

201128092A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究

(H22-難治-一般-132)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 井上 健

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所

平成24(2012)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究

(H22-難治-一般-132)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 井上 健

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所

平成24(2012)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究----- 1
井上 健

II. 分担研究報告

1. 先天性大脳白質形成不全症の全国実態調査(第3報)----- 12
井上 健、沼田有里佳、有馬恵里子、小坂 仁、黒澤健司、高梨潤一、
出口貴美子、山本俊至、岩城明子
2. 患者家族を対象とした第3回市民公開セミナーの実施
----- 17
井上 健、小坂 仁、黒澤健司、西川智子、高梨潤一、山本俊至、
出口貴美子、岩城明子
3. 細胞内小胞体ストレスを標的とした Pelizaeus-Merzbacher 病の治療薬候補の開発
----- 21
守村敏史、沼田有里佳、後藤玲央、井上 健
4. オートファジーに注目した食品化合物ライブラリースクリーニング
～オートファジー活性化をきたす化合物の探索～ ----- 24
沼田有里佳、守村敏史、井上 健
5. 先天性大脳白質形成不全症の診断と治療 ----- 27
小坂 仁、新保裕子、永井淳一、黒澤健司、井上 健、才津浩智、
松本直通
6. GeneReviews に掲載された PLP1-Related Disorders
—情報リソースの重要性— ----- 35
黒澤健司
7. 先天性大脳白質形成不全症モデルマウスを用いた脳画像研究 ----- 39
高梨潤一
8. 原因不明の先天性大脳白質形成不全症患者におけるエクソーム解析
----- 43
山本俊至
9. PLP1 遺伝子変異と臨床病型との関係：成人発症の家族性痙性対麻痺 2
型を中心として ----- 51
岩城明子

| | |
|---------------------------|----------|
| III. 資料 | |
| 平成23年度班会議資料 | ----- 57 |
| 先天性大脳白質形成不全症 疫学調査報告書 | ----- 64 |
| 第3回公開セミナーお知らせ | ----- 69 |
| 先天性大脳白質形成不全症ウェブサイト | ----- 70 |
| | |
| IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- 72 |
| | |
| V. 研究成果の刊行物・別刷 | ----- 81 |

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究

研究代表者 井上 健 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第二部

研究要旨

先天性大脳白質形成不全症は、原因不明（しかし多くは遺伝性と考えられる）の中樞神経系髄鞘の形成不全を特徴とし、非常に重篤な症状を呈する稀な神経疾患の一群である。罹患している患者の多くは、重度の運動障害と知的発達遅滞をもつ重症心身障害者であり、小児期に死亡する患者も多い。これまで *PLP1* などいくつかの原因遺伝子が同定され、病態が明らかになっている一方、遺伝子検索はおろか診断未確定の患者も多い。また、本邦の患者実態の把握は、ほとんど行われてこなかった。本研究は、これまで個別にこれらの疾患の臨床や研究に関わってきた臨床医と研究者を取りまとめ、全国調査による本邦の臨床実態の把握と診断基準の作成など臨床研究を推進し、さらにその成果を直接、治療法開発へつなげるべく、生体試料の登録保存や疾患モデル動物などの基盤整備を推進するものである。本研究の特色は、「ベッドからベンチへ、ベンチからベッドへ」という臨床・基礎研究一体型の研究組織を構築し、先天性大脳白質形成不全症の診断から治療までにかかる研究を一体的に推進する点である。本年度は、フィジビリティ・スタディであった初年度から数え、3年目の最終年度となるが、昨年度からの継続研究課題の実施とともに、新たな研究課題も追加し、より多面的な研究を推進し、最終年度として形に見える成果を残すとともに、さらに発展的に研究を進めるための基盤を作り上げた。

研究組織

研究代表者

井上 健 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第二部 室長

研究分担者

小坂 仁 神奈川県立こども医療センター 神経内科 部長

黒澤健司 神奈川県立こども医療センター 遺伝科 部長

高梨潤一 亀田メディカルセンター 小児科（神経担当） 部長

山本俊至 東京女子医科大学 統合医科学研究所 准教授

岩城明子 九州大学 生体防御医学研究所 助教

出口貴美子 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第二部 研究生

1. 研究目的

先天性大脳白質形成不全症は、遺伝性の中樞神経系髄鞘の形成不全を本態とする重篤かつ稀な神経疾患の一群で、代表的疾患として Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) が知られている。いくつかの原因遺伝子が同定され、病態が明らかになっている一方、臨床的には遺伝子検索はおろか診断未確定の患者も多い。また、本邦での患者実態の把握は全く行われていない。また、本疾患の診断基準や分類も十分に行

われおらず、さらに、治療法も存在しない。すなわち、本疾患を取巻く状況には、今後解決せねばならない課題が数多く存在する。

そこで、本研究では PMD を代表とする先天性大脳白質形成不全症に関する臨床実態の調査と診断基準の確立、遺伝子診断の推進、治療法開発に向けた基盤整備の推進を目的とする。

我々は、初年度より先天性大脳白質形成不全症に関する全国実態調査と診断基準と治療指針の策定、病態解明や治療法開発のための基盤整備等の総合的な研究を開始した。本研究では、昨年度からの課題をさらに押し進めるとともに、患者家族とのネットワークの確立をさらに進める。臨床研究では特に MRI 画像データの収集とデータベース化を新規に進めるとともに、疾患に関する情報発信のため、診断基準などの総説論文の公表とウェブサイトの充実をはかる。基盤研究では、患者生体試料の登録と収集を進める。また遺伝子解析あるいは画像解析の手法を用いた病態解明、新規疾患遺伝子の同定、さらに治療法を開発するための基盤整備を進め、臨床研究と基盤研究が有機的に連携した研究を推進する。

本研究が必要であった医療的背景として、以下の点が上げられる。

第1に、今後の先天性大脳白質形成不全症に関する診断の標準化や厚生労働行政の基盤になる知見を得るために、まず本邦における患者実態の把握が必要である。これまで疾患自体が稀であり、患者数や医療の実態についての情報が全くなかった。そこで、全国レベルでの実態把握調査が必要である。

第2に、先天性大脳白質形成不全症は稀であり、生化学的な診断指標がなく確定診断が困難であるが、近年 MRI などの画像診断技術や遺伝子診断技

術の進歩により、正確な診断が可能になりつつある。これらの情報を統合し、臨床場面で有用な本疾患の診断や治療のためのシステマチックなガイドラインの確立が必要である。

第3に、遺伝子診断の確定に基づく病態の解明と治療法の開発のための生体試料のシステマチックな収集・保存が非常に重要になり、そのための基盤整備が必要である。現在、この疾患には、根本的な治療法が存在しない。しかし、遺伝子・再生治療の技術進歩により、近い将来、治療法が開発される機会が訪れると期待されるが、そのためには、正確な臨床情報とリンパ芽球や皮膚線維芽細胞などの生体試料の登録保存システムの確立が重要である。

本研究の最大の特徴は、班員により高度先進医療として確立された遺伝子診断システムが、本邦で最初の遺伝子診断の保険適用疾患の一つとして認可されている点である。これはすなわち、実態の把握を遺伝子レベルで、正確かつ効率的に行えることを意味する。また、研究代表者は、疾患の分子病態の解明や診断法の開発を行い、さらに治療法開発へ向けた体制を整備していることである。また、すでに欧州や米国の研究グループとの交流もあり、国際的な共同研究も開始していることも特色の一つである。すなわち、臨床実態調査研究の枠を超え、その成果をすぐに病態解明と治療研究のため活かせる体制を整え、「ベッドからベンチへ、ベンチからベッドへ」をスムーズに行うトランスレーショナルな研究を行うことを念頭におき、実際にこの疾患の研究に携わる研究者や医師からなる小回りのきく研究班を立ち上げた。

2. 研究方法

A. 臨床の実態の把握調査と診断の

推進のための研究

(1) 全国疫学調査の結果の集計とフィードバック

H21年度より実施している全国実態調査は、昨年度に二次調査の結果を集計し、統計学的解析を進めた。本年度は、この結果を学会などで報告し、論文で公表できるようにまとめることを目標とした。

(2) 画像と遺伝子診断を含めた診断基準と疾患分類、治療指針の確立

昨年度に、見直して新たに1疾患を追加し、11疾患とした疾患分類（改訂版）に加え、最新の画像および遺伝学的解析の学術的知見を加味し、より詳細かつ専門的な総説的内容を加えた高度な診断と臨床評価と治療のためのガイドラインを作成したので、これを周知するために国内専門誌に総説として公表し、情報発信することにより、本疾患に関する臨床面でのボトムアップを図る。

(3) ウェブサイトの作成と公開

先天性大脳白質形成不全症は小児の稀少性神経難病であることから、患者家族が疾患のことを知ろうとしても、ほとんど日本語の情報がないというのがこれまでの実情であった。また、医療者も頻繁に目にする疾患ではないため、十分な知識を持ち合わせないこともしばしばあり、インターネットを利用した情報提供の場は、患者、医療者双方から求められている。そこで、我々は、先天性大脳白質形成不全症に関するウェブサイトを作成し、これを公開することにより、疾患に関する情報を積極的に発信することにより、臨床現場や患者家族への一助になることを目指す。

(4) MRI 画像の収集とデータベース化

脳のMRI画像は、先天性大脳白質形成不全症の臨床診断に必須の検査であり、疾患の鑑別や分類、重症度判定など臨床的有用性が高い。本疾患は稀少であることから、多くの画像を比較検討することができるような画像データバンクの有用性は高い。そこで、国立精神・神経医療研究センターの脳病態統合イメージングセンター（IBIC）との共同プロジェクトとして、脳MRI画像の収集を行い、本邦初の先天性大脳白質形成不全症の画像データベースを作成する。

(5) 患者家族や看護療育スタッフを対象とした公開セミナーの開催

一昨年度、昨年度に引き続き、患者家族とそのサポーターを対象にした公開セミナーを行い、患者家族間のネットワークの強化と医師・研究者との連帯をはかるとともに、情報提供を行う。

(6) 遺伝子診断と遺伝子カウンセリングの整備推進

遺伝子診断は、診断の確定や予後の判定、臨床表現型との関連解析、遺伝カウンセリング、将来の治療法の適応など重要な情報を供給することができるが、現段階ではその体制が十分に整っていない。そこで現在稼働しているPLP1遺伝子診断システムをさらに発展させ、すべての疾患原因遺伝子(SOX10、GJA12、DRCTNNB1Aなど)の解析を行っていけるような体制を神奈川県立こども医療センターと国立精神・神経医療研究センターに作る。

B. 病態解明と治療法開発に向けた基盤整備と基礎研究の推進

(1) リンパ芽球および皮膚線維芽細胞など生体試料の登録・保存

本研究の大きな役割の1つは治療法開発への基盤作りである。昨今のゲノムワイド解析や再生医療に関する技術革新は、様々な疾患に応用できる共通の

プラットフォームを持っており、従って高品質な疾患特異的な生体試料バンクを確立することが、これらの技術を病態の解明や治療法開発のために応用するための重要なカギになる。

そこで、引き続き疾患特異的な生体試料の収集を行う。ゲノムワイド解析による新規の疾患原因遺伝子の同定あるいはゲノム組換え機序の解明のための末梢血リンパ芽球株化とiPS技術の応用を見据えた皮膚線維芽細胞の収集・登録を国立精神・神経医療研究センターが中心となって行う。既にリンパ芽球は50家系の蓄積があり、さらに実態調査で見いだされた症例からの収集を目指す。また慶應大岡野教授らと共同研究でPMDの線維芽細胞からiPS樹立をすすめてきたが、本年度は研究班の中でもiPS細胞の樹立と病態解析への応用を行う。さらに国内剖検脳標本を収集し、新たな病態に関する知見の組織学的実証を行う。

(2) 治療法開発へ向けた基礎研究のための基盤整備

培養細胞や疾患モデル動物を用いた病態解明と治療法開発のための基盤を確立する。不死化細胞あるいはオリゴデンドロサイト初代培養細胞への疾患遺伝子の導入等により、試験管内での薬物ライブラリーのスクリーニング、薬理病態の解明や薬物効果の分子基盤の解明を進める。またPMDモデルマウス2系統、PCWHモデルマウス1系統を飼育し、治療薬の投与後の組織病理や電顕などの効果判定の実験系を確立している。放射線医学研究所青木博士と共同で動物用7T-MRIを用いた分子イメージングによる病態解析やクルクミンを含む複数の候補薬物を用いた治療研究を行う。

(3) 国際共同研究による海外の診療および研究実態の把握

欧米の研究者との共同研究を推進し、諸外国における医療の実態を把握する。既に仏INSERMのBoespflug-Tanguy教授らの大脳白質変性症コンソーシアム、米国PMD基金との連携し、臨床情報の交換やDNA検体の供与をうけるなど共同研究を開始しており、今後、患者登録データベースの共有や患者会への参加などを推進する。

3. 研究結果

A. 臨床の実態の把握調査と診断の推進のための研究

(1) 全国疫学調査の結果の集計とフィードバック

一昨年度、昨年度の報告書にて、全国実態調査に関する立案と実施についての詳細を報告したので、ここでは概要についての記載にとどめる。調査の立案は、「難病の患者数と臨床疫学像把握のための全国疫学調査マニュアル(第2版)」(2006年8月研究代表者 永井正規)の手法に基づいて行い、調査対象の選定や調査票の内容、さらに倫理審査などの具体的な手法の決定や作業内容を取り決めた。一次調査票は対象患者の有無のみを記載し返信する葉書による形式を用いて行い、患者有り回答のあった施設に、二次調査表を送付した。一次調査の対象施設は、小児神経学会の協力を得て、小児神経科専門医が所属する全国の医療・療育施設を抽出し、これに大学病院小児科および全国の重症心身障害児施設などを加え、合計約918施設に対してとした。調査票をH21年11月に発送し、約7割の回答率で一時調査票が回収された。

一次調査の結果、患者を有りとの回答が95施設よりあり、合計168名の対象患者が同定された。そこで、こ

これらの施設に対し二次調査表を発送し、二次調査を行った。その結果、65.8%の回収率で二次調査表が回収された。これらの結果の詳細の一部については、昨年度の分担研究報告書で報告した。

本年度は、解析を終了した。本年度分の結果の詳細については、分担研究報告書に記載した。これらの結果の概要に関する資料を作成し、調査協力者に対して研究協力への礼状とともに送付した(資料2)。また、調査の結果を日本小児神経学会総会、及び米国人類遺伝学会にて発表した。さらに、現在英文論文としてまとめているところであり、近日中に投稿・採択を目指す。この全国疫学調査から得られたデータは、今後難治性疾患の医療及び厚生労働行政の資料としておおいに活用されるべきものであると同時に、国際的にも報告する価値の高いものと考えている。

(2) 画像解析と遺伝子診断を含めた診断基準と治療指針の確立

一昨年に先天性大脳白質形成不全症の診断基準と疾患分類、そして治療指針を作成し、同年度の報告書に公表した。さらに昨年度、診断基準と疾患分類の内容の一部、改訂した。この際の最も大きな改訂は、疾患分類に関するもので、H21年度版では10疾患に分類されたが、H22年度版は1疾患追加となり、11疾患となった。追加された疾患は、「小脳萎縮と脳梁低形成を伴うび慢性大脳白質形成不全症」で、この疾患は2009年に佐々木らによって提唱されたもので、新しい疾患概念ながら、既に学会などでこの疾患に該当すると思われる症例の報告もある。従って、早い段階で疾患分類に記載することにより、本邦でのこの新しい疾患の症例の同定と症例の蓄積を推進することは、意義深いと考えた。

診断基準と疾患分類、そして治療指針は、臨床現場で活用してもらって初めてその存在意義が出てくる。そこで、本年は先天性大脳白質形成不全症の患者を診察する機会が最も多いと思われる小児神経科医師にこの診断基準、疾患分類および治療指針の存在を広く周知するための活動を、昨年を引き続き行った。先天性大脳白質形成不全症の診断基準と疾患分類を含めた総説を作成し、日本小児神経学会の学会誌である「脳と発達」にて公表された。この雑誌は、小児神経学会員全員に頒布されるものであり、本邦の小児神経科医師への認知を高めるためには非常に効果的と思われる。実際に本編の公表後、遺伝子解析の依頼が増えた。また、学会誌として常に閲覧できるものであることも重要である。

(3) ウェブサイトの作成と公開

昨年度末に本疾患に関する情報発信の場として、ウェブサイトの作成し、公開した(資料4)。ウェブサイトには、先天性大脳白質形成不全症に関する一般的な解説に加え、診断基準、治療指針など、医療者向けの情報や、遺伝子診断に関する案内、研究班および班員の紹介、さらには市民公開セミナーに関する予告や報告、さらに海外での臨床研究の動向などの紹介も行っている。今後、患者家族会のウェブページも併設し、医療、研究者と患者家族の間のコミュニケーションの場として、その役割を果たすように充実させていきたい。

(4) MRI 画像の収集とデータベース化

頭部MRI画像は、先天性大脳白質形成不全症の診断のために必須の検査である。その重要性は、本疾患群といわゆる古典的な白質変性症にみられる髄鞘の破壊像(脱髄)との鑑

別としてのみならず、本疾患群の中での鑑別診断のため、そして髄鞘低形成の程度による疾患の重症度の判定にも用いることができるため、臨床的な有用性が非常に高い。しかしながら、本疾患は稀少性疾患であるため、多くの症例について臨床情報を含むMRI画像を一元的に検討することが困難であり、MRIの比較検討から新たな知見を見いだすという機会がない。そこで、疫学調査で得られた患者の所在情報を活かし、2次調査に協力を得ることができた施設に対して、新たに疫学調査で報告された症例に関するMRI画像の収集への協力を要請した。倫理審査は国立精神・神経医療研究センターにおいて、実施、承認された。二次調査で見いだされた102例の症例の主治医に対して、協力依頼書と手順書を発送し、これらの症例のMRI画像データを匿名化（個人情報削除）した後、CDに入れた後、返送してもらえるように依頼した。平成24年3月の段階で、約30症例の収集に成功している。今後、臨床情報とあわせて、データベース化を進めていく予定である。

(5) 患者家族や看護療育スタッフを対象とした公開セミナーの開催

一昨年度、昨年度に引き続き、本年度も患者家族や養護学校職員や医療スタッフを対象とした市民公開セミナーを開催した。本年度は、これまでと趣向を変え、東京青山にあるこどもの城研修室で行った。これまでの公開セミナーでは、こどもたちが退屈してしまう、というのが問題点であった。こどもの城は、障害児も含め、こどもたちが安全に思い切り遊ぶことができるように配慮されているユニークな施設であることか

ら、今回利用を決めた。開催はH23年7月16日（土）であった。詳細については、分担研究報告書に記載した。

参加者は、27家族78名で、今回も広く日本全国から家族らの参加者を得ることが出来た。昨年のセミナーの後に、正式に発足した患者家族会のネットワークにより、公開講座開催の情報が伝達されたこと以外に、小児神経学会での口演発表の中での周知やパンフ（資料3）の配布などにより、セミナー開催についての情報が周知された。

セミナーは、前後半に分かれ、前半では3名の講演を行ったが、今年は班員以外の招待講演を2題行ったことも新たな試みであった。1題は先天性大脳白質形成不全症の皮膚線維芽細胞を用いて疾患特異的iPS作成を行っている最先端の研究者、もう1題は自身が重度心身障害児の母親であり、障害児の遊びに関する実践活動を行っている元小学校教諭と、非常にバラエティに富む内容とした。後半は、例年通り家族を中心に据えたQ&A形式で行った。また、昨年度正式に発足した患者家族会の運営に関する話し合いも同時に行われた。

本年度のセミナーでは、いくつかの点で特徴的であった。講演では、研究代表者により、研究班の研究成果の報告を行うことにより直接的な情報発信の場として、家族と研究班の間のコミュニケーションを取ることができた。また、上述の2題の招待講演により、外部の研究者や実践活動の当事者の話を聞く機会を作れたことも意義深かった。

また、昨年にも増して、患者家族の間でのコミュニケーションが広がり、活発な意見交換が出来たことである。発足したばかりの家族会のネットワー

クが徐々に成熟していることを知ることができた。

このセミナーは、疾患が稀少であるために、なかなか顔をあわせて話をすることが出来ない、家族同士のコミュニケーションを育てる有意義な機会となっていることは間違いがない。研究班の存続に関わらず、H24年度も、継続してこのセミナーを開催する予定である。

(6) 遺伝子診断と遺伝子カウンセリングの整備推進

本研究課題は、国立精神・神経センター倫理委員会、神奈川県立こども医療センター、東京女子医科大学、九州大学の各施設での倫理委員会の承認のもと、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠して行なっている。

従来より行っている *PLP1* 遺伝子の解析については、神奈川県立こども医療センターにて、継続して検体の受け入れ、保険診療の一部として解析を行った。一方で、*PLP1* 以外の遺伝子の解析も推進した。特に、昨年度の疾患分類の改訂で追加した「小脳萎縮と脳梁低形成を伴うび慢性大脳白質形成不全症」について、原因遺伝子 *POLR3A/B* の同定を目指した研究を横浜市立大学遺伝科の松本教授らのグループと行い、次世代型シーケンサーを用いたエクソーム解析によりこれを同定し、世界に先駆けて報告したことは、新たな疾患遺伝子の同定をしたということのみならず、原因遺伝子の同定から疾患概念の確率に至ったという点においても、重要な成果であった (Saitou et al. *AmJHumGenet* 2011)。

遺伝カウンセリングに関しては、欧米においてオンラインによる遺伝性疾患に関するエンサイクロペディアとし

て広く利用されている GeneReviews の日本語訳版について、Pelizaeus-Merzbacher 病に関するセクションを分担研究者の黒澤が担当した。近日中に脱稿し、本プロジェクトを総括している信州大学のウェブサイトにはアップされる予定である。研究班のウェブサイトからもリンクを張り、情報提供を進める予定である。

B. 治療法開発に向けた基盤整備と基礎研究の推進

(1) リンパ芽球および皮膚線維芽細胞など生体試料の登録・保存

本研究課題は、国立精神・神経センターおよび神奈川県立こども医療センターでの倫理審査を行ない、承認を得て行なっている。

リンパ芽球は、遺伝子診断を目的に採取された血液検体を用いて行う。全国実態調査で見いだされた症例、あるいは班員の所属施設で *PLP1* の変異が見いだされなかった症例について、*PLP1* 以外の疾患遺伝子の検索、さらには新規疾患原因遺伝子の同定に向けての解析を行った。その結果、Allan-Herndon-Dudley 症候群を疑う一例について *SLC16A2* 遺伝子の解析を行ったところ、1 アミノ酸残基の欠失を伴う変異を同定した。本疾患は、本邦での報告例がまだ数例しかなく、非常に貴重な報告となる。

皮膚線維芽細胞は、iPS 細胞化とこれを用いた病態解明や治療法開発のために重要な試料となる。昨年度、慶應大学生理学の岡野教授のグループに供与された皮膚線維芽細胞からは iPS 細胞が作成され、現在、分化誘導実験が岡野教授らのグループにより行われている。これらの研究の途中経過に関して、本年度の市民公開セミナーで、岡野研の沼澤医師により患者家族向けの講演として報告された。最先端の研究

成果をリアルタイムに患者家族にわかりやすく話をする機会が持てたのも、この班の特徴であると思われる。さらに、先天性大脳白質形成不全症の iPS は、東京女子医科大学山本分担研究者の研究室でも開始され、3例の異なる PMD 患者の皮膚線維芽細胞から樹立された iPS 細胞を用いた遺伝子発現解析が行われ、その成果の一部が、日本人類遺伝学会で報告された。PLP1 が iPS 細胞では、非常に高発現されていること、変異によって発現量が異なることなどが、初めて報告された。同様に、国立精神・神経医療研究センターでも 1例の PMD 症例から iPS 細胞が樹立され、変異の分子病態に関する知見に関して、同様に日本人類遺伝学会で報告された。今後、本疾患群に特異的 iPS 細胞がさらに作成され、その分子病態の解明が進むことが期待される。

昨年度より開始した剖検脳標本の収集は、昨年度 3 症例の剖検脳パラフィンブロック標本の提供を受けることが出来たが、本年度は新たな症例の収集をすることができなかった。この一因として、倫理審査の際に、広く剖検脳の提供を呼びかけるための調査に関して、一括して倫理承認が得られず、研究計画を一部断念したことがあげられる。今後、研究プランの再考慮が必要と考えられる。

(2) 治療法開発へ向けた基礎研究の推進

一昨年に度確立した薬物スクリーニング、治療効果の評価、分子薬理基盤の解明のためのオリゴデンドロサイト初代培養や PMD モデルマウスを用いた実験系を用いて、基礎研究を進めた。

● **PLP1 点変異に対するクルクミンの治療効果** 本年度は、昨年度から継続して行っている PLP1 点変異による PMD に対する治療薬候補として、

研究を行っているクルクミンやその他の小胞体ストレス反応を修飾する化合物の同定や効果の検証などを、培養細胞や疾患マウスモデルを用いて行った。以前、PLP1 変異マウス MSD に投与して一定の治療効果を得たクルクミンについて、その分子薬理動態を明らかにするため、HeLa 細胞を用いた変異型 PLP1 強制発現系を用いて培地中に投与したクルクミンの治療効果、変異蛋白の細胞内局在の変化に関して検証を行った。クルクミン投与は、変異体 PLP1 蛋白の小胞体内の局在を変化させるという細胞生物学的な所見は得られなかった。昨年度からの所見を総合すると、クルクミンはオリゴデンドロサイトの細胞死を抑制し、MSD マウスの寿命を延長するという治療効果を発揮するものの、その分子薬理動態、特に小胞体ストレスに対する薬理動態に関しては、優位な所見は得られなかった。また、クルクミンの持つ抗炎症作用などについても若干の検討を加えたが、明らかな所見は得られなかった。これらの所見をまとめた論文が受理された(Yu et al. *MolGenetMetab*, in press)。

● **PLP1 点変異に対する抗マラリア薬の治療効果** PLP1 点変異の対する治療薬の開発研究として、抗マラリア薬として知られているある薬物の効果について、細胞を用いた研究を行った。この薬物はライソゾームの機能を抑制することが知られているが、これとは別に細胞の翻訳を抑制し、これが薬理作用として変異型 PLP1 蛋白の産生を抑制し、細胞を小胞体ストレスから防御することを明らかになった。疾患モデルマウス MSD に腹腔内投与したところ、脊髄における小胞体ストレスの抑制と同時に PLP1 および MBP 遺伝子の発現上昇を認め、オリゴデン

ドロサイトの生存を促進する可能性が示唆された。

● **オートファジーを標的とした PLP1 重複の治療薬候補の探索** 一方、昨年から行っている重複に対する治療法開発研究を継続した。PLP1 重複の分子病態として、過剰発現された PLP1 タンパクがライソゾームに蓄積していることが知られている。我々はライソゾームを介して不要タンパクを分解する細胞内タンパク除去装置オートファジーに焦点を当て、これを修飾する化合物を見いだすことにより、重複変異による PMD の治療薬候補を同定することが出来るのではないか、と考え、昨年度、HeLa 細胞に GFP 融合 LC3 タンパクを安定発現させた細胞株を用いて、オートファジー活性化検出系の確立を行った。LC3 はオートファジー関連分子で、その活性化によって、細胞質からオートファゴソームに移動する。従って細胞内でオートファジーが活性化すると、蛍光シグナルがび慢性から顆粒状に変化するので、これを可視的に検出することが出来る。本年度は、約 140 種の食品化合物ライブラリーについて、この検出系を用いてオートファジーを活性化する薬剤のスクリーニングを行った。その結果、4 種類の化合物について、陽性コントロールとして用いたラパマイシンと同様の所見を得ることができた。今後、これらの薬物について、その薬理動態や PLP1 重複に対する治療薬候補としての可能性について検討する予定である。

● **動物用 7 T-MRI を用いた画像病態研究** 放射線医学総合研究所との共同研究により、動物用高性能 MRI を用いた画像解析研究を引き続き行った。一昨年度開始した PLP1 点変異マウス MSD の解析に引き続き、昨年度

年度より PLP1 重複のモデルである PLP1 トランスジェニックマウスを用いた MRI 解析を行った。また、MBP 遺伝子変異による髄鞘形成不全症モデルマウス Shiverer マウスの解析を追加した。これらについては、分担研究者高梨潤一が中心となり解析を行っており、結果の詳細は分担研究報告書に記載されている。この研究成果の一部は、本年、論文として発表された (Takanashi et al. *J Magn Reson Imaging* 2012)。

(3) 国際共同研究による海外の診療および研究実態の把握

仏 INSERM の Boespflug-Tanguy 教授らと行っている PMD のゲノム病態解明に関する共同研究は、アレイ CGH を用いたゲノム組換え機序の解明に向けて、研究を継続している。

また米国の PMD 基金の世話役でもあり、PMD 研究の第一人者でもある Hobson 博士と米国で会い、家族会運営などに関する情報を交換した。今後、米国の PMD 基金との連携についての話し合いを行った。また、米国で行われている PMD 患者への幹細胞移植治療についての最新の情報を得た。これらの情報は、班会議や公開セミナーなどで班員および家族会に伝えた。

4. 考察

本年度は、3 年計画の最終年度に当たり、研究成果のまとめと今後への発展への道筋を具体的に示す必要がある。

臨床研究では、診断基準と疾患分類の作成や疫学調査などの本研究課題の必須課題であったが、これらについては、報告と周知を含めて、目標を達成できた。

公開セミナーは、回を追うごとに充実し、単なる患者家族への情報提供のみならず、家族間のネットワークの構

築を通じての患者家族会の設立に大きく寄与することができた。また、患者と研究者とのネットワークも同時に構築されており、ウェブサイトの公開とともに、今後も更なる発展的な展開が期待される。

頭部 MRI 画像の収集とデータベースの構築に関しては、本邦でも他に類を見ない研究として、今後の発展が期待される。

遺伝子解析については、小脳萎縮と脳梁低形成を伴うび慢性大脳白質形成不全症の新規疾患遺伝子 POLR3A/B の同定という大きな成果があった。今後、この遺伝子の機能解析や病態解明を通じて、治療法の開発へつなげていきたい。

一方、基礎研究では、生体試料の収集については、iPS細胞の樹立が進み、これを利用した病態解明研究や治療法開発への足がかりがより確実なものとなった。実際に複数の班員の研究施設で疾患 iPS を用いた研究が進行しており、今後の成果が期待される。

病態解明と治療法開発研究は、クルクミンに加え、複数の異なる分子病態に対する治療法開発研究が進行しており、今後の実用化に向けた研究の発展が期待される。

5. 結論

本研究は、先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に大きな進歩をもたらすことを目的とする。一稀少疾患に焦点を当て、診断あるいは疫学といった臨床の基盤的な研究、遺伝子診断などの応用医療、そして治療法開発に向けた基礎研究といった幅広い領域についての縦断的な研究を継続的に行なっている。本研究で得られた成果は、次に挙げるような重要な意義を持つと考える。

A. 短期的意義

先天性大脳白質形成不全症罹患患者の多くは、これまで疾患に関する統合的な情報が少なく、的確な診断とこれに基づく治療や療育が困難であった。本研究により、難病に関する厚生労働行政上での施策に役立つ疫学情報や医療実態などの基本的な情報を得ることができた。また、臨床実態の把握と診断基準の策定、さらに遺伝子診断や画像診断の推進、治療指針の策定により、本邦での本疾患に対する認知度の向上、さらに医療と福祉の充実を図ることができたと思われる。臨床現場に即した成果として、特に市民公開セミナーを通して患者家族を中心としたネットワーク作りや欧米の患者団体を通しての情報提供などの患者と医療者の双方向性のネットワークを構築することができた。

B. 長期的意義

本疾患に対する病態解明および治療法の開発への戦略が具体的に始動し、基礎的な研究の成果が得られた。線維芽細胞など生体試料から作製する iPS 細胞を用いた病態解明あるいは治療法の開発、さらに薬剤スクリーニング系開発による候補治療薬の発見や、動物モデルの維持と解析系の確立による治療薬の有効性の検証等が期待される。今後これらの研究をさらに進めることにより、患者サポートから臨床研究、さらに治療法開発研究まで一体化した有機的な体制のもとで進展することが期待される。これらの研究より、稀少疾患に苦しむ重症心身障害者患者と家族、そしてそれを取巻く医療・療育・福祉に対する統合的アプローチとしての難病研究のスタイルを提示し得る。

6. 健康危険情報

特記事項無し

7. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

先天性大脳白質形成不全症の全国実態調査（第3報）

井上 健¹、沼田有里佳¹、有馬恵里子¹、小坂 仁²、黒澤健司³、高梨潤一⁴、
出口貴美子¹、山本俊至⁵、岩城明子⁶

1 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第二部

2 神奈川県立こども医療センター 神経内科

3 神奈川県立こども医療センター 遺伝科

4 亀田メディカルセンター 小児科

5 東京女子医科大学 統合医科学研究所

6 九州大学 生体防御医学研究所

研究要旨

先天性大脳白質形成不全症の患者数と診断・治療の実態を把握することを目的として、全国実態調査を行った。疫学班と協力し、日本小児神経学会の共同研究支援の指定を得て、専門医所属施設を中心に918施設に郵送によるアンケート調査を行った。一次調査による患者数と診断の把握、二次調査による詳細な臨床情報の解析を行った。最終的な集計の結果、101名の先天性大脳白質形成不全症の患者を同定した。昨年度の報告では、有病率や発生率などの疫学的なや臨床あるいは遺伝子診断に関する情報を明らかにした。本年度は、個々の症例の臨床症状に関する記載を詳細に検討した。その結果、眼振、低緊張、痙性四肢麻痺の頻度が高い事が明らかになった。さらに、遺伝子型、具体的には *PLP1* 遺伝子変異のある患者とない患者に分類し、その臨床経過の変化について検討したところ、*PLP1* 遺伝子変異のある患者は、経過の中で眼振、低緊張を頻度が高いが、これらの症状は後に一定の割合で消失する一方で、変異のない患者ではこういった症状の頻度の変化は見られない事が明らかになった。これまでに明らかになった本邦における先天性大脳白質形成不全症に関する推定患者数、有病率、罹患率などの基礎統計情報や診断の現状と合わせ、先天性大脳白質形成不全症に関する実態像が明らかになった。これらの情報は、今後先天性大脳白質形成不全症を始めとする希少性難治性疾患の厚生労働行政の基礎的資料として、活用されることが期待される。

1. 研究目的

先天性大脳白質形成不全症は、遺伝性の中枢神経系髄鞘の形成不全を本態とする重篤かつ稀な神経疾患の一群である。代表的疾患として Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) が知られている。*PLP1* をはじめ、いくつかの原因

遺伝子が同定され、病態が明らかになっているが、その一方で、臨床的には遺伝子検索はおろか診断未確定の患者も多いと考えられている。しかし、これまで、先天性大脳白質形成不全症の患者数や診断、治療、予後の現状など本邦における疫学的な知見が全くな

く、厚生労働行政の基盤となる情報が存在しなかった。そこで本研究では、全国疫学調査を実施することにより、本邦の先天性大脳白質形成不全症患者の実態を把握することを目的に、一昨年度より調査を開始した。本年度は3年目となり、個々の症例の臨床症状の解析を中心に行った。

2. 研究方法

全国実態調査の方法については、昨年度の報告書に詳細を記したので、ここでは概要のみとする。本研究は、研究代表者の所属施設での倫理審査を行い、承認を得た。さらに、日本小児神経学学会から本研究に対する共同研究支援の指定を得た。対象は、小児神経科専門医を有する全国の医療・療育施設を中心に、大学病院小児科および全国の重症心身障害児施設などの計918施設に対して、抽出率100%でアンケートによる調査を行った。

調査は、一次調査と二次調査の二段階で行うこととした。一次調査では葉書による簡便な調査票により行い、罹患の有無を把握した。次に二次調査では、患者有りの施設に対して、個別に詳細な調査票を送付し、臨床実態情報の収集を行った。さらに、これらの症例に関して、希望があるものに関しては、遺伝子診断の推進、生体試料の登録を進める予定である。昨年度は、一次調査票の発送、回収、および集計と二次調査の発送、回収までを行った。今年度は引き続き、二次調査票の回収と集計、結果の解析を行った。

倫理審査、調査票の作成および送付に関しては、昨年度の報告書に詳細を記載したので、ここでは割愛する。

3. 研究結果

A. 調査結果について

本年度は、二次調査によって得られたデータに関する詳細な検討を行った。まず、集計内容の照らし合わせから、同一症例が複数施設から重複して登録されている可能性があるものを複数見だし、これらに基づいて基礎情報の修正を行った。この修正は、本来早い段階で行われるべきであった。この修正は、イニシャルと生年月の照らし合わせにより確認されたことから、これらの情報を調査項目に含むことが、調査を正確に行う上で重要であることが改めて証明された。イニシャルの記載に関しては、倫理委員会で不適切との指摘を受けながらも、他の難治性疾患克服研究事業での疫学調査における使用実績をあげ、なんとか承認にこぎ着けたこともあり、今後、この実績を他の研究課題での倫理審査に反映させていきたい。

また、手間のかかる二次調査に協力していただいた医療施設の医師へは、謝辞とともに調査結果の概要を送付した(資料2)。今後、頭部MRI画像データの収集や、遺伝子解析研究の推進など、様々な研究課題において、継続的に接点を持っていきたいと考えており、そのためにも研究結果のフィードバックは重要な作業の一つと考えている。

本年度は、個々の症例の臨床情報に関する詳細な検討を行った。臨床症状の特徴に関しては調査時までに見られたことがある症状について集計したところ(101名)、最も頻度が高かったのは眼振で、74%の患者で、経過中に観察されていた。ほかに低緊張を71%、錐体路徴候として現れる深部腱反射の亢進、痙性、四肢麻痺をそれぞれ61%、58%、55%の患者で認めた。難聴を24%に認めたが、これは聴性脳幹反応での異常所見を反映している可能性がある。その他、固縮を20%に、ジス

トニアを14%に、小脳失調を21%に、アテトーシスを11%に、痙攣を26%に認めた。

次に、これらの症状について、*PLP1* 遺伝子変異のある患者(47名)とない患者(22名)に分け、それぞれの頻度を比較したところ、眼振と低緊張については*PLP1* 遺伝子変異のある患者で有意に頻度が高いことが明らかになった。すなわち、眼振は*PLP1* 遺伝子変異ありで91%、*PLP1* 遺伝子変異なしで55% ($p=0.0008$)、低緊張は*PLP1* 遺伝子変異ありで79%、*PLP1* 遺伝子変異なしで55% ($p=0.0049$)であった。一方、固縮とジストニアに関しては、逆に*PLP1* 遺伝子変異のある患者で頻度が低いことが明らかになった。すなわち、固縮は*PLP1* 遺伝子変異ありで11%、*PLP1* 遺伝子変異なしで32% ($p=0.04$)、ジストニアは*PLP1* 遺伝子変異ありで6%、*PLP1* 遺伝子変異なしで27% ($p=0.02$)であった。ただし、固縮とジストニアに関しては、統計学的な有意差が少ないため、慎重に取り扱う必要があると思われる。

さらに、長期経過の中での臨床症状の変化について、特に症状の消退に焦点を当てて調べるために、7歳以上の症例についての臨床情報を抽出し、過去に見られた症状と現在は消失している症状について、*PLP1* 遺伝子変異の有無を合わせて集計した。その結果、眼振は*PLP1* 遺伝子変異のある患者では、過去の91%から現在は66%に大きく減少しているのに対し、*PLP1* 遺伝子変異のない患者では、過去から現在まで53%のまま、変化がなかった。同様に、低緊張についても、*PLP1* 遺伝子変異のある患者では、過去の76%から現在は52%に減少しているのに対し、*PLP1* 遺伝子変異のない患者で

は、過去から現在まで40%のままであった。これらの結果より、*PLP1* 遺伝子変異のある患者では、眼振や低緊張の見られる頻度が高いが、経過中に消失することが多いという*PLP1* 遺伝子変異のない患者には見られない特徴があることが明らかになった。こういった所見は、臨床的な観察からある程度、予測されていたことであるが、*PLP1* 遺伝子変異のない患者では当てはまらないことが今回明らかになった。ただし、眼振も低緊張も、多くの患者で認められる臨床所見であることには変わりなく、ある患者の臨床所見から一元的に*PLP1* 遺伝子変異の有無を予想することは困難である。

MRI画像検査は、ほぼすべての症例で実施されており、髄鞘の低形成に基づくと思われるT2強調画像での大脳白質のび漫性高信号は約9割の患者で認められた。一方、先天性大脳白質形成不全症において比較的まれな所見と考えられる大脳の萎縮は19%、小脳萎縮は13%、基底核の萎縮あるいはT2高信号が5%の症例で認められた。

発達の程度に関しては、運動発達と知能発達について、解析を行った。運動発達に関しては、首もすわらない者が37%、首はすわる者が12%、座位がとれる者が19%、支持歩行ができるものが20%、独歩可能が10%であった。一方、知能発達に関しては、発語がないもの56%、1語が可能な者が11%、2語以上が可能な者が10%であった。患者の年齢を考慮した補正が必要であり、この所見から確定的な結論を導き出すことはできないが、一般的に言われているように、先天性大脳白質形成不全症の患者では、知能発達に比べて、運動発達の遅れあるいは停止が重度であるという傾向に矛盾しない所見であると考えられる。

現在、受けている治療内容に関しては、主に対症療法が主となっている。喉頭気管分離術を含む気管切開術を受けている者は12%、噴門形成術、胃瘻を含む経管栄養を受けている者は29%であった。リハビリテーションは57%の患者が実施しており、筋弛緩薬、抗痙攣薬を服用している者が、それぞれ28%、22%であった。ボトックス治療を受けた者は4%であった。

4. 考察

全国疫学調査は、二次調査票の集計と解析を大方終え、その結果の全体像が明らかになった。

本年度は、主に個々の症例の臨床症状に関する解析を行った。先天性大脳白質形成不全症の患者に見られる頻度の高い症状は、眼振、低緊張、錐体路徴候であった。*PLP1* 遺伝子変異の有る症例では、無い症例に比べて、眼振と敵緊張の頻度が高いことが明らかになった。また、長期経過の中での臨床症状の変化については、*PLP1* 遺伝子変異の有る症例のみで、眼振と低緊張が消退する傾向にあることが明らかになった。

頭部 MRI 所見では、先天性大脳白質形成不全症の患者で共通してみられる大脳白質の所見以外に、大脳皮質の萎縮や、小脳の萎縮、基底核の所見など、頻度は低いが特異的な所見を持つ症例が存在することが明らかになった。こういった症例は、PMD 以外の先天性大脳白質形成不全症である可能性が高く、特にまだ疾患概念が確立されていない新規の疾患である可能性もあるため、少数例ではあるがさらに詳細な検討を進めていくことが重要であると考えられた。

治療面では、外科的処置を伴うライフラインのケアとリハビリテーション、

そして対症療法としての薬物投与が行われていることが明らかになった。先天性大脳白質形成不全症には、現段階で根治療法がないことから、すべての治療はこれらの対症療法に限定される。今後、治療法開発に関する基礎研究から、本疾患の治療に寄与することができる成果が出てくることが望まれる。

5. 結論

本邦で初めてとなる先天性大脳白質形成不全症の全国実態調査により、患者数、診断・治療の実態を明らかにした。本年度は、臨床症状に関する検討などを行い、これをもってすべての解析を終了した。これらの情報は、今後、本疾患を始めとする希少性難治性疾患に関する厚生労働行政のための重要な資料となると思われる。また、今回の調査により見いだされた先天性大脳白質形成不全症の患者の中には、確定診断に至っていない者も多くいると思われる。今後、本研究班で体制を整えていく *PLP1* 以外の遺伝子解析により、こういった症例の診断も可能になると思われる。

6. 研究発表

A. 論文発表

なし

B. 学会発表

(1) 井上 健, 岩城明子, 黒澤健司, 高梨潤一, 出口貴美子, 山本俊至, 小坂 仁 先天性大脳白質形成不全症の診断基準と疾患分類の作成 第53回日本小児神経学会 横浜 2011年5月26日

(2) 沼田有里佳, 岩城明子, 小坂 仁, 黒澤健司, 高梨潤一, 山本俊至, 出口貴美子, 井上 健 全国実態調査によ

る先天性大脳白質形成不全症の疫学的研究 第53回日本小児神経学会
横浜 2011年5月28日

(3) 井上 健、岩城明子、黒澤健司、
高梨潤一、出口貴美子、山本俊至、小
坂 仁 先天性大脳白質形成不全症
の統合的研究の推進 第56回日本人
類遺伝学会総会 2011年11月12日
千葉

(4) Inoue K, Numata Y, Ohkubo T,
Arima E, Iwaki A, Kurosawa K,

Takanashi J, Deguchi K, Yamamoto T,
Osaka H. A comprehensive nation-wide
epidemiological survey for Pelizaeus-
Merzbacher disease and associated
disorders in Japan. 2011.10.13 12th
International Congress of Human
Genetics. Montreal, Canada

7. 知的財産権の出願・登録状況
なし