

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 α 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 α 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

α 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 α 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しられ、*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思われる。

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

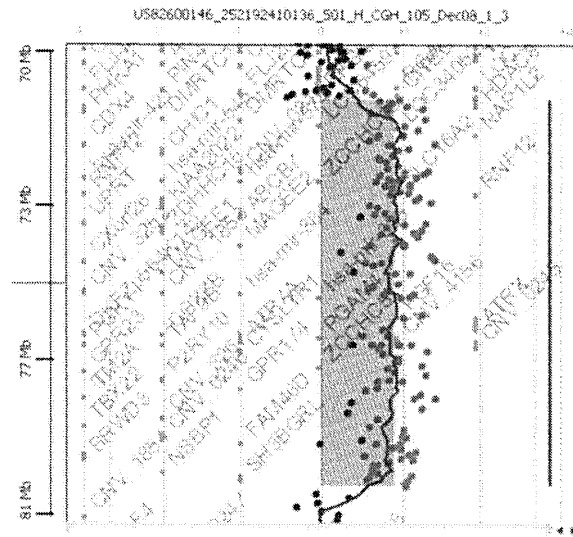
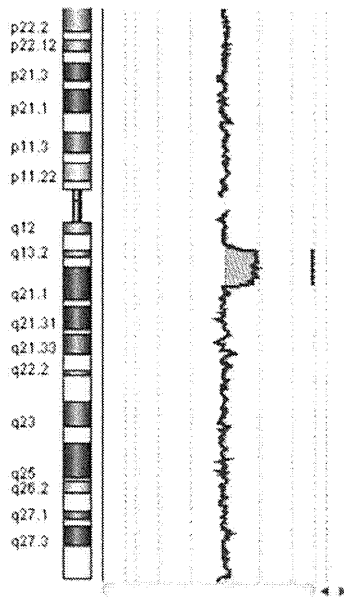
C. 研究結果

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、薄い上嘴唇、口角下垂を認めた。



71,531,708//80,563,782=9.0-Mb

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 Pelizaeus-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^{1) 2)}。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³⁾。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⁴⁾。

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, 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.

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 α 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

治療法のあるX連鎖精神遅滞のスクリーニング方法と診断法の開発に関する研究 脳内クレアチン代謝異常症

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：本研究では、クレアチン代謝異常の早期診断のためのスクリーニング法の開発、臨床および分子遺伝的診断システムの確立、および治療法の開発を目指した。弱酸性陽イオン交換カラムおよび弱酸性のリン酸水溶液を用いたクロマトグラフィーによる、尿中クレアチン、クレアチニン、グアニジノ酢酸の簡便な検出方法を開発し、本法を用いて、当センター神経外来患者104名を対象として尿中クレアチン、クレアチニン、グアニジノ酢酸を測定し、年齢別の正常値を設定した。また、X連鎖精神遅滞症候群が疑われた一家系において、本法により尿中クレアチン/クレアチニン比の異常高値を検出し、スクリーニング方法が有用であることが示された。

A. 研究目的

精神遅滞(mental retardation: MR)は、簡単には「知能指数が70以下」で、かつ「意思伝達・自己管理・家庭生活・対人技能・地域社会資源の利用・自律性・学習能力・仕事・余暇・健康・安全のうち、2種類以上の面にも適応問題がある」病態と定義される。人口の1-3%と高頻度であり、特に小児科あるいは小児神経科領域の臨床の場で遭遇する頻度が最も高い病態の一つである。¹⁾

精神遅滞の原因は、環境的要因と遺伝学的要因からなり、近年、急速に病態が明らかにされ始めている。中等度以下の精神遅滞(IQ<50)の20-25%、軽度の精神遅滞(50<IQ<70)の5-10%は遺伝学的要因が原因と見積もられ、特に重度精神遅滞の50%は遺伝的要因と考えられている。遺伝学的異常による精神遅滞の発症は、その変異した遺伝子がコードする蛋白の機能により、

(1)細胞骨格、細胞内情報伝達、シナプス形成、細胞分化など神経細胞の機能そのものに関わる遺伝子群、(2)エピジェネティクスに関わる遺伝子を含めた遺伝子の転写制御に関わる遺伝子群、(3)代謝に関わる遺伝子群、(4)その

他、に分類できる。特に、代謝に関わる遺伝子の変異による精神遅滞は、早期の診断および早期の治療により治療可能である可能性がある。すなわち、精神遅滞は「治らない疾患」から、「治し方が分からなかった疾患」そして「治療可能な疾患」に変貌しつつある。

主に男性のみが発症し、その責任遺伝子がX染色体上に局在しているX連鎖精神遅滞(XLMR)の分子遺伝学的研究が、欧米を中心に急速に進展し、現在までに、精神遅滞のみを主症状とする非症候群性XLMR(non-syndromic XLMR)では37遺伝子、精神遅滞以外に様々な臨床的特徴を持つ症候群性XLMR(syndromic XLMR)では72遺伝子が同定されてきた。また、最近では、常染色体に責任遺伝子を持つ精神遅滞の報告も増えている。²⁾

クレアチン/リン酸クレアチン系は、脳や筋における化学的エネルギーの細胞質貯蔵の緩衝系として働くが、クレアチン生合成や輸送の障害は脳内クレアチン欠乏をきたし、精神遅滞、言語発達遅滞、てんかんを引き起こし、脳内クレアチン欠乏症候群として、グアニジノ酢酸メチル基転移酵素(GAMT)欠損症、アルギニン・グ

リシンアミジノ基転移酵素 (AGAT) 欠損症、クレアチン輸送体 (CRT) 欠損症の3疾患が知られている。クレアチン欠乏症候群において臨床上重要な点は、クレアチンの早期投与により症状の改善が期待される、治療可能な精神遅滞症候群である点である。また、特に、X連鎖精神遅滞の一つとして知られる、CRT欠損症は、欧米においては遺伝性精神遅滞の中で最も頻度が高い (全人口の 1/1000-2500) 脆弱X症候群と同等の頻度と報告され、非症候群性X連鎖精神遅滞の男性の5.4-2.1%、あるいは精神遅滞男性の2.2%と推定されている。日本においては、クレアチン欠乏症候群の症例報告は見当たらず、診断されていない症例が少なくないと考えられる。

本研究では、クレアチン代謝異常の早期診断のためのスクリーニング法の開発、臨床および分子遺伝的診断システムの確立、および治療法の開発を目指し、クレアチン代謝異常症の簡便なスクリーニング法として、弱酸性陽イオン交換カラムおよび弱酸性のリン酸水溶液を用いたクロマトグラフィーによる、尿中クレアチン、クレアチニン、グアニジノ酢酸の簡便な検出方法を開発した⁴⁾ [特許出願2011-19561]。

また、本法を用いて、尿中クレアチン、クレアチニン、グアニジノ酢酸を測定し、年齢別の正常値の設定、および、クレアチン代謝異常症の検出を試みた。なお、本研究は、既に当センター倫理委員会において承認されている。

B. 方法

弱酸性陽イオン交換カラムおよび弱酸性のリン酸水溶液を用いたクロマトグラフィーによる、尿中クレアチン、クレアチニン、グアニジノ酢酸の簡便な検出方法を開発した。この方法は、尿 500 μ l で解析することが可能であり、また、従来の分析方法と比較しても、検出感度をあげるために特殊な試薬と反応 (誘導体化) させる必要がなく、経済性および簡便性において有用である。[Wada T, et al. Amino Acids, 2011]

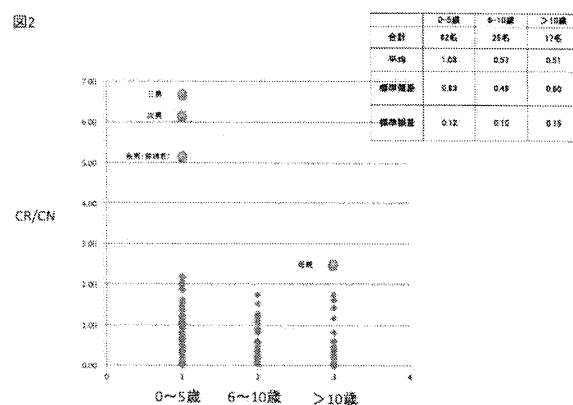
B. 対象

当センター神経内科外来を受診した患者の尿検体 500 μ l をもちいて、尿中クレアチン、クレアチニン、グアニジノ酢酸を測定した。対象患者数は、0~5才 62名、6~10才 25名、10~才 17名、合計 104名である。

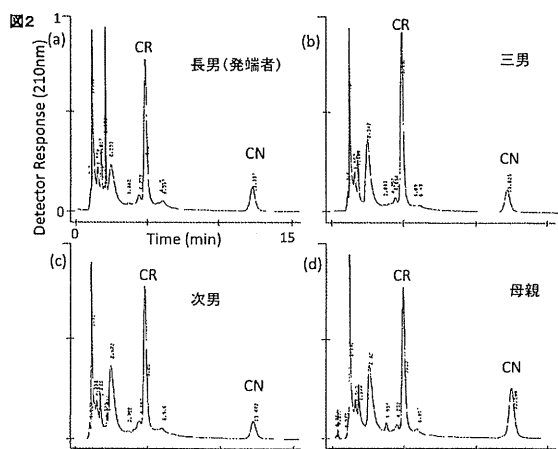
D. 結果

(1) 尿中クレアチン/クレアチニン

(CR/CN) 比は、0~5才、6~10才、10才~の3つの年齢層において、それぞれ平均値±標準偏差、1.03±0.93、0.57±0.49、0.51±0.60を得た。(図1)



(3) 男3兄弟が中等度の精神遅滞、てんかん、言語発達遅滞を、母親が軽度の発達遅滞を呈し、X連鎖性精神遅滞が疑われた家系の解析を行い、発端者において尿中 CR/CN 比が高値を示した。(図1および2) 本症例はクレアチン欠乏症候群の中のクレアチントランスポーター異常症が疑われたため、発端者の脳 MRS (脳基底核で解析) を行ったところ、クレアチンピークが低下し、脳クレアチン欠乏症が疑われ、*SLC6A8* 遺伝子解析を行ったところ、変異が検出され、分子遺伝学的に確定診断された。他の同胞2人及び母親においても尿中 CR/CN 比が高値を示し (図1および2)、分子遺伝学的にも同一の変異が検出された。



E. 考察

精神遅滞の原因が次第に明らかにされ、その一部に脳クレアチン欠乏症候群のような代謝性疾患が含まれているため、早期の治療介入のためにも、スクリーニング方法の開発は極めて重要であり、我々は、クレアチン代謝異常症の簡便なスクリーニング法として、弱酸性陽イオン交換カラムおよび弱酸性のリン酸水溶液を用いたクロマトグラフィーによる、尿中クレアチン、クレアチニン、グアニジノ酢酸の簡便な検出方法を開発し、*in vivo* において、従来法に比較して、同等あるいはそれ以上の検出方法であることを確認した。³⁾

今回、当センター神経外来受診患者を対象として、新しいスクリーニング方法による、年齢別の尿中クレアチン、クレアチニン、グアニジノ酢酸の正常値の設定を試みたところ、既に広く利用されている Green Wood Genetics Center (USA) のデータ (CN/CR 比; 0~5 才 0.2-2.03、6~10 才 0.006-1.05、10 才~0.006-0.65) と比較すると、同様の傾向を示し、年齢とともに CR/CN 値が減少する傾向にあり、我々の開発した解析方法が有用であることが示されている。一方で、Green Wood Genetics Center の正常値の上限を超えている症例も存在し、日本人と欧米人の中で正常値に差があるのか、今後の解析が必要である。

また、本法において、様々な程度の発達遅滞あるいは発達障害を主訴とする当センター

神経内科外来患者 104 例中 1 例 (0.96%) で、CR/CN 比の異常高値が検出され、臨床症状および脳 MRS からクレアチントランスポーター異常症を疑い、SLC6A8 遺伝子解析において、変異を検出し分子遺伝学的に確定診断に至った。104 例の発達障害の程度は様々であり、今後、臨床症状による患者のふるい分けにより、より高率にクレアチン異常症を検出され、日本国内における本疾患の頻度は欧米と変わらない可能性がある。

脳内クレアチン欠乏症は、神経細胞内のクレアチンが欠乏することにより発症するため、クレアチンが合成できない AGAT 欠損症や GAMT 欠損症ではクレアチン投与が症状改善に有効であることが示されているが、クレアチントランスポーター異常症は、クレアチンを脳内に取り込む装置そのものの異常であるため、クレアチン投与は効果なく、現時点で有効な治療法はない。

来年度以降、患者の皮膚線維芽細胞を用いたクレアチントランスポーターのクレアチンの取り込み活性の測定、クレアチントランスポーター蛋白の細胞内分布 (ソーティング) 異常の解析を行うことにより、患者における病態を検討し、薬剤のスクリーニングによるクレアチントランスポーターの機能回復の治療法の選択を目指す。また、特定の医療機関における患者を対象とした尿スクリーニングを実施し、本診断方法の有用性や、クレアチン代謝異常症の頻度の検証、治療法の開発を検討していきたい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Wada T, Shimbo H, Osaka H. A simple screening method using ion chromatography for the

diagnosis of cerebral creatine deficiency syndromes. Amino Acids. 2011 [Epub ahead of print]

2. 学会発表

加藤秀一、和田敬仁、新保裕子、三宅芙美、奥田美津子、高野亨子、井合瑞江、山下純正、小坂仁、尿中クレアチン濃度測定により診断できたクレアチントランスポーター欠損症の一例、第54回日本小児神経学会（札幌）、2012年5月（予定）

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願 2011-19561 弱酸性陽イオン交換カラムを用いた生体アミンの検出.

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）
分担研究報告書

マイクロアレイ CGH による X 連鎖精神遅滞の分子細胞遺伝学的解析に関する研究

研究分担者 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

研究要旨

マイクロアレイ CGH によるゲノムコピー数異常症のスクリーニングを行い、ATR-X 症候群をはじめとした X 連鎖性精神遅滞症例の分子細胞遺伝学的解析を行った。256 例の発達遅滞例に 60k のオリゴアレイで解析を行い、1 例に MID1 遺伝子領域の約 300kb の欠失、1 例に Xp22.2-p22.13 領域の約 0.7Mb の重複を検出した。今回の解析で ATR-X 領域 (Xq21.1) に有意なゲノムコピー数変化は認められなかった。非症候群性精神遅滞症例に ATRX 遺伝子の変異例がまれに検出されることから、微細欠失も念頭に入れて、同症候群変異未検出例では、アレイ CGH 解析が適応となると考えられた。

共同研究者

富永牧子(同 遺伝科)

A. 研究目的

X 連鎖 α -サラセミア・精神遅滞症候群 (X-linked α -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、外性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 Xq21.1 にマップされる ATRX で、ATR-X 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。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。

ATR-X は X 連鎖性精神遅滞の代表的疾患であるが、この X 連鎖性精神遅滞の多くは、原因不明とされている。こうした症例の多くは孤発例であるために連鎖解析や家系分析は不可能であり、手掛かりに乏しい。しかし近年の分子細胞遺伝学的解析の進歩により多くの奇形症候群の病因が明らかにされつつある。特にマイクロアレイ

CGH の普及は奇形症候群責任遺伝子同定に大きく貢献している。具体的には、長く病因不明であった CHARGE 症候群はマイクロアレイ CGH 解析により微細なゲノム構造異常が検出されたことが手掛かりとなって責任遺伝子 CHD7 が明らかにされている (Vissers et al., 2004)。今回我々は、精神遅滞症例 256 例にアレイ CGH スクリーニングを行い、2 例に病因と推定される X 染色体上のゲノムコピー数変化を検出したのでまとめた。

B. 研究方法

対象は、神奈川県立こども医療センター受診歴のある 256 例の精神遅滞症例である。診断は臨床症状の組み合わせから臨床遺伝専門医でもある経験豊かな Dysmorphology の専門家 (臨床遺伝専門医)、あるいは小児神経専門医によってなされた。多くは染色体検査など遺伝学的検査がなされて染色体異常症を含めた既知の奇形症候群は臨床的に否定されている。

末梢血液リンパ球を用いた通常の染色体分析は、標準的方法によった。マイクロアレイ CGH は、Agilent 社製マイクロアレイシステムを用い、アレイは SurePrint G3 Human CGH Microarray kit 8x60K を用いた。解析手順は、Agilent 社による標準プロトコールに準じて進めた。得られたデータの解析は Agilent Genomic Workbench ソフトウェアを用いた。データは DLR spread 値 < 0.30 を採用し

た。比較対照 DNA は、Promega 社製 Female および Male genomic DNA を用いた。解析したゲノム DNA は、QIAamp DNA Blood Mini kit を用いて自動抽出機で末梢血液から抽出した。アレイ CGH で検出されたゲノムコピー数異常は、ISCN2009 に準じて記載した。参照ゲノムマップとして UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (hg19) Assembly を用いた。

(倫理面への配慮)

マイクロアレイ CGH による解析は、こども医療センター倫理審査において、研究課題「原因不明多発奇形精神遅滞症候群のゲノムワイドな病因解析」として平成 22 年 7 月 22 日に承認を得たものである。検査前に十分な説明を行い、文書により同意のもとで解析を行った。解析にあたっては、全ての個人情報とを潜在化した。

C, D. 研究結果と考察

1 例に MID1 遺伝子領域の約 300kb の欠失、1 例に Xp22.2-p22.13 領域の約 0.7Mb の重複を検出した。今回の解析で ATR-X 領域(Xq21.1)に有意なゲノムコピー数変化は認められなかった。

今回の解析では、ATR-X 領域(Xq13)に病因と考えられる有意なゲノムコピー数変化は検出されなかった。理由の一つに、今回の解析プラットフォームが 60K であり、ゲノムコピー数変化検出条件から 150kb 以下の CNV は検出が困難であることがあげられるかもしれない。発生頻度との関連も想定される。今後、さらに高密度アレイを用いた解析が必要と考えられる。

E. 結論

マイクロアレイ CGH を用いて、256 例のゲノムコピー数変化のスクリーニングを行ったが、ATR-X 症候群領域 Xq21 に臨床的意義のあるゲノムコピー数変化は検出されなかった。さらに症例の集積が必要と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kurosawa K, Enomoto K, Tominaga M, Furuya N, Sameshima K, Iai M, Take H, Shinkai M, Ishikawa H, Yamanaka M, Matsui M, Masuno

M. Spastic quadriplegia in Down syndrome with congenital duodenal stenosis/atresia.

Cong Anom 2012 (in press)

Kurosawa K, Masuno M, Kuroki Y. Trends in occurrence of twin births in Japan. Am J Med Genet Part A 2012;158A:75-77.

Soneda A, Teruya H, Furuya N, Yoshihashi H, Enomoto K, Ishikawa A, Matsui K, Kurosawa K. Proportion of malformations and genetic disorders among cases encountered at a high-care unit in a children's hospital. Eur J Pediatr 2012;171:301-305.

Tachibana Y, Aida N, Enomoto K, Iai M, Kurosawa K. A case of Sjögren-Larsson syndrome with minimal MR imaging findings facilitated by proton spectroscopy. Pediatr Radiol 2011 Jun 29. [Epub ahead of print]

Kurosawa K, Tanoshima-Takei M, Yamamoto T, Ishikawa H, Masuno M, Tanaka Y, Yamanaka M. Sirenomelia with a de novo balanced translocation 46,X,t(X;16)(p11.2;p12.3). Cong Anom (in press)

黒澤健司 確定診断とその進め方 遺伝子医学 MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」 福嶋義光編 メディカルドゥ p58-9, 2011.7 大阪

黒澤健司 先天奇形、先天奇形症候群、Dysmorphology 遺伝子医学 MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」 福嶋義光編 メディカルドゥ p76-9, 2011.7 大阪

黒澤健司 予想外の結果が得られた場合：次世代シーケンシング 遺伝子医学 MOOK 別冊「遺伝カウンセリングハンドブック」 福嶋義光編 メディカルドゥ p345-7, 2011.7 大阪

2. 学会発表

黒澤健司、石川亜貴、和田敬仁、小坂仁 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)の臨床応用 第 53 回日本小児神経学会 2011.5.26-27. 横浜

Kurosawa K, Enomoto K, Furuya N, Ishikawa A, Tominaga M, Wada T, Masuno M, Kuroki Y.

- Estimation of prevalence of malformation syndrome by population-based birth defects monitoring system in Japan. European Human Genetics Conference 2011. 2011.5.28-31. Amsterdam RAI, The Netherlands.
- 富永牧子、榎本啓典、石川亜貴、古谷憲孝、吉橋博史、黒澤健司 全サブテロメア MLPA 法による多発奇形/精神遅滞 (MCA/MR) の変異スクリーニング 第 114 回日本小児科学会 2011.8.12-14. 東京
- 黒澤健司、榎本啓典、古谷憲孝、石川亜貴、富永牧子、和田敬仁、升野光雄、黒木良和 先天異常モニタリング調査および遺伝外来受診例による先天奇形症候群発生頻度の推定 第 114 回日本小児科学会 2011.8.12-14. 東京
- 島貴史、榎本啓典、古谷憲孝、黒澤健司、竹内麻希、関藍 先天代謝異常症を明らかにした、横紋筋融解症を繰り返した染色体複雑構造異常の 1 例 第 114 回日本小児科学会 2011.8.12-14. 東京
- 石川亜貴、富永牧子、榎本啓典、古谷憲孝、上田秀明、康井制洋、黒澤健司 高分解融解曲線分析法 (HRM) による Marfan 症候群原因遺伝子 FBN1 変異スクリーニング
- 黒澤健司、塩味正栄、浜之上聡、永井淳一、齋藤敏幸、榎本啓典、富永牧子、古谷憲孝、升野光雄、気賀沢寿人 $\text{del}(1)(\text{p}22.3\text{p}22.1)$ により Diamond-Blackfan 症候群と好中球減少を呈した 1 女性例. 第 56 回日本人類遺伝学会 2011.11.9-12. 千葉
- 石川亜貴、田中藤樹、重富浩子、続晶子、黒澤健司 頭蓋骨早期癒合を呈した 7 番染色体短腕中間部欠失の女兒例. 第 56 回日本人類遺伝学会 2011.11.9-12. 千葉
- 榎本啓典、菅原祐之、富永牧子、古谷憲孝、安達昌功、水野誠司、山内泰子、升野光雄、近藤達郎、土井庄三郎、水谷修紀、黒澤健司 $3\text{q}22.3$ を含む染色体部分欠失に起因する BPES の臨床像. 第 56 回日本人類遺伝学会 2011.11.9-12. 千葉
- 黒澤健司、富永牧子、古谷憲孝、和田敬仁、小坂仁、室谷浩二 新しい染色体微細構造異常 - $15\text{q}24$ 欠失症候群の 1 男児例. 第 313 回日本小児科学会神奈川県地方会 2011.11.19. 横浜
- 黒澤健司 希少難病と小児病院遺伝科 公開シンポジウム・成果発表会「難治性疾患の克服に向けて」 2011.7.10. 東京
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

研究課題：「ATR-X（X連鎖 α 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」

精神遅滞の体系的遺伝学的診断法の開発に関する研究

研究要旨

精神遅滞の遺伝学的病因は多彩である。そのため、系統的な遺伝学的診断法の開発には、種々の遺伝学的解析方法を体系的に実施することが必須である。私たちは、精神遅滞の体系的遺伝学的診断法の開発を目的として、遺伝性精神遅滞のひとつであるアンジェルマン症候群をモデルとして、体系的遺伝学的診断を行った。アンジェルマン症候群は染色体異常、エピジェネティクス、単一遺伝子病としての側面を有し、解析には染色体検査、FISH法、MLPA、アレイCGH、DNAメチル化テスト、シーケンス法の組み合わせが求められる。この結果、体系的な遺伝学的診断法の有用性を示すことができた。

研究分担者

齋藤伸治（名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野）

A. 研究目的

精神遅滞の体系的遺伝学的診断法を開発することを目的として、遺伝性精神遅滞症候群のひとつであるアンジェルマン症候群（AS）をモデルとして、体系的な遺伝学的診断法の確立を検討した。ASは*UBE3A*遺伝子の機能喪失により引き起こされる症候群であり、重度精神遅滞、てんかん、失調様歩行、容易に引き起こされる笑いなどを特徴とする。*UBE3A*はゲノム刷り込み現象の対象となっており、中枢神経では母由来アレルのみが発現している。そのため、*UBE3A*の発現喪失には複数の遺伝学的要因が存在するので、体系的遺伝学的解析の良いモデルと考えられる。

B. 研究方法

臨床的にASが疑われた非欠失119例を対象とした。119例ではすでにD15S10座位のFISH法により、一般的な15q11-q13の欠失は否定されている。患者末梢血白血球からゲノムDNAを抽出して一連の遺伝学的実験を行った。

解析は、*SNRPN*プロモータ領域のDNAメチル化テストを実施し、メチル化の異常を認めた場合は15番染色体の複数の多型マーカーを用いた多型解析を行い、片親性ダイソミーと刷り込み変異を区別した。刷り込み変異例に対しては、責任領域である刷り込み中心（IC）の微細欠失の有無を定量PCR法にて検討した。メチル化の異常がない例に対しては、*UBE3A*遺伝子の翻訳領域を直接シーケンス法にて解析を行った。

これらの異常が認められなかった男性22例を対象として、*SLC9A6*遺伝子解析を追加した。また、追加解析に同意を得られた33例に対して、Affymetrix SNP 5.0アレイ解析を行い、染色体微細コピー数異常の有無を検討した。

（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および名古屋市立大学大学院医学研究科倫理審査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

DNAメチル化テストでは陽性17例、陰性102例であった。陽性17例は全例で両親検体を用いた多型解析ができた。その結果、15番染色体父性

片親性ダイソミーが9例、刷り込み変異が8例であった。8例全例に対して、ICの微細欠失を検討したところ、1例にのみ微細欠失を認め、7例では微細欠失はなく、エピ変異と判定した。DNAメチル化異常のなかった102例に対して *UBE3A* 変異解析を行った結果、30例に病因変異を同定した。

これらの異常が同定されなかった男性22例を対象とした *SLC9A6* 変異解析では1例に c.441delG (p.S147fs) 変異を同定した。33例を対象としたDNAアレイ解析では、10q11.21-q11.23 5.6Mb de novo 欠失1例と ring 18 モザイク (18q21.2-q23 29.12Mb, 18p11.32 1.5Mb del) 1例を同定した。

D. 考察

AS 非欠失 119 例を対象として系統的に遺伝学的診断を行った結果、遺伝学的に 47 例 (39.5%) を AS と確定診断することができた。内訳は片親性ダイソミー9例、刷り込み変異8例、*UBE3A* 変異30例であった。今回解析を行った例は非欠失のみである。AS 全体の70%は欠失例であり、この群は商業的に FISH 法にて診断が可能である。非欠失例は全体の30%を占めるが、その中で40%が確定診断できたこととなる。これは、全体の12%に相当するので、AS が疑われた患者の82%は遺伝学的に診断が可能と考えられる。従来から、ASの10-20%は遺伝学的診断が得られないとされていたことと良く一致すると思われる。このように、臨床的にASが疑われた場合の80%以上が確定診断することができ、また、遺伝学的群に分けることで、予後予測や遺伝性の有無を正確に伝えることが可能になる。したがって、体系的遺伝学的解析は臨床において極めて重要な位置を占めることが明らかになった。

一方、臨床的にASが疑われる例の10-20%は現在の方法では、確定診断ができない。今回、これらを対象として、ASと似た表現型をとることが報告されている *SLC9A6* の変異解析およびDNAアレイを用いた微細染色体コピー数解析を実施した。その結果、*SLC9A6* 変異1例、微細染色体コピー数異常2例を同定した。合わせた3例は解

析対象の10%程に過ぎず、多くは原因の同定ができなかった。しかし、臨床的にASが疑われた例のなかに、全く異なった遺伝病が含まれていることを示すことができた。このことは臨床診断の限界を示している。ASに限らず、その他の症候群でも同様の結果が報告されている。特に、非特異的な症状である精神遅滞ではこの傾向は顕著である。精神遅滞の原因となる遺伝学的要因は沢山あり、それぞれが占める割合は低い。従って、遺伝学的診断法の果たす役割は高いと指摘できる。

近年開発が目覚ましい、DNAアレイや次世代シーケンシング技術により、網羅的遺伝子解析は実用的なレベルに達してきている。精神遅滞に対しては、強力な診断ツールとして期待される。

E. 結論

ASをモデルとして体系的な遺伝学的診断を行い、その有効性を明らかにした。また、臨床診断には限界があり、遺伝的異質性が存在することを示した。精神遅滞のような非特異的な疾患に対しては、網羅的遺伝学的診断法の臨床応用が求められる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hayashi S, et al. 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* 56:110-124, 2011.
2. Sato K, et al. Genetic analysis of two Japanese families with progressive external ophthalmoplegia and parkinsonism. *J Neurol* 258:1327-1332, 2011.
3. Takahashi Y, et al. A loss-of-function mutation in the *SLC9A6* gene causes X-linked mental

retardation resembling Angelman syndrome.
Am J Med Genet Part B: Neuropsychiatric Genetics 156:799–807, 2011.

4. Tohyama J, et al. West Syndrome Associated with Mosaic Duplication of FOXP1 in a Patient with Maternal Uniparental Disomy of Chromosome 14. *Am J Med Genet Part A* 155A:2584-2588, 2011.
5. Sudo A, et al. Successful cochlear implantation in a patient with mitochondrial hearing loss and m.625G > A transition. *J Laryngol Otol* 125:1282-1285, 2011.
6. Hosoki K, et al. Hand-foot-genital syndrome with a 7p15 deletion demonstrates a clinically recognizable syndrome. *Pediatr Int* (in press)

2. 学会発表

1. 斉藤伸治、細木華奈、夏目淳、今井純好、中島翠、植田佑樹、朝比奈直子、白石秀明：5q31 微細欠失は乳児期の筋緊張低下と重度精神遅滞を示す新しい症候群である、第 53 回日本小児神経学会総会 平成 23 年 5 月 26-28 日（東京）
2. 高野亨子、小沢浩、稲田穰、上石晶子、有本潔、木実谷哲史、久保田雅也、斉藤伸治：Prader-Willi 症候群の摂食の改善について 第 53 回日本小児神経学会総会、平成 23 年 5

月 26-28 日（東京）

3. 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 56 回日本人類遺伝学会 平成 23 年 11 月 10-12 日（幕張）
4. HOSOKI K, OHTA T, NATSUME J, IMAI S, OKUMURA A, MATSUI T, HARADA N, SCAGLIA F, BACINO CA, NIKAWA N, SAITOH S. 5q31.3 microdeletion syndrome is a clinically discernible new syndrome characterized by severe neonatal hypotonia, feeding difficulties, respiratory distress, and severe developmental delay. 61th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Montreal, Canada, 10/12-15/2011

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。

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 α 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、バリエント1、バリエント2と名付けられている。本変異はバリエント1にのみ存在する。バリエント1は蛋白レベルではアイソフォーム a、バリエント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⁺/H⁺ 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

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 α 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

3D-FISH法を用いたATR-X症候群の病態解明に関する研究

分担研究者 田辺 秀之 総合研究大学院大学 准教授

研究要旨 ATR-X症候群の患者由来の培養繊維芽細胞を用いて、3D-FISH法により、1) ATRX遺伝子が存在するXq、2) α サラセミアを引き起こす原因となる α グロビン遺伝子が存在する16p、3) β グロビン遺伝子が存在する11p(対照)の3領域を対象として、空間的な相互作用に関する検討を行った。その結果、16pとXq染色体テリトリーの高頻度な隣接(chromosome kissing)が観察され、遺伝子空間配置の特性が健常者のものと異なることが示唆された。

A. 研究目的

ATR-X症候群の責任遺伝子はXq13.3に局在するATR遺伝子であり、 α サラセミア、精神遅滞などを特徴とした多彩な症状を呈することが知られている。これらはATRタンパク質のエピジェネティクス制御の破綻によって引き起こされているものと考えられているが、詳細は不明である。本分担研究では、本研究では、ATR-X症候群の発症における細胞核高次構造や染色体配置の関与を検討するために、3D-FISH法により次の3つの染色体腕特異的領域の空間配置の特性を調べた。

B. 研究方法

ATR-X症候群患者由来の培養繊維芽細胞及び健常人由来の培養繊維芽細胞を用いて、3次元構造を維持した細胞核の固定を行い、1) ATRX遺伝子が存在するXq、2) α サラセミアを引き起こす原因となる α グロビン遺伝子が存在する16p、3) β グロビン遺伝子が存在する11p(対照)の3領域を対象として、共焦点レーザースキャン顕微鏡により、画像スキャンを行って、両染色体テリトリーの相対核内配置解析を行った。

(倫理面への配慮) ATR-X症候群患者由来および対照としての健常人由来の培養繊維芽細胞の使用に際して、すでに個人情報の連結不可能匿名化がなされ、研究倫理上、品質管理上、ともに十分配慮されている。

C. 研究結果

ATR-X症候群患者由来細胞核ではXqと16p、及び11pと16pが高頻度に隣接(chromosome kissing)する現象が観察された(それぞれ34%、36%; 健常人では20%、18%)。

D. 考察

ATR-X遺伝子はクロマチンリモデリング因子であるATRタンパク質をコードしている。今回のデータは、ATR-X症候群の発症に染色体・遺伝子空間配置の破綻が関与している可能性が示唆された。

E. 結論

ATR-X症候群の患者由来の細胞核では、16pとXq染色体テリトリーのkissing現象が高頻度に観察された。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

田辺秀之、和田敬仁. ATR-X症候群患者由来細胞核における染色体テリトリーの核内配置解析. 第62回財団法人染色体学会(平塚市)、2011年11月

Hideyuki Tanabe and Takahito Wada. Chromosome kissing in association with the ATR-X syndrome. European Human Genetics Conference 2012, Nurnberg, 2012.6.23-26.

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 特になし