30－6　運動症状を主症状とする小児期発症稀少難治性神経疾患研究

主任研究者　国立精神・神経医療研究センター

佐々木征行

総括研究報告

１．研究目的

小児の①Movement disorders（ジストニアなどの不随意運動症），②小脳性運動失調症、③痙性対麻痺、そして④発達性てんかん性脳症（DEE: Developmental and epileptic encephalopathy. 大田原症候群；EIEE、West 症候群など）を主な対象とする。いずれも発症頻度が低く通常検査で原因確定困難である。近年これらの疾患では、原因遺伝子が確定され分子レベルで病態が解明されつつある。本研究班では以下の研究を行う。

１）患者疫学調査。上記該当患者を登録して臨床像（神経学的所見、頭部画像所見等）を記録。

２）患者参加型の登録レジストリの確立。

３）次世代シークエンサーによる遺伝子解析で原因遺伝子探索を行う。ターゲットスクリーニングや必要に応じて全エクソーム解析を実施。

４）遺伝子診断などで確定した疾患について、その臨床像から診断ガイドライン（診断マニュアル）を作成。遺伝子情報から分子生物学的病態について検討し、治療研究を目指す。

２．研究組織

主任研究者：

佐々木征行　国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科

分担研究者：

加藤光広　昭和大学医学部小児科

遠山　潤　国立病院機構西新潟中央病院神経小児科

松本直通　横浜市立大学医学研究科遺伝学

井上　健　国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究２部

佐藤典子　国立精神・神経医療研究センター病院放射線診療部

齋藤貴志　国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科

石山昭彦　同上

竹下絵里　同上

本橋裕子　同上

３．研究成果

１）患者疫学調査

本橋らは、小児期発症の小脳性運動失調症の疫学調査を行い論文発表した[1)]。

竹下らは、不随意運動症の一つであるジストニアの小児期発症例について疫学調査を行った。小児対象のジストニア大規模調査は少ない。2020 年に全国の小児神経専門医を対象にアンケート調査を実施し、全体で 676 例、遺伝性が 436 例（DYT シリーズ 296 例、NBIA シリーズ 33 例、その他 107 例）集計された。二次調査を進めている。

本研究班では、小児期発症の小脳性運動失調症とジストニアについて大きな調査を実施することができた。今後の医療発展のため、この結果が基礎資料として活用されることを期待したい。

２）患者参加型登録システムについては本研究班では作成できなかった。

３）次世代シークエンサーによる遺伝子解析

加藤、齋藤、松本らは、大脳皮質形成異常の一つ polymicrogyria を呈した 2 症例で、てんかん性脳症の原因遺伝子である *SCN3A*（ナトリウムチャンネル Nav1.3 をコードする）にミスセンス変異（p.Ile875Thr）を同定した[2)]。これまでこのチャネル異常が大脳皮質形成異常を引き起こすことは知られていなかったため、脳形成異常の新たな分子機構が存在することを示した。

松本らは、発達性てんかん性脳症（DEE）の原因遺伝子探索のため全エクソーム解析を実施し、原因遺伝子を多数見出した[3)]。次世代シークエンサーによる遺伝子解析により様々な疾患の新規原因遺伝子（*PRUNE1*[4)], *SMC1A* など）を見出した。

４）診断ガイドライン（診断マニュアル）

佐々木らは、*ATP1*A3 関連神経疾患の主な病型について診断基準案を作成した。さらにこれまでに報告のない緩徐進行性小脳性運動失調症を呈した *ATP1A3* 関連神経疾患の 2 例を報告し[5)]、*ATP1A3* 関連疾患群の臨床的多様性を一層広げた。

加藤、松本らは、大脳皮質形成異常を呈した複数の症例で *ATP1A3* 異常を見出し、*ATP1A3* 関連疾患群の概念を一層拡大させた[6)]。

石山らは、*CACNA1A* 異常を呈した発作性失調 2 型の症例において、単線維針筋電図で jitter（振動）を見出した[7)]。電気生理学的検査で本遺伝子異常を疑える可能性があり、診断に有用となる。

佐藤らは MR 拡散テンソル画像（Diffusion tensor imaging：DTI）の手法を用いて、最重症てんかんを呈す片側巨脳症において皮質橋小脳路の走行異常や、滑脳症・帯状異所性灰白質スペクトルム重症例における橋での皮質脊髄路の走行異常を示した[8]。さらに SWI（susceptibility-weighted image）や DIR(double inversion recovery)など新たな MR 手法を用い、福山型筋ジストロフィー例で脳幹の神経細胞遊走障害や静脈異常、高頻度の出血など新知見を示した[9]。

５）治療研究

井上らは、PLP 遺伝子異常である Pelizaeus-Merzbacher 病例に、PLP 蛋白の産生や組み立てに影響を与えるクルクミン治療を試みた。1 年間の治験を 9 例で実施した。結果は集計中である。

遠山らは、脳内 NMDA 受容体を構成する GluN1 サブユニットをコードする *GRIN1* 遺伝子変異例と GluN2A サブユニットをコードする *GRIN2A* 変異をもつ例を報告し[10]、その神経症状にメマンチンの有効性を検討した。てんかん発作や不随意運動，行動面の改善がみられた。また Angelman 症候群に対してペランパネルを使用し，ミオクローヌスやてんかん発作への有効性を確認した。

４．研究成果刊行一覧

1. Ono H, Shimizu-Motohashi Y, Takeshita E, Ishiyama A, Saito T, Sasaki M, et al. Childhood-onset cerebellar ataxia in Japan: A questionnaire-based survey. *Brain Behav.* 2019;9:e01392. doi: 10.1002/brb3.1392.
2. Miyatake S, Kato M, Saito T, Matsumoto N, et al. Recurrent *SCN3A* p.Ile875Thr variant in patients with polymicrogyria. *Ann Neurol.* 2018:84:159-61. doi: 10.1002/ana.25256.
3. Takata A, Tohyama J, Sasaki M, Kato M, Matsumoto N, et al. Comprehensive analysis of coding variants highlights genetic complexity in developmental and epileptic encephalopathy. *Nat Commun.* 2019;10: 2506. doi: 10.1038/s41467-019-10482-9.
4. Imagawa E, Kato M, Sasaki M, Matsumoto N. et al. *PRUNE1*-related disorder: expanding the clinical spectrum. *Clin Genet.* 2018;94:362-7. doi: 10.1111/cge.13385.
5. Sasaki M, Shimizu-Motohashi Y, Takeshita E, Matsumoto N, et al. *ATP1A3* variants and slowly progressive cerebellar ataxia without paroxysmal or episodic symptoms in children. *Dev Med Child Neurol.* 2021;63:111-5. doi: 10.1111/dmcn.14666.
6. Miyatake S*, Kato M*, Kumamoto T, Matsumoto N, et al. De novo *ATP1A3* variants cause polymicrogyria. *Sci Adv.* 2021 Mar 24;7(13):eabd2368. doi: 10.1126/sciadv.abd2368. （*co-first author）
7. Hirasawa-Inoue A, Ishiyama A, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Saito T, Matsumoto N, Sasaki M, et al. Single-fiber electromyography-based diagnosis of *CACNA1A* mutation in children: A potential role of the electrodiagnosis in the era of whole exome sequencing. *Brain Dev.* 2019; 41: 905-9. doi: 10.1016/j.braindev.
8. Enokizono M, Sato N, Sasaki M, et al. Disrupted cortico-ponto-cerebellar pathway in patients with hemimegalencephaly. *Brain Dev.* 2019;41:507-15. doi: 10.1016/j.braindev.2019.01.002.
9. Hirasawa-Inoue A, Sato N, Ishiyama A, Takeshita E, Sasaki M, et al.　New MRI findings in Fukuyama congenital muscular dystrophy: brain stem and venous system anomalies.　*AJNR Am J Neuroradiol.* 2020;41:1094-98　doi: 10.3174/ajnr.A6577.
10. Tsuchida N, Kato M, Tohyama J, Matsumoto N, et al. *GRIN2D* variants in three cases of developmental and epileptic encephalopathy. *Clin Genet.* 2018;94:538-47. doi: 10.1111/cge.13454.

運動症状を主症状とする小児期発症稀少難治性神経疾患の病因・病態と診断・治療研究
分担研究報告書

1. *ATP1A3* 関連神経疾患の研究

分担研究者：佐々木征行
所属機関名：国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科

1 年度（平成 30 年度）:
緩徐進行性小脳失調を主症状とする、これまでに報告のない *ATP1A3* 関連神経疾患について
【はじめに】*ATP1A3* 関連神経疾患は、これまでに小児交互性片麻痺(AHC：Alternating hemiplegia of childhood)[1)]、RDP(Rapid-onset dystonia-Parkinsonism; DYT12)[2)]、CAPOS (Cerebellar ataxia with pes cavus, optic atrophy, and sensory neural hearing loss)[3)]、熱誘発性発作性脱力・脳症(FIPWE：Fever-induced paroxysmal weakness and encephalopathy)[4)]、新生児期発症てんかん性脳症[5, 6, 7)]などが報告された。反復性麻痺発作を伴わず緩徐進行性小脳失調症を主症状とした２例に *ATP1A3* 遺伝子変異を見出した。
【症例１】17 歳男性。小脳性失調症状と頭部 MRI での小脳皮質萎縮を認め、孤発性小脳性運動失調症と診断し、エクソーム解析を実施したところ、*ATP1A3* 遺伝子の新規変異（c.460A>G: p.Met154Val）を認めた。
【症例２】12 歳女児。１歳児健診で発達の遅れあり．３歳近くになりようやく歩行可能となるも不安定で転倒しやすかった．小脳失調（失調性歩行、測定障害、振戦）を認め、頭部 MRI で軽度の小脳皮質萎縮を認めた。孤発性小脳性運動失調症と診断し、エクソーム解析を実施したところ、*ATP1A3* 遺伝子の新規変異（c.1050C>A: p.Asn350Lys, N350K）を認めた。
【考察】本例は乳幼児期に発症した緩徐進行性小脳性運動失調（SPCA: slowly progressive cerebellar ataxia）を主症状とし、これまで報告された *ATP1A3* 関連神経疾患のいずれにも該当しない新しい臨床病型であった。小脳失調自体は AHC でも CAPOS でも FIPWE でも認められるので、*ATP1A3* 関連神経疾患の基本的な症状の一つであると考える。また頭部画像所見でも小脳皮質萎縮は *ATP1A3* 関連疾患に共通した異常である可能性がある。
　近年欧米より小児期発症統合失調症の患者から *ATP1A3* 遺伝子変異が見いだされたと複数の報告がある[8)]。*ATP1A3* がコードする Na^+/K^+-ATPase α3 サブユニットは大脳皮質・基底核および小脳皮質に多く発現していることから、てんかん・知的障害・不随意運動症・小脳失調などを組み合わせた様々な症状が起き得ることが予想できる。これらは必ずしもこれまでの診断基準通りの臨床像を呈す必要はない[9)]。今後も *ATP1A3* 関連神経疾患の臨床的スペクトラムがさらに広がる可能性がある。

2 年度（令和 1 年度）:
***ATP1A3* 関連神経疾患で認められた小脳萎縮について**
【はじめに】*ATP1A3* 関連神経疾患においては、頭部画像学的検討では脳形態に異常を来さないということがこれまで大きな特徴とされてきた。しかし、我々が報告した SPCA 型の 2 症例においては、すでに小児期より小脳萎縮を認めていた[10)]。改めて *ATP1A3* 関連神経疾患での小脳萎縮の有無と、小脳萎縮を認める際の小脳形態の特徴について検討した。
【対象と方法】当小児神経科を受診し、遺伝子検査で *ATP1A3* 異常を認めた 20 例を対象とした。年齢は 2 歳から 50 歳にわたっていた。臨床診断は、AHC 15 例、RECA 1 例、SPCA 2 例である。それぞれの患者で頭部 MRI を施行し、小脳萎縮の有無を検討した。
【結果】AHC においては 9 例で小脳萎縮を認めた。RECA 例には小脳萎縮を認めず、SPCA の

2 例はいずれも軽度の小脳皮質萎縮を認めた。

小脳萎縮を認めた 11 例では全般的な小脳皮質萎縮が共通した所見であった。この中で純粋な小脳萎縮だけを認めた例が 4 例、小脳萎縮に加えて前頭葉および海馬萎縮を伴った例が 7 例あった。後者の 7 例はいずれもけいれん重積を繰り返し、知的退行および運動退行が著しくいずれも常時臥床の状態であった。一方小脳萎縮だけを認めた 4 例では、いずれも緩徐進行性の小脳性運動失調を認めた。

【考察】*ATP1A3* がコードする Na^+/K^+-ATPase α3 サブユニットは大脳皮質・基底核および小脳皮質に多く発現していることが知られている [11]。そのため *ATP1A3* の変異により Na^+/K^+-ATPase α3 サブユニットの発現量や機能に異常を来し、*ATP1A3* 関連神経疾患では大脳皮質、基底核あるいは小脳の異常に由来する症状を呈すると考えられる。本症においては、てんかん・知的障害・不随意運動症・小脳失調などを組み合わせた様々な症状が起き得ることは、この遺伝子産物の発現部位と大いに関連があるといっていいだろう。

ATP1A3 関連神経疾患では発症当初は頭部 MRI で脳形態異常がないことがほとんどであるが、その進行過程でとくに小脳性運動失調症を来す例では緩徐進行性小脳皮質萎縮を来す症例が半数近くある [12] ことから、小脳皮質萎縮は *ATP1A3* 関連神経疾患では比較的ありふれた画像所見である可能性が想定される。

3 年度（令和 2 年度）:

ATP1A3 関連神経疾患の臨床的多様性について

【はじめに】*ATP1A3* 関連神経疾患の症状は、多くは発作的な運動麻痺・小脳失調・ジストニアなどがこれまでに報告されてきた。SPCA（slowly progressive cerebellar ataxia）型では発作的な症状を呈さないことが大きな特徴であった。改めて *ATP1A3* 関連神経疾患の臨床像の多様性についてまとめた。

【対象と方法】（１）2010 年以降に当科通院歴あるいは入院歴のある *ATP1A3* 関連神経疾患の自験例について診療録を用いて後方視的に集計した。

（２）これまでに論文報告された *APT1A3* 関連神経疾患に関する情報を集計した。

【結果】（１）AHC １７名、CAPOS １名、RECA １名、SPCA2 名、AHC と RDP の中間型１名 [9] の自験例があった。*ATP1A3* 関連神経疾患自体が多くはなく、中でも AHC 以外は非常に少ない。

（２）すでに *ATP1A3* 関連神経疾患の病型として確立しているのは、上記①AHC、②RDP、③CAPOS、④RECA/FIPWE、⑤EOEE がある。

（３）これらの他にこれまでに報告されてきた *ATP1A3* 関連神経疾患の病型は、⑥急性発症する小脳性失調症（ROA : Rapid—onset cerebellar ataxia）[13, 14]、我々の報告した⑦緩徐進行性小脳失調症（SPCA : Slowly progressive cerebellar ataxia）[10]、⑧小児期発症統合失調症（COS : childhood-onset schizophrenia）[15]、⑨自閉スペクトラム症（ASD : autism spectrum disorders）[16] などがある。

【考察】*ATP1A3* 関連神経疾患の各病型の臨床症状を表１、表２にまとめた。全病型に共通する症状はなかった。多くの病型で共有する症状としては、ジストニア（Dystonia）、てんかん（Epilepsy）、失調（Ataxia）、知的障害（Cognitive impairment）、腱反射消失（Areflexia）、嚥下障害（Dysphagia）、退行（Regression）、症状の変動（Fluctuation）、自閉症状（Autism）などであった。逆に症状から *ATP1A3* 関連神経疾患の病型が限られるものとしては、繰り返す片麻痺発作と眼振は小児交互性片麻痺（AHC）を、凹足・視神経萎縮・難聴は CAPOS を、そして若年型統合失調症症状は COS を強く疑わせる。ただしこれらの症状は非特異的であるため、確定診断には *APT1A3* の解析が必要である。

ATP1A3 関連疾患には小脳性失調を呈す例が多く、小脳萎縮を呈す例が多いこともすでに報告

した[12]。Na-K ATPase の α3 サブユニットが小脳皮質を含む中枢神経系に多く発現していることが知られており[11]、関連があると考えられる。

ATP1A3 関連神経疾患のほとんどは、Na^{+}-K^{+} ATPase の α3 サブユニットをコードする *ATP1A3* のヘテロ接合性点突然変異により発症する。*ATP1A3* 関連神経疾患の臨床症状は、この突然変異部位とかなりはっきりした臨床型と遺伝子型の相関関係（phenotype-genotype relationship）を持つことが知られている。

RDP は AHC と基本的に異なる部位に変異をもつ。例外的に D923N 変異では RDP あるいは AHC のどちらかの症状を呈す[9]。また D801 の変異ではアミノ酸の違いによって、RDP になる場合（D801Y）と AHC になる場合（D801N）がきれいに分かれている。

特定の臨床型に対応する遺伝子変異部位が関係しているものとして、CAPOS の E818K 変異[3]、RECA/FIPWE の R756（H, C, L）変異[4,17]がよく知られている。しかし、これ以外の小数例しか報告のない臨床型では、特定の遺伝子変異が決まっているかどうかは、まだはっきりしていない。AHC だけでも５０個以上の病的変異の報告があり、この中で D801N と E815K 変異が半数以上を占めている。我々は、日本人患者においては AHC の中だけでも D801N と E815K 変異では臨床症状に大きな差異があることを見出し報告した[1]。

遺伝子変異の部位により Na^{+}-K^{+} ATPase の働きが大きな影響を受けることが想定されている。現在 ATP1A3 遺伝子に病的変異を導入したモデル細胞やモデルマウスが作成され、病態の解明と治療法の開発研究が行われている。また患者細胞から iPS 細胞を樹立し新たな治療法開発研究が進められている。最近は CRISPR/cas9 の技術を応用した治療研究も進められている。

参考文献

1) Sasaki M, Ishii A, Saito Y, et al. Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood. *Neurology.* 2014; 82: 482-490.
2) Brashear A, Dobyns WB, de Carvalho Aguiar P, et al. The phenotypic spectrum of rapid-onset dystonia-parkinsonism (RDP) and mutations in the ATP1A3 gene. *Brain.* 2007;130:828-35.
3) Demos MK, van Karnebeek CD, Ross CJ, et al. A novel recurrent mutation in ATP1A3 causes CAPOS syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:15.
4) Yano ST, Silver K, Young R, et al. Fever-Induced Paroxysmal Weakness and Encephalopathy, a New Phenotype of ATP1A3 Mutation. *Pediatr Neurol.* 2017;73:101-105.
5) Paciorkowski AR, McDaniel SS, Jansen LA, et al. Novel mutations in ATP1A3 associated with catastrophic early life epilepsy, episodic prolonged apnea, and postnatal microcephaly. *Epilepsia.* 2015;56:422-30.
6) Marzin P, Mignot C, Dorison N, et al. Early-onset encephalopathy with paroxysmal movement disorders and epileptic seizures without hemiplegic attacks: About three children with novel ATP1A3 mutations. *Brain Dev.* 2018;40:768-74.
7) Ishihara N, Inagaki H, Miyake M, et al. A case of early onset life-threatening epilepsy associated with a novel ATP1A3 gene variant. *Brain Dev.* 2019;41:285-91.
8) Smedemark-Margulies N, Brownstein CA, et al. A novel de novo mutation in ATP1A3 and childhood-onset schizophrenia. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2016;2:a001008.
9) Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Hirose S. Intermediate form between alternating hemiplegia of childhood and rapid-onset dystonia-parkinsonism. *Mov Disord.* 2014;29:153-4.
10) Sasaki M, Sumitomo N, Shimizu-Motohashi Y, Takeshita E, Kurosawa K, Kosaki K, Iwama

K, Mizuguchi T, Matsumoto N. ATP1A3 variants and slowly progressive cerebellar ataxia without paroxysmal or episodic symptoms in children. *Dev Med Child Neurol.* 2021 Jan;63(1):111-115. doi: 10.1111/dmcn.14666.

11) McGrail KM, Phillips JM, Sweadner KJ. Immunofluorescent localization of three Na, K-ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na K-ATPase. *J Neurosc* 1991;11:381–91.

12) Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Hirose S. Progressive brain atrophy in alternating hemiplegia of childhood. *Mov Disord Clin Prac* 2017;4:406-11.

13) Schirinzi T, Graziola F, Nicita F, et al. Childhood rapid-onset ataxia: expanding the phenotypic spectrum of ATP1A3 mutations. Cerebellum. 2018;17:489-93.

14) Sweadner KJ, Toro C, Whitlow CT, Snively BM, Cook JF, Ozelius LJ, Markello TC, Brashear A. ATP1A3 Mutation in adult rapid-onset ataxia. PLoS One. 2016;11:e0151429.

15) Smedemark-Margulies N, Brownstein CA, Vargas S, et al. A novel de novo mutation in *ATP1A3* and childhood-onset schizophrenia. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2016;2:a001008.

16) Torres A, Brownstein CA, Tembulkar SK, et al. *De novo ATP1A3* and compound heterozygous *NLRP3* mutations in a child with autism spectrum disorder, episodic fatigue and somnolence, and muckle-wells syndrome. *Mol Genet Metab Rep.* 2018;16:23-9.

17) Dard R, Mignot C, Durr A, et al. Relapsing encephalopathy with cerebellar ataxia related to an *ATP1A3* mutation. *Dev Med Child Neurol.* 2015;57:1183-6.

表１．*ATP1A3*関連神経疾患の主な病型とその主症状　（１）小脳症状と頭部 MRI

	AHC	RDP	CAPOS	RECA/FIPWE	ROA（Rapid-onset ataxia）	SPCA
Main symptoms	Repeated attacks of hemiplegia that alternate laterality. Dystonic spells. Seizure-like episodes	Rapid-onset of dystonia and parkinsonism. Prominent bulbar findings	Cerebellar ataxia, areflexia, pes cavus, optic atrophy, and sensorineural hearing loss	Relapsing cerebellar ataxia and/or weakness	Rapid-onset of cerebellar ataxia	Slowly progressive cerebellar ataxia (SPCA)
Paroxysmal or episodic symptoms. Frequency	Paroxysmal onset of hemiplegia. Several times a month	Rapid-onset dystonia. Rarely repeated	Episodic cerebellar ataxia. Less than 1/a year.	Episodic onset ataxia/weak-ness. Less than 1/a year	Rapid-onset and stabilized ataxia. Rarely repeated	No paroxysmal nor episodic symptoms
Cerebellar symptoms	Ataxia (slowly progressive in some cases)	Ataxia	Ataxia (recover or persistent)	Ataxia (stepwise progressive)	Ataxia (rapid-onset, stabilized)	Ataxia (insidious onset)
Brain MRI findings	Cerebellar cortical atrophy (in some cases)	Normal	Normal	Normal	Cerebellar cortical atrophy	Cerebellar cortical atrophy

表２．*ATP1A3*関連神経疾患の主な病型とその主症状　（２）主な臨床症状のまとめ

Type / Symptoms	AHC	RDP	CAPOS	RECA/FIPWE	ROA（Rapid-onset Ataxia）	SPCA	Epileptic Encephalopathy	Autism	COS
Repeated attacks of hemiplegia	◎								
Dystonia	○	○		○					
Epilepsy	○			○			○		
Ataxia	○	○	○	○	○	○			
Areflexia	○		○	○					
Dysphagia	○	○		○					
Cognitive impairment	○	○	○			○	○	○	
Regression	○	○	○		○		○		
Fluctuation	○		○	○					
Autism	○		○					〇	
Schizophrenia									◎
Nystagmus	◎								
Pes cavus			◎						
Optic atrophy			◎						
Deafness (sensorineural hearing loss)			◎						

研究成果刊行一覧

1) Ishiyama A, Kimura Y, Iida A, Saito Y, Miyamoto Y, Okada M, Sato N, Nishino I, Sasaki M. Transient swelling in the globus pallidus and substantia nigra in childhood suggests SENDA/BPAN. *Neurology.* 2018 May 22;90(21):974-976. doi: 10.1212/WNL.0000000000005564.
2) Takeguchi R, Haginoya K, Uchiyama Y, Fujita A, Nagura M, Takeshita E, Inui T, Okubo Y, Sato R, Miyabayashi T, Togashi N, Saito T, Nakagawa E, Sugai K, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N, Sasaki M. Two Japanese cases of epileptic encephalopathy associated with an *FGF12* mutation. *Brain Dev.* 2018 Sep;40(8):728-732. doi: 10.1016/j.braindev.2018.04.002
3) Imagawa E, Yamamoto Y, Mitsuhashi S, Isidor B, Fukuyama T, Kato M, Sasaki M, Tanabe S, Miyatake S, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Matsumoto N. *PRUNE1*-related disorder: expanding the clinical spectrum. *Clin Genet.* 2018 Oct;94(3-4):362-367. doi: 10.1111/cge.13385.
4) Enokizono M, Sato N, Ota M, Shigemoto Y, Morimoto E, Oba M, Sone D, Kimura Y, Sugai K, Sasaki M, Ikegaya N, Iwasaki M, Matsuda H. Disrupted cortico-ponto-cerebellar pathway in patients with hemimegalencephaly. *Brain Dev.* 2019 Jun;41(6):507-515. doi: 10.1016/j.braindev.2019.01.002.
5) Takata A, Nakashima M, Saitsu H, Mizuguchi T, Mitsuhashi S, Takahashi Y, Okamoto N, Osaka H, Nakamura K, Tohyama J, Haginoya K, Takeshita S, Kuki I, Okanishi T, Goto T, Sasaki M, Sakai Y, Miyake N, Miyatake S, Tsuchida N, Iwama K, Minase G, Sekiguchi F, Fujita A, Imagawa E, Koshimizu E, Uchiyama Y, Hamanaka K, Ohba C, Itai T, Aoi H, Saida K, Sakaguchi T, Den K, Takahashi R, Ikeda H, Yamaguchi T, Tsukamoto K, Yoshitomi S, Oboshi T, Imai K, Kimizu T, Kobayashi Y, Kubota M, Kashii H, Baba S, Iai M, Kira R, Hara M, Ohta M, Miyata Y, Miyata R, Takanashi JI, Matsui J, Yokochi K, Shimono M, Amamoto M, Takayama R, Hirabayashi S, Aiba K, Matsumoto H, Nabatame S, Shiihara T, Kato M, Matsumoto N. Comprehensive analysis of coding variants highlights genetic complexity in developmental and epileptic encephalopathy. *Nat Commun.* 2019 Jun 7;10(1):2506. doi: 10.1038/s41467-019-10482-9.
6) Ono H, Shimizu-Motohashi Y, Maruo K, Takeshita E, Ishiyama A, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sasaki M. Childhood-onset cerebellar ataxia in Japan: A questionnaire-based survey. *Brain Behav.* 2019 Oct;9(10):e01392. doi: 10.1002/brb3.1392.
7) Hirasawa-Inoue A, Ishiyama A, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Yuasa S, Saitsu H, Hamanaka K, Miyatake S, Matsumoto N, Sasaki M. Single-fiber electromyography-based diagnosis of *CACNA1A* mutation in children: A potential role of the electrodiagnosis in the era of whole exome sequencing. *Brain Dev.* 2019 Nov;41(10):905-909. doi: 10.1016/j.braindev.2019.06.006.
8) Saito T, Sugai K, Takahashi A, Ikegaya N, Nakagawa E, Sasaki M, Iwasaki M, Otsuki T. Transient water-electrolyte disturbance after hemispherotomy in young infants with epileptic encephalopathy. *Childs Nerv Syst.* 2020 May;36(5):1043-1048. doi: 10.1007/s00381-019-04452-1.
9) Hirasawa-Inoue A, Sato N, Shigemoto Y, Kimura Y, Ishiyama A, Takeshita E, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Takahashi Y, Komaki H, Matsuda H, Sasaki M. New MRI findings in Fukuyama congenital muscular dystrophy: brain stem and venous system anomalies. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2020 Jun;41(6):1094-1098. doi: 10.3174/ajnr.A6577.
10) Tabata K, Iida A, Takeshita E, Nakagawa E, Sato N, Sasaki M, Inoue K, Goto YI. A novel pathogenic *NFIX* variant in a Malan syndrome patient associated with hindbrain overcrowding. *J Neurol Sci.* 2020 May 15;412:116758. doi: 10.1016/j.jns.2020.116758.
11) Sasaki M, Sumitomo N, Shimizu-Motohashi Y, Takeshita E, Kurosawa K, Kosaki K, Iwama K, Mizuguchi T, Matsumoto N. *ATP1A3* variants and slowly progressive cerebellar ataxia without paroxysmal or episodic symptoms in children. *Dev Med Child Neurol.* 2021 Jan;63(1):111-115. doi: 10.1111/dmcn.14666.

2. 運動症状を主症状とする小児期発症稀少難治性神経疾患の病態解析

分担研究者　石山昭彦
所属機関名　国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科

【緒言】小児期発症の稀少難治性神経疾患領域では、近年の遺伝子解析技術の進歩により新しい原因遺伝子が同定され、分子生物学レベルでの新しい病態が明らかになってきている。一方で臨床的な評価の面では、その病態解析に遅れをとっていると言わざるを得ないのが現状であり、臨床的な視点に立っての表現型の分類や検査所見との関連、分子生物学的な病態と身体所見との関連についての見直しの必要性に迫られている。

運動症状を主症状とする小児期発症稀少難治性神経疾患の患者症例において、日常診療のみからでは診断や診療に苦慮する例を対象として、原因遺伝子の同定、その病態について解析を行った。

【方法】

（１）当院で継続診療している患者において、失調症状を呈する症例を対象に遺伝子解析を実施し、*CACNA1A* 変異が同定された 3 例（2-7 歳、男児 1 名、女児 2 名）を後方視的に見直し、遺伝子変異の確定に至るまでの診断背景、臨床像の特徴について検討を行った。臨床像の評価にあたり、客観的な根拠となりうる電気生理学的評価としての単一筋線維筋電図（single fiber electromyography; SFEMG）では、筋内軸索を電気刺激し得られた single fiber potential を計測する stimulated SFEMG にて行った。

（２）精神運動発達遅滞を認める患者家系 2 家系に対して、原因検索としてアレイ CGH を実施し、原因精査を実施した。

【結果】

（１）反復発作性運動失調症 2 型（EA2)、脊髄小脳失調症 6 型（SCA6)の原因遺伝子として知られる *CACNA1A* 変異の 3 例においては、確定前の臨床診断は、反復発作性運動失調症 2 型、てんかん性脳症、小児交互性片麻痺であった。*CACNA1A* 変異を裏付ける所見として行った SFEMG の jitter の評価項目である mean consecutive difference (MCD)値はいずれの症例も 41.6-68.7us (range 14.5-169.8us)であり、>25us と異常所見を呈しており、*CANNA1A* 変異が有意であることを示す客観的根拠となりえた。遺伝子変異確定前後で、単一筋線維筋電図を実施し、その異常所見が遺伝子診断前の臨床診断において、あるいは遺伝子変異が確定した後の病型を確認するにあたっての病態評価においても有効であることを報告した。

（２）また、運動症状および軽度発達遅滞を呈する 2 家系において精査のなかでアレイ CGH を実施し、1 家系で 13q13.3 の微小欠失を、もう一家系では 2p14 の欠失を同定し、前者では、中枢神経特異的に発現する *NBEA* を、後者では *ACTR2* が表現型に関与していることを見出した。

【考察】次世代シークエンスによる解析で遺伝子変異の解析が可能となった昨今において、時に臨床評価の再考も大切であるが、その再評価に際して臨床的な生理学的検査として単一筋線維筋電図の有用性も再認識された。*ATP1A3* 変異による運動症状を主症状とするような小児交互性片麻痺のような疾患においても、反復発作性運動失調症は鑑別として挙げるべき疾患であり、通常の診断評価としても見直されるべき検査法ではないかと考えられた。

小児期発症稀少難治性神経疾患の症例では、いまだに原因が確定せず、診断難治例も多い。分子生物学的な解析のみならず、臨床的な評価を掘り下げることも表現型を見直すためには重要であり、この先も分子病態、臨床評価の両者の面から病態解析をすすめていく必要性があると考えられた。

・研究成果刊行一覧

1）Miura M, Ishiyama A, Nakagawa E, Sasaki M, Kurosawa K, Inoue K, Goto YI. 13q13.3 microdeletion associated with apparently balanced translocation of 46,XX,t(7;13) suggests NBEA involvement. Brain Dev. 2020 Sep;42(8):581-586. doi: 10.1016/j.braindev.2020.05.006. Epub 2020 Jun 4.

2）Hirasawa-Inoue A, Ishiyama A, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Yuasa S, Saitsu H, Hamanaka K, Miyatake S, Matsumoto N, Sasaki M. Single-fiber electromyography-based diagnosis of CACNA1A mutation in children: A potential role of the electrodiagnosis in the era of whole exome sequencing.

3）Ishiyama A, Iida A, Hayashi S, Komaki H, Sasaki M, Nonaka I, Noguchi S, Nishino I. A novel LMNA mutation identified in a Japanese patient with LMNA-associated congenital muscular dystrophy. Hum Genome Var. 2018 Jul 20;5:19. doi: 10.1038/s41439-018-0018-6. eCollection 2018.

4）Oitani Y, Ishiyama A, Kosuga M, Iwasawa K, Ogata A, Tanaka F, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Komaki H, Nishino I, Okuyama T, Sasaki M. Interpretation of acid alpha-glucosidase activity in creatine kinase elevation: A case of Becker muscular dystrophy. Brain Dev. 2018 Oct;40(9):837-840. doi: 10.1016/j.braindev.2018.05.001. Epub 2018 May 16.

5）小野博也、石山昭彦、須貝研司、竹下絵里、本橋裕子、斎藤貴志、中川栄二、佐々木征行．環状 20 番染色体症候群の非けいれん性てんかん発作時脳波の検討．てんかん研究．2020 38: 19-27.

３．小児期発症のジストニアに関する研究

分担研究者：竹下絵里
研究機関名：国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科
研究協力者：同上　末永祐太、土岐平、本橋裕子、齋藤貴志、石山昭彦、佐々木征行

緒言

小児期にジストニアを発症する疾患は多岐に渡り、日本では 2018 年にジストニア診療ガイドラインが発刊され、臨床特徴と病因から病型分類を行うことが提唱されている。近年、次世代シークエンサーを用いた網羅的遺伝子解析技術の進歩により、原因不明とされていた疾患の責任遺伝子が次々に明らかになっており、特発性とされていたジストニアの病因が判明する場合もあるが、過去に日本で小児期発症のジストニアの臨床像を多数調査した研究は限られるため、本研究では、日本での小児期発症のジストニアの診療実態について、その原因、頻度、臨床的特徴を調査した。

方法

2018 年度に研究計画立案、研究開始準備を行い、2019 年度には当科での小児期発症ジストニアの診療録調査を行った。2014 年 1 月～2019 年 10 月に当科に受診歴のある患者のうち、20 歳以下でジストニアを発症した症例を対象に、診療録を後方視的に調査し、症例数、性別、調査時年齢、発症年齢、病因、病状の経過、頭部画像所見、治療について検討した。2020 年度には日本小児神経学会の認定する小児神経専門医を対象に小児期発症のジストニア診療に関する質問票調査を行った。日本小児神経学会の認定する小児神経専門医 1218 名を対象に、小児期発症のジストニア診療に関する一次調査質問票を郵送し、研究の同意を得られた対象者の回答結果を集計した。一次調査の際に協力の承諾を得た専門医には、さらに二次調査質問票を郵送し、研究の同意を得られた対象者の回答結果を集計した。

結果

2019 年度に実施した当科での小児期発症ジストニアの診療録調査では、対象は 152 例（男 85 例、女 67 例）で、調査時年齢 1 歳 6 か月～54 歳 2 か月（中央値 15 歳 0 か月）、発症年齢 0 歳 1 か月～14 歳 6 か月（中央値 2 歳 0 か月）だった。病因は、遺伝性 104 例（DYT シリーズ 45 例（DYT5 が 8 例、DYT10 が 19 例、DYT12 が 17 例）、NBIA シリーズ 6 例、その他の遺伝性疾患 53 例（ミトコンドリア病 6 例、両側線条体壊死 5 例））、後天性 47 例（周産期脳障害 25 例）、特発性 1 例だった。病状の経過は、停止性 88 例、進行性 64 例だった。頭部画像では、異常所見なし 49 例、皮質・白質・基底核病変あり 49 例、基底核病変あり 24 例、白質病変あり 25 例、皮質病変あり 5 例だった。ジストニア治療は、内服 1 剤が 51 例、2 剤が 23 例、3 剤以上が 78 例、うち 42 例が抗コリン薬を使用し、ほかに 8 例がボツリヌス療法、2 例がバクロフェン持続髄腔内投与療法、3 例が脳深部刺激療法、1 例が視床凝固術を行っていた。

2020 年度に実施した小児神経専門医を対象とした小児期発症のジストニア診療に関する質問票調査では、一次調査質問票は 560 名（46%）から回答があり、548 名（98%）が有効であった。現在主治医として小児期発症のジストニア患者の診療を行っているのは 149 名（27%）、行っていないのは 399 名（73%）であった。ジストニア患者の診療を行っている専門医 149 名のうち、診療している患者数 5 例未満が 108 名（72%）で、全体の患者数の合計は 676 例であった。患者の病型は、遺伝性が 436 例（64%）（DYT1 が 4 例、DYT5 が 58 例、DYT9 が 29 例、DYT10 が 149 例、DYT12 が 28 例、その他の DYT シリーズ

が 28 例、NBIA1 が 4 名、NBIA2A が 5 名、NBIA4 が 0 名、NBIA5 が 21 名、その他の NBIA シリーズが 3 例、その他の遺伝性疾患が 107 名）、後天性が 118 例（17%）（周産期脳障害が 74 例、感染症が 16 例、薬剤性・中毒性が 3 例、血管性が 4 例、新生物が 0 例、脳外傷が 11 例、心因性が 10 例）、特発性が 116 例（17%）（孤発性が 66 例、家族性が 50 例）、その他が 6 例（1%）であった。二次調査では 142 名(93%)の承諾が得られ、69 名(49%)から有効回答を得た。患者数は 182 例（男性 90 例、女性 92 例）、調査時年齢 1 歳 1 か月～50 歳（中央値 16 歳）、ジストニア発症年齢 0 か月～17 歳（中央値 5 歳）だった。病型は、遺伝性が 130 例（71%）（DYT10 が 55 例など）、後天性が 26 例（14%）（周産期脳障害 20 例など）、特発性 18 例（10%）、分類不能 8 例（5%）だった。遺伝学的検査は 83 例（45%）で施行され、72 例（87%）で病因が同定された。罹患部位は、右下肢 140 例（77%）、左下肢 140 例（77%）、右上肢 128（70%）、左上肢（68%）、体幹 74 例（41%）、頸部 60 例（33%）の順に多かった。病状の経過は、停止性 133 例（73%）、進行性 33 例（18%）、変動性については持続性 70 例（38%）、発作性 68 例（37%）だった。ジストニア以外の運動徴候は、81 例（45%）で認め、うち痙縮が 37 例（20%）、合併症は 116 例（64%）で認め、知的障害など中枢神経症状 104 例（57%）が最多だった。脳 MRI は 156 例（86%）で施行され、63 例（40%）に異常所見（基底核病変 34 例、白質病変 25 例、皮質病変 25 例、その他 26 例）を認めた。治療は 168 例（92%）で行われ、160 例（88%）が内服加療（1 剤 106 例、2 剤 23 例、3 剤以上 31 例）していた。他にボツリヌス療法 16 例（10%）、ケトン食療法 10 例（6%）、バクロフェン持続髄腔内投与療法 8 例（5%）、脳深部刺激療法 6 例（4%）など少数例は特殊治療が行われていた.

考察

当科の小児期発症ジストニア患者では、遺伝性が約 7 割で、特に DYT10 と DYT12 が多かった。その他の遺伝性疾患や後天性では基底核病変をきたす疾患が多く、頭部画像異常例では約半数は基底核病変を伴っていた。内科的治療は抗コリン薬の使用頻度が多く、少数例には特殊治療が実施されていた。

日本では、小児神経専門医を対象とした舟塚ら(2008 年)の先行研究で、患者数 579 例（一次性 146 例（25%）（遺伝性 103 例（17%））、二次性 433 例（75%）（脳性麻痺 196 例（34%）、神経変性疾患 153 例（26%）、代謝性疾患 23 例（4%）））と報告されていた。先行研究では脳性麻痺などの二次性が多く、本調査では遺伝性が多かった理由は、2008 年当時は原因不明だったジストニアの病因がその後原因遺伝子の解明により遺伝性と確定診断しやすくなった可能性が考えられた。さらに本調査で周産期脳障害が少数だったのは、周産期医療の進歩と質問票調査の限界の両方が要因として挙げられた。乳児期発症例は、罹患部位が多部位にわたり、持続性のジストニア、ジストニア以外の症状も多く、頭部画像検査で異常を有し、多様な治療を要す傾向があった。一方、乳児期以降の発症例は、遺伝性が多く、ジストニアは停止性で発作性に生じ、単剤治療の傾向があった。

結論

本邦で小児期発症のジストニアに関する患者数や診療実態が把握できた。発症時期、罹患部位・経過・変動性などの臨床的特徴が明らかになり、頭部画像検査や遺伝子検査が病因の同定や治療方針の決定に役立っていることが確認できた。

参考文献

1. 日本神経学会監修，「ジストニア診療ガイドライン」作成委員会編集，ジストニア診療ガイドライン

2018.　南江堂.
2. 遺伝性ジストニア（指定難病 120）難病情報センター
http://www.nanbyou.or.jp/entry/4898
3. 舟塚真，加藤郁子，大澤真木子．小児神経科専門医に対する小児期発症ジストニアの疫学調査．脳と発達. 2008;40(Suppl.):S269.
4. 舟塚真，加藤郁子，大澤真木子．小児期発症ジストニアの疫学調査　各ジストニア病型に対する薬物療法の有効性に関して．脳と発達. 2009;41(Suppl.):S395.
5. Lohmann K, Klein C. Genetics of dystonia: what's known? What's new? What's next? Mov Disord. 2013;28:899-905.
6. Klein C. Genetics in dystonia. Parkinsonism Relat Disord. 2014;20:S137-42.

研究成果刊行一覧

土岐平、竹下絵里、住友典子、本橋裕子、石山昭彦、齋藤貴志、小牧宏文、中川栄二、須貝研司、佐々木征行：当科における小児期発症のジストニアに関する診療録調査. 第 62 回日本小児神経科学会学術集会, Web 開催, ライブ･オンタイム配信 2020.8.18-2020.8.20, オンデマンド配信 2020.9.1-2020.9.30.

４．小脳病変を有する小児期発症の神経疾患における、発達と失調症状に関する研究

分担研究者：本橋　裕子
研究機関名：国立精神・神経医療研究センター病院小児神経科

（緒言）
小児期発症の神経疾患には小脳病変を伴う疾患が複数存在し、小脳破壊性病変、脊髄小脳変性症、先天性筋ジストロフィー、脳奇形、ミトコンドリア病などが該当する。これらの疾患においては、種々様々な程度の大脳・脳幹の変化を合併することがあり、それ故に現れる症状は失調症状以外にも、知的障害、麻痺、不随意運動など多彩である。
このような背景のもと、本研究では以下を実施した。
①小児期発症の小脳性運動失調症に関する疫学調査（2018 年度）：本研究によって小児期発症の小脳性運動失調症の原因疾患に関する本邦の疫学データの収集。
②知的障害や不随意運動を合併する小児期発症の小脳性運動失調症患者に対する SARA（Scale for the Assessment and Rating of Ataxia）と ICARS(International Cooperative Ataxia Rating scale)の有用性に関する研究（2019 年度）：成人では有用性が確立した SARA と ICARS が小児期発症の小脳性運動失調症において使用可能かを検証した。
③小脳病変を有する小児期発症の神経疾患における、発達と失調症状に関する研究（2020 年度）：小脳病変を有する小児期発症の神経疾患において、発達マイルストーンへの影響や、臨床的特徴に関して検証した。

（方法）
研究①2016-2017 年度に実施した、小児期発症の小脳性運動失調症に関する疫学調査データを集計し、データを解析した。
研究②知的障害を有する小児患者に対して SARA と ICARS を実施し、これらの運動失調評価法が知的障害合併小児例に対して実施可能かを複数症例において検討した。
研究③小脳病変を有する疾患である福山型先天性筋ジストロフィー（Fukuyama congenital muscular dystrophy、 FCMD）において、小脳病変が疾患発達マイルストーンへ影響するかどうかを検証した。また、小脳病変を有するミトコンドリア病において、診療上特別な配慮を有する事項がないかを検討した。

（結果）
研究①本邦の小児期発症の小脳性運動失調症の原因疾患としては DRPLA が最多で、次いで ataxia telangiectasia と Joubert syndrome and related disorders が多かった[1]。また、診断率は 44%であり、これは既報にある海外でのデータとほぼ同程度であった。
研究②5 名の小児患者(6-14 歳；DQ/IQ20-65）で SARA と ICARS を実施した。3 名は未診断で、1 名は Glut 1 deficiency、1 名は SCA29 であった。全例、臨床的に失調症状を認めていた。各患者において SARA と ICARS の値に大きな乖離はなかった。
研究③FCMD を有する患者の頭部 MRI の T１、T2 強調画像所見に基づき、大脳・小脳・脳幹病変の重症度スコアリング方法を考案し、最高到達発達レベルとの相関を検証した。小脳病変の重症度は、発達との

相関があるとは言えなかった。

結果

画像のスコアリング上、最軽症例は 6 点で、多少脳回が一脳葉のみ、丸石様皮質異形成なし、限局性の白質変化、大脳萎縮や小脳脳回異常なし、軽度の脳幹形態異常を認めた。最重症例は 19 点で、広範な多小脳回と白質変化、丸石様皮質異形成、大脳萎縮、高度な小脳脳回異常、脳幹低形成を認めた。発達における始語や座位は、画像の重症度スコアが高い例の方が、より遅い年齢で獲得する傾向にあった。小脳病変の重症度は、発達との相関があるとは言えなかった。ミトコンドリア病に関しては、年少発症の mitochondrial encephalopathy、 lactic acidosis、 and stroke-like episodes (MELAS) では高血糖緊急症を発症するリスクが高い可能性が示唆された[2]。

（考察）

小脳性病変を有する小児神経疾患は多彩であり、小脳症状のみならず知的障害や不随意運動、他臓器病変を呈することが多い。知的障害を伴う場合、その運動症状の評価方法の妥当性判断が難しいが、成人でも使用される SARA や ICARS はある程度使用可能ということが判明した。また、FCMD では小脳病変は発達予後への影響が小さいことが示唆された。他、早期小児期に発症した MELAS では高血糖緊急症に対する注意が必要であることが分かった。

（結論）

本研究によって小脳病変を有する小児期発症の神経疾患における、疫学データ、失調症状評価法、発達予後への影響、他臓器合併症に関する新たな知見が得られた。

研究成果刊行一覧

1) Ono H, Shimizu-Motohashi Y, Maruo K, Takeshita E, Ishiyama A, Saito T, Komaki H, Nakagawa E, Sasaki M. Childhood-onset cerebellar ataxia in Japan: A questionnaire-based survey. Brain Behav 2019;9:e01392.
2) Toki T, Shimizu-Motohashi Y, Komaki H, Takeshita E, Ishiyama A, Mori-Yoshimura M, Sumitomo N, Hirasawa-Inoue A, Nakagawa E, Nishino I, Goto YI, Sasaki M. Hyperglycemic Crisis in Patients With Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episodes (MELAS). Pediatr Neurol 2021;114:1-4.
3) Shimizu-Motohashi Y, Sato N, Takeshita E, Ishiyama A, Mori- Yoshimura M, Oya Y, Nonaka I, Maruo K, Komaki H, Sasaki M. Brain image phenotyping to predict developmental prognosis in Fukuyama congenital muscular dystrophy. 第 62 回日本小児神経学会. 2020/8/17-20.Web 開催

５．運動症状を主症状とする小児期難治性神経疾患の病理組織学的検討および臨床的検討

分担研究者：齋藤貴志
研究機関名：国立精神・神経医療研究センター病院小児神経診療部

緒言

結節性硬化症（tuberous sclerosis complex, TSC）は、多くの場合 phosphatidylinositol 3-kinase（PI3K）-AKT- mammalian target of rapamycin（mTOR）経路のタンパク質をコードする TSC1 あるいは TSC2 の変異により、PI3K-AKT-mTOR 経路の活性亢進をきたし発症する疾患で、てんかん、知的障害、腫瘍などの中枢神経系をはじめとして、多系統に症状が出現する。TSC では、balloon cells（BCs）、異形な神経細胞である dysmorphic neurons（DNs）の出現などが特徴的である。最近、TSC に類似した病理学的特徴を持つてんかん原性の構造異常である限局性皮質異形成 2 型(focal cortical dysplasia type 2, FCD2）でも PI3K-AKT-mTOR 系関わる遺伝子の（体細胞変異を含む）異常が見つかってきている。FOXP1 は、中枢神経では、神経幹細胞の分化、神経細胞の遊走などの脳形成に関与し、知的障害、言語障害、自閉症などの神経発達障害の発症にも関連があることが知られてきている。FOXP1 の機能調節に PI3K-AKT-mTOR か関与していることが先行研究から示唆されている。このような背景から、TSC、FCD2 において、FOXP1 の発現やその機能が影響を受けると仮定し、まず手術組織を使用した研究を計画した。

方法

NCNP バイオバンクから供与された、てんかん手術で得られたてんかん原生組織標本 TSC（7 検体)、FCD2a（4 検体)、FCD2b（6 検体）を対象とした。FOXP1 のほか、中枢神経に発現する FOXP サブファミリーに属する FOXP2、FOXP4 に対する抗体等を用いて、その発現を免疫組織化学的に検討した。

結果

1）　FCD 2 で、正常な形態を持つ神経細胞では、FOXP1 は核に存在し、星状膠細胞、希突起膠細胞では FOXP1 陽性細胞は見られなかった。

2）　TSC で、FOXP1、2、4 の免疫反応性を評価した。FOXP1 陽性細胞は DN で平均 78.1%、BC で平均 89.4%であった。FOXP1 の細胞局在は、①細胞質のみに限定、②核のみに限定、③核と細胞質の両者に存在する 3 パターンが認められた。このパターンは、DNs では平均 70%で核に限定されていたが、対照的に、BC の 88.0%では、FOXP1 の発現は細胞質に限定されていた。FOXP2 は、DNs で平均 84.0%、BCs では 85.5%で陽性であった。FOXP2 の細胞内局在パターンは FOXP1 のそれと類似し、DNs の平均 78.6%で核のみに存在し、BCs の 80.5%で細胞質のみに見られた。FOXP4 は、DNs においては、平均 80.1%で核に限局して見られた一方で、BCs では、FOXP1 および FOXP2 とはやや異なり、平均 31.8%が細胞質のみ、20.9%が核にのみ認められた。

3）　FCD2 の DNs、BCs でも、FOXP1、2、4 の発現パターンは TSC と同様であった。

4）　TSC および FCD2 の BCs において JAGGED1 の発現が見られた

考察

FOXP1 は多くの組織においては、細胞の核に存在が認められる一方、一部の正常組織や癌細胞などの病

的細胞では、核外に存在することがある。FOXP1 では、乳癌の細胞での核外への局在が知られており、AKT の関与が示唆されている。FOXO、FOXA3 では、核外へ移動することでその転写因子としての活性が低下し、核外への輸送に AKT が関わっていることが知られている。今回の結果では、BC と一部の DNs での FOXP1 の核外への局在が見られ、FOXP1 の転写活性低下が示唆される。神経前駆細胞において、JAGGED1 は、FOXP1 で発現の調整を受けており、FOXP 1 は JAGGED1 の転写を抑制している。一方、成熟脳では、神経細胞にのみ JAGGED1 が見られる。このことから、FOXP1 が核外に存在している BCs では、FOXP1 の転写活性が低下の結果、JAGGED1 が発現している可能性が考えられた。FOXP1 は、神経の発生過程において、神経前駆細胞の分化調節や神経細胞の遊走に関わっている。FOXP1 のノックダウンで、神経細胞の遊走障害が生じ、mTOR の過剰発現でも、FOXP1 陽性細胞の神経細胞の遊走障害が見られる。JAGGED1 は神経前駆細胞の分化調節に関わる Notch のリガンドであり、FOXP1 により発現が抑制されるが、FOXP1 のノックダウンでは JAGGED1 発現が亢進する。これらの事実と今回の結果を考えあわせると、TSC、FCD での FOXP1 の調節障害は、細胞の遊走障害や分化異常に関連がある可能性が示唆された。

結論

TSC と FCD で見られた FOXP1 の細胞内局在の変化は、FOXP1 の調節異常が存在することの可能性を示唆し、その原因は mTOR 活性の亢進の可能性がある。FOXP1 は神経前駆細胞の分化や細胞の遊走に関わっていることから、この調節異常は TSC、FCD の病態に関与している可能性がある。

研究成果刊行一覧

1. 大吉由記美他．3 歳未満で発症した限局性病変による側頭葉てんかんの臨床的特徴と外科治療．脳と発達． 53:15-20, 2021
2. Saito, T. et al. Transient water-electrolyte disturbance after hemispherotomy in young infants with epileptic encephalopathy. Child's Nervous System (2019).
3. Ogasawara, M.et al. A p.Arg499His Mutation in SPAST Is Associated with Infantile Onset Ascending Spastic Paralysis Complicated with Dysarthria and Anarthria. Neuropediatrics (2019)

６．運動症状を主症状とする先天性疾患の画像に関する研究

分担研究者：佐藤典子
研究機関名：NCNP　放射線診療部

緒言

MR 拡散テンソル画像（Diffusion tensor imaging：DTI）は、白質線維に起因する水分子の拡散を介して，神経線維の走行路を可視化できる。さまざまな先天性脳奇形において神経線維の走行の異常が報告されている。また脳の神経線維の発達は胎生期のみならず出生後も発達しており、出生後のイベントが生じてもその繊維の発達が障害される。それらの現象は従来の解剖学的検索では提示できなかった事象で、MR の DTI 手法のみにて究明可能であり、近年明らかになりつつある。我々はこの手法を用いて、乳幼児発症の重症てんかん患者と Lissencephaly/Band heterotopia（LIS/BH） spectrum 疾患にて、MR tractography を用いてその病理を解明した。また福山型筋ジストロフィーにて DIR や SWI を含めた撮像方を検討し、新しい MR 所見を報告した。

方法

乳幼児発症の重症てんかん患者における症の皮質橋小脳路の検索対象は、24 人の片側巨脳症、28 例の原因不明のウェスト症候群、25 例のてんかんや MR で異常のない小児の disease control である。患児の年齢、性、既往歴、発症年齢、てんかんの頻度、現病歴を検索し、MR の解析には Johns-Hopskins 大学の DTI studio のソフトを用いた。左右それぞれの大脳脚に ROI を置き、皮質橋小脳路の小脳への分布のパターン（①左右とも両側分布②左右とも片側分布③混合性；一方は両側分布で、もう一方は片側分布）と臨床所見との関連を検索した。

LIS/BH spectrum 患者の拡散テンソル画像解析は 23 名を対象とし、MRI 所見による滑脳症 grading system に基づき患者を重症の grade1 から軽症の grade6 の 6 段階に分類し、臨床の重症度と、脳幹部での錐体路の走行部位の異常の有無を含む MR 所見との関連を検討した。

臨床的・遺伝子学的に福山型筋ジストロフィーと診断された 27 例を評価の対象とした。評価項目は、脳幹の表面のけば立った構造（T2WI）、脳幹表面の異常高信号（T2WI,FLAIR,DIR）、皮質表面直下を走行する異常血管（T2WI）、表在と深部静脈の異常（SWI）、実質内の出血（T2WI, SWI）。その他脳幹の低形成や大脳の皮質形成異常、小脳の嚢胞、白質の異常信号等も評価した。

結果

重症てんかん患者における症例の皮質橋小脳路は、コントロールとウェスト症候群において、それぞれ左右とも両側分布のパターンは 80.0%と 75.0%、左右とも片側分布のパターンは 20.0%と 17.9%であったが、混合性のパターンは 0.0%と 7.1%であった。一方片側巨脳症では両側分布、片側分布、混合性のパターンはそれぞれ 16.7%、54.1%、29.2%であり、コントロールやウェスト症候群と優位差を示した($p < 0.001$)。片側分布パターンを示した片側巨脳症では他のパターンを示した症例と比べて、より早期の発症($p = 0.049$)で、かつてんかんが重症である傾向を示した($p = 0.052$)。

滑脳症 grading system による MR 分類では、grade１が１名、grade２が１名、grade3 が３名、grade4 が４名、grade5 が３名、grade6 が 14 名であった。全例にてんかんを認めたが、重症度によるてんかんの頻度の有意差はみられなかった。一方、最大獲得運動・言語機能は滑脳症の重症度が高いほど不良であった。重症・中等症の滑脳症(grade1-4)の５名に錐体路の走行異常があり、正常では中小脳脚と橋小脳線維と二つの線維として分離走行する橋横走線維が、一塊となり橋の腹側を走行し、その背側を錐体路が内側毛帯と一塊となり走行していた。軽症群（grade 5,6）では錐体路走行の異常はみられなかった。MRI の grading system による重症度と有意な相関がみられたのは錐体路走行の異常、脳幹部の低形成、基底核の形態異常、最大獲得運動・言語機能であった。

福山型筋ジストロフィーでの MR 評価において､脳幹は 27 例全例低形成で､脳幹表面の毛羽立ちは 26/27 例（96%）に認めた。脳幹表面の異常高信号は T2WI,FLAIR,DIR で、それぞれ 26/27 例（96%）、23/27 例(85%)、6/6 例(100%)認めた。皮質表面直下を走行する異常血管は 3/27 例（11%）に、SWI にて前頭部の表在静脈の低形成は 5/5 例(100%)に、深部静脈の拡張を 2/5(40%)に認めた。脳内出血は T2WI で 3/27（11%）に、SWI では 2/5(40%)に認めた。小脳の嚢胞は 27 例全例に、大脳の多少脳回様の異常皮質も 27 例全例に、肥厚脳回は 4/27 例(15%)に、大脳白質の異常信号は全例に認めた。

考察
皮質橋小脳路は大脳皮質から橋の繊維と橋から小脳への２つの繊維で成り立っており、後者の繊維は橋から両側の小脳半球に神経線維が進展することが知られており、出生時には未完の状態で、生後発達する。小児期に血管障害をきたしたに若年者における脳血流 SPECT の評価を行ったところ、3 歳以前の障害では crossed cerebellar diaschysis が消失していたとの報告がある。片側巨脳症においてより若年発症、より重症で uncrossed cerebellar diaschysis を示したのは、その報告を裏付けるものと思われる。
LIS/BH spectrum の患者において重症例では錐体路走行が異常となり、臨床症状も重篤であることが明らかとなった。錐体路の走行異常がみられる例では脳幹部も低形成となっており、同一の疾患スペクトラムのなかでも神経細胞遊走障害の程度により、錐体路の走行パターンに違いがあるものと考えられる。
福山型筋ジストロフィーは muscle-eye-brain disease, Walker-Warburg disease などと共に、α-dystroglycan（DG)を伴う先天性筋ジストロフィーの疾患群に含まれる。この疾患群は α- DG の糖鎖修飾の異常のために、基底膜への laminin の assembly がうまくおこなわれず，グリア境界膜—基底膜複合体の破綻が生じて、神経細胞のクモ膜下腔への過遊走，大脳の層構造の乱れ，さらには脳回形成の異常などが生じる疾患群である。この現象は大脳だけでなく、脳幹にも認められ、今回指摘した脳幹表面の構造や信号異状はその病理を反映したものである。また出血も高い頻度で認めた。その理由は、静脈の還流異常あるいは血管壁そのものの異常が考えられる。

結論
我々は拡散テンソル手法を用いて、重症てんかん症例の片側巨脳症において皮質橋小脳路の走行異常や、滑脳症・帯状異所性灰白質スペクトルム重症例における橋での皮質脊髄路の走行異常を初めて指摘した。さらに DTI だけでなく、出血や静脈の検出に優れる SWI（susceptibility-weighted image）や脳実質の優れたコントラスを示す DIR(double inversion recovery)といった新たな MR の手法を用いて、福山型筋ジストロフィー患者にて脳幹の遊走障害による信号異常や静脈の異常、高頻度の出血など新たな知見を提示した。このように MR の様々手法を用いて小児難治性疾患の新たな知見を明らかにすることができた。

参考文献

1. Palesi F, Rinaldis A, Castellazzi G, Calamante F, Muhlert N, Chard D, et al. Contralateral cortico-ponto-cerebellar pathways reconstruction in humans in vivo : implications for reciprocal cerebro-cerebellar structural connectivity in motor and non-motor areas. Scientific Reports 2017 7:1 2017;7:12841
2. Sato N, Ota M, Yagishita A, Miki Y, Takahashi T, Adachi Y, et al. Aberrant midsagittal fiber tracts in patients with hemimegalencephaly. American Journal of Neuroradiology 2008;29:823–7.

研究成果刊行一覧

1. Enokizono M, Sato N, Ota M, Shigemoto Y, Morimoto E, Oba M, Sone D, Kimura Y, Sugai K, Sasaki M, Ikegaya N, Iwasaki M, Matsuda H. Disrupted cortico-ponto-cerebellar pathway in patients with hemimegalencephaly. Brain Dev. 2019 Jun;41(6):507-515.
2. Kimura Y, Sato N, Ishiyama A, Shigemoto Y, Suzuki F, Fujii H, Maikusa N, Matsuda H, Nishioka K, Hattori N, Sasaki M. Serial MRI alterations of pediatric patients with beta-propeller protein associated neurodegeneration (BPAN). J Neuroradiol. 20200423;S0150-9861(20):30157-7 doi: 10.1016/j.neurad.2020.04.002. Online ahead of print.J Neuroradiol. 2020. PMID: 32335071.
3. Hirasawa-Inoue A, Sato N, Shigemoto Y, Kimura Y, Ishiyama A, Takeshita E, Mori-Yoshimura M, Oya Y, Takahashi Y, Komaki H, Matsuda H, Sasaki M. New MRI Findings in Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy: Brain Stem and Venous System Anomalies. AJNR Am J Neuroradiol. 202006;41(6):1094-1098 doi: 10.3174/ajnr.A6577. Epub 2020 May 21.AJNR Am J Neuroradiol. 2020. PMID: 32439644.

7．脳形成障害関連疾患・てんかん性脳症のエクソーム解析

分担研究者：松本　直通
研究機関名：横浜市立大学大学院医学研究科遺伝学

緒言

小脳低形成を含む脳形成障害関連疾患およびてんかん性脳症で原因が特定されていない症例を対象に、次世代シーケンス（NGS）解析技術を用いてヒトゲノム上の全遺伝子を網羅的に解析し原因となる遺伝子変異を効率的に特定することを目的に研究を行った。様々な特徴的な疾患群においても既に多様な遺伝子の異常が明らかになりつつあり、その遺伝的多様性に対しては全遺伝子解析が最適な手法と位置づけられる。

方法

平成 30 年：カルシニューリンは 2 つのサブユニットである Catalytic A (CnA)と regulatory B (CnB)のヘテロダイマーで構成される。このタンパク質複合体は serine/threonine 特異的タンパク質フォスファターゼとして様々な下流のターゲットのリン酸化を調節し様々な臓器に関連しうるため、その変異がヒトにおいてどのような表現型を呈するかこれまで不明であった。難治性てんかんを呈する 1456 症例に対して全エクソームシーケンスを行った。CnA をコードする *PPP3CA* の変異を複数例で見出したため横浜市立大学で解析された全症例のエクソームデータを探索した。見出した変異に対して、出芽酵母を用いた機能解析を試みた。

平成 31/令和元年：対象は兄妹罹患例で、ともに 4 歳頃より運動失調、ミオクローヌス、全般てんかん発作を発症し、神経学的退行により寝たきりであった。遺伝子変異スクリーニング、酵素診断、皮膚生検を用いた電子顕微鏡所見で異常を認めず、WES を実施したが原因の同定は出来なかった。しかし同様の臨床経過をたどる難治、進行性の PME 兄妹例であり遺伝要因が強く示唆された。WES でカバーされない領域（イントロンや遺伝子間領域）やゲノム難読領域に病的変化がある可能性が想定された。本家系の罹患者に対し PacBio 社の Sequel を用いてロングリード whole genome sequencing (WGS)を施行した。全ゲノムに対しておよそ 6x 程度（20.9 Gb）のデータを産出し、SMRT-link に付属する PBSV を用いて参照ゲノム配列にアラインし 50 bp 以上の CNV を抽出した。正常対照の 3 例を用いて”正常な”CNV を除外し、異常な CNV を絞り込んだ。

令和 2 年：橋小脳低形成（Pontocerebellar hypoplasia, PCH）は現在 13 クラスに分類され次世代シーケンス解析によってその多くの責任遺伝子が単離されている。そのうち PCH 1 型 は極めて希少なで、臨床的には早期発重度発達遅滞、進行性運動神経障害、小脳･橋萎縮を特徴とする。 近年 EXOSC9 遺伝子（MIM: 606180)で 2 つの病的バリアント NM_001034194.1: c.41T>C (p.Leu14Pro）と c.481C>T (p.Arg161*）が 4 例の PCH type 1D (PCH1D) (MIM: 618065)において報告された。 EXOSC9 は RNA のプロセッシングと分解に関わるエクソソーム複合体の 1 コンポーネントをコードする。我々は PCD を呈する 2 家系に対して原因解明に向けた全エクソーム解析を施行した。

結果

平成 30 年：難治性てんかんの全エクソーム解析において West 症候群 4 例と発達遅滞・てんかん・多発奇形を伴う 1 例に *PPP3CA* の点変異を同定した。横浜市立大学の全エクソームデータ検索でさらに 1 例に点変異を同定したが、この症例は発達遅滞と多発奇形を呈していた。興味深いことに West 症候群を呈した 4 例中 3 例で変異は Catalytic domain の点変異であった。多発奇形を呈した 2 例では Autoinhibitory domain 内の変異であった。それぞれの変異について酵母モデルを使った機能解析を行い、West 症候群の変異は機能喪失型、多発奇形症例の変異は機能獲得型であることが明らかとなった。

平成 31/令和元年：症例に認めた CNV のうち、正常対照 3 例に認めた CNV と重複する CNV は全て多型として除外した。17,165 個の構造変化がコールされ(9,949 個の挿入、7,216 個の欠失)、Refseq 遺伝子、exon、タンパク質コード領域のみ、常染色体劣性遺伝性疾患遺伝子に焦点を当て異常 CNV 候補を絞りこみ、原因と考えられる病的欠失を同定に到った。この欠失は、既知の神経変性性疾患セロイドリポフスチン症の原因遺伝子 CLN6 の exon 1 を含んだ 12-kb の欠失で、ホモ接合性欠失であった。両親及び罹患同胞にも同じ欠失が、それぞれヘテロ接合性、ホモ接合性に認められ、本家系に発症した進行性ミオクローヌスてんかんの原因として妥当であると結論づけた。

令和 2 年：臨床的に PCH1D を呈した 2 家系で *EXOSC9* の病的バリアントを見言い出した。うち 1 家系で c.239T>G (p.Leu80Arg)と c.484dupA (p.Arg162Lysfs*3)の複合ヘテロ接合性バリアント、もう 1 家系で c.151G>C (p.Gly51Arg)のホモ接合性バリアントが同定された。

考察

平成 30 年：West 症候群で見出された変異と多発奇形で見出された変異は、機能的に全く異なるため（機能喪失型 vs 機能獲得型)、このことが症例の表現系に大きく影響していることが強く示唆された。さらに遺伝子探索研究において、シンプルな生物系を用いた機能解析研究が大変有効であることが示された。

平成 31/令和元年：本研究は、ショートリード WES の限界を明確に示し、かつ長鎖シーケンス等を用いた WGS の有用性を明らかにした。

令和 2 年：これらの症例では PCH1D の既報例と類似の表現型を呈するも、知的発達や橋発達が既報より良好な症例を認め *EXOSC9* の両アリル変異による表現型の広がりが観察された。

結論

平成 30 年：*PPP3CA* の点変異が West 症候群と多発奇形を伴う発達遅滞という異なる疾患で見出された。

平成 31/令和元年：WES で原因解明ができなかった進行性ミオクローヌスてんかん家系の原因をロングリード WGS を用いて明らかにした。

令和 2 年：これまで 2 つのバリアントしか報告のない *EXOSC9* の新規病的バリアントを 3 つ同定することに成功した。

原因不明の小脳低形成を含む脳形成障害関連疾患およびてんかん性脳症などに対して全エクソーム解析は極めて有効であり解析の第一選択肢である。一方で、全エクソーム解析で解決できない症例に対してロングリード WGS などの手法が有用であることが明らかとなった。

参考文献

1. Mitsuhashi S*, Matsumoto N. Long-read sequencing for rare human genetic diseases. J Hum Genet. 2020 Jan;65(1):11-19.

研究成果刊行一覧

１. Mizuguchi T*, Nakashima M, Kato M, Okamoto N, Kurahashi H, Ekhilevitch N, Shiina M, Nishimura G, Shibata T, Matsuo M, Ikeda T, Ogata K, Tsuchida N, Mitsuhashi S, Miyatake S, Takata A, Miyake N, Hata K, Kaname T, Matsubara Y, Saitsu H, Matsumoto N#. Loss-of-function and gain-of-function mutations in PPP3CA cause two distinct disorders. Hum Mol Genet. 2018 Apr 15;27(8):1421-1433. doi: 10.1093/hmg/ddy052.

２. Mizuguchi T, Suzuki T, Abe C, Umemura A, Tokunaga K, Kawai Y, Nakamura M, Nagasaki M, Kinoshita K, Okamura Y, Miyatake S, Miyake N, Matsumoto N*. A 12-kb structural variation in progressive myoclonic epilepsy was newly identified by long-read whole-genome sequencing. J Hum Genet. 2019 May;64(5):359-368. doi: 10.1038/s10038-019-0569-5.

３. Sakamoto M, Iwama K, Sekiguchi F, Mashimo H, Kumada S, Ishigaki K, Okamoto N, Behnam M, Ghadami M, Koshimizu E, Miyatake S, Mitsuhashi S, Mizuguchi T, Takata A, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N*. Novel EXOSC9 variants cause pontocerebellar hypoplasia type 1D with spinal motor neuronopathy and cerebellar atrophy. J Hum Genet. 2021 Apr;66(4):401-407. doi: 10.1038/s10038-020-00853-2. Epub 2020 Oct 10.

８．不随意運動や失調症状をともない発達障害をきたす発達性てんかん性脳症の原因及び治療法の解明

分担研究者：遠山　潤
研究機関名：国立病院機構西新潟中央病院

緒言

小児発達期に不随意運動や失調症状を伴う発達遅滞症例は様々な遺伝性疾患が含まれ，種類も多く，かつ一つ一つの疾患は非常に稀であると思われる．原因不明症例の臨床症状を詳細に検討することから，症状—原因の関係を確立することが適確な診断と治療のために必要である．診断を明確にすることにより，その疾患に特異的な治療法も解明できる可能性がある．今回の 3 年間の研究では不随意運動や失調症状をともない発達障害をきたす発達性てんかん性脳症例の疾患特異的な治療法の解明を行った．

初年度では，脳内 NMDA 受容体を構成する *GRIN1* 遺伝子変異例と *GRIN2A* 変異例の神経症状に対するメマンチンの有効性を検討した．2 年度では，進行性ミオクローヌスてんかんを来す新たな遺伝性疾患と Angelman 症候群（AS）に対してペランパネル(PER)の有用性を検討した．3 年度では発達性てんかん性脳症では比較的頻度の多い *CDKL5* 遺伝子異常をもつ CDKL5 deficient disorder (CDD)のてんかん発作を含む臨床症状，てんかん治療の経過，神経放射線所見，脳波所見について検討し，臨床症状の評価と最適治療を検討した．

方法

①*GRIN1* 遺伝子変異例と *GRIN2A* 変異例に対するメマンチンの有効性の検討．

対象は *GRIN1* 変異と *GRIN2A* 変異を持つ症例各 1 名ずつである．

症例 1 は発達性てんかん性脳症男児．*GRIN1* に c.1656C＞G:p.Asp552Glu ヘテロ接合変異がみられた．臨床的にミオクローヌス，ジスキネジア，ヒョレアの不随意運動，眼球上転発作，手の常同運動，焦点発作，強直間代発作，スパズムを呈した．

症例 2 は睡眠時に持続性棘徐波を持つてんかん性脳症の男児．*GRIN2A* に c.2201T>A:p.Val734Asp 変異がみられた．1 歳 7 ヵ月時に，発運動言語など退行あり．脳波異常があり VPA 開始された．3 歳 3 か月に強直間代発作や脱力発作出現した．脳波で全般性棘徐波結合あり．多動，重度知的障害あり．24 歳時の DQ=10 未満と 1 歳レベルであった．

症例 1 は 10 歳から，症例 2 は 24 歳からメマンチンを経口的に投与し症状に対する効果を臨床的に判断した．メマンチン投与は分担研究者施設の倫理委員会の承認をうけ，家族への十分な説明後に文書で同意を得て行なった．

②進行性ミオクローヌスてんかん例と AS に対する PER の有用性の検討．

対象は当院で加療中の AS5 例（男 1 例、女 4 例．15q11-13 欠失型 4 例，メチル化異常 1 例)，DRPLA 2 例，*DHDDS* 変異を持つ発達性てんかん性脳症 1 例，*SEMA6B* 変異による進行性ミオクローヌスてんかん 1 例である．PER0.5～2mg で投与を開始し，てんかん発作，不随意運動，副作用などの症状に応じて増量した．AS 例の 1 例は 8 歳であり，保護者に治療について説明し同意を得た後に 0.5mg/日で投与開始した．それぞれの症例について，てんかん発作及びミオクローヌスの状態，その他の症状，副作用について後方視的に検討した．

③*CDKL5* 遺伝子異常をもつ症例のてんかん発作を含む臨床症状，てんかん治療の検討．

対象は研究協力機関で遺伝学的検査を施行され *CDKL5* 病的バリアントを認めた CDD 29 例（女 21 例，男 8 例）である．それぞれの症例について，臨床調査票を作成し主治医に記入していただく方法で調査した．臨床調査票はてんかん発症時期，てんかん発作，不随意運動を含む臨床症状，脳波および MRI 所見，抗てんかん薬の有効性，抗てんかん薬以外のてんかん治療に対する有効性について後方視的に検討した．また，臨床症状および検査所見について男女の有意差を検討した．

結果

①症例 1 では，メマンチンは 0.5mg／日（体重 17kg）から開始し 5mg／日まで漸増した．6 か月間の投与で焦点発作や強直間代発作，スパズム回数の減少と焦点発作持続時間の短縮がみられ，発作が長いときに使用していたジアゼパム座薬の使用が減った．不随意運動も減少し全身状態は安定した．投与による明らかな副作用はなかった．症例 2 では，メマンチンは 5mg／日（体重 43kg）から開始し 15mg まで漸増した．メマンチン投与により，日常の動きが増えて，9 か月時には表情も豊かになるなど変化が出た．てんかん発作に対しては，おさまっていたため評価不能であった．投与による明らかな副作用はなかった．

②AS 例では 5 例中 4 例でミオクローヌスの改善を認め，維持量は 1～4mg（1mg 1 例，2mg 2 例，4mg 1 例）であった．うち 1 例は併用抗てんかん薬の減量が可能であった．その他の 1 例では PER 開始後問題行動が出現し，ミオクローヌス重積が悪化したため投与を中止した．2 例で睡眠リズムの改善が得られ，1 例で食欲増進，体重増加を認めた．てんかん発作の悪化はみられなかった．DRPLA 症例 2 例では，ミオクローヌスがほぼ消失し強直間代発作も減少した．*DHDDS* 変異例，*SEMA6B* 変異例による進行性ミオクローヌスてんかん症例でも強直間代発作とミオクローヌスは 50%以上減少と著効した．

③てんかん発症年齢は平均 3.3 か月（4 生日-26 か月）で，てんかん症候群としては West 症候群 13 例，分類不能早期発症乳児てんかん性脳症 12 例，大田原症候群 2 例，遅発性乳児てんかん性脳症及び症候性局在関連性てんかんがそれぞれ 1 例であった．初診時の発作型は焦点発作が 13 例，スパズム，強直発作がそれぞれ 5 例，強直間代発作が 4 例，ミオクロニー発作が 2 例で，経過中にスパズムを呈した例は 27 例あった．ミオクローヌスを除く不随意運動は 15 例で認め，手の常同運動が最も多く 8 例，次いでヒョレアが 7 例，ジストニアが 3 例に認められた．最終診察時の年齢は平均 9.5 歳（1-39 歳）で，発作抑制が得られたのは 2 例で，全例が重度の発達遅滞を認め，歩行獲得は 2 例で半数以上は寝たきりであった．運動発達の程度は女児に比べ男児が有意に重度遅滞であった．初診時の脳波は 7 例が正常，後頭部優位の棘波や多焦点性棘波がそれぞれ 5 例にみられた．経過中，ヒプスアリスミアは 19 例に認められた．脳 MRI では脳萎縮が 13 例(軽度 9 例，重度 4 例)にみられた．脳萎縮の程度は女児に比べ男児が有意に重度であった．

抗てんかん薬治療では，単剤で発作抑制された例はなく，併用療法時に 50%以上の発作抑制が得られたのは，バルプロ酸とビガバトリンが 2 例，ラモトリギン 1 例であった．それに対しカルバマゼピン，ガバペンチン，フェニトイン，臭化カリウムは無効例が多かった．ラモトリギンでは悪化例もみられた．遅発型の 1 例でバルプロ酸＋スルチアムの組み合わせが有効であった．ACTH 療法は 22 例で行われ 7 例で有効で最も有効な治療であったが有効期間は限定的であった．ケトン食療法は 10 例でおこなわれ 1 例で著効し，脳梁離断術，迷走神経刺激療法はそれぞれ 3 例で施行され無効であった．

考察

GRIN1 変異や *GRIN2A* 変異例に対してのメマンチン治療では *GRIN1* 変異例ではてんかん発作や不随意運動の改善がみられた．*GRIN2A* 変異例でも臨床的に行動面の改善がみられた．メマンチンは，*GRIN2A* 変異に加え，*GRIN1* 変異や *GRIN2D* 変異症例にもメマンチンの有効性が報告されている．メマンチンは NMDA 受容体阻害作用をもつため，遺伝子変異による NMDA 受容体の機能変化によって症例ごとにメマンチンの有効性は異なると考えられ，遺伝子変異の機能解析が重要となる．NMDA 受容体変異例の症例によっては有効な治療となり得る．今後は至適投与量の検討や他症例での検討、長期経過，遺伝子変異の機能解析による有効性の予測が重要である．
ミオクローヌスを来す AS や進行性ミオクローヌスてんかん症例に対しては多くは PER が有効であった．AS の 1 例では悪化を認めその理由は不明であるが注意が必要である．AS に対する睡眠リズムの改善にも有効であった．また，他の疾患でも *DHDDS* 変異症例では難治発作がほぼ消失するなど著効した．AMPA 受容体は，主に興奮性神経に存在する受容体であり，興奮性神経伝達物質であるグルタミンによりシグナルを脳内に伝達し作用すると考えられている．進行性ミオクローヌスてんかんでは主にこの受容体を介して主な症状が出現していると推定されるため拮抗薬である PER が有効であると考えられる．今回の検討からは AS のミオクローヌスもこの受容体が関与していることが推定された．今後，さらなる多症例や他疾患での検討，長期経過観察，副作用のコントロールなどが必要となると思われた．
CDD は X 連鎖性疾患である．今回の検討では，女児 21 例，男児 8 例と従来の報告より男児が多い結果であった．従来は非定型 Rett 症候群や女児のてんかん性脳症症例の解析から見いだされることが多かったが、今回の検討は発達性てんかん性脳症症例から見いだされた例であり，そのため男児の比率が高いと考えられる．不随意運動が従来例より少ないのも，発達性てんかん性脳症症例からみいだされた例であった可能性が考えられた．発達は重度発達遅滞が多く MRI の萎縮の程度は運動発達の程度と良く相関しており、男児の方が有意に重度であり，これはこれまでの報告と同一であった．
てんかん治療については，最近は疾患特異的な precision medicine が重要とされる．今回の検討では CDD のてんかん発作は各種抗てんかん薬に抵抗性であり有効な治療法見いだせなかった．バルプロ酸，ビガバトリン，トピラマートなどが比較的有効であった．CDD 特異的な治療法の確立のためには合理的な多剤療法や抗てんかん薬と各種特殊治療との組み合わせなどをさらに検討する必要があると思われた．また，副作用が多いような不必要な多剤併用療法は避ける必要性もあると考えられた．

結論
遺伝子異常による発達性てんかん性脳症症例ではその原因遺伝子により有効な薬剤が見いだされる症例がある一方，CDD のように有効な治療が見いだせない症例も多い．今後は遺伝子の機能解析に基づく有効な薬剤を見いだし多数例で検討を行うことにより，治療が確立されてゆく可能性がある．

参考文献
1. Ohba C, Shiina M, Tohyama J, et al. *GRIN1* mutations cause encephalopathy with infantile-onset epilepsy, and hyperkinetic and stereotyped movement disorders. Epilepsia 2015; 56: 841-848.
2. 遠山 潤，小林 悠，眞柄慎一，他．GRIN1 変異による発達性てんかん性脳症への個別治療．てんかん研究 2018; 36: 455.
3. Kobayashi Y, Tohyama J, Kato M, Akasaka N, Magara S, Kawashima H, et al. High prevalence of genetic alterations in early-onset epileptic encephalopathies associated with infantile movement disorders. Brain

Dev 2016; 38: 285-292.

4. Shiraishi H, Egawa K, Ito T, Kawano O, Asahina N, Kohsaka S. Efficacy of perampanel for controlling seizures and improving neurological dysfunction in a patient with dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). Epilepsy Behav Case Rep 2017; 26:44-46.

Kawano O, Egawa K, Shiraishi H. Perampanel for nonepileptic myoclonus in Angelman syndrome. Brain Dev 2020; 42: 389-392.

5. Hamanaka K, Imagawa E, Koshimizu E, Miyatake S, Tohyama J, Yamagata T, et al. *De novo* truncating variants in the last exon of *SEMA6B* cause progressive myoclonic epilepsy. Am J Hum Genet 2020; 106: 549-558.

6. Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OL, Archer H, et al. Mutations of *CDKL5* cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. Am J Hum Genet 2004; 75: 1079-93

7. Kobayashi Y, Tohyama J, Takahashi Y, Goto T, Haginoya K, Inoue T, et al. Clinical manifestations and epilepsy treatment in Japanese patients with pathogenic *CDKL5* variants. Brain Dev. 2021 Jan 9:S0387-7604(20)30330-2. doi: 10.1016/j.braindev.2020.12.006. Online ahead of print.

研究成果刊行一覧

1. Iwama K, Takaori T, Fukushima A, Tohyama J, Ishiyama A, Ohba C, Mitsuhashi S, Miyatake S, Takata A, Miyake N, Ito S, Saitsu H, Mizuguchi T, Matsumoto N. Novel recessive mutations in *MSTO1* cause cerebellar atrophy with pigmentary retinopathy. J Hum Genet 2018 Mar;63(3):263-270

2. Akita T, Aoto K, Kato M, Shiina M, Mutoh H, Nakashima M, Kuki I, Okazaki S, Magara S, Shiihara T, Yokochi K, Aiba K, Tohyama J, Ohba C, Miyatake S, Miyake N, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H. De novo variants in CAMK2A and CAMK2B cause neurodevelopmental disorders. Ann Clin Transl Neurol. 2018 Jan 29;5(3):280-296.

3. Itagaki R, Endo M, Yanagisawa H, Hossain MA, Akiyama K, Yaginuma K, Miyajima T, Wu C, Iwamoto T, Igarashi J, Kobayashi Y, Tohyama J, Iwama K, Matsumoto N, Shintaku H, Eto Y. Characteristics of PPT1 and TPP1 enzymes in neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL) 1 and 2 by dried blood spots (DBS) and leukocytes and their application to newborn screening. Mol Genet Metab. 2018 May;124(1):64-70.

4. Tsuchida N, Hamada K, Shiina M, Kato M, Kobayashi Y, Tohyama J, Kimura K, Hoshino K, Ganesan V, Teik KW, Nakashima M, Mitsuhashi S, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Saitsu H, Ogata K, Miyatake S, Matsumoto N. GRIN2D variants in three cases of developmental and epileptic encephalopathy. Clin Genet. 2018 Dec;94(6):538-547.

5. Nakashima M, Tohyama J, Nakagawa E, Watanabe Y, Siew CG, Kwong CS, Yamoto K, Hiraide T, Fukuda T, Kaname T, Nakabayashi K, Hata K, Ogata T, Saitsu H, Matsumoto N. Identification of de novo CSNK2A1 and CSNK2B variants in cases of global developmental delay with seizures. J Hum Genet. 2019 Apr;64(4):313-322.

6. Fujita A, Higashijima T, Shirozu H, Masuda H, Sonoda M, Tohyama J, Kato M, Nakashima M, Tsurusaki Y, Mitsuhashi S, Mizuguchi T, Takata A, Miyatake S, Miyake N, Fukuda M, Kameyama S, Saitsu H, Matsumoto N. Pathogenic variants of *DYNC2H1*, *KIAA0556*, and *PTPN11* associated with

hypothalamic hamartoma. Neurology. 2019; 93:e237-e251.
7. Negishi Y, Ieda D, Hori I, Nozaki Y, Yamagata T, Komaki K, Tohyama J, Nagasaki N, Tada H, Saitoh S. Schaaf-Yang syndrome shows a Prader-Willi syndrome-like phenotype during infancy. Orphanet J Rare Dis 2019 Dec 2; 14 :277. doi: 10.1186/s13023-019-1249-4.
8. Okumura A, Shimojima K, Kurahashi H, Numoto S, Shimada S, Ishii A, Ohmori I, Takahashi S, Awaya T, Kubota T, Sakakibara T, Ishihara N, Hattori A, Torisu H, Tohyama J, Inoue T, Haibara A, Nishida T, Yuhara Y, Miya K, Tanaka R, Hirose S, Yamamoto T. PRRT2 mutations in Japanese patients with benign infantile epilepsy and paroxysmal kinesigenic dyskinesia. Seizure. 2019 Oct;71:1-5 .
9. Hamanaka K, Imagawa E, Koshimizu E, Miyatake S, Tohyama J, Yamagata T, Miyauchi A, Ekhilevitch N, Nakamura F, Kawashima T, Goshima Y, Mohamed AR, Ch'ng GS, Fujita A, Azuma Y, Yasuda K, Imamura S, Nakashima M, Saitsu H, Mitsuhashi S, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Matsumoto N. De novo truncating variants in the last exon of SEMA6B cause progressive myoclonic epilepsy. Am J Hum Genet. 2020 Apr 2;106(4):549-558.
10. Itai T, Hamanaka K, Sasaki K, Wagner M, Kotzaeridou U, Brösse I, Ries M, Kobayashi Y, Tohyama J, Kato M, Ong WP, Chew HB, Rethanavelu K, Ranza E, Blanc X, Uchiyama Y, Tsuchida N, Fujita A, Azuma Y, Koshimizu E, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Takahashi H, Miyagi E, Tsurusaki Y, Doi H, Taguri M, Antonarakis SE, Nakashima M, Saitsu H, Miyatake S, Matsumoto N. De novo variants in CELF2 that disrupt the nuclear localization signal cause developmental and epileptic encephalopathy. Hum Mutat. 2020 Nov 1. doi: 10.1002/humu.24130.
11. Hiraiwa A, Matsui K, Nakayama Y, Komatsubara T, Magara S, Kobayashi Y, Hojo M, Kato M, Yamamoto T, Tohyama J. Polymicrogyria with calcification in Pallister-Killian syndrome detected by microarray analysis. Brain Dev 2020 Nov 20:S0387-7604(20)30314-4. doi: 10.1016/j.braindev.2020.11.003.
12. Kobayashi Y, Tohyama J, Takahashi Y, Goto T, Haginoya K, Inoue T, Kubota M, Fujita H, Honda R, Ito M, Kishimoto K, Nakamura K, Sakai Y, Takanashi JI, Tanaka M, Tanda K, Tominaga K, Yoshioka S, Kato M, Nakashima M, Saitsu H, Matsumoto N. Clinical manifestations and epilepsy treatment in Japanese patients with pathogenic *CDKL5* variants. Brain Dev. 2021 Jan 9:S0387-7604(20)30330-2. doi: 10.1016/j.braindev.2020.12.006. Online ahead of print.
13. 遠山　潤. 国際抗てんかん連盟, NICE ガイドラインに基づく新規抗てんかん薬の使い方. 脳と発達 2019, 51: 97-100.

９．運動障害を伴う脳発達障害の臨床像と病態解明

分担研究者：加藤　光広
研究機関名：昭和大学医学部小児科学講座

緒言

運動障害を伴う脳発達障害の原因はさまざまであり、原因によって脳の構造異常を示す場合（形態異常）と示さない場合（機能異常）がある。分担研究者はこれまで、形態異常をきたす脳形成異常と機能異常が中心のてんかん性脳症について、画像を含む臨床像の解析と遺伝学的原因の同定による分子病態の解明を行ない、両者に関する多数の原因遺伝子を明らかにしてきた。介在ニューロンの発生に深く関わる *ARX* 遺伝子の機能喪失変異は滑脳症などの形態異常をきたす一方、機能獲得変異はジストニアを伴う知的障害や発達性てんかん性脳症（大田原症候群、West 症候群）など脳構造異常を示さずに機能異常をきたす。近年、脳形成異常と発達性てんかん性脳症の原因遺伝子と遺伝的多面性が明らかになるにつれ、再び形態異常と機能異常との関連性が注目されている。

本研究では、これまでに集積した脳形成異常約 1200 例(DNA 収集 871 例)とてんかん症候群（その多くは発達性てんかん性脳症）約 1000 例(全例 DNA 収集)の症例と新規追加症例についての臨床情報をもとに、運動障害を伴う脳発達障害の臨床像と病態解明を行う。3 年間の計画として、初年度にデータベース整理を行い、二年度は既知遺伝子の臨床像を明らかにし、三年度は全エクソーム解析を行い原因遺伝子を同定する。最終的には運動障害を伴う脳発達障害、特に脳形成異常とてんかん性脳症に対して，画像・遺伝子・てんかん・リハビリ・全身管理を含む診断・治療・病態に関する包括的な情報提供システムを構築する。

方法

運動障害を伴う脳発達障害の臨床像と原因遺伝子同定を端緒とする病態解明のために、患児もしくは保護者から同意を得て血液（一部唾液）と臨床情報（病歴および脳形成異常では頭部 MRI）を収集した。臨床情報は脳形成異常とてんかん症候群のそれぞれの症例登録データベースに入力した。脳形成異常とてんかん症候群の症例登録データベースから運動障害を伴う症例を抽出し、臨床診断、遺伝子解析結果の概要を調査した。てんかん症候群データベースの 757 家系について病歴と発作型、脳波所見に基づき臨床診断を整理した。発達性てんかん性脳症の臨床診断は、大田原症候群から West 症候群への移行など経過中に変化することがあるため、初期診断を優先病名とした。脳形成異常のデータベースから多小脳回と、心奇形以外の心機能異常の併発例を抽出し、臨床的特徴を検討した。DNA を抽出後、臨床情報によって *ARX, LIS1, DCX, TUBA1A, PIK3R2* については Sanger 法で直接塩基配列解析を行った。Sanger 法で変異がみつからなかった症例と *ARX, LIS1, DCX, TUBA1A* の変異の可能性が低い表現型においては、横浜市立大学院医学研究科遺伝学講座、浜松医科大学医化学講座、理化学研究所でエクソーム解析が行われた。

結果

3 年間で脳形成異常 274 例の相談を受け、200 例の画像と 178 例の DNA を収集した。てんかん性脳症は 3 年間で 333 例の臨床情報と DNA を収集した。てんかん症候群 757 家系のうち発達性てんかん性脳症 701 家系中 353 家系で原因遺伝子を同定した [1]。また、分類不能の発達性てんかん性脳症の 3 例で

de Lange 症候群の原因遺伝子である *SMC1A* の変異を同定し、発達性てんかん性脳症の原因遺伝子として臨床的特徴を報告した [2, 3]。知的障害と上肢ジストニアを併発する Partington 症候群の 1 家系で *ARX* のポリアラニン伸長変異を同定した。前頭優位の多少脳回 2 症例で Na チャネル Nav1.3 をコードし、てんかん性脳症の原因遺伝子である *SCN3A* にミスセンス変異(p.ILE875Thr)を同定し、脳形成異常の新たな分子機構を報告した [4]。脳形成異常のデータベース 1394 例中多小脳回は 311 例で、そのうち詳細な臨床情報が得られている症例は 252 例であった。多小脳回 252 例中、心奇形以外の心機能異常を併発する症例は 5 症例であった。5 例とも生後数日から難治性のてんかん発作を発症し、進行性に大脳が萎縮し、重度の四肢麻痺と知的障害を呈した。また、甲状腺機能低下を 3 例で認めた。5 例中 4 例で多小脳回の新たな原因遺伝子として ATP1A3 を同定し、Science Advances 誌に論文が受理された [5]。

考察

エクソーム解析による網羅的な遺伝子解析は時として予想外の結果をもたらす。*SCN3A* は電位依存性ナトリウムチャネルの Nav1.3 をコードし、発達性てんかん性脳症や焦点性てんかんの原因遺伝子として報告されている。2018 年 Zaman らは 4 例の乳児期発症てんかん性脳症で *SCN3A* 変異を同定し、我々の症例と同じ p.Ile875Thr 変異の 2 症例はやはり多小脳回を伴っていた [6]。歴史的に特発性てんかんの原因遺伝子としてイオンチャネル関連遺伝子に変異が同定されることが多く、ナトリウムチャネルについては Dravet 症候群における *SCN1A* 変異や大田原症候群などの発達性てんかん性脳症における *SCN2A, SCN8A* 変異が報告されている。*SCN3A* の Ile875Thr 変異が多小脳回を示す病態は不明だが、*SCN1A* 変異が限局性皮質異形成や異所性灰白質で報告されているほか [7]、最近、NMDA 受容体のサブユニットをコードする *GRIN1, GRIN2B* が、発達性てんかん性脳症の原因遺伝子であるとともに多小脳回など脳形成異常の原因遺伝子でもあることが報告されている [8-10]。今後、イオンチャネルを介した電気信号の変化が脳の形態形成に与える影響と脳形成異常と機能異常としてのてんかん性脳症の病態の異同の解明が期待される。

SMC1A (Structural maintenance of chromosomes 1A)は、コヒーシン複合体を構成し、体細胞分裂の過程で DNA 複製後の姉妹染色分体の接着・分割・分離と、DNA 修復に関与する [11]。*SMC1A* などコヒーシン複合体のサブユニットをコードする *NIPBL, SMC3, RAD21* およびコヒーシンの制御因子である *HDAC8* の変異は Cornelia de Lange 症候群(CdLS)をきたす [12]。*SMC1A* 変異は CdLS の約 5%で認められ、*NIPBL* 変異(80%)に次いで多い。CdLS をきたす *SMC1A* 変異はミスセンスまたはインフレームの欠失が多く，女性は男性より軽い症状を示す。その一方、*SMC1A* のナル変異として、2015 年以降スプライス異常やフレームシフト変異の報告がこれまで 15 例報告され、すべて女児であり、男児は胎生致死と考えられている。興味深いことに、*SMC1A* のナル変異では典型的な CdLS 徴候を認めず、てんかん発作と知的障害が主症状であり、症例 3 の所見に合致する。*SMC1A* のナル変異 16 例の臨床症状をまとめると、てんかん発作の発症時期は生後 1 か月以内から 28 か月（平均 8 か月）で、12 例(75%)に発作の群発を認める。発作が消失したのは 4 例のみであり、多くは難治性であった。全例に知的障害を認め、軽度は 1 例のみで 15 例が中等度から重度であった。ミスセンス変異の症例 1 と 2 の母娘例も、ナル変異の症例と同様にてんかん発作の群発傾向を認め、*PCDH19* 変異による臨床像に類似していた。

多小脳回に心奇形を伴わず心機能異常を呈する症例は 252 例中 5 例(2.0%)のみでまれであった。5 例とも進行性脳萎縮を認め、また 3 例は甲状腺機能低下を示し、多小脳回としては非典型的であった。心機能異常は、徐脈もしくは頻脈発作が 3 例、発作性心不全が 2 例でいずれも一過性の異常で改善しており、

チャネル機能異常が鑑別の一つに挙げられる。5例とも重度の四肢麻痺と最重度知的障害を呈し、多小脳回としては重症度が高かった。5例中4例で同定された多小脳回の新たな原因遺伝子 *ATP1A3* は、神経系の機能異常をきたす複数の疾患の原因遺伝子として報告され、その一部は発作性の症状が特徴である。本研究においてもてんかん発作以外に心機能異常が発作性に生じており、*ATP1A3* の機能と関連すると考えられる。*ATP1A3* が多小脳回などの脳形成異常および心機能異常をきたすことは知られておらず、予期しない発見であった。

結論

多小脳回における *SCN3A* の特異的な変異の同定は、イオンチャネルが脳形成に関与することを示唆する。*SMC1A* は CdLS に加え、発達性てんかん性脳症の原因遺伝子でもあり、発作の群発が特徴である。心機能異常を呈する多小脳回は、甲状腺機能低下や早期発症のてんかん発作、進行性脳萎縮など特徴的な所見を呈し、共通する分子病態が示唆された。実際に原因遺伝子 *ATP1A3* を同定し、脳形成と心機能に関わる新たな分子機構を明らかにした。

参考文献

1)Takata A, Nakashima M, Saitsu H, Mizuguchi T, Mitsuhashi S, Takahashi Y, et al. Comprehensive analysis of coding variants highlights genetic complexity in developmental and epileptic encephalopathy. Nat Commun. 2019;10:2506.
2)Oguni H, Nishikawa A, Sato Y, Otani Y, Ito S, Nagata S, et al. A missense variant of *SMC1A* causes periodic pharmaco-resistant cluster seizures similar to *PCDH19*-related epilepsy. Epilepsy Res. 2019;155:106149.
3)上野弘恵，岡田拓巳，藏田洋文，島津智之，池田ちづる，今村穂積, et al. てんかん発作群発と軽度知的障害を呈し、新規 *SMC1A* 遺伝子変異を認めた女児例. 脳と発達. 2019;51:309-313.
4)Miyatake S, Kato M, Sawaishi Y, Saito T, Nakashima M, Mizuguchi T, et al. Recurrent *SCN3A* p.Ile875Thr variant in patients with polymicrogyria. Ann Neurol. 2018;84:159-161.
5)Miyatake S*, Kato M*, Kumamoto T, Hirose T, Koshimizu E, Matsui T, et al. De novo ATP1A3 variants cause polymicrogyria. Sci Adv. 2021;7. doi:10.1126/sciadv.abd2368 (*co-first author)
6)Zaman T, Helbig I, Bozovic IB, DeBrosse SD, Bergqvist AC, Wallis K, et al. Mutations in *SCN3A* cause early infantile epileptic encephalopathy. Ann Neurol. 2018;83:703-717.
7)Barba C, Parrini E, Coras R, Galuppi A, Craiu D, Kluger G, et al. Co-occurring malformations of cortical development and SCN1A gene mutations. Epilepsia. 2014;55:1009-19.
8)Fry AE, Fawcett KA, Zelnik N, Yuan H, Thompson BAN, Shemer-Meiri L, et al. De novo mutations in GRIN1 cause extensive bilateral polymicrogyria. Brain. 2018;141:698-712.
9)Platzer K, Yuan H, Schutz H, Winschel A, Chen W, Hu C, et al. GRIN2B encephalopathy: novel findings on phenotype, variant clustering, functional consequences and treatment aspects. J Med Genet. 2017;54:460-470.
10)Smith RS, Walsh CA. Ion Channel Functions in Early Brain Development. Trends Neurosci. 2020;43:103-114.
11)Diebold-Durand ML, Lee H, Ruiz Avila LB, Noh H, Shin HC, Im H, et al. Structure of Full-Length

SMC and Rearrangements Required for Chromosome Organization. Mol Cell. 2017;67:334-347 e5.
12)Yuan B, Neira J, Pehlivan D, Santiago-Sim T, Song X, Rosenfeld J, et al. Clinical exome sequencing reveals locus heterogeneity and phenotypic variability of cohesinopathies. Genet Med. 2019;21:663-675.

研究成果刊行一覧

1)Miyatake S*, Kato M*, Kumamoto T, Hirose T, Koshimizu E, Matsui T, et al. De novo ATP1A3 variants cause polymicrogyria. Sci Adv. 2021;7. doi:10.1126/sciadv.abd2368 (*co-first author)
2)Takata A, Nakashima M, Saitsu H, Mizuguchi T, Mitsuhashi S, Takahashi Y, et al. Comprehensive analysis of coding variants highlights genetic complexity in developmental and epileptic encephalopathy. Nat Commun. 2019;10:2506.
3)Oguni H, Nishikawa A, Sato Y, Otani Y, Ito S, Nagata S, et al. A missense variant of *SMC1A* causes periodic pharmaco-resistant cluster seizures similar to *PCDH19*-related epilepsy. Epilepsy Res. 2019;155:106149.
4)上野弘恵，岡田拓巳，藏田洋文，島津智之，池田ちづる，今村穂積, et al. てんかん発作群発と軽度知的障害を呈し、新規 *SMC1A* 遺伝子変異を認めた女児例. 脳と発達. 2019;51:309-313.
5)Miyatake S, Kato M, Sawaishi Y, Saito T, Nakashima M, Mizuguchi T, et al. Recurrent *SCN3A* p.Ile875Thr variant in patients with polymicrogyria. Ann Neurol. 2018;84:159-161.

１０．運動症状をきたす大脳白質疾患の病態に基づく治療法の開発

分担研究者：井上　健[1]
研究機関名：1 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
研究協力者：本橋裕子[2]、石山昭彦[2]、山本晃代[2]、佐藤典子[3]、佐々木征行[2]
2 国立精神・神経医療研究センター病院　小児神経科、3 同　放射線科

【緒言】
Pelizaeus-Merzbcher 病（PMD）は、重度の運動発達遅滞にジストニア、痙性四肢麻痺、小脳失調などの神経学的症状を伴う遺伝性小児神経疾患である。これまでに対症療法以外に疾患の原因を標的とした根治療法は見出されていない。原因遺伝子は CNS 特異的な髄鞘膜蛋白質をコードする PLP1 で、最も頻度が高いゲノム重複変異や主にアミノ酸置換を伴う点変異が知られている。これまでにモデル動物を用いた解析により、重複及び点変異の両方にウコンに含まれる活性ポリフェノール成分であるクルクミンの有効性が示唆されている (1,2)。クルクミンは、食品として広く市販され、小児においても安全性の高いものである。本研究でその有効性が確立されれば、極めて安全性が高く、かつコストも安価であり、すぐに実用化することが可能であることから、臨床的な有用性が極めて高い。そこで本研究では、ヒト PMD 患者に対するクルクミンの有効性を検証するために、オープンラベル臨床試験を実施し、臨床評価尺度、MRI 画像による髄鞘化評価、電気生理学的検査により治療効果の検証を行う。

【方法】
本研究は自己対照症例オープン試験で、同一患者群の介入前後比較によるコホート研究となる。クルクミンの有効性ならびに安全性の確認をエンドポイントとする。未治療時を対照とし、用量漸増を実施する。対象者は、点変異および重複変異のいずれかの PLP1 遺伝子変異を有する PMD 患者 10 名である。年齢は５歳以上 20 歳未満とする。患者のリクルートは患者親の会を通じて行なう。臨床情報は、所定の臨床情報提供書を用いて収集し、臨床症状の変化については臨床評価尺度（運動機能の評価尺度：粗大運動能力尺度 Gross Motor Function Measure: GMFM、日常生活動作を含む臨床症状の評価尺度：PMD 機能障害スコア　PMD Functional Disability Score:PMD-FDS）を用いて経時的に評価する。髄鞘化の評価は頭部 MRI 画像から得られる髄鞘化尺度により評価する。電気生理学的検査は聴覚脳幹反応を用いる。ともに投与開始前と後で評価し、投与前からの変化量を統計学的に検定する。オープンラベル漸増法試験で試験期間は 12 ヶ月である。低用量投与（2 ヶ月、1mg/kg/day、１日１回経口投与）、高用量投与（10 ヶ月、4mg/kg/day、１日１回経口投与）とする。本研究は、JRCT に特定臨床研究として登録して実施された（実施計画番号 jRCTs031180348）。

【結果】
9 名の患者をリクルートし、臨床試験を開始した。変異の内訳は、点変異 3 名（うち１名は null 変異による軽症型）、重複 5 名、三重複 1 名である。全ての症例において、有害事象なく、服用を完遂し、評価を終了することができた。臨床症状は PMD-FDS、GFMS ともに統計学的に有意な改善は確認できなかった。頭部 MRI に関しては T1WI、T2WI ともに髄鞘化の改善を認めた症例はなかった。ABR に関しては 2 例で一部波形分離が明瞭になったが残りの 7 例は変化がなかった。9 症例全例において中途脱落はなく、血液生化学検査では肝機能障害などの異常所見は認められなかった。

【考察】
今回の臨床研究では検証した項目において、研究期間にクルクミンの有意な治療効果を示すことはできなかった。しかし、クルクミン内服における明らかな有害事象はなく忍容性、安全性は確認できた。有意な治療効果が観察されなかった要因として、対象年齢が５歳から２０歳までと広く、かつ発症早期の患者を含まなかったことが挙げられる。低年齢の患者は、自然歴として緩やかな発達が見られるため、治療効果の検証が困難であることから、今回の研究では対象から外されたが、今後疾患自然歴との比較検討によりこれらの早期の症例を対象とすることで、有意な治療効果が得られる可能性がある。

【結論】
９症例の PMD 患者を対象とした高吸収型クルクミンの１年間のオープンラベル漸増法試験を実施した。

有意な治療効果は認めなかった。明らかな有害事象はなく忍容性、安全性を確認した。

【参考文献】

1. Yu, L.H., Morimura, T., Numata, Y., Yamamoto, R., Inoue, N., Antalfy, B., et al. (2012). Effect of curcumin in a mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. Mol Genet Metab 106(1), 108-114. doi: 10.1016/j.ymgme.2012.02.016.
2. Epplen, D.B., Prukop, T., Nientiedt, T., Albrecht, P., Arlt, F.A., Stassart, R.M., et al. (2015). Curcumin therapy in a Plp1 transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. Ann Clin Transl Neurol 2(8), 787-796. doi: 10.1002/acn3.219.

研究成果刊行一覧

1. Kashiki H, Li H, Miyamoto S, Ueno H, Tsurusaki Y, Ikeda C, Kurata H, Okada T, Shimazu T, Imamura H, Enomoto Y, Takanashi JI, Kurosawa K, Saitsu H, Inoue K. *POLR1C* variants dysregulate splicing and cause hypomyelinating leukodystrophy. Neurol Genet. 2020 Oct 13;6(6):e524. doi:10.1212/NXG.0000000000000524.

研究成果刊行一覧（全員分）

1. Ono H, Shimizu-Motohashi Y, Takeshita E, Ishiyama A, Saito T, Sasaki M, et al. Childhood-onset cerebellar ataxia in Japan: A questionnaire-based survey. *Brain Behav.* 2019;9:e01392. doi: 10.1002/brb3.1392.
2. Miyatake S, Kato M, Saito T, Matsumoto N, et al. Recurrent *SCN3A* p.Ile875Thr variant in patients with polymicrogyria. *Ann Neurol.* 2018:84:159-61. doi: 10.1002/ana.25256.
3. Takata A, Tohyama J, Sasaki M, Kato M, Matsumoto N, et al. Comprehensive analysis of coding variants highlights genetic complexity in developmental and epileptic encephalopathy. *Nat Commun.* 2019;10: 2506. doi: 10.1038/s41467-019-10482-9.
4. Imagawa E, Kato M, Sasaki M, Matsumoto N. et al. *PRUNE1*-related disorder: expanding the clinical spectrum. *Clin Genet.* 2018;94:362-7. doi: 10.1111/cge.13385.
5. Sasaki M, Shimizu-Motohashi Y, Takeshita E, Matsumoto N, et al. *ATP1A3* variants and slowly progressive cerebellar ataxia without paroxysmal or episodic symptoms in children. *Dev Med Child Neurol.* 2021;63:111-5. doi: 10.1111/dmcn.14666.
6. Miyatake S*, Kato M*, Kumamoto T, Matsumoto N, et al. De novo *ATP1A3* variants cause polymicrogyria. *Sci Adv.* 2021;7:eabd2368. doi: 10.1126/sciadv.abd2368. (*co-first author)
7. Hirasawa-Inoue A, Ishiyama A, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Saito T, Matsumoto N, Sasaki M, et al. Single-fiber electromyography-based diagnosis of *CACNA1A* mutation in children: A potential role of the electrodiagnosis in the era of whole exome sequencing. *Brain Dev.* 2019;41:905-9. doi: 10.1016/j.braindev.
8. Enokizono M, Sato N, Sasaki M, et al. Disrupted cortico-ponto-cerebellar pathway in patients with hemimegalencephaly. *Brain Dev.* 2019;41:507-15. doi: 10.1016/j.braindev.2019.01.002.
9. Hirasawa-Inoue A, Sato N, Ishiyama A, Takeshita E, Sasaki M, et al. New MRI findings in Fukuyama congenital muscular dystrophy: brain stem and venous system anomalies. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2020;41:1094-98 doi: 10.3174/ajnr.A6577.
10. Tsuchida N, Kato M, Tohyama J, Matsumoto N, et al. *GRIN2D* variants in three cases of developmental and epileptic encephalopathy. *Clin Genet.* 2018;94:538-47. doi: 10.1111/cge.13454.
11. Kashiki H, Li H, Inoue K, et al. *POLR1C* variants dysregulate splicing and cause hypomyelinating leukodystrophy. Neurol Genet. 2020;6:e524. doi:10.1212/NXG.0000000000000524.
12. Mizuguchi T, Nakashima M, Kato M, Matsumoto N, et al. Loss-of-function and gain-of-function mutations in PPP3CA cause two distinct disorders. Hum Mol Genet. 2018;27:1421-33. doi: 10.1093/hmg/ddy052.
13. Mizuguchi T, Suzuki T, Abe C, Matsumoto N, et al. A 12-kb structural variation in progressive myoclonic epilepsy was newly identified by long-read whole-genome sequencing. J Hum Genet. 2019;64:359-68. doi: 10.1038/s10038-019-0569-5.
14. Sakamoto M, Iwama K, Sekiguchi F, Matsumoto N, et al. Novel *EXOSC9* variants cause pontocerebellar hypoplasia type 1D with spinal motor neuronopathy and cerebellar atrophy. J Hum Genet. 2021;66:401-7. doi: 10.1038/s10038-020-00853-2. Epub 2020 Oct 10.
15. Oguni H, Nishikawa A, Kato M, Matsumoto N, et al. A missense variant of *SMC1A* causes periodic pharmaco-resistant cluster seizures similar to *PCDH19*-related epilepsy. *Epilepsy Res.* 2019;155:106149.
16. Itagaki R, Tohyama J, Matsumoto N, et al. Characteristics of PPT1 and TPP1 enzymes in neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL) 1 and 2 by dried blood spots (DBS) and leukocytes and their application to newborn screening. Mol Genet Metab. 2018;124:64-70.
17. Tsuchida N, Kato M, Tohyama J, Matsumoto N, et al. GRIN2D variants in three cases of developmental and epileptic encephalopathy. Clin Genet. 2018;94:538-47.
18. Nakashima M, Tohyama J, Matsumoto N, et al. Identification of de novo *CSNK2A1* and *CSNK2B* variants in cases of global developmental delay with seizures. J Hum Genet. 2019;64:313-22.
19. Fujita A, Tohyama J, Kato M, Matsumoto N, et al. Pathogenic variants of *DYNC2H1*,

KIAA0556, and *PTPN11* associated with hypothalamic hamartoma. Neurology. 2019; 93:e237-e251.
20. Negishi Y, Ieda D, Tohyama J, et al. Schaaf-Yang syndrome shows a Prader-Willi syndrome-like phenotype during infancy. Orphanet J Rare Dis 2019;14:277. doi: 10.1186/s13023-019-1249-4.
21. Okumura A, Shimojima K, Tohyama J, et al. *PRRT2* mutations in Japanese patients with benign infantile epilepsy and paroxysmal kinesigenic dyskinesia. Seizure. 2019;71:1-5 .
22. Hamanaka K, Tohyama J, Matsumoto N, et al. De novo truncating variants in the last exon of *SEMA6B* cause progressive myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet.* 2020;106:549-58.
23. Itai T, Tohyama J, Kato M, Matsumoto N. De novo variants in *CELF2* that disrupt the nuclear localization signal cause developmental and epileptic encephalopathy. *Hum Mutat.* 2021;42:66-76. doi: 10.1002/humu.24130.
24. Hiraiwa A, Matsui K, Kato M, Tohyama J, et al. Polymicrogyria with calcification in Pallister-Killian syndrome detected by microarray analysis. *Brain Dev.* 2021;43:448-53. doi: 10.1016/j.braindev.2020.11.003.
25. Kobayashi Y, Tohyama J, Kato M, Matsumoto N, et al. Clinical manifestations and epilepsy treatment in Japanese patients with pathogenic *CDKL5* variants. *Brain Dev.* 2021;43:505-14. doi: 10.1016/j.braindev.2020. 12.006. Epub 2021 Jan 9.
26. Toki T, Shimizu-Motohashi Y, Takeshita E, Ishiyama A, Sasaki M, et al. Hyperglycemic crisis in patients with mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS). *Pediatr Neurol.* 2021;114:1-4.
27. Miura M, Ishiyama A, Sasaki M, et al. 13q13.3 microdeletion associated with apparently balanced translocation of 46,XX,t(7;13) suggests *NBEA* involvement. *Brain Dev.* 2020;42:581-6. doi: 10.1016/j.braindev.2020.05.006.
28. Ishiyama A, Iida A, Sasaki M, et al. A novel *LMNA* mutation identified in a Japanese patient with *LMNA*-associated congenital muscular dystrophy. *Hum Genome Var.* 2018;5:19. doi: 10.1038/s41439-018-0018-6. eCollection 2018.
29. Oitani Y, Ishiyama A, Takeshita E, Shimizu-Motohashi Y, Sasaki M, et al. Interpretation of acid alpha-glucosidase activity in creatine kinase elevation: A case of Becker muscular dystrophy. *Brain Dev.* 2018;40:837-840. doi: 10.1016/j.braindev.2018.05.001.
30. Kimura Y, Sato N, Ishiyama A, Sasaki M, et al. Serial MRI alterations of pediatric patients with beta-propeller protein associated neurodegeneration (BPAN). *J Neuroradiol.* 2021;48:88-93. doi: 10.1016/j.neurad.2020.04.002.
31. Saito T, Sugai K, Sasaki M, et al. Transient water-electrolyte disturbance after hemispherotomy in young infants with epileptic encephalopathy. *Child's Nervous System* 2020;36:1043-8. doi: 10.1007/s00381-019-04452-1.
32. Ogasawara M, Saito T, Koshimizu E, Akasaka N, Sasaki M. A p.Arg499His mutation in *SPAST* Is associated with infantile onset ascending spastic paralysis complicated with dysarthria and anarthria. *Neuropediatrics.* 2019;50:391-4. doi: 10.1055/s-0039-1694973.

30-6

The Studies on Congenital Developmental Brain Dysfunction presenting mainly Motor Symptoms

Masayuki Sasaki, M.D.,
Department of Child Neurology,
National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)

(1) The main purpose of the studies

The main purposes of the studies are to clarify the pathogenesis of the congenital developmental brain dysfunction presenting mainly motor symptoms such as involuntary movements (dystonia, myoclonus, etc.), cerebellar ataxia, spastic paraplegia, or paroxysmal symptoms (spasms, tonic seizures, atonic seizures, transient hemiplegia, etc.) including developmental and epileptic encephalopathy (DEE). There are so many disorders which display these motor symptoms. Among these disorders, there are not a few patients who have not yet been diagnosed correctly. It is sometimes difficult to diagnose these patients with congenital developmental brain dysfunction presenting motor symptoms precisely only by both neuroradiological and biochemical studies. Using developed gene analysis methods including Next Generation Sequencing (NGS), we will try to elucidate pathogenesis of undiagnosed rare disorders in children with motor symptoms.

(2) The study group

The members are as follows, Masayuki Sasaki, Takashi Saitoh, Akihiko Ishiyama, Yuko Motohashi, Eri Takeshita (Department of Child Neurology, NCNP), Noriko Sato (Department of Radiology, NCNP), Ken Inoue (Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, NCNP), Naomichi Matsumoto (Yokohama City University), Mitsuhiro Kato (Showa University), and Jun Tohyama (NHO Nishi-Niigata Central Hospital)

(3) Results

1) By epidemiological methods, this study disclosed the numbers of patents with cerebellar ataxia and dystonia which started in childhood in Japan. We found that there are so many disorders which cause these symptoms in childhood.

2) By using NGS, this study clarified many causative genes presenting cerebellar ataxia, movement disorders, and developmental epileptic encephalopathies (DEE) in infancy to childhood.

3) New clinical trials, such as Curcumin for patients with Pelizaeus-Merzbacher disease, have been carried out.