

とも安価な遺伝学的検査ともいわれる。

小奇形を考える際の間診でのポイントを表2にまとめた。精神遅滞を特徴とする男児例ではX連鎖性の遺伝性疾患(母方家系の家族歴)を、また、必ずしもメンデル遺伝に従わない家族内再発では染色体転座などを念頭に置く。出生時の身体計測やその後の成長記録を成長曲線上に記録し、発達歴を確認することは必須である。

家族歴聴取での注意点の第1は、静かでプライバシーが保てる部屋で診療をすることである。多発奇形あるいは遺伝性に関する詳細な質問は、家族にとって必ずしも答えやすい内容ではない。診察室の構成(椅子の座り心地や担当医との距離、部屋の広さなど)は考慮すべきである。診察の前の間診の間、患児やきょうだいの面倒をみるスタッフも必要となることがある。第2は、話しやすい雰囲気を保つことである。全部ではないにしても、病歴に関する親からの話に静かに耳を傾けることも、ある程度必要となる。また、患児を名前で呼ぶことも話しやすい雰囲気をつくりだす。

## 先天異常の出生と親の心理反応

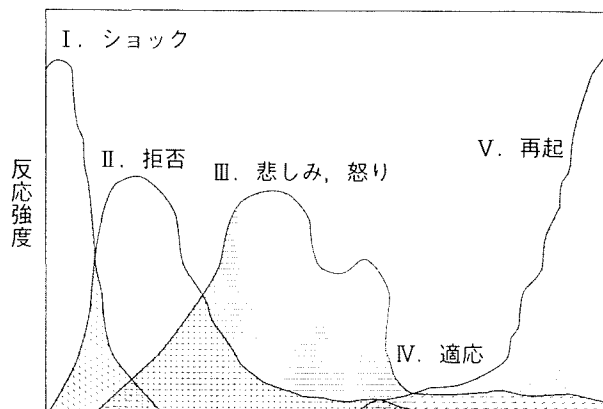
先天異常をもった児の出生は、親に大きな衝撃をもたらす。診断告知や病状経過説明は、こうした親の心理過程を十分配慮しなければならない。とくに初期の医療サイドの対応は親に強い印象を与え、その後の児の受容にも影響をもたらすことになる。

説明として、所見をそのまま親に伝えることは慎むべきであろう。告知は臨床遺伝専門医やカウンセラーとともに慎重に進める必要がある。ダウン症候群など染色体異常症では、検査結果がまとまりしだい、早期の告知が重要である。そして両親が揃ったときに、経験ある医師からの説明が必要である。

先天異常児を出産した親のたどる心理、情動の変化はDrotarらにより報告されている(図2)<sup>3)</sup>。

## 定期医療管理の重要性

診断を下すことだけが目的ではなく、診断を確定させ



Drotar D, Baskiewicz A, Irvin N, et al : The adaptation of parents to the birth of an infant with a congenital malformation : A hypothetical model. Pediatrics 56 : 710-717, 1975. より引用。

図2 情動の変化

ることにより、親の理解を促し、得られる情報を合併症管理に役立て、さらに遺伝カウンセリング(次子再発危険率の評価)に応用することが重要であることは最初に述べた。その際に、参考となるのはCassidyらによる『Management of Genetic Syndromes』である。自然歴に基づいた医療管理のポイントが網羅されている。また、GeneReviews (<http://www.geneclinics.org>)にも管理の要約がある。

## 文献

- 1) Moore KL, Persaud TVN : Human birth defects. The Developing Human, 6th ed. WB Saunders, Philadelphia, 1998. pp 167-200.
- 2) Epstein CJ, Erickson RP, Wynshaw-Boris A, ed : Inborn error of development. The molecular basis of clinical disorders of morphogenesis, 2nd ed. Oxford University Press, 2008.
- 3) Drotar D, Baskiewicz A, Irvin N, et al : The adaptation of parents to the birth of an infant with a congenital malformation : A hypothetical model. Pediatrics 56 : 710-717, 1975.
- 4) Cassidy S, Allanson J : Management of Genetic Syndromes, 2nd ed. Wiley-Liss, New York, 2005.

# 遺伝学的検査 アップデート

岡本伸彦\* (おかもとのぶひこ)

\*大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科

## 要旨

遺伝子診断などの遺伝学的検査は技術面で大きく進歩し、臨床現場での重要性も高まっている。遺伝子診断が可能な疾患の種類も増加した。マイクロアレイでは従来の顕微鏡下の検査では同定できない染色体異常が同定されるようになった。遺伝学的検査では、確定診断や病態の把握が可能になるとともに、家系の中の未発症者や保因者の診断が可能になる場合もある。そのため、実施にあたっては、適切な遺伝カウンセリングが必要である。遺伝子レベルでの病態解明から治療法開発にいたる可能性もあり、遺伝学的検査の有効な活用は今後の医学の大きな課題である。

Key words : 遺伝子診断, サブテロメア異常, 染色体検査, マイクロアレイ, MLPA 法

## はじめに

遺伝学的検査には、染色体検査、遺伝子診断、遺伝生化学検査などが含まれる。多くの疾患で責任遺伝子が解明され、遺伝子診断が可能な疾患数が増加している。技術面でも大きな進歩があり、従来の方法では困難であった解析も効率的に行われるようになった。しかし、一般的な臨床検査と異なり、遺伝学的検査の実施にあたって倫理面の配慮や遺伝カウンセリング体制などが求められる。本稿では、小児の遺伝性疾患の場合を中心に、遺伝学的検査に関する必要事項および最近の遺伝学的検査の進歩を中心に記載する。病原微生物に関する遺伝学的検査や腫瘍細胞の体細胞変異を調べる検査、多因子性疾患などはここではふれない。

## I 遺伝学的検査の種類

遺伝学的検査には多くの種類がある(図1)。それぞれの疾患、遺伝子情報、採取された検体などに基づき適切な診断法が選択される。数 Mb 以上の大きな領域を調べるのは染色体検査であり、1 bp の変化を調べるには、シーケン

スや DNA チップなどがある。それらの中間の大きさの検索には、過去にはサザンプロット法がよく用いられたが、最近ではアレイ CGH や MLPA 法などの新しい検査が汎用されている。また、病因となる変異遺伝子を直接検出できる場合と間接的に DNA 多型を利用して診断する場合がある。

検体は末梢血リンパ球が用いられることが多いが、目的によって、皮膚線維芽細胞、生検組織、頬粘膜細胞、毛根細胞などが利用される。出生前診断では、絨毛細胞や羊水細胞、母体血中の胎児由来細胞・DNA などが用いられる。着床前診断では受精卵の一部の細胞を採取して調べ、異常のない卵を子宮に戻す<sup>1)</sup>。遺伝子解析では、ゲノム DNA による解析と mRNA から逆転写酵素で cDNA を得て解析する場合もある。エクソン数の多い疾患で、mRNA が得られるのならば、RT-PCR による解析が効率的であろう。遺伝子解析は鑑別診断目的に安易に実施するものでなく、的確な臨床診断で標的を絞って解析を行うべきである。

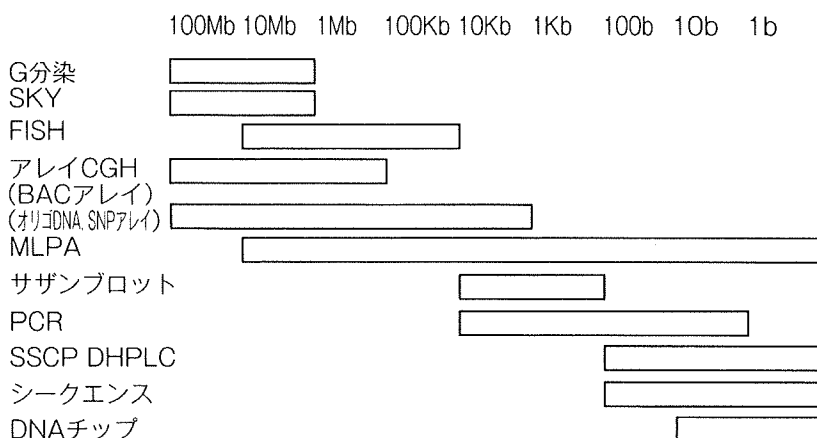


図1 染色体・遺伝子の変異の大きさと検出方法の対応

ゲノム全体では、3,000 Mb (22本の常染色体とX/Yの合計)となる。したがって、450バンドレベルの染色体検査では1バンドの幅が平均約7Mbとなる。

## II 遺伝カウンセリングと倫理

遺伝学的検査ではインフォームド・コンセントが重要である。後述する検査の目的・方法および精度、診断限界などについて情報提供を行う。遺伝学的検査は対象となる患者以外の家族にも結果が波及する可能性があること、検査にはメリット以外にデメリットもあること、検査を受けるか受けないかは患者側が決めるものであること、結果を知らせてほしくないという選択肢もあること、検査の同意は後日撤回可能なこと、などを伝える。解析結果は、十分な遺伝学的検査の知識をもち、対象疾患の予後や自然歴にも精通した専門家が判断する必要がある。染色体検査の結果のコピーのみを患者に渡し、「自分で調べなさい」といって済ますようなことはあってはならない。判断が難しい場合は専門家にコンサルトする。

遺伝性疾患に対する理解を支援し、不安を除くために遺伝カウンセリングを実施する。遺伝カウンセリングは、臨床遺伝専門医（日本人類遺伝学会、日本遺伝カウンセリング学会の専門医）ないし臨床遺伝の経験豊富な医師、あるい

は認定遺伝カウンセラーが行う。クライアントの心理面の配慮、フォロー体制が必要である。遺伝学的検査を多数実施する医療機関では、多職種がかかわる独立した遺伝診療部門の設置や非医師の遺伝カウンセラーの雇用が望まれる。

Huntington 舞踏病の発症前診断など、精神的リスクが生じる可能性が高い場合、複数回のカウンセリングなど慎重な対応が望ましい。クライアントの状態によっては、遺伝子診断をしない、あるいはすべきでない場合もある。また、治療法または予防法が確立されていない成人期以後に発症する遺伝性疾患について、小児期に遺伝学的検査を行うのは基本的に避ける。本人が理解できるようになってから、了解のもとに実施すべきである。

遺伝子解析で得られた個人情報や直接カウンセリング担当者の守秘義務によって管理され、本人以外に伝えてはならない。低年齢児や理解能力に問題がある場合は、保護者や代理人に伝えることも可能である。ただし、本人の同意が得られた場合、もしくは同意が得られなくても、情報を伝えることで特定の個人が重大な被害を受けることを防止でき、その必要性が判断された場合は守秘義務は解かれる。その判断は倫理

委員会などに委ねる。

遺伝学的検査にかかわる主な倫理指針・ガイドラインが定められている<sup>2)</sup>。次に主なものを示すが、詳細は、京都大学遺伝子診療部の運営する「いでんネット（臨床遺伝医学情報網）」、信州大学医学部の GENOTOPIA、厚生労働省ホームページなどで参照可能である。

① ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（文部科学省・厚生労働省・経済産業省合同）平成13年3月29日、平成16年12月28日全面改正、平成17年6月29日一部改正

② 個人情報の保護に関する法律 平成15年5月30日法律第57号

③ 遺伝学的検査に関するガイドライン 平成15年8月 遺伝医学関連学会

④ ヒト遺伝子検査受託に関する倫理指針 日本衛生検査所協会 平成16年9月16日改訂版

⑤ 疫学研究に関する倫理指針 平成19年8月16日全部改正

⑥ 遺伝子治療臨床研究に関する指針 平成16年12月28日告示改定

⑦ 臨床研究に関する倫理指針 平成20年7月31日全部改正

⑧ 医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン 厚生労働省 平成16年12月24日通達、平成18年4月21日改正

### III 遺伝学的検査の費用や実施機関

染色体検査（G分染法やFISH法など）は以前から健康保険に収載されている。遺伝子診断も保険収載されるものが増えており、検査会社が一定の精度管理のもとに実施している。2006年には進行性筋ジストロフィー（Duchenne型、Becker型、福山型）が実施料2,000点で収載された。2008年には、栄養障害型表皮水疱症、家族性アミロイドーシス、遺伝性QT延長症候

群、ライソゾーム病の一部（ムコ多糖症I型、III型、Gaucher病、Fabry病、Pompe病：酵素補充療法の関連）、脊髄性筋萎縮症、中枢神経白質形成異常症が加わった。さらに、2008年の診療報酬改定では、十分な経験を有する常勤医師が遺伝カウンセリングを行った場合、患者1人につき、月1回、500点の加算が認められた。ただし、「遺伝学的検査に関するガイドライン」に従い、遺伝カウンセリングを総合的に実施する体制の存在が必要である。

現状では多くの遺伝子診断は健康保険収載がなく、収載されている検査でも実際の費用より低く抑えられており、採算が合わないのが現状である。例えば、進行性筋ジストロフィーのジストロフィンの欠失のMLPA法による解析は、エクソン単位の欠失までの検索が限界であり、点変異は検出できない。その他の疾患においてもシーケンス解析を含む遺伝学的検査は、大学などの研究機関、検査会社が一定の条件下で実施している。研究的な解析の場合、研究終了とともに解析も終了する 경우가少なくない。解析には多額の費用、マンパワーを要する。結果報告までに数カ月以上要する場合もある。論文として報告する価値のなくなった解析の継続は研究機関にとっては負担となる。解析費用も研究機関の持ち出しになる場合もある。こうした現状を把握していない依頼者が除外診断目的に気軽な態度で解析を依頼する場合もあり、問題である。今後は一定の受益者負担がなければ、遺伝学的検査は行き詰まりを迎えることになり、体制の整備は急務である。

欧米では有料で解析を行う研究機関のネットワークが存在する。解析費用は数万円から数十万円である。GENDIA (<http://www.gendia.net>) は、米国、ヨーロッパ、オーストラリアの50以上の研究機関の国際ネットワークである。2,000種類以上の各種遺伝学的検査を提供している。GENDIAは、検査依頼元の機関と検査実施機関の仲介を行う。依頼元の検査実施機関

の検索、費用の送金などの煩雑な手続きを GENDIA が代行することになる。

先述の「いでんネット」のホームページには、国内の遺伝学的検査のオンラインデータベースがある。稀少疾患については、特定非営利活動法人のオーファンネット・ジャパン (Orphan Net Japan : ONJ <http://www.onj.jp/>) が 2007 年に活動をはじめた<sup>3)</sup>。ONJ は、一般市民および医療関係者に対して、稀少疾患に対する遺伝子診療の普及、ネットワークの整備、提供、開発、育成支援に関する事業を行い、遺伝子診療を通じて国民の健康増進に広く寄与することを目的とする。遺伝子診療関連技術の標準化および精度向上事業や遺伝子診療に関する社会啓発事業も課題である。今後の発展が期待される。

## IV 遺伝学的検査の各論

### 1. 染色体検査

遺伝学的検査でもっとも以前からよく利用されているものは、G 分染法などによる染色体検査である。不均衡転座の場合、両親の検査が必要な場合がある。G 分染法では、400~850 本のバンドが得られるが、数 Mb のレベルの解像度が限界である。細かく調べる場合に高精度分染法も用いられる。

FISH 法は染色体の目的の領域が特定される場合に用いられる。比較的早く診断結果が得られる。染色体微細欠失による症候群 (隣接遺伝子症候群) は G 分染法で異常がなくても FISH 法で欠失が同定される。Prader-Willi 症候群、Angelman 症候群、Williams 症候群、22q11.2 欠失症候群、Smith-Magenis 症候群などがある。欠失だけでなく、22q11.2 重複症候群のような、微細重複による症候群が注目されている。重複の場合、間期核による観察が必要である。1Mb 程度の微細欠失でも検出可能である。

SKY 法は蛍光色素の組み合わせで染色体を

色分けする方法である。由来不明の転座部位の同定などに有用である。

現行の健康保険制度では、染色体検査はある患者では同一月に 1 件のみが点数を認められる。例えば、G 分染法と FISH 法を同一月に提出すると、一方の点数は認められない。また、新生児で Down 症候群を疑った場合、FISH 法でトリソミーの確認しか行っていない例があるが、これでは正確な核型はわからず、別途 G 分染法も実施する必要がある。

### 2. サブテロメア異常

サブテロメア異常症が注目されている。G 分染法では異常が見出せないが、サブテロメアプローブを用いた FISH 法や MLPA 法などで同定される。サブテロメア領域には重要な遺伝子が多く存在し、欠失や重複その他の構造異常により多発先天異常や精神発達遅滞を生じる。原因不明の多発先天異常症候群の 2.5~数% はサブテロメア異常と考えられている<sup>4)</sup>。サブテロメア異常を検討していなければ、安易に「原因不明の症候群」とはいえない。1p36 欠失症候群、1q44 欠失症候群、2q37.3 欠失症候群、22q13 欠失症候群、9q34 欠失症候群などは認識可能な症候群である。

### 3. アレイ CGH を用いた診断

BAC (bacterial artificial chromosome) は、大腸菌によって増幅された 100~300 Kb の DNA の断片で、BAC を PCR で増幅させてスライドガラス上などに連続的スポットとして貼り付けたものを BAC アレイとよぶ。競合的ハイブリダイゼーション (comparative genomic hybridization : CGH) の原理により、患者のゲノム DNA と対照のゲノム DNA を断片化した上で、別の色に蛍光標識し、アレイ上でハイブリダイゼーションさせると、患者と対照の DNA の量の比によって蛍光が異なる部分が生じる。この差を数値化して染色体の欠失・重複を評価する。サブテロメアに限らず、染色体中間部の微細欠失や重複も検出可能である。均衡

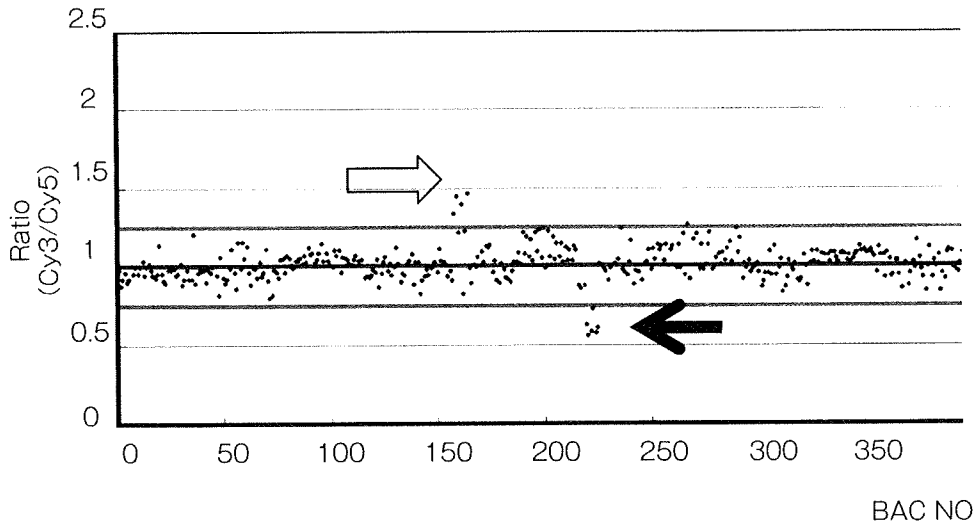


図2 アレイ解析例

G 分染法では異常はなく、サブテロメア領域の不均衡転座であることが判明した例。⇒：7q36 の重複を示す。→：9p24 の欠失を示す。図の一部は省略した。  
 ((株)ビーエム・エル会津善紀氏, 山口敏和氏提供)

型転座にみえても、アレイ CGH で欠失が判明する例がある。ただし、アレイ CGH では染色体の転座、挿入、逆位など構造異常は同定できない。染色体間の相対的な DNA 量の変化が生じないので、3 倍体も検出できない。

欧米では CGH はすでに汎用されており、CHARGE 症候群の責任遺伝子同定などに応用された。東京医科歯科大学難治疾患研究所の稲澤研究室では、既知 35 染色体異常症の責任領域および全染色体サブテロメア領域をカバーする 560 種類の BAC を配置した「Genome Disorder Array」を開発した<sup>5)6)</sup>。図 2 はこれによる解析結果例である。4,500 スポットのアレイでは、全ゲノム (約 3,000Mb) を 0.7Mb ごと のスポットでカバーしている<sup>5)6)</sup>。さらにオリゴ DNA アレイや SNP (一塩基多型) アレイも開発され、数 10Kb レベルの解像度も実現されている。マイクロアレイ技術は、現状では健康保険収載がないが、ゲノム全体の網羅的な解析にはもっとも威力を発揮し、臨床応用の発展が期待される。

マイクロアレイの結果の解釈で問題になるの

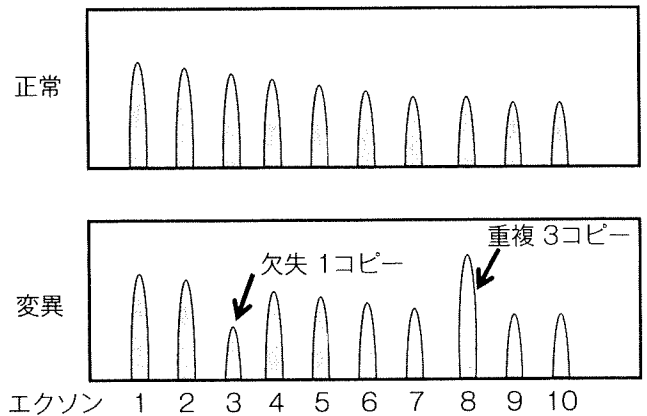


図3 MLPA 解析例 (模式図)

エクソンが 10 ある場合、欠失ではピークの高さが半分になり、3 コピーの重複では 1.5 倍になる (この図は模式図であり、実際の解析結果ではない)。

が、CNV (コピー数多型) である。通常、細胞の中の遺伝子は両親由来のもの 2 コピーが存在するが、数 Kb から中には数 Mb にも及ぶ領域が 1 コピーのみであったり、3 コピーの重複を示す場合があることがわかってきた。その領域内に遺伝子が含まれていても、無症状の場合もある。やはり、両親との比較は重要である。

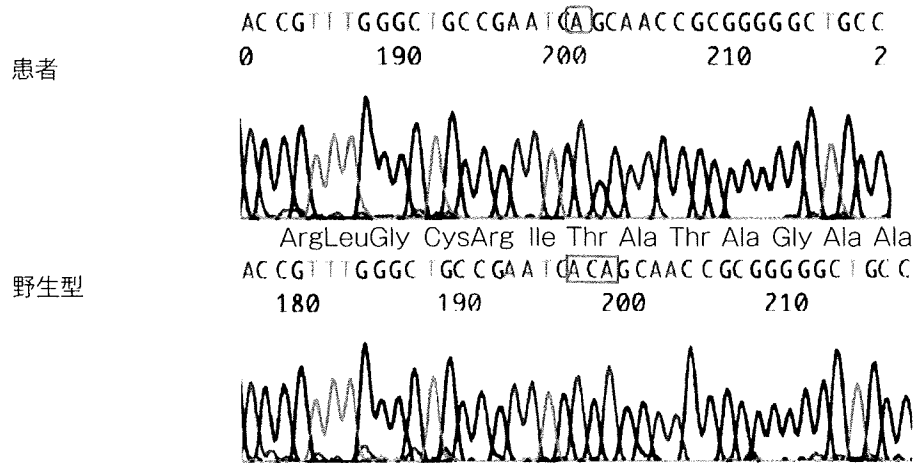


図4 シークエンス解析例

下段の正常（野生型）ではアミノ酸スレオニン（Thr）「ACA」の配列が、上段の患者では2塩基欠失して「A」となっている。このため、フレームシフトが生じている。

#### 4. メチル化特異性 PCR 法

Prader-Willi 症候群, Angelman 症候群では, FISH による微細欠失の場合が多いが, 非欠失例にメチル化特異性 PCR 法でゲノム刷り込みによる異常を検出できる例がある。最初からメチル化特異性 PCR 法を実施することが合理的であるが, 健康保険収載がないことが問題であり, 改善が求められている。Beckwith-Wiedemann 症候群や Russell-Silver 症候群の一部にもメチル化の異常が関与する。

#### 5. MLPA 法 (multiple ligation-dependent probe amplification)

近年導入された新しい解析方法である。プローブのハイブリダイゼーションと PCR による増幅反応を組み合わせ, 目的とする領域の欠失や重複を効率的に検出できる。ジストロフィン遺伝子のエクソン単位の欠失 (保険点数 2,000 点) やサブテロメア異常の解析を目的としたものが実用化している<sup>7)</sup>。目標とする遺伝子のエクソン単位の欠失や重複の検出に威力を発揮する。比較的少量の DNA でよく, 経済的な解析方法である。図3は MLPA 法による解析の1例である。

#### 6. シークエンスなど遺伝子変異解析

最終的には責任遺伝子の塩基配列を決定し, 変化を読みとる遺伝子診断が行われる。図4はシークエンスデータの例である。主要な単一遺伝子病の多くは責任遺伝子が同定され, 遺伝子解析を確定診断に用いる機会も増えた。既知の変異の同定は, PCR 産物の制限酵素処理だけで済む場合もある。軟骨無形成症では FGFR3 遺伝子のほぼ1カ所の変異を検索すればよいが, 多数のエクソンにわたって変異が分布する疾患もあり, 解析に工夫が必要となる。PCR のプライマー合成は1対で3,000円前後し, もっとも費用のかかる部分である。

慶應義塾大学の小崎らは, COPPER プレート法, DHPLC を用いた遺伝子診断システムを構築し, 約20種類の先天異常症候群について遺伝子診断 (<http://www.dhplc.jp/>) を実施している<sup>8)</sup>。

どの疾患でも遺伝子変異は100%の検出率ではない。遺伝性疾患では遺伝的な異質性が存在する場合が多く, 遺伝子変異が同定されない場合も, 臨床診断を必ずしも否定できないのが通常である。一般には遺伝子診断では, コーディング領域を含むエクソンや, イントロンとエク

ソンの境界領域を対象に解析するが、それ以外の領域（プロモーターなどの非翻訳領域、イントロン内部）の変異は否定できない。その遺伝子を含む領域の大きな欠失がある場合、PCRでは正常な対立遺伝子のみが増幅され、欠失が見出せない可能性もある。ある程度の大きさの欠失はFISH法やMLPA法の併用が必要である。

塩基の欠失や挿入があって、フレームシフトが生じたりストップコドンが生じていれば病因と考えてよい。アミノ酸の性質があまり変わらないミスセンス変異や3の倍数の欠失や挿入のインフレーム変異では病的と断定できない場合がある。両親が変異をもたず、多数の一般対象の中にみられない変異であれば病的意義が強くなるが、最終的には遺伝子の発現を調べて、機能低下を証明しないといけない場合もある。SNPのデータベースの検討、アミノ酸の変化による蛋白質の構造や機能の変化の予測、遺伝子変異の場所のアミノ酸が種を通じて保存されているかどうか、過去の同じ疾患の報告に関する文献的考察も重要である。ただし、過去の報告の誤りにも注意する。

エクソン内部のアミノ酸置換を伴わないDNA変異でも、病的な意味をもつ場合がある。エクソンのスプライシングには、エクソンとイントロンの境界部の配列が重要であるが、エクソン内のexonic splicing enhancer領域の変異により、スプライシング異常を生じた例が報告されている。

## V 遺伝学的検査をめぐるその他の話題

① 遺伝子診断に用いられるPCR反応装置、シーケンサーは年々、格段の進歩がみられる。長い塩基配列を短時間で正確に解析できるようになりつつある。

研究的な解析であるが、SNPの検出も大量にできるようになっている。数十万のSNPタイピングを効率的に行う方法も確立している。こ

こ3年ほどの間に次世代シーケンサーがいくつか発表されている。従来は膨大な時間と費用を要した全ゲノム情報の解読も、次世代シーケンサーを用いれば、10万円程度の金額で個人のゲノム情報を取得できる時代がくるといわれている。情報管理が追いつかない可能性がある。

② 薬理遺伝学の臨床応用が急速に進んでいる。薬理遺伝学的検査は、薬物の効果の予測や副作用の少ない治療方法の選択などに有用である。DNAチップが利用される場合が多い。個人の特性にみあった「テーラーメイド医療」が小児の領域でも進展するであろう。

③ インターネットのホームページなどで、医療機関を経ずに直接に遺伝子診断を受け付ける業者が存在する。生活習慣病やAlzheimer病の遺伝子診断などが対象で、頬粘膜細胞や爪を郵送して検体として用いている。DTC (direct-to-consumer) 検査とよばれ、検査の精度、科学的意義の裏づけに問題があるものも多いことや、カウンセリングの過程を経ないことが不測の事態を招きかねず、注意を喚起する必要がある。

④ 医学部で遺伝学教育は行われているが、多くは教養の生物学としての教育である。遺伝カウンセリングなどの臨床遺伝学教育を実施している医学部は多くなく、教育内容の改善が求められている。高校の生物学でも遺伝や多様性に関する内容が乏しく、一般市民だけでなく医療関係者までもが誤解をもつ場合が少なくない。遺伝および多様性に関する知識の普及啓発も重要課題である。

⑤ 遺伝子に関する情報は、インターネットで容易に取得できる。NCBI (National Center for Biotechnology Information) のホームページから多くの最新情報を入手できる。NCBIはNIHの米国立医学図書館に設置されている。ここから、PubMedやOMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) にもアクセスできる。



UCSC Genome Browser のホームページも BAC の情報など非常に有用である。

OMIM には既知のメンデル遺伝に従う遺伝性疾患，ミトコンドリア遺伝病が網羅され，遺伝子名でも登録されている。GeneReviews のホームページには，主要な遺伝性疾患の整理された記載がある。

## おわりに

遺伝学的検査の要点，最近の動向を概説した。検査には倫理的な面の配慮が必要であり，遺伝カウンセリングの実施が求められる。従来，ゲノム計画の推進，遺伝子の研究には膨大な予算が費やされた。その成果を効果的に患者・家族に還元し，国民全体の健康保持・増進に寄与するために，遺伝診療の重要性が認識され普及することが期待される。医療機関での遺伝診療体制の充実，遺伝カウンセラー養成などの人的資源の充実，コストのみあった検査供給体制の構築など克服すべき多くの課題があるが，基礎および臨床医学，行政，産業界，教育界などが一

体となって前進していくことが必要である。

## 文献

- 1) 末岡 浩：出生前遺伝子診断の進歩。小児科 2008；49：309-316
- 2) 福嶋義光：遺伝子診断・治療に関するガイドライン・倫理指針。日本臨床 2005；63：389-393
- 3) 松原洋一：存亡の危機に瀕する稀少遺伝性疾患の遺伝子検査—わが国における遺伝子検査ネットワークの構築。医学のあゆみ 2008；225：840-844
- 4) Knight SJ et al：Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. Lancet 1999；354：1676-1681
- 5) 林 深，稲澤譲治：BAC アレイを用いた微細染色体異常の検出。小児内科 2005；37：1399-1404
- 6) 稲澤譲治，蒔田芳男，羽田 明：アレイ CGH 診断活用ブック。医歯薬ジャーナル社，2008
- 7) Janssen B et al：MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene：potential and pitfalls. Neurogenetics 2005；6：29-35
- 8) 小崎健次郎：先天異常症候群の遺伝子診断システム。小児内科 2005；37：1317-1321

### Ⅲ. 染色体異常, 先天異常—26

## EEC 症候群

EEC syndrome

岡本伸彦\*

OKAMOTO Nobuhiko

#### ① 基本病因, 発症機序

指趾欠損・裂手 (Ectrodactyly), 外胚葉形成不全 (Ectodermal dysplasia), 唇顎口蓋裂 (Cleft lip palate) を 3 主徴とする先天異常症候群である。頭文字をとって EEC 症候群とよぶ。Rudiger らが最初に 3 主徴の合併に着目して記載した<sup>1)</sup>。ただし、それ以前にも類似例の報告はあった。罹患率に関して、出生 18,000 人に 1 人という報告がある。正確な症例数は不明であるが、わが国でも多数の報告がある。常染色体性優性遺伝による遺伝性疾患であるが、突然変異例もある。

#### ② 基本病態

EEC には遺伝的異質性 (EEC1, EEC2, EEC3) がある。現在までに 3 種の座位が知られており、EEC3 (OMIM#604292) のみで責任遺伝子 p63 が同定されている。浸透率は 93~98% であるが、3 主徴が揃うとは限らない。半数の症例は家族歴がなく、突然変異で発症する。突然変異例は家族例よりも重症の傾向がある。

Celli らは、EEC3 が 3q27 に連鎖することを明らかにし、p63 遺伝子異常を血縁のない 9 例の EEC 患者においてヘテロで同定した<sup>2)</sup>。8 例ではアミノ酸置換により DNA 結合能が失われ、1 例ではフレームシフトで早期ストップコドンが生じていた。

p63 は癌抑制遺伝子 p53 のホモログである。p63 遺伝子は 15 個のエクソンからなるが、スプライスの変化などで 6 個のアイソタイプが存在する。DNA 結合ドメインなどの機能的領域が存在し、遺伝子異常は DNA 結合ドメインに多く見つかっている。

\* 大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科  
[〒594-1101 和泉市室堂町 840]  
TEL 0725-56-1220 FAX 0725-56-5682  
E-mail: okamoto@osaka.email.ne.jp

ADULT (Acro-dermato-ungual-lacrima-tooth) syndrome, Rapp-Hodgkin 症候群, Ankyloblepharon-Ectodermal Defects-Cleft Lip/Palate, Limb-Mammary syndrome, Split-Hand/Foot Malformation (Type 4) も p63 遺伝子異常によるものがあり、allelic disorder である<sup>3,4)</sup>。これらの類縁疾患を“p63-associated disorders”と総称する場合もある。

腫瘍抑制遺伝子である p53 は、多くの癌細胞で多変異が報告されているが、p63 は癌細胞での変異の報告は少ない。p63 はプログラム化された細胞死 (アポトーシス) に関与する。p63 遺伝子のノックアウトマウスでは、四肢や上下顎の形成不全、表皮、毛包、乳腺、歯など、上皮間葉相互作用に依存する器官の発生が障害され、ヒトの外胚葉形成不全の症状と重なる所見を認める。

EEC1 (OMIM#129900) の遺伝子座位は 7q11 である。第 7 染色体異常を伴う EEC 8 例より、責任遺伝子は 7q11.2-q21.3 にあると判明した。EEC2 は、第 19 染色体セントロメア近傍に連鎖する。両者の責任遺伝子は現時点では不明であるが、p63 と類似した機能をもつ遺伝子の可能性がある。

鑑別診断として、EEM (Ectodermal-dysplasia-Ectrodactyly-Macular dystrophy) syndrome がある。これは、外胚様形成不全・欠指・黄斑ジストロフィーを主症状とする常染色体劣性遺伝性疾患で、cadherin-3 が責任遺伝子である。

#### ③ 病態生理からみた臨床症候

Rudiger らは両手と一側の足の欠指、重い角膜炎を伴う外胚葉形成不全、唇顎口蓋裂を伴う女児例を報告した<sup>1)</sup>。指趾欠損 (裂手・裂足)、外胚葉形成不全、唇顎口蓋裂が 3 主徴である。指は第 3 指が欠損する例がもっとも多く、カニばさみ様変形を呈する。多合指症の例もある。常染色体優性遺伝であるが、3 主徴がすべて揃うとは限らず、

家族内で所見に幅がみられる。EEC 症候群はアポトーシス不全による先天異常症と捉えることができる。裂手・裂足は、胎児期の指趾の間のアポトーシスの異常によって生じる。

外胚葉形成不全に基づく皮膚所見として、皮膚が薄い、軽度の角化亢進、発汗減少などを認める。毛髪・眉毛・睫毛は薄く、疎である。毛髪の色も薄い。爪低形成の例もある。鼻涙管の閉鎖や涙丘欠損のため、涙液が鼻腔に流れにくい。眼脂が多く、眼が潤んだ状態になり、角膜・結膜・眼瞼の慢性的炎症が日常生活上の問題となる。

口唇口蓋裂については、口唇裂単独の例や口蓋裂単独の例もあるが、唇裂は両側性のことが多い。口唇口蓋裂を欠く例もあるが、その場合は上顎低形成、短い人中、広い鼻先などの特徴が認められる。胎児期に左右の口蓋突起が癒合する際に、アポトーシスが重要であるが、アポトーシス不全により、癒合面の過剰な細胞が排除されないことが本症候群における口唇口蓋裂の原因である。

減歯、円錐歯、エナメル質形成不全などの歯科異常も多い。

伝音性難聴、後鼻孔閉鎖などの耳鼻咽喉科的異常例もある。水腎症、水尿管症、腎低形成、膀胱尿管逆流症など泌尿器系異常も合併率が高い。泌尿生殖器異常の一部は、ウォルフ管やミューラー管の退縮異常で説明できる。

Roelfsema と Cobben らは EEC 症候群を 230 例まとめた<sup>5)</sup>。孤発例(114 例)のほうが家族例(116 例)よりも重症例が多かった。指趾欠損は 193 例(84%)、外胚葉形成不全は 178(77%)例、唇顎口蓋裂は 156 例(68%)、鼻涙管異常 135 例(59%)、泌尿生殖器異常は 52 例(23%)、伝音性難聴は 33 例(14%)であった。

#### 4 病態生理からみた診断のための臨床検査

3 主徴が揃えば身体所見のみで診断可能である。慶應義塾大学の小崎らは、DHPLC を用いた p63 遺伝子診断例を報告している<sup>6,7)</sup>。ただし、p63 遺伝子異常がなければ EEC 症候群が否定されるわけでもない。四肢奇形に関しては放射線学的評価を行う。眼合併症に対して眼科的精査が必要である。眼底を調べることで、EEM 症候群との鑑別を行う。

泌尿器系異常については超音波検査や造影検査を行う。聴力検査も必要である。

#### 5 治療目標とその手順および臨床検査所見からみた効果判定指標

適切な時期に、口唇口蓋裂の手術を実施する。形態的な修復、口腔機能、構音機能の改善が目標である。術後は口腔機能の評価、言語訓練を実施する。歯科治療・矯正が必要な例もある。

裂手・裂足に対しては、整形外科手術を実施する。形態的・機能的な改善が治療目標である。巧緻作業を可能とするための、機能訓練が必要である。鼻涙管閉鎖・狭窄に対する治療も必要である。粘膜が乾燥しやすく、感染を反復しやすいため、局所的あるいは全身に抗生剤を投与する。

#### 6 よくある合併症の病態生理とその診断・治療・予防

眼や上気道、尿路の感染症を反復するので注意が必要である。とくに眼瞼、結膜や涙嚢の感染を反復する。慢性反復性の上気道感染症がみられる。免疫異常はなく、解剖学的な問題が原因である。点眼薬、皮膚保湿剤などの適切な処置、感染に対する抗生剤投与を行う。

p63 は p53 ファミリーに属する癌抑制遺伝子であるが、アポトーシスへの関与が注目されている。EEC 症候群では腫瘍発生の増加はないとされるが、p63 変異例同定例において悪性リンパ腫の合併例が報告されている<sup>7)</sup>。

#### 7 症状経過、検査所見からみた予後判定

形成手術後の四肢機能、口腔機能、構音の状況などを評価する。粘膜の感染症の状態に注意する。知的発達、生命予後に関しては多くの場合問題がない。

#### <関連 Web site>

- ・先天性四肢障害児父母の会(日本)  
<http://www10.ocn.ne.jp/~fubo>
- ・米国の外胚葉形成不全全般の情報  
<http://www.nfed.org>
- ・上肢先天異常の関連団体  
<http://www.reach.org.uk>

## 文献

- 1) Rudiger RA, Haase W, Passarge E : Association of ectrodactyly, ectodermal dysplasia, and cleft lip palate. *Am J Dis Child* **120** : 160-163, 1970
- 2) Celli J, Duijf P, Hamel BC, et al : Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* **99** : 143-153, 1999
- 3) Brunner HG, Hamel BC, Van Bokhoven H : The p63 gene in EEC and other syndromes. *J Med Genet* **39** : 377-381, 2002
- 4) Rinne T, Hamel B, van Bokhoven H, et al : Pattern of p63 mutations and their phenotypes—update. *Am J Med Genet A* **140** : 1396-406, 2006
- 5) Roelfsema NM, Cobben JM : The EEC syndrome : a literature study. *Clin Dysmorph* **5** : 115-127, 1996
- 6) Kosaki R, Ohashi H, Yoshihashi H, et al : A de novo mutation (R279C) in the P63 gene in a patient with EEC syndrome. *Clin Genet* **60** : 314-315, 2001
- 7) Akahoshi K, Sakazume S, Kosaki K. et al : EEC syndrome type 3 with a heterozygous germline mutation in the P63 gene and B cell lymphoma. *Am J Med Genet A* **120** : 370-373, 2003

\* \* \*

Ⅲ. 染色体異常, 先天異常-31

# 胎児ヒダントイン症候群および 胎児バルプロ酸症候群

Fetal hydantoin syndrome and fetal valproate syndrome

岡本伸彦\*

OKAMOTO Nobuhiko

## ① 基本病因, 発症機序

抗てんかん薬は、催奇形性を有する。妊婦の0.4%ないし0.5%は妊娠中に抗けいれん剤を服用している。胎児は一般人口の数倍のレベルで先天奇形のリスクが増加する。発達障害や行動異常のリスク増加の可能性もある。胎児ヒダントイン症候群(FHS)<sup>1-3)</sup>、胎児バルプロ酸症候群(FVS)<sup>4-7)</sup>などの先天異常症候群が知られている。トリメタジオンは胎児毒性が強く、妊婦には禁忌である。

ヒダントイン(フェニトイン:商品名アレビアチン®)は、1938年に導入され、抗てんかん薬として多用されている。Meadowらは、1968年にヒダントインの催奇形性を報告した<sup>8)</sup>。1975年にHansonとSmithは、特徴的顔貌、口唇口蓋裂や爪低形成などの共通の所見をもつ症例をまとめ、fetal hydantoin syndrome (FHS)を提唱した<sup>1)</sup>。ヒダントイン服用により、5~10%の胎児がFHSを呈するという。

ヒダントインはチトクロームP450で代謝されるが、つぎにミクロソームのepoxide hydrolase (EH)の解毒作用を受ける。この酵素は各種の外来化学物質の分解に関与し、酵素活性の低い個体では、epoxideによる副作用がでやすくなる。FHSの家族内発症は、EH酵素活性の低い多型によるものと考えられる。バルプロ酸などの併用で代謝が阻害されて、さらに副作用が増強する場合がある。

FHSで先天性心疾患が多い理由は、神経堤細胞の移動障害説がある。胎児の血流障害によると考えられる四肢異常の報告もある。

バルプロ酸は1978年から抗てんかん薬として使

用されているが、気分調整薬としても用いられる。Dalensらが、バルプロ酸の胎児毒性を報告した<sup>4)</sup>。FVSでは、特徴的顔貌、精神運動発達遅滞、自閉症、二分脊椎、先天性心疾患、口唇口蓋裂、四肢異常などを認める<sup>4-5,9-11)</sup>。とくに、FVSと二分脊椎との関連は強く、一般の罹患率の10倍となる。妊婦のバルプロ酸服用例の1~2%に神経管閉鎖不全を認める。葉酸欠乏、亜鉛欠乏は神経管閉鎖不全の増強因子である。トリメタジオンは別格として、抗てんかん薬のなかで、バルプロ酸はもっとも催奇形性が高い。FVSの同胞例の報告が複数あり、薬物代謝の個体差が遺伝的に規定されている可能性がある<sup>12)</sup>。最近、バルプロ酸の抗てんかん作用の機序として、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害作用が注目されているが、これは胎児の器官形成にも影響する可能性が示唆されている<sup>13)</sup>。

抗てんかん薬は多剤併用の種類が増えるほど、胎児への影響は強くなる。複数の抗てんかん薬を併用している場合にどの薬剤の影響が主であるか区別しにくい場合があること、薬剤の種類に関係なく、共通した所見が存在することなどから、胎児抗けいれん薬症候群(fetal anti convulsant syndrome: FACS)という概念も用いられる。カルバマゼピンやフェノバルビタールの胎児への影響も報告されている<sup>11,14)</sup>。妊娠中のカルバマゼピン服用も、神経管閉鎖不全の率が上昇する。ガバペンチン、トピラメート、ラモトリジン、レバチラセタムなど新規に開発された抗けいれん薬と胎児奇形の関連に関する知見も徐々に集積されつつある<sup>14)</sup>。

## ② 基本病態

妊娠中の抗けいれん薬の服用による。妊娠中の投与量・血中濃度、服用時期、多剤併用の場合の薬剤の種類数、薬物代謝の個体差(EH酵素活性な

\* 大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科  
[〒594-1101 和泉市室堂町840]  
TEL 0725-56-1220 FAX 0725-56-5682  
E-mail: okamoto@osaka.email.ne.jp

ど)が副作用の有無、重症度に影響する。胎児の発生の重要な時期に、抗てんかん薬やその代謝産物が正常発生を阻害することが基本病態である。同じ抗てんかん薬を服用している場合、次回妊娠で再発する可能性がある。

### ③ 病態生理からみた臨床症候

Dysmorphology 的な所見が重要である<sup>9~11)</sup>。FHS では眼間開離、内眼角贅皮、眼瞼下垂、斜視、目立つ耳介、耳介低位、幅広い鼻根部、短鼻、多毛、口唇口蓋裂、指趾遠位部低形成、爪低形成などを認める。拇指が他の四指状になることがある。先天性心疾患(大動脈縮窄、動脈管開存、心室中隔欠損、心房中隔欠損など)の合併例がある。子宮内発育遅延、出生後の成長障害例が多い。精神運動発達遅滞、小頭症の原因ともなる。前頭縫合の隆起を認める。頻度は低いが、幽門狭窄、十二指腸閉鎖、尿道下裂、横隔膜ヘルニア、脊椎・肋骨異常、神経芽細胞腫の合併例の報告がある。

FVS では、三角頭蓋、額が高く、側頭部の左右が狭い、内眼角贅皮、眼窩下部の溝、眉毛の中央部の欠損、鼻根部平低、短鼻、前向きの鼻孔、薄い人中、薄い上口唇、厚い下口唇、口角下垂などを認める。FHS と異なり、眼間開離が目立たず、口が小さい傾向がある。FVS と神経管閉鎖不全、とくに潜在性二分脊椎の関連は有名である。無脳症との関連は少なく、腰椎や仙椎の下部に異常がでる例が多いことから、バルプロ酸は神経管最下方の閉鎖障害と関連するようである。ほかに気管軟化症、腹壁異常、尿道下裂、先天性心疾患、四肢奇形、口唇口蓋裂の報告もある。

ヒダントインもバルプロ酸も発達障害や行動異常のリスクが一般よりも高くなる<sup>11)</sup>。FVS では、自閉症の合併例の報告もある。やはり多剤併用の場合、リスクが増強される。

### ④ 病態生理からみた診断のための臨床検査

母親が妊娠中に抗けいれん薬を服用している場合、胎児超音波検査を詳細に実施し、胎児の異常を妊娠中に診断できる可能性がある。二分脊椎の出生前診断に、 $\alpha$  フェトプロテイン濃度上昇が有用であるが、開放性でない潜在性二分脊椎の場合

は上昇しない。出生後の FHS, FVS に特異的な検査はないが、染色体異常症の鑑別のために染色体検査を実施する必要がある。通常の染色体検査に異常がなくても、アレイ CGH などの新しい検査も導入すべきであろう。FHS は Coffin-Siris 症候群と類似した所見を呈することがあり、鑑別する。FVS は VATER 連合などと鑑別する。

先天性心疾患の可能性があれば、心エコーなどの評価を行う。小頭、発達遅滞例では、頭部 CT, MRI, 脳波検査を行う。潜在性二分脊椎を疑う場合は腰仙部の MRI 検査が必要である。

### ⑤ 治療目標とその手順および臨床検査所見からみた効果判定指標

妊娠中の抗けいれん薬の服用が原因であり、特別な治療方法は存在しない。したがって、予防のための最大限の工夫が必要である<sup>11,14~15)</sup>。妊娠の可能性のあるてんかん患者に対して、妊娠中の投薬内容について事前に相談しておくべきである。最近では、妊婦に対してバルプロ酸は第一選択とすべきでないという意見が強い。他の抗てんかん薬に変更するか、変更できない場合でもできる限り単剤治療でかつ投与量を少なく、血中濃度を低く維持する工夫を行う。妊娠が判明した時点では重要な器官の発生が進みつつあるわけで、投薬の調整は妊娠の数か月以前に実施すべきである。ただし、若年での予期せぬ妊娠の可能性もある。一方、妊娠中の母親のてんかん発作は、流産や早産を誘発したり、胎児が低酸素状態に陥る可能性があり、抗けいれん剤のリスクと利益を慎重に考慮する。

神経管閉鎖不全や口唇口蓋裂のリスク低減のために、妊娠前1か月から妊娠全期間にわたって、葉酸の服用(0.4~1 mg/日)が推奨される。

口唇口蓋裂や先天性心疾患の合併例では、外科的治療を考慮する。二分脊椎例では脳神経外科的な治療を行う。成長発達の問題に対しては療育を実施する。

### ⑥ よくある合併症の病態生理とその診断・治療・予防

チトクローム P450 で代謝される抗けいれん薬を服用する妊婦から出生した新生児では、酵素誘導

によりビタミン K の代謝が亢進するため, ビタミン K 欠乏による出血性疾患の合併の率が高くなる。妊娠最後の 1 か月, 妊婦のビタミン K 補給(10 mg/日)が推奨される。

出生後の withdrawal syndrome にも注意すべきである。新生児に易刺激性, 過敏性, 筋緊張低下やけいれんが生じる場合がある。FHS で, まれに神経芽細胞腫の併発がみられる。EH 酵素活性の低下による代謝産物の影響と推測される。したがって, FHS では HVA, VMA の検査も一度は施行しておく必要がある。

### 7 症状経過, 検査所見からみた予後判定

生命予後は良好である。生後の成長発達についてフォローが必要である。発達の遅れの原因として, 妊娠中のでんかん発作の影響, 抗けいれん薬による発達期の脳への影響のほか, 母親のでんかんの原因となる基礎疾患が優性遺伝で児に遺伝している可能性もある。多動, 自閉症や行動異常についても注意する。成長発達フォローの中で心理発達の評価を定期的実施することが望ましい。

#### <関連 Web site>

・英国の FACS (fetal anti convulsant syndrome) ホームページ

<http://www.oacs-uk.co.uk/>

(妊娠と薬の情報センターが一部の専門医療機関に設置され, 相談に応じている。)

#### 文献

- 1) Hanson JW, Smith DW : The fetal hydantoin syndrome. *J Pediatr* **87** : 285-290, 1975
- 2) Allen RW Jr, Ogden B, Bentley FL, et al : Fetal hydantoin syndrome, neuroblastoma, and hemorrhagic disease in a neonate. *JAMA* **244** : 1464-

1465, 1980

- 3) 中根允文 : 神経症候群, その他の神経疾患を含めて (V) VIII. 各種疾患にみられる神経疾患奇形症候群胎児性ヒダントイン症候群. 日臨牀(別冊; 神経症候群) **5** : 99-101, 2000
- 4) Dalens B, Raynaud EJ, Gaulme J : Teratogenicity of valproic acid. *J Pediatr* **97** : 332-333, 1980
- 5) Clayton-Smith J, Donnai D : Fetal valproate syndrome. *J Med Genet* **32** : 724-727, 1995
- 6) Lindhout D, Schmidt D : In-utero exposure to valproate and neural tube defects. *Lancet* **1** : 1392-1393, 1986
- 7) 園田 徹 : 神経症候群, その他の神経疾患を含めて (V) VIII. 各種疾患にみられる神経疾患奇形症候群胎児性バルプロ酸症候群. 日臨牀(別冊; 神経症候群) **5** : 96-98, 2000
- 8) Meadow SR : Anticonvulsant drugs and congenital abnormalities. *Lancet* **2** : 1296, 1968
- 9) Kini U, Adab N, Vinten J, et al : Dysmorphic features : an important clue to the diagnosis and severity of fetal anticonvulsant syndromes. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **91** : F90-95, 2006
- 10) Moore SJ, Turnpenny P, Quinn A : A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *J Med Genet* **37** : 489-497, 2000
- 11) Gallagher RC, Kingham K, Hoyme HE : Fetal anticonvulsant syndrome. In Cassidy SB, Allanson JE (eds) : Management of genetic syndromes, 2nd ed, Wiley Blackwell, pp239-250, 2005
- 12) Malm H, Kajantie E, Kivirikko S, et al : Valproate embryopathy in three sets of siblings : further proof of hereditary susceptibility. *Neurology* **59** : 630-633, 2002
- 13) Gurvich N, Berman MG, Wittner BS : Association of valproate-induced teratogenesis with histone deacetylase inhibition *in vivo*. *FASEB J* **19** : 1166-1168, 2005
- 14) Pack AM : Therapy insight : clinical management of pregnant women with epilepsy. *Nat Clin Pract Neurol* **2** : 190-200, 2006
- 15) Crawford P : Best practice guidelines for the management of women with epilepsy. *Epilepsia* **46** (supple 9) : 117-124, 2005

\* \* \*

# A Patient With Early Onset Huntington Disease and Severe Cerebellar Atrophy

Satoru Sakazume,<sup>1,2\*</sup> Satoshi Yoshinari,<sup>3</sup> Eiji Oguma,<sup>4</sup> Emi Utsuno,<sup>5</sup> Takuma Ishii,<sup>5</sup> Yoko Narumi,<sup>2</sup> Takashi Shiihara,<sup>2</sup> and Hirofumi Ohashi<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Division of Medical Genetics, Gunma Children's Medical Center, Gunma, Japan

<sup>2</sup>Division of Neurology, Gunma Children's Medical Center, Gunma, Japan

<sup>3</sup>Division of Neurology, Saitama Children's Medical Center, Saitama, Japan

<sup>4</sup>Division of Radiology, Saitama Children's Medical Center, Saitama, Japan

<sup>5</sup>Division of Genetic Counseling, Chiba University Hospital, Chiba, Japan

<sup>6</sup>Division of Medical Genetics, Saitama Children's Medical Center, Saitama, Japan

Received 6 June 2008; Accepted 11 December 2008

We report on a girl with early onset Huntington disease (HD). Her initial symptoms at 2 years of age included oral motor dysfunction and gait disturbance. Magnetic resonance imaging of the head revealed severe atrophy of both the vermis and the cerebellar cortex in addition to the common findings of basal ganglia including the caudate nuclei, putamen, and globus pallidus. Molecular analysis showed 160 CAG repeats in the *HD* gene. This mutation was inherited from her mother who was also affected, with a *HD* CAG expansion of 60 repeats. Cerebellar symptoms should be considered as a manifestation of early onset HD. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** juvenile Huntington disease; CAG repeat; maternal expansion; cerebellar atrophy

## INTRODUCTION

Huntington disease (HD) is a neurodegenerative disorder usually diagnosed in adulthood on the basis of symptoms of involuntary movement and a change in character. The disorder is caused by the expansion of the 5' CAG repeat of the *HD* gene, and paternal anticipation is common. Early onset Huntington disease (EOHD), with an onset before 20 years of age, is estimated to account for only approximately 7% of all patients with HD, and patients for whom the age of onset is before 10 years constitute less than 1% of all patients with HD [Nance and Myers, 2001]. The clinical features of EOHD remarkably differ from those of adult-onset HD and are characterized by rigidity, oral motor dysfunction, ataxic gait, behavioral disturbance, and seizures [Rasmussen et al., 2000; Gonzalez-Alegre and Afifi, 2006; Yoon et al., 2006]. The CAG expansion in EOHD is greater than that in adult HD, and the prognosis of EOHD is generally unfavorable. Here, we describe a patient with EOHD and severe cerebellar cortical atrophy.

## How to Cite this Article:

Sakazume S, Yoshinari S, Oguma E, Utsuno E, Ishii T, Narumi Y, Shiihara T, Ohashi H. 2009. A patient with early onset Huntington disease and severe cerebellar atrophy. *Am J Med Genet Part A* 149A:598–601.

## CLINICAL REPORT

The patient (female) was born at term following an uneventful pregnancy. Her birth weight was 2,690 g (−0.8 SD) and length was 46 cm (−1 SD). During the first year of life, her growth and development was normal. She lifted her head and chest by herself at 3 months of age; walked with hands held and stood up independently at 12 months; and ran well, walked up and down, jumped independently, and put three words together at 2 years. Since then she has been gradually exhibiting symptoms of motor regression, difficulty in speech, and frequent temper tantrums. When we examined her at the age of 3 years and 8 months, she spoke only

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan; Grant sponsor: Kawano Masanori Memorial Foundation for Promotion of Pediatrics.

\*Correspondence to:

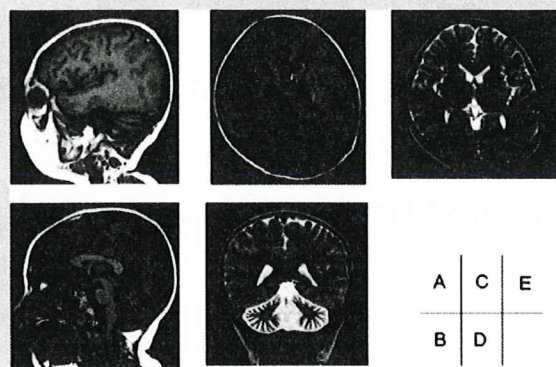
Satoru Sakazume, M.D., Ph.D., Division of Medical Genetics, Gunma Children's Medical Center, Shimohakoda 779, Hokkita, Shibukawa, Gunma 377-8577, Japan. E-mail: saka377@gcmc.pref.gunma.jp

Published online 27 February 2009 in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com)

DOI 10.1002/ajmg.a.32707





**FIG. 1.** A magnetic resonance image of the patient's brain at the age of 4 years. The sagittal (B) and the coronal (D) sections reveal cerebellar atrophy. E: The transverse section of a T2-weighted image shows atrophy of the globus pallidus. A,C: No significant cortical change was noted in cerebral gray or white matter.

single words and walked unstably with a wide gait. Three months later, she started having repeated and prolonged generalized tonic seizures and frequent falls. An electroencephalogram revealed bilateral sporadic spikes in the occipital areas. Magnetic resonance imaging (MRI) of the head revealed severe cerebellar atrophy in the vermis and cortex in addition to atrophy in the nuclei caudati, putamen, and globus pallidus (Fig. 1). Family history revealed that her mother, grandparent, and great grandparent were affected with HD.

### MOLECULAR GENETIC ANALYSIS

In brief, genomic DNA was extracted from peripheral blood samples that were collected from the patient and her mother by using standard methods. Polymerase chain reaction (PCR) was performed according to a protocol described elsewhere by using the FAM-labeled forward primer ATG AAG GCC TTC GAG TCC CTC AAG TCC TTC and non-labeled reverse primer AAA CTC ACG GTC GGT GCA GCG GCT CCT CAG to span both ends of the repeat in the *HD* gene [Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993]. The PCR reaction of 25  $\mu$ l consists of forward and reverse primers (1.0 pmol each), 0.4 mM dNTPs, 1xCG buffer (Takara Bio Ltd., Ohtsu, Shiga, Japan), TaKaRa LA *Taq* polymerase (1.0 U) (TaKaRa), 200 ng of genomic DNA. Reactions were performed in ABI9700 thermal cycler for 1 cycle at 95°C for 5 minutes, 35 cycle at 95°C for 1 min, 60°C for 2 min, 68°C for 1.5 min. One microliter of a 1:5 dilution of reaction products was added to 12  $\mu$ l of formamide (Hi-Di formamide, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) and 0.5  $\mu$ l of GS1000-ROX internal molecular weight standard (Applied Biosystems, Inc.), denatured at 95°C for 2 min, and immediately placed on ice for a minimum of 3 min. Amplicon length was analyzed by ABI PRISM 310 Genetic analyzer and Genescan software (Applied Biosystems, Inc.). The

CAG expansion of the patient and her mother were confirmed to be 160 and 60 repeats respectively.

### DISCUSSION

To our knowledge, the girl described here is one of the youngest patients with EOHD. We wish to emphasize the following two issues: maternal transmission of the mutant allele and cerebellar pathology. HD is inherited in an autosomal dominant pattern; both paternal and maternal transmission is possible. Paternal anticipation is the rule in HD [Ranen et al., 1995]. We reviewed seven reports of EOHD patients with over 100 repeats in the *HD* gene (Table I) [Nance et al., 1999; Gambardella et al., 2001; Milunsky et al., 2003; Seneca et al., 2004; Nahhas et al., 2005; Papapetropoulos et al., 2005]. In four patients, the mother transmitted the expanded allele and the maternal ages at the time of pregnancy were relatively young, ranging from 20 to 27 years [Nance et al., 1999; Nahhas et al., 2005; Papapetropoulos et al., 2005]. The age of the mothers when they had first experienced an HD symptom ranged from 16 to the early 20s. The incidence of maternal transmission in EOHD seems to be higher than that in the case of adult onset HD. Moreover, anticipation in maternal transmissions is seen in almost half of patients with EOHD having over 100 CAG repeats.

In two studies on adult onset HD, over 80 patients were screened for brain atrophy, and no significant cerebellar changes were detected [Jech et al., 2007; Ruocco et al., 2008]. However, among the seven reports of EOHD, cerebellar atrophy was confirmed in three patients (Table I) [Milunsky et al., 2003; Seneca et al., 2004]. In particular, progressive cerebellar atrophy was demonstrated by serial MRI in Patient 4, at the age of 2 years, periventricular leukomalacia was noted on brain MRI; and at 6 years, severe cortical atrophy with dilated ventricle and cerebellar atrophy were confirmed [Seneca et al., 2004]. We assume that the cerebellar change of the present patient is atrophy rather than hypoplasia.

Furthermore, Ribai et al. [2007] summarized the cases of 29 patients with HD. The incidence of maternal transmission was 25%, and cerebellar atrophy was identified in one patient. We observed that the incidences of maternal transmission and those of cerebellar atrophy are different between Ribai's report and our accumulated data (Table I).

In conclusion, anticipation in maternal transmissions is seen in half of very young onset cases with repeat number over 100. But it is important to note that this high maternal transmission rate might be overestimated because the patients with maternal transmission are more likely to be reportable. In addition, cerebellar atrophy is not a common, but a notable finding in EOHD, which might be progressive in some patients.

### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for the cooperation of the patients and their families in the present study. This work was supported in part by a grant for Research on Children and Families from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, and from Kawano Masanori Memorial Foundation for Promotion of Pediatrics.

TABLE I. Clinical Presentation of JHD With Family History

Refs.	Gender	Age at onset (years)	CAG repeat of the patient	Symptoms of the patient	Involvement of the brain	Transmission	Mutation of parent	Symptoms of parent	Maternal age at pregnancy (years)
Nance et al. [1999]	Male	2	250	Rigidity, seizure, drooling	Autopsy examination at 16 years revealed global cerebral atrophy. The cerebellum, midbrain, and brainstem changes were unremarkable histologically	Maternal	Mother; not tested	Mother developed depression and attempted suicide at age 16 years.	23
Gambardella et al. [2001]	Female	6	115	Seizure, cognitive failure, ataxia	Not described	Paternal	Father; not tested	Not described	—
Milunsky et al. [2003]	Female	1.5	256	Dystonia, speech impairment	At 3.5 years, cerebellar atrophy of the vermis, hemisphere, and peduncle	Paternal	Adopted when a neonate, not described by genetic test	Not described	—
Seneca et al. [2004]	Female	3	214	Seizure, psychomotor regression, diplegia	At 6 years, progressive cerebellar atrophy was confirmed	Paternal	CAG repeat of father: 54	Typical adult HD phenotype	—
Papapetropoulos et al. [2005]	Male	3.5	108	Cognitive failure, speech impairment, dystonia, ataxia,	Not described	Maternal	Not described	Patient's mother was first affected with HD at 23 years.	21
Nahas et al. [2005]	Female	3.5	130–150	Speech impairment, ataxia,	At postmortem examination, mild cortical atrophy and moderately severe atrophy of the caudate and putamen were noted	Maternal	CAG repeat of mother: 70–90	Mother had symptoms of HD at 18 years	20
Present patient	Female	3	160	Rigidity, ataxia, cognitive failure, seizure, speech impairment	Severe cerebellar atrophy in the vermis and cortex as well as atrophy in the nuclei caudati, putamen, and globus pallidus	Maternal	CAG repeat of mother: 60	Mother was first affected with HD in her late 20s after delivery of the patient	27



## REFERENCES

- Gambardella A, Muglia M, Labate A, Magariello A, Gabriele AL, Mazzei R, Pirritano D, Conforti FL, Patitucci A, Valentino P, Zappia M, Quattrone A. 2001. Juvenile Huntington's disease presenting as progressive myoclonic epilepsy. *Neurology* 57:708–711.
- Gonzalez-Alegre P, Afifi AK. 2006. Clinical characteristics of childhood-onset (juvenile) Huntington disease: Report of 12 patients and review of the literature. *J Child Neurol* 21:223–229.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72:971–983.
- Jech R, Klempir J, Vymazal J, Zidovska J, Klempirova O, Ruzicka E, Roth J. 2007. Variation of selective gray and white matter atrophy in Huntington's disease. *Mov Disord* 22:1783–1789.
- Milunsky JM, Maher TA, Loose BA, Darras BT, Ito M. 2003. XL PCR for the detection of large trinucleotide expansions in juvenile Huntington's disease. *Clin Genet* 64:70–73.
- Nahas FA, Garbern J, Krajewski KM, Roa BB, Feldman GL. 2005. Juvenile onset Huntington disease resulting from a very large maternal expansion. *Am J Med Genet Part A* 137A:328–331.
- Nance MA, Myers RH. 2001. Juvenile onset Huntington's disease—Clinical and research perspectives. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7:153–157.
- Nance MA, Mathias-Hagen V, Breningstall G, Wick MJ, McGlennen RC. 1999. Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with juvenile Huntington's disease. *Neurology* 52:392–394.
- Papapetropoulos S, Lopez-Alberola R, Baumbach L, Russell A, Gonzalez MA, Bowen BC, Singer C. 2005. Case of maternally transmitted juvenile Huntington's disease with a very large trinucleotide repeat. *Mov Disord* 20:1380–1383.
- Ranen NG, Stine OC, Abbott MH, Sherr M, Codori AM, Franz ML, Chao NI, Chung AS, Pleasant N, Callahan C, et al. 1995. Anticipation and instability of IT-15 (CAG)<sub>n</sub> repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease. *Am J Hum Genet* 57:593–602.
- Rasmussen A, Macias R, Yescas P, Ochoa A, Davila G, Alonso E. 2000. Huntington disease in children: Genotype-phenotype correlation. *Neuropediatrics* 31:190–194.
- Ribai P, Nguyen K, Hahn-Barma V, Gourfinkel-An I, Vidailhet M, Legout A, Dode C, Brice A, Durr A. 2007. Psychiatric and cognitive difficulties as indicators of juvenile Huntington disease onset in 29 patients. *Arch Neurol* 64:813–819.
- Ruocco HH, Bonilha L, Li LM, Lopes-Cendes I, Cendes F. 2008. Longitudinal analysis of regional grey matter loss in Huntington disease: Effects of the length of the expanded CAG repeat. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:130–135.
- Seneca S, Fagnart D, Keymolen K, Lissens W, Hasaerts D, Debulpaep S, Desprechins B, Liebaers I, De Meirleir L. 2004. Early onset Huntington disease: A neuronal degeneration syndrome. *Eur J Pediatr* 163:717–721.
- Yoon G, Kramer J, Zanko A, Guzijan M, Lin S, Foster-Barber A, Boxer AL. 2006. Speech and language delay are early manifestations of juvenile-onset Huntington disease. *Neurology* 67:1265–1267.

## Identification of loss-of-function mutations of *SLC35D1* in patients with Schneckenbecken dysplasia, but not with other severe spondylodysplastic dysplasias group diseases

T Furuichi,<sup>1</sup> H Kayserili,<sup>2</sup> S Hiraoka,<sup>3</sup> G Nishimura,<sup>4</sup> H Ohashi,<sup>5</sup> Y Alanay,<sup>6</sup> J C Lerena,<sup>7</sup> A D Aslanger,<sup>2</sup> H Koseki,<sup>3</sup> D H Cohn,<sup>8</sup> A Superti-Furga,<sup>9</sup> S Unger,<sup>9,10</sup> S Ikegawa<sup>1</sup>

► Additional table and figure are published online only at <http://jmg.bmj.com/content/vol46/issue8>

<sup>1</sup>Laboratory of Bone and Joint Diseases, Center for Genomic Medicine, RIKEN, Minato-ku, Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Medical Genetics Department, Istanbul Medical Faculty, Istanbul University, Capa/Istanbul, Turkey; <sup>3</sup>Laboratory for Developmental Genetics, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, Yokohama, Kanagawa, Japan; <sup>4</sup>Department of Radiology, Tokyo Metropolitan Kiyose Children's Hospital, Kiyose, Tokyo, Japan; <sup>5</sup>Division of Medical Genetics, Saitama Children's Medical Center, Saitama, Japan; <sup>6</sup>Department of Pediatrics, Ihsan Dogramaci Children's Hospital, Hacettepe University School of Medicine, Ankara, Turkey; <sup>7</sup>Medical Genetic Center, Instituto Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>8</sup>Medical Genetics Research Institute, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, California, USA; <sup>9</sup>Center for Pediatrics and Adolescent Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany; <sup>10</sup>Institute for Human Genetics, University of Freiburg, Freiburg, Germany

Correspondence to:  
Dr S Ikegawa, Laboratory of Bone and Joint Diseases, Center for Genomic Medicine, RIKEN, 4-6-1 Shirokane-dai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan;  
[sikegawa@ims.u-tokyo.ac.jp](mailto:sikegawa@ims.u-tokyo.ac.jp)

Received 3 December 2008  
Revised 4 April 2009  
Accepted 29 April 2009  
Published Online First  
8 June 2009

### ABSTRACT

**Background:** Schneckenbecken dysplasia (SBD) is an autosomal recessive lethal skeletal dysplasia that is classified into the severe spondylodysplastic dysplasias (SSDD) group in the international nosology for skeletal dysplasias. The radiological hallmark of SBD is the snail-like configuration of the hypoplastic iliac bone. *SLC35D1* (solute carrier-35D1) is a nucleotide-sugar transporter involved in proteoglycan synthesis. Recently, based on human and mouse genetic studies, we showed that loss-of-function mutations of the *SLC35D1* gene (*SLC35D1*) cause SBD.

**Object:** To explore further the range of *SLC35D1* mutations in SBD and elucidate whether *SLC35D1* mutations cause other skeletal dysplasias that belong to the SSDD group.

**Methods and results:** We searched for *SLC35D1* mutations in five families with SBD and 15 patients with other SSDD group diseases, including achondrogenesis type 1A, spondylometaphyseal dysplasia Sedaghatian type and fibrochondrogenesis. We identified four novel mutations, c.319C>T (p.R107X), IVS4+3A>G, a 4959-bp deletion causing the removal of exon 7 (p.R178fsX15), and c.193A>C (p. T65P), in three SBD families. Exon trapping assay showed IVS4+3A>G caused skipping of exon 4 and a frameshift (p.L109fsX18). Yeast complementation assay showed the T65P mutant protein lost the transporter activity of nucleotide sugars. Therefore, all these mutations result in loss of function. No *SLC35D1* mutations were identified in all patients with other SSDD group diseases.

**Conclusion:** Our findings suggest that *SLC35D1* loss-of-function mutations result consistently in SBD and are exclusive to SBD.

Schneckenbecken dysplasia (SBD; OMIM 269250) is an autosomal recessive perinatally lethal skeletal dysplasia.<sup>1-3</sup> The German term "Schneckenbecken" refers to the distinctive, snail-like appearance of the ilia due to medial bone projection from the inner iliac margin. Other skeletal hallmarks of SBD include thoracic hypoplasia, severe flattening of the vertebral bodies with absent ossification of the posterior parts of the vertebral bodies, and short thick long bones. Histological findings in SBD include large, round, and centrally located chondrocyte nuclei, scarce extracellular matrix, and an absence of columnar alignment of proliferating chondrocytes in the growth plate.

SBD belongs to the "severe spondylodysplastic dysplasias (SSDD)" group in the international nosology for skeletal dysplasias,<sup>4</sup> which includes achondrogenesis type 1A (ACG1A; OMIM 200600), spondylometaphyseal dysplasia (SMD) Sedaghatian type (OMIM 250220), and fibrochondrogenesis (FCG; OMIM 228520) (supplemental table 1). ACG1A shows more poorly ossified vertebral bodies, more hypoplastic ilia with protruded medial margins and arched lower margins, and misshapen, stellate tubular bones.<sup>5</sup> SMD Sedaghatian type exhibits better ossified vertebral bodies, less hypoplastic ilia, and milder tubular bone shortening. The medial projection of the ilia is very subtle, while the metaphyseal cupping and irregularity are conspicuous.<sup>6</sup> FCG is a disorder most similar to SBD, particularly in its absent ossification of the posterior parts of the vertebral bodies; however, the iliac medial projection is less conspicuous and the tubular bone shortening is more pronounced with bulbous metaphyses.<sup>7</sup> The aetiology of these disorders remains unknown except for a part of SMD Sedaghatian type.<sup>8</sup>

Recently, we reported mutations of the solute carrier-35 D1 (*SLC35D1*) gene (*SLC35D1*; OMIM 610804) in SBD—that is, three premature stop codon mutations that result in complete loss of *SLC35D1* function in two typical SBD patients.<sup>9</sup> This was the first report of identification of causative mutations for SBD and the first known gene for a disease in the SSDD group. *SLC35D1* is the nucleotide sugar transporter (NST) expressed in the endoplasmic reticulum (ER) and involved in proteoglycan (PG) synthesis.<sup>9-12</sup> *SLC35D1* transports UDP-GalNAc and UDP-GlcUA, the substrates used to synthesise CS, from the cytoplasm into the ER lumen.<sup>9-12</sup> We also reported that the *Slc35d1* deficient mouse develops a lethal form of severe short limbed dwarfism very similar to SBD.<sup>9</sup> The mice had defective chondroitin sulfate (CS) biosynthesis on the core protein of cartilage PGs. The CS chain in the mice was estimated to be half the length of the normal CS chain and it seemed to be reduced in number.

We showed that loss-of-function mutations of *SLC35D1* result in SBD phenotype; however, phenotypic consequences of other types of *SLC35D1* mutations remain elusive. It is intriguing to consider whether other types of *SLC35D1* mutations cause other skeletal dysplasias, particularly other disorders belonging to the SSDD group,