

可逆性脳梁膨大部病変を伴う軽症脳症の遺伝子解析に関する研究

研究分担者 奥村 彰久 愛知医科大学医学部小児科・教授

研究要旨

可逆膨大部病変を伴う軽症脳症（MERS）は、頭部MRI拡散強調画像において脳梁膨大部に一過性の拡散能低下を認める急性脳症のサブタイプである。現在までMERSの発症機序は解明されていない。我々は、昨年度までに2家系のMERS家族例に対し全エクソーム解析を用いた遺伝子解析を施行した。その結果、2家系のMERS患者にMYRF遺伝子の同一のミスセンス変異を同定した。HEK細胞にミスセンス変異を導入したMYRF蛋白を発現させてルシフェラーゼアッセイにて転写活性を測定したところ、変異を導入した蛋白は野生型に比べて機能低下を示した。33例のMERS孤発例に対しMYRF遺伝子の変異の有無を解析したところ、変異を認めた症例は無かった。これらの結果からMYRF遺伝子は家族性MERSの原因遺伝子であり、その機能低下がMERSの発症と関連する可能性が示唆された。本研究の成果は、急性脳症の遺伝学的背景を明らかにするのみならず、発熱に伴う異常言動のリスク因子の同定にも有用である可能性があると思われた。

A．研究目的

可逆膨大部病変を伴う急性脳症（MERS）は、頭部MRI拡散強調画像において脳梁膨大部に一過性の拡散能低下を認める急性脳症のサブタイプである。症例によっては、拡散能低下をが脳梁全体や半卵円中心にも認めることがある。一般にMERSの脳病変は数日～1週間以内に消失し、不可逆性の病変を認めることはない。MERSの臨床症状は、異常言動や軽度の意識障害にとどまることが多く、その持続も数日以内である。神経学的予後も良好であり、特に治療をしなくても後障害なく回復すると考えられている。現在までMERSの病態は十分に明らかになっていない。これまでに、SIADHや自然免疫反応炎症の関与が示唆されているが、それらの因子と病変や神経症状との関係は未解明である。

近年、遺伝子変異やバリエーションと急性脳症との関係が注目されている。二相性脳症では *SCN1A* などの遺伝子変異やバリエーションの報告がなされている。しかし、MERSにおいては遺伝学的背景の研究は進んでいない。我々は昨年度までに、2家系の家族性MERS症例においてエクソーム解析を行い、MYRF 遺伝子に2家系に共通するミスセンス変異を認め、MERSの責任遺伝子である可能性が濃厚であると考えた。今年度は、MERS孤発例においてMYRF 遺伝子変異の有無を解析するとともに、ルシフェラーゼアッセイを用いて我々が同定した遺伝子変異がMYRF蛋白に与える影響を解析した。

B．研究方法

I．MERS 孤発例の遺伝子解析

対象は、MERS 孤発例 33 例である。MERS の診断は、以下の全てを満たすものとした。

- 1) 軽度意識障害 and/or 異常言動が 24 時間以上持続する。
 - 2) 頭部 MRI で脳梁膨大部に一過性の拡散低下を認める。脳梁全体および半卵円中心に同様の異常を認めることもある。
 - 3) 1 週間以内に後障害なく回復し、頭部 MRI 異常も消失する
 - 4) 他の神経疾患が除外できる
- MYRF 遺伝子解析はサンガー法にて行った。

II . 遺伝子変異による MYRF 蛋白の機能への影響の解析

MYRF 遺伝子の N 末端フラグメントを組み込んだ pRBG4-MYRF-N ベクターと、MYRF 蛋白によって転写が促進されるラット *Rffl* 遺伝子のエンハンサー部分をルシフェラーゼの上流に組み込んだ pGL3P-Rffl ベクターを HEK293 細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイにて MYRF 遺伝子の c.1208A>G 変異による転写活性変化を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究については、愛知医科大学医学部、東京大学医学部、名古屋大学医学部の倫理委員会の承認を得て施行した。

C . 研究結果

I . MERS 孤発例の遺伝子解析

33 例の MERS 孤発例において MYRF 遺伝子の変異を認めなかった。

II . 遺伝子変異による MYRF 蛋白の機能への影響の解析

ルシフェラーゼアッセイの結果を図 1

に示す。我々が同定した c.1208A>G 変異を MYRF 蛋白に導入することにより、ラット *Rffl* 遺伝子のエンハンサー部分を介した転写活性が MYRF 野生型に比べて約 40%低下した。

D . 考察

昨年度までの研究で、我々は MYRF 遺伝子に 2 家系の MERS 家族例に同一のミスセンス変異を同定した。この変異はアミノ酸のグルタミンからアルギニンへの変異を伴い、頻度データベースに同バリエーションの登録は認めなかった。変異部位のアミノ酸 (グルタミン) は種間で非常に高い配列保存性を呈していた。各種 prediction tools ではこのバリエーションは disease causing と予測された。これらのことから MYRF 遺伝子の変異が MERS の原因であると推定していたが、その裏づけは不十分であった。

本年度の研究では、ルシフェラーゼアッセイを用いて変異の導入による MYRF 蛋白の機能変化を解析した。その結果、我々が同定した c.1208A>G 変異を導入することによってその活性が明らかに減少することが示された。この結果は、MYRF 遺伝子の変異が MERS の原因であることを支持するものである。現在まで MYRF 遺伝子と関連する疾患の報告はなく、MYRF 遺伝子がヒトの疾患に関与することが初めて証明されたと考える。MYRF 遺伝子は脳白質の髄鞘の維持に重要な役割を果たすと推定されており、MERS の発症機序を考察する上でも重要な知見が得られたと考える。

一方、MERS 孤発例では MYRF 遺伝子の変異を認めず、その関与を証明することはできなかった。この結果は、MERS 全体の中では MYRF 遺伝子の関与はそれほど大きなものはない可能性を示唆する。MERS 家族

例は、孤発例に比較して発症時の年齢がやや高く、画像異常が広範である傾向がある。家族性 MERS は、MERS の中でもやや特異な位置を占める可能性がある。しかし、*MYRF* 遺伝子変異の関与の発見は、孤発性 MERS の病因を考える上でも大きな手がかりを与えらると思われる。すなわち、髄鞘の維持の障害が MERS の原因であるとするならば、孤発性 MERS の原因も髄鞘の維持に関連した遺伝子にある可能性がある。現在 MERS 孤発例について全エクソーム解析を試行しており、今後も研究を継続しその原因の解明を試みる。

E . 結論

MERS 孤発例では *MYRF* 遺伝子の解析を行ったが変異を認めた症例は無く、現時点では *MYRF* 遺伝子が孤発性の MERS に関与している証拠は得られなかった。

一方、我々が同定したミスセンス変異は *MYRF* 蛋白の転写活性を明らかに低下させることが判明し、病的意義を持つことが明らかになった。今後は、*MYRF* 遺伝子の変異による機能の変化を様々な方法で研究する予定である。温度などの環境やサイトカインなどの液性因子による *MYRF* 蛋白の機能への影響を、試験管内や動物モデルの作成によって検討する準備を開始している。また、MERS や発熱に伴う異常言動の孤発例に対し全エクソーム解析を行い、*MYRF* 以外の遺伝子の関与を検討中である。これらの研究成果は、発熱に伴う異常言動や MERS の原因を明らかにし、その病態や治療法の解明に有用である可能性がある。また、薬物と発熱に伴う異常言動との関係が明らかになり、その使用の適否を科学的な根拠によって示すことが可能になることが期待される。

F . 研究発表

1. 論文発表

Ikeno M, Abe S, Kurahashi H, Takasu M, Shimizu T, Okumura A. Gastric perforation and critical illness polyneuropathy after steroid treatment in a patient with encephalitis/encephalopathy with transient splenic lesion. *Brain Dev* 2017;39(4):356-360.

Takasu M, Kubota T, Tsuji T, Kurahashi H, Numoto S, Watanabe K, Okumura A. The semiology of febrile seizures: Focal features are frequent. *Epilepsy Behav* 2017;73:59-63.

Fukushima W, Ozasa K, Okumura A, Mori M, Hosoya M, Nakano T, Tanabe T, Yamaguchi N, Suzuki H, Mori M, Hatayama H, Ochiai H, Kondo K, Ito K, Ohfuji S, Nakamura Y, Hirota Y. Oseltamivir use and severe abnormal behavior in Japanese children and adolescents with influenza: Is a self-controlled case series study applicable? *Vaccine* 2017; 35(36): 4817-4824.

Kidokoro H, de Vries LS, Ogawa C, Ito Y, Ohno A, Groenendaal F, Saitoh S, Okumura A, Ito Y, Natsume J. Predominant area of brain lesions in neonates with herpes simplex encephalitis. *J Perinatol* 2017;37(11):1210-1214.

Kurahashi H, Azuma Y, Masuda A, Okuno T, Nakahara E, Imamura T, Saitoh M, Mizuguchi M, Shimizu T, Ohno K, Okumura

A. MYRF is associated with encephalopathy with reversible myelin vacuolization. *Ann Neurol* 2018; 83(1): 98-106.

Okumura A, Ida S, Mori M, Shimizu T; Committee on Pediatric Nutrition of the Child Health Consortium of Japan. Vitamin B1 Deficiency Related to Excessive Soft Drink Consumption in Japan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018 in press.

Muto T, Nago N, Kurahashi H, Minagawa H, Okumura A. A One-Month-Old Boy With a Seizure During a Febrile Illness. *Clin Pediatr* 2018;57(3):355-357.

Chong PF, Kira R, Mori H, Okumura A, Torisu H, Yasumoto S, Shimizu H, Fujimoto T, Hanaoka N, Kusunoki S, Takahashi T, Oishi K, Tanaka-Taya K; AFM collaborative study investigators. Clinical Features of Acute Flaccid Myelitis Temporally Associated with an Enterovirus D68 Outbreak: Results of a Nationwide Survey of Acute Flaccid Paralysis in Japan, August-December 2015. *Clin Infect Dis* 2018;66(5):653-664.

2. 学会発表

Akihisa Okumura. Neuophysiological Aspects of Brain Injuries in Neonates. 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Fukuoka, 2017.5.12.

奥村彰久、森壘 . 急性弛緩性脊髄炎の MRI

所見 . 第 59 回日本小児神経学会学術集会、大阪、2017.6.16

奥村彰久 . 急性発作の診療: 新生児と小児 . 第10回日本てんかん学会東海・北陸地方会、岐阜、2017.7.8.

Akihisa Okumura. Neonatal Seizures: from Bench to Incubator: When, How, and What to Treat? The 32nd International Epilepsy Congress, Barcelona, Spain, 2017.9.4.

奥村彰久 . 急性脳症診療ガイドラインを読み解く . 第 11 回東海地区小児神経セミナー、名古屋、2017.9.9

奥村彰久、森壘 . 小児の急性弛緩性脊髄炎の MRI 所見 . 第 22 回日本神経感染症学会学術大会、北九州、2017.10.14

奥村彰久 . 急性脳症における脳波の意義と後障害としてのてんかん: インフルエンザ脳症を中心に . 第 51 回日本てんかん学会学術集荷、京都、2017.11.4

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし