

E. 結論

難治性疾患情報リソースの原型としての GeneReviews の PLP1-Related Disorders の邦訳を試みた。内容は、患者家族は勿論、医療従事者にもわかりやすく、そのフォーマット化された構成が理解を促していると考えられた。難治性疾患の治療法開発は疾患克服の最終ゴールではあるものの、膨大な時間と労力を要する。一方で、疾患の自然歴を明らかにし、情報リソースを整備することは根本治療に結びつかないものの、長期的予後改善には極めて有用である。GeneReviews を参照しつつ、情報リソースの在り方の重要性を再確認した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kurosawa K, Enomoto K, Tominaga M, Furuya N, Sameshima K, Iai M, Take H, Shinkai M, Ishikawa H, Yamanaka M, Matsui M, Masuno M. Spastic quadriplegia in Down syndrome with congenital duodenal stenosis/atresia. *Cong Anom* 2012 (in press)

Kurosawa K, Masuno M, Kuroki Y. Trends in occurrence of twin births in Japan. *Am J Med Genet Part A* 2012;158A:75-77.

Soneda A, Teruya H, Furuya N, Yoshihashi H, Enomoto K, Ishikawa A, Matsui K, Kurosawa K. Proportion of malformations and genetic disorders among cases encountered at a high-care unit in a children's hospital. *Eur J Pediatr* 2012;171:301-305.

Tachibana Y, Aida N, Enomoto K, Iai M, Kurosawa K. A case of

Sjögren-Larsson syndrome with minimal MR imaging findings facilitated by proton spectroscopy. *Pediatr Radiol* 2011 Jun 29. [Epub ahead of print]

Kurosawa K, Tanoshima-Takei M, Yamamoto T, Ishikawa H, Masuno M, Tanaka Y, Yamanaka M. Sirenomelia with a de novo balanced translocation 46,X,t(X;16)(p11.2;p12.3). *Cong Anom* (in press)

Saito Y, Kubota M, Kurosawa K, Ichihashi I, Kaneko Y, Hattori A, Komaki H, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M. Polymicrogyria and infantile spasms in a patient with 1p36 deletion syndrome. *Brain Dev* 2011;33:437-441.

Saitsu H, Osaka H, Sugiyama S, Kurosawa K, Mizuguchi T, Nishiyama K, Nishimura A, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Harada N, Kato M, Matsumoto N. Early infantile epileptic encephalopathy associated with the disrupted gene encoding Split-Robo Rho GTPase activating protein 2 (SRGAP2). *Am J Med Genet Part A* 2012;158A:199-205.

黒澤健司 確定診断とその進め方 遺伝子医学 MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」 福嶋義光編 メディカルドゥ p58-9, 2011.7 大阪

黒澤健司 先天奇形、先天奇形症候群、Dysmorphology 遺伝子医学 MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」 福嶋義光編 メ

ディカルドゥ p76-9, 2011.7 大阪
黒澤健司 予想外の結果が得られた場

合：次世代シーケンス 遺伝子医学 MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」 福嶋義光編 メディカルドゥ p345-7, 2011.7 大阪

学会発表

黒澤健司、石川亜貴、和田敬仁、小坂仁 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)の臨床応用 第 53 回日本小児神経学会 2011.5.26-27. 横浜

Kurosawa K, Enomoto K, Furuya N, Ishikawa A, Tominaga M, Wada T, Masuno M, Kuroki Y. Estimation of prevalence of malformation syndrome by population-based birth defects monitoring system in Japan. European Human Genetics Conference 2011. 2011.5.28-31. Amsterdam RAI, The Netherlands.

富永牧子、榎本啓典、石川亜貴、古谷憲孝、吉橋博史、黒澤健司 全サブテロメア MLPA 法による多発奇形/精神遅滞 (MCA/MR) の変異スクリーニング 第 114 回日本小児科学会 2011.8.12-14. 東京

黒澤健司、榎本啓典、古谷憲孝、石川亜貴、富永牧子、和田敬仁、升野光雄、黒木良和 先天異常モニタリング調査および遺伝外来受診例による先天奇形症候群発生頻度の推定 第 114 回日本小児科学会 2011.8.12-14. 東京

島貴史、榎本啓典、古谷憲孝、黒澤健司、竹内麻希、関藍 先天代謝異常症を明らかにした、横紋筋融解症を繰り返した染色体複雑構造異常の 1 例 第 114 回日本小児科学会 2011.8.12-14. 東京

石川亜貴、富永牧子、榎本啓典、古谷憲孝、上田秀明、康井制洋、黒澤健司 高分解融解曲線分析法 (HRM) による Marfan 症候群原因遺伝子 FBN1 変異スクリーニング

黒澤健司、塩味正栄、浜之上聡、永井淳一、齋藤敏幸、榎本啓典、富永牧子、古谷憲孝、升野光雄、気賀沢寿人 del(1)(p22.3p22.1) により Diamond-Blackfan 症候群と好中球減少を呈した 1 女性例. 第 56 回日本人類遺伝学会 2011.11.9-12. 千葉

石川亜貴、田中藤樹、重富浩子、続晶子、黒澤健司 頭蓋骨早期癒合を呈した 7 番染色体短腕中間部欠失の女児例. 第 56 回日本人類遺伝学会 2011.11.9-12. 千葉

榎本啓典、菅原祐之、富永牧子、古谷憲孝、安達昌功、水野誠司、山内泰子、升野光雄、近藤達郎、土井庄三郎、水谷修紀、黒澤健司 3q22.3 を含む染色体部分欠失に起因する BPES の臨床像. 第 56 回日本人類遺伝学会 2011.11.9-12. 千葉

黒澤健司、富永牧子、古谷憲孝、和田敬仁、小坂仁、室谷浩二 新しい染色体微細構造異常-15q24 欠失症候群の 1 男児例. 第 313 回日本小児科学会 神奈川県地方会 2011.11.19. 横浜

黒澤健司 希少難病と小児病院遺伝科 公開シンポジウム・成果発表会「難治性疾患の克服に向けて」 2011.7.10. 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況なし。

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

分担研究者：高梨潤一 亀田メディカルセンター小児科・部長

研究要旨

先天性大脳白質形成不全症の病態解明、新たな治療法の開発に向けて脳画像研究を行った。先天性大脳白質形成不全症の代表疾患である Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) において従来行ってきた脳 MRI, MRS 研究の延長として、PMD モデルマウス (Msd マウス、PLP1 トランスジェニックマウス) を放射線医学総合研究所の 7 テスラ MR 装置を用いて撮像した。

MRS では Msd マウスで wild マウスに比して tNAA (NAA+NAAG), creatine, glutamine, glutamate, taurine の高値を、Cho の低値を認めた。NAAG 単独では Msd マウスで高値であったが、十分な信頼度は得られなかった。HPLC による解析で Msd マウス脳において NAA, NAAG とともに wild マウスに比して高値であることが確認された。免疫染色では Msd マウス脳で髄鞘低形成とグリオーシスが明らかであったが、Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) 数には差は認めなかった。

Msd マウスにて tNAA の増加が確認された。この増加は NAA, NAAG 両者の増加を反映していた。NAA は乏突起膠細胞において aspartoacylase (ASPA) の働きで分解される。髄鞘低形成疾患では成熟した乏突起膠細胞が存在せず、NAA が分解されずに蓄積し、二次的に NAAG が高値を呈していると推測された。未診断の白質変性症における tNAA 高値は髄鞘低形成を強く示唆する所見と考えられる。

A. 研究目的

先天性大脳白質形成不全症の神経化学的病態解明、新たな治療法の開発には、モデルマウスを用いた検討が欠かせない。従来、モデルマウスの評価には剖検や行動評価が用いられているが、脳内代謝を非侵襲的に測定することは困難であった。そこで、超高磁場 MRI 装置を用い、PLP1 自然発生変異体の先天性大脳白質形成不全症モデルマウスである Msd マウス、PLP1 遺伝子を組み込んだ PLP1 トラ

ンスジェニックマウスの脳代謝の非侵襲的測定を試みた。

B. 研究方法

1. 対象は 3 週齢の正常マウス (B6C3-WT、雄) と Pelizaeus-Merzbacher 病のモデルマウス (MSD マウス、B6C3-Msd) である。放射線医学総合研究所にて動物実験研究承諾を得たのち、Bruker 社製 7 テスラ MR 装置を用いて T1, T2 強調画像、拡散強調画像、proton MR

spectroscopy (MRS, PRESS 法, TR=2500msec, TE=20msec, NEX 256, VOI=2x2x2mm or 3x3x3mm) を撮像した。MRS は LCModel を用い解析を行った。

両マウス脳の前駆物質 (NAA, NAAG) を HPLC 法にて定量測定した。また両マウス脳の前駆物質 (Mbp, Gfap, Ng2) の染色を施行した。2. PLP4e マウスは、PLP1 遺伝子 (プロモーター 20Kb およびコード領域 19Kb を含む) ゲノムをインサートとして持つコスミドベクター-LoristB をマウス受精卵に導入して作製された Tg の 1 ラインで、2 コピーの PLP1 遺伝子を有する。ホモ、ヘテロ、ワイルド型で同様の方法で画像情報を取得した。

C. 結果

1. MRS では Msd マウスで wild マウスに比して tNAA (NAA+NAAG), creatine, glutamine, glutamate, taurine の高値を、Cho の低値を認めた。NAAG 単独では Msd マウスで高値であったが、十分な信頼度は得られなかった。

HPLC による解析で Msd マウス脳で NAA, NAAG とともに wild マウスに比して高値であることが確認された。免疫染色では Msd マウス脳で髄鞘低形成とグリオシスが明らかであったが、Oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) 数には差は認めなかった。

2. ヘテロの T2 強調画像で白質信号が高信号、低信号の 2 群が認められ、PLP 以外の原因による白質変性が生じていることが想定された。従って他の検査は中止した。

D. 考察

Msd マウスにて tNAA の増加が確認された。この増加は NAA, NAAG 両

者の増加を反映していた。NAA は乏突起膠細胞において aspartoacylase (ASPA) の働きで分解される。髄鞘低形成疾患では成熟した乏突起膠細胞が存在せず、NAA が分解されずに蓄積し、二次的に NAAG が高値を呈していると推測された。未診断の白質変性症における tNAA 高値は髄鞘低形成を強く示唆する画像所見と考えられる。

E. 結論

7T MR 装置を用いた画像解析はマウスにも十分適応可能である。モデルマウス脳代謝の非侵襲的解析が可能となり、新たな治療法の有用性評価などに応用可能と思われる。

G. 研究発表

1. Takanashi J, Saito S, Aoki I, Barkovich AJ, Ito Y, Ken Inoue K. Increased *N*-acetylaspartate in model mouse of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Magn Reson Imaging* 2012; 35: 418-425.
2. Takanashi J, Somazawa F, Maruyama K, Terada H, Xu D, A. Barkovich AJ. Metabolic changes in early childhood using LCModel with corrected water scaling method. *J Magn Reson Imaging* 2012; 35: 174-180.
3. Saitsu H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi J, Hamada K, Yamashita A, Shibayama H, Shiina M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Doi H, Ogata K, **Inoue K**, Matsumoto N. Mutations in *POLR3A* and *POLR3B* encoding RNA polymerase III subunits cause an

- autosomal recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 644-651.
4. Takanashi J, Shirai K, Sugawara Y, Okamoto Y, Obonai T, Terada H. Kawasaki disease complicated by mild encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS). *J Neurol Sci* in press.
 5. Takanashi J, Takahashi Y, Imamura A, Kodama K, Watanabe A, Tominaga K, Muramatsu K, Barkovich AJ. Late delirious behavior with 2009 H1N1 influenza; mild autoimmune-mediated encephalitis? *Pediatrics* in press.
 6. Takanashi J, Hayashi M, Yuasa S, Satoh H, Terada H. Hypomyelination in I-cell Disease; MRI, MR spectroscopy and neuropathological correlation. *Brain Dev* in press
 7. Hoshino A, Saitoh M, Oka A, Okumura A, Kubota M, Saito Y, Takanashi J, Hirose S, Yamagata T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. Epidemiology of acute encephalopathy in Japan, with emphasis on the association of viruses and syndrome. *Brain Dev* in press.
 8. Shioda M, Hayashi M, Takanashi J, Osawa M. Lesions in the central tegmental tract in autopsy cases of developmental disorders. *Brain Dev* 2011; 33: 541-547.
 9. Oyazato Y, Iijima K, Emi M, Sekine T, Kamei K, Takanashi J, Nakao H, Namai Y, Nozu K, Matsuo M. Molecular analysis of *TSC2/PKDI* contiguous gene deletion syndrome. *Kobe J Med Sci* 2011; 57: E1-E10.
 10. Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Imamura T, Takanashi J, Nagata R, Okumura A, Kasii H, Tomita S, Kumada S, Kubota M. Oxidative stress in patients with clinically mild encephalitis/encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS). *Brain Dev* 2012; 34: 124-127.
 11. Hayashi S, Okamoto N, Chinen Y, Takanashi J, Makita Y, Hata A, Inazawa J. Novel intragenic duplications and mutations of *CASK* in patients with mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH). *Hum Genet* 2012; 131: 99-110.
 12. Takanashi J. Wide range of CNS manifestations of rotavirus infection. *Brain Dev* 2011; 33: 9.
 13. Takanashi J. Moyamoya disease in children. *Brain Dev* 2011; 33: 229-234.
 14. Omata T, Takanashi J, Wada T, Arai H, Tanabe Y. Genetic diagnosis and acetazolamide treatment of familial hemiplegic migraine. *Brain Dev* 2011; 33: 332-334.
 15. Hasegawa S, Saito S, Takanashi J, Morokoshi Y, Furukawa T, Saga T, Aoki I. Evaluation of ferritin-overexpressing brain in newly developed transgenic

- mice. *Magn Reson Imaging* 2011; 29: 179-184.
16. Shinohara M, Saitoh M, Takanashi J, Yamanouchi H, Kubota M, Goto T, Kikuchi M, Shiihara T, Yamanaka G, Mizuguchi M. Carnitine palmitoyl transferase II polymorphism is associated with multiple syndromes of acute encephalopathy with various infectious diseases. *Brain Dev* 2011; 33: 512-517.

H. 知的所有権の取得状況 なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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

研究分担者 山本 俊至 東京女子医科大学統合医科学研究所・准教授

研究要旨

研究目的：先天性大脳白質形成不全症においては、主な責任遺伝子である *PLP1* の変異が認められない症例が少なからず存在する。現在わかっているその他の責任遺伝子 *GJC2* や *SLC16A2* にも変異の認められない症例があり、それ以外にも関連遺伝子があると考えられる。そこで、本研究では新規関連遺伝子の同定を目的とした網羅的ゲノム解析を行った。

研究方法：既知の遺伝子に変異が認められなかった症例において、両親サンプルを含めたトリオサンプルを対象として次世代シーケンサーによるエクソン領域のターゲットリシーケンスを行った。

研究結果：患者において *POLR3A* のミスセンス変異が複合ヘテロで認められた。両親はそれぞれの変異の保因者であった。結果を受けて再度患者の臨床症状を確認したところ、成長障害、性腺発育障害、歯牙放出障害が認められ、hypomyelination, hypodontia and hypogonadotropic hypogonadism (4H)症候群に合致していることが明らかとなった。他の原因不明先天性大脳白質形成不全症患者 15 例において *POLR3* のサブユニット遺伝子をサンガー法で解析したが、まったく異常が認められなかった。

結論：今回 *POLR3A* の複合ヘテロで hypomyelination, hypodontia and hypogonadotropic hypogonadism (4H)症候群を発症した患者は、臨床的には Pelizaeus-Merzbacher 病(PMD)の症状とかなり類似しており、疾患概念を熟知していなければ鑑別が難しいと考えられたが、PMD と比較してその頻度はかなり低いと考えられた。従って、*POLR3* 関連の遺伝子以外にも、さらに別の原因遺伝子が存在すると考えられた。

A. 研究目的

先天性大脳白質形成不全症、特に Pelizaeus-Merzbacher 病(PMD)においては、主な責任遺伝子である *PLP1* の変異が認められない症例が少なからず存在する。現在わかっているその他の責任遺伝子 *GJC2* や *SLC16A2* にも変異の認められない症例があり、それ以外にも関連遺伝子があると考えられる。そこで、本研究では次世代シーケ

ンサーを用いたエクソン領域のターゲットリシーケンスを行い、原因遺伝子の探索を行った。

B. 研究方法

(1) 実施計画と経過

これまでに臨床症状から PMD が疑われ、遺伝子解析を実施した 35 例の患者のうち、責任遺伝子として知られている *PLP1*、*GJC2* そして *SLC16A2*

に異常が認められなかった患者のうち、臨床症状を精査して、PMD として矛盾のない 29 歳の女性患者 1 例を対象とした。結果のフィルタリングのために両親検体も含めたトリオサンプルでの解析を行った。

解析には次世代シーケンサーである Life Technologies 社 SOLiD4 を用い、全エクソン領域のターゲティング・リシーケンスによる網羅的な解析 (エクソーム解析) を行った。ターゲティングには Agilent Technologies 社製 SureSelect Target Enrichment システムを利用した。

エクソーム解析によって得られた結果を受け、診断未確定の 15 例を対象として当該遺伝子のリシーケンスをサンガー法により行った。

(2) 倫理面への配慮

本研究においては患者情報に基づく遺伝子解析を行うことから、個人情報に配慮する必要があるため、東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得て、書面に基づく説明と書面によるインフォームド・コンセントを得て実施した。収集される検体には、二重連結可能匿名化番号を付与し、匿名化番号、同意書のコピー 1 部、および患者情報票のコピー 1 部について個人情報管理者が管理した。個人情報と匿名化後の ID を連結する対応表はコンピューターの外部記憶装置に保存し、鍵のかかるキャビネット内で個人情報管理者が保管した。試料等に関するデータベースをコンピューターを用いて取り扱う場合は、インターネットや他のコンピューターから切り離れた状態で取り扱った。

C. 研究結果

SOLiD の解析結果から既知の一塩基多型(SNP)を除外し、1)両親にはな

く、発端者だけに見られる突然変異、2)両親にはヘテロで認められ、発端者でホモ接合として認められる、3)両親には別々のヘテロで認められ、発端者で複合ヘテロ接合として認められる、のいずれかのパターンで認められる変異を抽出し、サンガー法で確認した結果、*POLR3A* における複合ヘテロが確認された。両変異はそれぞれの親から遺伝していることも明らかとなった。

診断がついた患者は頭部 MRI 画像上は PMD とまったく区別がつかない所見を示していた。現在寝たきりの状態であるが、7 歳くらいまでは歩行可能であった。その後運動能力が徐々に低下している。成長障害、性腺発育障害、歯牙放出障害が認められ、hypomyelination, hypodontia and hypogonadotropic hypogonadism (4H)症候群に合致していることが明らかとなった。

POLR3A 遺伝子は *POLR3* のサブユニットの一つであり、他に 7 つのサブユニットが存在している。このサブユニットのエクソン領域を未診断の 15 例を対象として解析したが、まったく異常は認められなかった。

D. 考察

今回未診断の先天性大脳白質形成不全症を示す女性例についてエクソーム解析を行い、*POLR3A* 遺伝子の複合ヘテロ変異を同定した。当初臨床症状からは *PLP1* の変異による PMD とは区別できなかったが、遺伝子診断が確定したことを受けて再度臨床症状を確認したところ、hypomyelination, hypodontia and hypogonadotropic hypogonadism (4H)症候群として矛盾がないことが明らかとなった。疾患概念を熟知していなければ、臨床症状かたの鑑別は困難であった。

今回、遺伝子型が未診断である他の15例の患者においてPOLR3の全サブユニットの遺伝子解析を行ったが、まったく変異は同定できなかった。このことから、先天性大脳白質形成不全症を示す患者のうち、POLR3の変異による hypomyelination, hypodontia and hypogonadotropic hypogonadism (4H)症候群の症例は非常に稀であるということが言える。従って、POLR3 関連の遺伝子以外にも、さらに別の原因遺伝子が存在すると考えられた。

E. 結論

POLR3A の複合ヘテロ変異による hypomyelination, hypodontia and hypogonadotropic hypogonadism (4H)症候群の1例を同定した。POLR3の他のサブユニット変異は認められなかったため、POLR3 関連の遺伝子以外にも、さらに別の先天性大脳白質形成不全症の原因遺伝子が存在すると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. *Yamamoto, T., Shimojima, K., Nishizawa, T., Matsuo, M., Ito, M. & Imai, K. Clinical manifestations of the deletion of Down syndrome critical region including DYRK1A and KCNJ6. *Am J Med Genet A* 155A, 113-119 (2011).
2. Shimojima, K., Okumura, A., Natsume, J., Aiba, K., Kurahashi, H., Kubota, T., Yokochi, K. & *Yamamoto, T. Spinocerebellar ataxias type 27 derived from a disruption of the fibroblast growth factor 14 gene with

mimicking phenotype of paroxysmal non-kinesigenic dyskinesia. *Brain Dev*, (in press).

3. Shimojima, K. & *Yamamoto, T. Growth profiles of 34 patients with Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Ped Genet* (in press).
4. Shimojima, K., Okamoto, N., Inazu, T. & *Yamamoto, T. Tandem configurations of variably duplicated segments of 22q11.2 confirmed by fiber-FISH analysis. *J Hum Genet* 56, 810-812 (2011).
5. *Tohyama, J., Yamamoto, T., Hosoki, K., Nagasaki, K., Akasaka, N., Ohashi, T., Kobayashi, Y. & Saitoh, S. West syndrome associated with mosaic duplication of FOXP1 in a patient with maternal uniparental disomy of chromosome 14. *Am J Med Genet A* 155A, 2584-2588 (2011).
6. Hirose, M., *Haginoya, K., Yokoyama, H., Kikuchi, A., Hino-Fukuyo, N., Munakata, M., Uematsu, M., Iinuma, K., Kato, M., Yamamoto, T. & Tsuchiya, S. Progressive atrophy of the cerebrum in 2 Japanese sisters with microcephaly with simplified gyri and enlarged extraaxial space. *Neuropediatrics* 42, 163-166 (2011).
7. *Okamoto, N., Hatsukawa, Y., Shimojima, K. & Yamamoto, T. Submicroscopic deletion in 7q31 encompassing CADPS2 and TSPAN12 in a child with autism spectrum disorder and PHPV. *Am J Med Genet A* 155A,

- 1568-1573 (2011).
8. Shimojima, K., Okanishi, T. & *Yamamoto, T. Marfanoid hypermobility caused by an 862 kb deletion of Xq22.3 in a patient with Sotos syndrome. *Am J Med Genet A* 155A, 2293-2297 (2011).
 9. *Okumura, A., Yamamoto, T., Shimojima, K., Honda, Y., Abe, S., Ikeno, M. & Shimizu, T. Refractory neonatal epilepsy with a de novo duplication of chromosome 2q24.2q24.3. *Epilepsia* 52, e66-69 (2011).
 10. Yamashita, S., *Okumura, A., Yamamoto, T., Shimojima, K., Tanabe, T. & Shimizu, T. SCN1B is not related to benign partial epilepsy in infancy or convulsions with gastroenteritis. *Neuropediatrics* 42, 135-137 (2011).
 11. *Siggberg, L., Peippo, M., Sipponen, M., Miiikkulainen, T., Shimojima, K., Yamamoto, T., Ignatius, J. & Knuutila, S. 9q22 Deletion--first familial case. *Orphanet J Rare Dis* 6, 45 (2011).
 12. Shimojima, K., Sugawara, M., Shichiji, M., Mukaida, S., Takayama, R., Imai, K. & *Yamamoto, T. Loss-of-function mutation of collybistin is responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy. *J Hum Genet* 56, 561-565, (2011).
 13. Liang, J. S., Shimojima, K., Takayama, R., Natsume, J., Shichiji, M., Hirasawa, K., Imai, K., Okanishi, T., Mizuno, S., Okumura, A., Sugawara, M., Ito, T., Ikeda, H., Takahashi, Y., Oguni, H., Osawa, M. & *Yamamoto, T. CDKL5 alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders. *Epilepsia* 52, 1835-1842 (2011).
 14. *Kitoh, H., Kaneko, H., Kondo, M., Yamamoto, T., Ishiguro, N. & Nishimura, G. Spondylo-metaphyseal dysplasia with cone-rod dystrophy. *Am J Med Genet A* 155A, 845-849 (2011).
 15. Shimojima, K., Isidor, B., Le Caignec, C., Kondo, A., Sakata, S., Ohno, K. & *Yamamoto, T. A new microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination. *Am J Med Genet A* 155A, 732-736 (2011).
 16. *Okamoto, N., Tamura, D., Nishimura, G., Shimojima, K. & Yamamoto, T. Submicroscopic deletion of 12q13 including HOXC gene cluster with skeletal anomalies and global developmental delay. *Am J Med Genet A* 155A, 2997-3001 (2011).
 17. *Tanaka, T., Motoi, N., Tsuchihashi, Y., Tazawa, R., Kaneko, C., Nei, T., Yamamoto, T., Hayashi, T., Tagawa, T., Nagayasu, T., Kuribayashi, F., Ariyoshi, K., Nakata, K. & Morimoto, K. Adult-onset hereditary pulmonary alveolar proteinosis caused by a single-base deletion in CSF2RB. *J Med Genet* 48, 205-209 (2011).

18. Filges, I., Shimojima, K., Okamoto, N., Rothlisberger, B., Weber, P., Huber, A. R., Nishizawa, T., Datta, A. N., Miny, P. & *Yamamoto, T. Reduced expression by SETBP1 haploinsufficiency causes developmental and expressive language delay indicating a phenotype distinct from Schinzel-Giedion syndrome. *J Med Genet* 48, 117-122 (2011).
19. Kibe, T., Mori, Y., Okanishi, T., Shimojima, K., Yokochi, K. & *Yamamoto, T. Two concurrent chromosomal aberrations involving interstitial deletion in 1q24.2q25.2 and inverted duplication and deletion in 10q26 in a patient with stroke associated with antithrombin deficiency and a patent foramen ovale. *Am J Med Genet A* 155A, 215-220 (2011).
20. 山本俊至. 臨床遺伝に関わる人のためのマイクロアレイ染色体検査. 診断と治療社, 東京 (2012).
21. 山本俊至. マイクロアレイ染色体検査の臨床応用. *日小児誌* 116; 32-39 (2012).
22. 山本俊至. 疾患の責任遺伝子に関する研究の進歩. *脳と発達* (in press).
21. 山本俊至 & 下島圭子. てんかん診療最前線 アレイ CGH 法 新技術によるてんかんの遺伝子研究. *Epilepsy: てんかんの総合学術誌* 5, 47-52 (2011).
22. 山本俊至 & 下島圭子. ゲノムコピー数異常と疾患 iPS 細胞を用いた病態解析. *東京女子医科大学雑誌* 81, 215-219 (2011).
23. 山本俊至. 次世代シーケンサーによる遺伝子解析. *小児科* 52, 1591-1597 (2011).
24. 下島圭子 & 山本俊至. 【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. *脳* 21 14, 218-223 (2011).
25. 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 Pelizaeus-Merzbacher 病とその類縁疾患. *脳と発達* 43, 435-442 (2011).
26. 元井奈都紀, 田中健之, 根井貴仁, 森本浩之輔, 土橋佳子, 田澤立之, 栗林太, 山本俊至, 有吉紅也 & 中田光. 疾患形成における標的分子の役割 成人発症の GM-CSF 受容体 common β 鎖発現異常による先天性肺胞蛋白症症例の分子機序. *分子呼吸器病* 15, 106-110 (2011).
2. 学会発表
1. Inoue, K., Numata, Y., Ohkubo, T., Arima, E., Iwaki, A., Kurosawa, K., Takanashi, J., Deguchi, K., Yamamoto, T. & Osaka, H. A comprehensive nationwide epidemiological survey for Pelizaeus-Merzbacher disease and associated disorders in Japan. 12th International Congress of Human Genetics. 2011.10.11-15, Montreal.
2. Yamamoto, T., Shimojima, K., Sugawara, M., Shichiji, M., Mukaida, S., Takamaya, R., & Imai, K. Loss-of-function mutation of collybistin is

- responsible for X-linked mental retardation associated with epilepsy. 12th International Congress of Human Genetics. 2011.10.11-15, Montreal.
3. Okamoto, N., Shimojima, K. & Yamamoto, T. Skeletal anomalies and severe language disorder with submicroscopic deletion in 12q13 including HOXC cluster. 12th International Congress of Human Genetics. 2011.10.11-15, Montreal.
 4. Nishi, E., Mizuno, S. & Yamamoto, T. A novel mutation in GPC3 gene in a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. 12th International Congress of Human Genetics. 2011.10.11-15, Montreal.
 5. Shimojima, K., Isidor, B., Le Caignec, C., Kondo, A., Sakata, S., Ohno, K. & Yamamoto T. A new microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination. 12th International Congress of Human Genetics. 2011.10.11-15, Montreal.
 6. 山本俊至, 下島圭子, 高山留美子, 平澤恭子, 夏目淳, 奥村彰久, 池田浩子, 小国弘量, 今井克美 & 大澤真木子. 小児てんかん脳症における CDKL5 の包括的解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 2011.4.15-17, 東京.
 7. 七字美延, 下島圭子, 今井克美 & 山本俊至. Xq11.1 に位置する ARHGEF9 遺伝子の nullisomy は精神遅滞・てんかんの原因となる. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 2011.4.15-17, 東京.
 8. 那須裕郷, 高山留美子, 今井克美, 井上裕文, 松重武志, 下島圭子, 山本俊至, 高橋幸利 & 井上有史. CDKL5 微小欠損に肺炎球菌感染症を反復した IgG2 サブクラス欠損症の 1 例. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 2011.4.15-17, 東京.
 9. 下島圭子 & 山本俊至. 中枢神経病態解析を目指したダウン症候群患者由来 iPS 細胞の樹立. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 2011.4.15-17, 東京.
 10. 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総会, 2011.5.26-28, 横浜.
 11. 下島圭子, 井上貴仁, 今井由生, 荒井康裕, 藤田貴子, 井手口博, 安元佐和, 廣瀬伸一 & 山本俊至. Pelizaeus-Merzbacher 病患者由来 iPS 細胞の樹立と病態解析. 第 53 回日本小児神経学会総会, 2011.5.26-28, 横浜.
 12. 今井克美, 高山留美子, 美根潤, 那須裕郷, 伊藤智城, 池田浩子, 最上友紀子, 重松秀夫, 高橋幸利, 下島圭子, 山本俊至 & 井上有史. CDKL5 遺伝子異常に伴うてんかんの早期診断の手がかり. 第 53 回日本小児神経学会総会, 2011.5.26-28, 横浜.
 13. 山本俊至, 下島圭子 & 岡本伸彦. Schinzel-Giedion 症候群の原因遺伝子 SETBP1 のハプロ不全は非特異的な精神発達遅滞の原因となる. 第 53 回日本小児神経学会総会, 2011.5.26-28, 横浜.
 14. 山本俊至, 下島圭子, 平澤恭子

- & 前垣義弘. 1p36欠失症候群の本邦における実態と欠失範囲の同定. 第53回日本小児神経学会総会, 2011.5.26-28, 横浜.
15. 西村洋子, 豊嶋大作, 戸川雅美, 近藤章子, 前垣義弘, 大野耕策 & 山本俊至. 皮質下嚢胞を伴う巨脳性白質脳症の1例. 第53回日本小児神経学会総会, 2011.5.26-28, 横浜.
 16. 下島圭子, Bertland Isidor, Cedric Le Caignec, 近藤章子, 坂田晋史, 大野耕策, 山本俊至. 5q31.3 新規微細欠失症候群. 第34回日本小児遺伝学会学術集会, 2011.8.11, 横浜.
 17. 山本俊至, 下島圭子, 菅原みどり, 島田姿野, 成田綾, 前垣義弘, 齋藤聡, 鎌谷直之, 古川徹. トリオサンプルを用いた先天性疾患のエクソーム解析. 日本人類遺伝学会第56回大会, 2011.11.10-12, 千葉.
 18. 下島圭子, Bertland Isidor, Cedric Le Caignec, 近藤章子, 坂田晋史, 大野耕策, 山本俊至. 新規微細欠失症候群の確立; 5q31.3 deletion syndrome. 日本人類遺伝学会第56回大会, 2011.11.10-12, 千葉.
 19. 山本俊至, 下島圭子, 菅原みどり, 七字美延, 向田壮一, 高山留美子, 今井克美. Collybistin の機能喪失はてんかんを伴う症候性 X 連鎖精神発達遅滞の原因となる. 日本人類遺伝学会第56回大会, 2011.11.10-12, 千葉.
 20. 島田姿野, 宮一志, 渡辺祐紀, 熊田知浩, 小田望, 菅原みどり, 下島圭子, 山本俊至. 14q24.3 微細欠失による EIF2B2 の unmasked mutation で発症した Vanishing White Matter disease. 日本人類遺伝学会第56回大会, 2011.11.10-12, 千葉.
 21. 下島圭子, 井上貴仁, 今井由生, 荒井康裕, 藤田貴子, 井手口博, 安元佐和, 廣瀬伸一, 山本俊至. Pelizaeus-Merzbacher 病患者由来 iPS 細胞の樹立と病態解析. 日本人類遺伝学会第56回大会, 2011.11.10-12, 千葉.
 22. 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53回日本小児神経学会総会, 2011.5.26-28, 横浜.
 23. 島田姿野, 下島圭子, 荒井康裕, 岡本伸彦, 百崎謙, 大野耕策, 山本俊至. MECP2 領域微細重複の4例. 日本人類遺伝学会第56回大会, 2011.11.10-12, 千葉.
 24. 西恵理子, 村松友佳子, 谷合弘子, 水野誠司, 下島圭子, 山本俊至. 新規変異を認めた Simpson-Golabi-Behmel Syndrome の一例. 日本人類遺伝学会第56回大会, 2011.11.10-12, 千葉.
 25. 菅原みどり, 梁昭鉉, 下島圭子, 高山留美子, 夏目淳, 七字美延, 平澤恭子, 今井薫, 岡西徹, 水野誠二, 奥村彰久, 伊藤智城, 池田浩子, 高橋幸利, 小国弘量, 今井克美, 大澤眞木子, 山本俊至. CDKL5変異は男児における難治性てんかん脳症にも関連している. 日本人類遺伝学会第56回大会, 2011.11.10-12, 千葉.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得

- なし
- 2. 実用新案登録
 - なし
- 3. その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 岩城 明子
九州大学生体防御医学研究所遺伝情報実験センター

研究要旨

先天性大脳白質形成不全症の原因の中で PLP1 遺伝子 (*PLP1*) 異常は大きな位置を占めている。*PLP1* の完全重複では古典型が多いが、点変異の位置と種類は家系ごとに異なり重症な先天型 Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) から比較的軽症な家族性痙性対麻痺 2 型 (SPG2) まで幅広いスペクトラムを呈する。分担研究者はこれまで当施設で解析した *PLP1* 点変異による PMD/SPG2 患者 24 例につき長期経過を調査し Cailloux らの方法に従い最大運動発達到達点から重症度を 5 段階 (FORM 0~4) に分類し変異と病態の関係を検討してきた。今年度は SPG2 として報告された中では発症年齢が最も高く、長い経過を辿った複合型 SPG2 患者の病理学的検討と *PLP1* 遺伝子検索を行い、エクソン 7 に新たなミスセンス変異を同定した。この変異はオリゴデンドロサイトの成熟にはあまり影響を及ぼさないが、ミエリンの構造維持に影響を与えている可能性がある。

A. 研究目的

先天性大脳白質形成不全症の主な原因遺伝子である proteolipid protein 1 遺伝子 (*PLP1*) の変異 (重複・欠失・点変異) では重症な先天型 Pelizaeus-

Merzbacher 病 (PMD) から家族性痙性対麻痺 2 型 (SPG2) まで幅広いスペクトラムを呈する。本研究は患児の予後の予測や治療法開発の手掛かりを得るために *PLP1* 変異と病型との関係を明らかにすることを目的としている。

分担研究者は 1993 年に本邦初となった *PLP1* のミスセンス変異による先天型 PMD を報告し (Iwaki, *et al.*, *Hum Mol Genet*, 1993)、引き続きフレー

ムシフト変異による古典型 PMD を報告した (Kurosawa, Iwaki, *et al.*, *Hum Mol Genet*, 1993)。その後、全国の臨床医から依頼を受け PMD が疑われた患者の遺伝子解析を行った。当初は点変異のみ知られていたが、その後 *PLP1* の完全重複 (コピー数異常) や欠失でも発症すること、さらに両下肢の痙性だけが最初に出現し病気の進行に伴い他の症状も現われる家族性痙性対麻痺 2 型 (SPG2) も *PLP1* の異常で起ることが明らかとなった。

分担研究者はこれまでに同定した *PLP1* の点変異 24 例、重複 26 例、欠失 1 例のうち、点変異による PMD/SPG2 症例について長期経過を調査し Cailloux らの方法に従い最大

運動発達到達点から重症度を 5 段階 (FORM 0~4) に分類し変異と病態の関係を検討してきた。

今年度は 30 代で発症し長い経過を辿った複合型 SPG2 患者の病理学的検討ならびに PLP1 遺伝子解析を行い、その結果をまとめて学術論文として発表した。

B. 研究方法

(1) 病理学的検討

ホルマリン固定脳によりパラフィン切片を作製し、HE 染色ならびに Klüver-Barrera (KB) 染色を行った。抗リン酸化ニューロフィラメント抗体、抗 GFAP 抗体、抗 CD68 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。病理学的検討は九州大学医学研究院神経病理学分野の協力で行われた。

(2) PLP1 遺伝子解析

ゲノム DNA から *PLP1* の各エクソンを PCR 法により増幅し、コード領域の塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析は九州大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査専門委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) 病理学的検討

脳重量は 1275g で、大脳に脳室拡大を伴うびまん性萎縮を認め、脳梁が高度に菲薄化していた。KB 染色では脳梁のみならず中枢神経系の白質に広範な脱髄を認めた。これに対し末梢神経のミエリンはよく保たれていた。ニューロフィラメント染色により軸索変性が見られたものの、軸索線維は髄鞘と比較すると保たれる傾向にあった。ミエリンの脱落が著しい部位では軸索の消失とスフェロイド形成が見られた。CD68 染色ならびに GFAP 染色の結果

から、マクロファージの浸潤 (炎症反応) やグリオーシスは軽度であった。

(2) PLP1 遺伝子解析

ダイレクトシーケンシングにより、エクソン 7 に新規ミスセンス変異を見出した。この変異は健常成人男性 150 名にはなかった。このアミノ酸は種間で高度に保存されていた。

D. 考察

PLP1 蛋白質は中枢ミエリンの主要構成蛋白質 (~50%) であり主にオリゴデンドロサイトで発現している。一方、末梢神経のミエリン形成を担うシュワン細胞での PLP1 の発現は低い。したがって、中枢神経のミエリン形成障害があるが、末梢神経のミエリンが保たれているのが *PLP1* 変異による典型的な PMD 患者に共通する特徴である。

今回の症例は、発症年齢が 30 代と SPG2 患者として報告された症例よりも高齢であったが、剖検にて類似の病理所見が認められた。そこで PLP1 遺伝子解析を行った結果、これまでミスセンス変異の報告がなかったエクソン 7 において新たな変異を同定した。

PLP1 は 4 回膜貫通構造型の膜蛋白質でアシル化され脂溶性が極めて高く、種間で高度に保存されている。例えばヒトとマウス間でアミノ酸配列は 100% 相同であり、様々なアミノ酸置換がその構造と機能に影響を及ぼすことが考えられる。

重症型 (先天型 PMD) のミスセンス変異の場合、変異 PLP1 蛋白質が小胞体に蓄積して PLP1 の産生細胞であるオリゴデンドロサイトの細胞死を引き起こすものと考えられている。すなわち中枢ミエリンの構築を担うオリゴデンドロサイトあるいはその前駆体そのものが発生の初期に消失してしまうためミエリン形成不全を招くものと推

測される。

一方、今回報告した成人発症のSPG2症例は発症年齢が高く経過が長いことから、このC末に位置する変異はオリゴデンドロサイトの成熟や生死には大きく影響しないと考えられる。一方、その脆弱性から長い年月を経る過程でミエリンの構造維持に影響を与えて緩徐な脱髄が起ったものと推測した。

E. 結論

PLP1 の点変異の種類と位置は家系ごとに異なり、その臨床像は定頸まで至らないFORM 0から自立歩行可能なFORM 4、さらに今年度報告した成人発症のSPG 2まで多様であった。変異と病態との関係を明らかにすることは患者の予後の予測や病態に応じた治療法の開発に役立つものと考えられた。

F. 健康危機情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Toritsu, H., Iwaki, A., Takeshita, K., Hiwatashi, A., Sanefuji, M., Fukumaki, Y., Hara, T. Clinical and genetic characterization of a 2-year-old boy with complete *PLP1* Deletion. *Brain Dev*, in press.

Suzuki, S.O., Iwaki, T., Arakawa, K., Furuya, H., Fujii, N., Iwaki, A. An autopsy case of adult-onset hereditary spastic paraplegia type 2 with a novel mutation in exon 7 of the proteolipid protein 1 gene. *Acta Neuropathol.* 122: 775–781, 2011.

Inoue, K., Iwaki, A., Kurosawa, K., Takanashi, J., Deguchi, K., Yamamoto, T., Osaka, H. Congenital cerebral hypomyelination—Pelizaeus-Merzbacher disease and associated disorders. *No To Hattatsu*, 43: 435-442, 2011.

Miura, S., Shibata, H., Kida, H., Noda, K., Toyama, T., Iwasaki, N., Iwaki, A., Ayabe, M., Aizawa, H., Taniwaki, T., Fukumaki, Y. Partial *SPAST* and *DPY30* deletions in a Japanese spastic paraplegia type 4 family. *Neurogenetics.* 12: 25-31, 2011.

Matsuoka, T., Fujii, N., Kondo, A., Iwaki, A., Hokonohara, T., Honda, H., Sasaki, K., Suzuki, S.O., Iwaki, T. An autopsied case of sporadic adult-onset amyotrophic lateral sclerosis with FUS-positive basophilic inclusions. *Neuropathology.* 31: 71-76, 2011.

2. 学会発表

井上 健, 岩城 明子, 黒澤 健司, 高梨 潤一, 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総会, 2011.05.26.

沼田 有里佳, 岩城 明子, 黒澤 健司, 高梨 潤一, 山本 俊至, 小坂 仁, 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総会, 2011.05.26.

岩城 明子, 佐方 功明, 荒巻 敏寛,
高雄 啓三, 宮川 剛, 川上 良介, 伊
藤 功, 北村 孝司, 杉山 博之, 蔵
忍, 続 輝久, 服巻 保幸. 統合失調
症関連遺伝子AMPA受容体GluR4遺
伝子のノックアウトマウスの作出と
解析. 日本人類伝学会第56回大会,
2011.11.9.

柴田 宏紀, 三浦 史郎, 貴田 浩司,
野田 和人, 加来 庸一郎, 岩城 明子,
綾部光芳, 谷脇考恭, 服巻保幸. 連
鎖解析とエクソームシーケンシン
グの併用による家族性運動感覚
ニューロパチーの責任変異探索. 日
本人類伝学会第56回大会,
2011.11.10.

井上 健, 岩城 明子, 小坂 仁, 黒澤
健司, 高梨 潤一, 出口 貴美子, 山
本 俊至. 先天性大脳白質形成不全
症の統合的研究の推進. 日本人類伝
学会第56回大会, 2011.11.11.

Shibata H., Miura S., Kida H., Noda
K., Kaku Y., Iwaki A., Ayabe M.,
Taniwaki T., Fukumaki Y. Exome
sequencing approach to identify
the responsible variant for a novel
type of hereditary motor and
sensory neuropathy with proximal
dominancy in the lower
extremities found in a Japanese
descent. The 61st Annual Meeting

of the American Society of Human
Genetics, 2011.10.13.

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. The
61st Annual Meeting of the
American Society of Human
Genetics, 2011.10.13.

Fukumaki Y, Miura S, Yamamoto M,
Kida H, Noda K, Kaku Y, Iwaki A,
Ayabe M, Taniwaki T, Shibata H.
Linkage-Exome approach to
identify the responsible variant for
a novel type of hereditary
neuropathy. The 34th Annual
Meeting of the Molecular Biology
Society of Japan, 2011.12.14.

Fujioka R, Nii T, Iwaki A, Kitaichi,
K, Ito I, Shibata A, Nomura M,
Hattori S, Takao K, Miyakawa T
and Fukumaki Y. Molecular
mechanisms of behavioral
abnormalities of knockout mice of
Grm3. The 34th Annual Meeting of
the Molecular Biology Society of
Japan, 2011.12.14.

資料

資料 I
平成 23 年度
厚生労働科研費補助金（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」

第 2 回班会議

平成 24 年 2 月 19 日（日）
11 - 17 時
東京女子医科大学
心臓血管研究所 会議室
〒162-0054
東京都新宿区河田町 8-1

研究代表者： 井上 健
研究分担者： 岩城明子
小坂 仁
黒澤健司
高梨潤一
出口貴美子
山本俊至