

## Abstract/Session Information for Program Number 351

[Print](#) [Close window](#)

### Session Information

**Session Title:** 59. Neurogenetics and Brain Development **Session Type:** Platform

**Session Location:** Ballroom B, Level 3, Convention Center **Session Time:** Fri Nov 5, 2010 04:30PM-07:00PM

### Abstract Information

**Program Number:** 351 **Presentation Time:** 05:30PM-05:45PM

**Keywords:** Clinical Genetics and Dysmorphology, KW106 - MENTAL RETARDATION, KW046 - DYSMORPHOLOGY, KW076 - GENETIC TESTING, KW119 - NATURAL HISTORY, KW134 - PHENOTYPE

### Abstract Content

**Clinical and Molecular genetic study of ATR-X syndrome Patients in JAPAN and proposal of clinical diagnostic criteria of ATR-X syndrome.** T. Wada<sup>1</sup>, H. Shimbo<sup>1</sup>, T. Mitani<sup>1</sup>, H. Osaka<sup>1</sup>, K. Kurosawa<sup>2</sup>, N. Okamoto<sup>3</sup> 1) Division of Neurology, Kanagawa Children's Med Center, Yokohama, Kanagawa, Japan; 2) Division of Genetics, Kanagawa Children's Med Center, Yokohama, Kanagawa, Japan; 3) Department of Medical Genetics, Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, Osaka, Japan.

X-linked  $\alpha$ -thalassemia/ mental retardation (ATR-X) syndrome (OMIM301040) is among X-linked mental retardation syndromes, which is due to mutations of ATRX gene. More than 200 patients in the world, including more than 60 Japanese cases, have been diagnosed as ATR-X syndrome. ATR-X syndrome seems a rare disease, however, more patients should remain to be diagnosed. In 2010, we have established ATR-X syndrome Japan Network for patients and their families, and we have surveyed ATR-X syndrome patients in Japan. Molecular genetically, we have found ATRX gene mutations in 56 patients from 45 families in JAPAN, which include 35 missense mutations, one nonsense mutation, 2 splicing mutations, one nonsense mutations, 4 frame shift mutations, one exonic deletion, and one large insertion. As reported previously, most mutations reside in two functionally important regions, ADD domains and chromatin remodeling domain, but some mutations are out of these domains. A nucleotide, IVS34+4A>G, leading to skipping of exon 34. Interestingly the patient with this mutation showed no severe genital abnormalities, whereas previously reported patients with mutations around this C-terminal region showed severe genital abnormalities. Clinically, from the medical information of more than 60 Japanese ATR-X patients registered in our database, we propose a diagnostic criteria of ATR-X syndromes to assist the clinician in making a timely and accurate diagnosis. This criteria consists of four clinical features; consistent (>90%), frequent (>50%), associated (<50%), and other supporting features. The consistent feature includes male patient, severe mental retardation, hypotonic facies, gastrointestinal abnormalities (gastroesophageal reflux, aerophagia, ileus, constipation, etc), and characteristic behavior (autistic behavior, self-vomiting, avoiding eye contact, stereotype movement, etc). We hope that this criteria will facilitate further clinical study of individuals with proven ATR-X molecularly, and assist in the evaluation of those who appear to have clinical features of ATR-X with no ATRX mutations. We should evaluate validity of this criteria, and update the consensus for it in the near future.

[Print](#) [Close window](#)

*The American Society of Human Genetics*  
 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD  
 Phone: 301-634-7300, Fax: 301-634-7079  
 Questions and Comments: [ashgmeetings@ashg.org](mailto:ashgmeetings@ashg.org)

## [II] 分担研究報告

## 厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

### ATR-X（X連鎖 $\alpha$ サラセミア・精神遅滞）症候群の 診断及び治療方法の更なる推進に関する研究 分担研究報告書

#### ATR-X 症候群責任遺伝子重複例の臨床的検討に関する研究

研究分担者 大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科 岡本伸彦

#### 研究要旨

ATR-X症候群は特徴的顔貌、軽度HbH病、重度運動精神遅滞、外性器低形成などを特徴とするX連鎖性の先天異常症候群である。Weatherallら(1981)が $\alpha$ サラセミアをともなう精神遅滞3家系を報告した後、Wilkieら(1990)がX連鎖の遺伝形式をとる1つの症候群として確立した。Gibbonsら(1995)が包括的発現調節因子である*XH2/XNP*（現在は*ATRX*と呼ばれている）遺伝子の変異が原因であることを明らかにした。遺伝子座位はXq13で、責任遺伝子はZinc finger型DNA結合ドメイン、DNAヘリカーゼドメインを持つ転写調節因子である。原因不明の多発先天異常/精神遅滞症例においてマイクロアレイによる検索を行った結果、ATR-X症候群責任遺伝子の重複を証明した。臨床的に詳細な評価を行い、ATR-X症候群と比較をおこなった。*ATRX*遺伝子の過剰な作用はATR-X症候群と類似した所見を呈する可能性がある。

#### 主任研究者

神奈川県立こども医療センター神経内科

和田敬仁

共同研究者

東京女子医科大学 統合医科学研究所

山本俊至

医科大学統合医科学研究所山本俊至先生に依頼した。

倫理面への配慮について、遺伝子解析にあたり、遺伝カウンセリングを行い、インフォームド・コンセントを得た。

#### A. 研究目的

$\alpha$ サラセミアX連鎖性精神遅滞症候群（略称 ATR-X）は、生後まもなくからの筋緊張低下、特徴的顔貌、軽度の $\alpha$ サラセミア（ヘモグロビンH：HbH）による貧血、精神運動発達遅滞、外性器異常などを特徴とする。責任遺伝子は*ATRX*で、様々な変異が報告されている。原因不明の精神運動発達遅滞の原因検索の過程、マイクロアレイ法による*ATRX*を含むX染色体微細重複例を同定した。ATR-X症候群では*ATRX*遺伝子の様々な変異が知られ、*ATRX*遺伝子の機能不全が病因となっている。その場合、機能喪失変異であることが多い。ATR-X遺伝子の重複では*ATRX*遺伝子量が2倍にあり、機能亢進が生じると考えられる。

#### B. 研究方法

臨床経過については、カルテの記載を整理した。

マイクロアレイ解析（Agilent社44kアレイ）を実施した。解析は東京女子

#### C. 研究結果

症例経過：4歳男児。家族歴に特記事項なし。在胎41週、出生体重2900g（-0.8SD）、身長48.5cm（-0.9SD）、頭囲31.5cm（-1.6SD）で出生。APGAR7/9であった。生後より筋緊張低下、哺乳障害、摂食障害あり。乳児期早期より経管栄養を要した。喘鳴を聴取し、喉頭軟化症、気管軟化症を疑われた。胃食道逆流症もあり、誤嚥性肺炎を反復した。4歳でもチューブ栄養継続中である。

生後まもなく心雑音を聴取し、エコーなどで精査を行った結果、心房中隔欠損症が判明した。3歳で心房中隔欠損孔の閉鎖術を受けた。その後、心臓に関しては経過良好である。

乳児期より筋緊張低下、運動発達遅滞があり、独歩開始は2歳すぎであった。理学療法を実施した。精神発達も遅れ4歳でもことばは「いや」「おいし」程度であった。重度精神運動発達遅滞であった。

顔貌は特徴的で、顔面正中部低形成、対耳輪突出、眼間開離、浮腫状眼瞼、眼瞼裂斜下、外斜視、鼻根部平低、耳介低位、耳介後方回転、薄い上口唇、口角下垂を認めた。

図1 マイクロアレイの結果

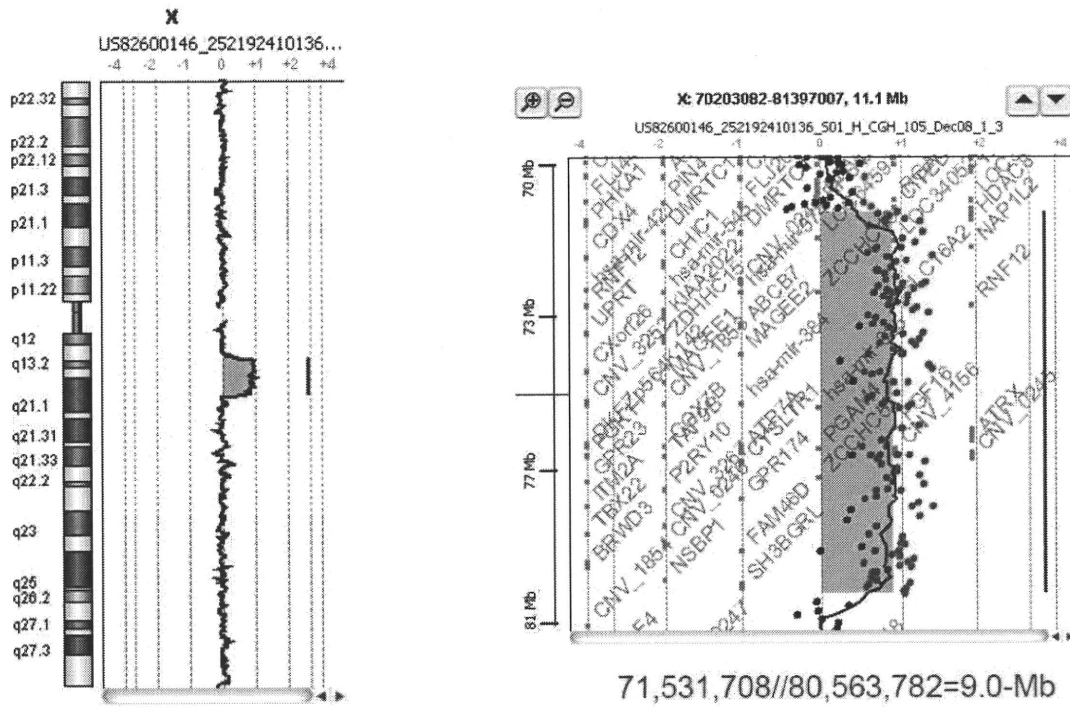


表 ATRX 遺伝子重複例と ATR-X 症候群の比較

	本例	ATR-X 症候群での頻度 (%) (平成 21 年度 本研究班報告書より)
重度精神遅滞	+	96
特異顔貌	+	94
骨格異常	+	90
HbH	-	88
新生児の筋緊張低下	+	84
外性器異常	-	79
小頭症	+ -1.9SD	77
腸管蠕動不良	+ GER	76
低身長	+ -3SD	65
けいれん	-	34
心奇形	+ ASD	21
腎・尿路の異常	-	15

本例の顔貌は ATR-X 症候群と類似した特徴もあった。外性器には異常はなかった。下肢は扁平足であった。4 歳 4 ヶ月で身長 90.4cm (-3SD)、体重 11.8kg (-2.2SD)、頭囲 47cm (-1.9SD) と成長障害を認めた。

検査結果：一般血液検査所見、代謝異常症スクリーニングでは特に異常認めず。糖代謝異常、糖鎖解析でも異常なかった。赤血球ブリリアントクレシルブルー染色では赤血球に封入体を認めなかった。この染色は実施日をかえて数回実施し、詳細に顕鏡を行ったが HbH は検出できなかった。GH 分泌能に関しては精査予定中である。

頭部 MRI、脳波検査では特記すべき異常はなかった。

遺伝学的検査：染色体 G-band は 46,XY と正常核型であった。

原因不明の多発先天異常、精神遅滞を伴う症候群として、マイクロアレイによる詳細な解析を行った。マイクロアレイ解析では *ATRX* 遺伝子を含む X 染色体微細重複を認めた (図 1)。重複領域には X 連鎖性精神遅滞症候群のひとつである MCT8 異常症の責任遺伝子である *SLC16A2* 遺伝子も含まれたが、臨床検査では甲状腺機能異常は認めなかった。テロメア側に Pelizzaeus-Merzbacher 病責任遺伝子である *PLP* 遺伝子が存在するがこれは重複していなかった。重複があれば MRI で白質異常が生じるはずである。

重複は FISH でも確認され、重複領域は X 染色体のセントロメア側に逆位で存在した。

FISH で確認したところ、母親は重複保因者であった。母親は無症状であった。

#### D. 考察

原因不明の多発先天異常、精神遅滞症例のマイクロアレイ解析で、*ATRX* 遺伝子領域の重複例を同定した。その臨床所見を ATR-X 症候群と比較した (表)。

筋緊張低下、重度精神運動発達遅滞、摂食嚥下機能障害、発育障害などは症状が重なった。重度の GER のため、誤嚥性肺炎を反復し、長期にわたる経管栄養治療を余儀なくされた。ATR-X 症候群では GER の合併が多く、噴門形成術や胃瘻造設術が必要になる例が多いが、本例も消化管機能障害は重症であった。

一部の ATR-X 症候群では先天性心疾患の合併がみられるが、本例では ASD を合併した。

顔貌の特徴は典型的な ATR-X 症候群と比較すると、眼間開離、耳介の形状などは類似した。しかし、前向きの鼻孔、テント状の上口唇、隙間の多い歯などの特徴は認めなかった。全体的な印象として、本例の顔貌は ATR-X 症候群と類似した特徴もあった。

RBC のブリリアントクレシルブルー染色は数回実施したが、HbH は検出されなかった。ただし、これは ATR-X 症候群においても必発所見ではなく、陰性であっても診断を除外できるわけではない。

ATR-X 症候群では精神運動発達遅滞は重度の例が多く、歩行獲得や有意語獲得に至らない例も少なくない。本例の場合、歩行開始は 2 歳で可能となり、走ったり高い場所に登るなど運動能力は向上したが、4 歳でも言語に乏しく、重度精神遅滞の状況であった。手が汚れるのを過剰にいやがるなど、こだわりが強い性格であった。

ATR-X 症候群では停留精巣や小陰茎など外性器異常の例が多い。本例においては外性器異常を認めなかった。

ATR-X 症候群の場合、各種の *ATRX* 遺伝子変異が報告されているが、*ATRX* 遺伝子の部分的な重複も報告されている<sup>1) 2)</sup>。この場合、遺伝子の一部で構造異常が生じている場合は、点変異例と同様に *ATRX* 遺伝子の機能喪失が生じると考えられる。

*ATRX* 遺伝子全体が重複する場合、遺伝子の発現が 2 倍になることが予想される。転写調節因子であれ *ATRX* 遺伝子の標的になる他の遺伝子の発現状況などを検索予定である。

過去に 11 例の同様症例の報告があるが、類似点は多かった<sup>3)</sup>。過去の 11 例の報告では外性器低形成、停留精巣の合併が多いが、本例ではともに認めず、相違点であった。顔貌の特徴は ATR-X 症候群とは異なるが、本例では類似する面もあった。

*ATRX* 遺伝子をマウスで過剰発現させた報告があるが、神経系の異常や成長障害を認めた<sup>4)</sup>。

本例では *ATRX* 遺伝子だけでなく、その近傍の複数の遺伝子も重複していた。近傍の遺伝子も本児の症状に影響を与えている可能性は否定できない。X 連鎖性精神遅滞症候群のひとつ

である MCT8 異常症の責任遺伝子である *SLC16A2* 遺伝子も含まれたが、臨床検査では甲状腺機能異常は認めず。この遺伝子が過剰に作用しても甲状腺機能に影響は与えないようである。

母親は *ATRX* 重複の保因者であったが、特に症状はなかった。重複のある X 染色体は選択的に不活化をうけることが予想されるが、不活化の偏りの程度は検討していない。

## E. 結論

*ATR-X* 遺伝子重複例を経験した。*ATR-X* 症候群と一部の症状は類似し、顔貌も類似点があった。*ATRX* 遺伝子は機能喪失でも機能亢進でも正常な発育発達が阻害されることが予想された。

*ATR-X* 症候群と臨床的に類似する面もあり、*ATR-X* 症候群の鑑別診断において重要な疾患と考えることもできる。X 染色体の微細重複はマイクロアレイによる解析が必要であり、原因不明の精神遅滞、多発先天異常症例でマイクロアレイ解析は重要な意義を持つ。

今後は *ATRX* 遺伝子による転写調節をうける遺伝子群の発現状況などを精査する予定である。*ATRX* 遺伝子重複例の研究は *ATRX* 遺伝子の機能の理解を深めるうえで非常に有意義と考えている。

## 文献

1) Thienpont B, de Ravel T, Van Esch H, Van Schoubroeck D, Moerman P, Vermeesch JR, Fryns JP, Froyen G, Lacoste C, Badens C, Devriendt K. Partial duplications of the *ATRX* gene cause the *ATR-X* syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2007;15:1094-7.

2) Cohn DM, Pagon RA, Hudgins L, Schwartz CE, Stevenson RE, Friez MJ. Partial *ATRX* gene duplication causes *ATR-X* syndrome. *Am J Med Genet A.* 2009;149A:2317-20.

3) Lugtenberg D, de Brouwer AP, Oudakker AR, Pfundt R, Hamel BC, van Bokhoven H, Bongers EM. Xq13.2q21.1 duplication encompassing the *ATRX* gene in a man with mental retardation, minor facial and genital anomalies, short stature and broad thorax. *Am J Med Genet A.* 2009 ;149A:760-6.

4) Bérubé NG, Jagla M, Smeenk C, De Repentigny Y, Kothary R, Picketts DJ. Neurodevelopmental defects resulting from *ATRX* overexpression in transgenic mice. *Hum Mol Genet.* 2002 ;11:253-61.

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

論文発表

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, Gillissen-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.

なし

**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・登録状況

## 厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

### ATR-X（X連鎖 $\alpha$ サラセミア・精神遅滞）症候群の診断及び治療方法の 更なる推進に関する研究

#### 分担研究報告書

#### ATR-X症候群の新しい分子遺伝学的診断方法に関する研究

分担研究者 小坂 仁 神奈川県立こども医療センター

研究要旨：*ATR-X* 遺伝子はクロマチンリモデリング蛋白をコードする、ATR-X 症候群の責任遺伝子である。昨年度の研究において、患者末梢血液から直接 RNA を抽出し、cDNA を合成し、PCR 後、ダイレクトシーケンス法による新しい *ATR-X* 遺伝子変異の効率的な分子遺伝学的診断方法を開発した。今年度はこの手法を用いて 24 検体の解析を行った。そのうち 1 症例において、cDNA 解析からエクソン 34 のスプライスアウトの所見が得られ、ゲノム DNA 解析からイントロン 34 の 4 番目の塩基が A>G に置換 IVS34+4A>G していたことが判明した。我々の開発した方法が有用であることが示された。一方で、新規患者 15 名で変異が検出されたのは 10 症例（67%）であり、臨床診断基準の設定および、本法では解析できない微小欠失あるいは重複に対する解析方法の開発が今後の課題である。

#### A. 研究目的

X連鎖性・サラセミア精神遅滞（ATR-X）症候群は男性のみに発症し、重度の精神遅滞、 $\alpha$ サラセミア（HbH病）、特徴的顔貌、外性器異常、骨格異常、独特の姿勢・行動異常を臨床的特徴とする。その責任遺伝子は Xq13 に局在するクロマチンリモデリング蛋白をコードする *ATR-X* 遺伝子であり、Gibbons et al. 1995）、X連鎖精神遅滞症候群の一つである。

*ATR-X* 遺伝子は 36 エクソン、300kb の genomic DNA からなり、10.5kb の mRNA の転写産物をコードする。機能的に重要な ADD(*ATR-X-DNMT3a/b-DNMT3L*)ドメインとクロマチンリモデリングドメインの2つの領域を持ち、患者のほとんどがこの2つの領域に変異を持っている。

従来からの *ATR-X* 遺伝子変異の分子遺伝学的解析は患者血液から抽出したゲノム DNA を用いて、イントロン-エクソン境界領域を含む全 35 エクソンを 39 組の PCR 法で増幅し、ダイレクトシーケンス法により解析していた。これに変わり、昨年度の本研究において、我々は、患者血液から白血球から RNA を抽出し cDNA を合成し、PCR 法、及びダイレクトシーケンス法により、より、効率的で経済的であり、かつ変異検出度の高い方法を開発した。遺伝子変異

を解析した。

そこで、本年度の研究では、新しく開発した手法により、ATR-X 症候群が疑われる新規の患者に対して *ATR-X* 遺伝子変異の検出を試みた。

#### B. 方法（詳細は、昨年度報告書を参照）

1. 末梢血液からの RNA の抽出  
患者末梢血液 5ml (EDTA 採血管) から、3ml をゲノム DNA の抽出、2ml を total RNA 抽出。
2. RNA から cDNA の合成  
PrimeScript® RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara 社) を用いて、抽出した total RNA 2 $\mu$ g を用いて、cDNA を合成。
3. RT-PCR  
*ATR-X* 遺伝子の全コーディング領域をカバーする 12 組のプライマーを用いて、PCR 反応を行い、RT-PCR 産物を電気泳動により確認後、カラム精製し、シーケンス反応に使用。
4. シーケンス
5. シーケンスデータの解析
6. cDNA 解析で見つかった異常をゲノム DNA で確認する。

#### C. 対象



臨床的に ATR-X 症候群が疑われ確定診断として、あるいは精神遅滞の鑑別診断として ATRX 遺伝子変異の解析を希望され、全国よりご紹介された新規の患者 15 症例に対して、ATRX 遺伝子変異の解析を行った。

#### D. 結果

15 症例中 10 症例 (67%) で ATRX 遺伝子変異を検出した。内訳は以下の通りである。

##### (a) ミスセンス変異 (5 例)

c. 736 C>T, p. Arg246Cys

c. 832 A>C, p. The278Pro

c. 668 G>T, p. Cys223Phe

c. 6511A>G, p. Met2171Val (2 例)

##### (b) ナンセンス変異 (1 例)

c. 7156C>T, p. Arg2386X

##### (c) スプライシング変異 (1 例)

IVS34+4A>G

##### (d) その他 (意義不明あるいは解析中; 3 例)

イントロン 2 の一塩基置換

イントロン 17 一塩基置換 3

3' UTR の一塩基置換

#### E. 考察

今回、臨床的に ATR-X が疑われる症例 15 症例中 10 例 (67%) で ATRX 遺伝子変異が同定された。その中でも、従来の解析方法を用いたスクリーニング法では確認で出来なかったスプライシング変異 (IVS34+4 A>G) を迅速に診断できたことは、我々が新しく開発した方法が有用であることを示している。従来、ATRX 遺伝子変異の検索は、その遺伝子サイズが大きく、エクソン数も多いため、解析に数ヶ月以上かかり、また、解析費用も 1 人あたり 5-10 万円かかった。今回、新たに開発した診断法により、解析時間は 1-2 週間と大幅に短縮され、また、解析費用も 5 万円以下に抑えることが可能となった。

一方、ATR-X 症候群が疑われた患者のうち約 3 割で、遺伝子変異が検出されなかった。その原

因は、臨床診断が誤っている可能もあるが、我々の方法では検出できない ATRX 遺伝子変異である可能性がある。

今後の課題として、ATRX 遺伝子を含む領域の微細欠失あるいは重複を検出できる解析方法を検討していく必要がある。また、ATRX 遺伝子の検出されなかった症例に対しては、ゲノムワイドで微細欠失あるいは重複を検出する CGH マイクロアレイ法を用いた検討も必要である。

#### E. 結論

患者末梢血液から抽出した RNA を用いた ATRX 遺伝子変異の新しい分子遺伝学的解析方法により ATR-X 症候群疑いの 15 症例中 10 例で変異を検出した。本法は、スプライシング異常の検出にも有用であることが示された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Osaka H, Koizume S, Aoyama H, Iwamoto H, Kimura S, Nagai, Kurosawa K, Yamashita S. Mild phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a PLP1-specific mutation, *Brain Dev.* 2010 32; 703-707

2. Osaka H, Hamanoue H, Yamamoto R, Nezu A, Sasaki M, Saitsu H, Kurosawa K, Shimbo H, Matsumoto N, Inoue K. Disrupted SOX10 regulation of GJC2 transcription causes Pelizaeus-Merzbacher-Like Disease. *Ann Neurol*, 2010; 68: 250-4.

3. Saitsu H, Kato M, Okada I, Orii KE, Higuchi T, Hoshino H, Kubota M, Arai H, Tagawa T, Kimura S, Sudo A, Miyama S, Takami Y, Watanabe T, Nishimura A, Nishiyama K, Miyake N, Wada T, Osaka H, Kondo N, Hayasaka K, Matsumoto N. STXBP1 mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burstpatter. *Epilepsia*, 51:2397-2405, 2010

- Tsuji M, Aida N, Obata T, Tomiyasu M, Furuya N, Kurosawa K, Errami A, Gibson KM, Salomons GS, Jakobs C, Osaka H. A new case of GABA transaminase deficiency facilitated by proton MR spectroscopy. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33: 85-90.
5. Tsuyusaki Y, Yoshihashi H, Furuya N, Adachi M, Osaka H, Yamamoto K, Kurosawa K. lp36 deletion syndrome associated with Prader-Willi-like phenotype. *Pediatr Int*. 2010; 52: 547-550
  6. Sato I, Onuma A, Goto N, Sakai F, Fujiwara I, Uematsu M, Osaka H, Okahashi S, Nonaka I, Tanaka S, Haginoya K. A case with central and peripheral hypomyelination with hypogonadotropic hypogonadism and hypodontia (4H syndrome) plus cataract. *J Neurol Sci*. 2011; 300;179-181
  7. 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 [Epub]
  8. Natsuga K, Nishie W, Shinkuma S, Arita K, Nakamura H, Ohyama M, Osaka H, Kambara T, Hirako Y, Shimizu H. Plectin deficiency leads to both muscular dystrophy and pyloric atresia in epidermolysis bullosa simplex. *Hum Mutat*. 2010; 31; E1687-98.
  9. Muto A, Oguni H, Takahashi Y, Shirasaka Y, Sawaishi Y, Yano T, Hoshida T, Osaka H, Nakasu S, Akasaka N, Sugai K, Miyamoto A, Takahashi S, Suzuki M, Ohmori I, Nabatame S, Osawa M. Nationwide survey (incidence, clinical course, prognosis) of Rasmussen's Encephalitis. *Brain Dev*. 2010;32:445-53
  10. Saitsu H, Tohyama J, Kumada T, Egawa K, Hamada K, Okada I, Mizuguchi T, Osaka H, Miyata R, Furukawa T, Haginoya K, Hoshino H, Goto T, Hachiya Y, Yamagata T, Saitoh S, Nagai T, Nishiyama K, Nishimura A, Miyake N, Komada M, Hayashi K, Hirai S, Ogata K, Kato M, Fukuda A, Matsumoto N. Dominant-negative mutations in alpha-II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *Am J Hum Genet*. 2010;86:881-91.
- B. 学会発表
1. 辻 恵、三谷忠宏、渡辺好宏、鮫島希代子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁、急性脳症を呈した重症乳児ミオクロニーてんかんの1例、第65回神奈川てんかん懇話会 2010. 1. 16 横浜
  2. 辻 恵、渡辺好宏、鮫島希代子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁、大脳白質変性を伴う交通性水頭症に末梢神経障害・呼吸不全を合併した乳児例第15回蔵王セミナー 2010. 2. 20-21 山形
  3. 渡辺好宏、藤田利治、和田敬仁、小坂仁、森雅亮、横田俊インフルエンザ罹患に伴うせん妄のDelirium Rating Scaleによる検討第113回日本小児科学会総会 2010. 4. 24 盛岡
  4. 露崎悠、高木篤史、渡辺好宏、辻恵、鮫島希代子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、新家敏弘、久原とみ子、相田典子、小坂仁、MRSが診断に有用であったCreatine transporter deficiency (CTD)の一例第52回関東小児神経学会 22. 3. 20 東京
  5. 秋庭真理子、渡辺好宏、辻恵、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁、山岡正慶、的場香織、抗NMDA受容体脳炎の1例 第46回神奈川小児神経学会、2010. 7. 10 横浜
  6. 山下純正、渡辺好、辻恵、鮫島希代子、和田敬仁、井合瑞江、小坂仁、阿部暁子、早坂清、小児期発症 Charcot-Marie-Tooth 病の臨床病理学および遺伝学的検討第52回日本小児神経学会 5月20日~22日福岡
  7. 和田敬仁、新保裕子、小坂仁、精神遅滞患者に対するクレアチニン代謝異常のスクリーニング法の開発 第52回日本小児神経学会 5月20日福岡
  8. 辻 恵、渡辺好宏、鮫島希代子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、小坂仁、大脳白質変性を伴う交通性水頭症に末梢神経障害・呼

吸不全を合併した MTHFR 欠損症の一例, 第 52 回  
日本小児神経学会 5 月 20 日福岡

9. 渡辺好宏、安西里恵、露崎悠、辻恵、  
鮫島希代子、和田敬仁、井合瑞江、小坂仁、山  
下純正, 新型インフルエンザによる急性脳症の  
臨床的検討 第 52 回日本小児神経学会 5 月 20  
日福岡

10. 、三谷忠宏、大塚佳満、和田敬仁、辻  
恵、渡辺好宏、井合瑞江、山下純正、小坂仁、  
サイクロフォスファミド療法が著効した抗  
NMDA 受容体抗体脳炎の 1 例第 53 回関東小児神  
経学会 22. 9. 11 東京

G. 知的所有権の取得状況

特願 2010-25346 弱酸性陽イオン交換カラム  
を用いた生体アミンの検出。

## 厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

ATR-X（X連鎖 $\alpha$ サラセミア・精神遅滞）症候群の診断及び治療方法の  
更なる推進に関する研究

### 分担研究報告書

ATR-X 症候群における喉頭・気管病変に関する研究

研究分担者 黒澤健司 神奈川県立こども医療センター遺伝科 部長

#### 研究要旨

X連鎖 $\alpha$ サラセミア・精神遅滞症候群（X-linked  $\alpha$ -thalassemia/mental retardation syndrome: ATR-X MIM.#301040）は、X連鎖性精神遅滞症候群で、多くの合併症を有し疾患を理解した医療管理が重要とされる。今回我々は、自験4症例の喉頭・気管病変についてまとめた。4例中2例に声門下狭窄を認め、生命予後決定因子としての心奇形、てんかん発作、逆流による窒息・誤嚥、気道感染などと並んで、喉頭・気管軟化症は重要な合併症の一つと考えられた。より多くの症例での情報蓄積は重要で、予後関連因子としてのそれぞれの合併症の重みづけも調査として必要と考えられた。

#### 研究協力者

榎本啓典（神奈川県立こども医療センター）

富永牧子（神奈川県立こども医療センター）

#### A. 研究目的

X連鎖 $\alpha$ サラセミア・精神遅滞症候群

（X-linked  $\alpha$ -thalassemia/mental retardation syndrome: ATR-X MIM.#301040）は、粗な特異顔貌、軽度のHbH病、重度精神遅滞、外生殖器異常などを特徴とするX連鎖性症候群である。原因遺伝子はXq13にマップされる*ATRX*で、*ATRX*は核内タンパクとして、複合体を作ってDNAメチル化に関わるクロマチンの再構築に関与している。女性保因者ではskewedパターンのために、保因者診断としてBCB染色法を用いる場合は慎重を要する。性腺モザイク例や、非症候群性精神遅滞の*ATRX*変異例の報告もある。臨床的には、多くの合併症を有し、疾患を理解した医療管理が重要とされる。

一般に、先天性多発奇形症候群の多くが遺伝

子異常を原因としており、根本治療は困難である。こうした難治性疾患である奇形症候群の自然歴を明らかにすることは極めて重要である。自然歴を明らかにすることにより、医療サイドの理解が得られ、合併症管理に有用となる。さらに自然歴に関する情報は、将来に対する親の不安を取り除くことを可能とし、結果として長期的予後の改善が期待できるからである。現在まで、世界で100例以上の報告があり、我が国においても数十例以上の症例の存在が確認されている。上述の極めて特徴的な症状を合併するが長期的な予後との関連は依然と不明なことが多い。

今回我々は、自験例4症例の喉頭・気管病変についてまとめた。理由は、比較的合併頻度が高い割に記載が少なく、かつ生命予後を左右する合併症とも考えられるからである。喉頭・気管の問題は、合併症治療としての手術時の呼吸管理へも影響を及ぼす可能性がある。遺伝学的解析結果とともにまとめた。

## B. 研究方法

対象は、臨床症状から診断し、*ATRX* 遺伝子解析により確定した 4 症例で、医療管理記録を参考として臨床経過をまとめた。

### (倫理面への配慮)

解析にあたっては全ての個人情報には潜在化させた。遺伝子解析は十分なインフォームドコンセントの後に文書により同意を得た。また遺伝子解析は施設内倫理審査を経たものである。

## C. 研究結果

### 症例報告

#### 症例 1. 2 歳男児

家族歴：同胞 2 男児の内、1 男児が *ATRX* 遺伝子解析により *ATR-X* と診断確定 (c.4870G>A, p.V1624M) されている。別の同胞 1 男児例は、診断未定のまま 4 歳時に痙攣重積後の脳症により死亡。他に大血管転位症 (TGA) を認め、手術治療 (B-T シヤント術) を受けた。新生児期に声門下狭窄を指摘され、気管内挿管呼吸器管理を受けた。現病歴：在胎 36 週 4 日に胎児心音低下を認め、緊急帝王切開で出生。出生体重 2148g、アプガー 5/7 点で、10 日間の呼吸管理を受けた。*ATRX* 遺伝子解析で同胞と同様の変異を検出した。新生児脳症 (皮質下白質軟化症) を認め、日齢 29 に退院。退院後、陥没呼吸が目立ち始め、喉頭・気管軟化による呼吸不全の診断により 6 カ月時に呼吸管理を行った。その後、同様のエピソードおよび声門下狭窄あり、1 歳 2 カ月時に気管切開による管理となった。

#### 症例 2 13 歳男児

在胎 36 週 3 日、出生体重 2712g で仮死なく出生。斜視および発達遅滞精査目的に 1 歳 2 カ月時に受診。3 歳時に全身強直性痙攣をおこし、人工呼吸管理 9 日間施行。以後てんかんにて治療開始となった。強直発作とともに起こるチアノーゼ発作を繰り返し、声門下狭窄を指摘され

た。以後も改善少ないが、現在に至るまで窒息等なく経過。*ATRX* 遺伝子解析で exon18 の 3 塩基欠失を確認した。

#### 症例 3 10 歳男児

在胎 36 週、出生体重 2810g、仮死なく出生。出生後から喉頭軟化を認め、啼泣時チアノーゼあり。4 歳ころまでに改善を見た。*ATRX* 解析で p.S576X を確認した。

#### 症例 4 3 か月男児

在胎 37 週 1 日、子宮内発育遅延目立ち、児心音低下による帝王切開で出生。出生体重 1624g、アプガー 7/8 点。精査目的に 3 カ月時に受診し、*ATRX* 解析で c.736C>T (p.R246C) を検出し、確定した。他に心房中隔欠損症 ASD・尿道下裂を認めた。陥没呼吸は若干認めるものの、経口哺乳は可能となっている。

## D. 考察

4 症例いずれも新生児期あるいは乳児期早期から陥没呼吸などの喉頭・気管軟化の症状を呈していたが、経過によっては自然軽快も期待できた。しかし、気道感染等による呼吸状態悪化に伴う気管内挿管および人工呼吸管理は、明らかに潜在する喉頭・気管軟化を増悪させる方向に働いていた。また、声門下狭窄を 2 例に認めたが、うち 1 例は罹患同胞にも声門下狭窄を認めていた。こうした喉頭・気管軟化は必ずしも *ATR-X* 症候群に特異的ではないが、医療管理においては重要である。その理由の第 1 は、胃食道逆流を特徴とする *ATR-X* 症候群で、逆流とこの喉頭・気管軟化が併存することは窒息の危険性を高めることになるからである。第 2 は手術治療を要する合併症が比較的多い本症候群では術後の抜管時に潜在していた喉頭気管軟化が顕在化して、術後の抜管困難に至る危険性が推測されるからである。今回の 4 症例のうち 1 症例

は実際抜管困難となり、気管切開に至っている。

今後、より多くの症例での情報蓄積は重要で、予後関連因子としてのそれぞれの合併症の重みづけも調査として必要と考えられた。

## E. 結論

ATR-X 症候群における喉頭・気管軟化症および声門下狭窄について自験例を中心にまとめた。生命予後決定因子としての、心奇形、てんかん発作、逆流による窒息・誤嚥、気道感染などに並んで喉頭・気管軟化症は重要な合併症の一つと考えられた。より多くの症例での情報蓄積は重要で、予後関連因子としてのそれぞれの合併症の重みづけも調査として必要と考えられた。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 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  
サブテロメア 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

宮武聡子、山下純正、黒澤健司、三宅紀子、松  
本直通 劣性遺伝性白質脳症の 1 家系の疾患  
責任遺伝子解析 第 55 回日本人類遺伝学会  
2010.10.27-30. さいたま市

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.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

ATR-X（X連鎖 $\alpha$ サラセミア・精神遅滞）症候群の診断及び治療方法の  
更なる推進に関する研究

分担研究報告書

臨床情報の収集およびリサーチリソースの運用に関する研究

分担研究者 後藤 雄一 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 部長

本研究では、日本人 ATR-X 症候群患者の集積をめざし、国立精神・神経医療研究センターにて行われている「精神遅滞バイオリソース」事業の DNA リソースを用いて遺伝子検査を行っている。本年度は、同バイオリソースから 1 例の ATR-X 遺伝子変異例を見だし、さらに平成 22 年度に新たに収集できた症例の DNA を、解析施設である神奈川県こども医療センターに送付する準備を整えた。

A. 研究目的

本研究の対象疾患である ATR-X 症候群は、X 染色体上に局在する遺伝子の変異により発症する遺伝性の疾患であり、現在までに日本国内に約 50 症例、世界的でも日本の症例を含めて 200 症例近くが診断されている希な疾患である。その病態はエピジェネティクスの破綻と考えられているが、ほとんど解明されていない。

本研究の目標は、ATR-X 症候群の臨床および分子遺伝学的診断体制を確立すると共に、患者の臨床情報をデータベース化し管理することにより、その医療情報を医療者および患者・家族に提供するためのシステムを構築し、診断基準の作成、重症度の判定法を確立することにある。

B. 研究方法

国立精神・神経センターでは、平成 15 年度から精神・神経疾患研究委託費を充当して、日本人「精神遅滞バイオリソース」を構築するために、患者及びその家族の血液及びリンパ芽球を収集し、同時に臨床情報を登録してきている。その中

で、精神遅滞の病因の中で染色体異常に次いで多いとされる本症候群の遺伝子検査を行ってきた。本年度も同様にこのバイオリソースに登録された DNA 試料を ATR-X 症候群の遺伝子検査に供する準備を行った。

（倫理面への配慮）

国立精神・神経医療研究センター倫理委員会に申請し、承認を得ている。

C. 研究結果

すでに主任研究者の和田が同バイオリソース症例から、1 例の非症候群性精神遅滞の 1 例と症候群性（同疾患疑い例）精神遅滞 3 例から ATR-X 遺伝子変異例を見だしていた。平成 22 年度において、3' -UTR 領域に変異が存在する 1 例もについて、患者家族のリンパ芽球を送付した。

平成 22 年度は、「精神遅滞バイオリソース」には 65 家系の新たな登録があった。これらについても遺伝子解析施設に試料を送る準備を整えた。



#### D. 考察

過去において、この「精神遅滞バイオリソース」から提供した 200 検体において、4 家系に ATR-X 遺伝子変異例が見いだされた。さらに本年度は 37-UTR 領域に変異の存在する家系 1 例のリンパ芽球を主任研究者の和田に送付した。日本人 ATR-X 症候群の症例集積に対して、このバイオリソースを有効に活用することが重要と考える。

#### E. 結論

本年度新たに ATR-X 遺伝子変異例 1 家系を送付した。また本年度は DNA 検索を行う準備として新たに 65 家系の登録を行った。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Honda S, Hayashi S, Imoto I, Toyama J, Okazaki H, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J, Japanese Mental Retardation Consortium. Copy-number variations on the X chromosome in Japanese patients with mental retardation detected by array-based comparative genomic hybridization. *J Hum Genet* 55:590-599, 2010.

##### 2. 学会発表

(国際学会)

Honda S, Hayashi S, Kobayashi J, Imoto I, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J: Exploration of the genes related to X-linked mental retardation by BAC-based X-tiling array. The 60th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Washington DC, USA, 11.2-6, 2010.

(国内学会)

本田尚三、林深、小林淳也、井本逸勢、中川栄二

後藤雄一、稲澤譲治. BAC-based X-tiling array を用いた X 連鎖性精神発達遅滞 (XLMR) の原因遺伝子探索. 第 55 回日本人類遺伝学会. 大宮, 10.29, 2010

神田将和、本田尚三、中川栄二、平田智子、黒澤健司、稲澤譲治、後藤雄一、岡崎康司. 精神発達遅滞 (MR) に関与する染色体構造異常の探索. 第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、12.10 2010

#### H. 知的所有権の出願・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

## 厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

### ATR-X（X連鎖 $\alpha$ サラセミア・精神遅滞）症候群の診断及び治療方法の 更なる推進に関する研究

#### 分担研究報告書

分担研究課題： X連鎖精神遅滞における *SLC9A6* 遺伝子変異の発症機構に関する研究

#### 研究要旨

私たちは昨年度の研究班において、X連鎖精神遅滞における *SLC9A6* 遺伝子変異の役割について検討した。その結果、アンジェルマン症候群が疑われた男性患者の中に *SLC9A6* 変異を1例に同定した。本年度はこの同定された変異の意義についてRNAおよび蛋白レベルでの解析を行い、発症機構について検討した。同定されたc.1692 +10A>Gを有するmRNAは発現量が低下し、その機構としてnonsense mediated mRNA decay (NMD)が存在することを示した。さらに、ウエスタンブロットにて *SLC9A6* 遺伝子がコードするNHE6蛋白が存在しないことを示した。これらの結果は本変異が機能喪失型変異であることを示すものであり、本例における *SLC9A6* 遺伝子変異の発症機構を明らかにすることができた。

#### 研究分担者

齋藤伸治（北海道大学病院小児科・講師）

#### A. 研究目的

X連鎖精神遅滞の原因遺伝子のひとつに *SLC9A6* 遺伝子があり、その変異によりアンジェルマン症候群（AS）と良く似た表現型を示すことが知られている。ASは重度精神遅滞に加えて、てんかんと失調様運動障害を示す。ASの原因遺伝子 *UBE3A* はグルタミン酸シナプスの可塑性に関与していることが明らかにされている。*SLC9A6* 遺伝子も脳におけるシナプス形成に関連していることが報告されており、疾患の表現型の類似から、これらの遺伝子のシナプス形成における相互作用の可能性が示唆されている。

私たちは昨年度の研究において、AS様症状を示す男性患者において *SLC9A6* 遺伝子に c.1692 +10A>G 変異を同定した。今回は、この同定された変異の意義について、RNA および蛋白レベルの解析を行い、発症機構を明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

患者末梢血白血球から EB ウイルスを用いて不死化リンパ芽球様細胞株を樹立した。この細胞株から RNA および蛋白を抽出した。RNA の解析は、RT-PCR 法にて発現の有無と量的解析を行った。その後 TaqMan プローブを作成して RNA 発現量の定量解析を定量 PCR にて行った。蛋白解析は抗 NHE6 ポリクローナル抗体（大阪大学理学部大学院生体膜機能研究室松下昌史先生、金澤浩先生による）を用いてウエスタンブロット法にて実施した。

*SLC9A6* 遺伝子はオルターナティブスプライシングにより2つの転写産物がつくられ、バリエーション1、バリエーション2と名付けられている。本変異はバリエーション1にのみ存在する。バリエーション1は蛋白レベルではアイソフォーム a、バリエーション2はアイソフォーム b に対応する。

（倫理面への配慮）

本研究は北海道大学大学院医学研究科医の倫理委員会の承認を受け、解析にあたっては、ご家族から書面による同意を得た。

#### C. 研究結果

RT-PCR では、正常対照4名と比較して、患者

ではバリエント1が明らかに低下していた。一方、バリエント2は増加していた。TaqManプローブを用いた定量RT-PCRの結果では、上述した結果が有意差をもって確認された。

患者ではバリエント1の中に終止コドンが存在する。したがって、バリエント1の発現低下はNMDの影響である可能性を考え、細胞をcycloheximide (CHX)にて処理した後に、定量RT-PCRを行ったところ、患者ではバリエント1の発現が有意に増加し、ほぼ正常対照と同じレベルとなった。しかし、バリエント2には変化がみられなかった。

抗NHE6抗体を用いたウエスタンブロットでは患者ではNHE6アイソフォームaおよびアイソフォームbのいずれも検出されず、NHE6蛋白は存在しなかった。アイソフォームbに相当する蛋白は正常対照およびHela細胞においても検出されなかった。

#### D. 考察

SLC9A6遺伝子はX染色体長腕26.3上に存在し、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体NHE6をコードしている。NHE6は細胞内のpHやNa濃度を調整する機能を有している。脳細胞においても高度に発現しており、樹上突起でのシナプス形成に関与していることが報告されている。

私たちは、アンジェルマン症候群の表現型を示したX連鎖精神遅滞男性患者に同定されたc.1692+10A>G変異の発症メカニズムについて検討を行った。その結果、c.1692+10A>G変異を含むバリエント1転写産物は有意に発現が低下していた。この発現低下はNMDを抑制する薬剤で処理するとほぼ正常近くまで復帰したことから、NMDのメカニズムにより転写産物が壊されていることが示された。一方c.1692+10A>G変異を含まないバリエント2の発現は有意に増加していたが、この増加はNMDを抑制する薬剤による変化はなかったことから、NMDはバリエント1にのみ影響していると考えられた。

蛋白レベルでの解析においては、バリエント1に相当するアイソフォームaは同定されなかった。

バリエント1は低下しているものの、全くなくはない。したがって、蛋白レベルでのNHE6アイソフォームaが検出されなかったことは、NMDのみでは説明が困難であり、変異蛋白の不安定性などの蛋白レベルでのメカニズムの存在を示唆する。一方アイソフォームbは患者のみならず、正常対照でも検出されなかった。患者ではRNAレベルでのバリエント2が増加していたことを考えると、NHE6アイソフォームbはそれ自体不安定な蛋白であって、機能を担っていない可能性が示唆される。

今回の患者ではバリエント1のみが変異の影響を受ける。しかし、患者の臨床症状はこれまでの報告と同じ程度の重症度であった。蛋白レベルでの解析結果と合わせて考えると、NHE6蛋白はバリエント1に相当するアイソフォームaが主要な役割を果たしている可能性が考えられる。

これまでに、蛋白レベルでNHE6の欠損が示された報告はない。したがって、今回の結果は、患者に同定された変異が完全な機能喪失型変異であることを明確に示すことができた。SLC9A6変異の完全な機能喪失が臨床的にはアンジェルマン症候群様の症状を引き起こすと結論づけることができた。

#### E. 結論

患者に同定された変異についてRNAおよび蛋白レベルでの解析を行い、機能喪失型変異であることを明白に示した。NHE6蛋白はバリエント1によりコードされているアイソフォームaが主要な役割を果たしていることを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakamura M, et al. MERRF/MELAS overlap syndrome: A double pathogenic mutation in mitochondrial tRNA genes. *J Med Genet* 47:659-664, 2010.

- 2) Saitsu H, et al. Dominant-negative mutations in alpha-II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *Am J Hum Genet* 86:881-891, 2010.
- 3) Yamazawa K, et al. Parthenogenetic chimaerism/mosaicism with a Silver-Russell syndrome-like phenotype. *J Med Genet* 47:782-785, 2010.

## 2. 学会発表

- 1) 斉藤伸治、高橋有美、植田佑樹、伊藤智城、白石秀明：微細染色体異常はプラダー・ウィリー症候群の重要な鑑別診断である、第52回日本小児神経学会総会、平成22年5月20-22日（福岡）
- 2) 細木華奈、太田亨、新川詔夫、斉藤伸治：PWS様表現型を示す微細染色体異常、第55回日本

人類遺伝学会、平成22年10月28-30日（さいたま）

- 3) 細木華奈、太田亨、新川詔夫、斉藤伸治：ゲノム刷り込み関連疾患 Prader-Willi 症候群の表現型を規定する遺伝学的因子の検討、第33回日本分子生物学会年会、平成22年12月7-10日（神戸）

## 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