

遺伝性ニューロパチーの診断と分子病態

高嶋 博*

要旨：Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) の多数の原因遺伝子に対する診断は、近年の遺伝子検査法の進歩により実施可能となった。われわれは、マイクロアレイ法をもちいた診断チップを作製し、CMT1A 以外の例に遺伝子検査を実施した。その結果、意外にも診断陽性率は低く、改善が必要であった。そのため、より多くの CMT の原因遺伝子を同定する必要がある、網羅的に配列をえられる次世代ゲノムシーケンシング法による解析が有効と思われた。一方、これまでの知見では、CMT の原因は髄鞘構成蛋白、転写因子、髄鞘/軸索蛋白の分解、輸送、代謝、ミトコンドリア、tRNA 合成酵素、DNA 修復の異常などである。

(臨床神経 2012;52:399-404)

Key words：遺伝性ニューロパチー、シャルコー・マリー・トゥース病、遺伝子診断、マイクロアレイ法、リシーケンシング

遺伝性ニューロパチーの病型分類

遺伝性ニューロパチーは、運動および感覚神経が障害される hereditary motor and sensory neuropathy (HMSN) または Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT)、感覚自律神経が障害される hereditary sensory and autonomic neuropathy (HSAN)、運動神経のみが障害される hereditary motor neuropathy (HMN)、アミロイドの蓄積がみられる familial amyloid neuropathy (FAP)、圧刺激により誘発される hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP)、家族性に neuralgic amyotrophy をきたす hereditary neuralgic amyotrophy (HNA) など、その他にも様々な病型がある。これらは、基本的にはことなる疾患と考えられるが、共通の原因で引き起こされる例も報告され、たとえば軸索障害型の CMT2 と HMN の原因として共通する遺伝子が少なくとも 5 遺伝子が報告されている。そのように多くの共通の原因が存在するという事は、軸索型ニューロパチーと運動性ニューロパチーの発症メカニズムはかなり近い可能性を示す。HSAN は、無髄神経や小径有髄神経が中心に障害されるため、CMT とは明らかにことなる疾患である。遺伝的原因が少なくとも 10 以上同定されているが、CMT と同じ遺伝子異常であったという報告はない。

遺伝性ニューロパチーの中でもっとも代表的な疾患は CMT で、足の変形 (凹足) や逆シャンペンボトルと呼ばれる下肢遠位筋萎縮で特徴付けられる。CMT は、臨床的、遺伝的

に多くの型に分けられ、少なくとも 35 以上の原因遺伝子が報告されている。臨床遺伝学的に命名され、ミエリンの障害が原因で優性遺伝形式のものを CMT1、劣性遺伝形式のものを CMT4、軸索の障害によるものを CMT2、X 染色体性を CMTX と分類する。脱髄型か軸索型かの判定は、正中神経の運動神経伝導速度 (MCV) 38m/sec を境に決定される。しかし家系内で MCV が 38m/sec の上下にまたがるばあいもあり、中間的な MCV を呈するばあいは中間型と呼ばれ、たとえば優性遺伝性のもは dominant intermediate CMT (DI-CMT) とよばれる。CMTX の分布もまた中間的な MCV 値をとる。また、脱髄型においては臨床的に発症年齢や重症度でも分類され、先天性で floppy infant を呈する最重症型が CHN (congenital hypomyelinating neuropathy)、生後から幼少時期 (通常 2 歳以下) に発症するものを Dejerine-Sottas syndrome (DSS) に分類する。圧迫などによりくりかえしおこる脱髄型ニューロパチーは HNPP (hereditary neuropathy with liability to pressure palsies) と呼ばれる。また、ストレスや感染などを誘因として上肢の再発性の plexus neuropathy をひき起こす hereditary neuralgic amyotrophy (HNA) という病型があり¹⁾、原因遺伝子 *SEPT9* が同定され日本人の報告例もある²⁾。

遺伝子診断と原因遺伝子頻度

1991 年に Lupski らが *peripheral myelin protein 22* (*PMP22*) の重複が CMT1A の原因であると同定して以来 CMT の原

*Corresponding author: 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病学講座神経内科・老年病学, 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 脳・神経センター神経内科 [〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘 8 丁目 35-1]
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病学講座神経内科・老年病学
鹿児島大学医学部・歯学部附属病院脳・神経センター神経内科
(受付日: 2011 年 12 月 26 日)

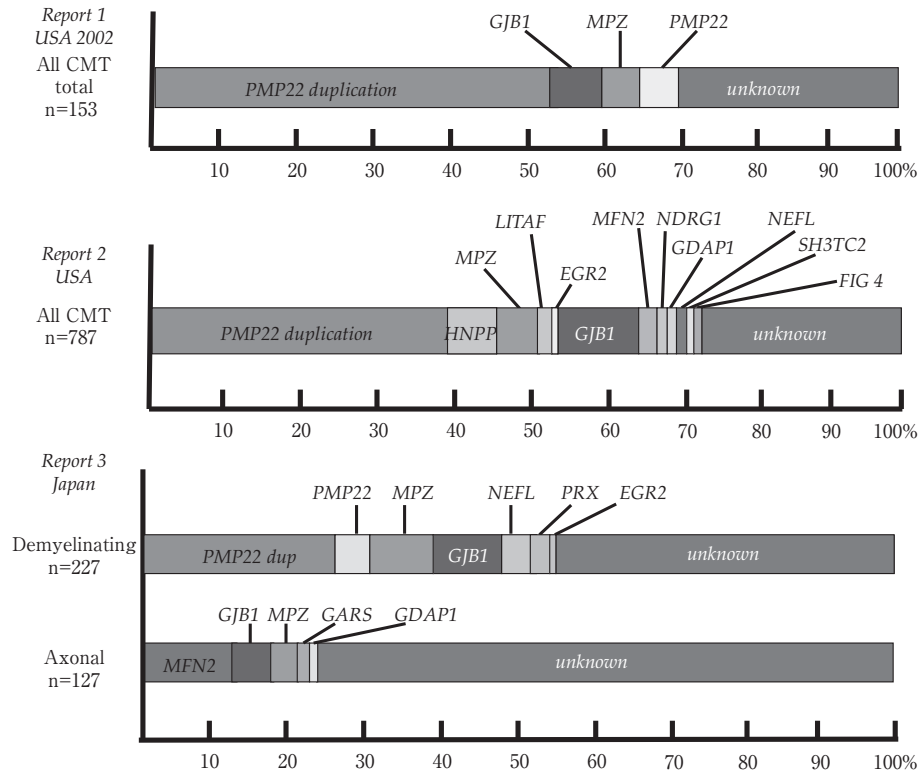


Fig. 1 Distribution of disease causing CMT mutations among CMT patients in three reports. Report 1: Boerkoel et al. *Ann Neurol* 2002 (Ref3); Report 2: Saporta et al. *Ann Neurol* 2011 (Ref5); Report 3: Abe A et al. *J Hum Genet* 2011 (Ref 6).

因遺伝子はつぎつぎに発見され、すでに 35 遺伝子を超えている。米国³⁻⁵⁾、本邦⁶⁾から遺伝子頻度の報告がある。欧米では、CMT1A が CMT 全体の約 50% を占め、本邦では CMT1A の疾患遺伝子頻度が低い (Fig. 1)、CMT1A は、本邦では商業的に検査がおこなわれており、現在大学や研究室の検査依頼から正確な頻度を出すことは難しい。さらに経験的に CMT1A は家系内発症者も多く、しかしその中でも未受診患者数もかなり多いため、そのことも実際の頻度の算出を困難にしている。

CMT1A の原因である PMP22 重複は fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法で確認される。その他の遺伝子変異の検索は一般的には Sanger 法シーケンス解析によりおこなわれるため、報告されている原因遺伝子のすべての遺伝子解析は、膨大な費用と労力を要する。厚生労働省の研究班を中心に包括的な遺伝子診断システムを構築することとなり、われわれは、コスト面、労力面さらに技術的な実現性を検討し、マイクロアレイ法をベースとしたリシーケンスアレイをもちいた遺伝子診断システムを構築した⁷⁾。本システムでは、決定すべき配列をデザインした DNA チップをもちいる。当初は 27 遺伝子と候補遺伝子 10 であったのが、後に候補遺伝子として入れていた 10 遺伝子の中から 2 つが CMT の原因と確立されたため 29 の既知の遺伝子を搭載した診断用マイクロアレイ DNA チップをもちい、検査をおこなった。われわれは、遺伝子頻度を算出する目的で検査依頼のあった連続 200

症例の結果を報告したが、PMP22 の重複のない脱髄型 CMT では、CMT1 型 47 例中 9 例 (19%) に変異を確定し、MPZ 6 例、GJB1、NEFL、SETX の変異をそれぞれ 1 例ずつ、CMT4 では 11 例中 3 例 (27%) に変異をみとめ、PRX 2 例と SBF2 1 例であった。CMT2 では 71 例中 10 例 (14%) に変異をみとめ、MFN2 変異が 8 例ともっとも多く、SETX、GJB1、DNM2 に変異をみとめた。CMTX は 17 例中 6 例 (35%) に GJB1 遺伝子異常を、その他、脊髄小脳変性症の合併例に SETX 変異 2 例、反射の亢進がみられる HMSN-V 例で MFN2 変異 1、分類不能症例の中に SETX と GARS 各 1 例をみとめた。総症例 200 例中 34 例 (17%) に原因遺伝子確定をおこなった。遺伝的原因のおよその頻度や傾向は世界的に大きな差はなく、PMP22、MPZ、GJB1、MFN2 の 4 遺伝子に異常が集中しており、その他はかなり少ない⁷⁾。われわれのおこなった遺伝子診断の陽性率は、当初のわれわれの想定よりかなり低いものであったが、他のスタディにおいても同様の傾向である。われわれの施設で、500 例近くの症例になった段階でも原因同定率は改善せず、遺伝子診断を効率的におこなうためには新しいアプローチが必要である。これは他の施設の検討でも同様の傾向であり、CMT1A の割合が多いため一見遺伝子診断率が高いようにみえるが、CMT1A を除くと陽性率はかなり低い。とくに軸索型では、数多くの原因が同定されている割には、MFN2 以外の原因を見つけるのは難しいのが現状である。この現状を改善するためには、さらなる原因の同定が必要であ

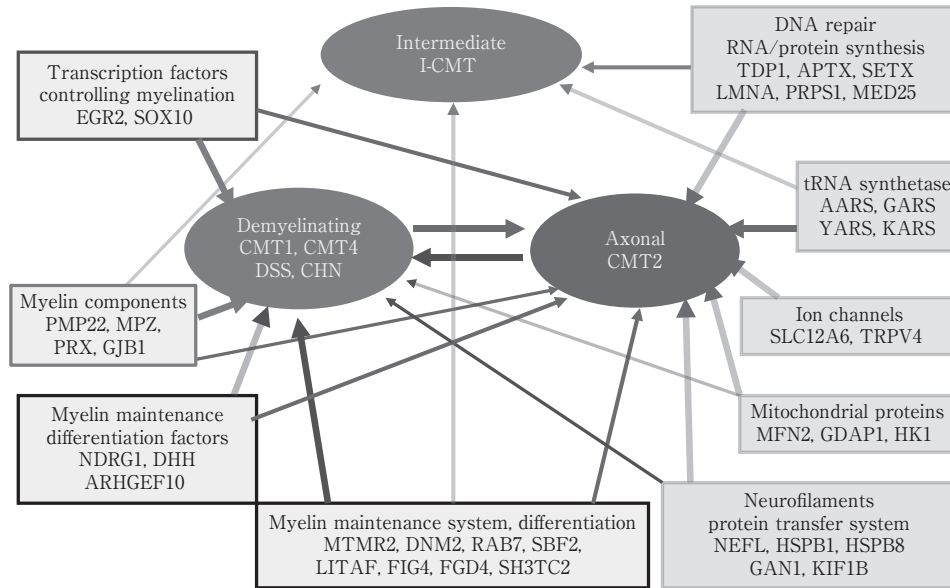


Fig. 2 Disease causing genes/proteins according to etiology.

Model for the pathogenesis of peripheral neuropathy.

AR—autosomal recessive; CHN—congenital hypomyelinating neuropathy; CMT—Charcot-Marie-Tooth disease; DSS—Dejerine-Sottas syndrome.

る。われわれは検査陰性例に対して、次世代ゲノムシーケンズ解析をもちいた包括的な新規の原因同定の試みをおこなうが、具体的には、数百例の陰性例を対象に全遺伝子のエクソン部分を抽出してDNAを解読するExome解析をおこなうことにより、大部分の原因同定ができることを期待している。

CMTの病態生理と治療の試み

CMTの原因は、その原因となる遺伝子がはじめてクローニングされた時点で予想された機能とはことなる機能をもつものが多数報告され、機能が明らかとなるにつれて、つぎつぎに新しい発見がおこなわれてきている。おおよそ病態別に①ミエリン構成蛋白、②ミエリン関連蛋白転写因子、③ミエリン関連蛋白の輸送・代謝・処理、④細胞分化・維持、⑤ニューロフィラメント・蛋白輸送関連、⑥ミトコンドリア関連、⑦DNA修復・転写・核酸合成、⑧イオンチャネル、⑨アミノアシル tRNA 合成酵素の9つに分類される。同じ遺伝子が原因であるにもかかわらず、ことなる病型が報告されているものも多い (Fig. 2)。

脱髄型 CMTの原因は Schwann 細胞のミエリンに関連しているものが多いが、軸索型 CMT は一般的な神経変性疾患において細胞死の原因としてあげられているものが多い。さらに CMT2の原因でかつ HMNの原因としても報告されている遺伝子が5つあることを最初に述べたが、その点からも motor neuron death と CMT2のかかわりも深く、CMTの研究の発展は運動ニューロン病研究にも大きな示唆を与えられる。ミトコンドリアの機能異常もパーキンソン病など多くの変性疾患で重要性が述べられているが、これも CMT

の主な原因の一つであり、機序的な類似性は大きいであろう。

ミエリンの構築や代謝とかかわる蛋白は脱髄型の CMT1 および CMT4の原因となる。ミエリンの主構成蛋白の20%を占める PMP22の量的および質的な異常が、CMT1, DSS または CHNの病態をひきおこす。PMP22の重複によりひきおこされる CMT1Aのモデルマウスに対して、PMP22のプロモーター部位で cAMP を拮抗的に阻害する作用のあるアスコルビン酸(ビタミン C)を投与したところ、過剰な PMP22の産生がおさえられ、ニューロパチーの改善と寿命の延長を確認した報告がなされた⁸⁾。これを受けて、いくつかの小さな試験の後、CMT1患者227名に対して2年間の期間で multicenter placebo controlled double-blind randomized trial がおこなわれた。その結果、2年後においてもコントロール群、プラセボ群でほとんど差がみられず、その効果は確認されていない⁹⁾。ただ、2年の期間では CMT1A は、ほとんど悪化がみられないため、進行の抑制作用の存在は否定できない。また、成長期など神経が作られる時期の投与も有効性がある可能性が残されている。評価方法の改良も必要であろう。一方、単独例ではあるが、PMP22変異の DSSの患者にクルクミンを投与したという症例報告があり、その結果、その効果が一部の症状にみられた¹⁰⁾。クルクミンは、様々な異常な蛋白に抗して働きアポトーシスを防ぐといわれ、様々なミスセンス変異の疾患に有効な可能性があるが、十分量の投与は高価であり、一般的に使用することは容易ではない。

その他の脱髄型 CMTの原因として、ミエリンの50%を占める Po (MPZ) は、コンパクトミエリンの接着に関与する。ミエリン形成時に必要な転写因子である EGR2(early growth

response 2), SOX10 (SRY-BOX 10) は、中枢および末梢のミエリン形成に必要な蛋白の転写に重要な因子である。ミエリンと軸索の接着、基底膜との結合に関与する PRX (Periaxin), GJB1 (*gap junction protein beta 1*) がコードする Cx32 の異常もミエリンと軸索の結合にかかわる。

ミエリンの構成蛋白の分解、処理、輸送、代謝、維持、再構築にかかわる蛋白も脱髄型の原因となるが、SIMPLE/LITAF (lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α factor) はユビキチン関連のプロテオソーム系とかかわりが示され、その他、オートファジー、小胞体輸送、シグナル伝達、末梢神経の成長や分化などにかかわる蛋白をコードする遺伝子異常が多数みつまっている。

ミトコンドリアの異常は、CMT においても他の変性疾患と同様に重要な原因である。実際に同定される CMT2 の原因でもっとも多い MFN2 (mitofusin2) もミトコンドリアの膜表面に存在し、ミトコンドリアの融合にかかわることでミトコンドリアの数の調節に大きくかかわっている。GDAP1 (ganglioside-induced differentiation-associated protein 1) もまた、ミトコンドリアの外膜上に分布し、ミトコンドリアの分裂 (fission) を促進する働きがある。シュワン (Schwann) 細胞にも神経細胞にも発現していることが確認され、常染色体劣性遺伝性の CMT, CMT2 型の原因となる。近年、おもしろいことに特定の GDAP1 変異は、通常とは逆にミトコンドリアの融合プロセスの障害をひきおこし、常染色体優性の遺伝性を示すことも示された¹¹⁾。この二つのミトコンドリア膜上の MFN2 と GDAP1 蛋白が機能することで、ミトコンドリアの分裂・増殖のコントロールがおこなわれている。すなわちミトコンドリアの数およびミトコンドリアネットワークの調節をおこなっている。加えて、HSPB1 は CMT2F と HMN2B の原因遺伝子であるが、その異常マウスにおいてもミトコンドリアネットワークの障害があることが報告された。このモデルマウスは、DNA 転写を活性化させる HDAC6 (ヒストンデアセチラーゼ) 阻害薬により、ある程度の延命が可能で、これは CMT2 型に対して治療の可能性が示されたはじめての報告となる¹²⁾。さらにミトコンドリアの移動やグルコース代謝に関連する HK1 (*hexokinase 1*) も HMSN-Russe/CMT4G の原因として報告されており、ミトコンドリア異常が CMT で重要な位置を占めることは、うたがいの余地がない。

その他の CMT2 の原因としては、軸索の構成成分である NEFL (NF-L, neurofilament, light chain), vesicle transport の RAB7 (RAS related GTP-binding protein), GAN (gigaxonin) などがあり、ニューロフィラメント形成や軸索輸送とかかわっている。大きくは神経細胞内の蛋白供給とかかわっているといえるかもしれない。

さらに大きな枠組みのなかで、核酸の合成、DNA 修復、転写関連にかかわる APTX (aprataxin), TDPI (tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1), SETX (senataxin), MED25 (mediator complex subunit 25), プリン・核酸代謝に関連する PRPS1 (phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1), 各膜蛋白 LMNA (laminA/C) などがある。また、tRNA の合成を助

ける酵素である GARS (glycyl-tRNA synthetase), YARS (tyrosyl-tRNA synthetase), AARS (*alanyl-tRNA synthetase*), KARS (lysyl-tRNA synthetase) が報告され、tRNA 合成酵素の異常が CMT 原因として 4 つも発見されたことは、非常に興味深い。この機序では、tRNA 合成酵素の異常により、蛋白合成 (翻訳) の部分で障害がおこることが想定される。先に述べた DNA 関連、RNA 関連、tRNA 関連、プリン体合成の異常は、最終的には蛋白質合成を障害することとなる。すなわち神経細胞のように大きな細胞においては、細胞を維持するための蛋白の供給が十分でないということが、強い障害因子になるのかもしれない。蛋白の輸送にかかわる蛋白の異常も同様な機序である可能性がある。

その他、イオンチャンネルの関連では、脳梁欠損をともなう重症型ニューロパチーの Andermann 症候群の原因として K-Cl トランスポーターの KCC3 (potassium-chloride cotransporter, CMT2C の原因として Ca^{2+} 浸透圧性カチオンチャンネルをコードする TRPV4 (*transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4*) がある。詳細な機序については不明である。

最後に運動ニューロン病にも近い HMN の原因として 10 の遺伝子が報告されているが、その中の HSPB1 (*heat shock 27kDa protein 1*), HSPB8 (*heat shock 22kDa protein 8*), GARS (*glycyl-tRNA synthetase*), BCSL2 (*Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2*), TRPV4 (*transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4*) の 5 つが、CMT2 と HMN の両疾患の原因となる。これらの 5 つの蛋白は、様々な機序にわたっており、今後も多くの原因遺伝子が両疾患にまたがって発見されるであろう。

終わりに

われわれのデザインした CMT 診断マイクロアレイ DNA チップを使用することで、既知の遺伝子の網羅的スクリーニングが可能となったが、実際に多数例におこなってみるとこれまで発見された原因遺伝子だけでは十分でなく、さらなる原因遺伝子を見つけ出す必要があることがわかった。それに対して近年、驚くべきスピードで発展している遺伝子解析技術により、2010 年には 1 患者の遺伝子診断をおこなうために個人のゲノム全塩基配列を次世代シーケンサーで解読し、原因を確認したという報告がなされた¹³⁾。それからまだ 2 年は経たないが、その時点よりもはるかに次世代シーケンサーの技術も発達し、多数例に包括的な検索が可能となった。それらの方法により、疾患原因遺伝子のおおよそが判明すれば、一般的な研究室においても 10~20 億塩基を 1 日で決定できるような小型ゲノムシーケンサーをもちいて、安価で迅速に遺伝子診断をできるようになるであろう。

CMT や HMN の現在までの分子病態を概説した。より多くの遺伝的原因解明により、CMT や HMN の分子メカニズムの全体像が明らかとなり、そのことは末梢神経疾患のみならず、神経変性疾患の全体の理解を深めるものと思われる。

謝辞：当研究は厚生労働省難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究、「シャルコー・マリー・トゥース病の診断・治療・ケアに関する研究」班、厚生労働省精神・神経疾患研究開発費（課題番号 22-4）、難治性ニューロパチーの診断技術と治療法の開発に関する研究、厚生労働省障害者対策事業（神経分野）ニューロパチーの病態解明に関する研究、によりおこなわれた。

日本全国より当研究に協力していただいた患者様および諸先生に感謝いたします。また本研究を実施するにあたり橋口昭大氏、徳永章子氏、樋口雄二郎、吉村明子氏に協力をいただき感謝いたします。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文 献

- 1) Kuhlenbaumer G, Hannibal MC, Nelis E, et al. Mutations in SEPT9 cause hereditary neuralgic amyotrophy. *Nat Genet* 2005;37:1044-1046.
- 2) Ueda M, Kawamura N, Tateishi T, et al. Phenotypic spectrum of hereditary neuralgic amyotrophy caused by the SEPT9 R88W mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:94-96.
- 3) Boerkoel CF, Takashima H, Garcia CA, et al. Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol* 2002;51:190-201.
- 4) Szigeti K, Nelis E, Lupski JR. Molecular diagnostics of Charcot-Marie-Tooth disease and related peripheral neuropathies. *Neuromolecular Med* 2006;8:243-254.
- 5) Saporta AS, Sottile SL, Miller LJ, et al. Charcot-Marie-

Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. *Ann Neurol* 2011;69:22-33.

- 6) Abe A, Numakura C, Kijima K, et al. Molecular diagnosis and clinical onset of Charcot-Marie-Tooth disease in Japan. *J Hum Genet* 2011;56:364-368.
- 7) 橋口昭大, 高嶋 博. シャルコー・マリー・トゥース病 200 例のマイクロアレイ DNA チップによる遺伝子診断. *末梢神経* 2011;22:64-71.
- 8) Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, et al. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* 2004;10:396-401.
- 9) Pareyson D, Reilly MM, Schenone A, et al. Ascorbic acid in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT-TRIAAL and CMT-TRAUK): a double-blind randomised trial. *Lancet Neurol* 2011;10:320-328.
- 10) Burns J, Joseph PD, Rose KJ, et al. Effect of oral curcumin on Déjérine-Sottas disease. *Ped iatr Neurol* 2009;41:305-308.
- 11) Zimon M, Baets J, Fabrizi GM, et al. Dominant GDAP1 mutations cause predominantly mild CMT phenotypes. *Neurology* 2011;77:540-548.
- 12) d'Ydewalle C, Krishnan J, Chiheb DM, et al. HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* 2011;17:968-974.
- 13) Lupski JR, Reid JG, Gonzaga-Jauregui C, et al. Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *N Engl J Med* 2010;362:1181-1191.

Abstract**Genetic diagnosis and molecular pathology of inherited neuropathy**

Hiroshi Takashima, M.D. Ph.D.

Department of Neurology and Geriatrics, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

Recent advances in genetic analysis technology have enabled a surprising progress in genetic diagnosis in the field of neurological disease research. High-throughput molecular biology techniques, such as microarrays and next-generation sequencing, are the major contributors to this progress and to new discoveries. Charcot-Marie-Tooth disease (CMT), a known hereditary motor and sensory neuropathy, is clinically and genetically heterogeneous. Genetic studies have revealed at least 35 disease causing-genes responsible for Charcot-Marie-Tooth disease. Genetic studies have revealed that abnormalities in the following factors are the cause of inherited neuropathies: myelin components, transcription factors controlling myelination, myelin maintenance system, differentiation factors related to the peripheral nerve, neurofilaments, protein transfer system, mitochondrial proteins, DNA repair, RNA/protein synthesis, ion channels, and aminoacyl-tRNA synthetase. On the other hand concomitant with the increase in the number of genes that must be screened for mutations, the labor and reagent costs for molecular genetic testing have increased significantly. Therefore, new methodology for detecting gene mutations is required. Based on the recent progress in DNA analysis methods, resequencing microarray appears to be an economical and highly sensitive method for detecting mutations. We have been screening CMT patients for mutations using originally designed microarray DNA chips since 2007, thencehaving identified disease causing mutations in *MPZ*, *GJB1*, *PMP22*, *EGR2*, *MFN2*, *NEFL*, *PRX*, *AARS*, *GARS*, *DNM2*, and *SETX* genes in CMT patients.

(Clin Neurol 2012;52:399-404)

Key words: inherited neuropathy, Charcot-Marie-Tooth disease, genetic diagnosis, microarrays, resequencing
