

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、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、MERS患者に2家系に共通するMYRF遺伝子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、軽度意識障害and/or異常言動を主徴とし、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ことを特徴とする急性脳症のサブタイプである。症例によっては、拡散能低下を脳梁全体や半卵円中心にも認めることがある。神経症状やMRI異常は数日から1週間以内に消失し、後障害を認めることは原則としてない。

現在までMERSの病態は十分に明らかになっていない。MERSでは急性期に低Na血症を伴うため、SIADHが関与していることが示唆されている。また、MERSは時に川崎病や上部尿路感染症に合併することが報告されており、自然免疫による炎症に伴うサイトカインなどの液性因子の関与も考え

られる。実際にMERSの症例では、その一部に髄液や血清中においてIL-6などのサイトカイン値の上昇も報告されている。

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、3世代にわたってMERSおよびそれに類似した神経症状を認める家族例に遭遇した。この家族例を手がかりとしてMERSの遺伝学的解析を行った。

B．研究方法

I. MERS 家族例の遺伝子解析

発端者は6歳女児である（図1）。2歳時に発熱に伴ってけいれんを認め、意識減損が遷延したため入院した。3歳時にも同様

のイベントがあり入院した。その際に頭部 MRI を施行したところ、脳梁および半卵円中心に拡散能低下を認め MERS と診断された (図 2)。特に治療を行わなかったが、神経学的後障害なく回復した。それ以降も発熱に伴って異常言動を認めることがあり、時に入院加療が必要である。現在までの発達は正常で、神経学的所見にも異常を認めない。

発端者の家系 (家系 A) には、以下のように同様の症状を認めるものが複数認められた (図 1)。

母: 11 歳時に発熱した際に急に話せなくなり、体も動かなくなった。2-3 日で回復した。

母の弟: 6 歳時に授業中に発熱した際に動けなくなり、寝たきりの状態が 2-3 日続いたが、自然に回復した。

母の妹: 8 歳時に発熱に伴って、けいれん・軽度意識障害・異常言動を認めた。

母方祖母: 幼児期に発熱に伴って急に話せなくなり、身体も動かなくなることが 2 回あった。

母方曾祖母: 発熱時に急に話せなくなり、身体も動かなくなることがあった。

この家系のうち、母方曾祖母を除いた 5 例についてインフォームドコンセントを得た後に採血し遺伝子解析を行った。遺伝子解析は、次世代シーケンサーを用いて全エクソーム解析を行った。この家系では常染色体優性遺伝であると想定し、以下の条件を満たす SNV を抽出した: 1) 5 例に共通する、2) heterozygous SNV である、3) エクソン中に存在するまたは splicing に影響する、4) アミノ酸変異を伴う、5) NHLBI Exome Sequencing Project・1000 Genomes、HGVD・ExAC の全てで頻度が 1% 未満。

さらに、家系 A と血縁がない既報告の MERS 家族例 (家系 B、図 1・2) において家系 A で同定した遺伝子変異の有無につき、サンガー法で解析を行った。

II . 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。

III . 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 *Rff1* 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-Rff1 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 家族例の遺伝子解析

家系 A において、前述のフィルターで 102 個の SNV が判明した。これらの SNV を 39 個の遺伝子に絞り込んで解析したところ、中枢神経系に特異的に発現する *MYRF* 遺伝子に 5 人が共有する c.1208A>G 変異を確認した。c.1208A>G 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。さらに、5 症例すべてにおいてサンガー法で c.1208A>G 変異の存在を確認した (図 1)。

家系 B において *MYRF* 遺伝子の解析を行ったところ、MERS または発熱に伴う異常言動の既往を持つものに c.1208A>G 変異の存在を確認した。

II . 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。

III . 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 3 に示す。我々が同定した c.1208A>G 変異を導入することにより作成した変異 *MYRF* は、ラット *Rfl1* 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%低下していた

D . 考察

本研究では、MERS 家系例について全エクソーム解析を施行し、*MYRF* 遺伝子とその発

症に関与する可能性があることを示すことができた。この結果は、MERS の発症には遺伝学的な因子が関与することを示唆するとともに、MERS および発熱時の異常言動の発症機序を解明する手がかりとなると思われる。

MYRF 遺伝子の機能は現在まで十分に解明されていないが、大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いる。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 遺伝子のノックアウトマウスでは、中枢神経系の炎症を起こすことが確認されている。これまでの研究の結果から MERS ではサイトカインなどの自然免疫反応との関連が示唆されている。したがって、*MYRF* 遺伝子の変異により感染によって何らかのトリガーがかかり中枢神経内で過剰な炎症反応が起きる可能性は否定できない。また、今回の同定された c.1208A>G 変異は、*MYRF* 遺伝子の DNA 結合ドメインとして機能予測されている箇所が存在する。したがって、c.1208A>G 変異が *MYRF* 遺伝子の機能に影響することが強く示唆されていた。ルシフェラーゼアッセイにて、c.1208A>G 変異をもつ *MYRF* 蛋白はその転写活性が野生型に比べて低下していることが確認された。これらのことから、*MYRF* 遺伝子の変異によって機能低下を起こすことが、MERS および発熱時の異常言動の発症に関与していると推測される。

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

MYRF 遺伝子の同一ミスセンス変異を2家系の MERS 家族例に同定し、*MYRF* 遺伝子が家族性 MERS の発症に関与していることを明らかにした。一方、MERS 孤発例では *MYRF* 遺伝子の変異を認めなかった。

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

Okumura A, Nakazawa M, Igarashi A, Abe S, Ikeno M, Nakahara E, Yamashiro Y, Shimizu T, Takahashi T. Anti-aquaporin 4 antibody-positive acute disseminated encephalomyelitis. *Brain Dev* 2015; 37(3): 339-343.

Ito Y, Natsume J, Kidokoro H, Ishihara N, Azuma Y, Tsuji T, Okumura A, Kubota T, Ando N, Saitoh S, Miura K, Negoro T, Watanabe K, Kojima S. Seizure characteristics of epilepsy in childhood after acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Epilepsia* 2015; 56(8): 1286-1293.

Nakahara E, Sakuma H, Kimura-Kuroda J, Shimizu T, Okumura A, Hayashi M. A diagnostic approach for identifying anti-neuronal antibodies in children with suspected autoimmune encephalitis. *J Neuroimmunol* 2015; 285: 150-155.

Nakazawa M, Akasaka M, Hasegawa T, Suzuki T, Shima T, Takanashi J, Yamamoto A, Ishidou Y, Kikuchi K, Niijima S, Shimizu T, Okumura A. Efficacy and safety of fosphenytoin for acute encephalopathy in children. *Brain Dev* 2015; 37(4): 418-422.

Nakazawa M, Toda S, Abe S, Ikeno M, Igarashi A, Nakahara E, Yamashita S, Niijima S, Shimizu T, Okumura A. Efficacy and safety of fosphenytoin for benign convulsions with mild gastroenteritis. *Brain Dev* 2015; 37(9): 864-867.

Okanishi T, Yamamoto H, Hosokawa T, Ando N, Nagayama Y, Hashimoto Y, Maihara T, Goto T, Kubota T, Kawaguchi C, Yoshida H, Sugiura K, Itomi S, Ohno K, Takanashi J, Hayakawa M, Otsubo H, Okumura A. Diffusion-weighted MRI for early diagnosis of neonatal herpes simplex encephalitis. *Brain Dev* 2015; 37(4): 423-431.

- Takanashi J, Shiihara T, Hasegawa T, Takayanagi M, Hara M, Okumura A, Mizuguchi M. Clinically mild encephalitis with a reversible splenic lesion (MERS) after mumps vaccination. *J Neurol Sci* 2015; 349(1-2): 226-228.
- Yamamoto H, Okumura A, Natsume J, Kojima S, Mizuguchi M. A severity score for acute necrotizing encephalopathy. *Brain Dev* 2015; 37(3): 322-327.
- Yamamoto H, Natsume J, Kidokoro H, Ishihara N, Suzuki M, Tsuji T, Kubota T, Yamada A, Ozeki M, Kato Z, Kawamura Y, Yoshikawa T, Okumura A, Ando N, Saitoh S, Takahashi Y, Watanabe K, Kojima S. Clinical and neuroimaging findings in children with posterior reversible encephalopathy syndrome. *Eur J Paediatr Neurol* 2015; 19(6): 672-678.
- Okumura A, Nakahara E, Ikeno M, Abe S, Igarashi A, Nakazawa M, Takasu M, Shimizu T. Efficacy and tolerability of high-dose phenobarbital in children with focal seizures. *Brain Dev* 2016; 38(4): 414-418.
- Okumura A, Abe S, Kurahashi H, Takasu M, Ikeno M, Nakazawa M, Igarashi A, Shimizu T. Worsening of attitudes toward epilepsy following less influential media coverage of epilepsy-related car accidents: An infodemiological approach. *Epilepsy Behav* 2016; 64: 206-211.
- Kurahashi H, Okumura A, Kubota T, Kidokoro H, Maruyama K, Hayakawa M, Itakura A, Matsuzawa K, Yamamoto H, Kato T, Hayakawa F, Watanabe K. Increased fetal heart rate variability in periventricular leukomalacia. *Brain Dev* 2016; 38(2): 196-203.
- Ikeno M, Okumura A, Abe S, Igarashi A, Hisata K, Shoji H, Shimizu T. Clinically silent seizures in a neonate with tuberous sclerosis. *Pediatr Int* 2016; 58(1): 58-61.
- Yamakawa K, Yamagishi Y, Miyata K, Shimomura Y, Iwata A, Hori T, Mikamo H, Okumura A. Bacteremia Caused by *Raoultella ornithinolytica* in Two Children. *Pediatr Infect Dis J* 2016; 35(4): 452-453.
- Igarashi A, Okumura A, Shimojima K, Abe S, Ikeno M, Shimizu T, Yamamoto T. Focal seizures and epileptic spasms in a child with Down syndrome from a family with a PRRT2 mutation. *Brain Dev* 2016; 38(6): 597-600.
- Abe Y, Sakai T, Okumura A, Akaboshi S, Fukuda M, Haginoya K, Hamano S, Hirano K, Kikuchi K, Kubota M, Lee S, Maegaki Y, Sanefuji M, Shimozato S, Suzuki M, Suzuki Y, Takahashi M, Watanabe K, Mizuguchi M, Yamanouchi H. Manifestations and characteristics of congenital adrenal hyperplasia-associated encephalopathy. *Brain Dev* 2016; 38(7): 638-647.
- Takeuchi T, Natsume J, Kidokoro H, Ishihara N, Yamamoto H, Azuma Y, Ito Y, Kurahashi N, Tsuji T, Suzuki M, Itomi K, Yamada K, Kurahashi H, Abe S, Okumura A, Maruyama K, Negoro T, Watanabe K, Kojima S. The effects of co-medications on lamotrigine clearance in Japanese children with epilepsy. *Brain Dev* 2016; 38(8): 723-730.
- Miyata K, Hori T, Yamakawa K, Takasu M, Hayakawa T, Shimomura Y, Iwata A, Okumura A, Nakura T, Jyoko M, Mori Y, Takahashi E, Hirato J. Medulloblastoma with epithelioid features in the cerebellar vermis. *Pediatr Int* 2016; 58(9): 908-12.
- 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 splenial 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, Ohfujii 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. 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. 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

奥村彰久. 小児の急性脳炎・脳症. 第263回日本小児科学会東海地方会、名古屋、2015.2.1.

Akihisa Okumura, Shinpei Abe, Mika Nakazawa, Michihiko Takasu, Hirokazu Kurahashi, Toshiaki Shimizu. Were attitude toward epilepsy and driving license affected by media coverage? 第118回日本小児科学会学術集会、大阪、2015.4.16.

Akihisa Okumura, Toshiyuki Yamamoto, Masakazu Miyajima, Keiko Shimojima, Satoshi Kondo, Shinpei Abe, Mitsuru Ikeno, Hirokazu Kurahashi, Michihiko Takasu, Toshiaki Shimizu. 3p Interstitial Deletion Including PRICKLE2 in Identical Twins with Autistic Features. 第57回日本小児神経学会学術集会、大阪、2015.5.29.

奥村彰久、辻健司、久保田哲夫、安藤直樹、夏目淳、齋藤伸治、東海小児神経研究. 09-10シーズン以降の小児のインフルエンザ脳症の実態. 第20回日本神経感染症学会学術集会、長野、2015.10.23.

Akihisa Okumura, Eisuke Arai, Yuri Kitamura, Shinpei Abe, Mitsuru Ikeno,

Michihiko Takasu, Hirokazu Kurahashi, Takuro Fujimaki, Toshiyuki Yamamoto, Toshiaki Shimizu. Epilepsy Phenotypes in Siblings with Norrie Disease. 第 49 回日本てんかん学会学術集会、長崎、2015.10.30.

奥村彰久 . 急性脳症 Up to Date . 第 624 回日本小児科学会東京都地方会講話会、東京、2016.1.9

奥村彰久 . 愛知県の EVD68 感染症の現状 . 第 5 回愛知県小児臨床研究会、名古屋、2016.1.15.

奥村彰久 . 消化管感染症と重症合併症 脳炎・脳症 . 第 12 回日本小児消化管感染症研究会、東京、2016.2.6.

奥村彰久 . 小児の脳炎・脳症:現在と未来 . 第 90 回日本感染症学会総会、仙台、2016.4.15.

奥村彰久 . 急性脳症における脳波 . 第 58 回日本小児神経学会学術集会、東京、2016.6.3.

Akihisa Okumura.
Electroencephalography in Children with Acute Encephalopathy. The 18th Annual Meeting of Infantile Seizure Society, Tokyo, Japan, 2016.7.2.

奥村彰久 . 急性脳炎・脳症 : 最近の話題 . 第 27 回日本小児神経学会中国・四国地方会、岡山、2016.7.16.

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

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

