

研究要旨

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、解明されていない。本研究では探索的統計処理(いわゆるデータマイニング)である主座標分析をもちいて、診断基準案を探索した。主要な6徴候の各徴候を有するかどうかを二値化して二次調査の対象となった患者数x6の行列を作成し、主座標分析を行った。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施設に対して調査票を送付した。一次調査では回答のあった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。二次調査では当報告書作成時点までに24名分の施設から回答が得られた。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気管食道瘻で18名に認められた。鎖肛は14名に、心室中隔欠損は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名の中で、13の症状の組み合わせが観察された。最も頻度の高かった症状の組み合わせは心室中隔欠損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。下記の6徴のうち少なくとも2徴を満たすこと。① Vertebral defects 椎体奇形、② VSD 心室中隔欠損等の心奇形、③ Anal defects 鎖肛ないし肛門狭窄、④ Tracheo-Esophageal defects 食道気管瘻・食道閉鎖、⑤ Radial defects 橈側奇形、⑥ Renal defects 腎奇形 との暫定診断基準案を作成した。主座標分析(本報告2頁参照)により24名の患者の2次元空間における分布を観察すると、食道気管瘻を伴うグループは全ての象限に分布、鎖肛を伴うグループは第1ないし第4象限のみに分布、腎奇形を伴うグループは第4象限のみに分布していた。この結果から、臨床診断上、最も重要な所見は食道気管瘻であり、鎖肛の有無により更に、分類されること、腎奇形を伴う症例は特異な亜群を形成していることが示唆された。

研究協力者

柳橋達彦 (慶應義塾大学医学部小児科学教室)

A. 研究目的

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、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懸念が入るのではないかと懸念があった。実際、一次調査の実施中に、複数の奇形症候群の専門家から非典型例の扱いについて照会を受けた。そこで、探索的統計処理(いわゆるデータマイニング)である主座標分析をもちいて、診断基準案を探索した。

B. 研究方法

研究代表者が過去にZimmer Phocomeliaという他の稀少疾患の診断基準の検討の際に利用した探索的統計処理(いわゆるデータマイニング)の手法「主座標分析 Principal coordinate analysis」を(Kosaki et al. 1996)をVATER症候群の研究にも応用することとした。具体的には主要な6徴候の各徴候を有するかどうかを二値化して二次調査の対象となった患者数x6の行列を作成し、主座標分析を行った。Kosaki K, Jones MC, Stayboldt

C. Zimmer phocomelia: delineation by principal coordinate analysis. Am J Med Genet. 66:55-9, 1996)

C. 研究結果

主座標分析の実施に際しては統計処理/データマイニング用プログラミング言語Rを応用した。研究代表者は1996年に主座標分析を用いて四肢奇形の解析を行い、国際的に注目された。しかし当時、コンパイラ形式のフォートラン言語によってプログラミングを行ったため、他の研究者が当該方法を他の疾患に利用することは困難であった。今回、研究代表者はコンパイラ形式より利用しやすいインタープリター形式のR言語を利用し、比較的汎用性のある方法により、主座標分析を実施することが出来た。他の難治性疾患克服研究事業の研究班での利用を促進すべく、当研究班のホームページにて、R言語を用いた主座標分析の実施について情報を提供している。

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。各範囲の最大数で見積もると、患者数は $11 \times 5 + 10 \times 3 + 5 \times 74 = 455$ 名（～500名）となる。

当報告書作成時点までに24名分の施設から回答が得られている。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気管食道瘻で18名に認められた。鎖肛は14名に、心室中隔欠損は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名の中で、13の症状の組み合わせが観察された。最も頻度の高かった症状の組み合わせは心室中隔欠損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。

VATER症候群 診断基準（暫定案）

下記の6徴のうち少なくとも2徴を満たすこと。

- ① Vertebral defects 椎体奇形
- ② VSD 心室中隔欠損等の心奇形
- ③ Anal defects 鎖肛ないし肛門狭窄
- ④ Tracheo-Esophageal defects 食道気管瘻・食道閉鎖
- ⑤ Radial defects 橈側奇形
- ⑥ Renal defects 腎奇形

ただし、VATER症候群の診断においては下記の疾患でないことを除外すること。

トリソミー18、母体糖尿病、ファンconi貧血、水頭症合併例
十分条件については現在、検討中である。

D. 考察

当初の研究主要目標の1つである「VATER症候群の患者数の推定」を達成できた。主座標分析（本報告2頁参照）により24名の患者の2次元空間における分布を観察すると、食道気管瘻を伴うグループは全ての象限に分布、鎖肛を伴うグループは第1ないし第4象限のみに分布、腎奇形を伴うグループは第4象限のみに分布していた。この結果から、臨床診断上、最も重要な所見は食道気管瘻であり、鎖肛の有無により更に、分類されること、腎奇形を伴う症例は特異な亜群を形成していることが示唆された。

現在、二次調査の途中である。全てのデータが

得られた段階で、再び上記の方法による分析を行い、上記の解釈が適切であることを確認し、臨床診断基準策定の基礎データとする。現時点での暫定診断基準は別添の通りであるが、二次調査が完了した時点で、再度、主座標分析を行い、診断基準の妥当性を確認する計画である。

E. 結論

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。本研究では探索的統計処理（いわゆるデータマイニング）である主座標分析をもちいて、診断基準案を探索した。主要な6徴候の各徴候を有するかどうかを二値化して二次調査の対象となった患者数 $\times 6$ の行列を作成し、主座標分析を行った。24名の患者の2次元空間における分布を観察すると、食道気管瘻を伴うグループは全ての象限に分布、鎖肛を伴うグループは第1ないし第4象限のみに分布、腎奇形を伴うグループは第4象限のみに分布していた。この結果から、臨床診断上、最も重要な所見は食道気管瘻であり、鎖肛の有無により更に、分類されること、腎奇形を伴う症例は特異な亜群を形成していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 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

研究要旨

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は急務である。

A. 研究目的

VATER 連合症候群は、V: Vertebral defects 椎体異常、A: Anal atresia 肛門奇形(鎖肛など)、TE: Tracheoesophageal fistula with Esophageal atresia 気管食道瘻、R: Renal or Radial defects 腎奇形あるいは橈骨奇形という5徴候の頭文字の組み合わせに由来する。C: Cardiac defects 先天性心疾患を加えて VACTER 連合とよぶ場合もあれば、L: limb defect 四肢異常を加えて VACTERL 連合とよぶ。さらに H:

Hydrocephalus 水頭症を合併する場合は VACTERL-H 連合となる。

新生児期より、呼吸・循環、消化器、腎泌尿器、運動器など多系統障害を呈する。数回以上にわたって外科手術を必要としたり、栄養管理、感染対策、リハビリテーションなどの慢性的かつ持続的な医学管理を要する疾患である。生活面での長期にわたる支障を来す。欧米では1万出生に1~1.6名と推定されているが、正確な罹患率は不明である¹⁾²⁾。

VATER 連合症候群の責任遺伝子は現在のところ不明である。HOXD13 遺伝子異常、FANCONI 貧血、ミトコンドリア異常症や染色体異常症などで類似した表現型を呈する場合もある。VACTERL-H では、PTEN 遺伝子異常が同定された例もある。

VATER 連合症候群はほとんどが新生突然変異であり、人種間の有病率差はそれほど大きくないと思われるが、日本での有病率・患者数に関するデータは存在しない。VATER連合症候群は特定疾患

に指定されているわけでもなく、患者を正確に把握する方法は存在しない。しかし、有病率を明確にすることは、本症候群に必要な医療供給体制の整備に重要である。小児専門病院の受診患者数から、大阪府域での VATER 連合症候群の有病率の推測を試みた。

B. 研究方法

大阪府立母子保健総合医療センターは大阪府の中核的な小児専門医療機関である。VATER 連合症候群のような多発先天異常症候群や外科系疾患を持つ小児は、専門的医療をもとめて受診するため、患者が集積する。特に気管食道瘻や食道閉鎖の合併のため、小児外科に紹介される例が多い。比較的頻度の高い先天異常症候群やダウン症候群など、有病率に関するデータが存在する既知の疾患と比較することにより、およその有病率や患者数を推測できる。VATER 連合症候群は典型例のみを対象とした。臨床診断は分担研究者である岡本伸彦が実施した。

C. 研究結果

現時点では当センターで VATER 連合症候群患者を 22 例フォロー中である。5 年ごとに区分した年齢別の患者数を表に示した。新生児期に外科系の診療科に受診する例が多かった。期間によって多少の差があるが、年間1例程度の VATER 連合症候群患者が受診している。なお、新生児期早期に死亡した重症例を除外した。

ダウン症候群は年間約 30 例の初診があり、ほぼダウン症候群児 30 例に対して 1 例程度の VATER 連合症候群の初診があることになる。ダウン症候群の有病率(出生率)は 700-1000 人に 1 人といわれており、単純に 30 倍すれば VATER 連合症候群の有病率(出生率)は 2 万-3 万人に 1 人程度となる。

一方、有病率に関する文献データが存在し、比較的頻度の高い他の先天異常症候群との有病率の比較を行った。当センターで 22 例の VATER 連合症候群を経験したのと同じ期間に、22 例の Rubinstein-Taybi 症候群(RTS)、48 例の Prader-Willi 症候群(PWS)、22 例の Sotos 症候群(STS)、20 例の Williams 症候群

(WS)、21例の Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) が受診した。

PWS は主要な症候群の中では患者数が多く、他の症候群の2倍強であった。他 4 疾患と VATER 連合症候群の患者数はほぼ同数であった。PWS は過去の報告で出生約 12,000 人に 1 人の有病率とされている。少なめの報告では 25,000 人に 1 人である³⁾⁴⁾。RTS に関する報告は少ないが、Hennekam らは、オランダで出生 10 万人から 12 万 5 千人に 1 人の有病率を報告した⁵⁾。STS は Gene tests に 14,000 人に 1 人という記載があるが、日本での罹患率の報告はない。WS は一般的に 20,000 人に 1 人程度とされている。WS はノルウェイでは 7500 人に 1 人という報告⁶⁾があるが、日常臨床ではそれほど多くない印象が強い。WS も日本での有病率の報告はない。BWS はジャマイカでは 13,700 人に 1 人という報告⁷⁾があり、日本ではこれと軽症例を含めるとやや多いと考えられている。これから推測を行っても、VATER 連合症候群の有病率は出生 2 万から 3 万人に 1 人と推測される。日本の出生数を 100 万人とすると、年間 30-50 名程度の VATER 連合症候群が出生していることになる。

D. 考察

ある疾患の患者数を把握することは、特定疾患などでは登録患者数を調査により可能である。しかし、VATER 連合症候群のような稀少な疾患においては悉皆調査は困難である。医療機関ごとの患者数は把握可能であるが、稀少疾患では一般の小児医療機関では正確な診断がついていない場合も少なくない。多数の患者が集積する専門医療機関での患者数からの推測は有用な手段となる。諸外国においても VATER 連合症候群の有病率に関する報告は少ない。

今回の検討結果と比較すると欧米の有病率は若干多めである。ほとんどの症例が新生突然変異であるので、人種間による有病率の差はほとんどないと予想されるので、未診断例が存在する可能性は否定できない。

VATER 連合症候群の多くは気管食道瘻や食道閉鎖を合併するため、小児外科の専門的診療体制が必要な医療機関に入院することとなる。脊椎や四肢異常を伴うため、整形外科の治療も必要である。診療体制の構築が必要である。

表 主要な先天異常症候群の出生年別患者数 (大阪府立母子保健総合医療センター患者統計)

症候群 出生年	VATE 連合 症候群	Rubinstein- Taybi 症候 群	Prader- Willi 症候 群	Sotos 症候群	Williams 症候群	Beckwith- Wiedemann 症候群
2005-	11	6	8	5	4	5
2000-2004	4	7	16	5	3	7
1995-1999	3	5	10	5	9	4
-1994	4	4	14	7	4	5
合計	22	22	48	22	20	21

VATER 連合症候群の確定にいたらず、原因不明の先天異常症候群として診断が確定していない例もありうる。主要症状への対応だけでなく、可能性のある多様な病態に対応するためには早期に正確な診断を実施する必要がある。

今回の調査の対象は大阪地区であるが、他の地域での同様な調査と比較することにより、VATER 連合症候群の有病率はさらに正確に推測できると考えられる。

E. 結論

今回の検討において、日本における VATER 連合症候群の罹患率は出生 2 万から 3 万人に 1 人と推測された。全国では年間 30-50 名程度の VATER 連合症候群を持つ小児が出生していると推定された。一部の小児期死亡例もあるが、成人例も多数知られており、VATER 連合症候群患者は全国で数千人存在すると考えられる。

VATER 連合症候群の概念が小児医療で浸透してきたのは最近 20 年ほどであるので、正確な診断を受けていない成人例が多いと思われる。VATER 連合症候群は生後早期に診断して関連

各科で適切な対応をすすめる体制構築が必要である。患者の QOL 向上のためさまざまな工夫が必要な疾患である。長期的な予後の把握のための継続的な研究が必要である。

参考文献

- 1) Khoury MJ, Cordero JF, Greenberg F, James LM, Erickson JD. A population study of the VACTERL association: evidence for its etiologic heterogeneity. Pediatrics. 1983 ;71:815-20.
- 2) VATER association “Atlas of genetic Diagnosis and Counseling” H. Chen Humana Press 2006
- 3) Smith A, Egan J, Ridley G, Haan E, Montgomery P, Williams K, Elliott E. Birth prevalence of Prader-Willi syndrome in Australia. Arch Dis Child. 2003 ;88:263-4.
- 4) Vogels A, Van Den Ende J, Keymolen K, Mortier G, Devriendt K, Legius E, Fryns JP. Minimum prevalence, birth incidence and cause of death for Prader-Willi syndrome in Flanders. Eur J Hum Genet. 2004;12:238-40.
- 5) Hennekam RC, Van Den Boogaard MJ, Sibbles BJ, Van Spijker HG. Rubinstein-Taybi syndrome in The Netherlands. Am J Med Genet Suppl. 1990b; 6: 17-29
- 6) Strømme P, Bjørnstad PG, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome. J Child Neurol. 2002 ;17:269-71.
- 7) Thorburn MJ, Wright ES, Miller CG, Smith-Read EH. Exomphalos-macroglossia-gigantism syndrome in Jamaican infants Am J Dis Child. 1970 ;119:316-21.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

発表論文

Hosokawa S, Takahashi N, Kitajima H, Nakayama , Kosaki K, and Okamoto N A case of Brachmann-de Lange syndrome with congenital diaphragmatic hernia and *NIPBL* gene mutation Congenit Anom (Kyoto). 2010 ;50:129-132

Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Kawame H, Fujiwara I, Takada F, Ohata T, Sakazume S, Ando T, Nakagawa N, Lapunzina P, Meneses AG, Gillessen-Kaesbach G, Wiczorek D, Kurosawa K, Mizuno S, Ohashi H, David A, Philip N, Guliyeva A, Narumi Y, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y. Molecular and

clinical analysis of *RAF1* in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. Hum Mutat. 2010 ;31:284-94

Okamoto N, Akimaru N, Matsuda K, Suzuki Y, Shimojima K, Yamamoto T. Co-occurrence of Prader-Willi and Sotos syndromes. Am J Med Genet A. 2010 ;152A:2103-9

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]

Takanashi J, Arai H, Nabatame S, Hirai S, Hayashi S, Inazawa J, Okamoto N, Barkovich AJ. Neuroradiologic features of *CASK* mutations. Am J Neuroradiol. 2010 ;31 :1619-22.

Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. J Hum Genet. 2010 Oct 28.

Filges I, Shimojima K, Okamoto N, Röthlisberger B, Weber P, Huber AR, Nishizawa T, Datta AN, Miny P, Yamamoto T. Reduced expression by SETBP1 haploinsufficiency causes developmental and expressive language delay indicating a phenotype distinct from Schinzel-Giedion syndrome. J Med Genet. 2010 Oct 30.

H. 知的財産権の出願・登録

なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

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

研究分担者 水野誠司

愛知県心身障害者コロニー中央病院 臨床第一部長

研究要旨

VATER 症候群(VATER 連合)は椎骨異常(Vertebrae anomalies)、肛門奇形(Anal atresia)、気管食道瘻(Tracheoesophageal fistula)、橈骨奇形および腎奇形(Radial and Renal dysplasia) の 5 徴候の頭文字の組み合わせで命名されたものである。心奇形(Cardiac anomaly)と橈骨以外の四肢異常(Limb anomalies)を合わせて VACTERL 症候群(VACTERL 連合)とよぶこともある。複数の臓器において先天異常が発症する機序は不明であり、その発生病態の解明が待たれている。

本症候群は各々の奇形が外科的治療の対象になるために診療科が複数になること、多くが知的障害を伴わないために小児科での受診の機会が少ない。そのために成長発達を含めた包括的な診療を受けていない場合が多い。今回 VATER 症候群を疑われた多発奇形を有する3症例の臨床経過を明らかにし、その医療の問題点と患者支援の方法について検討したところ、診断名のない先天多発奇形患児への情報提供と包括医療が不十分な現状が認識された。当研究班では患者支援を目的として VATER 症候群のウェブサイトを作成し公開した。

研究協力者

小崎健次郎(慶應義塾大学医学部小児科学教室)

小崎 里華(国立成育医療センター・遺伝診療科)

A. 研究目的

VATER 症候群は、V=椎体異常、A=肛門奇形、TE=気管食道瘻、R=橈骨奇形および腎奇形という 5 徴候の頭文字の組み合わせで命名された症候群である。本症候群において、複数の臓器において先天異常が発症する機序は不明であるが、異常を持つ臓器の発生時期の多くが胎生期の初期(原腸形成期)であることから、この時期に胎児の広い範囲に障害が起きていると推測されている。

全国で系統的な調査は行われたことが無く、実際の患者さんの総数は明らかにされていない。VATER 症候群のような複数の奇形を持つ患児や家族への支援は、その診断に基づいた科学的な情報による治療と健康管理が最重要であるとともに、稀少な疾患をもつ子どもの両親の不安や戸惑いに対する心理的な支援も同様に重要である。今回愛知県の心身障害者総合施設である心身障害者コロニー中央病院に通院する患児で、VATER 症候群を疑われて受診した患児の臨床経過と支援について考察する。

また本症候群の患児家族への正確な情報提供の一つの手段として当研究班で VATER 症候群のウェブサイトを構築し公開した。

B. 研究方法

愛知県心身障害者コロニー中央病院小児内科を受診中の患児のなかで、VATER 症候群を疑われて受診した症例について、過去の病歴録や診療録の解析、あるいは患児の親への聞き取り調査により、その遺伝歴、周産期歴、身体的特徴および合併症、精神発達について検討し、現在通院中の診療科と現在の生活上の問題点について聴取した。

(倫理面への配慮)

患者らは未成年であるため、研究への参加としての情報の収集に際しては代理人である両親に対して説明を行い同意を得た上で、個人情報保護の観点から患者氏名が特定されることのないように留意した。

C. 研究結果

症例1 12歳男児。

主訴:低身長、多発奇形の診断、

現在までの診断名:

鎖肛、脊椎奇形、過剰肋骨、二分脊椎、側弯症、多指症(拇指)、神経因性膀胱、膀胱尿管逆流、水腎症、尿道下裂、水頭症、低身長、脚長差、停留精巣、二分口蓋垂

病歴の概略:近親婚のない健康な両親の第1子として正期産にて地元のT市民病院にて出生。

妊娠中の糖尿病や催奇形物質の曝露はない。出生時に鎖肛を診断されて日齢1に総合周産期センターのあるN総合病院小児外科に転院。日齢2に鎖肛の手術を受ける。入院中に脊椎奇形、多指症、水頭症を診断。退院後N大学病院整形外科受診(小児整形外科、手の外科、脊椎外科)。2歳で椎弓形成術、脊髄係留解除術をうける。排尿障害、排便障害があり失禁する。知的障害はなく、耳介奇形や特徴的顔貌も認められない。幼稚園、小学校は普通クラス。

通院診療科

A 総合病院小児外科(鎖肛)
大学病院整形外科 脊椎外科(脊椎奇形側弯)
大学病院整形外科 手の外科(多指症)
大学病院整形外科 小児外科(脚長差)
B 総合病院小児外科(神経因性膀胱、停留精巢)
小児医療センター内分泌科(低身長)
小児医療センター泌尿器科(神経因性膀胱CIC)
療育センター整形外科(運動発達遅滞)
療育総合病院脳神経外科(水頭症、尾部退行症候群)
療育総合病院小児科(成長発達、包括的診療)

現状の問題点

患児は出生時に鎖肛を診断されて以来、複数の外科系診療科に通院を余儀なくされている。乳幼児期は主として鎖肛及び二分脊椎の検査治療、幼児期は多指症、側弯、水腎症。学童期には脚長差、側弯、神経因性膀胱、低身長が診療の主体であった。食道気管支奇形が無いためにVATER 連合には合致しない。現在までどの時期においても年間に数十回の通院が必要であった。側弯も進行しており全体を統括する診療科がないために将来への不安が強い。将来の次子への遺伝についても質問があった。

症例22歳男児

主訴:先天多発奇形の診断と療育について
現在までの診断名:食道気管支瘻、脊椎奇形、難聴、耳介奇形、耳小骨奇形、成長障害、口蓋裂、軽度精神遅滞
病歴の概略:近親婚のない健康な両親の第1子として出生。在胎39週、出生体重2100g、身長46cm。出生後の哺乳不良と経管チューブ挿入困難にて食道閉鎖を診断され大学病院小児外科医転院。その後複数の奇形を診断される。3ヶ月時に胃瘻造設。ABRで100dBの両側難聴、耳小骨奇形を診断される。耳介奇形、小耳症があり形成外科にて経過観察中。1歳9ヶ月で郊外形成術。独り歩き2歳6ヶ月、軽度の運動発達遅滞を認める。鑑別診断としてVATER症候群、CHARGE症候群が挙げられるが、いずれも診断基準を満たさず、現時点では診断未定の多発奇形症候群となる。

通院診療科

大学病院小児外科(食道閉鎖症C型、食道裂孔ヘルニア)
大学病院整形外科(脊椎奇形、垂直距骨)
大学病院耳鼻科(難聴、耳小骨奇形、中耳炎)
大学病院形成外科(耳介奇形)
大学病院口腔外科(軟口蓋裂)
総合病院小児科(成長障害、発達遅滞)
総合病院眼科(水晶体混濁)
総合病院リハビリ科(発達遅滞)
療育センター整形外科(運動発達遅滞)
療育総合病院小児科(成長発達、包括的診療)

療育教育

地域療育センター
聾学校通園部

現状の問題点.1

患児は新生児期に食道閉鎖を診断され、自宅から遠方の大学病院に搬送された後に複数の先天奇形を診断された。現在10の診療科に通院している。通院先は、大学病院、地元の総合病院、地元の療育センターに大別される。生活上の主たる問題点は、現在は摂食である。摂食に関わる食道奇形、口蓋裂、発達遅滞の診療が各々別の診療科であり、また大学病院には総合的に診療する診療科が存在せず、地元の総合病院は急性疾患の診療が主であるため包括的診療がなされていない。福祉支援として全体的な発達遅滞により療育手帳(C判定)を取得している。聴力障害による身体障害者手帳の取得予定である。

症例34歳女児

主訴:先天多発奇形の診断と療育について、兄弟への遺伝について
現在までの診断名:鎖肛、脊椎奇形、心房中隔欠損症、外斜視、成長障害、
病歴の概略:特記する遺伝歴のない健康な両親から出生した第一子。正期産にて出生体重2906g身長52cm頭囲33cmの標準計測値で出生。出生後に鎖肛に気付かれ出生産婦人科病院からN大学病院に転送入院。小児外科にて肛門形成術を受ける。その後心雑音から左末梢性肺動脈狭窄及び心房中隔欠損症を診断されN大学病院小児科循環器に受診。同じく乳児期に脊椎奇形(第4腰椎半椎)を診断されて整形外科受診し定期的に診察を受けている。脊椎奇形と鎖肛からVATER症候群を疑われていた。生後6ヶ月頃から斜視が認められてA小児総合センター病院眼科受診。-3SDの低身長に対し成長ホルモン分泌負荷試験を行い正常なGH分泌を認めている。精神発達は田中ビネーで81と境界領域。

現在通院中の医療機関

大学病院小児外科(鎖肛)
大学病院小児科循環器(心房中隔欠損症)
大学病院小児科神経(発達遅滞)
大学病院小児整形外科(脊椎奇形、側弯)

小児医療センター眼科(斜視)
地域基幹病院小児科内分泌外来(低身長)
地域療育センター小児科(発達遅滞)
地域療育センター整形外科
療育総合病院小児内科(遺伝科)

療育手帳 対象外
身体障害者手帳 未取得

現状の問題点

患児は新生児期に鎖肛と先天性心疾患を診断され、自宅から遠方の大学病院に搬送された後に脊椎奇形を含む複数の先天奇形を診断された。現在 10 の診療科に通院している。食道気管支奇形が無く第一子であり、新生児期は次々に診断される疾患に戸惑い 2 歳過ぎからは軽度発達遅滞、低身長(成長障害)と生活における諸問題(鎖肛の合併症としての排便障害の対応が両親の心配事である。今後就学以後の通院の負担が両親の心配の一つである。

D. 考察

先天多発奇形で VATER 症候群を疑われて受診した 3 例について検討した。いずれも鎖肛と脊椎奇形があり VATER 症候群を疑われていたが、食道気管支奇形や橈骨奇形のいずれかが存在しないために確定診断に至っていない。VATER 症候群は現時点で臨床的診断基準がなく、類似症例の場合には Fanconi 貧血(心臓、四肢、椎体の異常)、Holt-Oram 症候群(心臓、上肢とくに橈骨側の欠損)Townes-Brocks 症候群(拇指の異常、鎖肛、鰓弓由来組織の低形成)なども鑑別する。その上で診断名が確定しない症例も少なくない。今回の 3 例も明かな知的障害は認められないために小児科でのフォローアップがなく各々の合併症の治療を担当する外科系の診療科の定期診療のみであるために、生活面での支援や成長発達を含めた包括的診療が十分ではないと考えられた。

ほとんどの両親がこどもの疾患についてインターネットで検索をする現在、診断名が与えられないことで、患者は自身での情報検索や家族間交流の機会も少なくなる。診断名による患者サポートグループやウェブサイトが相次いで作られる一方で、診断名の未確定な先天多発異常患児の親が感じる不安は大きい。そうしたデメリットを解消するためにも、診断未定の多発奇形であっても、例えば脊椎奇形と鎖肛と伴う知的障害の無い小児、多指症と鎖肛と難聴を伴う小児など、多発奇形の部位の組み合わせで医療情報は患者間交流が可能な医学情報提供サイトも今後ニーズがあると思われる。実際に愛知県心身障害者コロニー中央病院小児内科に受診する先天多発奇形児の半数以上は診断名が確定していない。

現在は小児病院の遺伝科が多発先天奇形患児の包括医療の一端を担っているが、患者の数に比べて専門医の数は少なくその需要を満たしていない。一つには多発奇形の包括医療に対してその診療が想定されておらず医療保険制度においてその特殊診療に対する医療報酬が設定されていないことも、包括医療が進まない原因の一

つであろう。

今回本研究班では VATER 症候群の情報を患者家族・医療関係者の方に提供するために新たなウェブサイトを開設した(図 1)。

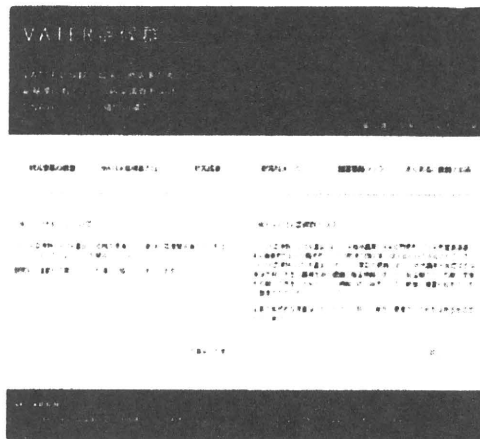


図 1.

E. 結論

鎖肛と脊椎奇形を合併し VATER 症候群を疑われて受診した症例についてその臨床経過と現在の問題点について検討し、診断名のない先天多発奇形患児への情報提供と包括医療が不十分な現状が認識された。研究班では情報提供と患者支援を目的として最新疾患情報が掲載されたウェブサイトを制作し公開した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamada K, Fukushi D, Ono T, Kondo Y, Kimura R, Nomura N, Kosaki KJ, Yamada Y, Mizuno S, Wakamatsu N.

Characterization of a de novo balanced t(4;20)(q33;q12) translocation in a patient with mental retardation.

Am J Med Genet A. 2010 Dec;152A(12):3057-67

2) Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J.

Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies.

J Hum Genet. 2010 Oct 28. [Epub ahead of print]

3) Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Kawame H, Fujiwara I, Takada F, Ohata T, Sakazume S, Ando T, Nakagawa N, Lapunzina P, Meneses AG, Gillessen-Kaesbach G, Wiczorek D, Kurosawa K, Mizuno S, Ohashi H, David A, Philip N, Guliyeva A, Narumi Y, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y.

Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation. Hum Mutat. 2010 Mar;31(3):284-94.

4)宮島雄二、北瀬悠磨、水野誠司、堺 温哉、松本直通、小川昭正

Marfan 症候群に合併した小児急性リンパ性白血病

臨床血液 第52巻第1号 28-31

中村みほ、水野誠司、熊谷俊幸

5)Williams 症候群における視空間認知障害に対応した書字介入法の検討

脳と発達 2010;42:353-358

2. 学会発表

S. Mizuno, M. Oshiro, M. Seishima, N. Okamoto, Y. Makita, N. Wakamatsu

Ectodermal Dysplasia, Vertebral Anomalies, Hirschsprung Disease, Growth and Mental Retardation: A Clinical Report of a Boy with BRESEK Syndrome.

60th annual meeting of American Society of Human Genetics Washington DC 2010.11.3

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究要旨

VATER症候群(VATER連合)は多発奇形症候群である。一部の症例がSALL1遺伝子の変異により発症することが知られているが、大部分の症例で遺伝的原因は未解明である。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。末梢血由来ゲノム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、エクソン領域の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。その後、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、粗DNA配列データを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のエクソン2およびエクソン3領域近傍にマッピングされ高い特異性を示した。極めて高い効率で標的領域遺伝子配列の濃縮されることが示された。今後、VATER症候群の発症との関連が強く示唆されているSHH信号伝達系を構成する遺伝子群の網羅的遺伝子解析への応用が期待される。一方、SALL1エクソン1 aの配列データは十分に得られなかった。一般に、標的領域のDNA塩基配列がグアニンやシトシンに富む場合(GC-rich)、回収効率が著しく低下すること、遺伝子の第1エクソンはGCリッチなことが多いことが知られており、本法を用いた網羅的な遺伝子解析法を行う場合に、注意を要することが明らかにされた。

研究協力者

鳥居千春 (慶應義塾大学医学部小児科学教室)
清水厚志 (慶應義塾大学医学部分子生物学教室)

A. 研究目的

VATER症候群(VATER連合)は多発奇形症候群である。一部の症例がSALL1遺伝子の変異により発症することが知られているが、変異の同定されない症例が大部分である。本研究では、次世代シーケンサーを用いた、高効率な遺伝子診断法の確立をめざし、ゲノム上の特定領域を選択的に濃縮して解析する技術を応用した分析手法の最適化を行った。

B. 研究方法

1) 標的領域遺伝子配列の濃縮

末梢血から得られたゲノムDNAをアコースティックソルビライザー(Covaris)によって断片化した。平行して、アジレント社のエクソンキャプチャキット(SureSelect Human All Exon 50 Mb kit)を用いてゲノムの標的領域に相補的な配列を持つ120bpのシングルオリゴシーケンスを作成した。

エクソン領域のDNAを選択的に回収した。当該キットを利用して、この相補的なオリゴDNAを用いて、ゲノムDNAの特定領域の配列を濃縮した。

2) 定法によりDNAにアダプターを連結し、PCR法

増幅後、イルミナ社GAIIxで75塩基のペアエンドシーケンシングを行った。その後、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、粗DNA配列データを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。

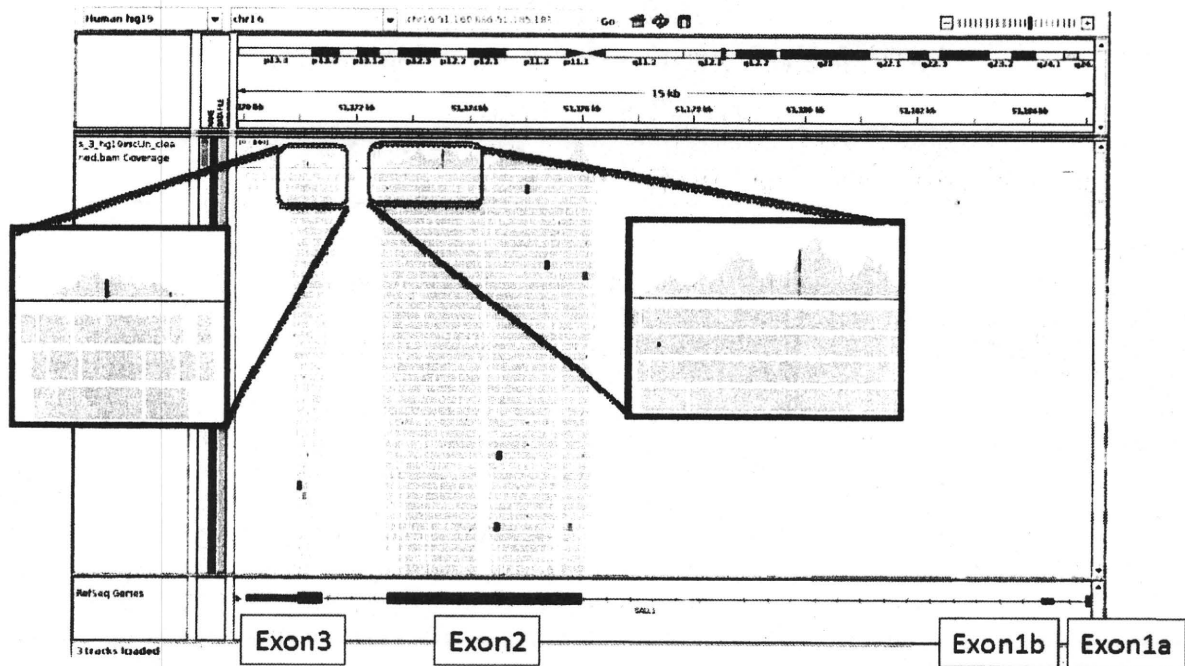
解析にあたっては個人情報の保護に関する法律を踏まえ、文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、文部科学省・厚生労働省「疫学研究指針」を遵守し、倫理委員会の承認の下に研究を実施した。

C. 研究結果

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のエクソン2およびエクソン3領域近傍にマッピングされ高い特異性とカバー率を示した。

図 1

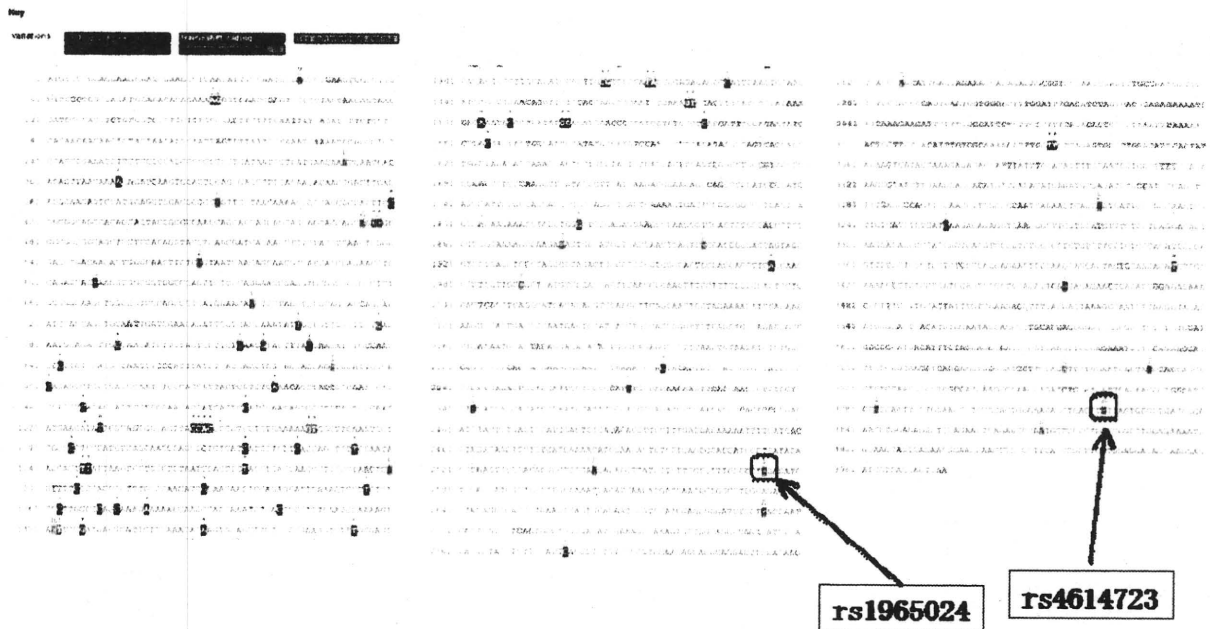
SALL1のゲノム構造とマッピングデータのゲノムブラウザーによる表示



SALL1のエキソン2、エキソン3から既知のSNPs (左拡大図赤、右拡大図緑) を同定
 一方でエキソン1 aおよびエキソン1 bはほとんどマッピングされていなかった (図 1 右端)。
 新規の変異は見つからなかったが、既知のSNPs (rs1965024、rs4614723) が同定された。(図 2)

図 2

SALL1のコーディング/スプライスサイトの多型



既知の2つのSNPs (rs1965024、rs4614723) を同定。

D. 考察

極めて高い効率で標的領域遺伝子配列が濃縮されることが示された。今後、VATER 症候群の発症との関連が強く示唆されている SHH 信号伝達系を構成する遺伝子群の網羅的遺伝子解析への応用が期待される。さらに、次世代シーケンサーを臨床応用するためには、より効率的に利用することが求められる。その際、本研究で示したような、標的配列濃縮技術の活用が必須であると考えられる。

先行研究では標的領域のDNA塩基配列がグアニンやシトシンに富む場合（GC-rich）、回収効率が著しく低下することが報告されており、SALL1エクソン1aの配列データが十分得られなかった一因と考えられた。一般的に遺伝子の第1エクソンはGCリッチなことが多いことが知られており、本法を用いた網羅的な遺伝子解析法を行う場合に、注意を要することが明らかにされた。

E. 結論

VATER症候群(VATER連合)の大部分の症例遺伝的原因は未解明である。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。次世代シーケンサーにより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のエクソン2およびエクソン3領域近傍にマッピングされ高い特異性を示した。極めて高い効率で標的領域遺伝子配列の濃縮されることが示された。一方、SALL1エクソン1aの配列データは十分に得られなかった。一般に、標的領域のDNA塩基配列がグアニンやシトシンに富む場合（GC-rich）、回収効率が著しく低下すること、遺伝子の第1エクソンはGCリッチなことが多いことが知られており、本法を用いた網羅的な遺伝子解析法を行う場合に、注意を要することが明らかにされた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 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

研究報告書

VATER症候群における消化器奇形(食道気管瘻・鎖肛)の実態

分担研究者 星野 健

慶應義塾大学 医学部 外科教室 小児外科 講師

研究要旨

原因不明の多発症候群である VATER 症候群を対象として全国調査を行い、小児外科的な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。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胎糖尿病合併症例は、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。

研究協力者

小崎里華 (国立成育医療研究センター)

A. 研究目的

VATER症候群は原因不明な多発奇形症候群である。小児外科的な観点からは、食道・気管の奇形と直腸肛門奇形、特に鎖肛が重要である。本研究では、全国調査を行い、VATER症候群と診断される症例を対象として、小児外科的な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 症例について小児外科的な合併症を総括した。

2次調査では、小児外科領域については下記の項目を質問した。

鎖肛(高位鎖肛・低位鎖肛・直腸会陰瘻・直腸尿道瘻・直腸腔瘻)、食道気管瘻/食道閉鎖、十二指腸閉鎖、後鼻孔閉鎖、咽頭狭窄、鼠径ヘルニア、小陰茎、停留精巣

C. 研究結果

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胎糖尿病合併症例は、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。それぞれの異常のスペクトラムとその頻度について表 1 に示す。

食道気管奇形については Gross 分類について回答のあった 84 例中、A 型が 7 例、B 型が 1 例、C 型が 74 例、D 型が 2 例で、食道気管奇形全般で言われているように、C 型が多かった。

十二指腸閉鎖を示した症例を 10 例に認め、注意すべき合併症と考えられた。後鼻孔閉鎖を合併した症例を 2 例に認めた。後鼻孔閉鎖は VATER 連合との鑑別を要する CHARGE 症候群(旧称 CHARGE 連合)の主症状であることから、該当する 2 例は CHARGE 症候群の可能性があると推測された。

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小児外科的症候の分布を初めて明らかにすることができた。

食道気管瘻の頻度が比較的高く、鎖肛と同程度であることが明らかになった。

調査対象を小児遺伝科に加えて小児外科施設としたことから、小児外科疾患が多く認められた、ascertainment bias である可能性も想定された。今後、整形外科専門施設や腎臓病専門施設などに対する追加調査を行うことが望ましい。

また、今回のアンケートは主に解剖学的異常に着目して、調査を行った。今後、機能的な予後について解析を進める必要がある

E. 結論

水頭症や母体糖尿病の合併のない VATER 症候群患者 112 例中、鎖肛は 80 例(71.5%)、食道気管奇形は 90 例(80.4%)に認められた。鎖肛と食道気管奇形が VATER 症候群の主要な合併症であることが確認された。食道気管奇形については Gross C 型が多く、VATER 症候群の一部ではない食道気管奇形と同様であることが確認された。十二指腸閉鎖を示した症例を 10 例に認め、注意すべき合併症と考えられた。後鼻孔閉鎖を合併した症例を 2 例に認め CHARGE 症候群の可能性があると推測された。

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

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

二次調査で回収された 120 例の解析結果

TE						
消化管奇形 有・無	食道気管瘻	食道閉鎖	Gross	十二指腸閉鎖	後鼻孔閉鎖	咽頭狭窄
有	有	有	有	A	有	有
93	73	86	7	11	3	3
77.5%	60.9%	71.7%	5.9%	9.2%	2.5%	2.5%
無	無	無	無	B	無	無
25	22	10	1	77	79	80
20.9%	18.3%	8.3%	0.9%	64.2%	65.8%	66.7%
	不明	不明	C	不明	不明	不明
	0	0	75	4	8	6
	0.0%	0.0%	62.5%	3.3%	6.7%	5.0%
無回答	無回答	無回答	D	無回答	無回答	無回答
2	25	24	2	28	30	31
1.6%	20.8%	20.0%	1.6%	23.3%	25.0%	25.8%
			無回答			
			35			
			29.1%			

A					
鎖肛有・無	高位鎖肛	低位鎖肛	直腸会陰瘻	直腸尿道瘻	直腸腔瘻
有	有	有	有	有	有
87	32	35	6	21	13
72.5%	26.7%	29.2%	5.0%	17.5%	10.9%
無	無	無	無	無	無
32	39	39	60	48	54
26.7%	32.5%	32.5%	50.0%	40.0%	45.0%
	不明	不明	不明	不明	不明
	3	3	2	2	3
	2.5%	2.5%	1.7%	1.7%	2.5%
無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答
1	46	43	52	49	50
0.8%	38.3%	35.8%	43.3%	40.8%	41.6%

水頭症合併症例と母体糖尿病合併症例を除いた 112 例の解析結果

TE						
消化管奇形 有・無	食道気管瘻	食道閉鎖	Gross	十二指腸閉鎖	後鼻孔閉鎖	咽頭狭窄
有	有	有	A	有	有	有
90	72	85	7	10	2	3
80.4%	64.3%	75.9%	6.3%	9.0%	1.8%	2.7%
無	無	無	B	無	無	無
20	20	8	1	75	78	79
17.9%	17.8%	7.1%	0.9%	67.0%	69.6%	70.6%
不明	不明	不明	C	不明	不明	不明
	0	0	74	4	7	5
	0.0%	0.0%	66.0%	3.5%	6.3%	4.4%
無回答	無回答	無回答	D	無回答	無回答	無回答
2	20	19	2	23	25	25
1.7%	17.9%	17.0%	1.8%	20.5%	22.3%	22.3%
			無回答			
			28			
			25.0%			

A					
鎖肛有・無	高位鎖肛	低位鎖肛	直腸会陰瘻	直腸尿道瘻	直腸腔瘻
有	有	有	有	有	有
80	28	33	6	20	12
71.5%	25.0%	29.5%	5.4%	17.9%	10.8%
無	無	無	無	無	無
31	37	35	56	44	50
27.7%	33.1%	31.3%	50.0%	39.3%	44.7%
不明	不明	不明	不明	不明	不明
	3	3	2	2	3
	2.7%	2.6%	1.8%	1.8%	2.6%
無回答	無回答	無回答	無回答	無回答	無回答
1	44	41	48	46	47
0.8%	39.2%	36.6%	42.8%	41.0%	41.9%

研究要旨

VATER 連合は V=脊椎、A=肛門、T=気管、E=食道、R=腎臓 を主徴とする先天奇形症候群である。C=先天性心疾患、L=四肢奇形の合併も高頻度に認め、これらを伴うものを VACTERL 連合という。循環器・呼吸器という生命維持に必須の臓器の障害に運動器の障害(橈骨奇形・側彎)を伴う、慢性的かつ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。本分担研究班では、VATER 連合患者由来の iPS 細胞を用いて、VATER 連合の病態解明、治療方法の開発を目指す。本年度は、iPS 細胞の作成条件について最適化をおこなった。また、作成された iPS 細胞の染色体構成(核型)に変化がないことを確認するために G バンド検査を実施した。今後は、可能であれば、G バンド法よりさらに詳しい検査(例えばアレイ CGH 法)による検査が望ましいと考えられる。

研究協力者

奥野 博庸 (慶應義塾大学医学部小児科学教室)

A. 研究目的

VATER 症候群は V=脊椎、A=肛門、T=気管、E=食道、R=腎臓 を主徴とする先天奇形症候群である。C=先天性心疾患、L=四肢奇形の合併も高頻度に認め、これらを伴うものを VACTERL 連合という。循環器・呼吸器という生命維持に必須の臓器の障害に運動器の障害(橈骨奇形・側彎)を伴う、慢性的かつ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 症候群が多系統に渡る先天異常を発症する機序は不明である。しかし異常を持つ臓器の発生時期の多くが、原腸形成期であることから、この時期に胚の広い範囲に障害が起きていると推測されている。母体糖尿病やトリソミー 18 の部分症状として VATER 連合の症状を呈する可能性があることから、催奇形因子や遺伝子異常など、複数の異なる原因により類似する病態を呈すると考えられている。このため、「症候群」という用語の代わりに「連合」という用語で呼ばれる場合がある。ここで連合とは、高頻度に併存する奇形の組み合わせを指す。現時点では、外科手術や症状に応じた療育上の対応が行われるが、現在、根治療法は開発されていない。

本研究では、VATER 症候群患者由来の iPS 細胞(induced pluripotent stem cell)を健康人の皮膚線維芽細胞由来の iPS 細胞と比較することで、VATER 症候群で特異的に認める発生初期の変化を再現することを試みたいと考える。iPS 細胞は、山中らにより開発された多分化能、自己複製能を持った ES 細胞(embryonal stem cell)様の細胞である。iPS 細胞は成体の皮膚線維芽細胞から樹立されるため、ES 細胞で生じ

る受精卵を使用することに関する倫理的問題や拒絶反応の問題を回避できるようになり、患者由来の細胞を用いた病気の研究や治療の実現可能性が高まると期待されている。

遺伝性疾患に罹患する患者の皮膚線維芽細胞より iPS 細胞を樹立し、さらに種々の組織・臓器に分化させる事により、今までは剖検時以外には入手する事が困難であった、組織や臓器を研究の対象とすることが可能となった。病態が明らかになる事により、治療効果のある低分子化合物のスクリーニングや、培養細胞を用いた治療法の研究が可能となると期待されており、病態解明や新たな治療方法の糸口になると考える。

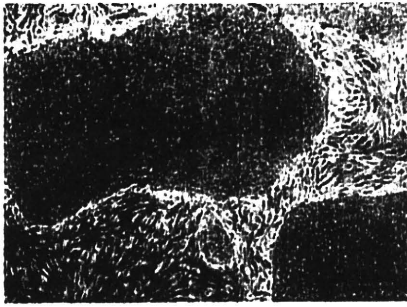
B. 研究方法

①健康人由来iPS細胞の樹立

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る。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。

②樹立した iPS 細胞の line 選定

iPS 細胞において、iPS 細胞樹立とともに導入した 4 遺伝子が発現低下し、内因性の転写因子が発現することが ES 細胞様の多分化能をもった細胞になるために必要である(Laurie. A et al. : Cell 2005)



レトロウイルス感染6日後の導入遺伝子が高発現している線維芽細胞と樹立した iPS 細胞で導入遺伝子の発現を定量 PCR により比較し、発現が抑えられている line を選定した。

③ 核型検査

通常の臨床検体の G 分染法のプロトコルに改変を加え、最適化を行った。

通常の末梢血リンパ球の染色体分析のプロトコルに比較して、コルセミド処理する場合のコルセミド濃度を通常の 2 倍程度(0.05)に増加し、またコルセミド添加後の培養時間を通常の 3 倍程度(5 時間)とした。

C. 研究結果

皮膚線維芽細胞から、マウスレトロウイルス受容体(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。得られた細胞の正常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、コルセミド処理時のコルセミ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。

D. 考察

iPS 細胞において、導入した遺伝子(Sox2,Oct3/4,Klf4,c-Myc)が高発現しているものは多分化能、自己複製能に乏しいことが先行研究により示されている。樹立した iPS 細胞において、今後は導入した遺伝子発現量を RT-PCR により比較し高発現しているものを除去する必要がある。また未分化マーカー(Nanog,Tra1,Rex など)の発現、iPS 細胞を免疫不全マウスに移植し奇形腫形成能を評価し、多分化能をもつ iPS 細胞 line を選出する必要がある。

本研究を通じて、G バンド染色体検査の必要性が明らかにされた。G バンド染色体検査によっては、微細な構造異常は明らかにされないため、G バンドで正常核型の場合にも、可能であればアレイ CGH 法をもちいたさらに詳細な検討を行うことが望ましい。

E. 結論

マウスレトロウイルス受容体(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。得られた細胞の正常を細胞遺伝学的分析法を最適化した。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし

2. 学会発表
特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

[IV]

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
黒澤健司	染色体異常の理解	千代豪昭	臨床遺伝学講義ノート	オーム出版社	東京	2010	pp37-49
古谷憲孝 黒澤健司	口唇口蓋裂の遺伝	小林眞司	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—	メジカルビュー社	東京	2010	pp32-38.

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
Hosokawa S, Takahashi N, Kitajima H, Nakayama K, Kosaki K, and Okamoto N	A case of Brachmann-de Lange syndrome with congenital diaphragmatic hernia and <i>NIPBL</i> gene mutation	Congenit Anom (Kyoto).	50	129-132	2010
Okamoto N, Akimaru N, Matsuda K, Suzuki Y, Shimojima K, Yamamoto T.	Co-occurrence of Prader-Willi and Sotos syndromes.	Am J Med Genet A.	152A	2103-9	2010
Takanashi J, Arai H, Nabatame S, Hirai S, Hayashi S, Inazawa J, Okamoto N, Barkovich AJ.	Neuroradiologic features of <i>CASK</i> mutations.	Am J Neuroradiol.	31	1619-22	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto N, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numaabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J.	Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies.	J Hum Genet.			Epub 2010 Oct 28.
Filges I, Shimojima K, Okamoto N, Rötthlisberger B, Weber P, Huber AR, Nishizawa T, Datta AN, Miny P, Yamamoto T.	Reduced expression by SETBP1 haploinsufficiency causes developmental and expressive language delay indicating a phenotype distinct from Schinzel-Giedion syndrome.	J Med Genet.			Epub 2010 Oct 30
Kobayashi T, Aoki Y, Niihori T, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Kawame H, Fujiwara I, Takada F, Ohata T, Sakazume S, Ando T, Nakagawa N, Lapunzina P, Meneses AG, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kurosawa K, Mizuno S, Ohashi H, David A, Philip N, Guliyeva A, Narumi Y, Kure S, Tsuchiya S, Matsubara Y.	Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation.	Human Mutation	31(3)	284-94	2010