

平成 25 年度厚生科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究

分担研究課題：本邦におけるクレアチン欠損症の解析

分担研究者 小坂仁 自治医科大学小児科
研究協力者 秋山倫之 岡山大学病院小児神経科
和田敬仁、新保裕子 神奈川県立こども医療センター神経内科

研究要旨：

治療可能発達遅滞および自閉症の原因として、治療が可能なクレアチン欠損症に着目し HPLC を用いた簡便なスクリーニング法を開発し、解析を行っている。クレアチン欠損症は L-arginine: glycine amidinotransferase 欠損症, guanidinoacetate methyltransferase 欠損症, creatine transporter 欠損症よりなる。我々は, guanidinoacetate methyltransferase 欠損症の本邦初症例を見出し、治療により著しい改善を認めた。

A．研究目的

種々の発達障害疾患のなかでも、治療可能発達遅滞および自閉症の原因として近年、先天的なクレアチン (CR) 代謝異常症 (CCDS) が注目されている。CR は、脳および筋肉において ATP の速やかな産生に重要な役割を持ち、言語機能を中心とした、知的機能での重要性が近年明らかになりつつある。CR は、血液脳関門を通過しないために、脳において独自の合成、輸送経路を持っている。これらの異常により、脳性クレアチン欠損症；Cerebral creatine deficiency syndromes, CCDS と総称される疾患を呈する。今までに (L-arginine: glycine amidinotransferase (AGAT) 欠損症, guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) 欠損症, creatine transporter (SLC6A8) がみだされている。これら 3 疾患の共通の症状は精神遅滞、自閉症、てんかんであり、欧米では精神遅滞の 2% 前後を占めるといわれるが、本邦では報告例がなく、その頻度は不明であった。昨年までに私共は、これらの疾患のスクリーニング方法として、HPLC を用いた簡便な方法を開発し SLC6A8 欠損症の本邦初症例を報告した。今年度は GAMT 欠損例（本邦初）を診断したので報告する。

B．症例

30 歳台女性。周期異常なし。定額獲得するもだが、以降の運動発達は遅れた。有意語は未獲得

で言語理解も乏しく、30 歳頃より長距離が歩けなくなった。1 歳半ばよりてんかん発作が出現し、Lennox-Gastaut 症候群を呈した。兄が難治性てんかんで死亡している。

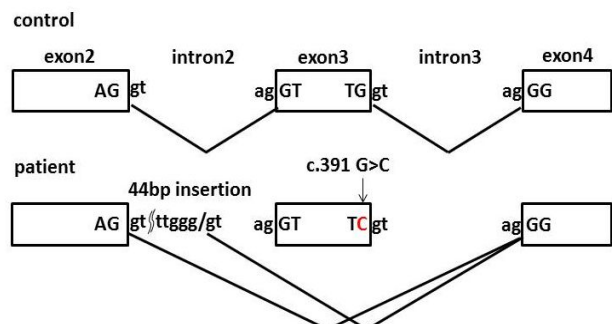
血清クレアチニン (<0.1 mg/dL) とクレアチン (0 mg/dL) が著明低値であり、頭部 MRS でクレアチンピークが欠損しており、頭部 MRI で両側淡蒼球の異常信号をみとめており、CCDS が疑われた。

C．研究結果

前処理した尿 25 μ l を用い、CR：クレアチン、GAA：グアニジノ酢酸、GN：クレアチニンを測定した。尿中グアニジノ酢酸 (GAA) が著しく上昇しており (548.64 mmol/mol cr; 基準値 3-78)、GAMT 欠損症を強く疑った。GAMT 遺伝子解析をおこなったところ、c.391G>C p.Gly131Arg in exon3 (p.Val110Glyfs*30 and .Ile111Profs*73)

c.578 A>G p.Gln193Arg in exon6 の複合ヘテロ変異 (2 つとも新規変異) を確認した。RT-PCR を行ったところ c.391G>C では、スプライシングの異常を来しエクソン 3 がスプライスアウトされ

図 1 . c.391G>C による 2 つのスプライシング産物



た2つの異常スプライシング産物ができていることが判明した。クレアチン・オルニチン補充療法を開始し、てんかん発作は完全抑制され歩行機能の改善もみられた。

D . 考察

血漿 GAA 値は、治療前の 28.43 $\mu\text{mol/L}$ (基準値 1.0-3.5) から、治療開始 1、3、6 ヶ月後は 7.53、6.14、5.45 $\mu\text{mol/L}$ と低下した。また髄液 GAA 値は、治療前の 7.09 $\mu\text{mol/L}$ (基準値 0.02-0.50) から、治療開始 6 ヶ月後は 3.01 $\mu\text{mol/L}$ と低下しており、臨床症状の改善と平行していた。

E . 結論

統合的遺伝子解析システムから見出される、種々の発達障害関連分子の中には、治療可能な疾患群が含まれる。それらの早期発見システムの構築も平行して進め、得られた成果を還元したい。

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. Takanashi JI, Osaka H, Saitsu H, Sasaki M, Mori H, Shibayama H, Tanaka M, Nomura Y, Terao Y, Inoue K, Matsumoto N, James Barkovich A. Different patterns of cerebellar abnormality and hypomyelination between POLR3A and POLR3B mutations. *Brain Dev.* 2013 May 3. doi:pil: S0387-7604(13)00132-0.10.1016/j.braindev.2013.03.006. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23643445
2. Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, Todd EJ, Vornanen P, Yau KS, Hayashi YK, Miyake N, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Osaka H, Yamashita S, Ohya T, Sakamoto Y, Koshimizu E, Imamura S, Yamashita M, Ogata K, Shiina Bryson-Richardson RJ, Vaz R, Ceyhan O, Brownstein CA, Swanson LC, Monnot S, Romero NB, Anthor H, Kresoje N, Sivadorai P, Kiraly-Borri C, Haliloglu G, Talim B, Orhan D, Kale G, Charles AK, Fabian VA, Davis MR, Lammens M, Sewry CA, Manzur A, Muntoni F, Clarke NF, North KN, Bertini E, Nevo Y, Willichowski E, Silberg IE, Topaloglu H, Beggs AH, Allcock RJ, Nishino I, Wallgren-Pettersson C, Matsumoto N, Laing NG. Mutations in KLHL40 Are a Frequent Cause of Severe Autosomal-Recessive Nemaline Myopathy. *Am J Hum Genet* 2013; 93: 6-18.
3. Anselm I, Azzouz H, Bratkovic D, de Brouwer A, Hamel B, Kleefstra T, Yntema H, Campistol J, Vilaseca MA, Cheillan D, D'Hooghe M, Diogo L, Garcia P, Valongo C, Fonseca M, Frints S, Wilcken B, von der Haar S, Meijers-Heijboer HE, Hofstede F, Johnson D, Kant SG, Lion-Francois L, Pitelet G, Longo N, Maat-Kievit JA, Monteiro JP, Munnich A, Muntau AC, Nassogne MC, Osaka H, Ounap K, Pinard JM, Quijano-Roy S, Poggenburg I, Poplawski N, Abdul-Rahman O, Ribes A, Arias A, Yap Lito-Lee J, Schulze A, Schwartz CE, Schwenger S, Soares G, Sznajer Y, Valayannopoulos V, Van Esch H, Waltz S, Wamelink MM, Pouwels PJ, Errami A, van der Knaap MS, Jakobs C, Mancini GM, Salomons GS. Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency. *J Med Genet* 2013; 50:463-472.
4. Mitani T, Aida N, Tomiyasu M, Wada T, Osaka H. Transient ischemic attack-like episodes without stroke-like lesions in MELAS. *Pediatr Radiol* 2013; 43: 1400-1403.
5. Kato H, Miyake F, Shimbo H, Ohya M, Sugawara H, Aida N, Anzai R, Takagi M, Okuda M, Takano K, Wada T, Iai M, Yamashita S, Osaka H (2013) Urine screening for patients with developmental disabilities detected a patient with creatine transporter deficiency due to a novel missense mutation in SLC6A8. *Brain Dev.* doi:S0387-7604(13)00256-8 [pii]10.1016/j.braindev.2013.08.004
6. Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, Imai K, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragan DE, Villarroel CE, Ohfu M, Writzl K, Gnidovec Strazisar B, Hirabayashi S, Chitayat D, Myles Reid D, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N, Saitsu H (2013) Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* 2013; 81:

992-998.

7. Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama J, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H (2013b) De Novo Mutations in GNAO1, Encoding a Galphao Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy. *Am J Hum Genet* 93: 496-505.
8. Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, Matsumoto N, Miyake N. A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? *Hum Genet*, accepted
9. Ohba C, Osaka H, Iai M, Yamashita S, Suzuki Y, Aida N, Shimozawa N, Takamura A, Doi H, Tomita-Katsumoto A, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Eto Y, Tanaka F, Matsumoto N, Saitsu H. Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood. *Neurogenetics* 2013; 14: 225-232.
10. Kodera H, Nakamura K, Osaka H, Maegaki Y, Haginoya K, Mizumoto S, Kato M, Okamoto N, Iai M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, Sugahara K, Yuasa I, Wada Y, Matsumoto N, Saitsu H. De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. *Hum Mutat*. 2013;34: 1708-1714.
11. Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H. A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia. *Pediatr Neurol*. 2013 Nov 4. doi:p11: S0887-8994(13)00559-6.
12. Matsufuji M, Osaka H, Gotoh L, Shimbo H, Takashima S, Inoue K. Partial PLP1 Deletion Causing X-Linked Dominant Spastic Paraplegia Type 2. *Pediatr Neurol*. 2013; 49: 477-481.
13. Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H. A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency. *JIMD Rep*. 2013 Jul 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID:
14. Abe J, Nakamura K, Nishikomori R, Kato M, Mitsuiki N, Izawa K, Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Toyoshima I, Hasegawa K, Ohshima Y, Hiragi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Kikuchi M, Osaka H, Ohya T, Ninomiya S, Fujikawa S, Akasaka M, Iwata N, Kawakita A, Funatsuka M, Shintaku H, Ohara O, Ichinose H, Heike T. A nationwide survey of Aicardi-Goutieres syndrome patients identifies a strong association between dominant TREX1 mutations and chilblain lesions: Japanese cohort study. *Rheumatology* (Oxford). 2013 Dec 3. [Rheumatology (Oxford). 2013 Dec 3. [Epub ahead of print]
15. Okabe T, Aida N, Niwa T, Nozawa K, Shibasaki J, Osaka H. Early magnetic resonance detection of cortical necrosis and acute network injury associated with neonatal and infantile cerebral infarction. *Pediatr Radiol*. 2014 Jan 14. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

全脊髄炎を呈し、重度の後遺症を残した急性散在性脳脊髄炎の一例

大城亜希子 1)、高木真理子 1)、安西理恵 1)、奥田美津子 1)、高野亨子 1)、和田敬仁 1)、井合瑞江 1)、山下純正 1)、小坂仁 1)、相田典子 2) 1) 神奈川県立こども医療センター神経内科 2) 放射線科 日本小児神経学会関東地方会 (第 58 回) 平成 25 年 3 月 9 日、東京医科大学病院(東京)

第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome

Kazuyuki Nakamura, 1, 2 Mitsuhiro Kato, 1 Hitoshi Osaka, 3 Sumimasa Yamashita, 3 Eiji Nakagawa, 4 Kazuhiro Haginoya, 5 Jun Tohyama, 6 Mitsuko Okuda, 3 Takahito Wada, 3 Shuichi Shimakawa, 7 Katsumi Imai, 8 Saoko Takeshita, 9 Masaharu Ohfu, 10 Kiyoshi Hayasaka, 1 Hiroto

Saitsu2 English Session 第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

COL4A1 変異の臨床病型の広がり: 孔脳症から裂脳症まで

萩野谷和裕、加藤光広、小坂仁、横地健治、荒井洋、和田敬仁、小山典久、近藤典子、高橋悟、平林伸一、平井聡里、才津浩智

拓桃医療療育センター小児科、山形大学小児科、神奈川子ども医療センター神経内科、聖隷三方原病院小児神経科、森ノ宮病院小児神経科、豊橋市民病院小児科、鳥取大学脳神経小児科、旭川医科大学小児科、長野県立こども病院神経科、横浜市立大学大学院遺伝学

第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

A rapid screening for the genetic diagnosis of Leigh syndrome.

Hitoshi Osaka¹, Mariko Takagi¹, Mitsuko Okuda¹, Rie Anzai¹, Takahito Wada¹, Kyoko Takano¹, Mizue Iai¹, Sumimasa Yamashita¹, Kei Murayama², Akira Ohtake³

Division of Neurology¹, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, 232-8555, Japan, Department of Metabolism², Chiba Children's Hospital, Chiba 266-0007, Japan, Department of Pediatrics³, Faculty of Medicine, Saitama Medical University, Saitama 350-0495, Japan. English Session 第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

生後 4 カ月に発症し急速な退行を示した vanishing white matter disease の 1 例

神奈川県立こども医療センター神経内科 高野亨子、高木真理子、奥田美津子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁

横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

m.3697G>A/ND1 変異を認めた Leigh 症候群の 2 症例

高木真理子、高野亨子、奥田美津子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁

神奈川県立こども医療センター神経内科第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

次世代シーケンサーを用いた小児神経疾患の

ターゲットシーケンス解析のワークフロー

黒田 友紀子¹、大橋 育子¹、高野 亨子²、和田 敬仁²、松井 潔³、小坂 仁²、黒澤 健司¹

1. 神奈川県立こども医療センター遺伝科 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総合診療科第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

ATG > AGG (開始コドン)の変異で軽症の表現型を示した Pelizaeus-Merzbacher 病の一男児例

山本亜矢子、大城亜希子、安西里恵、高木真理子、奥田美津子、新保裕子、高野亨子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂 仁 神奈川県立こども医療センター 神経内科 第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

小児期発症の脊髄小脳変性症: レビューと鑑別診断 シンポジウム 2DNA 修復障害と神経変性

小坂 仁 神奈川県立こども医療センター神経内科 第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

ポーランドメービウス症候群の神経病理 血管障害との関連において

山下純正、和田敬仁、小坂仁 神奈川県立こども医療センター神経内科 柴崎淳 新生児科 松井潔 総合診療科第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

日内変動のあるジストニアを認め、遺伝子解析で瀬川病と診断した 9 歳女児例

奥田美津子、安西、高木真理子、高野亨子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂 仁、新宅治夫 神奈川県立こども医療センター 神経内科 大阪市立大学小児科第 55 回日本小児神経学会 2013.5.29-2013.6.1 大分

EPI-743 を使用した Leigh 症候群 (ND3; m10158T>C) の 1 例

小坂 仁¹、高木真理子¹、村山圭²、大竹明³ 神奈川県立こども医療センター神経内科 1、千葉県こども病院代謝科 2 埼玉医科大学小児科 3 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「ミトコンドリア病の診断と治療に関する調査研究 平成 24 年度第 2 回班会議東京国際フォーラム 2013.2.10

ネマリンミオパチーの新規原因遺伝子 KLHL40 の同定

宮武 聡子(みやたけ さとこ)1、奥水 江里子1、林 由起子2、Gianina Ravenscroft3、三宅 紀子1、土井 宏1、鶴崎 美德1、才津 浩智1、小坂 仁4、山下 純正4、大宅 喬5、増澤 祐子6、今村 伸太郎7、山下 倫明7、椎名 政昭8、緒方 一博8、西野 一三2、Nigel Laing3、松本 直通1

1 横浜市立大学 大学院医学研究科 遺伝学、2 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第一部、3 ウェスタンオーストラリア大学、4 神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター神経内科、5 横浜市立みなと赤十字病院小児科、6 横浜市立大学附属市民総合医療センター、7 水産総合研究センター中央水産研究所、8 横浜市立大学大学院医学研究科生化学

日本人類遺伝学会 第58回大会 2013年11月20日~11月23日仙台

小児期に小脳萎縮を呈する疾患における全エクソーム解析による遺伝子診断

大場 ちひろ1,2、小坂 仁3、井合 瑞江3、山下 純正3、鈴木 ゆめ2、相田 典子4、土井 宏2、富田 敦子2、西山 精視1、鶴崎 美德1、中島 光子1、三宅 紀子1、田中 章景2、松本 直通1、才津 浩智11 横浜市立大学 大学院医学研究科 遺伝学、2 横浜市立大学 大学院医学研究科 神経内科・脳卒中科、3 神奈川県立こども医療センター 神経内科、4 神奈川県立こども医療センター 放射線科日本人類遺伝学会 第58回大会 2013年11月20日~11月23日仙台

3 量体G タンパク質G o サブユニットをコードするGNAO1 のde novo 変異はてんかん性脳症を引き起こす 小寺 啓文1、中村 和幸1,2、秋田 天平3、椎名 政昭4、加藤 光広2、星野 英紀5、寺嶋 宙5、小坂 仁6、中村 真一7、遠山 潤8、熊田 竜郎3、古川 智範3、岩田 暁美3、椎原 隆2,9、久保田 雅也5、早坂 清2、緒方 一博4、福田 敦夫3、松本 直通1、才津 浩智1

1 横浜市立大学 医学部 遺伝学、2 山形大学 医学部 小児科、3 浜松医科大学 医学部 神経生理学講座、4 横浜市立大学大学院 医学研究科生化学教室、5 国立成育医療研究センター 神経内科、6 神奈川県立こども医療センター 神経内科、7 長野赤十字病院 小児科、8 国立病院機構

西新潟中央病院 てんかんセンター小児科、9 群馬県立小児医療センター 神経内科

日本人類遺伝学会 第58回大会 2013年11月20日~11月23日仙台

ケトン血症を伴うLeigh 脳症兄弟例のエクソーム解析

今川 英里1、小坂 仁2、山下 暁朗3、椎名 政昭4、高橋 英彦5、杉江 秀夫6、中島 光子1、鶴崎 美德1、才津 浩智1、緒方 一博4、松本 直通1、三宅 紀子1

1 横浜市立大学 大学院医学研究科 遺伝学教室、2 神奈川県立こども医療センター 神経内科、3 横浜市立大学 大学院医学研究科 分子細胞生物学教室、4 横浜市立大学 大学院医学研究科生化学教室、5 神奈川県立こども医療センター 感染免疫科、6 自治医科大学 小児科

日本人類遺伝学会 第58回大会 2013年11月20日~11月23日仙台

クレアチントランスポーター欠損症5家系の分子遺伝学的検討

和田 敬仁1、立川 正憲2、伊藤 慎悟3、大槻 純男3、新保 裕子4、小坂 仁4

1 京都大学大学院医学研究科 医療倫理学・遺伝医療学分野、2 東北大学大学院薬学研究科 薬学微生物学分野、3 熊本大学大学院生命科学研究部 薬学微生物学分野、4 神奈川県立こども医療センター 神経内科 日本人類遺伝学会 第58回大会 2013年11月20日~11月23日仙台

14q12 欠失症候群の1例 高野 亨子1、小坂 仁1、大橋 育子2、黒田 友紀子2、黒澤 健司2、相田 典子3、村山 圭4 1 神奈川県立こども医療センター 神経内科、2 神奈川県立こども医療センター 遺伝科、3 神奈川県立こども医療センター 放射線科、4 千葉県こども病院 代謝科 日本人類遺伝学会 第58回大会 2013年11月20日~11月23日仙台

小坂 仁 特別講演；小児期神経疾患の治療を目指して 第216回日本小児科学会宮城地方会 2013(平成25)年11月9日(土) 12時 仙台

H. 知的所有権の取得状況；なし