

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

わが国における X連鎖 α サラセミア・精神遅滞 (ATR-X) 症候群の診断基準・診療指針の作成及び医療・患者間の情報ネットワークの確立

分担研究課題： ATR-X の分子病態に関する研究 (1)

分担研究者 松本直通 横浜市立大学医学研究科遺伝学

研究要旨：X連鎖性 α サラセミア精神遅滞 (ATR-X) 症候群は精神遅滞、 α サラセミア、性分化異常を特徴とする精神遅滞症候群である。ATR-X 症候群の原因はクロマチン調節関連蛋白をコードする *ATRX* 遺伝子変異である。*ATRX* 変異はこれまでに 123 種類の報告があり多くは機能低下型である。ATR-X の完全機能喪失型変異は致死性であることが疑われている。本年度は自閉症を呈する男児を対象に *ATRX* の完全欠失の有無を探索し *ATRX* 領域の欠失を探索した。139 例の男児症例に於いて欠失は同定されなかった。*Atrx* の完全欠失はマウスでは致死性でありヒト症例に於いて欠失が同定されないことはヒトにおける *ATRX* の null 変異の同様の効果を支持する所見である。

A. 研究目的

X連鎖性 α サラセミア精神遅滞 (ATR-X) 症候群はクロマチン調節関連蛋白をコードする *ATRX* 遺伝子の異常が原因である (Gibbons et al., 1995)。臨床的に精神遅滞・サラセミア・性分化異常を呈する。Human Gene Mutation Database Professional に登録されている *ATRX* 変異は 123 種存在し、その多くは機能低下型 (hypomorph) 変異である。*ATRX* の完全欠失の報告はなく、部分欠失を 4 例で認めるのみである。DECIPHER データベースには *ATRX* 領域の欠失の登録はなく正常多型としての CNV も認めない。本年度はヒトにおける *ATRX* の完全な欠失症例の有無を検討するため、特に自閉症を呈する男児のスクリーニングを行うこととした。

B. 研究方法

①対象症例 自閉症を呈する男児??例を対象とした。

②Affymetrix 社 Cytogenetics Array 2.7M または Cytoscan HD によるゲノム解析 全ゲノムにわたり 270 万プローブを配置した Cytogenetics Array 2.7Mあるいは210万プローブを配置したCytoscan HD Array を用いて 139 例を対象に CNV 解析を行い *ATRX* 遺伝子の欠失の有無を検討した。異常が疑われる場合は他のプラットフォームアレー (NimbleGen 社 700K アレー等) 等で検証した。

C. 研究結果

139 例全例で Cytogenetics Array 2.7M あるいは Cytoscan HD の解析が終了した。専用解析ソフト ChAS を用いて *ATRX* 領域を描出させ全例で Copy Number 解析を行うも明らかな欠失および重複等は認めなかった。病的な CNV のデータベースである DECIPHER にも *ATRX* 領域異常例は登録が無く正常多型としての CNVs も見出せなかった。

D. 考察

これまで登録されている *ATRX* 変異のほとんどは機能低下型 (hypomorph) で、機能完全喪失型 (amorph/null) は致死性であることが疑われている。*Atrx* ノックアウトマウスが致死性であることもこれを支持する。本研究でも自閉症を有する男児 139 例で *ATRX* 領域の欠失例は無かった。世界中で array 解析が進行し数多くの症例登録を有する DECIPHER データベースにも登録のないこと、正常多型としての CNV を認めないこと、*ATRX* の null 変異が致死性であることの全てが *ATRX* null 変異の致死性と矛盾しない。

E. 結論

自閉症を呈する男児 139 例の解析で *ATRX* の完全欠失は同定されなかった。DECIPHER 登録のないこと、*ATRX*を含むCNVの報告もないこと、ノックアウトマウスが致死であることなどからヒトにおいて *ATRX* の完全機能喪失型変異は

致死的可能性が高いと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Okada I[#], Hamanoue H[#], ([#] denotes equal contribution) Terada K, Tohma T, Megarbane A, Chouery E, Abou-Ghoch J, Jalkh N, Cogulu O, Ozkinay F, Horie K, Takeda J, Furuichi T, Ikegawa S, Kiyomi Nishiyama K, Miyatake S, Nishimura A, Mizuguchi T, Niikawa N, Hirahara F, Kaname T, Yoshiura K-i, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Furukawa T, *Matsumoto N, *Saitu H. *SMOCl* is essential for ocular and limb development in humans and mice. *Am J Hum Genet* 88(1): 30-41, 2011

*Tohyama J, Kato M, N, Kawasaki S, Kawara H, Matsui T, Akasaka N, Ohashi T, Kobayashi Y, Matsumoto N. Dandy-Walker malformation associated with heterozygous *ZIC1* and *ZIC4* deletion: Report of a new patient. *Am J Med Genet* 155(1): 130-131, 2011

Furuichi T, Dai J, Cho T-J, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y, Baynam G, Nagai T, Miyake N, Matsumoto N, Ohashi H, Unger S, Superti-Furga A, Kim O-H, Nishimura G, *Ikegawa S. *CANT1* is also responsible for Desbuquois dysplasia, type 2 and Kim variant. *J Med Genet* 48(1): 32-37, 2011

*Saitu H, Hoshino H, Kato M, Nishiyama N, Okada I, Yoneda Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Kubota M, Hayasaka K, Matsumoto N. Paternal mosaicism of a *STXBPI* mutation in Ohtahara syndrome. *Clin Genet* 80 (5):484-488, 2011.

*Yano S, Bagheri A, Watanabe Y, Moseley K, Nishimura A, Matsumoto N, Baskin B, Ray PN. Familial Simpson-Golabi-Behmel syndrome: Studies of X-chromosome inactivation and clinical phenotypes in two female individuals with *GPC3* mutations. *Clin Genet* 80 (5): 466-471, 2011.

Nishimura-Tadaki A, Wada T, Bano G, Gough K, Warner J, Kosho T, Ando N, Hamanoue H, Sakakibara H, Nishimura G, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Wakui K, Saitu H, Fukushima Y, Hirahara F, *Matsumoto N. Breakpoint determination of X;autosome balanced translocations in four patients with premature ovarian failure. *J Hum Genet* 56(2) 156-160, 2011

Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, Nishina S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitu H, Miyake N, *Matsumoto N. A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty. *Am J Med Genet* 152(2): 409-414, 2011

*Tonoki H, Harada N, Shimokawa O, Yosozumi A, Monzaki K, Satoh K, Mika Kosaki R, Sato A, Matsumoto N, Iizuka S. Axenfeld-Rieger anomaly and Axenfeld-Rieger syndrome: clinical, molecular-cytogenetic, and DNA array analyses on three patients with chromosomal defects at 6p25. *Am J Med Genet Part A* 155 (12): 2925-2932

Tadaki H, Saitu H, Nishimura-Tadaki A, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Miyake N, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, *Matsumoto N. *De novo* 19q13.42

- duplications involving *NLRP* gene cluster in a patient with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *J Hum Genet* 56 (5): 343-347, 2011.
- *Miyake N, Yamashita S, Kurosawa K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Matsumoto N. A novel homozygous mutation of *DARS2* may cause a severe LBSL variant. *Clin Genet* 80(3): 293-296, 2011.
- Tadaki H, Saitsu H, Kanegane H, Miyake N, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Nishimura A, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, *Matsumoto N. Exonic deletion of *CASP10* in a patient presenting with systemic juvenile idiopathic arthritis, but not with autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIa. *Int J Immunogenet* 38 (4): 287-293, 2011
- Tsurusaki Y, Osaka H, Hamanoue H, Shimbo H, Tsuji M, Doi H, Saitsu H, *Matsumoto N, *Miyake N. Rapid detection of a mutation causing X-linked leukodystrophy by exome sequencing. *J Med Genet* 48 (9): 606-609, 2011.
- *Narumi Y, Shiihara T, Yoshihara H, Sakazume S, van der Knaape MS, Nishimura-Tadaki A, Matsumoto N, Fukushima Y. Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum (H-ABC) in an infant with Down syndrome. *Clin Dysmorphol* 20 (3): 166-167, 2011
- Dai J, Kim O-K, Cho T-J, Miyake N, Song H-R, Karasugi T, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y, Nagai T, Matsumoto N, Ohashi H, Kamatani N, Nishimura G, Furuichi T, Takahashi A, *Ikegawa S. A founder mutation of *CANT1* common in Korean and Japanese Desbuquois dysplasia. *J Hum Genet* 56(5): 398-400, 2011.
- *Saitsu H, Matsumoto N. Genetic commentary: *De novo* mutations in epilepsy. *Dev Med Child Neurol* 53 (9):806-807, 2011.
- Shimizu K, Okamoto N, Miyake N, Taira K, Sato Y, Matsuda K, Akimaru N, Ohashi H, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, *Kosho T. Delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase 1 deficient Ehlers-Danlos syndrome: Observation of two additional patients and comprehensive review of 20 reported patients. *Am J Med Genet* 155(8): 1949-1958, 2011
- *Saitsu H, Osaka H, Sugiyama S, Kurosawa K, Mizuguchi T, Nishiyama N, Nishimura A, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Harada N, Kato M, Matsumoto N. Early infantile epileptic encephalopathy associated with the disrupted gene encoding Slit-Robo Rho GTPase activating protein 2 (*SRGAP2*). *Am J Med Genet* 158A (1):199-205, 2011
- Tsurusaki Y, Okamoto N, Suzuki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Exome sequencing of two patients in a family with atypical X-linked leukodystrophy. *Clin Genet* 80 (2): 161-166, 2011
- Hannibal MC#, Buckingham KJ#, Ng SB#, (# denotes equal contribution) Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC, Cook J, Yoshiura KI, Matsumoto T, Matsumoto N, Miyake N, Tonoki H, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Ohashi H, Kurosawa K, Hou JW, Ohta T, Liang D, Sudo A, Morris CA, Banka S, Black GC, Clayton-Smith J, Nickerson DA, Zackai EH, Shaikh TH, Donnai D, Niikawa N, Shendure J, *Bamshad MJ. Spectrum of *MLL2* (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 155 (7): 1511-1516, 2011.

*Kosho T, Miyake N, Mizumoto S, Hatamochi A, Fukushima Y, Sugahara K, Matsumoto N. A response to: Loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 (D4ST1/*CHST14*) function represents the first dermatan sulfate biosynthesis defect, “Dermatan sulfate-deficient adducted thumb–clubfoot syndrome”. Which name is appropriate, “Adducted thumb–clubfoot syndrome” or “Ehlers–Danlos syndrome”? *Hum Mut* 32(12):1507-1509, 2011

Doi H, Yoshida K, T Yasuda, Fukuda M, Fukuda Y, Morita H, Ikeda S-i, Kato R, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Sakai H, Miyatake S, Shiina M, Nukina N, Koyano S, Tsuji S, Kuroiwa Y, *Matsumoto N. Exome sequencing reveals a homozygous *SYT14* mutation in adult-onset autosomal recessive spinocerebellar ataxia with psychomotor retardation. *Am J Hum Genet* 89(2):320-327, 2011.

Yoneda Y, Haginoya K, Arai H, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Osaka H, Kato M, Matsumoto N, *Saito H. *De novo* and inherited mutations in the gene encoding a type IV collagen $\alpha 2$ chain (*COL4A2*) cause porencephaly. *Am J Hum Genet* 90 (1):86-90, 2012

*Saito H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi J, Hamada K, Yamashita A, Shiina M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Doi H, Ogata K, Inoue K, *Matsumoto N. Mutations in *POLR3A* and *POLR3B* encoding RNA polymerase III subunits cause an autosomal recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Am J Hum Genet* 90 (1):86-90, 2012.

2. 学会発表

講演会「次世代シーケンサーを用いた最先端研究」・松本直通「次世代シーケンサーを用いたヒト疾患ゲノム解析法」(徳島・徳島大学医学部臨床第一講堂 8月26日)

第一回サイトジェノミクスセミナー・松本直通(特別講演)「次世代シーケンス法による疾患研究の最前線」(三菱化学メディエンス志村事業所・東京9月17日)

第46回産婦人科研究会(順天堂大学)松本直通(特別講演)「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析の現状」(順天堂大学医学部・東京9月20日)

第18回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会・松本直通(特別講演)「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析の現状」(佐賀大学医学部・佐賀10月1日)

日本人類遺伝学会第56回大会・松本直通「ヒト遺伝性疾患の原因解明を目指して」学会賞受賞講演(於・幕張メッセ11月11日)

日本人類遺伝学会第56回大会「次世代シーケンサーを用いたヒト疾患ゲノム解析法」松本直通(シンポジスト)シンポジウム11(超高速シーケンサーによる疾患ゲノム解析)(於・幕張メッセ11月12日)

国立精神・神経医療研究センターTMC棟/クラスター研究棟開棟記念講演会「遺伝性神経疾患のエクソーム解析」松本直通(招待講演)(国立精神・神経医療研究センター11月22日)

The 34th annual meeting of the molecular biology society of Japan・Next generation sequencing technology enables a large scale medical genomic research (symposium)「Disease genome analysis

using next generation sequencer」 Naomichi
Matsumoto (Invited speaker)(Dec 14, 2011 at
Yokohama, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2012-136 松本直通／鶴崎美徳／三宅紀子・
コフィンーシリス症候群の検出方法・平成 24
年 1 月 4 日

特願 2011-247457 才津浩智／松本直通・孔脳症お
よび周産期脳出血の検出方法・平成 23 年 11
月 11 日

特願 2011-226488・才津浩智／松本直通・び慢性
大脳白質形成不全症の検出方法・平成 23 年
10 月 14 日

特願 2011-136277・松本直通／土井宏・常染色体
劣性遺伝性脊髄小脳変性症の検出方法・横浜
市立大学・平成 23 年 6 月 20 日

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 症候群の分子病態に関する研究（2）

分担研究者 松本直通 横浜市立大学医学研究科遺伝学

研究要旨：X連鎖性 α サラセミア精神遅滞（ATR-X）症候群に伴う精神遅滞、 α サラセミア、性分化異常のいずれかの発症機構を明らかにする事を目的とした。ATR-X 症候群はクロマチン調節関連蛋白をコードする *ATRX* 遺伝子変異とそれに伴うゲノムメチル化異常がその発症に深く関わる事が示唆されている。本研究では市販のオリゴ DNA アレー（Agilent 社プロモーターアレー）を用い *ATRX* 変異が証明されている ATR-X 症例 12 例を対象にゲノムワイドにエピゲノム異常を検索した。ゲノムワイドなメチル化異常解析によって正常対照と異なるメチル化異常候補領域を十数カ所同定した。それぞれの候補領域を Bisulfate シーケンス法を用いて検証を行った。中でも *HOXA1* 領域に ATR-X 症例で低メチル～高メチルを呈するメチル化不安定領域を特定し、特に精神遅滞との関連性に於いて大変興味深い知見であると考えられた。

A. 研究目的

X連鎖性 α サラセミア精神遅滞（ATR-X）症候群はクロマチン調節関連蛋白をコードする *ATRX* 遺伝子の異常が原因である（Gibbons et al., 1995）。臨床的特徴として精神遅滞・サラセミア・性分化異常が知られているが、*ATRX* 変異がどうしてこれらの臨床症状を来す機序は全く不明である。一方、ATR-X 症候群患者細胞ではリボゾーマル DNA（rDNA）等の DNA メチル化異常が存在し（Gibbons et al., 2000）、ATR-X における関連症状の発症にゲノム DNA メチル化を含むエピゲノム異常が関与する可能性が示唆されている。本研究では *ATRX* 遺伝子異常が証明された ATR-X 症候群患者のゲノム DNA を用いて、網羅的な全ゲノム DNA メチル化スクリーニングを行い、ATR-X 症候群特異的なメチル化領域を決定しその領域に存在する症状特異的関連遺伝子の同定を目指す事を目的とする。

B. 研究方法

ATRX 変異が証明されている ATR-X 症例を対象に以下の方法で全ゲノムメチル化異常領域の探索を行う。

①Agilent 社 CpG によるエピゲノム解析 抗メチル化シトシン抗体を用いてクロマチン免疫沈降反応を行い、沈降したゲノム DNA を増幅してプローブを作製し、これをヒト CpG アレーにハイブリし、メチル化シトシンを有する領域をゲノムワイドに特定する（いわゆる ChiP on chip による MeDIP 法で ATR-X12 例を対象）。別に、メチル化感受性制限酵素を用いて ATR-X 症例と正常例の両方をゲノム DNA を処理し、増幅後ラベルすることで ATR-X と正常ゲノムのメチル化異常部位を同じ CpG アレーで明らかにすることが可能である（メチル化感受性制限酵素をもちいた DMH法で ATR-X9 例を対象）。これらの2法を組み合わせ、ATR-X 症例ゲノムのメチル化異常部位をゲノムワイドに同定する。

②メチル化領域からの候補遺伝子群の同定 同定したメチル化異常 CpG アイランド候補領域の Bisulfite シーケンスを行いメチル化領域を観察しメチル化 CpG 領域に相当する遺伝子群のリストを作製する。

③ATR-X 症例の細胞で発現異常を示す遺伝子群の同定 メチル化異常をしめす CpG に関わる候補遺伝子のリンパ芽球における発現解析

を行う。

C. 研究結果

MeDIP 法と DMH 法で共通に検出される DNA メチル化異常領域は検出されなかった。よって MeDIP 法で検出された領域 7 カ所、DMH 法で検出された領域 5 カ所を選択しそれぞれ Bisulfite シーケンスを行いメチル化領域の観察を行い正常対照と比較検討し 2 カ所に於いて患者と正常とで明らかに異なるパターンを検出した。さらに 1 例に於いて *HOXA1* の CpG アイランドの高メチル化が観察されたため、ATR-X19 例、正常対照 9 例に於いて *HOXA1* の CpG アイランドのメチル化を観察した。すると正常対照では観察されない高メチル化 (80%以上) が 2 例、低メチル化 (20%以下) が 3 例とメチル化の多様性が観察された。症例由来の株化リンパ芽球での *HOXA1* 発現は、低レベルでの発現ながら高メチル化では高発現、低メチル化では低発現を示し DNA メチル化との相関が観察された。

D. 考察

HOXA1 変異は劣性型の変異で脳幹機能異常・内耳異常・心血管系異常・認識能力の異常を呈する他の症候群で変異が同定されている。この症候群ではサラセミア・性分化異常を認めないため、この症候群で認められた発達遅滞との何らかの関連性がある可能性がある。一方、MeDIP 法と DMH 法で同じ領域のメチル化異常が検出されなかったことで方法論的な問題が浮上した。用いたアレーは Agilent 社のプロモーターアレーであったがこのアレーはゲノムワイドな遺伝子領域の CpG アイランドやプロモーター領域をターゲットとしている。このため rDNA やその他のゲノム領域は検査対象となっておらず重要なメチル化異常を見落としている可能性がある。

E. 結論

ATR-X 症例を対象にプロモーターアレーを用いてゲノムワイドメチル化 DNA 異常スクリーニングを行い複数の領域でメチル化異常を検出した。*HOXA1* の CpG アイランドで ATR-X のメチル化に正常で観察されないばらつきが観察され、これが ATR-X の精神遅滞と何らかの関連がある可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hamanoue H, Rahayuningsih SE, Hirahara Y, Itoh J, Yokoyama U, Mizuguchi T, Saito H, Hirahara F, Matsumoto N. Gene screening of 104 patients with congenital heart disease revealed a fresh *GATA4* mutation in atrial septal defect. *Cardiol Young* 19: 482-485, 2009.

Shiihara T, Maruyama K-i, Yamada Y, Nishimura A, Matsumoto N, Kato M, Sakazume S. A case of Baraitser-Winter syndrome with unusual brain MRI findings of pachygyria, subcortical band heterotopia and periventricular heterotopias. *Brain Dev* (in press).

Kasuga K, Shimohata T, Nishimura A, Shiga A, Mizuguchi T, Tokunaga J, Ohno T, Miyashita A, Kuwano R, Matsumoto N, Onodera O, Nishizawa M, Ikeuchi T. Identification of Independent *APP* Locus Duplication in Japanese Patients with Early-Onset Alzheimer's Disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80(9): 1050-1052, 2009.

Yoshida K, Shimizu Y, Morita H, Okano T, Sakai H, Ohata T, Matsumoto N, Katsuya Nakamura K, Tazawa K-i, Ohara S, Tabata K, Inoue A, Sato S, Shimojima Y, Hattori T, Ushiyama M, Ikeda S-i. Severity and progression rate of cerebellar ataxia in 16q-linked autosomal dominant cerebellar

ataxia (16q-ADCA) in the endemic Nagano area of Japan. *Cerebellum* 8:46-51, 2009.

Hamanoue H, Megarbane A, Tohma T, Nishimura A, Mizuguchi T, Saitsu H, Sakai H, Miura S, Toda T, Miyake N, Niikawa N, Yoshiura K, Fumiki H, Matsumoto N. A locus for Ophthalmalmo-acromelic syndrome mapped to 10p11.23. *Am J Med Genet* 149A(3): 336-342, 2009.

Kuniba H, Yoshiura KI, Kondoh T, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Kaname T, Naritomi K, Matsumoto T, Moriuchi H, Kishino T, Kinoshita A, Miyake N, Matsumoto N, Niikawa N. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. *J Hum Genet* 54(5): 304-309, 2009

Saitsu H, Kurosawa K, Kawara H, Eguchi M, Mizuguchi T, Harada N, Kaname T, Kano H, Miyake N, Toda T, Matsumoto N. Characterization of the complex 7q21.3 rearrangement in a patient with bilateral split foot malformation and hearing loss. *Am J Med Genet* 149A(6):1224-1230, 2009.

Matsumoto N. Gene analysis of Marfan syndrome. Proceedings of VIII annual international symposium on advances in understanding aortic diseases. 23-27, 2009

2. 学会発表

日本医学哲学・倫理学会総合部会例会（第175回）（1月10日、東京・上智大学）松本直通・ヒトゲノム解析研究に携わって（招待講演）

横浜市立大学先端医科学研究センター市民講

座（2月7日横浜・みなとみらいエクステンションセンター）松本直通・遺伝子の傷で起こる病気（講師）

北海道先進医療研究会（平成21年2月10日旭川医大）松本直通 疾患ゲノムをどう攻めるか（招待講演）

第56回広島てんかん懇話会（2月28日広島・ホテルチューリッヒ東方 2001）松本直通 「年齢依存性てんかん性脳症の最近の知見」（特別講演）

平成20年度厚生労働省科学研究費補助金ヒトゲノムテラーメード研究推進事業研究成果発表会・ヒトゲノムテラーメード研究の成果と今後（3月5日・東京 砂防会館別館）松本直通 「アレー戦略によるヒト疾患遺伝子の単離研究」

第44回遺伝医学研究会（東京女子医科大学）（6月5日・東京女子医科大学・早稲田大学連携生命科学研究教育施設）松本直通 「年齢依存性てんかんの最近の話題」（招聘講演）

第44回日本小児腎臓病学会学術集会（6月26日・一橋記念講堂・東京）松本直通 「疾患ゲノム解析の新戦略」（特別講演）

第26回グライコミクス研究会（7月30日・北海道大学先端生命科学研究院）松本直通 「疾患ゲノム解析の新戦略」 招聘講演

理研・医科研・先端研合同開催 2009 遺伝医学夏期集中セミナー（8月28日・東京大学医科学研究所）松本直通 「メンデル遺伝病のアプローチ」 講師

第51回日本小児神経学会関東地方会（9月19日横浜市開港記念会館）松本直通 「年齢依存性てんかん性脳症の最近の話題」

題」(特別講演)

先端医科学研究に関する倫理的・法的・社会的
課題についての調査研究(ゲノム・遺伝子
研究の実施に関わる諸問題についての調
査研究)の研究会(10月4日上智大学)
松本直通「疾病の遺伝学研究」(講師)

Asin Cytogenetics Community Workshop (by
Affymetrix Inc.) Naomichi Matsumoto.
Evaluation of Affymetrix® Cytogenetics
Whole-Genome Array Using Clinical Sample.
(Oct 24, 2009 at Honolulu, Hawaii, HI)
(invited lecture)

The International Symposium in the 9th Annual
Meeting of the East Asian Union of Human
Genetic Society (Nov 19, 2009, Soel, Korea)
Naomichi Matsumoto: *STXBPI* mutations in
severe infantile epilepsies with
suppression-burst pattern (oral
presentation).

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

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、ATR-X 症候群の鑑別として重要な X連鎖精神遅滞症候群の一つであるクリアチントランスポーター異常症の 1 家系を見いだした。さらに平成 23 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 遺伝子変異例を見いだしていた。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 23 年度は「精神遅滞バイオリソース」に 27 家系の新たな登録があり、合計 421 家系の登録を得た。

D. 考察

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。また、精神遅滞を呈する 3 兄弟を有する 1 家系において、分担研究者小坂らが開発したスクリーニング方法により、クレアチントランスポーター欠乏症と診断された。

E. 結論

平成 23 年度は「精神遅滞バイオリソース」に 27 家系の新たな登録があり、合計 421 家系の登録を得た。精神遅滞の研究において、このバイオリソースが有効に活用されることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Waga C, Okamoto N, Ondo Y, Fukumura-Kato R, Goto Y, Kohsaka S, Uchino S. Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development. *Psychiatr Genet.* 21(4): 208-211. 2011.

Honda S, Satomura S, Hayashi S, Imoto I, Toyama J, Okazaki H, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J, Japanese Mental Retardation Consortium. Concomitant microduplications of MECP2 and ATRX in male patients with severe mental retardation. *J Hum Genet advance online publication*, 1 December 2011; doi:10.1038/jhg.2011.131

2. 学会発表

Waga C, Okamoto N, Ondo Y, Fukumura-Kato R, Goto Y, Kohsaka S, Uchino S. Mutations in the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development. 12th ICHG/ 61st ASHG Meeting, Montreal, Canada, 10-11-15, 2011

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 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症候群における情報管理、倫理問題への対応に関する研究

研究分担者 福嶋義光 信州大学医学部 教授

X連鎖 α サラセミア・精神遅滞(ATR-X)症候群の診断基準・診療指針を作成するため、今年度はとくに、日本医学会が公表した「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」に適合するための要件を中心に検討した。本疾患においては、すでに発症している患者の診断を目的とした遺伝学的検査と患者の母親を対象とした保因者診断のために行われる遺伝学的検査との違いを明確にした上で、遺伝学的検査・診断を行う必要がある。

共同研究者

涌井 敬子(信州大学遺伝医学・予防医学講座)

A. 研究目的

本研究が円滑に進むように、適切な情報管理のあり方、および予想される倫理問題への対応について検討する。

B. 研究方法, C. 研究結果

前年度、X連鎖 α サラセミア・精神遅滞(ATR-X)症候群はX連鎖劣性遺伝病であるため、発症者の診断が、母親の保因者診断に結びつく可能性が高く、研究協力を求める際には、遺伝カウンセリングを十分に行うことは必須であることを指摘した。

今年度は、日本医学会が公表した「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」に適合するための要件を中心に検討した。このガイドラインの記載の中で、本研究に関する主な事項は次の通りである。

- ・ 遺伝学的検査・診断に関与する医師・医療者は、遺伝医学の系統的知識をもち、遺伝情報の特性に配慮した対応が求められる。

- ・ 遺伝学的検査・診断が行われる場面を 1) すでに発症している患者の診断を目的とする場合と 2) 患者ではない者を対象とした保因者診断・発症前診断・出生前診断を目的とする場合とに明確に分類する。1) の場合には、主治医が診療の流れの中で、臨床的有用性がある場合には、積極的に遺伝学的検査・診断の意義を説明し、患者からインフォームドコンセントを得た上で実施すべきである。一方、2) の場合には、事前に適切な遺伝カウンセリングを行

い、遺伝的問題の解決のための選択肢の一つとして実施する。

- ・ 患者の診断を目的として行われた遺伝学的検査の結果は、原則として、他の臨床検査の結果と同様に、患者の診療に関係する医療者が共有する情報として診療録に記載する。

- ・ 遺伝カウンセリングは、情報提供だけではなく、患者・被検者等の自律的選択が可能となるような心理的社会的支援が重要であることから、当該疾患の診療経験が豊富な医師と遺伝カウンセリングに習熟した者が協力し、チーム医療として実施する。

D. 考察

X連鎖 α サラセミア・精神遅滞(ATR-X)症候群の診断基準・診療指針を作成する際には、日本医学会のガイドラインに従い、関係する医師・医療者を対象とした教育・研修システムを構築することが必要である。日本人類遺伝学会と全国遺伝子医療部門連絡会議が作成した遺伝医学系統講義e-learningシステム(全国遺伝子医療部門連絡会議のHP<

<http://www.idenshiiryoubumon.org/>>から登録することにより、視聴可能)は、診療指針を作成する際、極めて有用教育ツールであると考えられる。

遺伝カウンセリングは、当該疾患の診療経験が豊富な医師と遺伝カウンセリングに習熟した者が協力し、チーム医療として実施するべきであることが、日本医学会ガイドラインに記載されていることから、本研究を推進し、早急にX連鎖 α サラセミア・精神遅滞(ATR-X)症候群の診断基準・診療指針を作成することが、多くの患者・家族の福音につながると考える。

E. 結論

本研究を実施する際には、関係者に対する十分な教育と研修を行うこと、および十分な遺伝カウンセリング体制が整えられていることが必須である。

F. 健康危険情報

本研究課題では健康危機に関わる問題は生じない。

G. 研究発表

1. 論文発表

福嶋義光（編集）：遺伝カウンセリングハンドブック．遺伝子医学MOOK別冊、メディカルビュー、東京、2011

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Osaka H, Takagi A, Tsuyusaki Y, Wada T, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Saitsu H, Salomons GS, Jakobs C, Aida N, Toshihiro S, Kuhara T, Matsumoto N.	Contiguous deletion of SLC6A8 and BAP31 in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness.	Mol Genet Metabo	106	43-47	2012
Shozo Honda, Shigeo Satomura, Shin Hayashi, Issei Imoto, Eiji Nakagawa, Yu-ichi Goto and Johji Inazawa and the Japanese Mental Retardation Consortium (including Wada T).	Concomitant microduplications of <i>MECP2</i> and <i>ATRX</i> in male patients with severe mental retardation	J Hum Genet	57	73-77	2012
Giardine B, and others, Wada T, others, Patrions GP	Systematic documentation and analysis of human genetic variation in hemoglobinopathies using the microattribution approach.	Nat Genet	43	295-301	2011
Wada T, Shimbo H, Osaka H.	A simple screening method using ion chromatography for the diagnosis of cerebral creatine deficiency syndromes.	Amino Acids		epub ahead of print	2011
和田敬仁	ATR-X症候群の分子遺伝学	医学のあゆみ	239	645-652	2011
和田敬仁	X連鎖性遺伝性疾患. 福嶋義光 (編) 遺伝カウンセリングハンドブック.	遺伝子医学MOOK別冊		92-95	2011
和田敬仁	X連鎖精神遅滞症候群	小児内科	41	281-284	2009
和田敬仁	ATR-X症候群とクロマチン構造変化	実験医学	27	2902-2909	2009
和田敬仁	X連鎖αサラセミア・精神遅滞症候群 (ATR-X症候群)	臨床病理	57	382-390	2009

IV. 班構成員名簿

「わが国におけるX連鎖 α サラセミア・精神遅滞(ATR-X)症候群の診断基準・
診療指針の作成および医療・患者間の情報ネットワークの確立」研究班

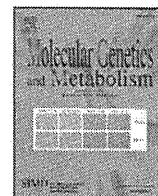
区 分	氏 名	所 属 等	職 名
研 究 代 表 者	和田敬仁	神奈川県立こども医療センター 神経内科	医 長
研 究 分 担 者	岡本伸彦	大阪府立母子保健総合医療センター 遺伝診療科	科長
	小坂仁	神奈川県立こども医療センター 神経内科	部長
	黒澤健司	神奈川県立こども医療センター 遺伝科	科長
	後藤雄一	国立精神・神経医療研究センター	部長
	斉藤伸治	名古屋市立大学大学院医学研究科 新生児・小児医学	教授
	田辺秀之	総合研究大学院大学先端科学研究科	准教授
	福島義光	信州大学医学部遺伝医学・予防医学講座	教授
	松本直通	横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学	教授

V. 研究成果の刊行物・別刷



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymgme

Contiguous deletion of *SLC6A8* and *BAP31* in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness

Hitoshi Osaka^{a,*}, Atsushi Takagi^a, Yu Tsuyusaki^a, Takahito Wada^a, Mizue Iai^a, Sumimasa Yamashita^a, Hiroko Shimbo^a, Hiroto Saito^c, Gajja S. Salomons^d, Cornelis Jakobs^d, Noriko Aida^b, Shinka Toshihiro^e, Tomiko Kuhara^e, Naomichi Matsumoto^c

^a Division of Neurology, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan

^b Division of Radiology, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama, Japan

^c Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, Yokohama, Japan

^d Metabolic Unit, Department of Clinical Chemistry, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

^e Division of Human Genetics, Medical Research Institute, Kanazawa Medical University, Uchinada, Ishikawa, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2012

Received in revised form 25 February 2012

Accepted 25 February 2012

Available online 5 March 2012

Keywords:

ATP-binding cassette, sub-family D, member 1 (ABCD1)

B-cell receptor-associated protein (BAP31)

Solute carrier family 6, member 8 (SLC6A8)

Xq28 deletion syndrome

ABSTRACT

We report here a 6-year-old boy exhibiting severe dystonia, profound intellectual and developmental disability with liver disease, and sensorineural deafness. A deficient creatine peak in brain ¹H-MR spectroscopy and high ratio of creatine/creatinine concentration in his urine lead us to suspect a creatine transporter (solute carrier family 6, member 8; SLC6A8) deficiency, which was confirmed by the inability to take up creatine into fibroblasts. We found a large ~19 kb deletion encompassing exons 5–13 of *SLC6A8* and exons 5–8 of the B-cell receptor-associated protein (*BAP31*) gene. This case is the first report in which the *SLC6A8* and *BAP31* genes are both deleted. The phenotype of *BAP31* mutations has been reported only as a part of Xq28 deletion syndrome or contiguous ATP-binding cassette, sub-family D, member 1 (*ABCD1*)/DXS1375E (*BAP31*) deletion syndrome [MIM ID #300475], where liver dysfunction and sensorineural deafness have been suggested to be attributed to the loss of function of *BAP31*. Our case supports the idea that the loss of *BAP31* is related to liver dysfunction and hearing loss.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The creatine (Cr)-creatine phosphate system provides for the storage and fast release of phosphate-bound energy to the muscle and brain. The recent elucidation of congenital genetic diseases supports the vital role of this system in the brain [1]. As such, cerebral Cr deficiency syndrome (CCDS) consists of 3 genetic defects in either L-arginine:glycine amidinotransferase (AGAT), guanidinoacetate methyltransferase (GAMT), or Cr transporter 1 [1]. To date, 9 cases from 4 families with AGAT deficiency (OMIM #612718) and ~40 cases with GAMT-related CCDS (OMIM #601240) have been reported [2]. The solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8 (*SLC6A8*) maps to Xq28 and encodes Cr transporter 1, which is ubiquitously expressed in human tissues and allows Cr uptake into cells [3]. *SLC6A8* deficiency (OMIM #300352) is the most frequent cause of CCDS and reported to constitute ~1–5% of X-linked intellectual disabilities [4–11]. To date, 43 mutations from 44 unrelated families have been

reported, including nonsense, missense, and splice-site mutations, single-amino acid deletions, and one large genomic deletion [6,12–15].

The phenotype of *SLC6A8* deficiency ranges from mild intellectual disability and speech delay to severe intellectual disability, seizures, and behavioral disorders. The precise pathophysiology of *SLC6A8* deficiency remains largely unknown; however, the severe phenotype associated with the large genomic deletion implies that the complete loss of *SLC6A8* correlates with severe phenotype. We report here another case of *SLC6A8* deficiency syndrome with a large genomic deletion of ~19 kb that encompasses exons 5–13 of *SLC6A8* and exons 5–8 of the B-cell receptor-associated protein (*BAP31*) gene, situating tail-to-tail. As far as we know, this is the first case report with a deletion of both the *SLC6A8* and *BAP31* genes. The phenotype of the *BAP31* mutations has only been reported as part of Xq28 deletion syndrome or contiguous ATP-binding cassette, sub-family D, member 1 (*ABCD1*)/DXS1375E (*BAP31*) deletion syndrome (CADD5; MIM ID #300475) [16]. Patients with CADD5 manifest with leukodystrophy due to an *ABCD1* mutation. Moreover, liver dysfunction and sensorineural deafness reportedly accompany the adrenoleukodystrophy (ALD) phenotype, implicating its attribution to the loss of function of *BAP31*. Our case supports the relationship between the loss of *BAP31* and liver dysfunction and hearing loss.

* Corresponding author at: Division of Neurology, Clinical Research Institute, Kanagawa Children's Medical Center, Mutsukawa 2-138-4, Minami-ku, Yokohama, 232-8555, Japan. Fax: +81 45 721 332.

E-mail address: hosaka@kcmc.jp (H. Osaka).

2. Materials and methods

2.1. Patient

This 6-year-old boy is the only child of his nonconsanguineous Japanese parents. He was born with a body weight of 2478 g without asphyxia at 37 weeks. He was noted to have poor weight gain at ~2 months. He exhibited hypertonus and athetosis at 4 months, and was referred to our neurology division for evaluation at 8 months. At first evaluation, he showed failure to thrive with a body weight of 6.0 kg (−2.7 SD) and height of 60.0 cm (−4.4 SD).

He showed no dysmorphic features and behavioral problems. He could not hold his head or follow an object with his eyes. His muscle tone was hypertonic and all extremities displayed exaggerated tendon reflexes and bilateral extensor plantar responses. Dystonia was also evident in his upper and lower extremities. Routine laboratory examinations revealed mild elevations of aminotransferase/alanine aminotransferase (AST/ALT) of ~100 IU/mL; however, there were no biochemical abnormalities in the levels of serum ammonia, lactate, and pyruvate, very long chain fatty acids, or arylsulfatase A. Nerve conduction velocities and electromyographic studies were all normal. No waves were identified by auditory evoked brain responses, even at a maximum stimulation intensity of 115 dB. Magnetic resonance imaging (MRI) revealed abnormal increased signals in the globus pallidi on T2-weighted images (Fig. 1A, upper left). Myelination delay, a decrease in the volume of cerebral white matter, and a very thin corpus callosum were also observed (Fig. 1A, lower left). At 4 years of age, he was admitted to our hospital due to status epilepticus with generalized tonic-clonic seizures lasting 1 h, which were controlled by intravenous diazepam. Electroencephalography showed frequent spikes and slow waves in central and mid-temporal areas. He was initiated with phenobarbital and no seizures have been noticed since then. MRI revealed the completion of myelination, persistent signal abnormalities in the globus pallidi, and the progression of cerebellar vermian atrophy (Fig. 1A, right panels). A deficient Cr peak in ¹H-magnetic resonance spectroscopy (MRS) (Fig. 1B) and high ratio of creatine/creatinine concentration in urine 4.73 mmol/mmol (normal range; 0.0075–1.51) led us to suspect SLC6A8 deficiency [17]. Now he is still very small and showing severe dystonia at 6 years of ages.

He cannot hold his head and does not pursuit object. During upper respiratory infections, he showed increased levels of AST/ALT >10,000 IU/mL without cholestasis. These values returned to his baseline levels without any therapy after a few weeks.

2.2. Cr uptake in fibroblasts

Cr uptake was measured in total cell lysates in triplicate using gas chromatography–mass spectrometry with stable isotope-labeled Cr as the internal standard, as described by Rosenberg et al. [18]. Briefly, fibroblasts from the patient were cultured for 24 h in medium (HAM/F10 supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin) that contained physiological levels of Cr (25 mM). Cr was added to the medium and obtains final concentrations of 25 and 500 mM [12].

2.3. Genomic DNA sequencing, RT-PCR, and sequencing

Genomic DNA was prepared from the patient's white blood cells using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). PCR of all exons and exon–intron boundaries of the SLC6A8 gene was performed as previously described [10]. Subsequent sequencing analyses of the PCR fragments were performed with specific primers using the Ex Taq PCR Kit (version 1.0; Takara, Shiga, Japan) according to the manufacturer's instructions (Supplementary Table). PCR buffers were selected from the GC I, GC II, and EX buffers (Takara) (Supplementary Table). Total RNA was extracted from leukocytes using the TRIzol reagent and reverse transcribed with Prime Script Reverse Transcriptase (Takara, Shiga, Japan) using oligo(dT) primers. RT-PCR was performed using primers that covered from exon 2 to exon 13 according to the manufacturer's instructions (Supplementary Table). The PCR fragments were sequenced using the Big Dye Terminators Cycle Sequencing Kit (v1.1; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.4. Western blotting

Fibroblasts (~3.0 × 10⁵ cells) were harvested and lysed with 300 μL of SDS lysis buffer (100 mM Tris–HCl (pH 6.8), 2% SDS, 100 mM DTT, 20% sucrose). After boiling for 5 min, aliquots were

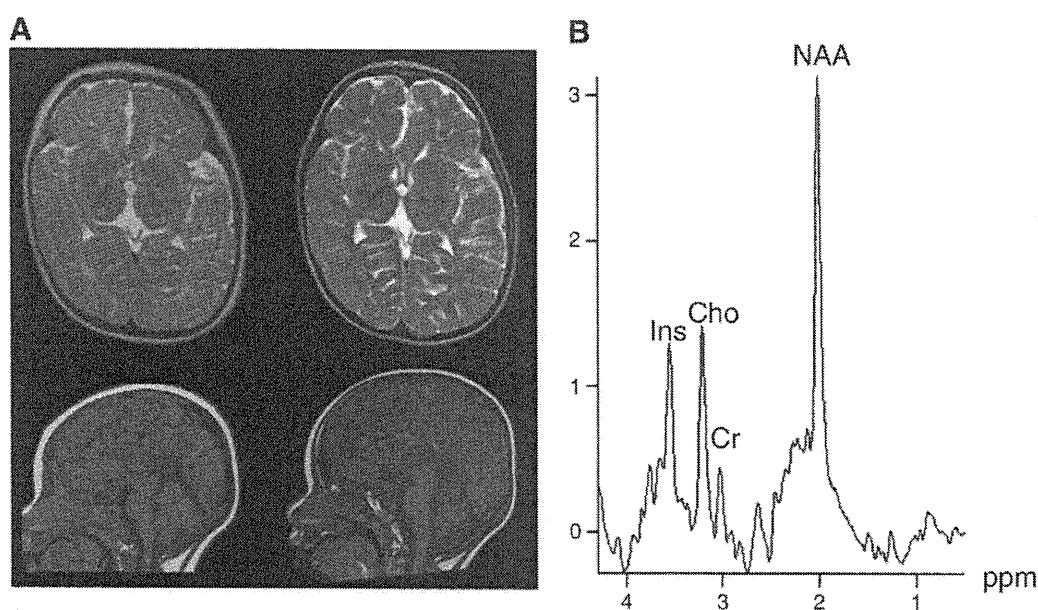


Fig. 1. MRI and MRS. T2-weighted axial image at 8 months shows an abnormal increased signal in the globus pallidi, myelination delay, and a decreased volume of cerebral white matter (A; upper left). T1-weighted sagittal image demonstrating a very thin corpus callosum (A; lower left). T2-weighted axial image (A; upper right) and T1-weighted sagittal image (A; lower right) at 4 years show persistent high signals in the globus pallidi, thin corpus callosum, and progression of cerebellar vermian atrophy. ¹H-MRS from the left basal ganglia at 4 years (B). MRS at 4 years shows a very low peak of Cr at 3.0 ppm (arrowhead).