

診断を進める上で遺伝カウンセリングは不可欠である。先天性大脳白質形成不全症は遺伝的異質性が高いため、遺伝カウンセリングは慎重に行う。ペリツェウス・メルツバッハ病を例にとると、X連鎖劣性遺伝であることのほかに、発症メカニズムが重複（タンデム、転座挿入）や点変異、ナル変異など多岐にわたり複雑であることがわかる。また、遺伝医療の専門家（臨床遺伝専門医および認定遺伝カウンセラー）も加わったチーム医療を考慮する必要がある。

## 資料4

# *PLP1* 遺伝子関連先天性大脳白質形成不全症 (Pelizaeus-Merzbacher 病、2 型痙性対麻痺) の遺伝カウンセ リングガイドライン

平成 25 年 12 月 改訂版

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業(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を目指した研究」

分担研究者 神奈川県立こども医療センター 遺伝科 黒澤健司

代表研究者 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 井上 健

## はじめに

遺伝カウンセリングとは、疾患の特性、遺伝様式、疾患がもつ意味を患者とその家族に伝え、理解を促し、医学的かつ個人的な決断が下せるように援助するプロセスを意味する。疾患がもつ意味は、それぞれの個人により捉え方が異なり、また、文化や宗教の影響も受ける。わが国においては、臨床遺伝専門医および認定遺伝カウンセラーが専門職として遺伝カウンセリングに関わっている。中枢神経ミエリンを構成する主要タンパクの一つであるプロテオリピドプロテインをコードする *PLP1* 遺伝子の異常は、先天性大脳白質形成不全症の代表である Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) から 2 型痙性対麻痺 (SPG2) まで、臨床的に幅広い臨床像をもたらす。これらは、*PLP1* 遺伝子が X 染色体上にあることから、X 連鎖劣性遺伝形式をとる。Pelizaeus-Merzbacher 病も含め先天性大脳白質形成不全症の多くは遺伝性疾患に分類され、多くの場合診断の確定は遺伝学的検査による。発端者の診断が家系内の保因者の存在を示唆することもあり、遺伝カウンセリングが診療の一環として不可欠である。本稿では、Pelizaeus-Merzbacher 病および 2 型痙性対麻痺を含めた *PLP1* 関連先天性大脳白質形成不全症の遺伝カウンセリングを進める際に役立つと思われる情報をガイドラインとしてまとめた。

## 1. 疾患の概要

*PLP1* 遺伝子関連の中枢神経系ミエリン形成異常症は、ペリツェウス-メルツバッハー病 (Pelizaeus-Merzbacher Disease ; PMD) から痙性対麻痺 2 型 (Spastic Paraplegia2 ; SPG2)

まで幅広い表現型を呈す。PMD は一般に乳児期もしくは幼児期早期に眼振、筋緊張低下、発達遅滞で発症し、症状は重度の痙性麻痺や運動失調へと進行する。生命予後も影響を受ける。いっぽうで、SPG2 は痙性対麻痺として発症するものの中樞神経系症状を伴わないこともあり、生命予後は比較的良好である。家族間での症状の違いはあるものの、通常は、家族内での症状は一定である。女性保因者にも軽度から中等度の症状が出現することがある。PLP1 関連疾患の臨床診断は、典型的な神経学的所見、X連鎖の遺伝形式と、MRI で観察されるびまん性のミエリン形成不全の所見などによる。PLP1 遺伝子の分子遺伝学的検査は臨床的に可能である。医療管理としては、対症療法が中心となる。神経内科、理学療法、整形外科、呼吸器内科、消化器内科の専門家からなる包括的医療チームによる対応が必要である。治療内容として、重症な嚥下困難に対する胃瘻増設や、痙攣に対する抗痙攣薬、理学療法や運動、薬物療法による痙直に対する日常管理、歯列矯正、関節拘縮に対する手術などがあげられる。側弯を認める場合、適切な車椅子の使用や理学療法が役に立つが、重症な場合は手術も考慮される。特別支援教育が必要であり、コミュニケーションツールの工夫が効果的なことがある。2次的合併症の予防として、側弯を防ぐために適切な車椅子の使用や、理学療法が効果的なことがある。小児期には、発達や、痙直、整形外科的合併症などを確認するため、半年から一年ごとの神経学的評価、理学的評価を行う。PLP1 関連疾患はX連鎖の遺伝形式をとるが、新生突然変異もあり得る。PMD 男性は妊孕性を得ることは難しいが、SPG2 男性は妊孕性がある。男性発端者の場合、その娘は全て保因者となり、息子には変異は遺伝されない。女性保因者の息子は、50%の確率で変異を受け継ぎ発症するリスクがあり、娘は50%の確率で保因者となる。病因である PLP1 遺伝子の変異が同定された家系内では、保因者診断が可能である。

## 2. 遺伝学的検査の進め方

### 検査方法の選択と注意点

PLP1 関連疾患をもたらす遺伝子変異としては、点変異、微細な欠失や挿入、大きな重複と欠失などがある。PLP1 遺伝子が3コピーさらには4コピー存在して病因となることもある。

ほぼ5割(50-75%)の症例で PLP1 遺伝子重複を認めるので、定量 PCR 法や FISH 法などにより正常の2倍量の PLP1 の存在を確かめる。MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)、マイクロアレイ染色体検査などでも、ゲノムコピー数の変化を検出できるようになり、特に前者は既に PMD 診断用にキットとして販売されている。PLP1

の欠失 (null mutation) も、2%以下で認められる。*PLP1* のアレルコピー数変化 (主に重複) を検出する FISH 法では、重複がタンデムで範囲も平均 500kb 程度なので、間期核 FISH が用いられる。しかし、この方法での観察は熟練を要することや、500kb 以下の重複や 3 重複は正確に判定することが困難なことを考慮に入れる必要があり、間期核 FISH 法での診断スクリーニングは推奨されない。間期核 FISH 法を診断に用いる場合には上述の *PLP1* 遺伝子の定量化解析法 (MLPA、定量 PCR、マイクロアレイ染色体検査) と組み合わせる必要がある。さらに、*PLP1* 遺伝子を含む X 染色体領域の染色体転座例や挿入例も報告されているために、FISH 法でタンデム重複でないシグナルパターンが検出された場合は、転座を考慮して通常の染色体 G 分染法も行う。つまり、コピー数変化のみを検出する方法として、MLPA、マイクロアレイ染色体検査、定量 PCR 法はいずれも鋭敏ではあるが、転座は検出できない。逆に、FISH 法はコピー数の変化を検出するには限界があるが、転座・挿入を検出することは可能である。PMD 遺伝子診断の難しさは、このように変異の多様性を念頭に置き、検査を組み合わせる点が上げられる。

*PLP1* 変異の約 15~20% を占める点変異は、シーケンス解析が有効である。ほとんどの点変異が結果としてミスセンス変異またはフレームシフト変異となるが、スプライシングに影響を及ぼす変異もある。

## 検査結果の解釈

検出された変異が実際に発症に関わる変異であるかは慎重に検討する必要がある。一般に、解釈からみた変異の種類として、1) 既に文献・データベースで報告されている病原性変異、2) 病原性と推測されるがこれまでのデータベース (文献) に登録 (報告) がない変異、3) 臨床的意義が不明な変異、4) 病的意義がないと推測できるがデータベース (文献) に登録 (報告) がない変異、5) 既に登録 (報告) されている臨床的意義のない多型、の 5 種類があげられる。具体的な検索方法として、Human Gene Mutation Database (HGMD, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)、NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)、日本人データベース Human Genetic Variation Browser (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>) などでの検索が有用である。

臨床的に *PLP1* 関連疾患と考えられる男性患者のうち、約 40% が *PLP1* 遺伝子内に変異が同定されない。解釈としては、変異が通常解析する領域以外、つまり遺伝子の上流または下流の領域やイントロンなどの領域に変異が起こっているか、*PLP1* 関連疾患に

似た別の疾患を想定する必要がある。

### 遺伝学的検査計画

最初に *PLP1* 遺伝子重複を確認する検査を行う。既に述べたように、定量PCR、MLPA、マイクロアレイ染色体検査は、感度・特異度ともに高いが、間期核 FISH は、重複部位が別の領域に挿入されている場合や、重複の体細胞モザイクを同定できるため、やはり望ましい検査法と言える。したがって、*PLP1* のアレルコピー数を調べて異常がある場合には間期核 FISH を施行すべきである。重複を認めなかった場合には、*PLP1* 遺伝子をシーケンスする。必要であれば、罹患男性に 2 本の X 染色体がないか（クラインフェルター症候群）、もしくは、*PLP1* の発現に位置的効果をきたすような X 染色体の再構成がないかを評価するために、染色体検査を行うべきである。

女性における保因者診断では、まずその家系内の病因となる変異を同定されていることが前提となる。

## 3. 遺伝カウンセリング

### 1) 男性発端者の親

発端者の父親は、変異の保因者ではない。罹患児および 1 名の別の家系内罹患者を有する女性は、ヘテロ接合（保因者）である。家系解析で発端者が唯一の家系内罹患者であった場合は、その罹患男性の母親は保因者であるか、あるいは、その罹患男性は *PLP1* 遺伝子の新生突然変異の可能性がある。実際には、家族歴の有無にかかわらず発端者の母親は殆どの場合、*PLP1* 遺伝子変異の保因者である。新生突然変異例は、主に *PLP1* 遺伝子の点変異例で報告されてきた。一方、*PLP1* 重複変異では、母方祖父の生殖細胞系列で新生突然変異がしばしば見られるが、発端者が新生突然変異であった報告はない。

### 2) 男性発端者の同胞

同胞におけるリスクは、母親が保因者であるか否かにより異なる。*PLP1* 変異を有する保因者女性が、児に変異アレルを受け渡す可能性は 50% である。変異アレルを受け継いだ男性は罹患する。また、変異アレルを受け継いだ同胞女性は保因者となるが、ときに軽度から中等度の症状を呈することもある。注意すべき点として、罹患男性において比較的軽症の神経学的症状（複雑型、あるいは純粋な痙性対麻痺）をもたらす *PLP1* アレルは、ヘテロ接合の女性での神経学的徴候（遅発性痙性対麻痺や知的退行など）と関連する傾向がある。ヘテロ接合女性が臨床的に罹患する可能性が最も高いのは、兄弟が欠失や早期終止コドンとなる点変異などの *PLP1* ナル（null）変異の場合で、可能性が最も低いのは兄弟が *PLP1* 重複の場合である。*PLP1* 重複のヘテロ接合女性は偏った X

染色体不活化状態を有していることが報告されている。

また、性腺モザイクも注意する必要がある。この場合は、母親の末梢血 DNA で病因となる変異が検出されなくても、発端者の同胞が病因となる変異を受け継ぐ可能性は一定の確率である。

### 3) 男性発端者の子孫

典型的な PMD 男性は子孫を残せないが、SPG2 の患者では妊孕性がある。罹患男性の変異アレルは必ず娘に受け継がれ、息子は受け継ぐことはない。

### 4) 男性罹患者の他の家族

発端者の母方おばやその子孫は、保因者あるいは罹患者になる可能性がある（性や家系内の近さ、発端者の母親が保因者かどうかにもよる）。罹患男性の症状が比較的軽症の場合には、ヘテロ接合女性は神経学的徴候（遅発性痙性対麻痺おなど）を呈することがある。

### 5) 保因者診断

ヘテロ接合女性は一般的には神経学的に正常だが、ときに軽度から中等度の症状を呈することもある。分子遺伝学的検査で保因者診断が可能なのは、*PLP1* の病因変異が罹患家族で同定されている場合か、家系内連鎖解析で明らかになっている場合である。

## 4. 遺伝カウンセリングに関連したその他の問題

### 1) 表現型の多様性

児が罹患者になる可能性があるカップルに、同じ家系内の同胞や血縁者間でもさまざまな表現型（症状）があることを認識させることは重要である。男性罹患者が軽症である家系では、次世代では重症となることもある。

### 2) Xq22 から離れた座位への挿入重複

もともとの *PLP1* 遺伝子座である Xq22 から離れた染色体部位に新たな挿入が起こって生ずる *PLP1* 重複変異は、*PLP1* 関連疾患の稀な原因となることがあるが、遺伝カウンセリング上難しい問題をもたらす。理由は、遺伝様式として必ずしも X 連鎖でなくなるからである。

### 3) 家族計画

遺伝的リスクを決定し、保因状況を明らかにし、出生前診断の適用を相談する時期は、妊娠前が望ましい。

### 4) 倫理的課題

遺伝学的検査は、十分な遺伝カウンセリングを行った後に実施する。関連したガイドライン（注）を遵守することが求められる。

## まとめ

Pelizaeus-Merzbacher 病の遺伝カウンセリングの難しさは、X 連鎖劣性遺伝であることと、発症メカニズムが重複（タンデム、転座挿入）や点変異、ナル変異など多岐にわたり複雑であることが上げられる。適切な遺伝カウンセリングを進めるために正確な診断は不可欠と考えられる。

注)

「遺伝学的検査に関するガイドライン」 遺伝医学関連学会（平成 15 年 8 月）

「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」 日本医学会（2011 年 2 月）

## 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
高梨潤一	小児神経疾患	Proton MRS の臨床有用性検討会	Proton MRS の臨床有用性コンセンサスガイド 2013 年度版	日本磁気共鳴医学会	東京	2013	P36-48
山本俊至	遺伝子解析とマイクローレイ染色体検査	奥村彰久, 浜野晋一郎 編	子どものけいれん・てんかんガイド	中山書店	東京	2013	p89-100
井上 健、小坂 仁	先天性大脳白質形成不全症	遠藤文夫	新領域別症候群シリーズ No.20 「先天代謝異常症候群（下）一病因・病態研究，診断・治療の進歩一」	日本臨牀社	大阪	2012	p897-901.
高梨潤一	脳の MRS 小児脳、発達	成瀬昭二、梅田雅宏、原田雅史、田中忠蔵	磁気共鳴スペクトルの医学応用	インナービジョン	東京	2012	p199-207
高梨潤一	脳炎、急性脳症、脊髄炎	「小児内科」「小児外科」編集委員会	小児疾患の診断治療基準 第4版	東京医学社	東京	2012	P696-699

### 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
Morimura T, Numata Y, Nakamura S, Hirano E, Gotoh L, Goto Y, Urushitani M, Inoue K.	Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by an anti-malaria drug, chloroquine.	<i>Exp Biol Med.</i>		doi: 10.1177/1535370213520108	2014
Numata Y, Gotoh L, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi J, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H, Inoue K.	Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies.	<i>J Neurol.</i>		DOI : 10.1007/s00415-014-7263-5	2014



Ishii K, Doi T, Inoue K, Okawada M, Lane GJ, Yamataka A, Akazawa C	Correlation between multiple <i>ret</i> mutations and severity of hirschsprung's disease.	<i>Pediatr Surg Int</i>	29(2)	157-63	2013
Lassuthová P, Zaliová M, Inoue K, Haberlová J, Sixtová K, et al.	Three new PLP1 splicing mutations demonstrate pathogenic and phenotypic diversity of Pelizaeus-Merzbacher disease.	<i>J Child Neurol.</i>		doi: 10.1177/0883073813492387.	2013
Matsufuji M, Osaka H, Gotoh L, Shimbo H, Takashima S, Inoue K.	Partial <i>PLP1</i> deletion causing X-linked dominant spastic paraplegia type 2	<i>Pediatr Neurol.</i>	49(6)	477-81	2013
Numata Y, Morimura T, Nakamura S, Hirano E, Kure S, Goto YI, Inoue K	Depletion of molecular chaperones from the endoplasmic reticulum and fragmentation of the Golgi apparatus associated with pathogenesis in Pelizaeus-Merzbacher disease.	<i>J Biol Chem</i>	288(11)	7451-66	2013
Takanashi J, Osaka H, Saito H, Sasaki M, Mori H, Shibayama H, Tanaka M, Nomura Y, Terao Y, Inoue K, Matsumoto N, Barkovich J.	Different patterns of cerebellar abnormality and hypomyelination between POLR3A and POLR3B mutations	<i>Brain Dev.</i>	36(3)	259-63	2014
Gotoh L, Inoue K, Helman G, Mora S, Maski K, Soul JS, Bloom M, Evans SH, Goto Y, Caldovic L, Hobson GM, Vanderver A.	GJC2 promoter mutations causing Pelizaeus-Merzbacher-like disease.	<i>Mol Genet Metab</i>		doi: 10.1016/j.ymgme.2013.12.001	2013
Ravenscroft G, Miyatake S, Lehtokari VL, et al.	Mutations in KLHL40 Are a Frequent Cause of Severe Autosomal-Recessive Nemaline Myopathy.	<i>Am J Hum Genet</i>	93	6-18	2013
Anselm I, Azzouz H, Bratkovic D, de Brouwer A, Hamel B et al.	Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency.	<i>J Med Genet</i>	50	463-472	2013
Mitani T, Aida N, Tomiyasu M, Wada T, Osaka H.	Transient ischemic attack-like episodes without stroke-like lesions in MELAS.	<i>Pediatr Radiol</i>	43	1400-1403.	2013
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.	Urine screening for patients with developmental disabilities detected a patient with creatine transporter deficiency due to a novel missense mutation in SLC6A8.	<i>Brain Dev</i>		doi: 10.1016/j.braindev.2013.08.004.	2013
Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, et al.	Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome.	<i>Neurology</i>	81	992-998	2013

Nakamura K, Koder H, Akita T, Shiina M, Kato M, et al.	De Novo Mutations in GNAO1, Encoding a Galphao Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy.	<i>Am J Hum Genet</i>	93	496-505	2013
Imagawa E, <u>Osaka H</u> , Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, et al.	A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link?	<i>Hum Genet</i>	133(2)	225-34	2014
Ohba C, <u>Osaka H</u> , Iai M, Yamashita S, Suzuki Y, et al.	Diagnostic utility of whole exome sequencing in patients showing cerebellar and/or vermis atrophy in childhood.	<i>Neurogenetics</i>	14	225-232	2013
Koder H, Nakamura K, <u>Osaka H</u> , Maegaki Y, Haginoya K, et al.	De novo mutations in SLC35A2 encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy.	<i>Hum Mutat.</i>	34	1708-1714	2013
Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, <u>Osaka H</u> .	A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia.	<i>Pediatr Neurol</i>	0(1)	599-100.	2014
Akiyama T, <u>Osaka H</u> , Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H.	A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency.	<i>JIMD Rep.</i>	12	65-9	2014
<u>Takanashi J</u> , Taneichi H, Misaki T, Yahata Y, Okumura A, Ishida Y, Miyawaki T, Okabe N, Sata T, Mizuguchi M.	Clinical and radiological features of encephalopathy during 2011 E. coli O111 outbreak in Japan.	<i>Neurology</i>	82(7)	564-72	2014
<u>Takanashi J</u> , Nitta N, Iwasaki N, Saito S, Tanaka R, Barkovich AJ, Aoki I.	Neurochemistry in Shiverer mouse depicted on MR spectroscopy.	<i>J Magn Reson Imaging</i>		doi: 10.1002/jmri.24306.	2013
<u>Yamamoto T</u> , Sato H, Lai PS, Nurputra DK, Harahap NIF, et al.	Intragenic mutations in SMN1 may contribute more significantly to clinical severity than SMN2 copy numbers in some spinal muscular atrophy (SMA) patients.	<i>Brain Dev</i>		doi: 10.1016/j.bra indev.2013.11.009.	2013
Lopez E, Thauvin-Robinet C, Reversade B, Khartoufi NE, Devisme L, et al.	C5orf42 is the major gene responsible for OFD syndrome type VI.	<i>Hum Genet</i>	133(3)	367-77	2014
Tada H, <u>Takanashi J</u> .	MR spectroscopy in 18q-syndrome suggesting other than hypomyelination.	<i>Brain Dev</i>	36(1)	57-60	2014
Shiihara T, Miyake T, Izumi S, Sugihara S, Watanabe M, <u>Takanashi J</u> , Kubota M, Kato M.	Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders.	<i>Brain Dev</i>		doi: 10.1016/j.bra indev.2013.06.011.	2013

Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, et al.	MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome.	<i>Am J Med Genet A</i>	161	2234-2243	2013
Shinohara M, Saitoh M, Nishizawa D, Ikeda K, Hirose S, Takanashi J, et al.	ADOR2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus.	<i>Neurology</i>	80	1571-1576	2013
Okumura A, Hayashi M, Shimojima K, Ikeno M, Uchida T, Takanashi J, et al.	Whole-exome sequencing of a unique brain malformation with periventricular heterotopia, cingulate polymicrogyria, and midbrain tectal hyperplasia.	<i>Neuropathology</i>	33	553-560.	2013
Sasaki A, Sumie M, Wada S, Kosaki R, Kurosawa K, Fukami M, Sago H, Ogata T, Kagami M.	Prenatal genetic testing for a microdeletion at chromosome 14q32.2 imprinted region leading to UPD(14)pat-like phenotype.	<i>Am J Med Genet A</i>	164A(1)	264-6	2014
Mori T, Mori K, Ito H, Goji A, Miyazaki M, Harada M, Kurosawa K, Kagami S.	Age-Related Changes in a Patient With Pelizaeus-Merzbacher Disease Determined by Repeated 1H-Magnetic Resonance Spectroscopy.	<i>J Child Neurol.</i>	29(2)	283-8.	2014
Ueda H, Sugiura T, Takeshita S, Ito K, Kakita H, Nagasaki R, Kurosawa K, Saitoh S.	Combination of Miller- Dieker syndrome and VACTERL association causes extremely severe clinical presentation.	<i>Eur J Pediatr</i>		Aug 11. [Epub ahead of print]	2013
Ishikawa A, Enomoto K, Tominaga M, Saito T, Nagai J, Furuya N, Ueno K, Ueda H, Masuno M, Kurosawa K.	Pure duplication of 19p13.3.	<i>Am J Med Genet A.</i>	161(9)	2300-4.	2013
Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, et al.	Gain-of-function mutations in RIT1 cause Noonan syndrome, a RAS/MAPK pathway syndrome.	<i>Am J Hum Genet.</i>	93(1)	173-80.	2013
Wada T, Ban H, Matsufuji M, Okamoto N, Enomoto K, Kurosawa K, Aida N.	Neuroradiologic features in X-linked $\alpha$ -thalassemia/mental retardation syndrome.	<i>AJNR Am J Neuroradiol.</i>	34(10)	2034-8.	2013
Nagase H, Ishikawa H, Kurosawa K, Furuya N, Itani Y, Yamanaka M.	Familial severe congenital diaphragmatic hernia: left herniation in one sibling and bilateral herniation in another.	<i>Congenit Anom.</i>	53(1)	54-7.	2013
Yamamoto T, Shimojima K:	Pelizaeus-Merzbacher disease as a chromosomal disorder.	<i>Congenit Anom</i>	53	3-8	2013
Shimada S, Okamoto N, Ito M, Arai Y, Momosaki K, Togawa M, Maegaki Y, Sugawara M, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T	MECP2 duplication syndrome in both genders.	<i>Brain Dev</i>	35	411-419	2013

Okumura A, Shimojima K, Kubota T, Abe S, Yamashita S, Imai K, Okanishi T, Enoki H, Fukasawa T, Tanabe T, Dibbens LM, Shimizu T, <u>Yamamoto T</u>	PRRT2 mutation in Japanese children with benign infantile epilepsy.	<i>Brain Dev</i>				In press
Shimada S, Maegaki Y, Osawa M, <u>Yamamoto T</u>	Mild developmental delay and obesity in two patients with mosaic 1p36 deletion syndrome.	<i>Am J Med Genet</i>				In press
<u>Yamamoto T</u> , Togawa M, Shimada S, Sangu N, Shimojima K, Okamoto N	Narrowing of the responsible region for severe developmental delay and autistic behaviors in WAGR syndrome down to 1.6 Mb including PAX6, WT1, and PRRG4.	<i>Am J Med Genet</i>				In press
Ishii A, Shioda M, Okumura A, Kidokoro H, Sakauchi M, Shimada S, Shimizu T, Osawa M, Hirose S, <u>Yamamoto T</u>	A recurrent KCNT1 mutation in two sporadic cases with malignant migrating partial seizures in infancy.	<i>Gene</i>	531	467-71		2013
Sangu N, Shimojima K, Shimada S, Ando T, <u>Yamamoto T</u>	Growth patterns of patients with 1p36 deletion syndrome.	<i>Congenit Anom</i>				In press
Eto K, Sakai N, Shimada S, Shioda M, Ishigaki K, Hamada Y, Shinpo M, Azuma J, Tominaga K, Shimojima K, Ozono K, Osawa M, <u>Yamamoto T</u>	Microdeletions of 3p21.31 characterized by developmental delay, distinctive features, elevated serum creatine kinase levels, and white matter involvement.	<i>Am J Med Genet</i>	161A	3049-56		2013
Okamoto N, Ohmachi K, Shimada S, Shimojima K, <u>Yamamoto T</u>	109 kb deletion of chromosome 4p16.3 limited to WHSCR2 in a patient with mild phenotype of Wolf-Hirschhorn syndrome.	<i>Am J Med Genet</i>	161A	1465-9		2013
<u>Yamamoto T</u> , Shimada S, Shimojima K	Fiber-FISH analyses as a diagnostic application for orientation of the microduplications.	<i>World J Med Genet</i>	3	5-8		2013
Okumura A, Hayashi M, Tsurui H, Yamakawa Y, Abe S, Kudo T, Suzuki R, Shimizu T, <u>Yamamoto T</u>	Lissencephaly with marked ventricular dilation, agenesis of corpus callosum, and cerebellar hypoplasia caused by TUBA1A mutation.	<i>Brain Dev</i>	35	274-279		2013
Shichiji M, Ito Y, Shimojima K, Nakamu H, Oguni H, Osawa M, <u>Yamamoto T</u>	A cryptic microdeletion including MBD5 occurring within the breakpoint of a reciprocal translocation between chromosomes 2 and 5 in a patient with developmental delay and obesity.	<i>Am J Med genet A</i>	161A	850-855		2013

Kobayashi S, Inui T, Wakusawa K, Tanaka S, Nakayama T, Uematsu M, Takayanagi M, <u>Yamamoto T</u> , Haginoya K	A case of atypical benign partial epilepsy with action myoclonus.	<i>Seizure</i>	22	242-245	2013
<u>Yamamoto T</u> , Matsuo M, Shimada S, Sangu N, Shimojima K, Aso S, Saito K:	De novo triplication of 11q12.3 in a patient with developmental delay and distinctive facial features.	<i>Mol Cytogenet</i>	6	15	2013
Shimojima K, Shimada S, Sugawara M, Yoshikawa N, Niijima S, Urao M, <u>Yamamoto T</u>	Challenges in genetic counseling because of intra-familial phenotypic variation of oral-facial-digital syndrome type 1.	<i>Congenit Anom</i>	53	155-159	2013
Usui D, Shimada S, Shimojima K, Sugawara M, Kawasaki H, Shigematu H, Takahashi Y, Inoue Y, Imai K, <u>Yamamoto T</u>	Interstitial duplication of 2q32.1-q33.3 in a patient with epilepsy, developmental delay, and autistic behavior.	<i>Am J Med Genet A</i>	161A	1078-1084	2013
Sangu N, Shimosato T, Inoda H, Shimada S, Shimojima K, Ando T, <u>Yamamoto T</u>	A novel nucleotide mutation leading to a recurrent amino acid alteration in SH3BP2 in a patient with cherubism.	<i>Congenit Anom</i>	53	166-169	2013
Okumura A, Hayashi M, Shimojima K, Ikeno M, Uchida T, Takanashi J, Okamoto N, Hisata K, Shoji H, Saito A, Furukawa T, Kishida T, Shimizu T, <u>Yamamoto T</u>	Whole-exome sequence for a unique brain malformation with periventricular heterotopia, cingulate polymicrogyria, and midbrain tectal hyperplasia.	<i>Neuropathology</i>	33	553-560	2013
Okamoto N, Ohmachi K, Shimada S, Shimojima K, <u>Yamamoto T</u>	101 kb deletion of chromosome 4p16.3 limited to WHSCR2 in a patient with mild phenotype of Wolf-Hirschhorn syndrome.	<i>Am J Med Genet A</i>	161A	1465-1469	2013
Shimada S, Okamoto N, Nomura S, Fukui M, Shimakawa S, Sangu N, Shimojima K, Osawa M, <u>Yamamoto T</u>	Microdeletions of 5.5 Mb (4q13.2-q13.3) and 4.1 Mb (7p15.3-p21.1) associated with a saethre-chotzen-like phenotype, severe intellectual disability, and autism.	<i>Am J Med Genet A</i>	161A	2078-2083	2013
Shimojima K, Tanaka R, Shimada S, Sangu N, Nakayama J, Iwasaki N, <u>Yamamoto T</u> :	A novel homozygous mutation of GJC2 derived from maternal uniparental disomy in a female patient with Pelizaeus–Merzbacher-like disease.	<i>J Neurol Sci</i>	330	123-126	2013
Abe Y, Kobayashi S, Wakusawa K, Tanaka S, Inui T, <u>Yamamoto T</u> , Kunishima S, Haginoya K:	Bilateral periventricular nodular heterotopia with megalencephaly: a case report.	<i>J Child Neurol</i>			in press

Shimajima K, Shimada S, Tamasaki A, Akaboshi S, Komoike Y, Saito A, Furukawa T, <u>Yamamoto T</u>	Novel compound heterozygous mutations of POLR3A revealed by whole-exome sequencing in a patient with hypomyelination.	<i>Brain Dev</i>			in press
Takanashi J, Saito S, Aoki I, Barkovich J, Itoh Y, Inoue K.	Increased N-acetyl- aspartate in Model Mouse of Pelizaeus-Merzbacher Disease.	<i>J Magn Reson Imaging</i>	35	418-425	2012
Yu L-H, Morimura T, Numata Y, Yamamoto R, Inoue N, Antalfy B, Goto Y, Deguchi K, Osaka H, Inoue K.	Effect of curcumin in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease.	<i>Mol Genet Metab</i>	106	108-114.	2012
Koizume S, Ito S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Sakuma Y, Osaka H, Takano Y, Ruf W, Miyagi Y.	HIF2alpha-Sp1 interaction mediates a deacetylation-dependent FVII-gene activation under hypoxic conditions in ovarian cancer cells.	<i>Nucleic acids research</i>	40	5389-5401	2012
Kouga T, Iai M, Yamashita S, Aida N, Takanashi JI, Osaka H.	A child with three episodes of reversible splenic lesion.	<i>Neuropediatrics</i>	44(4)	199-202	2013
Osaka H, Takagi A, Tsuyusaki Y, Wada T, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Saitsu H, Salomons GS, Jakobs C, Aida N, Toshihiro S, Kuhara T, Matsumoto N.	Contiguous deletion of SLC6A8 and BAP31 in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness.	<i>Mol Genet Metab.</i>	106	43-47	2012
Saitsu H, Kato M, Osaka H, Moriyama N, Horita H, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N.	CASK aberrations in male patients with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia.	<i>Epilepsia</i>	53	1441-1449	2012
Saitsu H, Osaka H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N.	A girl with early-onset epileptic encephalopathy associated with microdeletion involving CDKL5.	<i>Brain Dev</i>	34	364-367	2012
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 Slit-Robo Rho GTPase activating protein 2 (SRGAP2).	<i>Am J Med Genet A</i>	158A	199-205	2012
Tanigawa J, Kaneko K, Honda M, Harashima H, Murayama K, Wada T, Takano K, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Aida N, Ohtake A, Osaka H.	Two Japanese patients with Leigh syndrome caused by novel SURF1 mutations.	<i>Brain Dev</i>	34	861-865	2012

Tomiyasu M, Aida N, Mitani T, Wada T, Obata T, Osaka H.	Acute hemocerebellitis in a pediatric patient: a case report of a serial MR spectroscopy study.	<i>Acta Radiologica</i>	53	223-227	2012
Tomiyasu M, Aida N, Watanabe Y, Mori K, Endo K, Kusakiri K, Kershaw J, Obata T, Osaka H.	Monitoring the brain metabolites of children with acute encephalopathy caused by the H1N1 virus responsible for the 2009 influenza pandemic: a quantitative in vivo 1H MR spectroscopy study.	<i>Magn Reson Imaging</i>	30	1527-1533	2012
Tsuyusaki Y, Shimbo H, Wada T, Iai M, Tsuji M, Yamashita S, Aida N, Kure S, Osaka H	Paradoxical increase in seizure frequency with valproate in nonketotic hyperglycinemia.	<i>Brain Dev</i>	34	72-75	2012
Wada T, Shimbo H, Osaka H.	A simple screening method using ion chromatography for the diagnosis of cerebral creatine deficiency syndromes.	<i>Amino Acids</i>	43	993-997	2012
Yamashita S, Miyake N, Matsumoto N, Osaka H, Iai M, Aida N, Tanaka Y.	Neuropathology of leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and high lactate caused by a homozygous mutation of DARS2.	<i>Brain Dev</i>	35(4)	312-6	2013
Yoneda Y, Haginoya K, Arai H, Yamaoka S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Yokochi K, Osaka H, Kato M, Matsumoto N, Saitsu H.	De novo and inherited mutations in COL4A2, encoding the type IV collagen alpha2 chain cause porencephaly.	<i>Am J Hum Genet.</i>	90	86-90	2012
Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, et al.	Phenotypic Spectrum of COL4A1 Mutations: Porencephaly to Schizencephaly.	<i>AnnNeurol</i>	73(1)	48-57	2013
Yoshihara N, Okuda M, Takano K, Wada T, Osaka H.	Idiopathic cranial polyneuropathy with unilateral IX and X and contralateral XI nerve palsy in a 4-year-old boy.	<i>Pediatr Neurol</i>	47	198-200	2012
石川亜貴、榎本啓典、古谷憲孝、室谷浩二、朝倉由美、安達昌功、黒澤健司	CHARGE 症候群 26 例の臨床的検討	<i>日児誌</i>	116	1357-64.	2012
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.	<i>Pediatr Radiol</i>	42	380-382	2012
Kurosawa K, Enomoto K, Tominaga M, Furuya N, Sameshima K, Iai M, Take H, et al.	Spastic quadriplegia in Down syndrome with congenital duodenal stenosis/atresia.	<i>Cong Anom</i>	52	78-81	2012

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).	<i>Cong Anom</i>	52	106-110	2012
Enomoto K, Kishitani Y, Tominaga M, Ishikawa A, Furuya N, Aida N, Masun M, Yamada K, Kurosawa K.	Expression Aanalysis of a 17p terminal deletion, including YWHAE, but not PAFAH1B1, associated with normal brain structure on MRI in a young girl.	<i>Am J Med Genet Part A</i>	158A	2347-2352	2012
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).	<i>Hum Genet</i>	131	99-110	2012
Takanashi J, Somazawa F, Maruyama K, Terada H, Xu D, A. Barkovich AJ.	Metabolic changes in early childhood using LCMoel with corrected water scaling method.	<i>J Magn Reson Imaging</i>	35	174-180	2012
Takanashi J, Hayashi M, Yuasa S, Satoh H, Terada H.	Hypomyelination in I-cell disease; MRI, MR spectroscopy and neuropathological correlation.	<i>Brain Dev</i>	34	780-783	2012
Takanashi J, Okamoto N, Yamamoto Y, hayashi S, Arai H, Takahashi Y, Maruyama K, Mizuno S, Shimakawa S, Ono H, Oyanagi R, Kubo S, Barkovich AJ, Inazawa J.	Clinical and radiological features of Japanese patients with a severe phenotype due to CASK Mutations.	<i>Am J Med Genet Part A</i>	158A	3112-3118	2012
Takanashi J, Shirai K, Sugawara Y, Okamoto Y, Obonai T, Terada H.	Kawasaki disease complicated by mild encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS).	<i>J Neurol Sci</i>	315	167-169	2012
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?	<i>Pediatrics</i>		e1068-e1071	2012
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.	<i>Brain Dev</i>	34	337-343	2012
Saitoh M, Shinohara M, Hoshino H, Kubota M, Amemiya K, Takanashi J, Hwang S-K, Hirose S, Mizuguchi M.	Mutations of the SCN1A gene in acute encephalopathy.	<i>Epilepsia</i>	53	558-564	2012



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).	<i>Brain Dev</i>	34	124-127	2012
Mori H, Maeda M, Takanashi J, Kunimatsu A, Matsushima N, Suzuki H, Saito N, Ohtomo K.	Reversible splenial lesion in the corpus callosum following rapid withdrawal of carbamazepine after neurosurgical decompression for trigeminal neuralgia.	<i>J Clin Neurosci</i>	19	1182-1184	2012
Okumura A, Lee T, Ikeno M, Shimojima K, Kajino K, Inoue Y, Yoshikawa N, Suganuma H, Suzuki M, Hisata K, Shoji H, Takanashi J, AJ Barkovich, Shimizu T, Yamamoto T, Hayashi M.	A severe form of epidermal nevus syndrome associated with brainstem and cerebellar malformations and neonatal medulloblastoma.	<i>Brain Dev</i>	34	881-885	2012
Miya K, Shimojima K, Sugawara M, Shimada S, Tsuru H, Harai-Tanaka T, Nakaoka S, Kanegane H, Miyawaki T, Yamamoto T.	A de novo interstitial deletion of 8p11.2 including ANK1 identified in a patient with spherocytosis, psychomotor developmental delay, and distinctive facial features.	<i>Gene</i>	506	146-9	2012
Shimojima K, Okamoto N, Suzuki Y, Saito M, Mori M, Yamagata T, Momoi M, Hattori H, Okano Y, Hisata K, Okumura A, Yamamoto T.	Subtelomeric deletions of 1q43q44 and severe brain impairment associated with delayed myelination.	<i>J Hum Genet</i>	57	593-600	2012
Shimojima K, Inoue T, Imai Y, Arai Y, Komoike Y, Sugawara M, Fujita T, Ideguchi H, Yasumoto S, Kanno H, Hirose S, Yamamoto T.	Reduced PLP1 expression in induced pluripotent stem cells derived from a Pelizaeus-Merzbacher disease patient with a partial PLP1 duplication.	<i>J Hum Genet</i>	57	580-586	2012
Shimojima K, Okumura A, Mori H, Abe S, Ikeno M, Shimizu T, Yamamoto T.	De novo microdeletion of 5q14.3 excluding MEF2C in a patient with infantile spasms, microcephaly, and agenesis of the corpus callosum.	<i>Am J Med Genet A</i>	158A	2272-6	2012
Shimada S, Miya K, Oda N, Watanabe Y, Kumada T, Sugawara M, Shimojima K, Yamamoto T.	An unmasked mutation of EIF2B2 due to submicroscopic deletion of 14q24.3 in a patient with vanishing white matter disease.	<i>Am J Med Genet</i>	158A	1771-7	2012
Shimojima K, Mano T, Kashiwagi M, Tanabe T, Sugawara M, Okamoto N, Arai H, Yamamoto T.	Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a duplication-inverted triplication-duplication in chromosomal segments including the PLP1 region.	<i>Eur J Med Genet</i>	55	400-3	2012

Nakayama T, Nabatame S, Saito Y, Nakagawa E, Shimojima K, Yamamoto T, et al.	8p deletion and 9p duplication in two children with electrical status epilepticus in sleep syndrome.	<i>Seizure</i>	21	295-9	2012
Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura- Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, Yamamoto T, et al.	Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease.	<i>Neurology</i>	78	803-810	2012
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.	<i>Brain Dev</i>	34	230-233	2012
Shimojima K, Yamamoto T.	Growth profiles of 34 patients with Wolf- Hirschhorn syndrome.	<i>J Pediatr Genet</i>	1	33-37	2012
Takahashi I, Takahashi T, Sawada K, Shimojima K, Yamamoto T.	Jacobsen syndrome due to an unbalanced translocation between 11q23 and 22q11.2 identified at age 40 years.	<i>Am J Med Genet A</i>	158A	220-223	2012

研究成果の刊行物・別刷（抜粋）

ORIGINAL ARTICLE

# Reduced *PLP1* expression in induced pluripotent stem cells derived from a Pelizaeus–Merzbacher disease patient with a partial *PLP1* duplication

Keiko Shimojima<sup>1,2</sup>, Takahito Inoue<sup>3</sup>, Yuki Imai<sup>4</sup>, Yasuhiro Arai<sup>5</sup>, Yuta Komoike<sup>6</sup>, Midori Sugawara<sup>2</sup>, Takako Fujita<sup>3</sup>, Hiroshi Ideguchi<sup>3</sup>, Sawa Yasumoto<sup>3</sup>, Hitoshi Kanno<sup>7</sup>, Shinichi Hirose<sup>3</sup> and Toshiyuki Yamamoto<sup>2</sup>

Pelizaeus–Merzbacher disease (PMD) is an X-linked recessive disorder characterized by dysmyelination of the central nervous system (CNS). We identified a rare partial duplication of the proteolipid protein 1 gene (*PLP1*) in a patient with PMD. To assess the underlying effect of this duplication, we examined *PLP1* expression in induced pluripotent stem (iPS) cells generated from the patient's fibroblasts. Disease-specific iPS cells were generated from skin fibroblasts obtained from the indicated PMD patient and two other PMD patients having a 637-kb chromosomal duplication including entire *PLP1* and a novel missense mutation (W212C) of *PLP1*, by transfections of *OCT3/4*, *C-MYC*, *KLF4* and *SOX2* using retro-virus vectors. *PLP1* expressions in the generated iPS cells were examined by northern blot analysis. Although *PLP1* expression was confirmed in iPS cells generated from two patients with the entire *PLP1* duplication and the missense mutation of *PLP1*, iPS cells generated from the patient with the partial *PLP1* duplication manifesting a milder form of PMD showed null expression. This indicated that the underlying effect of the partial *PLP1* duplication identified in this study was different from other *PLP1* alterations including a typical duplication and a missense mutation.

*Journal of Human Genetics* (2012) 57, 580–586; doi:10.1038/jhg.2012.71; published online 14 June 2012

**Keywords:** Pelizaeus–Merzbacher disease (PMD); proteolipid protein 1 gene (*PLP1*); induced pluripotent stem (iPS) cells; partial duplication; dysmyelination

## INTRODUCTION

Pelizaeus–Merzbacher disease (PMD; MIM #312080) is an X-linked recessive neurodegenerative disorder characterized by dysmyelination of the central nervous system (CNS). Patients with PMD often present with nystagmus as the initial symptom, and psychomotor developmental delay associated with spasticity and ataxia is seen later in development.<sup>1–3</sup> The proteolipid protein 1 gene (*PLP1*; MIM #300401), located on chromosome Xq22.2, is the gene responsible for PMD. It encodes 2 isoforms, PLP1 and DM20, as a consequence of differential splicing of exon 3. The genetic basis of PMD is unique because two-thirds of *PLP1* abnormalities identified in PMD patients are duplications of small chromosomal segments that include *PLP1*. The remaining one-third of *PLP1* abnormalities are nucleotide alterations in the *PLP1* coding sequence. The nucleotide alterations in *PLP1* are varied and are scattered along the entire coding region of *PLP1*.<sup>1–3</sup>

Because *PLP1* is mainly expressed in oligodendrocytes in the CNS and cultured skin fibroblasts express low levels of *PLP1*, gene

expression in the fibroblasts has been analyzed by comparative reverse-transcription (RT)-PCR analysis.<sup>4,5</sup> The use of technology to establish induced pluripotent stem (iPS) cells has now made it possible to examine gene expression and function in greater detail.<sup>6</sup> In 2007, Takahashi *et al.* established iPS cells from human skin fibroblasts.<sup>7</sup> This revolutionary technology has stimulated and accelerated research in embryogenesis and genetics. In this study, we established iPS cells from skin fibroblasts of patients with PMD and examined *PLP1* expression. This is the first report analyzing *PLP1* expression in PMD disease-carrying iPS cells.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

For our ongoing study identifying genomic mutations in *PLP1*, three new patients with dysmyelination were referred to us for genetic diagnosis based on the clinical diagnosis of PMD.<sup>8</sup> Clinical information and radiographic findings by MRI for the patients were obtained from attending doctors. Based on

<sup>1</sup>Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Agency (JST), Kawaguchi, Japan; <sup>2</sup>Tokyo Women's Medical University Institute for Integrated Medical Sciences, Tokyo, Japan; <sup>3</sup>Department of Pediatrics, School of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka, Japan; <sup>4</sup>Department of Pediatrics and Child Health, Nihon University School of Medicine, Tokyo, Japan; <sup>5</sup>Tokyo Metropolitan Tobu Medical Center for Persons with Developmental/Multiple Disabilities, Tokyo, Japan; <sup>6</sup>Department of Hygiene and Public Health, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan and <sup>7</sup>Department of Transfusion Medicine and Cell Processing, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

Correspondence: Dr T Yamamoto, Institute for Integrated Medical Sciences, Tokyo Women's Medical University, Kawada-cho 8-1, Shinjuku-ward, Tokyo 162-8666, Japan.

E-mail: yamamoto.toshiyuki@twmu.ac.jp

Received 19 March 2012; revised 15 May 2012; accepted 16 May 2012; published online 14 June 2012