

は軸索長がより長いことによると考えた。

III 型では、II 型と同様の傾向がみられが、
1) 1-3 歳の III 型 2 症例と II 型の CMAP を比較すると III 型の方が高く、また 2) ulnar でのコントロールとの差は小さいのに対し tibial では差が目立つなど、運動単位の減少程度は II 型よりも軽いことが示唆された。

E. 結論

I 型では、早期から上下肢で大径有髄線維を有する前角細胞が変性し、運動単位が著減している。また、感覚神経にもワーラー変性が起こる可能性がある。

II 型では、I 型に比し前角細胞の変性程度は軽い、運動単位は下肢で著明に減少している。感覚神経には、NCS 明らかな異常はみられない。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

米川貴博，小牧宏文，齋藤貴志，齋藤義朗，
中川栄二，須貝研司，佐々木征行，齋藤祐子。
脊髄性筋萎縮症の末梢神経障害に関する検討。
第 53 回日本小児神経学会総会。2011. 5. 27. 横浜市。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

MLPA 法を用いた脊髄性筋萎縮症の遺伝子診断

小牧宏文 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科

研究要旨

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA 法) を脊髄性筋萎縮症 (SMA) の遺伝子診断に実際に使用した経験を報告する。MRC-Holland 社のキットを使用し、*SMN1* 遺伝子、*SMN2* 遺伝子、*NAIP* 遺伝子コピー数判定が十分に可能であった。これまでに、*SMN1* 遺伝子が 0 コピーであることにより 9 名を SMA と診断した。それらの患者では、*SMN2* 遺伝子のコピー数が多いほど軽症な傾向も確認された。なお、*SMN1* 遺伝子が 1 コピーであれば、複合ヘテロ接合を疑ってシーケンス解析へ検査を進めることもできる。以上のように、MLPA 法は SMA の遺伝子診断において第一選択としてよい手法である。

共同研究者

南 成祐, 村山久美子, 山下利花

(独立行政法人国立精神・神経センター病院
臨床検査部 遺伝子検査診断室)

遺伝子検査に際して、国立精神・神経センター倫理委員会の承認を受けた「診断と検体の研究使用に関する承諾書」を用いてインフォームド・コンセントを得た。

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症 (SMA) の遺伝子診断では、*SMN1* 遺伝子の欠失の検索がまず必須であり、さらに欠失と点変異の複合ヘテロ接合の可能性を考えると遺伝子コピー数の解析が必要となる。また、重症度との相関を知る目的では、*SMN2* 遺伝子や *NAIP* 遺伝子のコピー数解析が重要である。Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA 法) は原理的にそれらの条件を満たしており、実際に遺伝子検査に使用した経験を報告する。

B. 研究方法

MRC-Holland 社の SMA 用 MLPA 解析キット (P021, P060) を使用し、MLPA 反応をおこなった。ABI 社 3130xl Genetic Analyzer で MLPA 産物のフラグメント解析をおこない、自作の表計算テンプレートを用いてコピー数解析とグラフ化をおこなった。標準サンプルについては、疾患対照 12 例を解析して最も頻度の多いコピー数を持つサンプルを用いた。

(倫理面への配慮)

C. 研究結果

メーカーの説明書に沿っておこなえば、基本的に良好な測定データが得られた。個々のプロンプトが示す値は整数値から多少のばらつきが見られたが、*SMN1*, *SMN2* 遺伝子特異的プロンプト、*SMN1*, *SMN2* 遺伝子共通プロンプトの結果を総合的に勘案することにより、コピー数判定が十分に可能であった (図 4 参照)。

これまでに SMA 疑い患者 17 名について遺伝子診断をおこない、9 名で *SMN1* 遺伝子=0 コピーとなり、PCR-RFLP 法による欠失判定とも全例で一致し、SMA と確定診断した (図 1)。

図 1 SMA 遺伝子検査 (17 症例)

MLPA結果				PCR-RFLP の結果	判定
<i>SMN1</i>	<i>SMN2</i>	<i>NAIP</i>	人数		
0	3	1	5名	欠失 (+)	SMAと診断
0	3	2	1名		
0	4	2	3名		
2	1	2	2名	欠失 (-)	SMAでない
2	1	3	1名		
2	2	2	3名		
3	0	2	1名		
3	2	3	1名		

その SMA 患者 9 名の *SMN2* 遺伝子コピー数は、

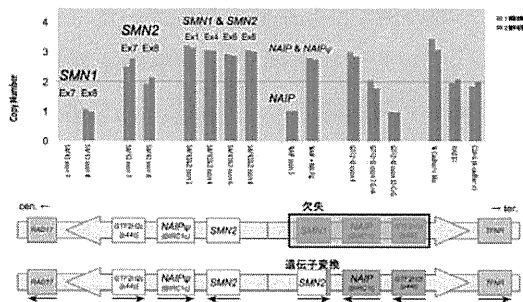
6名が3コピー、3名が4コピーであり、病型は前者がII型ないし発症年齢の早いIII型、後者はIII型と、コピー数が多いほど軽症になる傾向が見られた（図2）。

なお、ある症例では、*SMN1* 遺伝子のエクソン7と8でコピー数が異なる結果となり、エクソン7までが *SMN2* でエクソン8からが *SMN1* のキメラ遺伝子の存在が推測され、部分的な遺伝子変換が示唆された（図3）。

図2 *SMN2*コピー数と重症度

患者	年齢 (検査時)	性別	<i>SMN1</i>	<i>SMN2</i>	<i>NAIP</i>	病型	発症年齢	到達運動能力
P1	2歳	男	0	3	1	SMA II	7ヶ月	座位まで
P2	1歳4ヶ月	男	0	3	2	SMA II	8ヶ月	座位まで
P3	2歳4ヶ月	女	0	3	1	SMA II	10ヶ月	座位・つかまり立ち
P4	32歳	男	0	3	1	SMA II	1歳6ヶ月	座位まで
P5	2歳9ヶ月	男	0	3	1	SMA II	1歳6ヶ月	座位・つかまり立ち
P6	30歳	女	0	3	1	SMA IIIa	2歳	独歩獲得後に進行
P7	6歳7ヶ月	男	0	4	2	SMA IIIa/b	2-3歳	独歩獲得後に進行
P8	20歳	男	0	4	2	SMA IIIb	6歳	独歩獲得後に進行
P9	30歳	女	0	4	2	SMA IIIb	9歳	独歩獲得後に進行

図3 Exon 7と8でコピー数が異なった症例



D. 考察

MLPA 法は、1回の検査で、*SMN1*、*SMN2*、*NAIP* 各遺伝子のコピー数を判定できることから、SMA患者のスクリーニング検査法として高感度かつ情報量が多い。とくに、今回検索した患者の中にはいなかったが、*SMN1* 遺伝子が1コピーであった場合、シーケンス解析へと検査を進め、患者か保因者かを特定することができる。この点は定性的PCR-RFLP法にはない優れた利点である。その上、*SMN2* と *NAIP* のコピー数から病型予

想ができるという臨床的有用性がある。また、部分的な遺伝子変換や近傍遺伝子に関する情報も得られる。

MLPA 法の SMA 用キットは市販されており、その性能は、今回の結果のように、十分診断に用いることができる信頼性があると考えられる。使用する主な機器は PCR 装置と蛍光 DNA シークエンサーであり、遺伝学的検査を行っている多くのラボで実施可能である。PCR 法を応用していることから現在の保険適応の要件も満たしており、SMA の遺伝子診断において第一選択としてよい手法と思われる。

E. 結論

MLPA 法は、*SMN1*、*SMN2*、*NAIP* 遺伝子のコピー数を簡便に解析でき、脊髄性筋萎縮症の遺伝子診断法として優れた方法ある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

脊髄性筋萎縮症の心機能異常

齊藤利雄 国立病院機構刀根山病院 神経内科・小児神経内科

研究要旨

脊髄性筋萎縮症の心機能異常を調査した。脊髄性筋萎縮症患者 17 例で、12 誘導心電図、ホルター心電図、心臓超音波検査、心房性あるいは脳性ナトリウム利尿ペプチドの検査結果を後方視的に情報収集・検討した。心電図での PR 時間、QRS 幅、QTc 時間は、症例によっては年齢と有意な相関を示して延長し、一部の例では基準値を超えていた。ホルター心電図では心拍数変動に劇的な変化はなかった。心臓超音波検査の駆出率は、概ね 50%以上を保って推移した。心房性あるいは脳性ナトリウム利尿ペプチドの値も、ほぼ正常範囲内での変動を保って推移した。しかしながら、心電図変化からは、脊髄性筋萎縮症患者でも、モデルマウスと同様心機能異常が存在する可能性があることが伺われた。

共同研究者

西尾久英（神戸大学大学院医学研究科地域社会医学・健康科学講座 疫学分野）

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症のモデルマウスでは心筋障害、心伝導障害といった心機能異常が生じることが報告されている。本検討では、脊髄性筋萎縮症患者の心機能異常を調査・把握することを目的とした。

B. 研究方法

対象を脊髄性筋萎縮症患者 17 例とし、12 誘導心電図、ホルター心電図、心臓超音波検査、心房性あるいは脳性ナトリウム利尿ペプチドの検査結果を、後方視的に情報収集・検討した。対象の性別は男性 9 例、女性 8 例で、年齢は、検討最終年齢で 8.7～58.8 歳であった。病型は 1 型 2 例、2 型 14 例、3 型 1 例で、呼吸状態は、気管切開下人工呼吸 3 例、夜間中心の NPPV12 例、自発呼吸 2 例であった。情報収集可能であった期間は最長約 20 年であった。

C. 研究結果

収集可能であった検査結果は、表 1 に示すとおりであった。

PR 時間は年齢とともに延長し、うち 3 例で年齢との相関は有意であったが、その変動範囲は基準値範囲内であった。QRS 幅も年齢とともに延長し、うち 7 例で年齢と有意な相関を示し、一部の例では基準値を超えて延長していた。また、QTc 時間は、5 例で年齢と有意な相関を示して延長し、一部の例では基準値を超えていた（表 2、図 1）。ホルター心電図では平均心拍数は 80-100/min と頻脈傾向で、年齢とともに低下したが、心拍数変動に劇的な変化はなかった。心臓超音波検査では、駆出率の最低値が一時的に 40%台に低下している例もあったが、概ね 50%以上を保って推移した。心房性あるいは脳性ナトリウム利尿ペプチドの値は、一時的に基準値を逸脱する例もあったが、ほぼ正常範囲内での変動を保って推移した。

D. 考察

本検討により、脊髄性筋萎縮症では、経年的に心電図変化が起こることが示された。一方、ホルター心電図では頻脈傾向はあるものの心臓超音波検査、神経内分泌検査では特徴的変動は認めなかった。

脊髄性筋萎縮症モデルマウスでは、心筋線維化や交感神経系の機能異常が報告されている。脊髄性筋萎縮症患者での心電図変化が、モデル

マウスと同様の心筋障害や自律神経異常を反映したものか、また病的意義を持つか検討する必要がある。

さらなる検討には、心筋線維化は心臓超音波検査では病変を十分検出出来ない可能性もあり、造影心MRI、心筋シンチグラフィなども行う必要がある。また、心機能に限らず自律神経機能も再評価する余地がある。

E. 結論

脊髄性筋萎縮症患者でも、モデルマウスと同様心機能異常が存在する可能性がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
(準備中)

2. 学会発表

第54回日本小児神経学会総会（平成24年5月）にて発表予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 対象患者と収集データ

	現在年齢(歳)	呼吸状態	性別	心電図	Holter心電図	心エコー	ANP	BNP
type2	8.7	NPPV	F	1	1	1	0	1
type2	10.9	自発呼吸	M	1	0	1	0	0
type2	13.0	NPPV	M	6	2	1	0	3
type2	14.8	NPPV	F	3	0	1	0	3
type2	15.3	NPPV	F	20	1	2	0	19
type2	15.8	NPPV	F	2	0	0	0	2
type1	20.4	TIV	M	0	1	9	3	11
type2	23.7	NPPV	M	14	13	18	17	40
type2	30.5	NPPV	F	37	12	16	28	51
type2	32.8	自発呼吸	F	16	4	3	0	13
type2	33.2	NPPV	F	26	6	15	14	13
type2	34.7	NPPV	M	38	13	21	13	31
type2	37.0	NPPV	F	4	1	2	1	5
type2	41.0	NPPV	M	19	7	5	7	21
type3	42.6	NPPV	M	24	10	10	19	26
type2	58.8	TIV	M	33	15	17	21	38
type1	死亡	TIV	M	6	1	5	0	21

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

表2 心電図パラメータと年齢 (r^2)

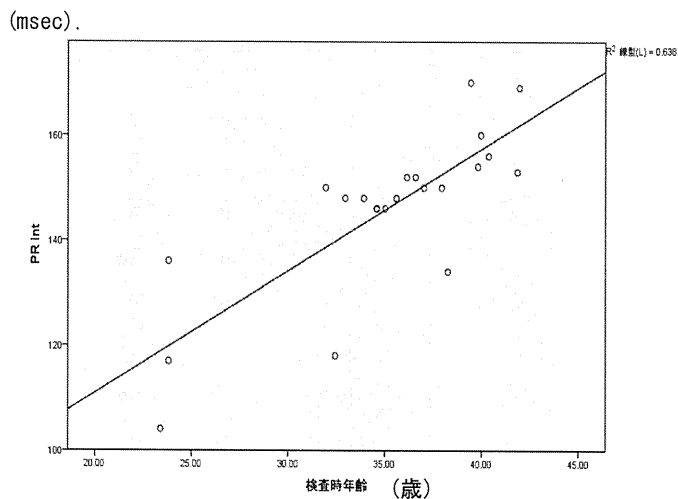
	最終検査時年齢 (歳)	心電図検査数	HR	PR	QRS	QT	QTc
type2	34.7	38	0	0.225*	0.097	0.002	0.026
type2	30.5	37	0	0.023	0.412*	0.04	0.331*
type2	58.8	33	0.056	0.005	0.023	0.178*	0.443*
type2	33.2	26	0.259	0.093	0.024	0.159	0.008
type3	42.6	24	0.013	0.638*	0.242*	0.093	0.151
type2	15.3	20	0.242*	0.202	0.564*	0.476*	0.468*
type2	41.0	19	0.334*	0.009	0.903*	0.239*	0.194
type2	32.8	16	0.051	0.13	0.114	0.002	0.041
type2	23.7	14	0.079	0.002	0.56*	0.002	0.006
type1	死亡	6	0.596	0.935*	0.903*	0.89*	0.79*
type2	13.0	6	0.9*	0.07	0.818*	0.926*	0.893*

* $p < 0.05$

図1 心電図変化を示す一例

PR 間隔と年齢

Type3 42.6歳 男性



神経筋疾患の血管新生マーカー

齊藤利雄 国立病院機構刀根山病院 神経内科・小児神経内科

研究要旨

神経筋疾患の病態・病状進行には組織血流障害・循環障害が影響する可能性がある。本検討では、Duchenne型筋ジストロフィー延べ32例、脊髄性筋萎縮症14例、健常対象8例の末梢血中のCD34陽性細胞数を測定した。CD34陽性細胞数は、Duchenne型筋ジストロフィーで0.45～4.54 cells/ μ l(平均1.99 cells/ μ l)、脊髄性筋萎縮症で0.54～4.78 cells/ μ l(1.65 cells/ μ l)、健常対象で0.79～3.82 cells/ μ l(1.53 cells/ μ l)であった。Duchenne型筋ジストロフィーでは筋崩壊が、脊髄性筋萎縮症では呼吸不全が、CD34陽性細胞数に関連する可能性が考えられた。

共同研究者

田浦映恵, 相馬俊裕 (兵庫医科大学 血液内科)
松村 剛, 猪山昭徳, 木村紀久, 藤村晴俊, 佐
古田三郎 (国立病院機構刀根山病院 神経内科)

(倫理面への配慮)

本研究施行にあたっては、国立病院機構刀根山病院臨床研究審査委員会の承認を得た。

A. 研究目的

その疾患の原因に関わらず、神経筋疾患の病態・病状進行には組織血流障害・循環障害が影響する可能性がある。本検討では、神経筋疾患患者の血管新生に関連するマーカーを測定し、病態との関連を考察した。

B. 研究方法

対象：対象は以下の通りである。

Duchenne型筋ジストロフィー延べ32例。3.7～47.7歳(平均17.0歳)。全員男性。自発呼吸17例、夜間中心NPPV10例、気管切開下人工呼吸5例。

脊髄性筋萎縮症14例。8.1～58.3歳(平均28.3歳)。男性6例、女性8例。自発呼吸1例、夜間中心NPPV12例、気管切開下人工呼吸1例。

健常対象8例。6.9～48.7歳(平均30.1歳)。男性5例、女性3例。

方法：以下の項目を測定し、各項目間、年齢との関係を検討した。

血清クレアチンキナーゼ、末梢血中のCD34陽性細胞数。

C. 研究結果

血清クレアチンキナーゼは、Duchenne型筋ジストロフィーで49～20,935 IU/l(平均4,883 IU/l)、脊髄性筋萎縮症で11～86 IU/l(平均38 IU/l)、健常対象で92～187 IU/l(平均140 IU/l)であった。

末梢血中のCD34陽性細胞数は、Duchenne型筋ジストロフィーで0.45～4.54 cells/ μ l(平均1.99 cells/ μ l)(図1)、脊髄性筋萎縮症で0.54～4.78 cells/ μ l(平均1.65 cells/ μ l)(図2)、健常対象で0.79～3.82 cells/ μ l(平均1.53 cells/ μ l)であった(図3)。

健常対象の1例を除く7例では、CD34陽性細胞数は2 cells/ μ l未満であった。Duchenne型筋ジストロフィーでCD34陽性細胞数が2 cells/ μ l以上であったのは、自発呼吸17例中10例、NPPV10例中3例、気管切開5例中2例で、20歳未満を中心とする自発呼吸例でその例数が多かった。脊髄性筋萎縮症でCD34陽性細胞数が2 cells/ μ l以上であったのは3例で、うち2例はNPPVコンプライアンス不良例、1例は自発呼吸例であった。

各疾患、健常対象とも、血清クレアチンキナー

ゼと CD34 陽性細胞数の相関は明らかではなかつた。

D. 考察

CD34 は, Endothelial circulating progenitor cell (血管内皮前駆細胞: EPC) の表面マーカーの一つとしても知られており, EPC は血管の恒常性, 機能維持, 新生に関わるとされる。CD34 陽性細胞投与による脳梗塞実験モデルでの血管新生促進や, 末梢血 CD34 陽性細胞数と脳梗塞後の機能回復の関連などが報告され, CD34 は血管新生のマーカーとして注目されている。

これまで, Duchenne 型筋ジストロフィー, 脊髄性筋萎縮症とも nNOS 発現不良を認め, 血管内皮・平滑筋の機能的障害が指摘されている。さらに Duchenne 型筋ジストロフィーでは, 若年症例で病理学的にも血管内皮・平滑筋異常が指摘されている。本検討での, 筋壊死再生が活発な

CD34 陽性細胞数(絶対数 / μ l)

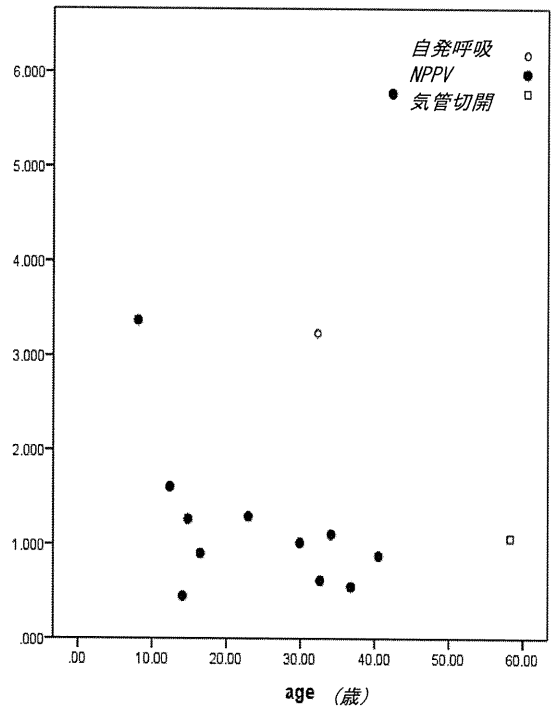


図 2 脊髄性筋萎縮症
CD34 陽性細胞と年齢

CD34 陽性細胞数(絶対数 / μ l)

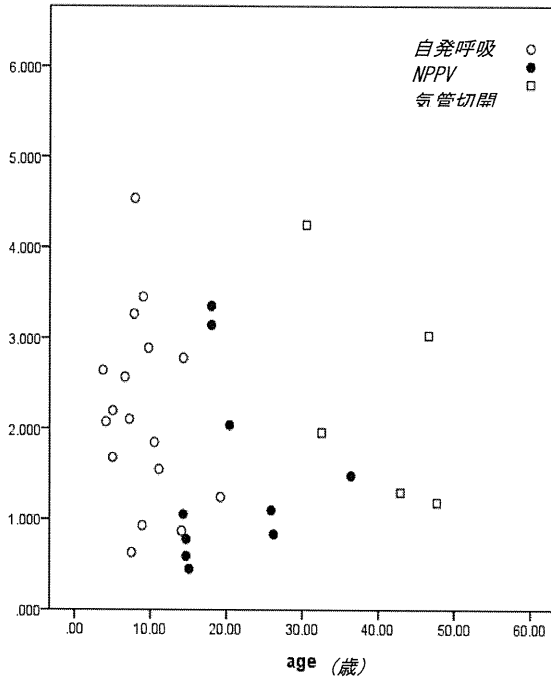


図 1 Duchenne 型筋ジストロフィー
CD34 陽性細胞と年齢

CD34 陽性細胞数(絶対数 / μ l)

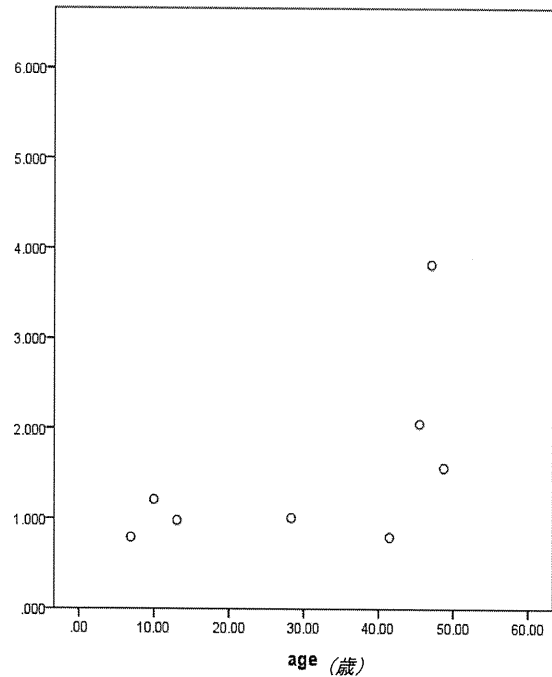


図 3 健常対象
CD34 陽性細胞と年齢

時期のCD34陽性細胞高値は筋崩壊と組織血流障害・循環障害の直接・間接の関連を疑わせる。

一方、OSASでも血管平滑筋障害が指摘されている。脊髄性筋萎縮症の呼吸不安定例でのCD34高値は、こうした低酸素を惹起する呼吸状態との関連も検討する必要があることを示すと考えられる。

E. 結論

血清クレアチンキナーゼとの相関はないが、Duchenne型筋ジストロフィーでは筋崩壊が、脊髄性筋萎縮症では呼吸不全が、CD34陽性細胞数に関連する可能性が最も考えやすい。いずれも組織血流障害・低酸素を惹起する状態であり、検討を進めたい。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

（準備中）

2. 学会発表

第53回日本神経学会学術大会（平成24年5月）にて発表予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

SMN2 遺伝子量解析による予測より軽症の経過をとった 脊髄性筋萎縮症の 2 歳男児に対するプロモーター解析

西尾久英 神戸大学大学院医学研究科地域社会医学・健康科学講座疫学分野 教授

研究要旨

SMN1 遺伝子のホモ接合性欠失を認め、SMN2 遺伝子を 2 コピー有する症例を経験した。その患者の臨床表現型は SMA type2/3 であった。SMN2 遺伝子のコピー数が 2 コピーの症例は SMA type1 であることがほとんどであり、本症例は SMN2 遺伝子コピー数による予測よりも軽症の経過をとっていると考えられた。また、2007 年に Prior が SMN2 遺伝子エクソン 7 の c. 859G>C 変異が SMA の症状を軽減するという報告を行ったが、本症例にはこの変異は認めなかった。

そこで今回我々は、SMN2 遺伝子コピー数以外の症状修飾因子を明らかにする目的でプロモーター領域の解析を行った。本症例が有する 2 つの SMN2 遺伝子のプロモーター領域には相異なる多型（GCC 挿入／欠失多型）が存在した。しかしながら、ルシフェラーゼアッセイを用いた検討で、GCC 挿入／欠失多型は SMN2 遺伝子プロモーターの転写活性に影響を与えていないことが明らかになった。このことより GCC 挿入／欠失多型は SMA の臨床症状の修飾因子ではないと考えられた。

以上のことから、SMN2 遺伝子コピー数、SMN2 遺伝子プロモーター内の GCC 挿入／欠失多型性以外の要因が症状の修飾因子となることが示唆された。

共同研究者

森川 悟（神戸大学大学院医学研究科地域社会医学・健康科学講座疫学分野）

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症（SMA）は、SMN2 遺伝子コピー数が少なければ重症化することが報告されてきた。しかし、SMN2 遺伝子コピー数が少ない軽症例も存在する。

今回、我々は、SMN2 遺伝子コピー数以外の症状修飾因子を明らかにする目的で、SMN2 遺伝子コピー数による予測よりも軽症の経過をとった症例について、プロモーター領域の解析を行った。

B. 研究方法

①症例：2 歳男児。1 歳 6 か月時には伝い歩きが可能であった。遺伝子解析の結果、SMN1 遺伝子は欠失し、SMN2 遺伝子は 2 コピー存在していた。それで症例は SMA type 2/3 (type3 に近い

type2) と診断した。

②SMN2 遺伝子エクソン 7 の変異：2007 年に Prior が報告した、SMA の症状を軽減するとされる SMN2 遺伝子エクソン 7 の c. 859G>C 変異の有無を調べるため、シーケンスを行った。

③SMN2 遺伝子プロモーター領域の変異：症例の SMN2 遺伝子プロモーター領域のシーケンスを行った。

④多型性の検索：温度変性高速液体クロマトグラフィー法（DHPLC）を用いて SMN1 遺伝子欠失群（SMA 群）51 例、健常群 50 例において SMN1/2 遺伝子プロモーター多型性の頻度を検討した。

⑤ルシフェラーゼ・アッセイ：SMN2 遺伝子プロモーターの多型性が転写活性に影響を与えるか否かを、ルシフェラーゼ・アッセイを用いて検討した。宿主細胞にはヒト神経芽腫細胞株を用いた。ルシフェラーゼ・レポーター・ベクターに、GCC 挿入多型を有する SMN プロモーター、GCC 欠失多型を有する SMN プロモーターをそれ

ぞれ挿入し、*SMN*プロモーターを挿入しないものと併せて、3種類のベクターを構築した。次に薬剤を添加してルシフェラーゼ活性を測定した。薬剤反応性は、(1)薬剤の添加を行わなかった群、(2)cAMP産生を増加させるフォルスコリンを投与した群、(3)cAMP合成と同じ効果を有するジブチルサイクリックAMPを投与した群、(4)フォルスコリンとジブチルサイクリックAMPの両方を投与した群で比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は神戸大学医学倫理委員会による承認を得て行われた。

C. 研究結果

①1996年1月から2011年10月に当分野で*SMN*遺伝子解析を行った*SMN1*遺伝子のホモ接合性欠失を認めるSMA患者89名を対象とした解析では、*SMN1*遺伝子を欠失し、*SMN2*遺伝子が2コピーしかない患者の94%がSMA1型の表現型をとった(表1)。

本症例は*SMN2*遺伝子が2コピーしかないにもかかわらずSMA2型の表現型をとっており、*SMN2*遺伝子コピー数による予測よりも軽症の経過をとったと考えるのが妥当である。

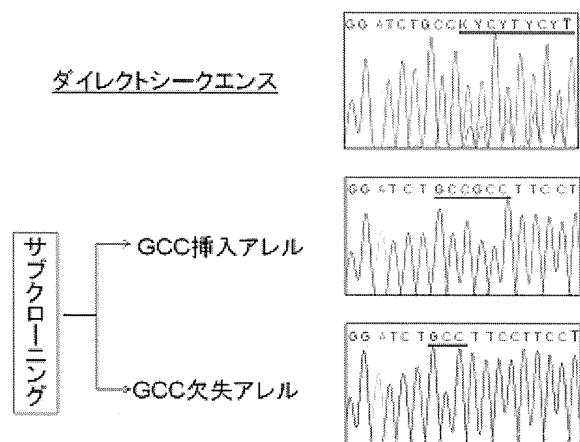
(表1) *SMN1* 遺伝子欠失を認める SMA 患者の表現型と *SMN2* 遺伝子コピー数の関係

	SMN2 copy number				total
	1	2	3	4	
Type 1	1	33	9	0	43
Type 2	0	1	29	0	30
Type 3	0	1	8	4	13
Type 4	0	0	1	2	3
total	1	35	47	6	89

②*SMN2* 遺伝子エクソン7のダイレクト・シーケンスの結果では、本症例ではPriorが報告したc.859G>C変異は認めなかった。

③症例の*SMN2*遺伝子プロモーター領域のダイレクト・シーケンスでは、途中から配列のオーバーラップを認めた。サブクローニング・シーケンスではGCCの繰り返しが2回存在するGCC挿入アレルと、GCCが1回のみGCC欠失アレルの2種類が存在する事が確認できた(図1)。

(図1) *SMN*プロモーター領域のシーケンス



以上の事から、本症例が有する2つの*SMN2*遺伝子のプロモーター領域には相異なる多型(GCC挿入/欠失多型)が存在することが明らかとなった。

④DHPLCによる解析では、GCC挿入多型の頻度はSMA群51例(全例、*SMN1*遺伝子欠失していた)中1例(2%)、健常群50例中12例(24%)であった(表2)。このことから、GCC挿入多型は主に*SMN1*遺伝子内で広まっていると考えられた。

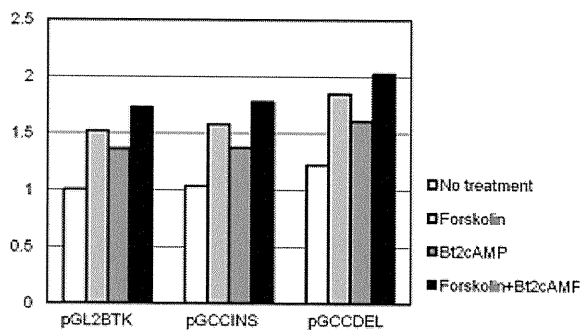
（表 2）GCC 挿入／欠失多型の頻度

	GCC- insertion	GCC- deletion	total
SMA patients lacking <i>SMN1</i> and retaining <i>SMN2</i>	1	50	51
Healthy controls containing <i>SMN1</i>	12	38	50
total	13	88	101

⑤ルシフェラーゼ・アッセイを用いた検討では、全てのベクター系でフォルスコリンやジブチルcAMP投与によりルシフェラーゼ活性の有意な増加を認めた。しかしながら、GCC挿入多型プロモーターとGCC欠失多型プロモーターの間の比較では、薬剤を添加しなかった群、薬剤を添加した群ともにルシフェラーゼの発現に有意差を認めなかった（図2）。

このことからGCC挿入／欠失多型は*SMN2*遺伝子プロモーターの転写活性に影響を与えていないことが明らかになった。このことよりGCC挿入／欠失多型はSMAの臨床症状の修飾因子ではないと考えられた。

（図 2）ルシフェラーゼ・アッセイ



D. 考察

今回、我々は、*SMN2*遺伝子コピー数による予測よりも軽症の経過をとった症例を経験した。2007年にPriorらが*SMN2*遺伝子エクソン7の変異によってSMAの症状が軽減されると報告しているが、我々の症例では、この変異を認めていない。

そこで、我々は、本症例が予測よりも軽症の経過をとった理由として、*SMN2*プロモーター活性の亢進によって*SMN2* mRNA転写量が増加しているためであるという仮説を立てた。

2004年にBodaらが6人のヒトゲノムDNAの解析を行ったところ、転写開始部位から4.6kb上流までの領域は*SMN1*遺伝子、*SMN2*遺伝子ともに同じ配列であったという報告を行って以降、*SMN*遺伝子のプロモーター配列は単一であるという認識が一般的となり、以降はプロモーターに関する検討はあまりなされてこなかった。しかしながら、今回の我々の研究により、*SMN1/2*遺伝子プロモーターの塩基配列はすべて同一ではなく、*SMN*遺伝子のプロモーター配列にはGCC挿入／欠失多型が存在する事が明らかとなった。

また*SMN1*遺伝子を有する健常群で有意にGCC挿入多型が多かった事、*SMN1*遺伝子が欠失しているSMA群でGCC挿入多型を認めたのが本症例のみであったことから、GCC挿入多型は主に*SMN1*遺伝子内で広まっていると考えられた。

ルシフェラーゼアッセイを用いたプロモーター活性の測定では、GCC挿入多型を有するプロモーターとGCC欠失多型を有するプロモーターの間にプロモーター活性には有意差を認めず、GCC挿入／欠失多型はプロモーター活性に影響を与えない事が明らかとなり、本症例のGCC挿入多型は修飾因子ではなく、他になんらかの症状の修飾因子が存在するものと考えられた。

E. 結論

今回の症例から、*SMN2*遺伝子コピー数、*SMN2*遺伝子プロモーター内のGCC挿入／欠失多型性以外の要因が症状の修飾因子となることが示唆された。また、*SMN1/2*遺伝子プロモーターの塩基配列はすべて同一であるとは言えないことも明らかになった。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Morikawa S, Harahap IS, Kaszynski RH, Yamamoto T, Pramudya DK, Van Pham HT, Hartomo TB, Lee MJ, Morioka I, Nishimura N, Yokoyama N, Ueno Y, Matsuo M, Nishio H. Diagnosis of spinal muscular atrophy via high-resolution melting analysis symmetric polymerase chain reaction without probe: a screening evaluation for SMN1 deletions and intragenic mutations. Genet Test Mol Biomarkers. 2011 Oct;15(10):677-84.

2) Katayama M, Naritomi H, Nishio H, Watanabe T, Teramoto S, Kanda F, Hazama A. Long-term stabilization of respiratory conditions in patients with spinal muscular atrophy type 2 by continuous positive airway pressure: a report of two cases. Kobe J. Med. Sci. 2011;57(3):E98-105.

3) Harahap NI, Harahap IS, Kaszynski RH, Nurputra DK, Hartomo TB, Pham HT, Yamamoto T, Morikawa S, Nishimura N, Rusdi I, Widiastuti R, Nishio H. Spinal Muscular Atrophy Patient Detection and Carrier Screening Using Dried Blood Spots on Filter Paper. Genet Test Mol Biomarkers. 2011 (in press).

4) Harahap IS, Saito T, San LP, Sasaki N, Gunadi, Nurputra DK, Yusoff S, Yamamoto T, Morikawa S, Nishimura N, Lee MJ, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H. Valproic acid increases SMN2 expression and modulates SF2/ASF and hnRNPA1 expression in SMA fibroblast cell lines. Brain Dev. 2011 (in Press).

5) 西尾久英, 斉藤利雄, 森川悟, 山本友人, Dian Kesumapramudya Nurputra, 寶田徹, 竹内敦子, 西村範行, 竹島泰弘, 松尾雅文. 小児医学最近の進

歩 脊髄性筋萎縮症と SMN 蛋白と低分子量リボ核蛋白合成. 小児科. 2011; 52(11) : 1535-1542.

6) 栗野宏之, 李知子, 八木麻理子, 竹島泰弘, 西尾久英, 松尾雅文. 非侵襲的陽圧換気療法と器械による咳介助を活用し、気管内挿管から離脱した脊髄性筋萎縮症 I 型. 日本小児科学会雑誌. 2011; 115(9) : 1451-1455.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

SMA など神経筋疾患に対するロボットスーツ HAL の治験準備研究

中島孝 国立病院機構新潟病院 副院長

研究要旨

希少性難病である脊髄性筋萎縮症 (SMA) など筋萎縮を来す疾患群は進行性・難治性であり、根本的治療法は成功しておらず、多専門職種ケア (multidisciplinary team) による QOL の向上が試みられているのみである。いかなる治療によっても、上記疾患による骨格筋の筋力低下・萎縮の悪化速度を抑制することができず、緊急に解決すべき課題である。HAL (Hybrid assistive limb) は分担研究者である筑波大学の山海により開発された装着型ロボットで、人の表面筋電図などの生体電位に加速度、関節角度、床反力センサーなどの情報を組み合わせ、リアルタイムに骨格筋の随意運動を増強するために開発された。この技術を基にして、疾患に使用可能な HAL-神経・筋難病型下肢用モデル (HAL-HN01) が開発された。これは他の HAL モデルとは異なり、病的筋の微小な電位をも検出し罹患筋をアシストできるものである。本研究は治療法が無い希少性神経・筋難病患者がこの HAL-HN01 を定期的、間欠的に装着し、適切なアシストにより筋収縮を助けられることで、障害された筋線維の過疲労が減少し、疾患の経過でおきる筋萎縮と筋力低下の進行を抑制するという仮説を検証し、短期使用の治療効果により新規医療機器としての承認を目指す準備研究の一つである。本研究の結果、SMA などに対する希少性疾患用医療機器として薬事承認を得る為の医師主導治験が可能と考えられた。

共同研究者

林知広¹⁾、新宮正広¹⁾、山海嘉之²⁾

1) サイバーダイナミクス株式会社、2) 筑波大学

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症 (SMA)、シャルコーマリートゥース (CMT)、筋萎縮性側索硬化症、遠位型ミオパチーなどを含む進行性の神経・筋疾患は難治性な上、障害が高度となり根本的な治療法の開発が望まれているが、現時点では成功しておらず、多専門職種ケアによる生活の質 (QOL) の向上がおこなわれているだけである。本研究では、この様な疾患群に対して、専用に開発された装着型ロボット HAL (hybrid assistive limb) をリハビリテーションプログラムの中で、一定時間間欠的に使用することで、病気の自

然経過を変容させることができるかどうか検証することを主要な目標とする。HAL-神経・筋難病下肢用モデルが神経・筋疾患患者の表面筋電図など生体情報をもとに適切なアシスト量を決めて、筋収縮を助けることにより、筋の過疲労を減少させ、筋を保護し、筋力低下の進行を抑制すると同時に、病変のより軽微な筋群では廃用症候群を予防できるという仮説を検討する。それに必要な装着型ロボット HAL の開発研究と薬事法に基づく治験 (無作為化クロスオーバー短期試験など) をめざした探索的検討をおこなう。

B. 研究方法

探索的な対象を脊髄性筋萎縮症 (SMA^{3,4})、CMT、遠位型ミオパチー、進行スピードの緩やかな筋萎縮

性側索硬化症などの神経筋疾患として、医療機器として将来申請可能な HAL 福祉モデルを装着して、表面筋電図の評価、罹患筋の CT による評価、HAL と関節運動の評価、安全性の確保、評価方法などに関して検討をおこなった。このような神経筋疾患に適した HAL の開発のために、生体電位データを共有し、山海嘉之教授（筑波大学大学院システム情報工学研究科）と開発を行っている。得られたデータをもとに医薬品医療機器総合機構（PMDA）と医療機器戦略相談、医療機器開発前相談を行っている。（倫理的配慮：本研究では、ヘルシンキ宣言、薬事法、臨床研究倫理指針を遵守するだけでなく、患者団体からの情報を得ながら、十分な倫理的配慮をおこない研究した。）

C. 研究結果

昨年被験者として SMA3 型 51 歳男性に対して、HAL-福祉用(両脚型)を装着したが、生体電極からの電位は HAL のアクチュエータトルクを発生させるにいたらなかった。このため HAL-HT01 (両脚型)を基に、実際の SMA 患者の表面筋電図から生体信号処理の方法の変更を（筑波大学山海研究室にて）おこなった。SMA 患者で、関節運動意図を示す有効な表面筋電図をスクリーニングする方法を検討し、微弱な表面筋電図であっても HAL は駆動し、今まで動かなかった関節運動をおこなうことが可能になった。その後、Hoist を利用して体重を免荷すると同時に、転倒しないような安全管理をおこない、HAL を用いた歩行に成功した。一日約 40 分を 3 回、歩行練習をおこなった。HAL 非装着時の歩行を練習前と練習後で比較すると、あきらかに、両脚の振り出しと膝の挙上、歩行スピードは改善し、自覚的にも改善感をみとめた。

CMT の 37 歳女性患者に対して、SMA 用に開発

された HAL の生体信号処理方法を使うことで、安定した随意運動トルクを発生させることができた。Hoist を用いた安全な歩行方法を検討した。40 分程度の HAL と Hoist による歩行練習を行うことで使用後に患者は主観的な両脚の動きの改善と杖歩行の改善を感じた。今回の検討により、今後薬事法に基づく治験に必要な、プロトコール作成や神経・筋疾患患者に利用する際の安全性確保の方法を得るための成果をあげることができた。PMDA との医療機器戦略相談、医療機器開発前相談を踏まえて、探索的治験相談に移行し、治験届けを行う方向で研究が継続できている。

D. 考察

HAL の様な装着型ロボットは日本で世界に先駆けて開発されており、世界では臨床試験や治験の実績がない。このため、今回の医師主導治験にむけた研究として、先行研究を参照することはほとんどできなかつた。補助機器を利用した歩行リハビリテーション用具には Gait trainer, Lokomat がありコクランデータベース（CD006876）で脳血管障害の歩行訓練に一部有効と評価されているが、生体信号を利用せず、トレッドミル装置に固定し、外的に強制的に訓練するもので、本研究での対象疾患である希少性神経・筋難病疾患における病的な罹患筋を傷害する危険性がある。オランダで開発されている LOPES は表面筋電図などよりアシストする点は HAL に類似するが、トレッドミル装置に固定され自由に歩行できない欠点がある。米国で開発中の BLEEX という装着型ロボットの主目的は軍事用であり、医療用の使用には制限がある。このため、本研究は上記の海外の研究とは異なり、きわめて独創的で有効性が高く、日本発の世界に発信できる医療技術となり得ると考えられた。

今回の研究に基づいて、今後、PMDA の開発前助言、治験前相談において得られる助言やその後の研究結果に基づいて、医師主導治験計画書（案）の治験前の改訂を行った上で、医師主導治験を我が国で率先して実施する価値がきわめて高いと考えられた。

E. 結論

SMA など神経・筋疾患用の HAL、HAL-神経・筋難病下肢用モデルの開発に成功し、HAL を使った神経・筋疾患に対する薬事法に基づく治験での必要な安全性を確保する方法も確立できた。HAL が SMA などの神経・筋疾患で障害された機能の補完以上の効果、すなわち疾患の自然経過を改善する治療効果をもたらすかどうかの探索的な検討として成功し、薬事法に基づく治験（無作為化クロスオーバー短期試験など）の準備が可能となった。さらに、将来、HAL 装着による介入効果と薬物治療や遺伝子治療を組み合わせた治療を構築することも検討可能と思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 中島孝、神経・筋難病患者が装着するロボットスーツ HAL の医学応用に向けた進捗、期待される臨床効果、保健医療科学 60(2),130-137, 2010
2. 中島孝、医療における QOL と緩和についての誤解を解くために、医薬ジャーナル、47:1167-1174,2011
3. T.Nakajima, Neuroethics and QOL perspectives of Cybernetics technology, enhancement or palliation, towards clinical trial, Cybernetics Technical Reports, Special issue on roboethics, p15-22, University of Tsukuba, 2011.

2. 学会発表

1. T.Nakajima, Issues in Testing Care Robotic Devices in the Field: Using HAL in a Japanese Hospital, Care Robotics in the Aging Society: Integrating Users, Developers and Technology, Deutsches Institut für Japanstudien (ドイツ日本研究所ワークショップ) 11.Nov.2011. Tokyo.http://www.dijtokyo.org/events/care_robotics_in_the_aging_society
2. 中島孝、神経・筋疾患に対する装着型ロボット HAL を用いた研究、2011 年 5 月 18 日、第 52 回日本神経学会学術大会、名古屋国際会議場。

G. 知的所有権の取得状況

今回の研究年ではあらたな取得はなかった。

SMN1 mRNA 導入ポリオウイルスベクターの開発研究

野本明男 公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所・所長

研究要旨

運動神経向性を有するポリオウイルス (PV) の構造蛋白質をコードする領域を欠失した欠陥干渉粒子 (DI 粒子) に Green Fluorescent Protein (GFP) をタグとして持つ Survival of motor neuron 1 (SMN1) mRNA を導入した PV ベクターを作製した。この PV DI 粒子を HeLa 細胞に感染させたところ細胞内で GFP-SMN 融合蛋白質として発現を確認した。PV ベクターを用いて SMN 蛋白質の発現に成功したのはこの研究が最初である。

共同研究者

荒川正行（公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所）

滝沢直己（公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所）

藤原俊伸（公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所）

PV-GFP-SMN1 DI 粒子が作製できるかどうかを検討した。その後、作製された PV DI 粒子を HeLa 細胞に感染させ、発現した GFP 抗原及び SMN 蛋白質抗原を免疫組織化学染色法により観察した。（倫理面への配慮）

本研究における組換え生物実験は微生物化学研究所の指針に基づき行った。

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症は脊髄前角運動神経細胞の変性疾患であり、その原因遺伝子の一つは Survival of motor neuron 1 (SMN1) である。一方、ポリオウイルス (PV) はプラス鎖 RNA ウイルスであり、ヒトに感染後、脊髄前角の運動神経細胞で増殖・複製する。さらに PV には自己複製能を持たず 1 回限りの感染が成立する欠陥干渉粒子 (DI 粒子) が存在する。これらの特長を活かし、PV DI 粒子ゲノムに SMN1 mRNA を導入し、安全性が高く運動神経細胞特異的に SMN 蛋白質を発現する PV ベクターを開発する。

B. 研究方法

PV 構造蛋白質コード領域を GFP tag human SMN1 mRNA に置換し、この領域を PV の internal ribosome entry site (IRES) で発現させるように設計した pPV-GFP-SMN1 由来 RNA を作製した。この RNA と PV 構造蛋白質領域の発現プラスミド (pKS435-EGFP-PV) をリポフェクション法により 293T 細胞に導入して、パッケージされた

C. 研究結果

GFP-SMN1 mRNA を搭載した PV-GFP-SMN1 DI 粒子を作製することに成功した。次に、この粒子を HeLa 細胞に感染させ、感染後 4 時間以降で導入された GFP の発現が観察され、さらに免疫組織化学染色法により GFP 抗原及び SMN 蛋白質抗原が細胞質及び核内で共発現しているのが検出された。

D. 考察

脊髄性筋萎縮症で主に欠失している SMN1 mRNA を搭載した PV-GFP-SMN1 DI 粒子の作製に成功した。さらに、この PV-GFP-SMN1 DI 粒子を HeLa 細胞に感染させたところ GFP-SMN 融合蛋白質の形で細胞内の細胞質及び核内で発現していることを免疫組織化学染色法によって確認した。一般に SMN 蛋白質は細胞質及び核内共に存在していると報告されており、本研究で発現した GFP-SMN 融合蛋白質は通常の SMN 蛋白質の性質と同様な細胞内局在を示していたと考えている。

E. 結論

ポリオウイルスをベクターとして、脊髄性筋萎縮症で主に欠失している SMN1 mRNA を搭載した PVDI 粒子を作製することに成功した。PV ベクターを用いることによる SMN 蛋白質の導入は我々が初めてである。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) ポリオウイルスの体内伝播機構

野本明男

第 15 回日本神経ウイルス研究会特別講演

5 月 19 日（金沢）

2) Dissemination mechanisms of poliovirus

Akio Nomoto

Symposium “Viruses Forever” May 27, New York

3) Characterization of a receptor for poliovirus

BBB-permeation

Coh-ichi Nihei, Manabu Yamasaki, Akio Nomoto

International Union of Microbiological

Societies, 2011 Congress (IUMS) September 13,

Sapporo

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

脊髄性筋萎縮症患者由来疾患 iPS 細胞の樹立

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

脊髄性筋萎縮症の病態解析に用いるツールとして利用するために、患者皮膚線維芽細胞を得て、レトロウイルス法により由来 iPS 細胞を樹立した。レトロウイルス法の場合、核内染色体への挿入のため、染色体再構成が起こり易いことが指摘されており、実際そのような細胞が認められた。今後はより簡便で、染色体再構成を起しにくいとされているエピソーマルベクターを使った樹立法により、疾患 iPS 細胞樹立を目指す。

A. 研究目的

脊髄性筋萎縮症の病態解析に用いるツールとして疾患患者由来 iPS 細胞を樹立し、今後の研究に利用する。

B. 研究方法

マウス細胞にのみ感染する同種指向性ウイルスレセプターSlc7a1 をあらかじめ脊髄性筋萎縮症患者由来皮膚線維芽細胞に導入する。そのために 293FT 細胞に Virapower packaging mix を用いて遺伝子導入し、レンチウイルスを産生させる。得られた培養上清を皮膚線維芽細胞の培養液と置き換えて感染させる。感染効率は同時に行った GFP の導入効率と比較して勘案する。次に Slc7a1 が発現している皮膚線維芽細胞にいわゆる山中 4 因子(OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) をレトロウイルストランスフェクションすることにより iPS 細胞に形質転換させる。そのために、山中 4 因子を含む pMX ベクタープラスミドを PLAT-E 細胞に導入し、レトロウイルスを産生させる。レトロウイルスを含む PLAT-E 細胞培養上清を 4 種類均等にして、Slc7a1 が発現している皮膚線維芽細胞の培養液と置き換える。山中 4 因子を感染させた皮膚線維芽細胞は、1 週間後に SNL フィーダー細胞上にまき直し、以後は ES 細胞用培地で培養する。約 3 週間後に現れるコロニーを最低 50 個収穫し、別々に培養する。以後、真の iPS 細胞が得られたかどうかを検証し、解析に堪え得る細胞を取捨選別し、解析に使用

する。

（倫理面への配慮）

本研究は学内倫理委員会の承認を得ている。研究計画書に則り書面による説明を家族に対して行い、書面への署名による同意を得て行った。

C. 研究結果

山中 4 因子の導入により患者皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立した。しかし、得られたコロニーは継代中に分化したり、癌化することもあり、核型解析により染色体再構成が認められることがあった。

D. 考察

iPS 細胞の樹立では、適切なクローンを得ることがその後の分化誘導実験にとって重要となるが、レトロウイルスによる樹立方法には効率性や核内染色体へのレトロウイルス挿入による染色体再構成の問題が避けて通れない。

E. 結論

レトロウイルスによる山中 4 因子の導入では、細胞の染色体への挿入が起こっており、質の良い疾患 iPS 細胞を得るには問題があるので、今後はより簡便で効率の良い方法としてエピソーマルベクターを用いた導入方法を試みる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山本俊至. 臨床遺伝に関わる人のためのマイクロアレイ染色体検査. 診断と治療社, 東京, 2012.
- 2) Shimojima K, Okumura A, Natsume J, Aiba K, Kurahashi H, Kubota T, Yokochi K, Yamamoto T. Spinocerebellar ataxias type 27 derived from a disruption of the fibroblast growth factor 14 gene with mimicking phenotype of paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia. *Brain Dev* (in press)
- 3) Shimojima K and Yamamoto T. Growth profiles of 34 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Pediatr Genet* (in press)
- 4) Shimojima K, Okamoto N, Inazu T, Yamamoto T. Tandem configurations of variably duplicated segments of 22q11.2 confirmed by fiber-FISH analysis. *J Hum Genet* 56: 810-812, 2011.
- 5) Tohyama J, Yamamoto T, Hosoki K, Nagasaki K, Akasaka N, Ohashi T, Kobayashi Y, Saitoh S. West syndrome associated with mosaic duplication of FOXP1 in a patient with maternal uniparental disomy of chromosome 14. *Am J Med Genet* 155: 2584-8, 2011.
- 6) Hirose M, Haginoya K, Yokoyama H, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Munakata M, Uematsu M, Iinuma K, Kato M, Yamamoto T, Tsuchiya S. Progressive atrophy of the cerebrum in 2 Japanese sisters with microcephaly with simplified gyri and enlarged extra axial space. *Neuropediatrics* 42: 163-166, 2011.
- 7) Okamoto N, Hatsukawa Y, Shimojima K, Yamamoto T. Submicroscopic deletion in 7q31 encompassing CADPS2 and TSPAN12 in a child with autism spectrum disorder and PHPV. *Am J Med Genet A* 155A: 1568-1573, 2011.
- 8) Okamoto N, Tamura D, Nishimura G, Shimojima K, Yamamoto T. Submicroscopic deletion of 12q13 including HOXC gene cluster with skeletal anomalies and global developmental delay. *Am J Med Genet A* 155: 2997-3001, 2011.
- 9) Shimojima K, Okanishi T, Yamamoto T. Marfanoid hypermobility caused by an 862 kb deletion of Xq22.3 in a patient with Sotos syndrome. *Am J Med Genet A* 155A: 2293-2297, 2011.
- 10) Okumura A, Yamamoto T, Shimojima K, Honda Y, Abe S, Ikeno M, Shimizu T. Refractory neonatal epilepsy with a de novo duplication of chromosome 2q24.2q24.3. *Epilepsia* 52: e66-9, 2011.
- 11) Yamashita S, Okumura A, Yamamoto T, Shimojima K, Tanabe T, Shimizu T. SCN1B is Not Related to Benign Partial Epilepsy in Infancy or Convulsions with Gastroenteritis. *Neuropediatrics* 42: 135-137, 2011.
- 12) Sigberg L, Peippo M, Sipponen M, Miikkulainen T, Shimojima K, Yamamoto T, Ignatius J, Knuutila S. 9q22 Deletion—first familial case. *Orphanet J Rare Dis* 6:45, 2011.
- 13) Shimojima K, Sugawara M, Shichiji M, Mukaida S, Takayama R, Imai K, Yamamoto T. Loss-of-function mutation of collybistin is responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy. *J Hum Genet* 56: 561-556, 2011.
- 14) Liang J-S, Shimojima K, Takayama R, Natsume J, Shichiji M, Hirasawa K, Imai K, Okanishi T, Mizuno S, Okumura A, Sugawara M, Ito T, Ikeda H, Takahashi Y, Oguni H, Imai K, Osawa M, Yamamoto T. CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders. *Epilepsia* 52: 1835-1842, 2011.