

らの意見を得たものである。名称変更を考慮するにあたり、実際に当事者である患者家族が疾患名称についてどう感じているかという患者家族の視点はたいへん重要である。患者家族が公開しているホームページ上では「「致死性」という病名が変わらない限り、本当の意味で私の気が休まることはないんだろうな…と思います」^{註3}、米国の患者においても thanatophoric という言葉の意味が致死性であることを知り、「I think they should change the name to life bringing」^{註4}など疾患名称に対する思いが見られる。患者家族からの意見聴取も、その調査自体が心理的負担になる可能性があるため倫理的配慮を含めた十分な検討が必要と考える。

■名称変更に伴う問題

疾患名称は国際名称や国際分類の和訳で制定されているため、名称変更により統計や診療に混乱をきたす可能性が考えられ、代替となる名称については熟慮する必要がある。また今後は関連学会が主体となり、名称変更に向けて議論をしていく必要もあると考える。

3. 研究の限界と今後の課題

本研究は調査法に以下の問題点や限界があり、患者数の推定はできない。①質問紙調査の際に患者がいない場合も“0”と記入し返送する旨を記載しなかった。②回収率が低い。通常第一次調査では患者数の調査に限定し回収率の向上を図る¹⁴⁾が、本研究では患者数調査に加え患者情報(臨床的事項)調査と第二次調査(インタビュー調査)の依頼状を同時に送付したため、回答が煩雑な印象を与え、回収率の低下に影響したと考える。これらには事前に回避できた事項もあり、計画段階に深く考慮すべき点であった。骨系統疾患の鑑別診断には熟練を要するため、診断の正確性の担保につい

註3

<http://blog.goo.ne.jp/wsmayu0501/e/9c25486199c5aa7cb9187009da28e786>

註4 http://www.youtube.com/watch?v=R_Q92MC8pIU

ては研究の限界である。研究班では診断基準の確立を目指すとともに、確定診断のための遺伝学的検査体制を整備している。

また今後の課題として、長期生存患者の人工呼吸管理状態の詳細や問題点、自然歴、QOL、精神発達面についての調査や、さらには長期にわたって患者のケアを行う家族に対する適切な支援を行うことを目的とした、患者家族が感じているケア上の不安や悩み、医療サービスの要望などについての調査も必要であると考え。これらについては、第二次調査(インタビュー調査)として実施することを検討している。

E. 結論

全国質問紙調査により致死性骨異形成症の現状調査を行うとともに、臨床医が「致死性骨異形成症」という疾患名称についてどのように感じているかを調査・解析した。致死性骨異形成症という名称とは実情は異なり、出生直後に適切な呼吸管理が行えれば長期生存が可能であることが示された。しかし同時に出生直後に呼吸管理がなされていないと周産期死亡を起こす可能性が高いことも示された。これらの状況を総合的に判断し、疾患名が適切であるかどうかも含めて今後の研究を進めていくべきである。

参考文献

- 1) 西村玄：骨系統疾患 X 線アトラス：遺伝性疾患の鑑別診断。医学書院，1993。
- 2) 成富研二：先天性奇形症候群および遺伝性疾患データブック。診断と治療社，469-472，2001。
- 3) 田中弘之：Achondroplasia group。小児内科，Vol. 36 増刊号，76-78，2004。
- 4) 澤井英明：Thanatophoric Dysplasia, type I, type II。小児内科，Vol. 36 増刊号 300-303，2004。
- 5) 澤井英明：妊娠中にみつかる先天性四肢短縮症への対応と遺伝カウンセリング。日本遺伝カウ

ンセリング学会誌, 25, 61-66, 2004.

6) Waller DK, Correa A, Vo TM, Wang Y, Hobbs C, Langlois PH, Pearson K, Romitti PA, Shaw GM, Hecht JT: The population-based prevalence of achondroplasia and thanatophoric dysplasia in selected regions of the US. *Am J Med Genet A*. 2008; 15; 146A(18): 2385-9.

7) 城良二, 君塚葵, 柳迫康夫: 骨系統疾患の出生有病率に関する全国調査. 厚生科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業) 研究報告書, 4-8, 1999.

8) Baker KM, Olson DS, Harding CO, Pauli RM: Long-Term Survival in Typical Thanatophoric Dysplasia Type 1. *Am J Med Genet*. 1997; 70: 427-436.

9) MacDonald IM, Hunter AG, MacLeod PM, MacMurray SB: Growth and development in thanatophoric dysplasia. *Am J Med Genet*. 1989; 33: 508-12.

10) 金吉晴: 病名変更の意義と影響 *Schizophrenia Frontier*, Vol6, No.1, 38-41, 2005

11) Wilcox WR, Tavormina PL, Krakow D, Kitch H, Lachman RS, Wasmuth JJ, Thompson LM, Rimoin DL: Molecular, radiologic, and histopathologic correlations in thanatophoric dysplasia. *Am J Med Genet*. 1998; 78: 274-81.

12) 田村正徳, 玉井真理子: 新生児医療現場の生命倫理. メディカ出版, 2005.

13) 櫻井浩子, 堀田義太郎: 生存学研究センター報告10 出生をめぐる倫理-「生存」への選択. 立命館大学生存学研究センター, 2009.

14) 川村孝編: 難病患者数と臨床疫学象把握のための全国疫学調査マニュアル第2版. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 特定疾患の疫学に関する研究班, 2006.

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamada T, Nishimura G, Nishida K, Sawai H, Omatsu T, Kimura T, Nishihara H, Shono R, Shimada S, Morikawa M, Mizushima M, Yamada T, Cho K, Tanaka S, Shirato H, Minakami H. *J Obstet Gynaecol Res*. Prenatal diagnosis of short-rib polydactyly syndrome type 3 (Verma-Naumoff type) by three-dimensional helical computed tomography. 2010 .

Wada R, Sawai H, Nishimura G, Isono K, Minagawa K, Takenobu T, Harada K, Tanaka H, Ishikura R, Komori S. Prenatal diagnosis of Kniest dysplasia with three-dimensional helical computed tomography. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011 Jan 20. [Epub ahead of print]

Watanabe A, Karasugi T, Sawai H, Naing BT, Ikegawa S, Orimo H, Shimada T. Prevalence of c.1559delT in ALPL, a common mutation resulting in the perinatal (lethal) form of hypophosphatasia in Japanese and effects of the mutation on heterozygous carriers. *J Hum Genet*. 2011 Feb;56(2):166-8. Epub 2010 Dec 23.

2. 学会発表

1) 河井昌彦 骨系統疾患の新生児管理について～致死性骨異形成症の新生児管理. 第3回胎児骨系統疾患フォーラム 2010.12.12 大阪

2) 矢田有里, 澤井英明, 和田龍, 田中宏幸, 武信尚史, 伊藤善啓, 原田佳世子, 池田ゆうき 出生前に胎児ヘリカルCTで診断し出生後に遺伝子変異を確認したII型コラーゲン異常症 近畿産科婦人科学会 2010.11.7 京都

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

致死性骨異形成症の遺伝子診断に関する研究

研究分担者 岡崎 伸 大阪市立総合医療センター
研究協力者 玉川信吉 大阪市立総合医療センター

研究要旨

致死性骨異形成症の原因遺伝子である **FGFR3** の遺伝子診断が、実施可能な施設は少ない。今回我々は、早期診断を可能とする為、自施設においてダイレクトシーケンス法による検査の構築を行った、**FGFR3** の解析は既報の変異領域だけでなく、全エクソンについて解析が可能となるように準備した。

A. 研究目的

致死性骨異形成症、唯一の原因遺伝子と考えられる **FGFR3** の遺伝子診断が行える施設は少なく、現状では早期の遺伝子診断は困難である。我々は、迅速な遺伝子診断を実現するため、自施設内で実施可能なダイレクトシーケンス法による **FGFR3** の全エクソン解析を構築し、また、院内倫理委員会において、遺伝子解析実施の審議を受け、遺伝子診断の体制を整えることを目的とした。

B. 研究方法

NCBI ホームページから得た、**FGFR3** の DNA 塩基配列 Reference Sequence : NG_12632.1 から、**FGFR3** のペプチドをコードするエクソンに対して 1~3 候補の **Primer** を設計し、コントロール DNA を用いて、PCR 反応条件の検討をするとともに、シーケンシングが良好に実施できる **Primer** セットを選別した。

また、**FGFR3** 遺伝子解析の有用性を自施設である大阪市総合医療センターの倫理委

員会にて説明し、遺伝子診断実施への審議を仰いだ。

（倫理面への配慮）

FGFR3 解析手順書を作成し、インフォームド Consent 確認方法、また、検体および報告書の匿名化を明記した。

C. 研究結果

FGFR3 全エクソンを 10 領域に分け、PCR およびシーケンスを実施、10 領域すべてが、良好な検査精度と考えられる解析が確認できた。また、検討した条件から解析手順書を作成した。

平成 22 年 10 月の院内倫理委員会にて **FGFR3** の遺伝子解析実施の許可を得た。

D. 考察

遺伝子解析にあたっては、患者情報の保護、結果の管理、検体の管理など多くの注意事項がある。実際の運用にあたっては、想定外の事故等も考慮していく必要があると思われる。

E. 結論

解析手順書の完成、院内倫理委員会の承認を得たことから、遺伝子診断開始の準備は、整ったと考えている。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

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 予定なし。
2. 実用新案登録 予定なし。
3. その他 特記すべきことなし。

FGFR3 シーケンス解析手順書

平成 23 年 2 月 21 日 作成
小児神経内科 岡崎 伸
中央臨床検査部 玉川 信吉

【はじめに、コンプライアンス】

遺伝子検査(生殖細胞系列)を実施する者は、以下の宣言、指針、ガイドラインを精読し、遵守したうえで検査にあたること。

- ・「ヒトゲノムと人権に関する世界宣言」(ユネスコ)
- ・「ヒト遺伝情報に関する国際宣言」(ユネスコ)
- ・「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(厚生労働省、文部科学省、経済産業省)
- ・「臨床研究に関する倫理指針」(厚生労働省)
- ・「遺伝学的検査に関するガイドライン」(各種関連学会)
- ・「遺伝カウンセリング・出生前診断に関するガイドライン」(日本人類遺伝学会)
- ・「遺伝性疾患の遺伝子診断に関するガイドライン」(日本人類遺伝学会)

【検査の注意事項】

- 1.分析にあたってはインフォームドコンセントの完了を文書にて確認すると。
また、インフォームドコンセント文書は決められた保管庫で管理すること。
- 2.検体は匿名記号(番号)により分析、保管すること。
- 3.報告は匿名記号(番号)によって行うこと。

【試薬】

主要な試薬を以下に示す。

名称	メーカー	Cat.No.
QIAamp DNA mini kit	QIAGEN	51304
Ampitaq Gold 360 Master Mix	Applied Biosystems (by life technologies)	439881
Distilled Water, Deionized, Sterile (以下 DDW と略)	ニッポンジーン	316-90101
QIAquick PCR Purification kit	QIAGEN	28104
Agencourt AMPure XP	BECKMAN COULTER	A63881
BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit	Applied Biosystems (by life technologies)	4337455
BigDye XTerminator 精製キット	Applied Biosystems (by life technologies)	4376486
3130 POP-7 ポリマー	Applied Biosystems (by life technologies)	4352759
10× Genetic Analysis Buffer with EDTA	Applied Biosystems (by life technologies)	402824

【機器】

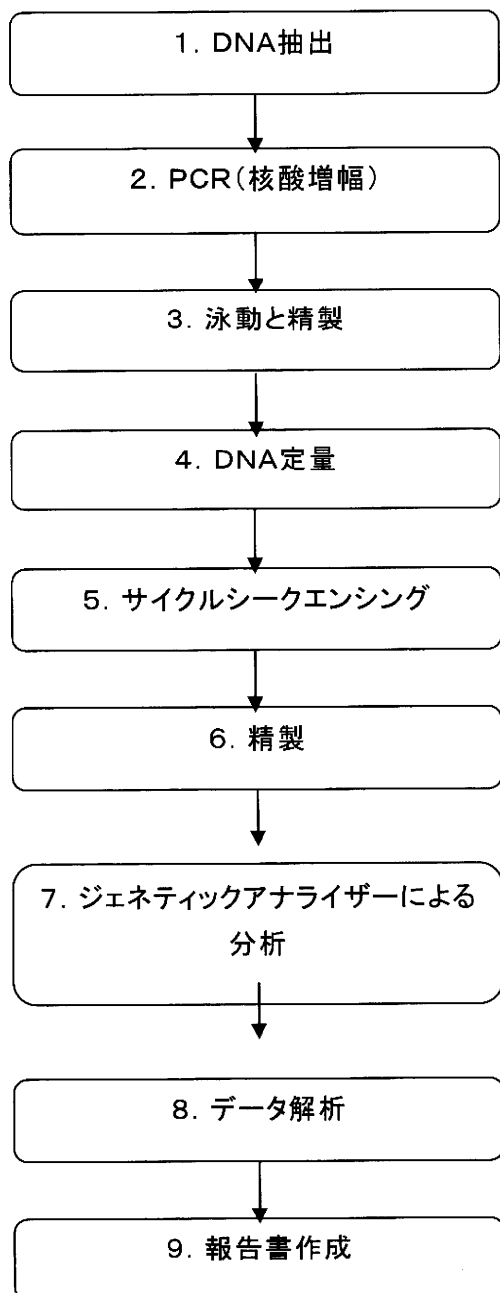
主要な機器を以下に示す。

一般名称	機器名称・モデル	メーカー
サーマルサイクラー	Veriti 96-well サーマルサイクラー,0.2ml (以下 Veriti200 と略)	Applied Biosystems (by life technologies)
ボルテックスミキサー	Vortex GENIE 2	MS機器
キャピラリー電気泳動	3130 ジェネティックアナライザ	Applied Biosystems (by life technologies)

【分析手順】

以下に操作の流れ(概略)を示す。
また、各操作の詳細は次項から記載する。

－ 操作の流れ －



1. DNA抽出

EDTA 採血管により採血した全血を、QIAamp DNA mini kit によりDNA抽出を行う。詳細は試薬添付マニュアルにしたがい、Elution は 100 μ l の Buffer AE にて実施。

2. PCR

試薬は Ampitaq Gold 360 Master Mix を用い、各エクソンの Primer は SIGMA GENOSYS などのメーカーにて作成してもらい、Primer 一覧は次項に示す。試薬、サンプルの調整は以下のとおりとする。PCR は Veriti200 にて以下のとおりサイクル反応をおこなう

(反応液の調整)

	Exon2	その他の exon
Ampitaq Gold 360 Master Mix	12.5 μ l	12.5 μ l
360 GC enhancer	2.5 μ l	—
50pmol/ μ l Forward primer	0.25 μ l	0.25 μ l
50pmol/ μ l Reverse primer	0.25 μ l	0.25 μ l
Template DNA (final concentration 50ng)	Variable (0.5~2 μ l)	Variable (0.5~2 μ l)
DDW	Variable (to 25 μ l)	Variable (to 25 μ l)
Total volume	25 μ l	25 μ l

(PCRの反応条件 全 exon 共通)

Step	Pre heat	PCR (35cycle)			1st hold	2nd hold
		Denature	Anneal	Extend		
Temp(°C)	95	95	60	72	72	4
Time	10min	15sec	30sec	1min	7min	∞

(各 exon の PCR 及びシーケンス primer)

対象 Exon	Primer 名称	配列	PCR Product 長
Exon2	FGFR3 2Fwd	TCTAACGAGCTGCCTTCCT	577bp
	FGFR3 2Rvs	CGAATAACAACAGCGGGAATC	
Exon3, 4	FGFR3 3-4Fwd	ACTGCTGTGTCTGTAAACGG	806bp
	FGFR3 3-4Rvs	GGCATCTAGAGCCATGTCAG	
Exon5~7	FGFR3 5-7Fwd	TACACAGGACGGGAAACTGA	875bp
	FGFR3 5-7Rvs	CCCTAGACCCAAATCCTCAC	
Exon9	FGFR3 9Fwd	GTAACGACTCTGTCCCATGC	872bp
	FGFR3 9Rvs	CCGTAAGTCACAGGATTCCC	
Exon10	FGFR3 10Fwd	CTCTAGACTCACTGGCGTTA	572bp
	FGFR3 10Rvs	GTTCTGACTTCCACCAGCAT	
Exon11	FGFR3 11Fwd	ATGCTGGTGGAAAGTCAGAAC	498bp
	FGFR3 11Rvs	CGTAAGGACGAAGAGTGTCA	
Exon12~14	FGFR3 12-14Fwd	CTCTTCGTCCTTACGAGCAG	914bp
	FGFR3 12-14Rvs	TCTTCATCACGTTGTCCTCG	
Exon15	FGFR3 15Fwd	CTGGACTACTCCTTCGACAC	509bp
	FGFR3 15Rvs	GACACGTACACGTCACTCTG	
Exon16, 17	FGFR3 16-17Fwd	GACAACGTGATGAAGATCGCAG	834bp
	FGFR3 16-17Rvs	GTGGACGTACGGTAAGGA	
Exon18, 19	FGFR3 18-19Fwd	CAGGCTGTTCCCGAATAAGG	587bp
	FGFR3 18-19Rvs	ATCTGCACTGAGTCTCATGC	

3. 泳動と精製

PCR が正常に完了していたかを、3 μ l を用いて、2%アガロースゲル電気泳動でチェックする。チェック後、PCR 後反応液を精製する。反応数が少ない(8 個以内なら)場合は、QIAquick PCR Purification kit(QIAGEN)を使用。反応数が多い場合は、Agencourt AMPure XP(BECKMAN COULTER)を用いて精製を行う。操作法は各キットの取り扱い説明に従う、最後のエルーションは DDW で行う。

4. DNA定量

精製終了後の PCR 産物を 260nm にて吸光度測定、 $\times 50$ ng で DNA 定量。
10~20ng/ μ l になるよう必要におおじ DDW で希釈する。これを DNA template とする。

5. サイクルシーケンシング

サイクルシーケンシングは、機器は Veriti200 サーマルサイクラーを使用し、試薬は BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit(Applied Biosystems)を用いる。反応液調整と反応条件は以下のとおり。

(反応液の調整、 $\times 8$ BigDye 法)

	Volume
DDW	Variable (to 20 μ l)
5 \times sequencing buffer	3.5 μ l
1.6pmol Fwd or Rvs primer	2 μ l
V3.1 BigDye	1 μ l
DNA template (final concentration 10~20ng)	Variable (0.5~3 μ l)
Total	20 μ l

(サイクルシーケンシング反応条件)

Step	Pre heat	Cycle sequencing (25cycle)			hold
		Denature	Anneal	Anneal/Extend	
Temp(°C)	94	96	50	60	4
Time	2min	10sec	5sec	2min30sec	∞

6. 精製

BigDye XTerminator 精製キットを用いて実施。

1) Xterminator を室温に戻し、十分ボルテックスする。

2) 先端をハサミで切り落としたチップで、Xterminator 7 μ l を 8 連 PCR チューブにとる。

3) 更に SAM 溶液 30 μ l を加える。

4) サイクルシーケンス反応液 1.5~2 μ l を加える

5) PCR チューブの蓋をしっかりと閉じ、プレート用アダプターを取りつけた Vortex GENIE2で最大パワー

で 15 分間ボルテックスする。

6) 2500rpm、2min 遠心

7) 上澄み 17 μ l をとりジェネティックアナライザー-sample 用 PCR プレートに移す。

7. ジェネティックアナライザーによる分析

ジェネティックアナライザー3130 (Applied Biosystems)を用い、ポリマーは、POP-7にて分析を開始する。

8. データ解析

データ解析用市販ソフト(日立 DNASIS)を用い、NCBI ホームページより得られた、Reference Sequence:

NG_12632.1 を対照とし、変異の有無を確認する。

9. 報告書作成

パソコン用ワープロ Word を用いて報告書を作成。患者の名前を記載せず、匿名番号によって、作成すること。また、FAX による送信は禁止する。

致死性骨異形成症の遺伝子解析

研究分担者 長谷川奉延

研究要旨

骨レントゲン所見から胎児期に致死性骨異形成症(Thanatophoric dysplasia 以下 TD)と診断された4名でFGFR3 遺伝子解析を行い、全例で既報変異を同定した。clover-leaf skull を認めないTDII型患者も存在するため、遺伝子解析による確定診断は有意義である。

共同研究者

慶應義製大学医学部小児科高木優構

A. 研究目的

TD は著明な四肢短縮を認める致死性の先天性骨系統疾患である。TD は骨レントゲン所見から大腿骨の彎曲 (telephone receiver 様) が著明な I 型と、頭蓋の変形 (clover-leaf skull) が著明な II 型とに分類される。TD の責任遺伝子は FGFR3 であり、変異の陽性率は 90% と報告されている。また、I 型、II 型各々で FGFR3 遺伝子変異の hot spot が異なる。本研究の目的は臨床的に TD と診断された患者の FGFR3 遺伝子解析を行うことにより、1) 本邦における FGFR3 遺伝子変異の陽性率を算出すること、ならびに 2) 遺伝子型表現型を解明することである。

B. 研究方法

研究の対象は骨レントゲン所見から胎児期に TD と診断され、家族から遺伝子解析の同意を得られた4名である。解析方法は PCR 直接シーケンス法による遺伝子解析である。まず FGFR3 遺伝子の TD hot spot を含

む Exon6, 13, 17 を解析し、変異が陰性であれば全翻訳領域を解析した。

得られた結果より責任遺伝子変異の遺伝子型表現型関連の有無につき検討した。(倫理面への配慮)

血液採取、遺伝子解析に関しては書面による同意を家族から得て行った。

C. 研究結果

1) 変異の陽性率: 4 名中全例で遺伝子変異を同定した。同定された遺伝子変異の内訳は、R248C が 1 名、S249C が 2 名、K650E が 1 名であった。なお、R248C および S249C は I 型の、K650E は II 型 TD の既報かつ hot spot 変異である。

2) FGFR3 遺伝子型表現型関連: R248C および S249C 変異陽性の症例は 3 例とも著明な四肢の短縮、大腿の telephone receiver 様変形を認める典型的な I 型 TD であった。K650E 変異陽性の症例は著明な四肢短縮のため重度の骨系統疾患が疑われ 21 週で人工流産となったが、大腿の変形を認めず、clover-leaf skull も認めなかった。

D. 考察

1) 臨床的に TD と診断された症例では高率(4/4)で既報変異が同定される。新規変異は稀であるため、TD においてはまずは hotspot の解析のみで良い可能性が高い。

2) clover-leaf skull を認めない K650E 変異陽性患者の存在が証明された。同じ FGFR3 遺伝子変異による軟骨無形成症の重症型である SADDAN も著明な四肢短縮をきたすが、骨レントゲン上では clover-leaf skull の有無で II 型 TD との鑑別が行われる。SADDAN は新生児期の呼吸管理さえなされれば比較的予後は良好なため、両者の鑑別は極めて重要であり、遺伝子解析が唯一の鑑別手段となり得る。

E. 結論

臨床的に TD と診断された症例では高率(4/4)で既報変異が同定される。clover-leaf skull を認めない TDII 型患者も存在するため、遺伝子解析による確定診断は有意義である。

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

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）
研究分担報告書

致死性骨異形成症の診断と予後に関する研究

窒息性胸郭異形成症の遺伝子診断

研究分担者 緒方 勤

国立成育医療研究センター研究所 分子内分泌研究部 部長

研究要旨

周産期致死性骨系統疾患の 1 つである窒息性胸郭異形成症 (ASPHYXIATING THORACIC DYSTROPHY: ATD) について研究を行った。本疾患では、常染色体劣性疾患として発症する 3 つのタイプ (ATD1, ATD2, ATD3) の存在が知られ、ATD2 は第 3 染色体長腕に存在する IFT80 の変異により、ATD3 は第 11 染色体長腕に存在する DYNC2H1 の変異により発症する。われわれは、窒息性胸郭異形成症の 5 例において IFT80 の変異解析を終了し、DYNC2H1 の変異解析を行っている。その結果、IFT80 遺伝子変異解析を終了した 5 例中 1 例において、正常者には見られない第 4 エクソンのミスセンス変異 (p. R113G) および第 4 イントロンの保存されたスプライスアクセプター部位の変異 (IVS4-1G>C) が認められた。両親の解析により、第 4 エクソンのミスセンス変異は父親から、スプライスアクセプター部位の変異は母親から伝達されていることが判明した。患者は、重度の新生児期における呼吸困難の他に、眼間狭小、右外反肘と末節骨短縮を呈し、母親には病的表現型は見られなかったが、父親は軽度四肢短縮傾向と正常範囲の低身長傾向を呈していた。この結果は、窒息性胸郭異形成症が遺伝的異質性に富む疾患であること、また、IFT80 の遺伝子変異による ATD の頻度が高くないことを示唆する。さらに、患者・両親の表現型解析から、IFT80 の複合ヘテロ変異が胸郭低形成の他に顔貌や四肢・指趾の形成異常を生じること、IFT80 のヘテロ異常が骨の成長・形成に影響しうることを示唆するものである。このような症例の集積は、遺伝子型-表現型解析を通じて、各々の責任遺伝子変異による表現型スペクトラムの決定、変異遺伝子特異的合併症や長期予後の解明、現行治療法の効果の検討など、多くの有用なデータの構築に貢献すると期待される。

共同研究者

和田 友香 (国立成育医療研究センター)

A. 研究目的

窒息性胸郭異形成症 (ASPHYXIATING

THORACIC DYSTROPHY: ATD) (短肋骨異形成症あるいは Jeune 症候群) は、周産期致死性骨系統疾患の 1 つであり、胸郭狭小と短い四肢などの外表奇形に骨盤、長管骨形成不全および腎、肝異形成を伴う遺伝性奇形

症候群である。発症頻度は 10～13 万人に一人の常染色体劣性遺伝疾患であり、その半数は乳幼児期に胸郭の低形成による呼吸不全で死亡する。また、幼児期以降に腎髄質嚢胞による腎機能不全により、透析導入となることも多い。

本疾患は、遺伝的異質性を伴う疾患であり、その発症には複数の責任遺伝子が関与する。現在少なくとも常染色体劣性疾患として発症する 3 つのタイプ (ATD1, ATD2, ATD3) の存在が知られている。そして、ATD2 の責任遺伝子は第 3 染色体長腕に存在する IFT80 であ

り、ATD3 の責任遺伝子は第 11 染色体長腕に存在する DYNC2H1 であることが判明している。一方、ATD1 の責任遺伝子は第 15 染色体長腕にマップされているものの、未だ同定されていない。

本年度、われわれは、窒息性胸郭異形成症の 5 例において IFT80 の変異解析を終了し、DYNC2H1 の変異解析を行っている。ここでは、その結果について報告する。

B. 研究方法

- ・ 症例：レントゲンならびに臨床的に窒息性胸郭異形成症と新省診断された 5 例を対象とした。代表的なレントゲン写真を図 1 に示す。

- ・ 遺伝子解析：IFT80 遺伝子の全 19 コードエクソンおよび DYNC2H1 遺伝子の全 89 コードエクソンを直接シークエンス法で解析した。また、変異の確認は、サブクローニングを用いたシークエンスによった。同様に、DYNC2H1 遺伝子の全 89 コードエクソンを解析中である。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守し、検体の収集を含めた研究計画については、

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ている。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集している。

C. 研究結果

- ・ IFT80 遺伝子変異解析：解析を終了した 5 例中 1 例において、正常者には見られない第 4 エクソンのミスセンス変異 (p.R113G) および第 4 イントロンの保存されたスプライスアクセプター部位の変異 (IVS4-1G>C) が認められた (図 2)。両親の解析により、第 4 エクソンのミスセンス変異は父親から、スプライスアクセプター部位の変異は母親から伝達されていることが判明した。また、第 16 エクソンに p.Thr601Ser という既報のミスセンス置換が認められた。

- ・ IFT80 遺伝子変異陽性例の表現型：患者では、重度の新生児期における呼吸困難の他に、眼間狭小、右外反肘と末節骨短縮が認められた。現ザ、乳児期に達しているが、腎機能障害が顕在化してきている。また、母親には病的表現型は見られなかったが、父親は軽度四肢短縮傾向と正常範囲の低身長傾向を呈していた。

- ・ DYNC2H1 遺伝子変異解析：現在 5 例においてエクソン約 1/3 の解析を終了している。現在、変異は見られていない。

D. 考察

窒息性胸郭異形成症 5 例中、1 例において IFT80 の複合ヘテロ変異が同定された。この結果は、窒息性胸郭異形成症が遺伝的異質性に富む疾患であることに一致する。また、AFT80 の遺伝子変異による ATD の頻度が高くないことを示唆する。4 例においては、現在変異は同定されていない。DYNC2H1 遺伝子変異が同定される可能性や、

未知の責任遺伝子変異の可能性が考えられる。

IFT80 変陽性症例の表現型は、IFT80 変異が胸郭低形成の他に、顔貌や四肢・指趾の形成異常を生じることを示唆する。さらに、保因者である父親の表現型は、世界で初めて IFT80 のヘテロ異常が骨の成長・形成に影響しうることを示唆するものである。このような症例の集積は、遺伝子型-表現型解析を通じて、各々の責任遺伝子変異による表現型スペクトラムの決定、変異遺伝子特異的合併症や長期予後の解明、現行治療法の効果の検討など、多くの有用なデータの構築に貢献すると期待される。

E. 結論

窒息性胸郭異形成症 5 例中、1 例において IFT80 の複合ヘテロ変異が同定された。そして、遺伝子型-表現型解析から、IFT80 複合ヘテロ変異が胸郭低形成の他に顔貌や四肢・指趾の形成異常を生じること、またヘテロ変異が軽度の骨成長・形成障害を招くことを示唆する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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 lentigines syndrome). *Int J Dermatol* 49 (10): 1146-1151, 2010.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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].

10. 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).

11. Miyazaki O*, Nishimura G, Kagami M, Ogata T. Radiological evaluation of dysmorphic thorax in paternal uniparental disomy for chromosome 14. Ped Radiol (accepted).

12. 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.

2. 学会発表

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

図1. 患者のレントゲン写真。著明な胸郭低形成が認められる。

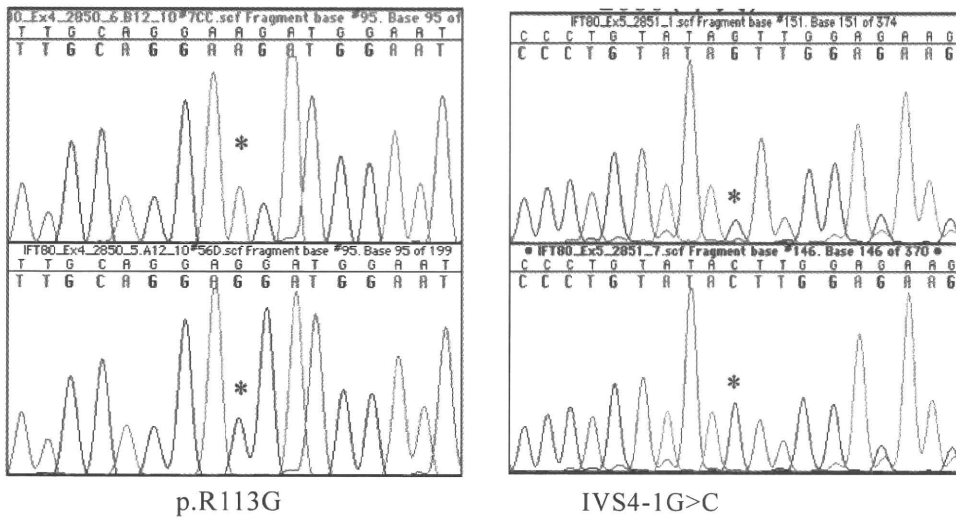


図2. IFT80 遺伝子の変異を示すクロマトグラム