

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591311

研究課題名（和文） 遺伝性ニューロパチーの病体解明

研究課題名（英文） Molecular basis of Charcot-Marie-Tooth disease

研究代表者

早坂 清（HAYASAKA KIYOSHI）

山形大学・医学部・教授

研究者番号：20142961

研究成果の概要（和文）：

遺伝性ニューロパチーを代表する Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病は 2500 人に 1 人と頻度が高い疾患である。多くの病因遺伝子が明らかにされてきたが、日本人の症例では欧米の報告と異なり、約半数の病因は不明である。日本人 CMT 病の遺伝的背景を明らかにし、病態に基づいた治療法の開発を試みるために、髄鞘型 227 例と軸索型 136 例を対象として解析した。既知の遺伝子については、感度の良い DHPLC 法や直接塩基配列を決定し、質的異常について検索した。また、遺伝子の量的変化について MPLA 法を用いて検索した。結果として、日本人 CMT 病では、CMT1A 重複の頻度は脱髄型 CMT 病も 23% と高くなく、日本人 CMT1A の症例は、罹患を自覚せず、医療機関を受診していない可能性が考えられた。PMP22 以外遺伝子においては、量的変化の関与は検出されなかった。髄鞘型では約 50%、軸索型では約 80% の病因が不明であった。

更に、候補遺伝子解析を行い、視神経萎縮、難聴、尿細管アシドーシス、性分化異常などを呈する兄妹例に OPA1 遺伝子の複合ヘテロ接合変異検出した。腎障害を合併する 2 例において、IFN2 遺伝子変異を検出した。SNPs を利用した連鎖解析を行い 12q42 に連鎖する 1 家系を見出した。

日本人における CMT 病では、多くの症例において病因遺伝子が特定されず、次世代シーケンサーなどを用いた新たな候補遺伝子の検索を行う必要がある。

研究成果の概要（英文）：

To study the genetic background of Japanese Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) patients, we analyzed qualitative and quantitative changes in the disease-causing genes mainly by denaturing high performance liquid chromatography and multiplex ligation-dependent probe analysis in 227 patients with demyelinating CMT and 127 patients with axonal CMT. In demyelinating CMT, we identified 53 patients with PMP22 duplication, 10 patients with PMP22 mutations, 20 patients with MPZ mutations, eight patients with NEFL mutations, 19 patients with GJB1 mutations, one patient with EGR2 mutation, five patients with PRX mutations and no mutations in 111 patients. In axonal CMT, we found 14 patients with MFN2 mutations, one patient with GARS mutation, five patients with MPZ mutations, one patient with GDAP1 mutation, six patients with GJB1 mutations and no mutations in 100 patients. Most of the patients carrying PMP22, MPZ, NEFL, PRX and MFN2 mutations showed early onset, whereas half of the patients carrying PMP22 duplication and all patients with GJB1 or MPZ mutations showing axonal phenotype were adult onset. Our data showed that a low prevalence of PMP22 duplication and high frequency of an unknown cause are features of Japanese CMT. Low prevalence of PMP22 duplication is likely associated with the mild symptoms due to genetic and/or epigenetic modifying factors.

We found the OPA1 compound heterozygous mutations in the siblings who had optic atrophy, deafness and renal tubular acidosis and the IFN2 mutations in the patients complicated FSGS. We also the linkage in the family with recessive demyelinating CMT, but cannot still identify the causing gene.

It will be necessary to establish a high-throughput method for screening of many disease-causing genes and to resequence the whole genome of patients with unidentified mutations to detect a new disease-causing gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：Charcot-Marie-Tooth disease; CMT;

denaturing high performance liquid chromatography; DHPLC; MLPA;

multiplex ligation-dependent probe analysis

1. 研究開始当初の背景

遺伝性ニューロパチーを代表する Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病は 2500 人に 1 人と頻度が高い疾患である。本症は伝統的に 2 つの病型、髄鞘型および軸索型に分類される。それぞれ多くの病因遺伝子が明らかにされており、私達は世界に先駆けて、主要なヒト髄鞘蛋白の遺伝子を分離し、構造および遺伝子の座を決定し、CMT 病の遺伝子解析を行ってきたが、日本人の症例では欧米の従来の報告と異なり、約半数の病因は不明である。

病因が同定されない理由としては、既知の病因遺伝子に対する検索法の問題と未知の病因遺伝子の存在との 2 つの問題が考えられる。前者の問題点としては、世界的に施行されているスクリーニング方法は、主に点変異（微小な欠失や重複を含む）を検出する方法であり、遺伝子の欠失や重複などの量的変化が検出出来ない。CMT 病では優性遺伝を示すものが多く、また、ノックアウトマウスなどのモデル動物の解析から、多くは Haploinsufficiency によって疾患が惹起することが考えられ、遺伝子の量的変化の検索が必要である。

未知の病因遺伝子の存在に関しては、連鎖解析から多くの病因遺伝子が明らかにされてきたが、まだ不明の病因遺伝子が存在することが考えられる。機能から推定される遺伝子、合併症から推定される遺伝子などを候補遺伝子として解析すること、また、連鎖解析による新たな病因遺伝子の解明が求められる。

2. 研究の目的

日本人 CMT 病の遺伝的背景を明らかにし、病態に基づいた治療法の開発を試みることを目的とする。

3. 研究の方法

対象：臨床的に髄鞘型 CMT 病と考えられた症例 227 例と軸索型 CMT 病 136 例である。

- 最初に、Southern blot hybridization 法または FISH 法で 17q11.2 領域の重複 (CMT1A 重複) を調べた。
- 17q11.2 領域の重複を認めなかった症例を対象とし、既知の遺伝子の質的变化については、Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) 法で調べ、もしくは直接塩基配列を決定した。変異を検出できなかった症例では、Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) 法により遺伝子の量的変化を検索した。
- 未知の病因遺伝子解明のために、候補遺伝子検索を行う。ミトコンドリア融合に関する OPA1 について視神経萎縮を伴う症例、IFN2 について腎障害を合併する症例を対象として検索する。また、また従兄弟婚により 2 人の罹患者と 2 人の健常者を有する家族について連鎖解析を行った。

4. 研究成果

髄鞘型 CMT 病において、CMT1A 重複 53 例 (3 例は MLPA 法により検出)、MPZ 変異 20 例、GJB1 変異 19 例、PMP22 変異 10 例に、

NEFL 変異 8 例, EGR2 変異 1 例に, PRX 変異 5 例に遺伝子変異を認めた. 軸索型 CMT 病では, MFN2 変異 14 例, MPZ 変異 5 例, GJB1 変異 6 例, GARS 変異 1 例, GDAP1 変異を 1 例検出した. また, 2 例の distal HMN で HSP27 の変異を認めた. MLPA 法では, 髄鞘型 CMT 病の 3 例で PMP22 の重複が検出された. FISH 法で欠失を認めた 1 例で, 他方 PMP22 アリルの exon 5 の欠失を認めた. 以上の解析から, 日本人 CMT 病では, CMT1A 重複の頻度は 23% と高くなく, 日本人 CMT1A の症例は, 罹患を自覚せず, 医療機関を受診していない可能性が考えられる. MLPA 法による量的変化の検索については, PMP22 のみ検出され, FISH では検出不能である小欠失の検出に有用であった. 髄鞘型では 111 例 (49%), 軸索型では 100 例 (79%) の病因が不明であった.

視神経萎縮, 難聴, 尿管管アシドーシス, 性分化異常などを呈する兄妹例に OPA1 遺伝子の複合ヘテロ接合変異を検出した. 腎障害を合併する 2 例において, IFN2 遺伝子変異を検出した. SNPs を利用した連鎖解析を行い 12q42 に連鎖する 1 家系を見出した.

日本人における CMT 病では, 多くの症例において病因遺伝子が特定されず, 次世代シーケンサーなどを用いた新たな候補遺伝子の検索を行う必要がある.

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Abe A, Numakura C, Kijima K, Hayashi M, Hashimoto T, Hayasaka K: Molecular diagnosis and clinical onset of Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. J Hum Genet. 56:364-368, 2011, 査読有, Doi: 10.1038/jhg.2011.20
- ② Abe A, Nakamura K, Kato M, Numakura C, Honma T, Seiwa C, Shirahata E, Kishikawa Y, Hayasaka K: Compound heterozygous PMP22 deletion mutations causing severe Charcot-Marie-Tooth disease type 1. J. Hum. Genet 55:771-773, 2010, 査読有, Doi: 10.1038/jhg.2010.106
- ③ Abe A, Numakura C, Nakayama T, Saito K, Koide H, Oka N, Ando K, Honma A, Kishikawa Y, Hayasaka K: Neurofilament light chain polypeptide (NEFL) gene mutations in Charcot-Marie-Tooth disease: Nonsense mutation probably causes a recessive

phenotype. J. Hum. Genet. 54: 94-97, 2009, 査読有, Doi: 10.1038/jhg.2008.13

- ④ Abe A, Hayasaka K: The GARS gene is rarely mutated in Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. J. Hum. Genet. 54: 310-312, 2009, 査読有, Doi: 10.1038/jhg.2009.25

[学会発表] (計 2 件)

- ① 林真貴子, 阿部暁子, 早坂清: 髄鞘型 Charcot-Marie-Tooth 病の病態解明. 第 115 回日本小児科学会学術集会 2012 年 4 月 21 日 福岡国際会議場 (福岡市)
- ② 阿部暁子, 早坂清ほか: 日本人における Charcot-Marie-Tooth 病 1A 型重複について. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011 年 8 月 13 日 東京グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール (東京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

早坂 清 (HAYASAKA KIYOSHI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号: 20142961