

200936137A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

# 肺胞低換気症候群の病態に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 早 坂 清

平成22 (2010) 年5月

# 目 次

## I. 総括研究報告

肺胞低換気症候群の病態に関する研究 .....	1
早坂 清	

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....

5

## III. 参考資料

1. アンケート .....	7
2. 研究についての患者への説明文書と同意書 .....	9
「肺胞低換気症候群もしくは中枢性睡眠時無呼吸の病態解明の研究へのご理解とご協力をお願い」	
「研究協力への同意書」	

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....

13

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括報告書

肺胞低換気症候群の病態に関する研究

研究代表者：早坂 清 山形大学医学部教授

**研究要旨** 肺胞低換気症候群や原因不明の中枢性睡眠時無呼吸症候群の病因を明らかにすること、および本疾患の DNA をバンクへの保管することを目的とし、日本人の肺胞低換気症候群における DNA の蒐集と *PHOX2B* 遺伝子の解析を計画した。当初、成人を対象としたが、従来の研究班の資料が利用出来ず、対象を先天性中枢性低換気症候群（congenital central hypoventilation syndrome: CCHS）とし疫学および遺伝子解析を進めた。結果は国内の 556 基幹病院から返答があり、79 名の症例の存在が明らかにされた。アンケートの回収率および小児人口約 2,200 万人を考慮すると、約 10 万人に一人と推定され、欧米と同様な有病率であった。CCHS が疑われ、*PHOX2B* 遺伝子解析の依頼があった 74 症例を解析し、アラニン伸長変異を 50 例、一塩基挿入変異（866InsG）を 1 例に検出した。家族を含めた検討では、成人に発症したものや感染症を契機に発症したものなどが検出された。多くは突然変異によるが、約 10% はモザイクなど症状のない親からの遺伝であった。成人を含めた中枢性の低換気を呈する、いわゆる肺胞低換気症候群の症例では、*PHOX2B* 変異を有する症例が多いことが予測され、解析が必要と考える。また、一部の検体に関しては、バンクへの保管の承諾が得られた。

研究分担者

佐々木綾子・山形大学医学部・講師

A. 研究目的

特定疾患のひとつである肺胞低換気症候群は、神経・筋疾患などは伴わず、肺機能も正常であるにもかかわらず肺胞換気量が低下し、高炭酸ガス血症を呈する疾患である。病因としては、呼吸中枢の異常と考えられているが、未だ病因は不明である。表 1 に示す疾患群が鑑別疾患と考えられる。平成 9 年の厚生省難病呼吸不全研究班による日本全国の疫学調査から、約 40 人の患者さんが存在する。

一方、先天性中枢性低換気症候群（congenital central hypoventilation syndrome: CCHS）は、呼吸中枢の先天的な異常

により新生児期に睡眠時低換気を、重症型では覚醒時にも低換気を来す疾患である。2003 年、呼吸中枢の形成に関与する転写調節因子 *PHOX2B* の異常が病因であると同定された。約 95% に認められる変異は、de novo のアラニンの伸長変異（5-13 アラニン伸長）である。さらに、近年、乳幼児期から成人期に発症する中枢性低換気症候群（late-onset central hypoventilation syndrome: LO-CHS）においても、*PHOX2B* の異常が約 70% の症例に確認された。LO-CHS は、肺胞低換気症候群に相当しており、国内では、私達が 1 家系を検出しているのみである。

本研究では、肺胞低換気症候群や原因不明の中枢性睡眠時無呼吸症候群の病因を明らかにし、適切な治療および遺伝カウンセリングを実施することを目的とし、肺胞低換気症候群の日

本人症例における *PHOX2B* 遺伝子の解析を計画した。平成9年、厚生省難病呼吸不全研究班で肺胞低換気症候群の疫学調査が実施され、日本全国に約40人の患者さんが存在することが報告されており、当初、この資料をもとに、主治医および患者さんの協力を得て、遺伝子解析を計画したが、残念ながら資料を利用することが出来なかった。

L0-CHS における *PHOX2B* の変異の関与、および国内における肺胞低換気症候群の疫学、CCHS の欧米における疫学をもとに、研究計画を再検討し、対象を CCHS の症例とし疫学および遺伝子解析を進めることとした。後述するように成人期に中枢性低換気が顕在化する CCHS 症例および CCHS 家族内に L0-CHS として成人期に中枢性低換気が発症している症例が検出され、当初の目的が果たす事が出来た。更に、本研究のもう一つの目的として難治性疾患である本疾患の DNA を蒐集し、バンクに保管し、他の研究者の利用を可能にすることである。

## B. 研究方法

全国の基幹病院（989 病院）における肺胞低換気症候群および原因不明な中枢性睡眠時無呼吸症例の有無について、アンケートによる一次調査を施行した。なお、本研究の内容および検体（DNA）のバンク保管について、山形大学医学部倫理委員会の承認を得ている。検査および検体の保管に関して、患者もしくは保護者から書面による承諾を得ている。バンク保管については、新規検索依頼の症例に限定された。

CCHS の疑いのある 74 症例の遺伝子解析は、原則的には既報に従い *PHOX2B* のエクソンおよびエクソン-イントロン移行部を PCR 法により増幅し、塩基配列を決定した。塩基配列は、big dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, USA) を用

いて、Applied Biosystems 3100 ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems, USA) により塩基配列を決定した。また、GeneScan Fragment Analysis (Applied Biosystems, USA) を用いて、伸長変異のモザイクを検出した。アラニン伸長変異を認めた症例に関しては、TA ベクターにサブクローニングして塩基配列を決定した。

## C. 研究結果及び考察

一次調査では、556 病院から返答があり、79 名の症例の存在が明らかにされた。アンケートの回収率および 15 歳以下の小児人口約 2,200 万人などを考慮すると、約 10 万人に一人と推定される。欧米の CCHS は 5-20 万人に一人と報告されており、同様な有病率と考える。

CCHS の疑いがあり、遺伝子解析の依頼のあった症例は 74 例であり、51 例に *PHOX2B* 変異検出した。アラニン伸長変異が 50 例、一塩基挿入変異 (866InsG) が 1 例であり、アラニン伸長変異では、25 ポリアラニン変異 13 例、26 以上のポリアラニン変異 37 例であった。

25 ポリアラニン変異を有する症例では、約 30% は乳幼児期に発症 (L0-CHS) している。症例の家系には、母 (30 歳代)、叔父 (30 歳代) 祖母 (60 歳代) と成人となり睡眠時低換気が発症した症例も検出された。また、感染症の罹患時のみ睡眠時低換気が出現・増悪する症例も確認された。25 ポリアラニン変異では、成人となり低換気を呈する症例や感染時に低換気が顕在化する症例も存在し、浸透率も低く、家族検索は重要である。

26 以上のポリアラニン変異を有する症例では、全て新生児期に発症し、巨大結腸症や慢性便秘を合併する症例も多い。

遺伝性に関して、5 例はモザイクで発症し

ていない親や LO-CHS に罹患しているが自覚していなかった親からの遺伝であった。家族を含めた遺伝子診断は、家族の罹患者の発見に有用であり、遺伝カウンセリング上も重要な情報が得られることが明らかにされた。

*PHOX2B*変異を認めなかった23症例では周産期に異常を認めたり、痙攣を伴ったりしていることが多く、二次性中枢性無呼吸症候群が考えられる。また、肥満や電解質異常を伴う特発性視床下部機能不全と考えられる3症例が含まれており、臨床的に鑑別して行く必要がある。

#### D. 結論

CCHS の罹患率は、欧米の報告と大きな違いはなく約 10-20 万人に一人と考えられる。また、CCHS の症例の解析から、新生児期以降に発症する LO-CHS の比率は CCHS の約 8% である。人口一億人とする と 40-80 人の患者の存在が推定できる。平成 9 年の厚生省難病呼吸不全研究班による日本全国の疫学調査では、肺胞低換気症候群の患者さんは約 40 人と報告されており、内科領域で肺胞低換気症候群と診断される患者さんの多くは、*PHOX2B* 異常による LO-CHS と考えられる。肺胞低換気症候群において、家族を含めた *PHOX2B* の遺伝子解析は、病態を解明するために、また潜在する症例の発見に、有効な遺伝カウンセリングを実施するためにも重要であることが明らかにされた。

#### E. 研究成果

1) Arai H, Otagiri T, Sasaki A, Umetsu K, Hayasaka K. Polyalanine expansion of *PHOX2B* in congenital central hypoventilation syndrome: rs17884724:A>C is associated with seven-alanine expansion.

J. Hum. Genet 55:4-7, 2010

2) 早坂清, 荒井博子, 吉田悠紀, 佐々木綾子: 先天性中枢性低換気症候群 (congenital central hypoventilation syndrome) における *PHOX2B* 遺伝子異常について (論文投稿中)

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得無し

実用新案登録無し

表 1. 睡眠時無呼吸症候群の分類

1) 中枢性睡眠時無呼吸症候群

(1) 一次性

congenital central hypoventilation syndrome (CCHS)

late-onset central hypoventilation syndrome (LO-CHS)

Arnold-Chiari 奇形 (脳奇形症候群)

特発性視床下部機能不全

(2) 二次性

外傷

梗塞

感染

腫瘍

頭蓋内圧亢進 など

2) 閉塞性睡眠時無呼吸症候群

アデノイド (口蓋扁桃肥大) など

3) 混合性睡眠時無呼吸症候群

生理学的には閉塞性の亜型と考えられる。

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表



## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

### 雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Arai H, Otagiri T, Sasaki A, Umetsu K, Hayasaka K	Polyalanine expansion of PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome: rs17884724:A>C is associated with seven-alanine expansion.	J. Hum. Genet	55	4-7	2010
早坂清, 荒井博子, 吉田悠紀, 佐々木綾子	先天性中枢性低換気症候群 (congenital central hypoventilation syndrome)における PHOX2B 遺伝子異常について	論文投稿中			

### Ⅲ. 参 考 资 料

アンケート調査

診療科 責任者様

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業  
「肺胞低換気症候群の病態に関する研究」

研究代表者 早坂 清（山形大学医学部小児科学講座）

拝啓

晩秋の候、皆様には益々ご健勝のこととお慶び申し上げます。

さて、今回、本邦に於ける肺胞低換気症候群（中枢性低換気症候群：睡眠時のみの低換気も含む）の実態を把握し、病因を解析するため、厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）の研究班による調査を実施することとなりました。本調査は、患者数の推計、症状・診断・治療の実態把握を通じ、病態を明らかにすることを目的とし、実施するものであります。

つきましては、ご多忙中誠に恐縮に存じますが、過去約 10 年間（1999 年 1 月 1 日～）の貴診療科における該当患者経験数をご記入いただき、2009 年 11 月末日までにご返信くださいますよう、お願い申し上げます。

該当患者ご経験ありの場合、後日二次調査を送らせていただきますので、重ねて御協力をお願い申し上げます。

ご不明の点がございましたら、下記事務局までお問い合わせください。

敬具

2009 年 11 月

疫学調査事務局： 〒990-9585 山形県山形市飯田西 2-2-2  
山形大学医学部小児科学講座  
担当 早坂 清  
Tel : 023-628-5329, Fax : 023-628-5332  
Mail : hayasaka@med.id.yamagata-u.ac.jp



## 肺胞低換気症候群もしくは中枢性睡眠時無呼吸の病態解明の研究へのご理解とご協力をお願い

肺胞低換気症候群もしくは中枢性睡眠時無呼吸は、呼吸中枢の異常が原因と考えられていますが、多くの患者さんでは原因が不明です。近年、生まれて間もなく睡眠時に呼吸が抑制される先天性中枢性低換気症候群では、PHOX2Bという遺伝子の異常（殆どは突然変異）が原因であることが明らかにされました。

最近、新生児期以降（生後1ヶ月から成人に至るまで）に発症する中枢性低換気症候群の約8割に、PHOX2Bの異常が検出されることが報告されました。

欧米では、可成りの数の患者さんが検出されておりますが、国内では私達が報告した3人の患者さんのみです。

今回、肺胞低換気症候群や原因不明の中枢性睡眠時無呼吸と診断されている方を対象とし、遺伝子検索を行い、病気の原因を明らかにし、適切な診断および治療法を確立することを目的として研究することに致しました。

是非とも、研究にご協力頂けますように、お願い申し上げます。

### 【同意の表明の前にご理解頂くべき項目と説明】

#### (1) 研究協力の任意性と撤回の自由

この研究への協力の同意はあなたの自由意志で決めて下さい。強制はまったくありません。また、同意されない場合でも、それを理由にあなたの不利益をこうむることは一切ありません。一旦同意した場合でも、あなたが不利益を受けることなく、いつでも同意を取り消すことができ、その場合は採取した血液などの試料や遺伝子を調べた結果は完全に廃棄されます。ただし、同意を取り消した時すでに研究結果が論文などで公表されていた場合などは、遺伝子を調べた結果の一部は廃棄することができないことがあります。

#### (2) 研究計画

##### 《研究課題名》

肺胞低換気症候群の病態の研究

##### 《研究期間》

平成20年10月1日～平成25年3月31日

##### 《研究責任者氏名》

早坂 清（山形大学医学部小児科学講座・教授）

##### 《研究機関》

山形大学医学部（主たる研究機関）

##### 《研究目的》

この研究は、肺胞低換気症候群の発症に関わる遺伝子を見出すことにより、将来的に、より有効な治療・予防や、より正確な診療などに結びつけられるようにしようとするものです。

##### 《研究方法》

この研究に際して、ご提供頂く試料は血液です。

血液：通常の方法で血液を3-10ミリリットル採血します。採血にともなう身体への重大な危険性はありません。

また遺伝子を解析することにより、後になってあなたが不安を感じたり、または、相談したいことができた場合のために、インフォームド・コンセント担当者もしくは相談窓口を確保し、誠意を持って対応いたします。また必要に応じて、遺伝カウンセリング担当者によるカウンセリングを行います。

#### 《研究計画等の開示》

ご希望があれば、個人情報保護や研究遂行に支障が生じない範囲内で、研究の計画書の内容を見ることができます。また、遺伝子を調べる方法等に関する資料が必要な場合はそれをご用意します。

#### (3) 試料提供者にもたらされる利益および不利益

本研究に参加することにより、病因が明らかにされる可能性があります。明らかにされれば、治療方針がある程度明らかにされます。また、遺伝についても情報が得られ、対処法などの情報も得られます。

一方、あなたが受ける不利益としては、あなた自身の遺伝子解析結果が外部に漏れた場合、生命保険加入の際の障害、社会における不当な差別などにつながる可能性が考えられます。しかしながら、以下(4)で申し上げるような嚴重な配慮を致しますので、情報が第三者に漏れることは決してありません。

#### (4) 個人情報の保護

この遺伝子解析研究が明らかにする個人情報は決して外部に漏れることがないように責任をもって嚴重に管理致します。あなたの血液は、遺伝子解析を行う前に、個人識別情報管理者(刑法により業務上知り得た秘密を漏らすことが禁じられている医師又は薬剤師で、山形大学医学部長が指名した者)が、個人情報(住所、氏名、生年月日、電話番号など)の代わりに無作為のコード番号をつけます。コード番号と個人情報の対応表は、この個人識別情報管理者のみが開閉できる専用の金庫に嚴重に保管され、研究者を含めて他の関係者からも見ることはできません。

#### (5) 遺伝子解析結果の取り扱い

遺伝子解析の結果は電子化され、山形大学医学部小児科学講座において以下のように嚴重に管理されます。

1. ネットワークに接続されていないパスワード保護されたコンピューターのハードディスクに暗号化することで保管されます。
2. コンピューターは研究責任者の嚴重な管理のもとで、第三者が操作することができないようになっています。こうすることによって、あなたの遺伝子を解析したいかなる結果も、予期せず第三者に漏洩することは起こり得ません。

#### (6) 遺伝子解析結果の開示

この研究によって判明した遺伝子解析結果は、あなたの遺伝子情報に限り、あなたの求めがあった場合にのみ、情報を開示します。その際、遺伝カウンセリングを希望される場合には、実施をいたします。なお、一般的な研究の進み具合やその成果については、あなたの求めに応じ、そのつど、分かりやすくご説明いたします。

#### (7) 研究成果の公表

あなたの協力によって得られた研究の成果は、提供者本人やその家族の氏名や個人情報が決して明らかにならないようにした上で、学会発表や学術雑誌等で公に発表されることがあります。

#### (8) 研究から生じる知的財産権の帰属

遺伝子解析研究の結果として特許権などが生じる可能性があります。その権利は研究機関に帰属し、あなたには帰属しません。また、その特許権などをもととして経済的利益が生じる可能性があります。これについてもあなたには権利は帰属しません。

### (9) 費用負担について

ここで行われる遺伝子解析研究に必要な費用は、あなたが負担することは一切ありません。ただし、あなたに対して交通費やお礼金をお支払いすることはありません。また、この研究によって病気の原因が明らかとなり、その診断あるいは治療が必要となる可能性があります。この場合、一般診療に要する費用のうち自己負担分については、あなたが負担しなければならないことをご了承下さい。

### (10) 研究終了後の試料等の取扱い方法

あなたの血液や皮膚組織などの試料等は、原則として本研究のためだけに用いさせていただきますが、もしご同意いただいた場合には、検査後、試料等（血液、皮膚組織、DNA、RNA など）を本研究に関連する将来の研究のための貴重な資源として、本研究終了後も保管させて頂きたいと思っております。試料は、厚生労働省が関わるバンクに厳重に保管され、肺胞低換気症候群の病態解明のために、研究者に提供されます。勿論、各研究については、厳密に審査され、承認を受けた後に提供されます。

この場合も試料等を誰のものかわからないように匿名化して、公的バンクに厳重に保管されます。なお、将来、あなたが保管を希望されなくなりましたら、文書にてお伝え頂ければ、直ちに廃棄されます。

### (11) 遺伝カウンセリングの体制

あなたが、病気のことや遺伝子解析研究に関して、不安に思うことがあったり、相談したいことがある場合には、私どもにその旨を申し出て下さい。必要とみなされた場合には、山形大学医学部内に設置された遺伝カウンセリング室もしくは各地区の遺伝カウンセリング専門医をご紹介します。

以上で全てですが、ご質問があれば遠慮なくお尋ね下さい。以上の事項をよくご理解いただいた上で、あなたが研究協力に同意していただける場合には、別紙の「研究協力への同意文書」にご署名の上、ご提出下さるようお願いいたします。

山形大学医学部小児科学講座  
教授 早坂 清

## 研究協力への同意書（被検者保存用）

山形大学医学部小児科学講座 教授  
早坂 清 殿

私（ ）は『肺胞低換気症候群の病態の研究』について、説明者（ ）により説明文書を用いて説明をうけ、遺伝子解析研究の方法、利益、不利益、結果の報告等について十分理解しました。

### 研究協力への同意

「はい」または「いいえ」に○をつけてください。

提供する血液が、この遺伝子解析研究に使用されることに同意します。

はい                      いいえ

### 遺伝子バンクにおける保管への同意

提供するDNAが厚生労働省が関与する遺伝子バンクに長期間保存され、肺胞低換気症候群の病態の解明の医学研究に使用されることに同意します。

はい                      いいえ

解析結果の通知を希望いたします。

はい                      いいえ

年      月      日

住所 \_\_\_\_\_

氏名（患者） \_\_\_\_\_ 署名 \_\_\_\_\_

氏名（代諾者） \_\_\_\_\_ 署名 \_\_\_\_\_

説明者の氏名 \_\_\_\_\_ 説明者の署名または捺印 \_\_\_\_\_



#### IV. 研究成果の刊行物・別刷



ORIGINAL ARTICLE

# Polyalanine expansion of *PHOX2B* in congenital central hypoventilation syndrome: rs17884724:A > C is associated with 7-alanine expansion

Hiroko Arai<sup>1</sup>, Tesshu Otagiri<sup>1</sup>, Ayako Sasaki<sup>1</sup>, Kazuo Umetsu<sup>2</sup> and Kiyoshi Hayasaka<sup>1</sup>

With congenital central hypoventilation syndrome (CCHS), most patients have a *de novo* 5–13 polyalanine expansion mutation in *PHOX2B*. We reported previously that *de novo* polyalanine expansion mutations were of paternal origin and were derived from unequal sister chromatid exchange during spermatogenesis in six and four informative families, respectively. In this study, we analyzed the relationship between haplotypes and *de novo* polyalanine expansion in *PHOX2B* and found that haplotypes carrying rs17884724:A > C were detected frequently in 7-alanine expanded (27-alanine) mutant alleles, which are the most prevalent mutations in CCHS. The allele with rs17884724:A > C made fewer nucleotide mismatches in the misalignment at crossing-over than the allele without rs17884724:A > C. The high frequency of rs17884724:A > C in 7-alanine expansion (27-alanine) mutations also supported the unequal crossover mechanism for polyalanine expansion. We also confirmed the paternal origin of *de novo* polyalanine expansion mutation and unequal sister chromatid exchange association in three more patients. In spite of paternal bias, the paternal age effect on CCHS incidence was not observed. *De novo* polyalanine expansion mutations are mainly derived from unequal sister chromatid exchange during spermatogenesis because of replication and/or repair systems that are specific for spermatogenesis.

*Journal of Human Genetics* advance online publication, 30 October 2009; doi:10.1038/jhg.2009.109

**Keywords:** congenital central hypoventilation syndrome; *PHOX2B*; polyalanine; trinucleotide repeats; unequal sister chromatid exchange

## INTRODUCTION

Congenital central hypoventilation syndrome (CCHS; MIM 209880) is characterized by failure of the automatic control of breathing during sleep, and results from the dominant *PHOX2B* mutation. About 90% of patients have *de novo* polyalanine expansion mutations in the polyalanine tract of 20 residues.<sup>1–6</sup> Approximately 5% of patients inherit polyalanine expansion mutations mostly from asymptomatic parents with somatic mosaicism and rarely from affected parents. Polyalanine expansion disorders constitute one family of homopolymer expansion disorders, including at least nine disorders. Expanded polyalanine tracts are encoded for by imperfect GCA, GCG, GCC and GCT repeats; they are meiotically and somatically stable. Warren<sup>7</sup> inferred unequal crossover as a causative mechanism of the polyalanine expansion of *HOXD13* in synpolydactyly I. In 2007, we reported that *de novo* polyalanine expansion mutations of *PHOX2B* were of paternal origin and were derived from unequal sister chromatid exchange in six and four informative CCHS families, respectively.<sup>8</sup> In contrast, Trochet *et al.*<sup>9</sup> suggested mechanisms other than unequal crossing-over on the basis of data of three rare complex

polyalanine expansion mutations. Parodi *et al.*<sup>10</sup> reported that *de novo* polyalanine expansion of *PHOX2B* was derived, respectively, from maternal allele and paternal allele in 7 and 13 CCHS patients.

In this paper, we studied the relationship between haplotypes and polyalanine expansion in *PHOX2B* and found that haplotypes carrying rs17884724:A > C are associated with a 7-alanine expansion (27-alanine) mutation, which supports that unequal crossover is involved in *de novo* polyalanine expansion mutation. We also confirmed paternal origin and association with unequal sister chromatid exchange during spermatogenesis of polyalanine expansion in three more CCHS patients.

## MATERIALS AND METHODS

The ethics committee of the Yamagata University School of Medicine approved this study. After receiving written informed consent from the patients' families, peripheral blood was collected from patients and family members for genomic DNA extraction. We studied 39 patients (male/female ratio, 18:21) with CCHS, including 29 previously analyzed cases and 10 newly diagnosed patients.<sup>2,8,11</sup> Seven patients carried 5, 13 patients carried 6, 14 patients carried 7, single

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Yamagata University School of Medicine, Yamagata, Japan and <sup>2</sup>Department of Legal Medicine, Yamagata University School of Medicine, Yamagata, Japan

Correspondence: Professor K Hayasaka, Department of Pediatrics, Yamagata University School of Medicine, 2-2-2 Iida-nishi, Yamagata 990-9585, Japan.  
E-mail: hayasaka@med.id.yamagata-u.ac.jp

Received 7 July 2009; revised 26 August 2009; accepted 6 October 2009

patients each carried 10, 11 and 12, and 2 patients carried 13 polyaniline expansion mutations. We analyzed six single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and three deletion–insertion polymorphisms (DIPs) in *PHOX2B* as follows: one DIP (rs72266779) and two SNPs (rs4608840 and rs6811325) in intron 1, one SNP (rs2196822) and two DIPs (rs3038692 and rs10614480) in intron 2 and three SNPs (rs17884724, rs6826373 and rs11723860) in exon 3. They were all within the same haplotype block. For the analysis of SNPs and DIPs, we amplified the *PHOX2B* genome using three-set primers described in our previous paper.<sup>8</sup> We studied all SNPs and DIPs by sequence determination using amplified products from genomic DNA and after subcloning of PCR-amplified products into the TA cloning vector. The primers used for sequence determination were designed on the basis of the genomic database (accession number NC\_000004.10). We classified the haplotypes into five (A–E) groups on the basis of the information of SNPs and DIPs, and determined the parental origin and chromosomal events of polyaniline expansion by haplotype analysis. Paternity was confirmed using 16 markers provided with the AmpFLSTR identifier kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Comparison of rs17884724:A>C frequencies in wild (20-alanine) alleles and mutant polyaniline expanded alleles was performed by Fisher's test. *P*-values <0.05 were considered to be significant.

## RESULTS

We detected polyaniline expansion mutations of *PHOX2B* in 39 patients. Familial mutant analysis and paternity testing indicated that each mutation in all families occurred as a *de novo* event.

To investigate the relationship between haplotypes and polyaniline expansion in *PHOX2B*, we determined six SNPs and three DIPs in 108 *PHOX2Bs* carrying the 20-alanine tract from healthy control individuals and 39 *PHOX2Bs* carrying the 25–33 (5–13 expanded) alanine tract from CCHS patients. On the basis of data from SNPs and DIPs, we classified them into five (A–E) haplotypes (Table 1). Table 2 presents a comparison of haplotypes between wild alleles with 20-alanine tracts and mutant alleles with 25 to 33-alanine tracts. The number of participants in our study limited the statistical analysis of the relationship between the haplotype and the polyaniline expansion. However, one allele of haplotype B and nine alleles of haplotype D were detected in 27-alanine (7-alanine expanded) mutant alleles, a most prevalent expansion mutation. Both haplotypes carry rs17884724:A>C. The frequency of rs17884724:A>C in the wild alleles with the 20-alanine tract was 0.10; however, the frequency of rs17884724:A>C in mutant alleles with the 27-alanine tract was 0.71, a significantly high frequency (*P*<0.01). In contrast, haplotypes B and D carrying rs17884724:A>C were very few (or none) in other polyaniline expansion mutations and there was no significant difference in the frequency of rs17884724:A>C between wild and other alanine expanded alleles. As presented in Figure 1, the allele with rs17884724:A>C is expected to form fewer nucleotide mismatches in the misalignment at crossover than the allele with rs17884724:A.

Regarding the paternal origin and alanine expansion mechanism, we studied 10 newly diagnosed families on the basis of haplotype

information. We confirmed the paternal origin of expansion mutation and unequal sister chromatid exchange event during spermatogenesis in three informed families (Figure 2). We also identified three other patients who possibly received mutant alleles from their fathers because these patients inherited normal alleles from their mothers and were negative for the maternal disomy of chromosome 4 by the detection of paternal *FGA* (marker on chromosome 4) by a paternity test.

To investigate whether the frequent mitotic division in paternal gametogenesis is associated with this paternal bias, we studied a 'male age effect on the incidence of CCHS' in 34 informative families. However, we were unable to detect any effect of paternal age on the offspring of patients, as depicted in Figure 3, suggesting that simple replication errors are not a major cause of *de novo* polyaniline expansion mutation of *PHOX2B*.

## DISCUSSION

Trinucleotide repeat sequences encoding polyaniline or polyglutamine tracts can form secondary structures. The formation of these secondary structures is considered to compromise DNA replication, thereby leading to expansion of those repeat sequences.<sup>12</sup> In contrast to strand slippage in complete trinucleotide repeats encoding polyglutamine tracts in polyglutamine expansion disorders, incomplete trinucleotide repeats encoding polyaniline tracts in polyaniline expansion disorders were considered to result from an unequal crossover.<sup>7</sup> As a matter of fact, CCHS is a polyaniline expansion disorder; most patients have a *de novo* 5–13 polyaniline expansion mutation in *PHOX2B*. In contrast, 5–13 polyaniline contractions are detected in normal healthy controls as polymorphisms. Combined with our previous report, we studied 23 families with a *de novo* polyaniline expansion and found that 9 (about 40%) families were informative for the parental origin of

Table 2 Haplotypes and polyaniline expansion

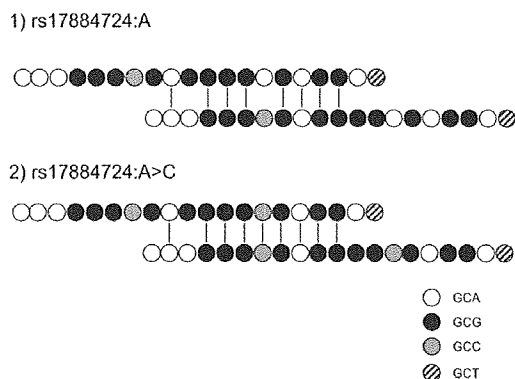
Alleles	Haplotypes					Total
	A	B	C	D	E	
Wild 20 Ala alleles	86	2	8	9	3	108
Expanded Ala alleles	23	1	4	11	0	39
25 Ala alleles	5	0	1	1	0	7
26 Ala alleles	11	0	2	0	0	13
27 Ala alleles	3	1	1	9	0	14
30 Ala alleles	1	0	0	0	0	1
31 Ala alleles	1	0	0	0	0	1
32 Ala alleles	1	0	0	0	0	1
33 Ala alleles	1	0	0	1	0	2

Data of wild alleles do not contain alanine-contracted alleles because some contracted alleles have no information of rs17884724.

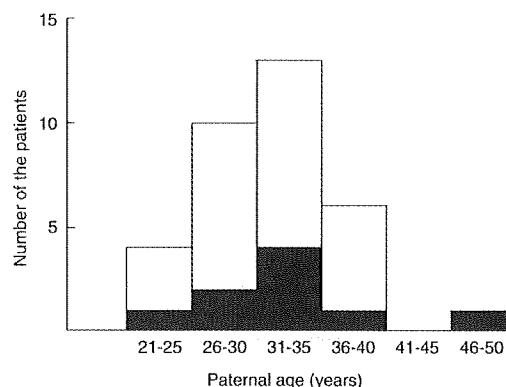
Table 1 *PHOX2B* haplotypes

Haplotypes	SNPs and DIPs								
	rs72266779	rs4608840	rs6811325	rs3038692	rs10614480	rs2196822	rs17884724	rs6826373	rs11723860
A	ag	c	c	ct	—	a	a	c	g
B	ag	c	c	ct	—	a	c	c	g
C	—	t	t	—	—	c	a	t	a
D	ag	t	t	—	—	c	c	t	a
E	ag	c	c	ct	—	a	a	t	a

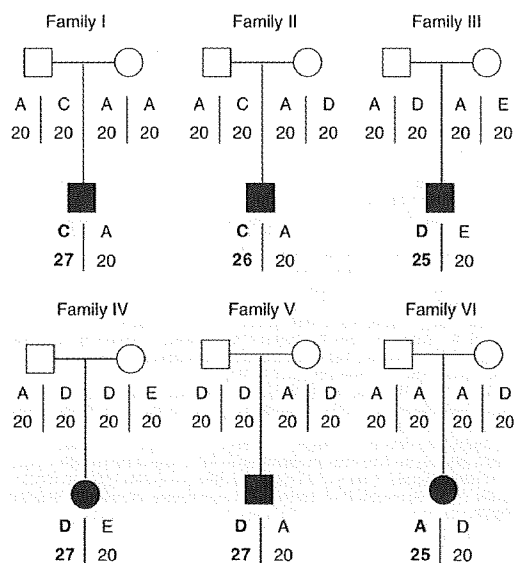
Abbreviations: DIP, deletion insertion polymorphism; SNP, single nucleotide polymorphism.



**Figure 1** Inferred alignment of polyalanine tracts of *PHOX2B* producing 7-alanine expansion by unequal crossing-over. Each distinct alanine codon is represented as a unique circle. The allele with rs17884724:A>C is expected to form fewer nucleotide mismatches than the allele with rs17884724:A.



**Figure 3** Paternal age effect on the incidence of congenital central hypoventilation syndrome (CCHS). Information regarding parental age was available for 34 of 39 patients. Black bars represent nine patients for whom paternal origin of polyalanine expansion was confirmed by haplotype analysis.



**Figure 2** Parental origin of *de novo* polyalanine expansion. Affected individuals are represented as solid symbols. Haplotypes and length of polyalanine tracts are shown beneath each subject. Polyalanine expanded alleles are described in bold. The patient in family I had a mutant 27-alanine allele showing haplotype C, which was derived from the father. The patient in family II had a mutant 26-alanine allele showing haplotype C and the patient in family III had a mutant 25-alanine allele showing haplotype D; haplotype information revealed that each expanded allele was derived from the allele of each patient's father. The patients in families IV, V and VI inherited wild 20-alanine alleles from their mothers and had no maternal disomy of chromosome 4, suggesting that mutant polyalanine expanded alleles (27-alanine alleles in families IV and V, and 25-alanine allele in family VI) were transmitted from fathers.

the mutant allele and all nine mutant alleles were of paternal origin. In addition, seven among nine (about 30%) families were also informative for chromosomal event and all seven mutations were derived from

an unequal sister chromatid exchange during spermatogenesis.<sup>8</sup> Regarding the relationship between haplotypes and polyalanine expansion, haplotypes carrying rs17884724:A>C were frequently detected in *de novo* 7-alanine expanded (27-alanine) alleles from unrelated patients. The 7-alanine expansion (27-alanine) mutation is the most prevalent expansion mutation. As presented in Figure 1, the allele with rs17884724:A>C is expected to form fewer nucleotide mismatches in the misalignment at crossover than the allele with rs17884724:A. Prevalence of rs17884724:A>C in 7-alanine expanded (27-alanine) alleles would also support that most *de novo* polyalanine expansion mutations are derived from an unequal crossover.

Regarding the parental origin and chromosomal events of polyalanine expansion, informative families by haplotype analysis are not many, about 30% of families. However, data from our informative families showed that all *de novo* polyalanine expansion mutations were of paternal origin and were derived from an unequal sister chromatid exchange during spermatogenesis.<sup>8</sup> Parodi *et al.*<sup>10</sup> studied 20 informative cases of parental origin by analyzing three SNPs and reported that *de novo* polyalanine expansion had occurred on the maternal allele in 7 patients and on the paternal allele in 13 patients. The reason for the difference from our data remains unclear; however, we cannot deny the possible influence of reaction artifacts during long PCR amplification. To avoid the influence of PCR errors, haplotype analysis seems to be a suitable method to study. Paternal expansion bias was also reported in most polyglutamine expansion disorders, another homopolymer expansion disorder,<sup>13</sup> as well as in Duchenne muscular dystrophy and achondroplasia.<sup>14,15</sup> Frequent mitotic division in paternal gametogenesis might contribute to sex differences in polyalanine expansion mutation rates. However, a 'male age effect' was not observed, as depicted in Figure 3, suggesting that simple replication errors are not a major cause of *de novo* polyalanine expansion mutation of *PHOX2B*. Frequent unequal sister chromatid exchange was observed in the yeast with *Sgs1* (homolog of human *BLM*) or *Mph1* (homolog of human *FANCM*) mutants.<sup>16,17</sup> In addition, increased sister chromatid exchange frequency in *Sgs1* mutants was reduced markedly by the disruption of the *Rad52* or *Msh2* gene, which is involved in mismatch repair.<sup>18</sup> De Gregori *et al.*<sup>19</sup> studied the parental origin of deletions in 5 *de novo* reciprocal translocations of chromosomes and 11 *de novo* complex chromosome rearrangements.