

## 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 25 年 4 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591120

研究課題名（和文）先天性髄鞘化障害の CGH アレイを用いた網羅的解析

研究課題名（英文）Exhaustive genetic analysis for congenital hypomyelination disorders using Comparative Genomic Hybridization Array.

## 研究代表者

植松 貢 (UEMATSU MITSUGU)

東北大学・病院・講師

研究者番号：90400316

研究成果の概要（和文）：CGH アレイなどを用いて先天性髄鞘化障害 27 例の遺伝子解析を行った。PLP1 遺伝子異常 3 例、GJC2 ヘテロ変異 1 例、18q-症候群 3 例、MCT8 遺伝子異常 1 例を確定したが、他の 19 例は原因遺伝子を確定できなかった。原因遺伝子に関する新規の知見として、①18 番染色体長腕末端の 15 個の遺伝子欠失 1 例、②SHH 遺伝子の欠失例 1 例、③15 番染色体全体の loss of heterozygosity 1 例、を得た。確定の為にはエクソームシーケンスなどを用いたさらなる解析が必要である。

研究成果の概要（英文）：I performed exhaustive genetic analysis for 27 cases with congenital hypomyelination disorders using CGH array.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：髄鞘化障害、マイクロアレイ、白質形成不全

## 1. 研究開始当初の背景

先天性髄鞘化障害は精神運動発達障害や眼振、てんかんなど多彩な臨床症状を呈する疾患で、頭部 MRI 検査で比較的容易に診断可能である。その原因は proteolipid protein1(PLP1)遺伝子異常(Pelizaeus-Merzbacher 病)が最も多く、次いで gap junction protein C2(GJC2)遺伝子異常や

18q-症候群などが報告されているが、多くの髄鞘化障害の原因は未だ不明である。本邦では GJC2 遺伝子異常症例の報告はまだなく 18q 症候群は 18q に染色体座がある myelin basic protein(MBP) 遺伝子が欠落することにより髄鞘化障害が起きると考えられているが、髄鞘化障害症例に対する MBP 遺伝子のエクソームシーケンス解析報告は多数あるにもかかわらず

ならず、遺伝子変異を検出した報告は未だないという奇妙な状態となっている。

申請者は従来のシーケンス法を用いた遺伝子解析以外に、近年開発された multiple ligation probe amplification (MLPA) 法というコピー数異常解析法を用いて、簡便で安価なスクリーニング法を確立し、全国から検体を収集してこれまで 20 例の解析を行った。その結果、PLP1 に 3 例の遺伝子変異を見出し、GJA12 に 1 例ヘテロ接合の遺伝子変異を、また 18q-症候群 1 例に MBP 遺伝子欠失を確認した。ところが、ごく最近解析した症例において通常の染色体検査 (G-band) で 18 番染色体 1 本の長腕末端に欠失が疑われたが、MLPA 法で確認したところ MBP 遺伝子のコピー数異常を認めない症例が見い出された。この症例の欠失部位を確定するために、Comparative Genomic Hybridization (CGH) アレイ法による解析を行ったところ、MBP 遺伝子は欠失しておらず、そのさらにテロメア側に切断点があり欠失していることが確認された。申請者の研究によるこれらのこれまでの知見から、PLP1、GJA12、MBP のスクリーニング検査で遺伝子異常が見つかる頻度は約 30% である。さらに申請者の経験した 18q-症候群が、髄鞘化障害を認めたにもかかわらず MBP 遺伝子自体の遺伝子欠失が認められなかったことから、18q のさらにテロメア側 (約 15 個の遺伝子) に髄鞘化障害を起こす重要な原因があることが推測された。

## 2. 研究の目的

先天性髄鞘化障害の症例収集を継続し、これまでに研究者が確立した通常のシーケンス法と MLPA 法を併用した解析系を用いて、PLP1、GJA12、MBP 遺伝子について解析を行い、いずれも異常を認めなかった症例に対し、CGH アレイ法により 18 番長腕を含む全染色体の微細なコピー数異常の検索を行い、網羅的な髄鞘化障害の責任領域解析を行う。これまでのスクリーニング検査に CGH アレイを組み合わせることで、効率的で精密な全染色体の解析を行うことができ、髄鞘化に関する遺伝

子群のヒトにおける機能の解明が進む。さらに遺伝子異常臨床所見 (症状や頭部 MRI 所見など) を比較検討することで、重度の発達障害を呈する髄鞘化障害疾患の疾患分類を確立できると共に、特に遺伝子の重複による過剰発現が原因の場合、RNA 干渉などによる発現調整によって、将来疾患の治療が可能となる。

## 3. 研究の方法

先天性髄鞘化障害の症例 (これまで収集した 20 例と今後収集する例) について、PLP1、GJA12、MBP 遺伝子のスクリーニング解析 (MLPA 法+シーケンス法) を行い、いずれも異常を認めなかった症例に対し、CGH アレイを用いて網羅的に全染色体の微細欠失や重複の解析を行い、異常を認めた領域の候補遺伝子を含めた責任領域の検討を行う。CGH マイクロアレイは Agilent Technologies の 244K 用の解析キットを用いて行う。解析結果症例間で共通するコピー数異常領域を比較検討し、バイオインフォマティクスを駆使しながら責任領域や責任遺伝子の推定を行う。

### (1) 対象

対象は年齢、性別を問わず、頭部 MRI 検査にて非進行性の髄鞘化障害を認める症例で、明らかな原因が不明のものとする。

### (2) 症例の収集

当院および当院関連病院、小児神経科医のメーリングリストなどを通じて研究についての周知を行い症例を収集する。東北大学医学系研究科の遺伝子検査に関する指針などに従って作成した同意書を用いて、主治医が患者もしくは家族よりインフォームドコンセントを得る。その後、末梢血約 10m l を EDTA2Na の試験管に採取してもらう。当院当科で末梢血より DNA を抽出して保存し、以後の検査にあてる。

### (3) 解析方法

MLPA 法を用いた PLP1、GJA12、MBP 遺伝子解

析は、PLP1 遺伝子については市販のプローブ (Salsa®MLPA®kit、ファルコバイオシステムズ) を用い、GJA12、MBP 遺伝子については平成 19-20 年度の科研費援助を受けて確立したプローブセットを用いる。シーケンス法を用いた解析は big dye を用いた通常のサイクルシーケンスを行う。上記で遺伝子異常が見つからなかった症例に対して、さらに CGH アレイ解析を行う。CGH マイクロアレイは Agilent Technologies の 244K 用の解析キットを用いる。解析結果症例間で共通するコピー数異常領域を比較検討し、バイオインフォマティクスを駆使しながら責任領域や責任遺伝子の推定を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 症例の収集

2013 年 4 月時点で、先天性髄鞘化障害の症例を 27 例収集した。うち当院症例が 8 例、当院関連施設が 8 例、全国の他施設からの症例が 11 例であった。今後も全国からの症例収集がさらに進むと考えている。

##### (2) 実験系の確立

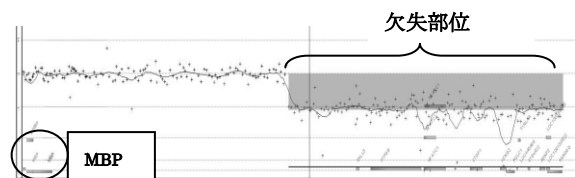
症例の DNA を用いて解析を行った。MLPA 法による PLP1、GJA12、MBP 遺伝子解析は、平成 19-20 年度の科研費援助を受けて確立したプローブセットを用いて行った。シーケンス法を用いた解析は big dye を用いた通常のサイクルシーケンスを行った。そして上記で遺伝子異常が見つからなかった症例に対し、本研究で新たに CGH アレイ解析の系を確立した。CGH マイクロアレイは Agilent Technologies の 244K 用の解析キットを用いて行い、解析ソフトを用いてコピー数異常領域を検出した。

##### (3) 解析結果

先天性髄鞘化障害 27 例の解析を行い、PLP1 遺伝子異常 3 例、GJC2 ヘテロ変異 1 例、18q-症候群 3 例、MCT8 遺伝子異常 1 例を確定できたが、他の 19 例は原因遺伝子確定できなかった。また、18q-症候群 3 例中 1 例において

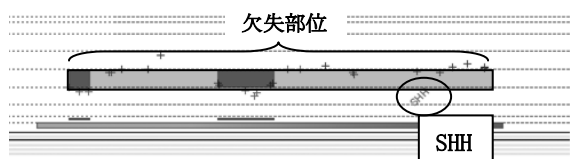
MBP の欠失を認めず、そのテロメア側に切断点があることが確認された (図 1)。18q-症候群では、18q に染色体座がある myelin basic protein (MBP) 遺伝子が欠落することにより髄鞘化障害が起きると考えられてきた (Gay CT et al. Am J Med Genet. 1997; 74: 422-31) が、3 症例とも頭部 MRI 上は異常所見に差がなく MBP が 18q-症候群の責任遺伝子ではない可能性が示唆された。最近、18q-症候群の剖検例において脳神経軸索に MBP の発現を認めたとの報告 (Tanaka et al. Brain Dev. 2012; 34: 234-7) も、その推測を支持するものである。

<図 1> 18q-末端の欠失 (MBP 欠失なし)



また、全前脳胞症の原因遺伝子である SHH 遺伝子の欠失を 1 例認めた (図 2)。さらに、SNP (Single Nucleotide Polymorphism) アレイを用いた解析を追加して行い、15 番染色体全体が loss of heterozygosity となっている症例を 1 例認めた。

<図 2> 7 番染色体の SHH 欠失



新たな髄鞘化障害の原因となる候補遺伝子及びその領域をいくつか同定することに成功したが、いずれも 1 例のみであり、その確定には更なる解析が必要である。

##### (4) 今後の展望

現在も症例解析の依頼が全国から集まりつつある状況であり、引き続き症例を収集して解析を行っていく予定である。今後アレイ

CGH解析でも異常を認めなかった16例(そのうち2症例は兄弟例)に対して、次世代シーケンサーを用いたエクソームシーケンス解析を行い、結果を近日中に論文化する予定である。

## 5. 主な発表論文等

[その他]

ホームページ等

東北大学医学部小児科

<http://ped-thk.umin.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

植松 貢 (UEMATSU MITSUGU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：90400316

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者