

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 6月 7日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790964

研究課題名（和文） Charcot-Marie-Tooth 病の分子病態の解明

研究課題名（英文） Molecular diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease in Japan.

研究代表者

阿部 暁子（ABE AKIKO）

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10536949

研究成果の概要（和文）：

Charcot-Marie-Tooth 病の病態を解明するため、既知の病因遺伝子の点変異のスクリーニングと MLPA 法を用いた病因遺伝子の欠失・重複に関する新たな検索法を確立した。その結果、重症例での PMP22 遺伝子の大きな欠失と同遺伝子の微小欠失の複合ヘテロ接合体が検出され、同法が遺伝子小欠失の検出に有用であることを報告した。また、日本人における遺伝子変異頻度を明らかにし、遺伝子型—臨床型の関係について考察した。欧米では最も多い CMT1A 型の頻度が日本では低く、病因不明例が多いことを報告した。今後、新たな遺伝子を明らかにするとともに、スクリーニング法の改善をはかり、遺伝子検索を継続する必要がある。

研究成果の概要（英文）：

In order to reveal the pathophysiological mechanisms of developing Charcot-Marie-Tooth disease (CMT), we examined the genes that had already been recognized as disease-causing genes of CMT. To evaluate the involvement of deletion or duplication of the responsible genes, we established the modified analyzing method of MLPA for the responsible genes. We have reported that a compound heterozygous minor and large deletions of PMP22 gene was detected in a patient with severe CMT by MLPA. We identified the disease-causing gene mutations in many Japanese CMT patients and revealed the genotype-phenotype relationship. CMT1A, which is most frequently found in Caucasian CMT patients, was less frequent in Japanese population. Furthermore, we could not identify the disease-causing mutation in most Japanese CMT patients. To identify the genetic background of Japanese CMT patients, we should establish sensitive screening methods and search for novel responsible genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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 病・遺伝性ニューロパチー・DHPLC 法・MLPA 法

1. 研究開始当初の背景

Charcot-Marie-Tooth (CMT) 病は罹患者が 2500 人に 1 人と頻度が高い遺伝性ニューロパチーである。多くは学童期に発症し、緩徐進行性の遠位筋の筋力低下および筋萎縮、深部腱反射の消失、手足の変形等の症状を呈する。

本症は大きく 2 つの髄鞘型および軸索型に分類される。さらにその両者にまたがる中間型も報告されている。

当教室では、世界に先駆けて、MPZ, PMP22 などの主要な髄鞘蛋白の遺伝子をクローニングし、構造および遺伝子の座を決定し、CMT 病 1B 型の病因を明らかにした。このような経緯から、日本における CMT 病の中心的解析施設となり、病態の研究と遺伝子診断法を確立し、多数の遺伝子診断を実施してきた。特に、最も頻度の高い 17p11.2 の遺伝子重複の簡便で精度の高い診断法や多くの遺伝子変異をスクリーニングする感度の高い Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 法や Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) 法を確立し、検索を行ってきたが、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。

DHPLC 法などスクリーニング法は主に点変異を検出する方法で、遺伝子の欠失や重複などの量的変化を検出できない。CMT 病では優性遺伝を示すものが多く、Haploinsufficiency によって疾患が惹起することも考えられ、遺伝子の量的変化の検索が必要と考えた。

2. 研究の目的

DHPLC 法と MLPA 法を併用し網羅的に遺伝子を解析し、日本人 CMT 病の遺伝的背景を明らかにすること、および遺伝子型と臨床型の関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

当教室に CMT 病の遺伝子検索を依頼された髄鞘型 CMT 病 222 症例、軸索型 CMT 病 127 例のうち、17p11.2 遺伝子重複、欠失のない症例を対象とする。

(1) DHPLC 法を用いた遺伝子変異のスクリーニング法を確立しており、図 1 に示すように、髄鞘型と軸索型それぞれに対して検索を継続する。

① 髄鞘型 CMT 病においては、PMP22, MPZ, LITAF, EGR2, NEFL, GJB1, GDAP1, MTMR2, PRX, YARS, DNM2 について検索を行う。

② 軸索型 CMT 病においては MFN2, RAB7, HSP22, HSP27, GARS, NEFL, YARS, DNM2 について検索を行う。

(2) 病因遺伝子、特に優性遺伝形式をとる遺伝子の MLPA 法を用いた量的変化の検索法を確立する。

① 髄鞘型では、PMP22, MPZ, LITAF, EGR2, NEFL, GJB1 について検索法を確立し、これまでの検索では変異を認めなかった 115 例について検索を行う。

② 軸索型では、MFN2, RAB7, GARS, NEFL, HSP22, HSP27, GJB1 の検索システムを確立し、検索を行う。これまでの検索では変異を認めなかった 100 例について検索を行う。

③ 量的変化が検出されれば、breakpoint を明らかにし、周辺の塩基配列を調べ、変異を惹起する機序について、考察する。

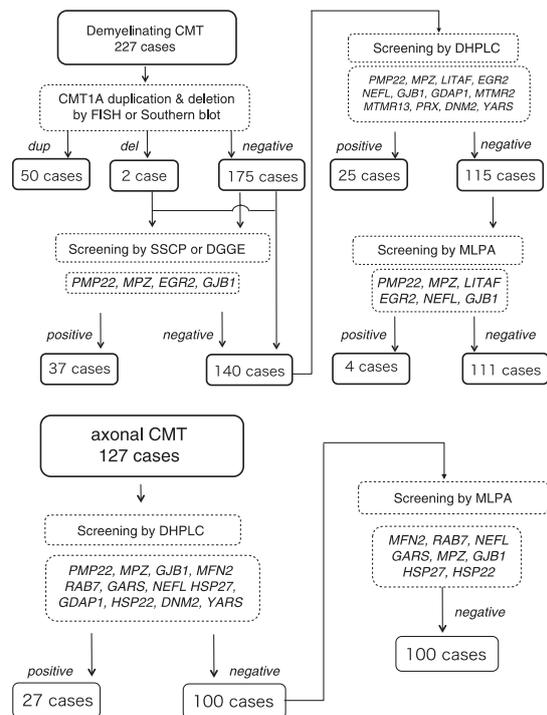


図1 検索対象と方法

(3) 遺伝子変異を検出した症例について、家族および健康対照を調べ、変異と罹病との関係を明らかにする。これらの遺伝子変異、発症年齢について検討した。

4. 研究成果

(1) ① 髄鞘型 CMT 病において、PMP22 変異 (CMT1A 重複を含む) 10 例、MPZ 変異 20 例、NEFL 変異 8 例、GJB1 変異 19 例、EGR2 変異 1 例、PRX に関しては 5 例に遺伝子変異を認めた。111 例 (48.9%) は病因が不明であった。

② 軸索型 CMT 病では、MFN2 変異 14 例、GARS 変異 1 例、MPZ 変異を 5 例、GDAP1 変異 1 例、GJB1 変異を 6 例検出した。100 例 (78.7%) は病因が不明であった。また、2 例の distal HMN で HSP27 の変異を認めた。

(2) MLPA 法により髄鞘型 CMT 病の 3 例で PMP22 の重複が検出された。また、FISH 法で PMP22 欠失を認めた 1 例で、他方 PMP22 アリルの部分欠失を認めた重症例を報告した。部分欠失領域を同定し、break point に 4bp の microhomology を確認した。PMP22 欠失による遺伝性圧脆弱性ニューロパチーは、一般に軽症であり、PMP22 の重複または欠失を認めた症例においても、重症例に関しては、点変異、微小欠失等を合併する可能性があるため、さらに検索をすすめる必要性が示された。

CMT 病における MLPA 法による量的変化の検索は、PMP22 のみで変異が検出され、FISH 法では検出不能である小欠失の検出に有用であった。

(3) 以上の検索結果より日本人における遺伝子変異頻度を明らかにした。表 1 に髄鞘型 CMT 病の遺伝子変異頻度、表 2 に軸索型 CMT 病における遺伝子変異頻度を示す。

表1. 髄鞘型CMT病の遺伝子変異頻度

	1A重複	PMP22	MPZ	LITAF	NEFL	GJB1	GDAP1	MTMR2	EGR2	PRX	不明	計
Our study	53	10	20	0	8	19	0	0	1	5	111	227
	23.3%	4.4%	8.8%	0%	3.5%	8.5%	0%	0%	0.4%	2.2%	48.9%	

表2. 軸索型CMT病の遺伝子変異頻度

	MFN2	RAB7	GARS	NEFL	HSP27	MPZ	HSP22	GDAP1	GJB1	不明	計
Our study	14	0	1	0	0 (2)	5	0	1	6	100	127
	11.0%	0%	0.8%	0%	0%	4.0%	0%	0.8%	4.7%	78.7%	

括弧内は変異を検出したdistal hereditary motor neuropathy (distal HMN)症例数を示す

髄鞘型では 48%、軸索型では 78%の症例で病因が不明である。CMT1A 重複の頻度は 23%と高くないことから、また、抗ガン剤の投与時や糖尿病罹患時に顕在化・重症化することから、日本人 CMT1A の症例のなかには、罹患を自覚せず、医療機関を受診していない症例がある可能性が考えられた。

図 2 に髄鞘型 CMT 病、図 3 に軸索型 CMT 病における発症年齢を示す。

① CMT1A 重複では主に小児期に発症するが、高齢発症例も存在することが示された。CMT1A 重複では症状が一般に軽く、PMP22、MPZ、EGR2、NEFL 異常では変異蛋白が gain of function に働き、乳幼児期に発症し進行も早く重篤な例が多い。

② 劣性遺伝形式をとる PRX 変異では、loss of function に働き、乳幼児期に発症するが

緩徐に進行するという特徴がある。

③ 軸索型では、MFN2 変異は全て小児期に発症し、GJB1 や MPZ 変異では発症年齢が比較的高い。

④ 早期発症例では、dominant negative 効果、あるいは変異蛋白が gain of function として作用するためと考えられる。CMT1A 重複の一部や GJB1 や MPZ 変異による軸索型では、髄鞘の障害に続く軸索の損傷が遅れるため、発症年齢が高くなると考える。

⑤ CMT 病では、通常、下肢優位で進行するが、GARS 異常では上肢優位に症状を認め、GARS 変異での臨床的特徴として報告した。

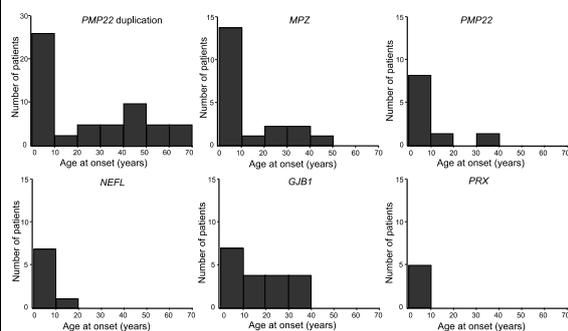


図2 髄鞘型CMT病における遺伝子変異と発症年齢

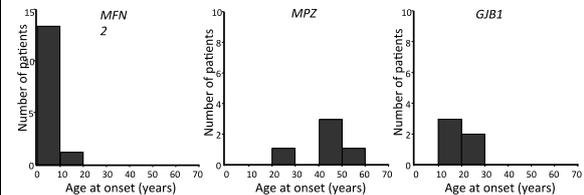


図3 軸索型CMT病における遺伝子変異と発症年齢

日本人における CMT 病では、多くの症例について病因遺伝子が特定されておらず、今後スクリーニング法の改善をはかるとともに、既知および候補遺伝子検索を継続していく必要がある。

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. 査読有, 2011, 56:364-8. DOI:10.1038/jhg.2011.20

② Hamaguchi A, Ishida C, Iwasa K, Abe A, Yamada M.

Charcot-Marie-Tooth disease type 2D with a novel glycyI-tRNA synthetase gene (GARS) mutation. J Neurol. 査読有, 2010, 257:1202-4.
DOI:10.1007/s00415-010-5491-x

③ Abe A, Nakamura K, Kato M, Numakura C, Honma T, Seiwa C, Shirahata E, Itoh A, Kishikawa Y, Hayasaka K.
Compound heterozygous PMP22 deletion mutations causing severe Charcot-Marie-Tooth disease type 1.
J Hum Genet. 査読有, 2010; 55:771-3.
DOI:10.1038/jhg.2010.106

④ Sudo Y, Numakura C, Abe A, Aiba S, Matsunaga A, Hayasaka K.
Phenotypic variability in a family with Townes-Brocks syndrome. J Hum Genet. 査読有, 2010; 55: 550-1.
DOI:10.1038/jhg.2010.64

〔学会発表〕(計5件)

① 阿部暁子, 林真貴子, 沼倉周彦, 木島一己, 橋本多恵子, 白幡恵美, 池上徹, 早坂清: 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, 東京都港区, グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール

② 中島正幸, 山下裕史郎, 永光信一郎, 大矢崇志, 原宗嗣, 渋谷郁彦, 松石豊次郎, 阿部暁子, 早坂清: Distal Hereditary Motor Neuropathy VI の兄弟例. 第 53 回日本小児神経学会総会, 2011 年 5 月 27 日, 横浜市, パシフィコ横浜

③ 友納優子, 藤田貴子, 児玉梨恵, 二之宮信也, 井原由紀子, 中村紀子, 井手口博, 井上貴仁, 阿部暁子, 早坂清, 安元佐和, 廣瀬伸一: Charcot-Maire-Tooth disease with pyramidal features の 1 家系. 第 53 回日本小児神経学会総会, 2011 年 5 月 27 日, 横浜市, パシフィコ横浜

④ 阿部暁子, 木島一己, 白幡恵美, 早坂清: 日本人 Charcot-Maire-Tooth 病の遺伝子診断と臨床像について. 第 52 回日本小児神経学会総会, 2010 年 5 月 22 日, 福岡市, 福岡国際会議場

⑤ 阿部暁子, 中村和幸, 加藤光広, 沼倉周彦, 本間友美, 白幡恵美, 清和ちづる, 伊東愛子, 早坂清: PMP22 遺伝子欠失の複合ヘテロ接合体による遺伝性ニューロパチーの 2 家系. 第 113 回日本小児科学会学術集会, 2010 年 4 月 23 日, 盛岡市, 盛岡市民文化ホール

6. 研究組織 (1) 研究代表者

阿部 暁子 (ABE AKIKO)
山形大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 10536949