

## 遺伝子診断の臨床提供における経済的基盤整備の研究

研究分担者 松原洋一 東北大学大学院医学系研究科 教授

### 研究要旨

遺伝性疾患にたいする遺伝子検査の多くは、すでに臨床的に有用な検査として位置付けられているが、わが国ではその提供体制が整備されていない。本分担研究では、遺伝子診断提供のための経済的基盤整備について検討を行い、大規模ゲノム解析施設との連携を試行した。今後、このシステムに遺伝子検査項目を順次追加していくことにより、効率的かつ経済的な遺伝子検査提供が可能と考えられる。

### 共同研究者

小原 収（かずさDNA研究所） 遺伝子解析  
斉藤加代子（東京女子医科大学）

対照検体の提供と検査結果の検証

での研究では、ハブ組織としてのオーファンネットジャパンを中心に、大学研究室を結ぶ遺伝子検査提供ネットワーク構築をおこない、遺伝子検査の提供を実施してきた。今年度はさらに、より効率的で経済的な遺伝子検査提供体制を構築した。

### A. 研究目的

遺伝性疾患の診療においては、その診断確定や治療方針の決定、さらに家族への遺伝カウンセリングをおこなうために、しばしば遺伝子診断が必要とされる。近年、遺伝子診断が可能な疾患が急増しており、それらの臨床的有用性も確立されつつある。遺伝子診断は、臨床検査の一つとして診療のツールへ移行しつつある。

しかしながらわが国の診療体系では、染色体検査とわずかに15種類の遺伝学的検査にしか保険が適用されていない。したがって、実際に遺伝学的検査が必要となった場合には様々な困難が存在する。まず遺伝学的検査そのものが、院内はもとより検査会社でも提供されておらず、当該疾患の研究を行なっている研究室を探し出して検査を依頼する必要がある。また、遺伝学的検査の費用については、保険未収載のため従来は各研究室が研究の一環として無償提供してきた。しかしながら、財政的・人支援がないため、診断サービスの維持が困難となりつつある。この経済的基盤の欠如は、医療としての遺伝子検査の普及に大きな足枷となっている。

本研究の目的は、わが国において遺伝性疾患に対する遺伝子検査を医療として継続的に提供していくための経済的基盤について検討を加えるとともに、モデルシステムをデザインして実際に運用することにある。昨年度ま

### B. 研究方法

昨年度までに構築してきた稀少遺伝性疾患に対する遺伝子検査提供ネットワークに、さらに大規模ゲノム解析施設である「かずさDNA研究所」の参画をえて、あらたな遺伝子診療ネットワークを構築し、その運用を試行した。

#### （倫理面への配慮）

遺伝子解析に際しては、遺伝医学関連10学会により策定された「遺伝学的検査に関するガイドライン」（平成15年8月）および厚生労働省により策定された「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」（平成16年12月24日）を遵守して実施した。

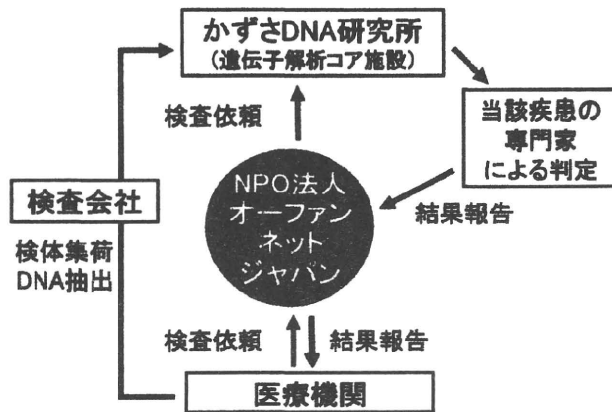
### C. 研究結果

#### （1）遺伝子検査の流れ

今年度の研究で構築した診療ネットワークを図1に示す。このネットワークでは、遺伝子検査を希望する医療機関、遺伝子解析実施施設、そして遺伝子解析結果を判定する専門家の3者の間に介在してコーディネートを行うオーファンネットジャパンが中心的機能を担う。オーファンネットジャパンが医療機関より遺伝子検査の依頼を受けた際には、検査会社であるエスアール

エル社に委託して、検体集荷、DNA抽出、検体搬送をおこなう。オーファンネットジャパンが検査を受理した段階でその検体に対してONJ番号が発行され、病院からエスアールエル社に血液検体が渡される時点ではすでに匿名化されている。

（図1）



抽出されたDNAはかずさDNA研究所に移送され、同研究所のオーファンネット解析チームによって当該遺伝子のシーケンス解析が行われる。解析が終了した段階で、そのデータを当該疾患の専門家がインターネットを通じて閲覧することができる。機密保持のため、ログインIDとパスワードはその都度専門家に通知される（図2）。遺伝子解析結果の一例を図3に示す。レファレンスシーケンスおよび既存のdbSNP データベースとの照合結果が一覧表となっている。

各疾患の専門家は、この結果と既知変異データベース（その多くは未公開で個人的に収集されたもの）を比較することによって、遺伝子検査結果報告書を作成する（図4）。この報告書はオーファンネット事務局に送付され、さらに本分担研究者である松原によって最終的な校正が行われる。

## （2）遺伝子検査の費用

遺伝子検査の費用については、受益者負担とし、医療機関が患者さんと協議の上何らかの形で負担していただいている。検査の価格は、DNA抽出と運搬費用（エスアールエル）、シーケンス解析費用（かずさ）、遺伝子解析結果判定費用（専門家）、そしてオーファンネット事務局手数料を合計したものである。後3者はいずれも非営利であるため、

検査会社では実現不可能な各設定で遺伝子検査を提供することが可能となった。具体的には、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの全エクソンシーケンス（79エクソン）は10万5千円で、ベルギーに本拠を置く GENDIA 社で提供されている価格（22万2千円）の半額である。また、乳児重症ミオクロニーてんかん（SCN1A）は5万5千円で、GENDIA 社の価格（21万円）のほぼ1/4である。

このほか、以下の検査項目はいずれも5万5千円で提供する予定である：

Arthrogryposis renal dysfunction and cholestasis 症候群（VPS33B）

Opitz 三角頭蓋症候群（CD96）

Hutchinson-Gilford progeria 症候群（LMNA）

乳児難治てんかん（SCN1A）

また、ウィルソン病（ATP7B）、糖原病 Ia 型（G6PC）については価格算定中である。今年度はすでに、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの遺伝子検査を実施提供した（検査結果判定は、研究協力者の斉藤加代子教授による）。

## D. 考察

今年度の研究では、「かずさDNA研究所」をパートナーとした新たな遺伝子診断提供体制を構築した。同研究所は、大規模ゲノム解析施設として世界的にも有数の存在であり、効率的、経済的かつ精度の高いシーケンス技術を有している。これまでの大学研究室を主体とした小規模で非効率的な解析システムと比較して、格段にコストを抑えながら、しかも迅速かつ高精度な解析結果を得ることが可能となった。さらに、シーケンス解析結果は、各疾患の専門家による判定を行うことによって最新の変異・多型データとの照合、過去の論文における誤謬の訂正がなされる。

その結果として、欧米の検査会社に比較して1/2～1/4という驚異的なコストで検査提供を行うことが可能となった。

さらに、オーファンネット事務局で行われる報告書の校正は、遺伝子検査に精通していない主治医にも容易に理解できるように説明を付加し、患者に説明する段階で可能な限り誤解や曖昧さが生じないように配

慮されている。

今後、検査項目を順次追加していくことによって稀少遺伝性疾患の遺伝子検査体制を整備していくことが可能と考えられる。

## E. 結論

わが国における稀少遺伝性疾患の遺伝子検査提供をおこなうために、大規模シーケンス解析施設と連携して効率的かつ経済的なネットワークを構築した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kobayashi T, et al. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. *Human Mutat* 31:284-294.2010

2) Ohtake A, et al. Non-Hodgkin lymphoma in a patient with cardio-facio-cutaneous syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010 Online

3) Komatsuzaki S, et al. *SHOC2* mutation analysis in Noonan-like syndrome and hematologic malignancies. *J Hum Genet* 55:801-809, 2010

4) Aizaki K, et al. Cardio-facio-cutaneous syndrome with infantile spasms and delayed myelination. *Brain & Development* 33:166-169, 2011

5) Kamada F, et al. A genome-wide association study identifies *RNF213* as the first Moyamoya disease gene. *J Hum Genet* 56:34-40, 2011

6) Ohashi H, et al. Implications of prenatal diagnosis of the fetus with both interstitial deletion and a small marker ring originating from Chromosome 5. *Am J Med Genet* (in press)

### 2. 学会発表

1) 松原洋一 稀少遺伝性疾患への取り組み：現状と展望～基礎研究の成果を臨床応用へ～ 日本人類遺伝学会第55回大会、大宮、平成22年10月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

図2 かずさDNA研究所からオーファンネットジャパンへの解析結果報告

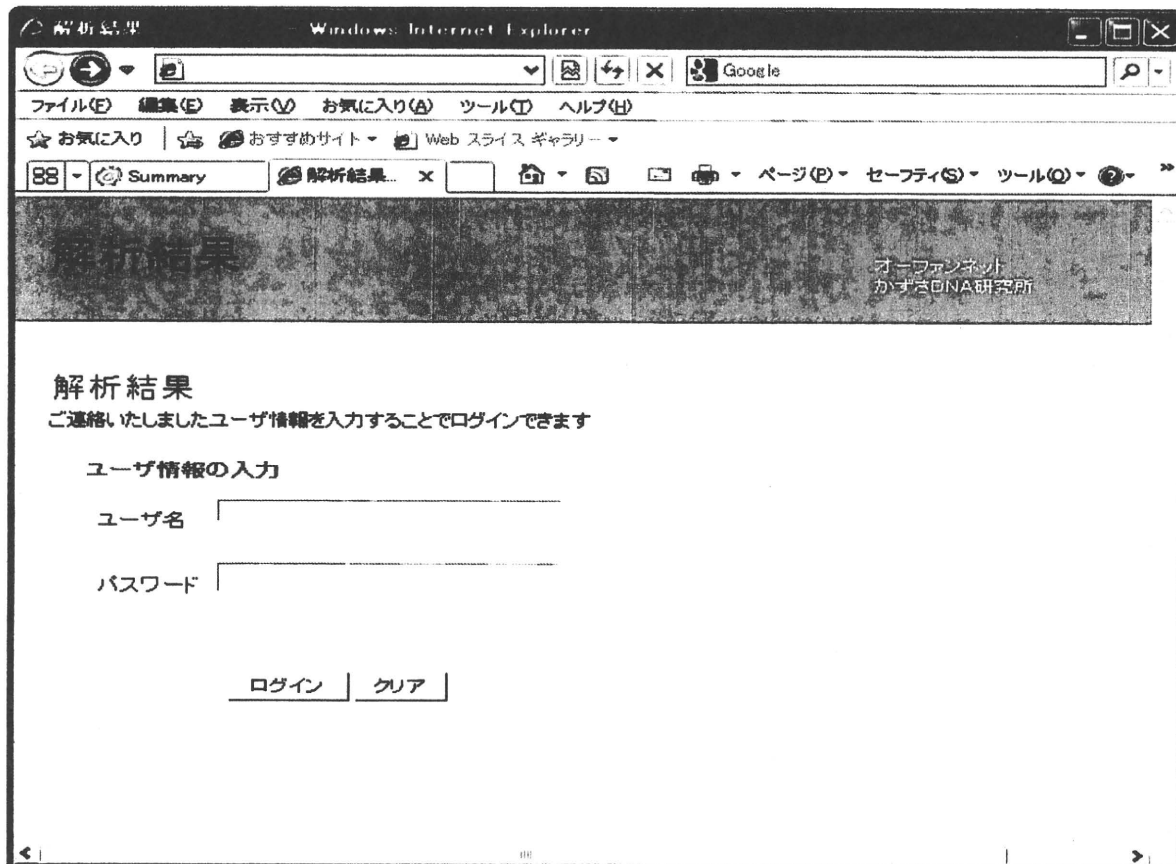


図3 遺伝子解析結果報告書

**Mutation Glance**

Summary of Find Mutation  
ATP7B - ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide  
20 sequence(s) found in your query.

Sequence #	Sequence Title	Sequence Type	Query Length	Mapped Region	Containing Unread Nucleotide	Mapping Status	# of Mutations Found
01	ATP7B_HO-w8_Exon01	Gene	126	1-126	0	OK	0
02	ATP7B_HO-w8_Exon02a	Gene	493	1-493	0	OK	0
03	ATP7B_HO-w8_Exon02b	Gene	468	1-468	0	OK	0
04	ATP7B_HO-w8_Exon02c	Gene	487	1-487	0	OK	1
05	ATP7B_HO-w8_Exon03	Gene	349	1-349	0	OK	0
06	ATP7B_HO-w8_Exon04	Gene	287	1-287	0	OK	0
07	ATP7B_HO-w8_Exon05	Gene	264	1-264	0	OK	0
08	ATP7B_HO-w8_Exon06	Gene	173	1-173	0	OK	0
09	ATP7B_HO-w8_Exon07	Gene	249	1-249	0	OK	0
10	ATP7B_HO-w8_Exon08	Gene	311	1-311	0	OK	2
11	ATP7B_HO-w8_Exon09	Gene	187	1-187	0	OK	0
12	ATP7B_HO-w8_Exon12	Gene	230	1-230	0	OK	1
13	ATP7B_HO-w8_Exon13	Gene	306	1-306	0	OK	0
14	ATP7B_HO-w8_Exon14	Gene	283	1-283	0	OK	0
15	ATP7B_HO-w8_Exon15	Gene	244	1-244	0	OK	0
16	ATP7B_HO-w8_Exon16	Gene	260	1-260	0	OK	1
17	ATP7B_HO-w8_Exon17	Gene	242	1-242	0	OK	0
18	ATP7B_HO-w8_Exon18-19	Gene	512	1-512	0	OK	1
19	ATP7B_HO-w8_Exon20	Gene	191	1-191	0	OK	0
20	ATP7B_HO-w8_Exon21	Gene	367	1-367	0	OK	0

Browse with Known Mutations | Data Download

5 mutations were found.

Mutation #	Title	Query		Reference		Exon/Intron	Type	Nucleotide change		Amino acid change		Known Variation		Features		Effect Predictor			
		Start	End	Start	End			Query	Reference	Query	Reference	Mutation	dbSNP	Pfam	3D Structure		UnProt	SEI	
1	ATP7B_HO-w8_Exon02c	369	369	plus	37491	37491	Exon 2	Substitution	G/T	T	c.1210T>G	Misense	p.Ser406Ala	Unknown	1801243	PF00483	Surface	NA	Tolerated
2	ATP7B_HO-w8_Exon08	226	226	plus	53139	53139	Exon 8	Substitution	G/C	C	c.2310C>G	Synonymous	-	Unknown	Unknown	PF00122	NA	Transmembrane	NA
3	ATP7B_HO-w8_Exon08	248	248	plus	53182	53182	Exon 8	Substitution	G/T	G	c.2333G>T	Misense	p.Arg778Leu	Unknown	Unknown	PF00122	NA	Transmembrane	Deleterious
4	ATP7B_HO-w8_Exon12	171	171	plus	61823	61823	Exon 12	Substitution	G/A	G	c.2859G>A	Misense	p.Arg952Lys	Unknown	732724	PF00122	NA	NA	Tolerated
5	ATP7B_HO-w8_Exon16	65	65	plus	70277	70277	Exon 16	Substitution	T/C	T	c.3410T>C	Misense	p.Val1140Ala	Unknown	1801249	PF00702	NA	NA	Tolerated
6	ATP7B_HO-w8_Exon18-19	269	269	plus	74025	74025	Intron	Substitution	T/C	C	c.3903+6C>T	Unknown	2282052	NA	NA	NA	NA	NA	

図4 検査依頼者への遺伝子解析結果報告書



## 遺伝学的検査結果報告書

医療機関名： ×××病院小児科 担当医氏名： ××××  
受付番号： ONJ-08-××  
検体種別： 血液  
検体採取日： 200×年×月×日  
結果報告日： 200×年×月×日

疾患名／遺伝子名： G6PC (Glucose-6-phosphatase 遺伝子)  
遺伝学的検査コード番号： GT-ONJ-232200

### 検査結果：

全翻訳領域にあたるエクソン1～5の直接シーケンスを行ったところ、エクソン5においてGからTへの置換がホモ接合のパターンで認められました。この変異 (g727t; 現行の表記法では c. 648G>T) は、日本人の糖原病 Ia 型患者でもっとも頻度が高い変異として報告されています。

### 判定：

糖原病 Ia 型と考えられます。

### コメント：

同定された変異は mRNA のスプライシング異常をきたすことが知られています。

### <参考文献>

- Kajihara et al. Am J Hum Genet 1995;57:549-555  
A kanuma et al. Am J Med Genet 2000;91:107-112

#### <遺伝子解析実施施設>

施設名： かずさDNA研究所 オーファンネット解析チーム  
実施責任者： 〇〇 〇〇

#### <遺伝子解析結果判定>

判定者： 〇〇 〇〇  
所属： 〇〇大学 〇〇研究室

特定非営利活動法人オーファンネット・ジャパン事務局

〒980-8574 仙台市青葉区星陵町1-1・東北大学大学院医学系研究科・遺伝病学分野内

E-mail: orphan-net@onj.jp TEL: (022) 717-8141 FAX: (022) 717-8142

## 先天性疾患の臨床的遺伝子診断と拠点施設の機能拡充

研究分担者 緒方 勤 国立成育医療研究センター研究所

### 研究要旨

本研究の目的は、小児先天性疾患および難治性疾患の臨床的遺伝子診断の継続的实施を可能とする基盤を整備することである。当該年度においては、遺伝子診断における留意点について検討した。その結果、(1) ミスセンス置換が、たとえ多数の健常者に見いだされなくとも、病的とは断定できないこと、(2) 現在なしうるすべての解析を行っても、原因が特定できないことがあること、(3) インプリンティング疾患においても、その発症機序が多岐にわたることが示された。これは、遺伝子診断が有用であると共に、限界と留意点を伴うことを明確に示すものであり、このようなデータの蓄積は、遺伝子解析結果の正しい解釈の重要性を喚起するものと考えられる。今後、ホームページから発信する予定である。

### 共同研究者

深見真紀、鏡雅代、伊達木澄人  
(国立成育医療研究センター研究所)

### A. 研究目的

本研究の目的は、小児先天性疾患および難治性疾患の臨床的遺伝子診断の継続的实施を可能とする基盤を整備することである。このために、研究分担者として、遺伝子診断法の整備と拠点機能の拡充を目的としている。そして、遺伝子診断法の整備に重点を置き、既に多数の遺伝子診断のための解析ツールを作成した。

しかし、遺伝子診断では、何をどこまで解析したのか、ということが問題となる。通常、ある遺伝子のタンパクコード領域のシーケンスが解析されるが、この場合、変異が認められたとき、特にミスセンス置換において、病的変異であるか否かが問題となる。通常、多数の健常者に見いだされた置換が存在しないとき病的置換とみなされるが、これはrare variantの可能性を否定するものではない。また、変異が見いだされないとき、遺伝的異質性（他の遺伝子異常の可能性など）が推測されるが、タンパクコード領域のシーケンスでは見いだされない異常（ヘテロの微小欠失、プロモーター異常、エンハンサー異常など）の存在が否定できない。本年度は、このような遺伝子診断にまつわる項目について検討した。

### B. 研究方法

多数の症例が集積されている疾患の代表として、(1) POU1F1, PROP1, HESX1, LHX3, LHX4, SOX3変異がごく少数の患者で同定されている汎下垂体機能低下症、(2) OTX2とSOX2が責

任遺伝子であることが判明している無眼球症、(3) SHOXを責任遺伝子とするLeri-Weil dyschondrosteosis (LWD)、(4) 第14染色体父性ダイソミー症候群を対象として、現在なしうるすべての解析を行い、上記の内容を検討した。

### （倫理面への配慮）

本研究で実施した遺伝子検査については、10学会が制定した「遺伝学的検査に関するガイドライン」およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成17年6月文部科学省厚生労働省経済産業省告示第1号）に従っている。また、国立成育医療センターおよび各検体の収集施設において予め倫理委員会の承認を得た後、書面によるインフォームド・コンセントを取得している。

### C. 研究結果

- 汎下垂体機能低下症：71例においてPOU1F1, PROP1, HESX1, LHX3, LHX4, SOX3のタンパクコード領域のシーケンス解析とMLPAによる各エクソンの欠失解析を行った。LHX4のヘテロ欠失が1例において同定された。さらに、LHX4-p.V201Iミスセンス置換が1例において見いだされ、この置換は健常者200例において認められなかった。しかし、POU1F1プロモーターを用いた機能解析により、LHX4-p.V201Iミスセンスタンパクが正常機能を有することが判明した。
- 無眼球症：12例においてSOX2とOTX2のタンパクコード領域のシーケンス解析

とMLPAによる各エクソンの欠失解析を行った。その結果、ナンセンス変異、フレームシフト変異、遺伝子欠失などの病的変異と共に、p.A245V-OTX2、p.T178S-OTX2という2つのミスセンス置換が認められた。これらは、健常者には見いだされなかったが、機能解析の結果は正常で、rare variantsと判定された(図1)。

- Leri-Weil dyschondrosteosis (LWD) : 29家系においてタンパクコード領域のシーケンズ解析、各エクソンの欠失を解析できるMLPA法、コード領域とエンハンサー領域のFISH解析、SHOX領域および候補領域であるHOX遺伝子群のアレイCGH解析を現例において行った。その結果、SHOX遺伝子内変異が5家系、遺伝子内微小欠失が3家系、タンパクコード領域の欠失が3家系、エンハンサー領域の欠失が3家系、タンパクコード領域とエンハンサー領域の欠失が12家系で見いだされた(図2)。しかし、3家系では、SHOX領域および候補領域であるHOX遺伝子群に異常は認められなかった。
- 第14染色体父性ダイソミー症候群 : 27例を対象としてDMRのメチル化解析、マイクロサテライト解析、欠失解析、変異解析、アレイCGH解析を行った。その結果、父性ダイソミーが17例で、微小欠失が6例で、エピ変異が4例で見いだされた(図3)。

#### D. 考察

汎下垂体機能低下症および無眼球症の成績は、ミスセンス置換が、たとえ多数の健常者に見いだされなくとも、病的とは断定できないことを示すものである。このようなrare variantは、今後遺伝子診断が進むにつれて増加すると推測され、正しい評価を誤らせる原因となりうるものである。機能解析の結果が、必ずしも生体内の状態を正確に反映するか否かは議論があるが、可能か限り機能解析をするべきであること、そして、このようなミスセンス置換がみとめられたときには、その病的意義の限界を正確に記載することの重要性を物語るものである。

一方、Leri-Weil dyschondrosteosis (LWD)におけるSHOX遺伝子解析の結果は、通常のタンパクコード領域のシーケンズ解析のみでは、多くの異常が見逃されることを示すものである。さらに、現在なしうるすべての解析

を行っても、原因がとくていけないことがあることを実証する。この場合も、陽性結果がえられないときには、度に様な解析をしたか、そして、陰性結果の意味づけを正確に記載することが重要と思われる。

第14染色体父性ダイソミー症候群の成績は、インプリンティング疾患においても、その発症機序が多岐にわたることを示すものである。今後、インプリンティング遺伝子変異解析、エピ変異解析、欠失解析、ダイソミー解析が必須になると思われる。

#### E. 結論

遺伝子診断の有用性と共に、限界と留意点が明確となってきた。このようなデータの蓄積は、遺伝子解析結果の正しい解釈の重要性を喚起するものであり、今後、ホームページから発信したいと考えている。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

1. Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T\*. Heterozygous *OTX2* mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (2): 756–764, 2010. (IF = 6.202)
2. Fukami M, Maruyama T, Dateki S, Sato N, Yoshimura Y, Ogata T\*. Hypothalamic dysfunction in a female with isolated hypogonadotropic hypogonadism and compound heterozygous *TACR3* mutations and clinical manifestation in her heterozygous mother. *Horm Res Paediatr* 73 (6): 477–481, 2010. (IF = 1.730)
3. Muroya K, Mochizuki T, Fukami M, Iso M, Fujita K, Ogata T\*. Diabetes mellitus in a Japanese girl with HDR syndrome and *GATA3* mutation. *Endocr J* 157 (2): 171–174, 2010. (IF = 1.806)
4. Fukami M\*, Nagai T, Mochizuki H, Muroya K, Yamada G, Takitani K, Ogata T. Anorectal and urinary anomalies and aberrant retinoic acid metabolism in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. *Mol Genet Metab* 100 (3): 269–273, 2010. (IF = 2.897)
5. Ashkenazi-Hoffnung L, Lebenthal Y, Wyatt AW, Ragge NK, Dateki S, Fukami M, Ogata T, Phillip M\*, Gat-Yablonski G. A

- novel loss of function mutation in *OTX2* is associated with phenotypically variable anophthalmia and isolated growth hormone deficiency. *Hum Genet* 127 (6): 721–729, 2010. (IF = 4.523)
6. Iijima K\*, Nozu K, Kamei K, Nakayama M, Ito S, Matsuoka K, Ogata T, Kaito H, Nakanishi K, Mastuo M. Severe Alport syndrome in a young woman caused by a t(X;1)(q22.3;p36.32) balanced translocation. *Pediatr Nephrol* 25 (10): 2165–2170, 2010. (IF = 2.425)
  7. Dateki S, Fukami M, Uematsu A, Kaji M, Iso M, Ono M, Mizota M, Yokoya S, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Ogata T\*. Mutation and gene copy number analyses of six pituitary transcription factor genes in 71 patients with combined pituitary hormone deficiency: identification of a single patient with *LHX4* deletion. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (8): 4043–4047, 2010. (IF = 6.202)
  8. Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T\*. The IG-DMR and the *MEG3*-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. *PLoS Genet* 6 (6): e1000992, 2010. (IF = 9.532)
  9. Yamazawa K, Nakabayashi K, Kagami M, Sato T, Saitoh S, Horikawa R, Hizuka N, Ogata T\*. Parthenogenetic chimaerism/mosaicism with a Silver-Russell Syndrome-like Phenotype. *J Med Genet* 47 (11): 782–785, 2010. (IF = 5.751)
  10. Kato H, Yoshida R, Tsukamoto K, Suga H, Eto H, Higashino T, Araki J, Ogata T, Yoshimura K\*: Familial cases of atypical clinical features genetically diagnosed as LEOPARD syndrome (multiple lentiginos syndrome). *Int J Dermatol* 49 (10): 1146–1151, 2010. (IF = 1.177)
  11. Hiraoka M\*, Takahashi H, Orimo H, Hiraoka M, Ogata T, Azuma N: Genetic screening of Wnt signaling factors in advanced retinopathy of prematurity. *Mol Vis* 16 (12): 2572–2577, 2010. (IF = 2.541)
  12. Matsubara K, Iwamoto H, Yoshida A, Ogata T\*: Semen analysis and successful paternity by intracytoplasmic sperm injection in a man with steroid 5 $\alpha$ -reductase-2 deficiency. *Fertil Steril* 94 (7): 2770.e7–2770.e10, 2010. (IF = 3.970)
  13. Suzumori N\*, Ogata T, Mizutani E, Hattori Y, Matsubara K, Kagami M, Suguhara-Ogasawara M: Prenatal diagnosis of paternal uniparental disomy 14: delineation of further patient. *Am J Med Genet A* 152A (12): 3189–3192, 2010. (IF = 2.404)
  14. Inoue H\*, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K: Identification and functional analysis of novel human growth hormone-releasing hormone receptor (*GHRHR*) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *Clin Endocrinol* [Epub ahead of print] 2010 Nov 2 doi: 10.1111/j.1365-2265.2010.03911.x.. (IF = 3.201)
  15. Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Matsubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T\*: Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes. *J Hum Genet* 56 (1): 91–93, 2011. (IF = 2.547)
  16. Inoue H\*, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K: Identification and functional analysis of novel human growth hormone secretagogue receptor (*GHSR*) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 Nov 17. [Epub ahead of print]. (IF = 6.202)
  17. Dateki S, Fukami M, Tanaka Y, Sasaki G, Moriuchi H, Ogata T\*: Identification of chromosome 15q terminal deletion with telomere sequences and its bearing on genotype-phenotype analysis. *Endocr J* (accepted).
  18. Fukami M, Muroya K, Miyake T, Iso M, Yokoi H, Suzuki Y, Tsubouchi K, Nakagomi Y, Kikuchi N, Horikawa R, Ogata T\*: *GATA3* abnormalities in six patients with HDR syndrome. *Endocr J* (accepted).
  19. Miyazaki O\*, Nishimura G, Kagami M, Ogata T: Radiological evaluation of dysmorphic thorax in paternal uniparental disomy for chromosome 14. *Ped Radiol* (accepted).
  20. Kalfa N, Cassorla F, Abdennabi IO, Audran F, Philibert P, Daures JP, Baskin L, Fukami M, Ogata T, C Sultan C\*: Exonic polymorphisms of *MAMLD1* (CXorf6) are associated with hypospadias. *J Urol* (accepted).



厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）  
分担研究報告書

21. Fukami, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T\*: Aromatase excess syndrome: identification of cryptic duplications and deletions leading to gain-of-function of *CYP19A1* and assessment of phenotypic determinants. (accepted).
  22. Stoppa-Vaucher S, Ayabe T, Paquette J, Patey N, Francoeur D, Vuissoz J-M, Deladoëy J, Ogata T, Deal CL: 46, XY gonadal dysgenesis: new point mutation in two siblings and a germ line mosaicism in their father. *J Clin Endocrinol Metab* (submitted).
  23. Kalfa N, Fukami M, Audran F, Philibert P, Pienkowski C, Weill G, Pinto C, Manouvrier S, Ogata T, C Sultan C\*: Screening of MAMLD1 mutations in 70 children with 46,XY DSD: Identification and functional analysis of 2 new mutations. (submitted).
  24. Matsubara K, Murakami N, Nagai T, Ogata T\*: Maternal age effect on the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through meiosis 1 errors. *J Hum Genet* (submitted).
  25. Ishikawa S, Umeda T, Tatsuno K, Isagawa T, Nagae G, Komura D, Yamamoto S, Matsubara K, Iwamoto Y, Stark M, Nemoto Y, Suemori H, Nakatsuji N, Jones KW, Ogata T, Soejima H, Fukayama M, Aburatani H\*: Hidden extra-embryonic imprinting profile revealed by systematic transcriptome typing. (submitted).
  26. Brandão MP, Fukami M, Mendonca BB, Gerdulo M, Domenice S, Arnhold IJP, Ogata T, Costa EMF\*. A MAMLD1 gain-of-function mutation causing 46,XY disorders of sex development.
  27. Mochizuki M\*, Kojika S, Hosaka H, Ishihara T, Kobayashi K, Yoshida R, Ogata T, Ohyama K. Low sensitivity to estradiol causes labial adhesion in young infants. *J Pediatr*
  28. Ayabe T, Ishizuka B, Maruyama T, Uchida H, Yoshimura Y, Yoshida R, Fukami M, Nagai T, Ogata T\*. Association of primary ovarian insufficiency with a specific HLA haplotype (A\*24:02-C\*03:03-B\*35:01) in Japanese patients. *Fertil Steril* (submitted).
  29. Nakamura M, Fukami M, Sugawa F, Miyado M, Nonomura K, Ogata T\*: *Mamld1* knockdown reduces testosterone production and *Cyp17a1* expression in mouse Leydig tumor cells. *PLoS ONE* (submitted).
  30. Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC\*: Uniparental disomy and human disease: an overview. *Am J Med Genet C (Seminars in Medical Genetics)* 154C (3): 329–334, 2010. (IF = 2.404)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

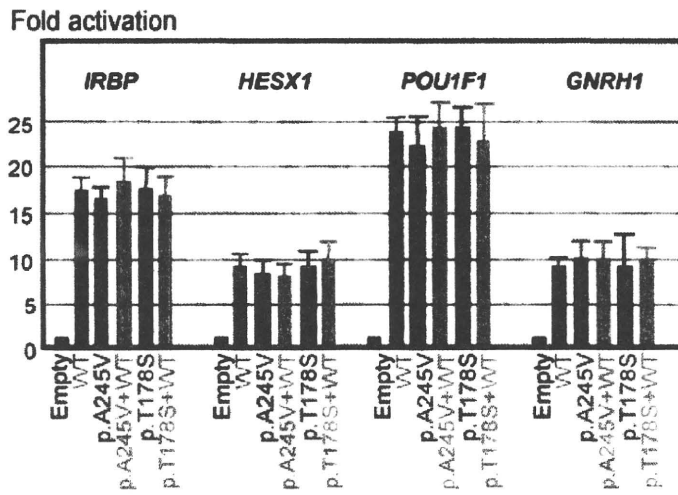


図1. 2つのOTX2ミスセンス置換の機能解析

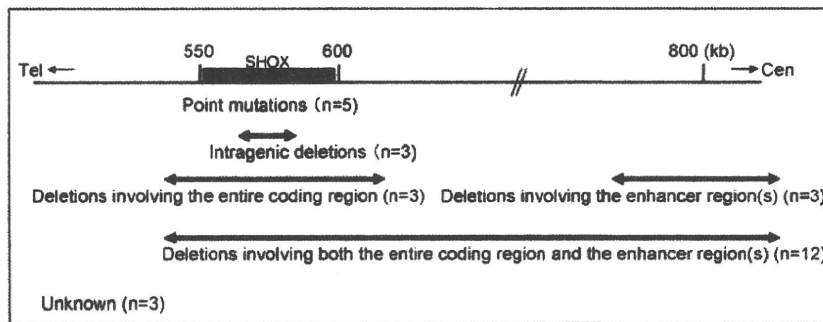


図2. SHOX遺伝子異常の種類

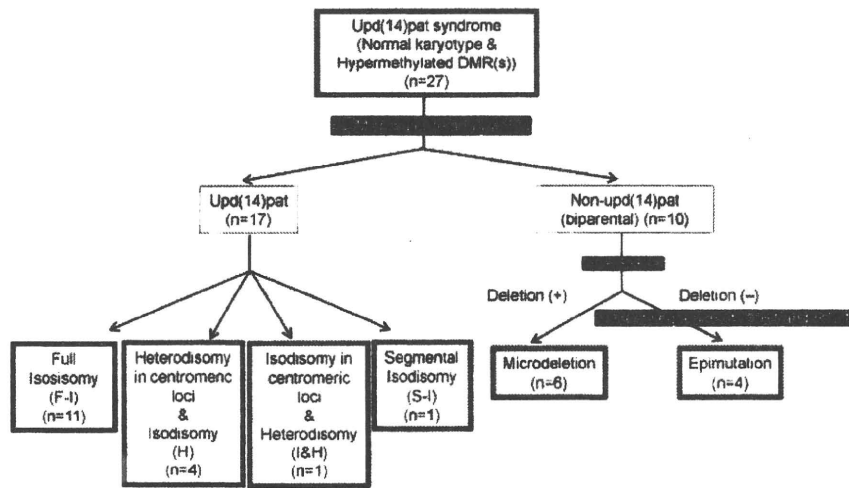


図3. 父性ダイソミー14症候群の原因内訳。

研究成果の刊行一覧表

## 別紙4

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, <u>Ogata T*</u>	Heterozygous <i>OTX2</i> mutations are associated with variable pituitary phenotype.	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>	95 (2)	756-764	2010
Fukami M, Maruyama T, Dateki S, Sato N, Yoshimura Y, <u>Ogata T</u>	Hypothalamic dysfunction in a female with isolated hypogonadotropic hypogonadism and compound heterozygous <i>TACR3</i> mutations and clinical manifestation in her heterozygous mother.	<i>Horm Res Peediatr</i>	73 (6)	477-481	2010
Muroya K, Mochizuki T, Fukami M, Iso M, Fujita K, <u>Ogata T</u>	Diabetes mellitus in a Japanese girl with HDR syndrome and <i>GATA3</i> mutation.	<i>Endocr J</i>	157 (2)	171-174	2010
Fukami M*, Nagai T, Mochizuki H, Muroya K, Yamada G, Takitani K, <u>Ogata T.</u>	Anorectal and urinary anomalies and aberrant retinoic acid metabolism in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency	<i>Mol Genet Metab</i>	100 (3)	269-273	2010
Ashkenazi-Hoffnung L, Lebenthal Y, Wyatt AW, Ragge NK, Dateki S, Fukami M, <u>Ogata T</u> , Phillip M*, Gatl-Yablonski G. A	A novel loss of function mutation in <i>OTX2</i> is associated with phenotypically variable anophthalmia and isolated growth hormone deficiency.	<i>Hum Genet</i>	127 (6)	721-729	2010
Iijima K*, Nozu K, Kamei K, Nakayama M, Ito S, Matsuoka K, <u>Ogata T</u> , Kaito H, Nakanishi K, Mastuo M	Severe Alport syndrome in a young woman caused by a t(X:1)(q22.3;p36.32) balanced translocation.	<i>Pediatr Nephrol</i>	25 (10)	2165-2170	2010

## 別紙4

Dateki S, Fukami M, Uematsu A, Kaji M, Iso M, Ono M, Mizota M, Yokoya S, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, <u>Ogata T*</u>	Mutation and gene copy number analyses of six pituitary transcription factor genes in 71 patients with combined pituitary hormone deficiency: identification of a single patient with <i>LHX4</i> deletion.	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>	95 (8)	4043–4047	2010
Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, <u>Ogata T</u>	The IG-DMR and the <i>MEG3</i> -DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers.	<i>PLoS Genet</i>	6 (6)		2010
Yamazawa K, Nakabayashi K, Kagami M, Sato T, Saitoh S, Horikawa R, Hizuka N, <u>Ogata T</u>	Parthenogenetic chimaerism/mosaicism with a Silver-Russell Syndrome-like Phenotype.	<i>J Med Genet</i>	47 (11)	782–785	2010
Kato H, Yoshida R, Tsukamoto K, Suga H, Eto H, Higashino T, Araki J, <u>Ogata T</u> , Yoshimura K	Familial cases of atypical clinical features genetically diagnosed as LEOPARD syndrome (multiple lentiginos syndrome).	<i>Int J Dermatol</i>	49 (10)	1146–1151	2010
Hiraoka M*, Takahashi H, Orimo H, Hiraoka M, <u>Ogata T</u> , Azuma N	Genetic screening of Wnt signaling factors in advanced retinopathy of prematurity	<i>Mol Vis</i>	16 (12)	2572–2577	2010
Matsubara K, Iwamoto H, Yoshida A, <u>Ogata T*</u>	Semen analysis and successful paternity by intracytoplasmic sperm injection in a man with steroid 5 $\alpha$ -reductase-2 deficiency	<i>Fertil Steril</i>	4 (7)	2770	2010
Suzumori N*, <u>Ogata T</u> , Mizutani E, Hattori Y, Matsubara K, Kagami M, Suguhara-Ogasawara M	Prenatal diagnosis of paternal uniparental disomy 14: delineation of further patient.	<i>Am J Med Genet</i>	A 152A (12)	3189–3192	2010

## 別紙4

Inoue H*, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, <u>Ogata T</u> , Fujieda K:	Identification and functional analysis of novel human growth hormone-releasing hormone receptor ( <i>GHRHR</i> ) gene mutations in Japanese subjects with short stature	<i>Clin Endocrinol</i>	[Epub ahead of print]		2010
Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Matsubara K, Hata K, Horikawa R, <u>Ogata T</u>	Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes	<i>J Hum Genet</i>	56 (1)	91-93	2010
Inoue H*, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, <u>Ogata T</u> , Fujieda K:	Identification and functional analysis of novel human growth hormone secretagogue receptor ( <i>GHSR</i> ) gene mutations in Japanese subjects with short stature	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>	Nov 17.		2010
Dateki S, Fukami M, Tanaka Y, Sasaki G, Moriuchi H, <u>Ogata T</u>	Identification of chromosome 15q terminal deletion with telomere sequences and its bearing on genotype-phenotype analysis		Nov 17.		
Fukami M, Muroya K, Miyake T, Iso M, Yokoi H, Suzuki Y, Tsubouchi K, Nakagomi Y, Kikuchi N, Horikawa R, <u>Ogata T*</u>	<i>GATA3</i> abnormalities in six patients with HDR syndrome	<i>Endocr J</i> (accepted).			
Miyazaki O*, Nishimura G, Kagami M, <u>Ogata T</u> :	Radiological evaluation of dysmorphic thorax in paternal uniparental disomy for chromosome 14.	<i>Ped Radiol</i> (accepted).			
Kalfa N, Cassorla F, Abdennabi IO, Audran F, Philibert P, Daures JP, Baskin L, Fukami M, <u>Ogata T</u> , C Sultan C	Exonic polymorphisms of <i>MAMLD1</i> ( <i>CXorf6</i> ) are associated with hypospadias.	<i>J Urol</i> (accepted)			

別紙4

Stoppa-Vaucher S, Ayabe T, Paquette J, Patey N, Francoeur D, Vuissoz J-M, Deladoëy J, <u>Ogata T</u> , Deal CL	46, XY gonadal dysgenesis: new point mutation in two siblings and a germ line mosaicism in their father.	1. <i>J Clin Endocrinol Metab</i> (submitted).			
Matsubara K, Murakami N, Nagai T, <u>Ogata T</u> *	Maternal age effect on the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through meiosis 1 errors.	<i>J Hum Genet</i> (submitted).			
斎藤加代子	日常診療に必要な臨床遺伝学と遺伝カウンセリング	日本医師会雑誌	139(3)	573-576	2010
斎藤加代子	保因者診断と遺伝カウンセリング	日本臨床 遺伝子診療学 第2版	68(増刊号8)	183-188	2010
Shimajima K, Inoue T, Hoshino A, Kakiuchi S, Watanabe Y, Sasaki M, Nishimura A, Takeshita-Yanagisawa A, Tajima G, Ozawa H, Kubota M, Tohyama J, Sasaki M, Oka A, Saito K, Osawa M, Yamamoto T.	Comprehensive genetic analyses of PLP1 in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease applied by array-CGH and fiber-FISH analyses identified new mutations and variable sizes of duplications	<i>Brain Dev</i>	32(3)	171-179	2010
Kondo H, Saito K, Urano M, Sagara Y, Uchio E, Kondo M	A case of Fukuyama Congenital Muscular Dystrophy Associated with Negative Electroretinograms	<i>Jpn J Ophthalmol</i>	54(6)	622-624	2010
福島武春, 斎藤加代子, 菅野仁, 川島眞, 肝付浩一郎	遺伝子検査結果の電子化	日本遺伝カウンセリング学会誌	31(2)	131-135	2011

## 別紙4

Nagao K, Fujii K, Saito K, Sugita K, Endo M, Motojima T, Hatsuse H, Miyashita T	Entire PTCH1 deletion is a common event in point mutation-negative cases with nevoid basal cell carcinoma syndrome in Japan	Clin Genet	79	196-198	2011
Kobayashi T, et al	Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation.	Human Mutat	31	284-294	2010
Ohtake A, et al	Non-Hodgkin lymphoma in a patient with cardio-facio-cutaneous syndrome	J Pediatr Hematol Oncol	online		2010
Komatsuzaki S, et al	SHOC2 mutation analysis in Noonan-like syndrome and hematologic malignancies	J Hum Genet	55	801-809	2010
Aizaki K, et al	Cardio-facio-cutaneous syndrome with infantile spasms and delayed myelination	Brain & Development	33	166-169	2011
Kamada F, et al	A genome-wide association study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene.	J Hum Genet	56	34-40	2011
Ohashi H, et al	Implications of prenatal diagnosis of the fetus with both interstitial deletion and a small marker ring originating from Chromosome 5	Am J Med Genet	in press		2011
福嶋義光	遺伝子診療と倫理(特集: 遺伝性消化管疾患の特徴と長期経過)	胃と腸	45	2101-2103	2010
福嶋義光	遺伝子診療学とは. 遺伝子診療学(第2版) 遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望	日本臨床	68	1-3	2010



別紙4

<p>Kaneko T, Okita H, Nakajima H, Iijima K, Ogasawara N, Miyagawa Y, Katagiri YU, Nakagawa A, Kiyokawa N, Sato T, Fujimoto J.</p>	<p>Neuroblastoma cells can be classified according to distinctive glycosphingolipid expression profiles identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.</p>	<p>International Journal of Oncology</p>	<p>37(5)</p>	<p>1279-88</p>	<p>2010</p>
<p>石田剛, 大喜多肇, 長谷川匡, 秦順一</p>	<p>Ewing肉腫の病理診断上の問題点</p>	<p>日本整形外科学会雑誌</p>	<p>84</p>	<p>1126-1131</p>	<p>2010</p>

研究成果の刊行物・別刷り

## Heterozygous Orthodontic Homeobox 2 Mutations Are Associated with Variable Pituitary Phenotype

Sumito Dateki, Kitaro Kosaka, Kosei Hasegawa, Hiroyuki Tanaka, Noriyuki Azuma, Susumu Yokoya, Koji Muroya, Masanori Adachi, Toshihiro Tajima, Katsuaki Motomura, Eiichi Kinoshita, Hiroyuki Moriuchi, Naoko Sato, Maki Fukami, and Tsutomu Ogata

Department of Endocrinology and Metabolism (S.D., N.S., M.F., T.O.), National Research Institute for Child Health and Development, and Division of Ophthalmology (N.A.) and Department of Medical Subspecialties (S.Y.), National Children's Medical Center, Tokyo 157-8535, Japan; Department of Pediatrics (S.D., K.M., E.K., H.M.), Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki 852-8501, Japan; Department of Pediatrics (K.K.), Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto 602-8566, Japan; Department of Pediatrics (K.H., H.T.), Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, Okayama 700-8558, Japan; Division of Endocrinology and Metabolism (K.M., M.A.), Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama 232-8555, Japan; and Department of Pediatrics (T.T.), Hokkaido University School of Medicine, Sapporo 060-8638, Japan

**Context:** Although recent studies have suggested a positive role of *OTX2* in pituitary as well as ocular development and function, detailed pituitary phenotypes in *OTX2* mutations and *OTX2* target genes for pituitary function other than *HESX1* and *POU1F1* remain to be determined.

**Objective:** We aimed to examine such unresolved issues.

**Subjects:** We studied 94 Japanese patients with various ocular or pituitary abnormalities.

**Results:** We identified heterozygous p.K74fsX103 in case 1, p.A72fsX86 in case 2, p.G188X in two unrelated cases (3 and 4), and a 2,860,561-bp microdeletion involving *OTX2* in case 5. Clinical studies revealed isolated GH deficiency in cases 1 and 5; combined pituitary hormone deficiency in case 3; abnormal pituitary structures in cases 1, 3, and 5; and apparently normal pituitary function in cases 2 and 4, together with ocular anomalies in cases 1–5. The wild-type Orthodontic homeobox 2 (*OTX2*) protein transactivated the *GNRH1* promoter as well as the *HESX1*, *POU1F1*, and *IRBP* (interstitial retinoid-binding protein) promoters, whereas the p.K74fsX103-*OTX2* and p.A72fsX86-*OTX2* proteins had no transactivation functions and the p.G188X-*OTX2* protein had reduced (~50%) transactivation functions for the four promoters, with no dominant-negative effect. cDNA screening identified positive *OTX2* expression in the hypothalamus.

**Conclusions:** The results imply that *OTX2* mutations are associated with variable pituitary phenotype, with no genotype-phenotype correlations, and that *OTX2* can transactivate *GNRH1* as well as *HESX1* and *POU1F1*. (*J Clin Endocrinol Metab* 95: 756–764, 2010)

**P**ituitary development and function depends on the spatially and temporally controlled expression of multiple transcription factor genes such as *POU1F1*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *PRO1*, and *SOX3* (1, 2). Whereas mu-

tations of some genes (e.g. *POU1F1*) result in a relatively characteristic pattern of pituitary hormone deficiency, those of other genes (e.g. *HESX1*) are associated with a wide range of pituitary phenotype including combined pi-

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2010 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2009-1334 Received June 23, 2009. Accepted November 9, 2009.

First Published Online December 4, 2009

Abbreviations: CGH, Comparative genomic hybridization; CPHD, combined pituitary hormone deficiency; EPP, ectopic posterior pituitary; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; HD, homeodomain; IGH, isolated GH deficiency; IRBP, interstitial retinoid-binding protein; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification; NMD, nonsense mediated mRNA decay; *OTX2*, orthodontic homeobox 2; PH, pituitary hypoplasia; SOD, septooptic dysplasia; TD, transactivation domain.

pituitary hormone deficiency (CPHD), isolated GH deficiency (IGHD), and apparently normal phenotype. However, because mutations of these genes account for a relatively minor portion of patients with congenital hypopituitarism (2, 3), multiple genes would remain to be identified in congenital hypopituitarism.

Orthodenticle homeobox 2 (*OTX2*) is a transcription factor gene primarily involved in ocular development (4). It encodes a paired type homeodomain (HD) and a transactivation domain (TD) and produces two functionally similar splice variants, isoform-a (GenBank accession no. NM\_21728.2) and isoform-b (NM\_172337.1) with and without eight amino acids because of alternative splice acceptor sites at the boundary of intron 3 and exon 4 (5). To date, at least 10 pathological heterozygous *OTX2* mutations have been identified in patients with ocular malformations such as anophthalmia and/or microphthalmia (6, 7). Ocular phenotype is highly variable, ranging from anophthalmia to nearly normal eye development, even in patients from the same family. Furthermore, most patients also exhibit brain anomaly, seizure, and/or developmental delay.

Recent studies have indicated that *OTX2* is also involved in pituitary development and function. Dateki *et al.* (8) showed that *OTX2* is expressed in the pituitary and has a transactivation function for the promoters of *POU1F1* and *HESX1* as well as the promoter of *IRBP* (interstitial retinoid-binding protein) involved in ocular function and that a frameshift *OTX2* mutation identified in a patient with bilateral anophthalmia and partial IGHD barely retained the transactivation activities. Subsequently a missense *OTX2* mutation with a dominant-negative effect and a frameshift *OTX2* mutation with loss-of-function effect were identified in CPHD patients with and without ocular malformation (9, 10).

However, detailed pituitary phenotypes in *OTX2* mutation-positive patients as well as other possible *OTX2* target genes for pituitary development and function remain to be determined. Here we report five new patients with *OTX2* mutations and summarize clinical findings in *OTX2* mutation-positive patients. We also show that *OTX2* is expressed in the hypothalamus and has a transactivation function for the promoter of *GNRH1*.

## Patients and Methods

### Patients

We studied 94 Japanese patients consisting of: 1) 16 patients with ocular anomalies and pituitary dysfunctions accompanied by short stature ( $< -2$  SD) (six with anophthalmia and/or microphthalmia and CPHD, five with anophthalmia and/or microphthalmia and IGHD, three with septooptic dysplasia (SOD)

and CPHD, and two with SOD and IGHD) (group 1); 2) 12 patients with ocular anomalies whose pituitary functions were not investigated (one with bilateral microphthalmia and short stature, one with bilateral optic nerve hypoplasia and short stature, and 10 with anophthalmia and/or microphthalmia and normal stature) (group 2); and 3) 66 patients with pituitary dysfunctions but without ocular anomalies (five with IGHD and 61 patients with CPHD) (group 3). No demonstrable mutation was identified for *HESX1* in patients with SOD, *GHI* and *HESX1* in patients with IGHD, and *POU1F1*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *PRO1*, and *SOX3* in patients with various types of CPHD (2). All the patients had normal karyotype.

### Primers and probes

The primers and probes used in this study are shown in Supplemental Table 1, published as supplemental data on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>.

### Sequence analysis of *OTX2*

This study was approved by the Institutional Review Board Committee at National Center for Child Health and Development. After obtaining written informed consent, the coding exons 3–5 and their flanking splice sites were PCR amplified using leukocyte genomic DNA samples of all 94 patients and were subjected to direct sequencing on a CEQ 8000 autosequencer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). To confirm a heterozygous mutation, the corresponding PCR products were subcloned with TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), and normal and mutant alleles were sequenced separately.

### Prediction of the occurrence of aberrant splicing and nonsense mediated mRNA decay (NMD)

To examine whether identified mutations could cause aberrant splicing by creating or disrupting exonic splicing enhancers and/or splice sites (11, 12), we performed *in silico* analyses with the ESE finder release 3.0 ([http://tulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese\\_finder.cgi](http://tulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/ese_finder.cgi)) for the prediction of exonic splice enhancers and with the program at the Berkeley Drosophila Genome Project ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) for the prediction of splice sites. We also analyzed whether identified mutations could be subject to NMD on the basis of the previous report (12, 13).

### Deletion analysis

Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was performed for *OTX2* intragenic mutation-negative patients as a screening of a possible microdeletion affecting *OTX2*. This procedure was performed according to the manufacturer's instructions (14), using probes designed specifically for *OTX2* exon 4 together with a commercially available MLPA probe mix (P236) (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) used as internal controls. To confirm a microdeletion, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was performed with a long PCR product for *OTX2* (a 6096 bp segment from intron 2 to exon 5) together with an RP11-56612 BAC probe (14q11.2; Invitrogen, Carlsbad, CA) used as an internal control. The probe for *OTX2* was labeled with digoxigenin and detected by rhodamine anti-digoxigenin, and the control probe was labeled with biotin and