

博士論文

副腎白質ジストロフィーの分子遺伝学研究並びに
造血幹細胞移植による治療

松 川 敬 志

目次

要旨	4
第一章 研究の目的と背景	5
第二章 <i>ABCD1</i> 遺伝子のハイスループット遺伝子解析法の開発	18
2-1 背景と目的	18
2-2 対象と方法	20
2-3 結果	27
2-3-1 <i>ABCD1</i> 遺伝子変異解析	27
2-3-2 <i>ABCD1</i> 大欠失を含む複雑な変異の解析	32
2-4 考察	38
第三章 ALD 症例の多彩な表現型を規定する修飾因子の探索	40
3-1 背景と目的	40
3-2 対象と方法	43
3-3 結果	36
3-3-1 <i>ABCD2</i> , <i>ABCD3</i> , <i>ABCD4</i> の多型解析及び ALD 表現型との関連解析	53

3-3-2 ペルオキシソームで機能する遺伝子群の variants 解析及びALD表現型との 関連解析	58
3-4 考察	68
第四章 思春期/成人大脳型 ALD に対する造血幹細胞移植	74
4-1 背景と目的	74
4-2 対象と方法	80
4-3 結果	84
4-4 考察	96
第五章 結語と今後の課題	104
謝辞	108
参考文献	109
付表	120

要旨

副腎白質ジストロフィー(Adrenoleukodystrophy: ALD)は、*ABCD1* を原因遺伝子とする X 連鎖性劣性遺伝性疾患である。進行性の中枢神経障害を認め、時に副腎不全を伴う。多彩な表現型を認めるが、遺伝子表現型連関は明らかではない。原因遺伝子 *ABCD1* と相同性の高い偽遺伝子(pseudogene)の存在のために、従来の遺伝子解析には RT-PCR を利用した遺伝子変異解析が一般的であったが、我々は、resequencing microarray を用いた迅速なハイスループット遺伝子解析システムを構築した。さらに、多彩な表現型を修飾する因子を同定するために、日本人 ALD 症例において、*ABCD1* と相同性の高い *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4*, 及び *ABCD1* の発現産物と同様に、ペルオキシソームで機能する 95 の遺伝子を表現型修飾因子の候補遺伝子と考え、網羅的な解析を行ったところ、既知病因変異及び複数の機能予測アルゴリズムにおいて遺伝子産物に機能変化を来すと考えられる新規 variants を有する症例数が、予後不良である大脳型 ALD において、緩徐進行性の AMN と比して、有意に多いことを見出した。

さらに、発症早期の小児大脳型 ALD においてのみ、症状の進行停止に有効であることが確立されている造血幹細胞移植(HSCT)を、思春期・成人大脳型 ALD に対しても適応し、症状の進行停止に有効であることを示した。

第一章

研究の背景と目的

副腎白質ジストロフィー(Adrenoleukodystrophy: ALD)は中枢神経系の脱髄を主体とし、時に副腎不全を伴う X 連鎖性劣性遺伝性疾患である¹。多彩な表現型を呈するが、遺伝子表現型連関は明らかではない²⁻⁶。確立された治療法として、小児大脳型 ALD に対して、発症早期の造血幹細胞移植(Hematopoietic stem cell transplantation:HSCT)が、唯一症状の進行停止に有効とされている⁷⁻⁹。

臨床病型について

ALD の表現型として、小児大脳型 ALD、思春期大脳型 ALD、成人大脳型 ALD、小脳脳幹型 ALD、Adrenomyeloneuropathy (AMN)、Addison 単独型等、多彩な臨床病型を呈する。

1) 小児大脳型 ALD (CCALD)

小児大脳型 ALD では 5-10 歳に好発し、視力・聴力障害、学業成績低下などで発症する。比較的急速な進行を呈し、通常 1-3 年で植物状態に陥る。平均生存期間は、発症後 7.5 年となっている。日本における全国調査では、全 ALD 症例の内 30%程度に認められる^{10,11}。

2) 思春期大脳型 ALD (AdolCALD)

思春期大脳型 ALD では、11 歳から 21 歳までに、小児大脳型と同様に、精神症

状、行動異常、認知機能低下等で初発し、進行性である(欧米では、11-21歳の時期に大脳症状で発症する場合を、思春期大脳型と分類しているため、その分類に従って記載している^{12,13})。全ALD症例の内9%程度に認められる^{10,11}。

3) 成人大脳型 ALD (ACALD)

精神症状、行動異常、認知機能低下等で初発し、比較的急速な進行を呈し、予後不良である。平均生存期間は、発症後7.5年となっている。全ALD症例の内、20%程度の症例で認められる^{10,11}。

4) Adrenomyeloneuropathy (AMN)

思春期から成人以降で発症することが多く、痙性歩行を主症状とし、インポテンツ、尿失禁、末梢神経障害を伴う。感覚障害が見られる場合は、脊髄障害を示唆するような sensory level を伴う場合が多い。緩徐進行性の経過であるが、経過10年で約半数の症例が大脳型に移行し、一旦大脳症状を呈すると急速な悪化を来す。全ALD症例の内、25%程度の症例で認められる^{10,11}。

5) 小脳・脳幹型 ALD

小脳症状を主症状とし、脳幹、小脳に始まる脱髄所見を特徴とするが、経過2年で約半数の症例が大脳型に移行する。全ALD症例の内、8%程度の症例で認められる^{10,11}。

6) Addison 病単独型

嘔吐、筋力低下、全身倦怠感、体重減少等の症状を認める。また皮膚や歯肉の色素沈着を来す。7歳頃に発症することが多いが、成人期にも認めることがある。AMNや大脳型などに進展することがあるため、注意を要する^{10,11}。

7) 発症前男性

どの病型をいつ発症するか、予測をすることができないため、注意深い経過観察を要する。

8) 女性発症者

AMNに類似の症状を呈する。年齢とともに軽度の症状から、歩行障害を呈する女性保因者も見られる。オランダの疫学調査では、60代以降では、軽微な異常所見を含めると、約半数にみられるとの報告がある¹³。

ALDの疫学について

日本における全国調査では、発症頻度は、出生男児30,000-50,000人に1人が患者と報告されている^{10,11}。また米国による調査では、発症頻度は、出生男児21,000人に1人が患者、出生女児14,000人に1人が保因者と報告されている¹⁴。

各表現型の割合については、これまで10の国と地域において、調査がなされている^{10,11,15-22}。小脳脳幹型は、日本のみにおいて、分類されていることが、特徴的である(表1, 図1)。

また、これまで、AMNから大脳型への移行例における疫学調査として、日本の

全国調査では、AMN の 1/2 の症例が 10 年で大型へ移行すると報告されている一方^{10,11}、France の調査では、AMN の 1/3 が 5-10 年で大脳型へ移行するとしており¹⁶、また、ノルウェーの全国調査では AMN の 36%が大脳型への移行例としており²²、日本において、AMN から大脳型への移行例が多い傾向にある。

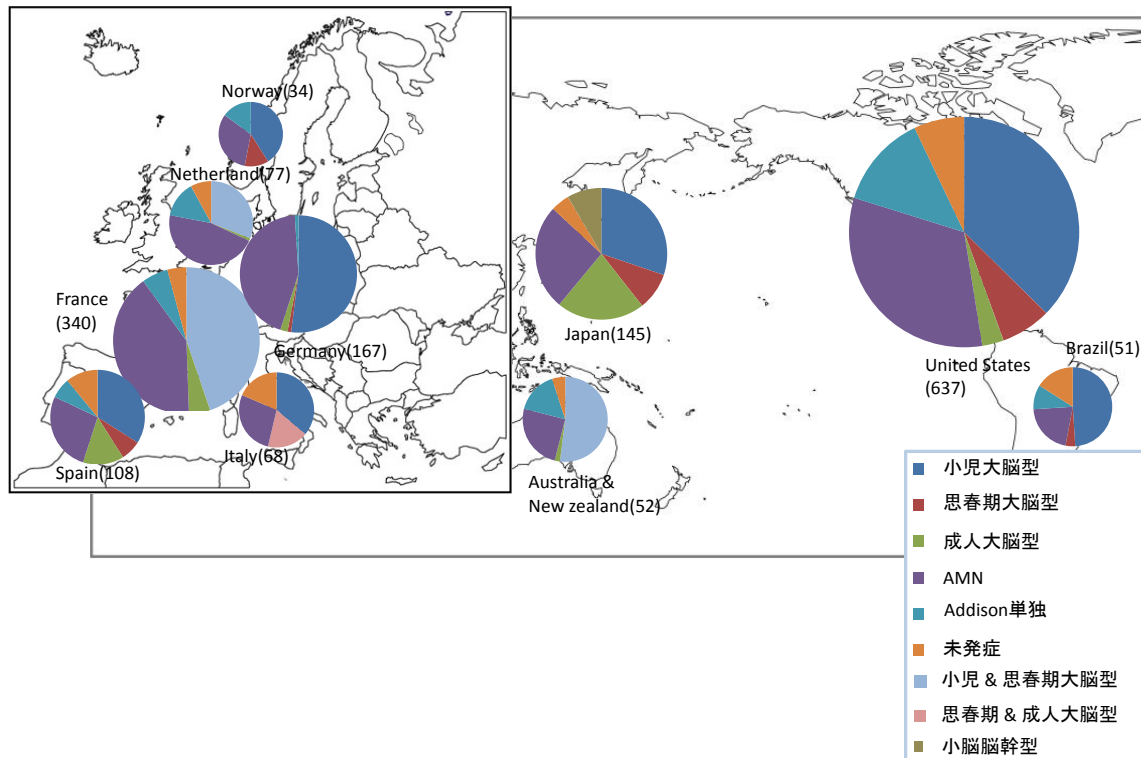
しかし、報告によって表現型の分類方法が異なり、且つ一施設で診断がなされた症例データにおける、表現型の割合を示している報告も存在する。さらには、症例を扱う科が小児科から、神経内科、内分泌内科と多岐に渡るため、症例収集において中心になる施設の科に依存した表現型の割合に偏りが生じる可能性も考えられ、条件を揃えた前向き検討が必要と考えられる。

一方で、実際に表現型の割合に人種差があることも否定はできないと考えられる。

表 1. 世界における ALD の疫学調査

国と地域	症例数 (人)	各表現型の割合 (%)							文献	検索方法
		小児 大脳型	思春期 大脳型	成人 大脳型	AMN	Addison 単独型	未発症	小脳 脳幹型		
United States	637	37	7	3	32	13	7	-	Brain 1997;120:1485-1508	Kringer instituteで診断された症例、紹介状、担当医から得られた臨床情報
France	340	44.8		4.7	40.6	5.8	4.2	-	Ann N Y Acad Sci. 1996;804:461-76	詳細についての記載なし、紹介状、担当医から得られた臨床情報
Netherlands	77	31		1	46	14	8	-	Neurology 1994;44:2343e6	1992.6-10、200床以上ある病院の神経内科、内科、小児科にALD症例の調査を依頼
Germany	167	52	1	2	44	1	-	-	Am J Med Genet 1997;71:475e8	ドイツの439の小児科、463の神経内科、41の病理部に調査を依頼
Australia & Newzealand	52	52		2	25	16	5	-	Am J Med Genet 1998;76:420e3	1981-96、Women's and Children's Hospitalで診断された症例、紹介状、担当医から得られた臨床情報
Italy	68	36.1	17.5		27.7	-	18.5	-	Ital J Neurol Sci 1998;19:315e9	1985-1997、イタリア国内で診断された症例(詳細についての記載なし)
Japan	152	30.3	9.2	21.7	26.0	-	4.6	8.5	Brain & Development 2005;27:353-357	1990-1999の全国調査。合計4802の200床以上の病院の内科、神経内科、小児科、精神科及び77の小児病院、国立療養所へ調査票を送り、2次調査として、調査に前向きな返事があった161の科及び病院からの臨床情報
Spain	108	34	7	14	27	7	11	-	Clin Genet 2005; 67:418e24	1988-2003 Corporació Sanitària Clínicで診断された症例
South Brazil	51	49	4	0	21	10	16	-	Brain Dev 2009; 32:180e90	2002-2006 Hospital de Clínicas de Porto Alegreで診断された症例
Norway	34	41	12	0	32	15	-	-	Pediatr Neurol 2013;48:212-9	1945-2011 ノルウェー全土の病院で診断された症例及びその家系

図 1. 世界における ALD の疫学調査、表現型の割合



これまで 10 の国・地域で疫学調査がなされている

ALD の病態

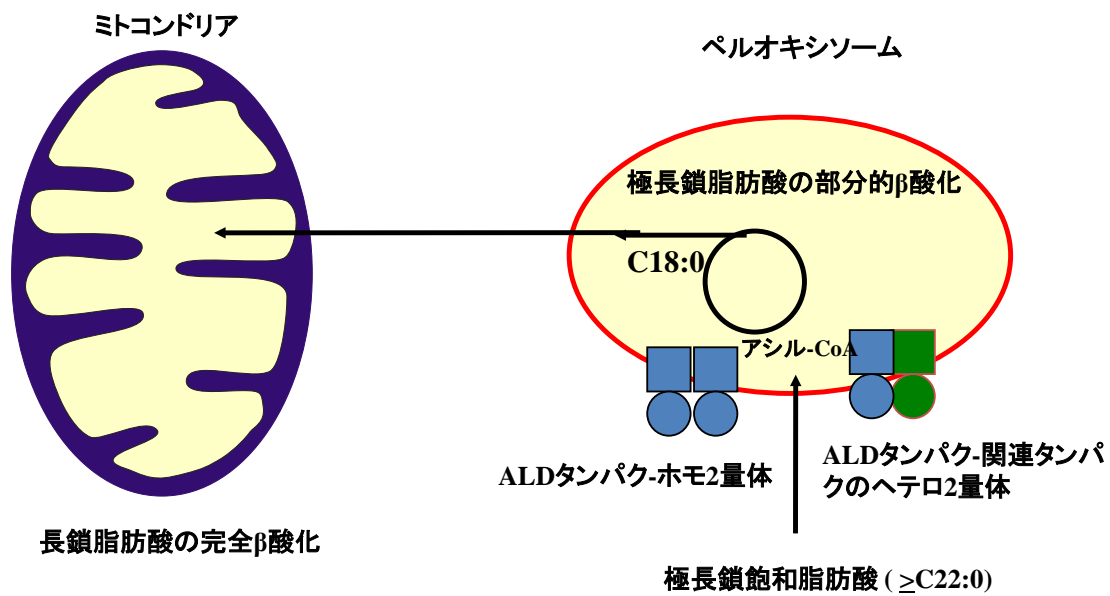
病因は Xq28 に存在する *ABCD1* 遺伝子変異による¹。*ABCD1* は、ペルオキシソーム膜に局在する adrenoleukodystrophy protein (ALDP) をコードし、*ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* という相同性の高い遺伝子が存在することが知られている⁶。

ALDP は、half transporter として homodimer を作る、または、もう一つの *ABCD1* 関連タンパクである *ABCD2* にコードされた adrenoleukodystrophy-related protein (ALDR) や *ABCD3* にコードされた 70-kDa peroxisomal membrane protein (PMP70) と heterodimer を作ると考えられている (図 2)²³。そして、極長鎖飽和脂肪酸の膜輸送に関与していると考えられている。生化学的な異常として、ALD 症例の血液や組織に極長鎖飽和脂肪酸の蓄積を認めるものの、その病態は解明されておらず、大脳白質で生じる炎症性脱髄の機序や、極長鎖飽和脂肪酸蓄積の病態への関与も不明である。

また、*ABCD1* ノックアウトマウスは、極長鎖飽和脂肪酸の上昇を認めるものの、生後 15 ヶ月以降に脊髄病変を認め、下肢の痙性を主な症状とするに止まる。大脳症状は認められず、ALD の表現型の中で、脊髄の非炎症性軸索変性のみを認める軽症の AMN 型に類似の表現型を呈することが知られている^{24, 25}。一方で、ALD の原因遺伝子 *ABCD1* と同様にペルオキシソームの物質輸送に関わっているとされる *PEX5* 遺伝子を、オリゴデンドロサイトにおいてノックアウトしたマ

ウスにおいては、オリゴデンドロサイトにおけるペルオキシソームが機能不全に陥り、小児・成人脳型 ALD で生じる大脳白質の広汎な軸索損傷、炎症性脱髄を生じることが知られている²⁶。

図 2. ペルオキシソーム膜に局在する adrenoleukodystrophy protein (ALDP)



ALD の診断について

診断としては、生化学的に血漿スフィンゴミエリン、赤血球膜スフィンゴミエリン分画、血漿中の総脂質の極長鎖飽和脂肪酸の上昇 (C24:0/C22:0, C25:0/C22:0, C26:0/C22:0 の比で評価される。)が認められる²⁷⁻²⁹。

0.1%の症例では境界値または正常値を示し、また、保因者の15%は正常値を示すため、極長鎖脂肪酸の分析が境界値を示す例や非典型例、保因者における診断確定等において遺伝子診断が重要となると報告されている³⁰。

1984年 Moser らにより、小児大脳型 ALD に対する同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT)の初めての報告以来、発症早期に行われた場合の小児大脳型 ALD に対する HSCT の有効性が示されている^{7-9,31-34}。そのため、ALD 症例及び保因者に対する原因遺伝子 *ABCD1* の迅速な遺伝子診断は、ALD の臨床現場において必須となる。

また、頭部 MRI 上、小児大脳型 ALD、思春期/成人大脳型 ALD において、後頭葉から頭頂葉、側脳室周囲に病巣が好発する。10%程度は前頭葉から病巣が進展する場合も存在する。脱髄病変を反映して T2WI/FLAIR で高信号域、T1WI で低信号域となる。病巣辺縁部で造影効果を認めることが特徴である¹³。内包や大脳脚を含む錐体路、脳梁膨大部に病変が進展することも多い。

また病状の評価のために、神経学的診察、神経心理学的検査、電気生理検査(脳

波、ABR、VEP、SEP、MEP)、副腎機能検査を行う。

ALD の治療について

確立された治療法として、小児大脳型 ALD に対しての、発症早期の造血幹細胞移植(HSCT)が、唯一症状の進行停止に有効とされている^{7-9, 31-34}。

1980年代前半より、小児大脳型 ALD に対して HSCT がなされ、発症早期に HSCT がなされた場合は、症状の進行の停止と極長鎖脂肪酸の低下が確認されている^{7-9, 31-34}。これまで思春期/成人例に対する HSCT は、HSCT の合併症である Graft versus host disease (GVHD)が小児例に比べ高率に生じることから、実施されてこなかったのが現状であった。

対症療法として、AMN の痙性対麻痺症状に対しては、対症療法として抗痙縮薬の内服や理学療法を行われている。また、副腎不全症状に対しては、ステロイドの補充が行われている。

ALD における表現型の多様性について

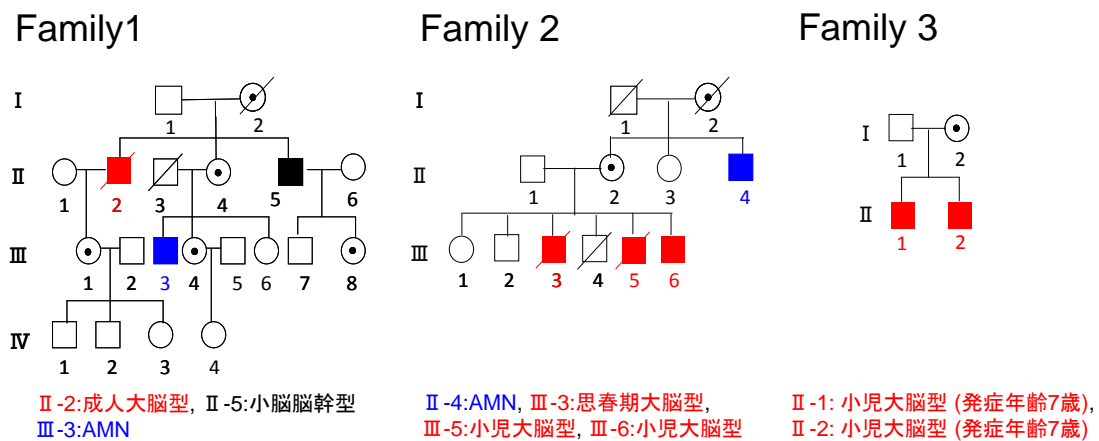
ALD は小児大脳型 ALD、AMN、AMN から大脳型への移行例、成人大脳型、Addison 単独型と様々な臨床病型を示すことが特徴であり、臨床現場での経験からは、単一家系においてでさえ、様々な表現型を呈することが知られている³⁵。日本における全国調査では、兄弟間で異なる表現型は、25%に認められ、おじ甥

間では、67%であったことが、報告されている¹¹。さらに、これまでの報告では、原因遺伝子 *ABCD1* の遺伝子変異の種類と表現型に相関がない、すなわち、明らかな遺伝子表現型連関を認めないことが知られている²⁻⁶。

図3の家系1, 2, 3の発症者は、様々な表現型を示しているが、注目すべき点として、家系2のⅢ-3, 5, 6ではいずれも大脳型を呈しており、また家系3のⅡ-1, 2ではいずれも小児大脳型を示しており、近親度の高い場合、表現型が近い傾向にあり、これはすなわち表現型に遺伝要因が関与している可能性が示唆されると考える。さらに上述のように、人種によって表現型の割合が異なる可能性もあり、このことから、表現型に遺伝要因が関与している可能性が示唆される。

これまでの研究で、ALDの表現型修飾因子の探索を試みた報告では、中枢神経の髄鞘化に必要とされるメチオニン代謝に関わる遺伝子 (*CBS*, *MTHFR*, *MTR*, *TC2*)、抗酸化物質として機能する遺伝子 *SOD2*、T細胞への脂質抗原の提示に関わる遺伝子 (*CD1A-E*)に注目したものが存在するものの、いずれも1~5遺伝子における既知の一塩基多型(single nucleotide polymorphism:SNP)の一部に注目したのみであったが³⁶⁻³⁸、欧米の症例において、*TC2*、*CBS* 遺伝子の既知のSNPの一つにおいて一部の表現型との関連が示唆されたのみであり、機能解析を行うには至っていないのが現状である。

図 3. 複数の ALD 発症者を有する家系 (自験例)



近親度が高い場合、表現型が近い傾向



表現型に遺伝要因が関与する可能性

我々は、上述のように原因遺伝子 *ABCD1* の迅速な遺伝子診断は、ALD の臨床現場において必須となることから、まず、*resequencing microarray* を用いた *ABCD1* の迅速なハイスループット遺伝子解析システムを構築した。

そして、ALD の多彩な表現型を規定する修飾遺伝子を同定することを目的に、*ABCD1* と相同性の高い *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* 及び、ペルオキシソームで機能する *PEX5* を含む 95 の遺伝子を表現型修飾因子の候補と考え、日本人 ALD 症例において、全エクソン解析を用いて、網羅的な解析を行い、検出された variants と表現型との関連解析を行った。

また、これまで成人大脳型 ALD に対する造血幹細胞移植(HSCT)は、HSCT の合併症である GVHD が小児例に比べて、高率に生じることから、積極的に実施がされておらず、成人大脳型 ALD に対しては、HSCT の臨床効果が確立されていないのが現状であった。そこで我々は、思春期/成人大脳型 ALD の症例に対しても、HSCT の臨床効果があるかの検討を行った。

第二章

ABCD1 遺伝子のハイスループット遺伝子解析法の開発

2-1 背景と目的

前章で述べたように、副腎白質ジストロフィー(ALD)の診断は、通常、血漿スフィンゴミエリン、赤血球膜スフィンゴミエリン中の極長鎖飽和脂肪酸の上昇と共に、*ABCD1* 遺伝子変異の解析によって行われる。

1984年 Moser らにより、小児大脳型 ALD に対する同種造血幹細胞移植の初めての報告以来、発症早期に行われた場合の小児大脳型 ALD に対する造血幹細胞移植の有効性が示されている^{7-9, 31-34}。そのため、ALD 症例及び保因者に対する迅速な遺伝子診断は、ALD の臨床現場において必須となる。

しかし、*ABCD1* のエキソン 7-10 において、92-96%前後配列の一致した偽遺伝子が、染色体 2p11, 10p11, 16p11, 22q11 に存在することから、従来 PCR 及び直接塩基配列法による遺伝子解析が困難であり、遺伝子解析には RT-PCR を利用した解析が行われていた³。そのため解析には長時間を要することが一般的であった。そこで、我々は、偽遺伝子が存在する領域内でも、他の領域と異なる塩基配列を 3'末端にしたプライマーをデザインすることで、PCR による増幅を可能にした。その後 resequencing microarray、及び直接塩基配列法を用いて、塩基配列解析を施行した。さらに、resequencing microarray では解析が困難な大欠失を含む

複雑な変異についても、シーケンスキャプチャー、次世代シーケンサーで
を用いて、解析を行った。

2-2 対象と方法

日本人の ALD69 家系 75 症例(16 名の小児大脳型、11 名の成人大脳型、8 名の思春期大脳型、21 名の副腎脊髄ミエロパチー、12 名の副腎脊髄ミエロパチーから大脳型への移行例、3 名の小脳脳幹型、1 名の小脳脳幹型から大脳型への移行例、1 名の Addison 病単独型、2 名の未発症男性)を対象とした。

解析対象 69 家系 75 症例の内 8 家系 8 症例(3 名の小児大脳型、3 名の成人大脳型、1 名の思春期大脳型、1 名の副腎髓質ミエロパチーから大脳型への移行例)については、すでに遺伝子診断がなされている症例を対象とした。

末梢血白血球より、DNA を抽出した。

本研究は東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認に基づいて施行された(承認番号 1396)。

Resequencing microarray 解析

ABCD1 遺伝子において、BLAST search 及び Smith-Waterman method を用いて、各エクソン固有のプライマーを作成した。エクソン 8-10 において、92-96%前後配列の一致した偽遺伝子が、染色体 2p11, 10p11, 16p11, 22q11 に存在することから、3'末端を他の偽遺伝子と異なるようにデザインした(図 4, 付表 1)。

50ng のゲノム DNA を、LA Taq PCR system (Takara Bio, Otsu, Shiga, Japan)を用いて、polymerase chain reaction (PCR)を行った。PCR 条件としては、94°Cで 1 分の後、94°Cで 30 秒、62°Cで 30 秒、68°Cで 2 分を 5 サイクル、94°Cで 30 秒、60°Cで 30 秒、68°Cで 2 分を 5 サイクル、94°Cで 30 秒、58°Cで 30 秒、68°Cで 2 分を 25 サイクル行った後、final extension として、68°C7 分とした。

Resequencing DNA microarray として、TKYPD01(*ABCD1*)が用いられた。TKYPD01 は、Affymetrix 社 (Santa Clara, CA, USA)の GeneChip™ CustomSeq を用いて、カスタムアレイを作成した。相同性の高い *ABCD2* は別のカスタムアレイに搭載することとした。

エクソン 3, 4, エクソン 6, 7, エクソン 8-10 に関しては、近傍に存在するため、一つの amplicon として PCR を行った。Affymetrix 社のプロトコールに従い、PicoGreen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)を用いて定量し、等モルになるようにプーリングを行った。その後、DNaseI による断片化、ビオチンでのラベル

化を行った後、マイクロアレイへハイブリダイゼーションを行った。マイクロアレイは Fluidics station 450 を用いて染色された後、GeneChip™ Scanner 3000 を用いてスキャンを行った(図 5)³⁹。

データは、GeneChip™ DNA Analysis Software version 2.0 (GDAS2.0)を用いて解析を行った。塩基配列が GDAS2.0 で決定できない場合には、各塩基のシグナル強度を目視することで、塩基配列の決定を行った。変異が疑われた場合は、直接塩基配列決定法を用いて、確認を行った。

直接塩基配列決定法

エキソンと周囲のイントロンを含んだ領域について PCR で増幅を行い、ExoSAP-IT (USB, Cleveland, OH, USA)を用いて、純化を行った後、BigDye Terminator v3.1 kit を用いて伸長反応を行い、ABI PRISM3100 シーケンサーを用いて塩基配列を解析した (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)。

図 4. *ABCD1* におけるプライマーの設計

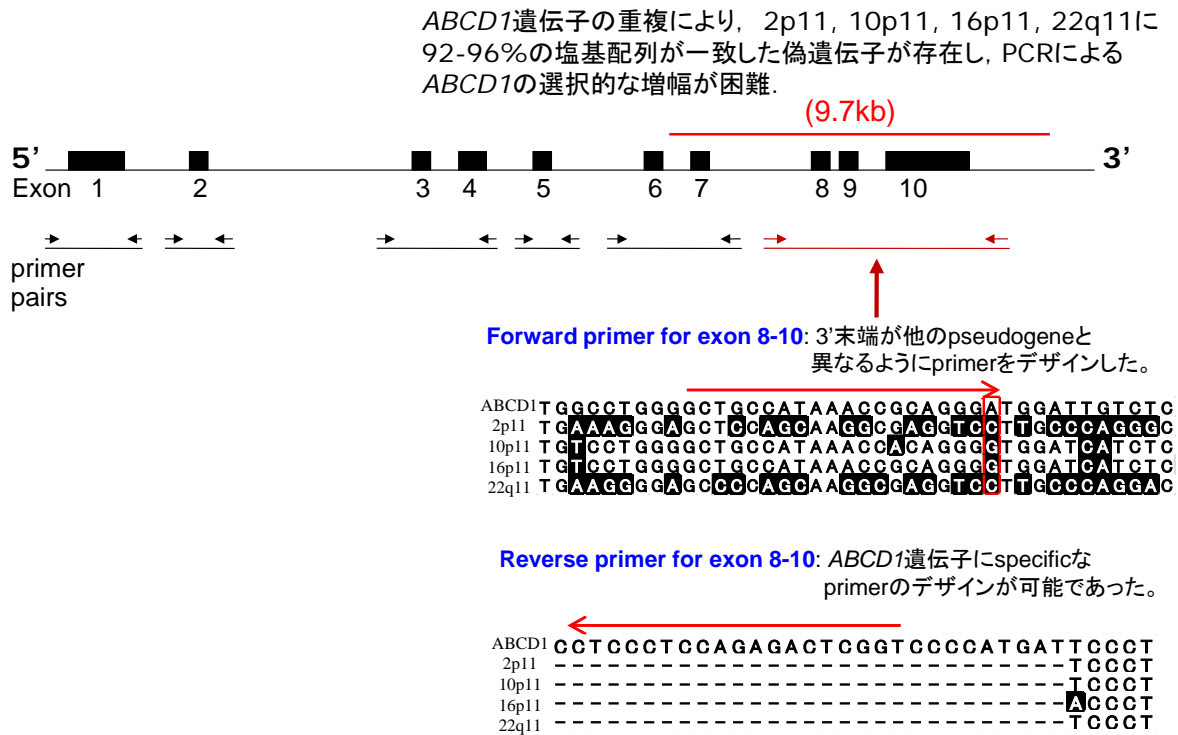
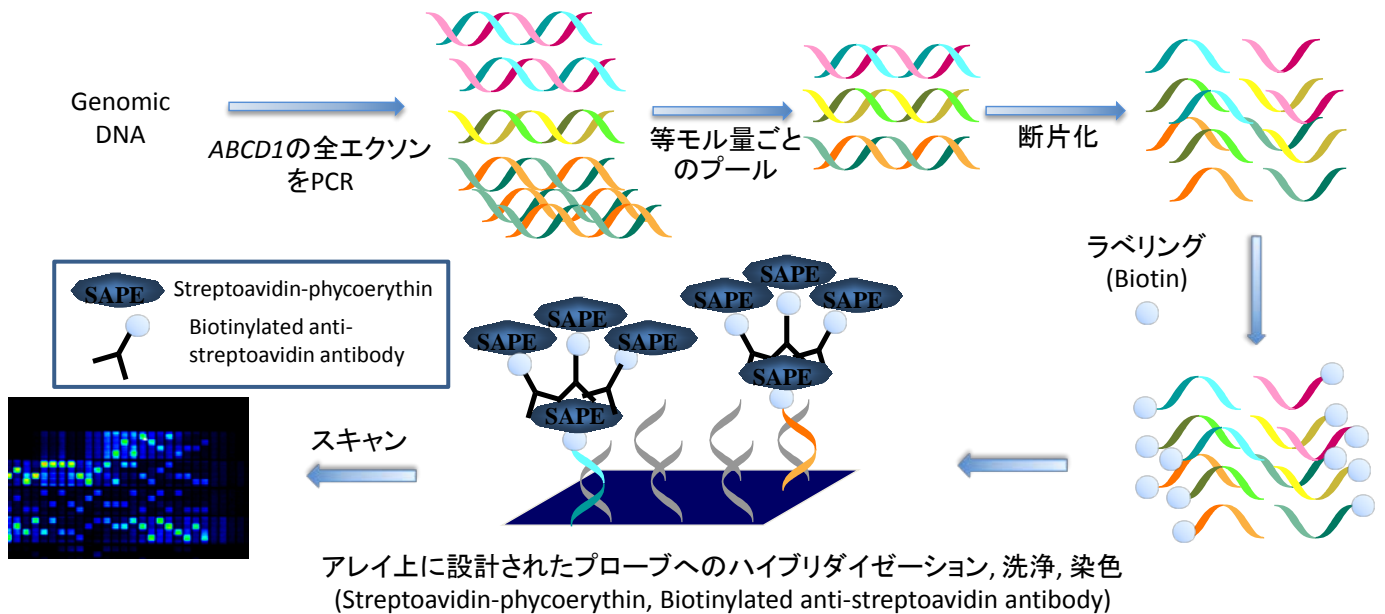


図 5. Resequencing microarray の工程



大欠失を含む複雑な変異の解析方法

大欠失を含む複雑な変異については、欠失の断端部位のさらに詳細な解析のために、Roche, Nimblegen 社の SeqCap EZ Developer(プローブは平均 76bp、最頻値 76bp とし、範囲としては 64bp-93bp)を用いて、*ABCD1* 及びその周辺領域(30.4kb, chrX: chrX:152,985,323-153,015,705)のキャプチャーを行った。キャプチャーを行い、候補領域に濃縮したサンプルを GS Junior (Roche, basel, Switzerland)を用いて、解析を行った(図 6)。

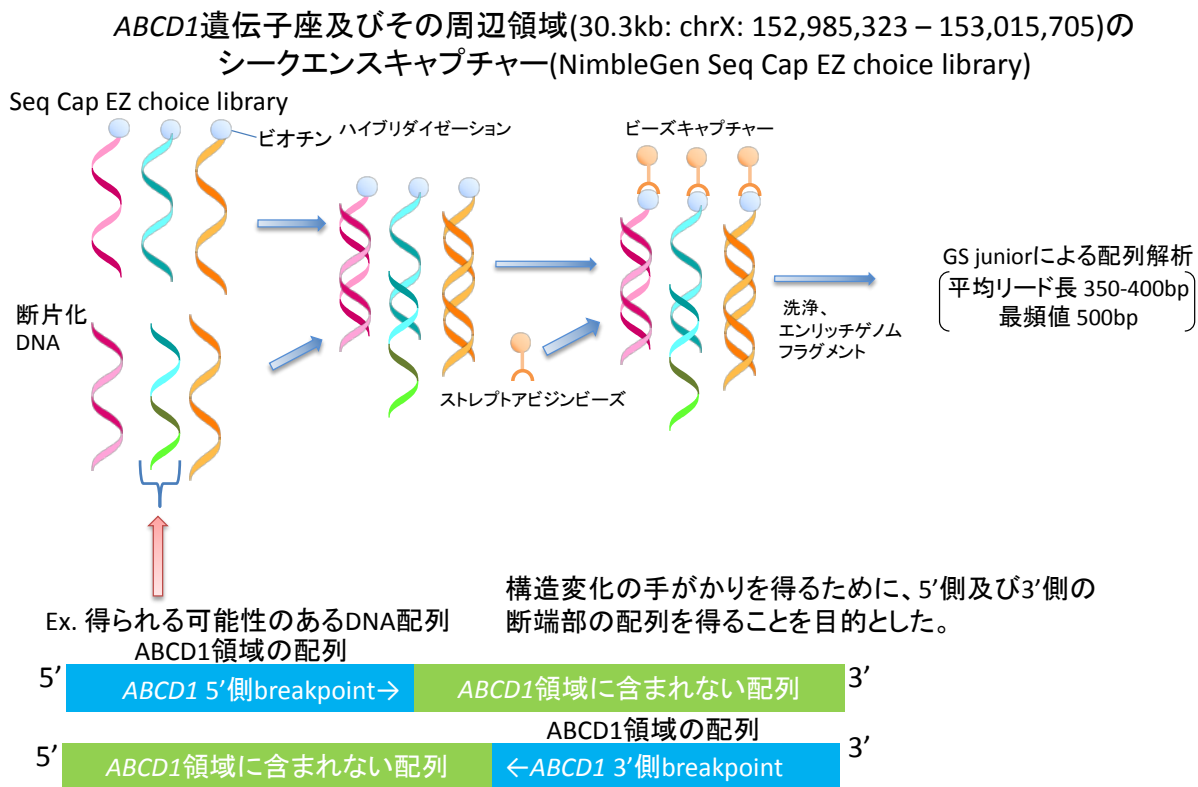
解析手順は、Roche, Nimblegen 社のプロトコールに従って、ライブラリの調整として、500ng のサンプル DNA のコバリスを用いた 500bp 程度への断片化、ゲノム断片の両端へのアダプターの結合、少数サイクル(12 サイクル)の Ligation mediated PCR (LM-PCR)によるサンプルライブラリの増幅を行った。調整したゲノムライブラリを Seq Cap EZ library と混合し、ハイブリダイゼーションを行った。ビオチン化 DNA オリゴプローブ混合溶液である SeqCap EZ library を、ストレプトアビジンビーズを添加することで、プローブオリゴとゲノム DNA 断片の複合体を回収した。ストレプトアビジンビーズで結合しなかった断片の洗浄除去し、エンリッチされた断片プールを少数サイクル(15 サイクル)の LM-PCR で増幅。定量 PCR を用いて、濃度を定量した。

Roche 社のプロトコールに従い、エマルジョン PCR を行うために、ターゲット

領域に濃縮されたキャプチャー済みサンプルを熱変性(95°C、2分)で一本鎖にした後、キャプチャービーズを混合した。さらにエマルジョンオイルと混合し、攪拌し、PCRを行い、ビーズ上でDNAを増幅した。イソプロパノールでエマルジョンをブレイキングし、ビーズを回収した。DNA増幅のあるビーズにビオチン化プライマーを結合し、ストレプトアビジンビーズを添加することで、DNA増幅のあるビーズのみをエンリッチした。DNAライブラリビーズのエンリッチメント後、シーケンスプライマーのアニーリングを行った。ピコタイタープレートへのビーズの充填を行い、GS Junior(Roche, Basel, Switzerland)を用いた解析を行った。

GS Reference Mapper(Roche, Basel, Switzerland)により、得られたリードの参照配列 GRCh37/hg19 へのマッピング、変異検出を行った。また、得られたマッピング結果(BAM ファイル)を IGV (Integrative Genomics Viewer) を用いて、確認した⁴⁰。

図 6. 大欠失を含む複雑な変異における断端配列解析の流れ



2-3 結果

2-3-1 *ABCD1* 遺伝子変異解析

日本人症例における Resequencing DNA microarray 及び直接塩基配列法による *ABCD1* の遺伝子解析では、*ABCD1* におけるすべての点突然変異、小欠失・挿入は、resequencing DNA microarray システム、及び直接塩基配列法を用いて、変異を同定することが可能であった。*ABCD1* の遺伝子変異は全領域に渡って検出され、点変異が 56 個、ナンセンス変異が 4 個、フレームシフト変異が 10 個、小欠失変異が 2 個、disruption of gene structure が 3 個であった。*ABCD1* 遺伝子変異の種類と表現型との間に相関は認めなかった(表 2-4)。ALDP の機能が完全になくなると考えられる欠失/フレームシフト/disruption of gene structure 変異においても、18 例中、小児大脳型 2 例、思春期大脳型 2 例、成人大脳型 5 例、AMN から大脳型への移行例 4 例、小脳脳幹型 1 例、AMN4 例と、遺伝子変異の種類と、表現型との間には ALD 症例の表現型の種類との相関は認められなかった(大脳型と AMN との比較 p 値 0.557)。

また、検出された *ABCD1* 遺伝子変異の種類が同一である症例として、frameshift at Q472, frameshift at R622, W595X, S108L, L154P, G266R, L313P, R518W, P540S, R554H, E609K, R617H, H667N の変異を有する症例が存在した (表 5)。L154P, R617 変異以外については、複数の表現型において、遺伝子変異が認められた。

また、自験例において、L154P 変異については、小児大脳型 ALD のみについて検出されたが、既報告において、発症前男性においても L154P 変異は、検出されている⁴¹。また、自験例において、R617H 変異は、自験例においては、AMN から大脳型への移行例においてのみ検出されたが、既報告においては、AMN においても R617H 変異は検出されている⁴²。

これらは、これまでの既報告同様に、遺伝子表現型連関を認めないことを示唆しているものとする³。

表 2. ALD の表現型と遺伝子変異の分布

Nonsense, frameshift mutation, Disruption of gene structure

Exon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
大脳型	Del. E291	Del. IVs1(-109)- Ex2(+11)*	fs at F385				Del. HHIL586- 589	Del. Ex8-10 s/o		
	fs at P34									
	fs at D200									
	fs at Y281*									
AMN		Q316X*		fs at E471						
大脳及び 非大脳型				fs at Q472				W595X		
								fs at R622*		

Missense mutation

Exon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
大脳型	S98L	L217R		L392P*	H420P		R518Q	P560L	R617H	R660W	H667N
	N148D	T254P					Q544R	P560L			
	N148S	G266R									
	L154P	L268P									
	R189Q	S290W									
	N214D	Y296C									
AMN	P84S	D200N		T386P*							W679R
	S98P	T245M		R389G							
	D194N	G277R		R401W							
小脳脳幹型	T254M							A616D			
大脳及び 非大脳型	S108L	L313P					R518W	R554H	E609K		
							F540S				

*:新規遺伝子変異, fs: frameshift, Del: deletion

表 3. ALD の表現型と遺伝子変異の種類

Phenotype	CC ALD	AdolC ALD	AC ALD	AMN Cer	Cerebello brainstem	AMN	Addison only	Asympto -matic
Sample number	16	8	11	13	3	21	1	2
Missense mutation	14	6	6	9	2	17	1	2
Nonsense, frameshift mutation/ Disruption of gene structure	2	2	5	4	1	4	0	0

CCALD:小児大脳型、AdolCALD:思春期大脳型、ACALD:成人大脳型、AMNCer: AMN から大脳型への移行例(1例小脳脳幹型から大脳型への移行例を含む)、Cerebellobrainstem:小脳脳幹型、AMN:Adrenomyeloneuropathy。遺伝子変異の種類と、表現型との間に相関を認めない。

表 4. 日本人 ALD75 症例、遺伝子変異の詳細

大脳型

Phenotype	ABCD1遺伝子変異	Effect of mutation	Age at onset	Age at sampling	First symptom	Loes score
CCALD**	c. 443 A>G	N148S	9	ND	歩行障害, 構音障害	ND
CCALD**	c. 796 G>A	G266R	7	8	視力障害, 歩行障害	ND
CCALD	c. 1631 A>G	Q544R	ND	ND	ND	ND
CCALD**	c. 1631 A>G	Q544R	7	ND	多動	ND
CCALD	c. 102 C>AT	Frameshift at P34	ND	ND	ND	ND
CCALD	c. 1679 C>T	P560L	6	ND	書字困難, 大便失禁, ふらつき	ND
CCALD	c. 323 C>T	S108L	9	ND	視力障害, 痙攣	ND
CCALD	Del. 1759-1770	Del. HILQ587-590	6	ND	視力障害, 易怒性	ND
CCALD	c. 938 T>C	L313P	8	ND	学業成績低下, 視力障害	ND
CCALD	c. 1259 A>C	H420P	8	33	学業成績低下	ND
CCALD	c. 1174C>G*	L392V	9	ND	性格変化	ND
CCALD	c.1772 G>A	R591Q	10	ND	歩行障害	ND
CCALD	c.1678 C>T	P560S	6	ND	視力障害	ND
CCALD	c.293 C>T	S98L	4	ND	視力障害	ND
CCALD	c. 461 T>C	L154P	7	7	学業成績低下, 視力障害	14.5
CCALD	c. 461 T>C	L154P	7	6	自覚症状なし(脳梁膝大部病変)	1
AdolCALD	Del. IVS1(-109)-exon2(+11)*	Disruption of gene structure	11	11	物忘れ, 集中力低下	13
AdolCALD**	Del. 871-873*	Del.E291	21	ND	聴力障害, 視野異常, 副腎不全徴候	ND
AdolCALD	c. 323 C>T	S108L	20	ND	下肢の動かしにくさ, 易怒性	ND
AdolCALD	c. 1552 C>T	R518W	17	19	無気力	10
AdolCALD	c.803 T>C*	L268P	中学生	ND	行動異常	ND
AdolCALD	c.1661 G>A	R554H	高校生	ND	歩行障害	ND
AdolCALD	c. 640A>G	N214D	11		学業成績低下	ND
AdolCALD	c. 1679 C>T	P560L	11		行動異常, 歩行障害	ND
AdultCer	c. 887 A>G	Y296C	30	35	性格変化	ND
AdultCer	c. 1999 C>A	H667N	31	ND	抑うつ, 物忘れ, 視力障害	ND
AdultCer**	c. 1553 G>A	R518Q	41	ND	認知機能低下	ND
AdultCer**	c. 1785G>A	W595X	27	ND	記憶力低下, 歩行障害	ND
AdultCer**	c. 1972 C>T	R660W	42	ND	記憶障害, 喚語困難	ND
AdultCer	Del. 1155C	Frameshift at F385	43	ND	物忘れ, ふらつき	ND
AdultCer	Del. 600C	Frameshift at D200	38	40	思考力低下, 易怒性, 不眠	ND
AdultCer	Del. 1415-1416AG	Frameshift at Q472	28	34	脱抑制	ND
AdultCer	c. 566 G>A	R189Q	76	76	意識障害, 不穏, 幻視	14
AdultCer	c. 1785 G>A	W595X	43	44	物忘れ, 不眠	ND
AdultCer	c. 1619 T>C	F540S	39	ND	失調, 構音障害	ND

大脳型への移行例

Phenotype	ABCD1遺伝子変異	Effect of mutation	Age at onset	Age at sampling	First symptom	Age at CNS symptom onset	Loes score
Cerebellobrainstem-Cer	c. 1619 T>C	F540S	39	50	右上肢の企図振戦	50(易怒性)	ND
AMN-Cer	c. 1785 G>A	W595X	43	44	走行時の足のもつれ, 両下肢のしびれ	51(右前頭葉に新出病変)	ND
AMN-Cer	Ins. 851T*	Frameshift at Y281	18	22	歩行時の不安定性	30(両側錐体路の増強効果)	ND
AMN-Cer**	c. 796 G>A	G266R	22	32	下肢の痙攣	32(認知機能低下)	ND
AMN-Cer	c. 1999 C>A	H667N	32	39	兄の造血幹細胞移植の際に診断(初診時両側錐体路徴候あり)	39(内側膝状体の増強効果)	ND
AMN-Cer	c. 760 A>C	T254P	44	ND	歩容の異常	47(抑うつ, 脱抑制)	ND
AMN-Cer	Del. 1865 GGTG ins. TGTTCT*	Frameshift at R622	42	62	両側の尖足, 歩行障害	59(意欲低下, 思考力低下)	13
AMN-Cer	c. 869 C>G	S290W	25	33	足を引きずる, 両下肢のしびれ	33(嚙下障害)	ND
AMN-Cer	c. 1850 G>A	R617H	36	47	下肢の痙攣	47(易怒性, 高次機能障害)	ND
AMN-Cer	c. 650 A>G	L217R	33	59	痙攣性歩行	59(認知機能障害, 左右失認)	ND
AMN-Cer	Ex3-10 deletion of the gene	Disruption of gene structure	30	34	痙攣性歩行	34(側頭葉に増強効果を伴う病変)	ND
AMN-Cer	c. 1850 G>A	R617H	33	45	下肢の痙攣	45(性格変化)	ND
AMN-Cer	c. 1825 G>A	E609K	20	25	歩行障害	25(構音障害, 嚙下障害)	ND

表 4(続き). 日本人 ALD75 症例の詳細、遺伝子変異の詳細

AMN

Phenotype	ABCD1遺伝子変異	Effect of mutation	Age at onset	Age at sampling	First symptom	Loes score
AMN	c. 829 G>A	G277R	25	31	足を引きずる	1
AMN	Del. 1415-1416AG	Frameshift at Q472	Early 30's	55	痙性歩行	ND
AMN	c. 250 C>T	P84S	43	46	歩行時のふらつき	1
AMN	c. 323 C>T	S108L	32	ND	両足のもつれ	ND
AMN	c. 811G>A	E271K	34	ND	下肢脱力と頻尿	0
AMN	c. 1195 C>T	R401W	21	ND	痙性歩行	1
AMN	Del. 1865 GGTG ins. TGTCT*	Frameshift at R622	28	ND	痙性歩行, 排尿困難	ND
AMN	c. 1156 A>C	T386P	20	40	下肢痙性	ND
AMN	c. 1661 G>A	R554H	29	32	歩行障害	0
AMN	c. 1619 T>C	F540S	25	31	足のつっぱり	1
AMN	c. 734 C>T	T245M	30	30	歩行時のつまずき, 下肢のしびれ	ND
AMN	c. 938 T>C	L313P	21	21	下肢の痙性	0
AMN	c. 580 G>A	D194N	21	21	痙性歩行	0
AMN	c. 2035 T>C	W679R	36	45	痙性歩行	1
AMN	c. 946 C>T*	Q316X	33	35	痙性歩行	1
AMN	c. 1661 G>A	R554H	37	39	痙性歩行	2
AMN	c. 292 T>C	S98P	44	55	下肢の痙性	1
AMN	c. 1165 C>G	R389G	25	31	下肢の痙性	0.5
AMN	c. 598 G>A	D200N	33	40	下肢の痙性	0
AMN	Del. 1415-1416AG	Frameshift at Q472	16	ND	歩行障害	ND
AMN	c.1661 G>A	R554H	34	ND	歩行障害	ND

小脳脳幹型、Addison 単独型、未発症患者

Phenotype	ABCD1遺伝子変異	Effect of mutation	Age at onset	Age at sampling	First symptom	Loes score
Cerebellarbrainstem	c. 1847 C>A	A616D	23	29	歩行時の不安定性 回転性目眩	0.5
Cerebellarbrainstem	c. 762 C>T	T254M	58	62	歩行時の不安定性	4
Cerebellarbrainstem	Del. 1415-1416AG	Frameshift at Q472	27	32	歩行時の不安定性、便失禁	4.5
Addison only	c. 1825G>A	E609K	20	20	副腎機能低下(びまん性の脱毛)	0
未発症	2211G>A	E609K	-	6	-	ND
未発症	c. 1552 C>T	R518W	-	17	-	ND

*:新規遺伝子変異, **:すでに遺伝子診断がなされていた症例

表 5. 複数の症例で検出された遺伝子変異と表現型

ABCD1変異	変異が検出された表現型(人数)	家族歴
frameshift at Q472	AdultCer(1), Cerebellarbrainstem(2), AMN(2)	-
frameshift at R622	AMN-Cer(1), AMN(1)	-
W595X	AdultCer(2), AMN-Cer(1)	-
S108L	CCALD(1), AdoICALD(1), AMN(1)	3症例共に同胞
L154P	CCALD(2)	2症例共に同胞
G266R	CCALD(1), AMN-Cer(1)	-
L313P	CCALD(1), AMN(1)	-
R518W	AdoICALD(1), 発症前男性(1)	2症例共に同胞
P540S	Cerebellarbrainstem-Cer(1), AMN(1)	2症例共に同胞
R554H	AMN-Cer(1), AMN(3)	-
E609K	AMN-Cer(1), Addison only(1), 発症前男性(1)	-
R617H	AMN-Cer(2)	-
H667N	AdultCer(1), AMN-Cer(1)	2症例共に同胞

CCALD:小児大脳型、AdoICALD:思春期大脳型、Adult-Cer:成人大脳型、AMN-Cer: AMN から大脳型への移行例、Cerebellarbrainstem:小脳脳幹型、Cerebellarbrainstem-Cer: 小脳脳幹型から大脳型への移行例、AMN:Adrenomyeloneuropathy

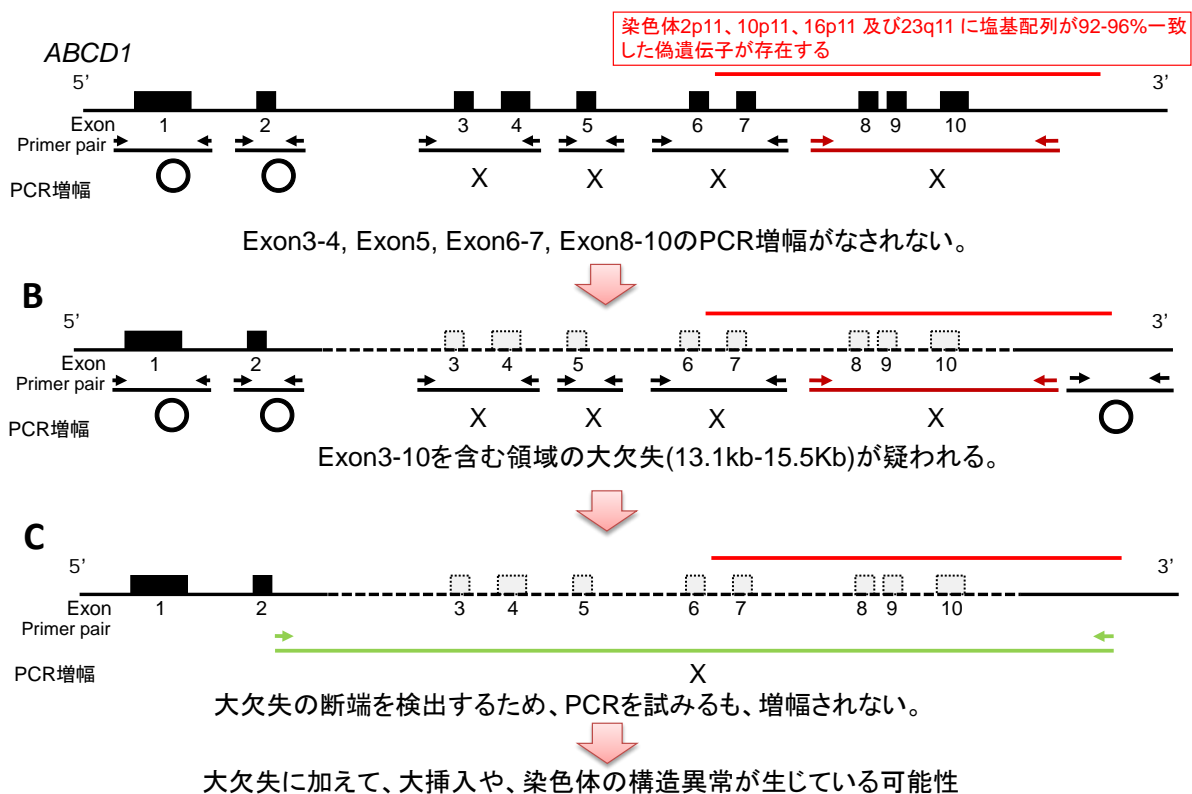
2-3-2 *ABCD1* 大欠失を含む複雑な変異の解析

ALD 症例(AMN から成人大脳型への移行例)1 例において、*ABCD1* 遺伝子の各エキソンの PCR 増幅において、エキソン 1, 2 のみが PCR 増幅され、エキソン 3-10 が PCR 増幅されない症例が存在した(図 7A)。エキソン 10 の 3' 側に配列固有の primer pair を作成し、PCR を行ったところ、PCR 増幅が可能であり、配列の存在が確認されたことから、エキソン 3-10 の大欠失(13.1kb-15.5Kb)が疑われた(図 7B)。

次に大欠失の断端部(breakpoint)を同定する目的で、5' 側の断端部と考えられる部位のすぐ上流(5' 側)及び、3' 側の断端部と考えられる部位のすぐ下流(3' 側)に固有の primer pair を設計し、PCR を試みたが、PCR 増幅がなされなかった(図 7C)。

大欠失のみの変化であれば、問題なく、PCR 増幅がなされることが予想されることから、大欠失に加え、大挿入や、染色体の構造異常が生じている可能性が考えられた。

図 7. *ABCD1* 大欠失を含む複雑な構造を含む遺伝子変異解析



そこで、5' 側及び3' 側の断端部位の配列を得ることで、構造変化の手がかりが得られる可能性を考え、断端部位の配列を得る目的で、Seq Cap EZ Developer (Roche, NimbleGen)を用いて、*ABCDI* 遺伝子座及びその周辺領域のシーケンスキャプチャーによって配列の濃縮を行った後、平均リード長 350-400bp、最頻値 500bp と得られるリード長が比較的長い、GS junior (Roche, basel, Switzerland) による配列解析を行った(図 6)。

リード数 190,854、平均リード長 425.7bp、最頻値 495bp のリードが得られ、5' 側断端部(ChrX:152,997,187(hg19))と考えられる部位の配列を確認したところ、大欠失のみであれば、5' 側断端部と3' 側断端部が融合した配列が得られることが予想されたが、図 8A のように ATC の 3bp の挿入を挟んで、Chr13:113,874,123 から始まる 13 番染色体に存在する配列が融合した配列が得られた。図 8B のように ChrX:152,997,187 の 5' 側に forward primer を、Chr13:113,874,123 の 3' 側に reverse primer を設計する形で PCR を行ったところ、症例の DNA のみで PCR 増幅が可能であり(図 8B)、直接塩基配列決定法による確認を行ったところ、GS Junior (Roche, basel, Switzerland)による配列解析で得られた配列が存在することを確認した(図 8C)。

次に、3' 側断端部(ChrX: ChrX:153,011,810(hg19))と考えられる部位の配列を確認したところ、図 9A のように、ChrX:153,011,810 に Chr13:113,983,144 から始ま

る 13 番染色体に存在する配列が融合した配列が得られた。さらに、ChrX:153,011,834-153,011,842 の 9bp (CTACAGGCA) の欠失も同時に伴っていることが分かった(図 9A)。3' 側の断端配列においても、直接塩基配列決定法により、GS Junior (Roche, basel, Switzerland) による配列解析で得られた配列が存在することを確認した(図 9B, C)。

以上の結果から、考えられ得る構造変化として、図 10 のように ChrX:

152,997,187-ChrX:153,011,810 に及ぶ 14,623 bp の大欠失に加えて、Chr13 由来の配列(Chr13:113,874,123-113,983,144) の 109,021bp の大挿入が生じている可能性(仮定 1)、または、ChrX: 152,997,187-ChrX:153,011,810 に及ぶ 14,623 bp の大欠失に加えて、Chr13 の配列(Chr13:113,874,123-113,983,144)が、重複する形で、ChrX と Chr13 の転座が起こっている可能性が考えられた(仮定 2)。

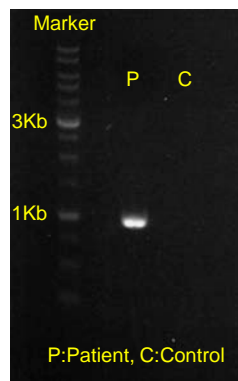
図 8. *ABCD1* 大欠失を含む複雑な遺伝子変異 5' 側断端部の配列解析

A 5'側断端部が予測される部位の配列

ChrX:152,997,187 | 3bp Insertion | Chr13:113,874,123
TTTGCTCATTCCAGTTCA | ATC | CAGGAGCATCTCAGAATTCTGCTGC.....

5'側断端部と考えられるの配列を確認すると、chr13領域の配列が融合する配列が得られた。

B



C

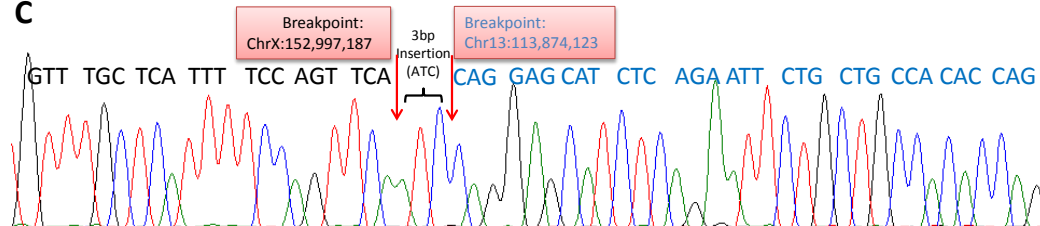


図 9. *ABCD1* 大欠失を含む複雑な遺伝子変異 3' 側断端部の配列解析

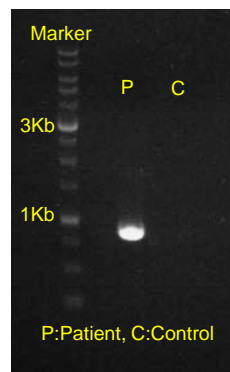
A

3'側断端部が予測される部位の配列

Chr13:113,983,144 | ChrX:153,011,810 | 9bp deletion (CTACAGGCA)
CGTCTCCCTCTCCCTTT | CCTCAGCCTCCTGAGTTACTGGGACATGCTACTGTGCC.....

5'側断端部と考えられるの配列を確認すると、chr13領域の配列が融合する配列が得られた。

B



C

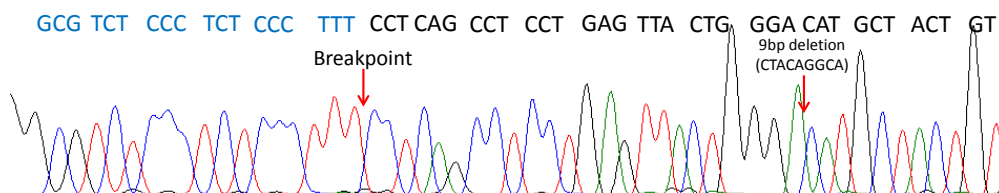
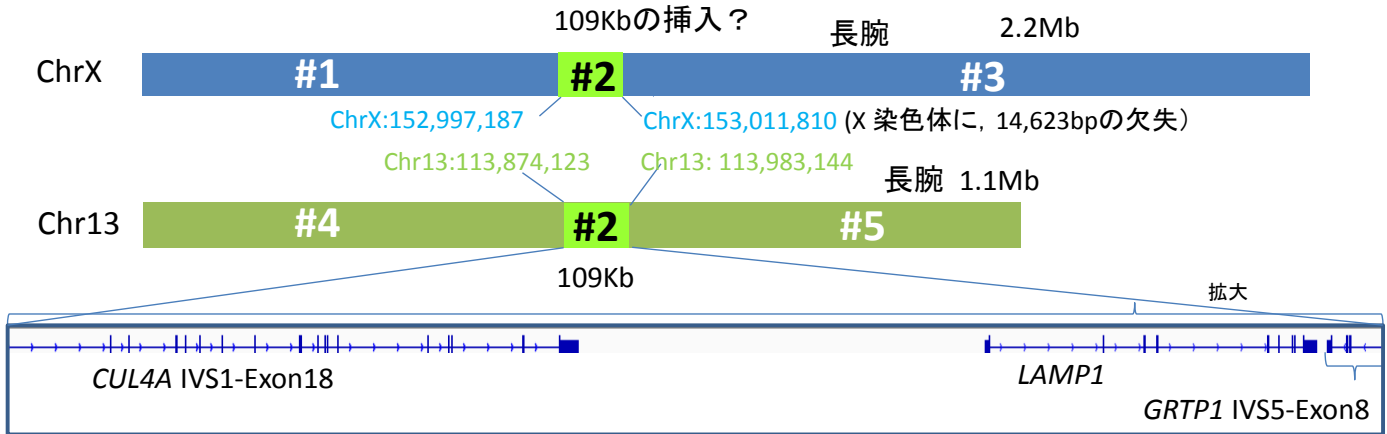


図 10. ABCD1 大欠失を含む複雑な遺伝子変異において考えられ得る構造変化

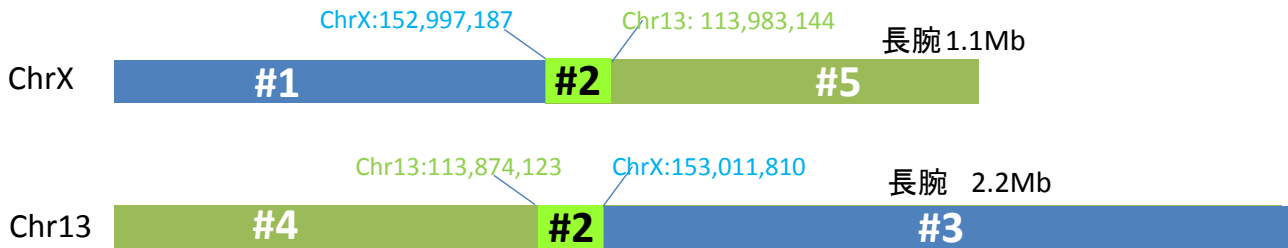
仮定1: Xq28:ABCD1に部分欠失があり, そこに, chromosome 13 の109kbpが挿入

ChrX: 152,997,187-153,011,810のlarge deletion及びChr13由来の配列(Chr13:113,874,123-113,983,144)のlarge insertion



仮定2: Xq28, chromosome 13 のtelomereの間に, unequal crossing over

ChrX: 152,997,187-153,011,810のlarge deletion, 及びChrX 3'側末端とChr13 3'側末端の転座, Chr13配列(Chr13:113,874,123-113,983,144)の重複



#2: chromosome 13 113,874,123-113,983,144

2-4 考察

我々が開発したマイクロアレイを用いたハイスループット遺伝子変異解析システムは、すべての点突然変異、小欠失・挿入を同定でき、正確な診断方法であった。これまで、*ABCD1* の遺伝子診断として、エキソン7からエキソン10の領域に配列が92-96%一致した偽遺伝子の存在により、*ABCD1* を特異的に増幅するために、これまで、RT-PCR が主に用いられてきたが³、今回、我々は、*ABCD1* に固有の配列をデザインした primer を用いることで、迅速で簡便に、配列解析を行うことが可能となった。

このシステムは、非典型である ALD 症例や、15%が極長鎖脂肪酸の解析で、正常値を示すとされる³⁰、ALD の保因者に対する診断として、非常に有用であると考えられた。また、発症早期のみ的大脑型 ALD の症状進行停止に有効であるとされる造血幹細胞移植前に必要となる迅速な遺伝子診断においても、重要になると考えた。

これまで、*ABCD1* のエキソン7-10において、92-96%前後配列の一致した偽遺伝子が存在することから、エキソン7-10を含む形での大欠失の正確な診断は困難であった。しかし、我々は、シーケンスキャプチャー、次世代シーケンサーを用いた配列解析を用いることで、大欠失、大挿入を含んだ複雑な構造変化を伴う遺伝子変異解析を行うことを可能とした。図10における仮定1または仮

定2 どちらの構造変化であるかを同定するためには、症例の細胞を用いた FISH 解析、具体的には、図 10 における#1、#2、#3、#4、#5 に FISH プローブを作成することで、1-#2-#3、#4-#2-#5 が観察されるか、または、#1-#2-#5、#4-#2-#3 が観察されるかによって、区別することができると思う。エクソン 7-10 の大欠失が疑われる他の症例についても¹³、今回の症例のように、他の変異が加わっているかを解析することは興味深いと思う。

日本人 ALD 症例において、*ABCD1* 遺伝子変異は、*ABCD1* の全領域に渡って存在した。そして、小児大脳型 ALD、思春期大脳型 ALD、成人大脳型 ALD、AMN を含むすべての表現型において、様々なタイプの *ABCD1* 遺伝子変異が存在した。この結果からは、*ABCD1* の遺伝子変異と表現型との間に関連がない、すなわち、これまでの報告と同様に、遺伝子表現型連関がないことが示された³。そのため、我々は、表現型を修飾する遺伝的要因が、*ABCD1* の遺伝子変異や種類以外に存在すると考え、次章で詳細を記述した候補遺伝子の網羅的な解析と表現型との関連解析を行う必要があると考えた。

第三章

ALD 症例の多彩な表現型を規定する修飾因子の探索

3-1 背景と目的

ALD は、前章までに述べたような様々な臨床病型を示すことが特徴とされている。しかし、前章で、ALD の原因遺伝子 *ABCD1* の遺伝子変異の種類と表現型に相関がないこと、つまり、遺伝子表現型連関は明らかでないことが示された。

第一章で述べたように、急速な進行を来し、予後不良である大脳型 ALD に対しては、早期の造血幹細胞移植(HSCT)が症状の進行停止に、有効である可能性がある。そのため、予後不良な大脳型 ALD を発症しやすい背景因子を同定できれば、臨床上有用であると考えられる。我々は、多彩な臨床病型を規定する、遺伝的修飾因子の存在を仮定した(近親度が高いほど、臨床病型に近い傾向がある(図 3)、表現型の割合が人種によって異なる可能性(表 1, 図 1))。

ABCD1 は、Peroxisome 膜に局在するタンパクである、half-ATP-binding cassette (ABC) transporter をコードしていることが知られている。また、*ABCD1* 遺伝子と相同性の高い *ABCD2*、*ABCD3*、*ABCD4* 遺伝子の存在が知られている。*ABCD1* をコードする half-ATP-binding cassette (ABC) transporter は half transporter として homodimer を作る、またはもう一つの ABCD 関連タンパク (*ABCD2* 遺伝子がコードする ALDR)や、(*ABCD3* がコードする PMP70)と heterodimer を作る可能性がある。

報告されている^{23,43,44}。これらの事実は、*ABCD1* 関連遺伝子がコードするタンパクが、ALD の表現型修飾因子として、機能する可能性を示唆している(図 2)。

また、*ABCD1* ノックアウトマウスは下肢の痙性を主な症状とし、大脳症状は認められず、生後 15 ヶ月以降に、ALD の表現型の中で、脊髄の非炎症性軸索変性のみを認める軽症の AMN 型に類似の表現型を呈することが知られている^{24,25}。

そのため、ALD 症例において、大脳白質の炎症性脱髄を生じるためには、*ABCD1* の遺伝子変異に加えて、何らかの追加要因が必要であると考えられている。ALD の原因遺伝子 *ABCD1* と同様にペルオキシソームの物質輸送に関わっているとされる *PEX5* 遺伝子を、オリゴデンドロサイトにおいてノックアウトしたマウスにおいては、オリゴデンドロサイトにおけるペルオキシソームが機能不全に陥り、小児・成人大脳型 ALD で生じる大脳白質の広汎な軸索損傷、炎症性脱髄を生じることが知られている²⁶。これらの事実は、ペルオキシソームで機能する遺伝子群が、ALD の表現型修飾因子として、機能する可能性を示唆すると考える。

そこで、我々は、第一段階として、*ABCD1* の機能に影響を与える可能性のある遺伝子群(*ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4*)を候補遺伝子として考えた(Step1)。

さらに、第二段階として、ペルオキシソーム病に関連する遺伝子、ペルオキシソームに局在するタンパクをコードする遺伝子を候補遺伝子として考えた(Step2)。

症例数が限られるので、**data-driven** のアプローチでは検出力が弱いと考え、候補遺伝子アプローチが必須になると考えた。これらの候補遺伝子内の **variants** について、出現頻度に有意な差のある場合、修飾因子としての可能性が指示されると考え、表現型との関連を検索した。

3-2 対象と方法

Step1. ABCD2, ABCD3, ABCD4 の variants 解析

日本人の ALD69 家系 75 症例(大脳型 48 例(16 名の小児大脳型、11 名の成人大脳型、8 名の思春期大脳型、12 名の副腎脊髄ミエロパチーから大脳型への移行例、1 名の小脳脳幹型から大脳型への移行例)、21 名の副腎脊髄ミエロパチー、3 名の小脳脳幹型、1 名の Addison 病単独型、2 名の未発症男性)を対象とした。

検出された variants においては、control 96 例における解析も行った。

候補遺伝子として、*ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* の全エクソン、5' UTR, 3' UTR の配列について、前章と同様の方法で、固有の primer pair を作成の上、PCR にて増幅。*ABCD2* に関しては DNA マイクロアレイを用いて、*ABCD3*, *ABCD4* に関しては直接塩基配列決定法で遺伝子の塩基配列を決定した(付表 2-4)。

dbSNP135 に登録がないものを新規 variants とした。

Step2. ペルオキシソームで機能する遺伝子群の variants 解析

日本人の ALD61 家系 67 症例(大脳型 42 名(13 名の小児大脳型 ALD、6 名の思春期大脳型 ALD、10 名の成人大脳型 ALD、12 名の副腎脊髄ミエロパチーから大脳型への移行例、1 名の小脳脳幹型から大脳型への移行例)、19 名の副腎脊髄ミエロパチー、3 名の小脳脳幹型、1 名の Addison 単独型、2 名の未発症男性)、日本人コントロール 369 名を対象とした。

・全エクソン解析

解析方法の流れを図 11 に示した。対象者のゲノム DNA を、SureSelect v4+UTR (Agilent) を用いて、全 Exon、UTR(untransltaed region)領域に、濃縮した。

具体的な手法として、まず、PicoGreen (Molecular Probes)を用いた DNA 定量に基づき、genomic DNA 3 μ g を調整した。コバリス(COVARIS, Woburn, MA, USA)を用いて、150-200 bp となるように断片化を行った。次いで、エンドリペアミックス(Sureselect Library Prep Kit GA に含まれる)を用いて、断片化の際に生じ得る突出部を平滑末端にした。アダプターライゲーションの反応効率を改善し、互いに反応し、コンカテマー形成を防ぐ目的で、アデニンヌクレオチドを 3'末端に、付加した。DNA 断片末端にインデックス化したアダプターを結合した後、アダプター付き DNA ライブラリを PCR で増幅。ペアエンドアダプター付き DNA ライブラリと、SureSelect オリゴキャプチャライブラリのハイブリダイゼーションを行い、ストレプトアビジン磁性ビーズを用いて、SureSelect オリゴライブラリにキャプチャーされた DNA の回収を行った。キャプチャーライブラリの増幅と、インデックスバーコードタグの付加を行った。

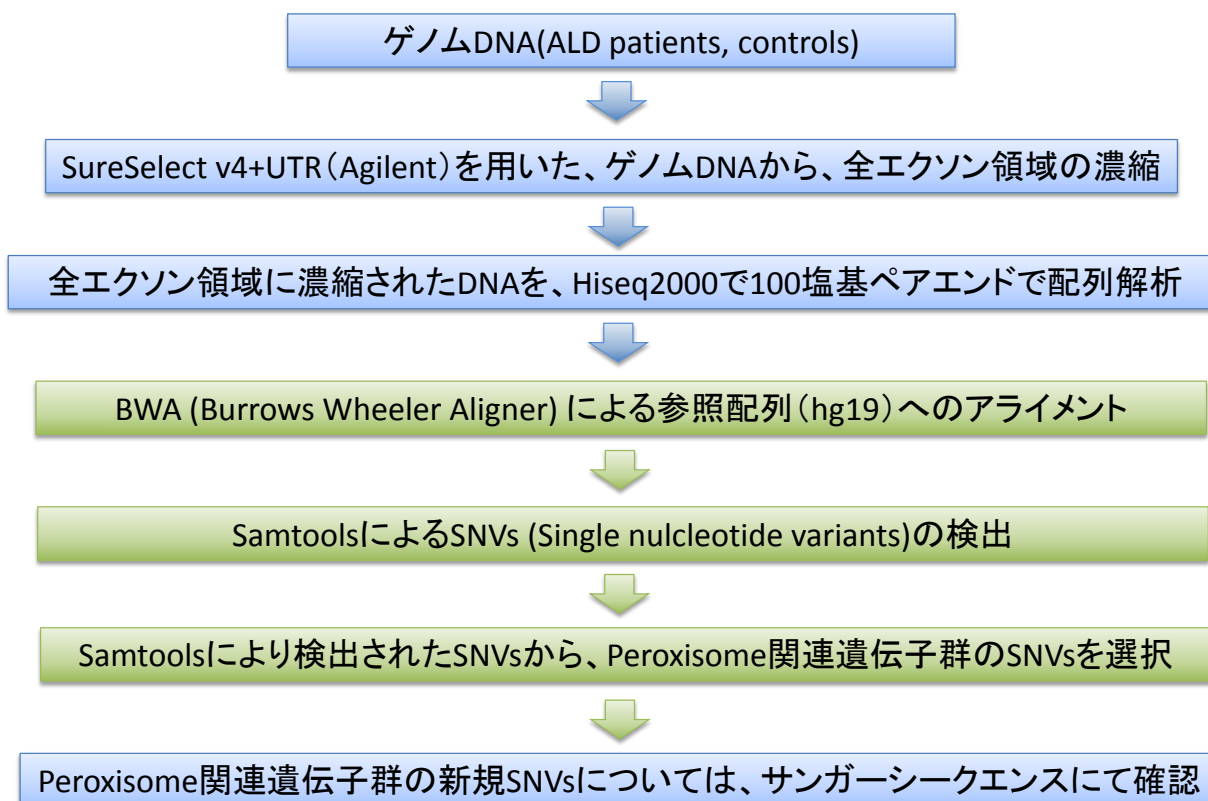
作成されたライブラリは定量 PCR を用いて、濃度を定量し、HiSeq2000 を用いて 100 塩基のペアエンド法で大規模塩基配列を行った。

得られた短鎖長のリードは、BWA^{45,46}を用いて、デフォルトのパラメーターを

使用し、参照配列 GRCh37/hg19 へのマッピングを行った。SAMtools⁴⁷ を用いて、得られたデータについて、ベースコールを行い、variants (一塩基変異及び、小欠失・挿入)を抽出した。Variants については、データベース(RefSeq, dbSNP135, the 1000 genomes project database, exome sequencing project database)を用いてアノテーションを行った。

本研究は東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認に基づいて施行された(承認番号 1396)。

図 11. 全エクソン解析の流れ(Step2)



・ ペルオキシソーム関連疾患遺伝子、ペルオキシソームで機能する遺伝子群に

存在する variants (一塩基変異及び、小欠失・挿入)の抽出

全エクソン解析において、検出された variant の中から、表 6 における 30 の

Peroxisome 関連疾患遺伝子、表 7 における 95 の Peroxisome で機能する遺伝子群

に存在する variants(一塩基変異及び、小欠失・挿入)の抽出を Peroxisome database

2.0⁴⁸, The peroxisome knowledge base v1.6⁴⁹, the Gene Ontology⁵⁰ を用いて行った。

さらにその中から、既知の疾患関連遺伝子変異及び dbSNP135 に登録のない、新規

の variants(一塩基変異及び、小欠失・挿入)の検出を行った。

Variants に関しては、機能予測プログラムである Polyphen-2, SIFT, Mutation Taster,

LRT, PhyloP を利用して、合計で 4 点以上(最大 5 点で、5 点の場合最も機能変化

を来す。)の variants を deleterious variants と定義し⁵¹、その deleterious variants に

限る形での比較も同時に行った。

さらに、既知の疾患関連遺伝子変異及び dbSNP135 に登録のない、新規の variants

(一塩基変異及び、小欠失・挿入)においては、直接塩基配列決定法により、確認

を行った。

表 6. ペルオキシソーム疾患関連遺伝子

<i>ABCD1</i>	X-linked adrenoleukodystrophy
<i>PEX1</i>	Zellweger syndrome
<i>PEX2</i>	Zellweger syndrome
<i>PEX3</i>	Zellweger syndrome
<i>PEX5</i>	Zellweger syndrome
<i>PEX6</i>	Zellweger syndrome
<i>PEX10</i>	Zellweger syndrome
<i>PEX11B</i>	Zellweger syndrome
<i>PEX12</i>	Zellweger syndrome
<i>PEX13</i>	Zellweger syndrome
<i>PEX14</i>	Zellweger syndrome
<i>PEX16</i>	Zellweger syndrome
<i>PEX19</i>	Zellweger syndrome
<i>PEX26</i>	Zellweger syndrome
<i>ACOX1</i>	Acyl-CoA oxidase deficiency (Pseudoneonatal adrenoleukodystrophy)
<i>HSD17B4</i>	Bifunctional protein deficiency
<i>PEX7</i>	Refsum disease, Rhizomelic chondrodysplasia punctata type 1(RCDP1)
<i>GNPAT</i>	Rhizomelic chondrodysplasia punctata type 2 (RCDP2)
<i>AGPS</i>	Rhizomelic chondrodysplasia punctata type 3 (RCDP3)
<i>CAT</i>	Acatlasemia
<i>AMACR</i>	Adult-onset sensory motor neuropathy
<i>SOD1</i>	ALS1
<i>MPV17</i>	Glomerulosclerosis
<i>AGXT</i>	Hyperoxaluria type I
<i>MLYCD</i>	Malonic aciduria
<i>ACSL4</i>	Mental retardation X-linked 63, MRX63
<i>TRIM37</i>	Mulibrey nanism
<i>PHYH</i>	Refsum disease
<i>ALDH3A2</i>	Sjogren-Larsson syndrome
<i>XDH</i>	Xanthinuria

表 7. ペルオキシソームで機能する遺伝子群

ChrX: <i>ABCD1</i>	ChrX: <i>ACSL4</i>	Chr19: <i>ECH1</i>	Chr5: <i>HSD17B4</i>	Chr7: <i>PEX1</i>	Chr6: <i>PEX6</i>	Chr6: <i>SOD2</i>
Chr12: <i>ABCD2</i>	Chr10: <i>ACSL5</i>	Chr3: <i>EHHADH</i>	Chr10: <i>IDE</i>	Chr1: <i>PEX10</i>	Chr6: <i>PEX7</i>	Chr11: <i>TMEM135</i>
Chr1: <i>ABCD3</i>	Chr5: <i>ACSL6</i>	Chr16: <i>ENSG00000140876</i>	Chr2: <i>IDH1</i>	Chr15: <i>PEX11A</i>	Chr10: <i>PHYH</i>	Chr17: <i>TRIM37</i>
Chr3: <i>ACAA1</i>	Chr2: <i>AGPS</i>	Chr14: <i>ENSG00000157326</i>	Chr10: <i>IDI1</i>	Chr1: <i>PEX11B</i>	Chr2: <i>POMC</i>	Chr2: <i>XDH</i>
Chr3: <i>ACAD11</i>	Chr2: <i>AGXT</i>	Chr8: <i>EPHX2</i>	Chr10: <i>IDI2</i>	Chr19: <i>PEX11G</i>	Chr1: <i>PRDX1</i>	Chr18: <i>ZADH2</i>
Chr10: <i>ACBD5</i>	Chr5: <i>AMACR</i>	Chr11: <i>FAR1</i>	Chr16: <i>LONP2</i>	Chr17: <i>PEX12</i>	Chr11: <i>PRDX5</i>	
Chr14: <i>ACOT1</i>	Chr9: <i>BAAT</i>	Chr12: <i>FAR2</i>	Chr16: <i>MLYCD</i>	Chr2: <i>PEX13</i>	Chr12: <i>PXMP2</i>	
Chr14: <i>ACOT2</i>	Chr11: <i>CAT</i>	Chr7: <i>FIS1</i>	Chr1: <i>MOSC2</i>	Chr1: <i>PEX14</i>	Chr20: <i>PXMP4</i>	
Chr14: <i>ACOT4</i>	Chr9: <i>CRAT</i>	Chr1: <i>FNDC5</i>	Chr2: <i>MPV17</i>	Chr11: <i>PEX16</i>	Chr1: <i>RHOC</i>	
Chr20: <i>ACOT8</i>	Chr7: <i>CROT</i>	Chr1: <i>GNPAT</i>	Chr12: <i>MVK</i>	Chr1: <i>PEX19</i>	Chr1: <i>SCP2</i>	
Chr17: <i>ACOX1</i>	Chr12: <i>DAO</i>	Chr7: <i>GSTK1</i>	Chr17: <i>NOS2</i>	Chr8: <i>PEX2</i>	Chr22: <i>SERHL</i>	
Chr3: <i>ACOX2</i>	Chr6: <i>DDO</i>	Chr3: <i>HACL1</i>	Chr5: <i>NUDT12</i>	Chr22: <i>PEX26</i>	Chr5: <i>SLC22A5</i>	
Chr4: <i>ACOX3</i>	Chr16: <i>DECR2</i>	Chr20: <i>HAO1</i>	Chr10: <i>PAOX</i>	Chr6: <i>PEX3</i>	Chr22: <i>SLC25A17</i>	
Chr4: <i>ACSL1</i>	Chr2: <i>DNAJC10</i>	Chr1: <i>HAO2</i>	Chr6: <i>PECI</i>	Chr12: <i>PEX5</i>	Chr15: <i>SLC27A2</i>	
Chr2: <i>ACSL3</i>	Chr12: <i>DNM1L</i>	Chr1: <i>HMGCL</i>	Chr2: <i>PECR</i>	Chr3: <i>PEX5L</i>	Chr21: <i>SOD1</i>	

・ 検出された Variants と ALD の表現型との関連解析

まず、ALD 表現型の修飾因子の候補遺伝子として、ペルオキシソーム病関連遺伝子群(1A)、ペルオキシソーム病関連遺伝子群を包括するペルオキシソームで機能する遺伝子群(1B)を選択した(図 12)。ペルオキシソームで機能する遺伝子群において、既知の疾患関連遺伝子変異を選択(2A)、新規の nonsense variants、frameshift variants、スプライス部位(アクセプター部位、ドナー部位)の variants、の選択(2B)、新規 non-synonymous SNVs の選択(2C)、さらに新規 non-synonymous SNVs の中で、deleterious SNVs として、5 つのアミノ酸置換の機能予測アルゴリズムである Polyphen-2、SIFT、Mutation Taster、LRT、PhyloP の合計スコアが 4 点以上の variant(満点 5 点)⁵¹ を選択した(2D)。

ALD 症例の表現型として、急速な進行を呈し、予後不良である大脳型 ALD (小児大脳型 ALD、思春期大脳型 ALD、成人大脳型 ALD、AMN から大脳型への移行例、小脳脳幹型から大脳型への移行例)、小脳脳幹型、AMN、Addison 単独型、未発症男性に分類した。

図 12. 検出された variants の分類、比較方法

1. 表現型修飾因子としての候補遺伝子の選択
 - A. ペルオキシソーム疾患関連遺伝子群
 - B. ペルオキシソームで機能する遺伝子群(ペルオキシソーム疾患関連遺伝子群を含む)
2. Variantsの選択
 - A. ペルオキシソーム疾患における既知の病因変異
 - B. Nonsense, frameshift, splice sites mutations
 - C. 新規のnon-synonymous variants (SNV)
 - D. Deleterious non-synonymous SNVs: Polyphen-2, SIFT, Mutation Taster, LRT, PhyloPの合計点が4点以上(5点が最も機能変化が大きいと予測される。)
3. 表現型の分類: 大脳型及びAMN

解析



少なくとも一つのvariantを有する症例数の比較

1. Variants: All novel non-synonymous SNVs/nonsense, frameshift, splice sites mutations / Known causative mutations
2. Variants: All novel deleterious non-synonymous SNVs /nonsense, frameshift, splice sites mutations/Known causative mutations

統計手法

統計手法として R3.0.1 を用いて、Fisher の正確検定(両側検定)を行った。P<0.05 のとき、有意差を有するとした。R3.0.1 を用いて、Hardy-Weinberg 平衡からの偏りについても検討した。近傍の多型との連鎖不平衡については、Haploview 4.1 を用いて検討を行った⁵²。

3-3 結果

3-3-1 *ABCD2, ABCD3, ABCD4* の variants 解析及び ALD 表現型との関連解析

(Step1)

表 8, 図 13 に示したように、*ABCD2, ABCD3, ABCD4* 遺伝子において、10 個の新規 SNV、14 個の既知 SNV を認めた。

Hardy-Weinberg 平衡はそれぞれの variants で保たれていた。*ABCD4* で検出された 2 個の non-synonymous variants を含む 5 個の Variants (rs17782508、rs2301345、rs4148077、rs4148078、rs3742801)に関しては、症例及び Control において、完全連鎖不平衡となっていた。

これらの *ABCD2, ABCD3, ABCD4* で検出された Variants において、表現型(大脳型及び AMN)との関連解析を行った(表 9)。

ABCD2 においては、大脳型、AMN、コントロールの間に、頻度に有意差を認める Variants は存在しなかった。

ABCD3 においては、3'UTR に存在する rs337592 においては、大脳型に比べ、AMN において、有意に頻度が多く認められた($p=0.0006$)。また大脳型と比べ、コントロールにおいても、有意に頻度が多く認められた($p=0.018$)。

ABCD4 においては、興味深いことに、2 個の non-synonymous variants を含む完全連鎖不平衡にある 5 個の既知の Variants において、AMN と比較して、コントロ

ールにおいて、有意に多く検出された($P=0.011$)。そのため、独立したフランスの ALD コホート集団(117 の小児大脳型と 71 の pure AMN (40 歳を越えても AMN の状態を保っており、頭部 MRI が正常))における replication study を行ったが、これらの 5 個の Variants と表現型との間に有意差は認められなかった。

表 8. *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* において検出された SNVs

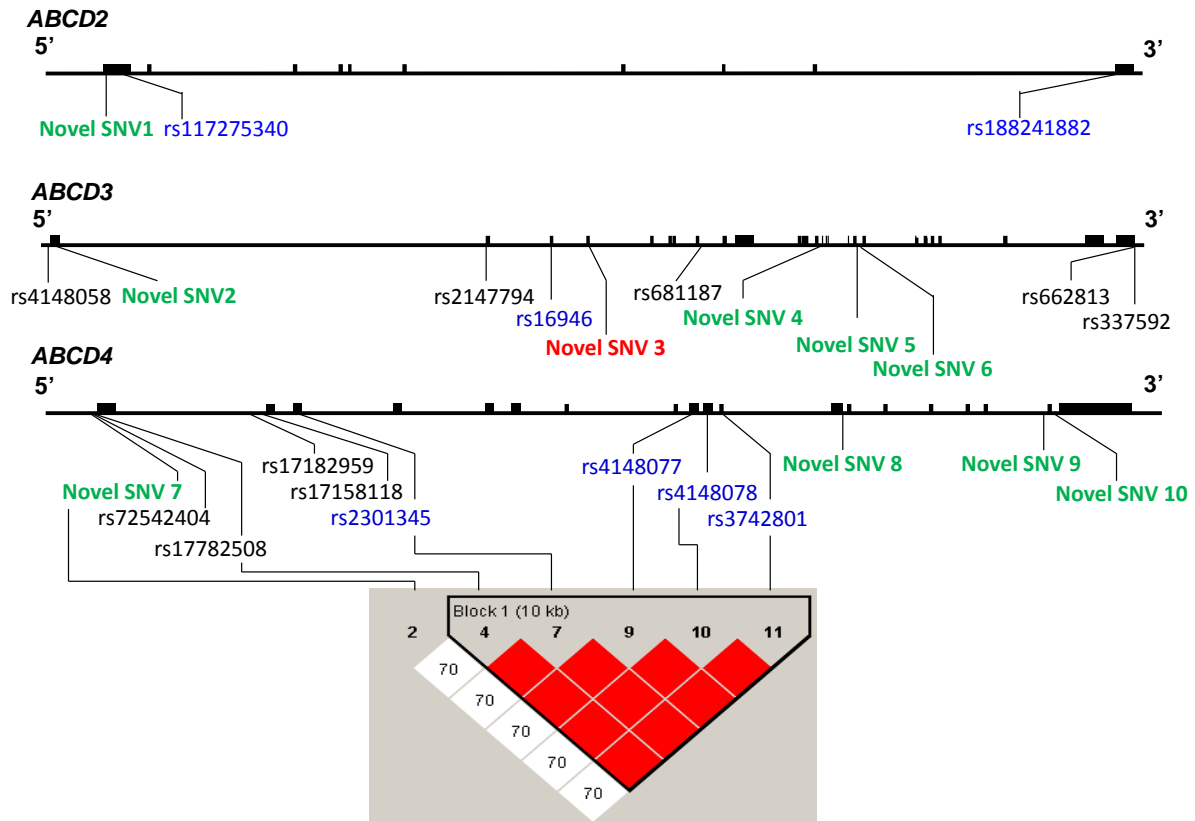
新規 SNVs

Gene	SNV ID	Position (hg19)	Base call	Amino acid change
<i>ABCD2</i>	Novel SNV1	Chr12: 40,013,687	5'UTR(-270) A>T	-
<i>ABCD3</i>	Novel SNV2	Chr1: 94,884,005	5'UTR(-30) C>G	-
<i>ABCD3</i>	Novel SNV3	Chr1: 94,933,508	c. 280 G>A	p. Val94Met
<i>ABCD3</i>	Novel SNV4	Chr1: 94,955,228	IVS13 (-53) G>T	-
<i>ABCD3</i>	Novel SNV5	Chr1: 94,955,764	IVS15 (+233) C>G	-
<i>ABCD3</i>	Novel SNV6	Chr1: 94,955,655	IVS15 (+124) G>A	-
<i>ABCD4</i>	Novel SNV7	Chr14: 74,770,192	5'UTR(-577) A>G	-
<i>ABCD4</i>	Novel SNV8	Chr14: 74,756,967	IVS12 (+27) G>A	-
<i>ABCD4</i>	Novel SNV9	Chr14: 74,753,567	IVS18 (-48) G>A	-
<i>ABCD4</i>	Novel SNV10	Chr14: 74,753,363	IVS18 (+41) C>T	-

既知 SNVs

Gene	SNV ID	Position (hg19)	Base call	Amino acid change
<i>ABCD2</i>	rs117275340	Chr12: 40,013,392	c. 26 C>G	p. Ala9Gly
<i>ABCD2</i>	rs188241882	Chr12: 39,947,842	c. 2095 G>C	p. Glu699Gln
<i>ABCD3</i>	rs4148058	Chr1: 94,883,995	5'UTR(-40) C>T	-
<i>ABCD3</i>	rs2147794	Chr1: 94,924,046	IVS1(-117) A>G	-
<i>ABCD3</i>	rs16946	Chr1: 94,930,345	c. 162 G>A	p. Lys54Lys
<i>ABCD3</i>	rs681187	Chr1: 94,941,376	IVS7(+83) G>A	-
<i>ABCD3</i>	rs662813	Chr1: 94,982,785	3'UTR(+100) A>T	-
<i>ABCD3</i>	rs337592	Chr1: 94,982,810	3'UTR(+125) A>G	-
<i>ABCD4</i>	rs72542404	Chr14: 74,769,851	5'UTR(-236) A>G	-
<i>ABCD4</i>	rs17782508	Chr14: 74,769,841	5'UTR(-226) G>A	-
<i>ABCD4</i>	rs2301345	Chr14: 74,766,352	c. 184 T>C	p. Leu62Leu
<i>ABCD4</i>	rs4148077	Chr14: 74,759,477	c. 910 G>A	p. Ala304Thr
<i>ABCD4</i>	rs4148078	Chr14: 74,759,301	c. 981 C>A	p. Leu327Leu
<i>ABCD4</i>	rs3742801	Chr14: 74,759,006	c. 1102 G>A	p. Glu368Lys

図 13. *ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* において検出された SNVs のまとめ



ABCD2, *ABCD3*, *ABCD4* 遺伝子の網羅的な解析により、10 個の新規 SNV、14 個の既知 SNV を認めた(上段)。赤文字はコーディング領域の新規 SNV、緑文字はノンコーディング領域の新規 SNV、青文字はコーディング領域の既知 SNV、黒文字はノンコーディング領域の既知 SNV を示している。下段は、Haploview 4.1 を利用した *ABCD4* 遺伝子の SNPs の日本人 ALD 症例、コントロールにおける Linkage disequilibrium (LD) map を示している。

5 個の既知の SNPs(rs17782508、rs2301345、rs4148077、rs4148078、rs3742801)に関しては、日本人症例及び ALD 症例において完全連鎖不平衡にあった($LOD=43.97$, $r^2=1.0$, $D'=1.0$)。

Novel SNV7 と既知の 5 個の SNPs(rs17782508、rs2301345、rs4148077、rs4148078、rs3742801) に関しては、日本人症例及び ALD 症例において強い連鎖不平衡にはなかった($LOD=1.15$, $r^2=0.037$, $D'=0.706$)。四角の中の数字は D' の値を示す。四角の色は LOD スコアと D' で決定される。

表 9. 各 Variants と表現型との関連解析
新規 Variants

Gene	SNV ID	Allele frequency (number)			P value ^a		
		Cerebral form (A total of 96 alleles)	AMN (A total of 44 alleles)	Control (A total of 192 alleles)	Cerebral form vs AMN	Cerebral form vs control	AMN vs control
<i>ABCD2</i>	Novel SNV1	2	0	5	1.000	1.000	0.586
<i>ABCD3</i>	Novel SNV2	1	0	0	1.000	0.364	1.000
	Novel SNV3	1	0	0	1.000	0.364	1.000
	Novel SNV4	1	0	3	1.000	1.000	1.000
	Novel SNV5	1	0	0	1.000	0.364	1.000
	Novel SNV6	1	0	0	1.000	0.364	1.000
<i>ABCD4</i>	Novel SNV7	3	0	2	0.552	0.358	1.000
	Novel SNV8	1	0	0	1.000	0.364	1.000
	Novel SNV9	11	4	14	1.000	0.512	0.767
	Novel SNV10	2	1	5	1.000	1.000	1.000

既知 Variants

Gene	SNV ID	Allele frequency (number)			P value ^a		
		Cerebral form (A total of 96 alleles)	AMN (A total of 44 alleles)	Control (A total of 192 alleles)	Cerebral form vs AMN	Cerebral form vs control	AMN vs control
<i>ABCD2</i>	rs117275340	1	0	3	1.000	1.000	1.000
	rs188241882	0	1	0	0.3088	1.000	0.204
<i>ABCD3</i>	rs4148058	21	8	22	0.821	0.082	0.338
	rs2147794	21	5	34	0.237	1.000	0.191
	rs16946	16	5	35	0.609	0.423	0.196
	rs681187	53	20	75	0.358	0.194	1.000
	rs662813	32	20	74	0.258	0.438	0.300
	rs337592	4	11	26	0.0006	0.014	0.068
<i>ABCD4</i>	rs72542404	2	1	5	1.000	1.000	1.000
	rs17782508 ^b	18	3	42	0.121	0.164	0.011
	rs2301345 ^b	18	3	42	0.1209	0.1638	0.011
	rs4148077 ^b	18	3	42	0.1209	0.1638	0.011
	rs4148078 ^b	18	3	42	0.1209	0.1638	0.011
	rs3742801 ^b	18	3	42	0.1209	0.1638	0.011

a: Two-sided Fisher's exact test の結果。

b: 5 個の SNPs(rs17782508、rs2301345、rs4148077、rs4148078、rs3742801)については、日本人において、完全連鎖不平衡にあった。

3-3-2 ペルオキシソームで機能する遺伝子群の variants 解析及び ALD 表現型との関連解析(Step2)

全エクソン解析における平均 coverage は x132.5 であり、variants を検出するに十分な coverage であった。各 sample において得られた総リード数の平均は、108,352,812 であり、得られた SNVs の平均は、411552.7 であり、その中で dbSNP 135 に登録されていない SNVs の平均は、326.0 であった。また得られた小欠失・挿入の平均は、36796.4 であり、その中で、dbSNP 135 に登録されていない小欠失・挿入の平均は、74.3 であった。

次に、全エクソン解析で得られた variants の中から、方法に記載したように、ペルオキシソームで機能する遺伝子群における variants を選択した。

ALD 症例において、ペルオキシソームで機能する遺伝群(ペルオキシソーム病関連遺伝子群を含む)において、1 個の既知の病因遺伝子変異を認めた。4 個の新規の nonsense variants、frameshift variants、スプライス部位(アクセプター部位、ドナー部位)の variants を認めた。44 個の新規 non-synonymous SNVs を認めた。そして、新規 non-synonymous SNVs の中で、19 個の deleterious SNVs (Polyphen-2、SIFT、Mutation Taster、LRT、PhyloP の総得点が 4 点以上)を認めた(表 10)。

表 10. ALD 症例において認められたペルオキシソームで機能する遺伝群
(ペルオキシソーム病関連遺伝子群を含む)の variants

小児大脳型 ALD

Smample IDs	Age at onset	Age at sampling	Gene	Variants	Related disease	Deleterious SNV score
CCALD1	8	33	<i>PEX11B</i>	p. Arg6Cys (c. 16 C>T)	Zellweger syndrome	4.978
			<i>DNAJC10</i>	p. Ser354Trp (c. 1061 C>G)	-	4.861
			<i>ACOX2</i>	p. Gln569His (c. 1707 G>C)	-	2.783
CCALD2	No data		<i>PEX5</i>	p. Pro151Arg (c. 452 C>G)	Zellweger syndrome	4.877
CCALD3	9	20	<i>PECR</i>	p. Lys291Glu (c. 871 A>G)	-	3.41
			<i>AGXT</i>	p. Ile251Thr (c. 752 T>C)	Hyperoxaluria type I	2.995
CCALD4	7	8	<i>CRAT</i>	p. Arg27His (c. 79 G>A)	-	3.902
CCALD5	9	No data	<i>IDE</i>	p. Ala956Ile (c. 2866 G>A)	-	4.077
CCALD7	9	No data	<i>ACOT1</i>	p. Arg281His (c. 842 G>A)*	-	3.958
			<i>ACOT2</i>	p. Arg343His (c. 1028 G>A)*	-	4.176
CCALD8	6	No data	<i>PEX14</i>	p. Pro98Ser (c. 295 C>T)*	Zellweger syndrome	4.097
			<i>ECI2</i>	p. Ser167Arg (c. 501 T>A)	-	3.586
CCALD6	6	8	No variants detected			
CCALD9	10	No data				
CCALD10	4	No data				
CCALD11	8	No data				
CCALD12	7	7				
CCALD13	7	6				

思春期大脳型 ALD

Smample IDs	Age at onset	Age at sampling	Gene	Variants	Related disease	Deleterious SNV score
AdoICALD1	17	29	<i>PEX10</i>	p. Pro8Thr (c. 22 C>A)	Zellweger syndrome	3.268
			<i>PECR</i>	p. Lys291Glu (c. 871 A>G)	-	3.41
AdoICALD4	Senior high school student	No data	<i>CAT</i>	p. Ile269Val (c. 804 A>G)	Acatlasemia	4.965
AdoCALD5	21	No data	<i>PEX11G</i>	fs. X242Val (c. 723_724insG)	-	NA
			<i>ECH1</i>	p. Arg148Stop (c. 442 C>T)		NA
AdoICALD2	17	19	No variants detected			
AdoICALD3	Junior high school student	No data				
AdoICALD6	11	11				

表 9(続き). 成人大脳型

Smample IDs	Age at onset	Age at sampling	Gene	Variants	Related disease	Deleterious SNV score
ACALD1	42	No data	<i>ABCD3</i>	p. Val94Met (c. 280G>A)	-	4.057
			<i>PXMP2</i>	p. Arg59Gln (c. 176 G>A)	-	1.737
ACALD2	38	40	<i>PEX1</i>	p. Ser1090Asn (c. 3269 G>A)	Zellweger syndrome	4.64
ACALD6	43	44	<i>MLYCD</i>	p. Asn434Ser (c. 1301A>G)	Malonic aciduria	4.997
			<i>TRIM37</i>	p. Ala580Val (c. 1739C>T)	Mulibrey nanism	3.446
			<i>MVK</i>	p. Val109Leu (c. 325G>C)	-	3.338
ACALD10	30	35	<i>PEX10</i>	p. Thr294Ile (c. 881 C>T)	Zellweger syndrome	3.752
			<i>ACBD5</i>	fs. Gln 358Arg (c. 1072_1073insG)	-	NA
			<i>HAO1</i>	p. Arg172His (c. 515 G>A)	-	4.738
ACALD3	28	34	No variants detected			
ACALD4	76	76				
ACALD5	31	33				
ACALD7	27	No data				
ACALD8	41	No data				
ACALD9	43	No data				

大脳型への移行例

Smample IDs	Age at onset	Age at onset of cerebral symptoms	Age at sampling	Gene	Variants	Related disease	Deleterious SNV score
AMNCer1	18	30	22	<i>ACOX3</i>	p. Gln295Stop (c. 883 C>T)	-	4.638
				<i>NOS2</i>	p. Glu971Lys (c. 2911 G>A)		1.623
				<i>MOSC2</i>	p. Leu153Pro (c. 458 T>C)		2.38
AMNCer2	33	59	59	<i>ACOT2</i>	p. Leu6Phe (c. 16 C>T)	-	1.852
AMNCer3	36	47	47	<i>ACSL6</i>	p. Leu107Phe (c. 319 C>T)	-	4.088
AMNCer4	42	59	62	<i>DECR2</i>	p. Gly270Trp (c. 808 G>T)	-	4.77
AMNCer9	32	39* ¹	32	<i>PEX7</i>	p. Gly217Arg (c. 649 G>A)	RCDP1	4.976
AMNCer12	20	25	25	<i>ACOX1</i>	p. Gly25Ser (c.73 G>A)	Acyl-CoA oxidase deficiency	4.873
AMNCer5	30	34* ²	34	No variants detected			
AMNCer6	43	51* ³	44				
AMNCer7	44	47	49				
AMNCer8	25	33	31				
AMNCer10	33	45	45				
AMNCer11	22	32	32				
Cerebello brainstemCer	39	50	53				

表 9 (続き). AMN 症例

Smample IDs	Age at onset	Age at sampling	Gene	Variants	Related disease	Deleterious SNV score	
AMN1	43	46	<i>PEX14</i>	p. Gln9Leu (c. 26 A>T)	Zellweger syndrome	3.403	
			<i>PRDX5</i>	p. Asp98Gly (c. 293 A>G)	-	3.368	
AMN2	29	32	<i>DEC2</i>	p. Val203Ile (c. 607 G>A)	-	3.294	
AMN6	30	59	<i>DEC2</i>	p. Gly270Trp (c. 808 G>T)	-	4.77	
AMN10	37	39	<i>ACOT2</i>	p. Ala106Glu (c. 317 C>A)	-	1.757	
AMN12	32	52	<i>ACSL6</i>	p. Val503Ile (c. 1507 G>A)	-	3.148	
AMN13	25	31	<i>PECR</i>	p. Phe98Cys (c. 293 T>G)	-	3.908	
AMN16	34	No data	<i>PEX13</i>	p. Tyr90Cys (c. 269 A>G)*	Zellweger syndrome	4.938	
AMN17	16	No data	<i>PAOX</i>	p. Ala116Gly (c. 347 C>G)*	-	2.081	
AMN18	28	59	<i>PECR</i>	p. His118Asp (c. 352C>G)	-	0.615	
AMN19	20	40	<i>ECH1</i>	p. Ile145Phe (c. 433A>T)	-	1.852	
AMN3	30	55	No variants detected				
AMN4	44	55					
AMN5	25	31					
AMN7	25	33					
AMN8	22	23					
AMN9	21	21					
AMN11	36	45					
AMN14	33	35					
AMN15	33	40					

小脳脳幹型

Smample IDs	Age at onset	Age at sampling	Gene	Variants	Related disease	Deleterious SNV score
Cerebello-brainstem1	23	29	<i>PEX6</i>	p. Val844Ala (c. 2531 T>C)	Zellweger syndrome	4.019
Cerebello-brainstem2	58	62	<i>PEX3</i>	p. Ser317Gly (c. 949 A>G)	Zellweger syndrome	3.622
Cerebello-brainstem3	27	32	<i>CAT</i>	p. Ile269Val (c. 804 A>G)	Acatlasemia	4.965

Addison 単独型、未発症男性

Smample IDs	Age at onset	Age at sampling	Gene	Variants	Related disease	Deleterious SNV score	
Addison only1	20	20	No variants detected				
Presymptomatic1	-	17					
Presymptomatic2	-	6					

コントロールにおいて、ペルオキシソームで機能する遺伝群(ペルオキシソーム病関連遺伝子群を含む)において、4個の既知の病因遺伝子変異を認めた。8個の新規の nonsense variants、20個の frameshift variants、3個のスプライス部位(アクセプター部位、ドナー部位)の variants を認めた。271個の新規 non-synonymous variants を認めた。そして、新規 non-synonymous variants の中で、118個の deleterious SNVs (Polyphen-2、SIFT、Mutation Taster、LRT、PhyloP の総得点が4点以上)を認めた。

・ 検出された Variants と ALD の表現型との関連解析

ペルオキシソームで機能する遺伝子群(ペルオキシソーム病関連遺伝子群を含む)における variants を有する症例の、それぞれの表現型における内訳は、大脳型においては、20例、AMNにおいては10例、日本人コントロールにおいては、194例となっていた(表11)。

Deleterious variants (既知の病因遺伝子変異、新規の nonsense variants、frameshift variants、スプライス部位(アクセプター部位、ドナー部位)の variants、Polyphen-2、SIFT、Mutation Taster、LRT、PhyloP の総得点が4点以上の non synonymous SNVs) に絞ると、大脳型においては、16例、AMNにおいては2例、日本人コントロールにおいては、133例となっていた(表11)。

ペルオキシソームで機能する遺伝子群(ペルオキシソーム病関連遺伝子群を含む)

む)において、それぞれの表現型(大脳型、AMN、コントロール)における variants を有する症例数の比較として、deleterious variants 及び non deleterious variants の分布も考慮する形で、deleterious variants を有する症例数、non deleterious variants を有する症例数、variants を有さない症例数の比較を行った。

まず、Step1 として、ALD 症例(大脳型及び AMN)と日本人コントロールに関して、3 群間で、違いがあるかを Fisher の正確検定によって、有意差があるかを検定したが、ALD 症例(大脳型及び AMN)と日本人コントロールでは、この 3 群間に違いは認められなかった($P=0.521$)(表 12A)。

次に、Step2 として、ALD 症例の中で、大脳型及び、AMN との間で、3 群間で、違いがあるかを Fisher の正確検定によって、有意差があるかを検定したところ、分布に有意差が認められた($P=0.0059$)(表 12B)。表の中で明らかに差があるのは、deleterious variants を有する症例数、non deleterious variants を有する症例数であることから、次に、Step3 として、Step2 を受けての post-hoc の解析として、ALD 症例の中で、大脳型及び、AMN との間で、deleterious variants、non deleterious variants を有する症例数で、違いがあるかを Fisher の正確検定によって、有意差があるかを検定したところ、有意差が認められた($P=0.0041$)(表 13C)。つまり、大脳型において、ペルオキシソームで機能する遺伝子群において、deleterious variants を有する症例の割合が、AMN に比べて多いという結果であった。

表 11. ペルオキシソームで機能する遺伝子群(ペルオキシソーム疾患関連遺伝子群を含む)における variants を有する症例数のまとめ

Variants: all non-synonymous SNVs/nonsense, frameshift, splice sites mutations/
Known causative mutations

Identified SNV	Cerebral form	AMN ^{*2}	Japanese Control
Total Samples	20/42 (47.6%)	10/20 (50.0%)	194/369 (52.5%)

Variants: Deleterious non-synonymous SNVs ^{*1}/nonsense, frameshift, splice sites mutations/
Known causative mutations

Identified SNV	Cerebral form	AMN ^{*2}	Japanese Control
Total Samples	16/42 (38.1%)	2/20 (10.0%)	133/369 (36.0%)

*1: Total score of Polyphen-2, SIFT, Mutation Taster, LRT, PhyloP is equal or more than 4 (fullpoints 5)

*2:両側 babinski 徴候を認める Addison 病単独型 1 例を含む。

表 12. ALD 症例、日本人コントロールにおけるペルオキシソームで機能する遺伝子群における deleterious variants、non deleterious variants を有する症例、variants を有さない症例数の比較

A. Step1: ALD 症例(大脳型、AMN)及びコントロールとの比較

	ALD症例 (大脳型、AMN)		Control	
Sample #	62		369	
Deleterious variants* (≥ 4)	18	29.0%	133	36.1%
Non-deleterious variants	12	19.4%	61	16.5%
Variants (-)	32	51.6%	175	47.4%

P 値 0.5206 (Two-sided Fisher's exact test)

B. Step2: 大脳型 ALD 及び AMN における比較

	大脳型		AMN	
Sample #	42		20	
Deleterious variants* (≥ 4)	16	38.1%	2	10.0%
Non-deleterious variants	4	9.5%	8	40.0%
Variants (-)	22	52.4%	10	50.0%

次のStepへ



P 値 0.0059 (Two-sided Fisher's exact test)

C. Step3: 大脳型 ALD 及び AMN における比較(deleterious variant、non deleterious Variants を有する症例の比較), Step2 の解析を受けての post-hoc の解析

	大脳型		AMN	
Sample #	42		20	
Deleterious variants* (≥ 4)	16	38.1%	2	10.0%
Non-deleterious variants	4	9.5%	8	40.0%

P 値 0.004111 (Two-sided Fisher's exact test)

また、ペルオキシソーム病疾患遺伝子に絞る形でも、またはペルオキシソームで機能する遺伝群における variants の合計数を大脳型、AMN、コントロールにおいて比較を、上記と同様の方法で行ったところ(表 13)、deleterious variants を有する症例数は、AMN と比較して、大脳型で有意に多く存在した(P= 0.017)。

表 13. ペルオキシソーム疾患関連遺伝子群における variants を有する症例数
 ペルオキシソーム疾患関連遺伝子群における variants の合計数

Variants: all non-synonymous SNVs/nonsense, frameshift, splice sites mutations

Identified SNV	Cerebral form	AMN* ²	Japanese Control
Total Samples	11/42 (26.2%)	2/20 (10.0%)	74/369 (20.1%)

Variants: Deleterious non-synonymous SNVs *¹/nonsense, frameshift, splice sites mutations

Identified SNV	Cerebral form	AMN* ²	Japanese Control
Total Samples	8/42 (19.0%)	1/20 (5.0%)	36/369 (9.8%)

*1: Total score of Polyphen-2, SIFT, Mutation Taster, LRT, PhyloP is equal or more than 4 (fullpoints 5)

*2: 両側 babinski 徴候を認める Addison 病単独型 1 例を含む。

3-4 考察

まず、*ABCD2*, *ABCD3*, *ABCD4* の全エクソン、エクソン/イントロン境界領域に渡る包括的な塩基配列解析を行うことで、ALD の表現型を修飾する因子を同定することを試みた(Step1)。種を越えて、表現型に関連する SNVs を同定することはできなかったが、*ABCD3* における 3'UTR に存在する rs337592、コントロールと比較して、大脳型で頻度が有意に少ないという結果であり、この SNP(rs337592) を有することで、大脳型になりにくい可能性が考えられた。*ABCD4* における 5 個の完全連鎖不平衡にある SNVs (rs17782508、rs2301345、rs4148077、rs4148078、rs3742801)においては、コントロールと比較し、大脳型で有意に頻度が高い傾向にあったが、フランス人の ALD 症例の独立した被験者集団では、有意差は認められなかった。

日本人 ALD 症例の表現型との関連が示唆される variants が同定されたものの、十分な結果とはいえないと考え、次に、ペルオキシソーム病に関連する遺伝子、ペルオキシソームで働くすべての遺伝子を候補遺伝子として考え、関連解析を行った(Step2)。

新規多型の中には、遺伝子産物の機能に影響を与える variants と、遺伝子産物の機能に影響を与えない variants の両方が存在するものと考えられる。各々の variants ごとに機能解析を行い、遺伝子産物の機能に影響を与えるかの検証を行

うことが理想的ではあるが、ペルオキシソームに存在する 95 もの遺伝子群に存在する variants 1 つ、1 つの機能解析は現実的ではない。一方で、1 つの遺伝子産物の機能予測アルゴリズムでは、実際の機能への影響と一致しないことがある⁵¹。そこで、我々は、各々の variants における複数の遺伝子産物の機能予測アルゴリズムの合計スコアを算出することで、合計スコアが高値のものを機能に多大な影響のある deleterious variants と定義し、選択を行った。

その結果、大脳症状を呈し、急速な大脳の炎症性脱髄を呈し、予後不良である大脳型 ALD 症例と、緩徐進行性の下肢痙性を主体とする AMN を比較した場合には、大脳型 ALD 症例において、non deleterious variants に比べ、deleterious variants を有する症例が有意に多いという結果を得た。

また、Step2 においては、下記に記述する背景から、今回、特に variants の中で、既知の疾患関連変異、及び新規 variants に注目し、解析を行った。

孤発性疾患の発症機構としては、複数の遺伝要因と環境要因の双方が相互に関与すると考えられており、2000 年代に入り、DNA マイクロアレイの技術が実用化され、ゲノムワイドに頻度の高い SNP を検出ことが可能となり、ゲノムワイド関連解析(GWAS: genome-wide association study)が行われるようになった。この解析方法の理論的背景には、“Common disease-common variants hypothesis” が存在する⁵¹。この技術を利用して、近年、様々な疾患・表現型における遺伝要因の

解析がなされた。しかし、これまで同定された疾患感受性多型の多くは、オッズ比が小さく、疾患・表現型の遺伝的要因の全体を解明するには至っていなかった。例えば、パーキンソン病の GWAS の研究では、複数の疾患感受性座位が検出されたが、いずれも遺伝的影響度は小さく、オッズ比は、いずれも 1.4 未満となっており、遺伝的要因の全体を理解するには至っていない⁵⁴。また、ヒトの身長という表現型では、大規模な GWAS が多数行われ、多くの疾患感受性座位が検出されたが、いずれも遺伝的影響度が小さく、想定される遺伝率の 5-6%のみしか説明できていない^{55,56}。このように疾患発症・表現型に対する影響度の大きい遺伝的要因が存在しているのにも関わらず、見出せない現象として、missing heritability として、注目されている⁵⁵。

最近の研究成果として、minor allele frequency (MAF)が 5%以上の頻度の高い common SNP のみを用いた GWAS では用いられなかった、低頻度の variants が、疾患発症に対する影響度の高い遺伝的要因として、同定されている⁵⁷⁻⁶⁰。

これらの低頻度の variants を検出する方法としては、これまでは直接塩基配列法が用いられてきた。この方法では、全ゲノム配列解析を行うことは、多大な時間、労力、費用を費やすことから現実困難であった。しかし、近年次世代シーケンサーが実用化されたことで、全塩基配列解析、全エクソン配列解析が可能となり、低頻度の variants の検出を全ゲノムにおいて網羅的に検出することが

可能となった。このような理由から、今回我々は、ALDの表現型に関わる遺伝要因として、低頻度であるものの、比較的影響度の高い遺伝要因を検出するべく、全エクソン配列解析を用いた解析を行い、ペルオキシソームで働くすべての遺伝子において検出された既知の疾患関連変異、及び新規 variants に注目し、表現型と variants との関連を探索した。

しかしながら、今後、common variants を含む既知の variants を含めた形でも、ALDの表現型と variants との関連を検討する必要があると考える。例えば、家族性及び孤発性アルツハイマー病の強いリスクファクターとして、APOEの遺伝子多型の一つであるAPOE4が、知られている⁶¹。APOE4のアレル頻度は、日本人において患者群では27.9%である一方で、健常者群では9.2%と報告されており⁶²⁻⁶⁶、比較的影響度の高いvariantとなっている。また、家族性及び孤発性多系統萎縮症の強いリスクファクターとしてCOQ2遺伝子が知られているが⁶⁷、その中の一つのvariantであるV343Aは、日本人のみに報告されている既知のvariantであるが、V343Aのアレル頻度は、患者では4.8%である一方で、健常者群では1.6%となっている。このようにcommon variants を含む既知の variants の中にも疾患と関連した強いリスクファクターとなるvariantsも存在し、common variants の中にも、ALD表現型の遺伝的修飾因子となり得るvariantsが存在する可能性も否定できない。

また、日本における全国調査では、発症頻度は、出生男児 30,000-5,000 人に 1 人と希少疾患であるために^{10,11}、今後全国の病院との協力体制による、症例の蓄積を行い、表現型との関連解析を行うことが重要であると考えられる。

また、今回日本人 ALD 症例において、大脳型 ALD において、deleterious variants が有意に多いという結果を得たが、人種を越えて共通にこの結果が得られるか、他人種においても共通しているかについて検証を行う必要があると考える。

ALD の原因遺伝子 *ABCD1* ノックアウトマウスは、ALD の表現型の中で、脊髄の非炎症性軸索変性のみを認める軽症の AMN 型に類似の表現型を呈することが知られている^{24,25}。一方で、*ABCD1* と同様にペルオキシソームの物質輸送に関わっているとされる *PEX5* 遺伝子を、オリゴデンドロサイトにおいてノックアウトしたマウスにおいては、オリゴデンドロサイトにおけるペルオキシソームが機能不全に陥り、小児・成人大脳型 ALD で生じる大脳白質の広汎な軸索損傷、炎症性脱髄を生じることが知られている。また *PEX5* を片側アレルにおいてのみノックアウトした場合は、コントロールマウスと変わりがないことが知られている²⁶。

そこで、今回見出された *PEX5* を含むペルオキシソームで機能する deleterious variants が、表現型に影響を与えるかを検証する実験として、X 染色体上に存在する *ABCD1* のノックアウトマウスと、片側アレルにおいてのみ *PEX5* をノック

アウトしたマウスを掛け合わせることで、片側アレルにおいてのみ *PEX5* をノックアウトし、且つ、*ABCD1* をノックアウトしたダブルノックアウトマウスを得ることで、*ABCD1* のみのノックアウトマウスと比較して、表現型に違いが生じるかを検討することも今後必要であると考えます。

さらに、小児大脳型 ALD における初期の病理変化として、ミクログリアのアポトーシスが報告されている⁶⁸。さらなる ALD の病態生理学の解明が進むことで、ALD の分子病理学的知見を元にした、表現型修飾因子の探索につながることを期待する。

第四章

思春期/成人脳型 ALD に対する造血幹細胞移植

4-1 背景と目的

現在、脳型 ALD において、炎症性脱髄による脳症状の進行を停止させる可能性がある、唯一の方法は、造血幹細胞移植(Hematopoietic stem cell transplantation: HSCT)である。

ALD に対する造血幹細胞移植の歴史

小児脳型 ALD 症例に対する造血幹細胞移植の最初の報告

1984 年に Moser らにより初めて、ALD 症例に対する allo-HSCT が報告された。

小児脳型 ALD の進行期、13 歳男児の症例に対して、HLA(human leukocyte antigen) 6 座(HLA-A, B, DRB1)一致の同胞より allo-HSCT が行われた。生着を認めたものの、神経症状の増悪を認め、HSCT 141 日後アデノウイルス感染により死亡している³¹。

小児脳型 ALD 症例に対する造血幹細胞移植の初めての成功例

1990 年に Aubourg らにより、小児脳型 ALD の極早期の 8 歳男児の症例に対し、HLA 一致の同胞(二卵性双生児)より allo-HSCT が行われ、神経症状の改善、血漿中極長鎖飽和脂肪酸の正常化、頭部 MRI 上白質病変の消失を認め、ALD に対する造血幹細胞移植の初めての成功症例として、報告がなされた⁷。

小児大脳型 ALD 症例に対する造血幹細胞移植の蓄積

Aubourg らの報告以降⁷、積極的に小児大脳型 ALD に対する allo-HSCT が行われるようになり、2000 年に Shapiro らによって、小児大脳型 ALD 12 症例に対する allo-HSCT の 5-10 年の長期予後に関する報告がなされ、大脳症状発症早期に allo-HSCT を施行することができれば、症状の進行停止に有効であることが示された⁹。

2007 年 Mahmood らによって、Kennedy Krieger Institute において、発症早期(神経障害が軽度であり、Loes score 9 点未満(ALD で障害され得る後頭頭頂葉、前側頭葉、脳梁、視覚路、聴覚路、錐体路、小脳、基底核、視床前部、萎縮の程度により加点を行う。最重症で 34 点。)⁶⁹)の HSCT を行った小児大脳型 ALD 19 症例の 5 年生存率が 95%であったのに対して、発症早期に HSCT を行わなかった小児大脳型 ALD の 5 年生存率は 56%であり、小児大脳型 ALD 発症早期に、allo-HSCT を施行することで、有意に生存率が上昇することが示された¹²。

小児大脳型 ALD 症例に対する造血幹細胞移植の国際共同研究

2004 年に Peters らによって、初めて国際的な共同研究として、1982-1999 年に 14 ヶ国、43 施設で行われた小児大脳型 ALD に対する allo-HSCT の成績がまとめられ、報告された³²。

HSCT 後の ALD 症例全体の 5 年生存率は 56%となっていた。

神経障害が軽度 (Neurologic deficit score が 0 または 1 点: 視覚、聴覚、言語、歩行、その他の領域で異常がなければ 0 点, 1 領域における異常で 1 点)、Loes score が 9 点未満の症例では、5 年生存率が 92% であった。一方で Neurologic deficit score が 2 点以上(視覚、聴覚、言語、歩行、その他の領域で、2 領域以上の異常)であり、Loes score が 9 点以上の症例では、5 年生存率が 45% と、神経所見の程度、Loes score によって、生存率に有意な差を認めた。

さらに、PIQ が 80 未満である場合、PIQ が 80 以上の症例に比べて、造血幹細胞移植後の神経心理学的機能、ADL が有意に低下することが示され、神経心理学的検査の中で HSCT 前の PIQ が HSCT 後の状態に、特に重要であることが示唆された。

ミネソタ大学単一施設における最も大規模な小児 ALD に対する HSCT の成績

2011 年には、ミネソタ大学の Miller らによって、これまでで最も大規模な、一施設での、小児大脳型 ALD に対する allo-HSCT の成績が報告された³³。

前処置においては、これまで、ブスルファンにおける中枢神経に対する影響が問題になることがあったが、2006 年より進行期の ALD 症例においては、化学放射線療法による中枢神経障害を軽減する目的で、ブスルファン/エンドキサンによる骨髄破壊的前処置に変えて、骨髄非破壊的前処置として、アレムツズマブ、クロファラビン、メルファラビンの投与、200 cGY 全身照射が行われた。一方

で大脳症状初期の症例は、ブスルファン/シクロフォスファミドを主体とした方法が用いられた。

HSCT の成績もさらに改善を認め、全症例における 5 年生存率は、75%であった。

HSCT 時 Loes score が 10 未満の場合は 5 年生存率は 89%であり、Loes score が 10 点以上の場合は 60%となっていた。

HSCT 時、神経障害を認めない場合の 5 年生存率は 91%であったが、神経障害を認めた症例では 5 年生存率は 66%であった。

HSCT の成績は、2004 年の Peter らの報告と同様に、HSCT 時の Loes score 及び神経障害の程度、ADL が重要であることが示された。

日本国内における小児大脳型 ALD に対する造血幹細胞移植

日本国内においては、1988 年以来、2010 年まで ALD 症例に対して、76 症例に対して HSCT が施行されている。移植に使用された細胞源としては、骨髄が 48 例(血縁 31 例、非血縁 17 例)、臍帯血が 28 例(血縁 1 例、非血縁 27 例)となっていた。移植前処置としては、初期はブスルファン、シクロフォスファミドが中心であったが、近年は、ブスルファンを避け、フルダラビン、メルファラン、低線量全身照射の前処置が施されている。また、5 年生存率についても、2004 年までの 85.9%から、2005 年以降は、93.9%へ改善している。その中で、臍帯血移植については、2004 年以前は、5 年生存率、68.6%であったのが、2005 年以降

は、94.7%と大きく改善を認めている^{34,70}。

大脳型 ALD に対する造血幹細胞移植のメカニズムについて

造血幹細胞移植が、炎症性脱髄の症状進行停止に有効である理由として、ドナー由来の血液幹細胞から分化したミクログリアが患者の中枢神経系に進入し、炎症の鎮静化に関わっているとされているが、詳細は不明である⁷¹。

思春期/成人大脳型 ALD に対する造血幹細胞移植

小児大脳型では小児期に、中枢神経白質の脱髄が急速に進み、予後不良となっており、上記のように早期に HSCT が適応された場合に、症状の進行を止める効果があることが示されている。

成人期に発症する ALD の表現型として、成人大脳型 ALD、AMN、小脳・脳幹型 ALD、アジソン病のみの病型が存在する。さらに 11-21 歳の間到大脳症状で発症する思春期大脳型 ALD (AdolALD)が存在する。

成人大脳型 ALD は、成人期に、小児大脳型 ALD と同様に、中枢神経白質の脱髄が急速に進み、予後不良である。

AMN の主な症状は、緩徐進行性の下肢痙性である。しかし、日本における全国調査では、約半分の症例は発症 10 年後に大脳症状を発症する^{10,11}。一旦大脳症状を呈すると、小児大脳型と同様に予後不良となっている。

小脳・脳幹型では、小脳症状を主症状とし、脳幹、小脳に始まる脱髄所見を特

徴とするが、経過 2 年で約半数の症例が大脳型に移行する^{10,11}。

Addison 単独型においても、成人期に発症することがあり、AMN や大脳型などに進展することがある。

これまで、思春期/成人大脳型 ALD に対する HSCT は、HSCT の合併症である Graft versus host disease (GVHD) が小児例に比べて、高率に生じること、感染、前処置関連毒性などのリスクが高かったことから、積極的に実施がなされず、成人大脳型に対しては、HSCT の臨床効果が確立されていないのが現状であった。しかし、近年感染対策、前処置、GVHD 予防の改善がみられることから、我々は、思春期/成人大脳型 ALD の症例に対しても、HSCT の臨床効果があるかを検討することとした。

4-2 対象と方法

思春期/成人大脳型 ALD に対する HSCT 適応基準

思春期/成人大脳型 ALD に対する HSCT の適応として、以下の条件とした。

1. 発症早期の大脳型 ALD (大脳症状の発症後 1 年未満)
2. ガドリニウム造影を伴う大脳白質の活動性病変
3. ALD-disability rating scale³² Level I 以上

(日常生活動作(Activity of daily living: ADL)の比較的良好な症例)

非大脳型 (AMN、小脳・脳幹型、Addison 病単独型)の場合は、緩徐進行性の経過を辿るが、大脳型に進展した場合、急激な神経症状の増悪を示すために、神経所見、頭部 MRI 検査を含めた注意深い経過観察が重要となる。大脳症状の出現が認められた場合には、速やかに HSCT の適応を検討することとした(図 14, 表 14)。疾患特異的な病状評価スケールがないことから、評価項目として、身体所見、検体検査、電気生理検査、各種画像検査、各種スコアリング、認知機能検査と多面的な評価を行い、非大脳型である場合の 1 年毎の評価、大脳型症状出現時、移植入院時、移植後に検査を行っている⁶⁵。本研究は東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認に基づいて施行された(承認番号 2011)。

図 14. 思春期/成人大脳型 ALD に対する造血幹細胞移植プロトコール

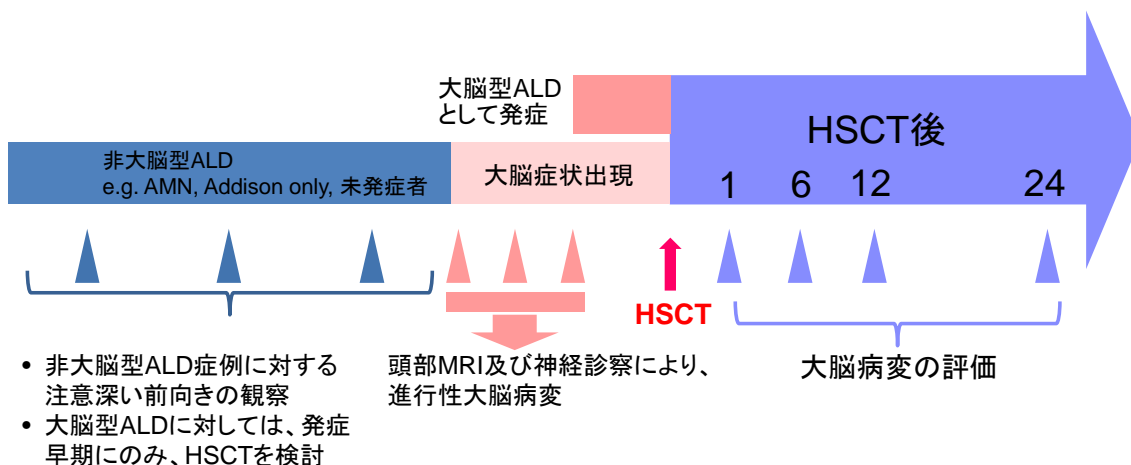


表 14. 思春期/成人大脳型 ALD に対する造血幹細胞移植プロトコールの詳細

項目	内容	非大脳型		大脳型症状出現時	移植準備	移植	移植後			
		初回評価	1年毎f/u	移植適応判断(入院)	移植前検査入院	移植入院	生着確認後1ヶ月	移植後半年	移植後1年	2年目以降1年毎f/u
身体所見	神経学的所見	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
	視力、純音聴力	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
検体検査	血算・生化学検査	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
	極長鎖脂肪酸	◎	(○)	→(○)	◎	◎	◎	◎	◎	(○)
	副腎機能検査・負荷試験	◎	◎	→◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
	DNA検査	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
	髄液検査	○	(○)	→○	○	◎	◎	(○)	◎	(○)
電気生理	末梢神経伝導検査、SEP、VEP、ABR、EEG、MEP(可能なら)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	
造影頭部MRI	Loes score	◎	◎	◎	◎	(○)	◎	◎	◎	
脳血流シンチ		◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	
脊髄MRI		(○)	(○)	(○)	(○)	◎	(○)	(○)	(○)	
ADL score	SF-36、mRS、Barthel Index、FIM、EDSS、ALD-DRS	◎	◎	→◎	◎	◎	◎	◎	◎	
各種score	SARA (失調評価)	(○)	(○)	→(○)	◎	(○)	(○)	(○)	(○)	
	SPRS (Spasticity評価)	(○)	(○)	→(○)	◎	(○)	(○)	(○)	(○)	
	Purdue Pegboard (巧緻性評価)	(○)	(○)	→(○)	◎	(○)	(○)	(○)	(○)	
	POMS (気分・感情評価)	(○)	(○)	→(○)	◎	(○)	(○)	(○)	(○)	
認知機能検査	MMSE	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	
	WAIS-R	◎	◎	◎	◎ (症状増悪時)	◎	◎	◎	◎	
	WAB、FAB	(○)	(○)	→(○)	◎	◎	◎	◎	(○)	
	WMS-R	(○)	(○)	→◎	◎	◎	◎	◎	(○)	
説明・同意	プロトコール説明・同意取得	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	
	遺伝子カウンセリング(適時)	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	
	精子保存			→◎(希望がある場合)						
ドナー検索	HLA検査			→◎						
	骨髄バンク登録(依頼)			→◎						

◎：必須、○：可能な限り、(○)：オプション、→：移植適応ある場合

当科経過観察中の症例

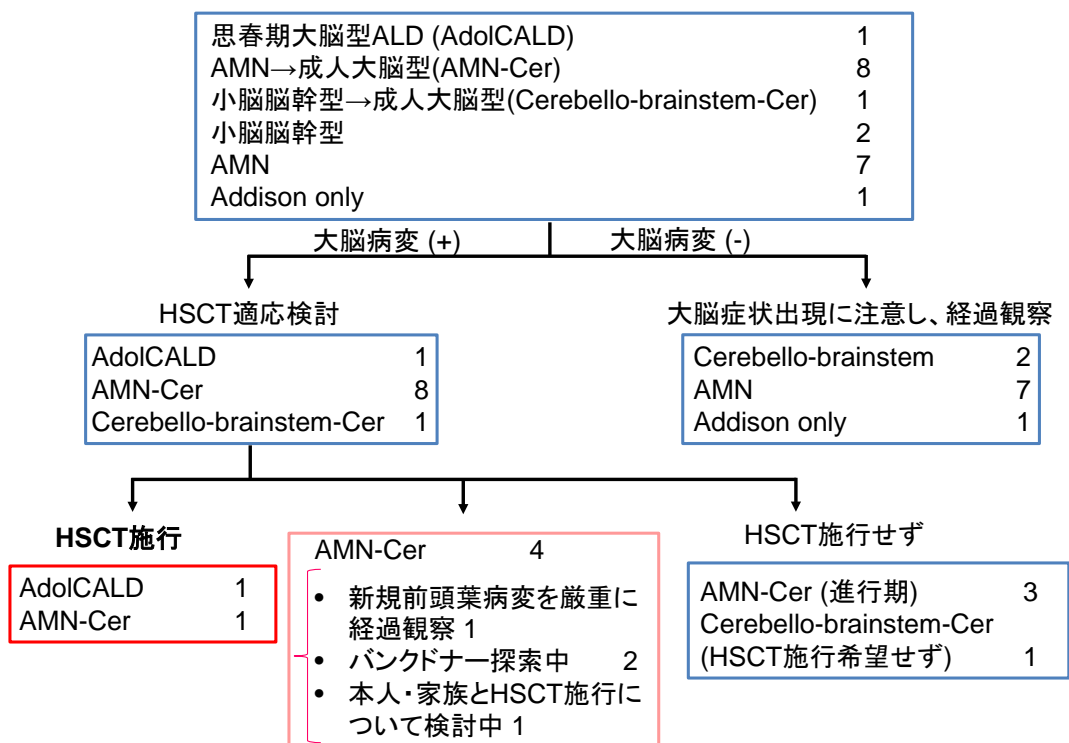
当科では 20 例の ALD 症例 (思春期大脳型 1 例、AMN から大脳型への移行例 8 例、小脳脳幹型から大脳型への移行例 1 例、小脳脳幹型 2 例、AMN 7 例、Addison 単独型 1 例)の経過観察を行っている(図 15)。

平均経過観察期間は、4.5 年となっている。

10 例の症例(思春期成人大脳型 1 例、AMN から大脳型への移行例 8 例、小脳・脳幹型から大脳型への移行例 1 例)において、HSCT の検討がなされている。2 症例(思春期成人大脳型 1 例、AMN から大脳型への移行例 1 例)において HSCT が行われた。4 例(AMN から大脳型への移行例 4 例)に関しては、現在検討中であり、1 例は、新規前頭葉病変の経過を慎重に追っており、2 例においては、骨髄バンクドナーを探索中であり、1 例に関しては、施行について、本人・家族と慎重に検討を行っている。

AMN から大脳型への移行例の 3 症例に関しては、すでに進行期であり、HSCT の適応基準を満たさなかった。小脳脳幹型から大脳型への移行例 1 症例に関しては、HSCT 施行を希望しなかった。

図 15. 当科経過観察中の ALD 症例



4-3 結果

HSCT を施行した思春期/大脳型 ALD 症例

症例 1：思春期大脳型 ALD (18 歳男性)

【主訴】 呂律が回らない、右上肢が動かしにくい

【現病歴】

17 歳：意欲低下の出現。

18 歳：呂律の回りにくさ、歩行時のふらつきを自覚。症状は徐々に進行していた。近医神経内科受診したところ、小脳性構音障害、体幹失調を認めた。頭部 MRI 上両側小脳歯状核及び脳梁膨大部に T2 強調像、FLAIR で高信号を認め、血漿スフィンゴミエリン中の極長鎖飽和脂肪酸の上昇を認めた。

意欲の低下出現 1 年後、思春期大脳型 ALD を疑われ、当科紹介受診。頭部 MRI 上造影効果を伴う病変の拡大を認め、進行性の大脳病変と考えられ、造血幹細胞移植目的に当科入院となった。

【既往歴】 特記事項なし

【家族歴】 母親(II-5)が保因者(図 16)

【一般身体所見】 特記所見なし。

【神経学的所見】 #1. 小脳性運動失調、#2. 構音障害、#3. 嚥下障害、#4. 両側錐体路徴候 (両側 babinski 徴候陽性、両側膝蓋腱反射亢進)

【入院時検査所見】一般血液生化学所見に異常なし。血中コルチゾール、ACTH 正常範囲内だが、rapid ACTH 負荷試験で潜在性副腎機能不全を疑われた。血漿スフィンゴミエリン中極長鎖飽和脂肪酸の上昇あり。

【頭部 MRI】脳梁膨大部、両側側脳室三角部背側、中脳外側、大脳脚、第4脳腔後方の小脳歯状核付近に T2 強調像、FLAIR で高信号を示し、T1 強調像で低信号を示す領域が認められる。造影後 T1 強調像での増強効果を脳梁膨大部・中脳で認める(図 17)。

【聴性脳幹反応】両側 III、IV、V 波の潜時延長を認める。

【高次機能検査】WAIS-R 全検査性 IQ:83、動作性 IQ:77、言語性 IQ:91

【遺伝子検査】*ABCD1* p. Arg518Trp (c. 1552 C>T)をヘミ接合性に認める。

【入院後経過】(図 18) 意欲低下で発症した思春期大脳型 ALD の 18 歳男性。頭部 MRI 画像上も進行性の脳症と考えられ、前処置として、ブスルファン(3.2mg/kg/day, 2 days)、シクロフォスファミド(60mg/kg/day, 2days)、全身リンパ節照射(7.5 Gy)を使用、GVHD 予防として、シクロスポリン(200mg/day)、メトトレキサート(HSCT 後 10mg/m² (day1), 7mg/m² (day3, 6, 11))を使用し、8 座一致非血縁者間同種骨髄幹細胞移植施行。造血幹細胞移植 49 日後には、病変の造影効果は消失(図 19)。

構音障害については改善傾向を認め、経過 4 年で臨床症状は安定している。ALD

において、大脳の脱髄病変の広がりを示す Loes score については、HSCT 前は急激に増悪していたが、HSCT 後は安定しており、軽度小脳脳幹の萎縮で1点加点されたのみである。また、血漿スフィンゴミエリン極長鎖脂肪酸の値に関しても、造血幹細胞移植後低下傾向となっていた(図 20)。

HSCT 後、急性 GVHD 症状(皮膚 stage 3、肝臓 stage 0、消化管 stage 2、Grade III)を認めた。HSCT 50 日後より発症した皮膚 GVHD に対しては、ステロイド外用で対応。HSCT 54 日後より発症した消化管 GVHD に対しては、58 日後より mPSL 60mg(1g/kg)を6日間投与。その後 PSL 内服に切り替え、漸減とした。

また HSCT 後 158 日頃より呼吸苦出現。呼吸機能検査で一秒率の低下(閉塞性障害)を来し、慢性 GVHD による閉塞性細気管支炎が考えられ、mPSL 60mg (1g/kg)を14日間投与。その後徐々に漸減し、PSL 内服に切り替えを行った。また、併せて β -stimulant 及びクラリスロマイシンを使用し症状はコントロールされている。

図 16. 当院で HSCT を施行した ALD 症例(症例 1)の家系図

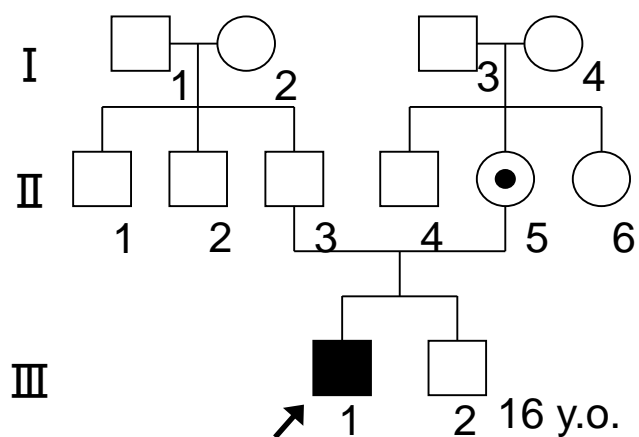


図 17. 当院で HSCT を施行した ALD 症例(症例 1)の HSCT 後の経過図

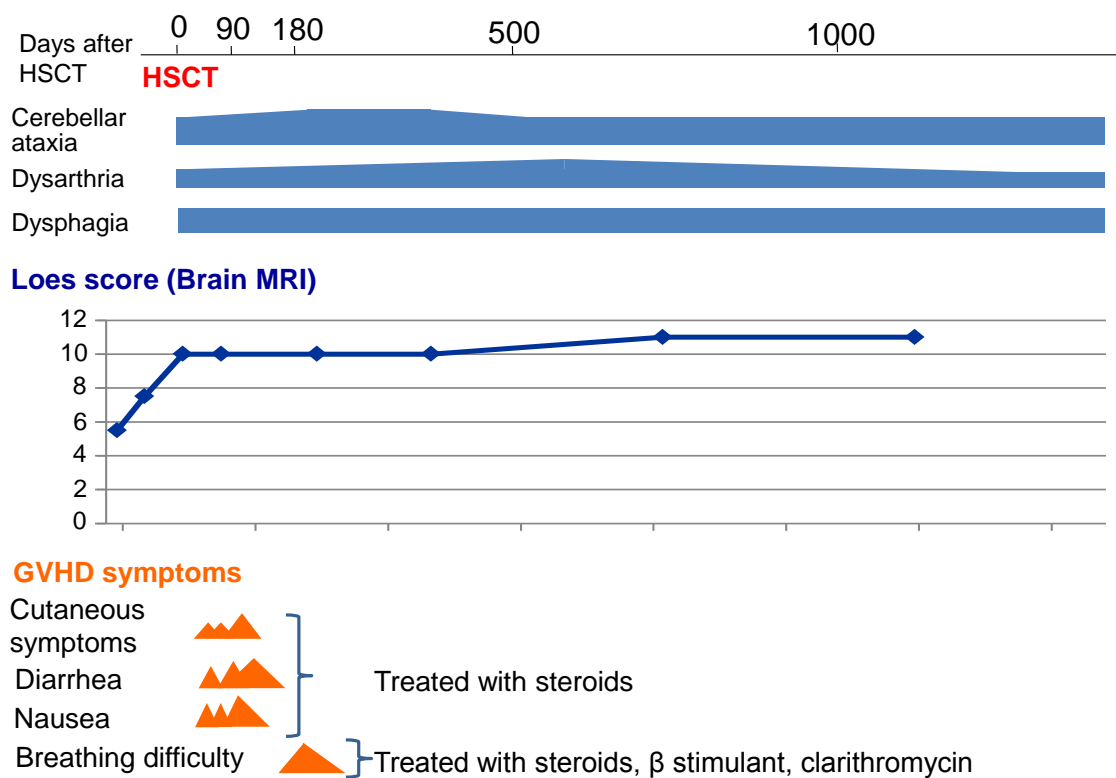


図 18. 当院で HSCT を施行した ALD 症例(症例 1)の HSCT 前頭部 MRI(造影効果を伴う脳梁膨大部病変)

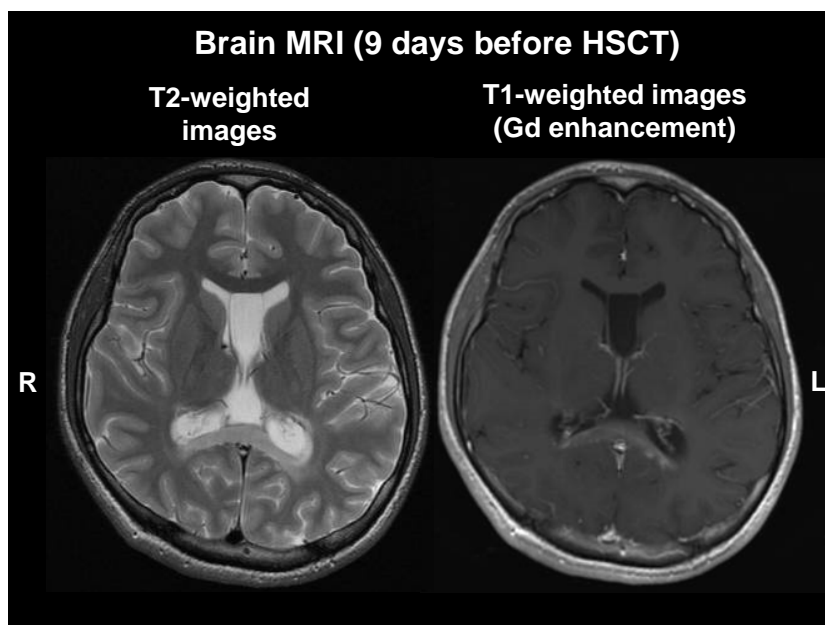


図 19. 当院で HSCT を施行した ALD 症例(症例 1)の HSCT 後頭部 MRI の変化(造影効果の消失)

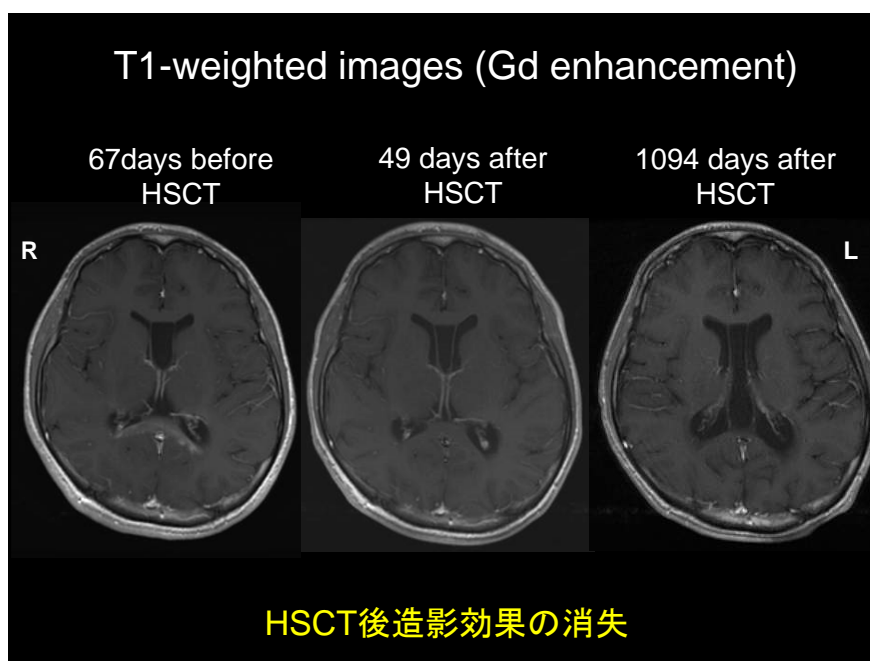
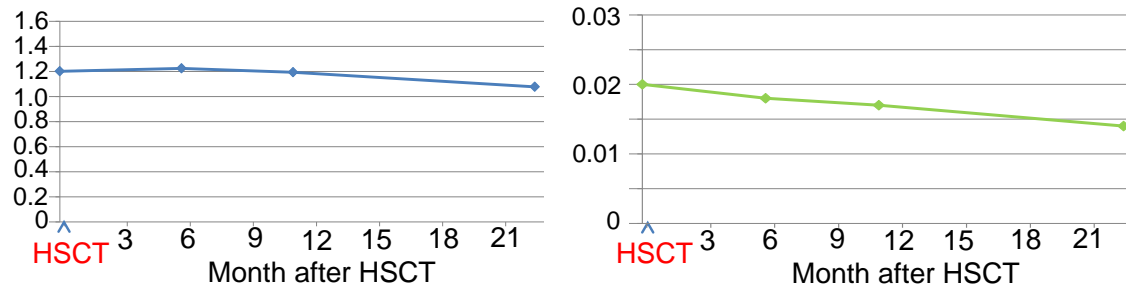


図 20. 当院で HSCT を施行した ALD 症例(症例 1)の HSCT 後血漿スフィンゴミ
エリン極長鎖脂肪酸の経過



症例 2: AMN から成人大脳型への移行例 35 歳男性

【主訴】 下肢の痙縮

【現病歴】 30 歳時に緊張した際に、両下肢痙性を自覚。

34 歳時より、時に両下肢のしびれを自覚し、これらの症状は徐々に増悪。

当科で経過観察中に脳 MRI 上右優位に側頭葉白質に造影効果を伴う病変の出現。

徐々に病変の拡大を認め、進行性の大脳病変と考えられ、造血幹細胞移植目的に当科入院となった。

【既往歴】 小児喘息

【家族歴】 同胞(II-1) 成人大脳型 ALD (図 21)

【一般身体所見】 軽度皮膚色素沈着あり。

【神経所見】 #1. 両側錐体路徴候 (両側 babinski 徴候陽性、四肢腱反射亢進)、#2.

両側足首以下 dysesthesia

【入院時検査所見】 一般血液生化学所見に異常なし。血中コルチゾールは、正常範囲内だが、ACTH の高値を認め、潜在性副腎機能不全と考えられた。血漿スフィンゴミエリン中極長鎖飽和脂肪酸の上昇あり。

【遺伝子検査】 *ABCD1* にエクソン 3-10 の大欠失を認め、chr13 由来配列の大挿入を認める。

【頭部 MRI】 両側側頭葉深部白質に右優位に造影効果を伴う T2WI/FLAIR 高信

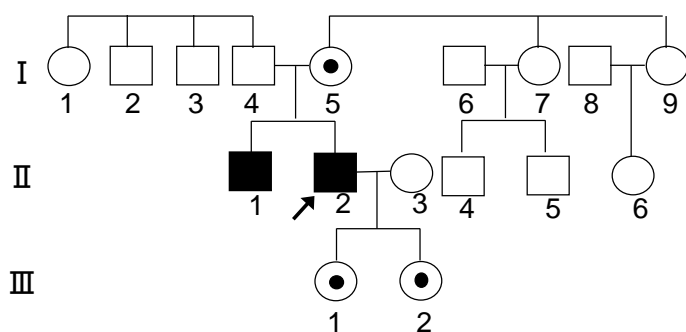
号域を認める。また、両側小脳半球にも T2WI/FLAIR 高信号域を認めるが、造影効果は認めない(図 22)。

【聴性脳幹反応】 両側 III、IV、V 波の潜時延長を認める。

【高次機能検査】 WIAS-III 全検査性 IQ:98、動作性 IQ:84、言語性 IQ:110

【入院後経過】 (図 23)30 歳時下肢の緩徐進行性の下肢痙性を認め、35 歳時右優位両側側頭葉に造影効果を伴う進行性の白質病変を認め、AMN から大脳型への移行例と考えられた 35 歳男性。造血幹細胞移植の適応と考え、前処置として、ブスルファン(3.2mg/kg/day, 2 days)、シクロフォスファミド(60mg/kg/day, 2days)、全身照射(4Gy:大脳遮蔽)、GVHD 予防として、FK506(1.8mg/day 持続静注から漸減、HSCT 後 25 日目より 2.0mg/day の経口投与へ切り替え)、メトトレキサート(HSCT 後 10mg/m² (day1), 7mg/m² (day3, 6, 11))の投与を行い、8 座一致非血縁同種骨髄幹細胞移植を施行。臨床症状は、経過 20 ヶ月で症状の進行を認めず、安定している。頭部 MRI 上側頭葉病変の造影効果は、HSCT 後徐々に消失(図 24)。Loes score も進行を認めず、両側側頭葉病変に関しては、HSCT 後徐々に病変が縮小傾向となっている。血漿スフィンゴミエリン極長鎖脂肪酸の値に関しても、造血幹細胞移植後低下傾向となり、6 ヶ月以降横ばいとなっている(図 25)。急性 GVHD としては、軽度の皮膚病変(grade 1 皮膚 stage1)を認めたのみであった。

図 21. 当院で HSCT を施行した ALD 症例(症例 2)の家系図



II-1 成人大脳型 ALD

図 22. 当院で HSCT を施行した ALD 症例(症例 2)の HSCT 施行前頭部 MRI

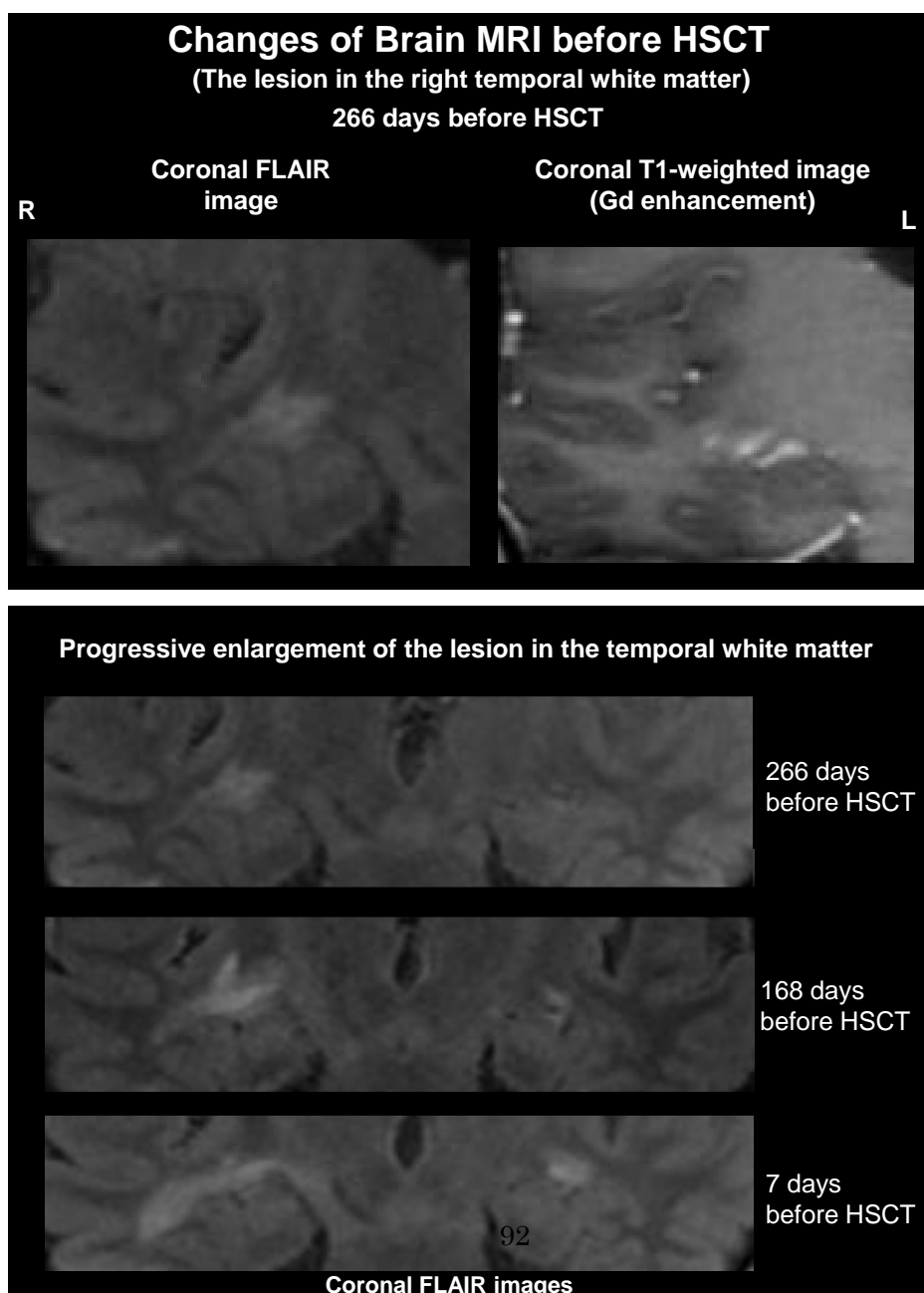


図 23. 当院で HSCT を施行した ALD 症例(症例 2)の HSCT 後の経過図

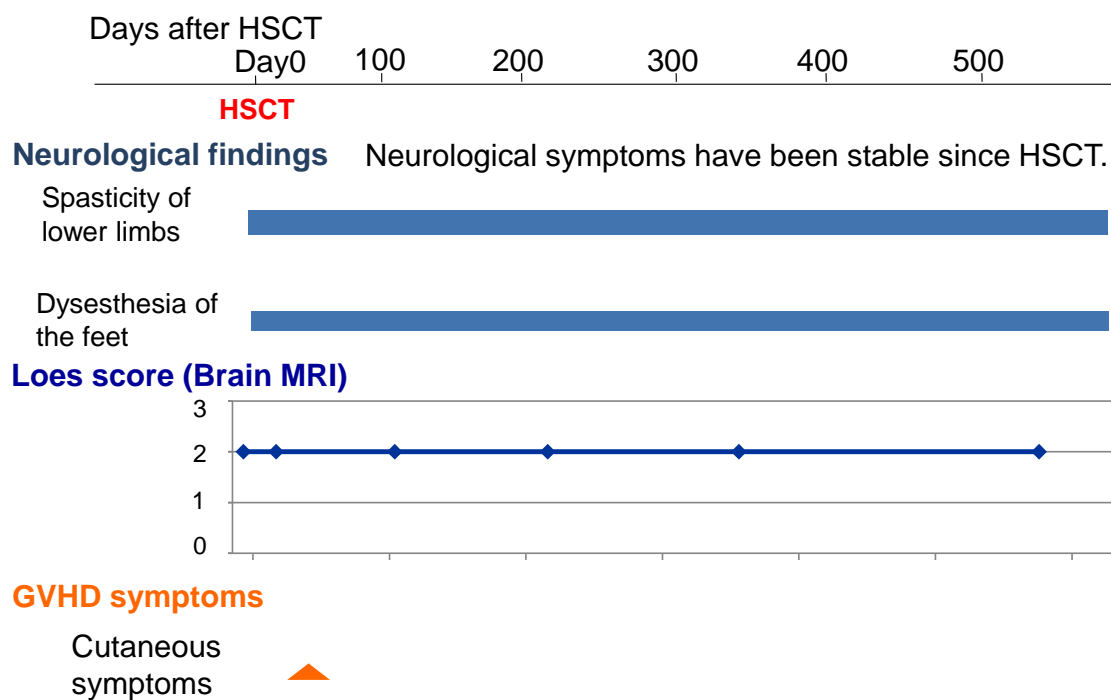


図 24. 当院で HSCT を施行した ALD 症例(症例 2)の HSCT 後の MRI 画像の変化

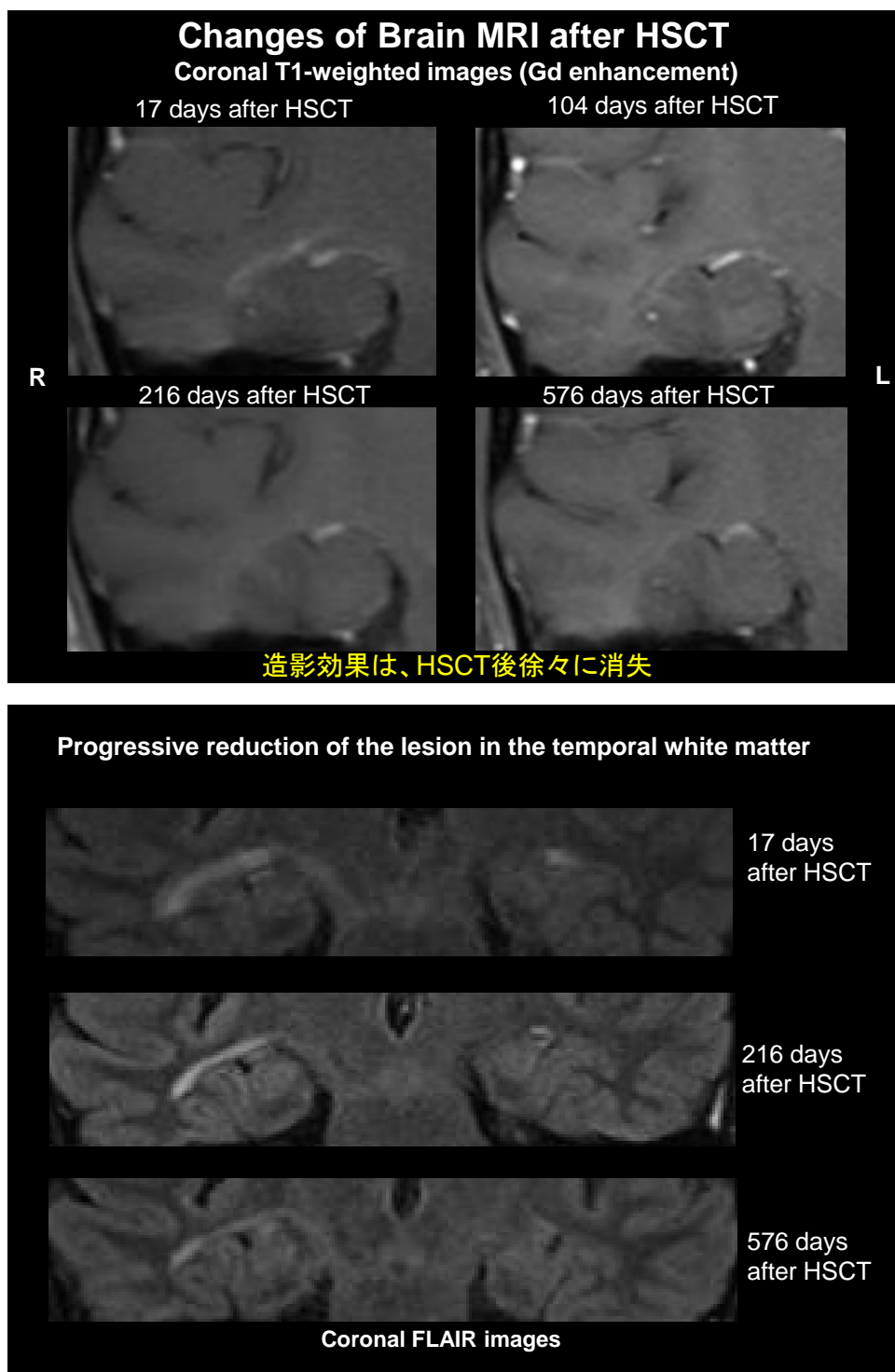
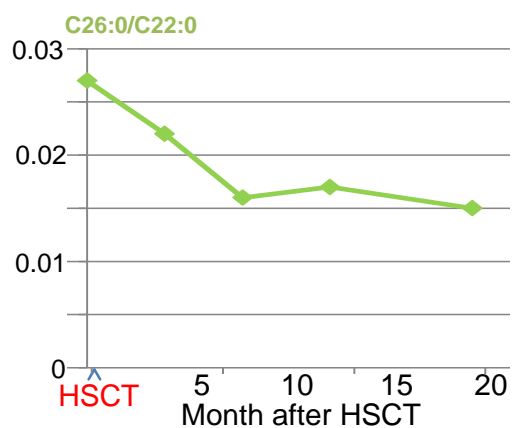
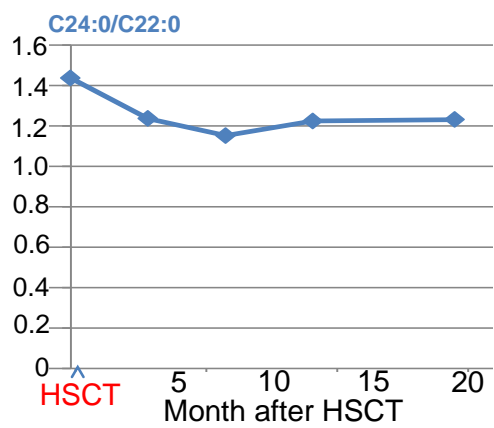


図 25. 当院で HSCT を施行した ALD 症例(症例 1)の HSCT 後血漿スフィンゴミ

エリン極長鎖脂肪酸の経過



4-4 考察

今回施行した 2 症例の思春期/成人大脳型 ALD に対する HSCT は、安全に施行可能であった。小児大脳型 ALD と同様に、HSCT は、大脳症状の進行停止に有効であった。

我々の 2 症例以外に、これまで HSCT を行った成人期における大脳型 ALD の症例は 2 症例報告がある⁷³⁻⁷⁵。

1 症例は、京都大学からの報告であり^{73,74}、20 歳男性、思春期大脳型 ALD に対して 6 座一致非血縁同種骨髄幹細胞移植が行われた。移植前の神経学的評価では#右顔面、右 SCM 筋力低下、#右上下肢の筋力低下、#右四肢失調、#右下肢深部腱反射亢進、#右上下肢冷覚低下、#両側右下 1/4 盲、#純粹失読、#軽度認知機能低下を認めた。頭部 MRI では左側延髄から中脳、左基底核、左視床外側、脳梁膨大部、両側後角周囲白質に T2 強調像で高信号(Loes score13.5 点)を認めた。前処置としては、ブスルファン(4mg/kg/day, 2 days)/シクロフォスファミド(60mg/kg/day, 2days)/全身リンパ節照射(7.5Gy)、GVHD 予防としては FK506、メトトレキサート、メチルプレドニゾロンを使用した。移植後 10 日に急性 GVHD(消化器、皮膚)が出現したもののプレドニン投与で軽快。2 ヶ月後には歩行障害及び右上肢筋力の改善を認めた。

2 症例目として、Royal Victoria Hospital, UK において 36 歳男性、成人大脳型 ALD

に対して、6 座一致血縁同種骨髄幹細胞移植が行われた⁷⁵。12 ヶ月の間に集中力の低下及び見当識障害を来たし、神経学的所見として聴覚及び視覚刺激に対する統合、解釈の障害を認め、頭部 MRI では頭頂後頭葉に T2 強調像で高信号域及び一部造影効果を認めた。前処置としてはブスルファン、シクロフォスファミド(詳細な記載なし)を使用した。しかし移植後も皮質盲及び、認知機能低下を来たし、術後 3 ヶ月で GVHD(詳細な記載なし)で死亡している。

HSCT が施行された思春期/成人大脳型 ALD 症例について、表 15 にまとめた。

表 15. HSCT が施行された思春期/成人大脳型 ALD 症例のまとめ

	症例1	症例2	Fizpatrick et al	Hitomi et al
発症年齢	17歳	30歳	36歳	20歳
大脳症状発症からHSCTまでの期間	12ヶ月	脳MRI上白質の活動性病変出現後11ヶ月 大脳症状 (-)	17ヶ月	9ヶ月
Loes score (HSCT施行前)	10	2	ND	13.5
Loes score (HSCT施行後)	11	2	ND	11
HSCT施行後臨床経過	経過4年で症状安定 構音障害改善	経過15ヶ月で症状安定	GVHDによりHSCT後103日で死亡	経過2年で運動機能はほぼ正常なまでに改善

我々の症例は、大脳症状発症早期に HSCT が行われ、経過も良好であった。特に 2 症例目の AMN から成人大脳型への移行例では、大脳症状の出現前より、頭部 MRI の慎重な経過観察により、進行性大脳病変を検出することが可能であった。

また、血漿スフィンゴミエリン中、極長鎖脂肪酸の値(C26:0/C22:0, C24:0/C22:0)に関しては、HSCT 後低下傾向ではあるものの、症例 2 については、HSCT 半年経過した後は、横這いとなっている。極長鎖脂肪酸の値(C26:0/C22:0, C24:0/C22:0)に関しては、依然として、正常コントロールよりも高値の状態であった。血漿スフィンゴミエリンにおける極長鎖脂肪酸の測定であるため、由来については、骨髄由来の細胞以外の臓器(例えば、肝臓や脾臓)からの極長鎖脂肪酸の値も反映している可能性があると考えられる。

そのため、今後、骨髄のみの由来と考えられる赤血球膜スフィンゴミエリンにおけるの測定をすることも検討している²⁷。

今後成人大脳型 ALD に対して、HSCT を行うにあたっては、発症早期に大脳型 ALD の診断を行うことが、HSCT で良好な治療成績を得る上で重要であると考ええる。大脳病変出現を早期に検出するために、非大脳型 ALD (AMN、Addison 病単独型、未発症)の前向きな follow-up 体制の整備が必要と考える。また、HSCT で良好な治療成績を得るために、症例及び家族(at risk 男性を含む)への HSCT を

含む詳細な臨床情報についての 遺伝カウンセリングが重要であると考え。

大脳型 ALD に対する HSCT における前処置について

前処置では、ブスルファン及びシクロフォスファミド、全リンパ節照射または、全身照射を行ったが、今回経験した 2 症例においては、ブスルファンの中枢神経障害は認められなかった。過去の成人例では、京都大学における症例においては、同様にブスルファン、シクロフォスファミド、全身リンパ節照射が行われている。また Royal Victoria Hospital, UK における症例では、ブスルファン、シクロフォスファミドが用いられていた(表 16)。

放射線照射については、全身リンパ節照射、または頭蓋遮蔽の全身照射によって、中枢神経毒性を減じることができている(表 16)。

表 16. HSCT が施行された思春期/成人大脳型 ALD 症例における前処置のまとめ

	症例1	症例2	Fizpatrick et al	Hitomi et al
Preparative regimen	BU 〔3.2mg/kg/day, 2 days〕	BU 〔3.2mg/kg/day, 2 days〕	BU	BU 〔4mg/kg/day, 2 days〕
	CY 〔60mg/kg/day, 2 days〕	CY 〔60mg/kg/day, 2 days〕	CY	CY 〔60mg/kg/day, 2 days〕
	TLI (7.5 Gy)	TBI (4 Gy) Brain shielding		TLI (7.5 Gy)

我々の症例 1, 2 においては、ブスルファンの中枢神経毒性は認められなかった。

BU: Busulphan, CY: Cyclophosphamide, TLI: Total lymphoid irradiation, TBI: Total

body irradiation

小児大脳型 ALD 症例における造血幹細胞移植では、中枢神経系への移行が良好なブスルファンは、進行期症例においては、痙攣などの副作用が生じ得るために、近年は用いられておらず¹²、厚生労働省の班研究のガイドラインでは、フルダラビン (25mg/m²/day x 5 days)、メルファラン (70mg/m²/day x 2 days)、全身照射 (4Gy/日 x 1day)、ATG (anti-T lymphocyte globulin) (1.25mg/kg/day x 4days) (ATG の投与は非血縁者間骨髄移植の場合のみであり、臍帯血移植ではウイルス感染の観点からその投与は好ましくないとされている)が、前処置として推奨されている⁷⁶。国内における小児大脳型 ALD に対するフルダラビン、メルファラン、低線量全身照射を前処置として用いた 18 例の報告では、全例で生存が確認されている⁵³。一方で、ブスルファンは近年は静注薬が主流となっており、前処置関連毒性は軽減されてきている。また、骨髄破壊的前処置(ブスルファン/シクロフォスファミド)で用いられる両の半分量のブスルファンを使用することで、中枢神経毒性を軽減させ、安全に造血幹細胞移植を施行することが可能となっている。

成人例においても、今後、中枢神経毒性の観点から、ブスルファン量の調整や、特に大脳症状の広がり大きい症例に関しては、フルダラビン、メルファラン、低線量全身照射による前処置も考慮に入れていくことが望ましいと考えられる。

大脳型 ALD に対する遺伝子治療について

さらに、近年小児大脳型 ALD 2 症例に対して、正常 *ABCD1* 遺伝子を導入した自己造血幹細胞移植により症状の進行停止を認めたことが報告されている^{13,77}。

複製欠損 HIV-1 ウイルス由来のレンチウイルスベクターを使用し、正常 *ABCD1* 遺伝子を血液幹細胞に導入し、患者に対して前処置を施した後、正常 *ABCD1* 遺伝子を導入した自己造血幹細胞の移植を行っている。造血幹細胞移植後それぞれの症例で、14、16 ヶ月後まで頭部 MRI 上病変の進行を認めたものの、その後病変の進行停止を認め、同種骨髄幹細胞移植と遜色ない治療であった。

正常 *ABCD1* 遺伝子を導入した自己造血幹細胞移植は、同種骨髄幹細胞移植を行う際に生じる GVHD が、小児に比べ高い確率で生じると考えられる成人大脳型 ALD に対しても、今後治療の選択肢の一つとして考慮されるべきと考える。

第五章 結語と今後の課題

本研究では、ALD 症例を対象にして、これまでと比較し、迅速な原因遺伝子 *ABCD1* の解析方法を確立し、さらには複雑な構造変化を来す *ABCD1* の遺伝子変異解析も可能とした。多彩な表現型に関わる表現型修飾因子を探索するために候補遺伝子として、*ABCD1* と相同性の高い、*ABCD2*、*ABCD3*、*ABCD4*、さらに、全エクソン解析を行うことで、候補遺伝子をペルオキシソームで機能するすべての遺伝子に候補を広げ、検出された variants と表現型との関連解析を行った。

また、小児大脳型 ALD においては、症状の進行停止に造血幹細胞移植が有効であることが知られているものの、これまで症状の進行停止に効果がある治療が存在しなかった思春期/成人大脳型 ALD に対して、造血幹細胞移植を適応した。

第二章で、我々が開発したマイクロアレイを用いたハイスループット遺伝子変異解析システムは、75 例すべての点突然変異、小欠失・挿入を同定でき、正確な診断方法であった。診断を行った ALD 症例の規模としては、日本において最も多い症例数である。このシステムは、造血幹細胞移植前の迅速な診断が必要な際等には、ALD 症例及び ALD の保因者に対する診断として、非常に有用であると考えられた。

第三章では、候補遺伝子をペルオキシソームで機能するすべての遺伝子に候補を広げ、検出された variants と表現型との関連解析を行った。エキソーム解析により、多数検出されるペルオキシソームで機能する遺伝子群の variants の中で、低頻度であるものの、比較的影響度の高い遺伝要因を検出するべく、既知の疾患関連変異、及び新規 variants、特にその中で、複数の遺伝子産物の機能予測アルゴリズムにおいて機能に多大な影響のあると予想される variants (deleterious variants) に注目し、表現型と variants との関連を探索した。その結果、deleterious variants を有する症例の比較においては、AMN 症例と比較して、大脳型 ALD において deleterious variants を有する症例が有意に多い結果となった。今回得られた結果が、人種を越えて同様に認められるかを確認するためには、他人種における独立した ALD コホートにおける検索が重要であると考ええる。

また、*PEX5* を含むペルオキシソームで機能する遺伝子群における variants が、ALD の表現型と関連するかのさらなる探索として、ノックアウトマウス (e. g. *ABCD1* 及び *PEX5* のダブルノックアウトマウス) や、培養細胞を使用した実験による解析も、今後必要と考える。

また、今回はペルオキシソームで機能するすべての遺伝子を ALD の表現型に関わる候補遺伝子としたが、ペルオキシソームの中で機能する遺伝子は、極長鎖脂肪酸に関わる遺伝子群、抗酸化作用を持つ遺伝子群など様々な遺伝子を有するこ

とから、候補遺伝子の選択方法として、極長鎖脂肪酸に関わる遺伝子群のみを選択した場合で、**deleterious variants** の頻度を表現型毎に比較することも重要と考える。また、大脳型 ALD においては、大脳白質において、**T-cell** の浸潤を伴う炎症性脱髄を来していることから、炎症に関わる遺伝子群や、**HLA** と表現型との関連解析も今後重要と考えられる。

また、発症頻度が、出生男児 30,000-5,000 人に 1 人と希少疾患であるために、今後は、小児科、神経内科、血液内科、内分泌内科に跨る全国の病院との協力体制による、症例の蓄積が重要と考える。

現在のところ、早期の大脳型 ALD に対する骨髄造血幹細胞移植のみが唯一症状の進行停止に有効な治療であること、さらに、骨髄造血幹細胞移植を試みる前に進行期になり、骨髄造血幹細胞のタイミングを逸してしまう症例が多く存在することを考えると、発症前から表現型に関わる修飾因子を検索することで、予め患者の大脳型を発症するリスクを予想し、頭部 **MRI** を含めた経過観察、大脳症状が認められた場合には、早期の造血幹細胞移植を行うことが可能になると考える。さらには表現型に関わる修飾因子に着目した新たな治療の試みも可能になると考える。

第四章では、これまで症状の進行停止に効果がある治療が存在しなかった思春期/成人大脳型 ALD に対して、造血幹細胞移植を適応し、安全に施行することが

可能であり、症状の進行停止に有効であることを示した。成人例に対して造血幹細胞移植を行うにあたっては、小児大脳型に対する HSCT と同様に、発症早期に大脳型 ALD の診断を行うことが、HSCT で良好な治療成績を得る上で重要であると考え。そのためには、大脳病変出現を早期に検出するために、非大脳型 ALD (AMN、Addison 単独型、未発症男性)の前向きな follow-up 体制、診断システムの整備が必要と考える。また、HSCT で良好な治療成績を得るために、前処置、GVHD 予防法の最適化、症例及び家族(at risk 男性を含む)への HSCT を含む詳細な臨床情報についての遺伝カウンセリングが重要であると考え。さらには、発症初期の小児大脳型 ALD の症状進行停止への有効性が示された正常 *ABCD1* 遺伝子を導入した自己造血幹細胞移植は、同種骨髄幹細胞移植を行う際に合併症である GVHD が小児に比べて、高率に生じると考えられる成人大脳型 ALD に対しても治療の選択肢の一つとして今後考慮されるべきものと考え。

謝辞

本稿を終えるにあたり、東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科教室 辻 省次 教授、後藤 順 准教授、山本 知孝 講師、市川 弥生子助教、高橋 祐二助教、三井 准特任助教、石浦 浩之助教、伊達 英俊特任助教、Budrul Ahsan 特任研究員、東京大学大学院新領域創成科学研究科情報生命科学専攻バイオ情報科学大講座バイオデータベース分野森下研究室 森下真一教授、土井晃一郎特任講師、吉村淳特任助教、東京大学大学院医学系研究科内科学専攻血液・腫瘍内科 黒川峰 夫教授、篠原 明仁特任講師、市川 幹講師、高橋 強志講師、南谷 泰仁講師をはじめとする教室員各位の皆様に深謝申し上げます。

貴重な検体を御提供下さりました新潟大学 西澤 正豊先生、小野寺 理先生、高野 弘基先生、小池 亮子先生、岐阜大学 鈴木 康之先生、下澤 伸行先生、慶応大学 末岡 浩先生を初め多くのご担当の先生方に深謝申し上げます。

実験の補助をして下さった呉 政宏様、竹山 未央様、平山圭子さまに深謝申し上げます。

参考文献

1. Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, et al. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 361:726-730, 1993
2. Krasemann EW, Meier V, Korenke GC, et al. Identification of mutations in the ALD-gene of 20 families with adrenoleukodystrophy/adrenomyeloneuropathy. *Hum Genet* 97:194-197, 1996
3. Takano H, Koike R, Onodera O, Sasaki R, Tsuji S. Mutational analysis and genotype-phenotype correlation of 29 unrelated Japanese patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Arch Neurol* 56:295-300, 1999
4. Kok F, Neumann S, Sarde CO, et al. Mutational analysis of patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mutat* 6:104-115, 1995
5. Ligtenberg MJ, Kemp S, Sarde CO, et al. Spectrum of mutations in the gene encoding the adrenoleukodystrophy protein. *Am J Hum Genet* 56:44-50, 1995
6. Matsukawa T, Asheuer M, Takahashi Y, et al. Identification of novel SNPs of ABCD1, ABCD2, ABCD3, and ABCD4 genes in patients with X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) based on comprehensive resequencing and association studies with ALD phenotypes. *Neurogenetics* 12:41-50, 2011

7. Aubourg P, Blanche S, Jambaqué I, et al. Reversal of early neurologic and neuroradiologic manifestations of X-linked adrenoleukodystrophy by bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 322:1860-1866, 1990
8. Malm G, Ringden O, Anvret M, et al. Treatment of adrenoleukodystrophy with bone marrow transplantation. *Acta Paediatr* 86:484-492, 1997
9. Shapiro E, Krivit W, Lockman L, et al. Long-term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Lancet* 356:713-718, 2000
10. Suzuki Y, Takemoto Y, Shimozawa N, et al. Natural history of X-linked adrenoleukodystrophy in Japan. *Brain Dev* 27:353-357, 2005
11. Takemoto Y, Suzuki Y, Tamakoshi A, et al. Epidemiology of X-linked adrenoleukodystrophy in Japan. *J Hum Genet* 47:590-593, 2002
12. Moser HW, Mahmood A, Raymond GV. X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Clin Pract Neurol* 3: 140-151, 2007
13. X-linked Adrenoleukodystrophy Database:<http://www.x-ald.nl>
14. Bezman L, Moser AB, Raymond GV, et al. Adrenoleukodystrophy: incidence, new mutation rate, and results of extended family screening. *Ann Neurol* 49:512-517, 2001

15. Moser HW. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain* 120:1485-1508, 1997
16. Jorge P, Brites P, Nogueira A, et al. Mutational analysis of an X-linked adrenoleukodystrophy (ALD) patient with detectable ALD protein. *Ann N Y Acad Sci.* 804:756-759, 1996
17. van Geel BM, Assies J, Weverling GJ, et al. Predominance of the adrenomyeloneuropathy phenotype of X-linked adrenoleukodystrophy in The Netherlands: a survey of 30 kindreds. *Neurology.* 44:2343-2346, 1994
18. Kirk EP, Fletcher JM, Sharp P, et al. X-linked adrenoleukodystrophy: the Australasian experience. *Am J Med Genet.* 1998 Apr 13;76(5):420-423, 1998
19. Di Biase A, Salvati S, Avellino C, et al. X-linked adrenoleukodystrophy: first report of the Italian Study Group. *Ital J Neurol Sci.* 19:315-319, 1998
20. Coll MJ, Palau N, Camps C, et al. X-linked adrenoleukodystrophy in Spain. Identification of 26 novel mutations in the ABCD1 gene in 80 patients. Improvement of genetic counseling in 162 relative females. *Clin Genet* 67:418-424, 2005
21. Jardim LB, da Silva AC, Blank D, et al. X-linked adrenoleukodystrophy: clinical course and minimal incidence in South Brazil. *Brain Dev* 32:180-90, 2010

22. Horn MA, Retterstøl L, Abdelnoor M, et al. Adrenoleukodystrophy in Norway: high rate of de novo mutations and age-dependent penetrance. *Pediatr Neurol* 48:212-9, 2013
23. Liu LX, Janvier K, Berteaux-Lecellier V, et al. Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *J Biol Chem* 274:32738-32743, 1999
24. Kobayashi T, Shinnoh N, Kondo A, et al. Adrenoleukodystrophy protein-deficient mice represent abnormality of very long chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 27:631-636, 1997
25. Pujol A, Hindelang C, Callizot N, et al. Late onset neurological phenotype of the X-ALD gene inactivation in mice: a mouse model for adrenomyeloneuropathy. *Hum Mol Genet* 11:499-505, 2002
26. Kassmann CM, Lappe-Siefke C, Baes M, et al. Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nat Genet* 39:969-976, 2007
27. Tsuji S, Suzuki M, Ariga T, et al. Abnormality of long-chain fatty acids in erythrocyte membrane sphingomyelin from patients with adrenoleukodystrophy. *J Neurochem* 36:1046-1049, 1981
28. Nakazato T, Sato T, Nakamura T, et al. Adrenoleukodystrophy presenting as

- spinocerebellar degeneration. *Eur Neurol* 29:229-234, 1989
29. Moser HW, Moser AB, Frayer KK, Adrenoleukodystrophy: increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology* 31:1241-1249, 1981
 30. Moser AB, Kreiter N, Bezman L, et al. Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *Ann Neurol* 45:100-110, 1999
 31. Moser HW, Tutschka PJ, Brown FR 3rd, et al. Bone marrow transplant in adrenoleukodystrophy. *Neurology* 34:1410-1417, 1984
 32. Peters C, Charnas LR, Tan Y, et al. Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood* 104:881-8, 2004
 33. Miller WP, Rothman SM, Nascene D, et al. Outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for childhood cerebraladrenoleukodystrophy: the largest single-institution cohort report. *Blood* 118:1971-8, 2011
 34. 加藤俊一. 副腎白質ジストロフィーにおける造血幹細胞移植. *BRAIN and NERVE* 59:339-346, 2007
 35. Berger J, Molzer B, Fae I, Bernheimer H. X-linked adrenoleukodystrophy (ALD): a novel mutation of the ALD gene in 6 members of a family presenting with 5 different phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1638-1643, 1994

36. Semmler A, Bao X, Cao G, et al. Genetic variants of methionine metabolism and X-ALD phenotype generation: results of a new study sample. *J Neurol* 256:1277-1280, 2009
37. Brose RD, Avramopoulos D, Smith KD. SOD2 as a potential modifier of X-linked adrenoleukodystrophy clinical phenotypes. *J Neurol* 259:1440-7, 2012
38. Barbier M, Sabbagh A, Kasper E, et al. CD1 gene polymorphisms and phenotypic variability in X-linked adrenoleukodystrophy. *PLoS One* 7:e29872, 2012
39. Takahashi Y, Seki N, Ishiura H, et al. Development of a high-throughput microarray-based resequencing system for neurological disorders and its application to molecular genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 65:1326-1332, 2008
40. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 14:178-192, 2013
41. Shimozawa N, Honda A, Kajiwara N, et al. X-linked adrenoleukodystrophy: diagnostic and follow-up system in Japan. *J Hum Genet* 56:106-109, 2011
42. Matsumoto T, Tsuru A, Amamoto N, et al. Mutation analysis of the ALD gene in seven Japanese families with X-linked adrenoleukodystrophy. *J Hum Genet*

48:125-129, 2003

43. Hillebrand M, Verrier SE, Ohlenbusch A, et al. Live cell FRET microscopy: homo- and heterodimerization of two human peroxisomal ABC transporters, the adrenoleukodystrophy protein (ALDP, ABCD1) and PMP70 (ABCD3). *J Biol Chem* 282:26997-27005, 2007
44. Tanaka AR, Tanabe K, Morita M, et al. ATP binding/hydrolysis by and phosphorylation of peroxisomal ATP-binding cassette proteins PMP70 (*ABCD3*) and adrenoleukodystrophy protein (*ABCD1*). *J Biol Chem* 277:40142-40147, 2002
45. Burrows M, Wheeler DJ. Technical report 124. Palo Alto, CA: Digital Equipment Corporation; 1994. A block-sorting lossless data compression algorithm.
46. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754-1760, 2009
47. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078-2079, 2009
48. Schlüter A, Real-Chicharro A, Gabaldón T, et al. PeroxisomeDB 2.0: an integrative view of the global peroxisomal metabolome. *Nucleic Acids Res* 38:D800-805, 2010
49. <http://www.peroxisomekb.nl/>
50. <http://www.geneontology.org/>

51. Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP: a lightweight database of human nonsynonymous SNPs and their functional predictions. *Hum Mutat* 32:894-899, 2011
52. Barrett JC, Fry B, Maller J, et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263-265, 2005
53. McCarthy MI, Hirschhorn JN. Genome-wide association studies: potential next steps on a genetic journey. *Hum Mol Genet* 17:R156-65, 2008
54. Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 41:1303-1307, 2009
55. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461:747-753, 2009
56. Visscher PM. Sizing up human height variation. *Nat Genet.* 40:489-490, 2008
57. Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, et al. Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol* 66:571-576, 2009
58. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 361:1651-1661, 2009
59. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, et al. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N*

Engl J Med 368:117-27, 2013

60. 辻 省次. ゲノム医学の展望 実験医学 Vol. 31 134-141, 2013
61. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science 13:921-923, 1993
62. Yoshizawa T, Yamakawa-Kobayashi K, Komatsuzaki Y, et al. Dose-dependent association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset, sporadic Alzheimer's disease. Ann Neurol 36:656-659
63. Dai XY, Nanko S, Hattori M, et al. Association of apolipoprotein E4 with sporadic Alzheimer's disease is more pronounced in early onset type. Neurosci Lett 175:74-76, 1994
64. Ueki A, Kawano M, Namba Y, et al. A high frequency of apolipoprotein E4 isoprotein in Japanese patients with late-onset nonfamilial Alzheimer's disease. Neurosci Lett 163:166-168, 1993
65. Okuizumi K, Onodera O, Tanaka H, et al. ApoE-epsilon 4 and early-onset Alzheimer's. Nat Genet 7:10-11, 1994
66. 奥泉 薫, 辻 省次. アルツハイマー病危険因子としてのアポリポ蛋白質 E とその受容体の分子遺伝学. 蛋白質核酸酵素 41:1460-1464, 1996

67. Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med* 369:233-244, 2013
68. Eichler FS, Ren JQ, Cossoy M, Rietsch AM, Naqpal S, Moser AB, Frosch MP, Ransohoff RM Is microglial apoptosis an early pathogenic change in cerebral X-linked adrenoleukodystrophy? *Ann Neurol* 63:729-742, 2008
69. Loes DJ, Hite S, Moser H, et al. Adrenoleukodystrophy: a scoring method for brain MR observations. *AJNR Am J Neuroradiol* 15:1761-1766, 1994
70. 加藤剛二. ALD に対する造血幹細胞移植ガイドライン. 副腎白質ジストロフィーハンドブック 2013 p.33-37.
71. Berger J, Gärtner J. X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenetic aspects. *Biochim Biophys Acta.* 1763:1721-1732, 2006
72. 松川敬志, 辻省次. 成人領域. 副腎白質ジストロフィーハンドブック 2013 p.30-31.
73. 辻井和美ら. 同種骨髄移植後早期に神経症状の改善を認めた adolescent adrenoleukodystrophy の 1 例. *臨床神経* 667-672, 2004
74. Hitomi T, Mezaki T, Tomimoto H, et al. Long term effect of bone marrow transplantation in adult-onset adrenoleukodystrophy. *Eur J Neurol* 12: 807-10, 2005
75. Fitzpatrick AS, Loughrey CM, Johnston P, et al. Haematopoietic stem-cell transplant for adult cerebral adrenoleukodystrophy. *Eur J Neurol* 15: e21-22, 2008

76. <http://www.japan-isd-mhlw.jp/ALD/pdf/zoketsu.pdf>

77. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC, et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy *Science* 326: 818-823, 2009

付表1: *ABCD1* primer pair

Exon	Primer	Primer length (bp)	Amplicon size (bp)
Exon1F	5'-TGACAGGACAGGAGAGCCAAGTTC	24	1547
Exon1R	5'- AACCGCTAGGATCGCAGCTCTAAG	24	
Exon2F	5'- TACACCTTGAGTTTGAGACCTGGC	24	640
Exon2R	5'- AGGGTATCTGTGCCTGGAGAAGTG	24	
Exon3F	5'- CTGGGTTGGTTTGTCTGTATGGTG	24	847
Exon4R	5'- GCAGCTACTGTCTGGGAAGGAAGG	24	
Exon5F	5'- GGAAGAGTTCAGCTTGTGGGAAGACC	26	438
Exon5R	5'- TCAGAGACACGTTGGTCTCTCACC	24	
Exon6F	5'- CTACTCATTCAGCTGTGGCAGAATAGG	27	2181
Exon7R	5'- AGGCCAAACACAGCAGAGTGACC	23	
Exon8F	5'- CCATAAACCGCAGGGATGGATTG	23	1636
Exon10R	5'- GACTCGAGTCTCTGGAGGGAGG	22	

付表 2: *ABCD2* primer pair

Exon	Primer	Primer length (bp)	Amplicon size (bp)
Exon1F	5'- GCGGGTTTCTAAGTGACATTGAGC	24	1616
Exon1R	5'- AGGACAACAGATGGTATCTGGCAC	24	
Exon2F	5'- GAAGATGGCATGTCAATCACCAAG	24	1030
Exon2R	5'- AGCTCAGAACTGGGAACGTCTTTG	24	
Exon3F	5'- ACATTATTGCTCCCTCCTAAGGGC	24	1440
Exon3R	5'- GTGTGATGCAGGCAATATACACAGC	25	
Exon4F	5'- AGGAACAAGGCACCATTCCATTGAG	25	2552
Exon5R	5'- TTTACCCTGTTCAATGCTACTCATCC	26	
Exon6F	5'- AAATTAACAGCCCAGCTGACTCC	24	1399
Exon6R	5'- CTATACTTCCAGCCTAGGCGCTTG	24	
Exon7F	5'- TTAGGAGGAATCACTTGAGGCAGG	24	779
Exon7R	5'- TGGCCTCAGGGACTTTGTACATTC	24	
Exon8F	5'- TTTCTCCCATCTCCCTCCAAGATAAG	26	482
Exon8R	5'- TTGTTGTTCTATTGTTGCTTGGTTTG	27	
Exon9F	5'-AATTGTTAGCAATGCAACTCATATTGTCC	29	972
Exon9R	5'- TTCCTTATAATGAGAGCCGTGTGCTG	26	
Exon10F	5'- TGCAGAAGAACTCATTCCCAAAGG	24	997
Exon10R	5'- TGCCCATGTTTGTAAAGAACTTCAG	25	

附表 3: *ABCD3* primer pair

Exon	Primer	Primer length (bp)	Amplicon size (bp)
Exon1F	5'- GGCCAAAGTACAAAGTGGGC	20	540
Exon1R	5'- CGCGGGCACAGAAGAATTCC	20	
Exon2F	5'- TGCCTAGTAAGAGTCAGGTGGAC	23	413
Exon2R	5'- ACTAATGCAGTTAATGCTGCCTC	23	
Exon3F	5'- GAGGAGCAGTGTAAGTATGCAAG	23	394
Exon3R	5'- AAGTGGAGGAGATGCTGTGC	20	
Exon4F	5'- AAATGTCAGCCAATATATTGAAAC	25	389
Exon4R	5'- GGCACATGGGAAACACTAAG	20	
Exon5F	5'- ATTTGCAGGATGAGGTTCCAG	21	2290
Exon7R	5'- ATTTACATGCTGCTGTTATGTCC	23	
Exon8F	5'- CAGTAGACATTGTGTAAGCTGTTCC	25	378
Exon8R	5'- AAATTCTTACAGGCCATCAAGC	22	
Exon9F	5'- GCAATTTCTTTCAGTCATTGAGG	23	484
Exon9R	5'- AAGGTATGAACAGGTGAATCAGG	23	
Exon10F	5'- TGAGCTAGGAACAGAATCTCAGG	23	330
Exon10R	5'- GTGTGTATGTGTGTCGGCCATAG	23	
Exon11F	5'- ATATAAACAGAAATCACGGGCAC	24	685
Exon13R	5'- CTGGGCTAGGAAATGTTGACC	21	
Exon14F	5'- TTCATCCCTATATTCCTGCTCTC	23	1822
Exon16R	5'- GAGACTAAGTCGAGCCTTAAAGTTAC	26	
Exon17F	5'- CCTCTTCACTGCTCTACCTAATGC	24	1292
Exon20R	5'- TTAAACTAATCCATACTGAAACAGC	26	
Exon21F	5'- TTAAACATAAGTTTGTTCGGCTTAC	26	272
Exon21R	5'- GACCTGGAATCTTCTCTTTGGAC	23	
Exon22F	5'- TGGCCAGTACTTTCCATTGC	20	2487
Exon23R	5'- GCTGACTTCGAATGGTTTACATC	23	

附表 4: *ABCD4* primer pair

Exon	Primer	Primer length (bp)	Amplicon size (bp)
Exon1F	5'- CCCTCCTCGGACTCTACCC	19	175
Exon1R	5'- CAGGAAAGCCCATTCCTAC	20	
Exon2F	5'- AACTACTCCCTAAGGCTTAATTATTG	26	243
Exon2R	5'- ATGGAAAGGGACCCCAAAC	19	
Exon3F	5'-GACTCAGGAAGAAGCCTCCC	20	255
Exon3R	5'- TTACGGTCACACTGGACTGG	20	
Exon4F	5'- GCCTTGAGCTTTGAGCTGAG	20	266
Exon4R	5'- TAGGCCAGAAGGAAAGGACC	20	
Exon5F	5'- TCTTGTCTCTCTACCTTTGGG	22	249
Exon5R	5'- CTTGACCTGGGAGAGCTGAC	20	
Exon6F	5'- CATGTGGGGATAGGTGGC	18	248
Exon6R	5'- GCAGTTTTACTCCAGATCCCC	21	
Exon7F	5'- CAAGAGTGAGGCCAGTACTCC	21	183
Exon7R	5'-GGGTTGAGGATTCATCTTTCC	21	
Exon8F	5'- GTGTGATATGGGACAGGCG	19	232
Exon8R	5'- GAAGGGAAGCAGACCAGTCC	20	
Exon9F	5'- TTAGGGTTGTGTCCGCTGTAG	21	456
Exon10R	5'- TTCACTCAGCCACTTCTGC	20	
Exon11F	5'- GTGTGTGCTGCTGGCAGAAG	20	447
Exon11R	5'- TGTGTACTTTGCTTCCACTGGC	22	
Exon12F	5'- CCCACAGCAATACTGACCC	19	609
Exon13R	5'- TTGTCACAGTGCCAGAGGTC	20	
Exon14F	5'- GCAGCTCCGTCTTTTGCTC	20	155
Exon14R	5'- CAGGTAGAGCAGGGACAACC	20	
Exon15F	5'- TATTTTGACCAGCCAGGAGG	20	165
Exon15R	5'- TACCTGTAGCTGGTGCTCCC	20	
Exon16F	5'- CCCATGATGGCAGGTAGC	18	571
Exon17R	5'- CTACACCCGTGAGTGCAGAC	20	
Exon18F	5'- GTATGGGTGGGAGGAGAAGC	20	511
Exon19R	5'- ATCTTCGCTGTCAGTCCTCC	20	