

201027060A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

ニューロパチーの病態解明に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高嶋 博

平成 23(2011)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業

ニューロパチーの病態解明に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高嶋 博

平成 23(2011)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
ニューロパチーの病態解明に関する研究	3
高嶋 博	
II. 分担研究報告	
1. Charcot-Marie-Tooth 病のマイクロアレイ DNA チップによる遺伝子診断	9
高嶋 博	
2. 免疫性・遺伝性ニューロパチーの診断と治療	13
田中 章景	
3. Fisher 症候群における感覚障害の臨床的特徴と感覚神経電動検査に関する検討	15
滋賀 健介	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

I . 総括研究報告

総括研究報告書

ニューロパチーの病態解明に関する研究

研究代表者 高嶋 博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨

本研究の目的は、原因が多数におよぶ遺伝性ニューロパチーの遺伝子診断はこれまでの手法では実現困難であったが、急速な進歩を遂げているマイクロアレイ技術を用いて、遺伝性ニューロパチー、主に Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) および末梢神経障害を伴う小脳失調症において、高速で網羅的な遺伝子診断のシステムを構築、運用し、その病態をあきらかにすることである。我々の開発した DNA チップによる解析により、CMT 症例に多数の既報告および新規の遺伝子異常が同定された。CMT 遺伝子診断チップによる遺伝子診断は、実験やデータ解析処理、結果判定のプロセスを改善し、検査システムとして完成した。425 例を超える解析により、本邦の症例のおおよその頻度が確認できた。

免疫学的ニューロパチーの研究として、慢性炎症性脱髄性根神経炎 (CIDP) のIVIg 療法に対する反応性を規定している要因を探るため、凍結末梢神経標本を用いてマイクロアレイ解析を行なった。この結果、治療に対する responder 群では non-responder 群と比較し、より多くの免疫関連遺伝子の発現変化が認められた。このことより、responder ではより高度の免疫機序が関与している可能性が考えられた。

Fisher 症候群(FS)は、眼筋麻痺・失調・腱反射消失を3主徴とし、抗 GQ1b 抗体が関与する感染後ニューロパチーであるが、感覚障害を伴う FS の末梢神経障害の電気生理学的な特徴について明らかにした。

研究分担者

田中章景 名古屋大学大学院医学系研究科
准教授
滋賀健介 京都府立医科大学 学内講師

AOA1, AOA2), FAP

2. 薬剤性ニューロパチー（主に抗癌剤による）
3. 免疫性ニューロパチー（CIDP, FS）

方法

DNA Chipによる解析の最適化と実践

ヒトDNAを検体として、PCR増幅し、作成したCMT遺伝子診断チップと反応させ、マイクロアレイシステムで解析する。新規の原因遺伝子同定には、連鎖解析、ゲノムシーケンズや実際の病態解明のためタンパク機能解析を行う。また、各症例に病理学的、電気生理学的を加えた。

CIDPのIVIgの反応性の規定因子の同定

IVIg responder (R) 4例と non-responder (NR) 3例が対象。凍結標本からRNA抽出、標識cDNA合成を行いマイクロアレイ (Human Genome U133 Plus 2.0 Array, Affymetrix®) にて遺伝子発現を網羅的に解析した。

Fisher 症候群における感覚障害の研究

感覚障害のあるFSの症例(H群)とない症例(NS群)の2群に分け、神経伝導検査の各パラメーターについて比較した。

A. 研究目的

我々が開発した遺伝性ニューロパチー診断DNAマイクロアレイチップを用いて、遺伝性ニューロパチーの診断、分子疫学の調査、解析および新規原因遺伝子の同定を目指す。

免疫性ニューロパチーの病態を明らかにするため、関連遺伝子解析、病理学的、生理学的にアプローチし、診断、治療反応性因子について検討する。

B. 対象・方法

対象

鹿児島大学神経内科、名古屋大学神経内科、京都府立医大神経内科において収集された。全例において、インフォームド・コンセントを得た。

1. 遺伝性ニューロパチー CMT1、CMT2、DSS (Dejerine-Sottas syndrome)、CHN (congenital hypomyelinating neuropathy)、Giant axonal neuropathy や小脳失調症など特徴的な症状を持つもの(SCAN1,

(倫理的事項) 本研究は各大学ヒトゲノム使用研究に関する倫理委員会で承認された。

C. 研究結果

遺伝性ニューロパチー診断チップによる遺伝子スクリーニング

CMT 診断アレイ実験において、PCR のステップの最適化を行い、586 の PCR 反応を 26 本のチューブで増幅することが可能となり、増幅過程が飛躍的に簡素化された。Multiplex PCR を導入し最適化し、実験的には、2 日で 8 アレイまで施行可能となっている。

現在まで 475 例 (コントロール 50 名含む) のアレイ実験が行われ、CMT 症例では、*PRX*, *MFN2*, *MPZ*, *GJB1*, *DNM2* などに、*AOA2* 例では、*SETX* に病的異常が確認された。新規原因遺伝子にも異常が見つかり、新規原因遺伝子の同定をすべく、変異の確認を行っている。連続症例の検討により、臨床型ごとの頻度が明らかになってきた。

SETX 異常の *AOA2* については、詳しい臨床病態が報告された。

CIDP への治療反応性で fold change > 2 の遺伝子群の機能解析 (gene ontology analysis) を施行したところ、responder 群では統計的有意性 ($p < 0.05$) を示す機能 (抗原提示メカニズム、細胞接着に関連する免疫関連遺伝子群) が示された。一方、non-responder 群では統計的有意性を持つ機能分類は得られなかった。

FS 連続症例を後方視的に検討し、感覚障害のある症例 (H 群) とない症例 (NS 群) の 2 群に分け、神経伝導検査の各パラメーターについて比較した。複合筋活動電位・運動神経伝導検査・遠位潜時・F 波潜時に関しては、両群で差を認めなかった。その一方で、腓腹神経の感覚神経活動電位 (SNAP) は H 群で有意に低下していた。

D. 考察

我々の調査では、全国各大学病院の神経内科の入院患者のうち、難治性ニューロパチーの患者数は約 10% を占め、比較的頻度が高く難治性のものも多い。また、Charcot-Marie-Tooth 病患者会からのいっそうの研究の発展の要望を受けている。これらの疾患の患者、家族、医療の社会的な負担は莫大であり、本研究は、その根本的または重要な原因を同定し、革新的な治療を旨とするもので、国民のニーズにも合致するものと考えられる。

我々のマイクロアレイチップによる遺伝子解析は、

遺伝子異常を調べるコストと時間を飛躍的に小さくし、患者 1 例あたりのスクリーニングの費用は従来の方法では 150 万円かかるものを、約 6.5 万円にまで軽減できた。データの質も良く、今後の症例の蓄積により、遺伝子新診断の速度と精度が改善されるものと思われる。コントロールも整備し、病的変異の判断も迅速になってきた。また、新規の候補遺伝子についても、コントロールにはないミスセンスおよびナンセンス変異が見つかり、今後、新規の CMT の原因の確立が期待される。

CIDP の研究では、今回の実験系では主にシュワン細胞や炎症細胞の遺伝子変動をみており、このなかで responder でより高度の免疫機序が関与していると考えられ、non-responder ではそれ以外の機序が病態に関与している可能性が示唆された。

感覚神経活動電位は、感覚低下を認める FS で有意に低下しており、感覚神経線維 (A α 線維) 損傷の重症度を反映したのと考えられる。この SNAP の低下は、SNAP の計時的追跡の結果から、A α 線維の部分的な脱同期性すなわち脱髄性病態をある程度反映している可能性が推測された。

E. 結論

1. Charcot-Marie-Tooth 病の診断 DNA Chip チップは、遺伝子診断に有用であった。本邦の遺伝子頻度が明らかになりつつある。
2. CIDP の IVIg responder には高度の免疫機序の関与が想定され、今後、その病態解明が重要である。
3. FS の患者でみられる SNAP の低下の少なくとも一部は、感覚神経の脱髄性変化を反映している可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Walton C, Interthal H, Hirano R, Salih MA, Takashima H, Boerkoel CF. Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Adv Exp Med Biol.* 685:75-83, 2010
- 2) Sakiyama Y, Okamoto Y, Higuchi I, Inamori Y, Sangatsuda Y, Michizono K, Watanabe O, Hatakeyama H, Goto Y, Arimura K, Takashima H.

- A new phenotype of mitochondrial disease characterized by familial late-onset predominant axial myopathy and encephalopathy. *Acta Neuropathol.* in press
- 3) Kawagashira Y, Koike H, Tomita M, Morozumi S, Iijima M, Nakamura T, Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. Morphological progression of myelin abnormalities in IgM-monoclonal gammopathy of undetermined significance anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 69: 1143-1157, 2010
 - 4) Kawagashira Y, Kondo N, Atsuta N, Iijima M, Koike H, Katsuno M, Tanaka F, Kusunoki S, Sobue G. IgM MGUS anti-MAG neuropathy with predominant muscle weakness and extensive muscle atrophy. *Muscle Nerve* 42: 433-435, 2010
 - 5) Hashizume A, Kawagashira Y, Banno H, Suzuki K, Ito M, Koike H, Katsuno M, Watanabe H, Tanaka F, Naganawa S, Kaneko R, Ishii A, Sobue G. Central nervous system involvement in n-hexane polyneuropathy demonstrated by MRI and proton MR spectroscopy. *Clin Neurol Neurosurg.* in press
 - 6) Sone J, Tanaka F, Koike H, Inukai A, Katsuno M, Yoshida M, Watanabe H, Sobue G. Skin biopsy is useful for the antemortem diagnosis of neuronal intranuclear inclusion disease. *Neurology,* in press
 - 7) 高嶋 博 遺伝疾患としての側面：総論シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル CMT 診療マニュアル編集委員会 金芳堂 29-36, 2010
 - 8) 高嶋 博 遺伝疾患としての側面：PMP22/CMT1A シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル CMT 診療マニュアル編集委員会 金芳堂 37-40, 2010
 - 9) 中川正法, 滋賀健介 シャルコー・マリー・トゥース病とは シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル CMT 診療マニュアル編集委員会 金芳堂 1-5, 2010
 - 10) 滋賀健介 臨床症状と診断 シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル CMT 診療マニュアル編集委員会 金芳堂 7-19, 2010
 - 11) 滋賀健介 シャルコー・マリー・トゥース病の専門医療機関・リンク集 シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル CMT 診療マニュアル編集委員会 金芳堂 143-151, 2010
 - 12) 滋賀健介, 中川正法 シャルコー・マリー・トゥース病患者診療の現況 - 全国 1 次アンケート調査結果 *末梢神経* 21:360-361, 2010
 - 13) 辻有希子, 田中章浩, 滋賀健介ら 右腕神経叢で発症した neurolymphomatosis の 1 例 *末梢神経* 21:353-354, 2010
- ## 2. 学会発表
- 1) 高嶋 博 Charcot-Marie-Tooth 病の分子遺伝学—治療への展望 第 52 回日本小児神経学会シンポジウム 3 2010 年 5 月 福岡
 - 2) 高嶋 博 CMT の臨床症状と診断法 (1) 成人発症の CMT シャルコー・マリー・トゥース病 市民公開講座 2010 年 2 月 東京
 - 3) 徳永章子, 橋口昭大, 岡本裕嗣, 中村友紀, 有村公良, 高嶋 博 マイクロアレイ DNA チップによる Charcot-Marie-Tooth 病の遺伝子診断 第 51 回日本神経学会総会, 2010 年 5 月 東京
 - 4) 滋賀健介, 藤井ちひろ, 能登祐一, 山田丈弘, 中川正法 Miller Fisher 症候群における感覚障害の臨床的特徴と感覚神経伝導検査に関する検討 第 51 回日本神経学会総会, 2010 年 5 月 東京
 - 5) 滋賀健介, 中川正法 シャルコー・マリー・トゥース病患者診療の現況—全国一次アンケート調査報告 第 21 回日本末梢神経学会, 2010 年 9 月 仙台
 - 6) 滋賀健介, 辻有希子, 藤井ちひろ, 能登祐一, 中川正法 Fisher 症候群における感覚神経活動電位に関する検討 第 40 回日本臨床神経生理学会, 2010 年 11 月 神戸

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし

Ⅱ. 分担研究報告

分担研究報告書

Charcot-Marie-Tooth 病のマイクロアレイ DNA チップによる遺伝子診断

研究代表者 高嶋 博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨

本研究の目的は、原因が多数におよぶ遺伝性ニューロパチーの遺伝子診断はこれまでの手法では実現困難であったが、急速な進歩を遂げているマイクロアレイ技術を用いて、遺伝性ニューロパチー、主に Charcot-Marie-Tooth disease (CMT)および末梢神経障害を伴う小脳失調症(AOA1、AOA2、SCAN1)において、高速で網羅的な遺伝子診断のシステムを構築、運用し、その病態をあきらかにすることである。さらに、CMT の新規遺伝的原因を明らかにする。

我々の開発した DNA チップによる解析により、CMT 症例に多数の既報告および新規の遺伝子異常が同定された。CMT 遺伝子診断チップによる、遺伝子診断は、実験やデータ解析処理、結果判定のプロセスを改善し、検査システムとしてほぼ完成した。大規模な遺伝子診断においてマイクロアレイ法はシーケンス法に比し、コストと労力において明らかに有利であった。425 例を超える解析により、本邦の症例のおおよその頻度が確認できた。一方、遺伝子診断の陰性例も多く、それら症例の原因の追及が課題であり、さらに、検査遺伝子を追加や次世代ゲノムシーケンサーによる包括的な解析も考慮された。

A. 研究目的

遺伝性ニューロパチー(特に Charcot-Marie-Tooth disease; CMT)は、現在まで少なくとも 30 の遺伝的原因は解明されてきたが、その遺伝子数の多さにより、正確な遺伝子診断を個々の患者に行うことは困難であった。我々は、近年急速な進歩を遂げているマイクロアレイ(リシーケンス)技術により、一度に多数の遺伝子を診断しうるシステムを開発することが可能となってきた。そこで我々は、ほぼすべての CMT の遺伝子異常を診断しうる遺伝子診断チップを開発し、遺伝子検査システムの確立を行う。また、同時に複数の候補遺伝子についても遺伝子チップに搭載し、新しい原因遺伝子の発見をめざす。

B. 対象・方法

対象

鹿児島大学神経内科、名古屋大学神経内科、京都府立医大神経内科において収集された。全例において、インフォームド・コンセントを得た。

1. 遺伝性ニューロパチー CMT1、CMT2、DSS (Dejerine-Sottas syndrome)、CHN (congenital hypomyelinating neuropathy)、Giant axonal neuropathy や小脳失調症など特徴的な症状を持つもの(SCAN1, AOA1, AOA2)、FAPなど。

2. 薬剤性ニューロパチー（主に抗癌剤による）

方法

インフォームド・コンセントを得た CMT 患者 425 例。コントロール 50 例。CMT1A(PMP22 の重複例)については保険診療の検査である PMP22 の重複同定 FISH 検査を行い、その陰性例においてのみ、遺伝子チップによる検査を行った。特に遺伝子頻度を算出するため連続 200 症例を用い、病型別遺伝子頻度についても明らかにした。

CMT の診断は患者それぞれの神経内科および小児科医によりなされ、臨床型分類は依頼元施設での電気生理検査及び家族歴より想定される遺伝形式をもとに、CMT1、CMT2、CMT4、CMTX、その他に分類した。電気生理学および遺伝学的基準は以下のものであり、正中神経伝導検査において運動神経伝導速度(MCV)38m/秒以下のものを脱髄型、38m/秒より早いものを軸索型、左右や家系内で 38m/秒をまたがる所見を呈するものを中間型とし、脱髄型において常染色体優性のものを CMT1、劣性遺伝形式のものを CMT4、軸索障害型を CMT2、X 染色体性が最も疑われるものを CMTX と分類した。遺伝子検査は、同一家系内の症例は発端者のみを対象に

検査を行った。対象患者全例において、遺伝子解析に関する承諾書に患者本人または代理同意人より、未成年患者に関しては保護者より署名で同意を得た。脱髄型 CMT に関しては FISH 法で *PMP22* 遺伝子の重複又は欠失が無い事を確認し、軸索型・中間型・その他分類に関しては連続 200 症例に CMT 遺伝子診断マイクロアレイ DNA チップ解析を施行した。2006 年時点で同定されていた 27 遺伝子として *PMP22*、*myelin protein zero (MPZ)*、*gap junction protein beta 1 (GJB1)*、*early growth response 2 (EGR2)*、*periaxin (PRX)*、*lipopolysaccharide-induced TNF factor (LITAF)*、*neurofilament light polypeptide (NEFL)*、*ganglioside-induced differentiation associated protein 1 (GDAP1)*、*myotubularin related protein 2 (MTMR2)*、*SH3 domain and tetratricopeptide (SH3TC2)*、*SET binding factor 2 (SBF2)*、*N-myc downstream regulated 1 (NDRG1)*、*mitofusin 2 (MFN2)*、*rab-protein 7 (RAB7)*、*glycyl-tRNA synthetase (GARS)*、*heat shock 27kDa protein 1 (HSPB1)*、*heat shock 22kDa protein 8 (HSPB8)*、*lamin A/C (LMNA)*、*dynammin 2 (DNM2)*、*tyrosyl-tRNA synthetase (YARS)*、*aprataxin (APTX)*、*senataxin (SETX)*、*tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDPI)*、*desert hedgehog (DHH)*、*gigaxonin 1 (GAN1)*、*K-Cl cotransporter family 3 (KCC3)* と新規原因遺伝子候補と考えられる 10 遺伝子を搭載した CMT-マイクロアレイ DNA チップをデザインした。全ての DNA 配列は NCBI GenBank より引用した。マイクロアレイ DNA チップは Affymetrix 社製 GeneChip® (100K array) を使用した。患者血液より抽出した DNA は、チップに搭載した 37 遺伝子の全エクソン 586 本の PCR で増幅した。586 本の PCR は 32 分割し QIAGEN® Multiplex PCR Kit で増幅した。増幅された DNA は専用カラムで不要物を除去した後、DNase I で断片化した。チップにデザインした配列プローブと結合する断片化 DNA のシグナルを増強するためにビオチン化抗ストレプトアビジン抗体でラベルを付け、専用オープンで hybridization した。hybridization 後、プローブと結合した DNA を染色し洗浄した後、チップ専用スキャナでシグナルを読み込みこんだ。スキャニングしたシグナル情報は専用情報処理ソフト GCOS

(GeneChip® Operating Software)で処理し、専用解析ソフト GSEQ (GeneChip® Sequence Analysis Software)で解析した。DNA チップ解析により検出された遺伝子異常は、更に Sanger 法シーケンス解析によりその存在を確認した。確認された遺伝子異常は可能な限り血縁者の同意を得た上で segregation を施行して確定した。

(倫理的事項) 本研究は各大学ヒトゲノム使用研究に関する倫理委員会で承認された。

C. 研究結果

遺伝性ニューロパチー診断チップによる遺伝子スクリーニング

CMT 診断アレイ実験において、PCR のステップの最適化を行い、586 の PCR 反応を 26 本のチューブで増幅することが可能となり、増幅過程が飛躍的に簡素化された。Multiplex PCR を導入し最適化し、実験的には、2 日で 8 アレイまで施行可能となっている。

現在まで 475 例 (コントロール 50 名含む) のアレイ実験が行われ、CMT 症例では、*PRX*、*MFN2*、*MPZ*、*GJB1*、*DNM2* などに、*AOA2* 例では、*SETX* に病的異常が確認された。新規原因遺伝子にも異常が見つかっており、新規原因遺伝子の同定をすべく、変異の確認を行っている。遺伝子頻度を算出するため連続 200 症例を用い、病型別遺伝子頻度についても明らかにした。

遺伝子検査の依頼のあった 200 例の病型は、CMT1 が 47 例(23.5%)、CMT2 が 71 例(35.5%)、CMTX が 17 例(8.5%)、CMT4 が 11 例(5.5%)、その他症例 54 例(27%)であった。その他症例は、電気生理学的もしくは臨床的に CMT が否定できない症例が含まれ、脊髄小脳変性症(SCD)に CMT を合併した症例 7 例、遺伝性圧脆弱性ニューロパチー(HNPP)症例 5 例、筋萎縮性側索硬化症(ALS)疑い症例 4 例、治療抵抗性慢性炎症性脱髄性多発根神経炎(CIDP)症例 4 例、遺伝性感覚性ニューロパチー(HSN)症例 2 例、遺伝性運動性感覚性ニューロパチー-V 型(HMSN-V)症例 2 例、Dejerine-Sottas 症候群(DSS)症例 2 例、congenital hypomyelinating neuropathy (CHN) 症例 1 例、パラミオトニア合併症例 1 例、分類不能 26 例であった。ALS 疑い 4 例は、上位運動ニューロン症状が無い点や進行が非常に緩徐な点など、臨床的に非典型的 ALS 疑いであり、遺伝性ニューロパチーの可能性が

否定できなかったためその他症例に含めた。

総症例 200 例中 34 例 17% で原因遺伝子を同定できた。CMT 以外の臨床症状を呈する 54 例をのぞいた 146 例においては、28 例 (19%) の症例に遺伝子変異を確認した。CMT1 では 47 例中 9 例 (19%) で変異を認めた。MPZ 変異が 6 例と最も多く、GJB1、NEFL、SETX の変異をそれぞれ 1 例ずつ認めた。CMT4 では 11 例中 3 例 (27%) で変異を認めた。PRX 変異 2 例と SBF2 変異 1 例であった。

CMT2 では 71 例中 10 例 (14%) に変異を認め、MFN2 変異が 8 例と最も多かった。その他、SETX 変異 1 例、GJB1 変異 1 例が認められた。CMTX は 17 例中 6 例 (35%) に GJB1 遺伝子の点変異及び欠失の異常を認めた。その他症例では脊髄小脳変性症を合併した CMT 症例に SETX 変異を 2 例認めた。HMSN-V 症例で MFN2 変異を 1 例認めた。分類不能症例の中に SETX 変異を 1 例認めた。様々な先天性の合併症を有する小児例、ALS 症例、治療抵抗性 CIDP 症例、電気生理学的に異常がなく臨床的に凹足や逆シャンペンボトル様下肢のため臨床的に CMT が疑われた症例などでは変異を同定できなかった。

D. 考 察

脱髄型 CMT の対象を脱髄型 CMT 原因遺伝子として最も多い PMP22 の重複のない症例に限定したため、依頼は軸索型 (CMT2) が 71 例 (35.5%) と最も多かった。Szigeti らによると軸索型 CMT の原因として MFN2 変異が最も多いとされており、本邦でも MFN2 変異が最も多い事が確認された。MFN2 遺伝子異常は HMSN-V と考えられた症例においても認められており、また、CMT2 においては MFN2 変異を認めた症例の発症年齢は 1 歳から 50 歳代と幅広い。脱髄型 CMT は PMP22 の重複による CMT1A が脱髄型 CMT の約 70% で、GJB1 変異が約 10%、MPZ 変異が約 5% と報告されている。しかし、今回の我々の解析では MPZ 変異が 6 例で GJB1 変異が 1 例と明らかに MPZ 変異が多く、PMP22 重複以外の脱髄型 CMT の原因遺伝子の頻度は本邦と欧米とでは異なっていた。PRX は劣性遺伝形式の CMT4 において、全く異なる家系の 2 症例に同一の変異を認め、本邦で、このヘテロ接合体変異が広がっている可能性が

ある。中間型 CMT では既報告とおり GJB1 変異が最も多く、その他の遺伝子異常を検出できなかった。また、GJB1 変異は電気生理学的及び遺伝形式で CMT1 や CMT2 と分類された患者にもそれぞれ 1 例ずつ含まれていたが、家系調査の問題も大きいと思われる。いずれにしても、臨床的および電気生理学的に CMT1 あるいは CMT2 で原因不明と診断される症例の中に少なからず GJB1 変異による症例が含まれる。SETX は遺伝性ニューロパチーに小脳失調を合併する ataxia-ocular apraxia-2 (AOA2) や autosomal dominant form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4) の原因遺伝子として知られているが、末梢神経障害を合併するために、我々の DNA チップに搭載した。SETX 変異は、電気生理学的及び遺伝形式で CMT1 や CMT2 と分類された患者に 1 例ずつ、分類不能患者に 1 例認めており、これまで原因不明とされていた CMT 症例の中に含まれている可能性が高い。

我々のデザインした CMT 遺伝子診断マイクロアレイ DNA チップを使用する事で、とりあえず既知の CMT 網羅的スクリーニングが可能となったと考える。1 症例のスクリーニングに要する時間は最短で 2 日となる。加えて、コスト面では搭載した DNA 全てを Sanger 法でシークエンスした場合と比較して約 25 分の 1 であり、現実的に実施可能なコストとなった。multiple PCR システムの導入により 586 本のプライマーセットに対する PCR の作業に要する労力も軽減でき、時間、コスト、労力の全てにおいてメリットは大きい。一方、検出された変異の病的意義については追加の検討が必要であり、新規の変異の場合、家族の segregation は常に必要である。

一方では、今回のマイクロアレイ DNA チップは、理論上、挿入変異、欠失変異、リピート配列、重複変異に関しては検出が困難である。しかし比較的大きな欠失に関しては、ホモ接合体であれば欠失部分のシグナルが消失するため、検出可能である。実際に今回、1 例において X 染色体性であるが男性症例で GJB1 遺伝子の欠失を認めた。また、搭載した遺伝子以外でもあたらしい原因遺伝子が発見され続けているが、DNA チップは一度制作すると容易にはデザイン変更ができないため、新たに原因遺伝子を搭

載する場合にはチップデザインそのものを変更し、新たにはじめからチップを制作しなければならない。また、遺伝子診断の陽性率は十分でなく、新しい試みが必要である。我々のデザイン以降にも新規遺伝子が発見されており、今回の我々の DNA チップで陰性例に関しては、新規遺伝子またはその候補を搭載した新 DNA チップのデザインや、次世代ゲノムシーケンス機器の導入などの検査への導入も将来は必要であろう。

いずれにしても、本検査システムにより蓄積された症例の検討を進めることで、本邦の CMT のおおよその分子疫学を明らかにしていかなければならない。おのおのの患者の遺伝子診断は、遺伝性疾患解明の第一歩であり、今回の結果は、今後の遺伝子診断の方向性や、治療対策などを検討する基礎データになるであろう。

我々の調査では、全国各大学病院の神経内科の入院患者のうち、難治性ニューロパチーの患者数は約 10% を占め、比較的頻度が高く難治性のものも多い。また、Charcot-Marie-Tooth 病患者会からのいっそうの研究の発展の要望を受けている。これらの疾患の患者、家族、医療の社会的な負担は莫大であり、本研究は、その根本的または重要な原因を同定し、革新的な治療を旨とするもので、国民のニーズにも合致するものと考えられる。

E. 結論

本マイクロアレイ DNA チップで既知の CMT 網羅的スクリーニングが可能となり、本邦の CMT の分子疫学がおおよそ確認できた。今回の研究により、CMT の遺伝子診断に要する時間とコストを飛躍的に軽減できた。一つの全国的な遺伝子診断のシステムを構築することに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Walton C, Interthal H, Hirano R, Salih MA, Takashima H, Boerkoel CF. Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Adv Exp Med Biol*. 685:75-83, 2010
- 2) Sakiyama Y, Okamoto Y, Higuchi I, Inamori Y, Sangatsuda y, Michizono K, Watanabe O, Hatakeyama H, Goto Y, Arimura K, Takashima H.

A new phenotype of mitochondrial disease characterized by familial late-onset predominant axial myopathy and encephalopathy. *Acta Neuropathol* 2011, in press

- 3) 高嶋 博 遺伝疾患としての側面：総論シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル CMT 診療マニュアル編委集員会 金芳堂 29-36, 2010
 - 4) 高嶋 博 遺伝疾患としての側面：PMP22/CMT1A シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル CMT 診療マニュアル編集委員会 金芳堂 37-40, 2010
- #### 2. 学会発表
- 1) 高嶋 博 Charcot-Marie-Tooth 病の分子遺伝学—治療への展望 第 52 回日本小児神経学会シンポジウム 3 2010 年 5 月 福岡
 - 2) 高嶋 博 CMT の臨床症状と診断法 (1) 成人発症の CMT シャルコー・マリー・トゥース病 市民公開講座 2010 年 2 月 東京
 - 3) 徳永章子、橋口昭大、岡本裕嗣、中村友紀、有村公良、高嶋 博 マイクロアレイ DNA チップによる Charcot-Marie-Tooth 病の遺伝子診断 第 51 回日本神経学会総会、2010 年 5 月 東京

免疫性・遺伝性ニューロパチーの診断と治療

研究分担者 田中 章景 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学准教授

慢性炎症性脱髄性根神経炎 (CIDP) のIVIg療法に対する反応性を規定している要因を探るため、凍結末梢神経標本を用いてマイクロアレイ解析を行なった。この結果、治療に対する responder 群では non-responder 群と比較し、より多くの免疫関連遺伝子の発現変化が認められた。このことより、responder ではより高度の免疫機序が関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

慢性炎症性脱髄性根神経炎 (CIDP) に対するIVIg治療では、治療への反応が良好な responder と不良な non-responder が存在する。これらの違いが生じる原因として、両者におけるCIDPの病態が異なっていることが示唆される。そこで、末梢神経に発現している遺伝子の相違を網羅的に解析することで、このことを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

IVIg前後の運動機能の変化により治療反応性を規定したIVIg responder (R) 4例と non-responder (NR) 3例が対象。グルタルアルデヒド固定エポン包埋トルイジンブルー染色標本、ときほぐし標本で顕著な有髄線維密度低下や軸索変性所見のないことを確認した例について、凍結標本からRNA抽出、クオリティチェックの後、標識cDNA合成を行いマイクロアレイ (Human Genome U133 Plus 2.0 Array, Affymetrix®) へハイブリダイゼーション、発現をスキャンし GeneSpring GX® で解析した。

(倫理面での配慮)

病理学的検索は、患者へのインフォームド・コンセントの下に施行した。

C. 研究結果

治療反応性で fold change > 2 の遺伝子群の機能解析 (gene ontology analysis) を施行したところ、responder 群では統計的有意性 ($p < 0.05$) を示す機

能 (抗原提示メカニズム、細胞接着に関連する免疫関連遺伝子群) が示された。一方、non-responder 群では統計的有意性を持つ機能分類は得られなかった。また遺伝子間作用をもとにした解析 (pathway analysis) では、治療反応性で fold change > 2 の遺伝子群について、responder 344 gene のうち 160 gene に相互関連性が示されたのに対し、non-responder では 160 gene のうちわずかに 5 gene に関連性が示されるのみであった。

D. 考察

今回の実験系では主にシュワン細胞や炎症細胞の遺伝子変動をみており、このなかで responder でより高度の免疫機序が関与していると考えられ、non-responder ではそれ以外の機序が病態に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

CIDP のIVIg responder には高度の免疫機序の関与が想定され、今後、その病態解明が重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawagashira Y, Koike H, Tomita M, Morozumi S, Iijima M, Nakamura T, Katsuno M, Tanaka F,

Sobue G. Morphological progression of myelin abnormalities in IgM-monoclonal gammopathy of undetermined significance anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 69: 1143-1157, 2010.

2) Kawagashira Y, Kondo N, Atsuta N, Iijima M, Koike H, Katsuno M, Tanaka F, Kusunoki S, Sobue G. IgM MGUS anti-MAG neuropathy with predominant muscle weakness and extensive muscle atrophy. *Muscle Nerve* 42: 433-435, 2010.

3) Hashizume A, Kawagashira Y, Banno H, Suzuki K, Ito M, Koike H, Katsuno M, Watanabe H, Tanaka F, Naganawa S, Kaneko R, Ishii A, Sobue G. Central nervous system involvement in n-hexane polyneuropathy demonstrated by MRI and proton MR spectroscopy. *Clin Neurol Neurosurg.* in press

4) Sone J, Tanaka F, Koike H, Inukai A, Katsuno M, Yoshida M, Watanabe H, Sobue G. Skin biopsy is useful for the antemortem diagnosis of neuronal intranuclear inclusion disease. *Neurology*, in press

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Fisher 症候群における感覚障害の臨床的特徴と感覚神経伝導検査に関する検討

研究分担者 滋賀 健介 京都府立医科大学神経内科学 助教

研究要旨

Fisher症候群(FS)は、眼筋麻痺・失調・腱反射消失を3主徴とし、抗GQ1b抗体が関与する感染後ニューロパチーである。一方、異常知覚や感覚低下を呈するFS症例もしばしば存在する。当施設で経験したFS連続症例を後方視的に検討し、感覚障害のある症例(H群)とない症例(NS群)の2群に分け、神経伝導検査の各パラメーターについて比較した。複合筋活動電位・運動神経伝導検査・遠位潜時・F波潜時に関しては、両群で差を認めなかった。その一方で、腓腹神経の感覚神経活動電位(SNAP)はH群で有意に低下していた。また計時的に経過を追跡した2症例では、SNAPの脱同期化と再同期化を認め、感覚神経線維(A α 線維)の不均一な脱髄を示唆する所見と考えた。これらの結果から、FSの患者でみられるSNAPの低下の少なくとも一部は、感覚神経の脱髄性変化を反映している可能性があると考えた。

A. 研究目的

Fisher症候群(FS)は眼筋麻痺・失調・腱反射低下を3主徴とし、抗GQ1b抗体が関与する感染後ニューロパチーである。その一方、FSにおいて3主徴以外の多彩な症状を呈することがある。とりわけ手袋靴下型の異常感覚や感覚低下については、Fisherの初報告3例のうち2例で記載され、FSの14-45%に出現すると報告されており、FSのポリニューロパチーとしての特徴を示している。また、FSの電気生理学的な特徴として、感覚神経活動電位(SNAP)が低下することが報告されているが、SNAP低下の原因が、感覚神経の脱髄性変化であるか、軸索障害であるかについて結論は出ていない。そこで、当施設で経験したFS連続症例を後方視的に検討し、(1)感覚障害の有無と神経伝導検査結果を比較し、(2)経過を追跡しえた2症例についてS波が計時的にどのように変化するか、検討した。

B. 研究方法：

1. 当施設に1991年から2010年にかけて入院し、FSの3徴を満たした患者9症例について、診療録と神経伝導検査の結果を後方視的に検討した。年齢・性、先行感染の有無と種類、潜伏期間、初発症状、感覚症状(異常知覚、表在覚低下、深部覚低下)、GQ1b抗体の有無などについての情報を収集した。
2. 神経伝導検査については、当施設でルーチンに行われている3神経で施行した結果を後方視的に検討した(運動神経伝導検査は正中神経・脛

骨神経、F波伝導検査は正中神経・脛骨神経、感覚神経伝導検査は正中神経・腓腹神経)。体温は32℃以上に保たれていた。検討した計測パラメータは、遠位運動潜時、複合筋活動電位、運動神経伝導速度、F波潜時、感覚神経活動電位(SNAP)、感覚神経伝導速度、SNAP持続時間(ここでは、立ち上がりから陽性頂点までと定義する)である。

3. 感覚低下を認めた群(Hypesthesia [H]群)、感覚低下を認めない群(Normal sensory [NS]群)の2群に分け、両群間で神経伝導検査の各計測パラメーター値を比較検討した。Mann-Whitney検定にて検討した(SPSS version 2, Chicago, IL, USA)。

C. 研究結果

1. 患者背景

男性6例・女性3例、発症年齢は平均44.8歳(23歳~68歳)。7例で先行感染(5例が呼吸器感染、2例が腸炎)があり、FS発症までの潜伏期は4日~11日であった。9例ともFSの3徴を満たし、うち6例が血清GQ1b抗体陽性であった。

感覚症状に関しては、7例(78%)で遠位優位の異常知覚を認めた。6例では感覚低下は認めなかったが(Normal sensory [NS]群)、3例で感覚低下を認めた(Hypesthesia [H]群)。筋力低下など四肢の運動症状は全例で認めず、錐体路徴候や意識障害などは認めなかった。

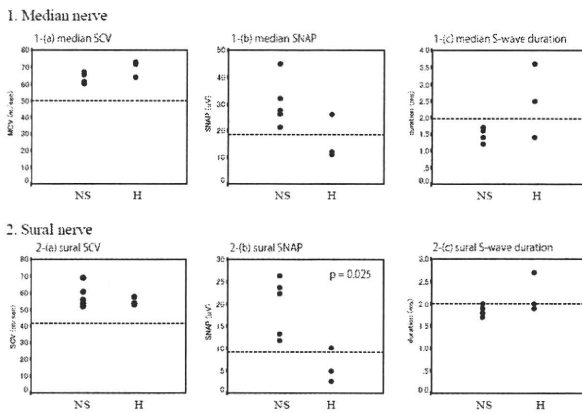
2. 2群間での神経伝導検査の結果

運動神経伝導検査・F波伝導検査における各パラメ

ーター（遠位運動潜時、複合筋活動電位、運動神経伝導速度、F波潜時）に関しては、H群・NS群の両群間で差は認めなかった。

感覚神経伝導速度では、正中神経・腓腹神経において、H群・NS群の両群間で有意差を認めなかった。その一方、腓腹神経のSNAPはH群で有意に低値を示した。正中神経SNAPは両群間で有意差を認めなかったが、H群の2例で正常下限値以下であった(図1)。持続時間はH群で延長する傾向にあったが有意差は認めなかった。

図1. 感覚神経伝導検査
(点線は正常値下限あるいは上限)

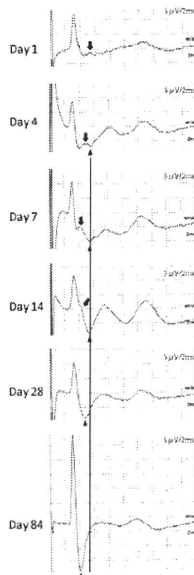


3. 計時的に追跡した症例でのSNAPの変化

計時的に正中神経・腓腹神経の感覚神経伝導検査を追跡した2症例(38歳・女性[H群]、36歳・女性[NS群])について、SNAPの形状、潜時、持続時間を経時的に検討した。図2には、H群症例(38歳・女性)の右正中神経SNAPの経過を示す。発症初期は、SNAPの初期陰性成分の後ろに別の後期陰性波が出現し

(図2、Day 1, 4, 7, 14、矢印)、経過とともにこの後期陰性波の潜時が短くなり、早期陰性波に融合した。同時に、陽性頂点(図2、矢頭)も、経過とともに徐々に潜時が早くなり、SNAPの同期性が改善し振幅が回復していた。二峰化したSNAPが再融合する過程は、感覚低下と異常知覚のなかった1例でも認められた。

図2. SNAPの計時的変化



D. 考察

本研究の結果は次の3点にまとめられる。(1) 感覚症状の重症度とSNAPとの間には負の相関の傾向が認められていること、(2) 感覚神経の脱同期化が急性期に生じていること、(3) 回復期に再同期化が生じSNAPが回復していること、である。

まず、腓腹神経SNAPはNS群と比較するとH群で有意に低下しており、正中神経SNAPは両群で有意差は認めなかったもののH群の2症例で正常下限値以下を示していた。感覚神経損傷がより重度であると推測された感覚低下群(H群)においてSNAPが低下していたことから、SNAPの低下はFSにおける感覚神経線維の損傷の重症度とある程度反映していると推測される。

次に、急性期にみられた二峰性のSNAPは、Aα線維の脱同期化を反映していると推測され、SNAPの低下は、脱同期化による時間的分散を反映している可能性を示唆している。

また回復期には、SNAPの小さな後期陰性成分の潜時が短縮し、前期陰性成分に癒合しつつ、陽性頂点潜時も短縮していることから、一旦脱同期化した線維が再び再同期化している可能性を示唆している。再同期化とともにSNAPが回復しており、FSにおける感覚神経の脱髄性病変を反映していると考えられた。

その一方で、SNAPの立ち上がりの潜時についてはそれほど遅延していないことから、神経束の中でも最速神経線維への脱髄の影響は比較的少ないと考えられる。また混在する軸索変性もSNAP低下に幾分関与している可能性は否定できない。

E. 結論

感覚神経活動電位は、感覚低下を認めるFSで有意に低下しており、感覚神経線維(Aα線維)損傷の重症度を反映したものと考えられる。このSNAPの低下は、SNAPの計時的追跡の結果から、Aα線維の部分的な脱同期性すなわち脱髄性病変とある程度反映している可能性が推測された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 中川正法、滋賀健介 シャルコー・マリー・トゥース病とは シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル CMT 診療マニュアル編集委員会 金芳堂 1-5, 2010

2. 滋賀健介 臨床症状と診断 シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル CMT 診療マニュアル編集委員会 金芳堂 7-19, 2010
3. 滋賀健介 シャルコー・マリー・トゥース病の専門医療機関・リンク集 シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル CMT 診療マニュアル編集委員会 金芳堂 143-151, 2010
4. 滋賀健介、中川正法 シャルコー・マリー・トゥース病患者診療の現況 - 全国1次アンケート調査結果 末梢神経 21:360-361, 2010
5. 辻有希子、田中章浩、滋賀健介ら 右腕神経叢で発症した neurolymphomatosis の1例 末梢神経 21:353-354, 2010

2. 学会発表

1. 滋賀健介、藤井ちひろ、能登祐一、山田丈弘、中川正法. Miller Fisher 症候群における感覚障害の臨床的特徴と感覚神経伝導検査に関する検討. 第51回日本神経学会総会、2010年5月東京
2. 滋賀健介、中川正法. シャルコー・マリー・トゥース病患者診療の現況—全国1次アンケート調査報告. 第21回日本末梢神経学会、2010年9月仙台
3. 滋賀健介、辻有希子、藤井ちひろ、能登祐一、中川正法. Fisher 症候群における感覚神経活動電位に関する検討. 第40回日本臨床神経生理学会、2010年11月神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
高嶋 博	遺伝疾患としての側面：総論	CMT診療マニュアル編集委員会	シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル	金芳堂	京都市	2010	29-36
高嶋 博	遺伝疾患としての側面：PMP22/CMT1A	CMT診療マニュアル編集委員会	シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル	金芳堂	京都市	2010	37-40
中川正法、滋賀健介	シャルコー・マリー・トゥース病とは	CMT診療マニュアル編集委員会	シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル	金芳堂	京都市	2010	1-5
滋賀健介	臨床症状と診断	CMT診療マニュアル編集委員会	シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル	金芳堂	京都市	2010	7-19
滋賀健介	シャルコー・マリー・トゥース病の専門医療機関・リンク集	CMT診療マニュアル編集委員会	シャルコー・マリー・トゥース病診療マニュアル	金芳堂	京都市	2010	143-151

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Walton C, Interthal H, Hirano R, Salih MA, Takashima H, Boerkoel CF.	Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy.	Adv Exp Med Biol	685	73-83	2010
Sakiyama Y, Okamoto Y, Higuchi I, Inamori Y, Sangatsuda Y, Michizono K, Watanabe O, Hatakeyama H, Goto Y, Arimura K, Takashima H.	A new phenotype of mitochondrial disease characterized by familial late-onset predominant axial myopathy and encephalopathy.	Acta Neuropathol			In press
Kawagashira Y, Koike H, Tomita M, Morozumi S, Iijima M, Nakamura T, Katsuno M, Tanaka F, Sobue G.	Morphological progression of myelin abnormalities in IgM-monoclonal gammopathy of undetermined significance anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy.	J Neuropathol Exp Neurol	69	1143-1157	2010
Kawagashira Y, Kondo N, Arita N, Iijima M, Koike H, Katsuno M, Tanaka F, Kusunoki S, Sobue G.	IgM MGUS anti-MAG neuropathy with predominant muscle weakness and extensive muscle atrophy.	Muscle Nerve	42	433-435	2010
Hashizume A, Kawagashira Y, Banno H, Suzuki K, Ito M, Koike H, Katsuno M, Watanabe H, Tanaka F, Naganawa S, Kaneko R, Ishii A, Sobue G.	Central nervous system involvement in hexosaminidase B-deficient polyneuropathy demonstrated by MRI and proton MR spectroscopy.	Clin Neurol Neurosurg			In press
Sone J, Tanaka F, Koike H, Inukai A, Katsuno M, Yoshida M, Watanabe H, Sobue G.	Skin biopsy is useful for the antemortem diagnosis of neuronal intranuclear inclusion disease.	Neurology			In press