

疾患の克服に向けた国際共同研究の推進：Pelizaeus-Merzbacher 病の自然歴調査 研究への取り組み

井上 健¹、高梨潤一²、小坂 仁³

1 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第二部 室長

2 東京女子医科大学八千代医療センター 小児科 教授

3 自治医科大学 小児科 教授

研究要旨

稀少性難治性疾患は患者数が極めて少ないものが多く、その臨床症状の多様性や疾患の自然歴についての知見は、記述的なものにとどまるものが多い。近年、遺伝子治療やゲノム編集技術の進歩などにより、これらの稀少性難病に対しても根本的な治療の可能性があることが、明らかになりつつある。稀少性疾患の臨床治験においては、症例数の確保が困難であり、かつ倫理的にも二重盲検法の適用が困難な場合がある。こういった場合には、既知の未治療の疾患自然歴との比較が有用となる。すなわち新規の治療法の臨床応用を進めていくためには、定量的データとして疾患本来の自然歴を確立しておくことが必要である。こういった共通認識のもと、先天性大脳白質形成不全症の臨床研究に取り組む国際的な研究者が共同でその代表的疾患である Pelizaeus-Merzbacher 病の疾患自然歴の収集を後方視野的に取り組むことになったのでその概要について報告する。

A. 研究目的

先天性大脳白質形成不全症は、非常に稀少な遺伝性の難治性疾患である。以前、我々が実施したわが国における全国疫学調査では、最も頻度の高い Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) でも男児 10 万出生あたり 1.4 人と推測されている (Numata et al. 2014)。PMD 以外の先天性大脳白質形成不全症はさらに稀少である。従って、これらの疾患の自然歴については、多数症例に関して、客観的数値や評価項目を用いた研究は行われておらず、もっぱら記述的な記載のみであった。

近年、遺伝子治療、幹細胞移植、ゲノム編集など革新的な分子細胞生物学的技術が次々に開発され、これまで

治療がなかったこれらの難治性疾患についても、治療法開発の可能性が見えてきた。今後、こういった先進技術を用いた分子標的治療や幹細胞治療が迅速に実用化されるためには、その有効性を確実に評価できる臨床的基盤の早急な整備が必要であり、その一つが疾患の自然歴である。

稀少性難治性疾患の臨床試験においては、多数症例を対象とした二重盲検法の実施が困難である。従ってその治療効果の検証には、疾患の自然歴との比較が有用となる。しかし、稀少性疾患においては、国内の患者数は少なく、また原因遺伝子変異によって、重症度も異なることから、なるべく多くの症例を集めたデータの集積が重要

である。そこで我々は、米国のペンシルベニア小児病院 (CHOP) が中心となって実施を計画している PMD の自然歴調査に参画し、合計 100 症例の自然歴に関するデータを収集することとなった。

B. 研究方法

【研究参加国】共同研究を取り仕切るのは、CHOP の Vanderver 博士であり、米国以外に日本を含め 5 カ国の研究者が参画している。

研究代表者

A. Vanderver (アメリカ、CHOP)

分担研究者

C. Stutterd (オーストラリア)

N. Wolf (オランダ)

G. Bernard (カナダ)

Harting (ドイツ)

井上 健、(小坂 仁、高梨潤一) (日本)

【予定症例数】100 例程度の PMD 症例を国際的に登録し、後方視的に臨床および画像情報を登録する。本邦からは 15 症例の登録を予定。

【登録方法】情報の登録は CHOP がもつ登録データベースを用いる。

【倫理審査】CHOP での倫理審査終了し、NCNP での倫理審査も終了した。

【研究資金】主要な研究資金は、米国の非営利患者団体である PMD foundation がサポートし、同時に収集されたデータへのアクセス権も共有する。将来的に国際共同治療研究・治療を実施するための基盤とする計画である。

C. 研究結果

本年度は、国際共同研究の枠組みの構築を行なった。対象者の数は、全体で 95 症例とした。日本からは 15 症例の登録予定となった。評価項目について

は、次の項目を決定した。

- 1) Leukodystrophy Functional Disability Rating Scale
- 2) Time to Event Measures
- 3) MRI Scoring system for PMD affected individuals
- 4) 他に CHOP が従来から収集している臨床情報シートに準ずる項目として、患者背景、変異、臨床症状、検査所見、GMFM クラス、WISC-IV あるいは WAIS、使用している薬剤などを含む。

患者リクルートは、現在までに 9 例について、IC を取得しており、順次 CHOP のデータベースに情報登録を行う予定である。

D. 考察

国際共同研究による 100 症例の PMD の後方視野的横断研究による自然歴の調査は、これまで例のない取り組みである。今後、この研究で得られた疾患自然歴のデータは、治療法開発研究によってもたらされる新たな治療法の臨床応用において、有用な情報となることは確実である。

E. 結論

国際共同研究として、PMD の自然歴研究に関するプラットフォームを確定し、研究が開始された。今後、1 年間で 15 症例の登録を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Yamamoto-Shimajima K, Imaizumi T, Aoki Y, Inoue K, Kaname T, Okuno Y, Muramatsu H, Kato K, Yamamoto T. Elucidation of the pathogenic mechanism and potential treatment strategy for a female patient with

- spastic paraplegia derived from a single-nucleotide deletion in PLP1. *J Hum Genet.* 2019 Apr 19;64(7):665-671. doi: 10.1038/s10038-019-0600-x.
- ② Li H, Okada H, Suzuki S, Sakai K, Izumi H, Matsushima Y, Ichinohe N, Goto Y, Okada T, Inoue K. Gene suppressing therapy for Pelizaeus-Merzbacher disease using artificial miRNA. *JCI Insight.* 2019 May 16; 4(10): e125052 doi: 10.1172/jci.insight.125052
- ③ Kouga T, Koizume S, Aoki S, Jimbo E, Yamagata T, Inoue K, Osaka H. Drug screening for Pelizaeus-Merzbacher disease by quantifying the total levels and membrane localization of PLP1. *Mol Genet Metab Rep.* 2019 May 7;20:100474. doi: 10.1016/j.ymgmr.2019.100474. eCollection 2019 Sep. PubMed PMID: 31110947; PubMed Central PMCID: PMC6510973.
- ④ Fukada M, Yamada K, Eda S, Inoue K, Ohba C, Matsumoto N, Saitsu H, Nakayama A. Identification of novel compound heterozygous mutations in ACO2 in a patient with progressive cerebral and cerebellar atrophy. *Mol Genet Genomic Med.* 2019 May 20;7(7):e00698. doi: 10.1002/mgg3.698. PubMed PMID: 31106992.
- ⑤ Hijazi H, Coelho FS, Gonzaga-Jauregui C, Bernardini L, Mar SS, Manning MA, Hanson-Kahn A, Naidu S, Srivastava S, Lee JA, Jones JR, Friez MJ, Alberico T, Torres B, Fang P, Cheung SW, Song X, Davis-Williams A, Jörnlin C, Wight PA, Patyal P, Taube J, Poretti A, Inoue K, Zhang F, Pehlivan D, Carvalho CMB, Hobson GM, Lupski JR. Xq22 deletions and correlation with distinct neurological disease traits in females: further evidence for a contiguous gene syndrome. *Hum Mutat.* 2020;41(1):150-168. doi: 10.1002/humu.23902.
- ⑥ Miyamoto S, Nakashima M, Ohashi T, Hiraide T, Kurosawa K, Yamamoto T, Takanashi J, Osaka H, Inoue K, Miyazaki T, Wada Y, Okamoto N, Saitsu H. A case of de novo splice site variant in SLC35A2 showing developmental delays, spastic paraplegia, and delayed myelination. *Mol Genet Genomic Med.* 2019 Aug;7(8):e814. doi: 10.1002/mgg3.814. Epub 2019 Jun 23.
- ⑦ Hirasawa-Inoue A, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Ishiyama A, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sugai K, Inoue K, Goto YI, Sasaki M. Static Leukoencephalopathy Associated with 17p13.3 Microdeletion Syndrome: A Case Report. *Neuropediatrics.* 2019 Dec;50(6):387-390. doi: 10.1055/s-0039-1693972. Epub 2019 Aug 1. PubMed PMID: 31370080.
2. 学会発表
- ① 李 コウ、岡田 浩典、境 和久、岡田 尚巳、一戸 紀孝、後藤 雄一、井上 健

Pelizaeus-Merzbacher 病における PLP1 遺伝子重複を標的とした AAV による artificial miRNA 遺伝子治療 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日-30日 (11月28日) パシフィコ横浜 横浜

2019. 10. 15-19 (10. 16). George R. Brown Convention Center Houston, USA.

- ② 宮本祥子、中島光子、大橋伯、平出拓也、宮崎岳大、黒沢健司、山本俊至、高梨潤一、小坂仁、井上健、和田芳直、岡本伸彦、才津浩智 De novo スプライスサイト変異が同定された SLC35A2-CDG の1症例 (口演) 第64回人類遺伝学会、2019年11月6日-9日 (11月7日) 長崎ブリックホール 長崎
- ③ Inoue K, Li H, Okada H, Suzuki S, Sakai K, Ichinohe N, Goto Y, Okada T. Gene suppressing therapy for Pelizaeus-Merzbacher disease using artificial miRNA. (口演) 第64回人類遺伝学会、2019年11月6日-9日 (11月8日) 長崎ブリックホール 長崎
- ④ 李コウ、岡田浩典、鈴木禎史、境和久、泉仁美、松島由紀子、一戸紀孝、岡田尚巳、後藤雄一、井上健 Pelizaeus-Merzbacher 病における PLP1 遺伝子重複を標的とした AAV による artificial miRNA 遺伝子治療 (ポスター) NEURO2019 2019年7月25日~28日 朱鷺メッセ 新潟
- ⑤ Inoue K, Li H, Okada H, Suzuki S, Sakai K, Ichinohe N, Goto Y, Okada T. *PLP1* gene suppression therapy for Pelizaeus-Merzbacher disease using artificial miRNA (poster) The American Society of Human Genetics Annual Meeting 2019.

7. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

白質病変拡大と臨床症状が急速に進行した *KARS* 遺伝子変異を有する白質変性症

研究分担者 久保田雅也 国立成育医療研究センター神経内科

研究要旨

ミトコンドリア異常症においても白質変性が知られているが、今回白質病変拡大と臨床症状の悪化が急速に進行した *KARS* 遺伝子変異(c.1786C>T (既報告)、c.1051C>T (新奇変異))を伴うミトコンドリア病に対し、Vitamine B系、Vitamine E、CoQ、ビオチン、L-カルチンなどの mitochondrial rescue とケトン食療法を開始した。開始から3か月であるが、ケトン比3を維持し、特記すべき副作用は認めず。以上の治療効果の評価には長期を要するが、これらの神経保護作用に期待し、臨床症状、画像所見の推移を観察していきたい。

A. 研究目的

ミトコンドリア異常症においても白質変性が知られているが、今回白質病変と臨床症状の悪化が急速に進行した *KARS* 遺伝子変異を伴うミトコンドリア病に対し、ケトン食療法を開始し、経過観察したので報告する。

B. 研究方法

カルテを後方視的に精査し、診断までの経過、その後の臨床症状の推移、および治療経過を解析検討した。

(倫理面への配慮)

個人情報保護に留意し、ヘルシンキ宣言に沿って解析を行った。

C. 研究結果

症例 6才男児。周産期に問題なし。先天性難聴があり、生後8か月で運動発達遅滞を指摘された。1歳時の頭部CTで両側大脳白質に石灰化あり。21か月で独歩可能となった。3才半で補聴器装着下で2語文表出は可能であった。3歳10か月より左上下肢優位の痙性不全麻痺が出現、その後退行し、5歳で移動や経口摂取が困難となった。てんかんはこれまでのところ合併せず。頭部MRIで進行性に拡大する大脳白質病変(図1)、MRSでNAA低下、乳酸ピークを認めた(図2)。髄液(一般、乳酸、ピルビン酸)、末梢神経伝導速度、脳波、眼底に異常はなかった。全エクソーム解析により *KARS* 遺伝子にミスセンス変異(c.1786C>T (既報告)、c.1051C>T (新奇変異))

が検出された。

ミトコンドリア病の可能性が高く、症状の進行が急速で、顔面神経麻痺、嚥下機能低下など脳幹病変も想定されたのでVB、E系、CoQ、ビオチン、L-カルチンなどの mitochondrial rescue とケトン食療法を開始した。現在開始から3か月であるがケトン比3を維持し、特記すべき副作用は認めず。以上の治療効果の評価には長期を要するが、これらの神経保護作用に期待し、臨床症状、画像所見の推移を観察していきたい。

D. 考察

細胞質とミトコンドリアで機能するLysil-tRNA合成酵素をコードする *KARS* 遺伝子の両アレル変異により進行性白質脳症を呈することが報告されている。常染色体劣性遺伝が想定され、特徴として早期からの哺乳障害、低緊張型発達遅滞、先天性難聴、頭部および脊髄のCT上の石灰化、頭部MRI上錐体路を含む大脳白質の信号異常が認められる。臨床的には少数の歩行可能な患者も2-3才で急速に退行し、痙性四肢麻痺で臥床状態となる。本症例は臨床経過、頭部画像所見は既報告に一致する *KARS* 遺伝子変異を伴う白質変性症と考えられる。

VB、E系、CoQ、ビオチン、L-カルチンなどの mitochondrial rescue とケトン食療法は一部のミトコンドリア病で効果が認められている。神経保護作用、神経細胞膜の安定化、伝達物質の調節などが効果の機序として想定されている。現在のところ特に副作用は認めておらず、今後長期に経過観察していく予定である。

E. 結論

KARS 遺伝子にミスセンス変異(c.1786C>T(既報告)、c.1051C>T(新奇変異))が検出された白質変性症に対し、VB、E 系、CoQ、ビオチン、L-カルチンなどの mitochondrial rescue とケトン食療法を行い経過観察中である。特に現在のところ副作用は認めず。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

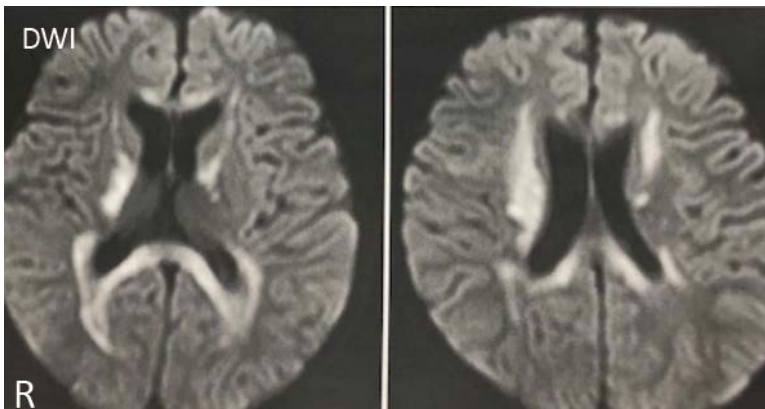


図1 MRI (DWI)

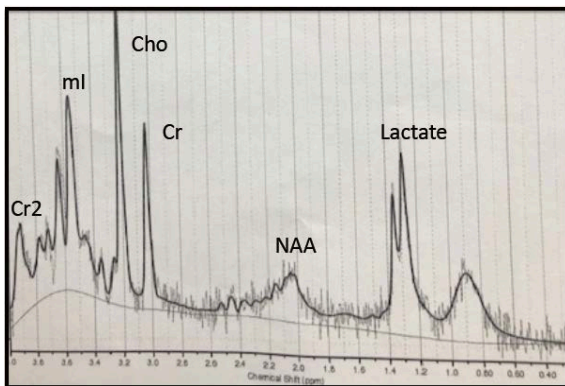


図2 MRS (大脳白質T2WI高信号領域)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

先天性大脳白質形成不全症および類縁疾患のゲノム解析

研究分担者 黒澤健司

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター遺伝科 部長

研究要旨

先天性大脳白質形成不全症は、遺伝的異質性の高い大脳白質を中心とした髄鞘形成不全を主たる病理所見とする疾患であり、代表的疾患として Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) があげられる。PMD は X 連鎖劣性遺伝形式を呈し、その正確な診断は医療管理のみでなく、患者家族の遺伝カウンセリングなどでも極めて重要である。遺伝的異質性が高い疾患の遺伝子診断は膨大な労力を要し、網羅的解析が不可欠となる。今回網羅的解析により 4 家系の同疾患家系の解析を行い、1 家系ではこれまで報告のない *GJC2* の遺伝子変異を検出した。遺伝学的検査の一つとして網羅的解析をいかに臨床に結び付けるかが、今後の課題と思われた。

A. 研究目的

中枢神経ミエリン構成タンパク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 型瘧性対麻痺 (SPG2) まで、幅広い臨床像をもたらす。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、診断の確定は遺伝学的検査による。先天性の大脳白質形成不全症は、遺伝的異質性が比較的高く、臨床症状のみで診断を特定することは難しい。遺伝子の多様性だけでなく、同一遺伝子の変異の位置なども多様性が高いことが特徴の一つである。*PLP1* 変異だけでも、エクソン内あるいはスプライスサイトの点変異、スプライス異常を惹起するイントロン内深くに存在する変異、マイクロアレイで検出可能なゲノム重複、染色体転座に由来する場合など、変異の種類は極めて多い。

先天性大脳白質形成不全症の遺伝子レベルでの診断は、再発の可能性評価や予後の推定、遺伝カウンセリングに不可欠である。こうした遺伝的異質性の高い疾患にける遺伝学的検査

では、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析が不可欠となりつつある。今回、これまでの標準的な遺伝子解析 (qPCR 法やサンガー法) に加え、次世代シーケンスによる原因不明の先天性大脳白質形成不全症家系の解析をおこなったので、その課題をまとめた。

B. 研究方法

対象は、診断が未定の神経疾患を疑われる 4 家系で、先天性大脳白質形成不全症を特徴とした。解析方法として、臨床エクソームキット (TruSight One Sequence Panel, Illumina) を用いて卓上型次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) で解析を進めた。得られたデータは、当施設でのオリジナルパイプライン (BWA、Snpeff、GATK を組み合わせた。データの可視化は、IGV (Integrative Genomics Viewer) を用いた。参照ゲノムデータベースは、gnomAD、1000 Genomes Project などを用いた。また、HGMD (Human Gene Mutation Database : <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) の最新版も参考とした。日本人データベースとして Human Genetic Variation Database (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>) や Tommo を参照した。さらに日本人データの不足を補うため、施設内既存 Exome データ (in-house データ) も参照する系とした。メン

デル遺伝病臨床エクソームで変異が検出されない場合には、全エクソーム解析を組み合わせた。

(倫理面への配慮)

解析にあたっては施設内倫理審査を経たのちに、対象症例に対して文書による同意のもとで解析を進めた。

C. 研究結果

4家系中1家系同胞発症例でGJC2遺伝子の複合ヘテロ異常を検出した。一方の変異は既報告変異で、国内でも確認されている変異である(p.R125*)。もう一方の変異はこれまで報告のない新規の変異(p.Thr191fs)であった。GJC2は、Pelizaeus-Merzbacher like disease (PMLD)と知られていて、現在まで64の疾患発症にかかわる変異が知られている。本家系の変異はいずれも、短縮型の機能喪失変異であり、原因とみなせる。臨床症状と合わせて、経過と変異の関連性を検討する必要がある。

D. 考察

先天性大脳白質形成不全症の遺伝子診断の解析方法として、次世代シーケンスによる網羅的解析を行い、1家系で原因となりえる複合ヘテロ変異をGJC2遺伝子に検出することができた。既存データベースは、解析において極めて重要な役割を果たした。また、variantの意義づけは推測プログラムによるものなので、症例ごとの十分な臨床評価が重要であることがかった。今後、実際の患者集団解析とゲノムデータベースの比較がますます重要になってくると思われた。

次世代シーケンスのプラットフォームに由来する解析のpitfallは多く、その全貌はなかなか把握できないが、臨床評価によるオントロジー解析の組み合わせは、今後有用性が増してくるかもしれない。さらに、予想スコアの低い、しかしオントロジー解析で可能性が高い変異に対しては、モデル動物での機能解析が必要となる。PLP1などの種間の保存性を考慮に入れた機能解析をいかに迅速に臨床と並行して実施するかは、今後の課題かもしれない。

E. 結論

網羅的解析により4家系の同疾患家系の解析を行い、1家系ではこれまで報告のないGJC2の遺伝子変異を検出した。遺伝学的検査の一つとして網羅的解析をいかに臨床に結び付けるかが、今後の課題と思われた。

F. 健康被害状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuroda Y, Kimura Y, Uehara T, Kosaki K, Kurosawa K. The refinement of 16p13.3 microdeletion syndrome from a case presentation of a girl with epilepsy and intellectual disability. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2019 Jun 24. doi: 10.1111/cga.12347. [Epub ahead of print] PMID:31231897

2. 学会発表

1) 森貴幸、黒田友紀子、太田さやか、柿本優、竹中暁、下田木の実、佐藤敦志、岡明、黒澤健司、水口雅 知的障害・大脳白質病変を呈したKIAA2022 遺伝子重複男児例 日本人類遺伝学会第64回大会 2019.11.6-9 長崎

2) 熊木達郎、蒲ひかり、山本亜矢子、池田梓、露崎悠、辻恵、井合瑞江、黒澤健司、山下純正、後藤知英 ACTH療法中に脳実質内の出血を認めたCOL4A1 遺伝子変異の一例 第61回日本小児神経学会 2019.5.31-6.2 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

なし

遺伝子診断システムの構築

分担研究者 才津 浩智 浜松医科大学 医学部 教授

研究要旨：

これまでの研究で、遺伝性白質疾患の遺伝子診断技術として、遺伝子のエクソン領域を網羅的に解析可能な全エクソーム解析の有用性を明らかにしてきた。今回、白質異常を呈する3症例において、全エクソーム解析により *TMEM106B*, *CLCN2* 変異を同定し、また 18 q 遠位端のモザイク欠失をエクソームデータを用いたコピー数解析で同定した。更に、*POLR3A* に片アレルの変異のみを認めた症例において、全ゲノム解析によりイントロンの変異を同定し、変異によって新たなエクソンが生成されることを RNA 解析で明らかにした。この知見は、全ゲノム解析によって診断率が向上する可能性を示している。

A、B. 研究目的および方法

本研究では、白質異常を呈する4症例において、その臨床所見と同定した変異およびコピー数異常の病的意義について検討した。

C. 結果

(1) *TMEM106B* 変異

症例1は2歳の男児で、乳児期早期からの眼振と運動発達の遅れを認め、頭部MRIにおける髄鞘化遅延(図1)、ABRにおけるI波以降の消失という所見から Pelizaeus-Merzbacher 病が疑われた。しかし、神奈川県立こども医療センターで行われた *PLP1* 遺伝子の定量PCRによるコピー数解析、サンガー法による変異解析およびメンデル遺伝病パネル解析では原因遺伝子変異は同定されなかった。そこで当教室で全エクソーム解析を行ったところ、*TMEM106B* 遺伝子に *de novo* 変異を同定した (NM_018374.4:c.754G>A: p.(Asp252Asn))。 *TMEM106B* 遺伝子変異による白質異常症はこれまでに5症例が報告されているが、全て同じ c.754G>A の *de novo* 変異であり、本変異によって Pelizaeus-Merzbacher 病に非常に類似した病気が引き起こされたと考えられる。 *TMEM106B* 遺伝子はライソゾームの膜に発現するタンパク質であり、ライソゾームがミエリン形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

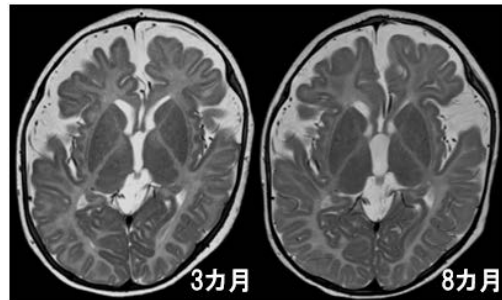


図1. 症例1の頭部MRI T2強調画像

(2) *CLCN2* 変異

症例2は13歳の男児で、発達歴に異常は認めなかった。6歳時に発熱と頭痛があり、髄膜炎の診断で入院となった。その際に、頭部MRI拡散強調画像で、大脳白質、内包後脚、中小脳脚～小脳髄質、橋(橋縦束)に高信号が認められた。経過観察のMRI検査では、T2強調画像で内包後脚～橋～中小脳脚～小脳髄質に高信号を認め、大脳白質は脳梁を含め淡い高信号を呈し、白質異常の所見であったが、本人に明らかな症状は認めなかった。MRI異常の原因究明を目的として全エクソーム解析を行ったところ、クロライドチャンネルをコードする *CLCN2* 遺伝子にホモ接合性のフレームシフト変異 (c.61dupC, p.(Leu21Profs*27)) を認めた。同じ遺伝子変異は日本人の1症例で報告されており、この変異によってMRI異常が引き起こされたと考えられた。ご両親の血族婚は無かったが、共にヘテロ接合性キャリアーであった。東北メディカルメガバンクにおける同変異のアレル頻度は0.0019であ

り、約 500 人に 1 人が保因者と考えられる。そのため、c.61dupC 変異による白質異常症は、今後も一定数の頻度で起こると考えられた。

(3) 18q モザイク欠失

症例 3 は 10 歳の女児で、乳児期より発達の遅れ、筋緊張の低下と小頭症、顔貌異常や多発奇形が認められた。5 歳時の頭部 MRI 検査では、脳梁の完全欠損とび慢性の大脳白質のミエリン形成不全が認められた。11 歳時に全エクソーム解析を行ったところ、18q21.31qter に約 20Mb の *de novo* モザイク欠失を認めた

(図 2)。この知見は、全エクソーム解析により、変異解析に加えてコピー数解析を加えることで、診断率が向上することを示している。

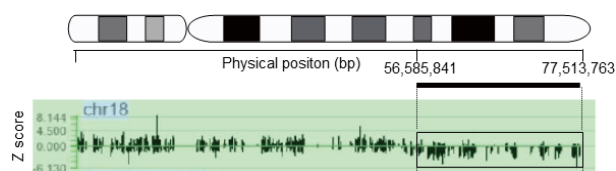


図 2. 全エクソーム解析データの XHMM 解析によるモザイク欠失の同定

(4) POLR3A 変異

症例 4 は 11 歳の男児で、3 歳頃から自閉症、知的障害、発育不良（低身長、低体重）でフォローされていた。9 歳時にインフルエンザ肺炎に罹患時に急性脳症も併発し、その際の頭部 MRI 検査で白質変性症が疑われた。10 歳児の頭部 MRI では大脳白質形成不全、小脳萎縮、脳梁低形成が認められ、PolIII 関連白質ジストロフィーが疑われた。全エクソーム解析を行ったところ、既知の原因遺伝子である *POLR3A* のヘテロ接合性ミスセンス変異

(NM_007055.3:c.1451G>A:p.(Arg484Gln)) を認めた。しかし、*POLR3A* の両アレル性変異が PolIII 関連白質ジストロフィーを引き起こすため、全エクソーム解析では同定できないイントロン領域の変異が関与している可能性が考えられた。そこで本症例の全ゲノム解析を施行した。*POLR3A* 遺伝子領域に注目して稀な変異を検索したところ、エクソンから 312-bp 離れたイントロンに一塩基置換を認めた

(NM_007055.3:c.645+312C>T)。2 つの変異はそれぞれ父親、母親由来であり、両アレル性変異であった。c.1451G>A 変異はアレル頻度が 0.000003980 であり、c.645+312C>T は公共

のデータベースに登録のない極めて稀な変異であった。人工知能を用いたスプライス異常予測プログラムである SpliceAI で評価したところ、変異によって新たなドナー部位が生成されることが強く予測された。そこで、患者末梢血単核球から RNA を抽出し、スプライス異常の有無を検討したところ、SpliceAI が予測した通りに新たなエクソンがイントロン内に生じることが確認された (図 3)。PCR 産物のシーケンスの結果、129bp が転写産物に挿入されていることが確認された。

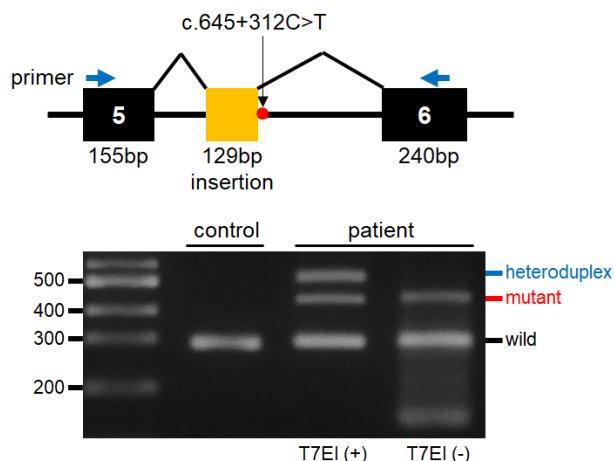


図 3. 変異による新たなエクソン生成

(Exon5 および Exon6 に PCR プライマーを設計し、RT-PCR を実施。患者において 3 本の増幅産物を認めたが、ヘテロ 2 本鎖 DNA を認識して切断する酵素である T7 Endonuclease I (T7EI) で処理すると、一方は切断されヘテロ 2 本鎖 DNA であったことが分かった)

D. E. 考察および結論

白質異常を呈する 3 症例において、全エクソーム解析により *TMEM106B*, *CLCN2* 変異および 18q モザイク欠失を同定した。また *POLR3A* に片アレルの変異のみを認めた症例において全ゲノム解析を施行し、スプライシング異常を引き起こすイントロン変異の同定に成功した。全エクソーム解析では解析不能で、全ゲノム解析によって解析が可能となるイントロンの変異は、これまではその病的意義の評価が困難であったが、最近の人工知能の発展によって、*in silico* でのスプライス異常予測が可能になった (SpliceAI)。全ゲノム解析にはゲノム構造異常を精度よく検出可能である利点もあり、シーケンスコストが低下して全エクソーム解析と全ゲノム解析のコスト差が小さくなっている現状では、全ゲノム

解析を第一選択として網羅的遺伝子解析を行うことも考慮するべきである。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ozaki A, Sasaki M, Hiraide T, Sumitomo N, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Ishiyama A, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sato N, Nakashima M, **Saitu H**. A case of *CLCN2*-related leukoencephalopathy with bright tree appearance during aseptic meningitis. *Brain Dev.* 2020 Mar 12. pii: S0387-7604(20)30089-9.
2. Hiraide T, Watanabe S, Matsubayashi T, Yanagi K, Nakashima M, Ogata T, **Saitu H**. A de novo *TOP2B* variant associated with global developmental delay and autism spectrum disorder. *Mol Genet Genomic Med.* 2020 Mar;8(3):e1145.
3. Hiraide T, Kubota K, Kono Y, Watanabe S, Matsubayashi T, Nakashima M, Kaname T, Fukao T, Shimozawa N, Ogata T, **Saitu H**. *POLR3A* variants in striatal involvement without diffuse hypomyelination. *Brain Dev.* 2020 Apr;42(4):363-368.
4. Yamoto K, **Saitu H**, Nishimura G, Kosaki R, Takayama S, Haga N, Tonoki H, Okumura A, Horii E, Okamoto N, Suzumura H, Ikegawa S, Kato F, Fujisawa Y, Nagata E, Takada S, Fukami M, Ogata T. Comprehensive clinical and molecular studies in split-hand/foot malformation: identification of two plausible candidate genes (*LRP6* and *UBA2*). *Eur J Hum Genet.* 2019 Dec;27(12):1845-1857.
5. Nakashima M, Ogata K, **Saitu H**, Matsumoto N. Reply to "Reduced *CYFIP2* Stability by Arg87 Variants Causing Human Neurological Disorders". *Ann Neurol.* 2019 Nov;86(5):805-806.
6. Ohishi A, Masunaga Y, Iijima S, Yamoto K, Kato F, Fukami M, **Saitu H**, Ogata T. De novo *ZBTB7A* variant in a patient with macrocephaly, intellectual disability, and sleep apnea: implications for the phenotypic development in 19p13.3 microdeletions. *J Hum Genet.* 2020 Jan;65(2):181-186.
7. Masunaga Y, Inoue T, Yamoto K, Fujisawa Y, Sato Y, Kawashima-Sonoyama Y, Morisada N, Iijima K, Ohata Y, Namba N, Suzumura H, Kuribayashi R, Yamaguchi Y, Yoshihashi H, Fukami M, **Saitu H**, Kagami M, Ogata T. *IGF2* Mutations: Report of Five Cases, Review of the Literature, and Comparison with H19/*IGF2:IG-DMR* Epimutations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020 Jan 1;105(1):116-125
8. Okano S, Shimada S, Tanaka R, Okayama A, Kajihama A, Suzuki N, Nakau K, Takahashi S, Matsumoto N, **Saitu H**, Tanboon J, Nishino I, Azuma H. Life-threatening muscle complications of *COL4A1*-related disorder. *Brain Dev.* 2020 Jan;42(1):93-97.
9. Hiraide T, Kaba Yasui H, Kato M, Nakashima M, **Saitu H**. A de novo variant in *RAC3* causes severe global developmental delay and a middle interhemispheric variant of holoprosencephaly. *J Hum Genet.* 2019 Nov;64(11):1127-1132.
10. Shimizu D, Sakamoto R, Yamoto K, **Saitu H**, Fukami M, Nishimura G, Ogata T. De novo *AFF3* variant in a patient with mesomelic dysplasia with foot malformation. *J Hum Genet.* 2019 Oct;64(10):1041-1044.
11. Yamoto K, **Saitu H**, Nishimura G, Kosaki R, Takayama S, Haga N, Tonoki H, Okumura A, Horii E, Okamoto N, Suzumura H, Ikegawa S, Kato F, Fujisawa Y, Nagata E, Takada S, Fukami M, Ogata T. Comprehensive clinical and molecular studies in split-hand/foot malformation: identification of two plausible candidate genes (*LRP6* and *UBA2*). *Eur J Hum Genet.* Dec;27(12):1845-1857.
12. Miyamoto S, Nakashima M, Ohashi T, Hiraide T, Kurosawa K, Yamamoto T, Takanashi J, Osaka H, Inoue K, Miyazaki T, Wada Y, Okamoto N, **Saitu H**. A case of de novo splice site variant in *SLC35A2* showing developmental delays, spastic paraplegia, and delayed myelination. *Mol Genet Genomic Med.* 2019 Aug;7(8):e814.
13. Fujita A, Higashijima T, Shirozu H, Masuda H, Sonoda M, Tohyama J, Kato M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Mitsuhashi S, Mizuguchi T, Takata A, Miyatake S, Miyake N, Fukuda M, Kameyama S, **Saitu H**, Matsumoto N. Pathogenic variants of *DYNC2H1*, *KIAA0556*, and *PTPN11* associated with hypothalamic hamartoma. *Neurology.* 2019 Jul 16;93(3):e237-e251.

14. Takata A#, Nakashima M#, **Saitsu H**#, Mizuguchi T, Mitsunashi S, Takahashi Y, Okamoto N, Osaka H, Nakamura K, Tohyama J, Haginoya K, Takeshita S, Kuki I, Okanishi T, Goto T, Sasaki M, Sakai Y, Miyake N, Miyatake S, Tsuchida N, Iwama K, Minase G, Sekiguchi F, Fujita A, Imagawa E, Koshimizu E, Uchiyama Y, Hamanaka K, Ohba C, Itai T, Aoi H, Saida K, Sakaguchi T, Den K, Takahashi R, Ikeda H, Yamaguchi T, Tsukamoto K, Yoshitomi S, Oboshi T, Imai K, Kimizu T, Kobayashi Y, Kubota M, Kashii H, Baba S, Iai M, Kira R, Hara M, Ohta M, Miyata Y, Miyata R, Takanashi JI, Matsui J, Yokochi K, Shimono M, Amamoto M, Takayama R, Hirabayashi S, Aiba K, Matsumoto H, Nabatame S, Shiihara T, Kato M, Matsumoto N. Comprehensive analysis of coding variants highlights genetic complexity in developmental and epileptic encephalopathy. *Nat Commun.* 2019 Jun 7;10(1):2506.
 15. Hiraide T, Hattori A, Ieda D, Hori I, Saitoh S, Nakashima M, **Saitsu H**. De novo variants in SETD1B cause intellectual disability, autism spectrum disorder, and epilepsy with myoclonic absences. *Epilepsia Open.* 2019 May 24;4(3):476-481.
 16. Miyado M, Fukami M, Takada S, Terao M, Nakabayashi K, Hata K, Matsubara Y, Tanaka Y, Sasaki G, Nagasaki K, Shiina M, Ogata K, Masunaga Y, **Saitsu H**, Ogata T. Germline-Derived Gain-of-Function Variants of Gs α -Coding GNAS Gene Identified in Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. *J Am Soc Nephrol.* 2019 May;30(5):877-889.
 17. Iwama K, Mizuguchi T, Takeshita E, Nakagawa E, Okazaki T, Nomura Y, Iijima Y, Kajiura I, Sugai K, Saito T, Sasaki M, Yuge K, Saikusa T, Okamoto N, Takahashi S, Amamoto M, Tomita I, Kumada S, Anzai Y, Hoshino K, Fattal-Valevski A, Shiroma N, Ohfu M, Moroto M, Tanda K, Nakagawa T, Sakakibara T, Nabatame S, Matsuo M, Yamamoto A, Yukishita S, Inoue K, Waga C, Nakamura Y, Watanabe S, Ohba C, Sengoku T, Fujita A, Mitsunashi S, Miyatake S, Takata A, Miyake N, Ogata K, Ito S, **Saitsu H**, Matsuishi T, Goto YI, Matsumoto N. Genetic landscape of Rett syndrome-like phenotypes revealed by whole exome sequencing. *J Med Genet.* 2019 Jun;56(6):396-407.
 18. Yoshitomi S, Takahashi Y, Yamaguchi T, Oboshi T, Horino A, Ikeda H, Imai K, Okanishi T, Nakashima M, **Saitsu H**, Matsumoto N, Yoshimoto J, Fujita T, Ishii A, Hirose S, Inoue Y. Quinidine therapy and therapeutic drug monitoring in four patients with KCNT1 mutations. *Epileptic Disord.* 2019 Feb 1;21(1):48-54.
 19. Hiraide T, Ogata T, Watanabe S, Nakashima M, Fukuda T, **Saitsu H**. Coexistence of a CAV3 mutation and a DMD deletion in a family with complex muscular diseases. *Brain Dev.* 2019 May;41(5):474-479.
 20. Nakashima M, Negishi Y, Hori I, Hattori A, Saitoh S, **Saitsu H**. A case of early-onset epileptic encephalopathy with a homozygous *TBC1D24* variant caused by uniparental isodisomy. *Am J Med Genet A.* 2019 Apr;179(4):645-649.
 21. Nakashima M, Tohyama J, Nakagawa E, Watanabe Y, Siew CG, Kwong CS, Yamoto K, Hiraide T, Fukuda T, Kaname T, Nakabayashi K, Hata K, Ogata T, **Saitsu H**, Matsumoto N. Identification of de novo *CSNK2A1* and *CSNK2B* variants in cases of global developmental delay with seizures. *J Hum Genet.* 2019 Apr;64(4):313-322.
2. 学会発表
 1. **才津浩智**. 「ゲノムから見た先天異常」第59回日本先天異常学会、第19回生殖発生発達教育セミナー、2019年7月28日、名古屋
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 特になし

研究要旨

大脳白質疾患は多数知られているが確定診断に至らない症例が少なくない。頭部画像検査で大脳白質疾患が疑われたものの、非常に稀な疾患と確定診断するまでに時間を要した2例を経験した。臨床症状では診断は困難で、後方視的には頭部MRI画像が診断に有用であった。症例1：2歳5か月男児、運動発達の遅れと早期に髄鞘化される脳白質領域の髄鞘化の遅れが当初の問題点であった。臨床的には痙性両麻痺を呈し、髄鞘化は徐々に進む経過を示した。18歳時に *PLP1* のイントロン領域に点変異を見出し、HEMS (Hypomyelination of early myelinated structures) と診断確定した。症例2：6歳男児、無菌性髄膜炎罹患時に頭部MRIで脳白質異常信号が確認された。けいれん重積型急性脳症で認められる皮質下白質の拡散能低下 (Bright tree appearance) を一過性に認め、臨床症状消失後も内包後脚から大脳脚および中小脳脚に T2/FLAIR での高信号が継続した。12歳時に受けた網羅的遺伝子解析で *CLCN2* にホモ接合性変異を認め *CLCN2* 関連神経疾患と診断確定した。2例とも頭部MRIで特徴があったものの臨床的な診断は困難で、遺伝子診断の重要性が確認された。

A. 研究目的

小児期に発症する大脳白質疾患は多数知られている。比較的容易に診断確定する症例もあるが、診断に難渋する症例も稀ではない。

頭部MRIで大脳白質異常が見出されてから6年以上経過後に、遺伝子解析により診断確定した2症例を報告する。より詳細な診断ガイドライン作成のため有用と考える。

B. 研究方法

症例1. 2歳5か月男児

主訴：運動発達遅滞、眼振、振戦

発達歴：GA39週、仮死なし。追視3か月、頸定4か月、座位7か月、つかまり立ち11か月、独歩未、有意語1歳4か月

現病歴：生後7か月、眼振と手の震え。1歳8か月、未歩行のため療育センター受診。頭部MRIで異常を認め、2歳当科紹介受診。水平性眼振、体幹動揺、企図振戦、筋緊張低下、深部腱反射亢進、下肢病的反射陽性を認めた。痙性両麻痺と大脳白質T2高信号より Pelizaeus-Merzbacher 病の軽症型を疑い、*PLP1* 遺伝子検査を行った。重複・欠失はなく、exon 内に変異を認めなかった。

その後も悪化なく痙性両麻痺継続、立位は不可能、移動はバニーホッピング。臨床的に進行は認めなかったが、徐々に大脳白質高信号域が拡がってくるため、18歳時に *PLP1* の intron 部の遺伝子解析を本研究班に依頼した。

症例2. 初診時 6歳男児

主訴：発熱頭痛時の頭部MRI異常

家族歴：なし、発達歴：順調

現病歴：6歳、発熱・頭痛が6日間続き近医受診。項部硬直あり入院。髄液検査で細胞数 227/3 (ほぼ単核球)、蛋白 50mg/dl、糖 55mg/dl。意識障害・けいれんなし。頭痛継続するため、入院3日目に頭部MRI、DWIで bright tree appearance (BTA)あり。内包後脚、大脳脚、橋(縦束)、中小脳脚、小脳髄質などにDWIおよびT2で高信号。

入院後1週間で頭痛消失、臨床的には無菌性髄膜炎の経過。症状と画像所見に乖離あり、入院1か月後、当科紹介受診。診察上は全く異常所見なし。頭部MRI：BTAは消失。それ以外は急性期と同様

6年経過。特記すべき臨床症状なし。MRI画像で改善を認めなかったが遺伝性白質脳症を疑い exome 解析を本研究班に依頼。

(倫理面への配慮) 両例とも遺伝子解析に当たり両親から文書による承諾を得た。

C. 研究結果

症例1. *PLP1* の c.453+159G>A (intron 3 に splice 異常をきたすことが予測される変異、既報告と同部位)を確認。→ Hypomyelination of Early Myelinated Structures (HEMS)と診断。(神奈川県立こども医療センター遺伝科黒

澤先生)

症例 2. *CLCN2* にホモ接合性変異 ; c.61dupC, p.(Leu21Profs*27) を認めた. 両親ともにヘテロ接合性変異を認め、*CLCN2* 関連神経疾患と診断. (浜松医大医化学 才津先生)

D. 考察

症例 1 は非進行性痙攣性両麻痺 (遺伝性痙攣性対麻痺) を呈し、症例 2 は無菌性髄膜炎後に神経学的異常は呈していなかったものの、いずれも頭部 MRI では特異的な異常所見を示していた.

症例 1 では、2 歳時に中心溝周囲大脳白質、半卵円中心、内包後脚、視放線、橋背側などの早期に髄鞘化する白質が T2 で高信号を呈していた. この画像は本疾患に特徴的であり、診断的価値があると考えられる.

一方症例 2 では、急性期に大脳皮質下白質の BTA を認めていたことから当初は急性脳症の軽症型を疑っていた. しかし、内包後脚、大脳脚、中小脳脚などの T2 高信号が改善しないことより何らかの白質脳症が基礎にあることを想定して遺伝子検査を行った. *CLCN2* という塩素チャンネル遺伝子に異常を認めた. 既報告例と比較したところ、長期間にわたって認めた T2 高信号域が *CLCN2* 関連神経疾患に典型的で、臨床症状が軽いことも本症によく合う所見であり、診断確定できた. 後方視的にこちらの MRI 画像も診断的価値のあるものであった.

E. 結論

特異的な頭部 MRI 画像所見を呈す非常に稀な大脳白質疾患を呈した 2 例を報告した. いずれも確定診断には遺伝子解析が有用であった.

F. 研究発表

1. 論文発表

Ozaki A, Sasaki M, et al. A case of *CLCN2*-related leukoencephalopathy with bright tree appearance during aseptic meningitis. *Brain Dev.* [Epub ahead of print]

2. 学会発表

尾崎文美、佐々木征行、ほか. 無菌性髄膜炎時の bright tree appearance で気付かれた *CLCN2* 関連大脳白質脳症の 1 例. 第 14 回小児神経放射線研究会. 国立精神・神経医療研究センター. 東京. 2019 年 10 月 26 日.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む.)

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1. 症例 1. 2 歳時. T2 強調画像. 小脳歯状核門、内包後脚、視放線、半卵円中心から中心前回および中心後回に高信号域を認める.

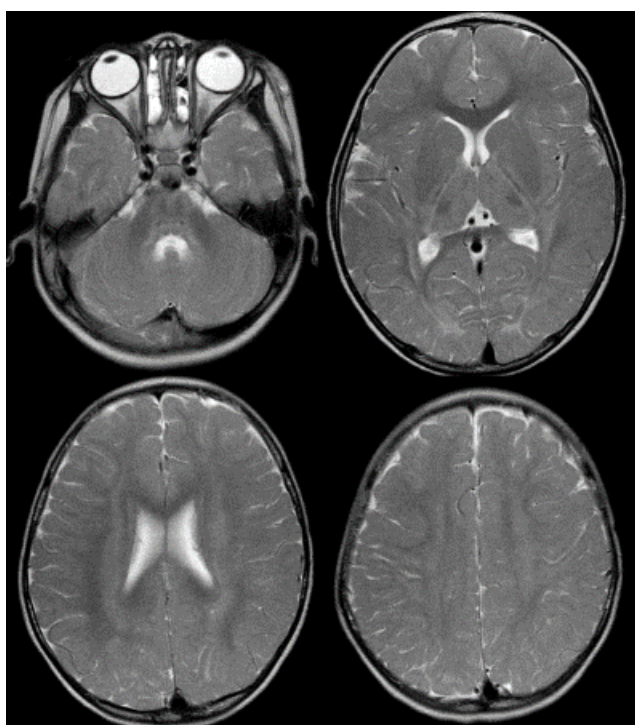
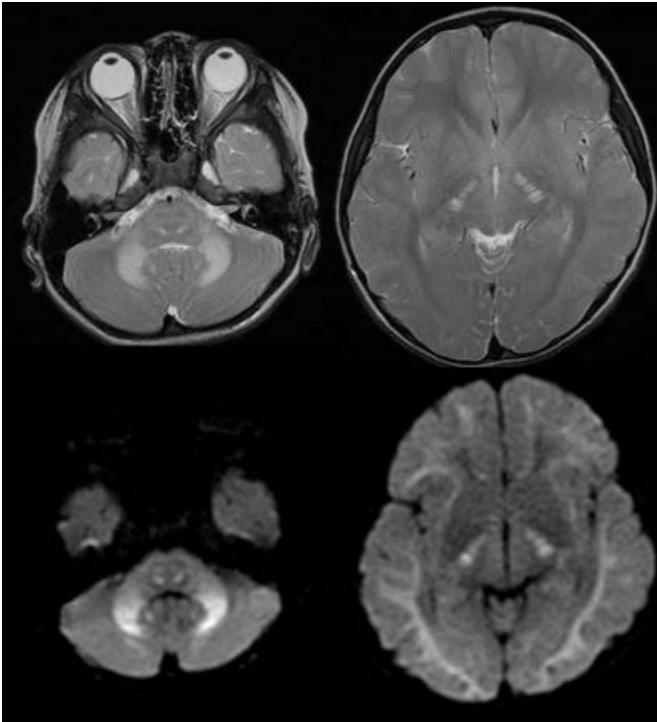


図2. 症例2. 6歳の無菌性髄膜炎時. 上段T2強調画像、下段拡散強調画像.
T2強調画像では内包後脚と中小脳脚から小脳髄質に高信号域を認める.
拡散強調画像ではT2で高信号の部位に加えて皮質下白質にも高信号域を呈する.



研究要旨

N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG) はシナプス前グルタミン酸代謝型受容体 (mGluR3) に作用しグルタミン酸放出を抑制するとともに、グリア細胞では神経保護成長因子の放出を促し、NMDA 受容体を介する神経興奮毒性に対し神経保護作用を有するとされる。また Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) での高値が報告されている。NAAG の経年的定量値は明確でないため、MR spectroscopy (MRS) を用い小児期の NAAG を計測した。年齢と NAAG の定量値には直線的な相関 (Spearman's $\rho = 0.634$, $p < 0.0001$, $y = 0.0807x + 0.3711$) が認められた。今回の結果は、PMD を含めた白質変性症における NAAG 定量解析の基礎的データとなる。

A. 研究目的

N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG) は神経細胞にて N-acetyl-aspartate (NAA) とグルタミン酸から合成される。NAAG は、シナプス前グルタミン酸代謝型受容体 (mGluR3) に作用しグルタミン酸放出を抑制するとともに、グリア細胞では神経保護成長因子の放出を促し、NMDA 受容体を介する神経興奮毒性に対し神経保護作用を有する。我々は MR spectroscopy (MRS) を用い、Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) において total NAA (NAA+NAAG) の高値を報告した。また PMD 患児の髄液で NAAG が高値とされている。しかし NAAG の経年的定量値は明確でない。今回 MRS を用い NAAG の経年的定量値を検討した。

B. 研究方法

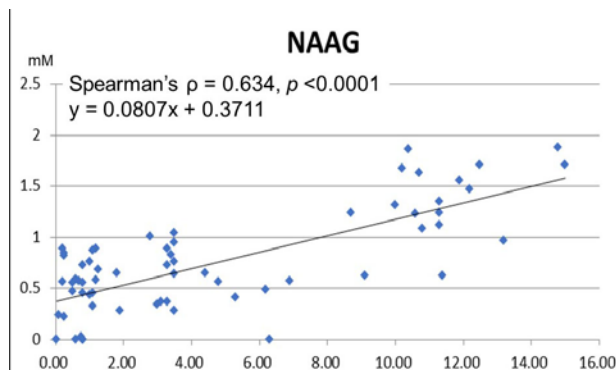
当センター小児科でけいれん性疾患、頭痛、頭囲異常、チックなどを主訴に MR 検査 (Philips, Ingenia CX 3.0T) を施行し、MRI 上異常病変を認めなかった 65 症例 (生後 1 か月から 15 歳) を対象とした。MRS は PRESS 法 (TR/TE/NEX=5000/30/32, ROI=半卵円中心, VOI=15x20x15mm) で施行し、LCModel (water scaling 法, Proton density=35.88M, corrected by R=1.3 [0-6 month], 1.2 [6-12 Mo], 1.1 [12-24 Mo]) で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は学内倫理審査委員会の承認を得て施行された (#3535R)。

C. 研究結果

年齢と NAAG の定量値には直線的な相関 (Spearman's $\rho = 0.634$, $p < 0.0001$, $y = 0.0807x + 0.3711$) が認められた。



D. 考察

小児期からの脳代謝物定量値の経年的報告 (2.0 テスラ MR 装置、LCModel による定量解析) は 1 つのみである。NAAG は年齢と相関して増加し、 0.4 ± 0.5 mmol/l (0-1 year), 0.9 ± 0.5 mmol/l (2-5 years), 0.8 ± 0.4 mmol/l (5-10 years), 1.6 ± 0.6 mmol/l (10-18 years) とされ、今回の検討と近似している。また、ラット脳梁の NAAG 濃度は、ミエリン形成の開始時の P7 ($0.16 \mu\text{mol/g}$ 湿重量) から成熟マウス ($0.32 \mu\text{mol/g}$ 湿重量) の間で約 2 倍に増加することが示されている。これらから今回の結果が妥当であると考えられる。

E. 結論

NAAG は年齢とともに増加し、10 歳以降は 1.0 mM 以上を呈する。PMD を含めた白質変性症における NAAG 定量解析の基礎的データとなる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Fujii H, Sato N, Takanashi J, Kimura Y, Morimoto E, Shigemoto Y, Sasaki M, Sugimoto H. Altered MR imaging findings in a Japanese female child

with PRUNE1-related disorder. *Brain Dev* 2020; 42: 302-306.

Miyamoto S, Nakashima M, Ohashi T, Hiraide T, Kurosawa K, Yamamoto T, Takanashi J, Osaka H, Inoue K, Miyazaki T, Wada Y, Okamoto N, Saitsu H. A case of de novo splice site variant in SLC35A2 showing developmental delays, spastic paraplegia, and delayed myelination. *Mol Genet Genom Med* 2019: e814.

2. 学会発表

2020年度日本小児放射線学会、欧州神経放射線学会（ESNR）で発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

遺伝性白質疾患・知的障害をきたす疾患の診断・治療・研究システム構築

研究分担者 松井 大 大津赤十字病院脳神経内科部長

研究要旨

遺伝性白質疾患の遺伝子診断を、コストや労力の点から効率よく行うためには、後天性白質疾患の鑑別を、臨床所見や画像所見から適切に行う必要がある。本研究では、当科にて診療を行った後天性白質疾患の症例を検討し、後天性白質疾患の鑑別について考察を行った。

A. 研究目的

臨床の現場においては、頻度としては遺伝性の大脳白質疾患よりも後天性の白質疾患が圧倒的に多い。そのため遺伝性白質疾患の診断のためには、遺伝子診断の前に後天性白質疾患を除外することが必要となる。本研究では、後天性白質疾患の中で多発性硬化症と進行性多巣性白質脳症について考察を加えることとする。

B. 研究方法

当科で診察を行った大脳白質疾患のうち多発性硬化症が疑われた症例について頭部 MRI の解析による検討を行った。
(倫理面への配慮)
個人を特定できる情報は消去した上で検討

C. 研究結果

当科で診療を行っている多発性硬化症の患者の中で、IFB β 、フマル酸ジメチル、グラチラマー酢酸塩などの治療を行っても難治性で大脳白質病変が進行している症例を認めた。本症例においては、抗 JCV 抗体価が高かった。

D. 考察

後天性白質疾患の中で多発性硬化症は、鑑別すべき白質疾患の一つである。近年、多発性硬化症の治療法の選択肢が増えたが、その治療法の中には、びまん性の大脳白質病変を引き起こす進行性多巣性白質脳症のリスクとなる薬剤が含まれている。進行性多巣性白

質脳症は、JC ウイルスにより引き起こされる脱髄性疾患であり、免疫不全の患者に好発する。頭部 MRI 上、皮質下白質が障害され、造影効果がみられないことが多い。フマル酸ジメチル、フィンゴリモド、ナタリズマブの投与時にリスクがあり、特に JC ウイルスの抗体価が高い場合は、注意が必要である。多発性硬化症の患者の場合、白質病変が多発性硬化症の増悪によるものであるか、進行性多巣性白質脳症を合併しているのかが、問題となるが、ナタリズマブ関連の進行性多巣性白質脳症では、頭部 MRI 上、大脳皮質下病変が多く、他の原因による進行性多巣性白質脳症よりも造影効果が高頻度といわれている。

E. 結論

近年多発性硬化症の治療法の選択肢が増えている中で、進行性多巣性白質脳症のリスクも増えている。後天性白質疾患の鑑別には多発性硬化症の鑑別のみでなく、進行性多巣性白質脳症も鑑別する必要があり、進行する白質病変を示す場合や新しい免疫療法を開始する場合には、JC ウイルスの抗体価を評価することが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

[出版物]治療可能な遺伝性神経疾患 診断・治療の手引き. 遺伝性白質疾患・知的障害をきたす疾患の診断・治療・研究システム構築班編集. 松井大: ミトコンドリア呼吸鎖複合体 1 欠乏症 (ACAD9 欠損症)、79-80 頁、2019 年、診断

と治療社

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし

2. 実用新案登録：なし

3.その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

希少難病における診療ガイドライン策定支援

研究分担者 三重野 牧子 自治医科大学情報センター医学情報学准教授

研究要旨 遺伝性白質疾患・知的障害をきたす疾患を含む希少難病を対象とした診療ガイドライン策定のうえで基礎資料となる国内外の動向についての情報収集を継続した。実際に希少難病で診療ガイドライン策定が行われた事例に注目し、本研究において応用できる策定支援およびそのプロセスについて検討を行った。

A. 研究目的

本研究で対象としている遺伝性白質疾患・知的障害をきたす疾患をはじめとする希少難病における診療ガイドライン策定に関して、国内外での議論についての情報を更新し、本研究で適切な診療ガイドラインを作成するための方法について検討した。

B. 研究方法

診療ガイドラインとしては、従来から検討しているとおり、Minds (EBM 普及推進事業) の提供資料を中心に検討する。希少疾患に関しては、欧米での希少疾患政策の最近の動向と公衆衛生上の位置づけも再度確認する。特に EU でまとめられた希少疾患ガイドライン開発に関するプロジェクト RARE BESTPRACTICES (Platform for sharing best practices for management of rare diseases) (www.rarebestpractices.eu) 報告、および実際に希少疾患において診療ガイドラインが策定された事例に注目する。希少難病を対象とした場合でも適切な診療ガイドラインを策定していく方法について検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は、既存文献検索および方法論研究であるため、個人情報保護に関する問題は生じない。

C. 研究結果

RARE BESTPRACTICES の最終報告書でも推奨されているところであるが、希少疾患の診療ガイドラインを策定する上で GRADE の方法論 (Grading of Recommendations, Assessment, Development and Evaluations) はもっとも強力なツールであることが示唆されている。BMJ においても特集が組まれており、BMJ Best Practice (<https://bestpractice.bmj.com>) という独自の web サイトは教育ツールとしての活用も推奨でき、オンラインツールキットとしての役割も大きい。確からしさに関する評定 (certainty rating) としては、very low (真の効果は推定した効果とかなりかけ離れているだろう) から、low (真の効果は推定した効果とかなり違うかもしれない)、moderate (真の効果は推定した効果に近いだろうと著者らは信じている)、high (著者らには、真の効果は推定した効果に類似しているという大きな自信がある) までの 4 段階で評価しており、機械的というよりは主観的な要素が強いが、より現実的である。確からしさに係る評定がおちる要因としては、バイアスのリスクや不正確さ、不一致、間接的、出版バイアスが挙げられ、確からしさを上げる要因としては、効果はかなり大きいこと、用量反応性があること、効果がある状況ではすべての残差交絡が効果の大きさを減じるような場合、が挙げられている。

実際に希少疾患に対して診療ガイドラインが

策定された事例としては、Pai らによる検討が詳しい(BMC Medical Research Methodology 2019, 19:67)。希少疾患での診療ガイドライン策定に関しての障壁となっていることとしては、これまでの指摘と共通する部分も多いが、以下の点が挙げられている。バイアスや交絡因子を最小化できるような適切な規模の研究を行うのが困難である、患者リクルートが困難である、診断基準が明確でなかったり確定診断ができなかったりするケースが多い、研究計画や患者組み入れの手がかりになりうる信頼できる患者レジストリの不足、重篤なケースも多くプラセボ服用の問題がある、出版バイアスの問題、仮に出版された研究が入手できた場合でも患者背景や方法等が不均一である、PRO (Patient Reported Outcomes : 疾患特異的 QOL 調査票) 等が用いられている場合の調査票の妥当性など、多くの指摘がなされている。そこで、Rare Best Practices Working Group のフレームを用いて、質的研究の活用や、構造化された観察フォームで収集された場合の expert-based evidence、当該希少疾患と共通点があるようなより頻度の高い疾患に雇っている集団からのデータの外挿ができる場合に間接エビデンスによる分析がなされたようなケースについて、3つの研究が分析された。特に注目すべき点を中心に以下に述べる。

1. 血友病ガイドラインのケースでは、間接エビデンス、質的研究、expert-based evidence が活用されていた。expert-based evidence については、「回答者の意見」ではなく「客観的情報」を回答者に要求する点が強調されている。重要なアウトカムについては、未発表データや観察者個人による情報であっても別に裏付けできるようなモデルも検討し、ガイドライン委員会に情報提供されている。
2. 劇症型抗リン脂質抗体症候群(CAPS)ガイドラインのケースでは、間接エビデンスや expert-based evidence に加えて、患者レジストリが活用されている。CAPS レジスト

リは患者の臨床データ、検査データ、治療データに関して網羅的に記録しており、アクセシビリティも優れているとのことである。とくに有益であるのが、重要な薬剤使用状況のデータが存在することであった。

3. 鎌状赤血球病ガイドラインのケースでは、質的研究と expert-based evidence が活用された。ガイドライン委員会とは独立の方法論グループが結成され、文献検索が行われた。委員会グループも一方で出版、未出版にかかわらず情報提供を行うことが要求され、両グループで議論されるというプロセスをとった。

Pai らは、希少疾患のガイドライン策定で理論的に障壁になる部分を超えて、GRADE に沿いながらも運用可能であったアプローチを提案している。その中でもっとも効果的であったのが、(未出版であっても) 専門家たちから大量かつ系統的に収集した、観察されたエビデンスであり、また、委員会における率直な議論であったと結論づけている。他疾患からの間接エビデンスの利用や、当該疾患レジストリも、出版されているが確からしさは弱いとされるエビデンスを補完することができ、質的研究においては、推奨を決定する際に考慮すべき要因に関する情報を拾い集める重要な役割を担うことも示された。

D. 考察

希少疾患に関するエビデンスおよびエビデンス産生方法については、臨床試験の方法論として、たとえば階層デザインやベイズデザイン等、研究としての報告は近年増加傾向にある。しかしながら、複雑なデザインであるために、現実問題として実際に計画して実施することは、通常のランダム化比較試験よりも技術的にも困難であることが多い。Pai らの先行研究で示唆されるように、一般的な診療ガイドライン策定プロセスを踏む一方で、エビデンスの弱い部分に関しては最大限補完できるような方法

を、個別事例（疾患）ごとに慎重に検討していく必要がある。患者レジストリ、間接的なエビデンス、専門家ベースのエビデンス、質的研究を組み合わせることで、希少難病に関する質の高い診療ガイドライン策定が可能になるだろう。とくに今後、診療ガイドライン策定を検討する疾患については、全数調査かつ重要なアウトカムについてのデータが得られるような患者レジストリ構築は必須と考えられる。

また、Patient Reported Outcome (PRO)については、Paiらは注意喚起しているものの、疾患によっては妥当性も確認されている例もあり、希少難病においても重要な指標として活用できる可能性があると考えられる。診療ガイドライン策定における適用可能性については今後、検討が必要である。

E. 結論

希少疾患における診療ガイドライン策定に関する先行研究について概観し、本研究課題である遺伝性白質疾患・知的障害をきたす疾患への応用可能性について検討した。診療ガイドライン策定の基本手順を踏襲することは重要であるが、少しでも根拠となりうるデータを収集できる体制を整えて議論を重ねていく必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 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。

遺伝性白質疾患・知的障害をきたす疾患の診断・治療・研究システム構築

研究分担者 村松 一洋 自治医科大学小児科 准教授

【研究要旨】

治療可能な神経疾患ガイドライン作成統括責任者作成統括責任者を担当し、原稿執筆、編集作業を行い「治療可能な神経疾患 診断・治療の手引き」を発刊した。

A. 研究目的

遺伝子診断技術の進歩により診断確定可能となる疾患が増加してきている。それにより一般に認知されていない疾患が当然多数存在するようになった。多くは診断が可能となったのみで、治療方法があるわけではないため、仮に診断できたとしても、それ以上の恩恵を患者が受けることはできない。しかしながら、その一部には画期的な治療法が開発されている疾患がある。このような疾患に関しては、見逃すべきではなく、迅速に診断し治療を開始すべきである。その一方で、診療の現場においてそのすべてを把握することは極めて困難である。本研究では、診療の現場に有用な情報を提供するための「治療可能な神経疾患診断・治療の手引き」を作成することで、適切な時期に診断し治療開始できるような体制を構築することを目的とする。これは患者だけではなく、診療の現場においても期待されている内容である。

B. 研究方法

「治療可能な神経疾患診断・治療の手引き」の出版

小坂仁研究総括、和田敬仁分担研究者、高梨潤一分担研究者および、診断と治療社編集部とともに、各執筆担当者を選定して原稿作成、編集校正作業を経て発刊した。

C. 研究結果

「治療可能な神経疾患診断・治療の手引き」の出版

第1部 症候 7項目（意識障害、知的退行、大頭症、不随意運動、眼球運動異常、肝脾腫、てんかん）、第2部総論 7項目（アミノ酸代謝異常、有機酸代謝異常、脂肪酸代謝異常、ライソゾーム病・ペルオキシゾーム病、ミトコンドリア病、尿素サイクル異常症、SLC病、神経伝達物質病）、第3部 各論 18疾患（ミトコンドリア病 10疾患、SLC病 6疾患、その他 2疾患）を盛り込み 2019年末に「治療可能な神経疾患診断・治療の手引き」を診断と治療社より発刊した。

D. 考察

治療可能なもので他研究班・ガイドラインがないものについて Minds に準拠し扱う。ミトコンドリア関連、脳内ビタミントランスポーター関連の疾患などを中心とし、他研究班が研究している疾患においても、神経症候の記載がないもの、または神経科医からの目線の内容が必要なものを掲載した。

他研究班かがアップデートしない疾患を扱うことで最新の情報を提供するに至った。

このような特徴を有するものであり、診療の現場及び患者にとっても非常に有用と考えられる。

実際に、読者からの問い合わせもすでにあり、診療の現場で大いに活かされていることが明らかである。

E. 結論

本研究班の成果の一つとして、診療の現場および患者にとって非常に有用な「治療可能

な神経疾患診断・治療の手引き」が出版された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

進行性白質脳症の研究成果情報収集と診断支援

研究分担者 山本 俊至 東京女子医科大学遺伝子医療センターゲノム診療科・教授

研究要旨

研究目的:

進行性白質脳症は、頭部外傷や発熱・感染などを契機に階段状に進行する大脳白質障害であり、①皮質下嚢胞をもつ大頭型白質脳症(megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: MLC)、②白質消失病、③卵巣機能障害を伴う進行性白質脳症の3疾患が含まれる。これらはすべて指定難病となっており、重症度を満たせば認定される。ただし、進行性に白質が障害される疾患はこれ以外にも多く存在しており、鑑別診断には遺伝学的検査以外に方法がない。その一方、3疾患の遺伝学的検査は保険適用になっていないため、今のところ研究として診断を支援するしかないのが現状である。診断を支援し、症例の掘り起しを行い、疾患に実態を把握することが本研究の目的である。

研究方法:

進行性白質脳症が疑われるも、未診断のままである患者に対して、遺伝学的検査を提供し、診断をサポートした。

結果と考察:

発達の遅れと大頭症を示し、頭部画像診断でMLCが疑われた1歳女児についてコンサルトがあった。MLC1の遺伝学的検査を実施し、日本人 common 変異と新規スプライシング変異の複合ヘテロ接合が認められた。患者は現在経過観察中である。

結論:

進行性白質脳症の中でもMLCは最も頻度が高く、臨床症状から比較的鑑別が得られやすい。MLC1の遺伝学的検査は保険適用とされることが望ましいと考えられる。

A. 研究目的

進行性白質脳症は、頭部外傷や発熱・感染などを契機に階段状に進行する大脳白質障害であり、①皮質下嚢胞をもつ大頭型白質脳症(megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: MLC)、②白質消失病、③卵巣機能障害を伴う進行性白質脳症の3疾患が含まれる。これらはすべて指定難病となっており、重症度を満たせば認定される。ただし、進行性に白質が障害される疾患はこれ以外にも多く存在しており、最終的に遺伝学的検査

以外に診断を確定させる方法がない。

このうちMLCは側脳室下角近傍ののう胞性変化と大頭症が特徴的であり、比較的鑑別が容易である。しかもこれまでに報告された日本人MLC患者は責任遺伝子であるMLC1の少なくとも一方のアリルにcommon変異を持っている。そのため、診断のアプローチとしては、まずcommon変異を検索し、common変異がホモで認められれば診断が確定する。もし、common変異がヘテロで認められた場合は、他のエクソン領域も解析し、複合ヘテロ変異によるかどうか検索する

こととなる。逆に common 変異が認められない場合は、MLC である可能性が低いため、全エクソン解析を行う必要はない。

本研究班においては未診断進行性白質脳症患者の情報を継続して収集するとともに、診断の支援を行っているが、本年度診断支援を行った患者において common 変異と新規スプライシング変異による複合ヘテロと診断された例があったので報告する。

B. 方法

まず、*MLC1* の common 変異の有無をサンガー法で確認した。*MLC1* common 変異が認められた場合、さらに他のエクソン領域にまで解析対象を広げた。

なお、本研究は東京女子医科大学における「遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会」で認められた研究の一部として行い、患者あるいはその家族から書面による同意を得て行った。

C. 研究結果

症例は下記のとおりである。

症例:1 歳女兒

家族歴:二卵性双胎の 1 子

周産期歴:帝王切開にて出生。低血糖のため NICU にて経過観察され、14 日後に退院した。

現病歴:10 か月健診で軽度の運動発達遅滞と頭囲拡大を指摘され、紹介された。頭部 MRI 検査が行われ、広範な大脳白質病変が認められ、MLC が疑われた。双胎の同胞は特に症状を示していない。

遺伝子解析結果:書面による同意取得後、*MLC1* common 変異の有無を解析したところ、ヘテロ変異を認めた。さらに全エクソン

領域を解析したところ、エクソン5のスプライシングドナーサイトにヘテロ変異を認めた。両変異は父と母の双方から受け継がれており、複合ヘテロと診断した。エクソン5のスプライシングドナーサイト変異は過去に報告のない新規変異であった。

D. 考察

MLC 患者においては、発達遅滞と大頭症、MRI による特徴的な所見から、比較的鑑別が容易である。本症例も *MLC1* の common 変異と新規変異の組み合わせによる複合テロ変異で比較的容易に診断に至った。MLC は進行性の疾患であり、注意深く経過観察する必要がある。

E. 結論

進行性白質脳症は希少疾患であり、新規患者は年間数例程度と考えられるが、遺伝学的検査でしか診断を確定させることができない。このうち MLC は日本人 common 変異が存在することから比較的診断が容易であり、*MLC1* の遺伝学的検査は保険収載されるべきと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Imaizumi T, Yamamoto-Shimajima K, Yanagishita T, Ondo Y, Yamamoto T. Analyses of breakpoint-junctions of complex genomic rearrangements comprising multiple consecutive microdeletions by nanopore sequencing. *J Hum Genet* (in press)
2. Suzuki T, Togawa T, Kanno H, Ogura H, Yamamoto T, Sugiura T, Kouwaki M,

- Saitoh S. A novel α -spectrin pathogenic variant in trans to α -spectrin LELY causing neonatal jaundice with hemolytic anemia from hereditary pyropoikilocytosis coexisting with Gilbert syndrome. *J Pediatr Hemat/Onc* (in press)
3. Kanda S, Ohmuraya M, Akagawa H, Horita S, Yoshida Y, Kaneko N, Sugawara N, Ishizuka K, Miura K, Harita Y, Yamamoto T, Oka A, Araki K, Furukawa T, Hattori M. Deletion in the cobalamin synthetase W domain-containing protein 1 gene is associated with congenital anomalies of the kidney and urinary Tract. *J Am Soc Nephrol*. 31: 139-147, 2020.
 4. Yamamoto-Shimajima K, Imaizumi T, Akagawa H, Kanno H, Yamamoto T. Primrose syndrome associated with unclassified immunodeficiency and a novel ZBTB20 mutation. *Am J Med Genet A*. 182: 521-526, 2020.
 5. Imaizumi T, Yamamoto-Shimajima K, Yamamoto H, Yamamoto T. Establishment of a simple and rapid method to detect MECP2 duplications using digital polymerase chain reaction. *Congenit Anom (Kyoto)*. 60: 10-14, 2020.
 6. 村松みゆき, 白井謙太郎, 今泉太一, 柳下友映, 山本圭子, 山本俊至. Duchenne型筋ジストロフィー患者の母親で認められたモザイク変異と遺伝カウンセリング. *脳と発達* 52: 41-44, 2020.
 7. Yamamoto T, Imaizumi T, Yamamoto-Shimajima K, Lu Y, Yanagishita T, Shimada S, Chong PF, Kira R, Ueda R, Ishiyama A, Takeshita E, Momosaki K, Ozasa S, Akiyama T, Kobayashi K, Oomatsu H, Kitahara H, Yamaguchi T, Imai K, Kurahashi H, Okumura A, Oguni H, Seto T, Okamoto N. Genomic backgrounds of Japanese patients with undiagnosed neurodevelopmental disorders. *Brain Dev*. 41: 776-782, 2019.
 8. Sato T, Sugiura-Ogasawara M, Ozawa F, Yamamoto T, Kato T, Kurahashi H, Kuroda T, Aoyama N, Kato K, Kobayashi R, Fukuda A, Utsunomiya T, Kuwahara A, Saito H, Takeshita T, Irahara M. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: a comparison of live birth rates in patients with recurrent pregnancy loss due to embryonic aneuploidy or recurrent implantation failure. *Hum Reprod*. 34: 2340-2348, 2019.
 9. Okumura A, Shimajima K, Kurahashi H, Numoto S, Shimada S, Ishii A, Ohmori I, Takahashi S, Awaya T, Kubota T, Sakakibara T, Ishihara N, Hattori A, Torisu H, Tohyama J, Inoue T, Haibara A, Nishida T, Yuhara Y, Miya K, Tanaka R, Hirose S, Yamamoto T. PRRT2 mutations in Japanese patients with benign infantile epilepsy and paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Seizure*. 71: 1-5, 2019.
 10. Yanagishita T, Yamamoto-Shimajima K,

- Koike T, Nasu H, Takahashi Y, Akiyama T, Nagata S, Yamamoto T. Compound heterozygous ALDH7A1 mutation causes the hemi-allelic expression in a patient with pyridoxine-dependent epilepsy. *Tokyo Women's Medical University Journal* 3: 73-77, 2019.
11. Hoshina T, Seto T, Shimono T, Sakamoto H, Okuyama T, Hamazaki T, Yamamoto T. Narrowing down the region responsible for 1q23.3q24.1 microdeletion by identifying the smallest deletion. *Hum Genome Var* 6: 47, 2019.
 12. Yamamoto-Shimajima K, Kouwaki M, Kawashima Y, Itomi K, Momosaki K, Ozasa S, Okamoto N, Yokochi K, Yamamoto T. Natural histories of patients with Wolf-Hirschhorn syndrome derived from variable chromosomal abnormalities. *Congenit Anom (Kyoto)* 59: 169-173, 2019.
 13. Tomita Y, Chong P-F, Yamamoto T, Akaminea S, Imaizumi T, Kira R. Sequential radiologic findings in osteopathia striata with cranial sclerosis. *Diagn Interv Imaging* 100: 529-531, 2019.
 14. Imaizumi T, Yamamoto-Shimajima K, Yamamoto T. Advantages of ddPCR in detection of PLP1 duplications. *Intractable Rare Dis Res.* 8: 198-202, 2019.
 15. Yamamoto-Shimajima K, Imaizumi T, Aoki Y, Inoue K, Kaname T, Okuno Y, Muramatsu H, Kato K, Yamamoto T. Elucidation of the pathogenic mechanism and potential treatment strategy for a female patient with spastic paraplegia derived from a single-nucleotide deletion in PLP1. *J Hum Genet.* 64: 665-671, 2019.
 16. Miyamoto S, Nakashima M, Ohashi T, Hiraide T, Kurosawa K, Yamamoto T, Takanashi J, Osaka H, Inoue K, Miyazaki T, Wada Y, Okamoto N, Saitsu H. A case of de novo splice site variant in SLC35A2 showing developmental delays, spastic paraplegia, and delayed myelination. *Mol Genet Genomic Med.* 7: e814, 2019.
 17. Yanagishita T, Yamamoto-Shimajima K, Nakano S, Sasaki T, Shigematsu H, Imai K, Yamamoto T. Phenotypic features of 1q41q42 microdeletion including WDR26 and FBXO28 are clinically recognizable: The first case from Japan. *Brain Dev.* 41: 452-455, 2019.
 18. Imaizumi T, Mogami Y, Okamoto N, Yamamoto-Shimajima K, Yamamoto T. De novo 1p35.2 microdeletion including PUM1 identified in a patient with sporadic West syndrome. *Congenit Anom (Kyoto).* 59: 193-194, 2019.
2. 著書
 1. 山本俊至. リボフラミン反応(3)モリブデン補助因子欠損症 A 型. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患政策研究事業 遺伝性白質疾患・知的障害をきたす疾患の診断・治療・研究システム

- 構築班[編]. 治療可能な遺伝性神経疾患 診断・治療の手引き. 診断と治療社, 東京, 2020.
2. 山本俊至[監修]. 症例でわかる小児神経疾患の遺伝学的アプローチ. 診断と治療社, 東京, 2019.
 3. 山本俊至. 染色体微細構造異常と小児神経疾患. 中村公俊, 佐村修[編]. 【遺伝子医学 MOOK 別冊 最新遺伝医学研究と遺伝カウンセリング(シリーズ4)】最新小児・周産期遺伝医学研究と遺伝カウンセリング, メディカルドゥ, 大阪, 2019.
 4. 山本俊至. 1p36 欠失症候群. 水澤英洋, 五十嵐隆, 北川泰久, 高橋和久, 弓倉整[編]. 日本医師会雑誌 指定難病ペディア 2019 148 巻・特別号(1), 日本医師会, 東京, 2019.
 5. 山本俊至. 進行性白質脳症. 水澤英洋, 五十嵐隆, 北川泰久, 高橋和久, 弓倉整[編]. 日本医師会雑誌 指定難病ペディア 2019 148 巻・特別号(1), 日本医師会, 東京, 2019.
 6. 山本俊至. Williams 症候群の遺伝学. 小児科診療 82: 895-900, 2019.
3. 学会発表
 1. 岩崎直子, 赤川浩之, 尾形真規子, 滝澤美保, 富岡光枝, 馬場園哲也, 山本俊至. 次世代シーケンサーを用いた MODY14 遺伝子の網羅的解析. 第 62 階日本糖尿病学会, 仙台, 2019/5/23.
 2. 今泉太一, 山本圭子, 椎原 隆, 岡本伸彦, 山本俊至. 10 番染色体長腕サブテロメア欠失の 6 例. 第 61 回日本小児神経学会学術集会, 名古屋 2019/5/31.
 3. 森岡景子, 高橋幸利, 臼井大介, 東本和紀, 大星大観, 伊藤智城, 木村暢佑, 植田祐樹, 山口解冬, 大谷英之, 今井克美, 重松秀夫, 井上有史, 加藤光広, 山本俊至. CDKL5 遺伝子異常による難治てんかん 10 例の検討: 発達の特徴. 第 61 回日本小児神経学会学術集会, 名古屋, 2019/5/31.
 4. 山本俊至. 【セミナー】「脳と発達」で論文 accept を勝ち取るには? 第 61 回日本小児神経学会学術集会, 名古屋, 2019/5/31.
 5. 山本圭子, 青木雄介, 井上 健, 山本俊至. 女性 Pelizaeus-Merzbacher 病患者の発症メカニズムと治療戦略の検討. 第 61 回日本小児神経学会学術集会, 名古屋, 2019/5/31.
 6. 柳下友映, 山本圭子, 恩藤由美子, 岡本信彦, 永田 智, 山本俊至. 精神運動発達遅滞・特徴的顔貌・心奇形を認める 19q13.32 欠失の新規症例. 第 61 回日本小児神経学会学術集会, 名古屋, 2019/5/31.
 7. 若林 慶, 小坂 仁, 小林華林, 今泉太一, 山本俊至, 山形崇倫. 乳児期から大脳半球の萎縮とジストニアを認めた MCT8 欠損症の 1 例. 第 61 回日本小児神経学会学術集会, 名古屋, 2019/5/31.
 8. Sunag A, Fujita K, Hikita N, Sakuma S, Hamazaki T, Yamamoto T, Seto T. Successful treatment with perampanel to control myoclonic seizure in an infant with neuronal ceroid lipofuscinosis type

14. International Symposium on Neonatal Seizures: Deepening Insights into Developmental Brain Injury: The 20th Annual Meeting of Infantile Seizure Society, Nagoya, 2019/5/31.
9. Akamine S, Chong P F, Yamashita F, Maeda K, Yamamoto T, Kira R. A case of chromosome 8p inverted duplication deletion syndrome with infantile spasms and severe developmental delay. International Symposium on Neonatal Seizures: Deepening Insights into Developmental Brain Injury: The 20th Annual Meeting of Infantile Seizure Society, Nagoya, 2019/5/31.
10. 荒井 篤, 熊倉 啓, 吉田真衣, 石嶺里枝, 佐々木宏太, 山本俊至, 岡本伸彦, 秦 大資 てんかんと自閉症スペクトラム症を伴った SZT2 変異例と CHD2 変異例の報告. 第 61 回日本小児神経学会学術集会, 名古屋, 2019/6/1.
11. 比屋根真彦, 松岡剛司, 山本俊至, 井上 健. 1 ヶ月時難治てんかんで発症し、肝脾腫、呼吸不全が急激に進行した大脳白質消失病の男児例. 第 61 回日本小児神経学会学術集会, 名古屋, 2019/6/1.
12. 橋詰拓摩, 衛藤薫, 鈴木美穂, 佐藤友哉, 柳下友映, 南雲薫子, 西川愛子, 中務秀嗣, 伊藤進, 平澤恭子, 山本俊至, 永田 智. LIS1 遺伝子のスプライシング変異を認めた古典型滑脳症一例. 第 4 回 副都心小児科カンファレンス, 東京, 2019/6/26.
13. Yamamoto T, Imaizumi T, Yamamoto-Shimajima K, Yanagishita T, Seto T, Okamoto N. Genomic backgrounds of Japanese patients with undiagnosed neurodevelopmental disorders. The 59th Annual Meeting of the Japanese Teratology Society/ The 13th World Congress of the International Cleftlip and Palate Foundation -CLEFT 2019-, Nagoya, 2019/7/26.
14. 山本俊至, 山本圭子, 恩藤由美子, 青山直樹, 黒田知子, 加藤恵一. 着床前染色体異数性診断(PGT-A)に用いる染色体数的異常の診断方法の検討. 臨床遺伝 2019 in Sapporo/第 26 回日本遺伝子診療学会大会・第 43 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会合同学術集会, 札幌, 2019/8/2.
15. 山本圭子, 今泉太一, 赤川浩之, 山本俊至. 全エクソーム解析で診断された Primrose 症候群の本邦第 1 例. 臨床遺伝 2019 in Sapporo/第 26 回日本遺伝子診療学会大会・第 43 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会合同学術集会札幌, 2019/8/2.
16. 今泉太一, チョンピンフイー, 吉良龍太郎, 山本圭子, 山本俊至. NGS 解析で診断された MECP2 重複症候群の 1 家系. 臨床遺伝 2019 in Sapporo/第 26 回日本遺伝子診療学会大会・第 43 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会合同学術集会札幌, 2019/8/2.
17. 井上陽子, 本岡里英子, 今泉太一, 恩藤由美子, 山本圭子, 山本俊至. 皮質下嚢胞をもつ大脳型白質脳症亜系遺伝子 MLC2 のヘテロ変異が同定され

- た1例. 臨床遺伝 2019 in Sapporo/第26回日本遺伝子診療学会大会・第43回日本遺伝カウンセリング学会学術集会合同学術集会札幌, 2019/8/2.
18. 柳下友映, 山本圭子, 小池敬義, 那須裕郷, 高橋幸利, 秋山倫之, 永田智, 山本俊至. ALDH7A1の複合ヘテロ変異が同定できたビタミン依存性てんかんの1例. 臨床遺伝 2019 in Sapporo/第26回日本遺伝子診療学会大会・第43回日本遺伝カウンセリング学会学術集会合同学術集会, 札幌, 2019/8/3.
 19. 村松みゆき, チョンピンフィー, 吉良龍太郎, 山本圭子, 岡本伸彦, 山本俊至. 13番染色体構造異常6例の遺伝子型・表現型相関. 臨床遺伝 2019 in Sapporo/第26回日本遺伝子診療学会大会・第43回日本遺伝カウンセリング学会学術集会合同学術集会, 札幌, 2019/8/3.
 20. 岩崎直子, 大友真理, 浦野真理, 佐藤裕子, 坂井晶子, 山本俊至, 齋藤加代子. GLP-1受動体作動薬が糖尿病および肝機能障害に有効であった筋強直ジストロフィーの同胞例. 臨床遺伝 2019 in Sapporo/第26回日本遺伝子診療学会大会・第43回日本遺伝カウンセリング学会学術集会合同学術集会, 札幌, 2019/8/3.
 21. 山本俊至, 今泉太一, 山本圭子, 柳下友映, 瀬戸俊之, 岡本伸彦. 神経発達障害に対するクリニカルシーケンスの診断効率. 日本人類遺伝学会第64回大会, 長崎, 2019/11/7.
 22. 山本圭子, 鈴木宏, 岡本伸彦, 山本俊至. NKX2-5が位置する5q35.1領域の中間部欠失を示した3例. 日本人類遺伝学会第64回大会, 長崎, 2019/11/7.
 23. 柳下友映, 山本圭子, 今泉太一, 恩藤由美子, 岡本伸彦, 山本俊至. 超ロングシーケンスによる染色体構造異常の新たなメカニズムの解析. 日本人類遺伝学会第64回大会, 長崎, 2019/11/7.
 24. 今泉太一, 山本圭子, 柳下友映, 恩藤由美子, 山本俊至. ロングリードシーケンサーを用いた複雑な染色体構造異常の切断点解析. 日本人類遺伝学会第64回大会, 長崎, 2019/11/7.
 25. 村松みゆき, 今泉太一, 柳下友映, 山本圭子, 岡本伸彦, 山本俊至. MED13遺伝子を含む17q23微細欠失を示した男児例. 日本人類遺伝学会第64回大会, 長崎, 2019/11/7.
 26. 青木貴子, 小倉浩美, 檜澤大樹, 山本俊至, 中原衣里菜, 矢ヶ崎博, 森岡一朗, 菅野仁. 先天性溶血性貧血関連遺伝子パネルを用いた新生児溶血性疾患の病因解析. 日本人類遺伝学会第64回大会, 長崎, 2019/11/7.
 27. 堀田純子, 馬場遥香, 濱崎考史, 山本俊至, 瀬戸俊之. 2q23.3q24.2欠失の1女児例. 日本人類遺伝学会第64回大会, 長崎, 2019/11/7.
 28. 岩崎直子, 大澤真里, 長谷美智代, 松尾真理, 山本俊至, 馬場園哲也, 齋藤加代子. Consensus guidelineに基づいた糖尿病個別化医療のアウトカム. 日本人類遺伝学会第64回大会, 長崎, 2019/11/7.

29. 宮本祥子, 中島光子, 大橋伯, 平出拓也, 宮崎岳大, 黒澤健司, 山本俊至, 高梨潤一, 小坂仁, 井上健, 和田芳直, 岡本伸彦, 才津浩智. De novo スプライスサイト変異が同定された SLC35A2-CDG の 1 例. 日本人類遺伝学会第 64 回大会, 長崎, 2019/11/7.
30. 井上陽子, 今泉太一, 柳下友映, 山本圭子, 岡本伸彦, 山本俊至. 重度発達遅滞を示した SATB2 を含む 2q33.1 領域の染色体重複例. 日本人類遺伝学会第 64 回大会, 長崎, 2019/11/7.
31. 柳下友映, 衛藤薫, 山本圭子, 今泉太一, 永田智, 山本俊至. LIS1 の de novo スプライシング変異による滑脳症の 1 例. 日本人類遺伝学会第 64 回大会, 長崎, 2019/11/8.
32. 山本俊至. 【シポジウム】新型出生前診断(NIPT)における懸念. 第 2 回日本ダウン症会議, 東京, 2019/11/17.
33. 山本俊至. 【特別講演】小児神経科医が知っておくべき臨床遺伝学的検査. 第 20 回 常総セミナー, つくば市, 2020/2/1.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

疾患表現型修飾遺伝子同定のためのアレキサンダー病
ゲノムデータベース構築に向けて

分担研究者 吉田誠克 京都府立医科大学大学院 医学研究科 神経内科

研究要旨

アレキサンダー病 (Alexander disease; AxD) の発症年齢に関連する疾患修飾遺伝子を明らかにするために、晩期発症(延髄脊髄優位型, 中間型)AxD 患者について関連解析を行った。対象は *GFAP* ヘテロ変異を認めた発端者 31 例。 *GFAP* 変異の違いによる影響を調整するため、PROVEAN を用いて "Neutral" または "Deleterious" に分類した。全エクソームシーケンス (WES) と DNA マイクロアレイ解析によりゲノムデータを取得し、発症年齢を目的変数、 *GFAP* 変異効果予測を共変量として、各バリエントについてロジスティック回帰分析による関連解析を行った。次いで AxD 病態生理との関連が報告されている 33 の候補遺伝子に注目した。 *GFAP* 変異効果予測は 9 例が Neutral, 22 例が Deleterious で、発症年齢に有意差を認めた (Neutral 58.0±8.8 歳, Deleterious 38.9±8.8 歳, $p<0.01$)。発症年齢に関する関連解析では WES で 46 バリエント, マイクロアレイ解析で 645 の SNPs が $p<0.01$ を示したが、ゲノムワイドレベルにおける有意水準には至らなかった。候補遺伝子の解析では *GAN*, *SLC1A2*, *CASP3*, *HDACs*, *PI3K* のバリエントに $p<0.05$ の関連が示された。超稀少単一遺伝子疾患である AxD のゲノムワイド解析は挑戦的であるが、今回の成果は、疾患表現型修飾遺伝子を同定するためのゲノムデータベース構築に向けて基盤となる。

A. 研究目的

アレキサンダー病 (Alexander disease; AxD) は *glial fibrillary acidic protein (GFAP)* 遺伝子変異による極めて稀な一次性アストロサイト疾患である。大脳優位型は乳児期発症の痙攣, 大頭症, 精神運動発達遅滞を呈し, 頭部 MRI では前頭部優位の白質病変が特徴である。延髄脊髄優位型は主に若年期から成人期発症で筋力低下, 痙攣性, 球症状を呈し, MRI では延髄・脊髄の異常信号や萎縮が特徴である。中間型は両病型の特徴を有する。大脳優位型は 70% の症例で *GFAP* 遺伝子の R79, R88, R239 に変異を有し, 表現型は *GFAP* 変異による規定が推測される。一方で, 延髄脊髄型,

中間型では幅広い発症年齢を呈し, 変異のホットスポットは認められず, *GFAP* 変異以外に表現型の多様性を修飾する因子の存在が予測される。近年, ハンチントン病やデュシャンヌ型筋ジストロフィーといった単一遺伝子疾患において, ゲノムワイド関連解析を用いて表現型の多様性に関連する遺伝子座が報告された。われわれは晩期発症(延髄脊髄優位型, 中間型)AxD 患者について, 全エクソームシーケンス (whole exome-sequencing; WES) と DNA マイクロアレイ解析によりゲノムデータを取得し, 表現型多様性に関連する遺伝子を発症年齢に注目して試みた。

B. 研究方法

対象は2004年から2016年までに当施設で*GFAP*ヘテロ変異を同定した日本人AxD患者40例。依頼施設からの臨床情報と脳・脊髄MRIをもとに病型を分類した。追加解析の同意が得られなかった症例および大脳優位型の症例を除外し、発端者である31例の延髄脊髄優位型または中間型AxD患者を解析対象とした。WESはSureSelect Human All Exon V5 (Agilent Technologies) を使用してターゲットキャプチャーを行い、HiScanSQ (Illumina) を用いてシーケンスを行った。マイクロアレイ解析ではtag SNPsを含む約55万個のマーカーを搭載したInfiniumCoreExome-24 v.1.1 BeadChip (Illumina) を用いてハイブリダイゼーションを行った。*GFAP*変異の違いによる発症年齢への影響を調整するため、変異効果予測ツールであるPROVEANを用いて*GFAP*変異を”Neutral”または”Deleterious”に分類した。WES, マイクロアレイデータを使用して、発症年齢(45歳未満または45歳以上)を目的変数、*GFAP*変異効果予測(NeutralまたはDeleterious)を共変数として、各バリエーションについてロジスティック回帰分析による関連解析を行った。次いでAxD病態生理との関連が報告されている33の候補遺伝子に注目した。

C. 研究結果

晩期発症のAxDの発症年齢は幅広く(5-72歳)、10-30歳代と60歳前後に二峰性のピークを認めた。これに基づいて45歳未満発症を若年発症群(n=13)、45歳以上発症を高年齢発症群(n=18)と定義した。高年齢発症群は全例で延髄脊髄型を呈し、若年

発症群は92%で中間型を呈した。同一*GFAP*変異を有する症例は同じ発症年齢群に分類される傾向にあったが、p.R416W変異は若年、高年齢発症群の双方に患者を認められた。*GFAP*変異効果予測は9例がNeutral、22例がDeleteriousで、発症年齢に有意差を認めた(Neutral 58.0±8.8歳, Deleterious 38.9±8.8歳, p<0.01)。*GFAP*変異効果予測で調整した発症年齢に関する関連解析ではWESで46バリエーション、マイクロアレイ解析で645のSNPsがp<0.01を示したが、ゲノムワイドレベルにおける有意水準には至らなかった。候補遺伝子解析では*GAN*, *SLC1A2*, *CASP3*, *HDACs*, *PI3K*のバリエーションにp<0.05の関連が示された。*GAN*は*GFAP*蛋白分解、*SLC1A2*はグルタミン酸毒性、*CASP3*はアストロサイトの生存、*HDACs*と*PI3K*は*GFAP*発現調節との関連が報告されている。

D. 考察

AxDを含む超稀少単一遺伝子疾患のゲノムワイド解析として初めての報告で、発症年齢に関連する複数の遺伝子を同定した。晩期発症AxDでは既報告(平均発症年齢21歳)と比較して本研究の対象では45歳以上が58%と高年齢発症の割合が高く、また幅広い発症年齢が明らかになり、多様性に関連する修飾遺伝子の存在が示唆された。

E. 結論

非常に稀な単一遺伝子疾患であるAxDに対してゲノムワイドで有意な修飾遺伝子を同定することは挑戦的であるが、今回の成果は、AxDの疾患表現型修飾遺伝子を同定するためのゲノムデータベース構築に向けて基盤となるものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasuda R, Nakano M, Yoshida T, Sato R, Adachi H, Tokuda Y, Mizuta I, Saito K, Matsuura J, Nakagawa M, Tashiro K, Mizuno T. Towards genomic database of Alexander disease to identify variations modifying disease phenotype. *Sci Rep* 9: 14763, 2019
- 2) Kora K, Kato T, Ide M, Tanaka T, Yoshida T. Inflammatory neuropathology of infantile Alexander disease: a case report. *Brain and Dev* 42: 64-68, 2020
- 3) Yoshida T, Mizuta I, Yasuda R, Nakagawa M, Mizuno T. Characteristics of cerebral lesions in adult-onset Alexander disease. *Neurological Sciences* 41: 225-227, 2020
- 4) 松山友美, 佐竹真理恵, 亀井遼太郎, 吉田誠克. 繰り返す意識消失と転倒を契機に急激に増悪する歩行障害を認めた Alexander 病の 1 例. *臨床神経* 60: 137-141, 2020

2. 学会発表

- 1) 吉田誠克, 水田依久子, 安田怜, 松浦潤, 齋藤光象, 中川正法, 水野敏樹. 成人期発症アレキサンダー病の大脳病変の特徴. 第 60 回日本神経学会学術大会. 2019 年 5 月 25 日 ; 大阪.
- 2) 吉田誠克, 水田依久子, 安田怜, 松浦潤, 齋藤光象, 中川正法, 水野敏樹. 小児期

発症のアレキサンダー病の臨床学的データ. 第 61 回日本小児神経学会学術大会. 2019 年 6 月 1 日 ; 名古屋.

- 3) 吉田誠克, 水田依久子, 安田怜, 中川正法, 水野敏樹. アレキサンダー病の家族内発症に関する遺伝学的データ. 第 64 回日本人類遺伝学会. 2019 年 11 月 9 日 ; 長崎.
- 4) 三木知子, 横田修, 原口俊, 水田依久子, 吉田誠克, 竹之下慎太郎, 寺田整司, 山田了士. GFAP 遺伝子の R416W 変異を伴う家族性成人型 Alexander 病の一剖検例. 第 47 回 臨床神経病理懇話会・第 10 回 日本神経病理学会中国四国地方会. 2019 年 11 月 24 日 ; 岡山.

H. 知的所有権の取得状況

なし