

201231175A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

Isaacs 症候群の診断、疫学
および病態解明に関する研究

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 渡邊 修

平成25（2013）年5月

目 次

I. 総括研究報告	
Isaacs 症候群の診断、疫学および病態解明に関する研究	3
渡邊 修	
(資料) Isaacs 症候群診断基準 (暫定案)	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	7
III. 研究成果の刊行物・別刷	11

I 総括研究報告

Isaacs 症候群の診断、疫学および病態解明に関する研究

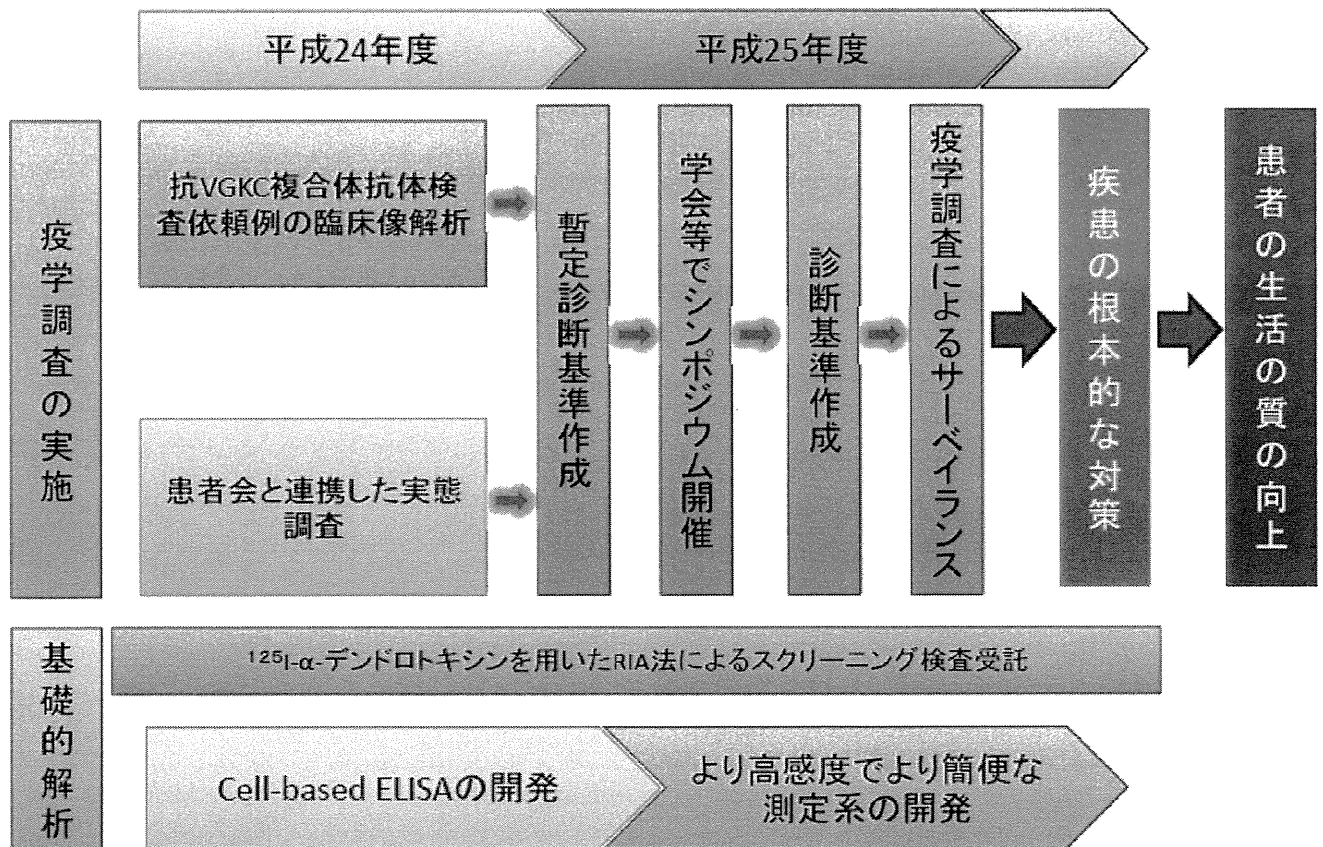
研究代表者 渡邊 修

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院脳神経センター神経内科 講師

研究要旨

抗 VGKC 複合体抗体関連症候群の中核である Isaacs 症候群は、筋けいれん、発汗過多、四肢の疼痛など多彩な臨床徴候を有する。電位依存性カリウムチャネルの機能異常による末梢神経の過剰興奮が病態に関与するものの、抗 VGKC 複合体抗体のスクリーニング検査での陽性率は 30%に過ぎない。また症状が多彩であるために社会的認知度が十分とは言えない。実態調査により診断基準を完成させ、疫学調査による詳細な臨床像の解析を行うとともに、新たな疾患マーカーの開発が急務である。今年度は、臨床像、電気生理所見、血清学的診断を中心とした暫定診断基準を作成するとともに、VGKC 複合体の既知の構成分子に対する自己抗体の Cell-Based ELISA による定量法を完成した。

Isaacs 症候群の診断基準作成に向けたロードマップ



A. 研究目的

Isaacs 症候群は、筋けいれん、発汗過多、四肢の疼痛など多彩な臨床徴候を呈する疾患として提唱されてきた。電位依存性カリウムチャネルの機能異常による末梢神経の過剰興奮の関与が明らかになり、抗 VGKC 複合体抗体のスクリーニングが用いられているが、陽性率は 30%に満たない。また症状が多彩であるために社会的認知度が十分とは言えない。実態調査により診断基準を完成させ、関連学

会でのコンセンサスを得た上で疫学調査による詳細な臨床像解析を行う。標的抗原に関する定量的解析を行い、臨床像との関連性を明らかにし、病態解明を行う。

B. 研究対象および方法

対象は、Isaacs 症候群およびその類縁疾患。これまでの抗 VGKC 抗体検査の依頼例の解析や実態調査（患者会参加を含む）を行い、病像の広がりを確認する。そのデータを元にして、暫定的に作成した診断基準を作成す

る。本研究は、鹿児島大学の倫理規定を遵守して行った。

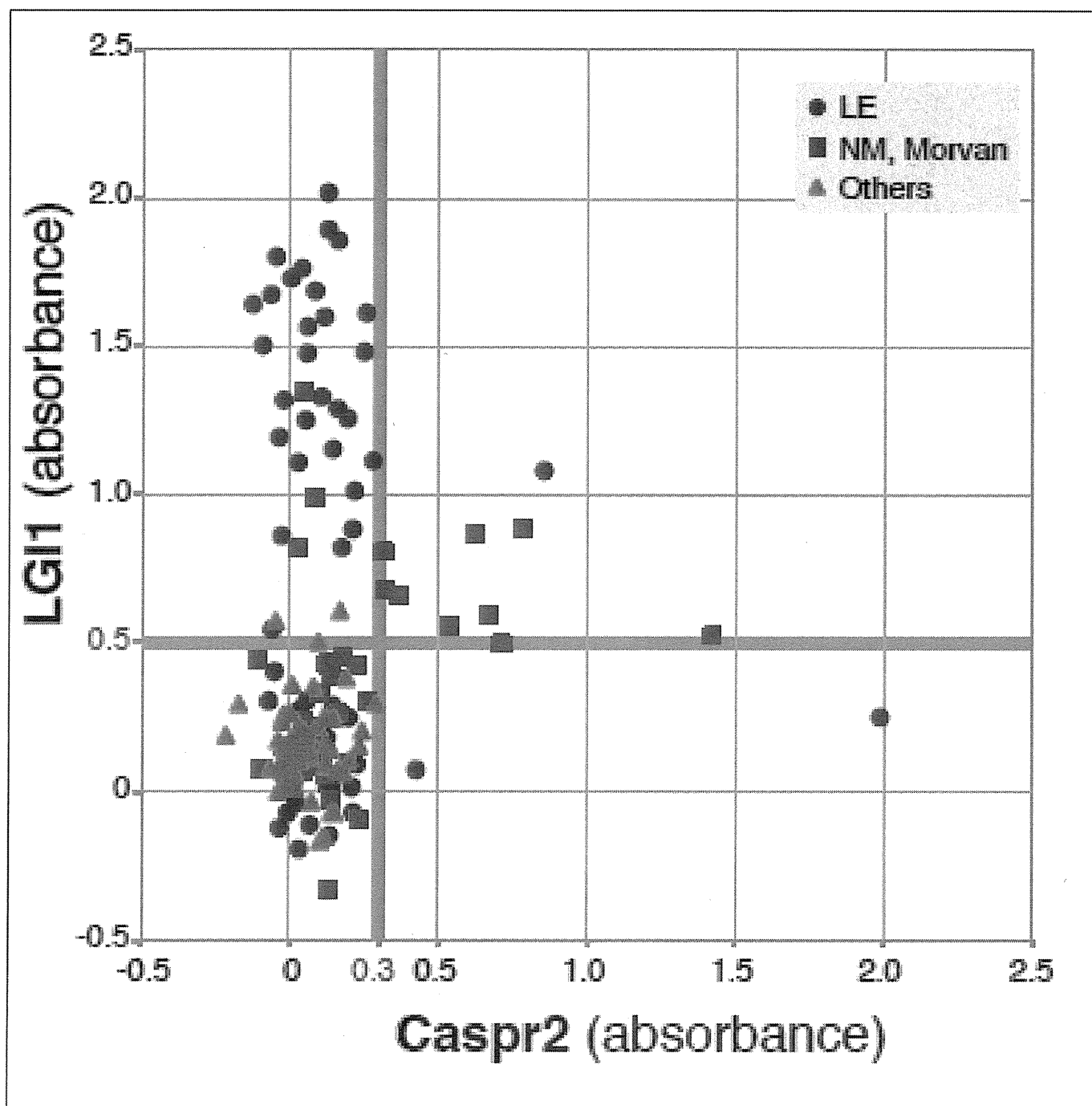
C. 研究結果

抗VGKC複合体抗体の陽性率
(H21年1月-H24年12月)

	抗体測定依頼件数	Isaacs症候群 関連疾患検体数	うち抗体陽 性検体数	抗体陽性率%
H21年	255	31	10	32.3
H22年	229	48	21	43.8
H23年	283	47	13	27.7
H24年	318	59	18	30.5
合計	1085	185	62	33.5

H21年以降の当科にスクリーニング検査依頼があった1085検体中、Isaacs症例検体は185で、うち62検体(33.5%)のみが抗体陽性であった。また、患者会に参加し、患者会参加者に対して実態調査を行った。抗VGKC複合体抗体検査依頼例の臨床像解析を行い、暫定診断基準を作成した(参考参照)。免疫性神経疾患調査研究班や神経免疫学会などでコンセンサスを得るべく、シンポジウム開催について協議を開始した。

既知の分子については、定量 Cell-Based ELISAにて症例毎の量比を検討した。多くの症例で複数の自己抗体を有することがあきら



かになった。辺縁系脳炎群では、LGI1 抗体が有意に高い傾向にあるが、Isaacs 症候群例では、一定の傾向は得られなかった。

候補遺伝子を一つずつ CBA で検討するだけでなく、一例ずつことなる複数の抗原について Cell-Based ELISA にて網羅的に解析した。

D. 考察

今回の検討では、同一の症例が、二つ以上の自己抗体を有する症例が散見された。一自己抗体→一疾患という今までの単純なパラダイムではなく、症例毎に、自己抗体の組み合わせやその量比による症状に差異が認められた。

E. 結論

今回、作成した暫定診断基準を元に Isaacs 症候群およびその類縁疾患の一次調査に取り組む。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- i. Irani SR, Watanabe O, et al (11 人中 8 番目) . Morvan syndrome: Clinical and serological observations in 29 cases. **Ann Neurol** 2012 72(2): 241-55. (査読あり)
- ii. Fujita K, Watanabe O, et al. (8 人中 3 番目) . Voltage-gated potassium channel complex antibodies in Creutzfeldt-Jakob disease. **J Neurol**. 2012 259:2249-50. (査読あり)
- iii. Kaneko K, Watanabe O, et al. (10 人中 8 番目) . Anti-voltage-gated potassium channel antibody is associated with chronic autonomic and sensory neuropathy. **J Neurol**. 2012 in press. (査読あり)
- iv. 渡邊 修. VGKC 関連抗体. **BRAIN and NERVE** 65 巻 4 号. 401-411. 2013 (査読なし)
- v. 渡邊 修. 抗 VGKC 複合体抗体と免疫性神経疾患. **日本臨牀**. 第 71 巻 5 号. 2013
- vi. 渡邊 修. 抗 LGI-1 (leucine-rich glioma inactivated protein 1) 抗体関連脳炎. **Annual Review 神経**. 鈴木則宏、祖父江元、荒木信夫、宇川義一、川原信隆編. 122-129. 中外医学社 2012 (査読なし)
- vii. 村田佳子、渡邊修ら (8 人中 2 番目) . Faciobrachial dystonic seizures を呈した抗電位依存性カリウムチャンネル複合体(LGI-1)抗体関連辺縁系脳炎の 1 例. **てんかん研究** 30 巻 1 号 Page43-50(2012.06) (査読あり)
- viii. 渡邊 修. 中枢神経障害に関連する自己抗体

～最近の知見と今後の展開. **Cognition and Dementia** 2012 11(1): 64-65. (査読なし)

- ix. 渡邊 修. 検査からみる神経疾患：抗 VGKC 抗体. **Clinical Neuroscience** 2012 30(11) 1322-24 (査読なし)

2. 学会発表

- i. 渡邊 修ら. 第 33 回日本アフェレシス学会. シンポジウム神経疾患とアフェレシス：アフェレシスの新たな展開. VGKC 複合体抗体関連疾患とアフェレシス. 2012 年 10 月
- ii. 渡邊 修. 第 43 回日本てんかん学会 シンポジウム自己免疫性脳炎とてんかん. VGKC 複合体 (LGI-1, Caspr-2) 抗体関連脳炎とてんかん. 2012 年 10 月
- iii. 渡邊 修. 第 52 回日本心身医学会学術集会 シンポジウム神経疾患診療の進歩. 自己免疫性脳炎の広がりとその進歩. 2012 年 5 月
- iv. 渡邊 修ら. 第 53 回日本神経学会総会. 抗 VGKC 複合体抗体関連疾患における自己抗体解析. 2012 年 5 月
- v. Watanabe, et al. 13th Asia Oceania Congress of Neurology. Target antigen analysis of acquired neuromyotonia (Isaacs' syndrome). June 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得：なし

実用新案登録：なし

参考

【Isaacs 症候群診断基準（暫定案）】

主要症状・所見

1. 睡眠時も持続する四肢・躯幹の持続性筋けいれんまたは筋硬直（必須）
2. myokymic discharge, neuromyotonic discharge など筋電図で末梢神経の過剰興奮を示す所見
3. 抗 VGKC 複合体抗体（抗 Kv 抗体、抗 Caspr2 抗体、抗 LGI1 抗体など）が陽性
4. ステロイド療法やその他の免疫療法、血漿交換などで症状の軽減が認められる。

支持症状・所見

1. 発汗過多
 2. 四肢の痛み・異常感覚
 3. 胸腺腫の存在
 4. 皮膚色調の変化
 5. 自己抗体の存在（抗 AChR 抗体、抗核抗体、抗甲状腺抗体など）
-

診断

確実（definite）

主要症状・所見のうちすべてを満たす。

可能性が大きい（probable）

主要症状・所見のうち、1 と 2 または 1 と 3 または 1 と 4 を満たす。

疑い（possible）

主要症状・所見のうち 1 を満たし、かつ支持症状・所見の 1 つ以上が見られる。

診断のポイント

自己免疫的機序で、末梢神経の過剰興奮による MUP の自発反復発火がおり、持続性筋収縮に起因する筋けいれんや筋硬直が起こる。末梢神経 origin なので叩打ミオトニアは、生じないが把握ミオトニア様にみえる手指の開排制限は起こりうる。Stiff-man 症候群や筋原性の myotonia 症候群、McArdle 病などは EMG で除外出来る。血漿交換療法やステロイド療法などの免疫療法が有効である。

II 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
橋口昭大、 高嶋 博	Charcot-Marie-Tooth病の網羅的遺伝子診断	鈴木則宏、 祖父江元、 荒木信夫、 宇川義一、	Annual Review of Neurology 2012	中外医学社	東京	2012	267-273

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
○Irani SR, <u>Watanabe O</u> , et al (11人中8番目)	Morvan syndrome: Clinical and serological observations in 29 cases.	Ann Neurol	72(2)	241-55.	2012
○Fujita K, <u>Watanabe O</u> , et al. (8人中3番目)	Voltage-gated potassium channel complex antibodies in Creutzfeldt-Jakob disease.	J Neurol.	259	2249-50.	2012
○Kaneko K, <u>Watanabe O</u> , et al. (10人中8番目)	Anti-voltage-gated potassium channel antibody is associated with chronic autonomic and sensory neuropathy.	J Neurol.	260	315-317	2013
○村田佳子、 <u>渡邊修</u> ら (8人中2番目)	Faciobrachial dystonic seizuresを呈した抗電位依存性カリウムチャンネル複合体(LGI-1)抗体関連辺縁系脳炎の1例.	てんかん研究	30巻 1号	43-50	2012
○ <u>渡邊 修</u> .	検査からみる神経疾患：抗VGKC抗体.	Clinical Neuroscience	30(11)	1322-24	2012
原 賢寿、 <u>渡邊 修</u> ら (5人中2番目)	上肢優位の疼痛とfasciculationのみを呈した抗VGKC複合体抗体陽性例の1例.	臨床神経	52巻	677-680	2012
○ <u>渡邊 修</u>	VGKC関連抗体	BRAIN and NERVE	65巻 4号	401-411	2013
○ <u>渡邊 修</u>	抗VGKC複合体抗体と免疫性神経疾患	日本臨牀	71巻 5号	915-920	2013

Yuan J, Matsuura E, Higuchi Y, Hashiguchi A, Nakamura T, Nozuma S, Sakiyama Y, Yoshimura A, Izumo S, Takashima H.	Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type IID caused by an SCN9A Mutation.	Neurology	80(18)	1641-9	2013
Yuan JH, Sakiyama Y, Higuchi I, Inamori Y, Higuchi Y, Hashiguchi A, Higashi K, Yoshimura A, Takashima H.	Mitochondrial myopathy with autophagic vacuoles in patients with the m.8344A>G mutation.	J Clin Pathol.			2013 Epub ahead of print
Yuan J, Higuchi Y, Nagado T, Nozuma S, Nakamura T, Matsuura E, Hashiguchi A, Sakiyama Y, Yoshimura A, Takashima H.	Novel mutation in the replication focus targeting sequence domain of DNMT1 causes hereditary sensory and autonomic neuropathy IE.	J Peripher Nerv Syst.	18(1)	89-93	2013
Yonekawa T, Komaki H, Saito Y, Takashima H, Sasaki M.	Congenital hypomyelinating neuropathy attributable to a de novo p.Asp61Asn mutation of the myelin protein zero gene.	Pediatr Neurol.	48(1)	59-62	2013
Arimura A, Deguchi T, Sugimoto K, Uto T, Nakamura T, Arimura Y, Arimura K, Yagihashi S, Nishio Y, Takashima H.	Intraepidermal nerve fiber density and nerve conduction study parameters correlate with clinical staging of diabetic polyneuropathy.	Diabetes Res Clin Pract	99(1)	24-9	2013
Miki Y, Tomiyama M, Hagiwara R, Nishijima H, Suzuki C, Kurihara A, Sugimoto K, Hashiguchi A, Takashima H, Baba M.	A family with IVIg-responsive Charcot-Marie-Tooth disease.	J Neurol.	260(4)	1147-5111	2013
Zhao Z, Hu J, Sakiyama Y, Okamoto Y, Higuchi I, Li N, Shen H, Takashima H.	DYSF mutation analysis in a group of Chinese patients with dysferlinopathy.	Clin Neurol Neurosurg			2012 Epub ahead of print
Nakamura T, Hashiguchi A, Suzuki S, Uozumi K, Tokunaga S, Takashima H.	Vincristine exacerbates asymptomatic Charcot-Marie-Tooth disease with a novel EGR2 mutation.	Neurogenetics	13 (1):	77- 81	2012
Iguchi M, Hashiguchi A, Ito E, Toda K, Urano M, Shimizu Y, Takeuchi C, Saito K, Takashima H, Uchiyama S.	Charcot-marie-tooth disease type 4C in Japan: report of a case.	Muscle Nerve	47(2)	283-286	2012
Tokunaga S, Hashiguchi A, Yoshimura A, Maeda K, Suzuki T, Haruki H, Nakamura T, Okamoto Y, Takashima H.	Late-onset Charcot-Marie-Tooth disease 4F caused by periaxin gene mutation.	Neurogenetics	13(4)	359-65	2012
Shiga K, Noto Y, Mizuta I, Hashiguchi A, Takashima H, Nakagawa M.	A novel EGR2 mutation within a family with a mild demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease.	J Peripher Nerv Syst.	17(2)	206-9	2012

Kawabata T, Higashimoto I, Takashima H, Izumo S, Kubota R.	Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ cells accumulate in the lungs of patients infected with HTLV-I with pulmonary involvement.	J Med Virol.	84(7)	1120-7	2012
Saiga T, Tateishi T, Tori i T, Kawamura N, Nagara Y, Shigeto H, Hashiguchi A, Takashima H, Honda H, Ohyagi Y, Kira J.	Inflammatory radiculoneuropathy in an ALS4 patient with a novel SETX mutation.	J Neurol Neurosurg Psychiatry.	83(7)	763-4	2012
Inamori Y, Higuchi I, Inoue T, Sakiyama Y, Hashiguchi A, Higashi K, Shiraishi T, Okubo R, Arimura K, Mitsuyama Y, Takashima H.	Inclusion body myositis coexisting with hypertrophic cardiomyopathy: an autopsy study.	Neuromuscul Disord.	22(8)	747-54	2012
Zhao Z, Hashiguchi A, Hu J, Sakiyama Y, Okamoto Y, Tokunaga S, Zhu L, Shen H, Takashima H.	Alanyl-tRNA synthetase mutation in a family with distal hereditary motor neuropathy.	Neurology	78(21)	1644-9	2012

Ⅲ 研究成果の刊行物・別刷

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 (dynamin 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>APTX (aprataxin)</i>
AOA2	<i>SETX (senataxin)</i>
minifascicular neuropathy	<i>DHH (desert hedgehog)</i>
CMT 2 (中間型)	
CMT DIB	<i>DNM2 (dynamin 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

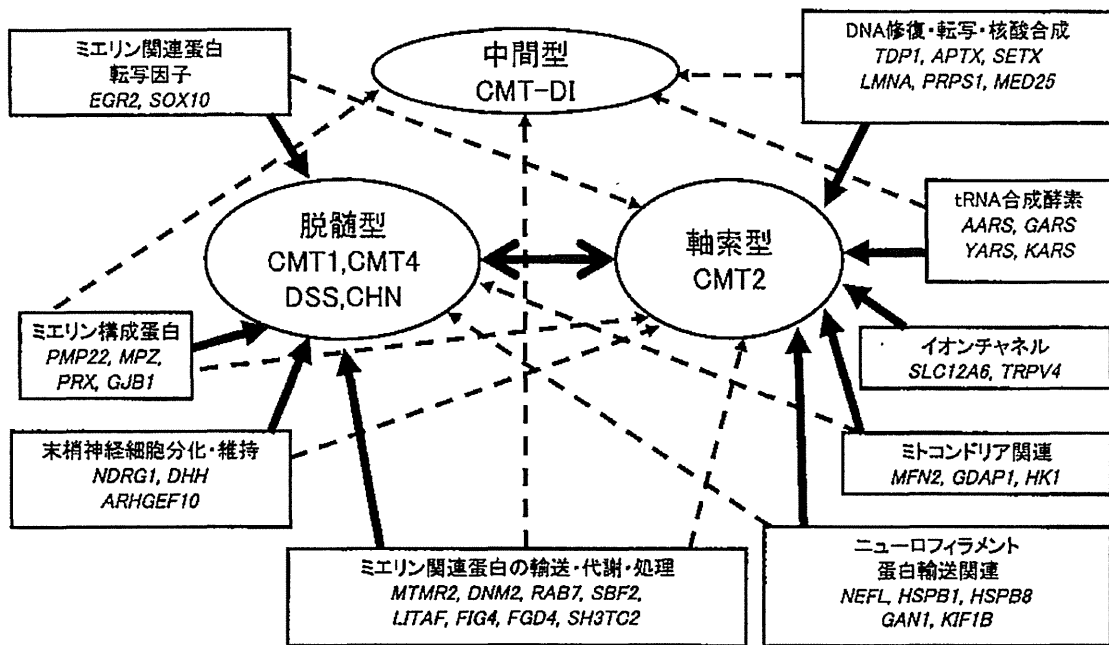


図1 Charcot-Marie-Tooth 病の病態別遺伝子分類 (文献19より改変)

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性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りうるため、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スの導入が必要であろう。次世代シーケンス法は、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ス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

- nucleotide biosynthesis, cause hereditary peripheral neuropathy with hearing loss and optic neuropathy (cmtx5). *Am J Hum Genet.* 2007; 81: 552-8.
- 13) Leal A, Huehne K, Bauer F, 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.* 2009; 10: 275-87.
- 14) Landouere G, Zdebik AA, Martinez TL, et al. Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C. *Nat Genet.* 2010; 42: 170-4.
- 15) Latour P, Thauvin-Robinet C, Baudelet-Mery C, 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.* 2010; 86: 77-82.
- 16) McLaughlin HM, Sakaguchi R, Liu C, et al. Compound heterozygosity for loss-of-function lysyl-tRNA synthetase mutations in a patient with peripheral neuropathy. *Am J Hum Genet.* 2010; 87: 560-6.
- 17) Sivakumar K, Kyriakides T, Puls I, et al. Phenotypic spectrum of disorders associated with glycyl-tRNA synthetase mutations. *Brain.* 2005; 128(Pt10): 2304-14.
- 18) Jordanova A, Irobi J, Thomas FP, et al. Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nat Genet.* 2006; 38: 197-202.
- 19) 橋口昭大, 高嶋 博. シャルコー・マリー・トゥース病の診断: 遺伝子診断. *Peripheral Nerve.* 2011; 22: 2-11.

Morvan Syndrome: Clinical and Serological Observations in 29 Cases

Sarosh R. Irani, DPhil, MRCP,¹ Philippa Pettingill, BSc,¹ Kleopas A. Kleopa, MD,²
 Natasa Schiza, MSc,² Patrick Waters, PhD,¹ Claudio Mazia, MD,³ Luigi Zuliani, MD,¹
 Osamu Watanabe, MD,⁴ Bethan Lang, PhD,¹ Camilla Buckley, DPhil, MRCP,¹
 and Angela Vincent, FRS, FRCPath¹

Objective: A study was undertaken to describe the clinical spectrum, voltage-gated potassium channel (VGKC) complex antibody specificities, and central nervous system localization of antibody binding in 29 patients diagnosed with Morvan syndrome (MoS).

Methods: Clinical data were collected using questionnaires. Radioimmunoassay, cell-based assays, and mouse brain immunohistochemistry were used to characterize the serum antibodies.

Results: Neuromyotonia (100%), neuropsychiatric features (insomnia 89.7%, confusion 65.5%, amnesia 55.6%, hallucinations 51.9%), dysautonomia (hyperhidrosis 86.2%, cardiovascular 48.3%), and neuropathic pain (62.1%) were the most common manifestations. A total of 93.1% of MoS patients were male. VGKC-complex antibodies were present in 23 of 29 (79%) MoS patients at referral; 24 of 27 available sera had CASPR2, LGI1, or both CASPR2 and LGI1 antibodies (3 also with contactin-2 antibodies). CASPR2 antibodies were generally higher titer than LGI1 antibodies. Tumors (41.4%), mainly thymomas, were associated with CASPR2 antibodies and a poor prognosis, whereas LGI1 antibodies were associated with serum hyponatremia. In brain tissue regions including the hypothalamus, raphe, and locus coeruleus, commercial antibodies to LGI1 bound to neuronal cell bodies including the antidiuretic hormone-secreting and orexin-secreting hypothalamic neurons, whereas CASPR2 commercial antibodies bound more often to the neuropil. MoS antibodies bound similarly, but there was evidence of additional antibodies in some sera that were not adsorbed by LGI1- or CASPR2-expressing cells and bound to mouse Caspr2^{-/-} tissue.

Interpretation: MoS is clinically distinct from other VGKC-complex antibody-associated conditions, and usually is associated with high-titer CASPR2 antibodies, often accompanied by lower-titer LGI1 antibodies. CASPR2 and LGI1 antibodies bind to multiple brain regions, which helps to explain the multifocal clinical features of this disease, but other antibodies are likely to play a role in some patients and need to be characterized in future studies.

ANN NEUROL 2012;00:000-000

In 1890 Augustin Morvan described la chorée fibrillaire associated with autonomic dysfunction and severe insomnia,¹ and a few cases of Morvan syndrome (MoS) were reported over the following 100 years, mainly in the French literature.² MoS is now recognized as a rare constellation of peripheral nerve hyperexcitability (neuromyotonia [NMT]), dysautonomia, and encephalopathy with marked insomnia. In the past 15 years, a number of single cases and 2 small series have been reported, mainly associated with antibodies to voltage-gated potassium

channels (VGKCs). Some of the patients had a thymoma, but many did not have a tumor, and there was often a good clinical response to immunotherapies.³⁻⁶

It has become clear that VGKC antibodies (now termed VGKC-complex antibodies) are mainly directed against proteins that are complexed with VGKCs in the detergent extracts of mammalian brain tissue used originally for their identification.^{7,8} The first identified antibody target within the VGKC complex was CASPR2 (contactin-associated protein 2) in patients with MoS.⁹

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/ana.23577

Received Sep 8, 2011, and in revised form Feb 8, 2012. Accepted for publication Feb 24, 2012.

Address correspondence to Dr Vincent, Nuffield Department of Clinical Neurosciences, West Wing, Level 6, John Radcliffe Hospital, Oxford, OX3 9DU, United Kingdom. E-mail: angela.vincent@ndcn.ox.ac.uk

From the ¹Neurosciences Group, Nuffield Department of Clinical Neurosciences, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom; ²Neurology Clinics and Neuroscience Laboratory, Cyprus Institute of Neurology and Genetics, Nicosia, Cyprus; ³Institute of Medical Research, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; and ⁴Department of Neurology and Geriatrics, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima, Japan.

Additional supporting information can be found in the online version of this article.