

201024096A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

VATER 症候群の臨床診断基準の確立と新基準にもとづく
有病率調査および **DNAバンク・iPS細胞の確立**

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小崎健次郎

平成23(2011)年3月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

VATER 症候群の臨床診断基準の確立と新基準にもとづく
有病率調査および*i*PS細胞の確立に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小崎健次郎

平成23(2011)年3月

目 次

I. 平成22年度構成員名簿	1
II. 総括研究報告	
平成22年度総括研究報告	3
小崎 健次郎(慶應義塾大学・医学部・小児科)	
III. 分担研究報告	
1. 整形外科的奇形(椎骨奇形と橈骨奇形)のまとめ	9
高山 真一郎(独立行政法人国立成育医療研究センター 外科系専門診療部)	
2. VATER症候群の疫学的検討	13
黒澤 健司	
(独立地方行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立こども医療センター・遺伝診療科)	
3. データマイニングの手法によるVATER症候群診断基準案の探索	16
小崎 里華	
(独立行政法人国立成育医療研究センター・内科系診療部・遺伝診療科)	
4. VATER連合症候群の有病率に関する検討	18
岡本 伸彦(大阪府立母子保健総合医療センター・遺伝診療科)	
5. VATER症候群類似症例と診断未定先天多発奇形小児の家族支援に関する研究	21
水野 誠司(愛知県心身障害者コロニー中央病院・臨床第一部)	
6. VATER症候群の次世代シーケンサーによる遺伝子解析	25
工藤 純(慶應義塾大学医学部共同利用研究室・遺伝子医学研究室)	
7. VATER症候群における消化器奇形(食道気管瘻・鎖肛)の実態	28
星野 健(慶應義塾大学医学部外科教室・小児外科)	
8. VATER連合患者に関するiPS細胞研究	31
赤松 和土(慶應義塾大学医学部生理学教室)	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
V. 資 料	
1. VATER症候群 調査票(小児遺伝学会医、小児外科医用)	37
2. VATER症候群 WEB サイト	39

〔 I 〕

平成22年度構成員名簿

平成22年度 厚生労働省難治性疾患克服研究事業

VATER 症候群の臨床診断基準の確立と新基準にもとづく有病率調査およびiPS 細胞の確立研究班

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	小崎健次郎	慶應義塾大学医学部小児科学教室	准教授
研究分担者	高山真一郎	独立行政法人国立病院機構東京医療センター 外科系診療部	部長
	黒澤健司	地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立こども医療センター遺伝科	部長
	小崎里華	独立行政法人国立成育医療研究センター 内科系診療部遺伝診療科	医長
	岡本伸彦	地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科	科長
	水野誠司	愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部	部長
	工藤 純	慶應義塾大学医学部共同利用研究室・遺伝子医学 研究室	教授
	星野 健	慶應義塾大学医学部外科教室小児外科 外科系診療部眼科	講師
	赤松和土	慶應義塾大学医学部生理学教室	講師
研究協力者	吉橋博史	東京都立小児総合医療センター臨床遺伝科	医長
	坂田英明	目白大学保健医療学部言語聴覚科	教授
	奥野博庸	慶應義塾大学医学部小児科学教室	医師

〔Ⅱ〕

総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

総括研究報告書

VATER症候群の臨床診断基準の確立と新基準にもとづく有病率調査および・i P S細胞の確立

研究代表者 小崎 健次郎

慶應義塾大学 医学部 小児科 准教授

研究要旨

VATER症候群(VATER連合)は、椎体・肛門・気管食道・橈骨・腎奇形の5徴により命名される。多系統に障害が発症する機序は不明であり、上記の暫定基準は不十分と考えられている。VATER症候群は最も頻度の高い奇形症候群と考えられているが、これまで、全国調査は行われていない。本研究では、VATER症候群患者の診療に関わる各診療科の専門医が連携し、患者の実態を明らかにするとともに、基礎研究者・疫学研究者と連携して、疾患の原因究明を目指した。具体的には、(1) 症状の統合データベースの作成と臨床診断基準の策定、(2) わが国における有病率の算定、(3) 生物試料(ゲノムDNA等)のバンク化、(4) 候補遺伝子の変異解析の実施と原因遺伝子を同定、(5) 人工多能性幹細胞株(iPS細胞株)の樹立を目標としてフィージビリティ・スタディを実施した。小児外科専門医が在籍する施設179施設、小児遺伝学会専門医が在籍する施設166施設、計346施設に対してVATER症候群の診療経験に関する調査票を送付した。回答率は57%であった。回答のあった、197施設のうち、111施設から症例ありとの回答を得た。111例のうち、症例数が11例以上との回答は5施設、6~10例との回答が3施設、1~5例との回答が74施設であった。これより全国患者数は最少でも150名程度であることが明らかとなった。現在、二次調査を実施中である。24名の分析を終えたところでは、平均では2.4徴候を有していた。最も頻度が高かった徴候は食道閉鎖で18名に認められた。鎖肛は14名に、VSDは11名に、腎奇形は8名に、椎体異常は6名に、橈側奇形は1名に認められた。平行して、4個の疾患原因候補遺伝子について、遺伝子変異スクリーニングを行うための解析システムを設計・完成すると共に、患者10名のゲノムDNAを集積した。うち1名については、難病バンクへ検体の供託の手続き中、2名については、iPS細胞作成について同意を得た。上記(1)~(5)の目標実現に向けて、不可欠と考えられる成果を達した。

研究分担者

高山真一郎 独立行政法人国立成育医療研究センター外科系診療部 部長
黒澤 健司 独立地方行政法人神奈川県立病院機構
神奈川県立こども医療センター・遺伝診療科
小崎 里華 独立行政法人国立成育医療研究センター 内科系専門診療部・遺伝診療科 医長
岡本 伸彦 地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター
遺伝診療科 科長
水野 誠司 愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部 部長
工藤 純 慶應義塾大学医学部共同利用研究室・遺伝子医学研究室 教授
星野 健 慶應義塾大学医学部外科教室小児外科 講師
赤松 和土 慶應義塾大学医学部生理学教室 講師
研究協力者
谷口 善仁 慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室 講師
加部 泰明 慶應義塾大学医学部医化学教室 講師

A. 研究目的

VATER症候群(VATER連合)は、椎体・肛門・気管食道・橈骨・腎奇形の5徴により命名され、「疾患区分(17):奇形症候群」に属する。多系統に障害が発症する機序は不明であり、上記の暫定基準は不十分と考えられている。

生命維持にかかわる臓器・運動器の障害を伴う、慢性的・持続的な疾患であり、生活面での長期にわたる支障を来す。VATER症候群は最も頻度の高い奇形症候群と考えられているが、これまで、全国調査は行われておらず、原因は不明である。治療や合併症の管理に関する包括的な診療ガイドラインはない。

本研究ではVATER症候群患者の診療に関わる各診療科の専門医が連携を強化して医療の質の向上を目指している。基礎研究者・疫学研究者を研究チームに含めて、疾患の原因究明に向けた取り組みも進めている。

具体的には、

- (1) 症状の統合データベースの作成と臨床診断基準の策定
- (2) わが国における有病率の算定
- (3) 生物試料(ゲノムDNA等)のバンク化
- (4) 候補遺伝子の変異解析の実施と原因遺伝子を同定。
- (5) 人工多能性幹細胞株(iPS細胞株)の樹立を目標としている。平成22年度はフィージビリティ・スタディを実施した。

B. 研究方法

疫学調査

関東地区・中京地区・大阪地区の各医療圏で活動している奇形症候群の遺伝専門医のコンソーシアムを形成(小崎健次郎・黒澤・岡本・水野・小崎里華)した上、小児整形外科医(高山)・小児外科医(星野)による研究班を組織し、「全国疫学調査マニュアル第二版」に従い、研究を遂行した。まず、第一次調査として、患者の有無と患者数に関して、全国の小児遺伝学会員・小児外科医に調査票を送付し、患者の概数を把握した。VATER症候群の患者の多くは食道閉鎖・鎖肛などの先天的かつ重大な消化管合併症を呈する。これらの疾患は、一般外科医ではなく、小児外科専門医により手術治療をされることが一般的であることから、小児外科学会に所属する専門医をアンケート対象に選んだ。また、疾患の性質上、必ず多発奇形を呈すること、多発奇形を呈する小児は臨床先天異常学の専門家集団である小児遺伝学会の会員をアンケート集団に選んだ。

一次調査の立案段階で、患者の正確な数の把握よりも、回収率の向上を図るべきではないかとの意見があり、患者数の実数よりも患者数の

範囲についてアンケートを行った。

予備調査によれば一施設に複数の小児外科専門医ないし小児遺伝学会員が在籍している施設が相当数あることから、重複解答を避けるために、一施設に対しては一名を選んでアンケート票を送付した。

VATER症候群の患者を診療中との回答が得られた施設に対して、詳細な二次調査票を送付した。

全国調査とは別に、神奈川県および大阪府において地域調査もおこなった。

臨床所見に対する探索的統計処理

二次調査の前半に回収された患者24名のデータについて V=vertebral defect 椎骨奇形, V=ventricular septal defect 心室中隔欠損, A=anal defects 鎖肛, TE=tracheoesophageal fistula 気管食道瘻, R=radial defect 橈骨奇形, R=renal defect 腎奇形の6徴候各症状を有するかどうかを二値化して24行x6列の行列を作成し、主座標分析を行った。主座標分析を実施する目的は、患者群(ここでは24名)が、①サブグループに分離可能かどうか、②主要症状(ここではVVATERR)間に関連性があるかどうかの2点を明らかにすることにあつた。

主座標分析は統計処理/データマイニング用プログラミング言語Rの主座標分析用パッケージade4を用いて実施した。24名の患者の、全ての2名ずつの組み合わせについて、類似性指数を計算し、この類似性指数にしたがって、各患者間のユークリッド空間距離を算出し、これを、二次元平面に投影した。患者間の「距離」の計算には、Jaccard指数、Czekanowski指数、Gower & Legendre指数、Sokal & Michener指数の4種類を用いた。Jaccard指数およびCzekanowski指数は、陽性所見間の一致を重視する評価法であるのに対し、Gower & Legendre指数、Sokal & Michener指数は陽性所見間・陰性所見間の一致の両方をカウントする評価法である。

消化器奇形(食道気管瘻・鎖肛)および整形外科的奇形(椎骨奇形と橈骨奇形)の実態

小児外科専門医が在籍する施設179施設、小児遺伝学会専門医が在籍する施設166施設に対して過去5年間のVATER連合の症例の調査票を送付した。回答のあつた197施設のうち、111施設から過去5年間に「症例あり」との回答を得た。111施設に対して、二次調査票を送付したところ、120症例について回答を得た。

これら120症例について消化器奇形および整形外科的な合併症を総括した。

遺伝子変異解析システムの設計

動物モデルより、VATER 症候群の発症と関連があると示唆されている遺伝子群(SHH、GLI2、GLI3、ZIC2)の遺伝子変異解析システムを設計した。次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断法の最適化のため、ゲノム上の特定領域を選択的に濃縮した。正常人由来ゲノム DNA を断片化するとともに、ゲノムの標的領域に相補的な配列を持つオリゴシーケンスを作成し、エキソン領域の DNA を選択的に回収した。回収後のゲノム DNA をアダプターにより連結し、PCR 法増幅後、シーケンシングを行った。

患者ゲノム DNA の集積

10 名の患者のゲノム DNA を集積し、上記遺伝子の遺伝子変異解析およびマイクロアレイを用いたゲノム全領域を対象としたゲノムコピー数異常のスクリーニングを行った。

iPS 細胞の樹立

皮膚真皮組織より皮膚線維芽細胞を培養し、山中 4 因子を導入して、リプログラミングを行った。インフォームド・コンセントを得た後、健康成人女性より皮膚組織より線維芽細胞を樹立した。作成した線維芽細胞にレンチウイルスベクターを用いてマウスレトロウイルス受容体(Slc7a1)を発現させることで、レトロウイルスの感染効率を上げた。その後レトロウイルスベクターにより 4 遺伝子(Sox2, Oct3/4, Klf4, c-Myc)を導入した。遺伝子導入されたことを見るため 4 因子に加えて ds-red 遺伝子を同時に遺伝子導入した。

VATER 症候群の新規候補遺伝子の探索

研究代表者らは先行研究によりニワトリ胚へのアドリアマイシン投与によって VATER 症候群と非常に類似した表現型が得られることを示している(Naito *et al.*)。これまでの研究では、アドリアマイシンが直接に結合するタンパクについては情報が得られていなかった。そこで、高機能性磁性微粒子を利用したアプローチを用いて、アドリアマイシン結合蛋白の単離を試みた。

方法としては、加部博士を研究協力者として迎え、他の催奇形物質であるサリドマイドの結合タンパクが単離された方法を利用した。アドリアマイシンを高機能性磁性微粒子に化学的に結合させ、アドリアマイシンの結合蛋白の単離を試みた。

倫理的配慮

ヒト検体を採取する際には、試料等提供者の個人情報保護、検体提供の任意性、提供を受けた検体の取り扱い方、得られる研究成果の医学的貢献度等について、試料等提供者ないしはその保護者に十分に説明したうえで、文書により同意を得た。個人情報の外部への持ち出し禁止、試料等の匿名化など個人情報の保護に努め、個人情報の保

護に関する法律等を遵守した。

遺伝子変異解析による変異陽性例の表現型の詳細な解析はヒトの家系情報を含めた身体的、遺伝的な情報の収集と、遺伝子解析から成り立っており、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」の適用範囲内であり当該ガイドラインを遵守して実施した。

VATER 症候群の有病率に関する研究は「疫学研究」に該当すると考えられ 慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を受けた。生体試料(主にゲノム DNA)を連結不能匿名化した上、バンク化して利用することについて慶應義塾大学医学部の倫理申請による承認が得られている。

慶應義塾大学医学部倫理委員会により「神経疾患患者からの iPS 細胞株の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究」が既に承認(平成20年6月18日)されている。

C. 研究結果

疫学調査

小児外科専門医が在籍する施設179施設、小児遺伝学会専門医が在籍する施設166施設、計346施設に対して調査票を送付した。

小児外科専門医が在籍する施設179施設のうち96施設から、小児遺伝学会専門医が在籍する施設166施設のうち、101施設、計197施設から回答が得られた。回答率は57%であった。

回答のあった、197施設のうち、111施設から症例ありとの回答を得た。111例のうち、症例数が11例以上との回答は5施設、6~10例との回答が3施設、1~5例との回答が74施設であった。

したがって、全国患者数は最少でも $11 \times 5 + 6 \times 3 + 74 = 147$ 名であることが明らかとなった。同様の計算により、上限としては500名程度の患者の存在が予測される。

2次調査の前半に回収された患者24名のデータについて集計結果を別表1に示す。

24名の中で、平均では2.4徴候を有していた。最も頻度が高かった徴候は食道閉鎖で18名に認められた。鎖肛は14名に、VSDは11名に、腎奇形は8名に、椎体異常は6名に、橈側奇形は1名に認められた。

24名の間で、13のパターンが観察された。最も頻度の高かった症状の組み合わせはVSDと食道気管瘻の組み合わせで6名に認められた。次に頻度の高かった組み合わせは鎖肛と食道気管瘻の組み合わせで4名に認められた。

臨床所見に対する探索的統計処理

24名の患者について V=vertebral defect 椎骨奇形, V=ventricular septal defect 心室中隔欠損, A=anal defects 鎖肛, TE=tracheoesophageal fistula 気管食道瘻, R=radial defect 橈骨奇形, R=renal defect 腎奇形の6徴候各症状を有するかどうかを二値化して24行x6列の行列を作成し、主座標分析を行った。

患者間の「距離」の計算には、Jaccard 指数、Czekanowski 指数、Gower & Legendre 指数、Sokal & Michener 指数の4種類の指数を用いた結果は良く一致していた。

神奈川県における調査

神奈川県先天異常モニタリング調査 (KAMP: Kanagawa Birth Defects Monitoring Program) のデータを用いて、VATER症候群のスペクトラムを検討した。鎖肛(A)および、食道閉鎖あるいは気管食道瘻(TE)の2つの奇形を中心として17例を把握し、その症状の広がりを検討したところ、典型的なVATER症候群として説明できる腎奇形のほかに、横隔膜ヘルニア、総排泄腔遺残、十二指腸閉鎖を合併する例も認められた。

大阪府での調査

主要な疾患の患者数との比較という方法でVATER連合症候群の有病率と患者数の推測を試みた。その結果、VATER連合症候群は出生2万から3万人に1人の有病率と推測された。全国では年間30-50例の新規患者が誕生していると考えられた。VATER連合症候群では多彩な合併症があり、高度専門医療を要する例が多い。未診断例であると合併症の把握が遅れる可能性もあり、VATER連合症候群をめぐる医療体制の充実が急務である。

消化管奇形(食道気管瘻・鎖肛)の実態

アンケートで集積された120例のうち、水頭症合併症例と母体糖尿病合併症例は、病因論的には他のVATER症候群患者と区別すべきであることが先行研究により示されていることから、以後の解析では112例に限った解析をおこなった。鎖肛は112例中80例(71.5%)、食道気管奇形は112例中90例(80.4%)に認められた。また、特徴的な所見として十二指腸閉鎖が得られた。

整形外科的奇形(椎骨奇形と橈骨奇形)の実態

椎体および頰骨の異常は全体の約半数、橈側列の異常は全体の1/4に認められた。

遺伝子変異解析システムの設計と患者ゲノムの集積

動物モデルより、VATER症候群の発症と関連があると示唆されている遺伝子群(SHH・GLI2・GLI3・ZIC2)の遺伝子変異解析システムを完成した。

次世代シーケンサーにより得られた粗DNA配列データを研究協力者清水らが開発した、自動化コンピュータプログラム群(いわゆるパイプライン)を用いて、ヒトゲノム参照配列にマッピングし、塩基置換、欠失、挿入の同定を行った。マッピングによって得られた塩基置換リストとdbSNPsと1000人ゲノムプロジェクトのデータに含まれる既知の塩基置換のアノテーションを比較することで、新規変異の同定を試みた。得られた配列データをSALL1参照配列にマッピングしたところ多くの配列がSALL1のエキソン2およびエキソン3領域近傍にマッピングされ高い特異性を示した。

VATER症候群の新規候補遺伝子の探索

これまでのニワトリ胚を用いた実験では、アドリアマイシンにより上部消化管の異常(食道閉鎖等)は発生したが、下部消化管の異常(鎖肛、肛門狭窄等)は発生しなかった。メダカを用いた実験により、下部消化管の異常が認められたことから、VATER症候群の発症機序を考える上でのアドリアマイシン曝露モデルの妥当性が確認された。

さらにアドリアマイシンを高機能性磁性微粒子(FG ビーズ)に固定化し、このアフィニティ担体を用いて、ニワトリ胚細胞溶解液から薬剤標的タンパク質を回収・精製することに成功した。

(論文発表前であり、詳細は追って報告予定)

iPS細胞の樹立

皮膚線維芽細胞から、マウスレトロウィルス受容体(Slc7a1)を発現と4遺伝子(Sox2, Oct3/4, Klf4, c-Myc)の導入によってiPS細胞を確立した。得られた細胞の性状を細胞遺伝学的方法で確認した。上記の方法により作成した、iPS細胞について、iPS化の過程で、正常細胞としての性質を維持しているかどうかを確認する目的で、G分染をおこなった。この際、コレシド処理時のコレシド濃度を高く設定し、培養時間を延長することが良好な分裂中期増を得ることができた。

本研究班のウェブサイトの開設・公開

VATER 症候群および本研究班の活動について一般小児科医師や患者・家族に広報するために、ウェブサイトを開設・公開した。
<http://clin-res-vater.jp/> (現在、試験運用中)

D. 考察

初年度の研究により全国患者数は150~500人前後と算定され、5万人未満という希少性の基準を満たすことが確認された。現在、二次調査票を分析中である。二次調査の中間成績によれば、主要症状は、食道閉鎖・鎖肛・腎奇形であることが示された。

VATER症候群の原因は未だ特定されていない。動物モデルでは、GLI2・GLI3・ZIC2・SHH遺伝子の関与が示唆されている。本研究において、われわれはZIC2を含む13番染色体欠失を伴う症例を同定し、ヒトにおいてもZIC2の変異がVATER症候群の発症に関与している可能性が高いことを示した。ZIC2を含む候補遺伝子の変異を効率的にスクリーニングするための分析システムを設計・完成した。集積しつつある患者ゲノムDNAにこれらの遺伝子の変異が認められるかどうか、今後、次世代シーケンサーを用いて網羅的な解析を進める計画であるが、GC含量の高いエクソンについては、十分なデータが得られない可能性が示唆されており、プロトコルの改良中である。

VATER症候群の新規候補遺伝子の探索

VATER症候群の原因として遺伝子異常や環境要因など複数の要因が関係していると推測されている。環境要因による発症と遺伝子異常による発症の間に共通の分子機構が働いていると予測される。われわれは、ニワトリ胚をアドリアマイシンに曝露すると、VATER症候群に類似する表現型(食道閉鎖・椎体異常等)を呈することを世界で初めて示している。これまでのニワトリ胚を用いた実験では、アドリアマイシンにより上部消化管の異常(食道閉鎖等)は発生したが、下部消化管の異常(鎖肛、肛門狭窄等)は発生しなかった。今般、メダカを用いた実験により、下部消化管の異常が得られた。ことから、VATER症候群の発症機序を考える上でのアドリアマイシンモデルの有用性・妥当性が確認された。

抗癌剤であるアドリアマイシンがどのようにVATER症候群に含まれる先天奇形を発症させるのか、現在不明である。そこでわれわれは代表的な催奇形因子であるサリドマイドの研究で最近、実績の示された研究アプローチを利用することを想起した。すなわちアドリアマイシンを高機能性磁性微粒子(FGビーズ)に固定化し、このアフィニティ担体を用いて、アドリアマイシン曝露ニワトリ胚由来の細胞溶解液から薬剤標的タンパク質を回収・精製することに成功した。現在、当該タンパクの性質を解析中である。こ

のタンパクをコードする遺伝子は、VATER症候群の原因の候補遺伝子と考えられる。

E. 結論

初年度の研究により、下記の成果を得た。

- ① VATER 症候群の患者の有無に関する一次調査を終了し、全国患者数は150~500人前後と算定された。
- ② 二次調査の中間分析結果によれば、主要症状は、食道閉鎖・鎖肛・腎奇形であることが示された。
- ③ 4候補遺伝子について、遺伝子変異スクリーニングを行うための解析システムを設計・完成した。
- ④ 新たな候補遺伝子のタンパクの回収・精製に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

別表1 24名のVATER症候群患者における症 状の一覧
 (0=症状なし、1=症状あり)

V 椎骨 奇形	V 心室中隔 欠損	A 鎖肛	TE 食道 気管瘻	R 橈骨 奇形	R 腎奇形	24名中に おける患者数
0	0	0	1	0	0	1名
0	0	0	1	0	1	1名
0	0	1	0	0	0	2名
0	0	1	0	0	1	2名
0	0	1	1	0	0	4名
0	1	0	1	0	0	6名
0	1	1	0	0	1	1名
0	1	1	1	0	1	1名
1	0	0	1	0	0	1名
1	0	1	1	0	0	1名
1	0	1	1	0	1	1名
1	1	0	1	0	0	1名
1	1	1	0	0	1	1名
1	1	1	1	1	1	1名

〔Ⅲ〕

分担研究報告書

研究報告書

整形外科的奇形(椎骨奇形と橈骨奇形)のまとめ

分担研究者 高山真一郎

独立行政法人国立成育医療研究センター 外科系専門診療部 部長

研究要旨

VATER連合は原因不明な多発奇形症候群である。本研究では、全国調査を行い、VATER連合と診断される症例を対象として、整形外科的奇形の実態について調査した。

小児外科専門医が在籍する施設 179 施設、小児遺伝学会専門医が在籍する施設 166 施設に対して過去 5 年間の VATER 連合の症例の調査票を送付した。回答のあった 197 施設のうち、111 施設から過去 5 年間に「症例あり」との回答を得た。111 施設に対して、二次調査票を送付したところ、120 症例について回答を得た。これら 120 症例について整形外科的な合併症を総括した。椎体および頰骨の異常は全体の約半数、橈側列の異常は全体の 1/4 に認められた。肋骨の異常の頻度が比較的高く、椎骨異常と同程度であることが明らかになった。発生生物学の分野では、椎骨異常も肋骨異常もともに homeotic defect の範疇に含まれている。今後、VATER 症候群の診断を rule-in する際に肋骨異常の有無に着目することは有意義であると思われた。VATER 症候群の患者では橈骨欠損ないし橈骨低形成の頻度は尺骨低形成の 5 倍程度と高く、VATER 症候群においては主として軸前性の奇形が起きることが確認された。また、上腕骨の低形成を示した症例は無く、柱脚ではなく、軛脚や自脚の異常を呈することが確認された。

研究協力者

小崎里華(独立行政法人国立成育医療研究センター)

A. 研究目的

VATER連合は原因不明な多発奇形症候群である。整形外科的な観点からは、椎体の異常と四肢の異常、とくに橈側列異常が重要である。本研究では、全国調査を行い、VATER連合と診断される症例を対象として、整形外科的奇形の実態について調査した。

B. 研究方法

VATER 症候群は VATER 連合とも呼称され、単一の疾患であるのか、異質な亜群を含むのかが、解明されていない。このため、研究開始の段階で暫定診断基準を確定してしまうと、選択バイアスが生じるとの懸念があった。そこで、本研究では、主治医が VATER 症候群(VATER 連合)と診断した症例について検討を行った。

小児外科専門医が在籍する施設 179 施設、小児遺伝学会専門医が在籍する施設 166 施設に対して過去 5 年間の VATER 連合の症例の調査票を送付した。回答のあった 197 施設のうち、111 施設から過去 5 年間に「症例あり」との回答を得た。111 施設に対して、二次調査票を送付したところ、120 症例について回答を得た。これら 120 症例について整形外科的な合併症を総括した。

2 次調査では、整形外科領域については下記の項目を質問した。

椎体および頰骨の異常

椎骨の異常の有・無、椎体の癒合、椎体の低形成、椎骨特機の欠損・低形成、胸腰部の班椎、仙骨の

異形成・無形成、脊柱の側彎、脊柱の前彎 脊柱の後彎、肋骨の異常

橈側列の異常

橈骨異形成の有・無、橈骨欠損、橈骨低形成、尺骨低形成、拇指欠損、拇指低形成、三関節

拇指、多指症、上腕骨低形成

C. 研究結果

椎体および頰骨の異常は全体の 55%、橈側列の異常は全体の 26%に認められた。椎体および頰骨の異常のスペクトラムとその頻度、橈側列の異常のスペクトラムとその頻度について表に示す。なお、データの集計にあたっては、水頭症症例 染色体異常例 母体糖尿病 8 例を除外した 112 例について分析した。

D. 考察

120 例という比較的多数の患者を対象として日本人 VATER 症候群患者における整形外科的

症状の分布を初めて明らかにすることができた。肋骨の異常の頻度が比較的高く、椎骨異常と同程度であることが明らかになった。発生生物学の分野では、椎骨異常も肋骨異常もともに homeotic defect の範疇に含まれている。今後、VATER 症候群の診断を rule-in する際に肋骨異常の有無に着目することは有意義であると思われた。

同様に仙骨部位の異常も約 20%と比較的高率であった。仙骨は腸管ガスと重なり、単純レントゲンの読影が困難である場合がある。注意

深い読影が必要と考えられた。

橈骨欠損ないし橈骨低形成の頻度（10.8%）は尺骨低形成（1.8%）の5倍とはるかに高く、VATER症候群においては主として軸前性の奇形が起きることが確認された。また、上腕骨の低形成を示した症例は無く、VATER症候群においては柱脚ではなく、軛脚や自脚の異常を呈することが確認された。

また、今回のアンケートは小児外科専門医・小児遺伝学会専門医が在籍する施設を対象として調査している。手の外科を専門とする学会を対象とした調査を行い、治療予後など機能的な問題について解析を進める必要がある

E. 結論

VATER症候群の患者では橈骨欠損ないし橈骨低形成の頻度は尺骨低形成の5倍程度とはるかに高く、VATER症候群においては主として軸前性の奇形が起きることが確認された。また、上腕骨の低形成を示した症例は無く、VATER症候群においては柱脚ではなく、軛脚や自脚の異常を呈することが確認された。

F. 研究発表

3. 論文発表

なし

4. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

V									
椎骨の異常有・無	椎体の癒合	椎体の低形成	椎骨特機の欠損・低形成	胸腰部の班椎	仙骨の異形成・無形成	脊柱の側彎	脊柱の前彎	脊柱の後彎	肋骨の異常
有	有	有	有	有	有	有	有	有	有
61	19	14	7	16	23	21	0	1	20
54.5%	17.0%	12.5%	6.3%	14.3%	20.6%	18.8%	0.0%	0.9%	17.9%
無	無	無	無	無	無	無	無	無	無
50	40	37	40	39	32	36	52	52	36
44.7%	35.8%	33.1%	35.7%	34.9%	28.6%	32.1%	46.5%	46.5%	32.2%
	不明	不明	不明	不明	不明	不明	不明	不明	不明
	2	8	12	5	4	1	7	6	3
	1.7%	7.1%	10.7%	4.4%	3.6%	0.8%	6.2%	5.3%	2.6%
無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答
1	51	53	53	51	53	54	53	53	53
0.8%	45.5%	47.3%	47.3%	45.5%	47.3%	48.3%	47.3%	47.3%	47.3%

R									
橈骨異形成有・無	腎異形成有・無	橈骨欠損	橈骨低形成	尺骨低形成	拇指欠損	拇指低形成	三関節拇指	多指症	上腕骨低形成
有	有	有	有	有	有	有	有	有	有
30	68	12	7	2	8	11	0	8	0
26.8%	60.8%	10.8%	6.3%	1.8%	7.2%	9.9%	0.0%	7.2%	0.0%
無	無	無	無	無	無	無	無	無	無
80	41	35	41	43	42	41	49	43	47
71.5%	36.7%	31.3%	36.7%	38.4%	37.5%	36.6%	43.8%	38.4%	42.0%
		不明	不明	不明	不明	不明	不明	不明	不明
		2	2	5	0	0	1	0	3
		1.7%	1.7%	4.5%	0.0%	0.0%	0.9%	0.0%	2.7%
無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答
2	3	63	62	62	62	60	62	61	62
1.7%	2.6%	56.2%	55.3%	55.3%	55.3%	53.5%	55.3%	54.4%	55.3%

R									
腎無・低形成	水腎症	膀胱尿道管逆流	馬蹄腎	尿管腎孟閉塞	鼠径ヘルニア	小陰茎	停留精巢	性別不明の外性器	
有	有	有	有	有	有	有	有	○	
43	22	24	13	5	5	7	11	3	
38.4%	19.7%	21.5%	11.7%	4.5%	4.5%	6.3%	9.9%	2.7%	
無	無	無	無	無	無	無	無	無	
32	47	43	55	61	62	59	55	63	
28.6%	42.0%	38.3%	49.1%	54.5%	55.4%	52.6%	49.1%	56.3%	
不明	不明	不明	不明	不明	不明	不明	不明	不明	
1	0	4	0	0	0	0	0	1	
0.9%	0.0%	3.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.9%	
無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	
36	43	41	44	46	45	46	46	45	
32.1%	38.3%	36.6%	39.2%	41.0%	40.1%	41.0%	41.0%	40.1%	

L			
四肢異常 有·無	彎曲足	合指趾症	股關節異常
有	有	有	有
10	2	3	3
9.0%	1.8%	2.7%	2.7%
無	無	無	無
101	22	24	21
90.2%	19.7%	21.5%	18.8%
	不明	不明	不明
	1	0	2
	0.9%	0.0%	1.8%
無回答	無回答	無回答	無回答
1	87	85	86
0.8%	77.6%	75.8%	76.7%

研究要旨

VATER症候群はVATER連合とも言われ、椎骨異常(V)、鎖肛(A)、食道閉鎖あるいは気管食道瘻(TE)、橈骨あるいは腎欠損(R)の5つの奇形を特徴とする先天奇形である。しかしその症状スペクトラムは広く、必ずしも上記5主要症状が揃うわけではないために、その定義は長らく議論の対象となっている。今回我々は、神奈川県先天異常モニタリング調査(KAMP: Kanagawa Birth Defects Monitoring Program)のデータを用いて、VATER症候群のスペクトラムを検討した。鎖肛(A)および、食道閉鎖あるいは気管食道瘻(TE)の2つの奇形を中心として17例を把握し、その症状の広がりを検討したところ、典型的なVATER症候群として説明できる腎奇形のほかに、横隔膜ヘルニア、総排泄腔遺残、十二指腸閉鎖を合併する例も認めた。さらに18トリソミーの混在もあった。原因不明の先天奇形疾患の病因解明として疫学調査の有用性を確認した。

A. 研究目的

先天異常モニタリングは、ある種の先天異常の発生増加や新しい先天異常の発生を指標として、環境中に導入された催奇形物質をいち早く見つけ、それを除去することにより、主に環境要因によって起こる先天異常を予防するシステムである。同時に、生活習慣や社会的要因(生殖補助医療の普及など)の影響を評価する上でも重要である。現在まで、われわれは人口ベースの先天異常モニタリング調査により、母年齢の上昇の影響や多胎発生頻度の変化、生殖補助医療の与える先天異常発生の動向を明らかにしてきた。しかし、こうしたモニタリング調査で報告されるものは確認された個々の奇形が対象となっており、奇形の組み合わせから得られる診断ではない。これは、先天異常モニタリング調査の限界でもある一方で、近年のゲノム研究では、遺伝的背景が推定される発生頻度の高い疾患(生活習慣病)から、発生頻度が極めて低いもの(影響力が大きいメンデル遺伝病へパラダイムシフトが起こりつつあり、研究と医療の両分野で希少難病の重要性が指摘されている。奇形症候群の多くは発生頻度が極めて低く、その医療管理は合併症の種類と程度に影響を受け、専門的な医療を必要とする希少難病である。原因不明の希少難病を疫学的解析を加えることは、発症メカニズムの手掛かりを得るだけでなく、医療施策立案や治療、さらに疾患予防において重要な基本情報となる。

VATER 症候群は VATER 連合とも言われ、椎骨異常(V)、鎖肛(A)、食道閉鎖あるいは気管食道瘻(TE)、橈骨あるいは腎欠損(R)の5つの奇形を特徴とする先天奇形である。しかし、その

症状スペクトラムは広く、必ずしも上記5主要症状が揃うわけではないために、その定義は長らく議論の対象となっている。

今回我々は、神奈川県先天異常モニタリング調査(KAMP: Kanagawa Birth Defects Monitoring Program)のデータを用いて、VATER 症候群のスペクトラムを検討した。解析の手掛かりとしてマーカー奇形である鎖肛(A)および、食道閉鎖あるいは気管食道瘻(TE)の2つの奇形を必須項目として抽出し、17例を把握した。この17例を対象として検討を加えるとともに、食道閉鎖(TE)そのものの合併奇形のスペクトラムも検討した。

B. 研究方法

神奈川県における先天異常モニタリングプログラム(KAMP)の方法論については既に述べているので省略する。奇形の発生状況を継続的に監視し、ベースラインとの比較において異常発生の有無を判定している。報告形式の変更などから、1981年から2008年のKAMP終了までの間の26年6ヶ月は、4期に分類されて登録されている。このうち、以下の2期に報告された症例について検討を加えた。

1989-2000: 第3世代
479,982(個表 18,953)
2001-2008: 第4世代
198,877(個票 9,748)

(倫理面への配慮)

神奈川県の先天異常モニタリング事業はすべての個人情報と切り離した形で登録され、施設内倫理審査により承認を受けた事業である。

C. 研究結果

最初に食道閉鎖(TE)を手掛かりとして検索を行い、観察期間に 99 例の食道閉鎖症例を把握した。この中には、確認できる範囲として 18 トリソミーが 15 例(15%)含まれていた。さらに絞り込み検索としてこの 99 例の中で鎖肛(A)を伴う例が 17 例存在した。この A+TE の組み合わせ 17 例中に 2 例の 18 トリソミー、1 例の汚溝外反シーケンス、外性器異常と鼻腔閉鎖を伴う CHARGE 症候群を強く疑う 1 例、などが含まれた。この明らかに既知の他疾患とされる 4 例を除いた 14 例の TE+A 症例のうち、腎奇形(R)を伴うものは 3 例、心奇形を合併する例が 4 例、と少なかったが、これは外表奇形を中心に評価するモニタリングシステムに由来するバイアスかもしれない。ほかに横隔膜ヘルニアを合併する例を 1 例認めた。

D. 考察

VATER 連合は、椎骨異常(V)、鎖肛(A)、食道閉鎖あるいは食道気管瘻(TE)、腎奇形(R)、橈骨欠損(R)のうち、3 つの奇形を合併するものをいうが、実際にはそのスペクトラムは広く、臨床の現場では、診断に躊躇することも少なくない。今回、先天異常モニタリングのデータを用いて、そのスペクトラムについて検討した。Botto ら(1997)は、こうした幅広いスペクトラムについて、国際的疫学調査のデータ(総出生数 9,995,151)を用いて検討し、発症メカニズムとしての共通機序より、異なったいくつかの機序が併存している可能性を指摘している。

今回の我々の検討は、VATER 症状のすべての組み合わせについて統計的検討を加えたわけではないが、A+T だけでも上述のスペクトラムが確認できた。興味深いのは、18 トリソミーや CHARGE 症候群などの既知の症候群が組み込まれてくることである。このことは、逆に、発症メカニズムが不明である VATER 連合の病因と、染色体異常である 18 トリソミーあるいは責任遺伝子 CHD7 の異常によって発症する CHARGE 症候群との間に何らかの共通メカニズムが存在する可能性が指摘できる。従来、症状のみでくられてきた VATER 連合の分子レベルでの発生学的検討が今後の課題といえる。

E. 結論

人口ベース疫学調査データを用いて VATER 連合の奇形スペクトラムを検討した。従来報告のあったその広がりを確認できたとともに、既知症候群との共通性も指摘でき、VATER 連合の分子レベルでの発生学的検討が必要と考えられた。(謝辞)

本研究の資料の一部は、神奈川県産科婦人科医会の協力による神奈川県新生児特別地域保健事業によっている。先天異常モニタリング調査による研究の一部は、厚生労働省科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)「本邦に

おける先天異常モニタリングの構築と外的・環境因子サーベイランスに関する研究(主任研究者 平原史樹)」(H19-子ども一般 007)によっている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Adachi M, Muroya K, Asakura Y, Kurosawa K, Nishimura G, Narumi S, Hasegawa T. Ruvalcaba syndrome revisited. *Am J Med Genet Part A* 152A:1854-7, 2010.

Tsuyusaki Y, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi N, Osaka H, Yamamoto K, Kurosawa K. 1p36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype. *Pediatr Int* 52:547-550, 2010.

Osaka H, Hamanoue H, Yamamoto R, Nezu A, Ssaki M, Saitsu H, Kurosawa K, Shimbo H, Matsumoto N, Inoue K. Disrupted SOX10 regulation of GJB2 transcription causes Pelizaeus-Merzbacher-like disease. *Ann Neurol* 2010;68:250-254.

Komatsuzaki S, Aoki Y, Niihori T, Okamoto N, Hennekam RC, Hopman S, Ohashi H, Mizuno S, Watanabe Y, Kamasaki H, Kondo I, Moriyama N, Kurosawa K, Kawame H, Okuyama R, Imaizumi M, Rikiishi T, Tsuchiya S, Kure S, Matsubara Y. Mutation analysis of the SHOC2 gene in Noonan-like syndrome and in hematologic malignancies. *J Hum Genet.* 2010 Sep 30. [Epub ahead of print]

Tsuji M, Takagi A, Sameshima K, Iai M, Yamashita S, Shinbo H, Furuya N, Kurosawa K, Osaka H. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency with progressive polyneuropathy in an infant. *Brain Dev.* 2010 Sep 16. [Epub ahead of print]

Saito Y, Kubota M, Kurosawa K, Ichihashi I, Kaneko Y, Hattori A, Komaki H, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M. Polymicrogyria and infantile spasms in a patient with 1p36 deletion syndrome. *Brain Dev.* 2010 Aug 12. [Epub ahead of print]

黒澤健司 神経線維腫症 1 型における分子細胞遺伝学的スクリーニング 日レ病会誌 2010;1:35-37.

黒澤健司 細胞遺伝学的診断のアルゴリズム 日本臨牀 68(Suppl 8):170-176, 2010.

黒澤健司 外表奇形 小児内科 42:1123-1125, 2010.

黒澤健司(訳)形態異常の記載法—写真と用語の解説 鼻と人中 小児内科 2010;42:1298-1315.

黒澤健司 染色体異常の理解 臨床遺伝学講義ノート pp37-49, 千代豪昭監修 オーム社

2010.10.

古谷憲孝 黒澤健司 口唇口蓋裂の遺伝 胎児診断から始まる口唇口蓋裂—集学的治療のアプローチ— 小林眞司編 メジカルビュー社

pp32-38. 2010.3

黒澤健司 診断へのアプローチ 臨床症状 小児内科 2010;42:1123-1125.

2. 学会発表

榎本啓典、石川亜貴、古谷憲孝、黒澤健司 全サブテロミア FISH による診断未定症例のスクリーニング 第 113 回日本小児科学会 2010.23-25. 盛岡

石川亜貴、黒澤健司、山下純正 MECP2、L1CAM を含む Xq28 領域の重複を認めた重度精神遅滞の男児例 第 52 回日本小児神経学会 2010.5.20-22. 福岡

Kurosawa K, Enomoto K, Furuya N, Masuno M, Kuroki K. Trends of the incidence of twin births in Japan. 60th American Society of Human Genetics 2010.11.2-6. Washington DC. USA.

Miyatake S, Miyake N, Yamashita S, Kurosawa K, Matsumoto N. A novel homozygous intronic DARS2 mutation in a family with congenital leukoencephalopathy. 60th American Society of Human Genetics 2010.11.2-6. Washington DC. USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし