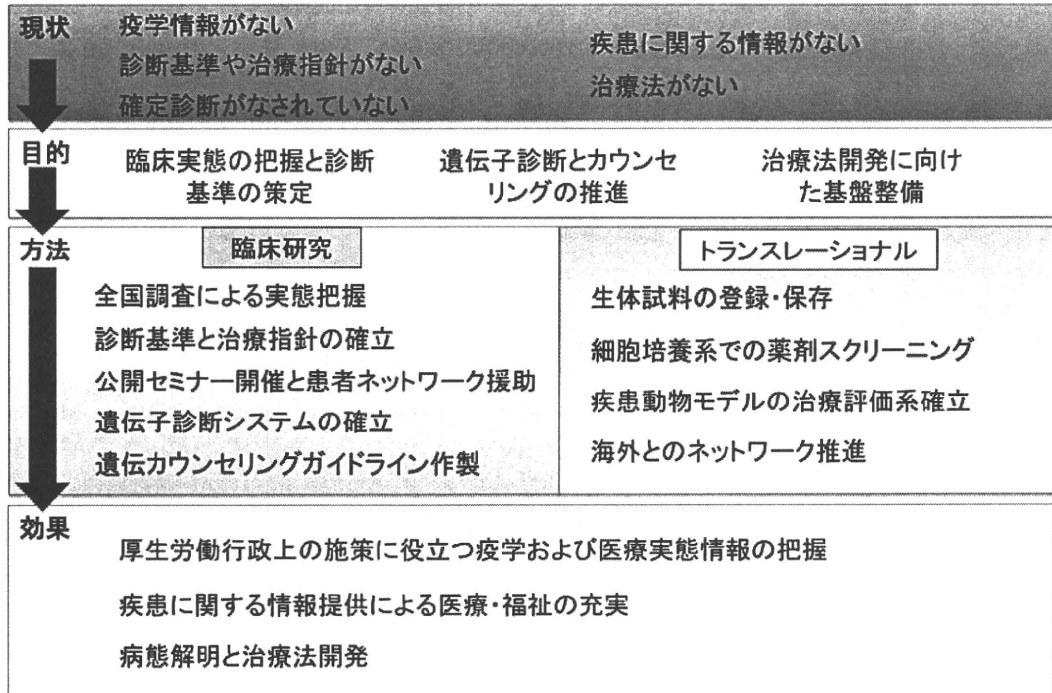
高梨潤一

出口貴美子

山本俊至

議題：本年度の研究計画と実施について

## 先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究



### 研究計画

1. 臨床研究面では、臨床の実態把握と診断および治療の推進のため
  - A. 全国疫学調査による患者数と診断・治療の実態の把握
  - B. 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
  - C. 患者家族や看護療育スタッフを対象とした公開セミナーの開催
  - D. 遺伝子診断と遺伝子カウンセリングの整備推進
2. トランスレーショナル・リサーチ面では、基盤整備と基礎研究の推進のため
  - A. 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
  - B. 治療法開発へ向けた基礎研究のための基盤整備
  - C. 国際共同研究による海外の診療および研究実態の把握

平成22年度  
厚生労働科研費補助金（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」

第2回班会議

平成23年1月9日（日）  
13-17時  
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

研究代表者： 井上 健  
研究分担者： 岩城明子  
小坂 仁  
黒澤健司  
高梨潤一  
出口貴美子  
山本俊至

プレゼンテーションは1名20分程度とし、ディスカッションを含めて、30分以内には終わるようにお願いします。適宜、休憩を入れつつ進めていきたいと思えます。発表は基本的に班員の方にはお願いしますが、参加は班員以外の方も歓迎します。

順番は、今年も五十音順で下記の通りとします。

1. 井上 健
2. 岩城明子
3. 小坂 仁
4. 黒澤健司
5. 高梨潤一
6. 出口貴美子
7. 山本俊至



**【演題名】** 先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究の進展状況と来年度への展望

**【演者】** (発表者に○を付けてください。)

氏名：○井上 健、沼田有里佳、守村敏史

所属：国立精神・神経医療研究センター 神経研究所

**【目的】** 先天性大脳白質形成不全症の研究班は、1年のフィジビリティ期間を含め、本年度は2年目となり、一段の成果が求められている。特に、1年目に必須課題とされた疫学調査による疾患の実態把握と診断基準や分類の作成は、その公表を含め、明確な成果を形にする必要がある。また、アウトリーチ活動としての情報発信、そして病態解明や治療法開発のための患者試料の収集、基礎的な治療法開発研究など着実に進めていくことが必要である。そこで、本研究班での多面的な研究の進展状況について報告し、来年度どのようにこれを発展させていくべきか検討をする。

**【方法】** 疫学調査については、二次調査表の集計と結果の考察を行った。診断基準の作成は、昨年度版のマイナーな改訂と学術雑誌での公表を行った。昨年度好評であった公開セミナーを本年度も継続して行った。遺伝子解析は神奈川こどもなどで実施されているが、広く患者検体を募ることが出来なかった。患者試料の収集はDNA、リンパ芽球、線維芽細胞、剖検脳標本について行った。基礎研究の実施は、薬剤や分子療法についてのマウスを用いた検討を行った。

**【結果および考察】** 疫学調査では、推定患者数を始め、有病率や罹患率などの算出が終了した。詳細な解析はまだ終わっていない。疾患分類を11疾患に改訂し、これを「脳と発達」の総説として投稿し、専門医への周知を図った。今後エビデンスを加え、学術論文とする方向を探りたい。公開セミナーは情報発信とニーズの収集の二方向性の情報の得ることが出来た。患者試料の収集は、あまり進んでおらず、来年度へ課題となった。基礎研究については、成果の発表が望まれる。

**【結論】** 着実に成果が出ている課題がある一方で、予定した成果が得られていない課題もある。来年度に向け、積極的な遺伝子解析のための患者検体の収集、研究成果の公表、治療法開発を目指した基礎研究の推進が次年度への大きな課題となった。

PLP1 遺伝子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

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・ゲノム機能学分野)

当施設では病理所見により Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) と診断された男児で本邦初となった PLP1 遺伝子 (*PLP1*) の点変異を報告して以来、全国の臨床医から依頼を受け PMD が疑われた患者の遺伝子解析を研究の一環として行ってきた。当初は *PLP1* の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が明らかになった。これまでに点変異 26 例、重複 26 例、欠失 1 例などを同定している。その他 *PLP1* 遺伝子変異の認められない症例もある。我々はそれらにつき多面的な取り組みをしているので、その経過について発表する。(1) 点変異の位置と種類は家系ごとに異なり、重症な先天型 PMD から成人発症の家族性痙性対麻痺 2 型 (SPG2) まで幅広いスペクトラムを呈することがわかった。点変異と病態との関係を明らかにすることは診断や予後を予測する上で重要と考えられるので、昨年度に引き続き種々検討を重ねている。(2) 通常解析で *PLP1* 変異が検出できなかった症例のうち 20 例について PMDL の原因遺伝子 (*GJC2*) を解析したが、ヘテロの変異が新たに 1 例認められただけであった。さらに 1 症例については *PLP1* の全配列を調べたがイントロン内に複数の indel が検出されたのみで異常はなかった。

【演題名】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～

【演者】(発表者に○を付けてください。)

氏名：○小坂 仁<sup>1</sup>、新保裕子<sup>1</sup>、永井淳一<sup>2</sup>、黒澤健司<sup>3</sup>

所属：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

【目的】当院では、先天性白質形成不全症における、*PLP1* 遺伝子解析を保険診療として行っている。今回は平成 21 年度以降の症例についてまとめ、特に軽症の 2 症例について詳細に解析を行ったので報告する。

【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；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。症例 2；*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。

【結果および考察】

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。

## 【演題名】

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

【演者】(発表者に○を付けてください。)

氏名：○黒澤健司<sup>1</sup>、永井淳一<sup>2</sup>、小坂 仁<sup>3</sup>

所属：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

【目的】Pelizaeus-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。*PLP1* 遺伝子のコピー数異常が原因の約 6-7 割を占める。間期核 FISH は直接遺伝子重複を確認可能で微細転座例の検出にも優れるが、技術的な熟練を要し、500kb 以下の重複は見落とされる可能性がある。アレイ CGH 解析は検出手段として極めて優れるが、依然としてコスト的に負担が大きく、exon レベルのコピー数変化に必ずしも対応せず、見落とされる可能性も否定できない。MLPA は、exon レベルでのコピー数変化を検出することに優れ、本症の 1 次スクリーニングとして有用と考えられる。今回 *PLP1* 特異的 MLPA による PMD 解析についてまとめた。

【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。提出されたヘパリン化末梢血液リンパ球より標準法 (QIAamp DNA BloodMini kit) によりゲノム DNA を抽出し、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。FISH 解析では検出プローブとして RP11-832L2 を用い、Leica CW4000 で観察した。解析は施設内倫理委員会の承認のもとで行われた。

【結果および考察】*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、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、PMD 1 次スクリーニングとして極めて有用であった。

【結論】*PLP1* 特異的 MLPA は PMD の臨床診断における 1 次スクリーニングとして極めて有用であり、BAC FISH を補完するものと考えられた。