

Progressive Atrophy of the Cerebrum in 2 Japanese Sisters with Microcephaly with Simplified Gyri and Enlarged Extraaxial Space

Authors

M. Hirose¹, K. Haginoya^{1,2}, H. Yokoyama³, A. Kikuchi¹, N. Hino-Fukuyo¹, M. Munakata¹, M. Uematsu¹, K. Iinuma⁴, M. Kato⁵, T. Yamamoto⁶, S. Tsuchiya¹

Affiliations

Affiliation addresses are listed at the end of the article

Key words

- microcephaly
- simplified gyri
- enlarged extraaxial space
- atrophy

Abstract

This is a case report that describes 2 sisters with microcephaly, simplified gyri, and enlarged extraaxial space. Clinical features of the cases include dysmorphic features, congenital microcephaly, failure of postnatal brain growth, neonatal onset of seizures, quadriplegia, and severe psychomotor delay. Neuroradiological imaging demonstrated hypoplasia of bilateral cerebral hemispheres with enlarged extraaxial spaces, simplified gyral patterns without a thickened cortex, hypoplastic corpus callosum, and enlarged lateral ventricles, with a reduction in

gray and white matter volume during the prenatal and neonatal periods. Repeat MRI revealed progressive atrophy of the cerebral gray and white matter, with enlarged lateral ventricles, although the sizes of the bilateral basal ganglia, thalamus, and infratentorial structures were relatively preserved. These neuroradiological findings imply that this disease is caused by the gene involved in neuronal and glial proliferation in the ventricular zone and in tangential neuronal migration from the ganglionic eminence. The nature of the progressive degeneration of the hemispheric structures should be clarified.

Introduction

From medical records and brain images in 237 patients with brain malformations characterized as microcephaly with simplified gyri, Basel-Vanagaite and Dobyns classified patients into 4 major groups: microcephaly with simplified gyri only, microcephaly with simplified gyri and pontocerebeller hypoplasia, microcephaly with simplified gyri and enlarged extraaxial space, and microcephaly with simplified gyri and both pontocerebeller hypoplasia and enlarged extraaxial space [1]. One of these groups, microcephaly with simplified gyri and enlarged extraaxial space is clinically characterized by severe developmental failure, feeding difficulty, spastic quadriplegia, and dyskinesia, with postnatal or congenital brain growth failure [occipital frontal circumference (OFC) below -3 SD]. MRI findings typically show microcephaly, simplified gyri, enlarged extraaxial space and relatively preserved pontocerebeller structures [1]. In this case study, we describe 2 Japanese sisters with microcephaly with simplified gyri and enlarged extraaxial space. In one of the sisters, repeat MRI findings showed progressive atrophy of the cerebral hemispheres.

Case Report

Patient 1

The older sister, the first child of unrelated parents, was born after 38 weeks gestation by spontaneous delivery following a normal pregnancy. Microcephaly was noted during fetal ultrasonographic examination in the last trimester. The patient's birth weight was 2400 g (-1.5 SD), length 45.0 cm (-1.7 SD), and OFC 30 cm (-2.2 SD). She temporally showed clonic seizure activity on day 0. Upon admission at the age of 1 month, her general condition was unremarkable in spite of microcephaly and feeding difficulties. Dysmorphic features including a sloping forehead, arched and thick eyebrows, blepharophimosis, a saddle nose, triangular mouth, and micrognathia were observed. She began having complex partial seizures with right facial clonic seizures at 2 months of age. The seizures were controlled with valproic acid. The patient had spastic quadriplegia without obvious spontaneous movements and gastroesophageal reflux disease (GERD) beginning at 3 months of age. She died suddenly at 4 years and 8 months of age.

received 25.04.2011
accepted 28.08.2011

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1287771>
Neuropediatrics 2011;
42: 163–166
© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York
ISSN 0174-304X

Correspondence

Kazuhiro Haginoya, MD, PhD
Department of Pediatric
Neurology
Takuto Rehabilitation Center for
Children
20 Shikaoto
Akiu Yumoto
Taihaku-ku
Sendai 982-0241
Japan
Tel.: +81/22/398 2221
Fax: +81/22/397 2697
khaginoya@silk.ocn.ne.jp

Laboratory examinations were normal including blood NH_3 , blood gas analysis, serum lactate, blood glucose, cerebrospinal fluid (CSF) glucose, CSF lactate, CSF white cell count, blood amino acid analysis, urine organic acid analysis, and plasma very long-chain fatty acid (VLCFA). Chromosome analysis and fluorescent in situ hybridization (FISH) studies for the LIS1 specific deletion at 17p13.3 revealed no abnormalities.

Her electroencephalogram (EEG) showed low amplitude and irregular waking background without obvious epileptic discharges on day 0. The ictal EEG of complex partial seizures at 3 months of age revealed right fronto-central spike bursts. Auditory evoked potentials (ABRs) and visual evoked potentials (VEPs) both showed a flat pattern. Brain magnetic resonance imaging (MRI) on day 0 revealed hypoplasia of bilateral cerebral hemispheres with enlarged extraaxial space, a simplified gyral pattern without a thickened cortex, a relatively spared volume of the bilateral basal ganglia and thalamus, a mildly flattened brain stem, and a hypoplastic corpus callosum (© Fig. 1a–c).

Patient 2

The microcephaly of the younger sister was recognized at a gestational age (GA) of 28 weeks by means of ultrasonography. She was born after 37 weeks gestation by spontaneous delivery following a normal pregnancy. The patient's birth weight was 2566 g (−0.5 SD), length 46.0 cm (−0.7 SD), and OFC 27 cm (−4.0 SD). Her Apgar score was 8 at 1 min, and 9 at 5 min. She developed generalized tonic seizures at 3 months of age. Her seizures were well controlled with valproic acid beginning when she was 2 years old.

She was able to bottle feed through the first 12 months, but her feeding skills deteriorated beginning at 18 months of age. At 2 years and 6 months, she was also diagnosed with GERD and required the use of a duodenal feeding tube. She also had spastic quadriplegia and visual impairment from early infancy. No developmental progress was observed.

Clinical examination performed at 3 years and 1 month of age showed microcephaly of OFC 41.5 cm (−4.2 SD), and other growth parameters were between −1 and −2 SD. Her dysmorphism was similar to that of her older sister. She had marked scoliosis, with hypertonic extremities and a posture characterized by asymmetrical tonic neck reflex. Deep tendon reflexes were exaggerated, and ankle clonus appeared bilaterally. Erratic myoclonus in the bilateral orbicular muscles and systemic myoclonus easily induced by sounds were often seen. There was no spontaneous movement of the extremities.

Laboratory examinations were normal including blood chemistry, creatinine kinase, intrauterine infection screen, blood NH_3 , blood gas analysis, serum lactate, serum glucose, CSF glucose, CSF lactate, CSF white cell count, blood amino acid analysis,

urine organic acid analysis, and plasma VLCFA. Chromosome analysis (G band) was 46XX; FISH for the LIS1 specific deletion at 17p13.3 was negative. Array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) was performed using the Agilent Human Genome Microarray kit 244A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), and it showed no apparent deletions or duplication.

The brain MRIs were performed at a GA of 30 weeks via intruterine imaging, at day 0, and at 3 years and 1 month (© Fig. 2a–g). The former 2 MRI findings were almost identical to those of the older sister. Cerebellar white matter around the dentate nucleus had high T_2 signal intensity, showing unmyelinated cerebellar white matter. The MRI at 3 years and 1 month of age demonstrated marked dilatation of the posterior and inferior horns of the lateral ventricles and severe volume reduction of whole hemispheric gray and white matter, which was most dominant in the frontal lobes, whereas the volumes of bilateral basal ganglia, thalamus, and infratentorial structures were relatively preserved. The patient's EEG at 4 months of age and 3 years and 1 month of age demonstrated almost continuous spikes in the mid-frontal to right frontal regions. ABR and VEP were normal.

Discussion

There have been only 3 reports describing patients with microcephaly with simplified gyri and enlarged extraaxial space [1,2,8]. None of these reports included repeat MRI studies. As in the previous reports, our patients suggested an autosomal recessive trait of inheritance. Alternatively, an autosomal dominant or X-linked dominant inheritance with gonadal mosaicism is also possible. The genes responsible for microcephaly with simplified gyri only have been identified as *MCPH1*, *ASPM*, *CDK5RAP2*, *CENPJ*, and *WDR62* [1,9]. However, it is not clear whether microcephaly with simplified gyri and enlarged extraaxial space with this phenotypic presentation can be explained by different mutation patterns of the already identified genes or whether it represents a distinct disease entity caused by still unknown genes. The extraaxial space enlargement described previously was less severe as compared to the present cases [1]. Dysmorphic features as observed in the present patients have not been described previously, although multiple anomalies, eye defects and jejunal atresia have been reported in patients with microcephaly with simplified gyri [1]. It remains to be clarified whether those phenotypic and neuroradiological features suggest distinctive clinical entity. Moreover, there may be overlap in the MRI findings between patients with microcephaly with simplified gyri and enlarged extraaxial space and those with microcephaly with simplified gyri and both enlarged extraaxial space

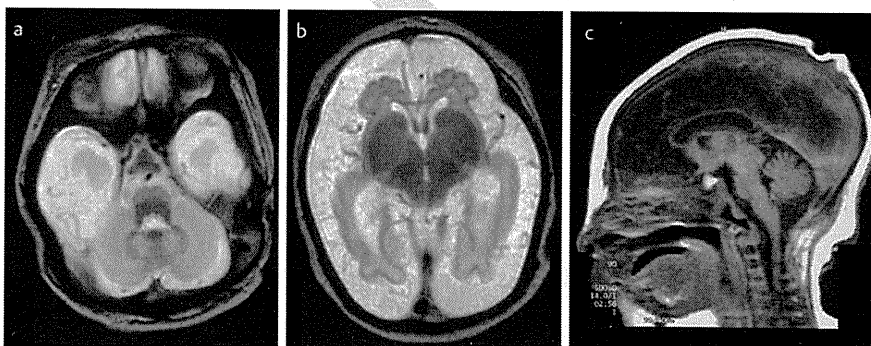


Fig. 1 Brain MRI of older sister at age of day 0. The MRI (a and b: T_2 -weighted image [TR 4000, TE 132], c: T_1 -weighted image [TR 500, TE 14.0]) showing hypoplasia of bilateral cerebral hemispheres with enlarged extraaxial space, a simplified gyral pattern without a thickened cortex, hypoplastic corpus callosum, and a mildly flattened brain stem.

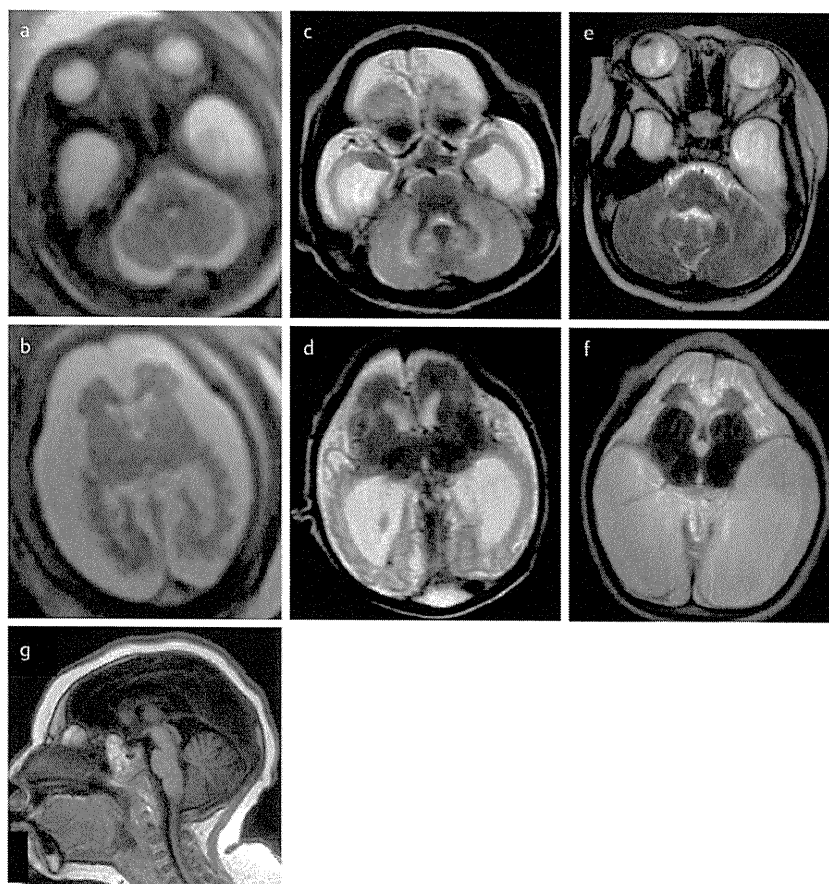


Fig. 2 Brain MRI with T₂-weighted images [TR 4500, TE 90] (a–f) and T₁-weighted images [TR 500, TE 14.0] (g) of the younger sister at 30 weeks gestational age (a, b), day 0 (c, d), and 3 years and 1 month of age (e–g). The MRI at 30 weeks gestational age and day 0 (a–d) revealed hypoplasia of bilateral cerebral hemispheres, particularly in the frontal regions, with enlarged extraaxial space, a simplified gyral pattern without thickened cortex, and enlarged lateral ventricles, especially in the posterior and temporal horns, with a reduction in the surrounding white matter. There was no change in the findings between GA 30 weeks and day 0. High signal intensity was observed in the lateral sides of the dentate nucleus (c). The MRI at 3 years and 1 month of age (e–g) demonstrated progressive dilatation of the posterior and inferior horns of the lateral ventricles, with a volume reduction in the surrounding hemispheric structures, especially in the frontal lobe. Some extent of myelination in the cerebellar hemisphere was observed (e). The size of the basal ganglia and thalamus, as well as of the infratentorial structures, was relatively preserved (g).

and pontocerebellar hypoplasia, because the older sister in our study had a mildly flattened brain stem at age of day 0. On the other hand, pontocerebellar hypoplasia may be the result of extensive cerebral pathology, as seen in the pontocerebellar hypoplasia in preterm infants [7].

A striking finding in these patients was progressive atrophy of the cerebral gray and white matter, with enlarged lateral ventricles, which was evident in the younger sister. Neurodegenerative processes such as accelerated apoptosis may be estimated from the MRI findings described in this report and the clinical deterioration observed in the younger sister. Basel-Vanagaite and Dobyns also described a rapid decrease in OFC postnatally in the subgroup of patients without congenital microcephaly but with enlarged extraaxial space [1]. Similar progressive changes in the cerebrum have also been reported in a patient most likely categorized as microcephaly with simplified gyri and pontocerebellar hypoplasia [4].

In spite of remarkable volume reductions in cerebral hemisphere cortices and white matter, the size of the bilateral basal ganglia, thalamus, and infratentorial structures was relatively preserved in these cases. As a cortical ribbon was formed and periventricular nodular heterotopia or band heterotopia was not observed, migration of cortical neurons from the ventricular zone may not be involved, but the proliferation process of neuronal and glial cells in the ventricular zone may be altered. On the other hand, the proliferation of neuronal cells in the lateral ganglionic eminence that generates the striatum and in the medial ganglionic eminence that mostly generates the globus pallidus and septum [3,6] may not be involved, although tangential migration of cortical GABAergic interneurons from the ganglionic eminence may have been altered [5].

In conclusion, it is believed that the genes responsible for microcephaly with simplified gyri and enlarged extraaxial space are involved in the neuronal and glial proliferation in the ventricular zone as well as in tangential neuronal migration. Moreover, the nature of progressive degeneration of the hemispheric structures should be clarified in the near future.

Affiliations

¹Department of Pediatrics, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

²Department of Pediatric Neurology, Takuto Rehabilitation Center for Children, Sendai, Japan

³Department of Nursing, Yamagata University Faculty of Medicine, Yamagata, Japan

⁴Ishinomaki Red Cross Hospital, Ishinomaki, Japan

⁵Department of Pediatrics, Yamagata University Faculty of Medicine, Yamagata, Japan

⁶Tokyo Women's Medical University Institute for Integrated Medical Sciences, Tokyo, Japan

References

- 1 Basel-Vanagaite L, Dobyns WB. Clinical and brain imaging heterogeneity of severe microcephaly. *Pediatr Neurol* 2010; 43: 7–16
- 2 Basel-Vanagaite L, Marcus N, Klinger G et al. New syndrome of simplified gyral pattern, micromelia, dysmorphic features and early death. *Am J Med Genet A* 2003; 119: 200–206
- 3 Deacon TW, Pakzaban P, Isacson O. The lateral ganglionic eminence is the origin of cells committed to striatal phenotypes: neural transplantation and developmental evidence. *Brain Res* 1994; 668: 211–219
- 4 Kure-Kageyama H, Saito Y, Maegaki Y et al. A patient with simplified gyral pattern followed by progressive brain atrophy. *Brain Dev* 2007; 29: 383–386
- 5 Letinic K, Zoncu R, Rakic P. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature* 2002; 417: 645–649

- 6 Olsson M, Campbell K, Wictorin K *et al*. Projection neurons in fetal striatal transplants are predominantly derived from the lateral ganglionic eminence. *Neuroscience* 1995; 69: 1169–1182
- 7 Srinivasan L, Allsop J, Counsell SJ *et al*. Smaller cerebellar volumes in very preterm infants at term-equivalent age are associated with the presence of supratentorial lesions. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006; 27: 573–579
- 8 Woods CG, Bond J, Enard W. Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 717–728
- 9 Yu TW, Mochida GH, Tischfield DJ *et al*. Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture. *Nat Genet* 2010; 42: 1015–1020



神経系におけるiPS細胞 iPS細胞の活用も含めた神経機能修復の現状と将来

iPS細胞の小児神経疾患の 病態解析への応用

しもじまけいこ 1, 2), やまもととしゆき 2)
下島圭子 1, 2), 山本俊至 2)
1) 科学技術振興機構さきがけ (〒162-0054 東京都新宿区河田町8-1)
E-mail: keiko.shimojima@twmu.ac.jp
2) 東京女子医科大学統合医科学研究所

SUMMARY

小児神経疾患は、未熟な神経細胞が成熟し、分化する過程で起こる障害が原因となる。したがって小児神経疾患患者由来の疾患特異的 iPS 細胞を分化誘導させる際に、最も初期の段階から何らかの所見として現れるということが期待される。患者の脳の中で起こっている病態は、これまで MRI などの画像診断などから間接的に解析するしか方法がなかったが、患者由来 iPS 細胞を利用すれば、直接的に病態を解析することができる可能性が広がっている。さらに、その病態に対して、直接的に薬の投与を行うなどして、効率よく、患者への負担なしに治療研究を行うことが期待される。そのためには、まず、iPS 細胞を効率的に神経細胞に分化誘導し、さまざまな疾患の病態解析ができる系を確立する必要がある。

はじめに

ヒト iPS 細胞は京都大学の山中教授らが、再生医療を目指した研究により確立することができた世界に誇る成果であるが、そのポテンシャルから、患者から直接バイオプシーできないような組織の病態解析への応用研究も期待されている。我々は、患者の病変部位からのバイオプシーによる解析が最も期待できない小児の脳神経疾患の病態解析のために疾患 iPS 細胞を使用することを目指して研究を行っている。本稿では、この領域における世界の研究の現状と、わが研究室における取組みを紹介したい。

小児神経疾患とは

出生してくる新生児においては、およそ 1% において何らかの障害が認められる。その主な原因となる小児神経疾患は大きく分けて周産期の分娩時障害に起因するものと、先天的な遺伝的要因によって発生するものに分類される。分娩時障害に起因する脳性麻痺は妊娠管理の向上や、早産児に対する肺サーファクタント投与の開始、人工呼吸器の発展、それに伴う呼吸循環管理の向上により多くが防げるようになってきた¹⁾。一方、先天的・遺伝的要因によって発生する先天異常も分子生物学的解析法の進歩により、多くの原因が明

KEY WORDS

小児神経疾患
ゲノムコピー数異常
アレイ CGH
病態解析
iPS 細胞

らかになりつつある。

同じ神経系の障害による疾患といえども、成人期以降のアルツハイマー病やパーキンソン病は、一度発達が完成し、正常な社会生活を送ることができるまでに機能が成熟した神経細胞系が、老化や酸化ストレスなどの影響により、変性し、次第に機能を喪失していくことによって発症するのに対して、小児期の先天的・遺伝的要因による神経系疾患は、発達過程の要因により、神経細胞系が正常に発達し、成熟した機能を獲得することができなくなるために引き起こされる点で大きく異なる。受精卵であるたった1個の細胞が、母体の子宮内で細胞分裂を繰り返し、出生に至るまでに多くの臓器が形成されるが、その間に多くの遺伝子が器官形成に関わっている。特に脳はヒトにおいて最も高度かつ複雑に発達しており、非常に多くの遺伝子が器官形成期に関わっているが、徐々にそのメカニズムが明らかにされつつある。

▶ 小児神経疾患とゲノムコピー数異常

先天性の小児神経疾患の多くは、脳の器官形成期に重要な働きを示す遺伝子の障害によるものと考えられるが、非常に多くの遺伝子が器官形成に関わっているため、多くの疾患単位に分類され、しかもそのどれもが非常に稀である。それらの多くの原因遺伝子が、この十数年における著しい分子生物学的解析方法の発展により明らかにされてきた。我々はこの数年来、主にマイクロアレイ comparative genomic hybridization (aCGH) を用いた解析により、原因不明の小児神経疾患患者において多くの微細なゲノムコピー数異常 (copy number variation: CNV) を見出してきた。1-Mb 以上の比較的大きな染色体領域の CNV であって、両親には認められない、いわゆる de novo の CNV の多くは病的変異であり、その CNV が疾患原因となっていることに疑いが無い。これらは pathogenic CNV と呼ばれる。しかし aCGH で認められる CNV 所見には、過去に報告がない非常に微細なものもあり、その CNV が真に pathogenic であるかどうかを判断することが困難な場合もある。この場合、CNV 領域内に含まれる遺伝子の量的変化によって患者の phenotype を説明し得るかどうかは、pathogenic

CNV かどうかを判断するために重要な情報となる。

我々は、難治性てんかんに精神発達遅滞を合併した患者において、過去にほとんど報告のない14番染色体の微細欠失を見出した²⁾。Database 検索によると、この CNV 領域において、脳で高発現を示す遺伝子は *TULIP1* のみであった。そこで、ゼブラフィッシュのヒト *TULIP1* ホモログをモルフォリノによりノックダウンさせて phenotype を観察すると、脳の形成障害を示したため、*TULIP1* のハプロ不全が、患者における神経症状の原因であるということが示された。同様にして、*GABARAP* や *YWHAG* のハプロ不全が神経症状の原因となることを明らかにしてきた^{3, 4)}。しかし、このゼブラフィッシュを用いる手法には自ずと限界がある。モルフォリノによりノックダウンは当然ハプロ不全などによる遺伝子機能喪失のモデルであり、染色体トリソミーや微細なゲノム領域の重複などで遺伝子発現が亢進していることが予測されるモデルには用いることができない。また、ゼブラフィッシュにおいてはターゲットとするヒトホモログが存在しないこともあり、その場合はゼブラフィッシュそのものが実験動物モデル足り得ない。ノックアウトマウスでも同様の問題があり得る。ヒトにおいてはハプロ不全で症状を発症する遺伝子であっても、ヘテロ欠失マウスで無症状であり、ホモ欠失させると lethal となり病態を解析できない遺伝子は多く存在する。

▶ 小児神経疾患と疾患 iPS 細胞

そこで、このような場合の病態解析手法として我々が注目したのが疾患 iPS 細胞である。疾患患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、神経系細胞に分化誘導することにより患者の病態を *in vitro* で解析しようとするものである。実験動物による解析では生物種の違いから忠実に病態を再現できない場合があるのに比べ、疾患患者由来 iPS 細胞を利用する手法の優れているところは、患者から直接得ることが不可能な脳などの臓器の細胞の病態を解析できることであり、疾患のよりナチュラルな病態を再現することが可能であるということである。現在、分子細胞生物学的に疾患原因となる異常を特定することができた患者から皮膚線維芽細胞を採取し、順次 iPS 細胞を樹立している。

iPS 細胞の樹立は京都大学の山中教授らが確立したいわゆる山中 4 因子をレトロウイルスで導入する方法を用いている。樹立できた iPS 細胞について最低 50 個のコロニーを選択し、多能性因子の発現、外来性 4 因子のサイレンシングなどを検閲し、最低 3 コロニーを以後の病態解析に用いるという系を確立した。現在複数の疾患 iPS 細胞について、神経系への分化誘導による病態解析を行っている。

神経細胞遊走障害による脳形成障害

神経細胞は胎児期の発生の段階において、脳室周囲の神経堤から大脳皮質に向かって段階的に遊走し、最終的に皮質 6 層構造が形成される (図 1)。その後、皮質における水平方向への遊走により皮質構造が完成するといわれている。この大脳皮質の形成には非常に多くの遺伝子が、時間的・空間的变化に応じて関わっていることが明らかになってきた。

このうち 17 番染色体短腕末端のサブテロメア領域に存在する *LIS1* は、ヘテロの機能喪失により神経細胞の遊走障害をきたし、そのために脳溝が形成されず、脳回形成不全、ないし滑脳症といわれる脳回無形成の状態を示す (図 2)。患者は重度の発達遅滞を

示し、難治性てんかんを生じる。17p テロメア末端から *LIS1* 領域までが欠失した場合には、滑脳症以外にも顔貌異常を示し、この状態は Miller-Dieker 症候群と呼ばれる。これは隣接する他の遺伝子の影響による隣接遺伝子症候群として理解される。滑脳症そのものは *LIS1* 以外の遺伝子の関与も明らかになっており、*Reelin* や *DCX*, *ARX* といった多くの神経細胞遊走因子が関与している。*LIS1* の genotype はさまざまで、*LIS1* の翻訳領域のミスセンス変異やナンセンス変異、微細欠失、エクソンレベルの重複など実にさまざまである。我々は、従来の解析では異常が認められなかった滑脳症患者において、aCGH による網羅的なゲノムコピー数解析により、*LIS1* 領域の微細欠失を明らかにした⁹⁾。さらに重度の精神運動発達遅滞を伴う難治性てんかん患者において、*LIS1* 領域の 3 重複を世界に先駆けて明らかにした (図 3)⁹⁾。この患者においては、滑脳症のような脳回の形成障害は認められなかったものの、大脳の全体的な脳容量低下とそれに伴う脳室拡大が認められた。従って、*LIS1* はコピー数の減少により、滑脳症という脳形成障害を示す一方、コピー数増加の場合は脳容量低下という別の phenotype を示すということで、このことは我々に非常に示唆に富む教唆を与えている。つまりゲノムのコピー数に感受

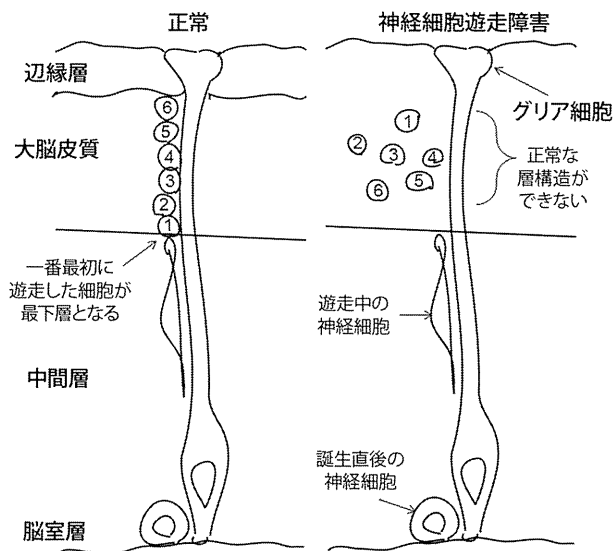


図 1 神経細胞遊走障害のイメージ

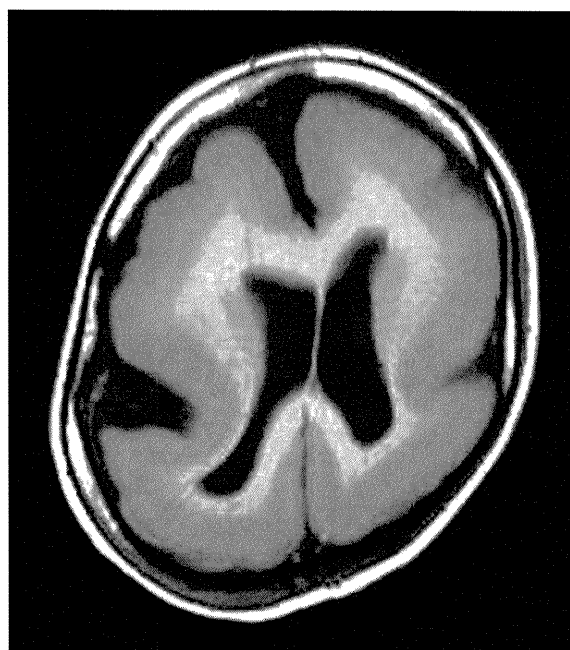


図 2 滑脳症を示す MRI 画像

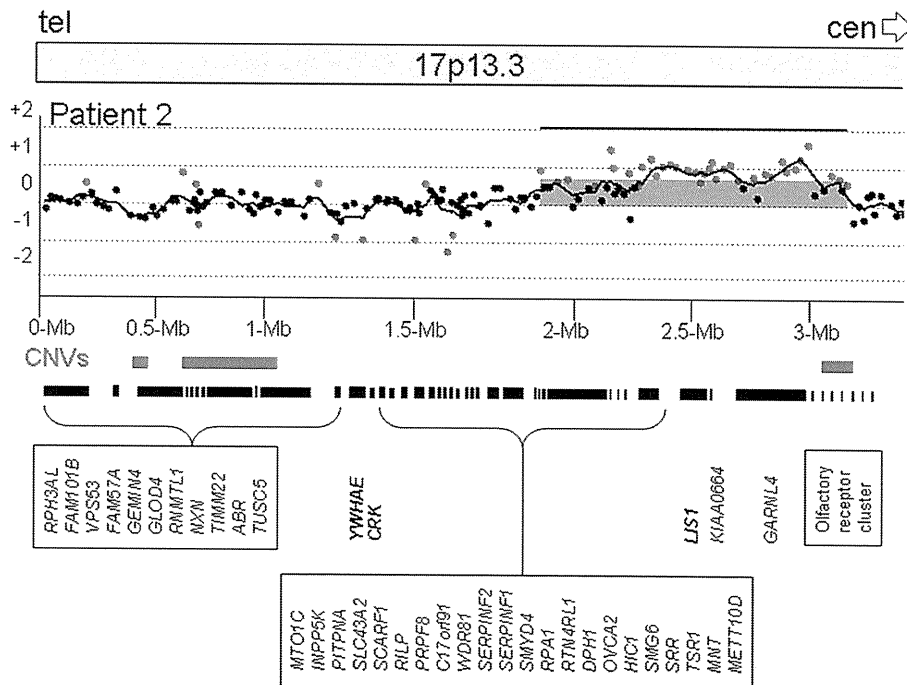


図3 LIS1 領域のゲノムコピー数異常

性を示す遺伝子は、ゲノムコピー数の loss でも gain でも phenotype に重要な影響を与えるということである。

LIS1 の機能は、ノックアウトマウスによりかなり研究が進んでおり、*LIS1* の極性に関連した働きは微小管に関連した dynein などの運動タンパクを制御することによって行われていることが明らかである。我々は、このことを逆に *LIS1* 欠失を示す患者から樹立した疾患 iPS 細胞で確認することを目指している。この系が確立できれば、他の小児神経疾患における病態解析に応用できると考えるからである。

▶ ダウン症候群と DYRK1A

ダウン症候群は最も頻度の高い先天異常症候群であり、出生 1000 対 1 の割合で発生する。ほとんどの場合、生殖細胞における染色体の不分離による 21 番染色体のトリソミーを示す。特異顔貌や筋緊張低下を認め、比較的重度の精神運動発達遅滞を示す。また、先天性心疾患や消化器、感覚器における合併症を示すことがあり、医学的な管理を要する。ダウン症候群患者

の剖検脳における研究により、大脳皮質 6 層構造の形成が乱れ、神経細胞の樹状突起の形成が粗であることが明らかになっており、このことが臨床的な知的障害の原因となっていると考えられている。ダウン症候群では、成人期以降、急激にアルツハイマー様の退行現象を示すことがある。剖検脳では、アルツハイマー患者において観察される所見と同様に、老人斑やアミロイドの蓄積が認められる。このことから、アルツハイマーの原因が 21 番染色体と関連しているのではないかという説もある。

ダウン症候群の研究に関連して、これまでに多くのマウスモデルが作成されてきた。この目的のため、ヒト 21 番染色体に対応するマウスの 11 番染色体をさまざまなサイズで人工的にトリソミー状態として表現型を調べた研究がある。それらの研究によると、ヒト 21 番染色体の中でも、比較的長腕末端に近い領域でダウン症候群類似の phenotype を示すことから、この領域がダウン症候群責任領域 (down syndrome critical region: DSCR) とされてきた。

我々は先に示した aCGH 解析により、この DSCR 領域の微細欠失を示す患者を明らかにした (図 4)⁶⁾。

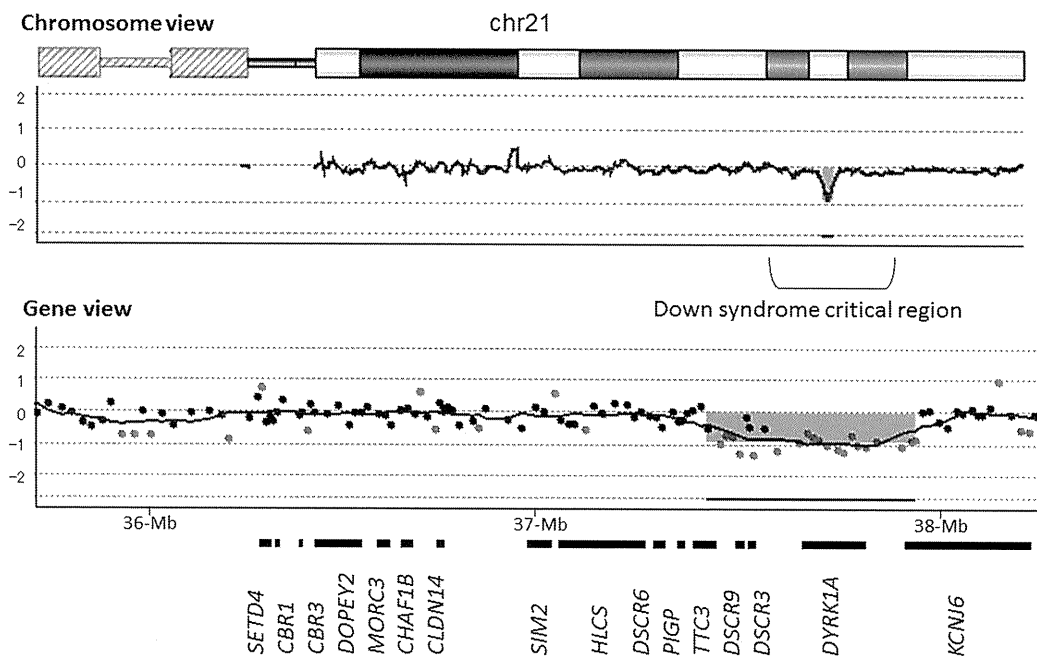


図4 DYRK1A 領域の微細欠失

患者は知的障害とてんかんを主な症状とし、やや特徴的な顔貌を示していた。aCGH で明らかになった微細欠失の範囲内には、*KCDJ6* と *DYRK1A* の2つが phenotype に影響を与える主な遺伝子と考えられた。過去にも *DYRK1A* の転座による disruption の報告例があり、知的障害と特徴的な顔貌が共通していたため、*DYRK1A* がこの患者の phenotype に最も影響を与えていると考えられた。実際、*DYRK1A* はさまざまな基質をリン酸化するセリンスレオニンキナーゼであり、神経細胞の発生や分化に係わり、学習や記憶に関連していると考えられている。我々は、前項の *LIS1* 同様、この *DYRK1A* は phenotype がゲノムコピー数に依存している可能性があり、gain ではダウン症候群における知的障害、loss でも知的障害に関連しているのではないかと考えている。

▶ 新規染色体異常と生物種による違い

我々は aCGH によって過去に報告のない 5q31 の微細欠失を見出し、この染色体異常が新たな疾患単位を示すということを明らかにした⁷⁾。この染色

体領域には、プロトカドヘリン (protocadherin: *PCDH*) という、脳形成にとって非常に重要な働きを示す遺伝子のクラスターが存在する。この遺伝子は、immunoglobulin スーパーファミリーのように、クラスターを形成しており、いくつものアイソフォームが存在し、多様性を発揮していると考えられている。興味深いことに、この *PCDH* はマウスにおいて、神経細胞ごとにどちらかの allele が hemiallelic expression を示していることも示されている。しかし、実際には、この *PCDH* をノックアウトしたマウスのヘテロ接合体は何の症状も示さない。

ヒトにおいてはヘミ接合で発症する疾患はいくつかもあり、Sotos 症候群もその例である。Sotos 症候群は 5q35 領域にある *NSD1* を含む領域の微細欠失によって引き起こされるが、この *NSD1* の領域は low copy repeat (LCR) に挟まれており、LCR を介する非相同組換 (non-allelic homologous recombination: NAHR) による突然変異が原因である。このヒト *NSD1* のホモログをヘテロ欠失させたノックアウトマウスは何の症状も示さない。これは生物種による違いが原因である。

このようにマウスなどの動物実験で見られる生物種の違いを克服するツールとして、ヒト疾患患者由来 iPS 細胞の病態解析への応用が期待されている。

▶ ヒト疾患患者由来 iPS 細胞を利用した病態解析の成果

海外からは、すでにヒト疾患患者由来 iPS 細胞を利用した神経疾患の病態解析の成果が少しずつ発表されつつある。

最初に公開されたのは Chamberlain らによる Angelmann 症候群と Prader-Willi 症候群の疾患患者由来 iPS 細胞である⁸⁾。Angelman 症候群と Prader-Willi 症候群は最も有名なゲノム刷り込み機構に伴う疾患である。共に 15q11.2 領域の欠失により生じるが、Angelman 症候群は母方由来アレルの欠失が、Prader-Willi 症候群は父方アレルの欠失で生じる。その理由は、この領域の *SNRPN* は父方アレルのみで発現しており、*UBE3A* は母方アレルのみで発現しているため、欠失の起源により異なった症状をきたすのである。ゲノム刷り込みは臓器ごとに異なっており、特に *UBE3A* は脳において特に刷り込みが強いことが知られている。Chamberlain らは Angelmann 症候群と Prader-Willi 症候群の疾患患者由来 iPS 細胞を神経系に分化誘導させ遺伝子発現の状態を解析した⁸⁾。その結果、iPS 細胞誘導によってゲノムが初期化されているにも関わらず、ゲノム刷り込み機構は維持されていることを明らかにした。今後は同様の手法で神経細胞への分化誘導と、それによる病態解析が進んでいくことが期待される。

▶ 今後の展望

小児神経疾患は、未熟な神経細胞が成熟し、分化する過程で起こる障害が原因となる。したがって小児神経疾患患者由来の疾患特異的 iPS 細胞を分化誘導させる際に、最も初期の段階から何らかの所見として現れ

るということが期待される。患者の脳の中で起こっている病態は、これまで MRI などの画像診断などから間接的に解析するしか方法がなかったが、患者由来 iPS 細胞を利用すれば、直接的に病態を解析することができる可能性が広がっている。さらに、その病態に対して、直接的に薬の投与を行うなどして、効率よく、患者への負担なしに治療研究を行うことができるかも知れない。そのためには、まず、iPS 細胞を効率的に神経細胞に分化誘導し、さまざまな疾患の病態解析ができる系を確立する必要がある。このことを目指して、我々はすでに動物実験などで病態に関する知見が多く蓄積している *LIS1* 欠失による滑脳症やダウン症候群などをモデルとして取り組んでいるところである。

参考文献

- 1) 高橋尚人：小児医療の進歩と展望 新生児医療の進歩と展望. 小児科診療 71 : 2029-2033, 2008.
- 2) Shimojima K, et al : TULIP1 (RALGAP1) haploinsufficiency with brain development delay. *Genomics* 94 : 414-422, 2009.
- 3) Komoike Y, et al : A functional analysis of GABARAP on 17p13.1 by knockdown zebrafish. *J Hum Genet* 55 : 155-162, 2010.
- 4) Komoike Y, et al : Zebrafish gene knockdowns imply roles for human YWHAG in infantile spasms and cardiomegaly. *Genesis* 48 : 233-243, 2010.
- 5) Shimojima K, et al : Genomic copy number variations at 17p13.3 and epileptogenesis. *Epilepsy Res* 89 : 303-309, 2010.
- 6) Yamamoto T, et al : Clinical manifestations of the deletion of Down syndrome critical region including *DYRK1A* and *KCNJ6*. *Am J Med Genet* 155A : 113-119, 2011.
- 7) Shimojima K, et al : A new microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination. *Am J Med Genet* 155 : 732-736, 2011.
- 8) Chamberlain SJ, et al : Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 : 17668-17673, 2010.

