

**厚生労働科学研究費補助金**

**難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）**

**脳クレアチン欠乏症候群の臨床研究**

**平成26年度 総括研究報告書**

**研究代表者 和田 敬仁**

**平成26（2015）年 3月**

## 目 次

I . 総括研究報告	
脳クレアチン欠乏症候群の臨床研究 和田敬仁	1
(資料) 図 1 ~9	
II . 分担研究報告	
1 . 脳クレアチン欠乏症の脳MRI/MRSに関する研究 相田典子	11
2 . 脳クレアチニン欠乏症候群の病態解明に対する研究 小坂 仁	14
3 . 脳クレアチン欠乏症候群の診断基準作成および疫学調査に関する研究 20 後藤知英	
4 . 脳クレアチン欠乏症候群の分子遺伝学的診断に関する研究 新保裕子	22
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV . 研究成果の刊行物・別刷	29
V . 研究班構成員名簿	41

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）  
総括研究報告書

脳クレアチン欠乏症候群の臨床研究

研究代表者 和田敬仁 京都大学大学院医学研究科 准教授

## 研究要旨

脳クレアチン欠乏症候群(cerebral creatine deficiency syndromes: CCDSs)は、グアニジノ酢酸メチル基転移酵素(GAMT)欠損症、アルギニン・グリシンアミジノ基転移酵素 (AGAT) 欠損症、クレアチン輸送体 (SLC6A8) 欠損症の3疾患からなり、知的障害・自閉症・てんかんを主症状とする。CCDSsの特徴は、脳内クレチンの改善が治療法となる点である。SLC6A8欠損症は欧米において最も頻度の高い遺伝性精神遅滞症候群の一つと考えられているが、日本における診断症例は限られている。本研究は日本におけるCCDSsの診断基準、重症度分類、診療ガイドラインを作成し、臨床家に周知させ、症例を登録し、近い将来の治療のための基盤整備を進めることを目的とする。

### 【研究分担者】

相田典子・神奈川県立こども医療センター放射線科・部長

小坂仁・自治医科大学小児科・教授

後藤知英・神奈川県立こども医療センター神経内科・部長

新保裕子・神奈川県立こども医療センター臨床研究所・臨床研究員

### 【研究協力者】

加藤秀一・神奈川県立精神医療センター・医員

黒澤裕子・立命館大学・研究員

高野亨子・信州大学医学部・助教

露崎悠・神奈川県立こども医療センター神経内科・医長

(症例紹介)

秋山倫之・岡山大学病院小児神経科・講師

絹笠英世・筑波学園病院・科長

野崎章仁・滋賀県立小児保健医療センター・医員

(患者登録システム)

倉田真由美、樋野村亜希子、深川明子、平田誠、松山晃文・国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所

## A. 研究目的

知的障害(intellectual disability: ID)は人口の1-3%を占める頻度の高い病態であり、エビデンスに基づいた治療あるいは療育を行うためには、IDの病態解明は他の疾患と同様に必須である。[和田敬仁 神経研究の進歩、2006]

遺伝学的要因によるIDのなかで代謝異常症は治療可能なIDとして、早期診

断・治療の重要性が指摘されている。[van Karnebeek, 2012]本研究は、IDを主症状とする脳クレアチン代謝異常の臨床研究である。クレアチン/リン酸クレアチン系は、脳や筋における化学的エネルギーの細胞質貯蔵の緩衝系として働く。脳クレアチン欠乏症候群(cerebral creatine deficiency syndromes: CCDSs)は、クレアチン生成や輸送の障害により脳内クレアチン欠乏をきたし、知的障害・自閉症・てんかんを主症状とし、グアニジノ酢酸メチル基転移酵素(GAMT)欠損症、アルギニン・グリシンアミジノ基転移酵素(AGAT)欠損症、クレアチン輸送体(SLC6A8)欠損症の3疾患からなる。(図1、2)

CCDSsにおいて、臨床上重要な点は、(1)クレアチンの早期投与により症状の改善が期待される治療可能なIDである(2)特にSLC6A8欠損症は欧米においては、男性ID全体の0.3-3.5%、アメリカには42000人、世界では100万人以上と推定され頻度が高い、の2点である。

本年度の目標は、診断基準の作成と疾患の周知、および、基礎研究推進のためのリサーチリソースの基盤整備にあり、近い将来、アメリカを中心に準備が進められている臨床治験に遅滞なく参加するための体制を整備する。

## B. 研究方法および結果

(倫理面への配慮)

本研究は、本学における医の倫理委員会で承認を受け(G693)、「臨床研究に関する倫理指針」「医療における遺伝学的検査・

診断に関するガイドライン」などに則って行われる。

### 1. 脳クレアチン欠乏症の脳 MRI/MRS に関する研究(相田)

(方法)脳クレアチン欠乏症候群の臨床症状は非特異的であり、その診断には脳<sup>1</sup>H-MR spectroscopy(以下MRS)が重要であり、クレアチンピークの減少が特徴的所見である(図3)本研究においては、発達遅滞を示す児にMRSを施行し、クレアチン欠乏症の早期診断をはかるとともに、診断確定例の脳MRI所見を解析し、その特徴を明らかにすることを目的とした。

(結果)本年度は、患児44例(男児30例、女児14例、生後10ヶ月から11才)のうち1例の23ヶ月男児において、視覚的なクレアチンピークの減少を認め、定量解析にてその濃度は正常の2割以下と判断され、クレアチン欠乏症候群と診断した。特異的MRI異常は認めなかった。

### 2. 脳クレアチン欠乏症候群の病態解明に関する研究(小坂)

(方法)脳クレアチン欠乏症はGAMT欠損症、AGAT欠損症、SLC6A8欠損症の3疾患からなり、その鑑別は治療法の選択において重要である。本研究においては、3疾患を鑑別するためHPLC方法を用いた尿スクリーニング方法を開発し、その有効性を検討した。

(結果)本年度、知的障害を呈する30才代女性において、MRSにより脳クレアチ

ン欠乏症を疑い、HPLC法を用いた尿の分析により、尿グアニジノ酢酸の高値を認めため、GAMT欠損症を疑い、分子遺伝学的解析により確定した。本症例の診断は本邦初であり、クレアチンを用いた治療により症状が著しく改善した。

HPLC法を用いた尿の解析が、脳クレアチン欠乏症候群のスクリーニング方法として有効であることが示された。

### 3. 脳クレアチン欠乏症候群の診断基準作成および疫学調査に関する研究（後藤・和田）

（方法）脳クレアチン欠乏症候群は発達遅滞やてんかんといった非特異的な臨床像を呈する。よって、本症候群の診断には尿のグアニジノ化合物（クレアチン、クレアチニン、グアニジノ酢酸）の解析を積極的に行い、脳MRI検査機器による脳magnetic resonance spectroscopy(MRS)で異常所見を検出し確定診断することが重要である。我が国では、脳MRSの実施は限られており、未診断となっている脳クレアチン欠乏症候群症例が多数存在していると推定される。

本研究においては、患者を集積し診断基準を作成するとともに、本邦における有病率を推定することが目的である。

（結果）

神奈川県立こども医療センター神経内科における年間559件の新規紹介症例のうち、発達遅滞・自閉症・てんかんのいずれかを主訴に受診したものの352件(2013年度実績。2014年度については集計中であるが、例年同数程度の受診がある)の

ほぼ全例対して、脳MRSを含めた頭部MRI検査を実施し、1症例においてクレアチン輸送体欠損症が強く疑われる所見が得られた。

現在までに本邦においてGAMT欠損症1症例、SLC6A8欠損症5例が診断され臨床情報を集積中である。(図4、5)平成27年度は、当センターにおいて診断された症例を中心に、本邦症例の臨床情報を集積し、診断基準を作成する予定である。

### 4. 脳クレアチン欠乏症の分子遺伝学的診断に関する研究（新保）

（方法）脳クレアチン症候群はGAMT欠損症、AGAT欠損症、SLC6A8欠損症の3疾患からなるため、その鑑別診断は治療法の選択に重要である。また、尿を用いたグアニジノ化合物の解析による診断方法は、SLC6A8欠損症の女性患者においては有効ではないことが知られている。よって、尿の解析や脳MRSによる診断とともに、分子遺伝学的診断による確定診断が極めて重要である。本研究においては、尿中のクレアチン関連化合物をHPLC法で測定し、次いで血液からRNA、ゲノムDNAを抽出して遺伝子解析を行うことによる診断システムを開発し、その有効性を検証する。

（結果）本年度は脳クレアチン代謝異常症が疑われた3症例に対して尿中クレアチン化合物を測定し、1症例において異常を検出しされた。(現在、遺伝子解析を進めている)。

特にSLC6A8欠損症はX連鎖性の遺伝形式をとるが、男性のみならず、女性も発

症しうるため、男性患者が診断された場合、その母親の保因者診断は、遺伝カウンセリングの立場からも重要である。

現在までに、GAMT 欠損症 1 症例、SLC6A8 欠損症 5 例の遺伝学的診断を行った（図 6）。また、HPLC 法を用いた尿クレアチン/クレアチニン比の正常値を設定した。（図 7）

## 5. 患者さんの検体登録システムと将来の治験を目指した体制整備（和田）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬資源部 難病資源研究室のご協力により、患者さんの検体登録システムを確立し、研究参加支援サイト“CURE Path”(<http://raredis.nibio.go.jp/cure/index.html>)を開設した。（図 8）

また、将来の治験に備えて臨床研究と基礎研究を進めていくための整備を進めていく（図 9）。

## C. 考察

脳クレアチン欠乏症の患者は知的障害・自閉症・てんかんの非特異的症状を呈するため、患者に対しては、負担の少ない尿検査によるスクリーニングが必須で有り、そのためにはまず臨床現場における本疾患の周知が重要である。

現在までに本邦で診断が確定しているのは 6 家系であり、未診断例が多数存在することが推定される。

HPLC 法を用いた尿スクリーニング方法は確立しているが、女性に対しては診断を見逃す可能性もあるため、分子遺伝学的診断を平行に行うことが重要である。

また、MRS を用いた診断も必須であり、その診断基準作成を進めている。

## D. 結論

GAMT 欠損症、AGAT 欠損症は劣性遺伝性疾患、SLC6A8 欠損症は X 連鎖性疾患であり、早期治療の有効性も考慮すると、適切な遺伝カウンセリングは極めて重要であり、臨床的および分子遺伝学的確定診断および疾患の診断基準、自然歴の確立が求められる。

## E. 健康危険情報

特に報告すべき事項はない。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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. *Brain Dev* 36: 630-603, 2014.
2. Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H. A Japanese adult case of guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *JIMD Rep* 12: 665-69, 2014.

3. van de Kamp JM, Errami A, Howidi M, Anselm I, Winter S, Phalin-Roque J, Osaka H, van Dooren SJ, Mancini GM, Steinberg SJ, Salomons GS. Genotype-phenotype correlation of contiguous gene deletions of SLC6A8, BCAP31 and ABCD1. Clin Genet 87: 141-147, 2015.

4. 野崎 章仁、熊田知浩、柴田実、藤井達哉、和田敬仁、小坂仁 . 尿中クレアチン/クレアチニン比と家族歴より診断に至ったクレアチントランスポーター欠損症の1家系 本邦3家系目 .脳と発達 47; 49-52、2015.

発明の名称： 生体試料中のアミン測定方法およびその方法を用いる患者のスクリーニング方法

特許権者： 地方独立行政法人神奈川県立病院機構

発明者：： 和田敬仁、新保裕子、小坂仁

出願番号： 特願 2011-019561

出願日： 平成 23 年 2 月 1 日

登録日： 平成 26 年 12 月 12 日

## 2 . 学会発表

1 . 和田敬仁 脳クレアチン欠乏症への取り組み . 第 35 回グアニジノ化合物研究会、2014 年 10 月 11 日、筑波 .

2 . 太田悠介、立川正憲、落合祐介、和田敬仁、大槻純男、寺崎哲也：ヒトクレアチントランスポーター変異症例におけるクレアチン輸送機能の解明 .日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、神戸

3 . 上村立記、伊藤慎悟、太田悠介、立川正憲、平山未央、和田 敬仁、寺崎哲也、大槻純男：脳クレアチン欠乏症候群に関連する新規変異クレアチントランスポーターの発現・局在と輸送機能特性の解析 . 日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、神戸 .

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

特許第 5662182 号

図1

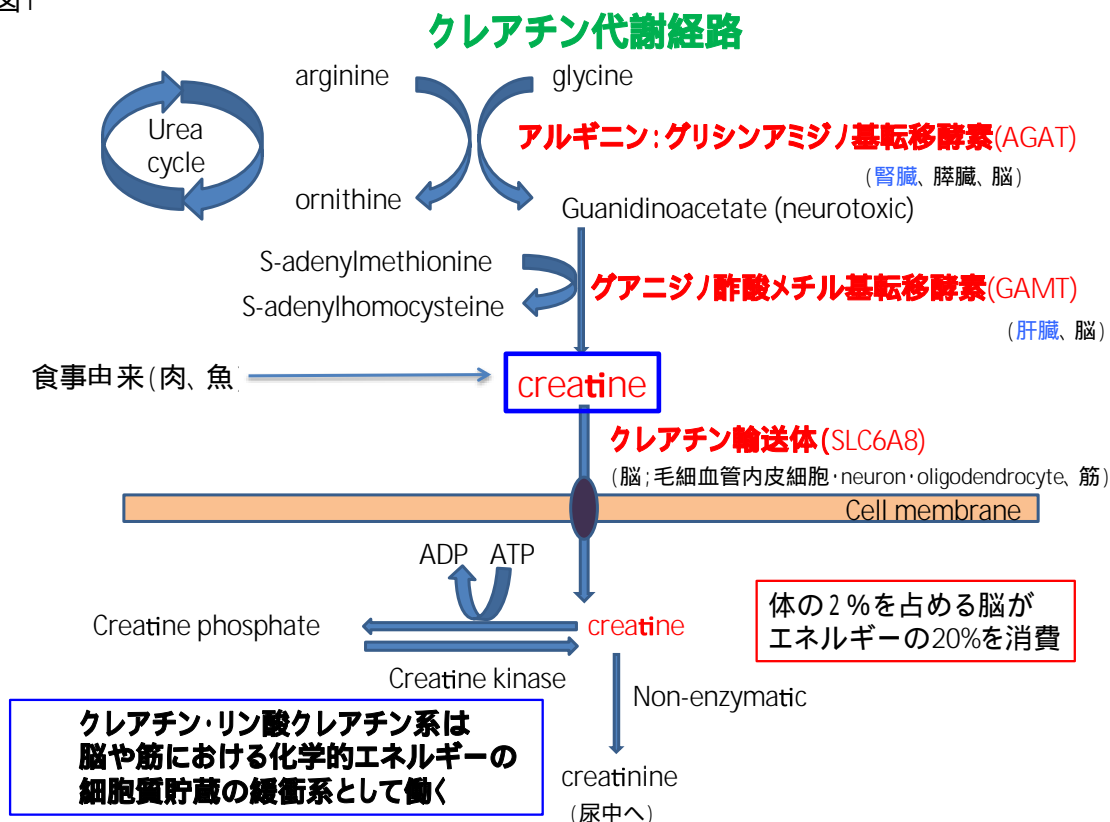


図2

脳クレアチン欠乏症候群

cerebral creatine deficiency syndromes (CCDSs)

- 常染色体劣性
  - アルギニン:グリシンアミノ基転移酵素(AGAT)欠損症
    - AGAT遺伝子 (15q15.3)
    - 治療:クレアチン400mg/kg/day
  - グアニジノ酢酸メチル基転移酵素(GAMT)欠損症
    - GAMT遺伝子 (19p13.3)
    - 治療:クレアチン400mg/kg/day, オルニチン、安息香酸Na摂取、アルギニン摂取制限
- X連鎖
  - クレアチン輸送体 (SLC6A8)欠損症
    - SLC6A8遺伝子 (Xq28); 中枢神経(neuron, oligodendrocyte, microcapillary endothelial cells)、心筋、骨格筋で発現
    - 治療:なし
    - 頻度が高い
      - X連鎖精神遅滞の2%
      - 精神遅滞の男性の0.3-3.5%
    - 女性保因者
      - 程度は様々;無症状~学習障害や行動異常

治療法がある  
精神遅滞

[Stockler, 2007]



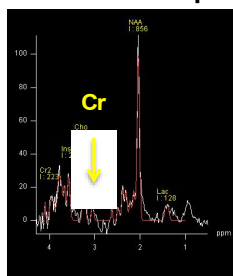
図3

## 脳クレアチン欠乏症の診断

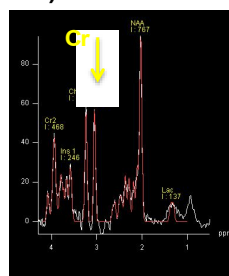
1. deficiency		urine		serum			Cerebrospinal fluid		
		GAA/CN	CR/CN	GAA	CR	CN	GAA	CR	CN
AGAT					no data		no data		
GAMT						~			
SLC6A8	male				?		no data		
	female		~					?	

(GAA: guanidinoacetic acid, CR: creatine, CN: creatinine)

### 2. <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy (<sup>1</sup>H-MRS)



Patient with CTD



control

decreased peak of creatine at basal ganglia

図4

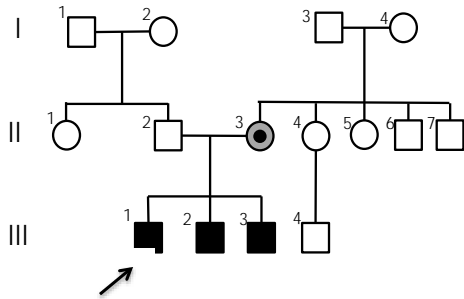
## SLC6A8欠損症 臨床情報(抜粋)

	Family A				Family B				Family C			Family D		Family E
	III-1	III-2	III-3	II-3	III-3	III-6	III-7	II-3	II-1	II-2	I-2	II-1	I-2	II-1
年齢	6 Yr	4 Yr	2 Yr	29 Yr	17 Yr	19 Yr	9 Yr		10 Yr	5 Yr		1 Yr 8 Mo		6 Yr
性	M	M	M	F	M	M	M	F	M	M	F	M	F	M
身長(S.D.)	-0.7	-1.7	-3.4	-2.2		-0.4	-2.1		-0.1	-2.2		-3.2		-4.4
独歩	24 m	22 m	24 m	18 m		NA	4.7Y		24 m	30 m		25 m		No Head control
有意語	24 m	20 m	21 m	16 m		-	-		24 m	36 m		-		-
けいれん F: 熱性、Ep: てんかん	F	F	Ep	Ep	Ep	F(+), Ep	F/A		F	No		F		Ep
Intellectual Disability	moderate ID	severe ID	severe ID	mild ID	severe ID	Severe autism	Severe ID	mild ID	moderate ID	moderate ID	healthy	Moderate ID	healthy	Severe ID
SLC6A8 変異	c.1681 G > C, p.Gly561Arg in exon 12				c.1661C>T, p.Pro554Leu in exon 12				c.321_323del CTT, p.Phe107del in exon 2			c.514 T>C, p.Cys172Arg in exon 3		19-kb 欠失 <i>de novo</i>

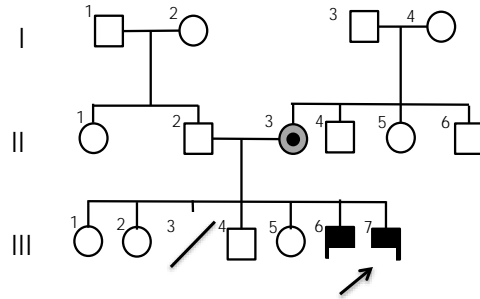
図5

### SLC6A8欠損症 日本症例5家系の家系図

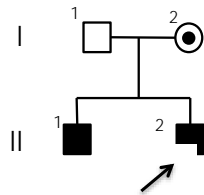
Family A



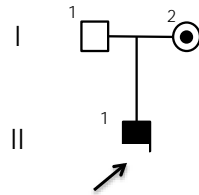
Family B



Family C



Family D



Family E

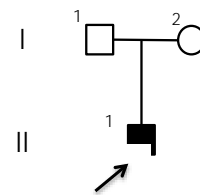
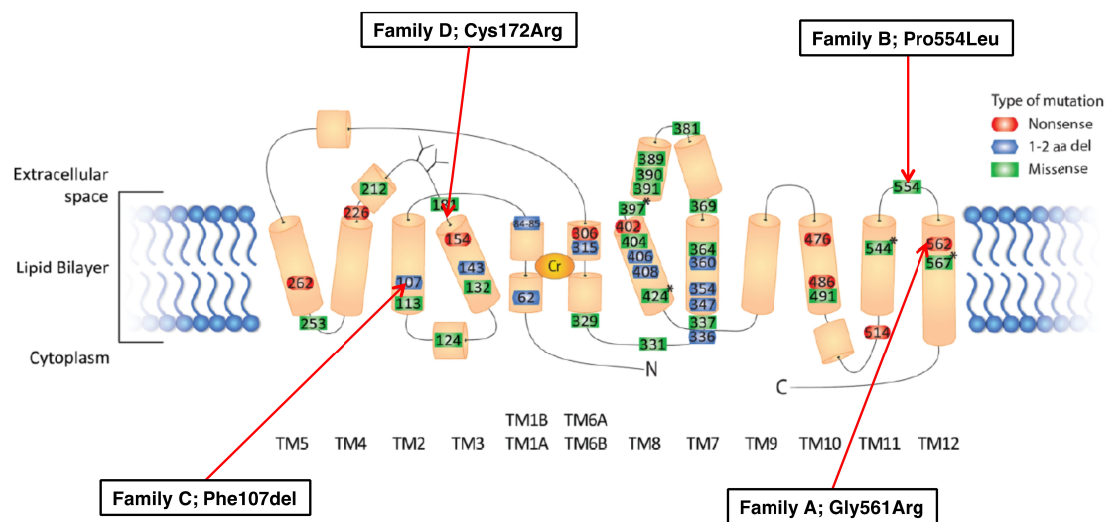


図6

### 患者で検出された変異の位置



The large deletion of Family E was excluded.

[From Van de Kamp, et al. J Med Genet, 2013]

図7

## 尿中クレアチン/クレアチニン比106名のコントロール およびSLC6A8遺伝子変異を持つ男性患者および女性保因者

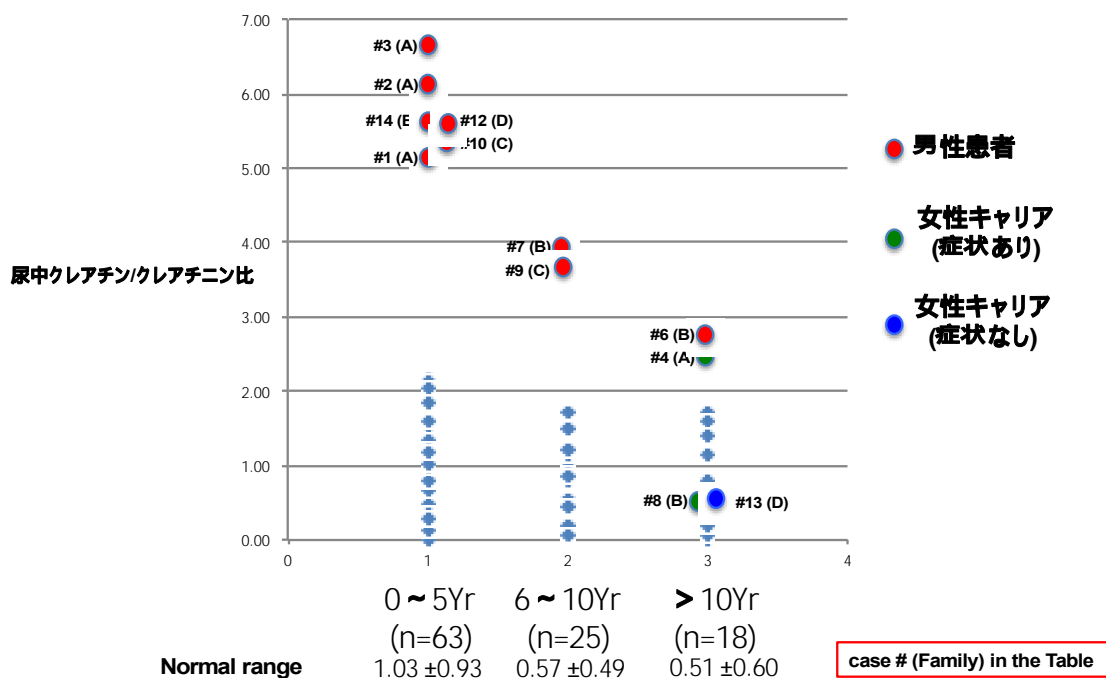


図8

Research Rare Disease R<sup>2</sup> Square    **CURE Path**    Creatine deficiency Urine test Rare disease Encounter care    このウェブサイトは患者さまのサイトです。医療従事者の方はこちら医療従事者のみさまへ

トップページ    疾患情報    研究者情報    ご協力のお願い    お知らせ

精神遅滞や言語発達遅滞を引き起こす  
**脳クレアチン欠乏症候群**  
をご存じですか？

本プロジェクトへ  
参加していただける方を  
只今募集しています。

■脳クレアチン欠乏症候群とは  
脳クレアチン欠乏症候群(cerebral creatine deficiency syndromes: CCDSs)には、いくつかの種類があり、そのうち一番多くの人がかかっているといわれている「クレアチン輸送体欠損症」は、いまだ研究の途上であり、治療法が確立されていません。ぜひ研究にご協力ください。→ くわしくは [こちら](#)へ

■新着情報  
2015.04.28 : CURE Path 登録受付開始  
2015.03.16 : CURE Path 公開

■ご意見をお寄せください。  
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬資源部 難病資源研究室  
住所 : 〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8  
TEL/FAX : 072-641-9016 (受付時間: 9:00~16:00【土・日・祝日除く】)  
E-mail : [raredis-r2@nibiohn.go.jp](mailto:raredis-r2@nibiohn.go.jp)

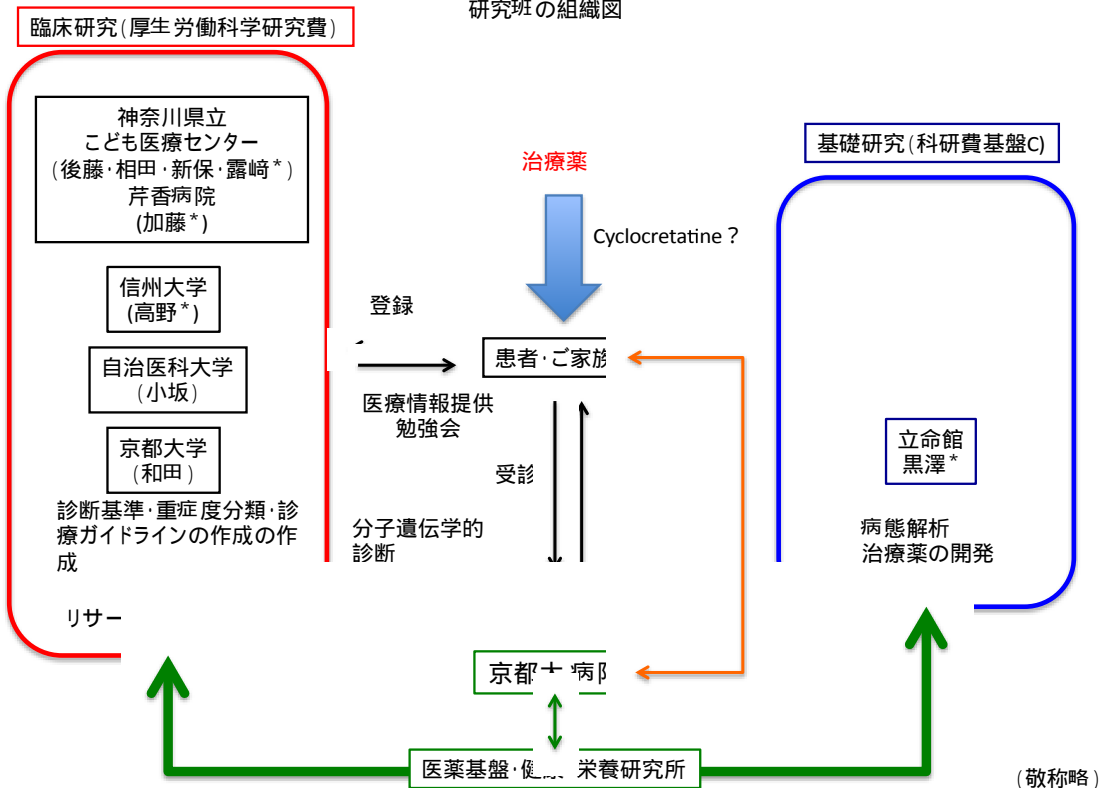
制作・運用 : 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬資源部 難病資源研究室  
監修 : 和田敏仁先生 (京都大学医学部医学生理学/遺伝医学講座/厚生労働省科学研究費助成事業「脳クレアチン欠乏症候群の臨床研究 (H26-難治等(難)一般-006)」代表者)    プライバシーポリシー

All copyrights Reserved 2015 National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

<http://raredis.nibio.go.jp/cure/index.html>

図9

研究班の組織図



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

脳クレアチン欠乏症候群の脳 MRI/MRS に関する研究

研究分担者 相田 典子

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 放射線科部長

研究要旨

発達遅滞や自閉症を主訴に脳を初回検査した患児 44 例（男児 30 例、女児 14 例、生後 10 ヶ月から 11 才）のうち 1 例の 23 ヶ月男児において、視覚的なクレアチンピークの減少を認め、定量解析にて濃度は正常の 2 割以下と判断され、クレアチン欠乏症候群と診断した。特異的 MRI 異常は認めなかった。

共同研究者

富安 もよこ

放射線医学総合研究所重粒子医科学センター

ペクトルは視覚的診断とともに、共同研究者である MRS の専門家により LC Model を用いた定量解析が行われる。

(倫理面への配慮)

何らかの神経症状があるか神経疾患が疑われる患児の脳 MRI 検査の際には、神奈川県立こども医療センターでは通常検査の中に MRS が組み込まれている。本研究での対象者も同様に通常検査の一環として MRS が取得された。また、臨床上施行された画像診断を後方視的に検討することに関しては、包括同意が院内および HP 上で掲示されており、当センターの規定で倫理委の個別承認は必要とされていない。

A. 研究目的

脳クレアチン欠乏症候群の臨床症状は非特異的であり、中枢 MRI 所見の報告も少ない。一方脳 <sup>1</sup>H-MR spectroscopy (以下 MRS) では、クレアチンピークの減少が明らかになることが知られている。発達遅滞を示す児に MRS を施行し、クレアチン欠乏症の早期診断をはかるとともに、診断確定例の脳 MRI 所見を解析し、その特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

当センターの神経疾患疑い例でのルーチン脳 MRI 検査には、2-3 カ所（基底核、半卵円中心と小脳）の MRS が組み込まれている。主に 3 T 装置を用い、通常の T2 強調像、T1 強調像、拡散強調像などを撮像した後に MRS データを取得する。具体的撮像方法は、single voxel、PRESS 法を用い、TR5000、TE30、加算回数は 4-32 で、取得時間はシミング（磁場を均一にする前処置）時間を入れて約 5 分弱である。得られたス

C. 研究結果

平成 27 年度、発達遅滞や自閉症を主訴に脳を初回検査した患児は 44 例（男児 30 例、女児 14 例、生後 10 ヶ月から 11 才）でいずれにも MRS が取得された。このうち 1 例の 23 ヶ月男児において、視覚的なクレアチンピークの減少を認め（図）、定量解析にて脳内クレアチン濃度は正常の 2 割以下と判断された。クレアチン代謝の 1 つ上流のグアニジノアセテート（GAA）は定量解析ソフト上で正常群との差は明らかで

なかった（微量であるため微妙な差の判断は難しい）。したがって、ここの変換酵素（グアニジノアセテートメチルトランスフェラーゼ、GAMT）の低下は考えにくい結果であった。

脳 MRI には大きな異常所見は認められなかった(図)。

### 図 Creatine deficiency

23 months boy with mental retardation

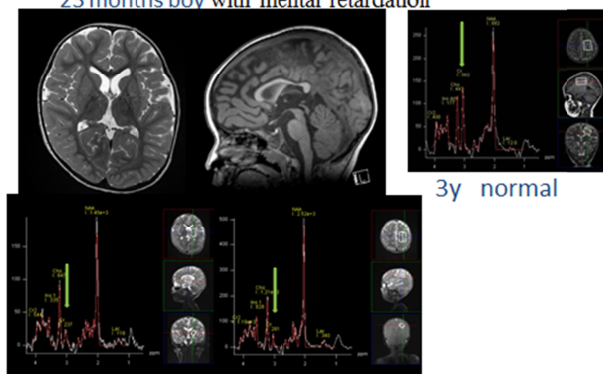


図 クレアチン欠乏症候群の MRI/MRS

23 ヶ月男児

基底核、半卵円中心の双方で得られた MRS でクレアチンピークの明らかな低下が見られる(↓)。右は正常児での波型。

本例は現在、病型の確定診断にむけて精査中である。

### D. 考察

諸外国の文献によると、クレアチン欠乏症候群による発達遅滞はある頻度で存在しているが、我が国での診断確定例はまだ非常に少ない。当センターの過去 3 例の経験でも、画像的にも特異所見に乏しく、MRS の追加がなければ容易に診断にたどり着けなかった。今年度の症例は酵素欠損を特定する病型診断あるいは遺伝子診断は検索中であるが、クレアチン欠乏症候群であることは間違いなく、本例も MRS が診断のきっかけとなった。

来年度以降は、当センターの 4 例と他院での確定例の画像所見、MRS 所見、病型との対比を

行い、早期診断に寄与できる方法と検討し、診断体制の構築を目指したい。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Nakashima M, Takano K, Osaka H, Aida N, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Causative novel PNKP mutations and concomitant PCDH15 mutations in a patient with microcephaly with early-onset seizures and developmental delay syndrome and hearing loss. J Hum Genet. 2014 Aug;59(8):471-4. doi:10.1038/jhg.2014.51. Epub 2014 Jun 26. PubMed PMID: 24965255. 査読あり
- 2) Takano K, Tsuyusaki Y, Sato M, Takagi M, Anzai R, Okuda M, Iai M, Yamashita S, Okabe T, Aida N, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Osaka H. A Japanese girl with an early-infantile onset vanishing white matter disease resembling Cree leukoencephalopathy. Brain Dev. 2014 Oct 27. pii: S0387-7604(14)00250-2. doi:10.1016/j.braindev.2014.10.002. 査読あり
- 3) Matsui K, Kataoka A, Yamamoto A, Tanoue K, Kurosawa K, Shibasaki J, Ohyama M, Aida N. Clinical characteristics and outcomes of Möbius syndrome in a children's hospital. Pediatr Neurol. 2014 Dec;51(6):781-9. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2014.08.011. Epub 2014 Aug 27. PubMed PMID: 25306435. 査読あり
- 4) Niwa T, Aida N, Osaka H, Wada T, Saitsu H, Imai Y. Intracranial Hemorrhage and

Tortuosity of Veins Detected on Susceptibility-weighted Imaging of a Child with a Type IV Collagen 1 Mutation and Schizencephaly. Magn Reson Med Sci. 2014 Dec 15.[Epub ahead of print] PubMed PMID: 25500781.査読あり

## 2 . 学会発表

- 1) Noriko Aida, Moyoko Tomiyasu, Kumiko Nozawa, Yuta Fujii, Mikako Enokizono, Takayuki Obata, Sumimasa Yamashita : Utility of <sup>1</sup>H-MRS in the diagnosis and disease monitoring for pediatric CNS disorders.  
XXth Symposium Neuroradiologicum  
Istanbul, September 9, 2014

- 2) 相田典子、富安もよこ、小畠隆行：先天性小児神経代謝疾患の診断・経過における<sup>1</sup>H-MRSの有用性．第42回日本磁気共鳴医学会（京都 2014年9月19日）

## G. 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

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

脳クレアチニン欠乏症候群の病態解明に対する研究

分担研究者 小坂仁 自治医科大学 小児科 教授

研究要旨：

脳クレアチニン欠乏症候群には L-arginine: glycine amidinotransferase 欠損症, guanidinoacetate methyltransferase 欠損症, creatine transporter 欠損症がある。昨年度までに我々は、本邦における creatine transporter 欠損症を見出してきた。本年度我々は、guanidinoacetate methyltransferase 欠損症の本邦初症例を見出し、治療により著しい改善を認めた。脳クレアチニン欠乏症候群では治療可能な、guanidinoacetate methyltransferase 欠損症, creatine transporter 欠損症のスクリーニング体制および最も多い creatine transporter 欠損症の新たな治療法開発という、2つのアプローチが必要である。

研究協力者 秋山倫之 岡山大学病院 小児  
神経科・講師

A．研究目的

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

B．症例

30歳台女性。周生期異常なし。定額獲得するもたが、以降の運動発達は遅れた。有意語は未獲得で言語理解も乏しく、30歳頃より長距離が歩けなくなった。1歳半ばよりてんかん発作が出現し、Lennox-Gastaut 症候群を呈した。兄が難治性てんかんで死亡している。

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

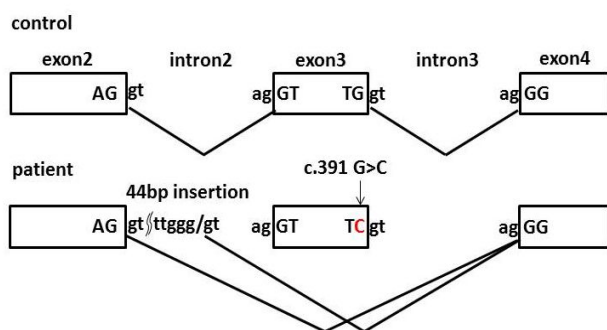
C．研究結果

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

(p.Val110Glyfs\*30 and .Ile111Profs\*73) c.578 A>G p.Gln193Arg in exon6 の複合ヘテロ変異 (2つとも新規変異) を確認した



**図1** .c.391G>C による2つのスプライシング産物



RT-PCR を行ったところ c.391G>C では、スプライシングの異常を来しエクソン3がスプライスアウトされた2つの異常スプライシング産物ができていることが判明した。クレアチン・オルニチン補充療法を開始し、てんかん発作は完全抑制され歩行機能の改善もみられた。

#### D . 考察

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

(Akiyama T, JIMD rep., 2014)

#### E . 結論

脳クレアチニン欠乏症候群の中には、治療可能な疾患群 ; AGAT) 欠損症, GAMT 欠損症が含まれる。この2疾患の早期発見システムの構築も重要な課題であると考えられた。

#### G . 研究発表

##### 1 . 論文発表

1. Imagawa E, Osaka H, Yamashita A, Shiina M, Takahashi E, Sugie H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Ogata K, Matsumoto N, Miyake N. A hemizygous GYG2 mutation and Leigh syndrome: a possible link? Hum Genet 2014 ; 133 : 225-34
2. Okabe T, Aida N, Niwa T, Nozawa K, Shibasaki J, Osaka H. Early magnetic resonance detection of cortical necrosis

and acute network injury associated with neonatal and infantile cerebral infarction. *Pediatr Radiol*. 2014; 53; 448-58

3. Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H. A Japanese Adult Case of Guanidinoacetate Methyltransferase Deficiency. *JIMD Rep*. 2014 ; 12 : 65-9
4. Wada T, Haddad MR, Yi L, Murakami T, Sasaki A, Shimbo H, Kodama H, Osaka H, Kaler SG. A Novel Two-Nucleotide Deletion in the ATP7A Gene Associated With Delayed Infantile Onset of Menkes Disease. *Pediatr Neurol*. 2014; 50: 417-20
5. Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. *Mol Genet Metab Report*, 2014; 1:133-138.
6. Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H. A Three-Year-Old Boy With Glucose Transporter Type 1 Deficiency Syndrome Presenting With Episodic Ataxia. *Pediatr Neurol*. 2014 Jan;50(1):99-100.
7. Nakashima M, Takano K, Osaka H, Aida N, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. Causative novel PNKP mutations and concomitant PCDH15 mutations in a patient with microcephaly with early-onset seizures and developmental delay syndrome and hearing loss. *J Hum Genet*. 2014 Aug;59(8):471-4.
8. Miyatake S, Osaka H, Shiina M, Sasaki M, Takanashi J, Haginoya K, Wada T, Morimoto M, Ando N, Ikuta Y, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Ogata K, Matsumoto N, Saitsu H. Expanding the phenotypic spectrum of TUBB4A-associated hypomyelinating leukoencephalopathies. *Neurology*. 2014 Jun 17;82(24):2230-7.
9. Kouga T, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Yamakawa K, Osaka H. Effect of CYP2C19

- polymorphisms on stiripentol administration in Japanese cases of Dravet syndrome. *Brain Dev.* 2014 May 9.
10. Kato M, Saito H, Murakami Y, Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Miya K, Matsuura R, Takayama R, Ohba C, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Kinoshita T, Matsumoto N. PIGA mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology.* 2014 May 6;82(18):1587-96.
  11. van de Kamp J, Errami A, Howidi M, Anselm I, Winter S, Phalin-Roque J, Osaka H, van Dooren S, Mancini G, Steinberg S, Salomons G. Genotype-phenotype correlation of contiguous gene deletions of SLC6A8, BCAP31 and ABCD1. *Clin Genet* 2014 Mar 5. doi: 10.1111/cge.12355. [Epub ahead of print]
  12. 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. *J Neurol.* 2014 Apr;261(4):752-8.
  13. Nakamura K, Osaka H, Murakami Y, Anzai R, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kinoshita T, Matsumoto N, Saito H. PIGO mutations in intractable epilepsy and severe developmental delay with mild elevation of alkaline phosphatase levels. *Epilepsia.* 2014 Feb;55(2):e13-7.
  14. Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of ER Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes. *Stem Cell Reports.* 2014 Apr 24;2(5):648-61.
  15. Tamaura M, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Osaka H. Seizure recurrence following pyridoxine withdrawal in a patient with pyridoxine-dependent epilepsy. *Brain Dev.* 2014 Aug 7. pii: S0387-7604(14)00185-5. doi: 10.1016/j.braindev.2014.07.008. [Epub ahead of print]
  16. Kodera H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saito H, Matsumoto N. Mutations in the glutamyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy. *J Hum Genet.* 2014 Dec 4. doi:10.1038/jhg.2014.103. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25471517.
  17. Takano K, Tsuyusaki Y, Sato M, Takagi M, Anzai R, Okuda M, Iai M, Yamashita S, Okabe T, Aida N, Tsurusaki Y, Saito H, Matsumoto N, Osaka H. A Japanese girl with an early-infantile onset vanishing white matter disease resembling Cree leukoencephalopathy. *Brain Dev.* 2014 Oct 27. pii: S0387-7604(14)00250-2. doi:10.1016/j.braindev.2014.10.002. [Epub ahead of print]
  18. Niwa T, Aida N, Osaka H, Wada T, Saito H, Imai Y. Intracranial Hemorrhage and Tortuosity of Veins Detected on Susceptibility-weighted Imaging of a Child with a Type IV Collagen 1 Mutation and Schizencephaly. *Magn Reson Med Sci.* 2014 Dec 15. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25500781.
- 雑誌
- 1) 小坂 仁 大脳萎縮症 編集 水澤秀洋、新領域別症候群シリーズ No.29 「神経症候群(第2版)IV、日本臨牀社 p.319-324. 2014
  - 2) 小坂 仁 小脳萎縮症 編集 水澤秀洋、新領域別症候群シリーズ No.29 「神経症候群(第2版)IV、日本臨牀社 p.325-328. 2014 (査読無)
2. 学会発表
- Hitoshi Osaka, Hiroko Shimbo, Kei Murayama, Akira Ohtake, Noriko Aida
- A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome.

Mitochondrial Medicine 2014: Pittsburgh, PA  
June 4-7, 2014.

ガバペンチンが有効であった GNA01 変異をもつヒョレアアテトーシスの一例

高木真理子<sup>1</sup>, 佐藤睦美<sup>1</sup>, 安西里恵<sup>1</sup>, 奥田美津子<sup>1</sup>, 露崎悠<sup>1</sup>, 高野亨子<sup>1,2</sup>, 井合瑞江<sup>1</sup>, 中村和幸<sup>3,4</sup>, 才津浩智<sup>3</sup>, 小坂仁<sup>1,5</sup>, 山下純正<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 神奈川県立こども医療センター神経内科, <sup>2</sup> 信州大学医学部遺伝医学予防医学講座, <sup>3</sup> 横浜市立大学医学部遺伝学講座, <sup>4</sup> 山形大学小児科, <sup>5</sup> 自治医科大学小児科学講座  
56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30.  
浜松

重度精神遅滞, 難治性てんかんの臨床像を示し, PIG0 遺伝子変異が同定された 1 例

安西里恵<sup>1</sup>, 佐藤睦美<sup>1</sup>, 高木真理子<sup>1</sup>, 奥田美津子<sup>1</sup>, 露崎悠<sup>1</sup>, 高野亨子<sup>1,4</sup>, 井合瑞江<sup>1</sup>, 中村和幸<sup>2,3</sup>, 才津浩智<sup>2</sup>, 小坂仁<sup>1,5</sup>, 山下純正<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 神奈川県立こども医療センター神経内科, <sup>2</sup> 横浜市立大学医学部遺伝学, <sup>3</sup> 山形大学医学部小児科, <sup>4</sup> 信州大学医学部遺伝医学, <sup>5</sup> 自治医科大学医学部小児科  
56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30.  
浜松

Whole exome sequencing reveals molecular basis of childhood cerebellar atrophy

Hitoshi Osaka<sup>1,2</sup>, Yu Tsuyusaka<sup>1</sup>, Mizue Iai<sup>2</sup>, Sumimasa Yamashita<sup>2</sup>, Nobuyuki Shimosawa<sup>3</sup>, Yoshikatsu Eto<sup>4</sup>, Hiroto Saito<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Jichi Medical School, <sup>2</sup>Division of Neurology, Kanagawa Childrens Medical Center, <sup>3</sup>Division of Genomics Research, Life Science Research Center, Gifu University, <sup>4</sup>Advanced Clinical

Research Center & Asian LSD Center, Institute of Neurological disorders, <sup>5</sup>Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, Yokohama City University  
56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30.  
浜松

Effect of CYP2C19 polymorphisms on stiripentol administration in cases of Dravet syndrome

Takeshi Kouga<sup>1,2</sup>, Mariko Takagi<sup>3</sup>, Rie Anzai<sup>3</sup>, Mutsumi Sato<sup>3</sup>, Mitsuko Okuda<sup>3</sup>, Kyoko Takano<sup>3</sup>, Mizue Iai<sup>3</sup>, Sumimasa Yamashita<sup>3</sup>, Hitoshi Osaka<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Jichi Medical University, <sup>3</sup>Division of Neurology, Kanagawa Children's Medical Center  
56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30.  
浜松

Mutational and functional analysis of Glucose transporter 1 deficiency syndrome.

*Sachie Nakamura<sup>1)</sup>, Hitoshi Osaka<sup>1)</sup>, Shinichi Muramatsu<sup>2)</sup>, Shiho Aoki<sup>1)</sup>, Eriko F. Jimbo<sup>1)</sup>, Takanori Yamagata<sup>1)</sup>*

Department of Pediatrics<sup>1)</sup>, Department of Neurology<sup>2)</sup>, Jichi Medical University  
2014.10.18-22 第 64 回アメリカ人類遺伝学会 (サンディエゴ)

ミトコンドリア DNA m.3243A>T 変異を認めた mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes の 1 例

池田尚広<sup>1)</sup>, 山崎雅世<sup>1)</sup>, 鈴木峻<sup>1)</sup>, 門田行史<sup>1)</sup>, 小坂仁<sup>1)</sup>, 杉江秀夫<sup>1)</sup>, 新保裕子<sup>2)</sup>, 山形崇倫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>自治医科大学小児科, <sup>2)</sup>神奈川県立こども医療センター臨床研究所  
56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30.

浜松

Infantile Neuroaxonal Dystrophy 様の脳 MRI 所見を示した SLC9A6 変異を有する一例

山本亜矢子 1,2, 和田敬仁 2,3, 新保裕子 2, 松本直通 4, 小坂仁 2,5

1 大和市立病院小児科, 2 神奈川県立こども医療センター神経内科, 3 京都大学大学院医学研究科医療倫理学/遺伝医療学, 4 横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学, 5 自治医科大学小児科学講座 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

治療可能な小脳失調: Cerebral Folate Transport Deficiency の同胞例

露崎悠 1, 井合瑞江 1, 安西里恵 1, 佐藤睦美 1, 高木真理子 1, 奥田美津子 1, 高野亨子 1,3, 小坂仁 1,2, 山下純正 1, 才津浩智 4

1 神奈川県立こども医療センター神経内科, 2 自治医科大学小児科学講座, 3 信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座, 4 横浜市立大学医学部遺伝学  
56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

当院における副腎白質ジストロフィー6 例の臨床的検討

宮内彰彦 1, 門田行史 1, 池田尚広 1, 川原勇太 1, 長嶋雅子 1, 小坂仁 1, 杉江秀夫 1, 森本哲 1, 渡辺浩史 3, 下泉秀夫 3, 下澤伸行 2, 山形崇倫 1

1 自治医科大学小児科, 2 岐阜大学生命科学総合研究支援センターゲノム研究分野, 3 国際医療福祉リハビリテーションセンターなす療育園 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

非造影灌流画像, ASL で最も鋭敏にとらえた MELAS の脳卒中様発作の一例

奥田美津子 1, 佐藤睦美 1, 安西里恵 1, 高木真

理子 1, 露崎悠 1, 高野亨子 1,2, 井合瑞江 1, 小坂仁 1,3, 山下純正 1

1 神奈川県立こども医療センター神経内科, 2 信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座, 3 自治医科大学小児科学講座 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

頸部動脈解離による脳梗塞

佐藤睦美 1, 高木真理子 1, 安西里恵 1, 奥田美津子 1, 露崎悠 1, 高野亨子 1,2, 小坂仁 1,3, 井合瑞江 1, 山下純正 1

1 神奈川県立こども医療センター神経内科, 2 信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座, 3 自治医科大学小児科学講座  
56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

くも膜下出血を合併した Reversible cerebral vasoconstriction syndrome の女兒例

吉原尚子 1,2, 和田敬仁 1,3, 高木真理子 1, 佐藤睦美 1, 安西里恵 1, 奥田美津子 1, 露崎悠 1, 小坂仁 1,4, 高野亨子 1,5, 井合瑞江 1, 山下純正 1

1 神奈川県立こども医療センター神経内科, 2 日本赤十字社医療センター小児科, 3 京都大学医学部医療倫理学遺伝医療学講座, 4 自治医科大学小児科学講座, 5 信州大学医学部付属病院遺伝医学講座  
56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

早期ステロイドパルス療法によるけいれん重積型急性脳症発症予防効果の検討

池田尚広, 山形崇倫, 谷口祐子, 宮内彰彦, 石井朋之, 長嶋雅子, 門田行史, 小坂仁, 杉江秀夫自治医科大学小児科 56 回日本小児神経学会 2014.5.28-2014.5.30. 浜松

日内変動を伴うジストニアを認める自閉症スペクトラム障害の男児例

宮内彰彦<sup>1)</sup>、門田行史<sup>1)</sup>、長嶋雅子<sup>1)</sup>、杉江秀夫<sup>1)</sup>、小黒範子<sup>2)</sup>、小坂仁<sup>1)</sup>、山形崇倫<sup>1)</sup>

1) 自治医科大学小児科学

2) とちぎリハビリテーションセンター小児科

2014.9.20 第61回日本小児神経学会関東地方会（筑波）

#### H. 知的所有権の取得状況

1. エリスロポエチン発現増強剤。国際出願 国際公開番号：W02014/080640A1

2. 生体試料中のアミンの測定方法およびその方法を用いる患者のスクリーニング方法

特願 2011-019561 特許第 5662182 号

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

脳クレアチン欠乏症候群の診断基準作成および疫学調査に対する研究

分担研究者 後藤知英

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 神経内科 部長

研究要旨：脳クレアチン欠乏症候群の診断には脳 MRI 検査機器による脳 magnetic resonance spectroscopy (MRS) で異常所見（クレアチンピークの減衰）を検出することが重要である。神奈川県立こども医療センターでは年間 559 件の新規紹介があり、このうち発達遅滞・自閉症・てんかんのいずれかを主訴に受診したものは 352 件であった（2013 年度実績。2014 年度については集計中）。これらの症例に対して、ほぼ全例で脳 MRS を含めた頭部 MRI 検査を実施した。その結果、2014 年度は 1 症例においてクレアチン輸送体欠損症が強く疑われる所見が得られ、生化学的・遺伝学的検査を実施して診断の確定を進めている。352 件のうち約半数が男児であるとした場合、前述の有病率から当院で遭遇すると期待されるクレアチン輸送体欠損症の症例数は 0.5～6.2 人となる。したがって、2014 年度の 1 年間に 1 症例が検出されたことは予測値の範囲内にあったことになる。来年度も引き続き MRS 検査による患者スクリーニングを進めていく予定である。

A. 研究目的

脳クレアチン欠乏症候群はクレアチン産生にかかわる酵素（グアニジノ酢酸メチル基転移酵素、アルギニン・グリシンアミジノ基転移酵素）あるいは細胞内への輸送体（クレアチン輸送体）の機能異常によって、脳内のクレアチンの欠乏を生じる先天性代謝疾患である。臨床的には精神遅滞、言語発達遅滞、てんかんなどを引き起こすことが知られている。特にクレアチン輸送体の異常によるもの（SLC6A8 遺伝子欠損症）は遺伝性精神遅滞のうち脆弱 X 症候群に次ぎ頻度が高い疾患とされ、精神遅滞を有する男性の 0.3～3.5%、アメリカでは 42,000 人、世界では 100 万人と推定されている。

脳クレアチン欠乏症候群は発達遅滞やてんかんといった非特異的な臨床像を呈するため、診断には脳 MRI 検査機器による脳 magnetic resonance spectroscopy (MRS) で異常所見を検出することが重要である（クレアチンピークの減衰）。我が国では MRI 検査機器は広く普及

しており発達遅延やてんかんの診断の上でルーチンの検査となっている。しかし、脳 MRS は検査手技あるいは検査時間の制約のため実施される症例は限られている。このことから、未診断となっている脳クレアチン欠乏症候群症例が、我が国にも多数存在する可能性がある。

本研究においては、患者を集積し診断基準を作成するとともに、本邦における有病率を推定することが目的である。

B. 研究方法

神奈川県立こども医療センターにおける年間 559 件の新規紹介症例のうち、発達遅滞・自閉症・てんかんのいずれかを主訴に受診したものの 352 件（2013 年度実績。2014 年度については集計中であるが、例年同数程度の受診がある）のほぼ全例に対して、脳 MRS を含めた頭部 MRI 検査を実施した。

（本研究は、当センターの倫理委員会で承認されている。）

## C. 研究結果

2014年度は352症例のうち、1症例においてクレアチン輸送体欠損症が強く疑われる所見が得られ、生化学的・遺伝学的検査を実施して診断の確定を進めている。

## D. 考察

脳クレアチン欠乏症候群は発達遅延の原因として潜在的に多い疾患と推測されている。352件のうち約半数が男児であるとした場合、前述の有病率から当院で遭遇すると期待されるクレアチン輸送体欠損症の症例数は0.5～6.2人となる。したがって、2014年度の1年間に1症例が検出されたことは予測値の範囲内であったことになる。来年度も引き続きMRS検査による患者スクリーニングを進めていく予定である。

## E. 結論

脳クレアチン欠乏症候群は、発達遅滞、自閉症、てんかんの鑑別診断として重要であるが、まだ臨床現場での認知度が低いことが予想される。欧米での有病率を考慮すると、日本国内の大多数の症例は診断されていないと考えられる。

来年度は診断基準作成にむけて、既に診断されている症例の臨床情報を集積するとともに、臨床現場への周知を進めていく予定である。

## G. 研究発表（本研究に関連するものに限る）

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

## H. 知的所有権の取得状況

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

脳クレアチン欠乏症候群の分子遺伝学的診断に関する研究

分担研究者 新保裕子 神奈川県立こども医療センター 臨床研究所

## 研究要旨

治療可能な代謝疾患のひとつに脳内クレアチンが欠乏するクレアチン代謝異常症があげられる。クレアチン代謝異常症は、重度の精神遅滞を主要症状とし、てんかん、自閉症、重度の言語障害などの様々な臨床症状を有する。その先天的な原因として、クレアチン生合成に関わるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ(GAMT)、アルギニン・グリシンアミジノトランスフェラーゼ(AGAT)、およびクレアチントランスポーター(SLC6A8)の遺伝子の欠損が知られている。臨床症状を有する患者の脳を磁気共鳴スペクトル装置(MRS)で調べて脳内クレアチン値の低下を確認することにより診断されるが、原因遺伝子を特定する手掛かりを得るには、尿や血清中のクレアチン関連化合物(特にグアニジノ酢酸/クレアチニン比、クレアチン/クレアチニン比)を測定する必要がある。本研究では、クレアチン代謝異常症が疑われる症例において、まず尿中のクレアチン関連化合物を HPLC 法で測定し、次いで血液から RNA、ゲノム DNA を抽出して遺伝子解析を行う。

### A. 研究目的

クレアチン代謝異常症は、重度の精神遅滞を主要症状とし、てんかん、自閉症、重度の言語障害などの様々な臨床症状を有する疾患である。海外におけるクレアチン代謝異常症の報告が多いが、日本での報告は当院で解析した数例にとどまる。その先天的な原因として、クレアチン生合成に関わるグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ(GAMT)、アルギニン・グリシンアミジノトランスフェラーゼ(AGAT)、およびクレアチントランスポーター(SLC6A8)の遺伝子の欠損が知られている[1-3]。臨床症状を有する患者の脳を磁気共鳴スペクトル装置(MRS)で調べて

脳内クレアチン値の低下を確認することにより診断されるが、原因遺伝子を特定する手掛かりを得るには、尿や血清中のクレアチン関連化合物(特にグアニジノ酢酸/クレアチニン比、クレアチン/クレアチニン比)を測定する必要がある。

2011年に当研究室において、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)-UV 検出器でポリマー系の陽イオンクロマトグラフィー用カラムを用いた生体試料中のクレアチン化合物の測定方法及びその方法を用いるクレアチン代謝異常症の患者のスクリーニング方法を開発し[4]、本邦の初症例を含むクレアチン代謝異常症 6 家系(SLC6A8 欠損症:5 家系、GAMT 欠損:1 家



系)の診断を行った[5-7]。生体試料分析において、SLC6A8 欠損症は尿中のクレアチン/クレアチニン比が上昇、GAMT 欠損症は尿、血漿、髄液中のグアニジノ酢酸濃度上昇を特徴とする。

尿のスクリーニング、脳内 MRS、遺伝子検査から早期診断、治療応用を目指す。

## B. 研究方法

### 1. 尿中のクレアチニン関連化合物の測定

採取した尿は、直ちに凍結し、-80 で保存する。

HPLC 測定には、表面にカルボキシル基の付いたポリマー系ゲルが充填された弱酸性陽イオン交換カラム(Shodex YS-50)を用い、薄いリン酸またはギ酸の水溶液を溶離液として UV 210nm で検出する。まず、グアニジノ酢酸、クレアチン、クレアチニンの標準溶液(1~10 μM)を測定し、各成分について、濃度を X-軸、ピーク高さを Y-軸にとって検量線を作成する。

患者尿検体の測定は、凍結尿 500 μl に等量のアセトニトリルを添加後、氷上に静置し、遠心分離により蛋白を除去後の上清を 10~100 倍希釈し、評価する。

### 2. 遺伝子検査

末梢血液(EDTA2Na)5ml(3ml をゲノム DNA 抽出、2ml を RNA 抽出)に使用する。cDNA 合成には Primescript RT reagent kit (Takara)を用いる。

SLC6A8, GAMT, AGAT 各遺伝子の全コーディング領域をカバーするプライマーを独自に設計、プライマー内側特に 3' 側に SNP が入らないことを確認する。

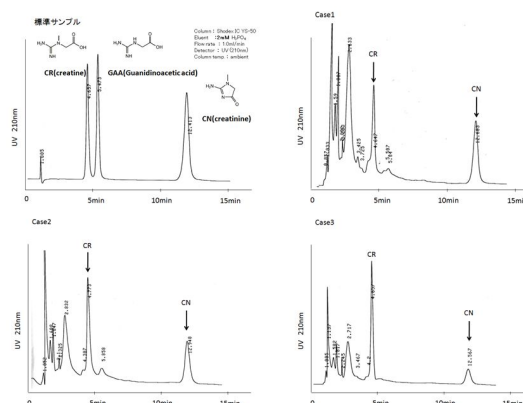
## C. 研究結果

臨床学的クレアチン代謝異常症が疑われた 3 症例(男児 2 名、女児 1 名)について尿中のクレアチン化合物を HPLC 法で測定した(表 1、図 1)。1 例(Case3)の男児に関して、尿中クレアチン/クレアチニン比が同年齢の正常上限値の約 3 倍上昇を認めた。2 例(Case1, 2)に関しては尿中クレアチン/クレアチニン、グアニジノ酢酸/クレアチニン比は正常範囲内であった。

表 1. 尿中クレアチン/クレアチニン比

Patient (year)	gender	クレアチン/クレアチニン比
Case1 (2y5m)	male	1.10 (ref.0.2-2.03)
Case2 (3y2m)	female	1.81 (ref.0.2-2.03)
Case3 (2y)	male	6.45 (ref.0.2-2.03)

図 1. クロマトグラム



## D. 考察

本研究期間にクレアチン代謝異常症が疑われた 3 患者の尿中のクレアチン化合

物を測定したところ、1例(Case3)においてクレアチン/クレアチニン比の上昇を認めた。MRS検査では脳内クレアチン値の低下が認められたことにより、クレアチントランスポーター(SLC6A8)欠損症が疑われた。

遺伝子検査により確定診断を行う。

## E. 結論

尿中のクレアチン関連化合物のHPLC測定は、クレアチン代謝疾患の診断に有用である。

## References

- [1] S. Stockler et al. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man Am J Hum Genet 58 (1996) 914-922.
- [2] C.B. Item et al. Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans Am J Hum Genet 69 (2001) 1127-1133.
- [3] G.S. Salomons et al. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome Am J Hum Genet 68 (2001) 1497-1500.
- [4] T. Wada et al. A simple screening method using ion chromatography for the diagnosis of cerebral creatine deficiency syndromes Amino Acids 43 (2012)

993-997.

[5]H. Osaka et al. Contiguous deletion of SLC6A8 and BAP31 in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness Mol Genet Metab 106 (2012) 43-47.

[6]H. Kato et al. Urine screening for patients with developmental disabilities detected a patient with creatine transporter deficiency due to a novel missense mutation in SLC6A8 Brain Dev (2013).

[7] T. Akiyama et al. A Japanese adult case of guanidinoacetate methyltransferase deficiency JIMD Rep 12 (2013) 65-69.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Shimbo H, Ninomiya S, Kurosawa K, Wada T. A case report of two brothers with ATR-X syndrome due to low maternal frequency of somatic mosaicism for an intragenic deletion in the ATRX. J Hum Genet, 59 (2014) 408-410.

2) Shimbo H, Takagi M, Okuda M, Tsuyusaki Y, Takano K, Iai M, Yamashita S, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Aida N, Osaka H. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. Mol Genet Metab Rep.1 (2014) 133-138

3) Tamaura M, Shimbo H, Iai M, Yamashita

S, Osaka H.

Seizure recurrence following pyridoxine withdrawal in a patient with pyridoxine-dependent epilepsy. *Brain Dev.* (2014) [Epub ahead of print]

4) Kouga T, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Yamakawa K, Osaka H. Effect of CYP2C19 polymorphisms on stiripentol administration in Japanese cases of Dravet syndrome. *Brain Dev.* 37(2015)243-249.

5) Wada T, Haddad MR, Yi L, Murakami T, Sasaki A, Shimbo H, Kodama H, Osaka H, Kaler SG. A novel two-nucleotide deletion in the ATP7A gene associated with delayed infantile onset of Menkes disease. *Pediatr Neurol.* (2014): 50:417-420

6) Ohshiro-Sasaki A, Shimbo H, Takano K, Wada T, Osaka H. A three-year-old boy with glucose transporter type 1 deficiency syndrome presenting with episodic ataxia. (2014): 50:99-100

## 2 . 学会発表

1) Shimbo H, Kurosawa K, Okamoto N, Ninomiya S, Wada T. Molecular genetic study of 75 patients with ATR-X syndrome in Japan. 64th American Society of Human Genetics . 2014.10.18-22 San Diego

2) Osaka H, Shimbo H, Murayama K, Akira Ohtake, Noriko Aida. A rapid screening with direct sequencing from blood samples for the diagnosis of Leigh syndrome. *Mitochondrial Medicine.* 2014.6. 4-7 Pittsburgh PA

3) Sasaki Y, Shimbo H, Osaka H. Regulation of osteoblast derived from dental pulp cells of cleidocranial dysphasia. 9th Biennial Conference of PDAA 2014.8.22-24 Singapore

4) Infantile Neuroaxonal Dystrophy 様の脳MRI所見を示したSLC9A6変異を有する一例 山本亜矢子, 和田敬仁, 新保裕子, 松本直通, 小坂仁 56回日本小児神経学会 平成26年5月28-30日 浜松

5) ミトコンドリア DNA m.3243A>T 変異を認めた mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes の1例 池田尚広, 山崎雅世, 鈴木峻, 門田行史, 小坂仁, 杉江秀夫, 新保裕子, 山形崇倫 56回日本小児神経学会 平成26年5月28-30日 浜松

6) 頭蓋縫合早期癒合症に対する縫合切除と術後ヘルメット装着による治療. 伊藤進、三宅勇平、下吹越航、新保裕子 第42回日本小児神経外科学会, 仙台, 2014年5月

7) 頭蓋縫合早期癒合症に対する縫合切除と術後ヘルメット装着による治療 伊

藤進、鈴木良介、三宅茂太、新保裕子 第  
10 回 craniosynostosis 研究会, 名古屋,  
2014 年 7 月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

特許第 5662182 号

発明の名称： 生体試料中のアミン測定  
方法およびその方法を用いる患者のスク  
リーニング方法

特許権者： 地方独立行政法人神奈川県  
立病院機構

発明者： 和田敬仁、新保裕子、小坂仁

出願番号： 特願 2011-019561

出願日： 平成 23 年 2 月 1 日

登録日： 平成 26 年 12 月 12 日

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
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.	Brain Dev	36	630-633	2014
Akiyama T, Osaka H, Shimbo H, Nakajiri T, Kobayashi K, Oka M, Endoh F, Yoshinaga H.	A Japanese adult case of guanidinoacetate methyltransferase deficiency.	JIMD	12	665-669	2014
van de Kamp JM, Errami A, Howidi M, Anselm I, Winter S, Phalin-Roque J, Osaka H, van Dooren SJ, Mancini GM, Steinberg SJ, Salomons GS.	Genotype-phenotype correlation of contiguous gene deletions of SLC6A8, BCAP31 and ABCD1.	Clin Genet	87	141-147	2015
野崎 章仁、熊田知浩、柴田実、藤井達哉、 <u>和田敬仁</u> 、 <u>小坂仁</u> .	尿中クレアチン/クレアチニン比と家族歴より診断に至ったクレアチントランスポーター欠損症の1家系 本邦3家系目 .	脳と発達	47	49-52	2015