

「毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と、病態評価に関する研究」

研究分担者 熊田 聡子

(財団法人東京都医学研究機構東京都立神経病院・小児神経学・医長)

研究要旨：AT の神経症状に対するステロイド(ベタメサゾン)少量療法の長期的効果を検討する臨床研究を計画し、開始した。ベタメタゾン 0.02mg/kg/日の内服を、14 日間投薬、14 日間休薬のサイクルで、4 年間繰り返す。神経症状は 2 つの評価尺度を用いて半定量的に評価し、ビデオ記録による比較検討も行う。同時に長期投与の安全性検証のため、免疫及び内分泌機能に対する影響を含む副作用の検討を行う。本年は AT 患者 2 例を登録し、1 例に治療を開始した。開始後 9 ヶ月までの観察期間中、神経症状の改善は見られなかったが、症状の進行を緩和させる可能性や不随意運動を軽減させる可能性が示唆され、さらに検討を要する。経過中明らかな有害事象は見られなかった。

A. 研究目的

毛細血管拡張性小脳失調症(AT)は、進行性の小脳失調をはじめとする神経症状に加え、免疫不全症、高頻度の腫瘍発生、内分泌異常症、毛細血管拡張症などの多臓器障害を生じる遺伝性疾患である。治療法は無く、神経症状についても、運動障害や嚥下障害に対するリハビリテーションが行われているのみである。多くの患者が 10 歳前後に車いす移動となり、その後も症状は進行し、日常生活動作(ADL)全般に介助を要するようになる。

最近イタリアの研究グループが、AT の小脳失調に対するステロイド(ベタメサゾン)少量療法の短期的な有効性を報告した。AT の神経変性には酸化ストレスの関与が推定されているので、抗炎症作用及び抗酸化作用を有するステロイドによる神経症状の改善は大いに期待できる。一方、ステロイドには免疫抑制作用や内分泌作用もあるので、これらの機能にも障害のある AT 患者への投与にあたっては、副作用に対する十分な検討が必要である。

研究班では本年より、AT 患者に対する少量ベタメサゾン長期投与の有効性と安全性を検討する臨床研究を開始した。

B. 研究方法

神経症状が比較的軽度で ADL が軽介助下保たれ、かつ、他の臓器の重篤な障害を認めない 20 歳未満の AT 患者を対象とした。本年は 11 歳男児と 8 歳女児を登録して治療前評価を行い、11 歳男児に対する投薬を開始している。

投与量はベタメタゾン 0.02mg/kg/日、1 日 1 回内服。14 日間投薬、14 日間休薬のサイクルを、4 年間の投薬期間中繰り返す。

治療効果判定と副作用の監視を目的として、治療開始前及び開始後 3 ヶ月毎に、神経学的所見の評価と採血検査を施行した。神経学的評価は次の 2 つの評価尺度を用いて半定量的に行った。

(1) Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA)：小脳失調の重症度評価のために国際的に用いられている尺度で、最高 40 点、得点が高いほど重症。

(2) A-T neuroexamination scale toolkit (AT NEST)：本研究分担者も所属する AT に関する国際委員会が 2010 年に作成した尺度で、小脳失調の他、眼球運動障害、構音障害、不随意運動、筋力、末梢神経障害といった AT の神経症状を項目毎に評価する。最高 100 点、得点が低いほど重症。

評価尺度による点数化に加え、所見を経時的にビデオ記録し、比較検討した。

治療開始前及び開始後1年毎には、神経学的検査(頭部MRI・脳波・筋電図・嚥下検査・知能検査)と、さらに詳細な副作用の評価(網羅的ウイルス探索・内分泌負荷試験・骨量検査・眼科検診)を行う。またステロイド投与による酸化ストレスの変化を検討するため、1年毎に尿中酸化ストレスマーカーを測定する。

全観察期間は5年を予定している。

(倫理面への配慮)

本研究は、厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針あるいは疫学研究に関する倫理指針を遵守して実施する。被験者の選定においては人権保護の観点から適否を慎重に検討し、施行においては被験者の安全性を最重視し、機密保護に十分な配慮をする。研究実施計画書は、東京医科歯科大学治験等審査委員会の審査を受け、承認を得た。本研究に利益相反は存在しない。

C. 研究結果

治療を開始した11歳男児における現在まで9ヶ月の経過は下記の通りである。

1) 神経症状に対する改善効果

2つの神経学的評価スケールの得点は下表のように推移した。

	治療開始前	治療開始後		
		3ヶ月	6ヶ月	9ヶ月
SARA	22	21.5	21.5	23.5
AT NEST	55.5	53.5	54	51.5

AT NESTの項目別検討及びビデオによる所見の比較では、小脳失調の中で、体幹及び歩行失調の重症度が経過中増悪している。これに対して、頸部・体幹・上肢に見られる不随意運動(ミオクローヌス)の頻度には減少傾向があり、これは特に投薬期間中に明らかであった。眼球運動障害、構音障害、筋力、末梢神経障害には明らかな変化を認めなかった。

2) 有害事象

9ヶ月の経過中に、自覚的ならびに他覚的有害事象は見られなかった。臨床検査上も、免疫機能低下や、耐糖能異常・副腎機能低下などの内分泌的異常所見を認めなかつ

た。今後、治療開始1年後の詳細な免疫機能検査、骨量評価、内分泌負荷試験、眼科検診を施行する。

もう一人の登録者である8歳女児は、治療前評価を施行した後にATに伴う舌の悪性リンパ腫を生じたため本治療の開始を延期したが、その後抗腫瘍療法により悪性リンパ腫が寛解、本年10月より本治療を開始している。今後治療後の神経学的所見ならびに検査値を評価する。

D. 考察

ATでは、進行性小脳失調に加え、眼球運動障害、構音・嚥下障害、不随意運動症、末梢神経障害など、多様な神経症状を生じる。これらは、免疫不全症や高発癌性以上に、AT患者の生活の質を低下させ、生命予後を悪化させるので、治療法の開発が待たれている。2008-10年にかけて、イタリアのPignataらのグループが、ATの小脳失調に対するベタメサゾン少量療法の有効性を報告した。これは、AT患者6例に対して、ベタメサゾン0.01mg/kg/日及び0.03mg/kg/日をそれぞれ20日間投与し、投与前、投与終了直後、投与終了20日後の小脳失調の重症度をSARAを用いて比較したものである。両投与量いずれにおいても、投与終了直後にはSARAの改善が認められた。ただし、投与終了20日後にはSARAの再増悪傾向が示され、効果が一時的である可能性が示唆された。今回我々は、同治療の長期効果の評価を目的に臨床研究を開始した。評価尺度としてSARAに加えAT NESTを採用し、小脳失調以外の神経症状に対する効果も検討した。また、長期投与の安全性を検討するため、副作用の詳細な調査を行っている。

今回治療を開始した第1例では、9ヶ月の観察期間中、2つの評価尺度の得点は軽度ながら悪化した。項目別評価では、小脳失調の中の体幹及び歩行失調に悪化傾向が強かった。悪化の程度がATの自然経過と比較して軽度と言えるのか、すなわち、ステロイド投与が進行性疾患であるATの症状増悪を緩和させうるのか、については、さらに長期間の検討が必要である。一方、投薬期間中には不随意運動の減少が見られた。AT患者に見られる不随意運動は、振戦、舞踏運動、ミオクローヌス、バリズム、ジス

トニア、チックなど種々に表現され、その本態及び発現機序は未だ明らかでない。本例に見られた不随意運動は皮質下(大脳基底核や脳幹)由来のミオクローヌスと推定される。ステロイドが皮質下の興奮性にどのように作用するのか、これがATの神経学的予後を改善させうるのか、についても今後の検討が必要である。また、ATにおける酸化ストレスと神経変性の関係、これに対するステロイドの影響について検討するため、近日治療開始1年後の尿中酸化ストレスマーカーを測定する。

AT患者へのステロイド長期投与にあたっては、免疫及び内分泌機能などに対する副作用に十分な注意が必要である。本例では今までの経過中に明らかな副作用を認めないが、今後さらに長期の安全性を確認していく。

来年以降は、本年の2例に加え新たな症例の参加を促し、検討を進める予定である。

E. 結論

今回の症例では、ベタメサゾン少量療法によるAT神経症状の改善を示すことはできなかった。しかし、神経症状の進行を緩和させる可能性や不随意運動を減少させる可能性について、今後症例を増やして検討する価値がある。観察期間中、免疫・内分泌機能に対する影響を含み明らかな有害事象は認められず、本治療の安全性が示唆された。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

1. 上肢の動作時ミオクローヌスと体幹優位の同期性ミオクローヌスを来した2例. 京都立神経病院神経小児科 笠井恵美, 熊田聡子 他. 第5回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres. 2011

年10月6~8日 品川

H. 知的所有権の取得状況

(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

「毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と、病態評価に関する研究」

研究分担者 林 雅晴

(財団法人東京都医学総合研究所・脳発達/神経再生研究分野・プロジェクトリーダー)

研究要旨：毛細血管拡張性小脳失調症(A-T)の神経変性機序を解明することを目的に、A-T 2 剖検例の小脳と大脳基底核で DNA・脂質の酸化ストレスマーカーの表出を解析したところ、小脳皮質の顆粒細胞で脂質の酸化ストレスの亢進が疑われた。また、A-T での大脳基底核病変を明らかにするため、種々の機能マーカーに関する免疫染色を行ったところ、カテコールアミン合成系律速酵素の表出が障害されていた。さらに日本での A-T 家族会樹立に向けて A-T メーリングリストに所属する 3 家族が研究者と初めて会合を持った。

A. 研究目的

毛細血管拡張性小脳失調症(A-T)の神経変性機序を解明するとともに、患者家族会を設立し、神経症状に対する標準的評価法確立と新規治療法開発を目指す。昨年度、A-T 剖検例の小脳皮質病変を、GABA 系介在神経指標である glutamate decarboxylase とカルシウム結合蛋白に対する免疫組織化学染色(免疫染色)により再評価した。一般に A-T モデル動物の小脳変性では酸化ストレスの関与が推定されているが、ヒト脳では十分解析されていない。本年度は、剖検例の小脳と大脳基底核での酸化ストレスを検討した。一方、A-T 患者では、小脳失調に加えて、大脳基底核病変に起因する不随意運動がみられるが、ヒトの大脳基底核での詳細な免疫組織化学的検討は行われてこなかった。そこで A-T での大脳基底核病変の病態を明らかにするため、種々の神経・グリア細胞の機能マーカーに関する免疫染色を行った。さらに昨年度、立ち上げた A-T 患者のメーリングリスト(ML)を利用して、家族会設立を目指して、研究班活動の一環として、3 家族と研究者が初めて一堂に会した。

B. 研究方法

1) A-T 2 剖検例(9 歳女性、31 歳男性)神経系に著変を認めない年齢相当対照において、

小脳と大脳基底核の連続切片を作成、DNA・脂質の酸化ストレスマーカー 8-hydroxy-2'deoxyguanosine (8-OhdG)・4-hydroxy nonenal (4-HNE)、脳内の主たる抗酸化酵素である superoxide dismutase(SOD) (Cu/ZnSOD, MnSOD)に対する免疫染色を行い、視察的に評価した。

2) A-T 2 剖検例(19 歳女性、31 歳男性)の大脳基底核、視床の連続切片において、神経細胞・アストロサイト・ミクログリアのマーカーである MAP2・GFAP・CD68、カテコールアミン合成系律速酵素でドーパミン神経の指標である tyrosine hydroxylase (TH)、レンズ核介在神経の指標であるカルシウム結合蛋白(calbindin-D28K, parvalbumin)と dopamine receptor 2、大脳基底核の投射神経マーカーである calcineurin α 、大脳基底核の介在神経と淡蒼球内節・外節の機能マーカー substance P・methionine-enkephalin、さらには神経細胞内に凝集物を構成し成人の神経変性疾患で神経変性を惹起することが知られるリン酸化タウ、リン酸化 α -シヌクレイン、リン酸化 TDP43 に対する免疫染色を行った。

3) A-T ML に所属する 3 家族による東京ディズニーランド内サンルートプラザ東京での会合を企画した。

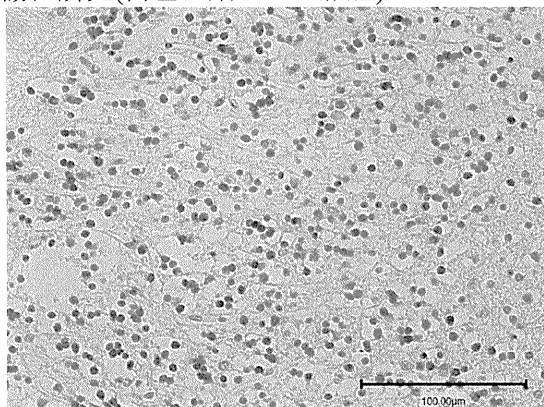
(倫理面への配慮)

剖検脳を用いた神経病理学的解析は、財団法人東京都医学総合研究所の倫理委員会の承認を得て行った。また、A-T 患者家族会関連の活動は個人情報保護に留意して進めた。

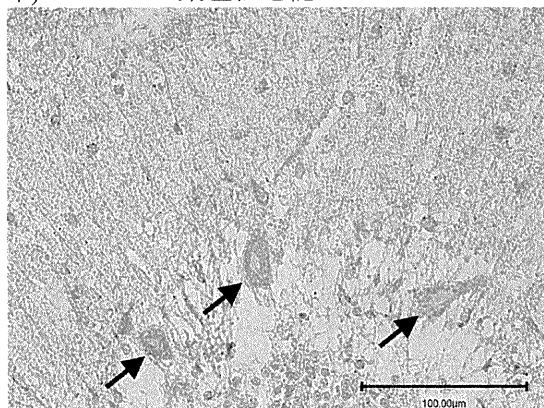
C. 研究結果

1) 酸化ストレスマーカーの免疫染色では、19 歳女性例の小脳皮質で一部の顆粒細胞胞体が脂質酸化ストレスマーカーの 4-HNE で濃染していた(図 1A)。一方、31 歳男性例の小脳皮質、両例の小脳歯状核、さらには両例の大脳基底核+視床に陽性所見を認めなかった。抗酸化酵素である Cu/ZnSOD・MnSOD に対する免疫染色では、両例ともに、小脳皮質の残存 Purkinje 細胞、小脳分子層・白質のグリア細胞に、対照と同様な陽性所見が確認された(図 1 B)。

図 1 小脳皮質の酸化ストレス関連染色
(A)19 歳女性例: 小脳皮質顆粒層の 4-HNE 陽性所見(褐色に染まった細胞)

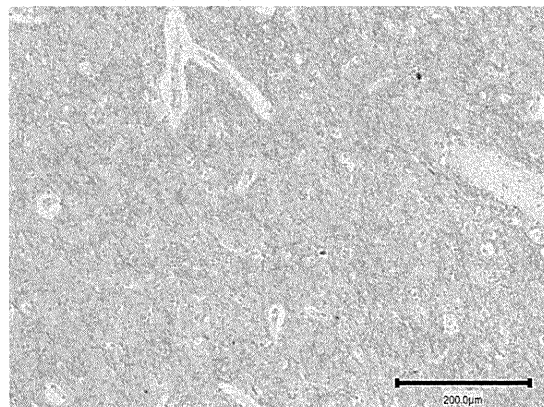


(B)31 歳男性例: 残存する Purkinje 細胞(矢印)で MnSOD 染色性を認めた

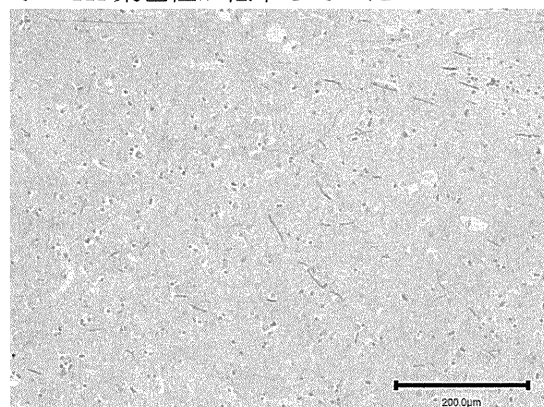


2) 大脳基底核、視床では、A-T 2 剖検例(19 歳女性、31 歳男性)ともに MAP2 陽性の神経細胞が保たれ、GFAP 陽性アストロサイトと CD68 陽性ミクログリアの増加を認めなかった。TH 染色では、19 歳女性例の線条体の神経線維・neuropil とレンズ核束、視床下部室傍核の神経細胞において、他染色では構造が保たれているにもかかわらず、染色性が低下していた(図 2)。介在神経指標のカルシウム結合蛋白と dopamine receptor 2、投射神経マーカー calcineurin α 、淡蒼球内節・外節の substance P・methionine-enkephalin の表出は、いずれも対照同様で、比較的保たれていた。さらに 3 種類のリン酸化蛋白の免疫染色では異常な凝集体を同定できなかった。

図 2 大脳基底核での免疫染色
(A)31 歳男性例: 被殻の神経線維・neuropil での TH 染色性が保たれていた



(B)19 歳女性例: 被殻の神経線維・neuropil での TH 染色性が低下していた



3) 2011年の夏休みを利用して、A-T MLに所属する3家族(患者、両親または母親、同胞)が、それぞれ長崎県、東京都(島部)、群馬県から東京ディズニーランドに集合し、8月27日、サンルートプラザ東京のレストランにおいて研究者を含め歓談した(いずれも初対面)。同集まりにおいて、「A-T患者家族の会」の名称として「シェアザハート(Share the Heart)」が提案され、今後、MLで議論を深めることとした。

D. 考察

1) A-T患者由来の細胞、モデル動物で酸化ストレスの亢進が報告されている。平成21年度の本研究班において、A-T同様にゲノム修復機構の遺伝的障害から小脳変性が生じるAT-like disorder同胞例の剖検脳で、DNA酸化ストレスがMre11欠損と相まって小脳変性を惹起することを明らかにした(Acta Neuropathol 2010; 119: 513-20)。今回、A-T 2剖検例のうち、19歳例の小脳皮質顆粒細胞で脂質の酸化ストレス亢進が疑われた。一方、脳内の主たる抗酸化酵素SODの表出は比較的保たれており、抗酸化システムの障害による酸化ストレス亢進は考えにくかった。今後、剖検例の数を増やして同様な解析を進めるとともに、今回、検討した小脳、大脳基底核、視床以外の部位についても酸化ストレスに関する免疫染色を行う。

2) A-T患者では以前より不随意運動などの錐体外路症状がしばしば認められることが知られており、剖検脳の大脳基底核において通常染色標本を用いて検討されてきたが、有意の変化を見出すことはできなかった。今回、2剖検例中の1例において、基底核機能で重要な役割をなすドーパミンを含むカテコールアミン合成系の律速酵素であるTHの表出が、他染色で構造が保たれているにもかかわらず、障害されていた。このようなTH染色性低下は、瀬川病など大脳基底核に神経細胞脱落を認めないジストニアで認められ、A-T患者にみられる不随意運動も大脳基底核の機能異常と関連している可能性が示唆された。一方、小脳皮質とは異なり、酸化ストレスの亢進、リン酸化蛋白の凝集は認められず、TH染色性低下の原

因は不明だった。酸化ストレス研究と同様に、今後、剖検例を増やして検討を進める必要性が示唆された。

3) A-T患者家族会の設立に向けて、昨年度はMLを整備し、本年度はMLを利用して、患者・家族による会合を初めて持つことができた。さらに家族会の名称に関して案が提案された。今後、毎年、同様な集まりを繰り返し持つことにより、家族に負担とならない形で、A-T患者家族会の設立を目指す予定である。

E. 結論

1) A-T 2剖検例中1例の小脳皮質顆粒細胞で脂質の酸化ストレスの亢進が疑われた。一方、抗酸化酵素SODの表出は比較的保たれていた。今後、剖検例の数を増やして同様な解析を進め、A-T患者由来細胞、モデル動物で確認されている酸化ストレスの小脳変性への関与を明らかにする。

2) A-T 2剖検例中1例の大脳基底核において、その機能に重要な役割をなすカテコールアミン合成系律速酵素 tyrosine hydroxylase の表出が障害され、臨床的な錐体外路症状との関連が示唆された。

3) A-T患者家族会の設立に向けて、MLを利用した患者・家族による会合を初めて持った。今後、集まりを繰り返すことにより、家族会の設立を目指す。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hayashi M, et al. Lesions of cortical GABAergic interneurons and acetylcholine neurons in xeroderma pigmentosum group A. *Brain Dev.* 2012 Apr; 34(4): 287-92.
2. Miyata R, Tanuma N, Hayashi M, Takahashi Y. Focal encephalopathy having recurrent episodes of epileptic status and cluster mimicking hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome. *Brain Dev.* 2012 May; 34(5): 360-3.

3. Hayashi M, et al. Brain vascular changes in Cockayne syndrome. *Neuropathology*. 2012 Apr; 32(2): 113-7.
 4. Tanaka R, Iwasaki N, Hayashi M, et al. Abnormal brain MRI signal in 18q⁻ syndrome not due to dysmyelination. *Brain Dev*. 2012 Mar; 34(3): 234-7.
 5. Nakajima K, Hayashi M, Tanuma N, Morio T. An autopsy case of polymicrogyria and intracerebral calcification dying the intracerebral hemorrhage. *Neuropathology*. 2012 Apr; 32(2): 207-10.
 6. Miyata R, Hayashi M, et al. Oxidative stress in mild encephalitis/ encephalopathy with a reversible splenial lesion (MERS). *Brain Dev*. 2012 Feb; 34(2): 124-7.
 7. Shioda M, Hayashi M, et al. Lesions in the central tegmental tract in autopsy cases of developmental brain disorders. *Brain Dev*. 2011 33(7): 541-7.
 8. Hayashi M, Miyata R, Tanuma N. Decrease in acetylcholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus in a patient with Prader-Willi syndrome. *Neuropathology*. 2011 31(3): 280-5.
 9. Saito T, Hayashi M, et al. Neocortical layer-formation of human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific marker expression. *Cerebral Cortex*. 2011 21(3): 588-96.
 10. 林雅晴. 色素性乾皮症の神経病変. *Visual Dermatology*. 2011 10(5): 456-8.
2. 林雅晴. こどもの脳の発達における環境因子と神経伝達物質代謝の影響. 東京都医学研開所記念シンポジウム. 2011年7月20日 東京
 3. Segawa M, Nomura Y, Hayashi M. An autopsy on 90 year old female of Segawa disease. 15th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. Jun 8, 2011. Toronto, Canada
 4. 林雅晴, 宮田理英, 田沼直之. 毛細血管拡張性運動失調症の小脳皮質病変. 第52回日本神経病理学会総会学術研究会. 2011年6月4日 京都
 5. 林雅晴, 宮田理英, 田沼直之. 色素性乾皮症におけるモノアミン神経病変に関する解析. 第53回日本小児神経学会総会. 2011年5月28日 横浜
 6. 大場大樹, 林雅晴 他. 進行性の小脳失調症とFanconi症候群を呈し診断のついていない1例. 第16回小児神経症例検討会(蔵王セミナー). 2011年2月11日 山形・上山
- H. 知的所有権の取得状況
(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
2. 学会発表
 1. 林雅晴. 大脳基底核疾患の画像と病理: 最近の話題. 第6回小児神経放射線研究会. 2011年10月29日 京都

「毛細血管拡張性小脳失調症の実態調査、早期診断法確立と、病態評価に関する研究」

研究分担者 金子 英雄

(独立行政法人国立病院機構長良医療センター・臨床研究部・部長)

研究要旨：毛細血管拡張性小脳失調症は進行性の小脳失調、毛細血管拡張、免疫不全を特徴とする遺伝性の疾患である。特徴的な症状がそろえば、临床上、比較的容易に診断される場合もあるが、非典型的な場合は診断に苦慮する場合も少なくない。そのような場合、病因遺伝子である *ATM* 遺伝子の変異が確定診断となる。しかし、PCR を基にした方法では、ヘテロに欠失または重複を有していた場合、検出できない。そこで、MLPA(Multiple Ligation Probe Amplification)法を用いて片方の allele の変異のみ検出されている A-T 患者とその両親の全エクソン領域の欠失または重複について検討した。対象とした A-T 患者と両親の *ATM* 遺伝子には欠失または重複が存在しないことが明らかになったが、今後、さらに多くの症例での検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

毛細血管拡張性小脳失調症は、*ATM* 遺伝子の変異による常染色体劣性の遺伝形式をとる疾患である。今までに、500 以上の遺伝子変異が報告されている。我々が、以前報告したように本邦 AT 患者に比較的共通する変異は存在するが、多くの変異は *ATM* 遺伝子の全域に、散在している。昨年度に、我々は、本邦の毛細血管拡張性小脳失調症 10 症例の *ATM* 遺伝子変異について報告した。その結果、片方のアレルの *ATM* 遺伝子変異しか検出できない症例が 10 症例中 5 症例存在していた。変異の解析は、一般的に PCR で増幅した DNA 断片を基にして、塩基配列を決定する。この方法では、片方の allele に、大きな欠失または重複が存在する場合検出できないという問題がある。近年、Multiple Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法とよばれる、標的とする遺伝子のプライマーをライゲースを用いて標識することで、エクソンの欠失や重複を検出する方法が進歩してきた。今回、我々は、臨床的には *ATM* と考えられる 1 症例につき、MLPA 法を用いて、*ATM* 遺伝子の欠失、重複の解析を行った。

B. 研究方法

PCR を基に塩基配列を決定したところ、片方のアレルには、cDNA 上は 7883del5、ゲノム上は、exon53 TTATA の 5bp の欠失 (Ensembl *ATM*-201:108203583-108203587) が存在した。もう片方の allele の変異は検出できなかった。

MLPA は、ファルコバイオシステムズ、SALSA®*ATM* P041、042 のキットを用いた。

(倫理面への配慮)

遺伝子変異に関しては「先天性免疫不全症の原因遺伝子同定および病態形成機序の解明」として、岐阜大学医学研究等倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

対象とした患者 GAT2 は表 1 に示すように、頸部のリンパ腫を合併した。比較的典型的な A-T の症状を示していた。IgA8.3mg/dl と低値を示し、ConA、PHA に対する反応性も低下していた。免疫不全の状態であり、AFP も高値を示し、毛細血管拡張性小脳失調症に合致する所見であった。

リンパ腫を合併したAtaxia-telangiectasia症例(GAT2)

症例 12歳 男児
主訴 頸部リンパ節腫脹
家族歴 特記すべきことなし
既往歴 在胎33週、2100gにて出生。周産期は特に異常は認められなかった。生後18ヶ月ごろまでは、正常範囲内の発達を示した。その後、動揺性歩行と言語発達遅延が出現。易感染も認められた。そのため、7歳時に精査が行われ、臨床症状、IgA、IgEの低値、リンパ球幼若化反応が低値であり、A-Tと診断された。
現病歴 平成6年11月(12歳2ヶ月時)ごろより、頸部リンパ節の腫脹に気づかれていたが、抗生剤投与などにより、縮小したため経過観察されていた。しかし、平成7年4月中旬から再び頸部リンパ節の増大が認められたため、同年4月25日精査目的で入院となった。
 身体所見 身長128cm(-3SD)、体重28kg(-1.7SD) 体温 36.5°C 脈拍 70/min。扁桃およびアデノイドの腫脹あり。両側眼球結膜の毛細血管拡張あり。頸部リンパ節: 左: 径2cmおよび1cmを2個触知。右: 1.5cmを1個触知。腋下および鼠径リンパ節触知せず。
 腹部平坦、軟。動揺歩行および企図振戦あり

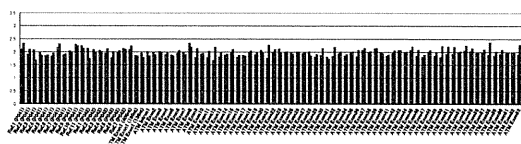
入院時検査所見

末梢血	RBC 534 X10 ⁶ / μl	T.bil 0.2 mg/dl	EB-VCA IgG X640
Hb 13.6 g/dl	AST 29 IU/ml	EB-VCA IgM X10未満	
Ht 42.3 %	ALT 20 IU/ml	EB-VCA IgA X10未満	
Plt 36.1 X10 ³ / μl	LDH 587 IU/L	EB-DR IgG X10	
WBC	Ca 4.2 mEq/L	EB-DR IgA X10未満	
Neutrophil 81.6 %	Amylase 191 IU/L	EB-EBNA X10未満	
Eosino 3.4 %	CPK 62 IU/L		
Baso 0.8 %	BS 81 mg/dl		
Mono 5.1 %	CRP 0.35 mg/dl		
Ly 8.4 %	ESR 11 mm/hr		
生化学	免疫		
Na 142 mEq/L	IgG 1155 mg/dl		
K 3.9 mEq/L	IgA 8.3 mg/dl		
Cl 100 mEq/L	IgM 318 mg/dl		
BUN 8.3 mg/dl	IgE 0.1 IU/L以下		
Cre 0.5 mg/dl	C3 112 mg/dl		
TP 7.2 g/dl	C4 30.6 mg/dl		
Alb 4.1 g/dl	PHA 12910 cpm		
	ConA 16995 cpm		
	CH50 38.6 U/ml		
	AFP 298.9 ng/dl		

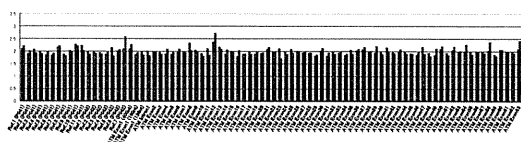
Gaシンチ 頸部および縦隔に異常集積像

そこで、MLPA 法により、*ATM* の全 63 エクソンにつき解析した。その結果、図 1 に示すように患者その父、母とも全エクソンが検出された。本患者、父、母ともに *ATM* の遺伝子欠失または重複は存在しないと考えられた。

GAT-2



GAT-2 父



GAT-2 母

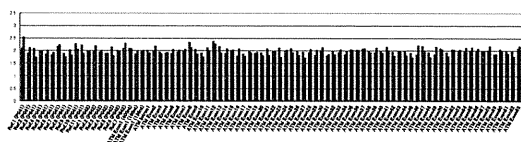


図 1 MLPA 法による *ATM* 遺伝子解析

D. 考察

毛細血管拡張性小脳失調症患者の *ATM* 遺伝子の欠失、重複について検討した。MLPA 法は、*ATM* 遺伝子の再構成に関して、早く、効果的に検出できる方法と考えられた。本患者では、*ATM* 遺伝子の欠失、重複は検出されず、本患者が毛細血管拡張性小脳失調症の表現型を示したこと、*ATM* 遺伝子変異との関連については、さらに検討が必要と考えられた。

MLPA 法の注意すべき点として、テンプレートとして用いる DNA の純度により、量的な解釈を誤る可能性が指摘されているが、今回の結果は、全エクソンとも明瞭に検出されており、本プロトコールで、欠失、重複について検出は可能と考えられた。また、MLPA 法では、逆位に関しては、検出できないが、その頻度は少ないと考えられる。

Cavalieri らは、21 人のイタリア人の毛細血管拡張性小脳失調症患者の *ATM* 遺伝子変異を解析し、4 人に欠失または重複があったと報告している。我々が報告した毛細血管拡張性小脳失調症患者の *ATM* 遺伝子が検出されていない症例の中に、欠失または重複を有する患者が存在すると考えられ、今後、さらに症例を増やして検討する予定である。

E. 結論

MLPA 法は毛細血管拡張性小脳失調症の病因遺伝子 *ATM* の欠失または重複を簡便に検出するのに有用であると考えられた。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kubota K, Yamamoto T, Matsui E, Teramoto T, Fukao T, Kasahara K, Kondo N. Structural property of soybean protein P34 and specific IgE response to recombinant P34 in patients with soybean allergy. *Int J Mol Med.* 2012 Feb; 29(2): 153-8.

- Ohnishi H, Miyata R, Suzuki T, Nose T, Kubota K, Kato Z, Kaneko H, Kondo N. A

- rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Feb; 129(2): 578-80.
3. Funato M, Fukao T, Sasai H, Hori T, Terazawa D, Kubota K, Ozeki M, Orii K, Kaneko H, Kondo N. Successful treatment of pediatric immune thrombocytopenic purpura associated with ulcerative colitis. *Pediatr Int*. 2011 Oct; 53(5): 771-3.
 4. Funato M, Kaneko H, Kubota K, Ozeki M, Kanda K, Orii K, Kato Z, Fukao T, Kondo N. Pediatric acute lymphoblastic leukemia mimicking Henoch-Schönlein purpura. *Pediatr Int*. 2011 Oct; 53(5): 766-8.
 5. Funato M, Kaneko H, Ohkusu K, Sasai H, Kubota K, Ohnishi H, Kato Z, Fukao T, Kondo N. Refractory chronic pleurisy caused by *Helicobacter equorum*-like bacterium in a patient with X-linked agammaglobulinemia. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep; 49(9): 3432-5.
 6. Kaneko H, Fukao T, Kasahara K, Yamada T, Kondo N. Augmented cell death with Bloom syndrome helicase deficiency. *Mol Med Report*. 2011 4(4):607-9.
 7. An Y, Ohnishi H, Matsui E, Funato M, Kato Z, Teramoto T, Kaneko H, Kimura T, Kubota K, Kasahara K, Kondo N. Genetic variations in MyD88 adaptor-like are associated with atopic dermatitis. *Int J Mol Med*. 2011 Jun; 27(6): 795-801.
 8. Morita H, Kaneko H, Ohnishi H, Kato Z, Kondo N. Antigen-specific immune response to endotoxin-free recombinant P34. *Allergy*. 2011 Jul; 66(7): 985-6.
2. 学会発表
 1. Kaneko H, Ohnishi H, Morita H, Yamamoto T, Kubota K, Teramoto T, Kato Z, Matsui E, Kato H, Nakano T, Kondo N. Development of enzymatically digested peptides for immunomodulation therapy in patients with cow's milk allergy. 16th Asia Pacific Association of Pediatric Allergy, Respiratory and Immunology. Fukuoka, Japan. Oct 28~30, 2011.
 2. Kaneko H, Ohnishi H, Funato M, Kondo N. Pathogenesis and clinical feature of primary antibody deficiencies. The 7th Congress of Asian Society for Pediatric Research. Denver, Colorado, USA. Apr. 30~May. 3, 2011.
- H. 知的所有権の取得状況
(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

IV. 研究成果に関する刊行の一覧表

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
Nakamura K, Du L, Tunuguntla R, Fike F, Cavalieri S, Morio T, Mizutani S, Brusco A, Gatti RA.	Functional characterization and targeted correction of ATM mutations identified in Japanese patients with ataxia-telangiectasia.	Hum Mutat.	33(1)	198-208	2012
Hayashi M, et al.	Lesions of cortical GABAergic interneurons and acetylcholine neurons in xeroderma pigmentosum group A.	Brain Dev	34(4)	287-92	2012
Hayashi M, et al.	Brain vascular changes in Cockayne syndrome.	Neuropathology	32(2)	113-7	2012
Atsumi Y, Fujimori H, Fukuda H, Inase A, Shinohe K, Yoshioka Y, Shikanai M, Ichijima Y, Unno J, Mizutani S, Tsuchiya N, Hippo Y, Nakagama H, Masutani M, Teraoka H, Yoshioka K.	Onset of quiescence following p53 mediated down-regulation of H2AX in normal cells.	PLoS One.	6(8)	e23432	2011
Kaneko H, Fukao T, Kasahara K, Yamada T, Kondo N.	Augmented cell death with Bloom syndrome helicase deficiency.	Mol Med Report.	4(4)	607-9	2011

V. 別刷

Functional Characterization and Targeted Correction of ATM Mutations Identified in Japanese Patients with Ataxia-Telangiectasia

Kotoka Nakamura,¹ Liutao Du,¹ Rashmi Tunuguntla,¹ Francesca Fike,¹ Simona Cavalieri,² Tomohiro Morio,³ Shuki Mizutani,³ Alfredo Brusco,² and Richard A. Gatti^{1,4*}

¹Department of Pathology and Laboratory Medicine, UCLA School of Medicine, Los Angeles, California; ²Department of Genetics, Biology and Biochemistry, University of Torino, Medical Genetics Unit, S. Giovanni Battista Hospital, Torino, Italy; ³Department of Pediatrics and Developmental Biology, Tokyo Medical and Dental University Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan; ⁴Department of Human Genetics, UCLA School of Medicine, Los Angeles, California

Communicated by Michel Goossens

Received 14 June 2011; accepted revised manuscript 15 September 2011.

Published online 17 October 2011 in Wiley Online Library (www.wiley.com/humanmutation). DOI: 10.1002/humu.21632

ABSTRACT: A recent challenge for investigators studying the progressive neurological disease ataxia-telangiectasia (A-T) is to identify mutations whose effects might be alleviated by mutation-targeted therapies. We studied ATM mutations in eight families of Japanese A-T patients (JPAT) and were able to identify all 16 mutations. The probands were compound heterozygotes in seven families, and one (JPAT2) was homozygous for a frameshift mutation. All mutations—four frameshift, two nonsense, four large genomic deletions, and six affecting splicing—were novel except for c.748C>T found in family JPAT6 and c.2639-384A>G found in family JPAT11/12. Using an established lymphoblastoid cell line (LCL) of patient JPAT11, ATM protein was restored to levels approaching wild type by exposure to an antisense morpholino oligonucleotide designed to correct a pseudoexon splicing mutation. In addition, in an LCL from patient JPAT8/9, a heterozygous carrier of a nonsense mutation, ATM levels could also be partially restored by exposure to readthrough compounds (RTCs): an aminoglycoside, G418, and a novel small molecule identified in our laboratory, RTC13. Taken together, our results suggest that screening and functional characterization of the various sorts of mutations affecting the ATM gene can lead to better identification of A-T patients who are most likely to benefit from rapidly developing mutation-targeted therapeutic technologies.

Hum Mutat 33:198–208, 2012. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: ataxia-telangiectasia; ATM; large genomic deletions; functional analysis of DNA variants; mutation-targeted therapy; Japanese ATM mutation

Introduction

Ataxia-telangiectasia (A-T; MIM# 208900) is an autosomal recessive neurodegenerative disorder characterized by progressive cerebellar degeneration, ocular apraxia and telangiectasia, increased cancer risk, immunodeficiency, sensitivity to ionizing radiation (IR), chromosomal instability, and cell cycle abnormalities [Boder and Sedgwick, 1958; Gatti, 2001]. A-T is caused by mutations in the ATM gene (MIM# 607585) that usually encodes a 13 kb transcript that produces a 370 kDa protein [Gatti et al., 1988; Lange et al., 1995; Savitsky et al., 1995]. Intranuclear ATM protein is low or absent in most A-T patients, despite the presence of relatively normal levels of ATM transcripts. ATM is activated by autophosphorylation after binding with the MRN (Mre11-Rad50-Nbs) complex at sites of DNA double strand breaks [Bakkenist and Kastan, 2003; Kozlov et al., 2006], and subsequently phosphorylates hundreds of downstream target proteins involved in cell cycle checkpoints, DNA repair, and apoptosis [Bolderson et al., 2009; Matsuoka et al., 2007; Shiloh 2006]. ATM also appears to play a critical role in resolving chronic inflammation [Westbrook and Schiestl, 2010].

A-T patients are usually compound heterozygotes, carrying two distinct mutations. Mutations occur throughout the entire gene without hot spots. Founder effects are commonly observed in many ethnic isolates [Birrell et al., 2005; Campbell et al., 2003; Cavalieri et al., 2006; Gilad et al., 1996a; Laake et al., 1998; McConville et al., 1996; Mitui et al., 2003, 2005; Telatar et al., 1998a, b] wherein patients often carry mutations in a homozygous state. We have previously shown [Du et al., 2007, 2009, 2011; Lai et al., 2004] that accurately analyzing the functional consequences of mutations in individual A-T patients enables the grouping of patients into “mutation categories” that are most likely to be corrected by future customized mutation-targeted therapies.

The aims of the present study were to: (1) characterize the ATM mutations in Japanese A-T (JPAT) families; and (2) identify which JPAT patients might be candidates for personalized mutation-targeted therapy. We report that three of eight JPAT families examined are potential candidates for mutation-targeted therapy based on partial restoration of functional ATM protein production.

Materials and Methods

Cell Lines

Lymphoblastoid cell lines (LCLs) [Svedmyr et al., 1975] or activated T-cells [Minegishi et al., 2006] were established from affected

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

*Correspondence to: Richard A. Gatti, Department of Pathology and Laboratory Medicine, UCLA School of Medicine, 675 Charles E. Young Drive South, Los Angeles, CA 90095-1732. E-mail: rgatti@mednet.ucla.edu

Contract grant sponsors: National Institutes of Health (1R01NS052528); A-T Ease Foundation; A-T Medical Research Foundation.

members of eight Japanese A-T families, including three sibling pairs (JPAT4/5, 8/9, and 11/12). The families came from different geographical regions. Clinical descriptions of patients from these families have been reported previously [Morio et al., 2009].

Short Tandem Repeat (STR) Haplotype Analysis

Standardized STR (short tandem repeat/microsatellite) genotyping for the *ATM* gene region was performed as previously described [Mitui et al., 2003]. Briefly, we used four fluorescently labeled microsatellite markers located within a 1.4 cM region of chromosome 11q22-q23: D11S1819, NS22, D11S2179, and D11S1818. Markers NS22 and D11S2179 are located within the *ATM* gene, in introns 45 and 62, respectively [Udar et al., 1999; Vanagaite et al., 1995]. Allelic sizes were detected with an ABI 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems Inc, Carlsbad, CA) and standardized to a reference sample (CEPH 1347-02).

Identification of Mutations

Total RNA was isolated from patient-derived T-cell lines using RNeasy (QIAGEN, Valencia, CA), and cDNA was synthesized using random primers and the Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The entire *ATM* coding region was divided into eight overlapping fragments (Regions 1–8) ranging from 1,500 to 1,800 bps [Du et al., 2008]. These regions were PCR amplified and then sequenced using 19 different primers. Mutations on the cDNA level were confirmed in genomic DNA (gDNA) by sequencing relevant exon and intron boundaries. Mutation analysis is based on the same *ATM* reference sequence used for *ATM* mutations in the Leiden Open Variation Database (www.LOVD.nl/ATM; NCBI reference sequence:NM_000051.3).

Maximum Entropy Scores and Search for Exonic Splicing Enhancers (ESEs)

The strength of the 5' and 3' splice sites (ss) was determined by calculating and comparing the wild-type and mutant 5' and 3' ss using the Maximum Entropy software available at http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html [Eng et al., 2004; Mitui et al., 2009; Yeo and Burge, 2004]. We scanned for putative binding motifs for serine/arginine-rich (SR) proteins using the ESEfinder software available at <http://rulai.cshl.edu/tools/ESE> [Cartegni et al., 2003; Smith et al., 2006].

Long-Range PCR and Breakpoint Regions for Genomic Deletions

To amplify large gDNA fragments, 500 ng of gDNA was used as template, followed by 35 cycles of 95°C for 1 min, 68°C for 10 min, and extension at 72°C for 15 min using EX Taq polymerase according to the manufacturer's protocol (Takara Bio Inc, Shiga, Japan). Fragments containing large genomic deletions (LGDs) were isolated from agarose gels and sequenced to determine the breakpoints.

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

A total of 100 ng of gDNA was used as starting material for the SALSA MLPA P041 and P042 *ATM* kits (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands, www.mrc-holland.com) [Schouten et al., 2002]. The P041 probe mix contained probes for 33 of the 65 exons as well as three probes for exon 1. The P042 *ATM* probe mix contained probes for the remaining *ATM* exons. Both probe mixtures also contained

probes for control genes. After hybridization, ligation, and amplification, according to the instructions of the manufacturer, 1 μ l of PCR product was mixed with 0.2 μ l of ROX-500 labeled internal size standard, separated on an ABI Prism 3100 Avant automatic sequencer (Applied Biosystems, Norwalk, Connecticut, CA), and analyzed using the GeneScan software ver.3.1. For MLPA data analysis, we used Coffalyser MLPA DAT software developed by MRC-Holland. For each probe, a range from 1 ± 0.2 was considered as a normal exon dosage, while a deletion was determined as being between 0.3 and 0.7.

Antisense Morpholino Oligonucleotide (AMO) Design and Treatment

A 25-mer antisense morpholino oligonucleotide (AMO) was designed to target the 5' aberrant splice site of a pseudoexon mutation in pre-mRNA of JPAT11/12. The AMO-J11 sequence was: CCTG-GAAAAATACTTACAATTAAAC. AMO748C (ATTACACACTC-GAATTTCGAAAGTT) and AMO4956GC (CTTGGATAACTGCAACAAATTGACA) were designed to target wild-type sequences to determine potential regulatory elements at the site of a mutation(s). AMOs were synthesized by Gene-Tools (Philomath, OR). Treatment of LCLs with AMOs was performed as previously described [Du et al., 2007]. Cells were suspended in 5% FBS/RPMI medium and the AMO was added directly to medium at the concentrations indicated. Endo-Porter (Gene-Tools) was added to the medium to assist in intracellular incorporation of the AMO. Cells were collected after 48 hr for RNA analysis, and after 84 hr for *ATM* protein detection. Vivo-AMO was also used to treat JPAT 11 to enhance cellular delivery (Gene-Tools).

Irradiation Induced *ATM*-Ser1981 Foci Formation (IRIF)

Immunostaining of nuclear foci of *ATM*-Ser1981 was performed as described [Du et al., 2007, 2009]. In brief, LCLs were first treated with the relevant compounds for 4 days before being irradiated with 2 Gy and then incubated at 37°C for 30 min. Next, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and then permeabilized on cover slips. The cover slips were blocked for 1 hr and incubated with mouse anti-*ATM* pSer1981 for 1 hr (1:500; Cell Signaling Technology, Danvers, MA). After a second blocking, cells were stained with Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (1:150; Invitrogen) for 1 hr and mounted onto slides.

Flow Cytometry Analysis of *ATM*-Ser1981 Autophosphorylation (FC-*ATM*-pSer1981)

FC-*ATM*-pSer1981 was used to verify the restoration of Ser1981 autophosphorylation by readthrough compounds (RTCs) [Du et al., 2009; Nahas et al., 2009]. The cells were treated for 4 days with RTCs, resuspended in PBS, and irradiated with 10 Gy. After 1 hr, the cells were fixed and permeabilized using FIX & PERM (Invitrogen). The cells were then incubated with 1 μ l of mouse *ATM*-s1981 antibody (Cell Signaling Technology) for 2 hr at room temperature. After this time, cells were washed and resuspended in 100- μ l PBS with Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (Invitrogen) for 45 min, and then washed and resuspended in PBS with 0.2% paraformaldehyde, before being analyzed using a FACSCalibur (BD, Franklin Lakes, NJ).

Western Blotting

Nuclear extracts were prepared by following the NE-PER protocol (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Proteins were separated

on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel. Western blots were prepared as described [Du et al., 2007], and probed with anti-ATM (Novus Biologicals, Littleton, CO), -SMC1, or -KAP1 antibodies (Novus Biologicals).

Results

Mutation Analysis

We initially screened our A-T patients for two previously reported Japanese mutations, c.4776(IVS33)+2T>A and c.7883_7887delTTATA [Ejima and Sasaki 1998; Fukao et al., 1998]. Neither of these mutations was detected.

STR genotyping of the *ATM* genomic region was performed for 11 JPAT patients, but since parental gDNAs were unavailable, we could only verify that one patient was homozygous for all markers (JPAT2): [S1819, 131; NS22, 165; S2179, 143; S1818, 162] [Mitui et al., 2003]. As a result, we set out to directly sequence the entire *ATM* coding region after PCR amplifying eight partially overlapping fragments from patients' cDNA [Du et al., 2008]. We identified 12 of the 16 expected mutations (75%) and confirmed them upon sequencing gDNA (Table 1). Only one patient (JPAT2) was homozygous, suggesting that most JPAT patients do not result from consanguineous marriages. The 12 mutations included four frameshifts (counting the homozygous JPAT2 twice), two nonsense, and six splice variants (Table 1). The remaining mutations (4/16; 25%) were four LGDs, which we identified after performing long-range PCR using gDNA as template. Fourteen mutations were novel; two had been previously reported: c.748C>T in JPAT6 [Teraoka et al., 1999] and c.2639-384A>G in JPAT11/12 [Soback 2001]. All mutations resulted in the absence of ATM protein (Supp. Fig. S1 and data not shown).

Splicing Mutations

The six splicing mutations identified were analyzed by using Maximum Entropy software (MaxENT) to estimate the strength of the splice sites [Yeo and Burge, 2004] and type of splice defect [Eng et al., 2004]. The mutations found are described below, and diagrams for potential splicing mechanisms are shown in Figure 1.

- (1) c.331+5G>A (IVS6): This mutation changed the MaxENT score of the 5' ss from 9.8 to 3.6. A shorter PCR product compatible with exon 6 skipping was observed at the cDNA level in patient JPAT1 using primers for exons 4 and 7 (Figs. 1 and 2A, lane 3).
- (2) c.748C>T: cDNA from patient JPAT6 showed skipping of exon 9 (Figs. 1 and 2B, lane 5). This allele with substitution c.748C>T predicted an amino acid change from Arg to a stop codon (CGA > TGA). Given that c.748C>T did not affect the scores for consensus splice sites, nor affect an ESE site, we hypothesized that it affected an as yet unknown splicing regulatory element. To test this idea further, we designed an AMO targeting the wild-type sequence at the site of the mutation in order to block the interaction between any regulatory molecule(s) and the wild-type sequence. Wild-type cells treated with increasing concentrations of AMO748C (Fig. 2G) showed skipping of exon 9, supporting idea model that the region around nucleotide 748 most likely contains a regulatory splicing motif.
- (3) c.2639-384A>G (IVS19): The c.2639-384A>G variant in patient JPAT11/12 creates a novel splice acceptor site within IVS19 (Fig. 1), thereby creating a cryptic splice and "pseudo-exon" of 58 bp is created in intron 19 (Fig. 2C, lanes 5 and 6).

Table 1. Mutations of Eight Japanese Families

Ex/Int	Patient	cDNA change	Genomic DNA mutation	Consequence
IVS6	JPAT1 ^a	c.186_331del146 (deletes exon 6)	c.331+5G>A (5' ss 9.81>3.58)	Aberrant splicing (IV)
7	JPAT6 ^a	c.397_398insT	c.397_398insT	Frameshift
9	JPAT6 ^b	c.663_901del239 (deletes exon 9)	c.748C>T (R>X)	Aberrant splicing (III)
10	JPAT8/9 ^a	c.902_1065del164 (deletes exon 10)	c.902-19_1065+869del1052	Large genomic deletion
IVS19	JPAT11/12 ^a	c.2639_2640ins58	c.2639-384A>G (5' ss 0.36>8.54)	Aberrant splicing (II)
IVS19	JPAT3 ^a	c.2639_2838del200 (deletes exon 20)	c.2639-19_2639-7del13 (3' ss 8.8>3.4)	Aberrant splicing (IV)
20	JPAT8/9 ^b	c.2877C>G	c.2877C>G (Y>X)	Nonsense (TAG)
35	JPAT4/5 ^a	c.4910_5005del96 (deletes exon 35)	c.4956G>C>TT (LQ>FX)	Aberrant splicing (III)
38	JPAT1 ^b	c.5415G>A	c.5415G>A (W>X)	Nonsense (TGA)
IVS48	JPAT11/12 ^b	c.6808_7515del708 (deletes ex 49-52)	c.6807+272_7516-275del5350	Large genomic deletion
55	JPAT4/5 ^b	c.7925_7926del2(GA)	c.7925delGA	Frameshift
60	JPAT10 ^a	c.8419_8584del166 (deletes exon 60)	c.8419-643_8507del732	Large genomic deletion
61	JPAT10 ^b	c.8585_8671del87 (deletes exon 61)	c.8585-IG>C (5' ss 10.2>2.0)	Aberrant splicing (IV)
61	JPAT2 ^h	c.8624delA	c.8624delA	Frameshift
IVS63	JPAT3 ^b	c.8851_9697del847	c.8852-2kbdel17kb (CRAT [B] mutation?)	Large genomic deletion

Bolded mutations have not been reported previously.

^aFirst allele.

^bSecond allele.

^hHomozygote.

Nucleotide numbering is based on +1 being the A of the first translation start codon in exon 4 (NCBI reference sequence: NM_000051.3).

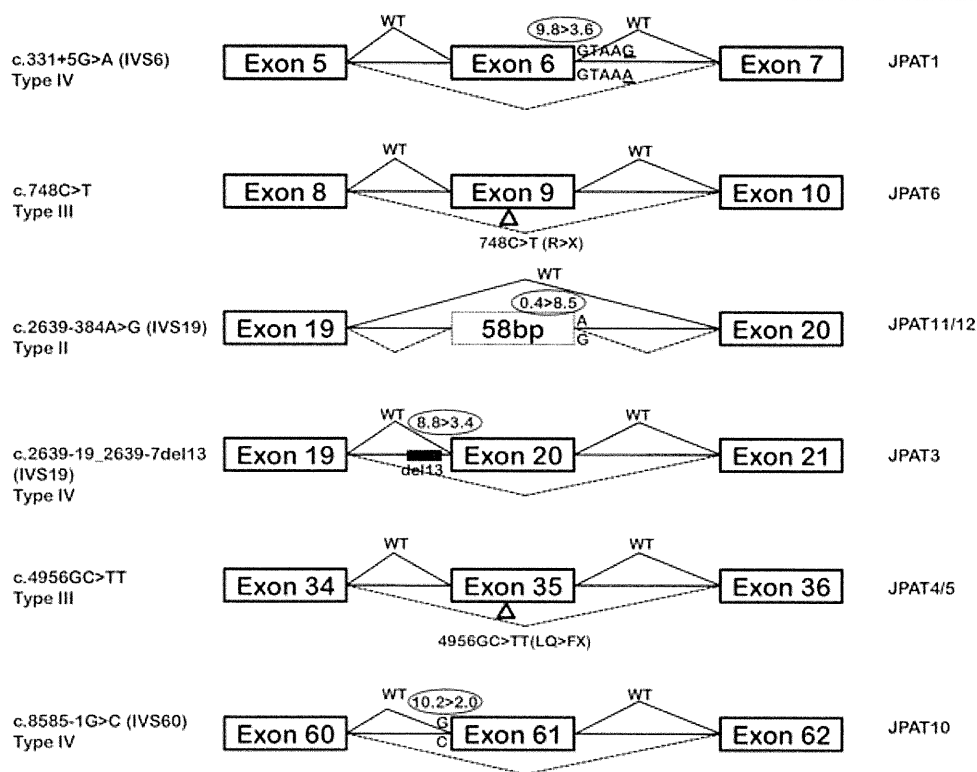


Figure 1. *ATM* splicing mutations. Genomic mutations causing splicing mutations were analyzed for changes in splicing scores calculated by Max ENT. Classification of splicing mutations is reported accordingly to Eng et al. [2004]. See text for additional details.

This results in a frameshift and a predicted secondary premature stop codon.

- (4) c.2639-19_2639-7del13 (IVS19): In Figure 2D (lane 3), the PCR products from JPAT3 cDNA showed a normal and an additional prominent lower band (783 bp and 583 bp, respectively). Sequencing of the 583-bp band revealed skipping of exon 20. gDNA sequencing identified a 13 nt deletion in intron 19 at position c.2639-19_2639-7. The 3' MaxENT score changed from 8.8 to 3.4 (Fig. 1).
- (5) c.4956GC>TT: In family JPAT4/5, we identified a c.4956GC>TT substitution within exon 35 (p.LQ1652_1653FX) that leads to skipping of exon 35 without affecting an ESE or canonical splice sites (Figs. 1 and 2E, lanes 3 and 4). Exposing wild-type LCLs to increasing concentrations of AMO4956GC, targeting the mutation site, revealed skipping of exon 35 (Fig. 2H); these results suggest that nucleotide 4956 is part of a regulatory protein binding site, which when disrupted influences the aberrant splicing observed in JPAT4/5.
- (6) c.8585-1G>C (IVS60): JPAT10 harbors the IVS60-1G>C mutation that changed the MaxENT score of the 3' ss from 10.2 to 2.0, resulting in a skipping of the exon 61 (Fig. 2F, lane 4). Interestingly, the second allele of this patient was a splicing mutation that is predicted to result in exon 60 skipping (Fig. 2F, lane 4). We sequenced gDNA for exons 59–62 but failed to find a mutation that would account for the skipping of exon 60 (however, see additional results on JPAT10 below).

Large Genomic Deletions (LGDs)

- (1) c.902-19_1065+869del1052 (del ex10): Two siblings (JPAT8/9) yielded an abnormal 369-bp fragment when cDNA

was amplified from exon 9 to 11 (Fig. 3A, cDNA gel, lanes 3 and 4). When this band was isolated and sequenced, we found a deletion of exon 10. No mutation was observed in exons 9–11, ruling out a conventional splicing mutation. Using long-range PCR to amplify the genomic region from exon 9 to 11, we obtained a 3.3 kb fragment (Fig. 3A, gDNA gel lanes 3 and 4), whose sequence revealed a 1,052-bp deletion from IVS9-19 to IVS10+869; this deletion included exon 10 (164 bp).

- (2) c.6807+272_7516-275del5350 (del ex49-52): Two siblings (JPAT11/12) showed an abnormal PCR fragment of 1.1 kb when cDNA was amplified from exon 48 to 53 (Fig. 3B, cDNA gel). The sequence of the PCR product showed a deletion of exons 49–52. A long-range PCR performed on gDNA using primers for exons 48 and 53 produced a 1.1 kb band instead of the expected 6.4 kb (Fig. 3B, left). Sequencing of the 1.1 kb band revealed a 5,350-bp genomic deletion that starts in intron 48 and ends in intron 52.
- (3) c.8419-643_8507del732 (del ex 60): In patient JPAT10, we suspected that skipping of exon 60 might reflect an LGD. We amplified the gDNA surrounding exons 59–61 and found a 732-bp genomic deletion extending from IVS59-643 to nucleotide 89 of exon 60 (Fig. 3C).
- (4) c.8851-2kdel17kb (del ex64-65): When mutation screening failed to identify a second pathogenic mutation in JPAT3, we were prompted to search for an LGD mutation with Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). We observed a significant decrease in peak height for the final exons 64 and 65, indicative of a deletion carried in heterozygous state (Fig. 4A). Previous studies have demonstrated two LINE-1 sequences between IVS63 and downstream of exon 65, as well as a 17 kb genomic deletion in the *ATM* gene of A-T patients

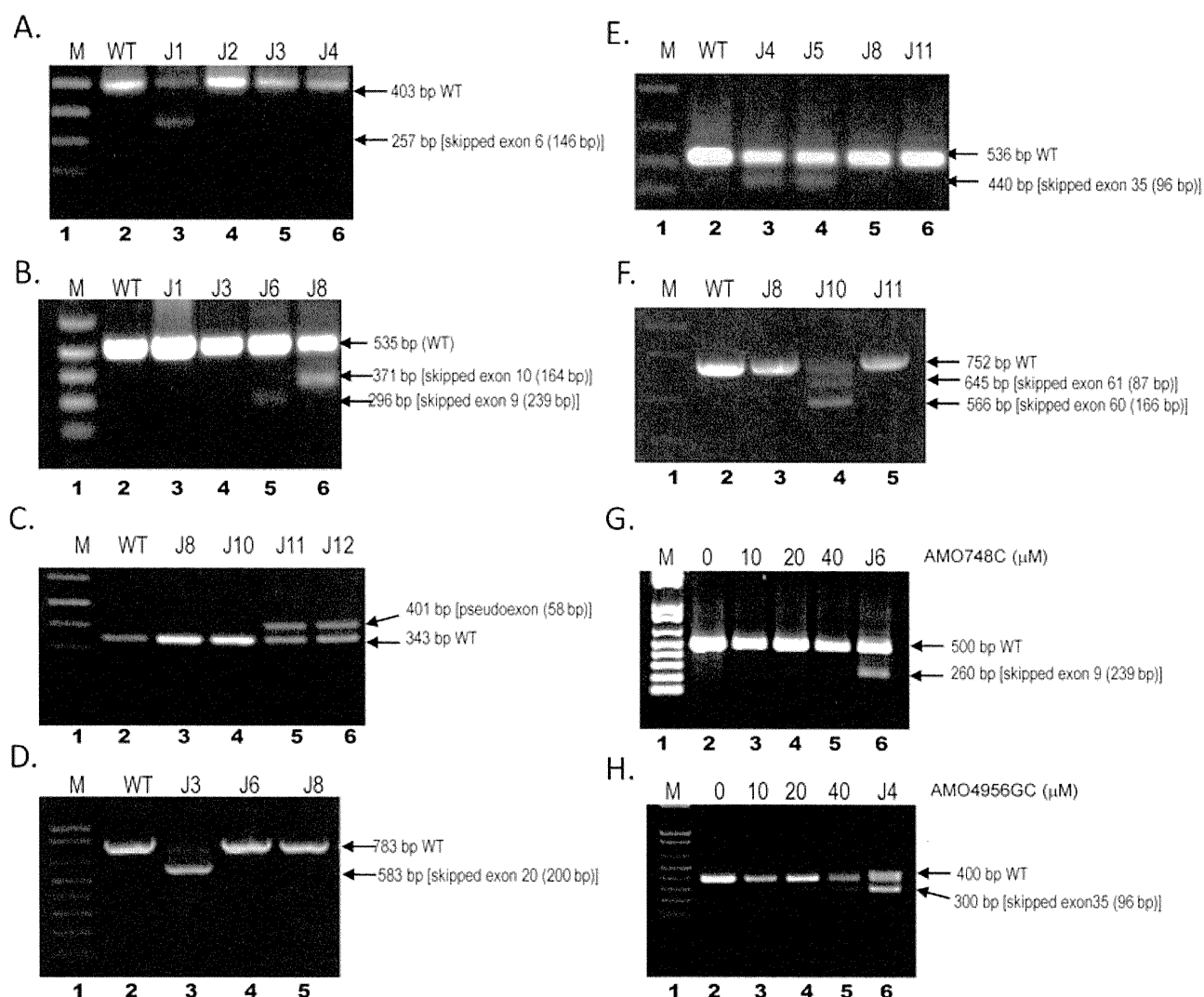


Figure 2. Effect of splicing mutations on cDNA. Agarose gel images of PCR products showed aberrant spliced products. Patient cDNA were used as templates for PCR amplifications in the regions displaying splicing mutations. M (lane 1) is 1 kb plus ladder (Invitrogen), wild-type cDNA was used as control (lane 2). **(A)** Skipped exon 6 in JPAT1 (lane 3). **(B)** Skipped exon 9 in JPAT6 (lane 5) and skipped exon 10 in JPAT8 (lane 6). **(C)** Pseudoexon of JPAT11 and JPAT12 (lanes 5 and 6). **(D)** Skipped exon 20 in JPAT3 (lane 3). **(E)** Skipped exon 35 in JPAT4 and JPAT5 (lanes 3 and 4). **(F)** Skipped exons 60 and 61 in JPAT10 (lane 4). **(G)** AMO-treated wild-type lymphoblastoid cell line (LCL) produced alternative spliced product that skipped exon 9. JPAT6, carrying the c.748C>T mutation, showed a skipped exon 9 product (lane 6). **(H)** AMO 4956GC treated wild-type LCL produced alternative spliced product that skipped exon 35. JPAT4 that has 4956GC>TT mutation showing skipped exon 35 products as a control (lane 6). See text for additional details.

with Costa Rican, Dutch, and Brazilian backgrounds [Broeks et al., 1998; Coutinho et al., 2004; Mitui et al., 2003; Telatar et al., 1998b].

Figure 4B summarizes the locations of primers, LINE-1 sequences, and an LGD for this region.

We used two sets of primers: Primer set #1 (P1Fw and P4Rev) was 23 kb apart, flanking the 17 kb deletion. Because of the nature of our PCR conditions, no PCR product was anticipated from the wild-type allele, while the mutant allele should yield a 6 kb fragment. Primer set #2 (P2Fw and P3Rev) was placed within the 17 kb deletion, which should have produced a 2.4 kb fragment from only the wild-type allele [Telatar et al., 1998b]. Figure 4B (lane 2) shows that wild-type gDNA produced the 2.4 kb fragment, while CRAT [B] (a Costa Rican patient homozygous for a 17 kb deletion) produced the 6 kb fragment (lane 4). A CRAT [B] heterozygote

produced both the 2.4 kb fragment and the 6 kb product from the deletion (Fig. 4B, lane 5). The CRAT [B] band pattern was also observed in the gDNA of JPAT3, suggesting the presence of an LGD between two LINE-1 sequences (Fig. 4B, lane 3). Available breakpoints and surrounding sequences were analyzed using Repeat Masker software to search for flanking repetitive elements [Babushok and Kazazian, 2007; Kazazian and Goodier, 2002; Telatar et al., 1998b] (see Fig. 3). Because the breakpoint was in a highly homologous repeat sequence, the ends could not be accurately determined. The other Japanese patient (JPAT8) who did not have a deletion in this region showed a pattern identical to the wild type (Fig. 4B, lane 6).

The STR haplotypes for JPAT3, CRAT [B], and BRAT3 differed. JPAT3: S1819 [131,133]; NS22 [173,175]; S2179 [137,137]; S1818 [160,168]; CRAT [B]: S1819 [131]; NS22 [171]; S2179 [141]; S1818 [160] [Mitui et al., 2003]; BRAT 3: S1819 [133]; NS22 [155]; S2179

Figure 3

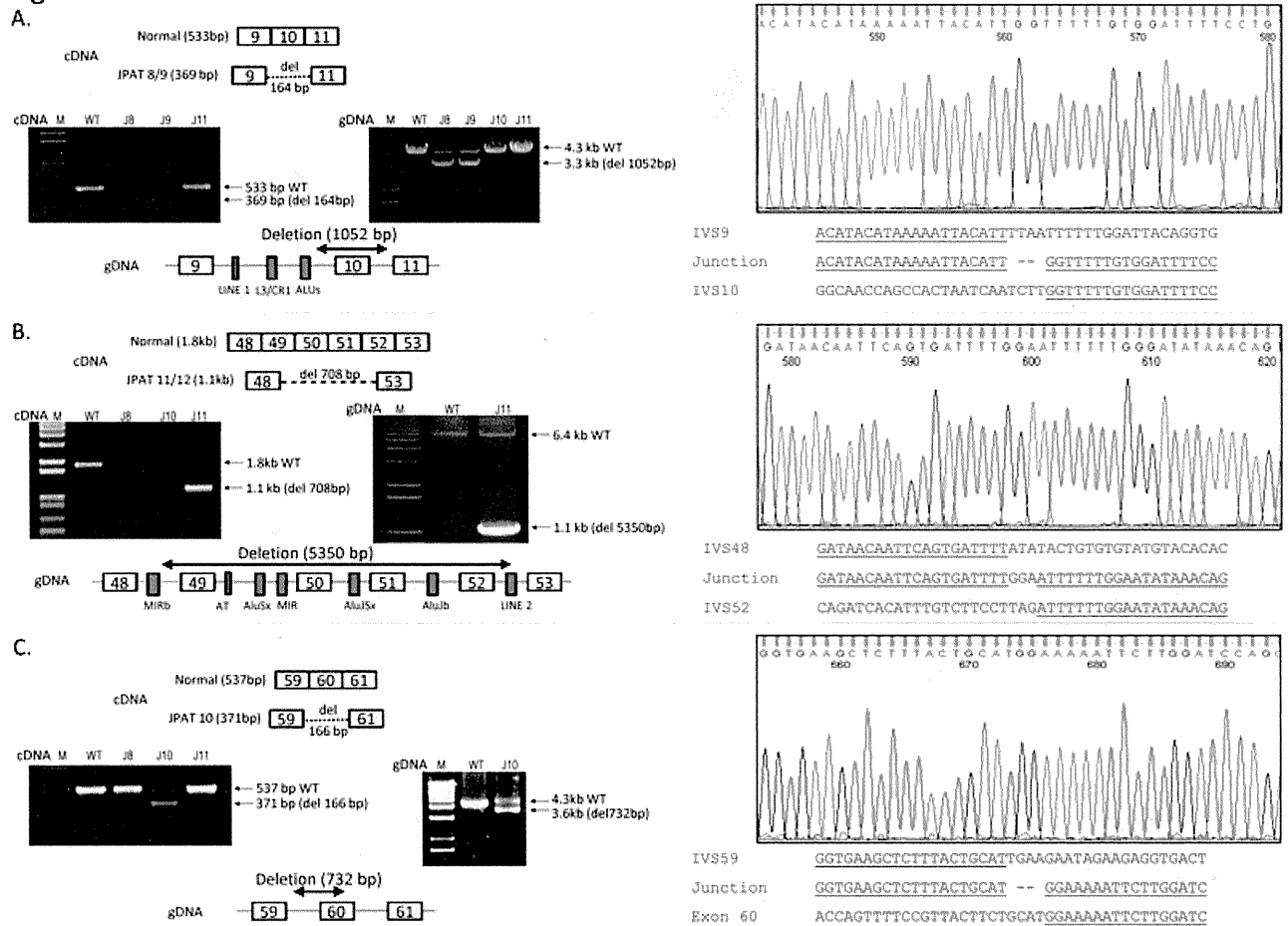


Figure 3. Large genomic deletions (LGDs). **(A)** Schematic representation of cDNA showing deletion of exon 10 and agarose gel image of PCR products (using primers GFw and GREv) (left): Lane 1 is 1 kb plus ladder (Invitrogen), lane 2 is wild-type control, lane 3 (JPAT8) and lane 4 (JPAT9) showing deletion of exon 10, lane 5 is JPAT control. Agarose gel image (right) for genomic DNA (gDNA) PCR products (using primers EX9Fw and EX11Rev) showing deletion of 1 kb in JPAT8/9. Schematic representation of DNA shows LGD, as well as repetitive elements within the region (at bottom). Sequence data with junction sequences are shown on right. **(B)** Schematic representation of cDNA change in JPAT11/12 between exon 48 and exon 53, which are analyzed by PCR (using primers FATFw and FATRev). Agarose gel image (left) for cDNA shows aberrant spliced products of JPAT11 (lane 5). Lane 1 is 1 kb plus ladder, lane 2 is wild-type, lanes 3 and 4 are JPAT control. Agarose gel image (right) for gDNA shows deletion of 5.3 kb (using EX Taq polymerase with LREX48Fw and LREX53Rev primers). Schematic representation of gDNA (at bottom) shows large deletion. Sequence data with junction sequences are shown on right. **(C)** Schematic representation of JPAT10 cDNA shows deletion of exon 60. Agarose gel image (left) shows aberrant spliced products. Agarose gel image (right) for gDNA PCR products (using primers EX59Fw and EX61Rev) show reduced size in JPAT10 (3.6 kb) compared to wild type (4.3 kb) and schematic representation of gDNA showing deletion at c.8269-643del732, which includes the first 89 bp of exon 60. Sequences are shown at right.

[147]; S1818 [146] [Mitui et al., 2003]. These results suggested that the c.8851-2kdel17kb mutations in the three patients were not ancestrally related.

Correction of Type II Pseudoexon Splicing Mutation using an AMO

In family JPAT11/12, we identified a type II splicing mutation [Eng et al., 2004] c.2639-384A>G, which created a cryptic acceptor splice site resulting in the inclusion of 58 bp of intronic sequence (Figs. 2C and 5A). We designed AMO-J11 to target the cryptic 5' splice site (Fig. 5A) [Du et al., 2007; Eng et al., 2004]. The LCL of JPAT11 was treated with AMO-J11 for 4 days followed by RT-PCR analysis. Mutant splicing was almost completely abrogated in an AMO dose-dependent manner and normal transcript was restored (Fig. 5B). Nuclear extracts from treated JPAT11 cells also showed a

full-length ATM protein (data not shown). In order to enhance the delivery and efficiency of the AMO, we also designed a structurally modified AMO referred as "Vivo-AMO" [Morcos et al., 2008; Moulton and Jiang, 2009]. Notably, a significant amount of functional ATM protein was induced by 0.5 μ M Vivo AMO-J11 (Fig. 5C). However, "Vivo-AMO" started to show possible cytotoxicity at 0.8 μ M (Fig. 5C, lane 4).

Correction of Nonsense Mutation in JPAT8 using RTCs

The JPAT8/9 siblings lack ATM protein because they carry an LGD and a nonsense mutation (c.2877C>G, p.Tyr959X). Functional ATM protein is inducible with compounds that readthrough premature termination codons [Du et al., 2009] even when the LCL carries the nonsense mutation in a heterozygous state [Lai et al., 2004]. We treated JPAT8 LCL with the readthrough compound RTC13 for 4

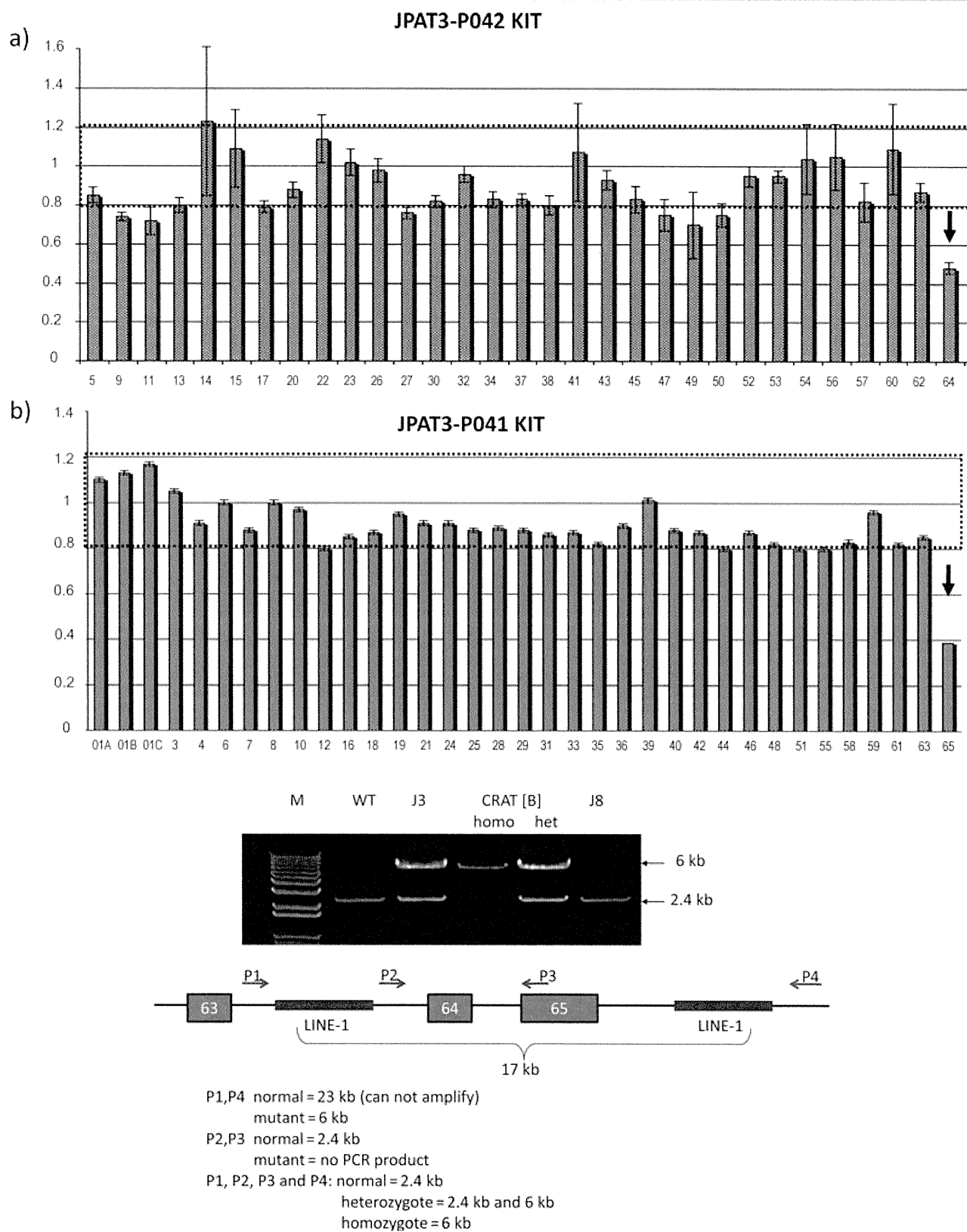


Figure 4. Analysis of LGD in patient JPAT3. **(A)** Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) analysis using MLPA P041 **(A)** and P042 **(B)** kits. For each of the two analyses normalized peak area histograms of JPAT3 are shown. The dotted lines indicate the normal exon dosages between 0.8 and 1.2. The heavy black arrows indicate the exon probes of decreased signal, corresponding to the genomic deletion of exons 64 and 65. **(B)** PCR products depicting a LGD between two LINE-1 sequences. Lane 1 is 1 kb plus ladder, lane 2 is wild-type control, lane 3 is JPAT3, lane 4 is homozygous CRAT [B] patient with a very similar mutation, lane 5 is a heterozygous individual with CRAT [B] mutation, lane 6 is JPAT8. Schematic diagram (below) shows the relative locations for four different primers at the region of the LGD.