

1. アスコルビン酸

アスコルビン酸は前述の CMT1A の原因の *PMP22* の遺伝子発現量を下げる機序により、CMT1A モデルマウスに対するアスコルビン酸投与は有効であったとの報告がある⁴⁴⁾。海外で小規模臨床試験も行われたがいずれもエビデンスを得るには至らなかった⁴⁵⁻⁴⁷⁾。本邦においても厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「難治性ニューロパチーの病態に基づく新規治療法の開発に関する研究」研究班で臨床試験が行われたが、残念ながら有効性を確認するには至っていない。しかし、握力や一部の指標に改善傾向がみられたため、今後、治療評価項目の検討を行い、さらに研究が発展する可能性はある。

2. クルクミン (curcumin)

ウコンに含まれる天然色素成分であるクルクミンは *PMP22* 変異による dominant negative effect を減少させると考えられている。クルクミンは変異 *PMP22* 蛋白を小胞体 (endoplasmic reticulum: ER) に停滞させ、ER ストレス性アポトーシスを誘発させる。同様の事象は *MPZ* 変異による CMT でも同様であり、さまざまな CMT に有効である可能性を秘めている。CMT1A マウスを用いた動物実験では運動機能が改善している⁴⁸⁾。

3. NT-3

神経栄養因子である NT-3 により Schwann 細胞増加や軸索再生が得られることから、CMT に対する治療の有効性が期待される。今後、大規模で長期間の randomized control study が必要である。

4. プロゲステロン拮抗薬

プロゲステロンは Schwann 細胞や神経細胞で産生され、*PMP22* や *MPZ* などミエリン構成蛋白の発現に必要である。プロゲステロン拮抗薬が CMT1A モデルラットにおいて脱髄による軸索減少を改善させると報告されている⁴⁹⁾。

しかし、このラット実験に使用したプロゲステロン拮抗薬は肝毒性のためヒトには使用できない。安全性の高いプロゲステロン拮抗薬の開発が待たれるところである。

おわりに

遺伝性ニューロパチーの原因は、ミエリン構成蛋白の異常から DNA 修復機能の障害、ミトコンドリア関連、tRNA 合成酵素など多様である。それゆえ、根治的で、

包括的な治療は容易ではなく、それぞれ原因別に対応する必要がある。CMT の約 50% を占める CMT1A においても有効な治療法がなく、今後、研究が進展し、遺伝子異常に応じた治療法の早期開発が期待される。

文 献

- 1) Roa BB, Garcia CA, Lupski JR: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: molecular mechanisms of gene dosage and point mutation underlying a common inherited peripheral neuropathy. *Int J Neurol* 25-26: 97-107, 1991-1992
- 2) Boerkoel CF, Takashima H, Garcia CA, Olney RK, Johnson J, et al: Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol* 51: 190-201, 2002
- 3) Szigeti K, Nelis E, Lupski JR: Molecular diagnostics of Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *Neuromolecular Med* 8: 243-254, 2006
- 4) Chance PF, Alderson MK, Leppig KA, Lensch MW, Matsunami N, et al: DNA deletion associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Cell* 72: 143-151, 1993
- 5) Saifi GM, Szigeti K, Snipes GJ, Garcia CA, Lupski JR: Molecular mechanisms, diagnosis, and rational approaches to management of and therapy for Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *J Investig Med* 51: 261-283, 2003
- 6) Hayasaka K, Himoro M, Sato W, Takada G, Uyemura K, et al: Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nat Genet* 5: 31-34, 1993
- 7) Guilbot A, Williams A, Ravisé N, Verny C, Brice A, et al: A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet* 10: 415-421, 2001
- 8) Takashima H, Boerkoel CF, De Jonghe P, Ceuterick C, Martin JJ, et al: Periaxin mutations cause a broad spectrum of demyelinating neuropathies. *Ann Neurol* 51: 709-715, 2002
- 9) Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, et al: Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science* 262: 2039-2042, 1993
- 10) Nakagawa M, Takashima H, Umehara F, Arimura K, Miyashita F, et al: Clinical phenotype in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease with an entire deletion of the connexin 32 coding sequence. *J Neurol Sci* 185: 31-37, 2001
- 11) Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M, et

- al: EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron* 30: 355-368, 2001
- 12) Stolt CC, Rehberg S, Ader M, Lommes P, Riethmacher D, et al: Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes Dev* 16: 165-170, 2002
 - 13) Berger P, Bonneick S, Willi S, Wymann M, Suter U: Loss of phosphatase activity in myotubularin-related protein 2 is associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 4B1. *Hum Mol Genet* 11: 1569-1579, 2002
 - 14) Senderek J, Bergmann C, Weber S, Ketelsen UP, Schorle H, et al: Mutation of the SBF2 gene, encoding a novel member of the myotubularin family, in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 4B2/11p15. *Hum Mol Genet* 12: 349-356, 2003
 - 15) Zuchner S, Nouredine M, Kennerson M, Verhoeven K, Claeys K, et al: Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet* 37: 289-294, 2005
 - 16) Verhoeven K, De Jonghe P, Coen K, Verpoorten N, Auer-Grumbach M, et al: Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet* 72: 722-727, 2003
 - 17) Street VA, Bennett CL, Goldy JD, Shirk AJ, Kleopa KA, et al: Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth disease 1C. *Neurology* 60: 22-26, 2003
 - 18) Senderek J, Bergmann C, Stendel C, Kirfel J, Verpoorten N, et al: Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy. *Am J Hum Genet* 73: 1106-1119, 2003
 - 19) Chow CY, Zhang Y, Dowling JJ, Jin N, Adamska M, et al: Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature* 448: 68-72, 2007
 - 20) Delague V, Jacquier A, Hamadouche T, Poitelon Y, Baudot C, et al: Mutations in FGD4 encoding the Rho GDP/GTP exchange factor FRABIN cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4H. *Am J Hum Genet* 81: 1-16, 2007
 - 21) Kalaydjieva L, Gresham D, Gooding R, Heather L, Baas F, et al: N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Am J Hum Genet* 67: 47-58, 2000
 - 22) Umehara F, Tate G, Itoh K, Yamaguchi N, Douchi T, et al: A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46, XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. *Am J Hum Genet* 67: 1302-1305, 2000
 - 23) De Jonghe P, Mersivanova I, Nelis E, Del Favero J, Martin JJ, et al: Further evidence that neurofilament light chain gene mutations can cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Ann Neurol* 49: 245-249, 2001
 - 24) Jordanova A, De Jonghe P, Boerkoel CF, Takashima H, De Vriendt E, et al: Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* 126: 590-597, 2003
 - 25) Evgrafov OV, Mersivanova I, Irobi J, Van Den Bosch L, Dierick I, et al: Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet* 36: 602-606, 2004
 - 26) Tang BS, Zhao GH, Luo W, Xia K, Cai F, et al: Small heat-shock protein 22 mutated in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2L. *Hum Genet* 116: 222-224, 2005
 - 27) Bomont P, Cavalier L, Blondeau F, Ben Hamida C, Belal S, et al: The gene encoding gigaxonin, a new member of the cytoskeletal BTB/kelch repeat family, is mutated in giant axonal neuropathy. *Nat Genet* 26: 370-374, 2000
 - 28) Züchner S, Mersivanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, et al: Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36: 449-451, 2004
 - 29) Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, Stajich JE, Hulette C, et al: Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 30: 21-22, 2002
 - 30) Hantke J, Chandler D, King R, Wanders RJ, Angelicheva D, et al: A mutation in an alternative untranslated exon of hexokinase 1 associated with hereditary motor and sensory neuropathy — Russe (HMSNR). *Eur J Hum Genet* 17: 1606-1614, 2009
 - 31) Takashima H, Boerkoel CF, John J, Saifi GM, Salih MA, et al: Mutation of TDPI, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet* 32: 267-272, 2002
 - 32) Moreira MC, Barbot C, Tachi N, Kozuka N, Uchida E, et al: The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet* 29: 189-193, 2001
 - 33) Sano Y, Date H, Igarashi S, Onodera O, Oyake M, et al: Aprataxin, the causative protein for EAOH is a nuclear protein with a potential role as a DNA repair protein. *Ann Neurol* 55: 241-249, 2004
 - 34) Moreira MC, Klur S, Watanabe M, Németh AH, Le Ber I, et al: Senataxin, the ortholog of a yeast RNA

- helicase, is mutant in ataxia-ocular apraxia 2. *Nat Genet* 36: 225-227, 2004
- 35) Chen YZ, Bennett CL, Huynh HM, Blair IP, Puls I, et al: DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4). *Am J Hum Genet* 74: 1128-1135, 2004
- 36) De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat JM, Tazir M, et al: Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* 70: 726-736, 2002
- 37) Kim HJ, Sohn KM, Shy ME, Krajewski KM, Hwng M, et al: Mutations in PRPS1, which encodes the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase enzyme critical for nucleotide biosynthesis, cause hereditary peripheral neuropathy with hearing loss and optic neuropathy (cmtx5). *Am J Hum Genet* 81: 552-558, 2007
- 38) Leal A, Huehne K, Bauer F, Sticht H, Berger P, et al: Identification of the variant Ala335Val of MED25 as responsible for CMT2B2: molecular data, functional studies of the SH3 recognition motif and correlation between wild-type MED25 and PMP22 RNA levels in CMT1A animal models. *Neurogenetics* 10: 275-287, 2009
- 39) Howard HC, Mount DB, Rochefort D, Byun N, Dupré N, et al: The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet* 32: 384-392, 2002
- 40) Landouré G, Zdebek AA, Martinez TL, Burnett BG, Stanescu HC, et al: Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C. *Nat Genet* 42: 170-174, 2010
- 41) Latour P, Thauvin-Robinet C, Baudalet-Mery C, Soichot P, Cusin V, et al: A major determinant for binding and aminoacylation of tRNA(Ala) in cytoplasmic Alanyl-tRNA synthetase is mutated in dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet* 86: 77-82, 2010
- 42) Sivakumar K, Kyriakides T, Puls I, Nicholson GA, Funalot B, et al: Phenotypic spectrum of disorders associated with glycyI-tRNA synthetase mutations. *Brain* 128: 2304-2314, 2005
- 43) Jordanova A, Irobi J, Thomas FP, Van Dijck P, Meerschaert K, et al: Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nat Genet* 38: 197-202, 2006
- 44) Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, et al: Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* 10: 396-401, 2004
- 45) Micallef J, Attarian S, Dubourg O, Gonnaud PM, Hogrel JY, et al: Effect of ascorbic acid in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 8: 1103-1110, 2009
- 46) Verhamme C, de Haan RJ, Vermeulen M, Baas F, de Visser M, et al: Oral high dose ascorbic acid treatment for one year in young CMT1A patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *BMC Med* 7: 70, 2009
- 47) Toth C: Poor tolerability of high dose ascorbic acid in a population of genetically confirmed adult Charcot-Marie-Tooth 1A patients. *Acta Neurol Scand* 120: 134-138, 2009
- 48) Khajavi M, Shiga K, Wiszniewski W, He F, Shaw CA, et al: Oral curcumin mitigates the clinical and neuropathologic phenotype of the Trembler-J mouse: a potential therapy for inherited neuropathy. *Am J Hum Genet* 81: 438-453, 2007
- 49) Meyer zu Horste G, Prukop T, Liebetanz D, Mobius W, Nave KA, et al: Antiprogestosterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy. *Ann Neurol* 61: 61-72, 2007

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

神経内科ハンドブック 第4版

鑑別診断と治療

編集 水野美邦

●A5 頁1312 2010年
定価14,175円(本体13,500円+税5%)
[ISBN978-4-260-00874-7]

「これ1冊で神経内科臨床がわかる」好評の書、8年ぶりの改訂。神経内科専門医をめざす研修医、若手臨床医必読の神経学的診察法や症候の診かたについては従来どおり懇切丁寧に解説。加えて、脳血管障害や変性疾患をはじめとした各種神経疾患の診断・治療や検査法について最新の知見を盛り込んだことで、前版の読みやすさ、理解しやすさはそのままに、情報量をボリュームアップした。

BRAIN and NERVE 63巻6号 2011年6月

Vincristine exacerbates asymptomatic Charcot–Marie–Tooth disease with a novel *EGR2* mutation

Tomonori Nakamura · Akihiro Hashiguchi ·
Shinsuke Suzuki · Kimiharu Uozumi ·
Shoko Tokunaga · Hiroshi Takashima

Received: 1 November 2011 / Accepted: 9 January 2012 / Published online: 25 January 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract Neurotoxicity is a common side effect of vincristine (VCR) treatment. Severe exacerbations of neuropathy have been reported in patients with Charcot–Marie–Tooth disease (CMT) 1A with duplication of the *peripheral myelin protein 22 (PMP22)* gene. However, whether or not VCR exacerbates neuropathies through mutations in other CMT-associated genes besides *PMP22* duplication has not been well studied. The purpose of this study was to identify mutations in any CMT-associated genes in a patient with hypersensitivity to VCR. We performed clinical, electrophysiological, and genetic examinations of a 23-year-old woman, who was hypersensitive to low-dose VCR, and her healthy mother. DNA analysis was performed using our specially designed resequencing array that simultaneously screens for 28 CMT-associated genes. Electrophysiological studies revealed that the patient and her healthy mother had demyelinating polyneuropathy. Furthermore, they showed the same novel mutation in the *early growth response 2 (EGR2)* gene. Recognizing pre-existing asymptomatic CMT by electrophysiological studies and genetic analysis before VCR treatment allowed us to prevent severe VCR-induced neuropathy.

Keywords Charcot–Marie–Tooth disease · Early growth response 2 · Vincristine-induced neuropathy · DNA chip

Introduction

Vincristine (VCR) is a vinca alkaloid drug that is an essential part of the chemotherapeutic regimens used to treat Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma, acute lymphocytic leukemia, and several types of solid tumors. Neurotoxicity, the most frequently predominant distal axonal sensorimotor neuropathy, is a well-known dose-limiting side effect of VCR [1]. VCR disrupts microtubule functions in axons and inhibits axonal transport by binding and inactivating tubulin, thereby leading to axonal degeneration. VCR-induced neuropathy is usually observed after cumulative doses of 6–8 mg of VCR, and significant toxicity occurs at doses greater than 15–20 mg in neurologically normal individuals [2]. The symptoms of toxicity usually include paresthesia and muscle weakness in the distal extremities. Deep tendon reflexes often diminish or disappear. In most cases, neuropathy gradually improves as VCR is discontinued, but neuropathy can persist in some cases of severe sensorimotor dysfunction. Patients with pre-existing neuropathy are generally at increased risk of developing severe neuropathy after chemotherapy [2, 3]. Charcot–Marie–Tooth disease (CMT), a hereditary motor and sensory neuropathy, is one of the most common types of inherited neuropathies, with a prevalence rate of 1 in 2,500 [4], and it is clinically and genetically heterogeneous [5]. Until date, at least 30 genes are known to be associated with CMT and related inherited neuropathies (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Mutations>). The most common type is CMT1A, which is an autosomal dominant demyelinating neuropathy associated with duplication of the *peripheral*

T. Nakamura · A. Hashiguchi · S. Tokunaga · H. Takashima (✉)
Department of Neurology and Geriatrics, Kagoshima University
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Sakuragaoka 8-35-1,
Kagoshima City, Kagoshima 890-8520, Japan
e-mail: thiroshi@m3.kufm.kagoshima-u.ac.jp

S. Suzuki · K. Uozumi
Department of Hematology and Immunology, Kagoshima
University Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Sakuragaoka 8-35-1,
Kagoshima City, Kagoshima 890-8520, Japan

myelin protein 22 (PMP22) gene. Some anticancer drugs such as vinca alkaloids, platinum agents, taxanes, and thalidomide are potentially toxic to patients with CMT [3, 6]. There are many reports of cases of CMT1A that deteriorated or were revealed after VCR treatment [7–12]. However, whether or not VCR exacerbates neuropathies in other types of CMT besides CMT1A is unclear. There is insufficient data to comment on the neurotoxicity of VCR in less common subtypes of CMT that affect other genes [13–15]. In order to identify the genetic risk of severe VCR-induced neuropathy, we screened for mutations in 28 CMT disease-causing genes using a custom resequencing DNA chip. Our DNA chip can screen 28 genes in 2 days and is relatively cost-effective. Using this chip, we identified a mutation in the *early growth response 2 (EGR2)* gene in a 23-year-old woman with hypersensitivity to low-dose VCR. *EGR2* encodes a transcription factor that regulates the expression of peripheral myelin protein genes [16]. Although the risk of VCR-induced neuropathy in patients with an *EGR2* mutation is unknown, our high-throughput mutation screening method revealed a novel risk of developing drug-induced neuropathy.

Materials and methods

Patient

A 23-year-old woman was referred to our hospital with primary mediastinal large B-cell lymphoma. She presented no subjective clinical symptoms except mediastinal lymphadenopathies and was diagnosed with clinical stage IA (Ann Arbor Classification). At that time, she had not developed any neurological abnormalities. Her family seemed healthy and had no history of inherited or acquired neuropathies. She was treated with chemotherapy following the administration of rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, VCR, and prednisolone (day 1, 750 mg/m² cyclophosphamide, 50 mg/m² adriamycin, 1.4 mg/m² VCR; days 1–5, 100 mg prednisolone; and day 5, 375 mg/m² rituximab). After two courses (total VCR administered, 3.9 mg), she developed muscular weakness and paresthesia with pain in the distal extremities and was hardly able to walk. On day 49, she demonstrated distal predominant muscular weakness and paresthesia on neurological examination. No obvious muscular atrophy or pes cavus was evident. In addition, she had developed areflexia. Her Babinski reflex was negative, and there were no signs of cerebellar or cranial nerve disturbances.

Electrophysiological studies

On day 54, nerve conduction studies were performed using the standard procedure. Skin temperature was maintained above 32°C.

DNA analysis

Genomic DNA was extracted from the peripheral blood leukocytes of the patient using the Genra Puregene Blood Kit (Qiagen, Tokyo, Japan). The purpose-built GeneChip® CustomSeq® Resequencing Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) was designed to screen for CMT and related diseases such as ataxia with oculomotor apraxia type 1, ataxia with oculomotor apraxia type 2, spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy type 1, and hereditary motor neuropathies. The resequencing array was designed to screen for the following 28 genes: *EGR2*, *PMP22*, *myelin protein zero (MPZ)*, *gap junction protein beta 1 (GJB1)*, *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 repeats 2 (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 27 kDa protein 1 (HSPB1)*, *heat shock 22 kDa protein 8 (HSPB8)*, *lamin A/C (LMNA)*, *dynamin 2 (DNM2)*, *tyrosyl-tRNA synthetase (YARS)*, *alanyl-tRNA synthetase (AARS)*, *lysyl-tRNA synthetase (KARS)*, *aprataxin (APTX)*, *senataxin (SETX)*, *tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1)*, *desert hedgehog (DHH)*, *gigaxonin 1 (GANI)*, and *K-Cl cotransporter family 3 (KCC3)*. We designed 363 primer sets to cover all the coding exons and splice sites. The 363 polymerase chain reactions (PCRs) were amplified in 32 multiplex reactions using the Qiagen Multiplex PCR system (Qiagen). Each reaction used 120 ng of genomic DNA, 10 pmol of the primer set, dNTP, and the Qiagen Multiplex PCR reaction mix (Qiagen). We generated each multiplex PCR product using the following conditions: 15 min at 95°C; 42 cycles of amplification (94°C for 30 s, 60°C for 3 min, and 72°C for 1 min 30 s); and 15 min at 68°C. Pooling, DNA fragmentation, labeling, and chip hybridization were performed using the Affymetrix CustomSeq Resequencing protocol instructions. The chips were washed using the Affymetrix fluidics station using the Customseq Resequencing wash protocols. Analysis of microarray data was performed using the GeneChip sequence Analysis Software version 4.0 (Affymetrix).

The mutations detected by our DNA chip method were confirmed by conventional DNA Sanger sequencing. Briefly, we amplified 50 ng of the patient's genomic DNA using primers and the hot start PCR method. Using a presequencing kit (USB, Cleveland, OH), we purified the patient's PCR products detected using our resequencing array method and sequenced them by dye-primer chemistry using an ABI Prism 377 Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). We then aligned the resulting sequences and evaluated the mutations using the Sequencher sequence alignment program (Gene Codes, Ann Arbor, MI).

Results

Electrophysiological studies

The motor nerve conduction studies revealed moderately slow motor nerve conduction velocities (MCV) with reduced compound muscle action potential (CMAP) amplitude in all examined nerves. The sensory nerve conduction studies showed moderately slow sensory nerve conduction velocities (SCV) with slightly reduced sensory nerve action potential (SNAP) amplitude (Table 1). No temporal dispersions or conduction blocks were observed. These results suggest demyelinating polyneuropathy complicated by axonal sensorimotor polyneuropathy. Because the patient showed hypersensitivity to low-dose VCR (total VCR administered, 3.9 mg), we suspected a pre-existing, inherited neuropathy. Furthermore, electrophysiological studies were performed on her healthy, 51-year-old mother. MCV of the mother was slower in the lower extremities than the upper extremities. CMAP amplitudes were within normal limits. Median nerve distal latency was slightly prolonged. SCV was moderately slow, but this finding was uniform in all examined nerves. SNAP amplitudes were moderately reduced in the upper extremities; SNAP amplitude of the sural nerve was at the lower limit of our normal control data. Temporal dispersions, conduction blocks, and entrapment neuropathies were not observed. These results indicate an electrophysiologically mild demyelinating polyneuropathy (Table 1). These findings suggest that this family may have an inherited demyelinating polyneuropathy.

Resequencing analysis of this family and a control study

The DNA chip resequencing analysis detected a novel c.1057 C>G (p.R353G) missense mutation in the *EGR2* gene. In contrast, the analysis was negative for mutations

involving the other 27 CMT or related disease-causing genes. The patient was heterozygous for the c.1057 C>G mutation that substitutes an arginine for glycine at amino acid 353 (p.R353G) in exon 2 of *EGR2* by conceptual translation (Fig. 1a). The mother had the same mutation as the patient (Fig. 1a). We did not observe R353G in 200 control chromosomes or in the 850 chromosomes from 425 patients with inherited neuropathy. In addition, we did not find the R353G mutation in the 1000 Genomes website (<http://browser.1000genomes.org>), which catalogs human genetic variations using 1,197 samples including 300 East Asian (100 Japanese) samples.

Clinical course of the patient

We changed the chemotherapy regimen after we suspected that the patient had CMT. We chose radiotherapy and rituximab for the treatment of B-cell lymphoma. After 2 months, her symptoms had almost recovered, and she walked normally with only mild numbness in her distal lower limbs.

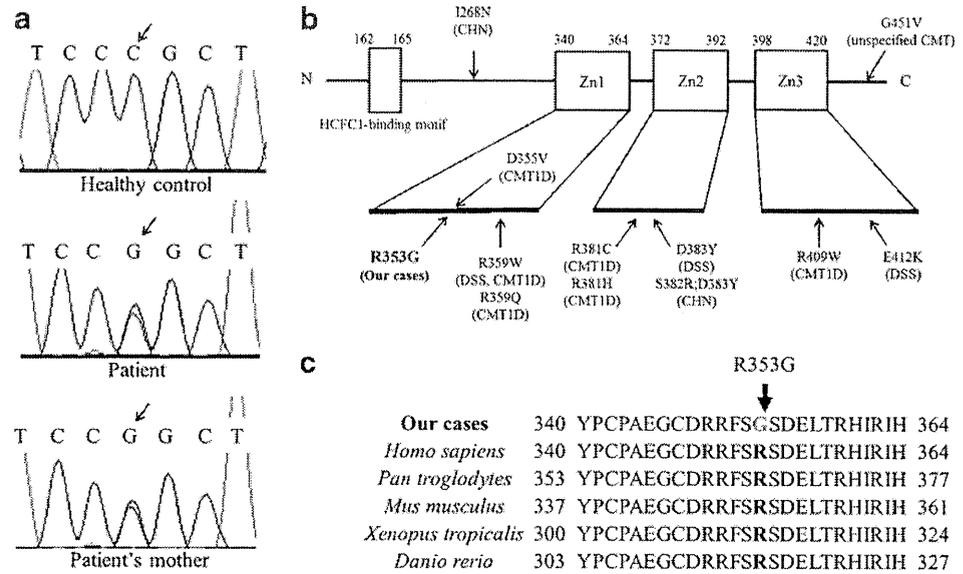
However, it was difficult to trace the causal agent because she was treated with a combination of chemotherapy agents. According to a previous report [3], there is uncertainty about the neurotoxicity of cyclophosphamide, prednisolone, and rituximab in patients with CMT, while VCR is classified as high risk for such patients. Furthermore, she and her mother's electrophysiological findings were consistent with inherited demyelinating polyneuropathy without the presence of conduction block or temporal dispersion. There were no findings indicated other inherited demyelinating polyneuropathy such as disturbance of lipid metabolism, peroxisomal disorders, hepatic porphyria and amyloidosis besides CMT. The results of her laboratory studies, including liver function tests, renal function tests, serum electrolyte and fasting blood glucose were normal. Her mother was healthy in the past periodic medical checkup, but laboratory

Table 1 Results of the nerve conduction studies

	Nerve	DL (ms)	CMAP amplitude (mV)	MCV (m/s)	SNAP amplitude (µV)	SCV (m/s)
Patient	Median	4.3	1.5	26.9	6.7	45.1
	Ulnar	3.9	2.7	31.8	7.3	45.8
	Tibial	8.2	3.9	23.0	–	–
	Sural	–	–	–	4.2	33.3
Patient's mother	Median	5.0	11.2	44.6	3.9	39.7
	Ulnar	3.3	9.1	50.1	3.1	38.7
	Tibial	4.7	23.6	37.9	–	–
	Sural	–	–	–	5.2	37.6
Control	Median	<4.5	>3.1	>49.6	>7.0	>47.2
	Ulnar	<3.6	>6.0	>50.1	>6.9	>46.9
	Tibial	<5.7	>4.4	>41.7	–	–
	Sural	–	–	–	>5.0	>40.8

DL distal latency, *CMAP* compound muscle action potential, *MCV* motor conduction velocity, *SNAP* sensory nerve action potential, *SCV* sensory conduction velocity

Fig. 1 **a** Chromatograms of the alterations in the *early growth response 2 (EGR2)* gene that was identified in the patient and her mother, both of whom had the heterozygous transition c.1057 C>G that resulted in R353G. **b** Schematic diagram of the *EGR2* showing previously reported mutations and the R353G alteration. *CHN* congenital hypomyelination neuropathy, *DSS* Dejerine–Sottas disease, *Zn* zinc-finger domains. **c** Comparison of *EGR2* mutations in different species



screening tests were not examined in this report. We strongly suspected VCR-induced neuropathy in CMT with the *EGR2* mutation.

Discussion

This is the first report to describe an *EGR2* mutation that induced VCR hypersensitivity, similar to *PMP22* duplication. The *EGR2* gene located on human chromosome 10q21.1 has two exons that encode a 476 amino acid protein with three zinc finger domains, which is believed to be a transcription factor that regulates myelinogenesis [17, 18]. *EGR2* knockout mice exhibit severe hypomyelination of peripheral nerves due

to the blocking of Schwann cell differentiation [19, 20]. Heterozygous mutations in *EGR2* cause myelinopathies, including congenital hypomyelinating neuropathy, Dejerine–Sottas disease, and mild to severe CMT1 [21–26]. Until date, 17 types of *EGR2* mutation have been found (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/Mutations>). *EGR2* induces high expression levels of myelin protein components such as *PMP22*, *MPZ*, *DHH*, and *PRX* in Schwann cells [27–30]. Vincristine inhibits axonal transport; thus, an insufficient supply of the myelin protein component necessary for the increased demand created by vincristine may induce a large degree of neurotoxicity. In the present study, we showed a novel R353G mutation in the first zinc finger domain of *EGR2* in a patient with late onset CMT1 who presented with

Table 2 Computational predictions of the pathogenicity on *EGR2* mutation within the zinc finger domain

	Mutation	MUPro (SVM score ^a)	PolyPhen ^b	PolyPhen2 ^c	SIFT ^d
Our patients	R353G	-0.43 ^e	2.57 ^e	0.90 ^e	0.00 ^e
Reported mutations	D355V	1.00	2.75 ^e	0.97 ^e	0.00 ^e
	R359W	-0.64 ^e	2.79 ^e	1.00 ^e	0.00 ^e
	R359Q	-1.00 ^e	1.89 ^e	0.92 ^e	0.00 ^e
	R381C	-0.11 ^e	2.79 ^e	0.99 ^e	0.00 ^e
	R381H	-0.24 ^e	2.12 ^e	0.99 ^e	0.00 ^e
	S382R	0.35	2.06 ^e	0.81 ^e	0.00 ^e
	D383Y	0.09	2.75 ^e	0.99 ^e	0.00 ^e
	R409W	-0.98 ^e	2.69 ^e	1.00 ^e	0.00 ^e
	E412K	-1.00 ^e	1.69 ^e	0.77 ^e	0.00 ^e

^a Support Vector Machine (SVM) scores <0 indicate a decrease in protein stability

^b PolyPhen scores ≥1.5 indicates a prediction of pathogenic

^c PolyPhen2 scores of ~1 indicate a prediction of pathogenic

^d SIFT scores ≤0.05 indicate a prediction of pathogenic

^e Denotes a pathogenic prediction

a very mild phenotypic expression. Most *EGR2* mutations within the first zinc finger domain cause Dejerine–Sottas disease or severe CMT1 phenotypes (Fig. 1b) [22, 24]. A sequence homology search was performed, which aligned protein sequences from multiple species, using a Constraint-based, Multiple-Alignment tool (COBALT) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>). Arginine 353 was conserved among all of the species analyzed (Fig. 1c). It was found that the R353G mutation identified in our patients was located in a remarkably well-conserved sequence of amino acids, suggesting that it may have a potential impact on *EGR2* function. Furthermore, we computationally predicted the effect of the R353G mutation on protein function using the MUpro (<http://www.ics.uci.edu/~baldig/mutation.html>), PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), and SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_seq_submit2.html) algorithms. The algorithms in these programs use evolutionarily conserved species as well as reference sequence alignments, physiochemical differences, and the proximity of various substitutions to predict functional domains and/or structural features. All these programs predicted that the R353G mutation is most likely pathogen-based on the degree of conservation of the affected residues (Table 2). Therefore, the R353G mutation could possibly disrupt various functions. Furthermore, different mutations in the same codon result in divergent CMT phenotypes [26]. The electrophysiological findings were the only abnormal results for the patient's asymptomatic mother with the same *EGR2* mutation. Her neurological findings were normal, including a normal handgrip, the absence of foot deformities, normal and prompt deep tendon reflexes, and normal sensations. It is difficult to diagnose late onset mild CMT based on clinical findings and family history because the disease is heterogeneous. Although we did not perform in vitro functional analysis of the R353G mutation in this study, such further functional studies would illuminate the details of the pathomechanism of the *EGR2* mutation and its relationship with vincristine toxicity in this patient. In order to clarify the pathogenic nature of the *EGR2* mutation and vincristine neurotoxicity, we need to continue the genetic analysis of vincristine-induced neuropathy patients who do not show the CMT phenotype.

VCR-induced neuropathy is a dose-limiting side effect observed in neurologically normal individuals, but it sometimes results in severe neuropathy in patients with CMT. Early recognition of CMT before VCR treatment can prevent severe neurotoxicity. It is very important to use electrophysiological studies to recognize pre-existing CMT before VCR treatment, even if there is no family history or neurological abnormalities. Moreover, the labor and reagent costs of molecular genetic testing have significantly increased along with the increase in the number of genes associated with CMT and related neuropathies that must be

screened for mutations. Realistically, it is difficult to perform nerve conduction studies or genetic testing in all patients who receive chemotherapy because of the costs and effort. Because of recent progress in the development of a new generation of genomic sequencing technologies, it will be possible to screen the entire genome/exome sequence for potential risks in all patients before they undergo chemotherapy.

Acknowledgements We thank the families described in this report for their cooperation. We also thank Ms. A. Yoshimura of Kagoshima University for her excellent technical assistance.

Disclosures This study was supported in part by grants from the Nervous and Mental Disorders and Research Committee for Charcot–Marie–Tooth Disease, Neuropathy, Ataxic Disease and Research on Applying Health Technology of the Japanese Ministry of Health, Welfare and Labor (H.T.). H.T. has received royalty from Athena diagnostics.

References

- Weiss HD, Walker MD, Wiernik PH (1974) Neurotoxicity of commonly used antineoplastic agents (second of two parts). *N Engl J Med* 291:127–133
- Trobaugh-Lotrario AD, Smith AA, Odom LF (2003) Vincristine neurotoxicity in the presence of hereditary neuropathy. *Med Pediatr Oncol* 40:39–43
- Weimer LH, Podwall D (2006) Medication-induced exacerbation of neuropathy in Charcot–Marie–Tooth disease. *J Neurol Sci* 242:47–54
- Birouk N, Gouider R, Le Guern E, Gugenheim M, Tardieu S, Maisonobe T, Le Forestier N, Agid Y, Brice A, Bouche P (1997) Charcot–Marie–Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain* 120:813–823
- Boerkoel CF, Takashima H, Garcia CA, Olney RK, Johnson J, Berry K, Russo P, Kennedy S, Teebi AS, Scavina M, Williams LL, Mancias P, Butler JJ, Krajewski K, Shy M, Lupski JR (2002) Charcot–Marie–Tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype–phenotype correlation. *Ann Neurol* 51:190–201
- Yerushalmi R, Levi I, Wygoda M, Ifergane G, Wirguin I (2007) Are platinum-based chemotherapeutic drugs safe for patients with Charcot–Marie–Tooth disease? *J Peripher Nerv Syst* 12:139–141
- Neumann Y, Toren A, Rechavi G, Seifried B, Shoham NG, Mandel M, Kenet G, Sharon N, Sadeh M, Navon R (1996) Vincristine treatment triggering the expression of asymptomatic Charcot–Marie–Tooth disease. *Med Pediatr Oncol* 26:280–283
- Mercuri E, Poulton J, Buck J, Broadbent V, Bamford M, Jungbluth H, Manzur AY, Muntoni F (1999) Vincristine treatment revealing asymptomatic hereditary motor sensory neuropathy type 1A. *Arch Dis Child* 81:442–443
- Uno S, Katayama K, Dobashi N, Hirano A, Ogihara A, Yamazaki H, Usui N, Kobayashi T, Inoue K, Kuraishi Y (1999) Acute vincristine neurotoxicity in a non-Hodgkin's lymphoma patient with Charcot–Marie–Tooth disease. *Rinsho Ketsueki* 40:414–419
- Hildebrandt G, Holler E, Woenkhaus M, Quarch G, Reichle A, Schalke B, Andreessen R (2000) Acute deterioration of Charcot–Marie–Tooth disease IA (CMT IA) following 2 mg of vincristine chemotherapy. *Ann Oncol* 11:743–747

11. Naumann R, Mohm J, Reuner U, Kroschinsky F, Rautenstrauss B, Ehninger G (2001) Early recognition of hereditary motor and sensory neuropathy type 1 can avoid life-threatening vincristine neurotoxicity. *Br J Haematol* 115:323–325
12. Cil T, Altintas A, Tamam Y, Battaloglu E, Isikdogan A (2009) Low dose vincristine-induced severe polyneuropathy in a Hodgkin lymphoma patient: a case report (vincristine-induced severe polyneuropathy). *J Pediatr Hematol Oncol* 31:787–789
13. Ajitsaria R, Reilly M, Anderson J (2008) Uneventful administration of vincristine in Charcot–Marie–Tooth disease type 1X. *Pediatr Blood Cancer* 50:874–876
14. Nishikawa T, Kawakami K, Kumamoto T, Tonooka S, Abe A, Hayasaka K, Okamoto Y, Kawano Y (2008) Severe neurotoxicities in a case of Charcot–Marie–Tooth disease type 2 caused by vincristine for acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 30:519–521
15. Porter CC, Carver AE, Albano EA (2009) Vincristine induced peripheral neuropathy potentiated by voriconazole in a patient with previously undiagnosed CMT1X. *Pediatr Blood Cancer* 52:298–300
16. Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M, Milbrandt J (2001) EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron* 30:355–368
17. Scherer SS (1997) The biology and pathobiology of Schwann cells. *Curr Opin Neurol* 10:386–397
18. Niemann A, Berger P, Suter U (2006) Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot–Marie–Tooth disease. *Neuromolecular Med* 8:217–242
19. Swiatek PJ, Gridley T (1993) Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene Krox20. *Gene Dev* 7:2071–2084
20. Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P (1994) Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371:796–799
21. Warner LE, Mancias P, Butler IJ, McDonald CM, Keppen L, Koob KG, Lupski JR (1998) Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* 18:382–384
22. Timmerman V, De Jonghe P, Ceuterick C, De Vriendt E, Lofgren A, Nelis E, Warner LE, Lupski JR, Martin JJ, Van Broeckhoven C (1999) Novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with Dejerine–Sottas syndrome phenotype. *Neurology* 52:1827–1832
23. Warner LE, Svaren J, Milbrandt J, Lupski JR (1999) Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet* 8:1245–1251
24. Boerkoel C, Takashima H, Bacino C, Daentl D, Lupski J (2001) EGR2 mutation R359W causes a spectrum of Dejerine–Sottas neuropathy. *Neurogenetics* 3:153–157
25. Yoshihara T, Kanda F, Yamamoto M, Ishihara H, Misu K, Hattori N, Chihara K, Sobue G (2001) A novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with late-onset Charcot–Marie–Tooth disease type 1. *J Neurol Sci* 184:149–153
26. Mikesova E, Huhne K, Rautenstrauss B, Mazanec R, Barankova L, Vyhnalek M, Horacek O, Seeman P (2005) Novel EGR2 mutation R359Q is associated with CMT type 1 and progressive scoliosis. *Neuromuscul Disord* 15:764–767
27. Jang SW, LeBlanc SE, Roopra A, Wrabetz L, Svaren J (2006) In vivo detection of Egr2 binding to target genes during peripheral nerve myelination. *J Neurochem* 98:1678–1687
28. LeBlanc SE, Ward RM, Svaren J (2007) Neuropathy-associated Egr2 mutants disrupt cooperative activation of myelin protein zero by Egr2 and Sox10. *Mol Cell Biol* 27:3521–3529
29. Jang SW, Svaren J (2009) Induction of myelin protein zero by early growth response 2 through upstream and intragenic elements. *J Biol Chem* 284:20111–20120
30. Jones EA, Lopez-Anido C, Srinivasan R, Krueger C, Chang LW, Nagarajan R, Svaren J (2011) Regulation of the PMP22 gene through an intronic enhancer. *J Neurosci* 31:4242–4250

シャルコー・

Charcot-Marie-Tooth
disease (CMT)

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 編



 Kinpodo

4. 運動ニューロン疾患のリハビリテーション

4.1 はじめに

運動ニューロン疾患は運動ニューロンを選択的に障害する弧発性あるいは家族性の疾患の総称である。この範疇には、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、進行性球麻痺 (progressive bulbar palsy, PBP) 進行性筋萎縮症 (progressive muscular atrophy, PMA)、原発性側索硬化症 (primary lateral sclerosis, PLS)、球脊髄性筋萎縮症 (spinalobular muscular atrophy, SBMA)、脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy, SMA)、などが入る。この中で成人発症運動ニューロン疾患として最も重要なALSに関してリハビリ療法の立場から概要を述べることにする (表1)¹⁾。なお、小児リハでしばしば遭遇する Werdnig-Hoffman 病は乳児期発症の重症型SMA、Kugelberg-Welander病は1歳半以降に発症して成人まで生存する軽症型SMAであり、成人発症運動ニューロン疾患に含まれるのは成人型SMAである。

4.2 ALSの概要

ALSは大脳皮質運動野にある一次運動ニューロン (upper motor neuron, UMN) および脳幹と脊髄にある二次運動ニューロン (lower motor neuron, LMN) の両方が障害される神経変性疾患である (図1)。ALSは既に19世紀にフランス人神経科医 Charcotにより報告されていたが、ニューヨーク・ヤンキースの Lou Gehrig が罹患して1939年に野球選手を引退せざる得なくなったことで注目を浴びるようになった。ALSは主に中年以降に発症し、UMNとLMNが進行性に変性し消失する疾患であり、臨床症状は筋萎縮による筋力低下が主体で、上肢機能障害、下肢機能障害 (起立・歩行障害)、構音障害、嚥下障害、呼吸障害を生じ、人工呼吸器を用いなければ通常は2～4年で死亡する。2006年TDP-43というユビキチン陽性、tau陰性の細

胞内凝集体がALSと前頭側頭葉変性症の病巣に異常蓄積していることが報告され²⁾、ALSの病態解明や治療法の開発に新しい展開が期待されるようになってきた。一方、ALSのリハは疾病の本来の特性のため、適切な障害の評価と機能訓練を行っても最終的には進行を止めることはできず、患者・家族ばかりではなく医療福祉関係者にも負担の大きい疾患である。

4.3 ALSの病態

ALSは運動ニューロン疾患の中では最も頻度が高く、世界的な有病率は人口10万人対5～7である³⁾。発症年齢は40～60歳で、発病率は人口10万人当たり0.4～1.9人/年であるが、グアム島や我が国では紀伊半島に症例集積地域がある。男女比は1.5:1.0で男性がやや多く、発症危険因子として、高脂肪・低繊維の摂取、喫煙、グルタミン酸塩、金属イオン濃度、その他の要因があげられているが、確実ではない。

ALSにはいくつかの病型があるが、最も頻度の高いものは古典的ALSである。その他にUMNのみの障害はPLS、球麻痺のみの障害はPBP、LMNのみの障害はPMAと呼ばれる。当初PLS、PBP、PMAと診断された患者も、後にALSに移行することが多い (図2)³⁾。

ALSの病態に関して多くの知見が報告されているが、神経変性の機序は明らかではない。ALSの多くは弧発性であるが約10%は家族性であり、遺伝性ALSは12種類が報告されている⁴⁾。家族性ALSのおよそ15%に遺伝子の欠損による抗酸化酵素Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) の変異があり⁵⁾、SOD酵素活性低下が神経細胞に障害を生じる可能性があるが、実際は明らかではない。Glutamateは中枢神経の興奮性神経伝達物質であり、Glutamate受容体の過剰な刺激により神経細胞は死滅する。ALS患者の脳脊髄液にはglutamate活性が上昇している報告もあり⁶⁾、gluta-

表1 成人発症運動ニューロン疾患の分類¹⁾

・ 特発性筋萎縮性側索硬化症(ALS): 弧発性 (古典的) ALS と家族性 ALS
・ 限局型運動ニューロン疾患: 進行性球麻痺、進行性筋萎縮症、原発性側索硬化症
・ 筋萎縮性側索硬化症様症候群: ALS と類似する 2 次的運動ニューロン疾患
・ 異型筋萎縮性側索硬化症: 運動ニューロン疾患と他神経疾患との合併 (Guam 島、紀伊半島 ALS-parkinsonism-dementia complex など)
・ 成人発症脊髄性筋萎縮症

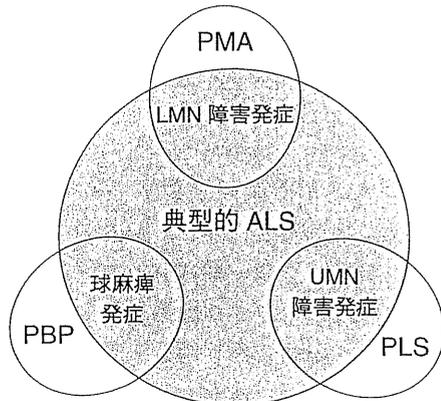


図1 ALSの診断とUMN, LMNの障害 (文献3一部改変)

mate transportの障害が原因かもしれない。アポトーシス、炎症、神経原線維の蓄積、その他の機序が関与している可能性もある。TDP-43が前頭側頭葉変性症とALSに発見され、特異的な神経難病と考えられていたALSが認知症を伴う神経変性疾患と共通の基盤を有することが判明し、今後の病態解明や治療法開発の糸口になる可能性がある。

4.4 ALSの診断のポイント

ALSの初発症状は手足の筋力低下、嚥下障害、体重減少であるので、整形外科、耳鼻科、内科を受診して、診断に直接結び付かない検査が行われ、結果として経過観察と言われ確定診断に至らないことも稀ではない。早期に適切な診断をするには専門医への紹介が重要であり、改訂版El Escorial ALS診断基準に基づき臨床所見や検査を実施する必要がある⁷⁾。まず、身体を延髄、頸髄、胸髄、腰仙髄の4領域に分け、UMNとLMNの障害を調べる。UMNは、上肢・下肢・体幹部腱反射亢進、ホフマン反射亢進、バビンスキー兆候、腹壁皮膚反射消失、仮性球麻痺などの所見で判定する。LMNは、舌・咽頭、上肢、下肢、体幹に筋萎縮、筋力低下、筋線維束性攣縮、筋電図所見などで判断する。これらの臨床所見をもとに、「確実、可能性大、検査上可能性大、可能性あり、疑い」に分類する(図3)⁷⁾。El Escorial ALS診断基準で検査上可能性大ALSと診断するには、針筋電図で上記4領域中2領域に脱神経電位がなければならない。高振幅の大運動単位電位(いわゆる giant spike)が一筋で見つかったので直ちにALSと診断するものではない。

リハ医がALSの確定診断をする機会は少ないが、筋電図検査の依頼を受けることは稀ではない。また、リハ訓練効果の臨床研究を実施するには適切な診断基

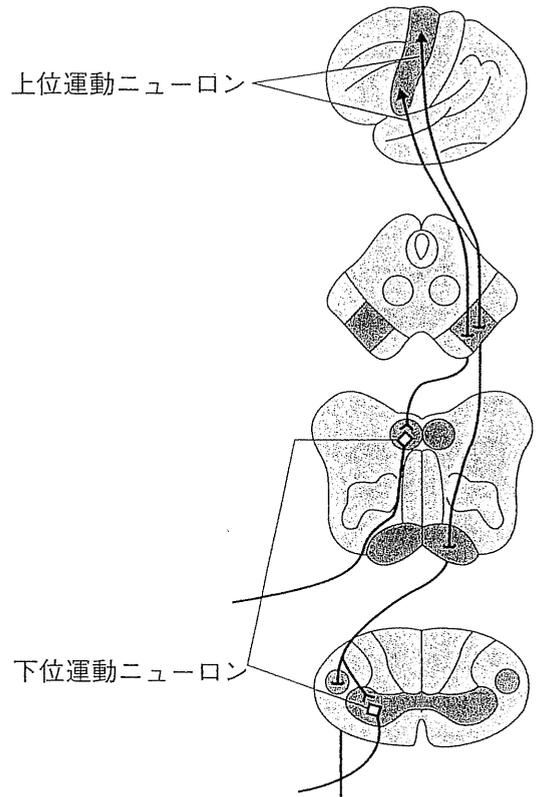


図2 上位運動ニューロンと下位運動ニューロン

準に基づき診断され確実・可能性大など、どのレベルのALSか明確にすることが重要である。そのためには診断基準と診断のプロセスを十分理解する必要がある。

4.5 リハビリテーション

1) ALSリハビリテーションの概要

ALSのリハは、脳卒中や切断のリハと比べ、無効であるとの誤解がある。脳卒中患者の多くは2~6ヵ月のリハ訓練により、自分の力で歩けるようになるか、少なくとも車椅子で移動できるようになる。また、大腿切断では大腿義足が完成し2週間程度の歩行訓練を行うと多くの切断者は独歩可能となる。一方、典型的ALSは余命が2~4年であり、症状は月単位で進行するので、リハ訓練を実施しても一時的な改善は得られ

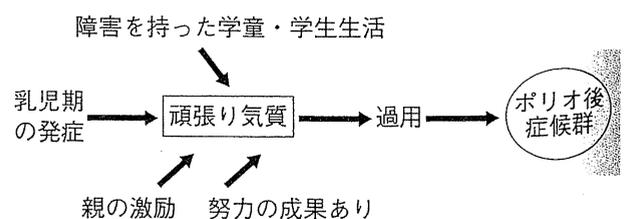


図3 頑張り気質

るものの機能障害は必ず進行し死に至る。しかし、少なくとも包括的で適切なリハを行うと一時的にでも障害を軽減し、生涯を通して生活をより快適により充実して過ごすことができる。これらはあらゆる外科的治療や内科的治療よりも優れている。

ALSへのリハ・アプローチは他の疾患と同様である。まず、患者の理学所見、日常生活動作、検査所見をもとに、リハ課題となる問題点を抽出し、これらに対する対策を立案することである。ALSの一般的な問題点は、機能障害：筋力低下、関節可動域制限、呼吸障害、構音障害、嚥下障害、痙性、疼痛、活動制限：日常生活動作制限、歩行障害、座位障害、参加制約：家庭復帰、社会参加、介護などである。日常生活動作の介助、呼吸障害に対する理学療法や人工呼吸器装着、嚥下障害の対策、構音障害に対する文字盤・会話補助装置・パソコンの活用、自宅の環境整備による生活支援など、ALS特有の知識と技術があるが、主に筋力低下に対するリハ訓練に関して述べることにする。

2) 筋力低下

ALSの筋力低下に関して、どんな方法でどの位の運動強度で筋力強化訓練を行うかは重要な問題である。一般に筋力低下に対しては抵抗運動による筋力強化訓練を実施するが、ポリオなどLMNに障害を有する患者では、過度の運動負荷を続けて過用性筋力低下 overwork weakness を生じることが報告されている^{8,9)}。

ALSの筋力低下の場合も、前角細胞が変性してLMNが脱落し、残存するLMNが筋線維を再支配して、機能障害を部分的に代償しており、ある意味では最大限に働いている。このような状態では過度の筋力強化訓練により過用性筋力低下を生じる可能性がある。ポリオ罹患者では、過用性筋力の誘因の一つに「がんばり気質」と呼ばれる積極的な性格傾向がある(図4)¹⁰⁾。小児期のポリオ罹患者のため、幼少時より努力で障害を克服してきた体験があり、自ら進んで筋力強化に励み、麻痺した上下肢の機能を回復させてきたにもかかわらず、中高年になり症状が悪化してきた事例にしばしば遭遇する。ALS患者は一般に「がんばり気質」ではなく、また、ポリオ後症候群に比して症状の進行も急激であるので、過負荷の状態を一定期間続けることは困難であり、過用性筋力低下を生じる余地は少ないかもしれない。一方、ALS患者が筋力低下を自覚して非活動的になっているか、あるいは社会参加の機会が減少して、廃用を生じているかもしれない。この状態であれば運動負荷や筋力強化訓練が有効である。従って現時点では、必ずしも十分なエビデンスはないが、最大筋力の30%前後、即ち軽度から中等度の運動負荷量の抵抗運動を数回反復し、これを3セット実施する¹¹⁾。過用性筋力低下を防止するには、筋力低下の進行に応じて負荷量を軽減させる配慮が必要であろう。

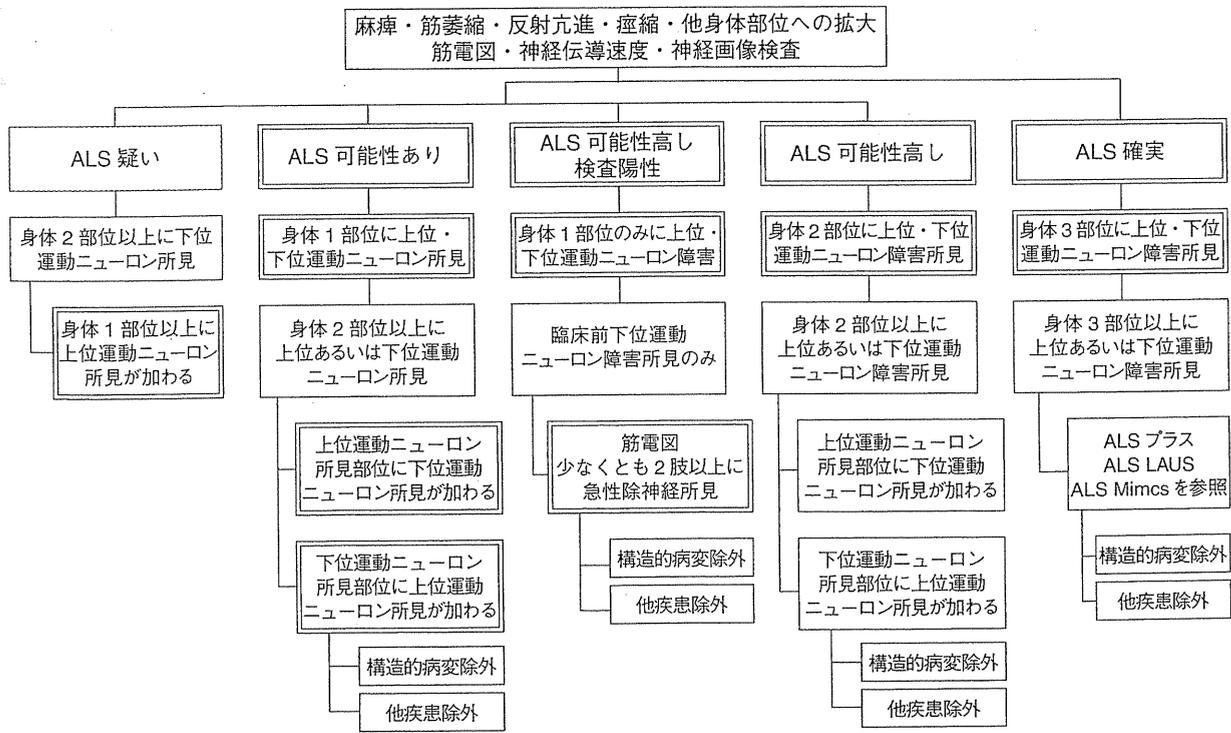


図4 世界神経学会 EL Escorial 改訂 ALS 診断基準

3) 筋力強化のエビデンス

2009年のCochrane Database of Systematic Reviewsによれば¹²⁾、ALSに対する運動効果は十分解明されていないので論文レビューを実施したが、無作為化された研究は2件に過ぎなかった。下記の2件の研究は運動介入の有効性を示唆しているが、いずれも対象患者数が少なく、どの程度の運動負荷が適切か、運動が有害であるかは依然として明らかではなかった。

DroryらはALS患者に中等度の家庭で行う運動プログラムを実施し有用性を報告した¹³⁾。ALS患者25名を無作為に、中等度の有酸素運動である歩行、固定自転車、水泳からなるプログラムを毎日30分程度行う群と、通常の日常活動を行う群に分けた。開始時、3、6、9ヵ月後に、徒手筋力テスト、Ashworth痙性尺度、ALS機能評価尺度、疲労度尺度、筋骨格疼痛視覚アナログ尺度、生活の質(Short Form 36)を評価した。中等度の運動を実施した群は、3ヵ月の時点でALS機能評価尺度とAshworth痙性尺度の悪化が少なく、6ヵ月の時点では大部分の尺度で悪化が少ない傾向にあったが有意差はなく、9ヵ月と12ヵ月の時点では対象となる症例が少なく統計学的検討ができなかった。これらの結果より規則的な中等度の運動はALSの障害に対して一時的ではあるが陽性効果をもたらすことが明らかとなった。

Bello-HaasらはALS患者に抵抗運動を実施して機能、疲労、生活の質に及ぼす効果を報告した¹⁴⁾。确实、可能大、検査上可能性大と診断されたALS患者で、努力肺活量が90%以上、ALS機能評価尺度が30点以上の者27名を2群に無作為に振り分けた。運動群は週3回の抵抗運動と毎日伸張運動を自宅で行い、ケア群は毎日伸張運動を行い、ALS機能評価尺度、疲労度尺度、生活の質(Short Form 36)、最大等尺性筋力、努力肺活量を開始時および6ヵ月まで毎月評価した。6ヵ月の時点まで研究を完了できたのは、運動群8名、ケア群10名であり、運動群はALS機能評価尺度とShort Form 36の身体機能下位尺度で有意に高得点であった。また、介入に関連した有害事象はなく、最大等尺性筋力や努力肺活量に陰性効果はなく、筋力の減少も運動群の方が少なかった。これらの結果より抵抗運動を行うことは通常のケアよりも有意に優れていると考えられる。

4.6 おわりに

ALSは筋力低下を始めとして、多くの機能障害や活動制限・参加制約を有する。筋力低下は完治困難ではあるが、軽度から中等度の抵抗運動により一時的には陽性効果が得られる可能性があり、今後の詳細な臨床研究によりエビデンスを蓄積してどの程度の運動負荷が適切であり、運動介入が包括的なALSリハを真に向上させるかを明らかにする必要がある。

文献

- 1) ALS担当小委員会：Ⅲ. 診断・鑑別診断。ALS治療ガイドライン。日本神経学会ホームページよりダウンロード http://www.neurology-jp.org/guidelinem/neuro/als/als_03.pdf
- 2) Arai T, et al: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* **351**: 610-614, 2006
- 3) Krivickas L, et al: Motor neuron disease. In: DeLisa et al. eds, *Physical medicine and rehabilitation*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,; 931-956, 2005
- 4) Kunst CB: Complex genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* **75**: 933-947, 2004
- 5) Hosler BA, et al: Copper/zinc superoxide dismutase mutations and free radical damage in amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol* **680**: 41-46, 1995
- 6) Plaitakis A, et al: Altered metabolism of excitatory amino acids, N-acetylaspartate glutamate in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull* **30**: 381-386, 1993
- 7) Brooks BR, et al: El Escorial revised: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Sclero Other Motor Neuron Disord* **1**: 293-299, 2000
- 8) Bennet RL, Knowlton GC: Overwork weakness in partially denervated muscle. *Clin Orthop* **195**; 12: 711-715
- 9) 蜂須賀研二：自由走行がラットの acrylamide neuropathy に及ぼす影響—いわゆる overwork weakness について。リハ医学 **20**: 241-250, 1983
- 10) 蜂須賀研二：ポリオ後症候群：その診断と治療。リハ医学 **39**: 642-647, 2002
- 11) Aitkens SG, et al: Moderate resistance exercise program: its effects in slowly progressive neuromuscular disease. *Arch Phys Med Rehabil* **74**: 711-715, 1993
- 12) Bello-Haas VD, et al: Therapeutic exercise for people with amyotrophic lateral sclerosis or motor neuron disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 4, CD005229, 2009
- 13) Drory VE, et al: The value of muscle exercise in patient with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* **191**: 133-137, 2001
- 14) Bello-Haas VD, et al: A randomized controlled trial of resistance exercise in individuals with ALS. *Neurol* **68**: 2003-2007, 2007

(蜂須賀研二)

1) Charcot-Marie-Tooth 病の網羅的遺伝子診断

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経内科・老年病学講座 橋口昭大
同 教授 高嶋 博

key words microarray DNA chip, next generation genome sequencer, *PMP22* duplication, *MFN2*, aminoacyl-tRNA synthetase

要 旨

Charcot-Marie-Tooth病 (CMT) の原因遺伝子は30以上報告されており、臨床的および遺伝子学的に多様である。CMTの最も多い原因である *peripheral myelin protein 22 (PMP22)* の異常は外注委託検査による fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法で検出可能であるが、その他の遺伝子異常を全てスクリーニングするには膨大な労力と費用が必要である。本邦では、従来通常のシーケンス法やDHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) 法による遺伝子診断が行われてきたが、これらに加えてCMTの遺伝子異常を低コストかつ迅速に診断できるマイクロアレイDNAチップが開発され、27の遺伝子を同時にスクリーニング可能となった。その結果およそその原因遺伝子頻度が発表されるにいたった。一方、米国においても詳細なCMTの遺伝子診断が行われ、病型別のおおよその原因遺伝子頻度が発表された。これらから、総合的な遺伝子異常の検出割合は、*PMP22* の重複例であるCMT1Aを除けば約20%であり、原因遺伝子が未解明の症例が多いことが確認された。それ故、今後も新しい原因遺伝子の同定が必要と考えられ、実際に毎年複数の新規原因遺伝子

が報告されている。2010年には次世代シーケンサーを用い、個人のゲノム全塩基配列を解読することで、SH3TC2遺伝子変異によるCMT4Cと確認しえた初めての報告がなされた¹⁾。今後、次世代シーケンサーなどの網羅的遺伝子診断により、原因遺伝子の発見が加速し、包括的な遺伝子診断にも利用されていくことが期待される。

動 向

1991年にLupskiらが*PMP22*の重複がCMT1Aの原因であると報告²⁾して以来、すでに30以上のCMT原因遺伝子が報告されている(表1)。欧米では、いくつかのCMT原因遺伝子診断を、従来のSanger法のシーケンス解析を用いて商業的に行っている。一方、本邦では*PMP22*以外の遺伝子診断は商業的には行われていないが、近年、CMT原因遺伝子を網羅的にスクリーニングする試みが行われている。マイクロアレイDNAチップを用いた手法では、DNAチップ上に搭載された27のCMT原因遺伝子を最短2日で診断可能で、注目されている。

一方、本邦とアメリカでの遺伝子解析にて、原因遺伝子の多様性および病型別遺伝子頻度が報告されており、本稿で概説する。また、近年相次い

表1 Charcot-Marie-Tooth病の原因遺伝子 (文献19より改変)

CMT 1 (脱髄型 常優)	
CMT1A	<i>PMP22 (peripheral myelin protein 22)</i>
CMT1B	<i>MPZ (myelin protein zero)</i>
CMT1C	<i>LITAF (lipopolysaccharide-induced TNF factor)</i>
CMT1D	<i>EGR2 (early growth response 2)</i>
CHN	<i>SOX10 (sex determining region Y-box 10)</i>
CMT1E	<i>MPZ (myelin protein zero)</i>
CMT1F	<i>NEFL (neurofilament, light polypeptide)</i>
CMT 4 (脱髄型 常劣)	
CMT4A	<i>GDAP1 (ganglioside-induced differentiation associated protein 1)</i>
CMT4B1	<i>MTMR2 (myotubularin related protein 2)</i>
CMT4B2	<i>SBF2 (SET binding factor 2)</i>
CMT4C	<i>SH3TC2 (SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2)</i>
CMT4D	<i>NDRG1 (N-myc downstream regulated 1)</i>
CMT4E	<i>EGR2 (early growth response 2)</i>
CMT4F	<i>PRX (periaxin)</i>
CMT4G	<i>HK1 (hexokinase 1)</i>
CMT4H	<i>FGD4 (FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4)</i>
CMT4J	<i>FIG4 (FIG4 homolog, SAC1 lipid phosphatase domain containing)</i>
CMT X (X連鎖性)	
CMTX1	<i>GJB1 (gap junction binding protein beta 1)</i>
CMTX5	<i>PRPS1 (phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1)</i>
CMT 2 (軸索型 常優)	
CMT2A1	<i>KIF1B (kinesin family member 1B)</i>
CMT2A2	<i>MFN2 (mitofusin 2)</i>
CMT2B	<i>RAB7 (rab-protein 7)</i>
CMT2C	<i>TRPV4 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4)</i>
CMT2D	<i>GARS (glycyl-tRNA synthetase)</i>
CMT2E	<i>NEFL (neurofilament, light polypeptide)</i>
CMT2F	<i>HSPB1 (heat shock 27kDa protein 1)</i>
CMT2G	<i>unknown</i>
CMT2H	<i>unknown</i>
CMT2I/J	<i>MPZ (myelin protein zero)</i>
CMT2K	<i>GDAP1 (ganglioside-induced differentiation associated protein 1)</i>
CMT2L	<i>HSBP8 (heat shock 22kDa protein 8)</i>
CMT2M	<i>DNM2 (dynamamin 2)</i>
CMT2N	<i>AARS (alanyl-tRNA synthetase)</i>
CMT 2 (軸索型 常劣)	
AR-CMT2A	<i>LMNA (lamin A/C)</i>
AR-CMT2B	<i>MED25 (mediator complex subunit 25)</i>
GAN	<i>GAN1 (gigaxonin 1)</i>
ACCPN	<i>KCC3 (K-Cl cotransporter family 3)</i>
SCAN1	<i>TDPI (tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1)</i>
AOA1	<i>APTIX (aprataxin)</i>
AOA2	<i>SETX (senataxin)</i>
minifascicular neuropathy	<i>DHH (desert hedgehog)</i>
CMT 2 (中間型)	
CMT DIB	<i>DNM2 (dynamamin 2)</i>
CMT DIC	<i>YARS (tyrosyl-tRNA synthetase)</i>

CHN: congenital hypomyelinating neuropathy, GAN: giant axonal neuropathy, ACCPN: agenesis of the corpus callosum with peripheral neuropathy, SCAN: spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy, AOA: ataxia with oculomotor apraxia

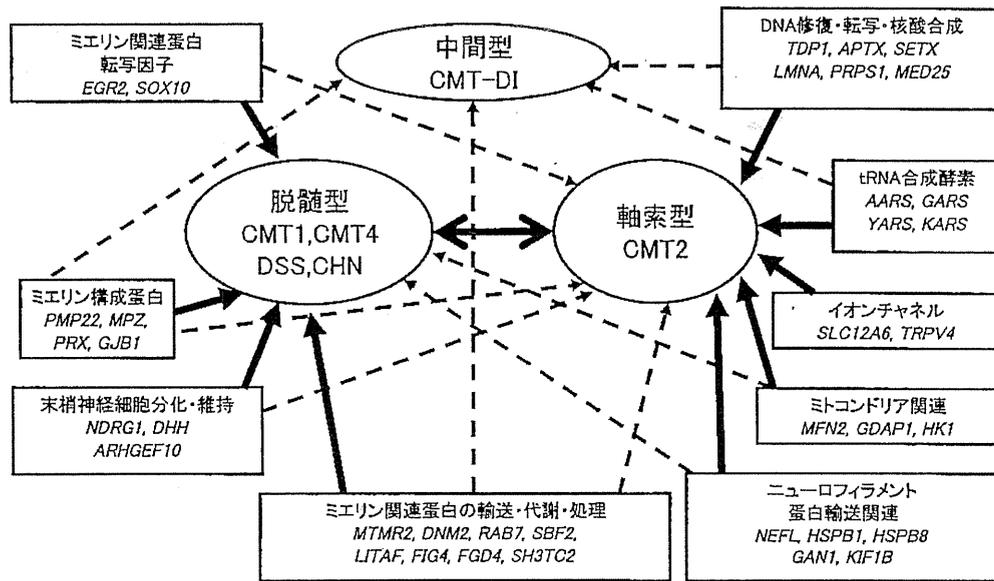


図1 Charcot-Marie-Tooth 病の病態別遺伝子分類 (文献19より改変)

で発見された注目すべき原因遺伝子に関する知見と、マイクロアレイ DNA チップによる網羅的遺伝子診断法の特長と問題点についても概説する。

A. 原因遺伝子の多様性

CMTの原因遺伝子はすでに30を超えている(表1)。それらの遺伝子は病態別に、①ミエリン構成蛋白、②ミエリン関連蛋白転写因子、③ミエリン関連蛋白の輸送・代謝・処理、④細胞分化・維持、⑤ニューロフィラメント・蛋白輸送関連、⑥ミトコンドリア関連、⑦DNA修復・転写・核酸合成、⑧イオンチャネル、⑨アミノアシル tRNA 合成酵素のおおよそ9つに分類できる。①～④はミエリン形成に関する遺伝子で、主に脱髄型CMTの原因に、⑤～⑨は神経細胞の形成・維持・活動に関連する遺伝子で、主に軸索型CMTの原因となる。図1に示すように、これら原因遺伝子によっては脱髄型と軸索型いずれの病型もとれるため、数多くのCMTサブタイプが報告されている。

B. CMTの分子疫学

CMTは電気生理学的所見、病理学的所見、発症年齢、家族歴、進行経過、合併症などから原因遺伝子がある程度推定できるが、必ずしも想定した遺伝子に異常を認めないことも多い。

Saportaらは、遺伝子診断を行ったCMT患者787例の疫学解析を行い、CMT1が45% (354例)、CMT2が12.2% (96例)、CMTXが10.2% (80例)、CMT4が0.9% (7例)と報告している³⁾。CMT1が最多で、そのうち約82% (290/354例)がPMP22重複によるCMT1Aであった。CMT1Aについて、Szigetiらは米36施設で遺伝子診断されたCMTにおいて、脱髄型CMTの約70%がCMT1Aであると報告し⁴⁾、Onishiらはアジア/コーカシアンにおいても脱髄型CMTの約70%がCMT1Aであると報告している⁵⁾。これらの報告からは脱髄型CMTにおけるCMT1Aの割合は世界共通に約70～80%であると推定される。また、Boerkoelらは、商業的な遺伝子診断が開始される以前の検体について検討し、CMT患者153例

のうち、約半数(79例)がCMT1Aであったと報告している⁶⁾。一方、近年Abeらは本邦での脱髄型CMT患者227例のうち、CMT1Aは約23%(53例)であったとし、本邦では世界的な比率より低い可能性を示唆した⁷⁾。実際には23%という頻度はこれまでの報告と比べ低すぎるように見受けられる。本邦ではCMT1Aのみ商業的な遺伝子検査が行われている点や小児科領域からの報告であることなどのバイアスが存在する可能性は否定できない。CMT1A以外の脱髄型CMTについて、Saportaらの報告³⁾ではMPZ変異によるCMT1Bが約13%(45/354例)で認められた以外はいずれも0.3~1.4%と稀であった。Abeらの論文⁷⁾においてもCMT1Bが脱髄型CMTの約9%(20/227例)と多かった。筆者らによるCMT1A以外のCMT患者200例のマイクロアレイ法による網羅的遺伝子診断の結果⁸⁾では、CMT1A以外の脱髄型CMTの約12.8%(6/47例)がMPZ変異によるCMT1Bであった。CMT1Aを除いた脱髄型CMTにおけるCMT1Bの頻度は3つの報告^{3,7,8)}で同等であった。

軸索型CMTについて、Saportaらの報告³⁾では、約22%(21/96例)が*Mitofusin-2 (MFN2)*変異によるCMT2Aであった。Abeらの報告⁷⁾でも約11%(14/127例)がCMT2Aであった。筆者らの報告⁸⁾においても軸索型CMTの約11.3%(8/71例)に*MFN2*変異を認め、Abeら⁷⁾とほぼ同様の結果であった。CMT2A以外の軸索型CMTは、3つの報告^{3,7,8)}において、いずれの遺伝子も5%未満と少なかった。Saportaらの報告³⁾は対象数が非常に多い点、Abeらの報告⁷⁾は日本人で評価した点が重要である。

一方、これら論文に共通する点として、原因遺伝子が特定できない症例が依然として多い点あげられる。Boerkoelら⁶⁾は約29%(44/153例)のCMT患者が原因不明だったとしているが、CMT1Aの79例を除くと実に約60%(44/74例)

が原因不明である。Abeらの報告⁷⁾でも、原因不明の脱髄型CMTは約49%(111/227例)であるが、CMT1Aを除くと約64%(111/174例)が原因不明である。さらに軸索型CMTの約79%(100/127例)の原因が特定できていない。Saportaらの報告³⁾では、原因不明の脱髄型CMTは約2%(8/354例)と低かったが、軸索型CMTは約66%(63/96例)が原因不明であった。筆者らの報告⁸⁾でも、CMT1Aを除いた脱髄型CMTの約81%(38/47例)が原因不明であり、既報告と同様あるいはそれ以上に多かった。軸索型CMTも約86%(61/71例)が原因不明であった。このように、脱髄型、軸索型CMTともにその多くはいまだ原因遺伝子が同定できていないのが現状である。

C. 新規原因遺伝子

以下に2007年以降に報告された、新規の原因遺伝子をあげる。

FIG4 homolog, SAC1 lipid phosphatase domain containing (FIG4), FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4 (FGD4) はミエリン関連蛋白の輸送・代謝・処理に関する蛋白である。FIG4はホスファチジルイノシトール代謝に関連し、CMT4J⁹⁾の原因遺伝子である。FGD4はシュワン細胞の分化調節に関連し、CMT4H¹⁰⁾の原因遺伝子である。

Hexokinase 1 (HK1) はミトコンドリア関連遺伝子で、ミトコンドリアの移動やグルコース代謝に関連し、CMT4G / HMSN-Russe¹¹⁾の原因遺伝子である。

Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1 (PRPS1) は、X染色体上にあるDNA修復・転写および核酸合成関連遺伝子で、プリン・核酸代謝に関連し、CMTX5¹²⁾の原因遺伝子である。*Mediator complex subunit 25 (MED25)* もDNA

修復・転写および核酸合成関連遺伝子で、RNAポリメラーゼIIを介する転写に関連する、AR-CMT2B¹³⁾の原因遺伝子である。

Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 (TRPV4) はイオンチャネル関連遺伝子で、Ca²⁺浸透圧性カチオンチャネルをコードし、浸透圧調整に関与する。2010年にCMT2C¹⁴⁾の原因遺伝子として同定された。

Alanyl-tRNA synthetase (AARS) と *Lysyl-tRNA synthetase (KARS)* はアミノアシルtRNA合成酵素をコードする遺伝子で、AARSはCMT2N¹⁵⁾の、またKARSはCMT-RIB¹⁶⁾の原因遺伝子として2010年に同定された。アミノアシルtRNA合成酵素は特定のアミノ酸とtRNAを結合させ、アミノアシル化させるために必要な酵素である。AARS、KARSの同定以前に、*Glycyl-tRNA synthetase (GARS)* はCMT2D¹⁷⁾の原因遺伝子として、*Tyrosyl-tRNA synthetase (YARS)* はCMT-DIC¹⁸⁾の原因遺伝子としてすでに同定されていた。これら以外にも各アミノ酸に対応するアミノアシルtRNA合成酵素は存在しており、今後、新たなCMT原因遺伝子として同定される可能性が高い。アミノアシルtRNA合成酵素異常による慢性的な蛋白供給不足が、転写要求が高い大型の神経細胞を傷害し、軸索型CMTを発症する機序は大変興味深い。

D. 網羅的遺伝子診断法

本邦では、FISH法によるPMP22遺伝子診断が保険適応となっており、外注委託検査で容易に診断可能である。一方、CMT1A以外のCMTは、各研究施設が個別に遺伝子解析を実施しているのが現状である。電気生理検査所見・末梢神経病理所見・家族歴などの患者情報から原因遺伝子を推測することは、一部の例では可能であるが、同じ原因遺伝子でも脱髄型あるいは軸索型を呈するこ

ともあり、また*de novo*変異も少なくない。したがって、患者情報から原因遺伝子を特定するのは困難である。これまでの網羅的遺伝子診断に関する報告で³⁻⁷⁾は、FISH法の他に、Sanger法シーケンス、denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)法、multiplex ligation-dependent probe analysis (MLPA)法などを組み合わせてスクリーニングを行っている一方、個々の症例に対して、これらの方法で30を超す原因遺伝子全てをスクリーニングすることは労力的にもコスト的に困難である。特に一般的なSanger法では莫大な費用と時間を要し、現時点で、全ての原因遺伝子をスクリーニングすることは現実的に不可能である。

DHPLC法は、液体クロマトグラフィーと厳密な温度コントロール可能なオープンと特殊なDNA分離カラムを組み合わせ、遺伝子異常を同定する方法である。より簡便に実施できるように設計され、高感度、ハイスループット、比較的低温ランニングコストという特徴がある。DHPLC法は、シーケンスの必要な検体を簡単に減らせられるという点で、有用なスクリーニング法の一つであろう。

一方、近年のマイクロアレイ法を用いたりシーケンス技術の発展により、高速かつ低コストで網羅的に遺伝子配列を決定することが可能となった。マイクロアレイ法は、目的遺伝子をPCR法で増幅し、それを断片化後標識し、あらかじめ配列がデザインされたDNAオリゴマーを配置したチップと反応させ、専用のスキャナで信号を読み、配列を決定する方法である。筆者らは2006年時点でCMT原因遺伝子として確認されていた27遺伝子と新規遺伝子候補10遺伝子を搭載したCMT-DNAチップを作成した¹⁹⁾。586本のPCR反応を32分割しmultiplex PCRにかけることで、時間と労力はかなり軽減でき、10万塩基の配列を決定するのに必要な時間は最短で2日間となっ

た。この手法を用いて、脱髄型CMTではFISH法でPMP22コピー数が正常だった症例を、また軸索型・中間型CMTでは全例を対象とし、2007年より網羅的遺伝子診断を行っている。

マイクロアレイDNAチップは、その仕組み上、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し難い。比較的大きな欠失の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。我々が用いているAffymetrix社製マイクロアレイDNAチップは一度デザイン/製作すると容易には仕様を変更できない問題点がある。新たに原因遺伝子を搭載したい場合、マイクロアレイDNAチップのデザインそのものから変更する必要がある。また、著者らの報告でも診断率が約20%程度と十分とはいえず、今後新しい試みの検討が必要であろう。現時点では、新規遺伝子を追加搭載し、DNAチップを更新していく方法がコスト的には有効と考えられるが、将来的には次世代ゲノムシーケンズの導入が必要であろう。次世代シーケンズ法は、数千万から1000億塩基の配列を一度に決定する方法で、1ランでヒトゲノム全体を決定できる能力をもつ機種も登場している。ランニングコストが高い点や、データ量が膨大すぎる点などの問題点があり、個々の症例に対して解析を行うにはもう少し時間を要する。最近になり、1ランあたりのコストが比較的安価な機種が登場しており、将来はゲノムシーケンズ法が遺伝子診断の主力になる可能性が高い。根本的な遺伝子異常を明らかにし、病態の解明および治療法へつなげていくためにも、網羅的遺伝子診断をさらに発展させていく必要がある。

文献

- 1) Lupski JR, Reid JG, Gonzaga-Jauregui C, et al. Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *N Engl J Med*. 2010; 362: 1181-91.
- 2) Roa BB, Garcia CA, Lupski JR. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: molecular mechanisms of gene dosage and point mutation underlying a common inherited peripheral neuropathy. *Int J Neurol*. 1991-1992; 25-26: 97-107.
- 3) Saporta ASD, Sottile SL, Shy ME, et al. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol*. 2011; 69: 22-33.
- 4) Szigeti K, Nelis E, Lupski JR, et al. Molecular diagnostics of Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *Neuromolecular Med*. 2006; 8: 243-54.
- 5) Ohnishi A, Li LY, Fukushima Y, et al. Asian hereditary neuropathy patients with peripheral myelin protein-22 gene aneuploidy. *Am J Med Genet*. 1995; 59: 51-8.
- 6) Boerkoel CF, Takashima H, Lupski JR, et al. Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol*. 2002; 51: 190-201.
- 7) Abe A, Numakura C, Hayasaka K, et al. Molecular diagnosis and clinical onset of Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. *J Hum Genet*. 2011; 56: 364-8.
- 8) 橋口昭大, 徳永章子, 高嶋 博, 他. シャルコー・マリー・トゥース病 200例のマイクロアレイDNAチップによる遺伝子診断. *Peripheral Nerve*. 2011; 22: 64-71.
- 9) Chow CY, Zhang Y, Dowling JJ, et al. Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature*. 2007; 448: 68-72.
- 10) Delague V, Jacquier A, Hamadouche T, et al. Mutations in FGD4 encoding the Rho GDP/GTP exchange factor FRABIN cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4H. *Am J Hum Genet*. 2007; 81: 1-16.
- 11) Hantke J, Chandler D, King R, et al. A mutation in an alternative untranslated exon of hexokinase 1 associated with hereditary motor and sensory neuropathy -- Russe (HMSNR). *Eur J Hum Genet*. 2009; 17: 1606-14.
- 12) Kim HJ, Sohn KM, Shy ME, et al. Mutations in PRPS1, which encodes the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase enzyme critical for