

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月4日現在

機関番号：82611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659531

研究課題名（和文） 先天性大脳白質形成不全症を引き起こす分子機序とゲノム脆弱性の解明

研究課題名（英文） Study on molecular mechanism underlying genomic susceptibility to congenital hypomyelinating leukodystrophy

研究代表者

井上 健（INOUE KEN）

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第二部 室長

研究者番号：30392418

研究成果の概要（和文）：Pelizaeus-Merzbacher病（PMD）は、中枢神経系の髄鞘形成不全を特徴とする遺伝性難治性神経疾患である。PLP1遺伝子のゲノム重複がPMDの最も頻度の高い遺伝子変異であるが、なぜPLP1遺伝子にゲノム重複変異が高頻度におこるのか、その機序については不明である。我々は、PLP1ゲノム領域に構造変化がおこりやすい構造的脆弱性があるからではないかと仮説した。そこで本研究では、多数のPLP1重複のDNA検体を用いて、ゲノム異常の構造を高解像度で解析することにより、PLP1重複がおこる共通の機序を明らかにすることにより、この仮説を検証した。我々はカスタム高密度オリゴCGHアレイを用いて、PLP1遺伝子重複によるPMD症例約70例の微小ゲノム構造変化領域の高解像度ゲノム解析を行った。すべての症例にPLP1領域の重複を確認した。重複するゲノム領域の大きさは、それぞれ症例ごとに異なり、組み換え断端の位置も症例ごとに異なっていた。共通の断端は近位端、遠位端ともに存在しなかった。しかし、遠位端は数十Kbに渡るsegmental duplicationの多い領域に集積する傾向があった。複数の症例で重複が一部、中断している、あるいは3重複になっている症例が存在し、これらの症例には複雑な組換え機序が関与することが示唆された。今後、これらの症例の組換え断端を塩基配列レベルで解明する予定である。

研究成果の概要（英文）：Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD) is inherited intractable disorder characterized by hypomyelination of central nervous system. Genomic duplication containing PLP1 gene is the most common cause of PMD. However, it is unknown as to why duplication is the most common cause of PMD. We hypothesized that there may be a genomic structural feature that predispose this genomic region for susceptibility of genomic rearrangement. We tested this hypothesis by applying numerous DNA samples from PLP1 duplication patients for high-resolution genomic analysis to delineate molecular mechanism underlying the abnormal genomic rearrangement resulting in PLP1 duplication. We designed a high-resolution custom CGH array specific to the PLP1 genomic region and analyzed 70 PMD cases with duplication. We confirmed genomic duplications involving PLP1 in all cases. Duplicated segments vary in length and region. No common breakpoint was found in either proximal or distal breakpoints, although distal breakpoints tend to cluster within a few thousands kb region enriched with segmental duplication. We also found interruption of duplication by single copy or triplicated copy segments in some cases, indicating a complex mechanism underlying genomic rearrangement. We are examining the recombination junction fragments in these cases at the nucleotide level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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

キーワード：小児神経学

1. 研究開始当初の背景

遺伝子重複や欠失などのゲノム構造変化は、多くの小児遺伝性精神神経疾患に共通してみられる疾患原因変異であり、その分子機序の解明は、臨床診断や分子病態の理解のために重要である。PMD は、中枢神経系の髄鞘形成不全を本態とし、重度精神運動発達障害をきたす X連鎖性劣性疾患である。原因遺伝子 *PLP1* は主要な髄鞘蛋白をコードしている。我々は以前、***PLP1* ゲノム領域の重複**が最も頻度の高い疾患原因遺伝子変異であることを報告した。^{2,3} また、定量的PCRあるいはFISHを用いた遺伝子診断法の開発や変異と臨床症状の相関等の臨床に直結する研究成果を報告してきた。^{3,4} これらの解析の中で、我々は PMD 患者の *PLP1* ゲノム重複に特異的な特徴を見いだした。すなわち、*PLP1* 重複はそのゲノム領域の変化の範囲や大きさが患者ごとに異なる複雑な構造をとっていた。これらの知見より、PMD におけるゲノム構造異常は、他の一般的な疾患原因ゲノム構造異常 (Charcot-Marie-Tooth 病や DiGeorge 症候群など) とは異なる新たな機序で起こっていることが示唆された。³⁻⁵ しかし、現在、**どうしてゲノム重複変異が最も頻度の高い PMD の原因変異なのか、どの様な機序で、ゲノム重複が起こるのか、その分子機構は未知である。**

2. 研究の目的

本研究では、なぜ *PLP1* 遺伝子にゲノム重複変異が高頻度におこるのか、その分子遺伝学的機序を明らかにする。

いくつかの遺伝性疾患において、遺伝子の欠失や重複などの変異がある領域に高頻度に見られることが知られている。これらの発生には、その領域に特異的なヒトゲノムの構造的な特徴が関与していると考えられている。本研究では、*PLP1* 遺伝子領域に焦点を当てて、多数の PMD 患者の DNA 検体を並行して評価することにより、*PLP1* 領域が持つどの様なゲノム特性が重複変異を引

き起こしているのか、その仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

- PLP1* 遺伝子重複による PMD 症例約 70 例のゲノム DNA を用いて、微小ゲノム構造変化領域の高解像度ゲノム解析を行う。カスタムメイドオリゴ DNA アレイを用いたオリゴアレイ CGH おこない、*PLP1* 遺伝子領域のコピー数の変化を高解像度で明らかにする。
- 各症例の重複ゲノム領域の構造を明らかにする。特に複雑な構造変化を検出した症例について、*PLP1* ゲノム領域の詳細な構造解析を行い、塩基配列レベルでゲノム構造変化を明らかにする。
- これらの 70 症例のゲノム構造異常のデータとヒトゲノム配列とを統合的に比較解析し、*PLP1* 重複がおこる分子機序を明らかにする。
- 大腸菌やイーストなどのゲノム解析の知見を参考にしつつ、*PLP1* ゲノム領域が持つ脆弱性に関する構造的な特徴を明らかにする。さらに、同様の脆弱性をもつヒトゲノム領域に注目し、疾患との関連性を探る。

4. 研究成果

PLP1 遺伝子周辺約 50kb をカバーするカスタム高密度オリゴ CGH アレイを、アジレント社の専用ソフト eArray を用いて設計・作成した。これを用いて、これまで FISH や定量 PCR などを用いて診断された *PLP1* 遺伝子重複による PMD 症例約 70 例の微小ゲノム構造変化領域の高解像度ゲノム解析を行った。DNA 検体は、研究協力者の Boespflug-Tanguy 教授 (INSERM) からの譲渡を受けた。すべての症例に *PLP1* 領域の重複を確認し、カスタムアレイの有用性を確認した。重複するゲノム領域の大きさは、それぞれ症例ごとに異なり、組み換え断端の位置も症例ごとに異なっていた。共通の断端は近位端、遠位端ともに存在しなかった。しかし、遠位端は数十 Kb に渡る segmental duplication の多い領域に集積

する傾向があった。複数の症例で重複が一部、中断している、あるいは3重複になっている症例が存在し、これらの症例には複雑な組換え機序が関与することが示唆された。今後、これらの症例の組換え断端を塩基配列レベルで解明する予定である。

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8件)

1. Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, Saito H, Matsumoto K. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet.* 2011 Jul;7(7):e1002170 doi: 10.1371/journal.pgen.1002171 査読有
2. Saito H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi JI, Hamada K, Yamashita A, Shibayama H, Shiina M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Doi H, Ogata K, Inoue K, Matsumoto N. Mutations in POLR3A and POLR3B encoding RNA polymerase III subunits cause an autosomal-recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Am J Hum Genet.* 2011 89(5):644-51 doi: 10.1016/j.ajhg.2011.10.003 査読有
3. Takanashi J, Saito S, Aoki I, Barkovich J, Itoh Y, Inoue K. Increased N-acetylaspartate in Model Mouse of Pelizaeus-Merzbacher Disease. *J Magn Reson Imaging.* 2012;35:418-425. DOI: 10.1002/jmri.22817 査読有
4. Yu L-H, Morimura T, Numata Y, Yamamoto R, Inoue N, Antalffy B, Goto Y, Deguchi K, Osaka H, Inoue K. Effect of curcumin in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Mol Genet Metab* 2012;106:108-114. 査読有
5. Ishii K, Doi T, Inoue K, Okawada M, Lane GJ, Yamataka A, Akazawa C. Correlation between multiple *ret*

mutations and severity of hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 2013;29(2):157-63 査読有

6. Numata Y, Morimura T, Nakamura S, Hirano E, Kure S, Goto YI, Inoue K. Depletion of molecular chaperones from the endoplasmic reticulum and fragmentation of the Golgi apparatus associated with pathogenesis in Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Biol Chem.* 2013;288(11):7451-7466. 査読有
7. 井上 健, 岩城明子, 黒澤健司, 高梨潤一, 出口貴美子, 山本俊至, 小坂 仁 先天性大脳白質形成不全症: Pelizaeus-Merzbacher 病とその類縁疾患 *脳と発達* 2011;43(6); 435-442 PMID: 22180957 査読有
8. 井上 健, 岩城明子, 黒澤健司, 高梨潤一, 出口貴美子, 山本俊至, 小坂 仁 先天性大脳白質形成不全症: ゲノム解析から診断、治療への取り組み *脳と発達* 2013;45(2);122-126 PMID: 23650816 査読無

[学会発表] (計21件)

1. 井上 健, 岩城明子, 黒澤健司, 高梨潤一, 出口貴美子, 山本俊至, 小坂 仁 先天性大脳白質形成不全症の診断基準と疾患分類の作成 第53回日本小児神経学会 横浜 2011、5、26
2. 沼田有里佳, 岩城明子, 小坂 仁, 黒澤健司, 高梨潤一, 山本俊至, 出口貴美子, 井上 健 全国実態調査による先天性大脳白質形成不全症の疫学的研究 第53回日本小児神経学会 横浜 2011、5、28
3. Osaka H, Nezu A, Saito H, Kurosawa K, Matsumoto N, Inoue K. A SOX10 binding site mutation in GJC2 promoter causes Pelizaeus-Merzbacher-like disease. 第53回日本小児神経学会 横浜 2011、5、26
4. 出口貴美子, 久保健一郎, 仲島一範, 井上 健 新たな超早産児の虚血性脳傷害モデルマウスを用いた解析(続報) 第53回日本小児神経学会 2011年5月28日 横浜、パシフィコ横浜
5. 守村 敏史, 沼田 由里佳, 有馬 恵里子, 後藤 雄一, 井上 健 小胞体ストレスを標的とした Pelizaeus-Merzbacher 病に対する治療薬の確立 第34回日本神経科学大会 横浜 2011年9月15日
6. Inoue K, Numata Y, Ohkubo T, Arima E, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi J, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H. A

- comprehensive nation-wide epidemiological survey for Pelizaeus-Merzbacher disease and associated disorders in Japan. 2011.10.13 12th International Congress of Human Genetics. Montreal, Canada
7. 沼田 有里佳、守村 敏史、畠山英之、横田睦美、後藤 雄一、涌澤 圭介、植松 貢、大沼 晃、井上 健 フレームシフト変異による *PLP1*mRNA の不安定化：軽症型 Pelizaeus-Merzbacher 病の分子病態 第 56 回日本人類遺伝学会総会 2011 年 11 月 12 日 千葉
 8. 後藤玲央、小坂 仁、新保裕子、後藤雄一、井上 健 Pelizaeus-Merzbacher-like-disease における *GJC2* プロモーター変異の分子病態解析 第 56 回日本人類遺伝学会総会 2011 年 11 月 10 日 千葉
 9. 井上 健、岩城明子、黒澤健司、高梨潤一、出口貴美子、山本俊至、小坂 仁 先天性大脳白質形成不全症の統合的研究の推進 第 56 回日本人類遺伝学会総会 2011 年 11 月 12 日 千葉
 10. Inoue K, Numata Y, Iwaki A, Kurosawa K, Takanashi J, Deguchi K, Yamamoto T, Osaka H. Epidemiological and molecular diagnostic landscape of Pelizaeus-Merzbacher disease and associated disorders in Japan: a nation-wide survey. 2012, 6, 11. 22nd Meeting of the European Neurological Society, Prague, Czech
 11. 井上 健、後藤雄一 複合型神経堤症候群 PCWH: Tg マウスによる疾患モデルの作成 第 54 回日本小児神経学会総会、2012 年 5 月 19 日 ロイトン札幌、札幌
 12. 出口貴美子、久保健一郎、仲嶋一範、井上 健 超早産児の虚血性脳傷害モデルマウスを用いた解析; 第 3 報 第 54 回日本小児神経学会総会、2012 年 5 月 18 日 ロイトン札幌、札幌
 13. 沼田 有里佳、涌澤 圭介、植松 貢、大沼 晃、後藤 雄一、井上 健 軽症型 Pelizaeus-Merzbacher 病の分子病態：患者の皮膚由来の線維芽細胞、iPS 細胞による病態解析 第 54 回日本小児神経学会総会、2012 年 5 月 17 日 ロイトン札幌、札幌
 14. 松藤まゆみ、中村紀子、友納優子、井上貴仁、井上 健、小坂仁、黒澤健司、宇都宮英綱、高嶋幸男 *PLP1* 部分欠失による X 連鎖性不完全優性産性対麻痺の 1 家系：*PLP1*in11 変異の臨床的特異性について 2012 年 5 月 19 日 ロイトン札幌、札幌
 15. 沼田 有里佳、守村 敏史、有馬 恵里子、後藤 雄一、井上 健 小胞体ストレス関連疾患 (Pelizaeus-Merzbacher 病) における、小胞体からのシャペロンの排除 2012 年 9 月 18 日 第 35 回日本神経科学大会 名古屋 (名古屋国際会議場)
 16. 守村 敏史、沼田 有里佳、有馬 恵里子、後藤 玲央、後藤 雄一、井上 健 小胞体ストレス型 Pelizaeus-Merzbacher 病に対する抗マラリア薬であるクロロキンの応用 2012 年 9 月 21 日 第 35 回日本神経科学大会 名古屋 (名古屋国際会議場)
 17. 井上 健、守村敏史、沼田有里佳、Li-Hua Yu、後藤玲央、山本良子、井上直子、出口貴美子、小坂 仁、後藤雄一 Pelizaeus-Merzbacher 病の治療法開発への試み 第 57 回日本人類遺伝学会 2012 年 10 月 26 日 東京 (京王プラザホテル)
 18. Ken Inoue, Toshifumi Morimura, Yurika Numata, Li-Hua Yu, Leo Gotoh, Ryoko Yamamoto, Naoko Inoue, Barbara Antalffy, Kimiko Deguchi, Hitoshi Osaka, Yu-ichi Goto. Treating Pelizaeus-Merzbacher disease with clinically applicable compounds, curumin and chloroquine: preclinical studies. 2012, 11, 8 62nd Annual meeting of the American Society of Human Genetics, San Francisco, USA
 19. 井上 健、岩城明子、黒澤健司、高梨潤一、出口貴美子、山本俊至、小坂 仁 先天性大脳白質形成不全症：ゲノム解析から診断、治療への取り組み シンポジウム「先天性大脳白質形成不全症-疾患概念の確立から、病態解析・治療的展開まで」第 54 回日本小児神経学会総会、2012 年 5 月 19 日 ロイトン札幌、札幌
 20. 小坂 仁、井上 健、才津浩智 白質形成不全症の臨床症状と分子病態 シンポジウム「先天性大脳白質形成不全症-疾患概念の確立から、病態解析・治療的展開まで」第 54 回日本小児神経学会総会、2012 年 5 月 19 日 ロイトン札幌、札幌
 21. Ken Inoue, Toshifumi Morimura, Yurika Numata, Li-Hua Yu, Leo Gotoh, Ryoko Yamamoto, Naoko Inoue, Yu-ichi Goto. Toward the therapeutic intervention for hypomyelinating disorders in the CNS: Pelizaeus-Merzbacher disease. 2nd Joint symposium between MPI and NCNP. 2012, 10, 4. Munich, Germany
- [図書] (計 1 件)
1. 井上 健、小坂 仁 先天性大脳白質形成不全症 編集 遠藤文夫、新領域別症候群シリーズ No. 20 「先天代謝異常症候群 (下) — 病因・病態研究、診断・治療の進歩 —」 日本臨牀社 p897-901. 2012

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://kcmc.jp/pmd/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 健 (INOUE KEN)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター

ー 神経研究所 疾病研究第二部 室長

研究者番号：30392418